

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE

SPÉCIALITÉ Chimie Organique

Par Stéphanie ANTUNES

**AGENTS ANTIMICROBIENS INNOVANTS DE TYPE FOLDAMÈRE POUR LE
CONTRÔLE DE L'INFECTION PAR DES PATHOGÈNES DU RISQUE
BIOLOGIQUE : APPLICATION À *BACILLUS ANTHRACIS***

Sous la direction de : Dr. Gilles GUICHARD
(Co-directeur : Dr. Céline DOUAT)

Soutenue le 16 Décembre 2015

Membres du jury:

Mme AMBLARD, Muriel
Mme DARBRE, Tamis
M. BARTHELEMY, Philippe
M. GOOSSENS, Pierre
Mme DOUAT, Céline
M. GUICHARD, Gilles
M. THOUROT, Julien

Directeur de recherche CNRS, Université de Montpellier
Professeur, Université de Bern (Suisse)
Directeur de recherche INSERM, Université de Bordeaux
Directeur de recherche, Institut Pasteur
Chargé de recherche CNRS, Université de Bordeaux
Directeur de recherche CNRS, Université de Bordeaux
Représentant DGA

Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Co-directeur
Directeur
Invité

AGENTS ANTIMICROBIENS INNOVANTS DE TYPE FOLDAMÈRE POUR LE CONTRÔLE DE L'INFECTION PAR DES PATHOGÈNES DU RISQUE BIOLOGIQUE : APPLICATION À *BACILLUS ANTHRACIS*

Résumé :

Face à l'émergence de pathogènes multi-résistants aux antibiotiques classiques, et au développement des armes biologiques, la découverte de nouveaux agents antimicrobiens reste un enjeu majeur de santé public. Dans ce contexte, la conception d'oligomères peptidomimétiques, capables de mimer le caractère amphiphile et la structure en hélice des peptides antimicrobiens naturels, effecteurs clés de l'immunité innée, offre d'intéressantes perspectives. Il a été établi que des foldamères à base d'urées amphipathiques, structurés en hélice-2,5, possédaient une forte activité bactéricide contre *Bacillus anthracis*, bactérie considérée comme une arme biologique potentielle. En vue d'optimiser l'activité anthracidale et la sélectivité *in vitro* de la première génération de composés, une étude relation structure-activité a été initiée en réalisant une série de modifications (*i.e.* séquence primaire, longueur et squelette de l'oligourée). Des oligomères originaux possédant des motifs isostères de type thiourée et guanidine ont ainsi été préparés en solution puis sur support solide. Des études conformationnelles approfondies soulignèrent que seule l'insertion de lien thiourée à proximité du dipôle négatif était bien tolérée par l'hélice-2,5. Parallèlement, les études *in vivo* ont montré une forte stabilité des oligourées avec une accumulation sélective dans le rein ainsi qu'une protection partielle des souris contre l'infection systémique par *Bacillus anthracis*. Enfin l'étude de l'interaction de ces oligourées avec des membranes lipidiques modèles a confirmé leur capacité à perturber les membranes et a mis en avant des mécanismes d'action différents selon le type de lipides utilisés.

Mots clés :

Agents antimicrobiens ; Oligourées hélicoïdales amphipathiques ; Foldamères ; *Bacillus anthracis*.



CBMN
Institut de Chimie et de Biologie des Membranes et des Nano-objets-UMR5248
IECB-Institut Européen de Chimie et Biologie
2, rue Robert Escarpit – 33607 Pessac, France

INNOVATIVE ANTIMICROBIAL AGENTS BASED ON FOLDAMERS FOR THE CONTROL OF INFECTION BY PATHOGENS OF THE BIOLOGICAL RISK: APPLICATION TO *BACILLUS ANTHRACIS*.

Abstract:

The increasing antibiotic resistance among pathogens and the emergence of biological weapons have highlighted the urgent need of new antimicrobial agents. In this context, the design of peptidomimetics as urea-based foldamers, capable of mimicking the amphiphilic character and conformation of natural antimicrobial peptides, key effector molecules of innate immunity, offers new prospects. It has been previously established that amphipathic oligoureia 2.5-helices have a strong bactericidal activity against *Bacillus anthracis*, bacteria considered as a potential biological warfare agent. Based on these results and with the aim of optimizing the potency and selectivity *in vitro* of the first generation of compounds, a structure-activity relationship study was carried out by performing series of modifications on a lead compound (*i.e.* side-chain replacement, size and backbone modifications). Among them, new series oligomers incorporating isosteric substitutions such as thiourea and guanidine moieties were prepared in solution then on solid support. Interestingly, the conformational studies revealed that only the insertion of thiourea linkage near the negative end of the helix dipole was well-tolerated by the 2.5-helix. Concurrently, *in vivo* studies highlighted a strong stability of the lead oligoureia with a selective accumulation in the kidneys as well as a partial protection of the mice after systemic infection by *Bacillus anthracis*. Finally, biophysical interaction studies of selected oligoureias with model membranes confirmed their capacity to disturb membranes and showed different mechanisms of action depending on the lipid composition.

Keywords:

Antimicrobial agents; amphipathic oligoureia helices; Foldamers; *Bacillus anthracis*.



CBMN
Institut de Chimie et de Biologie des Membranes et des Nano-objets-UMR5248
IECB-Institut Européen de Chimie et Biologie
2, rue Robert Escarpit – 33607 Pessac, France

Remerciements

Ce travail de doctorat a été réalisé au sein l'Institut de Chimie et de Biologie des Membranes et des Nano-objets (CBMN) à l'Institut Européen de Chimie et de Biologie (IECB) et a été financé par une bourse de la Direction Générale des Armées et de la Région Aquitaine. Je souhaiterais donc dans un premier temps remercier les organismes financeurs de mon projet mais aussi le Dr. Erick Dufourc directeur du laboratoire de Chimie et Biologie des Membranes et des Nano-objets (CBMN) ainsi que le Dr. Jean-Jacques Toulmé et le Dr. Ivan Huc, directeur et co-directeur de l'Institut Européen de Chimie et de Biologie (IECB), pour m'avoir accueillie dans leur institut et permis de travailler dans les meilleures conditions.

Je tiens à remercier le Dr. Amblard et le Dr. Darbre qui ont accepté d'évaluer ce travail en qualité de rapporteurs. Je remercie également le Dr. Barthelemy et le Dr. Goossens d'avoir accepté d'examiner mon travail. Je les remercie pour l'attention qu'ils ont portée à la lecture de mon manuscrit.

Je remercie tout particulièrement le Dr. Gilles Guichard et le Dr. Céline Douat pour avoir été d'excellents directeurs de recherche. J'ai eu la chance de participer à un projet de recherche multidisciplinaire passionnant, dans un laboratoire doté des meilleurs équipements, tout en bénéficiant d'un encadrement extrêmement motivant et formateur. Je tiens à vous remercier pour votre dynamisme, votre communicative passion pour la recherche mais aussi pour m'avoir accompagnée et fait progresser tout au long de ces trois années.

Je souhaiterais aussi remercier le Dr. Pierre Goossens de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire à Paris pendant un mois. Cette collaboration a été particulièrement enrichissante autant sur le plan scientifique que personnel. Je voudrais aussi remercier tous les autres collaborateurs de ce travail de thèse: Axelle Grelard, le Dr. Isabel Alves, le Dr. Sabine Castano du CBMN pour leurs expertises, le Dr. Vincent Humblot de m'avoir accueillie dans son laboratoire des surfaces et de m'avoir si agréablement reçue. Enfin je tiens à remercier le Dr. Julien Pytkowicz et tous les autres chercheurs des différentes équipes de recherche du CBMN ou de différents laboratoires avec qui j'ai eu l'opportunité de travailler au cours de ces trois années et sans qui je n'aurais pu réaliser ce travail.

Je remercie aussi toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce projet. Merci à Estelle Morvan pour tes conseils et ton aide précieuse en RMN. Merci à Loic Klinger pour toutes les masses et ta disponibilité. Merci à Brice Kauffmann et Stéphane Massip d'avoir résolu les structures cristallographiques.

Enfin, un grand merci à tous ceux qui ont rendu ces trois années agréables à vivre au quotidien avec lesquels j'ai pris grand plaisir à travailler et à partager tous ces moments. Je pense tout spécialement à Arnaud (le meilleur de tous) et à Christophe et Diane (sans qui cette troisième année aurait été beaucoup moins agréable). Je voudrais aussi remercier Léonie, Maialen, Caterina mais aussi Christel, Morgane, Gavin, Johanne, Laura, Yella-Reddy, Neil, Karolina, Juliette et Claire. Merci à la team Garanger : Elisabeth (merci pour tous tes précieux conseils et notre fameux road trip au Mont Saint Michel), Charlotte, Laura et Rosine. Merci aux membres de l'équipe Innis, Huc et Quideau : Maelle (merci pour ton soutien et tous nos bons moments), Caro et Britta (Beach time !), les Antoine, les Simon et à la fine équipe du CBMN : Marie-Lyse, Sarah, Maud, Antoine et Alexis.

Enfin je tiens à remercier indéfiniment en premier lieu ma famille (merci Sabine pour ton aide précieuse) puis mes amis pour leur présence de loin ou de près tout au long de ces trois années, en particulier Benjamin, Jonathan, Clément, Amalia, Marie, Mehdi, Ophélie, Imane, Damien. Pierrick, merci de ton soutien permanent.

Abréviations

δ	déplacement chimique (ppm)
%	pourcent
°	degré
2D	deux dimensions
Å	angström
Abs	absorbance
ACHC	acide 2-aminocyclohexane carboxylique
ACPC	acide (<i>R,R</i>)-trans-2-aminocyclopentanecarboxylique
AcCN	acétonitrile
ADN	acide désoxyribonucléique
AMP	peptide naturel antimicrobien
Aib	acide α -aminoisobutyrique
AP	(<i>R</i>)- β -amino-(<i>D</i>)-proline
APC	acide (<i>3S,4R</i>)-trans-3-aminopyrrolidine-4-carboxylique
APN	acide peptide nucléique
ASU	unité cristalline asymétrique
ATR	spectroscopie à réflexion atténuée
ATR-FTIR	infrarouge à transformée de Fourier en réflexion totale atténuée
BHI	bouillon cœur-cerveau
Bn	benzyle
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyle
BOP	hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yloxy-tris(diméthylamino)-phosphonium
Bu	butyle
Bn	benzyle
Bt	benzotriazole
C	celsius
Cbz = Z	benzyloxycarbonyle
CCM	chromatographie sur couche mince
CD	dichroïsme circulaire
CFU	unité de formation de colonie
CHx	cyclohexyle
CMI	concentration minimale d'inhibition
COSY	correlated Spectroscopy
CPM	count per minute
Cu	cuivre
DCM	dichlorométhane
DIAD	diisopropyl azodicarboxylate
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DLS	diffusion dynamique de la lumière
DMF	diméthylformamide
DMPC	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DMPG	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-1'- <i>rac</i> -glycérol
DMSO	diméthylsulfoxyde
DOPG	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-1'- <i>rac</i> -glycérol
DOTA	acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique
DSC	carbonate de disuccinimide
EF	facteur œdémateux de <i>Bacillus anthracis</i>
EggPC	extrait du jaune d'œuf naturel de phosphatidylcholine
EggPG	extrait du jaune d'œuf naturel de phosphatidylglycérol
ETGA	acide éthylène glycol tétraacétique
EMPR	ellipticité molaire par résidu
eq.	équivalent

ESI-MS	analyse de masse par ionisation par electrospray
EtOAc	acétate d'éthyle
Et₃N	triéthylamine
Fmoc	9H-fluoren-9-ylméthoxy-carbonyl
FT-IR	infrarouge à transformée de Fourier
g	gramme
h	heure
min	minute
H₂O	eau
HOBT	1-hydroxybenzotriazole
Hz	hertz
IBCF	chloroformiate d'isobutyle
iBu	isobutyle
i.n.	par voie intranasale
i.p.	par voie intrapéritonéale
iPr	isopropyle
i.v.	par voie intraveineuse
K	kelvin
kcal	kilocalorie
kDa	kilodalton
kg	kilogramme
λ	longueur d'onde
LF	facteur létal de <i>Bacillus anthracis</i>
LPS	lipo-polysaccharides de glycolipides
M	mol.litre ⁻¹
Me	méthyle
mg	milligramme
MHz	mégahertz
min	minute
mL	millilitre
mM	millimolaire
mmol	millimole
mol	mole
ms	milliseconde
MBHA	methoxybenzhydrilamine
MeOH	méthanol
MW	masse molaire
NHS	N-hydroxysuccinimide
nm	nanomètre
NMM	N-méthylmorpholine
NOE	nuclear overhauser effect
PBS	tampon phosphaté salin
PA	antigène protecteur de <i>Bacillus anthracis</i>
PC	phosphatidylcholine
PD	pharmacodynamie
PE	phosphatidyléthanolamine
PET	tomographie par émission de positons
PG	phosphatidylglycérol
pH	potentiel hydrogène
ppm	partie par million
POPE	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphoethanolamine
PK	pharmacocinétique
PS	polystyrène
quant.	quantitatif
res	résidu

RMN	résonnance magnétique nucléaire
RMSD	root mean square deviation
RNase	ribonucléase
ROESY	rotating-frame nuclear overhauser effect spectroscopy
RP-HPLC	chromatographie liquide haute performance à phase inverse
s	seconde
S^{CD}	paramètre d'ordre
SC(Bt)₂	bis(benzotriazolyl)methanethione
TA	température ambiante
term	terminal
TFA	acide trifluoroacétique
TFE	2,2,2-trifluoroéthanol
THF	tétrahydrofurane
TOCSY	total correlation spectroscopy
TIS	triisopropylsilane
t_R	temps de rétention
Tris	trishydroxyméthylaminométhane
Trt	triphénylméthyle
W	watt
Δδ	écart de déplacement chimique (ppm)
Δν_Q	éclatement quadripolaire
μ	micro
μm	micromètre

Nomenclature utilisée

Les acides α -aminés seront indifféremment désignés sous leur nom complet ou sous leur code à trois lettres. Par exemple, l'alanine sera nommée Ala. Les acides β -aminés seront eux précédés du signe β . (β^3 -Homoalanine : β^3 -HAla). Les acides γ -aminés seront eux précédés du signe γ . (γ -valine : γ Val).

Les résidus de type urée seront désignés par le code de trois lettres de l'acide aminé dont ils sont issus suivi en exposant de la lettre « u ». Ainsi le résidu dérivé de l'alanine sera nommé Ala^u. Les résidus de type thiourée seront désignés par le code de trois lettres de l'acide aminé dont ils sont issus suivi en exposant de la lettre « s ». Le résidu dérivé de l'alanine sera nommé Ala^s. Enfin les résidus de type guanidine seront désignés par le code de trois lettres de l'acide aminé dont ils sont issus suivi en exposant des lettres « gua ». Le résidu dérivé de l'alanine sera nommé Ala^{gua}.

De plus, les atomes de carbone de la chaîne principale seront désignés par des lettres grecques α , β , γ , δ , et ϵ comme présenté sur la Figure 1.

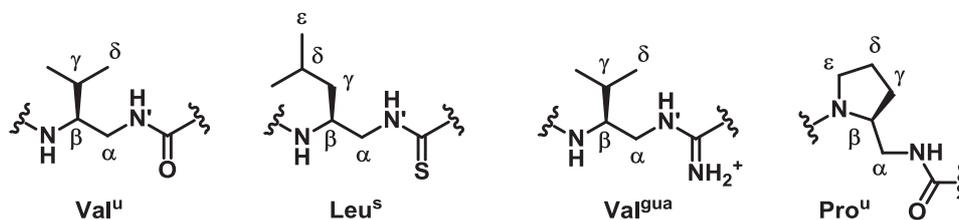


Figure 1 : exemple de notation des résidus de type urée.

Afin de désigner les séquences des oligourées synthétisées dans ce manuscrit, la mise en place d'une notation a été nécessaire. Ainsi, un trimère protégée par un groupement *tert*-butoxy carbonyle et comportant trois résidus dérivés de la valine, de l'alanine et de la leucine sera notée Boc-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe (Figure 2a). De manière similaire, le trimère Val^s-Lys^u-Phe^u-NH₂ représente le trimère comportant trois résidus dérivés de la « valine thiourée », de la lysine et de la phénylalanine (Figure 2b). Par analogie avec la synthèse peptidique, les résidus des oligourées seront numérotés de l'extrémité « C-terminale » à l'extrémité « N-terminale ». Dans le cas présent l'extrémité couplée à la méthylamine pour le trimère a) et l'extrémité amide libre pour le trimère b) sont les extrémités « C-terminale » alors que l'extrémité « N-terminale » est ici soit l'extrémité protégée par le groupement Boc pour le trimère a), soit une amine libre pour le trimère b).

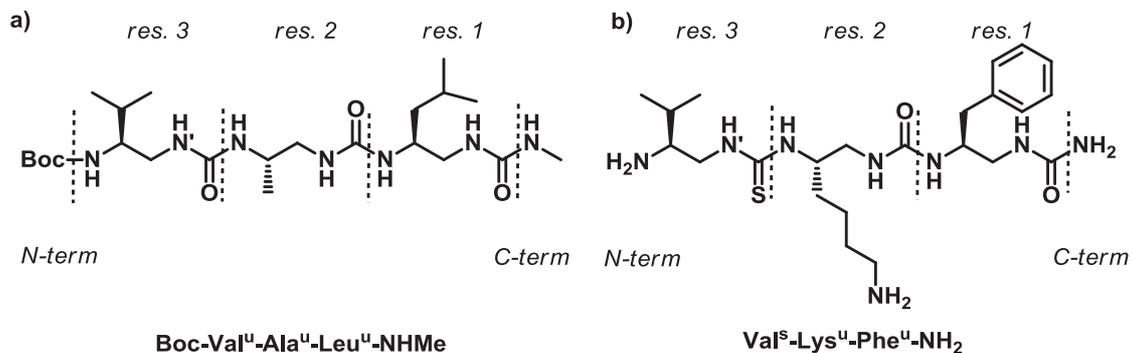


Figure 2 : Notation des oligourées et numérotation des résidus.

Pour désigner un résidu spécifiquement dans une séquence, le code à trois lettres sera suivi en indice du numéro de position du résidu dans la séquence. Il pourra aussi être suivi en exposant de la lettre désignant la nature du lien (« u » pour urée, « s » pour thiourée et « gua » pour guanidine). Ainsi le résidu dérivé de l'alanine en deuxième position du trimère a) sera identifié par le code Ala₂^u et le résidu dérivé de la valine en troisième position du trimère b) sera identifié par le code Val₃^s.

Un produit X immobilisé sur résine sera annoté X-R.

Les angles dièdres (ϕ , θ_1 , θ_2) seront définis par $\phi = C(=O)-NH-\beta C-\alpha C$, $\theta_1 = NH-\beta C-\alpha C-N'H$ et $\theta_2 = \beta C-\alpha C-N'H-C(=O)$ comme décrit sur la Figure 3.

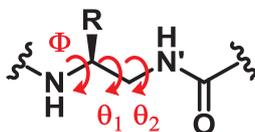


Figure 3 : Angles dièdres des résidus dans une oligourée.

La plupart des composés rapportés font l'objet d'une numérotation systématique, suivant leur ordre d'apparition dans ce manuscrit, réinitialisée au début de chaque nouveau chapitre. Dans le chapitre I, les composés seront désignés avec la nomenclature suivante I.X avec X le numéro du composé suivant son ordre d'apparition. Dans le chapitre II, III et IV, les molécules sont désignées suivant des nomenclatures particulières. Ainsi les monomères seront désignés par la lettre **M** suivie de leur ordre d'apparition dans le manuscrit. Les oligourées synthétisées sont désignées par les lettres **OL** suivies de leur ordre d'apparition dans le manuscrit.

Sommaire

CHAPITRE 1 : Conception de nouveaux mimes synthétiques de peptides antimicrobiens et leurs applications *in vivo* 1

1. <u>Structures des mimes synthétiques antibactériens</u>	5
a) Les structures hélicoïdales	5
i) Les β -peptides	6
ii) Les peptides mixtes α/β	11
iii) Les peptoïdes	15
b) Les structures étendues	22
i) Les foldamères arylamides	22
ii) Les oligomères de phénylène-éthynylène	24
c) Oligomères sans conformation préférentielle encore démontrée	25
i) Les oligoacyllysines (OAKs)	25
ii) Les AA-peptides	28
d) Les structures globulaires : les dendrimères polypeptidiques	31
2. <u>Un nombre d'applications <i>in vivo</i> limité</u>	35
a) Evaluation de la pharmacocinétique et de la biodistribution des mimes synthétiques de peptides antimicrobiens	38
i) Les β -peptides	38
ii) Les peptoïdes	39
b) Efficacité <i>in vivo</i> des mimes synthétiques des peptides antimicrobiens	41
i) Les peptoïdes	41
ii) Les arylamides	41
iii) Les oligoacyllysines	44
3. <u>Les oligourées antibactériennes</u>	45
a) Présentation et caractérisation structurale	45
b) Synthèses des oligourées	48
c) Développement de séquences oligourées à visée antibactérienne	50
4. <u>Objectifs de la thèse</u>	54
Bibliographie	58

CHAPITRE 2 : Conception de nouveaux foldamères hybrides à base d'urée par insertion de motifs isostères 64

1. <u>Introduction du lien thiourée et ses conséquences structurales</u>	65
a) Généralités sur les thiourées	65
b) Synthèse en solution	66
i) Synthèse des monomères activés	66
ii) Synthèse des oligomères	68
c) Etude conformationnelle en solution	71
i) Par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)	71
ii) Par dichroïsme circulaire	73
(1) Cas des composés hybrides	73
(2) Cas du composé oligothiourée OL6	74
iii) Par RMN	74
(1) Cas des composés hydrides	74
(2) Cas du composé oligothiourée OL6	80
d) Etude structurale par diffraction des rayons X	81
e) Le cas de la sélénourée	84

2. <u>Introduction du lien thiourée sur support solide</u>	87
a) Synthèse par stratégie Boc	87
b) Synthèse sur support solide par stratégie azoture	88
i) Synthèse des monomères activés	89
ii) Difficultés rencontrées	89
iii) Utilisation d'une protection temporaire de type Fmoc	95
(1) Synthèse des monomères activés	95
(2) Optimisation des conditions	97
(3) Synthèse d'OL8 par les méthodes optimisées	98
3. <u>Introduction de motif guanidine sur support solide</u>	99
a) Généralités sur les guanidines	99
b) Introduction du motif guanidine en solution	103
c) Introduction du motif guanidine sur support solide	104
i) Mise au point de la synthèse	104
ii) Etude conformationnelle	107
Bibliographie	109

113

CHAPITRE 3 : Relation structure-activité sur le modèle de *Bacillus anthracis*

1. <u>L'infection par <i>Bacillus anthracis</i></u>	115
a) La bactérie	115
b) L'infection	116
c) Les préventions et traitements actuels	119
2. <u>Relation structure fonction : approche <i>In vitro</i></u>	123
a) Les mesures d'activité bactéricide et de toxicité	123
b) Activité anthracidale <i>in vitro</i> du composé « tête de série » OL22	124
c) Modification de la chaîne latérale	127
i) Evaluation de la face cationique de type imidazole	127
ii) Modification de la face hydrophobe	131
(1) Introduction du groupement de type tyrosine	131
(2) Introduction du motif de type trifluorométhylène	135
iii) Variation de l'hélicité : introduction du groupement pyrrolidine	135
d) Modification du squelette	140
i) Introduction de liens amides	140
ii) Introduction du lien isostère thiourée	140
iii) Introduction du lien isostère guanidine	143
3. <u>Relation structure-activité : approche <i>In vivo</i></u>	144
a) Etude pharmacocinétique et de la distribution tissulaire de OL22	144
b) Efficacité du traitement de l'infection par OL22	147
c) Modification de la longueur et du caractère amphiphile	148
d) Développement de surfaces antimicrobiennes	151
Bibliographie	154

CHAPITRE 4 : Etude du mécanisme d'interaction des oligourées <i>N,N'</i>-liées avec des membranes lipidiques modèles	159
1. <u>Les membranes biologiques</u>	161
a) La membrane cellulaire des mammifères	161
b) La membrane bactérienne	161
c) La surface de <i>B. anthracis</i>	163
d) Mimer les membranes biologiques	163
2. <u>Les mécanismes d'interaction des peptides antimicrobiens naturels</u>	165
a) Les premières phases : l'attraction et l'attachement	166
b) Les différents mécanismes de pénétration des AMPs	167
3. <u>Les mécanismes d'interaction des mimes synthétiques antibactériens</u>	169
4. <u>Interaction des oligourées avec des membranes modèles</u>	170
a) Expériences de fuite de calcéïne	170
i) Méthode	170
ii) Résultats	172
b) Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (ATR-FTIR)	174
i) Méthode	174
ii) Résultats	176
c) RMN solide du phosphore ³¹ P et du deutérium ² H	181
i) Méthode	181
ii) Résultats	183
(1) Interaction de OL22 et OL33 avec des MLVs de DMPC	183
(2) Interaction de OL22 et OL33 avec des MLVs de DMPC/DMPG	186
(3) Interaction de OL22 et OL33 avec des MLVs de POPE/DMPG	187
4. <u>Discussion et perspectives</u>	188
Bibliographie	192
Conclusions et perspectives	195
Partie expérimentale	201
1. Méthodes générales	202
2. Partie expérimentale du chapitre 2	209
3. Partie expérimentale du chapitre 3	233
4. Partie expérimentale du chapitre 4	258
Bibliographie	263

CHAPITRE 1

Conception de nouveaux mimes
synthétiques de peptides antimicrobiens
et leurs applications *in vivo*

Face à l'émergence de nouveaux agents pathogènes et de micro-organismes multi-résistants [1,2], la recherche de nouveaux antibiotiques innovants est devenue un défi majeur de santé publique. Depuis la découverte des magainines, peptides antimicrobiens, isolés de la peau de grenouilles africaines *Xenopus laevis* par Zasloff *et al.* [3], les peptides naturels antimicrobiens (AMPs) n'ont cessé de susciter un intérêt croissant et se profilent aujourd'hui comme des candidats sérieux pour de potentielles applications antibiotiques [4,5]. Éléments clés de la défense immunitaire innée des organismes multicellulaires animaux et végétaux, les AMPs assurent la défense de ces organismes contre la majorité des agents pathogènes [6-9].

Les AMPs représentent aujourd'hui un vaste ensemble de peptides (plus de 2100 séquences recensées sur la base de donnée : *Antimicrobial Peptide Database* <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Ils sont constitués en moyenne de 20 à 50 acides aminés et recouvrent plusieurs classes structurelles (Figure I.1). Cette grande diversité structurale est à l'origine de trois grandes familles de peptides antimicrobiens : (i) les peptides linéaires formant des hélices (tels que les mélittines du venin des abeilles [10], les cécropines de l'intestin porcine [11], ou encore les magainines de la peau des grenouilles [3,9] et les cathélicidines des mammifères [12,13]) ; (ii) les peptides riches en cystéines avec un ou plusieurs ponts disulfures (tels que les défensines [14,15] et la protégrine [16]) ; et enfin (iii) une famille plus hétérogène de peptides dont la composition est dominée par un type d'acide aminé (tels que les histidines dans les histatines [17] trouvés dans la salive humaine ou les tryptophanes dans les indolicidines [18,19] de bovins).

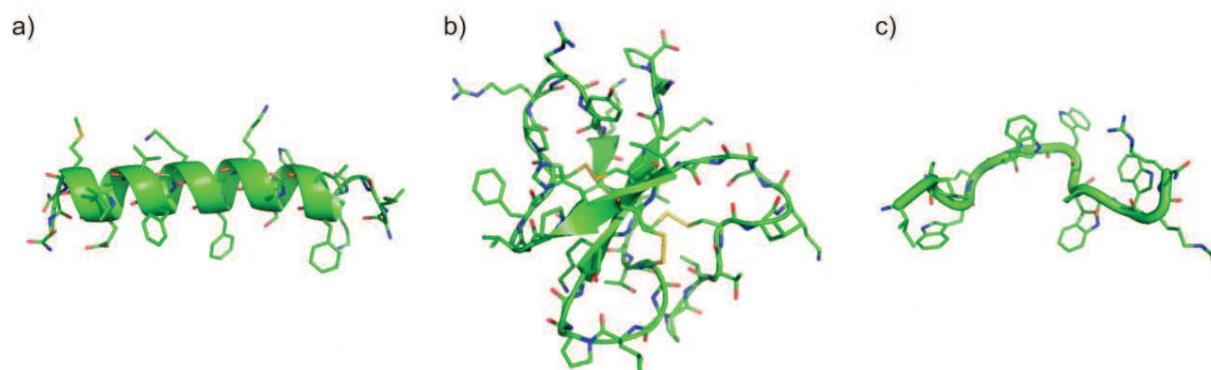


Figure I.1 : Représentation de différentes classes de peptides antimicrobiens : a) structure du peptide magainine-2 (code PDB : 2MAG) [20] ; b) Structure du peptide défensine-2, les ponts disulfures sont représentés en jaune (code PDB : 1E4Q) [15] ; c) structure du peptide indolicidine, riche en tryptophanes (code PDB : 1G89) [19]. Les structures ont été réalisées avec le logiciel Pymol.

En dépit de cette pluralité, ils possèdent en grande majorité un caractère cationique et adoptent à la surface de l'hôte une topologie amphiphile dans laquelle les chaînes hydrophiles et les chaînes hydrophobes s'agrègent en des régions distinctes [21]. Cette

amphiphilicité est un paramètre essentiel du mécanisme d'action des AMPs. En effet, les membranes bactériennes sont composées d'environ 30 % de phospholipides négativement chargés (phosphatidylglycérol (PG)) et de 70 % de lipides zwitterioniques (de type phosphatidylcholine (PC) ou phosphatidyléthanolamine (PE)). Tandis que la surface d'une membrane cellulaire eucaryote est composée principalement de phospholipides zwitterioniques (de PC, de phospholipide sphingomyéline (SM) et de cholestérol). C'est par cette différence fondamentale de compositions lipidiques que les AMPs présentent une sélectivité pour les membranes bactériennes. La phase initiale de leur mécanisme d'action se déroule *via* des interactions électrostatiques entre les AMPs, positivement chargés, et les lipides des membranes bactériennes négativement chargés. Ensuite, l'effet hydrophobe permet aux peptides de pénétrer et de perméabiliser la membrane de la bactérie entraînant sa mort. Plus récemment, il est aussi apparu que certains peptides n'agissent pas ou pas uniquement en perméabilisant les membranes des micro-organismes mais *via* des interactions spécifiques avec des récepteurs membranaires ou cytoplasmiques [22,23]. C'est le cas notamment des peptides antimicrobiens tels que les peptides oncocines et Bac7, riches en proline, pour lesquels le ribosome a été identifié comme la cible à l'origine de leur mécanisme d'action [24-26].

Il est aussi apparu que les peptides antimicrobiens détiennent un rôle de régulateur du système immunitaire inné et adaptatif, impactant alors les infections et les inflammations. Ce rôle leur a conféré le terme de « peptide de défense de l'hôte » [5,27,28]. Dernièrement des maladies complexes telles que la maladie de Crohn, la parodontite, l'athérosclérose, mais aussi certains cancers mettent en jeu des mécanismes jusqu'à présents mal connus faisant intervenir les AMPs [29].

De par leur mécanisme d'action, les peptides antimicrobiens présentent en théorie un faible potentiel d'induction de résistance contrairement aux antibiotiques conventionnels qui agissent sur une cible précise du métabolisme bactérien, et par conséquent possèdent un fort intérêt en terme de développement thérapeutique [5].

Le « screening » des peptides naturels antimicrobiens a permis d'obtenir les peptides cycliques cationiques polymyxin B et gramicidin S, produits par les bactéries *Bacillus polymyxa* et *Bacillus brevis* qui font partie de la première génération d'antibiotiques commercialisés depuis de nombreuses années. Une dizaine de peptides synthétiques, dérivés de séquences antimicrobiennes naturelles, sont aujourd'hui en développement clinique [30,31]. En outre, l'Omiganan [32,33], un dérivé de l'indolicidine a réussi à franchir la phase clinique III, pour la prévention des infections des cathéters. Le Pexiganan [34],

analogue synthétique de 22 acides aminés du peptide magainine, a pu aller jusqu'en phase clinique III contre les infections du pied diabétique mais a depuis été stoppé car son efficacité n'était pas supérieure au traitement conventionnel. Il en a été de même pour l'Isegaran [35], analogue de la protégrine contre les inflammations de la muqueuse orale des patients en chimiothérapie.

Malgré leurs forts potentiels, les AMPs présentent plusieurs inconvénients qui constituent un frein non négligeable à la valorisation de ce type d'antibiotique, y compris (i) des activités hémolytiques importantes [36], (ii) une faible stabilité aux protéases présentes dans le sérum humain (et donc une rapide dégradation dans le corps limitant leur administration à une voie topicale) [28] et enfin (iii) une possible désactivation en milieu salin [37]. Alors, grâce à un vaste éventail d'études de relation structure-activité permettant une meilleure compréhension de leurs mécanismes d'action et une meilleure appréciation des principaux facteurs influençant leurs activités [38,39], plusieurs stratégies se sont développées afin de pallier ces différentes limitations. L'utilisation de bibliothèques combinatoires [30,40-42], la modification chimique d'AMPs déjà existants [43-45] et la conception de mimes synthétiques [46-51] sont les principales voies explorées.

La modification chimique d'AMPs déjà existants met en jeu l'utilisation d'acides aminés de configuration (D) [43], et/ou de résidus fluorés [44], la méthylation de quelques acides aminés, la modification des régions terminales (amidation, acétylation) ou encore la cyclisation des peptides [43,45]. Ces modifications permettent l'amélioration des activités antimicrobiennes et de la résistance protéolytique sans modifier leurs squelettes peptidiques. Toutefois, elles peuvent aussi directement affecter la structure secondaire finale du composé dérivé et donc son activité. Compte tenu de cette difficulté à contrôler la relation entre la structure primaire et la structure secondaire, la synthèse *de novo* de mimes synthétiques de peptide naturel antimicrobien s'est donc amplifiée au cours des vingt dernières années. Cette stratégie est basée sur la reproduction des caractéristiques biophysiques essentiels des AMPs dans un oligomère de séquence non naturelle. Cette stratégie serait probablement suffisante pour conférer à cet oligomère synthétique une activité antibactérienne, tout en évitant les limitations des AMPs. Cette recherche a largement bénéficié de l'intérêt croissant de la conception de nouvelles architectures moléculaires non naturelles présentant des conformations contrôlables et bien définies inspirées par les biopolymères, que l'on appelle aujourd'hui les foldamères [52]. L'avènement de la chimie des foldamères a, en effet, apporté de nombreuses perspectives

dans le domaine de leurs applications biologiques et thérapeutiques. Ainsi, afin de reproduire la structure et la fonction des peptides tout en augmentant leur potentiel thérapeutique, la conception de foldamères a été envisagée parmi lesquels on retrouve les β -peptides, les peptoïdes et les arylamides [49,53,54]. De nombreux mimes polymériques [51,55] ont aussi été rapportés comme les oligoacyllysines [56,57], les polymères de Nylon-3 [58], de phénylène éthynylène, de polyméthacrylate [59] ou encore de polynorbornène [60,61]. Bien que ces mimes synthétiques répondent à la question de biostabilité (protéolyse) et que certains possèdent des propriétés antimicrobiennes *in vitro* intéressantes, la plupart présentent une toxicité accrue avec des coûts de production qui restent élevés. Leurs propriétés *in vivo* restent aussi bien souvent inconnues, probablement à cause des problèmes éthiques des expériences sur les animaux et de la difficulté du choix du modèle d'infection.

Dans ce chapitre, nous dresserons, un état de l'art non exhaustif, des différentes avancées réalisées dans le développement des mimes synthétiques antimicrobiens à partir de squelettes foldamères, ainsi que des rares études *in vivo* qui ont été réalisées sur ces architectures moléculaires.

1. Structures des mimes synthétiques antibactériens

a) Les structures hélicoïdales

Bien que ne présentant pas ou peu d'homologie de structure primaire, un grand nombre de peptides antimicrobiens de vertébrés et d'invertébrés montrent une forte tendance à se structurer en hélice- α amphiphile. Une des faces de l'hélice renferme la majorité des acides aminés polaires ou chargés positivement alors que les acides aminés hydrophobes sont situés sur la face opposée. Cette amphipathicité de structure semble conférer à ces peptides la propriété commune d'interagir avec les bicouches lipidiques, d'en perturber l'organisation et d'induire ainsi la lyse cellulaire. La structuration en hélice a été largement exploitée par de nombreux groupes de recherche qui ont cherché à imiter cette conformation hélicoïdale en particulier en développant des architectures foldamères. Il est en effet possible de tirer profit de la répartition spatiale des chaînes latérales offerte par ce type de structuration pour concevoir des séquences amphipathiques à fort potentiel antimicrobien. Dans ce chapitre, nous allons développer les différentes stratégies utilisant la chimie des foldamères qui ont été développées au cours de ces dernières années pour élaborer de nouveaux agents antimicrobiens.

i) Les β -peptides

Les oligomères d'acides β -aminés, appelés plus communément β -peptides, sont une classe de polyamides, adoptant une variété de conformations hélicoïdales largement développées et étudiées à partir des années 1990 par les groupes de Seebach, Gellman et Degrado [62,63].

Les β -peptides possèdent un méthylène supplémentaire dans le squelette de chaque acide aminé, comparé à celui des α -peptides naturels (Figure I.2a et 2b). La substitution de la chaîne latérale peut ainsi soit être portée sur le carbone α soit sur le carbone β . Les β -peptides correspondants sont nommés β^2 - et β^3 - peptides. La présence de ce méthylène confère une nouvelle possibilité de rotation de liaison $C^\alpha-C^\beta$ et devrait apporter intuitivement une plus grande flexibilité au squelette. Néanmoins, les travaux initiés par les groupes de Gellman et de Seebach dès le milieu des années 1990s ont montré qu'il n'était rien et que l'oligomérisation de résidus d'acides β -aminés conduisait à des oligoamides aux propriétés de repliement inédites et variées (Figure I.2c). Cinq types de structuration hélicoïdale, dépendant fortement de la substitution et de la configuration des acides aminés, ont été reportés dans la littérature au cours de ces deux dernières décennies [64-68].

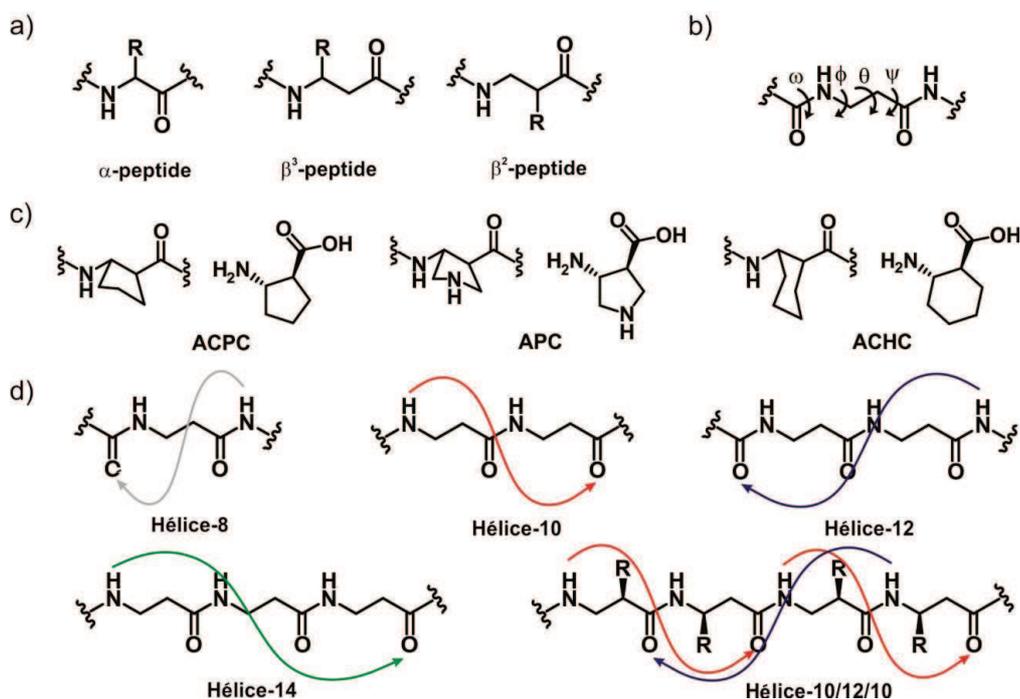


Figure I.2 : a) Nomenclature des β -peptides proposés par Seebach ; b) Angles dièdres des résidus β ; c) Résidus ACPC, APC, ACHC développés par l'équipe de Gellman *et al.* ; d) Représentation schématique des différentes hélices pouvant se former à partir de séquences de résidus β .

Parmi les structures secondaires obtenues, l'hélice 3_{14} fait notamment partie des hélices les plus caractérisées. Constituée de trois résidus par tour, elle résulte des liaisons hydrogènes $C=O_i \dots HN_{i-3}$ formant un pseudo-cycle à 14 atomes. Elle peut être soit droite (P) soit gauche

(M) suivant le mode de substitution des résidus β (Figure 1.2d). Par comparaison, les α -peptides naturels forment une hélice droite avec 3,6 résidus par tour et un pseudo-cycle à 13 atomes. Cette conformation en hélice 3_{14} a notamment été identifiée par le groupe de Gellman au cours de l'étude d'homooligomères d'acide *trans*-2-aminocyclohexanoïque (ACHC) [62]. L'intérêt des résidus d'acide aminé cycloalcanoïque de type ACHC est de permettre un renforcement de la structure hélicoïdale en gelant la rotation autour de la liaison $^{\alpha}\text{C}-^{\beta}\text{C}$ (environ 60° pour les résidus ACHC). L'utilisation de dérivés cyclopentyle (par exemple l'acide (*S,S*)-*trans*-2-aminocyclopentanoïque (ACPC)) permet d'augmenter la valeur de cet angle dièdre et conduit à la formation d'une autre structure hélicoïdale plus contrainte dans les oligoamides correspondants. Cette hélice de type $2,5_{12}$ avec 2,5 résidus par tour est caractérisée des liaisons hydrogène $\text{C}=\text{O}_i \dots \text{HN}_{i-2}$ fermant des pseudo-cycles à 12 atomes [69]. Enfin, les β -peptides constitués d'une alternance de résidus de type β^2 et β^3 , de même configuration, forment une hélice plus complexe de type $10/12/10$, structure découverte par le groupe de Seebach (Figure 1.3) [70].

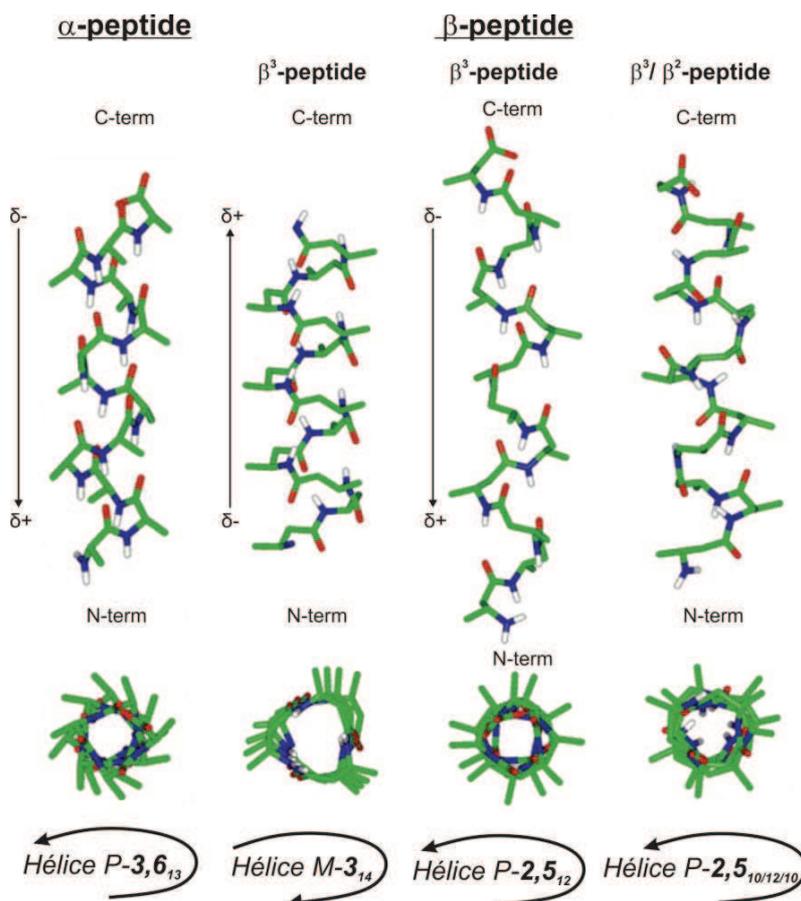


Figure 1.3 : Représentation des différentes structures hélicoïdales décrites. Les carbones sont représentés en vert, les azotes en bleu et les oxygènes en rouge [67].

Ces différentes structures hélicoïdales voisines de l'hélice- α apparaissent comme autant de plateformes d'intérêt pour essayer de mimer des peptides naturels antimicrobiens hélicoïdaux tout en apportant une résistance démontrée à la dégradation enzymatique.

L'amphipathicité étant un facteur clé pour l'activité antimicrobienne, de nombreux groupes se sont donc intéressés à la conception de structures hélicoïdales amphipathique à partir de β -peptides.

La première synthèse de β -peptides antimicrobiens a été rapportée par le groupe de Degrado en 1999 [71]. Le groupe a développé des triades, plus ou moins longues, composées de résidus de type valine, lysine et leucine afin de former des hélices amphipathiques de type 3_{14} (Figure I.4a *série A*). Les activités antimicrobiennes et hémolytiques des oligomères correspondants ont ensuite été évaluées. Des études par dichroïsme circulaire (CD) en milieu aqueux et en présence de micelles de Dodécylphosphocholine (DPC) ont, de plus, été menées en parallèle dans le but de connaître la structuration de ces composés en fonction de leur environnement.

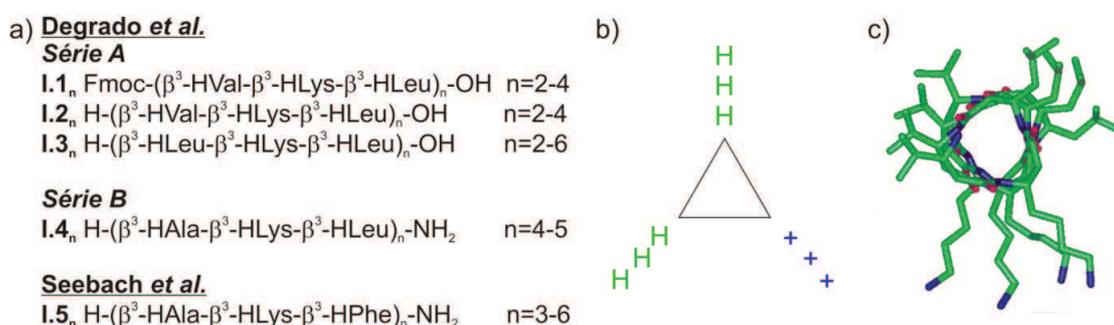


Figure I.4 : a) Séquences des composés décrits ; b) Représentation schématique des hélices 3_{14} formées, avec **H** représentant les résidus hydrophobiques et **+** les résidus chargés ; c) Vue du dessus du modèle moléculaire du composé H-(β^3 -HVal- β^3 -HLys- β^3 -HLeu)₄-OH. Les carbones sont en vert, les azotes en bleu et les oxygènes en rouge [71].

En premier lieu, les études CD montrent que ces séquences ne sont pas structurées en milieu aqueux mais le deviennent lors de l'ajout de micelles DPC. Effectivement, les spectres CD montrent un fort minimum à 215 nm et maximum à 195 nm d'ellipticité molaire, caractéristique de l'hélice 3_{14} . Cette structuration en présence de micelles, est d'autant plus forte que l'oligomère est long. Les composés ont ensuite été testés pour leur activité antimicrobienne. Il est à noter qu'il n'est pas nécessaire que le composé se structure en milieu aqueux pour qu'il puisse posséder une activité antimicrobienne. Néanmoins, celle-ci reste en étroite adéquation avec la capacité de l'oligomère à adopter une conformation hélicoïdale amphipathique, puisque les résultats montrent que plus l'oligomère est structuré et de taille élevée et plus l'activité antimicrobienne augmente. La plus faible concentration minimale d'inhibition (CMI) obtenue sur *E. coli* est de 9 $\mu\text{g/mL}$ avec le composé **I.2₄** [72]. Cependant, l'effet hémolytique (définissant la sortie de l'hémoglobine des globules rouges humains et donc la lyse cellulaire) pour ce même composé est aussi significative avec une concentration provoquant 50 % de lyse des cellules eucaryotes (HD_{50}) de 31 μM . La

sélectivité, définie comme le rapport de l' HD_{50} et de la concentration inhibant 50 % de la croissance de la bactérie (IC_{50}) pour **I.2₄** est de 15. Des résultats similaires sont obtenus pour tous les autres composés de la série.

Même si la sélectivité de ces composés reste modeste au vue des futurs autres travaux présentés ci-après, cette première étude a constitué une excellente base pour le développement de foldamères antimicrobiens.

Le groupe de Degrado a par la suite synthétisé une deuxième série de composés (Figure I.4a *série b*) en substituant le résidu valine par un résidu moins hydrophobe de type Alanine et en ajoutant une extrémité amide C-terminale [72]. Ces modifications permettent de réduire le caractère hydrophobe élevé, semblant être responsable de la moindre sélectivité des composés de la première série A. L'hydrophobicité est, en effet, la clé de l'interaction avec les lipides zwitterioniques, composants principaux des membranes eucaryotes. Cette série B de composés, comme la série A, ne se structurent qu'en présence de micelles DPC et présentent cette fois-ci une bien meilleure sélectivité. Le composé **I.4₄** possède une CMI de 26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mais une HD_{50} de 910 μM avec une sélectivité de 180, ce qui le rend beaucoup plus pertinent pour des études complémentaires. Simultanément et indépendamment, le groupe de Seebach a synthétisé des β^3 -peptides de séquences semblables **I.5_n** $\text{H}-(\beta^3\text{-HVal}-\beta^3\text{-HLys}-\beta^3\text{-HPhe})_n\text{-OH}$ avec n variant de 3 à 6 (Figure I.4a) [73]. La seule différence est le choix de la face hydrophobe : Seebach a en effet choisi un résidu de type Phénylalanine ($\beta^3\text{-HPhe}$) au lieu du résidu de $\beta^3\text{-HVal}$ employé par Degrado *et al.* Comme pour les séries précédentes la longueur de chaîne optimale a été obtenue pour $n=4$. **I.5₄** détient une CMI de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sur *E. coli* et *K. pneumoniae* et une faible hémolyse de 10 % à 300 μM . Cependant le reste de la série de composés publiés ne possède pas ou peu d'activités antimicrobiennes et démontre l'importance du choix des chaînes latérales dans la conception des mimes synthétiques antimicrobiens.

Tandis que les groupes de Degrado et Seebach se sont focalisés sur des hélices 3_{14} , le groupe de Gellman a également développé des hélices $2,5_{12}$ possédant des activités antimicrobiennes, à partir de deux résidus cycliques : l'acide (*R,R*)-*trans*-2-aminocyclopentanecarboxylique (ACPC) et l'acide (*3S,4R*)-*trans*-3-aminopyrrolidine-4-carboxylique (APC) (Figure I.5a) [69]. L'insertion de résidus APC, constitué d'un hétérocycle de type pyrrolidine, apporte la polarité et la charge supplémentaire permettant ainsi la formation de la face hydrophile des hélices amphipathiques.

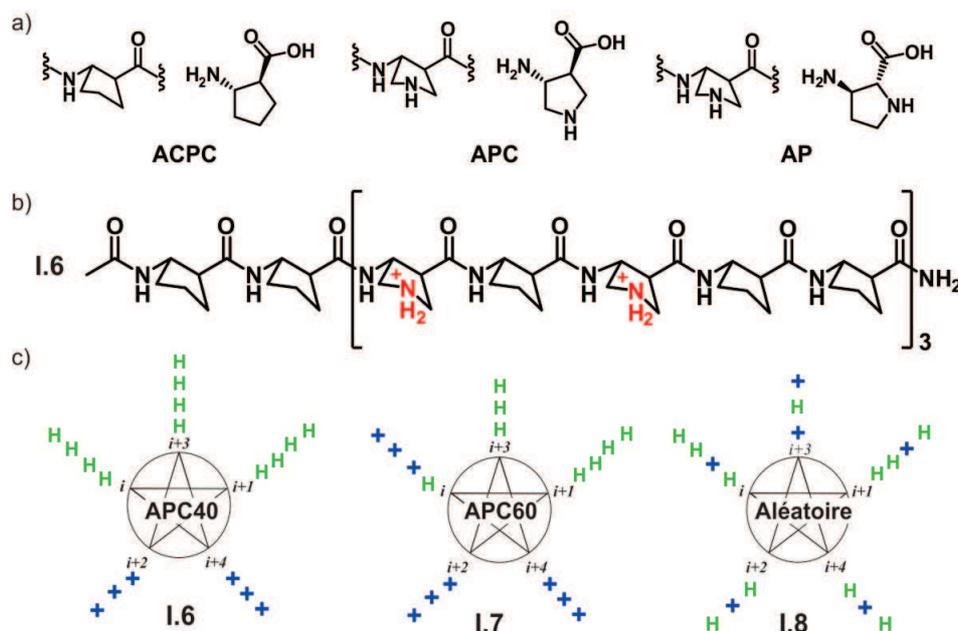


Figure 1.5 : a) Résidus ACPC, APC, AP développés par l'équipe de Gellman *et al.* ; b) Structure chimique du composé **I.6 (APC40)** ; c) Représentation schématique des hélices 2,5₁₂ formées, H représentant les composés hydrophobiques et + les résidus chargés.

A partir d'un composé de référence **I.6 (APC40)** [69], le rapport de charge et la position de cette dernière dans la séquence ont été optimisés afin de mieux comprendre le mécanisme d'interaction de ce type de structure avec la membrane bactérienne [74]. Alors que le composé **I.6** comportant 40 % de charge cationique, possède une très bonne activité antimicrobienne (CMI de 6,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$), le composé **I.7** qui comporte 60 % de charge cationique, voit sa valeur de CMI sur *E. coli* augmenter drastiquement à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Finalement et comme attendu le composé **I.8**, contrôle négatif sans structure amphipathique définie, ne possède pas d'activité lytique (CMI de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Le groupe de Gellman a ensuite comparé ces résultats avec des hélices 2,5₁₂ formées à partir de l'alternance des groupes ACPC et d'un nouveau résidu (*R*)- β -amino-(*D*)-proline (AP) qui possède l'amine cyclique en *ortho* de l'acide carboxylique [74] (Figure 1.5a). Deux composés **I.9 (AP40)** et **I.10 (AP60)** ont été synthétisés avec respectivement des proportions de 40 % et de 60 % en charge cationique. Ils ont alors constaté que leurs activités antimicrobiennes étaient légèrement plus faibles que les composés possédant les résidus APC, cette légère baisse pouvant être associée à une hélicité plus faible, hypothèse confirmée lors de l'analyse par CD de ces deux structures dans du méthanol et du tampon phosphate.

Pour finir, ces études soulignent l'importance d'un ajustement précis du rapport hydrophobicité/hydrophilicité pour l'activité antimicrobienne et semblent confirmer qu'une

amphipathicité de structure est obligatoire pour la conception de nouveaux mimes synthétiques non-naturels d'AMPs.

ii) Les peptides mixtes α/β

Plus récemment, l'étude de composés hybrides α -peptide/ β -peptide a attiré l'attention des chercheurs [75-84]. De telles architectures bénéficieraient de la reconnaissance moléculaire des α -peptides mais aussi de la stabilité protéolytiques des β -peptides. Après avoir étudié intensément les β -peptides, le groupe de Gellman s'est intéressé à ces nouvelles architectures hybrides, en incorporant des résidus cycliques de type ACPC imposant une contrainte angulaire favorable à la structuration en hélice [76,82]. Les données RMN du proton ont montré que de tels α , β -peptides en alternance 1:1 pouvaient adopter deux types structures secondaires hélicoïdales bien définies proches de l'hélice α : tout d'abord, une hélice $2,8_{11}$, formée à partir de liaisons hydrogène $i, i+3$ $C=O \cdots H-N$ et qui ferment un pseudo-cycle à 11 atomes, puis une hélice plus complexe $3,6_{14/15}$ formées par des liaisons hydrogène de type $i, i+4$ $C=O \cdots H-N$ et fermant cette fois alternativement des pseudo-cycles à 14 et 15 atomes (Figure I.6).

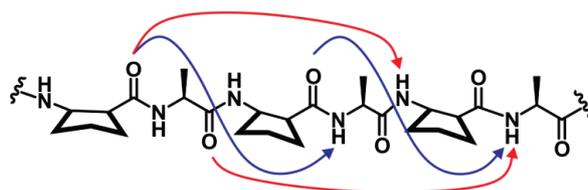


Figure I.6 : Liaisons hydrogène permettant la formation des structures hélicoïdales des α/β peptides : en bleu la formation d'hélice 11 et en rouge d'hélice 14/15.

Par la suite, Gellman *et al.* ont réussi à obtenir les différentes structures cristallines d'une série de α/β peptides (de 4 à 10 résidus) formés de résidus ACPC et d'acides aminés de type Alanine et α -aminoisobutyrique (Aib) (Figure I.7) [80,81]. La longueur de l'oligomère influence l'hélice formée à l'état solide : jusqu'à l'octamère, les composés forment exclusivement des hélices $2,8_{11}$. Au-delà, les nonamères et decamères adoptent à l'état solide des structures en hélice 14/15.

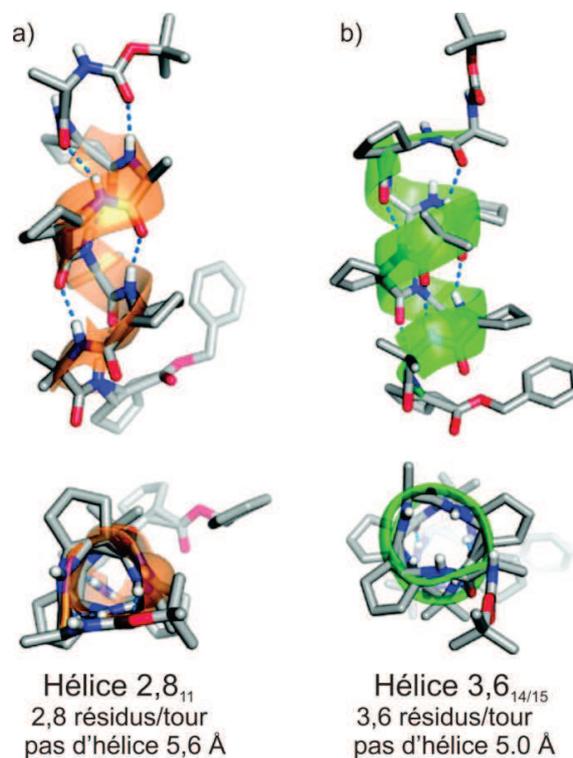


Figure 1.7 : a) Vue de côté et de dessus de la structure cristalline obtenue pour l'octamère Boc- α Ala-ACPC- α Ala-ACPC- α Aib-ACPC- α Aib-ACPC-OBn ; b) Vue de côté et de dessus de la structure cristalline obtenue pour l'octamère Boc- α Ala-ACPC- α Ala-ACPC- α Aib-ACPC- α Aib-ACPC- α Aib-ACPC-OBn [81].

Fort des différentes données structurales obtenues, le groupe de Gellman a préparé les composés **I.11** à **I.13** (Figure 1.8a) en vue de possibles applications antimicrobiennes. Comme expliqué précédemment, ces octamères peuvent se stabiliser en solution sous les deux formes hélicoïdales 2,8₁₁ et 3,6_{14/15} [76], avec lesquelles le groupe a joué pour la conception de leurs structures amphipathiques. Le composé **I.11** possède une structure amphipathique lorsqu'il se structure en hélice 2,8₁₁ mais ne l'est pas lorsqu'il est structuré en hélice 3,6_{14/15}. La situation inverse a lieu pour le composé **I.12** : il possède une structure amphipathique lorsqu'il se structure en hélice 3,6_{14/15} mais ne l'est pas lorsqu'il est structuré en hélice 2,8₁₁. Enfin, le composé **I.13** est un isomère « brouillé » (« scrambled »), sa structure n'est pas amphipathique qu'il soit structuré en hélice 2,8₁₁ ou 3,6_{14/15}. Les activités hémolytiques de ces composés ainsi que leurs activités antimicrobiennes sur différentes souches bactériennes ont été évaluées.

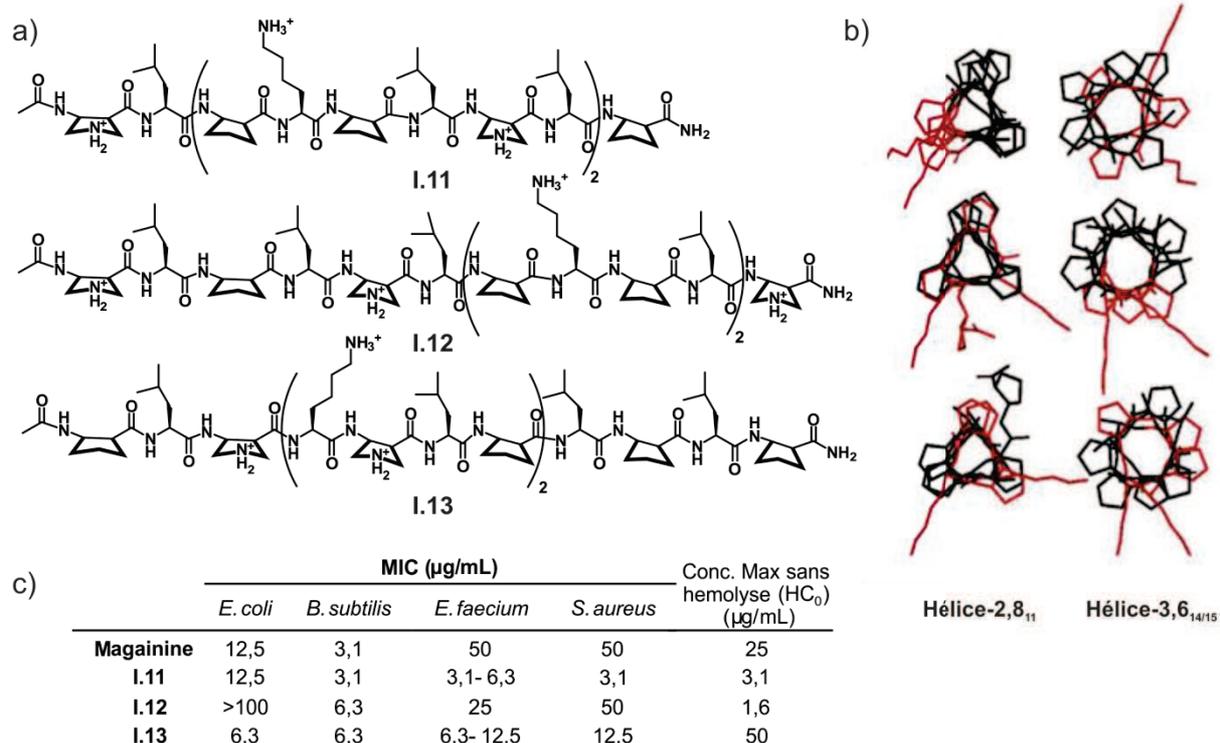


Figure I.8 : a) Structures chimiques des composés **I.11-I.13** ; b) Vue de dessus des modèles moléculaires des structures hélicoïdales formées, la face hydrophobe est en noire, la face hydrophile est en rouge [76] ; c) Tables des activités antimicrobiennes et hémolytiques.

Des résultats contrastants avec les études précédentes sur les β -peptides homogènes ont été obtenus sur cette série de composés. Effectivement, le composé **I.13** dont les possibles structures hélicoïdales ne ségrégent pas la face hydrophobe et la face cationique, possède de meilleures activités que les composés **I.11** et **I.12**. Ces derniers sont, pour leur part, fortement hémolytiques. A première vue, il semblerait donc qu'une pré-structuration globalement amphipathique ne soit pas obligatoirement essentielle à l'activité antimicrobienne. Le composé **I.13**, bien que hélicoïdalement non amphipathique, possède un squelette suffisamment flexible pour se structurer à la surface de la membrane bactérienne de manière amphiphile grâce aux interactions électrostatiques, d'interagir et de provoquer la mort de la bactérie. De plus par rapport aux cellules eucaryotes, la face hydrophobe est moins bien définie et possède alors une toxicité amoindrie. Une étude structure-fonction plus approfondie a été réalisée afin d'approfondir ces résultats [79], mais aucune logique rationnelle n'a malheureusement pu être établie.

En conclusion, les premières recherches de composés antimicrobiens se sont inspirées de la structure amphipathique hélicoïdale des peptides naturels antimicrobiens, comme la magainine, en synthétisant des foldamères hélicoïdaux de β -peptides et mixtes de α/β peptides. Les différentes études (notamment celles des α/β peptides) ont fini par

montrer qu'une structure hélicoïdale globalement amphipathique n'était pas pré-requise pour obtenir des activités antimicrobiennes sélectives. Il est possible d'obtenir de tels résultats avec des structures plus flexibles (oligomérique ou polymérique) possédant autant de chaînes cationiques que lipophiles et dont le squelette serait suffisamment flexible pour se replier de manière amphiphile à la surface de l'hôte. Ces derniers adopteraient alors une structure globalement amphiphile mais conformationnellement irrégulière. (Figure I.9). Ce modèle hypothétique, développé par Gellman corrèle avec les toutes premières études d'Oren et Shai dans lesquelles l'incorporation d'acides aminés de configuration (D), déstructure les α -peptides naturels initialement hélicoïdaux (dans les cas présents la mélittine et la cytolysine) entraînant la réduction de leurs activités hémolytiques sans pour autant diminuer leurs activités antibactériennes [85,86].

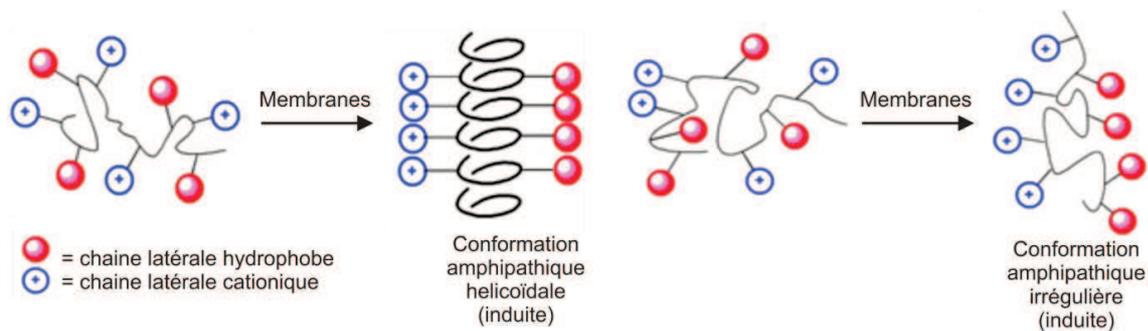


Figure I.9 : modèle hypothétique développé par Gellman *et al.* [87].

C'est dans ce contexte que Gellman *et al.* ont développé des copolymères aléatoires basés sur des dérivés de nylon-3 (Figure I.10) [58,87]. Ces copolymères possèdent un squelette polyamide identique à celui des β -peptides et peuvent être perçus comme un prolongement des travaux initiés par le groupe sur les β -peptides antimicrobiens. Des études préliminaires ont démontré qu'en ajustant le ratio d'unités γ/x (hydrophobe/cationique), il était possible d'améliorer les activités antimicrobiennes. Ainsi les meilleures activités ont été obtenues avec le composé contenant 60 % d'unités lactame hydrophobe (CMI en $\mu\text{g/mL}$ de 12,5 sur *E. coli*, de 3,1 sur *B. subtilis* et de 25 sur *S. aureus*). Comme ce qui a pu être observé avec les β -peptides, les activités antimicrobiennes décroissent soit avec un nombre d'unité hydrophobe trop faible ou un nombre trop élevé. Des mesures de concentrations micellaires critiques (CMC) par fluorescence [87] ont par la suite révélé que l'agrégation des copolymères avec l'augmentation de la face hydrophobe serait responsable de la perte d'activité puisqu'ils rencontreraient des difficultés à traverser la membrane bactérienne sous forme d'agrégats. L'activité hémolytique est aussi fortement liée à la proportion d'unités cationiques et hydrophobes, puisqu'elle reste faible pour des ratio $x : y$ inférieurs à

40 : 60, et croît fortement pour les polymères contenant un ratio de 50 %. Enfin, de nouveaux travaux montrent que seule l'activité antimicrobienne est indépendante de la longueur du polymère ; l'activité hémolytique, elle, augmente avec la taille du composé [87].

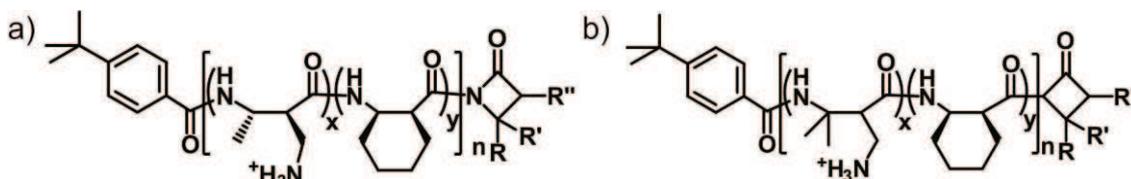


Figure 1.10 : Exemples de structures chimiques des polymères nylon-3 avec en a) la première séquence publié [58] nommée MM:CH_x (Monométhyl:Cyclohexyl) et avec R = Me, R' = H, R'' = CH₂NH₃⁺ ou R = H, R' = R'' = -(CH₂)₄⁻ ; en b) série possédant les meilleures activités antimicrobiennes mais un taux d'hémolyse élevé, nommée DM:CH_x (Diméthyl:Cyclohexyl) et avec R = R' = Me, R'' = CH₂NH₃⁺ ou R = H, R' = R'' = -(CH₂)₄⁻ [87].

En conclusion, tous ces travaux confirment que pour mimer des AMPs, une pré-organisation structurale du mime synthétique n'est pas obligatoire tant que celui-ci possède la flexibilité suffisante pour s'organiser en une conformation amphiphile sous l'influence d'une interface. Un ajustement précis du ratio hydrophobe/charge doit être réalisé afin d'obtenir la meilleure sélectivité pour les membranes bactériennes.

iii) Les peptoïdes

Un deuxième type de peptidomimes, les peptoïdes, s'est distingué pour ces propriétés antimicrobiennes. Introduits par Zuckermann *et al.* en 1992 [88,89], les peptoïdes sont des oligoamides artificiels constitués de résidus glycines N-substitués, de structures très proches de celles des α -peptides. Dans ce type de squelette, les chaînes latérales ne sont donc plus portées par le carbone α mais par l'atome d'azote des amides (Figure I.11), ce qui leur confèrent des propriétés intéressantes, en terme de stabilité métabolique [90] ou de perméabilité membranaire [91,92].

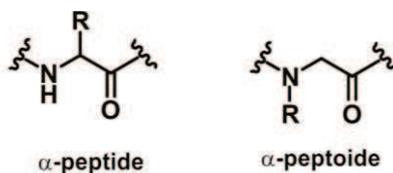


Figure I.11 : Représentation schématique des α -peptoïdes.

De plus, les chaînes latérales sont introduites par substitution d'amines primaires (par la stratégie de synthèse dite « submonomère » développée par Zuckermann) permettant ainsi une diversité chimique infinie et exacerbant leur potentiel comme futurs agents thérapeutiques [93-95]. Cependant, cette migration de la chaîne latérale du carbone vers l'azote provoque la perte de la chiralité et la disparition de possibles liaisons hydrogène intramoléculaires entre les NH amidiques et les carbonyles du squelette, présents dans les

α - ou β - peptides. Les équilibres *cis/trans* des nouveaux liens amides *N,N*-disubstitués sont alors favorisés, compliquant par conséquent la formation d'une architecture contrôlable bien définie, et notamment en hélice.

Zuckermann *et al.* ont toutefois montré qu'il était possible d'induire une structuration hélicoïdale en utilisant des chaînes latérales chirales, encombrées ou aromatiques [96]. Ainsi, la chiralité permet de générer un sens d'hélicité. L'encombrement ou l'aromaticité jouent, pour leur part, sur l'équilibre *cis/trans* autour de la liaison amide par un jeu de répulsions stériques ou électroniques et influencent la conformation de la chaîne principale. Cette incorporation, à hauteur d'un minimum de 50 %, doit être périodique, afin que les chaînes latérales soient bien distribuées le long de la séquence. La structure hélicoïdale formée par les α -peptoïdes, largement étudiée par CD, n'est pas complètement identique à celle des α -peptides. Les peptoïdes forment une hélice de type poly-proline-I (PPI), composée de liens amides de type *cis*, de trois résidus par tour et d'un pas d'hélice d'environ 6-6,7 Å (Figure I.12) [97-99]. Cette hélice, se caractérise par un signal CD (visible à partir du pentamère) composé d'une bande d'ellipticité molaire positive à 192 nm, et de deux bandes négatives à 202 et 218 nm.

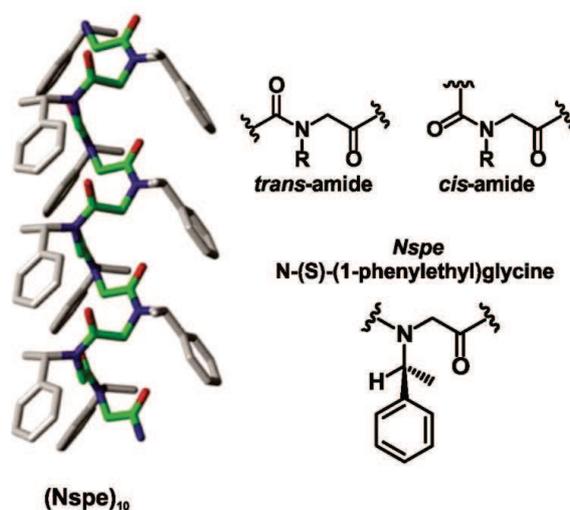


Figure I.12 : Représentation des amides *cis/trans*, modèle moléculaire d'une hélice PPI formée par un décimère de résidus Nspe de type phenylalanine [100]. Les carbones sont en gris et vert, les azotes en bleus et les oxygènes en rouge.

Due à la périodicité des résidus, les α -peptoïdes sont traditionnellement décrits avec une séquence primaire de type (NAaa-NBbb-NCcc)_n répétée n fois (Aaa, Bbb, Ccc désignant le code à trois lettres classiquement utilisé pour les acides α -aminés naturels) et forment un excellent modèle structural à trois faces pour le design, dans le cas précis, de composés amphipathiques.

Les premiers peptoïdes antimicrobiens ont été décrits en 1999 par Goodson *et al.*, en utilisant la chimie combinatoire par stratégie dite « split and mix » [101,102]. Les meilleurs résultats ont été obtenus pour des trimères, comportant une chaîne latérale dehydroabiéthylamine (DHAA). Le meilleur composé identifié **I.14** (Figure I.13) possède de bonnes activités antimicrobiennes (CMI de 12,5 µg/mL sur *E. coli*, *S. aureus* et *K. pneumonia*) tout en possédant une importante hémolyse à forte concentration (80 % de lyse cellulaire à 250 µM). La toxicité résiduelle pourrait provenir de l'incorporation de la déhydroabiéthylamine, déjà, elle-même, toxique seule.

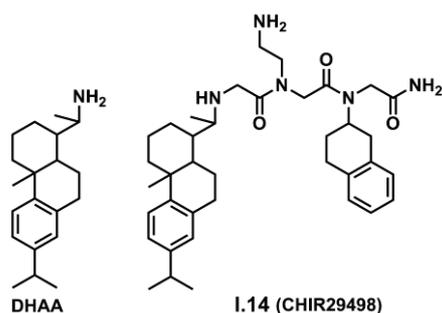


Figure I.13 : Structures chimiques de DHAA et de I.14.

Depuis, de nombreuses stratégies plus rationalisées ont été mise en place afin d'accroître la sélectivité des peptoïdes pour les membranes bactériennes.

Ainsi une des autres approches envisagées a été la substitution d'un seul acide aminé par un résidu peptoïde dans une séquence antimicrobienne naturelle, afin de conserver dans la mesure du possible ses propriétés mais en lui conférant une meilleure stabilité enzymatique. Des substitutions de ce type ont été réalisées par le groupe de Shin *et al.* sur la mélittine, un peptide naturel non sélectif [103]. Ils ont synthétisés une série d'analogues de ce peptide en substituant des résidus Leucine et Isoleucine de la partie Leucine « zipper », par des résidus peptoïdiques de type NAla, NLeu, NPhe, et NLys. Ces analogues se sont avérés posséder de meilleures activités antimicrobiennes et un plus faible taux d'hémolyse en comparaison de la mélittine. Cependant, différentes mesures physico-chimiques (fluorescence de tryptophane, fuite de calcéïne, perméabilisation membranaire et flip-flop des lipides) ont montré que le mécanisme d'interaction avec la membrane bactérienne est différent de celui du peptide naturel. Il semblerait qu'il soit passé d'un mécanisme membranaire à une cible intracellulaire indéterminée. Cette forte modification de comportement biologique montre la difficulté de prédiction des effets d'une telle substitution.

Pour augmenter les chances de réussites, les chercheurs se sont donc tournés vers la conception d'homo-oligomères peptoïdiques amphipathiques. En 2003, Barron *et al.* ont

décrit la première synthèse de mimes peptoïdiques du peptide naturel antimicrobien hélicoïdal magainine-2 [104]. Une bibliothèque de peptoïdes, composés de chaînes latérales α -chirales hélicogènes (*N*-(*S*)-(1-phenylethyl)glycine NSpe, *N*-(*S*)-(sec-butyl)glycine Nssb) et de NLys pour former la face hydrophile du composé, a été réalisée (Figure I.14a, b). Le composé **I.15** possède les meilleures activités bactéricides avec des CMI de 9,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contre *E. coli* (3.5 μM) et de 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contre *B. subtilis* (0.88 μM). En 2008, à partir de leurs composés **I.15** et **I.16**, une étude très complète (Figure I.14c) sur les effets de la charge, de l'hydrophobicité, de la longueur de chaîne, de la chiralité et de l'amphipathicité sur l'activité lytique et la sélectivité de cette série de composés a été publiée [105].

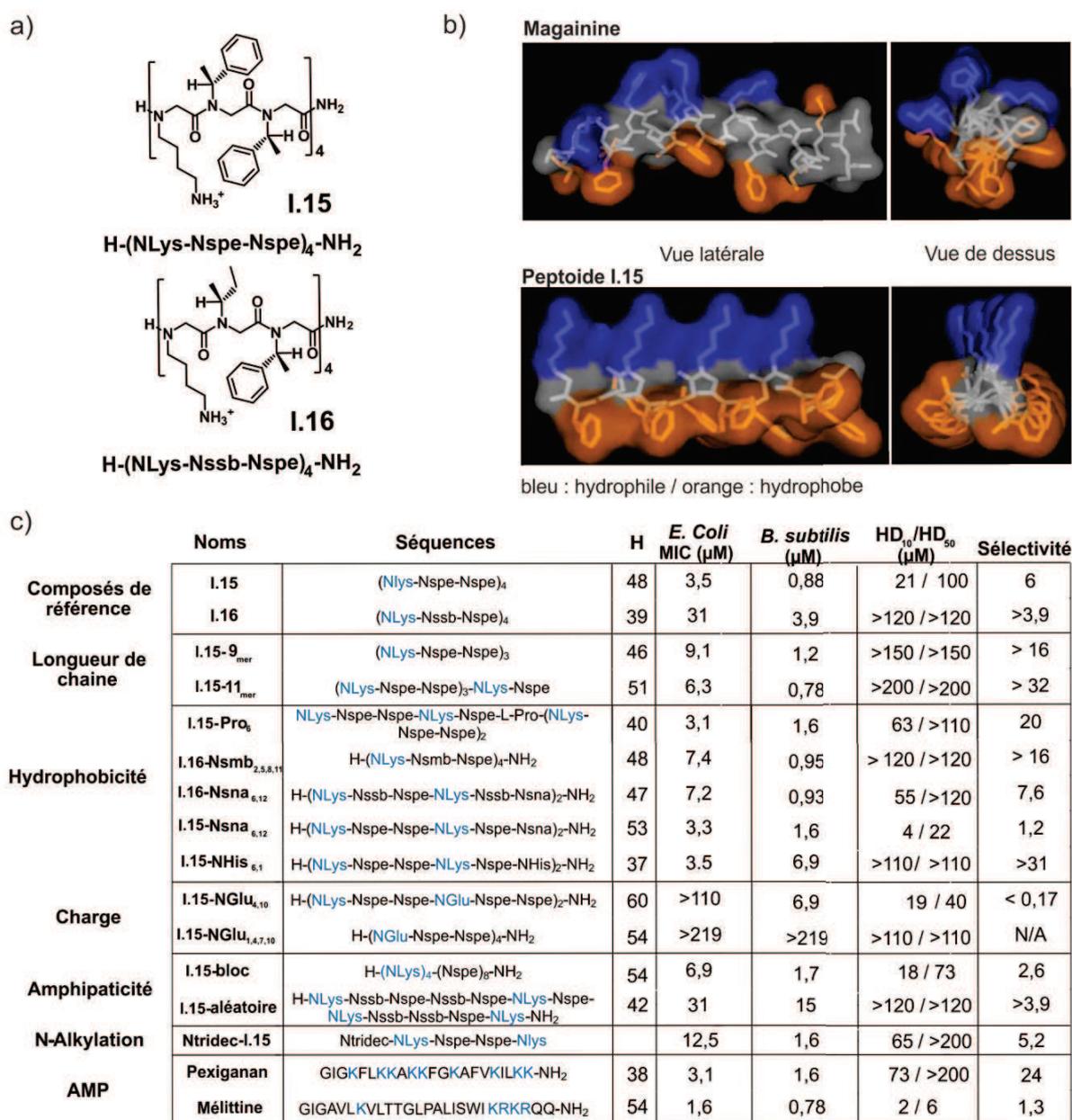


Figure I.14 : a) Structures chimiques des composés de référence **I.15** et **I.16** ; b) Structure RMN de magainine-II en milieu micellaires de 1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) et modèle structural du peptide **I.15** [105] ; c) Table des activités antimicrobiennes des différents composés sur *E. coli* et *B. subtilis* et leurs activités hémolytiques avec NSna : *N*-(*S*)-(1-naphthyléthyl)glycine, NSpm : *N*-(*S*)-(1-phenylméthyl)glycine, H : Hydrophobicité.

De manière similaire à ce qui a été observé pour les β -peptides, un rapport hydrophobicité / charge cationique adéquat est essentiel : une forte hydrophobicité semble être responsable de la toxicité des composés. **I.15-NGlu_{4,10}**, **I.15-15mer**, **I.15-Nsna_{6,12}** et **I.15-bloc**, sont plus hydrophobes ou moins chargés que le peptoïde de référence **I.15** mais sont également moins sélectifs. Les composés **I.15-19mer**, **I.15-NHis_{6,12}**, et **I.15-Pro₆**, moins hydrophobes que **I.15**, détiennent des activités antimicrobiennes comparables mais une meilleure sélectivité. De plus, bien que la stabilité de l'hélice ne semble pas être importante pour l'activité antimicrobienne elle apparait l'être pour l'activité hémolytique. Les composés ayant un fort ou un faible signal dichroïque possèdent, en effet, toujours une activité antibactérienne. Par exemple, le signal CD de **I.15-Nsna_{6,12}** dans un milieu micellaire PE/PG est moins intense que **I.15** pourtant les deux composés possèdent des activités antimicrobiennes similaire. **I.16-Nsmb_{2,5,8,11}** possède un signal CD identique à **I.16** dans un milieu micellaire PE/PG mais une activité antimicrobienne plus importante.

Enfin, les paramètres de l'amphipathicité ont été étudiés. Comme ce qui a pu être constaté avec les α/β peptides, le composé **1.15-aléatoire** possède un squelette suffisamment flexible pour former une conformation irrégulière mais amphipathique à la surface de la bactérie et possède donc une activité antimicrobienne. De surcroit, il détient une bonne sélectivité. Le composé **I.15-bloc** possède une structure amphipathique et une activité antimicrobienne, par contre sa sélectivité est plus faible. Il semblerait donc que l'amphipathicité de la structure influe sur le caractère hémolytique de cette série de peptoïdes.

Récemment d'autres architectures de type peptoïde, telles que les β -peptoïdes [106-108], les composés hybrides α -peptide/peptoïde [109-113], les arylopeptoïdes, les N-hydroxy/alcoxy-peptoïdes et les peptoïdes cycliques [114-117] ou liés à des chaînes lipidiques (Figure I.14c, le composé **Ntridec-I.15** possède une chaîne alkyle C13 terminale avec Ntridec = tricedylamine) [118] ont également été rapportées dans la littérature et accroissent un peu plus la diversité d'agents antibactériens disponibles avec cette classe de peptidomimes.

Alors que les séquences d'homo-oligomères de β -peptoïdes, dont le repliement en hélice droite (d'un pas de 9,6-9,8 Å, de trois résidus par tour et de forme originale en prisme) vient juste d'être découvert [119], possèdent de modestes activités antimicrobiennes [120] (le meilleur composé publié possède une activité de 128 $\mu\text{g/mL}$ sur *E. coli* par rapport au

peptide magainine détenant une MIC de 16 $\mu\text{g/mL}$ sur *E. coli*), le développement des composés hybrides peptoïde/ α -peptide a permis d'obtenir d'intéressants résultats. Inspiré par les travaux de Ryge *et al.* sur les hybrides α -peptoïde/ α -peptide antimicrobiens et par les travaux de Gellman sur les composés mixtes α/β -peptides [76,121,122], Olsen *et al.* ont réalisées différentes études relation-structure-activité à partir de séquences hybrides β -peptoïde/ α -peptide (Figure I.15) [123,124]. Ces composés possèdent l'avantage d'être résistant à la protéolyse due à la présence de la chaîne synthétique peptoïde mais également la possibilité de former des liaisons hydrogènes par la présence des NH des résidus α -aminés et donc de pouvoir se structurer plus facilement en solution que les peptoïdes seuls.

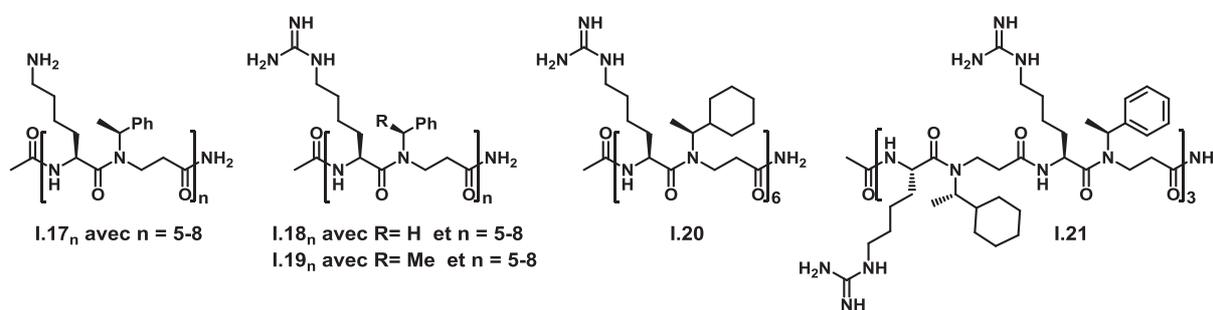


Figure I.15 : Séquences hybrides β -peptoïde/ α -peptide réalisées par Olsen *et al.* [124].

Les trois premières séries de composés (**I.17_n**, **I.18_n** et **I.19_n**) ont permis de comprendre l'influence de la longueur de chaîne (n variant de 5 à 8), du type de chaîne cationique (Lys contre Arg avec **I.17_n** vs **I.19_n**) et de la chiralité du résidu peptoïde (**I.18_n** vs **I.19_n**). Les composés **I.20** et **I.21** ont permis, pour leurs parts, de comprendre l'influence de la face hydrophobe (soit complètement aliphatique pour le composé **I.20**, soit mixte pour le composé **I.21**). Ces oligomères ont été testés sur différents pathogènes (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *Enterococcus faecium* résistant à Vancomycine et enfin *Staphylococcus aureus* résistant à méticilline). Parmi tous, le composé **I.20** possède les meilleures activités avec des CMI respectivement de 64, 8, 4 et 8 $\mu\text{g/mL}$ et une HD_{50} de 125 $\mu\text{g/mL}$ (la mélittine testée en parallèle possède des CMI de 256, 64, 8 et 8 $\mu\text{g/mL}$).

L'ensemble de ces résultats a permis de tirer certaines conclusions. Ainsi l'augmentation de la taille du composé, de l'hydrophobicité et du nombre de groupe guanidine permet l'amélioration de l'activité antimicrobienne contre la plupart des agents pathogènes examinés. L'insertion de groupements guanidines par rapport aux groupements cationiques lysines améliorent les activités antimicrobiennes. Néanmoins, ces effets restent largement dépendant du pathogène ciblé, puisque l'élongation des séries **I.17_n-I.19_n** a provoqué une augmentation de pouvoir bactéricide contre toutes les bactéries excepté pour

E. coli, où les composés les plus courts montrent les plus fortes activités. De surcroît, comme il a déjà pu être constaté pour les β -peptides, l'augmentation de l'hydrophobicité est corrélée avec une augmentation de la toxicité. Cette observation a aussi été constatée pour le nombre de guanidines. Ces deux paramètres doivent être donc ajustés pour éviter des effets hémolytiques trop sévères et il paraît alors difficile d'ériger de simples règles de conception simple pour ces composés hybrides. De plus, il est délicat de corréliser ces études avec une possible structuration des composés. Les études spectroscopique CD de ces derniers montrent une diminution des effets Cotton en présence de vésicules lipidiques, ce qui laisse envisager que les composés ne soient pas structurés à la surface de la membrane lipidique.

Enfin dans le développement de composés cycliques, on peut citer les travaux de Kirchenbaum *et al.* [115,125], qui soulignent que la contrainte apportée par la macrocyclisation « tête à queue » permet l'organisation des chaînes latérales cationiques et hydrophobes de chaque face du macrocycle plan et donc l'obtention de structure « fortement » amphiphile détenant de meilleures activités antimicrobiennes (Figure I.16a). La relation structure-activité menée sur *E. coli* dans laquelle les CMI obtenues avec différentes chaînes latérales hydrophobes, hydrophiles et différentes tailles de cycle sont comparées à leurs analogues linéaires, montre que dans ce type de structure, la taille de la surface hydrophobe est l'un facteur clé (Figure I.16b, c, d).

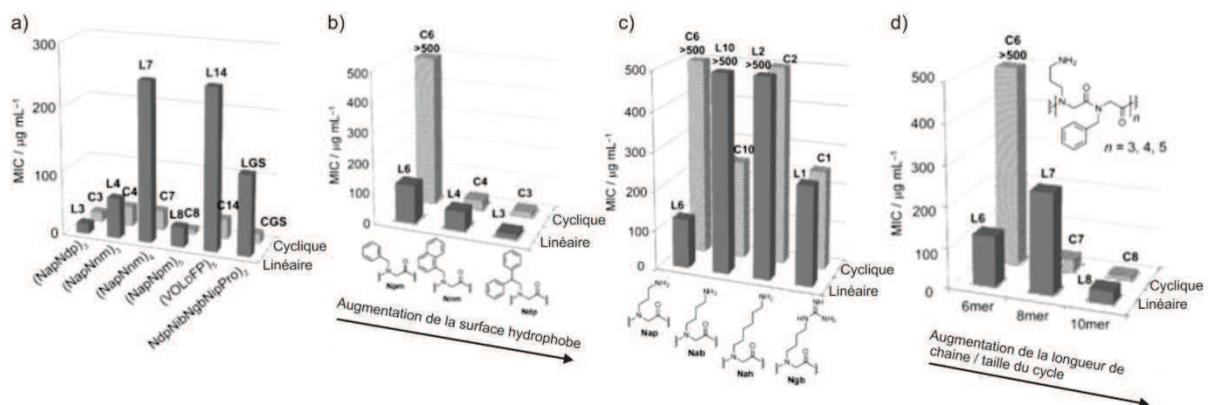


Figure I.16 : Relation structure activité menée sur *E. coli* par Huang *et al.* [115]

Tous les dérivés synthétiques (β -peptides et peptoïdes) présentés jusqu'ici ont été conçus pour reproduire les structures secondaires hélicoïdales d'AMPs naturels. Néanmoins, la découverte de peptides antimicrobiens non-hélicoïdaux et les résultats encourageants obtenus avec les peptides α/β développés par Gellman, ont mis en doute le rôle clé joué par cette conformation hélicoïdale. La conception d'oligomères beaucoup plus simples,

notamment de structures étendues et de polymères, capable d'adopter une structuration amphipathique à la surface de la membrane bactérienne a alors été envisagée.

b) Les structures étendues

i) Les foldamères arylamides

La diversité des structures employées dans les différentes études de peptidomimes antimicrobiens ont poussé l'équipe de Degrado *et al.* à se demander si ces principes pouvaient être étendus à la conception de polyarylamides aromatiques antimicrobiens [53,126-132]. Étant-donné leur relative facilité de synthèse, ces séquences aromatiques sont apparues comme d'excellents candidats pour amorcer dans un second temps la synthèse de polymères amphipathiques antimicrobiens. Ainsi le groupe a développé une série de composés dont la structure contient des unités diamine 1,3-phenylène connectées par un acide isophtalique (Figure I.17) [127,133]. Le thioéther, de la chaîne latérale portée par l'unité aryle, forme des liaisons hydrogène intramoléculaires avec les NHs des liens amides ce qui permet de rigidifier la molécule. L'amphipathicité de la molécule est obtenue par la dichotomie entre l'aminoéthyl-thioéther (polaire et hydrophile) et le groupe *tert*-butyle hydrophobe du motif aryle.

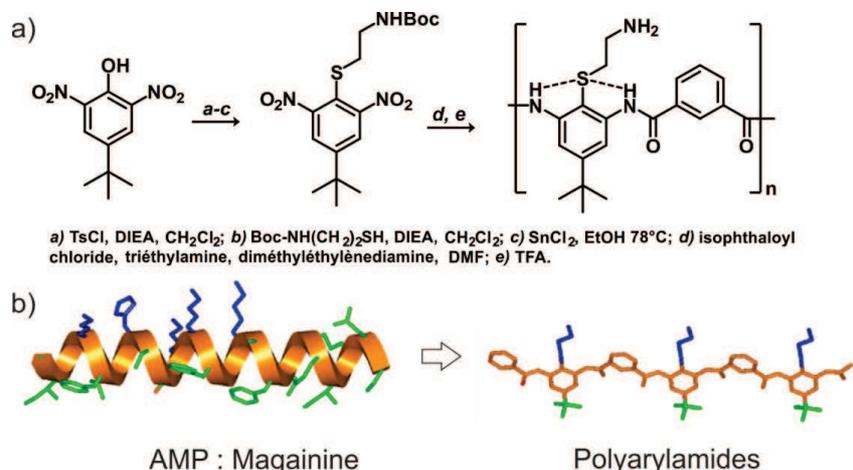
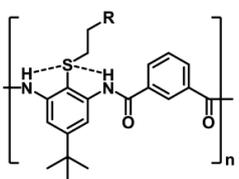


Figure I.17 : a) Schéma de synthèse des arylamides développées par Tew *et al.* ; b) Principe de conception des polyarylamides amphipathiques [129].

Les premiers oligomères synthésés, composés de deux jusqu'à soixante répétitions du motif aryle, ont été testés pour leur activité antibactérienne sur *E. coli*, *K. pneumoniae* et *B. subtilis* [133] (Figure I.18).



	n	R	MIC (µg/mL)		
			<i>E. Coli</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>B. subtilis</i>
I.22	2	NH ₃ ⁺	19	66	12
I.23	3	NH ₃ ⁺	<19	N.A	19
I.24	8	NH ₃ ⁺	7,5-15	31-50	16
I.25	60	NH ₃ ⁺	>200	-	-
I.26	8	NH-Ac	>500	250	>500

Figure I.18 : Activités antimicrobiennes de la première série de foldamères d'arylamides synthétisés.

Il est intéressant de constater que les meilleures activités ont été obtenues pour les oligomères les plus courts (**I.22**, **I.23** et **I.24** par rapport **I.25**). La perte d'activité avec l'élongation de la séquence serait peut-être due à une solubilité amoindrie et à l'incapacité de ces longs oligomères à pénétrer les différentes couches protectrices des membranes bactériennes, notamment le peptidoglycane. De plus, la charge apportée par la lysine semble obligatoire puisque son acétylation provoque la perte d'activité du composé **I.26**. Par la suite, le groupe de Degrado s'est intéressé à un trimère **I.27** de ce même motif [127], avec lequel ils obtiennent une CMI de 12,5 µg/mL sur *E. coli* et de 50 µg/mL sur *B. subtilis*. **I.27** possède malheureusement un effet hémolytique sur les globules rouges (appelés RBCs) important avec HD₅₀ de 12 µg/mL. Toutefois, ces premiers résultats ont permis d'initier l'optimisation (Figure I.19). Ainsi, pour atteindre une meilleure sélectivité, l'addition d'acides aminés aux extrémités a été réalisée. Celle-ci permet d'accroître le nombre de charges et apporte une grande diversité de chaînes latérales. L'apport de liaisons hydrogène supplémentaire par des groupes dialkoxyles (**I.28**), par un cœur pyrimidine (**I.29**), ou encore par l'ajout de lien de type urée, permet la rigidification de la structure et améliore l'activité antimicrobienne [129]. De plus, le remplacement des groupements *tert*-butyles hydrophobes par des groupements trifluorométhyles s'est aussi avéré efficace. Enfin, le composé **I.30**, synthèse de cette optimisation et comportant deux chaînes de type arginines aux extrémités a montré les meilleurs résultats avec une CMI de 0,2 µM sur *E. coli*, de 0,1 µM sur *S. aureus* et cette fois une impressionnante HD₅₀ quatre mille fois plus grande (à 440 µM) [129].

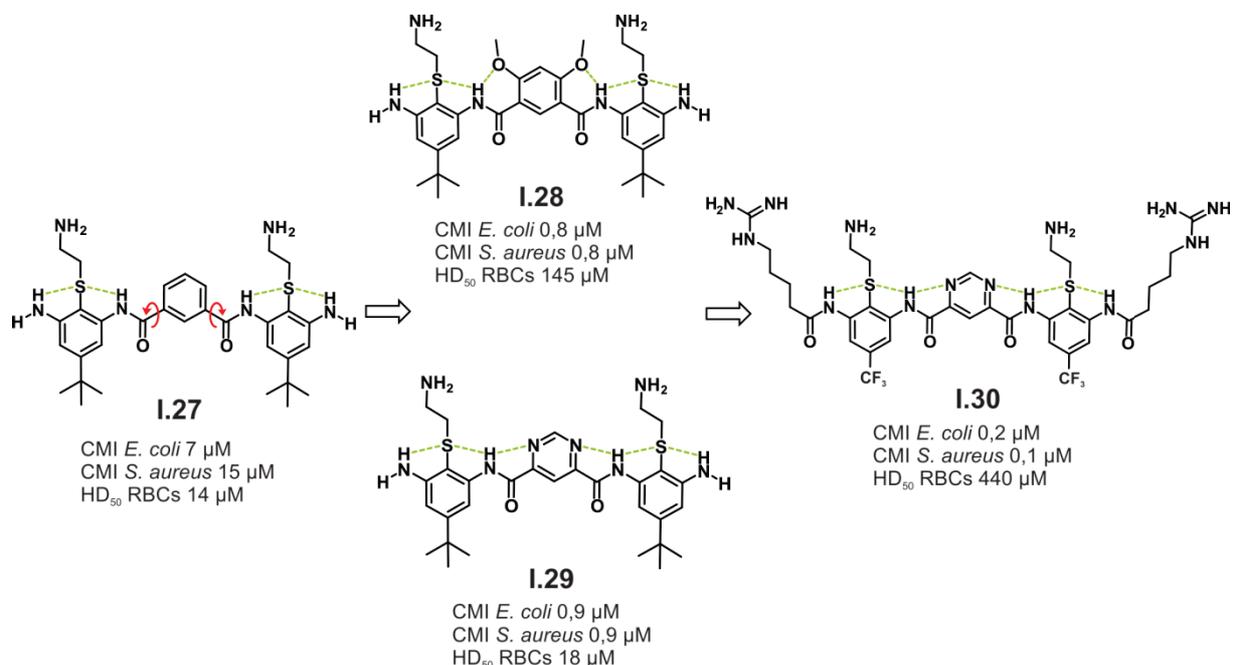


Figure I.19 : Optimisation de l'activité des oligomères arylamides, comprenant l'introduction de groupes donneur de liaison hydrogène et l'optimisation des groupes fonctionnels aux extrémités.

ii) Les oligomères de phénylène-éthynylène

Dans le prolongement de ses travaux et afin d'étendre la conception de mimes synthétiques de peptides naturels antimicrobiens à des systèmes complètement abiotiques (suppression de la liaison amide), Tew *et al.* ont préparé des oligomères de *meta*-phénylène-éthynylène (Figure I.20) [134,135]. Ces oligomères sont constitués d'une répétition d'un squelette aromatique rigide pouvant s'orienter librement autour de liens alcynes. La substitution supplémentaire du cycle aromatique en position *meta*, de nature cationique, permet de stabiliser la structure étendue sans aucune liaison hydrogène intramoléculaire à la surface du pathogène [136]. Les composés oligomériques ($n=1$ à 3) [135] mais aussi polymériques ($n=6$ et $n=20$) [134] ont été étudiés. De manière surprenante, seul le composé **I.31₁** ne comportant qu'une unité de répétition ($n=1$) se révèle être de loin le plus actif (CMIs sur *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* inférieures à 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et de 1,56 pour *K. pneumoniae*) et en plus possède une bonne sélectivité envers les globules rouges. Le rapport HD₅₀/MIC est de 440 pour le composé **I.31₁** alors que la valeur de ce rapport pour le peptide naturel mélittine est de 1. Les composés polymériques sont pour leur part beaucoup moins intéressants car beaucoup plus toxiques. Un tel comportement avait déjà été observé avec les arylamides développés par le groupe de Degradó.

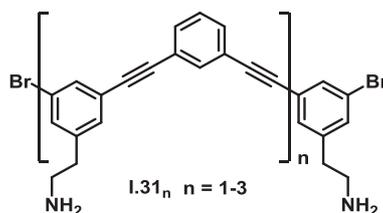


Figure I.20: Structure chimique des composés I.31_n.

c) Oligomères sans conformation préférentielle encore démontrée

i) Les oligoacyllysines (OAKs)

La dermaseptine est un peptide naturel antimicrobien isolé sur la peau des amphibiens. Composé de 24 à 34 acides aminés, il se structure en hélice- α amphipathique à la surface de la membrane bactérienne. C'est en étudiant les propriétés antibactériennes de ce peptide de défense de l'hôte [137,138], que le groupe de Mor s'est intéressé à la synthèse d'une nouvelle classe de peptidomimétiques : les oligomères d'acyle-lysines. Appelés plus communément OAKs ces oligomères de formule $A_jK-\alpha_i$ sont constitués d'un enchainement de chaîne acyle de longueur variable (j) (notée A) et d'un acide aminé cationique Lysine K. Le monomère « aminoacyle-lysine » est noté α_i , où i définit le nombre de carbone de la chaîne acyle et n le nombre de répétition de cette unité (Figure I.21). Par cette structure bien particulière, il est possible de distinguer le rôle propre apporté par la charge et par l'hydrophobicité sur l'activité des composés, en modifiant soit le nombre de sous unités lysine-acyle soit la longueur de la chaîne acyle. De manière intéressante, cette chaîne acyle empêche la formation de structures secondaires stables à cause d'un degré de rotation trop élevé autour des liaisons C-C.

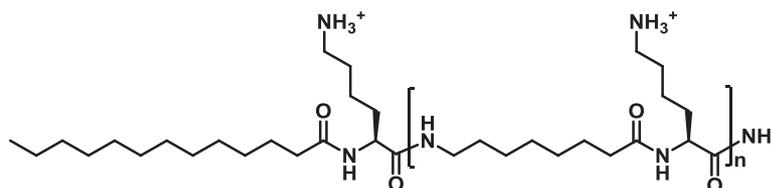


Figure I.21 : Structure chimique représentative d'un OAK : $C_{12}K-\alpha_8$. L'unité α_8 (aminooctanoyl-lysyl) est définie entre crochets et $n \geq 1$.

Mor *et al.*, ont tout d'abord synthétisé une première série de 16 oligoacyle-lysines composés d'aminobutyryl-lysine (noté α_4) et d'aminooctanoyl-lysine (noté α_8) (Figure I.22a)[57].

a)	Séquences	Noms	Q	H	MIC (µM)				HD ₅₀ (µM)
					<i>E. Coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i> (résistante à la methicilline)	<i>B. cereus</i>	
Série de OAKs Butyroyl									
	C ₂ K-C ₂ K	I.32 , C ₂ K-1α ₂	2	19,6	>50	>50	>50	>50	>100
	C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K	I.32 , C ₂ K-2α ₂	3	21,8	>50	>50	>50	>50	>100
	C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K	I.32 , C ₂ K-3α ₂	4	21,5	>50	>50	>50	>50	>100
	C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K	I.32 , C ₂ K-4α ₂	5	22	>50	>50	>50	>50	>100
	C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K	I.32 , C ₂ K-5α ₂	6	22,9	>50	>50	>50	>50	>100
	C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K	I.32 , C ₂ K-6α ₂	7	23,5	>50	>50	>50	>50	>100
	C ₂ K-C ₂ K	I.32 , C ₂ K-7α ₂	8	24,3	>50	>50	>50	>50	>100
Série de OAKs Octanoyl									
	C ₂ K-C ₂ K	I.33 , C ₂ K-1α ₃	2	38,9	>50	>50	>50	>50	>100
	C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K	I.33 , C ₂ K-2α ₃	3	36	>50	>50	>50	>50	>100
	C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K	I.33 , C ₂ K-3α ₃	4	39,5	>50	>50	>50	>50	>100
	C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K	I.33 , C ₂ K-4α ₃	5	40,5	>50	>50	>50	>50	>100
	C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K	I.33 , C ₂ K-5α ₃	6	40,8	25	>50	>50	>50	>100
	C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K-C ₂ K	I.33 , C ₂ K-6α ₃	7	40,3	25	>50	>50	>50	>100
	C ₂ K-C ₂ K	I.33 , C ₂ K-7α ₃	8	40,3	12,5	>50	>50	>50	>100
OAKs mixtes									
	C ₂ K-C ₂ K	I.34 C ₂ K-7α ₂	8	45,2	12,5	>50	>50	>50	>100
	C ₂ K-C ₂ K	I.35 C ₂ K-7α ₃	8	47,5	3,1	6,2	50	12,5	>100
Contrôles									
AMPs	MSI-78, dérivé de la magainine		10	44	50	3,1	>50	37,5	45
	S4(1-16), dérivé de la dermaceptine		6	47	3,1	6,3	6,3	3,1	10
	LL37, dérivé de la cathélicidine		11	61	50	12,5	nd	37,5	8
Antibiotiques	Ciprofloxacine		nd	nd	0,05	0,3	>50	0,3	nd
	Imipenem		nd	nd	0,6	16,4	>50	<0,03	nd
	Tétracycline		nd	nd	1,8	>50	0,4	0,07	nd

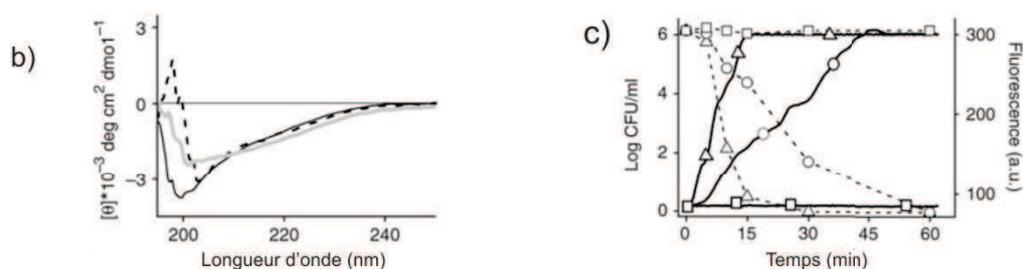


Figure 1.22 : a) Activités et pouvoir hémolytique des différentes séries d'OAKs Q : charge, H :Hydrophobicité; b) CD de **I.30** dans le tampon phosphate salin (PBS) (noir), en milieu liposomes 2 mM PC/PG (1:1) (gris) ou PC/PG (3:1) (pointillé) ; c) Dépolarisation de la membrane cytoplasmique de *E. coli* pour une valeur 6 x MICs (plein) et courbes d'activités lytiques correspondantes (pointillé): **I.32** (rond), S4(1-16) (triangle), contrôle négatif (rectangle), a.u : unités arbitraires [57] .

Un seul des composés **I.32** de séquence C₁₂K-7α₄ présente des activités antimicrobiennes intéressantes avec notamment une CMI de 3,1 µM sur *E. coli* et de 6,2 µM sur *P. aeruginosa*. De plus, les HD₅₀ supérieure à 100 µM montrent qu'aucun des composés synthétisés n'est hémolytique. Les analyses par CD dans le TFE mais également en milieu micellaire, confirment que les OAKs ne sont pas structurés (Figure 1.22b). Néanmoins des expériences de fuite de fluorescence montrent que le composé **I.32** est capable de dépolariser la membrane bactérienne d'*E. coli* de la même manière que les contrôles peptidiques utilisés (deux dérivés de peptides antimicrobiens naturels MSI-78 et S4 (1-16)). Il semblerait donc que cet oligomère suive un mécanisme d'action semblable impliquant la déstabilisation de la membrane cytoplasmique (Figure 1.22c).

Fort de ces premiers résultats très encourageants, le groupe s'est ensuite attelé à étudier la relation structure-activité des OAKs en synthétisant une librairie d'une centaine de

composés en variant l'hydrophobicité H (déterminée par chromatographie liquide haute performance à phase inverse) et la charge Q [56].

L'analyse des effets bactériostatiques (sur deux types de bactéries *E. coli* et *S. aureus*, résistante à la méticilline) et du pouvoir hémolytique a permis d'établir des premières conclusions pertinentes quant aux propriétés physicochimiques exigées pour l'activité et la sélectivité de ces oligomères. Il semblerait notamment que les composés possédant une activité antimicrobienne significative soient tous compris dans une fenêtre de rapports « H/Q » bien définies.

Une forte corrélation entre les propriétés d'auto-assemblages des composés et le potentiel hémolytique est de plus observée : ainsi les séries d'oligomères courts (α_4 et α_8) présentent une sélectivité élevée pour les cellules bactériennes avec un taux d'hémolyse extrêmement faible mais n'adoptent pas de conformation particulière lors de l'analyse conformationnelle par spectrométrie CD en milieu aqueux ou en présence de micelles PC/PG. Les OAKs plus longs (**1.36**, de séquence α_{12}), formant des agrégats visibles par CD en milieu aqueux, sont quant à eux hémolytiques ; leur capacité de s'agréger est liée à la longueur des chaînes acyles. Les chaînes à 12 carbones peuvent se replier sur elles-mêmes, créant une boucle hydrophobe qui absorbe la lumière polarisée circulaire. Lorsque plusieurs boucles se rassemblent, elles forment un cœur hydrophobe, créant une superstructure stable et rigide (Figure I.23).

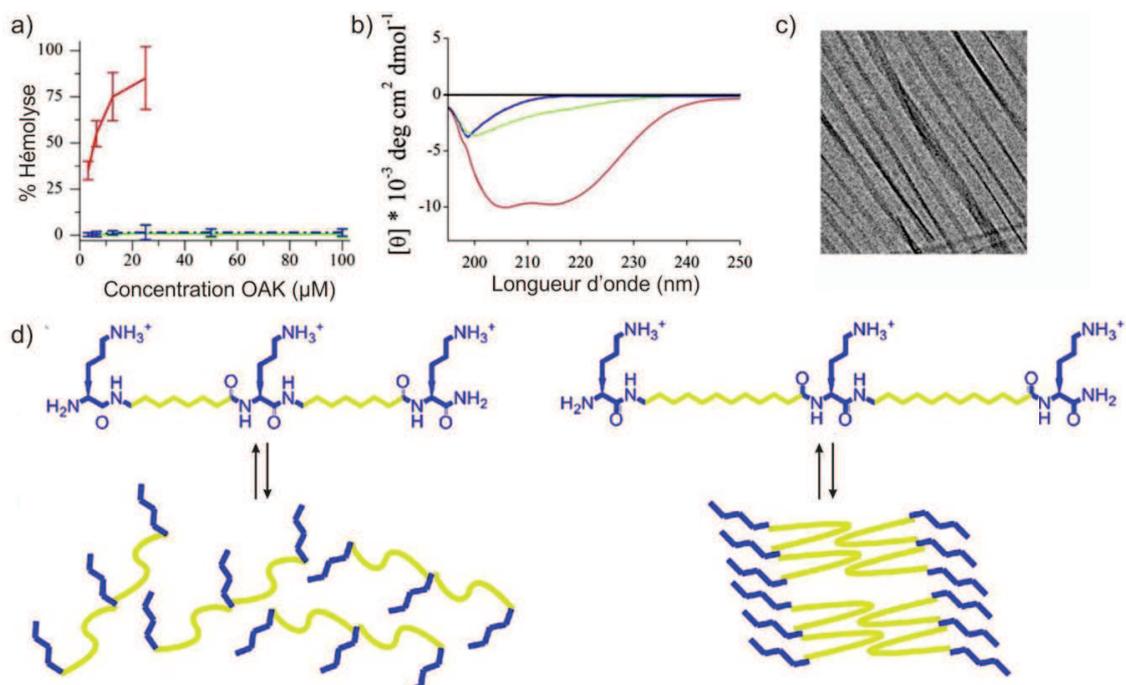


Figure I.23: a) activité hémolytique sur des globules rouges humains de **1.36** $C_{12}K-7\alpha_{12}$ en rouge, en vert, **1.34** ($C_{12}K-7\alpha_4$) en bleu, **1.35** ($C_{12}K-7\alpha_8$) ; b) Spectre de dichroïsme circulaire (100 μ M) dans PBS de **1.36** en rouge, **1.34** en bleu et **1.35** en vert ; c) Image Cryo-TEM d'un α_{12} -OAK à 1 mg/mL (pression = 50 nm) ; d) représentation schématique du modèle de structuration des OAKs en milieu aqueux (C_8 à gauche et C_{12} à droite) [49].

Des travaux plus récents indiquent que les OAKs possèdent plusieurs mécanismes d'action [139,140]. **I.35** provoque la mort de la bactérie par dépolarisation de la membrane alors qu'un composé de séquence $C_{12}K-5\alpha_8$ est capable de pénétrer la membrane cytoplasmique et d'interagir avec les acides nucléiques. Cette différence peut-être expliquée par la différence de charge et une moins bonne interaction du composé $C_{12}K-5\alpha_8$ avec les composantes de la membrane. La différence de potentiel transmembranaire conduit alors à son internalisation. Ces différents mécanismes d'actions ne sont, somme toute, pas surprenants puisqu'il a été récemment démontré que de nombreux peptides naturels antimicrobiens possèdent sur des cibles intracellulaires [22,27].

ii) Les AA-peptides

Les AA-peptides, dont le squelette s'inspire de celui des PNAs (Peptides Nucléiques Acides) chiraux, forment aujourd'hui une nouvelle classe de peptidomimétiques et ont été très récemment développés par le groupe de Cai *et al.* (Figure I.24) [141,142].

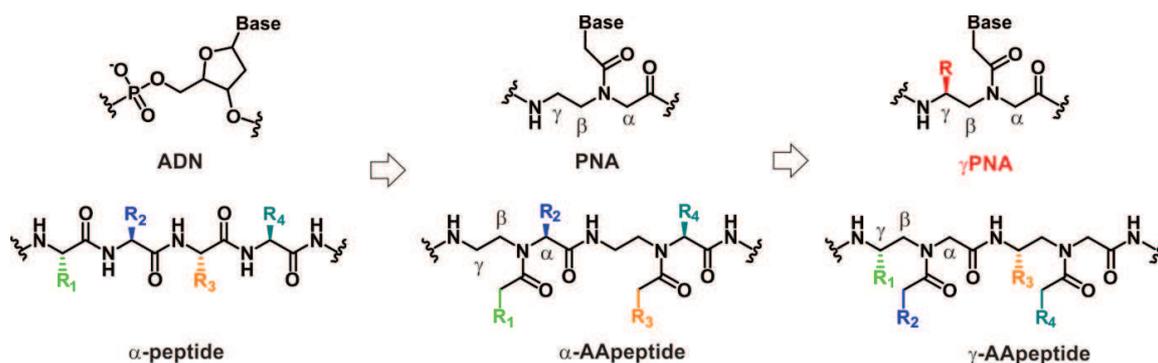


Figure I.24 : Représentation schématique des α -AApeptides et des γ -AApeptides.

Formés à partir d'acides aminés *N*-Acyle *N*-éthylamine, deux sous classes d'AA-peptides ont été développées suivant la position de la chaîne latérale : les α -AApeptides et les γ -AApeptides (Figure I.24). Dans l'unité répétitive des AA-peptides, la chaîne latérale est connectée soit au C_α soit au C_γ . La seconde chaîne est formée par acylation sur l'azote central. Une unité d'AA-peptide est comparable à un dipeptide. Les AA-peptides projettent un nombre de chaînes latérales (et ainsi de groupes fonctionnels) de part et d'autre du squelette identique à celui des α -peptides conventionnels de la même longueur.

Néanmoins, le squelette des AA-peptides est beaucoup plus flexible, les liaisons amides disubstituées pouvant être soit de conformation *cis* ou *trans*. Et à l'heure actuelle, aucune structure secondaire bien définie n'a été démontrée pour ce type d'oligomères.

Ainsi, seule l'amphipathicité globale de la structure en contact avec les membranes est primordiale. Ce principe a pu être appliqué avec succès à cette nouvelle famille de peptidomimes qui montre des activités antimicrobiennes très prometteuses (Figure I.25).

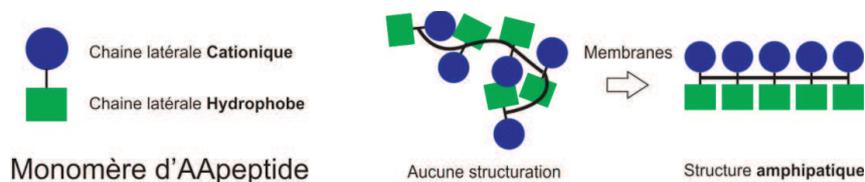
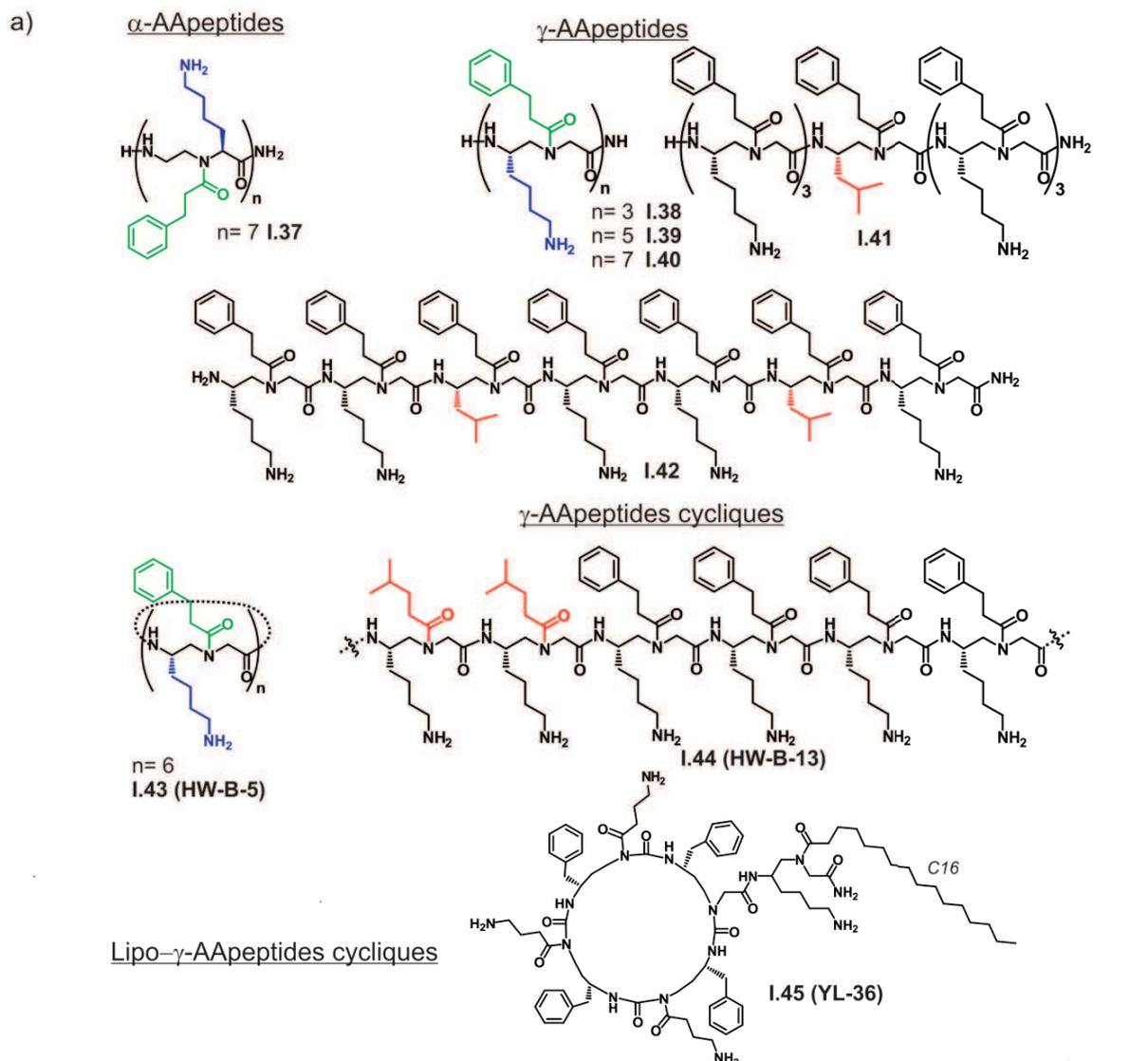


Figure I.25 : Principe de design des AApeptides antimicrobiens [143].

Cai *et al.* ont dans un premier temps travaillé à l'élaboration d'une première série de composés α -AA-peptidiques [144], mais ce sont finalement les γ -AA-peptides qui détiennent les meilleures activités antimicrobiennes avec une très bonne sélectivité (et ce même sur de nombreuses souches résistantes) (Figure I.25) [143,145,146]. Le groupe a, par ailleurs, réalisé des études de relation structure-activité révélant une meilleure activité avec des longueurs de chaînes plus grandes et en ajustant le nombre de groupes hydrophobes (comme ce qui a pu déjà être constaté sur les composés mixtes α -peptide/ β -peptide de Olsen *et al.*). Ainsi on peut observer que les effets bactéricides augmentent entre les composés **I.38** à **I.40**. Les composés **I.41** et **I.42**, possédant un et deux groupements hydrophobes de type leucine en plus par rapport à **I.40**, ont de meilleures activités antibactériennes. Le composé **I.42** présente des CMI supérieure à celle de Pexiganan, peptide synthétique analogue de la magainine en phase clinique III et des activités intéressantes sur des souches résistantes à de nombreux antibiotiques et une CMI de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sur *Bacillus anthracis*. Cependant on note qu'il présente également le taux d'hémolyse ($\text{HD}_{10}/\text{HD}_{50}$) le plus élevé, ce qui réduit son potentiel thérapeutique. L'effort d'optimisation a donc été poursuivi. A cet effet, le groupe de Cai a développé des γ -AApeptides cycliques [147]. La cyclisation permet de conférer une rigidité plus importante et de conforter l'amphipathicité à la surface de l'hôte. De la même manière que dans le cas des structures peptoides développées par Kirchenbaum *et al.*, le groupe a observé une augmentation des activités antimicrobiennes suivant la taille du cycle. De plus, il semblerait que les composés cycliques soient moins cytotoxiques que les composés linéaires. Le composé **I.44** est le composé ayant les activités antimicrobiennes les plus intéressantes, supérieures à celle de Pexiganan mais aussi à celles du composé linéaire **I.42**.



b)

MIC ($\mu\text{g/mL}$)

Composés	I.37	I.38	I.39	I.40	I.41	I.42	I.43	I.44	I.45	Pexiganan
Gram-positif										
<i>B. subtilis</i>	2	>100	5			2	5	1	-	4
"Multidrug" resistant <i>S. epidermidis</i> (MRSE)	10	>100	>100	6,3-12,5	3,1-6,3	3,1-6,3	8	2	1	8
Vancomycine resistant <i>E. faecalis</i> (VREF)	75	>100	>100	12,5-25	12,5-25	3,1-6,3	20	5	3	32
Méticilline resistant <i>S. aureus</i> (MRSA)	75	>100	>100	12,5-25	3,1-6,3	5	25-50	1	2	16
<i>B. anthracis</i>	>100	-	-	25-50	25-50	5	-	-	-	-
Gram-négatif										
<i>E. Coli</i>	4.5	25	25	2,5-5	2,5-5	2,5-5	-	-	2	-
<i>K. pneumoniae</i>	>100	>100	>100	>100	>100	5	>50	8	3	8
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	>50	18	8	5	8-16
Fungus <i>C. albicans</i>	20-30	>100	>100	12,5-25	12,5-25	8	>50	2	-	124
Hémolyse (HD₁₀/HD₅₀)	400/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	400/ >500	75/300	>500/ >500	40/100	- /100	181/495

Figure I.26 : a) Structures chimiques des composés développés par le groupe de Cai *et al.* ; b) Activités antimicrobiennes sur différentes souches bactériennes dont des souches résistantes et *Bacillus anthracis*, ainsi que le taux d'hémolyse des différents AA-peptides.

Enfin, comme pour les peptoïdes, le groupe a étudié l'ajout de chaînes lipidiques, sur les AA-peptides linéaires et cycliques [148-151] (Figure I.26). L'ajout de chaînes lipidiques de type C16 à l'extérieur du cycle contenant seulement 3 unités amphiphiles permet d'obtenir

de meilleures activités antimicrobiennes sur les bactéries de type Gram-positif avec le composé **I.45** (toujours comparé au peptide Pexiganan). A nouveau, de manière similaire aux lipo-peptoïdes cycliques, l'augmentation de la taille du cycle n'entraîne par une augmentation de l'activité antimicrobienne et l'ajout de la chaîne lipidique directement sur le cycle annihile l'activité antimicrobienne.

Pour finir, le groupe a récemment développé des dérivés sulfonamides des γ -AApeptides à la structure hélicoïdale présumée et dont les activités antimicrobiennes ont été démontrées [152].

d) Les structures globulaires : les dendrimères polypeptidiques

Parmi les différentes approches biomimétiques de design de nouveaux composés antimicrobiens, la multimérisation de peptides a récemment été envisagée. Celle-ci a tout d'abord été rendue possible grâce à l'utilisation de dendrimères peptidiques de type poly-lysine [153-157]. Ces macromolécules aux propriétés uniques sur lesquels des peptides antimicrobiens ont été attachés à l'extrémité d'un cœur central d'acide aminé lysine forment des structures globulaires.

Comparé à leurs homologues monomériques, la version dendrimérique des peptides affiche alors une concentration plus localisée des unités bioactives et permet donc une activité accrue. De surcroît, de telles architectures possèdent une stabilité accrue contre les peptidases du fait de la ramification de leurs squelettes.

Tam *et al.* ont été les pionniers dans ce domaine en publiant en 2002 la synthèse divergente de dendrimères poly-L-lysine [158]. Ces macromolécules (Figure I.27, de zéro à deux générations) présentent à leur extrémité des tétra- et octa-peptides terminaux (R4 : Arg-Leu-Tyr-Arg et R8 : Arg-Leu-Tyr-Arg-Lys-Val-Tyr-Gly), possédant le motif de reconnaissance des surfaces bactériennes des peptides antimicrobiens naturels protragrine et tachyplésine. Les différents dendrimères obtenus ont montrés des CMI inférieures à 1 μ M pour une grande variété de bactéries gram-positifs et gram-négatifs tout en possédant une plus faible cytotoxicité que leurs analogues linéaires.

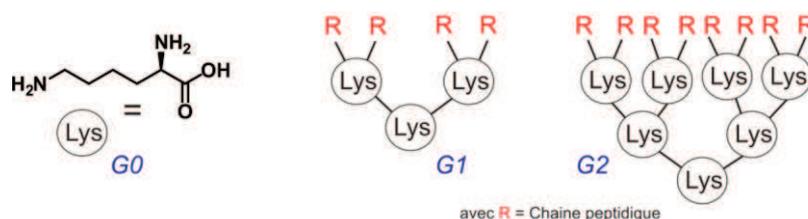


Figure I.27 : Représentation schématique des dendrimères poly-lysine peptidiques développés par Tam *et al.* [158].

Cette stratégie a par la suite été appliquée par de nombreux groupes de recherche [153-157]. A titre d'exemple on peut citer les travaux du groupe de Kallenbach qui a simplifiée la partie peptidique à un dimère de type Arg-Trp (Figure I.28) [154]. Le dendrimère poly-lysine de première génération **I.46** et comportant ce dimère Arg-Trp possède une activité antimicrobienne intéressante sur des souches de *E. coli* résistante à l'ampicilline et à la streptomycine (CMI₅₀= 4,5 µg/mL) et une CMI₅₀ un peu plus élevée de 16 µg/mL sur une souche multi-résistante de *S. Aureus*. Kallenbach *et al.* ont aussi montré que ce dendrimère tétravalent peptidique est aussi actif sur des biofilms d'*E. coli* [159].

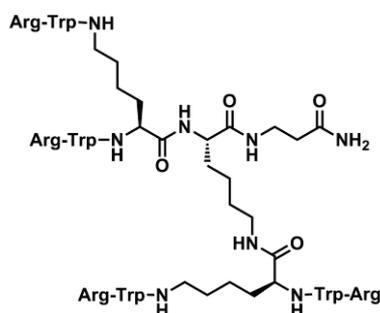


Figure I.28 : Structure chimique de **I.46** (RW)_{4D}.

Enfin, l'utilisation de dendrimères poly-lysines possédant à leur surface des groupements polysaccharides ou lipo-polysaccharides permet d'inhiber l'adhésion d'*E. coli*. Plus précisément, de nombreuses bactéries gram-négatif ont des organelles d'adhésion, appelées *fimbriae*, responsables notamment des infections urinaires. Ce processus d'adhésion est gouverné par l'interaction entre ces *fimbriae* et les mannoses à la surface des cellules épithéliales de la vessie. Lee *et al.* ont synthétisé avec succès des dendrimères poly-lysines possédant 2, 4, 8 et 16 mannoses à leurs surfaces afin d'inhiber l'adhésion de *E. coli* [160].

L'utilisation des dendrimères poly-lysines a ainsi été intensivement étudiée et a permis de nombreuses applications à visée antimicrobienne. Toutefois la stratégie reste limitée à l'affichage de peptides linéaires à la surface de la structure globulaire. Le groupe de Raymond a récemment développé une nouvelle synthèse divergente de dendrimères peptidiques permettant l'incorporation de divers acides aminés directement au cœur et sur les unités de branchements. Contrairement aux structures poly-lysines classiques, ces dendrimères peptidiques varient dans la nature et la taille du cœur dendrimérique ainsi que des branches intermédiaires et terminales. Cette diversité a pu être exploitée pour de nombreuses applications thérapeutiques dont la recherche de nouveaux agents antimicrobiens.

Le groupe a réalisé une bibliothèque de 6750 dendrimères peptidiques par chimie combinatoire sur support solide (synthèse divergente : du cœur vers la périphérie) comportant des chaînes hydrophobes et des extrémités de branche cationiques de type *N*-terminale, de séquence de type $X^4_8(BX^3)_4(BX^2)_2BX^1$ avec *X* un acide aminé variable et *B* représentant une unité de branchement de type lysine ou l'acide diaminopropanoïque (Figure I.29).

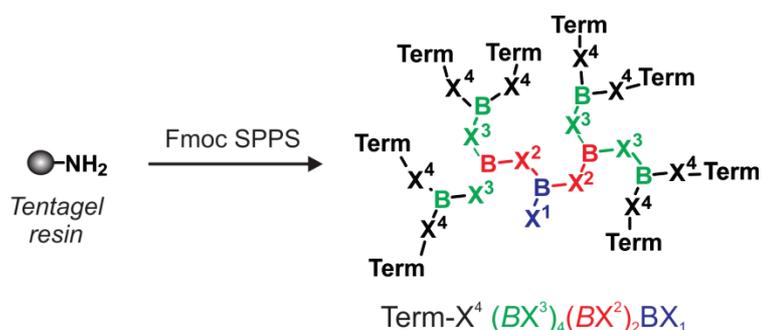


Figure I.29 : Représentation schématique de la synthèse de la chimiothèque de Raymond *et al.* « Term » représente le groupement terminal qui peut être soit omis soit un groupement acétyle ou glycosyle [161].

Ce premier « screening » a montré que deux séquences, **I.47** et **I.48** (Figure I.30), possédaient de très bonnes activités antimicrobiennes comparables au peptide naturel indolicidine et aux précédents dendrimères développés [162].

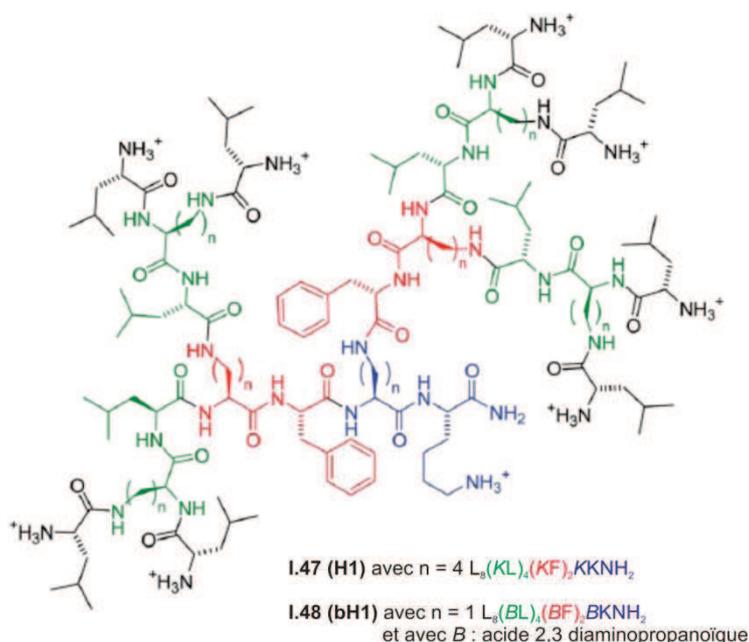


Figure I.30 : Structures chimiques de **I.47** et **I.48**.

Les modifications de séquences sur **I.47** et **I.48** se révélant inefficaces sur l'amélioration des activités antimicrobiennes, le groupe s'est alors focalisé sur la synthèse de dendrimères peptidiques de taille plus importante et possédant un nombre de charges positives plus élevé [163]. Un des composés de la nouvelle série **I.49 (G3KL)**, de séquence

(KL)₈(KKL)₄(KKL)₂KKL, possède de très bonnes activités sur différentes souches de bactéries Gram-négatif multi-résistantes (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*). Des études conformationnelles montrent que le composé n'est pas structuré en solution mais possède de manière globale une conformation globulaire amphipathique.

En conclusion, le développement de mimes synthétiques de peptides antimicrobiens n'a cessé de croître depuis une vingtaine d'années. Une grande variété de structures révèle le nombre conséquent de stratégies adoptées. Ainsi, il a tout d'abord été d'opinion commune qu'il fallait développer des structures amphipathiques hélicoïdales afin d'imiter les propriétés antimicrobiennes des peptides naturels hélicoïdaux tel que la magainine. A cet effet, des structures amphipathiques hélicoïdales de β -peptides et de peptoïdes ont vu le jour. Par la suite, l'étude de la relation structure-activité d'hybrides α/β peptides réalisée par Gellman *et al.* et la découverte de peptides antimicrobiens non hélicoïdaux, ont montré qu'il était possible d'envisager des structures non hélicoïdales mais capables de ségréger la face hydrophobe et la face cationique de part et d'autre de leur structure, comme il est observé pour les structures étendues. De nombreux composés tels que les polyarylamides, les oligomères de phénylène-éthynylène, les oligoacylsines et encore plus récemment les AA-peptides font partie de cette catégorie. Bien que non abordée dans cette partie bibliographique, l'utilisation de systèmes encore plus flexibles comme les polymères synthétiques antimicrobiens ou comme les SAMPs (courtes séquences peptidiques modifiées qui seraient trop petites pour être dégradées par les protéases et les peptidases), ouvre à l'heure actuelle un vaste champ d'exploration [55,164,165]. Enfin en marge de ces structures usuelles, la multimérisation de peptides, par des dendrimères donne aussi naissance à des structures globulaires plus atypiques mais tout aussi efficaces. Malgré cette grande pluralité de structures, il est clair que les relations structures-activités mettent en exergue le rôle clé du ratio hydrophobicité/hydrophilicité afin de garantir une activité antimicrobienne et certaine sélectivité vis-à-vis des cellules eucaryotes. De plus, il semblerait que l'hydrophobicité impacte la toxicité des composés. De part cette grande diversité et une vision plus précise des paramètres nécessaires à leur conception d'agents antimicrobiens actifs et sélectifs, il n'y a aucun doute qu'à l'heure où beaucoup d'agents pathogènes ont développé des résistances aux antibiotiques, les mimes synthétiques représentent des candidats viables pour de futures applications thérapeutiques et notamment pour de possibles études *in vivo*.

2. Un nombre d'applications *in vivo* limité

Dans la recherche de nouveaux agents antimicrobiens, les études *in vivo* sont l'une des étapes essentielles et permettent de pouvoir définir quels composés parmi les têtes de séries obtenues *in vitro* seront testés en phase clinique chez l'homme et à quelle dose. Lors de ces études, deux disciplines sont définies : la pharmacocinétique (PK) et la pharmacodynamie (PD). La pharmacocinétique est l'étude de l'influence de l'organisme sur la substance active, c.-à-d., l'étude des paramètres de l'absorption (est que le principe actif peut atteindre la circulation sanguine à partir du site d'administration?), la distribution (est-ce que le principe actif peut atteindre le site d'action?), le métabolisme (est-ce que le principe actif est transformé par le système enzymatique?) et l'excrétion (par voie urinaire, biliaire ou par les selles). L'étude de la pharmacodynamie permet pour sa part de définir ce que la substance active fait à l'organisme, c.-à-d., la relation entre la dose et la réponse. L'intégration de ces études dans le développement de nouveaux composés thérapeutiques permet de guider le processus décisionnel conduisant à l'optimisation des composés têtes de séries de faire le lien entre la caractérisation *in vitro* et l'évaluation clinique des agents antimicrobiens [166,167]. Afin de réaliser ces différentes études *in vivo*, comme il est impossible d'exposer des humains à des agents pathogènes potentiellement mortels, des modèles animaux sont utilisés.

Au cours des quarante dernières années, les rongeurs, en particulier les souris, se sont avérés être les animaux les plus utilisés pour le développement de modèles d'infection. En effet, l'expérimentation sur des souris offre un certain nombre d'avantages : elles sont faciles à élever et à reproduire, elles possèdent une courte gestation et un faible coût. De plus, le problème d'éthique est moins important par rapport à l'expérimentation sur d'autres mammifères comme les chimpanzés ou les chiens par exemple. Enfin, les souris sont aussi génétiquement manipulables et facilement dissécables. Cependant, en dépit de ces avantages, les souris sont souvent résistantes à bon nombre d'agents pathogènes qui causent la maladie chez l'homme par leur processus métaboliques et leurs mécanismes de défenses. Dans le cadre des études de pharmacodynamie, pour pallier cette difficulté, les souris sont rendus immuno-déficientes avant l'infection par le pathogène ce qui permettra à l'infection de se développer plus facilement. Toutefois, cette immunodépression n'est pas vraiment représentative des infections naturelles où le plus souvent, le système immunitaire n'est pas déprimé. Plus récemment, des souris humanisées, c'est-à-dire des animaux

exprimant des gènes humains et/ou hébergeant des tissus humains, ont aussi été développées dans le but de remédier à la résistance au pathogène ciblé [168].

Un autre problème méthodologique qui limite l'extrapolation simple des données animales à l'homme (et d'autant plus pour les rongeurs) tient à la différence en termes de pharmacocinétique. En effet plus l'animal est petit et plus, la clairance est élevée et la demi-vie d'élimination courte, rendant la pharmacocinétique éloignée de celle de l'homme. Pour éviter ce problème et fournir des données qui ne sont pas entachées d'un biais méthodologique majeur, l'approche expérimentale consiste à étudier chez le petit animal une multitude de doses différentes ou d'induire une insuffisance rénale ponctuelle grâce à l'administration de nitrite d'uranyle [166,169].

Enfin, pour l'étude des infections bactériennes, différents modèles PK/PD d'animaux peuvent être utilisés suivant le pathogène ciblé et fournissent de nombreuses informations essentielles sur des processus de l'infection dans une approximation de leur contexte naturel. Les modèles les plus couramment utilisés sont les modèles systémiques ou celui de l'infection de la cuisse. Mais il existe aussi de nombreux modèles plus spécifiques à un organe afin de comparer par exemple une activité antibactérienne à celle d'un traitement de référence et d'étudier la diffusion tissulaire comme l'endocardite infectieuse (infection des valves cardiaques), l'ostéite (infection du tissu osseux), la pneumopathie, la méningite expérimentale, de la blessure (infection bactérienne provoquée sur une brûlure, une excision ou une abrasion de la peau de l'animal) ou encore un modèle d'infection des voies urinaires [169,170].

Le modèle systémique par voie intra-péritonéale a été le premier modèle animal utilisé afin de démontrer l'efficacité des sulfonamides contre *Streptococcus pyogenes* en 1935. Il est à ce jour l'un des deux modèles les plus utilisés pour l'évaluation préclinique *in vivo* de l'efficacité des antibactériens. L'animal (dans la plupart des exemples des souris) est rendu neutropénique (immuno-déficient) par l'administration de 100-150 mg/kg de cyclophosphamide une fois par jour pendant trois jours. L'animal est ensuite infecté par une injection intra-péritonéale de 0,1-0,5 ml d'une suspension bactérienne. L'antibiotique peut alors être administré par les différentes voies d'administration. Les points finaux pour ce modèle peuvent être la morbidité (% de survie) et la charge bactérienne (CFU) dans le sang [169,170].

Le modèle d'infection de la cuisse de souris immunodéprimée a été quant à lui, utilisé la première fois en 1950 par Eagle *et al.* pour tester les effets de la pénicilline G sur

différents streptocoques [171]. Le modèle consiste en une injection intramusculaire d'une suspension de la souche bactérienne choisie sous légère anesthésie, le composé antibactérien examiné est administré après un délai défini. L'efficacité de l'agent antibactérien est ensuite généralement déterminée en comparant le nombre de bactéries restantes chez les souris traitées à celui des souris non traitées. De par sa facilité de mise en place, de nombreuses combinaisons antibiotique-bactérie ont été étudiées dans ce modèle [169,170]. Pour finir, un certain nombre de modèles animaux d'infection a été aujourd'hui adapté à l'utilisation de bactéries luminescentes, permettant le suivi de l'infection chez l'animal vivant de manière non invasive. Toutefois, la sensibilité de la bioluminescence est généralement inférieure comparée aux méthodes de comptage viables [172,173].

Il est possible à présent de comprendre que les études *in vivo* sur les modèles animaux sont une étape clé du développement des composés à visée thérapeutique mais que le choix du modèle et sa mise en place reste encore aujourd'hui compliqués. Il faut adapter le modèle au pathogène et au composé testé. Si un modèle sur petit animal est utilisé, l'immunodéficience nécessaire à la possible infection rend le modèle plus « artificiel » et les paramètres de pharmacocinétique doivent être analysés avec prudence et être seulement considérées comme des données préliminaires.

Déjà évoqué en introduction, le développement des études PK/PD sur des modèles d'animaux *in vivo* des peptides naturels antimicrobiens comme nouveaux agents thérapeutiques a vite été freiné par un majeur inconvénient. Les AMPs possèdent un mauvais potentiel pharmacocinétique.

Tout d'abord, leurs activités peuvent être considérablement affectées par les conditions physiologiques de par un fort antagonisme avec les différentes espèces anioniques présentes dans le sang, les organes, les muqueuses ou encore dans les liquides corporels. L'activité antimicrobienne du peptide cathélicidine humain est par exemple sévèrement atténuée en tampon salin physiologique [174]. Ensuite, les AMPs possèdent une faible résistance contre la protéolyse. Ils sont rapidement dégradés (temps de demi-vie de 2 min [28]) par les enzymes digestives de type trypsine ou chymotrypsine présentes dans le sérum du sang, ce qui limitent leur voie d'administration à la voie topique [175]. Comme nous avons pu le voir précédemment, un effort considérable a été réalisé dans la recherche de nouveaux peptidomimes, où l'incorporation d'éléments non naturels suggère une meilleure stabilité protéolytique. Cependant malgré de très bonnes activités antimicrobiennes *in vitro* pour certains, très peu d'études PK/PD *in vivo* ont été réalisées,

montrant l'ampleur de la tâche restant à accomplir. Les seuls exemples que nous avons identifiés dans la littérature et qui seront développés ci-après sont : (i) les études de pharmacocinétique et de biodistribution de β -peptides par Seebach *et al.* [176] et de dérivés peptoïdes marqués par un complexe DOTA-cuivre (*cf. vide infra*) par Barron *et al.* [177], (ii) l'évaluation *in vivo* dans des modèles d'infection de certains peptoïdes, de foldamères d'arylamides développés par le groupe de Degrado [129] et enfin d'oligomères d'acyle-lysines par Mor *et al.* [57].

a) Evaluation de la pharmacocinétique et de la biodistribution des mimes synthétiques de peptides antimicrobiens

i) Les β -peptides

Seebach *et al.* ont été les premiers à étudier de manière approfondie les caractéristiques pharmacocinétiques de mimes synthétiques de peptides antimicrobiens [178]. Pour leur part, ils ont évalué les paramètres pharmacocinétiques et de biodistribution chez la souris d'un β -nonapeptide cationique amphiphile **I.5₃** H(β^3 -HAla- β^3 -HLys- β^3 -HPhe)₃-OH, marqué au carbone-14 sur les deux carbones CH₂-C=O du résidu central β^3 -HPhe (décrit dans le paragraphe 1.a.i). Toutefois, ce composé n'a pas démontré d'activité antimicrobienne *in vitro* et par conséquent aucune étude *in vivo* de pharmacodynamie n'a été réalisée [73].

Après administration intraveineuse (i.v.) de 5 mg/kg de **I.5₃** à des rats, la métabolisation *in vivo* est négligeable (il est en effet retrouvé intact dans les urines, le plasma et les selles). Une baisse initiale rapide (0-8 h post-dose, temps de demi-vie d'une heure) des niveaux du composé **I.5₃** dans le sang et le plasma, est observée, suivie d'une baisse plus lente (8-96 h post-dose, temps de demi-vie d'environ 30 h). Au bout de 96 h, 53 % de la radioactivité est toujours présente dans le corps du rat. L'élimination du β -peptide est donc extrêmement lente comparé à celle observée pour les AMPs. L'étude de la biodistribution du composé par quantification de la radioactivité retrouvée dans les différents organes indique que le rein est de loin l'organe dans lequel s'accumule le plus de composé avec une radioactivité identique jusqu'à 168 h. De fortes concentrations ont aussi été retrouvées dans d'autres tissus comme les ganglions lymphatiques, le cartilage et le foie, tandis que les concentrations les plus basses ont été constatées dans les tissus adipeux et le cerveau (Figure I.31). L'étude de l'élimination du composé chez des rats dont les voies biliaires ont été canulées afin de récupérer la bile, permet de montrer que l'élimination du composé se réalise de manière prédominante par le système intestinal. En effet, voies

biliaires canulées ou non, le composé est toujours retrouvé majoritairement dans les selles. Enfin, une radioactivité négligeable est observée dans la circulation sanguine après l'administration orale de **I.5₃** (10 mg/kg) indiquant une absorption négligeable ; la dose orale entière est récupérée intacte dans les selles 96 h après.

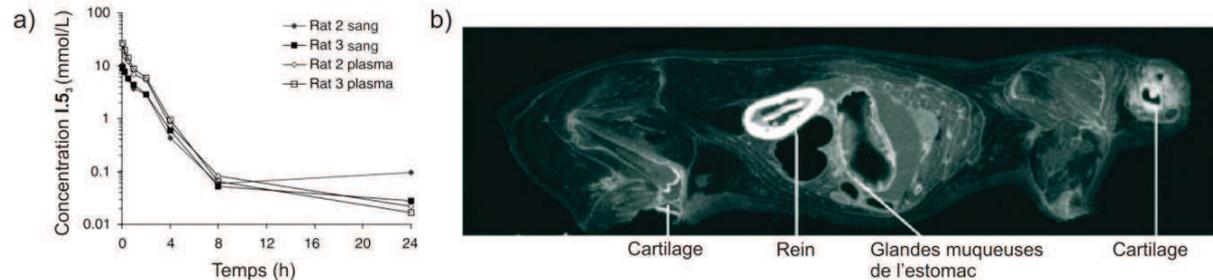


Figure I.31 : a) Concentration de la radioactivité ($\mu\text{mol/L}$) dans le sang et le plasma des rats après injection i.v. de 5 mg/kg de **I.5₃** b) Autoradioluminogramme du corps entier du rat sacrifié 5 min après l'injection i.v. de 5 mg/kg de **I.5₃** [177].

ii) Les peptoides

Plus récemment, le groupe de Baron s'est attelé à évaluer comment les différences structurales entre peptides et peptoides pouvaient affecter la pharmacocinétique *in vivo* [177]. Des études de biodistribution et de tomographie d'émission de positron (PET) sur petit animal ont été réalisées à partir d'une petite série de peptoides complexés à un système cuivre ⁶⁴-acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique (DOTA) (Figure I.32) [177].

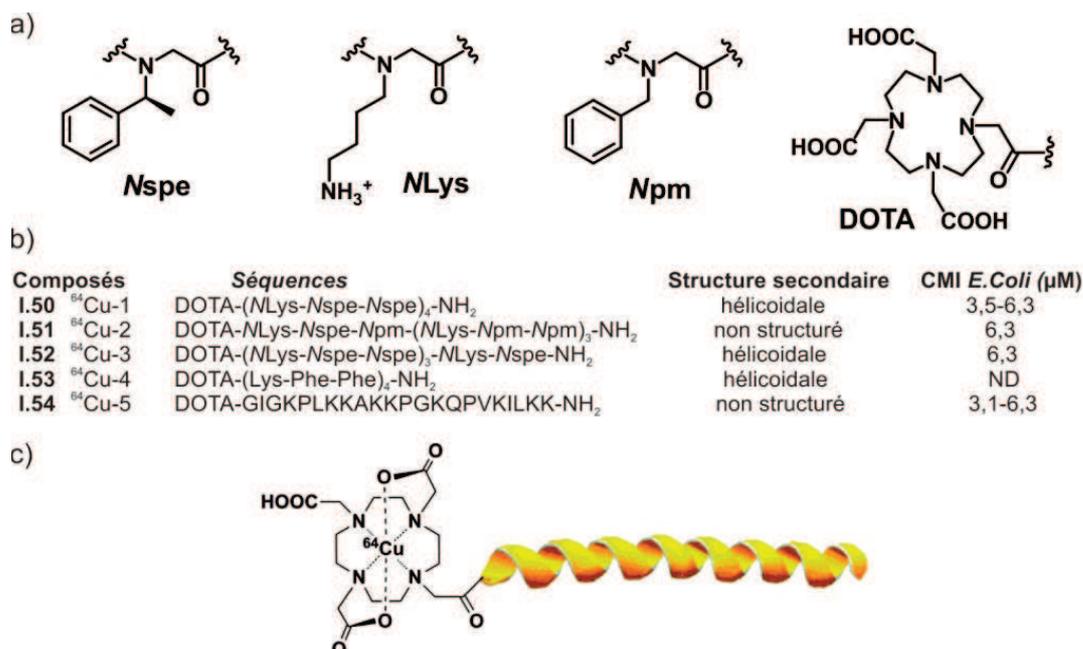


Figure I.32 : a) Structures chimiques des différents unités peptoides et du DOTA ; b) Séquences des composés testés, ainsi que leur structuration et la CMI en μM sur *E. coli* ; c) Représentation schématique des complexes formés [177].

Trois peptoïdes conjugués en N-terminal à du DOTA complexés à du ^{64}Cu (**I.50**, **I.51**, **I.52**) ont été testés en les comparant à leur analogue peptidique (**I.53**) et à une séquence peptidique dérivée de Pexiganan (**I.54**). **I.50** et **I.52** adoptent des structures hélicoïdales et sont de séquences presque identiques. **I.52** possède néanmoins une hydrophobicité plus faible en possédant un résidu *Nspe* de moins. **I.51**, pour sa part, n'est pas structuré en milieu aqueux mais uniquement en présence de lipides membranaires anioniques [177]. Les résultats de cette étude *in vivo*, confirment tout d'abord la meilleure stabilité protéolytique des peptoïdes puisque 95 % des complexes radioactifs restent intacts après 1 heure d'incubation à 37°C. Cette différence d'élimination est confirmée par les images par tomographie par émission de positons (PET) (Figure I.33b). Au niveau de la biodistribution, les expériences montrent une accumulation majeure des peptoïdes **I.50** et **I.51** dans le foie après 2 heures et 24 heures. De manière surprenante, le composé **I.52** s'accumule pour sa part dans les reins, comme les peptides témoins (**I.53** et **I.54**) (Figure I.33). Le composé **I.52** ne diffère pourtant que d'un seul résidu hydrophobe en moins par rapport **I.50**. On peut donc de nouveau constater l'importance du ratio hydrophobe/hydrophile mais cette fois sur la réponse *in vivo*. **I.50** et **I.51** montrent des réponses similaires bien que le composé **I.51** ne soit pas pré-structuré. Il semblerait donc ici que la structure secondaire ne soit pas déterminante pour l'activité *in vivo*.

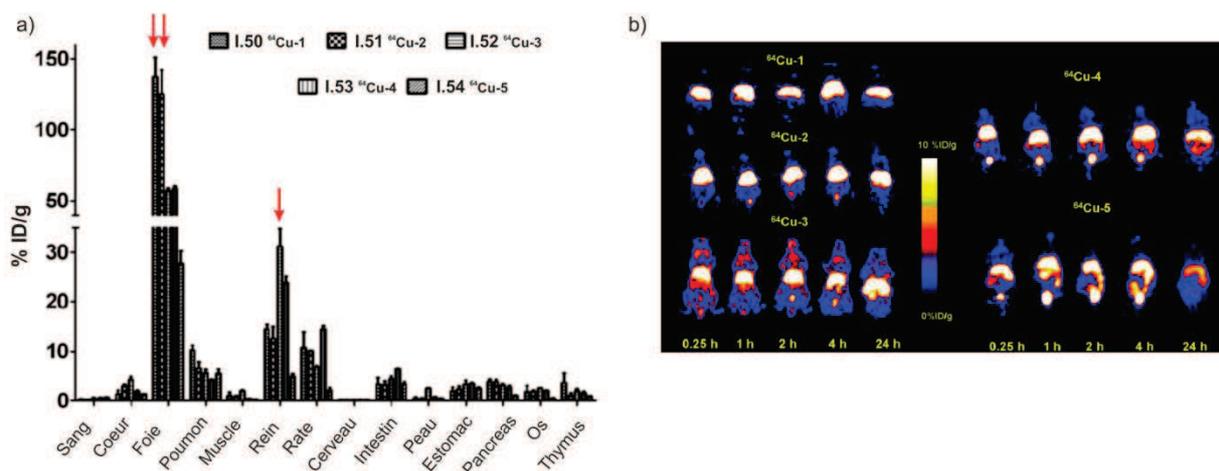


Figure I.33 : a) Biodistribution des complexes chez la souris après 2h ; b) Image PET des différentes souris traitées en intraveineux par les différents complexes au cours du temps [177].

Enfin, différentes voies d'administration (intraveineuse, intra-péritonéale ou orale) ont été examinées pour le peptoïde **I.50**. Lorsque celui-ci est administré oralement une faible biodisponibilité, proche de celle des α -peptides et des β -peptides développés par le groupe de Seebach est observée. **I.50** atteint le système digestif (en particulier l'estomac) mais n'atteint pas la circulation sanguine. L'administration intra-péritonéale (i.p.) permet

une importante biodisponibilité au niveau du système gastro-intestinal (intestin, colon, estomac, rein, foie, rate, pancréas) avec des activités persistantes jusqu'à 24 heures.

Ces études très complètes et uniques à ce jour, démontrent de fait le potentiel des peptoïdes en tant que futurs agents thérapeutiques.

b) Efficacité *in vivo* des mimes synthétiques des peptides antimicrobiens

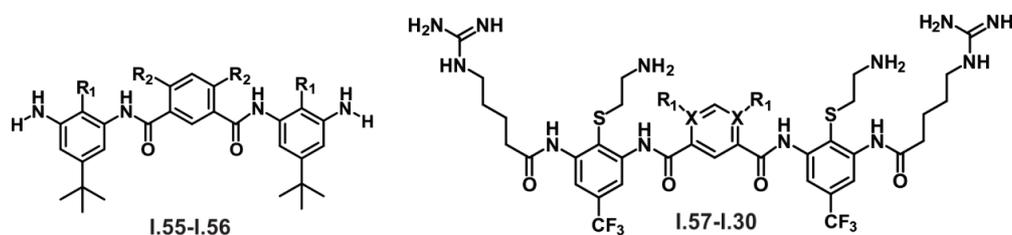
i) Les peptoïdes

A la fin des années 90, la société Chiron a montré qu'une seule dose juste après infection, de 10 mg/kg du trimère **I.14** CHIR29498 (Figure I.13), par administration i.p. traite de manière complète l'infection par *S. aureus* dans un modèle systémique de souris [101]. En outre, 50 % des souris survivent lorsqu'une administration de 30 mg/kg a lieu 110 minutes après l'infection.

Le groupe de Barron, après avoir mené une étude de relation-structure activité intensive à partir de leur peptoïde précurseur hélicoïdale **I.15** (NLys-Nspe-Nspe)₄ a aussi démontré son efficacité *in vivo*. Ce peptoïde réduit l'infection de *S. aureus* de 75 % lorsque 4 mg/kg sont administrés par voie i.p. quatre heures après l'infection [95] (toutefois, il est à noter que ces données indiquées par Barron *et al.* dans cette revue n'ont pas donné suite à de publications).

ii) Les arylamides

Le groupe de Degrado a développé de courts foldamères de type arylamide mimant les peptides antimicrobiens. Comme, nous l'avons résumé dans les paragraphes précédents (*cf.* 1.b.i), des études préliminaires ont montré que sous la contrainte imposée par le réseau de liaisons hydrogène intramoléculaires, la conformation se rigidifie et augmente l'activité *in vitro* sur *S. aureus* et *E. coli*. Le modèle murin d'infection de la cuisse a été utilisé afin de confirmer le maintien de ces activités de *in vitro* à *in vivo* pour les composés **I.55**, **I.56**, **I.57** et **I.30** (Figure I.34) [129]. Après l'infection de la cuisse de la souris par *S. aureus*, une injection de composé est réalisée par administration intraveineuse.



	X	R ₁	R ₂	MIC (μM)		Hémolyse (HC ₅₀) Erythrocyte (μM)
				<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
I.55	-	O(CH ₂) ₂ NH ₂	S(CH ₂) ₂ NH ₂	5	0,7	593
I.56	-	O(CH ₂) ₂ NH(NH)NH ₂	S(CH ₂) ₂ NH(NH)NH ₂	2,1	0,5	492
I.57	C	OCH ₃	-	2,1	0,5	73-103
I.30	N	-	-	0,2	0,1	61

Figure I.34 : Structures chimiques des composés **I.55-I.57** et **I.30**, leurs activités antimicrobiennes sur *E. coli* et *S. aureus* et leurs effets hémolytiques sur des erythrocytes en μM avec une masse moléculaire pour **I.57** = 975 g/mol et une masse moléculaire pour **I.30** = 915 g/mol [129].

Les composés **I.55** et **I.56** permettent une protection partielle contre *S. aureus* identique à celle obtenue avec la vancomycine, l'antibiotique conventionnel pour ce type d'infection (Figure I.35a). Ensuite, le composé **I.57** administré en deux fois avec un intervalle de six heures entre les injections, montre une activité significative à des doses de 10 mg/kg, de 2 mg/kg, ou de 1 mg/kg. À une dose de 10 mg/kg de **I.57**, une forte diminution de 4 log₁₀ de CFU est observée, par comparaison la vancomycine ne permet une telle réduction qu'à sa dose maximale de 30 mg/kg i.v. dans ce type de modèle d'infection de la cuisse (Figure I.35b).

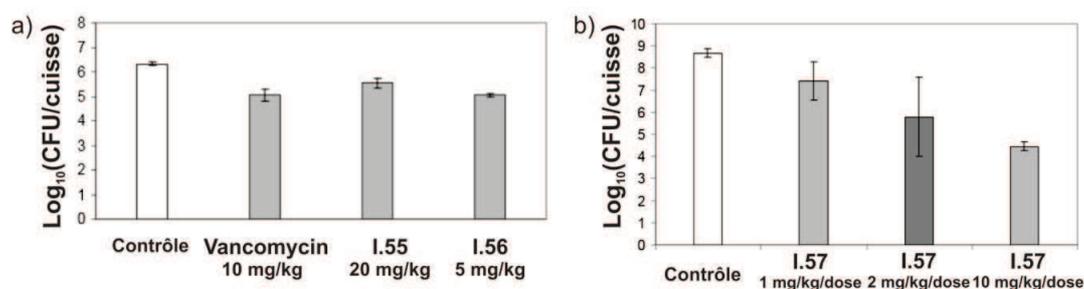


Figure I.35 : Efficacité *in vivo* en a) des composés **I.55** et **I.36** et en b) du composé **I.57** sur le modèle de l'infection de la cuisse de la souris neutropénique [129].

Inopinément, une augmentation de l'activité de la molécule **I.57** est observée en espaçant le temps entre les deux injections. Cet effet pourrait être lié à la distribution dans le corps de la souris et aux paramètres pharmacocinétiques de **I.57** qui n'ont pas été étudiées (Figure I.36). Le composé **I.30** permet aussi d'obtenir aussi de très bonnes activités à des doses inférieures à celle maximale tolérée (de 20 mg/kg sans toxicité pour la souris). Par contre, son activité se révèle plus complexe que celle de **I.57** puisque à de plus faibles doses (à 1 mg/kg) **I.30** n'est que partiellement actif et des variations de réponses considérables ont été observées suivant le temps entre les deux injections (Figure I.36). Comme il a déjà pu être constaté lors

de l'étude de biodistribution des peptoïdes par Barron *et al.*, le changement structural peut considérablement changer l'activité *in vivo* et il devient alors difficile d'extrapoler les résultats *in vitro*. Enfin, l'analyse de la pharmacocinétique du composé **1.30** a aussi été réalisée : quelle que soit la dose injectée en i.v. un temps de demi-vie dans le plasma de 0,8-0,9 heures est obtenu avec des concentrations supérieures à la CMI.

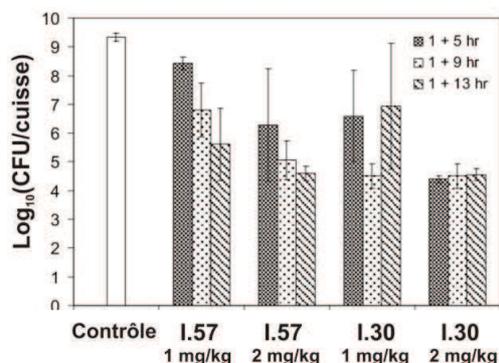


Figure 1.36 : Efficacité *in vivo* avec deux injections espacées de 4, 8 et 12 heures des composés **1.57** et **1.30** sur le modèle de l'infection de la cuisse de la souris neutropénique.

La poursuite de ces études et l'optimisation de ces composés ont conduit à la découverte de la Bralacidine [131,179] (ou PMX30036) (Figure 1.37), qui est aujourd'hui développé par l'entreprise Cellceutix Corporation (<http://cellceutix.com/#sthash.JURSDPub.dpbs>). Cet arylamide, substitué par quatre groupements cationiques de type guanidinyne et pyrrolidinyne, ainsi que par deux groupements trifluorométhyle, a passé les phases cliniques I et II. Il est actuellement en attente de phase clinique III pour le traitement des infections aiguës bactériennes de la peau et des tissus mous par le staphylocoque doré (*S. aureus*). Testé sur plus de 300 patients, une seule dose de Brilacidine équivaut à 7 jours de traitement avec la daptomycine (un lipopeptide antibiotique généralement utilise pour ce type d'infection), avec au minimum 20 % de diminution de la zone infectée en 48-72 heures (<http://cellceutix.com/brilacidin/#sthash.GnOCzGyC.-xWTSsedb.dpbs>). Des études mécanistiques ont mis en évidence que la Bralacidine agit bien par perturbation des membranes cellulaires mais ce foldamère agirait aussi sur les protéines cytoplasmiques [180].

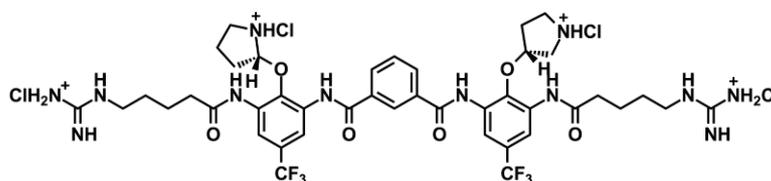


Figure 1.37 : Structure chimique de la Brilacidine.

iii) Les oligoacyllsines

Le groupe de Mor a mené des études *in vivo* avec leur composé de référence, **I.35** ($C_{12}K-7\alpha_8$, précédemment cité) en utilisant un modèle murin de type systémique. Une seule injection intrapéritonéale (i.p.) dans l'abdomen de 4 mg/kg de ce composé permet la survie de souris neutropéniques infectées par *E. coli* (Figure I.38 a et b). Les tests de toxicité montrent qu'aucun effet indésirable n'est constaté après l'administration i.p. de 10 mg/kg de **I.35**, chez une souris neutropénique. Toutefois, après l'injection de 20 mg/kg, 3 souris sur 12 décèdent. Enfin, la stabilité métabolique a été aussi confirmée : l'analyse du sang après administration i.p. de **I.35** montre qu'il n'est pas dégradé même après plusieurs heures, ce qui n'est de nouveau pas le cas des peptides naturels antimicrobiens témoins (Figure I.38c).

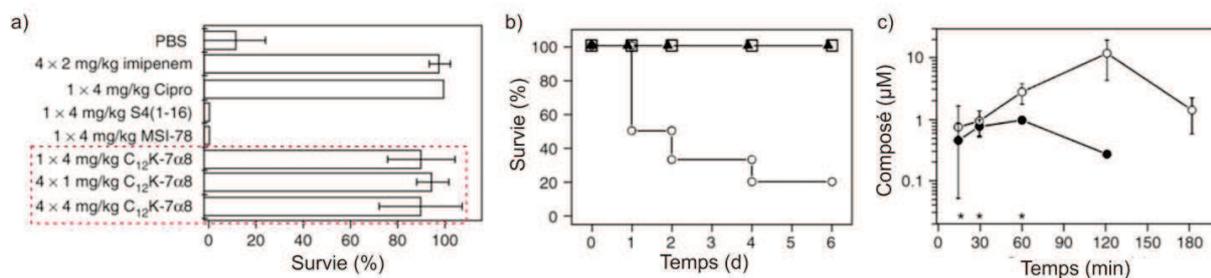


Figure I.38 : a) Survie de souris neutropéniques inoculées par injection i.p. d' *E. coli* ($4.2 \pm 1.2 \times 10^6$ CFU) et traitées en i.p. de sérum (PBS), de deux antibiotiques (Imipenem, Ciprofloxacine), de deux peptides antimicrobiens (S4(1-16), MSI-78) et de **I.35** ; b) Survie de souris infectées par $2,5 \times 10^6$ CFU et traitées par quatre doses d'imipenem à 2 mg/kg (carré), une dose de **I.35** mg/kg (triangle) ou PBS (cercle) ; c) Concentration dans le plasma de **I.35** après son administration i.p. de 100 (rond plein), 250 (rond vide) µg/poids souris et concentration dans le plasma après 100 µg/poids souris de S4(1-16) (astérisques) [57].

Finalement le groupe de Mor a récemment publié de nouveaux oligomères, dans lesquels la chaîne acyle en position N-terminale a été substituée par des chaînes éthyléniques et possédant cette fois des activités *in vivo* intéressantes sur des bactéries Gram-positif de type *S. aureus* [181]. Ces groupements limitent l'agrégation des composés, jugée facteur limitant de l'interaction avec les membranes bactériennes.

En conclusion, peu d'études *in vivo* sur les mimes synthétiques des peptides naturels antimicrobiens ont été réalisées. Ces nouvelles architectures moléculaires non naturelles possèdent une résistance protéolytique élevée et un choix rationnel de leurs compositions permet d'obtenir des composés de faible toxicité, *in vitro* comme *in vivo*. Les groupes de Barron et de Seebach ont publié les seules études approfondies de biodistribution et de pharmacocinétique de peptidomimes antimicrobiens. Dans les deux études, on retrouve après administration i.v. une rapide distribution de la molécule dans les organes et les tissus, dans lesquelles on peut retrouver (majoritairement dans le foie et les reins) une forte concentration sans dégradation du composé jusqu'à 24 heures après l'injection.

Malheureusement dans les deux cas, l'administration orale des composés ne permet pas d'atteindre la circulation sanguine. Enfin, les travaux de Barron suggèrent qu'un changement mineur de séquence ainsi que dans le ratio hydrophobe/cationique peut avoir de grandes conséquences sur le site d'accumulation du composé et que de manière similaire à ce qui a pu être constaté avec les activités *in vitro*, la structuration n'est pas un critère déterminant. Enfin, par les quelques exemples d'efficacité *in vivo* cités, une bonne corrélation entre les activités *in vitro* et *in vivo* peut être constatée puisque les « têtes de séries » restent actives *in vivo* sans pour autant présenter une forte toxicité apparente. Il reste cependant impossible de prédire l'activité et la cinétique *in vivo* de ces composés.

3. Les oligourées antibactériennes

a) Présentation et caractérisation structurale

Parmi les différentes classes de foldamères décrits dans la littérature, les oligomères aliphatiques, comportant des liens urées entre des unités de type éthylène diamine, ont suscité une attention croissante au cours des quinze dernières années. Décrits pour la première fois en 1995 par Burgess *et al* [182,183], ces oligomères de type oligourées *N,N'*-liées sont des aza-analogues des γ -peptides dans lesquels les motifs amide ($\text{CH}_2\text{-CO-NH}$) ont été substitués par des liaisons urées (NH-CO-NH). Le lien urée partage des caractéristiques communes avec le lien amide comme la rigidité, la planéité, la polarité et la capacité à former des liaisons hydrogène. Toutefois il diffère par certains paramètres : le moment dipolaire de l'urée est supérieure à celui de l'amide [184], son caractère de double liaison est diminué et les barrières d'énergie de rotation sont plus faibles pour l'urée (de 10-12 Kcal/mol contre 16-20 Kcal/mol pour les amides). Enfin ces oligomères d'urées possèdent un NH supplémentaire susceptible de donner une liaison hydrogène additionnelle par rapport à leurs homologues oligoamides (Figure I.39). Les propriétés de repliement de ces foldamères peptidomimes ont fait l'objet d'études approfondies dans notre laboratoire.

Des études structurales en solution [187-190] et à l'état solide [191,192] ont tout d'abord permis de montrer que les oligourées *N,N'*-liées dérivant d'acide α -aminés de configuration (L) (Figure I.39) adoptent une hélice-2,5 droite bien définie, apparentée à l'hélice-(P)-2,6₁₄ des γ -peptides. La présence des liens urées permet la formation d'un réseau de liaisons hydrogène intramoléculaires à 3 centres fermant des pseudocycles à 12 et 14 atomes résultant des liaisons hydrogène $\text{C=O}_{i\dots}\text{HN}'_{i-2}$ et $\text{C=O}_{i\dots}\text{HN}_{i-3}$ (Figure I.39).

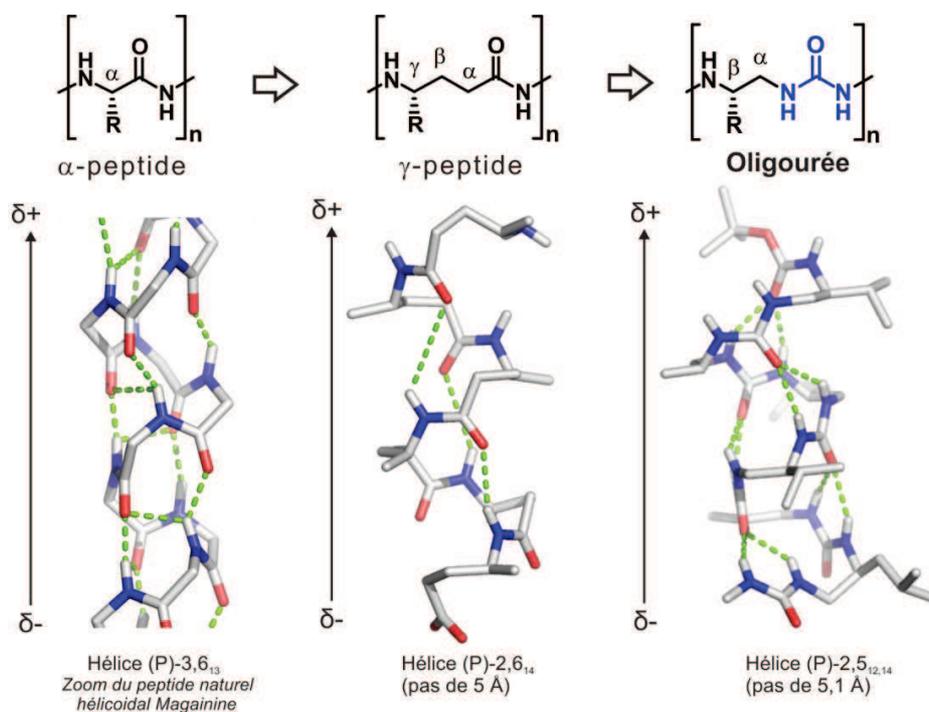


Figure I.39 : Comparaison des structures cristallines d'une hélice de α -peptide [20] (zoom sur une partie de la structure du peptide naturel antimicrobien magainine, PDB : 2MAG), de γ -peptide [185] et d'oligourée [186].

Différentes méthodes d'analyses structurales ont été utilisées pour caractériser ces structures hélicoïdales en solution. Les études en solution par résonance magnétique nucléaire (RMN) réalisées dans différents solvants (pyridine, MeOH, DMSO, AcCN) ont tout d'abord montré que les signaux correspondants aux NHs étaient fortement dispersés, et ce quelque-soit la température d'analyse, signe qu'ils sont par conséquent impliqués dans des liaisons hydrogène. De plus, des valeurs élevées (≈ 9 -10 Hz) de constantes de couplage vicinal 3J (NH, $^{\beta}\text{CH}$) caractérisant un arrangement anti-périplanaire de ces protons NH et $^{\beta}\text{CH}$ de la chaîne principale ainsi qu'une forte diastéréotopie des protons $^{\alpha}\text{CH}_2$ déterminée par des écarts de déplacement chimique ($\Delta\delta$) (allant jusqu'à 1-1,5 ppm pour les résidus centraux) dans ces structures en hélice ont été enregistrées (Figure I.40a). Finalement les corrélations NOE (*Nuclear Overhauser effect*) à moyenne distance (de type $i/i+2$ et $i/i+3$) répétées le long de la séquence sont caractéristiques d'une structure en hélice et ont été utilisées pour obtenir un modèle tridimensionnel de l'hélice des oligourées (Figure I.40b). De surcroît, d'autres caractéristiques conformationnelles d'oligourées peuvent être mentionnées [193] : ainsi (*i*) dans les solvants de basse polarité, quatre à cinq unités d'urées sont suffisantes pour amorcer leur repliement (les plus petits oligomères ont tendance à favoriser des liaisons hydrogène intermoléculaires pour former des feuillets); (*ii*) la stabilité de l'hélice-2,5 est accrue en acylant l'amine N-terminale (*capping* par un motif de type isopropyle urée) ce qui a pour effet d'apporter un premier groupement accepteur de liaison hydrogène et de supprimer les interactions électrostatiques répulsives entre la charge à l'extrémité et le

macro-dipôle de l'hélice ; (iii) le repliement hélicoïdal observé en milieux protique et aprotique polaire (MeCN > MeOH > DMSO) est optimal dans un environnement de basse polarité comme la pyridine.

L'analyse de ces oligomères par spectroscopie CD dans le 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE) et le méthanol a permis de déterminer une signature caractéristique de l'hélice 2,5 avec un minimum d'ellipticité négative à 188 nm et un maximum d'ellipticité positive près de 203 nm, dont l'intensité par résidu augmente radicalement avec la longueur de la chaîne (Figure I.40d) [188]. De plus, les études CD sur des oligourées solubles en tampon salin à pH= 7,4 conservent leur signature dichroïque (bien que plus faible) suggérant ainsi que la structure hélicoïdale reste significative en solution aqueuse [194]. La conservation de l'hélicité en milieu aqueux est particulièrement intéressante pour de potentielles applications biologiques et trouve tout son sens pour la conception de nouvelles architectures antibactériennes.

Pour finir, les résultats obtenus en solution ont pu être confirmés par l'obtention de différentes structures cristallographiques caractérisées par diffraction des rayons X [191,192]. Les études plus récentes ont aussi mis en évidence la possibilité de concevoir des structures hybrides possédant différents résidus non canoniques acycliques ou cycliques (de type glycine ou *cis*-diaminocyclohexane) et leur compatibilité avec la formation d'une hélice régulière [195].

En raison de sa modularité, de sa stabilité structurale et de sa résistance à la protéolyse, cette nouvelle plateforme hélicoïdale présente un très fort potentiel pour la conception de mimes d'hélices peptidiques particulièrement pertinents dans un contexte thérapeutique.

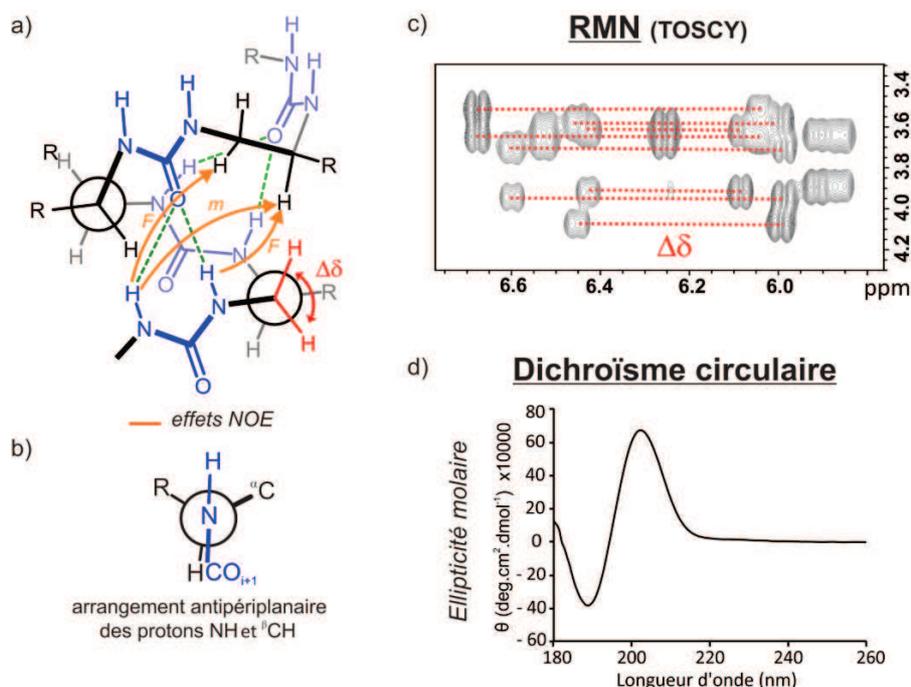


Figure I.40: a) Informations structurales obtenues par spectroscopie RMN du proton : connectivités NOE caractéristiques de l'hélice oligourée (en orange sur un schéma simplifié de l'hélice oligourée) ; b) arrangement anti-périplanaire observé par RMN des protons NH et ^{13}C ; c) Ecarts de déplacement chimique entre les protons $^{13}\text{CH}_2$ diastérotopiques d'une séquence oligourée observés sur un spectre TOCSY dans le CD_3OH ; d) Spectre de CD d'une hélice d'oligourée dans le TFE (séquence modèle Boc-Val^L-Ala^U-Leu^U-Val^L-Ala^U-Leu^U-NHMe à 0,2 mM).

b) Synthèses des oligourées

La synthèse de peptidomimes d'oligourées, décrite pour la première fois par Burgess *et al.* en 1995, a depuis largement été rapportée dans la littérature [182]. La première synthèse sur support solide d'oligourées aliphatiques utilisait une succession d'étapes de couplage et de déprotection d'isocyanates protégés par un groupement phtalimide [182]. Indépendamment, le groupe de Schultz a développé une élégante procédure à partir de monomères activés sous forme de carbamate de 4-nitrophényle [196]. Par la suite, une nouvelle méthodologie de synthèse a été développée basée cette fois sur l'utilisation de monomères activés dérivant de précurseurs de type éthylène diamine protégés par un groupement *N*-fluorénylméthoxy-carbonyl (Fmoc) [197,198] puis *tert*-butoxycarbonyl (Boc) [199] (Figure I.41).

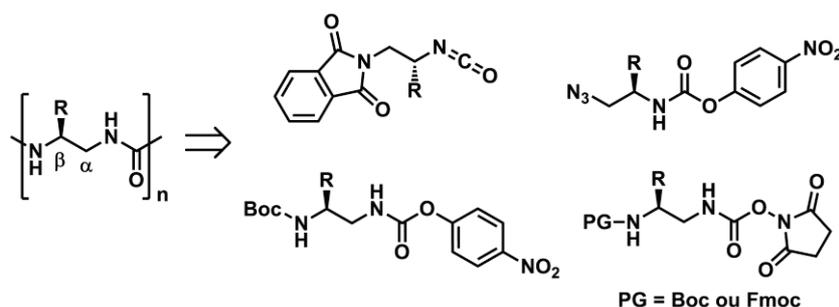


Figure I.41 : Représentation schématique d'oligourées aliphatiques et les différentes unités monomériques correspondantes.

Une des méthodes, et certainement la plus robuste, aujourd'hui couramment utilisée au laboratoire consiste à réaliser une réaction de condensation en milieu basique d'un dérivé carbamate de succinimide sur l'amine libre d'un motif éthylène diamine mono-protégé, qui donne accès à une large variété de chaînes latérales (la majorité des chaînes latérales des 20 acides aminés naturels). Une fois ces monomères activés en main, la synthèse des oligourées est ensuite réalisée soit en solution [192] (Figure I.42) soit sur support solide.

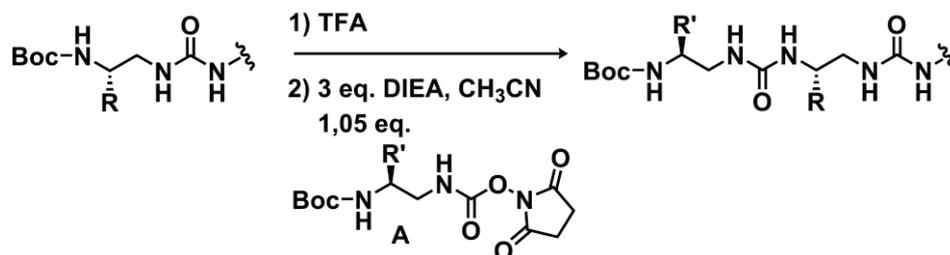
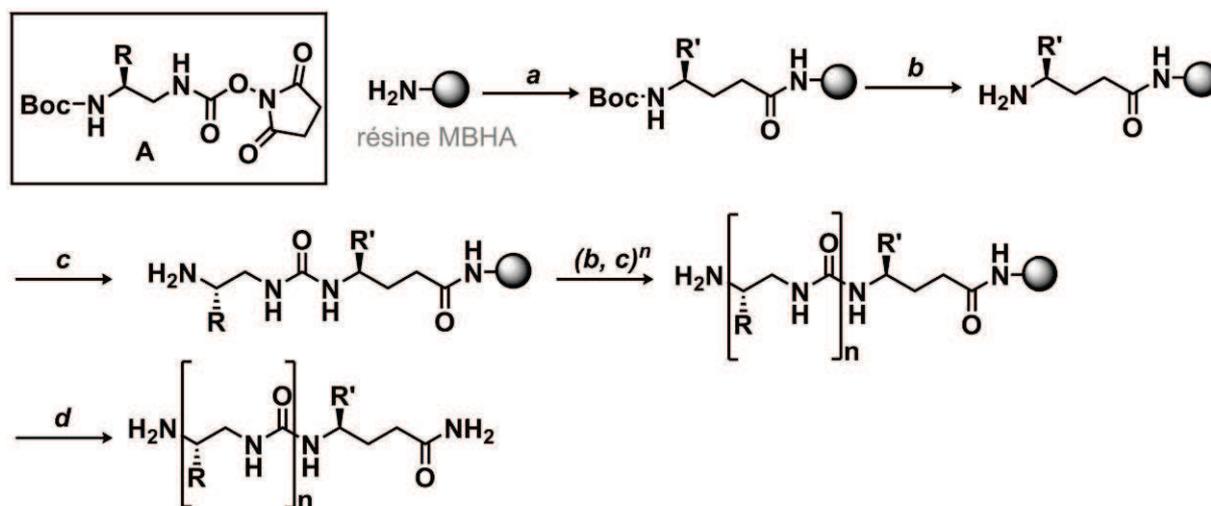
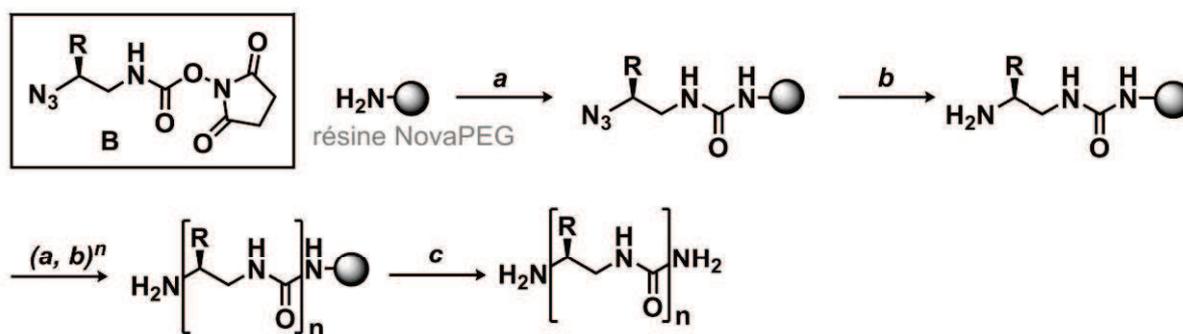


Figure I.42 : Synthèse en solution des oligourées suivant une stratégie de type Boc avec l'utilisation de monomères éthylène diamine activé sous forme de carbamates de succinimide.

Historiquement, la synthèse d'oligourées aliphatiques sur support solide a tout d'abord été développée au sein de l'équipe en suivant une stratégie de type Fmoc [188,194]. Néanmoins l'obtention de très faibles rendements dus à la formation de nombreux sous-produits de sur-insertion et l'incompatibilité de cette méthode de synthèse sous champ microonde ont conduit au développement d'une autre stratégie utilisant le groupement temporaire de type Boc. Cette dernière s'avère être beaucoup plus robuste que la précédente et a permis le développement des premières synthèses assistés par les micro-ondes [186,200]. Toutefois, la stratégie Boc sur support solide possède, elle aussi, certaines limitations. D'une part, elle nécessite l'emploi d'une résine de type 4-Methylbenzhydrylamine (MBHA) et donc un clivage final par traitement à l'acide fluorhydrique. D'autre part, le lien urée formé par couplage de monomère de type **A** sur la résine n'est pas stable en présence d'acide trifluoroacétique et oblige le couplage d'un premier résidu de type acide γ -aminé (Figure I.44). Pour toutes ces différentes raisons, une nouvelle approche de synthèse sur support solide, compatible avec les résines acido-labiles (ex : résine Rink amide) a récemment été mise au point au laboratoire par C. Douat *et al.* [201]. Cette méthode utilise le couplage sous champ micro-ondes de monomères azotures activés sous forme de carbamate de succinimide de type **B**. L'azoture est réduit en présence de triméthylphosphine pour permettre le couplage du monomère suivant (Figure I.43).



a : 1,5 eq. , Boc- γ -AA-OH, 3 eq. BOP, 3 eq. DIEA, DMF, 2 x 30 min, TA; **b** : TFA, 5 min, TA;
c : 1,5 eq. **A**, 3 eq. DIEA, DMF, μ W : 70 °C, 25 W, 2 x 15 min ; **d** : HF, 10 % p-cresol, 0 °C, 1 h



a : 1,5 eq. **B**, 3 eq. DIEA, DMF, μ W : 70 °C, 25 W, 2 x 15 min ; **b** : 10 eq. PMe₃ dans THF (1 M), Dioxane, H₂O (7:3, v/v), μ W : 70 °C, 25 W, 2 x 30 min ; **c** : TFA/TIS/H₂O (95:2,5:2,5, v/v/v)

Figure I.43 : Schéma de synthèse des oligourées sur support solide sous champs microondes en a) stratégie Boc et en b) stratégie azoture.

c) Développement de séquences oligourées à visée antibactérienne

Inspiré par le développement des β -peptides et peptoïdes antibactériens [69,74,104] et prenant avantages des études structurales réalisées sur les oligourées, le groupe a utilisé le squelette oligourée afin de développer de nouveaux agents antibactériens. Leur conception repose sur la formation en solution d'une hélice-2,5 amphipathique. La séquence a été choisie de telle manière qu'en moyenne deux cinquième de l'hélice soit couverte par des chaînes latérales polaires et les trois autres cinquièmes par une sélection de chaînes latérales hydrophobes (Figure I.44). Après avoir constaté que la majorité des peptidomimes antimicrobiens publiés à l'époque était en général assez courts (pas plus de 20 résidus), le groupe a décidé de préparer des octamères d'oligourées : 8 résidus urées correspondent, en effet, à une séquence de 11 résidus peptidiques d'une hélice- α . Afin de constituer la face cationique, des résidus de type Lysine ont été incorporés dans le squelette de l'hélice. La

longueur de l'oligomère, le nombre, la position et la nature de la chaîne hydrophobe ainsi que la terminaison finale ont été ensuite fait l'objet d'une première optimisation [194].

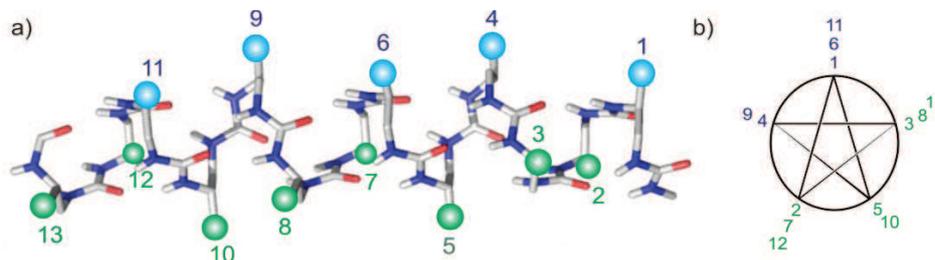


Figure 1.44 : Conception d'un oligomère d'urée amphipathique replié en hélice-2,5 : a) Numérotation et répartition spatiale des résidus dans une hélice-2,5 d'urées ; b) Numérotation et répartition spatiale des résidus sur la projection d'une hélice-2,5 idéale.

Ainsi une première série d'oligourées de sept à neuf résidus, comportant une sélection de résidus hydrophobes soit aliphatiques (Me, *i*Pr, *i*Bu) ou aromatiques (Benzyle et (1*H*-indol-3-yl)méthyle) ont été préparés en stratégie Fmoc en phase solide (**I.58-I.70**). Leurs CMI mais aussi leurs concentrations minimales de bactéricidie (CMB) ont été mesurées sur des bactéries à Gram positif et négatif (*S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*) et comparées à leur analogue peptidique ainsi qu'au peptide naturel mélittine (Figure 1.45).

a)

b)

Noms	Composés	<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
I.58	H-β-HLeu ^u -β-HLys ^u -β-HLeu ^u -β-HLys ^u -β-HPhe ^u -β-HPhe ^u -β-HLys ^u -β-HLeu ^u -β-HLys ^u	>256	>256	>256	>256	>256	>256
I.59	H-β-HAla ^u -β-HLys ^u -β-HAla ^u -β-HLys ^u -β-HTyr ^u -β-HTyr ^u -β-HLys ^u -β-HAla ^u -β-HLys ^u	>256	>256	>256	>256	>256	>256
I.60	H-β-HTyr ^u -β-HLys ^u -β-HVal ^u -β-HLys ^u -β-HVal ^u -β-HVal ^u -β-HLys ^u -β-HVal ^u -β-HLys ^u	>256	>256	>256	>256	>256	>256
I.61	H-β-HVal ^u -β-HLys ^u -β-HTrp ^u -β-HVal ^u -β-HLys ^u -β-HVal ^u -β-HLys ^u -β-HVal ^u -β-HLys ^u	128	>256	>256	>256	>256	>256
I.62	H-β-HVal ^u -β-HTrp ^u -β-HLys ^u -β-HTrp ^u -β-HLys ^u -β-HVal ^u -β-HTrp ^u -β-HLys ^u	>256	>256	>256	>256	256	>256
I.63	H-β-HVal ^u -β-HLys ^u -β-HTrp ^u -β-HVal ^u -β-HLys ^u -β-HTrp ^u -β-HLys ^u -β-HVal ^u	32	128	128	>256	256	256
I.64	H-β-HVal ^u -β-HLys ^u -β-HTrp ^u -β-HVal ^u -β-HLys ^u -β-HVal ^u -β-HLys ^u -β-HTrp ^u	32-64	64-128	128	>256	64	>256
I.65	H-β-HVal ^u -β-HLys ^u -β-HPhe ^u -β-HVal ^u -β-HLys ^u -β-HPhe ^u -β-HLys ^u -β-HVal ^u	64-128	128	128	>256	64-128	>256
I.66	<i>i</i> Pr-NHCO-β-HVal ^u -β-HTrp ^u -β-HLys ^u -β-HTrp ^u -β-HLys ^u -β-HVal ^u -β-HTrp ^u -β-HLys ^u	128	>256	>256	>256	128	256
I.67	<i>i</i> Pr-NHCO-β-HVal ^u -β-HLys ^u -β-HTrp ^u -β-HVal ^u -β-HLys ^u -β-HTrp ^u -β-HLys ^u -β-HVal ^u	32	256	64	>256	32	32
I.68	Bz-NHCO-β-HVal ^u -β-HLys ^u -β-HTrp ^u -β-HVal ^u -β-HLys ^u -β-HTrp ^u -β-HLys ^u -β-HVal ^u	64	128	128	>256	32	64
I.69	<i>i</i> Pr-NHCO-β-HLys ^u -β-HTrp ^u -β-HVal ^u -β-HLys ^u -β-HTrp ^u -β-HLys ^u -β-HVal ^u	>256	>256	>256	>256	128	>256
I.70	<i>i</i> Pr-NHCO-β-HVal ^u -β-HLys ^u -β-HTrp ^u -β-HVal ^u -β-HLys ^u -β-HTrp ^u -β-HLys ^u	64-128	64-256	256	>256	32-64	64-128
	Ac-Val-Lys-Trp-Val-Lys-Trp-Lys-Val	>256	>256	>256	>256	>256	>256
	Mélittine	>256	>256	>256	>256	32	64

en µg/mL

Figure 1.45 : a) Structure chimique de l'oligourée **I.67** ; b) Table des différentes activités antimicrobiennes obtenues avec la première série d'oligourées préparée.

La chaîne aromatique (1*H*-indol-3-yl)méthyle, déjà connue pour ces interactions privilégiées avec les surfaces membranaires [202], permet d'obtenir les meilleurs résultats. L'effet de la terminaison a aussi été évalué. L'ajout d'un groupement benzyle ou isopropyle terminal stabilisant l'hélice-2,5 permet d'obtenir de meilleures activités antimicrobiennes. Les

composés **I.66** et **I.67** sont en effet plus actifs que leurs analogues « non cappés » **I.62** et **I.63**.

La séquence de l'oligomère **I.67** ayant donné les meilleures activités antimicrobiennes (CMI de 32 µg/mL soit 23 µM sur *E. coli* et *S. aureus* et de 64 µg/mL soit 46 µM sur *P. aeruginosa*) a ensuite été testée pour son effet hémolytique et sa résistance à la protéolyse. Une HD₅₀ de 150 µg/mL soit 108 µM est obtenue et le suivi de l'incubation d'**I.67** dans le sérum de la souris montre la présence de l'oligourée après 5 jours. **I.67** possède donc une bonne biodisponibilité et une certaine sélectivité pour les membranes bactériennes par rapport aux cellules eucaryotes. Il détient un fort potentiel thérapeutique des oligourées antimicrobiennes. Toutes ces expériences ont été menées en parallèle d'analyses par CD en solution aqueuse, en milieu tamponné et dans des milieux lipidiques anionique et zwitterionique. Une tendance au repliement en hélice-2,5 plus forte est observée en présence de lipides anioniques que dans toutes les autres solutions aqueuses suggérant que l'activité et la sélectivité pour les membranes bactériennes pourraient être directement reliées au repliement de la molécule.

Enfin, à partir de la séquence **I.67**, le groupe a étudié les activités antimicrobiennes d'une série de composé analogues γ -peptides et hybrides amide/urée, dont les résultats mettent en exergue l'importance du squelette oligourée dans les activités bactéricides [200]. Tout d'abord, la synthèse sur support solide de type Fmoc utilisée à l'époque ne permettant pas d'obtention l'oligomère de référence **I.67** de manière efficace a été remplacée par une stratégie de type Boc. **I.71**, de séquence identique à celle de **I.67** mise à part la présence d'un résidu γ -amino acide sur la terminaison « C-terminale » a été synthétisé. Des mesures de CD et de CMIs de **I.71** ont prouvé que ni l'hélicité ni l'activité ne sont affectées par ce changement (Figure I.45). La stratégie Boc pour la synthèse de ces oligomères pourra être donc systématiquement appliquée lors de la préparation d'analogues de **I.67**.

Dans le cas de l'analogue γ -peptide **I.72**, composé uniquement de liens amides (Figure I.44a et d), l'activité antimicrobienne est totalement perdue. Pourtant, comme il a été décrit précédemment, les γ -peptides se replient en une hélice 2,6₁₄ formant une structure très proche de celle des oligourées et imposant une répartition spatiale des chaînes latérales très semblable (Figure I.44b). De surcroît, l'insertion ponctuelle de deux acides γ -aminés successifs (**I.75**) qui déstabilise l'hélice-2,5 par analyse CD, semble défavorable à l'activité antimicrobienne. En revanche l'insertion ponctuelle en début et

milieu de séquence (**I.73**), n'altérant que très peu le signal dichroïque, permet d'améliorer la cytotoxicité des oligomères sans pour autant compromettre l'activité antimicrobienne (Figure I.44c et d).

Comme les travaux de Gellman *et al.* ont pu le montrer, une pré-organisation conformationnelle n'est pas nécessairement un pré-requis pour concevoir des oligomères antimicrobiens [58,76]. Ainsi, il est peu probable que la seule différence dans la stabilité d'hélice entre les composés hybrides d'oligoamides et urées soit responsable de la dichotomie observée dans l'interaction de membrane et activité antibactérienne. En revanche, la géométrie de l'hélice (la projection de chaînes latérales) et la polarité du squelette oligourée (notamment en tant que site de reconnaissance d'anions) sont deux facteurs qui varient considérablement entre les deux systèmes oligomériques et qui doivent être considérés.

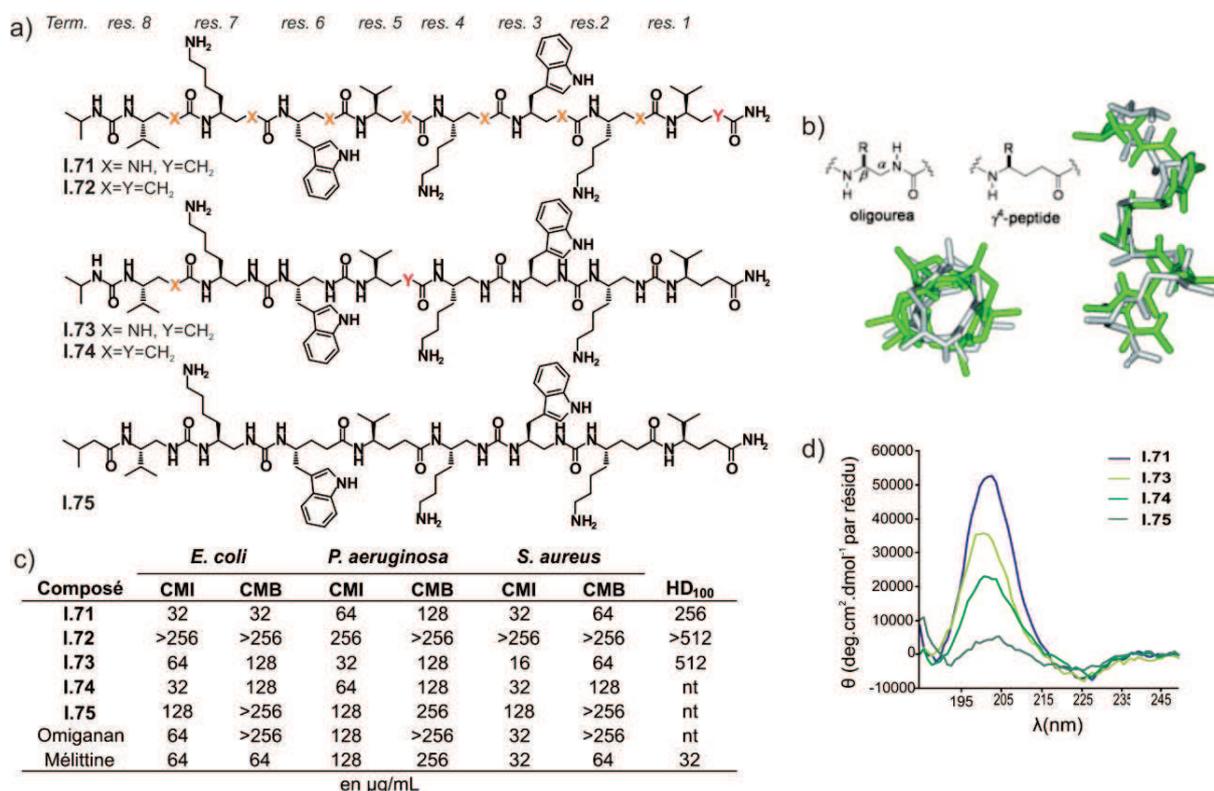


Figure I.44 : a) Structure chimique des composés hybrides amide/urée et analogue γ -peptide ; b) Superposition des squelettes oligourées en gris et des γ -peptides en vert c) Table des différentes activités antimicrobiennes obtenues d) Spectres CD mesurés dans le méthanol à 0.5 mM [200].

Pour finir, des études conformationnelles et de dynamique (mesure des couplages résiduels dipolaires ou RDCs) de l'oligourée **I.71** ont été réalisées par RMN du proton à 9 mM dans l'eau en milieu orienté par le Dr. Miclet dans le cadre d'une collaboration (Laboratoire des Biomolécules de l'UMPC, Paris) et ont confirmé sa structuration en hélice-2,5 amphipathique (Figure I.45, résultats non publiés).

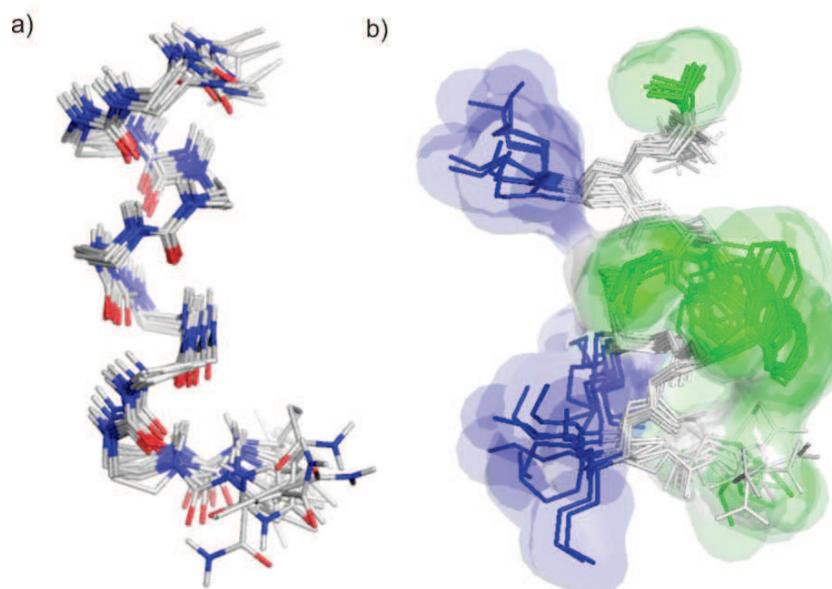


Figure 1.45 : Structure de **1.71** sous contrainte RMN en milieu aqueux : a) Superposition des 10 structures de plus basse énergie, les chaînes latérales ont été omises pour plus de clarté ; b) Superposition des 10 structures de plus basse énergie avec les représentations des surfaces des chaînes latérales hydrophobes de type valine et tryptophane en vert, les chaînes cationiques de type lysine en bleu.

4. Objectifs de la thèse

Des expériences préliminaires menées en collaboration avec le Dr. Pierre Goossens de l'unité des Pathogénie des toxi-infections bactériennes de l'institut Pasteur avaient montré que l'oligourée **1.71** semblait avoir une activité bactéricide contre différentes souches de *B. anthracis*, bactérie de type Gram positif (CMB de 10 µg/mL soit de 7 µM) et considérée à l'heure actuelle comme une arme biologique potentielle. L'objectif principal de cette thèse a été d'étudier de manière spécifique l'activité des foldamères d'urées en tant que nouvelle classe de mimes de peptides naturels antimicrobiens contre l'infection par *B. anthracis*. Une étude de relation structure-activité sera conduite dans le but d'optimiser la molécule « tête de série » **1.71** en termes d'activité anthracidale mais également en termes de sélectivité. A cet effet, plusieurs séries de modifications chimiques ont été envisagées pour moduler les propriétés physicochimiques et biologiques des oligourées. Par la suite, des études *in vivo* ont aussi pu être réalisées à partir des composés les plus intéressants, la pharmacocinétique et la biodistribution d'oligourées antimicrobiennes seront caractérisées pour la première fois.

Afin d'accroître la diversité chimique de nos composés, la création de nouveaux squelettes originaux par insertion de motifs isostères a composé le premier volet de cette thèse. L'idée a été de créer des oligomères hybrides qui conserveraient une capacité à former des hélices bien définies mais dont les modifications isostères ponctuelles à des positions stratégiques du squelette (comme l'insertion de motifs thiourée (NHC(=S)NH)), ou

guanidine ($\text{NH}(\text{C}=\text{NHR})\text{NH}$) permettrait de moduler les propriétés physicochimiques de l'hélice (polarité, hydrophobicité, lipophilie, charge) sans changer la nature des chaînes latérales et sans à priori modifier drastiquement la géométrie hélicoïdale des oligomères envisagés (Figure I.46).

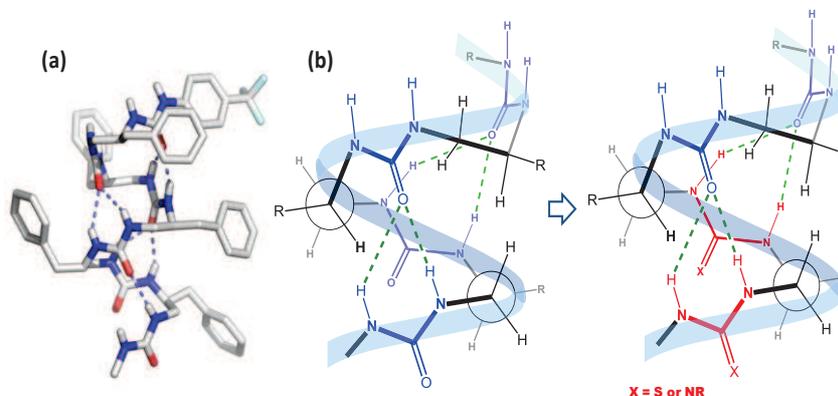


Figure I.46. a) Structure cristalline de l'hélice-2,5 canonique formée par les homo-oligomères d'urées ; b) Exemple de modifications isostères sur le squelette en hélice des oligomères d'urée.

A cet effet, la synthèse des monomères correspondants et des oligomères hybrides urée/thiourée a été tout d'abord réalisée en solution puis adaptée sur support solide. Une étude conformationnelle approfondie en solution et à l'état solide des différents oligomères préparés en solution a permis de comprendre l'impact de telles substitutions sur le squelette de l'hélice-2,5. Enfin, la modification post-synthèse des thiourées en motif guanidine a été réalisée sur support solide et une méthodologie originale d'insertion de motif guanidine sur un foldamère d'urées a ainsi pu être développée. Ces nouveaux outils synthétiques ont pu être ensuite valorisés lors de l'étude de relation structure-activité ciblant *B. anthracis*.

En parallèle de ce travail de synthèse, des modifications de la séquence primaire permettant d'évaluer l'impact de différentes chaînes latérales dans la relation structure-activité ont été envisagées. L'évaluation des chaînes latérales cationiques imidazole et des modifications de la face hydrophobe par l'introduction de chaînes latérales de type tyrosine mais aussi de groupements trifluorométhylènes ont été réalisées. De plus, il a aussi été possible d'évaluer l'incidence de modifications du squelette et de l'hélicité des composés par l'insertion de groupements pyrrolidine, thiourée et guanidine. Enfin, la taille des oligomères *via* la dimérisation des séquences a également été un paramètre sur lequel nous avons pu intervenir pour notamment essayer d'améliorer les activités *in vivo*.

Le dernier volet de cette thèse consistait en l'étude des propriétés d'interaction de ces nouvelles générations de molécules avec des modèles de membranes par différentes méthodes spectroscopiques avec l'équipe du Dr. Lecomte et du Dr. Dufourc à CBMN.

Bibliographie

- [1] W.H. Organization, Antimicrobial resistance : Global report on surveillance 2014, WHO, (2014).
- [2] S.R. Harris, E.J. Feil, M.T. Holden, M.A. Quail, E.K. Nickerson, N. Chantratita, S. Gardete, A. Tavares, N. Day, J.A. Lindsay, J.D. Edgeworth, H. de Lencastre, J. Parkhill, S.J. Peacock, S.D. Bentley, Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread, *Science*, 327 (2010) 469-474.
- [3] M. Zasloff, Magainins, a class of antimicrobial peptides from xenopus skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84 (1987) 5449-5453.
- [4] R.E.W. Hancock, R. Lehrer, Cationic peptides: A new source of antibiotics, *Trends Biotechnol.*, 16 (1998) 82-88.
- [5] R.E.W. Hancock, H.-G. Sahl, Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies, *Nat. Biotechnol.*, 24 (2006) 1551-1557.
- [6] P. Bulet, R. Stöcklin, L. Menin, Anti-microbial peptides: From invertebrates to vertebrates, *Immunol. Rev.*, 198 (2004) 169-184.
- [7] M. Zaiou, Multifunctional antimicrobial peptides: Therapeutic targets in several human diseases, *J. Mol. Med.*, 85 (2007) 317-329.
- [8] H. Jenssen, P. Hamill, R.E.W. Hancock, Peptide antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev.*, 19 (2006) 491-511.
- [9] M. Zasloff, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature*, 415 (2002) 389.
- [10] E. Habermann, Bee and wasp venoms, *Science*, 177 (1972) 314-322.
- [11] H. Steiner, D. Hultmark, A. Engstrom, H. Bennich, H.G. Boman, Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity, *Nature*, 292 (1981) 246-248.
- [12] J. Turner, Y. Cho, N.-N. Dinh, A.J. Waring, R.I. Lehrer, Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42 (1998) 2206-2214.
- [13] R. Gennaro, M. Zanetti, Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides, *Pept. Sci.*, 55 (2000) 31-49.
- [14] R.I. Lehrer, A.K. Lichtenstein, T. Ganz, Defensins - antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian-cells, *Annu. Rev. Immunol.*, 11 (1993) 105-128.
- [15] C. Hill, J. Yee, M. Selsted, D. Eisenberg, Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: Mechanisms of membrane permeabilization, *Science*, 251 (1991) 1481-1485.
- [16] V.N. Kokryakov, S.S.L. Harwig, E.A. Panyutich, A.A. Shevchenko, G.M. Aleshina, O.V. Shamova, H.A. Korneva, R.I. Lehrer, Protegrins: Leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins, *FEBS Lett.*, 327 (1993) 231-236.
- [17] F.G. Oppenheim, T. Xu, F.M. McMillian, S.M. Levitz, R.D. Diamond, G.D. Offner, R.F. Troxler, Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human-parotid secretion - isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on candida-albicans, *J. Biol. Chem.*, 263 (1988) 7472-7477.
- [18] M.E. Selsted, M.J. Novotny, W.L. Morris, Y.Q. Tang, W. Smith, J.S. Cullor, Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils, *J. Biol. Chem.*, 267 (1992) 4292-4295.
- [19] A. Rozek, C.L. Friedrich, R.E.W. Hancock, Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles, *Biochemistry*, 39 (2000) 15765-15774.
- [20] J. Gesell, M. Zasloff, S.J. Opella, Two-dimensional ¹H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an α -helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution, *J. Biomol. NMR*, 9 (1997) 127-135.
- [21] M.R. Yeaman, N.Y. Yount, Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance, *Pharmacol. Rev.*, 55 (2003) 27-55.
- [22] K.A. Brogden, Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?, *Nat. Rev. Microbiol.*, 3 (2005) 238-250.
- [23] L. Otvos, The short proline-rich antibacterial peptide family, *Cell. Mol. Life Sci.*, 59 (2002) 1138-1150.
- [24] M. Mardirossian, R. Grzela, C. Giglione, T. Meinel, R. Gennaro, P. Mergaert, M. Scocchi, The host antimicrobial peptide bac71-35 binds to bacterial ribosomal proteins and inhibits protein synthesis, *Chem. Biol.*, 21 (2014) 1639-1647.
- [25] A. Krizsan, D. Volke, S. Weinert, N. Sträter, D. Knappe, R. Hoffmann, Insect-derived proline-rich antimicrobial peptides kill bacteria by inhibiting bacterial protein translation at the 70S ribosome, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53 (2014) 12236-12239.
- [26] A.C. Seefeldt, F. Nguyen, S. Antunes, N. Perebaskine, M. Graf, S. Arenz, K.K. Inampudi, C. Douat, G. Guichard, D.N. Wilson, C.A. Innis, The proline-rich antimicrobial peptide onc112 inhibits translation by blocking and destabilizing the initiation complex, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 22 (2015) 470-475.
- [27] R.E.W. Hancock, G. Diamond, The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences, *Trends Microbiol.*, 8 (2000) 402-410.
- [28] S.C. Mansour, O.M. Pena, R.E.W. Hancock, Host defense peptides: Front-line immunomodulators, *Trends Immunol.*, 35 (2014) 443-450.

- [29] E. Guaní-Guerra, T. Santos-Mendoza, S.O. Lugo-Reyes, L.M. Terán, Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease, *Clinical Immunology*, 135 (2010) 1-11.
- [30] C.D. Fjell, J.A. Hiss, R.E.W. Hancock, G. Schneider, Designing antimicrobial peptides: Form follows function, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 11 (2011) 37-51.
- [31] J. Wiesner, A. Vilcinskas, Antimicrobial peptides the ancient arm of the human immune system, *Virulence*, 1 (2010) 440-464.
- [32] H.S. Sader, K.A. Fedler, R.P. Rennie, S. Stevens, R.N. Jones, Omiganan pentahydrochloride (MBI 226), a topical 12-amino-acid cationic peptide: Spectrum of antimicrobial activity and measurements of bactericidal activity, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48 (2004) 3112-3118.
- [33] M.N. Melo, D. Dugourd, M.A.R.B. Castanho, Omiganan pentahydrochloride in the front line of clinical applications of antimicrobial peptides, *Recent patents on anti-infective drug discovery*, 1 (2006) 201-207.
- [34] Y. Ge, D.L. MacDonald, K.J. Holroyd, C. Thornsberry, H. Wexler, M. Zasloff, *In vitro* antibacterial properties of pexiganan, an analog of magainin, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43 (1999) 782-788.
- [35] S. Elad, J.B. Epstein, J. Raber-Durlacher, P. Donnelly, J. Strahilevitz, The antimicrobial effect of isegagan HCl oral solution in patients receiving stomatotoxic chemotherapy: Analysis from a multicenter, double-blind, placebo-controlled, randomized, phase III clinical trial, *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 41 (2012) 229-234.
- [36] E.J. Helmerhorst, I.M. Reijnders, W. van 't Hof, E.C.I. Veerman, A.V. Nieuw Amerongen, A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides, *FEBS Lett.*, 449 105-110.
- [37] R. Bals, M.J. Goldman, J.M. Wilson, Mouse β -defensin 1 is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract, *Infect. Immun.*, 66 (1998) 1225-1232.
- [38] M.R. Yeaman, N.Y. Yount, Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance, *Pharmacological reviews*, 55 (2003) 27-55.
- [39] M. Dathe, T. Wieprecht, Structural features of helical antimicrobial peptides: Their potential to modulate activity on model membranes and biological cells, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1462 (1999) 71-87.
- [40] K. Hilpert, R. Volkmer-Engert, T. Walter, R.E.W. Hancock, High-throughput generation of small antibacterial peptides with improved activity, *Nat. Biotechnol.*, 23 (2005) 1008-1012.
- [41] S.E. Blondelle, R.A. Houghten, Novel antimicrobial compounds identified using synthetic combinatorial library technology, *Trends Biotechnol.*, 14 (1996) 60-65.
- [42] R. Rathinakumar, W.C. Wimley, High-throughput discovery of broad-spectrum peptide antibiotics, *FASEB J.*, 24 (2010) 3232-3238.
- [43] A.A. Strömstedt, M. Pasupuleti, A. Schmidtchen, M. Malmsten, Evaluation of strategies for improving proteolytic resistance of antimicrobial peptides by using variants of EFK17, an internal segment of LL-37, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53 (2009) 593-602.
- [44] H. Meng, K. Kumar, Antimicrobial activity and protease stability of peptides containing fluorinated amino acids, *J. Am. Chem. Soc.*, 129 (2007) 15615-15622.
- [45] L.T. Nguyen, J.K. Chau, N.A. Perry, L. de Boer, S.A.J. Zaat, H.J. Vogel, Serum stabilities of short tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptide analogs, *PLoS one*, 5 (2010) e12684.
- [46] P. Méndez-Samperio, Peptidomimetics as a new generation of antimicrobial agents: Current progress, *Infection and Drug Resistance*, 7 (2014) 229-237.
- [47] A. Som, S. Vemparala, I. Ivanov, G.N. Tew, Synthetic mimics of antimicrobial peptides, *Pept. Sci.*, 90 (2008) 83-93.
- [48] A. Giuliani, G. Pirri, A. Bozzi, A. Di Giulio, M. Aschi, A.C. Rinaldi, Antimicrobial peptides: Natural templates for synthetic membrane-active compounds, *Cell. Mol. Life Sci.*, 65 (2008) 2450-2460.
- [49] S. Rotem, A. Mor, Antimicrobial peptide mimics for improved therapeutic properties, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1788 (2009) 1582-1592.
- [50] A. Giuliani, A.C. Rinaldi, Beyond natural antimicrobial peptides: Multimeric peptides and other peptidomimetic approaches, *Cell. Mol. Life Sci.*, 68 (2011) 2255-2266.
- [51] K. Lienkamp, A.E. Madkour, G.N. Tew, Antibacterial peptidomimetics: Polymeric synthetic mimics of antimicrobial peptides, in: A. Abe, H.H. Kausch, M. Moller, H. Pasch (Eds.) *Polymer composites - polyolefin fractionation - polymeric peptidomimetics - collagens*, vol. 251, Springer-Verlag Berlin, Berlin, 2013, pp. 141-172.
- [52] S.H. Gellman, Foldamers: A manifesto, *Acc. Chem. Res.*, 31 (1998) 173-180.
- [53] G.N. Tew, R.W. Scott, M.L. Klein, W.F. DeGrado, De novo design of antimicrobial polymers, foldamers, and small molecules: From discovery to practical applications, *Acc. Chem. Res.*, 43 (2010) 30-39.
- [54] J.A. Patch, A.E. Barron, Mimicry of bioactive peptides via non-natural, sequence-specific peptidomimetic oligomers, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6 (2002) 872-877.
- [55] K. Kuroda, G.A. Caputo, Antimicrobial polymers as synthetic mimics of host-defense peptides, *Wiley Interdiscip. Rev.-Nanomed. Nanobiotechnol.*, 5 (2013) 49-66.
- [56] I.S. Radziszewsky, T. Kovachi, Y. Porat, L. Ziserman, F. Zaknoon, D. Danino, A. Mor, Structure-activity relationships of antibacterial acyl-lysine oligomers, *Chem. Biol.*, 15 (2008) 354-362.

- [57] I.S. Radziszewsky, S. Rotem, D. Bourdetsky, S. Navon-Venezia, Y. Carmeli, A. Mor, Improved antimicrobial peptides based on acyl-lysine oligomers, *Nat. Biotechnol.*, 25 (2007) 657-659.
- [58] B.P. Mowery, S.E. Lee, D.A. Kissounko, R.F. Epand, R.M. Epand, B. Weisblum, S.S. Stahl, S.H. Gellman, Mimicry of antimicrobial host-defense peptides by random copolymers, *J. Am. Chem. Soc.*, 129 (2007) 15474-15476.
- [59] I. Sovadinova, E.F. Palermo, M. Urban, P. Mpiga, G.A. Caputo, K. Kuroda, Activity and mechanism of antimicrobial peptide-mimetic amphiphilic polymethacrylate derivatives, *Polymers*, 3 (2011) 1512.
- [60] M.F. Ilker, K. Nüsslein, G.N. Tew, E.B. Coughlin, Tuning the hemolytic and antibacterial activities of amphiphilic polynorbornene derivatives, *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (2004) 15870-15875.
- [61] G.J. Gabriel, J.G. Pool, A. Som, J.M. Dabkowski, E.B. Coughlin, M. Muthukumar, G.N. Tew, Interactions between antimicrobial polynorbornenes and phospholipid vesicles monitored by light scattering and microcalorimetry, *Langmuir*, 24 (2008) 12489-12495.
- [62] D.H. Appella, L.A. Christianson, I.L. Karle, D.R. Powell, S.H. Gellman, β -peptide foldamers: Robust helix formation in a new family of β -amino acid oligomers, *J. Am. Chem. Soc.*, 118 (1996) 13071-13072.
- [63] D. Seebach, M. Overhand, F.N.M. Kuhnle, B. Martinoni, L. Oberer, U. Hommel, H. Widmer, β -peptides: Synthesis by Arndt-eistert homologation with concomitant peptide coupling. Structure determination by NMR and CD spectroscopy and by X-ray crystallography. Helical secondary structure of a β -hexapeptide in solution and its stability towards pepsin, *Helv. Chim. Acta*, 79 (1996) 913-941.
- [64] D. Seebach, A.K. Beck, D.J. Bierbaum, The world of β - and γ -peptides comprised of homologated proteinogenic amino acids and other components, *Chem. Biodivers.*, 1 (2004) 1111-1239.
- [65] D. Seebach, J. Gardiner, β -peptidic peptidomimetics, *Acc. Chem. Res.*, 41 (2008) 1366-1375.
- [66] G. Guichard, β -peptides, γ -peptides and isosteric backbones: New scaffolds with controlled shapes for mimicking protein secondary structure elements, in: *Pseudo-peptides in drug development*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, pp. 33-120.
- [67] R.P. Cheng, S.H. Gellman, W.F. DeGrado, β -peptides: From structure to function, *Chem. Rev.*, 101 (2001) 3219-3232.
- [68] T.A. Martinek, F. Fülöp, Side-chain control of β -peptide secondary structures, *Eur. J. Biochem.*, 270 (2003) 3657-3666.
- [69] E.A. Porter, X. Wang, H.-S. Lee, B. Weisblum, S.H. Gellman, Antibiotics: Non-haemolytic β -amino-acid oligomers, *Nature*, 404 (2000) 565-565.
- [70] D. Seebach, S. Abele, K. Gademann, G. Guichard, T. Hintermann, B. Jaun, J.L. Matthews, J.V. Schreiber, L. Oberer, U. Hommel, H. Widmer, β^2 - and β^3 -peptides with proteinaceous side chains: Synthesis and solution structures of constitutional isomers, a novel helical secondary structure and the influence of solvation and hydrophobic interactions on folding, *Helv. Chim. Acta*, 81 (1998) 932-982.
- [71] Y. Hamuro, J.P. Schneider, W.F. DeGrado, De novo design of antibacterial β -peptides, *J. Am. Chem. Soc.*, 121 (1999) 12200-12201.
- [72] D. Liu, W.F. DeGrado, De novo design, synthesis, and characterization of antimicrobial β -peptides, *J. Am. Chem. Soc.*, 123 (2001) 7553-7559.
- [73] P.I. Arvidsson, J. Frackenpohl, N.S. Ryder, B. Liechty, F. Petersen, H. Zimmermann, G.P. Camenisch, R. Woessner, D. Seebach, On the antimicrobial and hemolytic activities of amphiphilic β -peptides, *ChemBioChem*, 2 (2001) 771-773.
- [74] E.A. Porter, B. Weisblum, S.H. Gellman, Mimicry of host-defense peptides by unnatural oligomers: Antimicrobial β -peptides, *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (2002) 7324-7330.
- [75] A.J. Wilson, Helix mimetics: Recent developments, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*.
- [76] M.A. Schmitt, B. Weisblum, S.H. Gellman, Unexpected relationships between structure and function in α , β -peptides: Antimicrobial foldamers with heterogeneous backbones, *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (2004) 6848-6849.
- [77] S. De Pol, C. Zorn, C.D. Klein, O. Zerbe, O. Reiser, Surprisingly stable helical conformations in α / β -peptides by incorporation of cis- β -aminocyclopropane carboxylic acids, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43 (2004) 511-514.
- [78] M.A. Schmitt, S.H. Choi, I.A. Guzei, S.H. Gellman, Residue requirements for helical folding in short α / β -peptides: Crystallographic characterization of the 11-helix in an optimized sequence, *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (2005) 13130-13131.
- [79] M.A. Schmitt, B. Weisblum, S.H. Gellman, Interplay among folding, sequence, and lipophilicity in the antibacterial and hemolytic activities of α / β -peptides, *J. Am. Chem. Soc.*, 129 (2007) 417-428.
- [80] S.H. Choi, I.A. Guzei, S.H. Gellman, Crystallographic characterization of the α / β -peptide 14/15-helix, *J. Am. Chem. Soc.*, 129 (2007) 13780-13781.
- [81] S.H. Choi, I.A. Guzei, L.C. Spencer, S.H. Gellman, Crystallographic characterization of helical secondary structures in α / β -peptides with 1:1 residue alternation, *J. Am. Chem. Soc.*, 130 (2008) 6544-6550.
- [82] A. Hayen, M.A. Schmitt, F.N. Ngassa, K.A. Thomasson, S.H. Gellman, Two helical conformations from a single foldamer backbone: "Split personality" in short α / β -peptides, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43 (2004) 505-510.
- [83] M.A. Schmitt, S.H. Choi, I.A. Guzei, S.H. Gellman, New helical foldamers: Heterogeneous backbones with 1:2 and 2:1 α : β -amino acid residue patterns, *J. Am. Chem. Soc.*, 128 (2006) 4538-4539.

- [84] G.V.M. Sharma, P. Nagendar, P. Jayaprakash, P. Radha Krishna, K.V.S. Ramakrishna, A.C. Kunwar, 9/11 mixed helices in α/β peptides derived from C-linked carbo- β -amino acid and l-ala repeats, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44 (2005) 5878-5882.
- [85] Y. Shai, Z. Oren, Diastereomers of cytolysins, a novel class of potent antibacterial peptides, *J. Biol. Chem.*, 271 (1996) 7305-7308.
- [86] Z. Oren, Y. Shai, Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin: Structure-function study, *Biochemistry*, 36 (1997) 1826-1835.
- [87] B.P. Mowery, A.H. Lindner, B. Weisblum, S.S. Stahl, S.H. Gellman, Structure-activity relationships among random nylon-3 copolymers that mimic antibacterial host-defense peptides, *J. Am. Chem. Soc.*, 131 (2009) 9735-9745.
- [88] R.J. Simon, R.S. Kania, R.N. Zuckermann, V.D. Huebner, D.A. Jewell, S. Banville, S. Ng, L. Wang, S. Rosenberg, C.K. Marlowe, D.C. Spellmeyer, R.Y. Tan, A.D. Frankel, D.V. Santi, F.E. Cohen, P.A. Bartlett, Peptoids - a modular approach to drug discovery, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89 (1992) 9367-9371.
- [89] R.N. Zuckermann, J.M. Kerr, S.B.H. Kent, W.H. Moos, Efficient method for the preparation of peptoids oligo(*N*-substituted glycines) by submonomer solid-phase synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (1992) 10646-10647.
- [90] S.M. Miller, R.J. Simon, S. Ng, R.N. Zuckermann, J.M. Kerr, W.H. Moos, Proteolytic studies of homologous peptide and *N*-substituted glycine peptoid oligomers, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 4 (1994) 2657-2662.
- [91] Y.U. Kwon, T. Kodadek, Quantitative evaluation of the relative cell permeability of peptoids and peptides, *J. Am. Chem. Soc.*, 129 (2007) 1508-+.
- [92] P.A. Wender, D.J. Mitchell, K. Pattabiraman, E.T. Pelkey, L. Steinman, J.B. Rothbard, The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97 (2000) 13003-13008.
- [93] R.N. Zuckermann, Peptoid origins, *Biopolymers*, 96 (2011) 545-555.
- [94] T. Szekely, C. Caumes, O. Roy, S. Faure, C. Taillefumier, A-peptoides et composés apparentés : Synthèse et contrôle de la conformation, *Comptes Rendus Chimie*, 16 (2013) 318-330.
- [95] M.T. Dohm, R. Kapoor, A.E. Barron, Peptoids: Bio-inspired polymers as potential pharmaceuticals, *Curr. Pharm. Des.*, 17 (2011) 2732-2747.
- [96] P. Armand, K. Kirshenbaum, A. Falicov, R.L. Dunbrack, K.A. Dill, R.N. Zuckermann, F.E. Cohen, Chiral *N*-substituted glycines can form stable helical conformations, *Fold. Des.*, 2 (1997) 369-375.
- [97] C.W. Wu, T.J. Sanborn, K. Huang, R.N. Zuckermann, A.E. Barron, Peptoid oligomers with α -chiral, aromatic side chains: Sequence requirements for the formation of stable peptoid helices, *J. Am. Chem. Soc.*, 123 (2001) 6778-6784.
- [98] C.W. Wu, T.J. Sanborn, R.N. Zuckermann, A.E. Barron, Peptoid oligomers with α -chiral, aromatic side chains: Effects of chain length on secondary structure, *J. Am. Chem. Soc.*, 123 (2001) 2958-2963.
- [99] P. Armand, K. Kirshenbaum, R.A. Goldsmith, S. Farr-Jones, A.E. Barron, K.T.V. Truong, K.A. Dill, D.F. Mierke, F.E. Cohen, R.N. Zuckermann, E.K. Bradley, NMR determination of the major solution conformation of a peptoid pentamer with chiral side chains, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95 (1998) 4309-4314.
- [100] S.A. Fowler, H.E. Blackwell, Structure-function relationships in peptoids: Recent advances toward deciphering the structural requirements for biological function, *Org. Biomol. Chem.*, 7 (2009) 1508-1524.
- [101] B. Goodson, A. Ehrhardt, S. Ng, J. Nuss, K. Johnson, M. Giedlin, R. Yamamoto, W.H. Moos, A. Krebber, M. Ladner, M.B. Giacona, C. Vitt, J. Winter, Characterization of novel antimicrobial peptoids, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43 (1999) 1429-1434.
- [102] S. Ng, B. Goodson, A. Ehrhardt, W.H. Moos, M. Siani, J. Winter, Combinatorial discovery process yields antimicrobial peptoids, *Bioorg. Med. Chem.*, 7 (1999) 1781-1785.
- [103] W.L. Zhu, Y.M. Song, Y. Park, K.H. Park, S.-T. Yang, J.I. Kim, I.-S. Park, K.-S. Hahm, S.Y. Shin, Substitution of the leucine zipper sequence in melittin with peptoid residues affects self-association, cell selectivity, and mode of action, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1768 (2007) 1506-1517.
- [104] J.A. Patch, A.E. Barron, Helical peptoid mimics of magainin-2 amide, *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (2003) 12092-12093.
- [105] N.P. Chongsiriwatana, J.A. Patch, A.M. Czyzewski, M.T. Dohm, A. Ivankin, D. Gidalevitz, R.N. Zuckermann, A.E. Barron, Peptoids that mimic the structure, function, and mechanism of helical antimicrobial peptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105 (2008) 2794-2799.
- [106] S.W. Shuey, W.J. Delaney, M.C. Shah, M.A. Scialdone, Antimicrobial β -peptoids by a block synthesis approach, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16 (2006) 1245-1248.
- [107] C.A. Olsen, Beta-peptoid "foldamers"-why the additional methylene unit?, *Biopolymers*, 96 (2011) 561-566.
- [108] J.S. Laursen, J. Engel-Andreasen, C.A. Olsen, β -peptoid foldamers at last, *Acc. Chem. Res.*, (2015).
- [109] T.S. Ryge, P.R. Hansen, Potent antibacterial lysine-peptoid hybrids identified from a positional scanning combinatorial library, *Bioorg. Med. Chem.*, 14 (2006) 4444-4451.
- [110] C.A. Olsen, G. Bonke, L. Vedel, A. Adsersen, M. Witt, H. Franzyk, J.W. Jaroszewski, α -peptide/ β -peptoid chimeras, *Org. Lett.*, 9 (2007) 1549-1552.
- [111] T.S. Ryge, N. Frimodt-Møller, P.R. Hansen, Antimicrobial activities of twenty lysine-peptoid hybrids against clinically relevant bacteria and fungi, *Chemotherapy*, 54 (2008) 152-156.

- [112] A.S. Culf, R.J. Ouellette, Solid-phase synthesis of *N*-substituted glycine oligomers (α -peptoids) and derivatives, *Molecules*, 15 (2010) 5282-5335.
- [113] C.A. Olsen, H.L. Ziegler, H.M. Nielsen, N. Frimodt-Møller, J.W. Jaroszewski, H. Franzyk, Antimicrobial, hemolytic, and cytotoxic activities of β -peptoid-peptide hybrid oligomers: Improved properties compared to natural amps, *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 11 (2010) 1356-1360.
- [114] D. Comegna, M. Benincasa, R. Gennaro, I. Izzo, F. De Riccardis, Design, synthesis and antimicrobial properties of non-hemolytic cationic α -cyclopeptoids, *Biorg. Med. Chem.*, 18 (2010) 2010-2018.
- [115] M.L. Huang, S.B.Y. Shin, M.A. Benson, V.J. Torres, K. Kirshenbaum, A comparison of linear and cyclic peptoid oligomers as potent antimicrobial agents, *ChemMedChem*, 7 (2012) 114-122.
- [116] M.L. Huang, M.A. Benson, S.B.Y. Shin, V.J. Torres, K. Kirshenbaum, Amphiphilic cyclic peptoids that exhibit antimicrobial activity by disrupting staphylococcus aureus membranes, *Eur. J. Org. Chem.*, 2013 (2013) 3560-3566.
- [117] O. Roy, S. Faure, V. Thery, C. Didierjean, C. Taillefumier, Cyclic β -peptoids, *Org. Lett.*, 10 (2008) 921-924.
- [118] N.P. Chongsiriwatana, T.M. Miller, M. Wetzler, S. Vakulenko, A.J. Karlsson, S.P. Palecek, S. Mobashery, A.E. Barron, Short alkylated peptoid mimics of antimicrobial lipopeptides, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 55 (2011) 417-420.
- [119] J.S. Laursen, P. Harris, P. Fristrup, C.A. Olsen, Triangular prism-shaped β -peptoid helices as unique biomimetic scaffolds, *Nat Commun*, 6 (2015).
- [120] S.W. Shuey, W.J. Delaney, M.C. Shah, M.A. Scialdone, Antimicrobial β -peptoids by a block synthesis approach, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16 (2006) 1245-1248.
- [121] T.S. Ryge, P.R. Hansen, Novel lysine-peptoid hybrids with antibacterial properties, *J. Pept. Sci.*, 11 (2005) 727-734.
- [122] T.S. Ryge, N. Frimodt-Møller, P.R. Hansen, Antimicrobial activities of twenty lysine-peptoid hybrids against clinically relevant bacteria and fungi, *Chemotherapy*, 54 (2008) 152-156.
- [123] C.A. Olsen, G. Bonke, L. Vedel, A. Adersen, M. Witt, H. Franzyk, J.W. Jaroszewski, α -peptide/ β -peptoid chimeras, *Org. Lett.*, 9 (2007) 1549-1552.
- [124] C.A. Olsen, H.L. Ziegler, H.M. Nielsen, N. Frimodt-Møller, J.W. Jaroszewski, H. Franzyk, Antimicrobial, hemolytic, and cytotoxic activities of β -peptoid-peptide hybrid oligomers: Improved properties compared to natural amps, *ChemBioChem*, 11 (2010) 1356-1360.
- [125] M.L. Huang, M.A. Benson, S.B.Y. Shin, V.J. Torres, K. Kirshenbaum, Amphiphilic cyclic peptoids that exhibit antimicrobial activity by disrupting staphylococcus aureus membranes, *Eur. J. Org. Chem.*, (2013) 3560-3566.
- [126] G.N. Tew, D. Liu, B. Chen, R.J. Doerksen, J. Kaplan, P.J. Carroll, M.L. Klein, W.F. DeGrado, *De novo* design of biomimetic antimicrobial polymers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99 (2002) 5110-5114.
- [127] D. Liu, S. Choi, B. Chen, R.J. Doerksen, D.J. Clements, J.D. Winkler, M.L. Klein, W.F. DeGrado, Nontoxic membrane-active antimicrobial arylamide oligomers, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43 (2004) 1158-1162.
- [128] R.W. Scott, W.F. DeGrado, G.N. Tew, *De novo* designed synthetic mimics of antimicrobial peptides, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 19 (2008) 620-627.
- [129] S. Choi, A. Isaacs, D. Clements, D. Liu, H. Kim, R.W. Scott, J.D. Winkler, W.F. DeGrado, *De novo* design and *in vivo* activity of conformationally restrained antimicrobial arylamide foldamers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106 (2009) 6968-6973.
- [130] Y. Su, W.F. DeGrado, M. Hong, Orientation, dynamics, and lipid interaction of an antimicrobial arylamide investigated by 19f and 31p solid-state NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, 132 (2010) 9197-9205.
- [131] W.F. DeGrado, D. Liu, R.W. Scott, Y. Xu, H. Tang, B. Korczak, Preparation of arylamide compounds as synthetic mimetics of host defense useful as antibiotics, in, *Polymedix, Inc., USA* . 2010, pp. 71pp.; Chemical Indexing Equivalent to 152:501404 (US).
- [132] B. Mensa, Y.H. Kim, S. Choi, R. Scott, G.A. Caputo, W.F. DeGrado, Antibacterial mechanism of action of arylamide foldamers, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 55 (2011) 5043-5053.
- [133] G.N. Tew, D.H. Liu, B. Chen, R.J. Doerksen, J. Kaplan, P.J. Carroll, M.L. Klein, W.F. DeGrado, *De novo* design of biomimetic antimicrobial polymers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99 (2002) 5110-5114.
- [134] L. Arnt, K. Nusslein, G.N. Tew, Nonhemolytic abiogenic polymers as antimicrobial peptide mimics, *J. Polym. Sci. Pol. Chem.*, 42 (2004) 3860-3864.
- [135] G.N. Tew, D. Clements, H. Tang, L. Arnt, R.W. Scott, Antimicrobial activity of an abiotic host defense peptide mimic, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1758 (2006) 1387-1392.
- [136] L. Arnt, G.N. Tew, Cationic facially amphiphilic poly(phenylene ethynylene)s studied at the air-water interface, *Langmuir*, 19 (2003) 2404-2408.
- [137] R. Feder, A. Dagan, A. Mor, Structure-activity relationship study of antimicrobial dermaseptin S4 showing the consequences of peptide oligomerization on selective cytotoxicity, *J. Biol. Chem.*, 275 (2000) 4230-4238.
- [138] S. Navon-Venezia, R. Feder, L. Gaidukov, Y. Carmeli, A. Mor, Antibacterial properties of dermaseptin S4 derivatives with *in vivo* activity, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46 (2002) 689-694.
- [139] S. Rotem, I.S. Radzishovsky, D. Bourdetsky, S. Navon-Venezia, Y. Carmeli, A. Mor, Analogous oligo-acyl-lysines with distinct antibacterial mechanisms, *FASEB J.*, 22 (2008) 2652-2661.

- [140] R.M. Eband, S. Rotem, A. Mor, B. Berno, R.F. Eband, Bacterial membranes as predictors of antimicrobial potency, *J. Am. Chem. Soc.*, 130 (2008) 14346-14352.
- [141] V. Menchise, G. De Simone, T. Tedeschi, R. Corradini, S. Sforza, R. Marchelli, D. Capasso, M. Saviano, C. Pedone, Insights into peptide nucleic acid (PNA) structural features: The crystal structure of a D-lysine-based chiral PNA-DNA duplex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100 (2003) 12021-12026.
- [142] Y. Hu, X. Li, S.M. Sebti, J. Chen, J. Cai, Design and synthesis of AApeptides: A new class of peptide mimics, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21 (2011) 1469-1471.
- [143] Y. Niu, H. Wu, Y. Li, Y. Hu, S. Padhee, Q. Li, C. Cao, J. Cai, AApeptides as a new class of antimicrobial agents, *Org. Biomol. Chem.*, 11 (2013) 4283-4290.
- [144] S. Padhee, Y. Hu, Y. Niu, G. Bai, H. Wu, F. Costanza, L. West, L. Harrington, L.N. Shaw, C. Cao, J. Cai, Non-hemolytic α -AApeptides as antimicrobial peptidomimetics, *Chem. Commun.*, 47 (2011) 9729-9731.
- [145] Y. Niu, S. Padhee, H. Wu, G. Bai, L. Harrington, W.N. Burda, L.N. Shaw, C. Cao, J. Cai, Identification of γ -AApeptides with potent and broad-spectrum antimicrobial activity, *Chem. Commun.*, 47 (2011) 12197-12199.
- [146] Y. Niu, Y. Hu, X. Li, J. Chen, J. Cai, γ -AApeptides: Design, synthesis and evaluation, *New J. Chem.*, 35 (2011) 542-545.
- [147] H. Wu, Y. Niu, S. Padhee, R.E. Wang, Y. Li, Q. Qiao, G. Bai, C. Cao, J. Cai, Design and synthesis of unprecedented cyclic γ -AApeptides for antimicrobial development, *Chem. Sci.*, 3 (2012) 2570-2575.
- [148] Y. Hu, M.N. Amin, S. Padhee, R.E. Wang, Q. Qiao, G. Bai, Y. Li, A. Mathew, C. Cao, J. Cai, Lipidated peptidomimetics with improved antimicrobial activity, *ACS medicinal chemistry letters*, 3 (2012) 683-686.
- [149] Y. Niu, S. Padhee, H. Wu, G. Bai, Q. Qiao, Y. Hu, L. Harrington, W.N. Burda, L.N. Shaw, C. Cao, J. Cai, Lipo- γ -AApeptides as a new class of potent and broad-spectrum antimicrobial agents, *J. Med. Chem.*, 55 (2012) 4003-4009.
- [150] Y. Niu, H. Wu, R. Huang, Q. Qiao, F. Costanza, X.-S. Wang, Y. Hu, M.N. Amin, A.-M. Nguyen, J. Zhang, E. Haller, S. Ma, X. Li, J. Cai, Nanorods formed from a new class of peptidomimetics, *Macromolecules*, 45 (2012) 7350-7355.
- [151] Y. Li, C. Smith, H. Wu, S. Padhee, N. Manoj, J. Cardiello, Q. Qiao, C. Cao, H. Yin, J. Cai, Lipidated cyclic γ -AApeptides display both antimicrobial and anti-inflammatory activity, *ACS Chem. Biol.*, 9 (2014) 211-217.
- [152] Y. Li, H. Wu, P. Teng, G. Bai, X. Lin, X. Zuo, C. Cao, J. Cai, Helical antimicrobial sulfono- γ -AApeptides, *J. Med. Chem.*, 58 (2015) 4802-4811.
- [153] P. Polcyn, M. Jurczak, A. Rajnisz, J. Solecka, Z. Urbanczyk-Lipkowska, Design of antimicrobially active small amphiphilic peptide dendrimers, *Molecules*, 14 (2009) 3881.
- [154] Z. Liu, A.W. Young, P. Hu, A.J. Rice, C. Zhou, Y. Zhang, N.R. Kallenbach, Tuning the membrane selectivity of antimicrobial peptides by using multivalent design, *ChemBioChem*, 8 (2007) 2063-2065.
- [155] M. Bruschi, G. Pirri, A. Giuliani, S.F. Nicoletto, I. Baster, M.A. Scorciapino, M. Casu, A.C. Rinaldi, Synthesis, characterization, antimicrobial activity and LPS-interaction properties of SB041, a novel dendrimeric peptide with antimicrobial properties, *Peptides*, 31 (2010) 1459-1467.
- [156] M. A. Scorciapino, G. Pirri, A. V. Vargiu, P. Ruggerone, A. Giuliani, M. Casu, J. Buerck, P. Wadhvani, A. S. Ulrich, A. C. Rinaldi, A novel dendrimeric peptide with antimicrobial properties: Structure-function analysis of SB056, *Biophys. J.*, 102 (2012) 1039-1048.
- [157] J. Janiszewska, J. Swieton, A.W. Lipkowski, Z. Urbanczyk-Lipkowska, Low molecular mass peptide dendrimers that express antimicrobial properties, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13 (2003) 3711-3713.
- [158] J.P. Tam, Y.-A. Lu, J.-L. Yang, Antimicrobial dendrimeric peptides, *Eur. J. Biochem.*, 269 (2002) 923-932.
- [159] S. Hou, C. Zhou, Z. Liu, A.W. Young, Z. Shi, D. Ren, N.R. Kallenbach, Antimicrobial dendrimer active against escherichia coli biofilms, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19 (2009) 5478-5481.
- [160] N. Nagahori, R.T. Lee, S.-I. Nishimura, D. Pagé, R. Roy, Y.C. Lee, Inhibition of adhesion of type 1 fimbriated escherichia coli to highly mannosylated ligands, *ChemBioChem*, 3 (2002) 836-844.
- [161] J.-L. Reymond, T. Darbre, Peptide and glycopeptide dendrimer apple trees as enzyme models and for biomedical applications, *Org. Biomol. Chem.*, 10 (2012) 1483-1492.
- [162] M. Stach, N. Maillard, R.U. Kadam, D. Kalbermatter, M. Meury, M.G.P. Page, D. Fotiadis, T. Darbre, J.-L. Reymond, Membrane disrupting antimicrobial peptide dendrimers with multiple amino termini, *MedChemComm*, 3 (2012) 86-89.
- [163] M. Stach, T.N. Siriwardena, T. Kohler, C. van Delden, T. Darbre, J.L. Reymond, Combining topology and sequence design for the discovery of potent antimicrobial peptide dendrimers against multidrug-resistant *pseudomonas aeruginosa*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53 (2014) 12827-12831.
- [164] B.E. Haug, W. Stensen, M. Kalaaji, Ø. Rekdal, J.S. Svendsen, Synthetic antimicrobial peptidomimetics with therapeutic potential, *J. Med. Chem.*, 51 (2008) 4306-4314.
- [165] J. Isaksson, B.O. Brandsdal, M. Engqvist, G.E. Flaten, J.S.M. Svendsen, W. Stensen, A synthetic antimicrobial peptidomimetic (Itx 109): Stereochemical impact on membrane disruption, *J. Med. Chem.*, 54 (2011) 5786-5795.
- [166] B. Fantin, Modèles expérimentaux : Quels modèles peuvent encore apporter des informations dans le traitement des infections bactériennes ?, *Réanimation*, 15 (2006) 214-220.
- [167] D. Andes, W.A. Craig, Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: A critical review, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 19 (2002) 261-268.

- [168] N. Legrand, A. Ploss, R. Balling, P.D. Becker, C. Borsotti, N. Brezillon, J. Debarry, Y. de Jong, H. Deng, J.P. Di Santo, *et al.* Humanized mice for modeling human infectious disease: Challenges, progress, and outlook, *Cell host & microbe*, 6 (2009) 5-9.
- [169] J.D. Alder, Determining the therapeutic potential of experimental antibacterial agents: The use of animal models, *Curr. Pharm. Des.*, 3 (1997) 143-158.
- [170] T. Velkov, P.J. Bergen, J. Lora-Tamayo, C.B. Landersdorfer, J. Li, PK/PD models in antibacterial development, *Curr. Opin. Microbiol.*, 16 (2013) 573-579.
- [171] H. Eagle, R. Fleischman, A.D. Musselman, The bactericidal action of penicillin *in vivo* - the participation of the host, and the slow recovery of the surviving organisms, *Ann. Intern. Med.*, 33 (1950) 544-571.
- [172] H.L. Rocchetta, C.J. Boylan, J.W. Foley, P.W. Iversen, D.L. Letourneau, C.L. McMillian, P.R. Contag, D.E. Jenkins, T.R. Parr, Validation of a noninvasive, real-time imaging technology using bioluminescent *escherichia coli* in the neutropenic mouse thigh model of infection, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45 (2001) 129-137.
- [173] G. Wang, W. Cong, K. Durairaj, X. Qian, H. Shen, P. Sinn, E. Hoffman, G. McLennan, M. Henry, *In vivo* mouse studies with bioluminescence tomography, *Opt. Express*, 14 (2006) 7801-7809.
- [174] D.M.E. Bowdish, D.J. Davidson, Y.E. Lau, K. Lee, M.G. Scott, R.E.W. Hancock, Impact of LL-37 on anti-infective immunity, *Journal of Leukocyte Biology*, 77 (2005) 451-459.
- [175] A.K. Marr, W.J. Gooderham, R.E.W. Hancock, Antibacterial peptides for therapeutic use: Obstacles and realistic outlook, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 6 (2006) 468-472.
- [176] H. Wiegand, B. Wirz, A. Schweitzer, G. Gross, M.I.R. Perez, H. Andres, T. Kimmerlin, M. Rueping, D. Seebach, Pharmacokinetic investigation of a ^{14}C -labelled β^3/α tetrapeptide in rats, *Chem. Biodivers.*, 1 (2004) 1812-1828.
- [177] J. Seo, G. Ren, H. Liu, Z. Miao, M. Park, Y. Wang, T.M. Miller, A.E. Barron, Z. Cheng, *In vivo* biodistribution and small animal PET of ^{64}Cu -labeled antimicrobial peptoids, *Bioconjugate Chem.*, 23 (2012) 1069-1079.
- [178] H. Wiegand, B. Wirz, A. Schweitzer, G.P. Camenisch, M.I. Rodriguez Perez, G. Gross, R. Woessner, R. Voges, P.I. Arvidsson, J. Frackenpohl, D. Seebach, The outstanding metabolic stability of a ^{14}C -labeled β -nonapeptide in rats – *in vitro* and *in vivo* pharmacokinetic studies, *Biopharm. Drug Dispos.*, 23 (2002) 251-262.
- [179] W.F. Degrado, D. Liu, R.W. Scott, Y. Xu, H. Tang, B. Korczak, Preparation of arylamide compounds as synthetic mimetics of host defense useful as antibiotics, in, Polymedix, Inc., USA . 2010, pp. 46pp.; Chemical Indexing Equivalent to 153:11679 (WO).
- [180] B. Mensa, G.L. Howell, R. Scott, W.F. DeGrado, Comparative mechanistic studies of brilacidin, daptomycin, and the antimicrobial peptide LL16, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 58 (2014) 5136-5145.
- [181] H. Sarig, L. Livne, V. Held-Kuznetsov, F. Zaknoon, A. Ivankin, D. Gidalevitz, A. Mor, A miniature mimic of host defense peptides with systemic antibacterial efficacy, *The FASEB Journal*, 24 (2010) 1904-1913.
- [182] K. Burgess, H. Shin, D.S. Linthicum, Solid-phase syntheses of unnatural biopolymers containing repeating urea units, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 34 (1995) 907-909.
- [183] K. Burgess, J. Ibarzo, D.S. Linthicum, D.H. Russell, H. Shin, A. Shitangkoon, R. Totani, A.J. Zhang, Solid phase syntheses of oligoureas, *J. Am. Chem. Soc.*, 119 (1997) 1556-1564.
- [184] W.D. Kumler, G.M. Fohlen, The dipole moment and structure of urea and thiourea, *J. Am. Chem. Soc.*, 64 (1942) 1944-1948.
- [185] T. Hintermann, K. Gademann, B. Jaun, D. Seebach, γ -peptides forming more stable secondary structures than α -peptides: Synthesis and helical NMR-solution structure of the γ -hexapeptide analog of H-(Val-Ala-Leu)(2)-OH, *Helv. Chim. Acta*, 81 (1998) 983-1002.
- [186] Y.-R. Nelli, C. Douat-Casassus, P. Claudon, B. Kauffmann, C. Didierjean, G. Guichard, An activated building block for the introduction of the histidine side chain in aliphatic oligourea foldamers, *Tetrahedron*, 68 (2012) 4492-4500.
- [187] V. Semetey, D. Rognan, C. Hemmerlin, R. Graff, J.P. Briand, M. Marraud, G. Guichard, Stable helical secondary structure in short-chain *N,N'*-linked oligoureas bearing proteinogenic side chains, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41 (2002) 1893-+.
- [188] A. Violette, M.C. Averlant-Petit, V. Semetey, C. Hemmerlin, R. Casimir, R. Graff, M. Marraud, J.-P. Briand, D. Rognan, G. Guichard, *N,N'*-linked oligoureas as foldamers: Chain length requirements for helix formation in protic solvent investigated by circular dichroism, NMR spectroscopy, and molecular dynamics, *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (2005) 2156-2164.
- [189] A. Violette, N. Lancelot, A. Poschalko, M. Piotto, J.-P. Briand, J. Raya, K. Elbayed, A. Bianco, G. Guichard, Exploring helical folding of oligoureas during chain elongation by high-resolution magic-angle-spinning (HRMAS) NMR spectroscopy, *Chem. Eur. J.*, 14 (2008) 3874-3882.
- [190] G. Guichard, A. Violette, G. Chassaing, E. Miclet, Solution structure determination of oligoureas using methylene spin state selective NMR at ^{13}C natural abundance, *Magn. Reson. Chem.*, 46 (2008) 918-924.
- [191] L. Fischer, P. Claudon, N. Pendem, E. Miclet, C. Didierjean, E. Ennifar, G. Guichard, The canonical helix of urea oligomers at atomic resolution: Insights into folding-induced axial organization, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49 (2010) 1067-1070.
- [192] J. Fremaux, L. Fischer, T. Arbogast, B. Kauffmann, G. Guichard, Condensation approach to aliphatic oligourea foldamers: Helices with *N*-(pyrrolidin-2-ylmethyl)ureido junctions, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50 (2011) 11382-11385.

- [193] L. Fischer, G. Guichard, Folding and self-assembly of aromatic and aliphatic urea oligomers: Towards connecting structure and function, *Org. Biomol. Chem.*, 8 (2010) 3101-3117.
- [194] A. Violette, S. Fournel, K. Lamour, O. Chaloin, B. Frisch, J.-P. Briand, H. Monteil, G. Guichard, Mimicking helical antibacterial peptides with nonpeptidic folding oligomers, *Chem. Biol.*, 13 (2006) 531-538.
- [195] N. Pendem, C. Douat, P. Claudon, M. Laguerre, S. Castano, B. Desbat, D. Cavagnat, E. Ennifar, B. Kauffmann, G. Guichard, Helix-forming propensity of aliphatic urea oligomers incorporating noncanonical residue substitution patterns, *J. Am. Chem. Soc.*, 135 (2013) 4884-4892.
- [196] J.-M. Kim, Y. Bi, S.J. Paikoff, P.G. Schultz, The solid phase synthesis of oligoureas, *Tetrahedron Lett.*, 37 (1996) 5305-5308.
- [197] G. Guichard, V. Semetey, M. Rodriguez, J.P. Briand, Solid phase synthesis of oligoureas using O-succinimidyl-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)ethylcarbamate derivatives as activated monomers, *Tetrahedron Lett.*, 41 (2000) 1553-1557.
- [198] A. Boeijen, J. van Ameijde, R.M.J. Liskamp, Solid-phase synthesis of oligourea peptidomimetics employing the Fmoc protection strategy, *J. Org. Chem.*, 66 (2001) 8454-8462.
- [199] G. Guichard, V. Semetey, C. Didierjean, A. Aubry, J.P. Briand, M. Rodriguez, Effective preparation of O-succinimidyl-2(tert-butoxycarbonylamino) ethylcarbamate derivatives from β -amino acids. Application to the synthesis of urea-containing pseudopeptides and oligoureas, *J. Org. Chem.*, 64 (1999) 8702-8705.
- [200] P. Claudon, A. Violette, K. Lamour, M. Decossas, S. Fournel, B. Heurtault, J. Godet, Y. Mély, B. Jamart-Grégoire, M.-C. Averlant-Petit, J.-P. Briand, G. Duportail, H. Monteil, G. Guichard, Consequences of isostructural main-chain modifications for the design of antimicrobial foldamers: Helical mimics of host-defense peptides based on a heterogeneous amide/urea backbone, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49 (2010) 333-336.
- [201] C. Douat-Casassus, K. Pulka, P. Claudon, G. Guichard, Microwave-enhanced solid-phase synthesis of *N,N'*-linked aliphatic oligoureas and related hybrids, *Org. Lett.*, 14 (2012) 3130-3133.
- [202] W.-M. Yau, W.C. Wimley, K. Gawrisch, S.H. White, The preference of tryptophan for membrane interfaces, *Biochemistry*, 37 (1998) 14713-14718.

CHAPITRE 2

Conception de nouveaux foldamères
hybrides à base d'urée par insertion de
motifs isostères

1. Introduction du lien thiourée et ses conséquences structurales

Afin de diversifier la composition de nos foldamères à base d'urées (NHC(=O)NH) et ainsi établir la relation structure-fonction de nos oligourées antimicrobiennes sur *B. anthracis*, nous avons décidé d'étudier dans un premier temps le remplacement d'un ou plusieurs liens urées par des liens isostères thiourée NHC(=S)NH. La synthèse des composés en solution et sur support solide mais aussi les conséquences structurales de ces substitutions sur l'hélicité des composés nouvellement préparés seront donc abordés dans cette première partie.

En comparaison, l'incorporation de lien thioamide dans des séquences hélicoïdales α -peptidiques a déjà été réalisée dans le cadre de l'organocatalyse [1], de la synthèse de composés antibactériens [2,3] ou encore herbicides [4]. Xie *et al.* se sont intéressés par exemple à l'incorporation de thioamides et d'amidines au sein de la Vancomycine, un antibiotique de la famille des glycopeptides inhibant la synthèse de la membrane des bactéries [3]. Le groupe de Seebach a aussi inséré des liens thioamides dans les β -peptides afin d'étudier les conséquences structurales de ce nouveau lien dans la structure secondaire hélicoïdale des séquences β -peptidiques [5]. De surcroît, les thioxopeptides ont aussi été décrits comme de bons candidats pour le photochromisme rapide des protéines dans le but de moduler leurs activités biologiques ou enzymatiques [6]. En effet, la liaison thioamide *trans* s'isomérise en liaison *cis* sous irradiation UV et conduit à la perte de l'activité enzymatique qui sera de nouveau installée après l'isomérisation thermique *cis/trans*.

a) Généralités sur les thiourées

Dans la classification périodique, l'atome de soufre se situe dans la 16^{ième} colonne juste en dessous de l'atome d'oxygène. Néanmoins, les propriétés chimiques et physico-chimiques des fonctions thiocarbonyles sont différentes de celles des carbonyles (Table II.1).

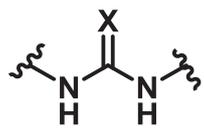
	X=O	X=S
		
Longueur de la liaison C=X (Å)	1,22	1,68
Longueur de la liaison hydrogène (N-X, Å)	2,90	3,41
Rayon covalent (Å)	0,73	1,02
Electronégativité de X (Pauling)	3,44	2,58
pKa (DMSO à 25 °C) [7]	26,9	21,1

Table II.1 : Propriétés chimiques et physico-chimiques des urées et des thiourées.

La liaison C=S est plus longue que la liaison C=O et sa capacité à former des liaisons hydrogène est différente : l'atome de soufre possède une électronégativité inférieure à celle de l'atome d'oxygène (Tableau II.1) et par conséquent ce même atome montre un caractère

accepteur de liaison hydrogène plus faible. En revanche, les NH des motifs thiourées sont plus acides que ceux des urées correspondantes (Tableau II.1) et sont donc potentiellement de meilleurs donneurs de liaison hydrogène. Enfin, la géométrie des liaisons hydrogène diffère (longueur et angles des liaisons H) selon que l'accepteur est un carbonyle ou un thiocarbonyle [8]. L'orientation de la liaison hydrogène dans le cas des thiourées, est plus diffuse, l'angle dièdre (N, C, S, H) varie de 0 à 70° alors qu'il n'est compris entre 0 et 20° dans le cas des urées. De plus, lorsque la liaison hydrogène n'est pas formée dans le plan des doublets non liants du soufre (c'est-à-dire quand l'angle dièdre est davantage compris entre 60° et 120°), l'angle (C, S, H) adopte systématiquement des valeurs plus faibles que celles des angles (C, O, H) habituels résultant d'une interaction de l'hydrogène avec les électrons π de la liaison C=S.

b) Synthèse en solution

Afin d'étudier les conséquences structurales de l'insertion de motif(s) thiourée(s) NHC(=S)NH sur une l'hélice-2,5 d'oligourée, la synthèse de différents composés comportant un ou plusieurs liens thiourées a été réalisée en solution sur une séquence modèle de type Boc-Val^u-Ala^u-Leu^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe. Pour ce faire, l'assemblage de la chaîne suivant une stratégie Boc a été choisie car elle reste la méthode de synthèse la plus facilement contrôlable (méthodes analytiques simples (CCM, HPLC) avec des produits intermédiaires facilement caractérisés). Ainsi, un ou plusieurs liens thiourées ont été introduits en extrémité et au centre de la séquence.

Cette étude a d'abord été initiée par le Dr. Nelli puis m'a été confiée car elle répondait aux objectifs de ma thèse résumés dans le chapitre précédent.

i) Synthèse des monomères activés

Dans un premier temps, la préparation de monomères adaptés pour permettre l'insertion de lien thiourée a été mise au point. La synthèse de thiourées a été intensément étudiée dès les années 60 [9]. Les nombreuses méthodes présentes dans la littérature se différencient selon la symétrie ou non de la thiourée à synthétiser. Pour la synthèse de thiourées symétriques (Figure II.1), la réaction entre (i) du thiophosgène et une amine primaire ou secondaire est longtemps restée la principale méthode [10]. Toutefois, l'utilisation quelque peu délicate du thiophosgène peut être évitée en utilisant des composés comme (ii) le 1,1'-thiocarbonyldiimidazole [11], (iii) des sels de 2-chloropyridinium

avec du trithiocarbonate de sodium [12] ou (iv) par une réaction entre un carbodiimide et du sulfure d'hydrogène [13].

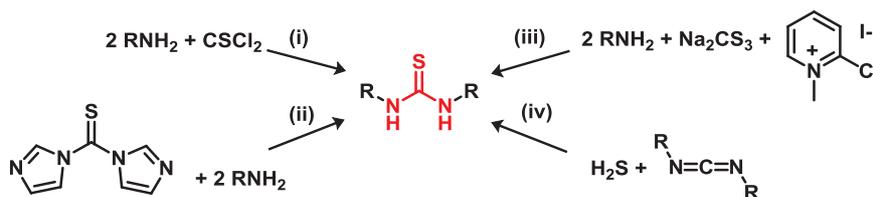


Figure II.1 : Exemples de méthodes de synthèse de thiourées symétriques.

Pour la formation de thiourées non symétriques, une grande variété de méthodes ont été développées (Figure II.2). L'utilisation d'isothiocyanates [14] ((i), Figure II.2) en présence d'amines primaires ou secondaires est la stratégie la plus couramment utilisée. Néanmoins, la formation de produits secondaires, l'instabilité des isothiocyanates et leurs difficultés de synthèse, ont incité les chercheurs à développer des méthodes alternatives. De manière non exhaustive, on peut citer (ii) la réaction entre une amine secondaire sur le thiocyanogène de triphénylphosphine [15], ou encore (iii) l'activation du dithiocarbamate grâce à un sel de 2-halothiazolium puis au couplage sur une amine [16]. Il est également possible (iv) de synthétiser une thiourée par attaque nucléophile sur une thiourée déjà existante [17-19]. D'autre part, (v) la réaction du disulfure de carbone sur une amine primaire en présence de triarylposphite ou de hexaméthylphosphoramide [20] ou en milieu aqueux [21], (vi) l'utilisation de 1-(methyldithiocarbonyl)imidazole [22] et (vii) enfin l'utilisation d'alkyl/aryl-thiocarbamoyl-benzotriazoles comme isothiocyanate masqué [23] sont différentes voies d'accès aux thiourées asymétriques qui ont été tour à tour développées.

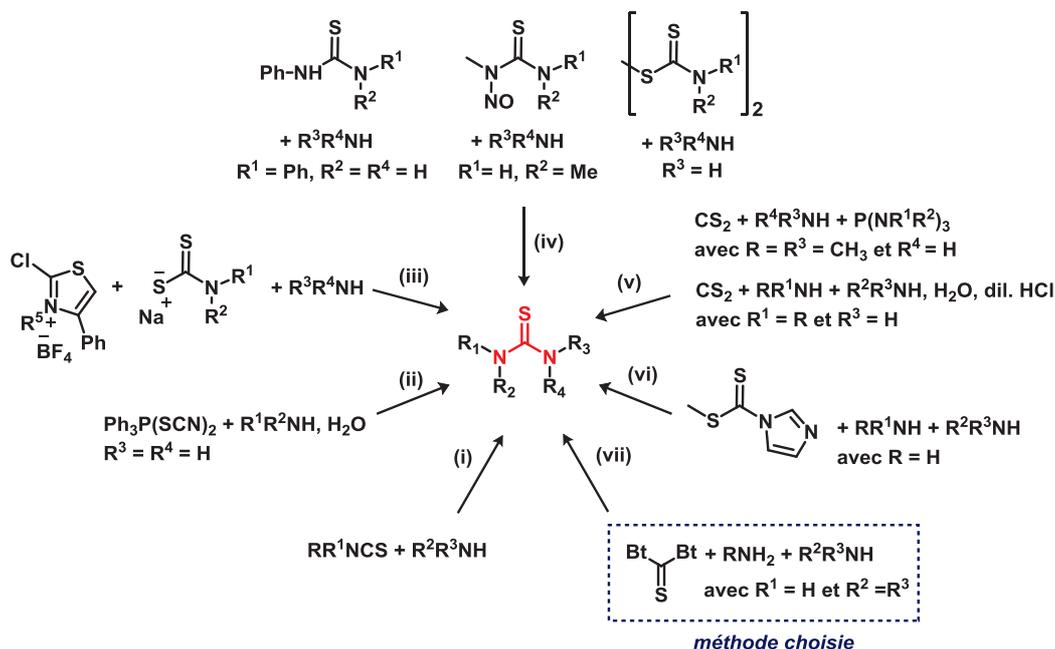


Figure II.2 : Exemples de méthodes de synthèse de thiourées asymétriques.

Dans le cadre de notre étude, nous avons choisi d'utiliser les thiocarbamoyl-benzotriazoles développés comme isothiocyanates masqués par le groupe de Katritsky *et al.* [23]. La synthèse de nos nouveaux monomères a été obtenue à partir des acides α -aminés correspondants, l'amine étant protégée par un groupement Boc (Schéma II.1). Après la réduction de l'acide en alcool, le dérivé phthaloyle est obtenu par une réaction de Mitsunobu [24]. Il reste ensuite à convertir l'amine par réduction en présence de monohydrate d'hydrazine (réaction dite « version modifiée de la réaction de Gabriel » [25]) avant d'activer l'amine nouvellement formée sous forme de thiocarbamoyle à l'aide de bis(benzotriazolyl)méthanethione [23]. Dans ces conditions, les monomères de type alanine **M1**, valine **M2** et leucine **M3** ont été synthétisés avec un rendement global de 37 %, 30 % et 31 % respectivement.

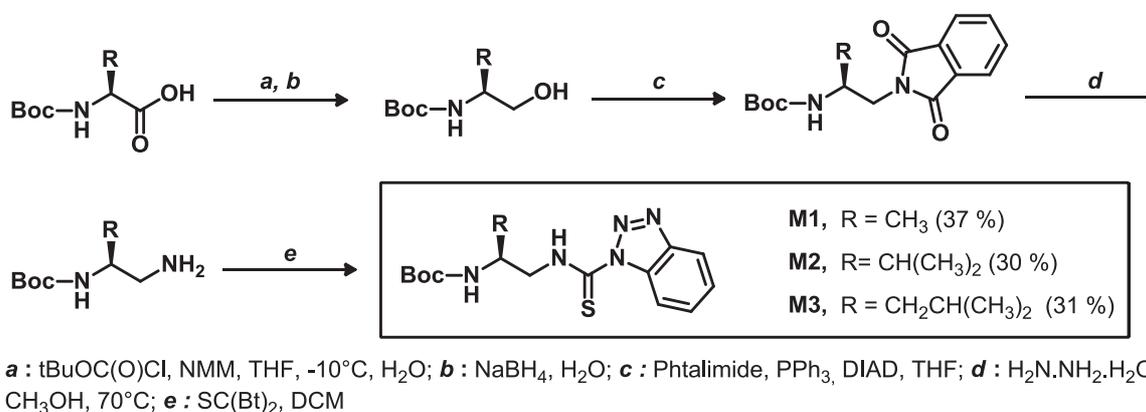


Schéma II.1 : Synthèse des monomères activés **M1**, **M2** et **M3**.

ii) Synthèse des oligomères

Pour réaliser notre étude sur le repliement de séquences hybrides en solution, six oligomères (Figure II.3) ont été synthétisés en utilisant des conditions de couplage et de déprotection conventionnelles. Le composé **OL1** ne possède pas de jonction thiourée, il est notre composé de référence. Ensuite une série de cinq composés hybrides a été préparée (composés **OL2**, **OL3**, **OL4** et **OL5**). Une ou deux thiourées consécutives ont été positionnées aux extrémités ou en position centrale de la séquence de l'oligourée de référence **OL1**. Pour finir, la synthèse de l'oligothiourée **OL6** a aussi été réalisée afin de mesurer la capacité de structuration d'un oligomère ne comportant que des liens thiourées.

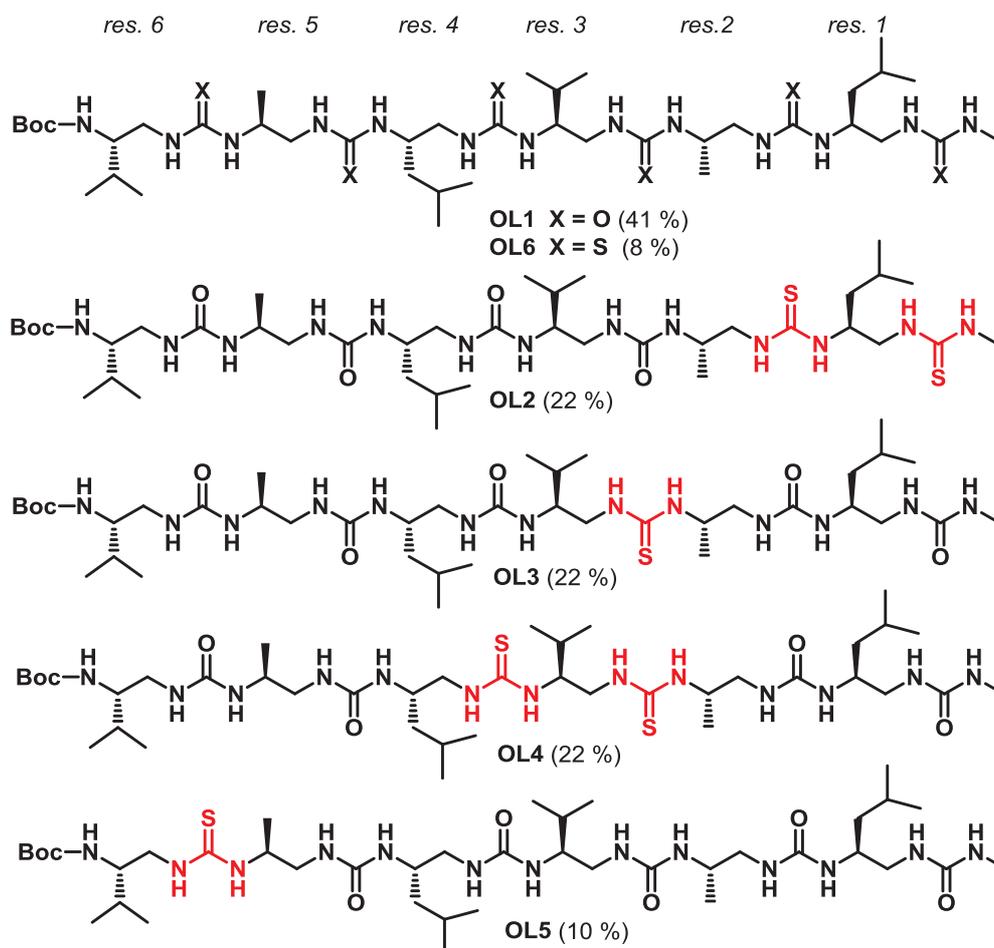
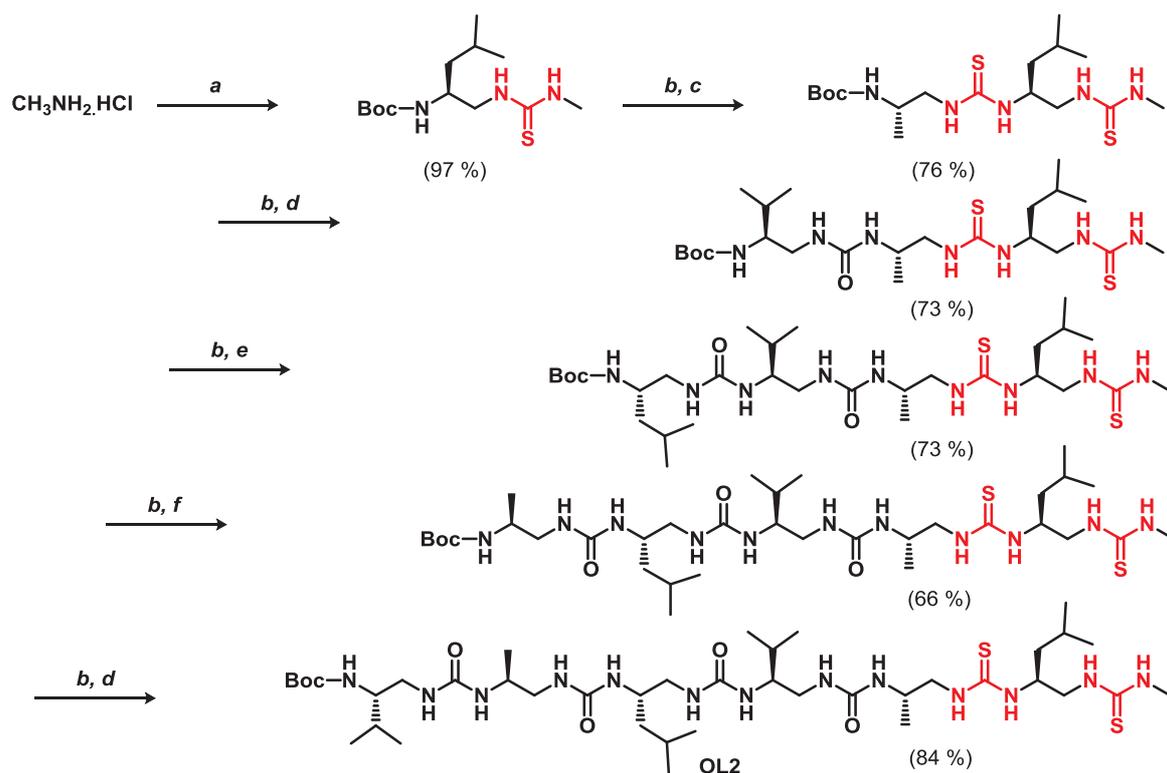


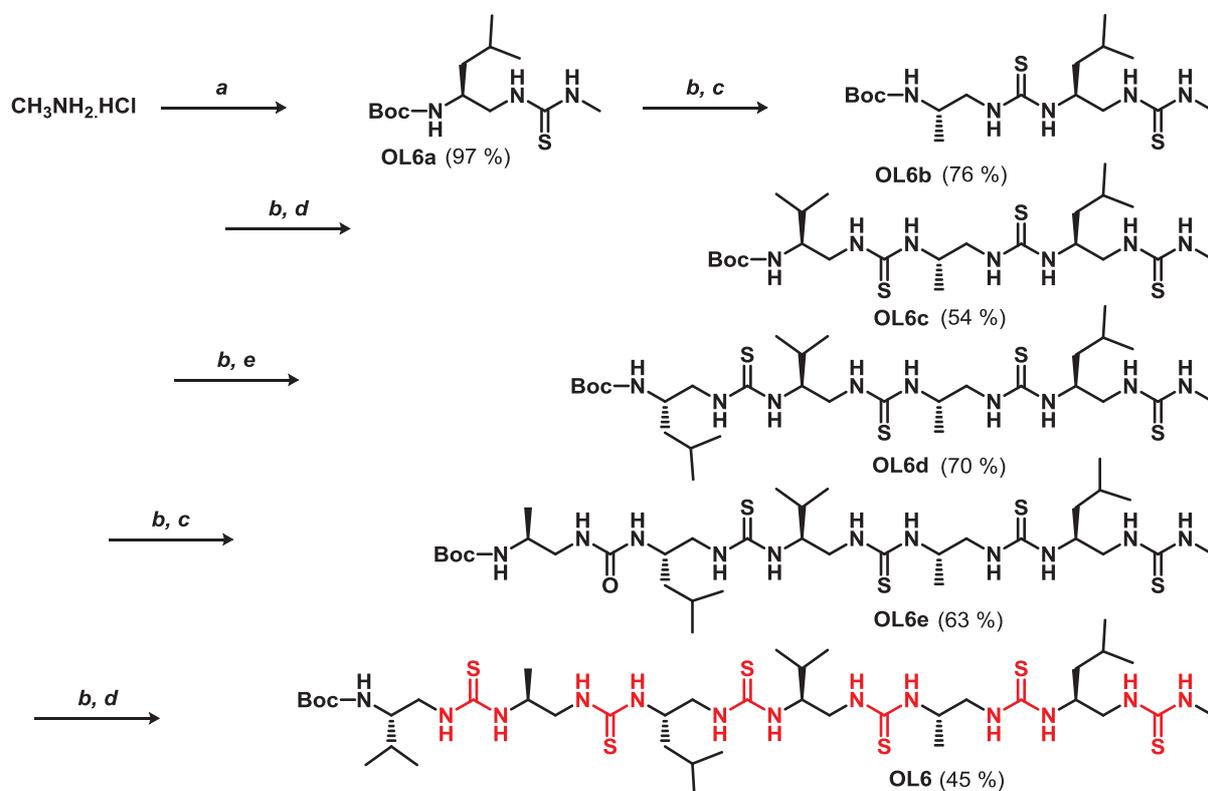
Figure II.3 : Structures chimiques de molécules **OL1** (molécule de référence), **OL2**, **OL3**, **OL4**, **OL5** et de l'homologothiourée **OL6** avec entre parenthèses leurs rendements globaux de synthèse.

Présentée en détails dans le schéma II.2, la synthèse débute par la condensation du chlorure de méthylamine sur le premier monomère, suivie de la déprotection du groupement protecteur Boc à l'aide d'acide trifluoroacétique (TFA). Le couplage suivant peut être ensuite réalisé en présence de diisopropyléthylamine (DIEA): soit avec le carbamate de succinimide pour la synthèse d'un lien urée, soit à partir du thiocarbamoylbenzotriazole pour la synthèse d'un lien thiourée. Les synthèses des composés **OL1**, **OL2**, **OL3**, **OL4**, **OL5**, **OL6** de 41 %, 22 %, 22 %, 22 %, 10 % et de 8 % respectivement. De surcroît, lors de nos synthèses, le rendement de couplage des monomères thiourées varie de 36 à 76 % alors que le rendement de couplage des monomères urées est compris en 66 à 86 %. Ces rendements plus faibles soulignent une réactivité moindre des monomères activés de type thiocarbamoyl par rapport aux monomères activés de type carbamate de succinimide. Une fois cette série d'oligomères en main, leur mode de repliement en solution en utilisant différentes techniques

spectroscopiques (Infrarouge, CD, RMN) et à l'état solide (Infrarouge, diffractions des rayons X) a pu être étudié.



a : M3, Et₃N, DCM; **b** : TFA ; **c** : M1, DIEA, DMF; **d** : Boc-Val^u-OSu, DIEA, CH₃CN; **e** : Boc-Leu^u-OSu, DIEA, CH₃CN; **f** : Boc-Ala^u-OSu, DIEA, CH₃CN;



a : M3, Et₃N, DCM ; **b** : TFA ; **c** : M1, DIEA, CH₃CN; **d** : M2, DIEA, CH₃CN; **e** : M3, DIEA, CH₃CN

Schéma II.2 : Synthèses des oligomères hybrides OL2 et OL6.

c) Etude conformationnelle en solution

i) Par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)

Nous avons premièrement analysé par spectroscopie infrarouge en solution (dans le méthanol à 1-2 mg/mL) et en poudre chacun des composés (Figures II.4 et II.5). Les bandes principales observées dans la région caractéristique entre 1400-1800 cm^{-1} sont rapportées dans le tableau (Table II.2). De précédents travaux réalisés dans le groupe avaient révélés que deux bandes intenses et fines à 1580 cm^{-1} et 1635 cm^{-1} dominaient les spectres FT-IR de séquences homo-oligourées hélicoïdales. Ces deux bandes proviennent de l'élongation du carbonyle et de l'élongation de la liaison C-N couplées à la déformation de la liaison N-H. Elles sont appelées, respectivement, «urée I» et «urée II», par analogie aux bandes amide I et amide II que l'on trouve chez les peptides et les protéines [26,27]. Dans le cas de la fonction thiourée, on retrouve une bande vers 1600 cm^{-1} résultant de l'étirement symétrique et asymétrique du thiocarbonyle et une bande vers 1450 cm^{-1} due à l'étirement de la liaison C-N.

Composé	En solution		A l'état solide	
	Bande Urée I	Bande Urée II	Bande Urée I	Bande Urée II
OL1	1639 (s)	1583 (m), 1557 (sh)	1635 (s)	1577 (m), 1556 (sh)
OL2	1639 (s)	1576 (m), 1559 (sh)	1642 (s)	1576 (m), 1548 (sh)
OL3	1643 (br)	1582 (m), 1560 (w, sh)	1642 (br)	1575 (br), 1549 (w, sh)
OL4	1654 (br)	1576 (br), 1562 (w, sh)	1646 (br)	1569 (br), 1544 (w, sh)
OL5	1645 (br)	1577 (br), 1559 (w, sh)	1636 (m)	1573 (m), 1546 (sh)
OL6	/	1576, 1560 (br)	/	1574, 1556 (br)

Table II.2 : Nombre d'ondes des bandes d'étirements des liaisons C=O et C=S des composés **OL1** à **OL6**, l'annotation entre parenthèses donne l'allure des bandes avec *s = forte*, *br = large*, *w = faible* et *m = moyenne*.

L'analyse des spectres permet d'entrevoir certaines tendances sur le repliement de nos composés. Tout d'abord, les spectres, en poudre et en solution, du composé de référence **OL1** confirme la formation d'une hélice avec la présence des deux bandes intenses «urée I» et «urée II» (plus large). Des spectres similaires peuvent être observés pour la molécule **OL2** comportant deux liens thiourées en extrémité « C-terminale », ce qui semble indiquer le maintien d'une conformation hélicoïdale malgré l'insertion de deux thiourées terminales.

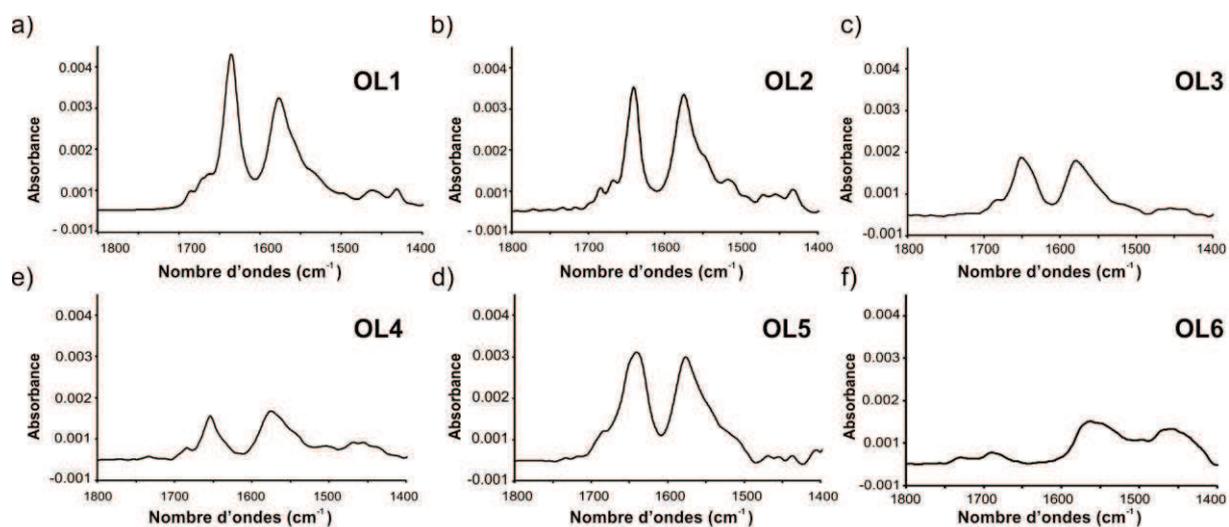


Figure II.4 : Régions 1400-1800 cm^{-1} des spectres des composés oligourées **OL1** à **OL6** en solution dans le méthanol à 1-2 mg/mL.

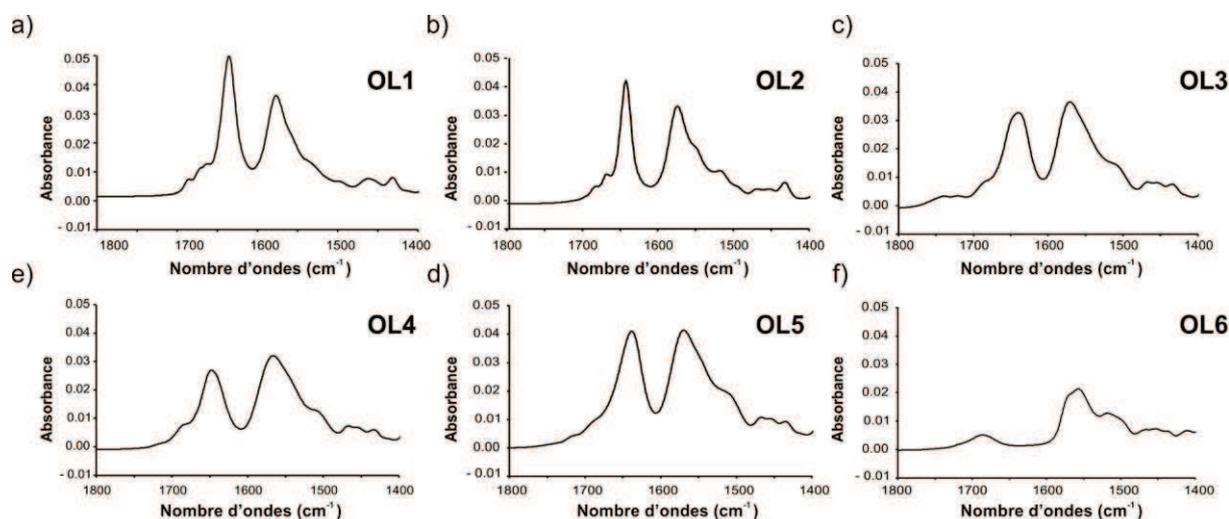


Figure II.5 : Régions 1400-1800 cm^{-1} des spectres des composés oligourées **OL1** à **OL6** en poudre.

Les spectres des composés **OL3**, **OL4** et **OL5**, comportent toujours ces deux bandes, mais diffèrent cependant significativement par leur allure générale. En effet, la bande «urée I» est notablement plus large, plus faible et subit un déplacement vers des longueurs d'ondes plus élevées. Cette tendance est accentuée dans les spectres en solution (Table II.2). Ces modifications de signature FT-IR (principalement la bande de « urée I») reflètent des perturbations de structuration résultant de l'insertion des liens thiourées dans ces oligomères. Il est également possible ici de souligner que les changements des spectres du composé hybride **OL5** sont moins significatifs que ceux d'**OL3** et **OL4**, reflétant une déstabilisation de l'hélice plus importante en position centrale (**OL3** et **OL4**) qu'en position « N-terminale » (**OL5**).

Enfin, l'interprétation des spectres de **OL6** est assez difficile. Que ce soit en solution ou en poudre, les spectres ne possèdent pas de bandes intenses et fines remarquables. De

plus, alors que deux larges bandes à 1560 et à 1455 cm^{-1} sont visibles en solution, seule la bande à 1560 cm^{-1} est apparente à l'état solide.

ii) Par dichroïsme circulaire

(1) Cas des composés hybrides

La caractérisation des oligomères (urée/thiourée) **OL1-OL5** en solution a été réalisée par dichroïsme circulaire (CD). Déjà évoqué dans le chapitre 1, les oligourées par leur structuration en hélice 2,5 possèdent une signature CD caractéristique avec un maximum d'ellipticité molaire positif aux environs de 203 nm ainsi qu'un maximum négatif d'intensité plus faible à 188 nm [28,29]. Dans le cas de nos composés hybrides, une augmentation de la complexité des spectres est attendue due à la présence de deux chromophores différents (C=O et C=S).

Les spectres, présentés en figure II.6, ont été réalisés dans le TFE à 0,2 mM. Pour chacune de nos molécules (**OL1-OL5**), il est toujours possible d'observer la signature caractéristique de l'hélice 2,5, mais avec, cette fois, une intensité moindre en comparaison de **OL1**. Ces résultats semblent confirmer que les liens thiourées soient compatibles avec une structuration hélicoïdale. Cependant, en comparant de plus près, les spectres des oligomères hybrides **OL2** et **OL4** il semble que la position de la substitution est un impact sur la stabilité de l'hélice (voir Figure II.3). En effet ces deux oligomères possèdent le même nombre de liens urées et thiourées. **OL2** possèdent deux thiourées consécutives dans en position 1 et 2 et **OL4** en position 3 et 4. Pourtant l'intensité du maximum à 203 nm du composé **OL4**, est très faible par rapport à celle d'**OL2**. L'insertion de deux liens thiourées consécutifs en position centrale de l'hélice semble alors fortement déstabiliser cette dernière et ces résultats CD sont en accords avec les résultats obtenus par FT-IR. Enfin, la nouvelle contribution du chromophore thiourée est visible par l'apparition d'une nouvelle bande positive à 225 nm dont l'intensité atteint son maximum avec l'oligomère **OL4**.

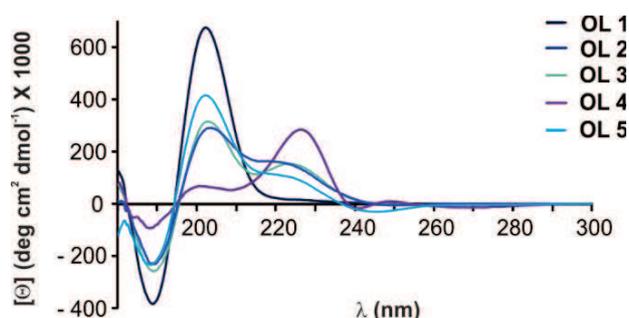
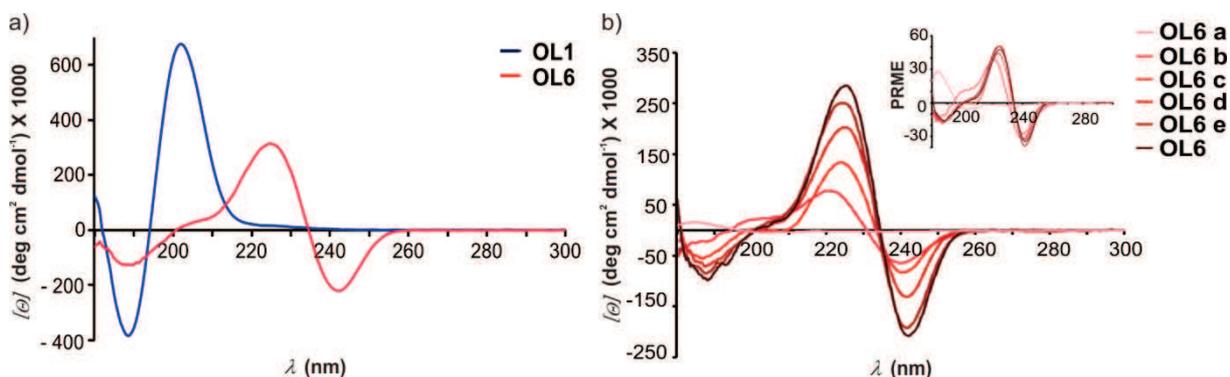


Figure II.6 : Spectres CD obtenus pour les composés **OL1**, **OL2**, **OL3**, **OL4** et **OL5** dans le TFE à 0,2 mM.

(2) Cas du composé oligothiourée OL6

Le spectre CD de l'oligothiourée **OL6**, réalisé à 0,2 mM dans le TFE, révèle une signature bien distincte de celle des homo-oligothiourées. Il possède deux maximums négatifs à 188 nm et 242 nm, ainsi qu'un maximum d'ellipticité molaire vers les 225 nm avec un épaulement à 204 nm (Figure II.7a). On remarque également qu'hormis la présence d'un plus léger maximum à 204 nm, les spectres de **OL4** et **OL6** sont très similaires. Toutefois, ce spectre seul reste difficilement interprétable.

Afin d'obtenir plus d'informations, nous avons décidé d'étudier l'influence de la longueur de chaîne sur l'allure spectrale, en enregistrant les spectres CD (Figure II.7b) des intermédiaires de synthèse du composé **OL6** (présentés dans le schéma II.2). On constate que l'intensité de l'ellipticité molaire par résidu (PRME, Figure II.7b encart) reste constante quelle que soit la taille de l'intermédiaire (sauf pour le monomère (n=1) où elle est nulle) jusqu'au composé final **OL6**. Contrairement aux homo-oligothiourées, il n'y a donc aucun phénomène de coopérativité structurale basée sur des interactions à longues distances qui augmentent avec l'élongation du squelette.



iii) Par RMN

(1) Cas des composés hydrides

Les spectres RMN du proton réalisés dans le CD₃OH présentent des données caractéristiques d'une structuration en hélice (Figure II.8). Tout d'abord, une forte dispersion des jeux de signaux (compris entre 5 et 8 ppm) correspondants aux NHs des urées et des thiourées est observée en RMN du proton. De plus, on remarque que les signaux des NHs des thiourées sont plus déblindés (entre 7,2 et 8 ppm) mais également plus larges, révélant un équilibre *cis/trans* plus marqué pour le lien NHC(=S)NH.

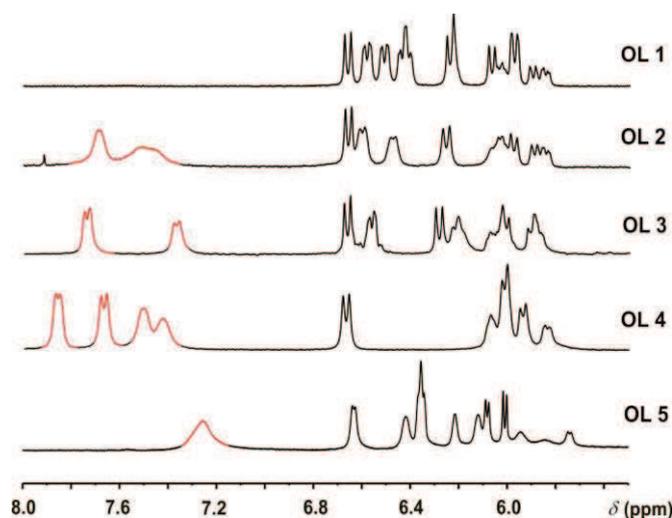
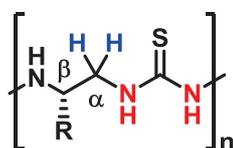


Figure II.8 : Région des NHs des spectres RMN ^1H (CD_3OH , 400MHz) des composés **OL1-OL5**.

L'attribution complète de tous les systèmes de spin a été réalisée par des expériences RMN à deux dimensions : COSY, TOCSY et ROESY. De cette manière, pour chaque résidu nous avons pu mesurer l'écart de déplacements chimiques $\Delta\delta$ entre les protons $^{\alpha}\text{CH}_2$ de la chaîne principale (Table II.3). Comme évoqué dans le chapitre 1, ces protons, placés dans un environnement hélicoïdal, possèdent en effet un fort degré d'anisochronicité [30,31].



Composé	Val_6^x	Ala_5^u	Leu_4^x	Val_3^x	Ala_2^x	Leu_1^x
OL1	1,08	1,27	1,34	1,25	1,22	0,96
OL2	1,08	1,28	1,33	1,22	1,59	1,01
OL3	1,05	1,24	1,30	1,71	0,96	0,45
OL4	1,06	1,23	1,71	1,67	0,62	0,30
OL5	0,95	0,90	1,20	1,17	1,20	0,97

Table II.3 : Ecart des déplacements chimiques des protons $^{\alpha}\text{CH}_2$ mesurés pour chaque résidu des composés **OL1 à OL5**, les écarts des liens urées sont en noir, ceux des thiourées en bleu.

Tout d'abord, on constate que les valeurs de $\Delta\delta$ d'**OL2** sont similaires à celles d'**OL1** des résidus Val_3^u à Val_6^u , mais que les valeurs de $\Delta\delta$ des deux résidus thiourées Ala_2^s , Leu_1^s sont supérieures à celles obtenues avec les liens urées correspondants (Ala_2^u , Leu_1^u) du composé de référence **OL1**.

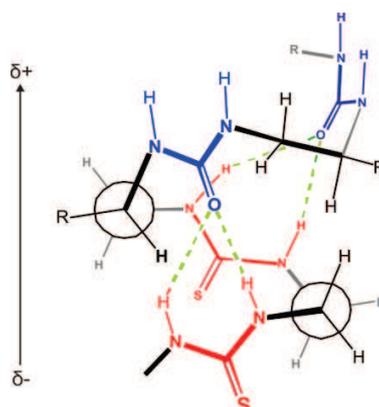


Figure II.9 : Représentation schématique du réseau des liaisons hydrogène en début de séquence de **OL2**.

Ce résultat peut s'expliquer par l'acidité plus importante des NHs des thiourées, qui renforcent alors les liaisons hydrogène formées entre le C=O du 3^{ième} résidu de type valine urée et les NHs de la thiourée de la leucine, mais également entre le C=O du 4^{ième} résidu de type leucine urée et les NHs de la thiourée de l'alanine en 2^{ième} position (Figure II.9). Comme l'avaient déjà indiqué les analyses structurales par spectroscopie infrarouge et dichroïsme circulaire, il semble donc que l'insertion de thiourées près du pôle négatif du macrodipôle de l'hélice soit bien tolérée par l'hélice. Une analogie peut être réalisée avec les travaux du groupe de Seebach lors de l'insertion de thioamides au sein de séquences de β -peptides. La substitution en thiocarbonyle des trois derniers liens amides près du pôle négatif du macrodipôle de l'hélice (M)-3₁₄ formée par l'hexapeptide H-(β^3 -HVal- β^3 -HAla- β^3 -HLeu)₂-OH a été étudiée par CD et RMN. De manière similaire, il a été constaté que la plus grande acidité des NH des thioamides impliquées dans le réseau de l'hélice 3₁₄ permettait la conservation de la structuration hélicoïdale.

Pour les composés **OL3** et **OL4**, en revanche, on note une diminution significative des valeurs des écarts de déplacements chimiques en position *i*-2 des thiourées. La présence des liens thiourées en position centrale déstabilise la géométrie des liaisons hydrogène formées entre : (i) pour **OL3** et **OL4**, le 3^{ième} résidu du type « valine thiourée » et le premier résidu « leucine urée », ainsi que (ii) pour **OL4** celles formées entre le 3^{ième} résidu de type « leucine thiourée » et le 2^{ième} résidu de type « alanine urée » (Figure II.10). Ces modifications peuvent être expliquées à la fois par une longueur plus importante des liaisons C=S et par le moins bon caractère accepteur de liaisons hydrogène du thiocarbonyle. De la même manière, un effet de déstabilisation de l'hélice- α a été observé lors de l'étude de l'insertion de thioamide au sein d'une séquence modèle peptidique par Reiner *et al.* [32].

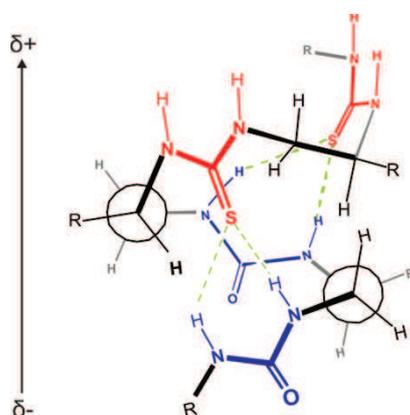


Figure II.10 : Représentation schématique du réseau des liaisons hydrogène en début de séquence de **OL4**.

Enfin, pour l'oligomère **OL5**, l'hélice semble être perturbée en position terminale avec une diminution des écarts de déplacements chimiques pour les résidus 5 et 6 qui reflète probablement les mêmes pénalités structurales imposées par la présence du lien thiourée en position terminale.

Pour compléter cette étude structurale en solution, plusieurs corrélations NOE représentatives des structures en hélice ont pu être observées entre les protons de différents résidus par des expériences ROESY à 25°C et un temps de relaxation de 300 ms. Elles sont représentées par des flèches sur les structures des molécules des figures II.11, II.12 et II.13. Les homo-oligourées hélicoïdales sont caractérisées par des signatures NOE caractéristiques de type $^{\beta}\text{CH}(i+2)/\text{N}'\text{H}(i)$, $^{\beta}\text{CH}(i+2)/\text{NH}(i)$ mais aussi $^{\alpha}\text{CH}(i+2)/\text{N}'\text{H}(i)$ [28]. Cette signature est bien celle retrouvée pour la molécule **OL1**, même si le chevauchement des taches ne permet pas l'identification des taches ROE impliquant le NHMe et le premier résidu leucine (Figure II.11a).

Ces mêmes corrélations sont également observées pour les composés **OL2** et **OL3**, soutenant l'idée qu'ils possèdent, tous deux, une conformation hélicoïdale régulière (figure II.11b, 12a). Pour **OL4** et **OL5**, un nombre inférieur de connectivités est constaté (figure II.12b, 13). De surcroît, l'absence de ROE avec les CH₃ du groupement terminal Boc suggère une distorsion terminale de l'hélice résultant de l'absence de conformation bien définie.

Comme il a déjà pu être constaté dans de précédents travaux [28,33], des corrélations attribuées à une isomérisation *Z/E* (*cis/trans*) de liaisons urées ont pu être observées entre les protons N'H(*i*+1) et $^{\beta}\text{CH}(i)$. De manière surprenante, nous n'observons pas de corrélations attribuables à des isomérisations *Z/E* des liaisons thiourées alors que les énergies de barrière rotationnelle des liaisons C-N des thiourées sont plus basses que celle des urées (à hauteur de 11-14 kcal/mol) et que de telles observations corrélent avec l'élargissement des signaux des NHs des thiourées observée en RMN du proton [34-36]. Toutefois certains spectres étaient difficiles d'interprétations dues à d'importantes superpositions de jeux de signaux. Certains spectres (notamment pour les composés **OL4** et **OL5**) possédaient de plus une faible qualité spectrale avec peu de taches NOEs pour les signaux larges malgré de longs paramètres d'acquisitions. On peut néanmoins supposer que les isoméries *cis/trans* observées en aval des motifs thiourée insérés confortent l'idée d'une flexibilité accrue du squelette en solution. Des expériences RMN à basse température qui permettraient de visualiser les différents conformères pourraient être réalisées.

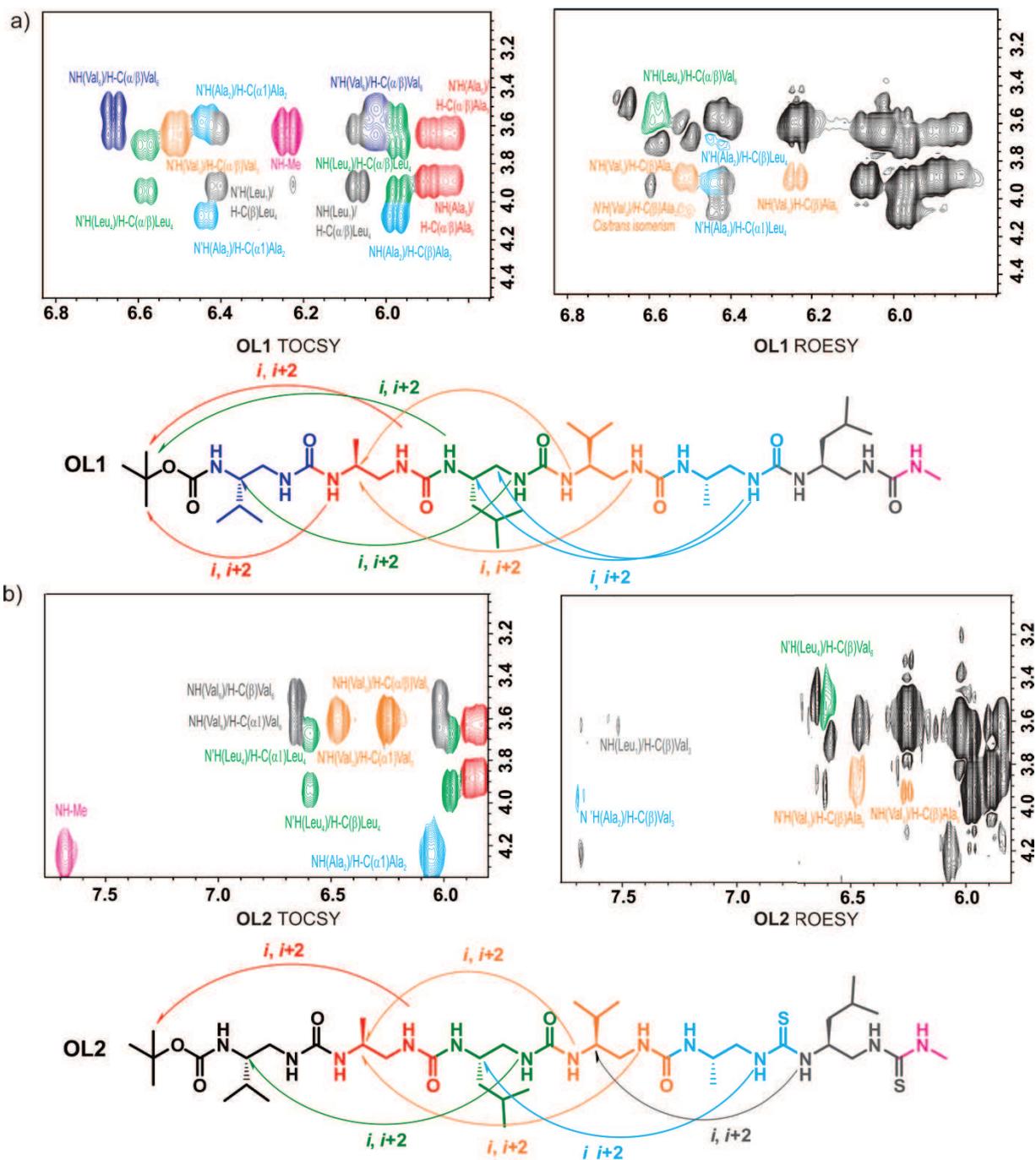


Figure II.11 : Corrélations NOE observées par TOCSY et ROESY à 298 K dans du CD_3OH à 5 mM en a) pour la molécule **OL1**, en b) pour la molécule **OL2**.

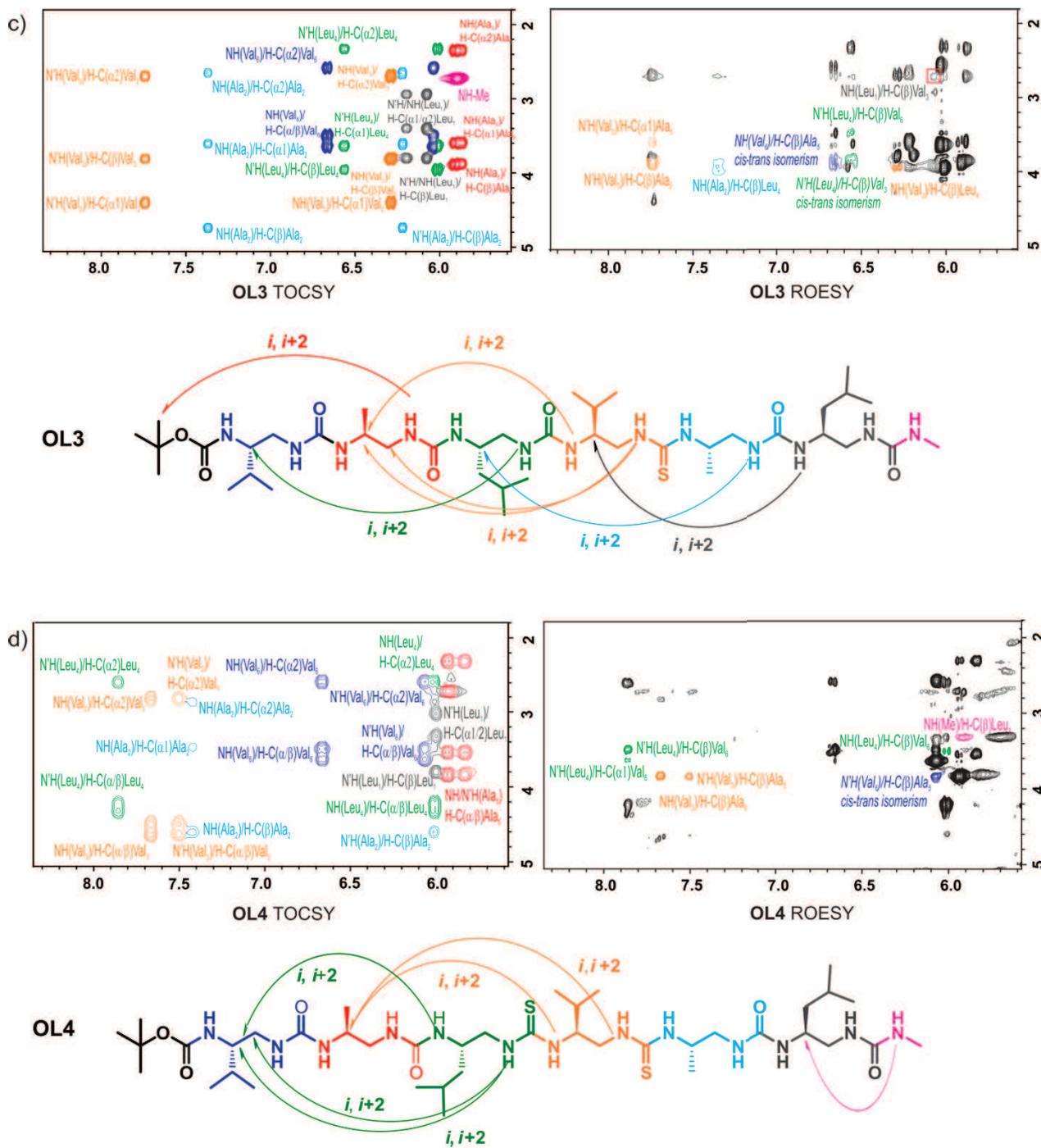


Figure II.12 : Corrélations NOE observées par TOCSY et ROESY à 298 K dans du CD₃OH à 5 mM en c) pour la molécule OL3, en d) pour la molécule OL4.

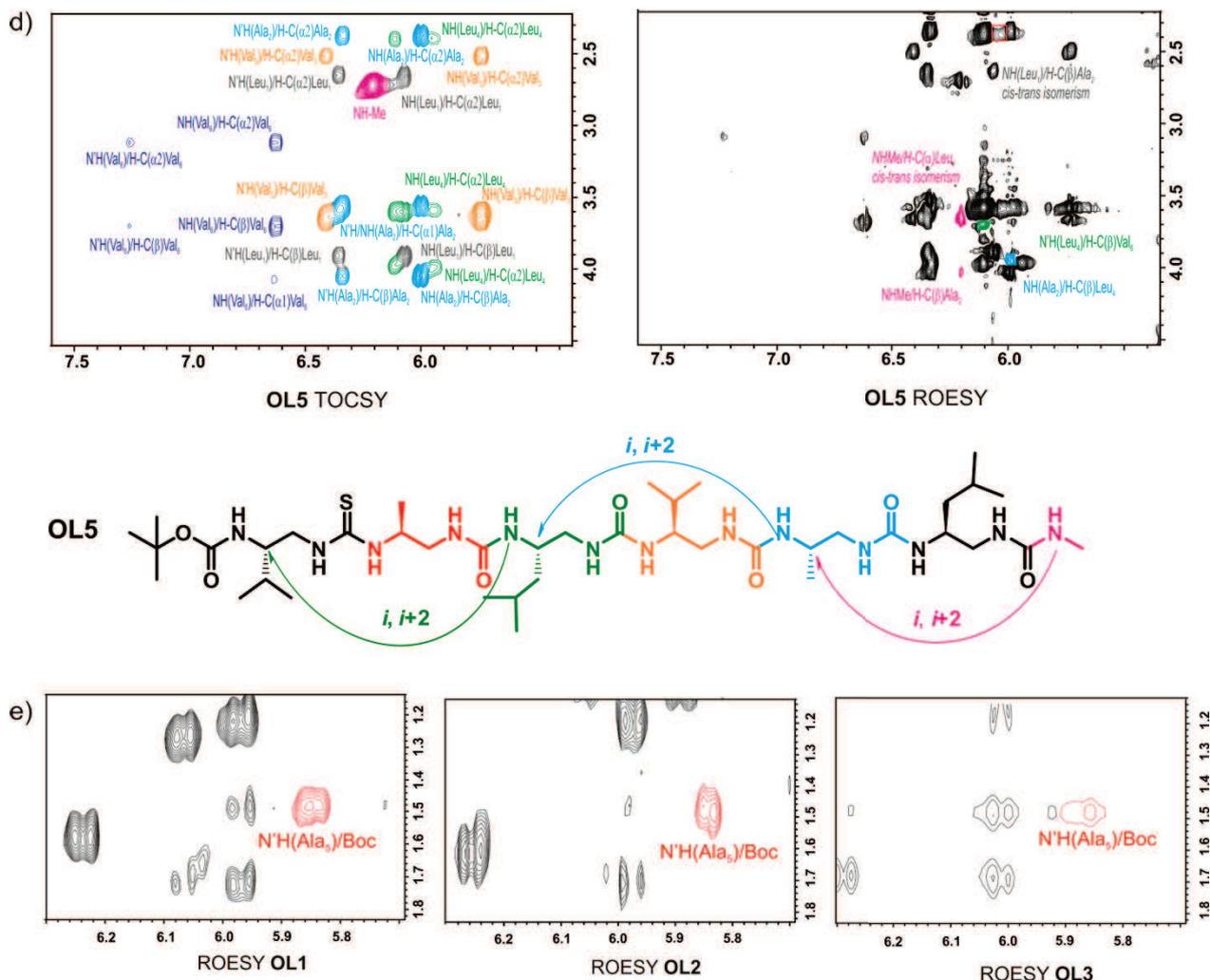


Figure II.13 : e) Corrélations NOE observées pour la molécule **OL5** par TOCSY et ROESY à 298 K dans du CD₃OH à 5 mM ; b) Zoom des ROESY sur les corrélations N'H(Ala₅)/Boc des composés **OL1**, **OL2** et **OL3**.

(2) Cas du composé oligothiourée OL6

L'étude RMN de l'oligothiourée **OL6** a été réalisée à 5 mM dans le CD₃OH (Figure II.14). Le spectre présente des signaux extrêmement larges et très peu résolus ne permettant aucune attribution. Ce résultat démontre l'absence de structuration en solution. Comme il a déjà évoqué précédemment, les énergies de barrière rotationnelle des liens thiourées étant légèrement en dessous de celles des urées (à hauteur de 11-14 kcal/mol), l'élargissement des signaux proviendrait d'une interconversion *Z/E* rotamérique de la liaison C-N des liens thiourées [34-36]. Afin de conforter cette hypothèse, une étude RMN à basse température de cette molécule a été réalisée. L'objectif était de vérifier s'il était possible de figer le « système » et ainsi de voir apparaître sur le spectre RMN une ou plusieurs espèces. Le spectre RMN du proton réalisé à -10°C confirme cette hypothèse puisque on peut y voir de multiples conformères, résultant de la possible isomérisation *Z/E* autour des six liens thiourées présents dans la molécule (soit au total 4⁶ conformères possibles de type *Z,Z* ; *E,E* ;

Z,E; ou encore *E,Z*). Malgré une meilleure résolution, la complexité du spectre ne nous a pas permis d'approfondir cette étude.

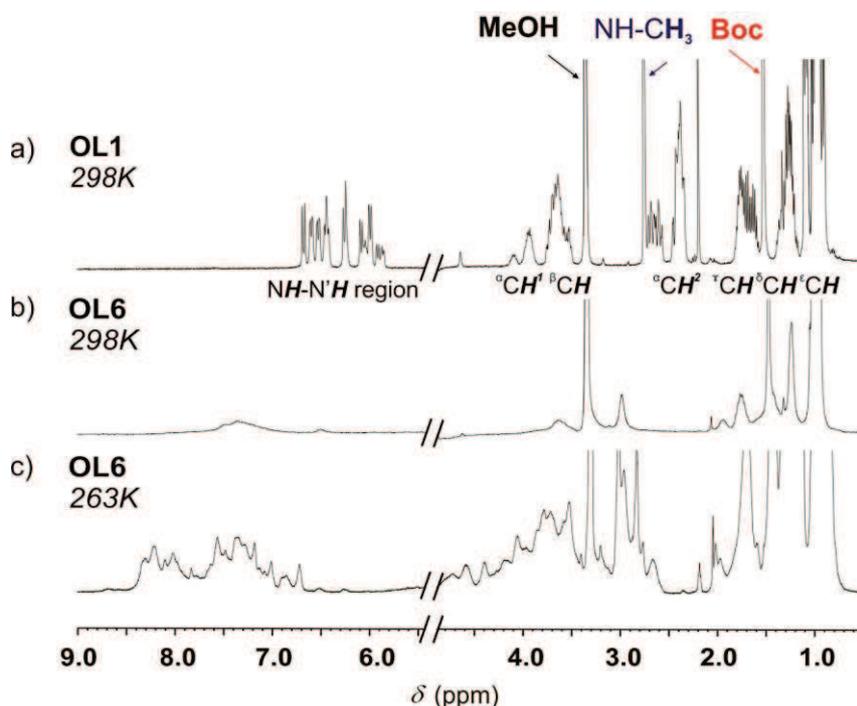


Figure II.14 : Comparaison des spectres RMN ^1H (CD_3OH , 400 MHz) d'**OL1** et d'**OL6** à 298 K et 263 K.

d) Etude structurale par diffraction des rayons X

Après avoir étudié la structuration de nos oligomères en solution, leur cristallisation a permis de pouvoir les étudier à l'état solide. Les oligomères **OL1**, **OL2**, **OL3** et **OL5** ont pu être cristallisés (dans le MeOH et dans des mélanges MeOH/DCM et MeOH/ CH_3CN) (Figure II.15). Malgré de nombreuses tentatives, aucun cristal n'a pu être obtenu pour le composé **OL4**, ce qui pourrait être le signe d'une trop grande déformation de l'hélice liée à l'insertion des thiourées en position centrale.

La structure d'**OL1** a été résolue dans le groupe spatial triclinique P1 et celles des hybrides **OL2**, **OL3** et **OL5** dans le groupe spatial monoclinique P21. (Les données cristallographiques de ces deux structures sont données sous forme de tableau dans la partie expérimentale). Les unités asymétriques (ASU) des cristaux d'**OL3** et **OL5** contiennent 2 et 3 molécules indépendantes, respectivement numérotées de I à III. Comme on peut le constater dans la figure II.15, les structures des composés **OL2**, **OL3 (I)**, **OL5 (I)** adoptent une structure en hélice droite très voisine de la forme canonique du composé de référence **OL1**. Comme il a pu être constaté avec les différentes études structurales réalisées en solution, les insertions de thiourées sont donc bien compatibles avec une structure hélicoïdale.

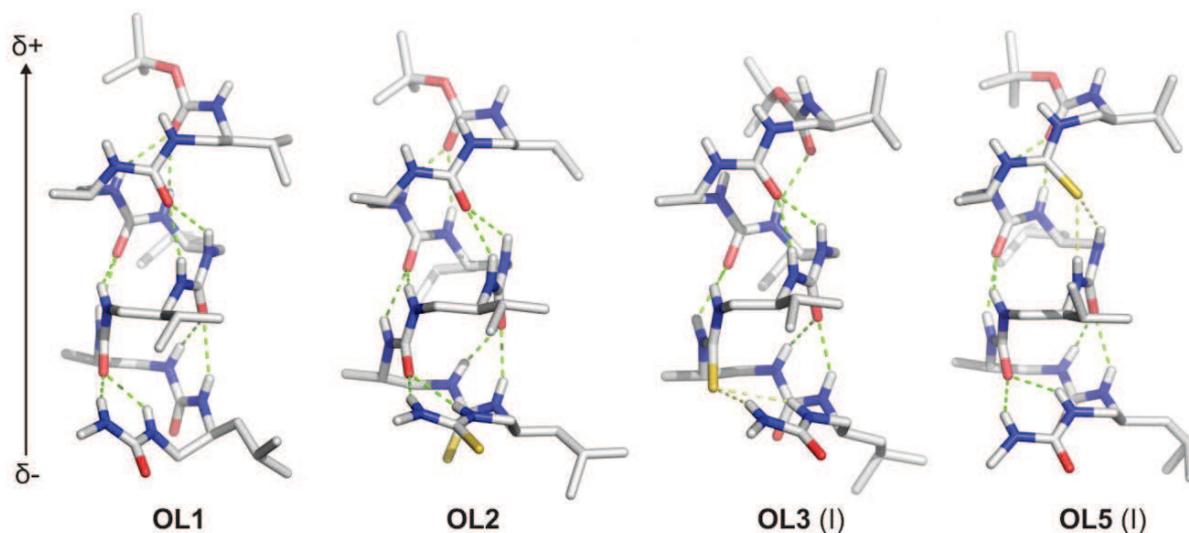
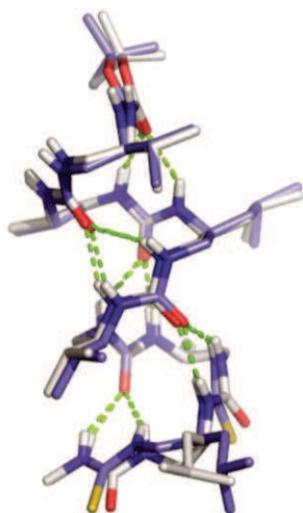


Figure II.15 : Structures cristallographiques (vue de face) d'**OL1**, **OL2**, **OL3(I)** et **OL5(I)**.



Plus en détails, la superposition des structures cristallographiques des molécules **OL1** et **OL2** démontre que l'introduction de deux thiourées sur le dipôle négatif de l'hélice n'induit qu'un effet très limité sur la géométrie globale de l'hélice. Les deux squelettes se superposent de manière quasi identique avec un RMSD d'environ 0,2 Å ; seule la chaîne latérale de la leucine en position 1 est déviée (Figure II.16).

Figure II.16 : Superposition des structures cristallographiques d'**OL1** et d'**OL2** (RMSD = 0,199 Å).

L'analyse des différentes molécules indépendantes présentes dans les unités asymétriques des composés **OL3** et **OL5** montre une plus grande flexibilité de ses structures mais aussi qu'un réarrangement local de la base hélicoïdale a lieu afin de permettre la formation de liaisons hydrogène entre la liaison C=S et les NHs des urées.

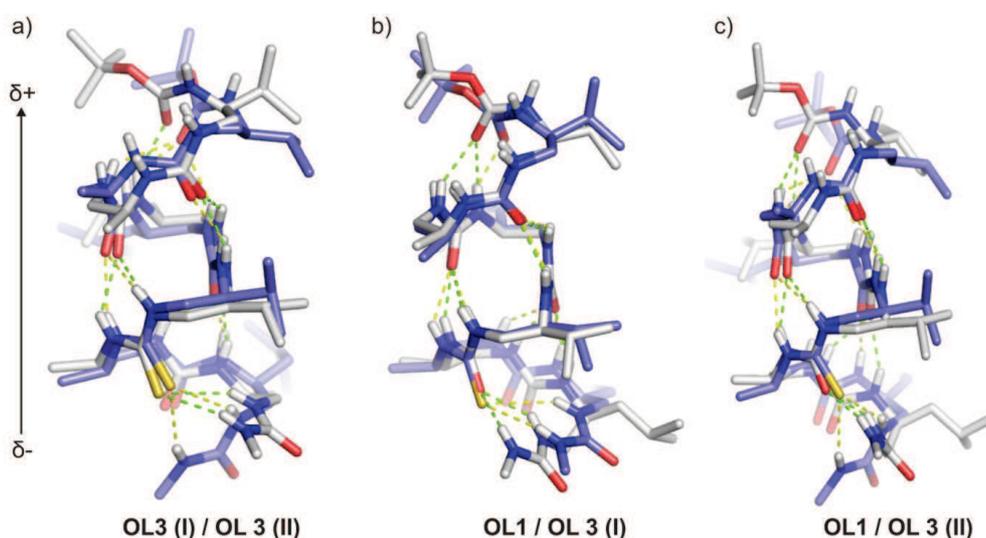


Figure II.17 : Superposition d'**OL1** et des molécules indépendantes **OL3 (I)** et **OL3 (II)**.

La superposition des structures des composés **OL1**, **OL3 (I)** et **OL3 (II)** révèle que le thiocarbonyle C=S chevauche la position du carbonyle C=O canonique mais que le reste de la chaîne fluctue pour placer les azotes de l'urée à une distance adéquate pour la formation d'une liaison hydrogène (Figure II.17). Cette variabilité structurale qui concerne essentiellement le dernier résidu près du pôle positif de l'hélice est supportée par la diminution de l'anisochronicité du méthylène de cette position observée lors de l'étude RMN en solution (Table II.3).

Pour le composé **OL5**, l'unité asymétrique est, quant à elle, composée de trois molécules indépendantes (Figure II.18a). Tandis que la structure de **OL5(I)** est entièrement hélicoïdale (en accord avec les résultats de dichroïsme circulaire et de RMN du proton), les liaisons $^{\alpha}\text{C-N}$ du 6^{ième} résidu de type valine des structures **OL5(II)** et **OL5(III)**, tournent de 180° ($\Theta_2 = +76.3^{\circ}$ dans **OL5(I)** mais -97.6° dans **OL5(II)** et -99.8° dans **OL5 (III)**) entraînant alors la perte de la liaison hydrogène avec le carbonyle du Boc (Figure II.18b). De surcroît, et à l'inverse de ce qui a pu être observé dans **OL3**, cette fois c'est la liaison thiocarbonyle C=S de **OL5** qui adopte une orientation différente de celle observée par le carbonyle C=O dans **OL1** ; l'objectif étant de maximiser l'angle et la distance nécessaire à la formation de la liaison hydrogène. Ce repositionnement est la conséquence d'une flexibilité accrue de la partie terminale au niveau du pôle positif du macrodipôle de l'hélice (Figure II.18c).

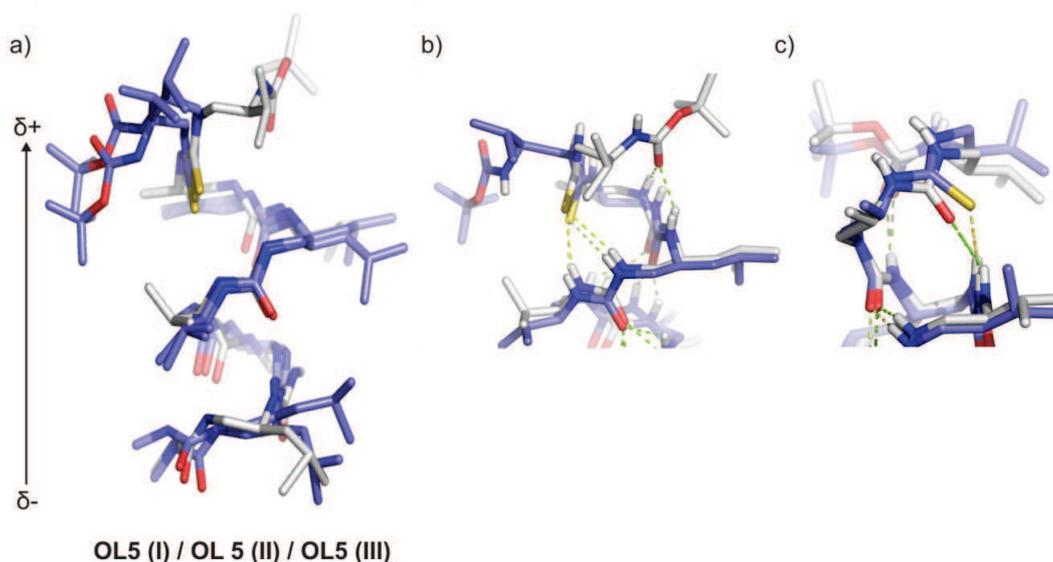


Figure II.18 : a) Superposition des molécules indépendantes du composé **OL5** avec **OL5(I)** en gris et **OL5(II)**, **OL5(III)** en bleu ; b) Zoom sur le dipôle positif de l'hélice avec la superposition en gris de **OL5(I)** et en bleu de **OL5 (III)** ; c) Zoom sur le dipôle positif de l'hélice avec la superposition en gris de **OL1(I)** et en bleu de **OL5 (I)**.

Pour conclure, au cours de cette étude, une série d'oligomères hybrides thiourées/urées a été synthétisée en solution par stratégie Boc à partir de nouveaux monomères activés par un groupement thiocarbamoylbenzotriazole. Leurs propriétés structurales ont été ensuite étudiées par infrarouge, dichroïsme circulaire, RMN ^1H et cristallographie aux rayons X. Les résultats montrent que l'hélice canonique n'est pas affectée par l'insertion de thiourée près du pôle négatif de l'hélice mais l'est plus fortement près du pôle positif et majoritairement dans la partie centrale. Ces résultats montrent qu'il est possible de moduler les paramètres de l'hélice et par conséquent les propriétés physicochimiques qui en découlent. Enfin, la propension à la structuration du squelette homo-oligothiourée a été étudiée pour la première fois. Les différentes analyses réalisées sur **OL6** ne montrent aucune évidence de conformations stabilisées par un réseau de liaisons hydrogène mais plutôt un système très dynamique résultant de la multiplicité des isomères possibles au niveau des liaisons thiourées (*Z,Z* ; *E,E* ; *Z,E* ; *E,Z*).

e) Le cas de la sélénourée

Afin d'appuyer nos propos, nous avons entrepris la même étude avec un oligomère sélénourée **OL7** (Schéma II.3). En effet, le sélénium est un peu moins électronégatif par rapport au soufre (2,55 sur l'échelle de Pauling) et possède un rayon de Van der Waals plus large ($r_{\text{VDW}} \text{ Se} = 1,90 \text{ \AA}$) [37], il forme ainsi des liaisons C=Se plus longues ($\sim 1,85 \text{ \AA}$). On peut donc s'attendre à une désorganisation de l'hélice accrue par cette introduction près du dipôle positif de l'hélice.

De plus, bien qu'il soit encore peu étudié, le sélénium est un oligo-élément important qui intervient chez l'homme dans l'activité du système enzymatique protecteur. Il constitue sous forme de sélénocystéine, le site actif de la glutathion peroxydase. Cette enzyme localisée à la fois dans le cytosol des cellules et les mitochondries a pour rôle de réduire un grand nombre de peroxydes et protège ainsi les membranes cellulaires, les acides nucléiques et les protéines contre la dégradation par les radicaux libres [38]. Dans la littérature, les sélénopeptides contiennent majoritairement des sélénocystéines ou des sélénométhionines. Ils possèdent une large variété d'applications en tant que sondes structurales, fonctionnelles et mécanistiques, pour la conjugaison de séquence peptidiques et l'étude des réactions enzymatiques (*cf.* revue sur les sélénopeptides [39]).

Le composé **OL7** a été synthétisé à partir d'un précurseur pentamère oligourée (schéma II.3) et grâce à l'utilisation d'un monomère activé de type *isosélénoisocyanate* **M4** dont la synthèse a été développée par Chennakrishna *et al.* [40], avec un rendement global de synthèse de 15 %.

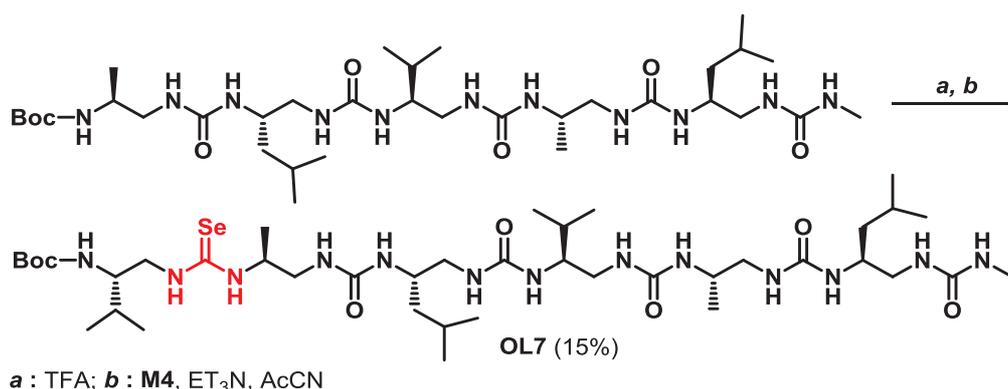


Schéma II.3 : Synthèse du composé **OL7**.

Des études par dichroïsme circulaire, RMN du proton et diffraction des rayons X ont été réalisées et comparées à celles réalisées pour **OL1** et **OL5**. En premier lieu, La caractérisation par dichroïsme circulaire dans le TFE révèle une signature semblable à celle d'**OL5** mais avec des intensités plus faibles. Les valeurs d'anisochronicité des protons $^{\alpha}\text{CH}_2$ mesurées par RMN pour tous les résidus de **OL7** sont similaires de celles trouvées dans **OL5** suggérant ainsi une certaine similitude entre les deux structures (Figure II.19).

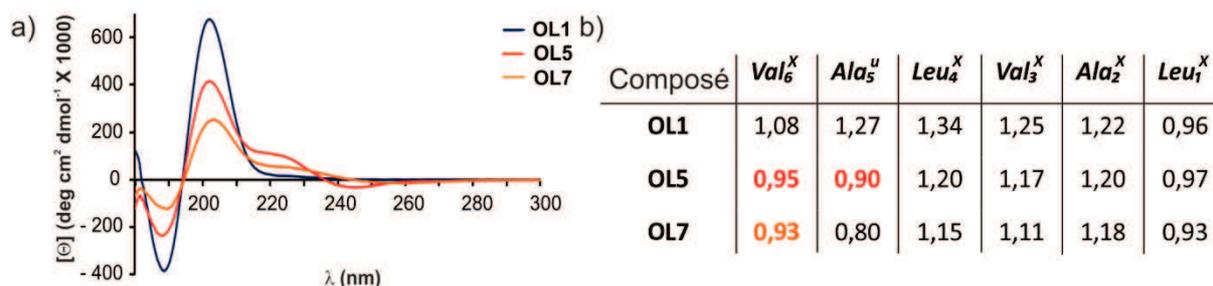


Figure II.19 : a) Spectres CD obtenus pour les composés **OL1**, **OL5** et **OL7** ; b) Ecarts de déplacements chimiques des protons $^{\alpha}\text{CH}_2$ mesurés pour chaque résidu de **OL1**, **OL5** et **OL7**, les écarts des liens urées sont en noir, ceux des thiourées en rouge, de la sélénourée en orange.

Des cristaux de **OL7** ont pu être obtenus dans un mélange $\text{CH}_3\text{CN}/\text{DMSO}$ (95:5, v/v) et la structure a été résolue dans le groupe spatial $\text{P2}_1\text{2}_1\text{2}_1$ (Figure II.20). La structure du cristal est remarquable puisqu'elle possède une partie hélicoïdale (qui se superpose bien avec celle de **OL1** avec un RMSD = 0,425 Å (Figure II.24c) et une autre partie « N-terminale » qui est de manière surprenante complètement dépliée.

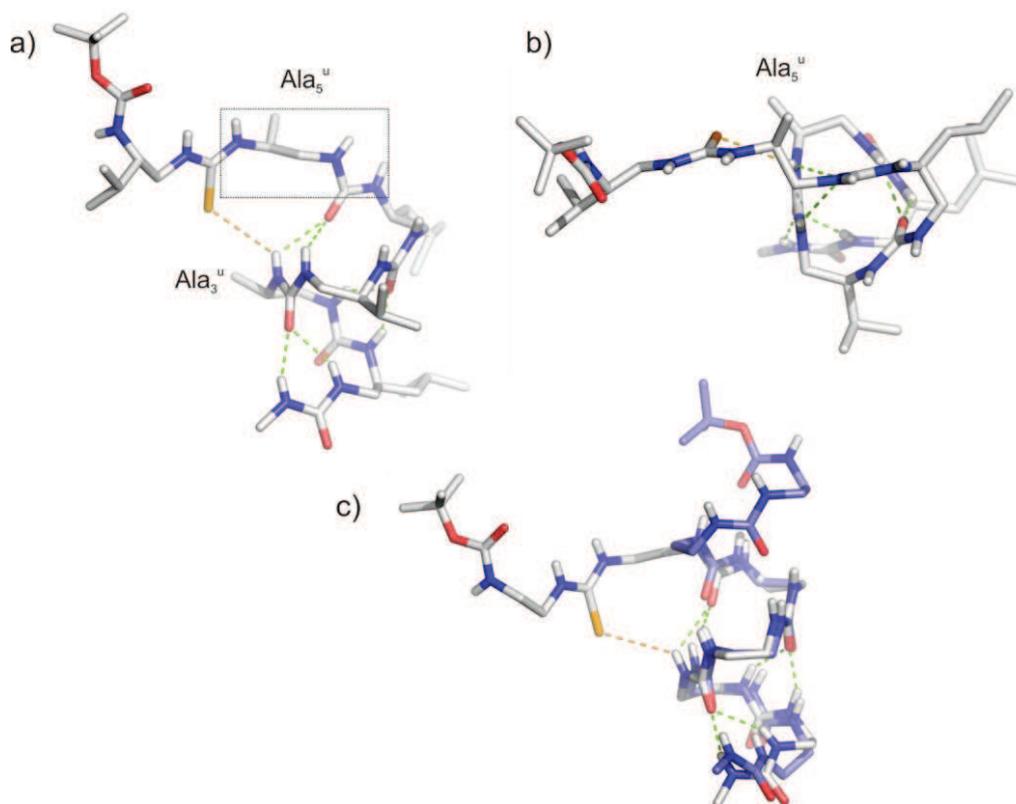


Figure II.20 : Structure cristallographique de la molécule **OL7** : a) vue de face, b) vue de dessus ; c) Superposition des molécules **OL7** et **OL1** (**OL7** est en gris, **OL1** est en bleu).

L'hélicité au dipôle positif est en effet perdue. La présence de la sélénourée ne permet pas la formation de la liaison hydrogène à la sixième position et provoque un réarrangement du résidu de type alanine antérieure. La liaison $^{\alpha}\text{C}-\beta\text{C}$ du résidu de type alanine en position 5 adopte une conformation *anti* comme on peut bien le distinguer sur la vue de dessus en figure II.20b. Les angles θ_1 et θ_2 du résidu sont de sens opposés à ceux

retrouvés dans **OL1** et **OL5(I)** (Table II.4). La position originale du résidu sélénourée se stabilise, quant à elle, en formant une liaison hydrogène avec l'un des NH du résidu Ala₃^U.

Angles (°)	OL1	OL5(I)	OL7
Φ	-92	-108	-105
θ_1	54	57	-176
θ_2	84	84	-87

Table II.4 : Comparaison des angles de torsions du 5^{ème} résidu de type alanine dans les structures cristallines des composés **OL1**, **OL5** et **OL7**.

En conclusion, les résultats obtenus sur le composé **OL7** confortent les précédents résultats obtenus avec l'insertion de thiourée à proximité du dipôle positif de l'hélice. La perturbation de l'hélice-2,5 a bel et bien, été amplifiée par l'introduction d'une sélénourée, menant à une structure partiellement hélicoïdale et ouverte.

2. Introduction du lien thiourée sur support solide

Dans la continuité de l'étude structurale réalisée en solution, le deuxième volet de ce travail consistait à développer une méthodologie permettant l'introduction des liens thiourées sur support solide, afin de pouvoir synthétiser par la suite des composés hybrides urée/thiourée à visée antimicrobienne et évaluer l'impact de cette substitution dans la relation structure-fonction sur *B. anthracis*. Pour cela, les différentes stratégies disponibles au laboratoire (stratégie de type Boc et azoture) ont été envisagées dans le but de synthétiser une séquence modèle possédant une thiourée en position centrale **OL8** (Figure II.21):

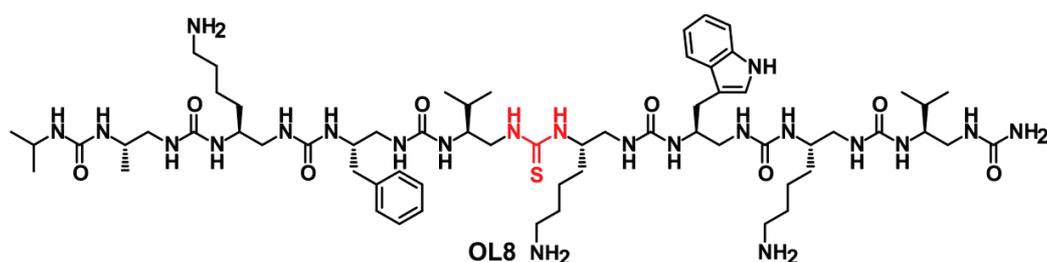


Figure II.21 : Structure chimique d'**OL8**.

a) Synthèse par stratégie Boc

La stratégie Boc reste à ce jour la stratégie la plus robuste utilisée au laboratoire pour la synthèse sur support solide des oligourées. Tout naturellement, les premières synthèses ont été réalisées en utilisant cette stratégie en partant d'une résine polystyrène de type 4-methylbenzhydrylamine (MBHA). De plus le monomère activé **M2**, nécessaire à l'installation du lien thiourée, avait déjà été préparé lors de l'étude en solution présentée dans le

paragraphe précédent. Les conditions conventionnelles sous champ micro-ondes des étapes de couplage et de déprotection ainsi qu'un clivage HF final ont été utilisés pour préparer le composé **OL9** (Figure II.22c) [41]. Dans ces conditions, le composé **OL9** (analogue à **OL8** mais possédant un acide aminé γ en première position) a été obtenu avec un rendement de 17 % (après purification par HPLC préparative). Le chromatogramme du produit brut (Figure II.22b) révèle la présence de deux sous-produits, analysés par ESI-MS. Ils résultent de délétions : soit du motif éthylène diamine porteur du chaîne latérale de type lysine (identifiée sur le chromatogramme HPLC par un point), soit de l'unité thiourée de type valine (identifiée sur le chromatogramme HPLC par un astérisque).

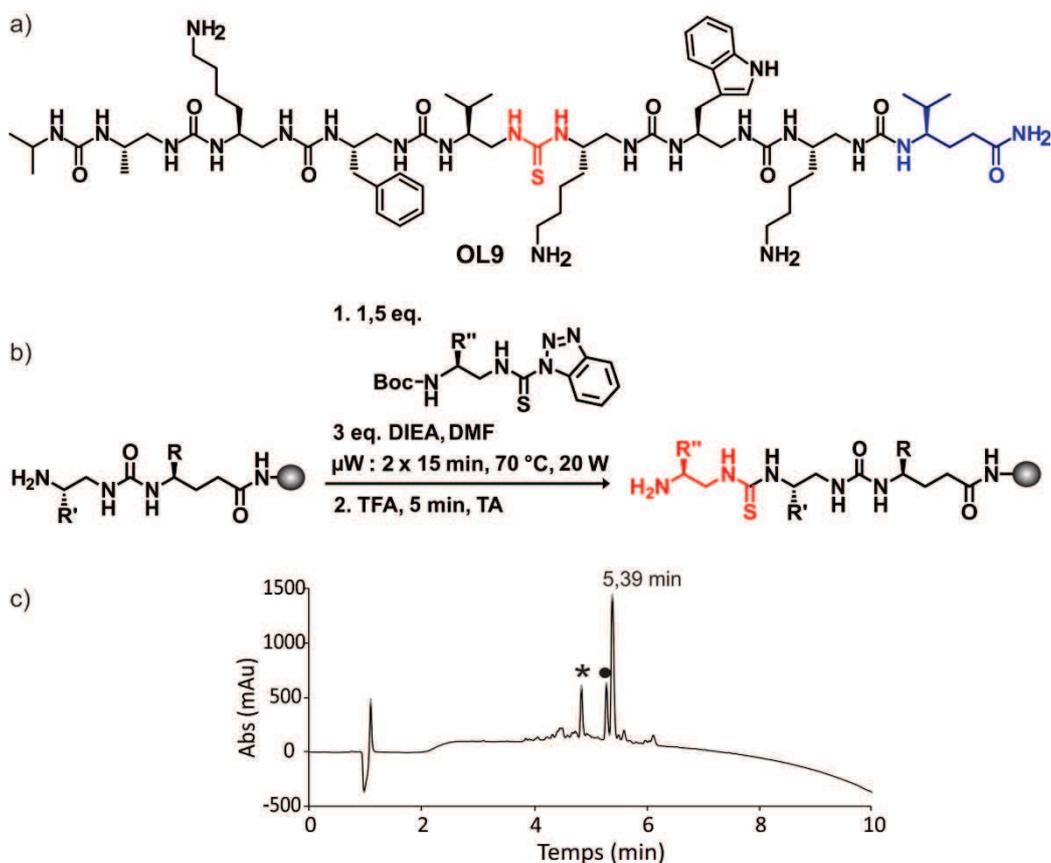


Figure II.22 : a) Structure chimique de **OL9** ; b) Conditions de couplage et de déprotection du bloc **M2** ; c) Chromatogramme du produit brut **OL9** par stratégie Boc (UV avec 200 nm, 10-100 % CH₃CN (+ 0.1 % TFA) dans H₂O (+ 0.1 % TFA) en 10 min).

b) Synthèse sur support solide par stratégie azoture

La stratégie azoture en synthèse supportée (*cf.* chapitre 1.3.2) a été développée depuis peu au laboratoire [42]. Cette approche qui utilise une résine de type Rink amide (RAM) [43] et le TFA pour le clivage final de la résine permet d'éviter certains problèmes liés à l'utilisation de la stratégie Boc et notamment l'emploi de l'acide fluorhydrique pour le clivage final (d'ailleurs sous-traité auprès d'une société externe dans le cadre de nos travaux). C'est pourquoi une attention particulière a été portée au développement de cette méthodologie.

i) Synthèse des monomères activés

Le monomère azoture thiocarbamoylé **M5** de type valine a été préparé en suivant la même procédure de synthèse que celle décrite dans la littérature (Schéma II.4) [42]. Une fois l'amine obtenue, elle est activée en thiocarbamoylé à l'aide de bis(benzotriazolyl)méthanethione avec un rendement global de 40 %.

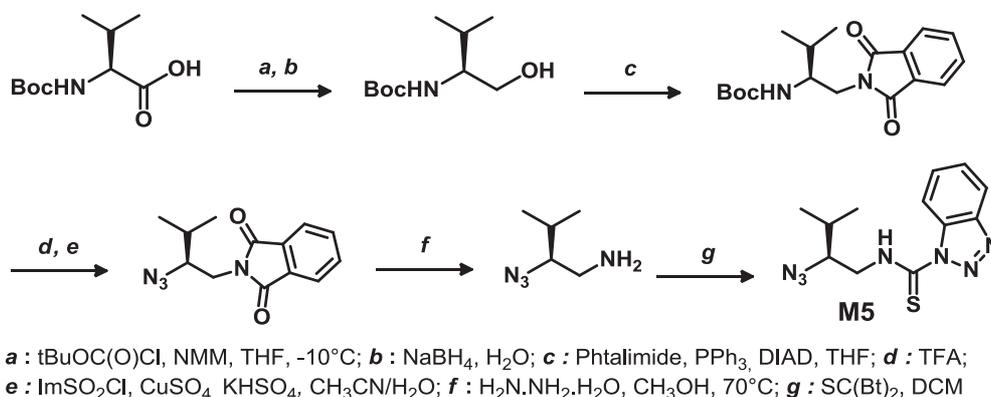


Schéma II.4 : Voie de synthèse pour la préparation de monomère activé **M5**.

ii) Difficultés rencontrées

Les conditions de couplage et de réduction de l'azoture à l'aide de triméthylphosphine sous champ micro-ondes mises au point sur support solide pour la synthèse des homooligourées se sont révélées incompatibles avec ce nouveau monomère. En effet, toutes les tentatives de synthèses réalisées sur différentes séquences se sont montrées totalement infructueuses avec l'observation de dégradations et/ou de sous-produits. Nous avons donc décidé de réaliser une optimisation plus approfondie sur une courte séquence modèle : le trimère **OL10** Val^S-Lys^U-Phe^U (Figure II.23a). Pour faciliter le suivi HPLC, une unité de type phénylalanine a été installée dans la séquence de ce trimère modèle.

En premier lieu, le trimère **OL11** Val^U-Lys^U-Phe^U (Figure II.23b) « tout urée » a été préparé afin de vérifier l'intégrité de la synthèse. L'analyse par HPLC et ESI-MS du produit brut confirme la présence du composé souhaité, avec une HPLC du produit brut très propre (Figure II.28c).

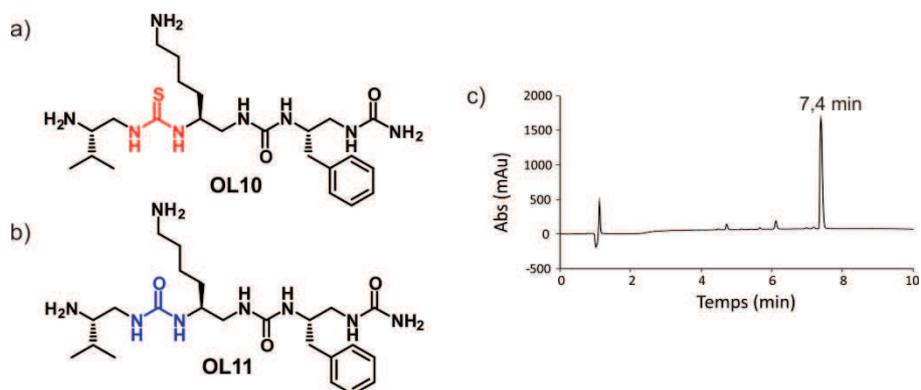


Figure II.23 : Structures chimiques des composés en a) **OL10** et en b) **OL11** ; c) Chromatogramme du produit brut **OL11** obtenu par stratégie azoture après unique précipitation à l'éther (UV avec 200 nm, 10-50 % CH_3CN (+ 0.1 % TFA) dans H_2O (+ 0.1 % TFA) en 10 min).

Comme résumé ci-dessous dans le Schéma II.5, le couplage du monomère thiocarbamoylé azoture **M5** sur l'intermédiaire supporté a ensuite été réalisé dans des conditions identiques à celles utilisées pour **OL11**.

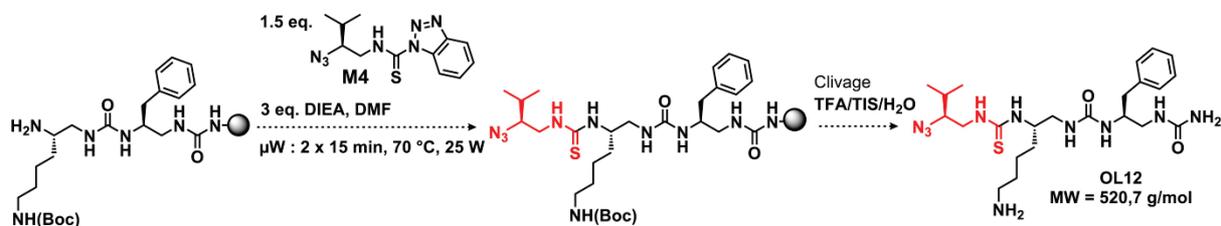


Schéma II.5 : Conditions expérimentales de la synthèse sous champs micro-ondes du trimère **OL12**.

Cependant, en dépit de nombreuses tentatives, **OL12** n'a jamais pu être obtenu. Etrangement, le seul produit visible par HPLC, possède par HRMS une faible masse de 220 g/mol. Ce produit n'a pas pu être complètement identifié. Néanmoins l'analyse HRMS a permis d'obtenir une formule brute de $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_2\text{N}_2$ et il semblerait qu'il contienne le cycle aromatique de la phénylalanine par RMN- ^1H . De plus, l'absence après clivage, du dimère $\text{NH}_2\text{-Lys}^{\text{u}}\text{-Phe}^{\text{u}}$ peut être un signe de réactions secondaires qui décrocheraient le produit de la résine. Le seul produit obtenu après clivage serait alors un reste de dérivé azoture qui n'aurait pas réagi lors de la réduction du monomère de type phénylalanine. Il semblerait donc que dans ces conditions l'utilisation des micro-ondes ne soit pas compatible avec le bloc azoture thiourée **M5** (Figure II.24).

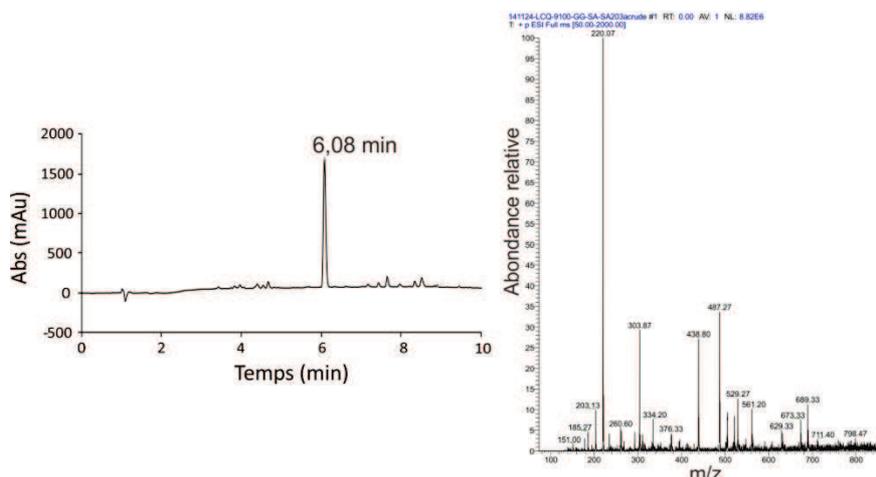


Figure II.24 : HPLC et ESI-MS du produit brut obtenu après clivage de la synthèse d'**OL2** sous champs micro-ondes.

Afin de vérifier cette hypothèse, le couplage du monomère azoture thiourée a été répété mais cette fois à température ambiante (Figure II.25a). Dans ces conditions, **OL12** ($t_R = 7,53$ min, Figure II.25b) a pu être obtenu avec un rendement de 28 % après purification (Figure II.25c) mais la cinétique du couplage s'est révélée être lente. Différents tests ont permis d'établir que les conditions expérimentales optimales étaient obtenues avec 5 équivalents de monomère benzotriazole **M5** et 20 équivalents de base *N,N*-diisopropyléthylamine (DIEA) dans le dichlorométhane. Le dichlorométhane s'est révélé être aussi le solvant de choix lors de la synthèse de thioxopeptides [44]. Néanmoins, un certain nombre de sous-produits restent observables (Figure II.25b). Le sous-produit annoté avec un astérisque a été isolé et caractérisé par RMN du proton. Détaillé en partie expérimentale, il semblerait correspondre à une cyclisation intramoléculaire entre le résidu du type lysine et le résidu thiourée de type valine. De plus, la cinétique du couplage, très lente, est en accord avec les conditions utilisées en solution pour la préparation des oligomères **OL2-OL6** présentés précédemment.

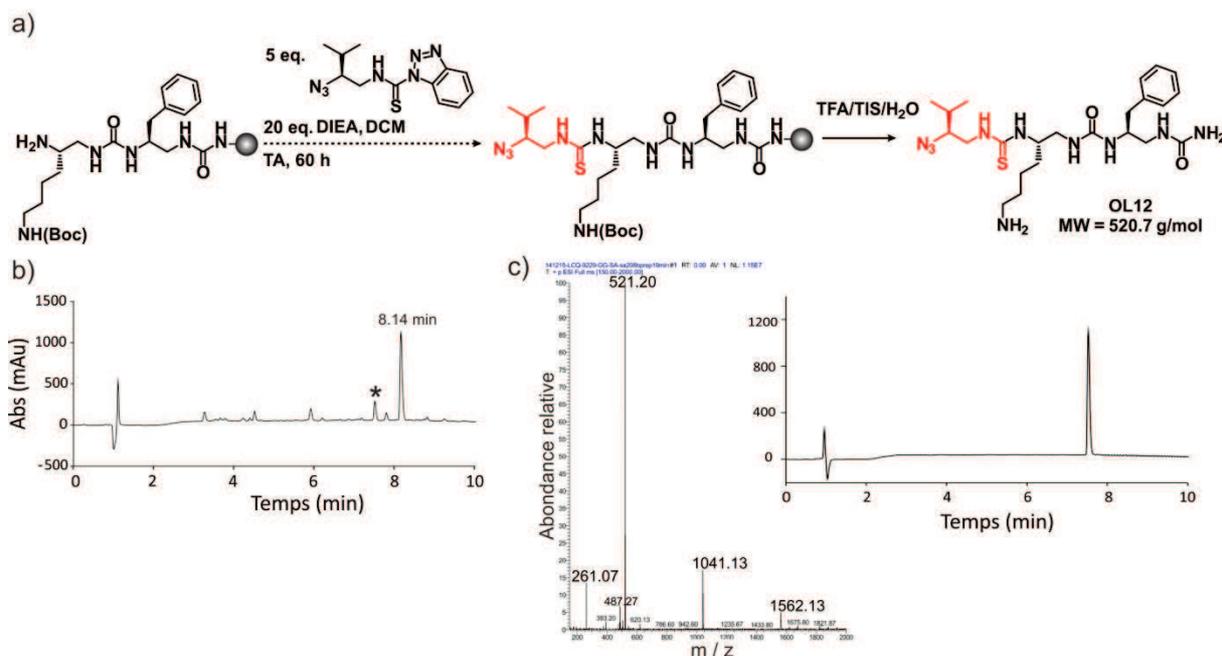


Figure II.25 : a) Conditions de couplage du monomère **M5** à température ambiante; b) Chromatogramme du produit brut (UV avec 200 nm, 10-50 % CH_3CN (+ 0.1 % TFA) dans H_2O (+ 0.1 % TFA) en 10 min); c) Chromatogramme et ESI-MS du produit purifié (UV 200 nm, 10-50 % CH_3CN (+ 0.1 % TFA) dans H_2O (+ 0.1 % TFA) en 10 min).

Afin d'expliquer les raisons de cette « dégradation » durant le chauffage sous conditions micro-ondes, un nouveau trimère **OL13** : $\text{Val}^{\text{S}}\text{-}\gamma\text{Lys-Phe}^{\text{U}}$ a été préparé. Une γ -lysine a été introduite à la place de Lys^{U} pour mettre en évidence de manière indirecte un rôle de la fonction urée précédant la thiourée dans les difficultés de synthèse; la fonction amide à cette position pouvant permettre d'éviter de possibles cyclisations intramoléculaires et donc la formation de sous-produits.

La synthèse de **OL13** a été réalisée sous champ micro-ondes (Figure II.26a). Le chromatogramme du brut de synthèse après clivage de la résine réactionnel (Figure II.26b), révèle cette fois-ci la présence d'**OL13** qui a été isolé et analysé. Il est identifié par un astérisque sur le chromatogramme. Toutefois on note qu'**OL13** est en mélange avec un second produit à hauteur de 44 % (identifié par un point sur le chromatogramme). Ce sous-produit, purifié et analysé par RMN et ESI-MS possède un poids moléculaire de 504 g/mol et correspond au trimère dont le thiocarbonyle du résidu de type valine a été échangée en carbonyle $\text{Val}^{\text{U}}\text{-}\gamma\text{Lys-Phe}^{\text{U}}$. Ce type d'échange, déjà été observé lors des synthèse d'oligo(thio)urées en solution au laboratoire, proviendrait d'une réaction d'hydrolyse aqueuse de la thiourée désirée avec départ de sulfure d'hydrogène et a déjà été rapportée durant l'étape de couplage de la synthèse des thiopeptides sur support solide [44,45].

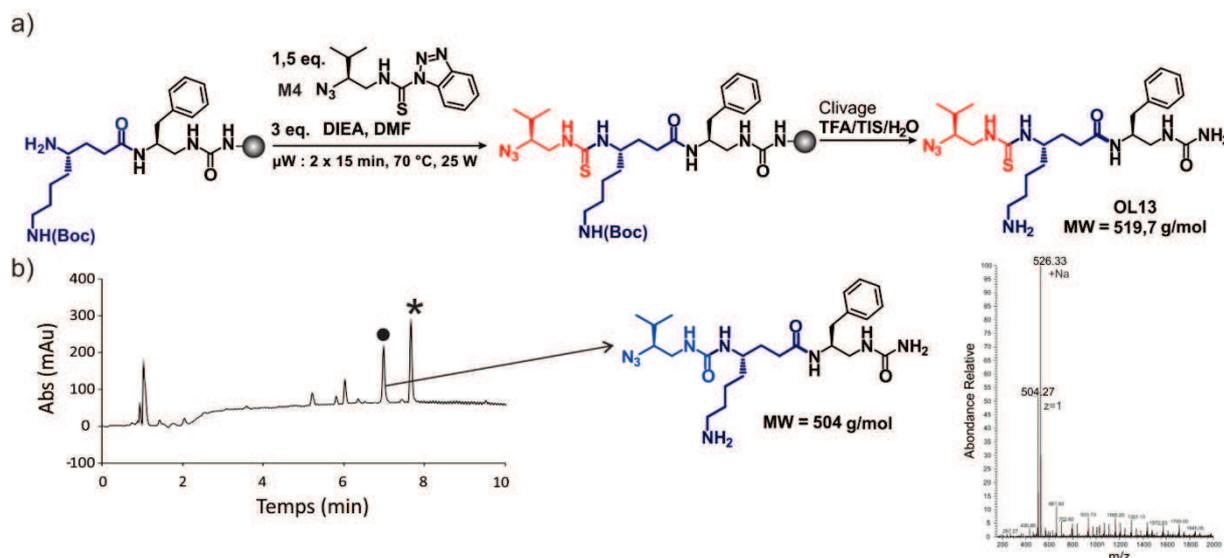


Figure II.26 : a) Conditions de couplage du monomère **M5** pour former **OL13** sous champ micro-ondes; b) Chromatogramme du produit brut (UV avec 200 nm, 10-50 % CH₃CN (+ 0.1 % TFA) dans H₂O (+ 0.1 % TFA) en 10 min) et ESI-MS du sous-produit isolé.

Ces résultats confirment l'hypothèse de départ puisque cette fois **OL13** a bien été obtenu et ce malgré des conditions de chauffage sous champs micro-ondes. Le lien thiourée possède donc une réactivité particulière lorsqu'il suit un résidu urée dans la séquence, des réactions de cyclisation intramoléculaire pouvant avoir lieu en conditions micro-ondes. Pour cette raison, le couplage sera dorénavant réalisé à température ambiante avec 5 équivalents de monomère et 20 équivalents de base durant 60 heures.

L'étape suivante de réduction en amine de l'azoture en présence de triméthylphosphine a été réalisée à partir du trimère **OL12-R** immobilisé sur résine (Figure II.27). Un sous-produit **OL14** a été obtenu à hauteur de 30 % (désigné par un point sur le chromatogramme); les analyses de spectrométrie de masse, HPLC et une caractérisation complète par RMN du proton (Figure II.28) ont montré qu'il s'agissait d'une guanidine cyclique **OL14**, dérivé de la 4,5-Dihydro-1*H*-imidazol-2-amine provenant d'une cyclisation intramoléculaire lors de l'étape de réduction. Sa formation pourrait s'expliquer par la réaction de l'imino-phosphorane, intermédiaire clé de la réaction de Staudinger, sur le thiocarbonyl avec libération de Me₃P(O) et H₂S.

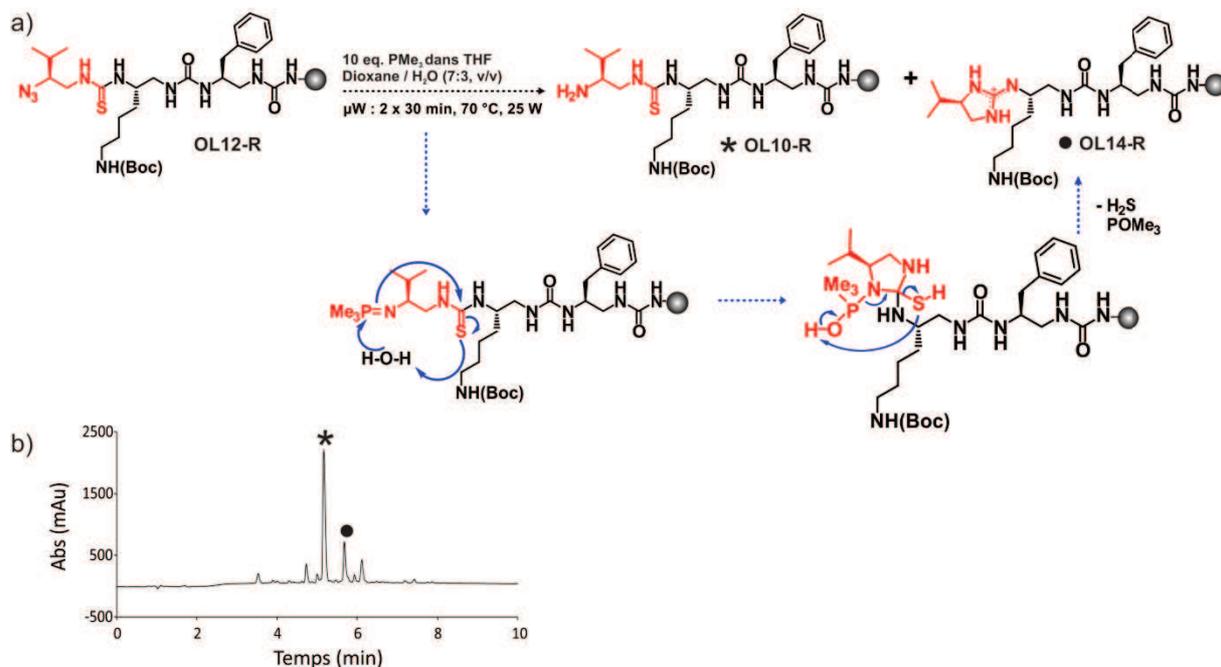


Figure II.27 : a) Réduction de l'azoture sous champ micro-ondes et mécanisme proposé pour expliquer la formation du dérivé 4,5-Dihydro-1H-imidazol-2-amine **OL14** ; b) chromatogramme du produit brut (UV avec 200 nm, 10-50 % CH₃CN (+ 0.1 % TFA) dans H₂O (+ 0.1 % TFA) en 10 min).

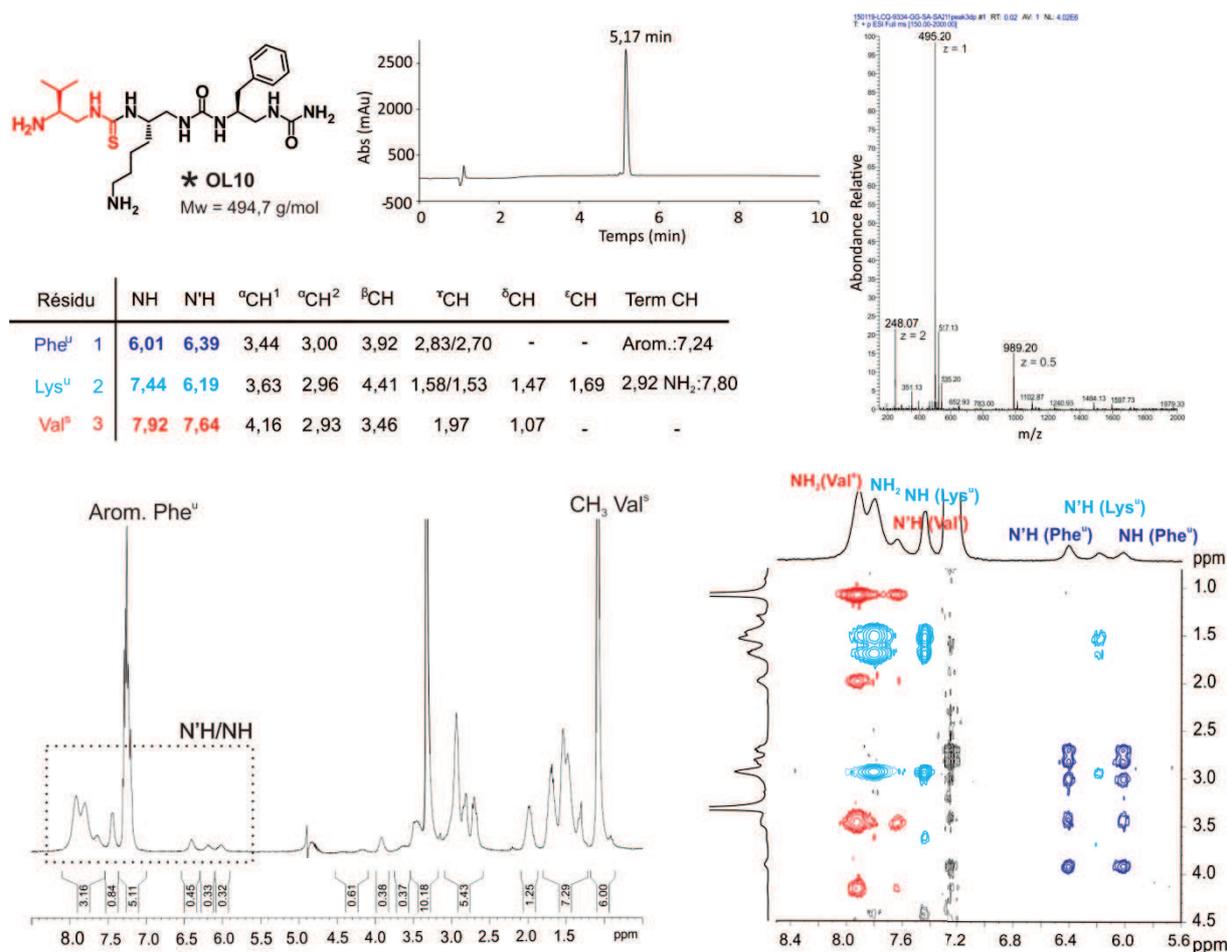


Figure II.28 : Caractérisation du composé **OL10** par ESI-MS et RMN du proton (HPLC avec UV 200 nm, 10-50 % CH₃CN (+ 0.1 % TFA) dans H₂O (+ 0.1 % TFA) en 10 min).

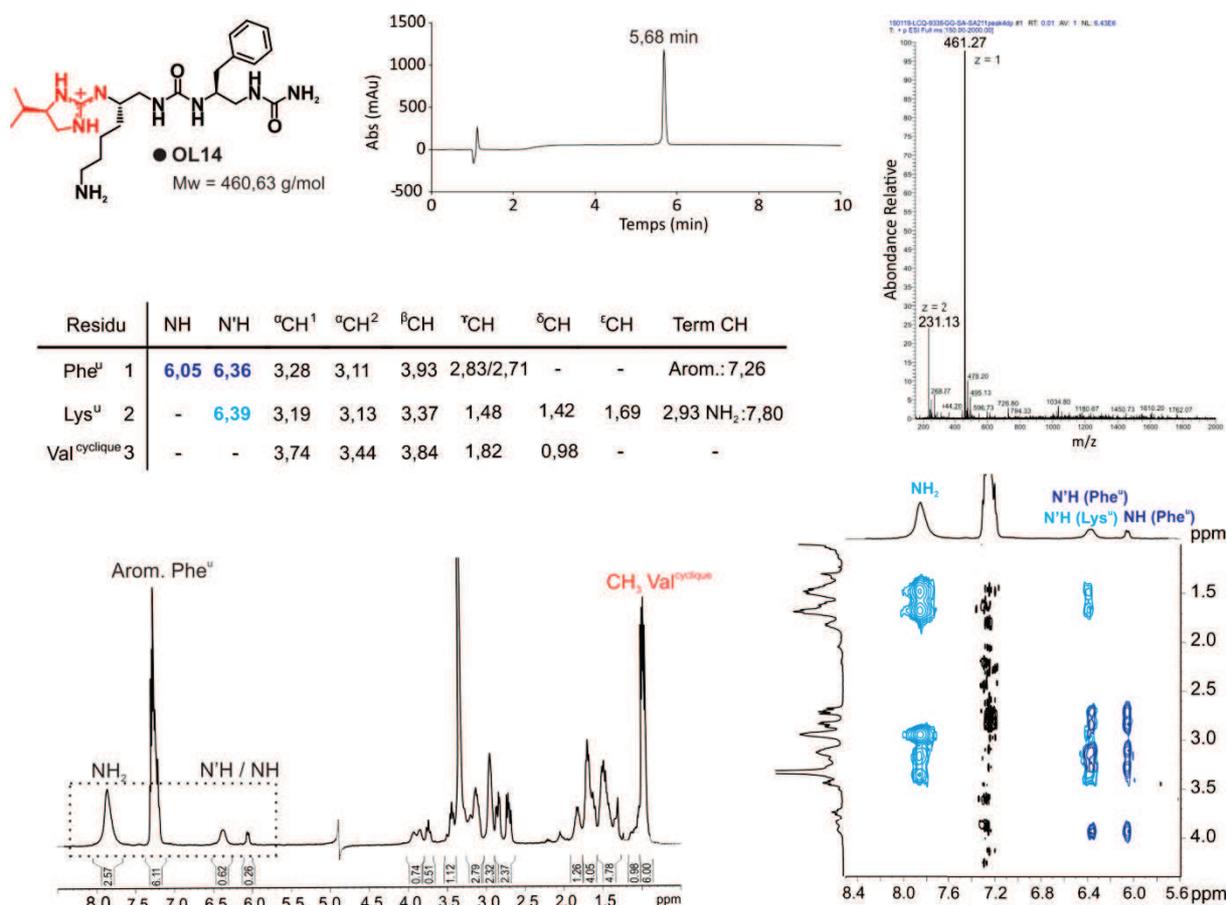


Figure II.29 : Caractérisation du dérivé guanidine cyclique par ESI-MS et RMN du proton (HPLC avec UV avec 200 nm, 10-50 % CH₃CN (+ 0.1 % TFA) dans H₂O (+ 0.1 % TFA) en 10 min).

Ces difficultés sur le plan synthétique nous ont incitées à réexaminer notre stratégie. En particulier, un changement de protection temporaire qui pourrait être utilisée localement pour l'insertion du lien thiourée et qui serait compatible avec la stratégie azoture a donc été considéré.

iii) Utilisation d'une protection temporaire de type Fmoc

(1) Synthèse des monomères activés

L'utilisation d'un groupement temporaire de type *N*-fluorénylméthoxy-carbonyl (Fmoc) a été envisagée comme alternative au monomère de type azoture. Il est en effet compatible avec l'emploi d'une résine TFA labile (et donc une stratégie azoture pour le reste de la séquence). De plus, sa déprotection rapide par de la pipéridine dans le DMF pourrait éviter la formation de sous-produits secondaires.

La synthèse des monomères de type Fmoc avait déjà été décrite pour les carbamates de succinimidyle [46] (Schéma II.6). Les *N*-Fmoc β -amino acides étaient d'abord convertis en azotures d'acyle correspondants par réaction de leurs anhydrides mixtes avec une solution aqueuse d'azoture de sodium. Un réarrangement de Curtius dans le toluène permettait

d'obtenir les isocyanates, directement transformés en carbamates par ajout de *N*-hydroxysuccinimide.

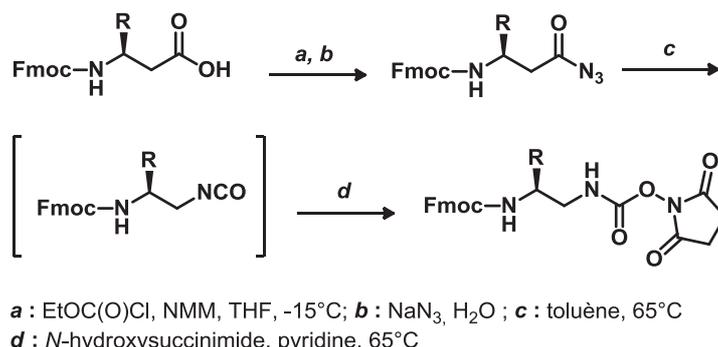


Schéma II.6 : Schéma de synthèse des monomères carbamate de succinimidyle protégés par un groupement Fmoc précédemment utilisée au laboratoire [46].

La voie de synthèse que nous avons développée pour accéder aux monomères thiocarbamoylés correspondants repose sur l'obtention de la diamine *N*-Fmoc protégée **M6d** et s'inspire des travaux de Mondal *et al.*[47] et de Sureshbabu *et al.* [14] (Schéma II.7). Le β-amino-alcool **M6a** préalablement formé est transformé en dérivé iodoalkyle **M6b** à l'aide de triphénylphosphine, d'imidazole et de diiode. Puis **M6b** est substitué par un azoture **M6c**, afin de le réduire ensuite en une amine par hydrogénation. Cette réaction est réalisée en présence de chloroforme car l'acidité résiduelle du chloroforme permet d'obtenir le sel de chlorhydrate **M6d** plus stable et aisément purifié par trituration en présence d'éther et d'acétate d'éthyle. Finalement, une fois déplacée de son sel de chlorhydrate l'amine peut être alors activée avec la bis(benzotriazolyl)méthanethione pour former le monomère **M6**. L'isothiocyanate **M7** a pu être synthétisé, à son tour, à partir du thiocarbamoylbenzotriazole **M6** en présence de base avec des rendements compris entre 50 et 70 %.

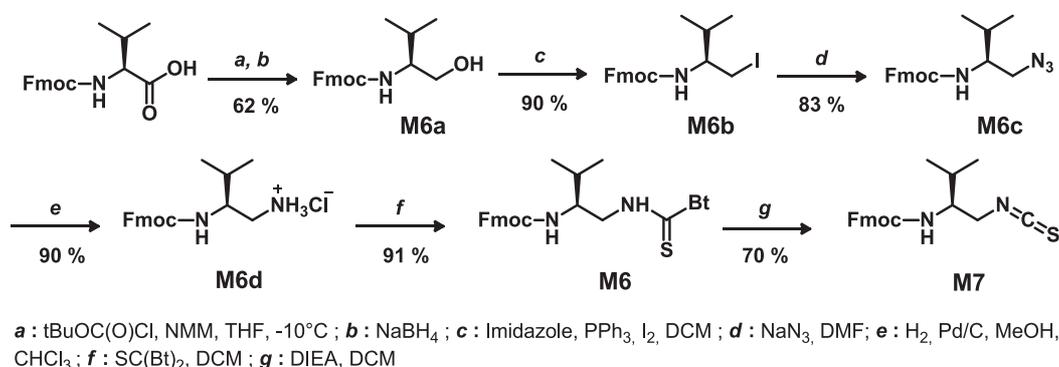


Schéma II.7 : Schéma de synthèse des monomères **M6** et **M7**.

(2) Optimisation des conditions

Une fois synthétisé, le monomère **M6** a tout d'abord été engagé dans la synthèse du trimère modèle **OL15** Fmoc-Val^S-Lys^U-Phe^U (Figure II.30). En s'inspirant des résultats obtenus lors des premières synthèses d'oligourées en stratégie Fmoc par le groupe [46], le couplage a été réalisé en 48 heures avec 5 équivalents de **M6** dans le dichlorométhane et 20 équivalents de DIEA dans le dichlorométhane. Toutefois comme il avait déjà pu être observé, un sous-produit de sur-insertion (caractérisé par ESI-MS) a été obtenu. Afin de limiter la déprotection partielle du groupement Fmoc pendant la réaction de couplage entre l'amine libre et du thiocarbamoylbenzotriazole nous avons pensé utiliser l'isothiocyanate **M7** qui nous permettrait de réaliser le couplage sans avoir recours à une amine tertiaire (Figure II.31). Cet isothiocyanate est aisément accessible en une étape à partir de **M6**. Une synthèse de **M6** par réaction de la diamine *N*-Fmoc protégée avec le sulfure de carbone a également été proposée en 2009 par Sureshbabu *et al* [14].

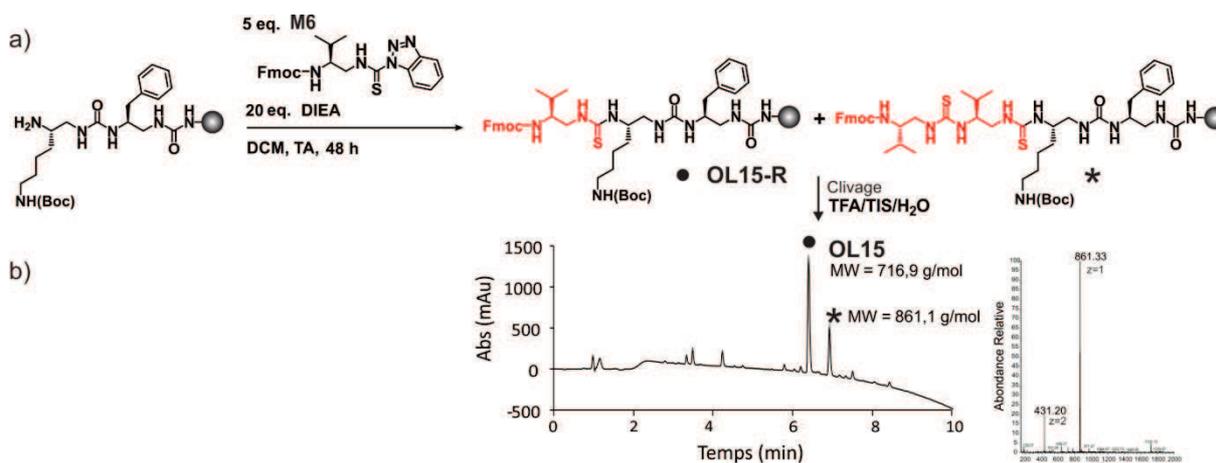


Figure II.30 : a) Schéma de synthèse formant **OL15** et le produit de sur-insertion b) Chromatogramme du produit brut (UV avec 200 nm, 10-100 % CH₃CN (+ 0.1 % TFA) dans H₂O (+ 0.1 % TFA) en 10 min) et ESI-MS du sous-produit isolé.

L'isothiocyanate **M7** a été couplé en 48 heures avec 5 équivalents (réduit à 3 équivalents par la suite) dans le dichlorométhane et permet d'obtenir le trimère **OL15** avec une très bonne pureté comme le prouve le chromatogramme représenté dans la figure II.31 ci-dessous. L'étape de déprotection du groupement Fmoc réalisée avec des conditions classiques en utilisant de la pipéridine dans le DMF (20 %) durant 7 min puis deux fois 15 minutes conduit à **OL10** dont le brut réactionnel est obtenu avec une pureté de 63 % par HPLC et un rendement isolé de 34 %.

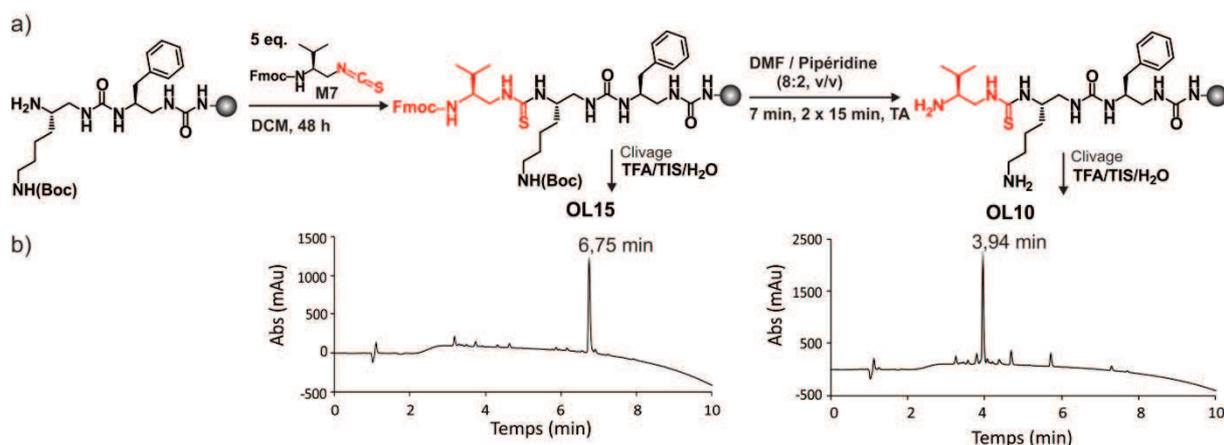


Figure II.31 : a) Schéma de synthèse formant **OL15** et **OL10** b) Chromatogrammes des produits bruts (UV avec 200 nm, 10-100 % CH₃CN (+ 0.1 % TFA) dans H₂O (+ 0.1 % TFA) en 10 min).

(3) Synthèse d'OL8 par les méthodes optimisées

Afin de valider cette nouvelle stratégie, nous avons évalué à nouveau la synthèse de l'oligomère **OL8** en suivant (i) soit la stratégie « tout azoture » avec le monomère **M5**, (ii) soit la stratégie azoture couplée à l'utilisation du monomère isothiocyanate *N*-Fmoc protégé **M7** (Figure II.32a).

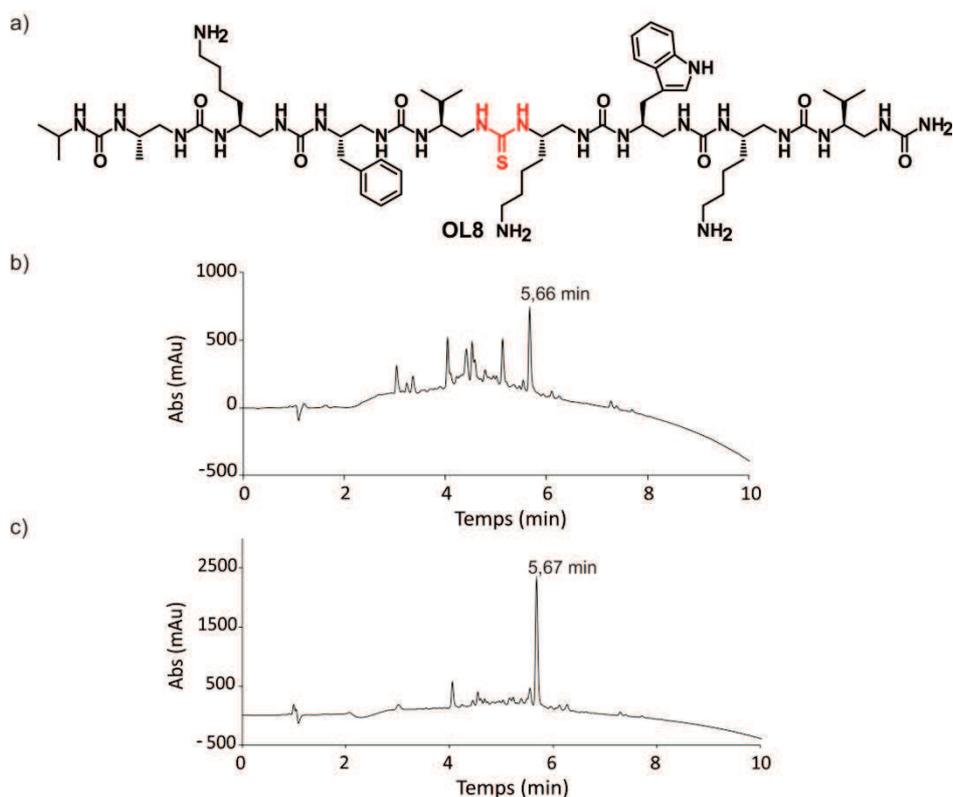


Figure II.32 : a) structure chimique d'**OL8** ; Chromatogrammes des produits bruts (UV avec 200 nm, 10-100 % CH₃CN (+ 0.1 % TFA) dans H₂O (+ 0.1 % TFA) en 10 min) en utilisant a) **M5** b) **M7**.

En utilisant **M5**, **OL8** est obtenu avec un rendement après purification par HPLC semi-préparative de 4 %. Le chromatogramme HPLC du brut réactionnel après clivage et précipitation montre la présence de nombreux produits secondaires (Figure II.32a), une

pureté HPLC du produit brut est observée à hauteur de 13 %. En revanche, l'utilisation du monomère **M7** permet d'obtenir **OL8** avec 12 % de rendement après purification par HPLC et une pureté du produit brut réactionnel (52 %) très satisfaisante (Figure II.32b).

En conclusion, l'insertion du motif thiourée, isostère du lien urée a été réalisée avec succès que ce soit en solution ou sur support solide. L'étude conformationnelle des oligomères synthétisés en solution nous a permis de comprendre les conséquences structurales de cette modification isostère sur l'hélice 2,5 formée par les urées *N,N'*-liées. Sur support solide, deux méthodologies permettent d'insérer le lien thiourée. D'abord, la stratégie Boc, développée en solution, peut être facilement transposée à la phase solide avec l'utilisation de monomère thiocarbamoylbenzotriazole activé comme **M2**. Ensuite, des problèmes d'instabilité du monomère de type azoture benzotriazole (**M5**) en conditions micro-ondes et la formation de produits secondaires dérivé de la 4,5-Dihydro-1*H*-imidazol-2-amine nous ont amenés à utiliser une protection temporaire de type *N*-Fmoc pour pouvoir insérer simplement le lien thiourée. Fait majeur, l'utilisation du *N*-Fmoc isothiocyanate **M7** donna de très bons résultats (*un manuscrit est en cours de finalisation*). Ainsi nous disposons à présent de tous les outils nécessaires à l'insertion de ce motif dans des séquences plus longues et à la synthèse d'oligomères innovants pour réaliser l'étude de leur activité antimicrobienne et comme nous allons le présenter ci-après pour préparer des squelettes guanidylés sur support solide.

3. Introduction de motif guanidine sur support solide

a) Généralités sur les guanidines

Le motif guanidine NHC(=N)NH est retrouvé naturellement dans les guanidines, les arginines et dans de nombreux composés naturels biologiquement actifs [48-51]. Ce motif est qualifié d'organosuperbase car sa basicité est magnifiée par la stabilisation par résonance des acides conjugués correspondants. Le motif guanidine possède une forte intégrité de sa charge positive sur une large gamme de pH (pK_a de 13,7). Dans l'eau ce motif n'est en fait présent qu'à l'état cationique, appelé communément sel de guanidinium. Cette charge positive joue un rôle important en formant des interactions intermoléculaires spécifiques *via* la formation de liaisons hydrogène dans de multiples étapes-clés de phénomènes biologiques y compris : dans (i) certains processus enzymatiques, (ii) dans l'appariement des bases de l'ADN ou (iii) encore dans l'interaction entre des hormones avec leurs récepteurs. Par exemple, le motif Arg-Gly-Asp (couramment abrégé RGD) est le site de

reconnaissance de la matrice extracellulaire des protéines transmembranaires Intégrines, qui sont surexprimées dans les tumeurs cancéreuses [52-54].

Parmi tant d'autres applications, le motif guanidine a été utilisé lors de l'étude du mécanisme d'hydrolyse des phosphodiester [55,56], en tant que motif de reconnaissance d'anions dans des récepteurs synthétiques [56-60], comme édulcorant artificiel [61] et enfin dans la formation de structure secondaire en chimie supramoléculaire [62]. De surcroît, cette remarquable capacité de formation de liaisons hydrogène a été mis à profit pour le transport de molécules au sein des cellules. Ces travaux ont débuté lorsqu'à la fin des années 80, les équipes de Frankel et Pabo et celles de Green et Loewenstein, se sont intéressées à la protéine Tat sécrétée par le virus HIV-1. Ils découvrent au cours d'un contrôle que la protéine Tat est spontanément internalisée par les cellules et acheminée jusqu'à l'intérieur de leur noyau [63,64]. Par la suite, différents travaux ont permis de démontrer que le domaine de transduction de la protéine Tat se réduit à la séquence cationique, riches en arginines, Tat₄₉₋₅₇ (Arg-(Lys)₂-(Arg)₂-Gln-(Arg)₃), appelée plus simplement peptide Tat. La différence d'affinité flagrante observée entre les oligomères d'arginines et leurs analogues à base d'autres résidus aminés conduit Wender *et al.* à formuler la proposition suivante: les guanidines du peptide positivement chargées établissent une liaison bidentate avec les oxo-anions (principalement de type phosphates) abondants à la surface de la membrane plasmique des cellules, cette liaison est stabilisée à la fois par la neutralisation de charge et par la formation de deux liaisons hydrogène [65].

Dès lors, l'utilisation de ce motif pour le transport dans les cellules toutes sortes de molécules a gagné en popularité. Par exemple on peut citer les travaux de Rothbard *et al.* sur la Cyclosporine A, peptide cyclique aux propriétés immunosuppressives [66]. Inefficace en application topique en raison d'une pauvre pénétration dans la peau, sa conjugaison à un heptamère d'arginines permet un transport efficace de la Cyclosporine dans des cellules dans la peau de souris et d'humain. Il a aussi pu être observé que le conjugué atteint les lymphocytes T et empêche le d'inflammation cutanée. Cette fonction « vecteur » du motif guanidine a aussi été appliquée aux peptoides et aux β -peptides [67,68]. Ainsi le groupe de Gellman a étudié l'effet de la disposition spatiale du motif guanidine et de la stabilité de l'hélice sur la pénétration cellulaire de leurs peptidomimes. Des travaux de fluorescence et de microscopie confocale montrent qu'un β -peptide stabilisé en hélice 3_{14} en milieu aqueux et composé de six arginines regroupées sur une des faces pénètre de manière six fois plus importante que les autres analogues après trente minutes d'incubation [67].

Enfin le motif guanidine est retrouvée dans bien d'autres applications (revue sur les applications biologiques : [69]) tels que anticancéreuse avec notamment le transport de molécules toxiques pour les cellules [70,71] et antidiabétique avec la découverte de nouveaux antagonistes du récepteur humain du glucagon de type guanines cycliques [72]. Le screening par Blondelle *et al.* de guanidines bicycliques et le développement de nouveaux composés de type 2,5-diaryl-1-méthyl-1H-pyrroles par Jana *et al.* a aussi permis l'obtention de nouvelles classes de composés antifongiques [73,74]. Enfin Andreev *et al.* ont récemment démontré par différentes techniques spectroscopiques que le motif guanidine permet d'augmenter considérablement l'action de chimères peptoïde/ α -peptide synthétiques antimicrobiennes contre les membranes cytoplasmiques bactériennes [75].

La synthèse du motif guanidine a été étudiée depuis de nombreuses années et les méthodes de synthèse en solution et sur support solide [76] sont d'une très grande variété (Figure II.33) ([69,76-80]).

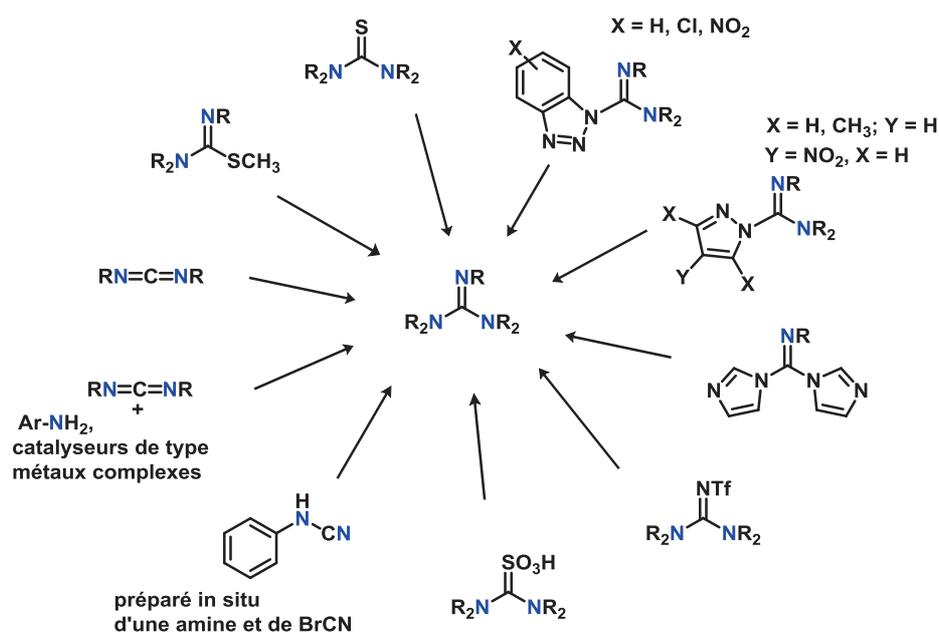


Figure II.33. Exemples de méthodes de synthèse utilisées pour la formation du lien guanidine (liste non exhaustive) [76,79,80].

Les thiourées font partie des principaux précurseurs pour l'obtention de guanidines. L'incorporation du motif guanidine dans le squelette oligourée de nos foldamères apparaît alors comme le prolongement naturel du travail initié sur l'insertion de liens thiourées.

Dans la littérature, les oligoguanidines aromatiques ont été développés par le groupe de Shudo [62,81,82]. L'unique propriété conformationnelle *cis/cis* de chaque unité guanidine alkylées confère une structure en hélice à la molécule (Figure II.34 a, b). La synthèse est

réalisée en solution par condensation à 160°C dans le chlorobenzène de la *N,N'*-diméthyl-*m*-phényldiamine avec 2 équivalents de *N*-méthyl-*N*-phénylcyanamides (préparées à partir de nitroaniline) pour donner le diguanidine méta-substitué. Après le deacétylation des deux groupes aminés terminaux, le sel de chlorhydrate de la diamine est mis à réagir avec le *N*-méthyl-*N*-phénylcyanamide, en présence d' AlCl_3 pour donner le composé tétraguadinine (Figure II.34 c).

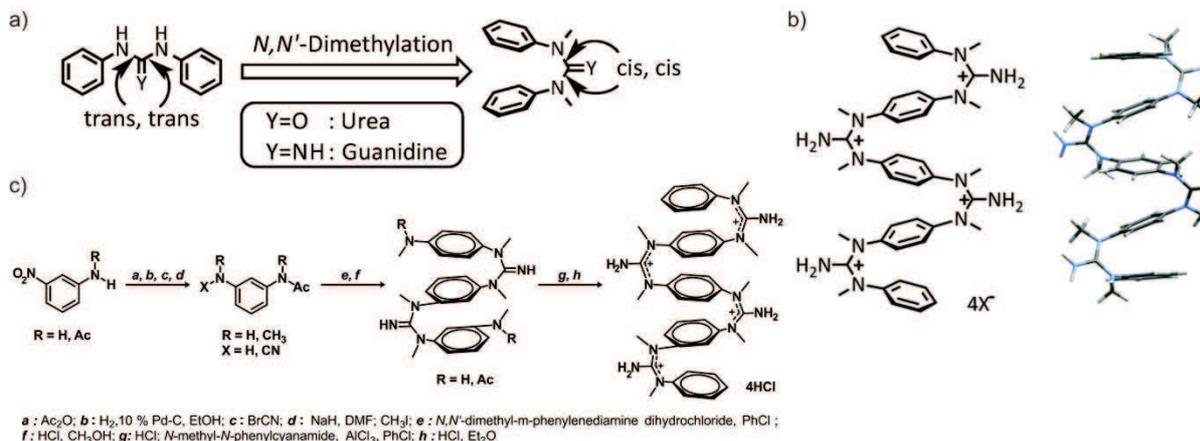


Figure II.34 : a) Conformation cis-cis des diphénylguanidines [81] ; b) Exemple d'oligoguanidine développé par Kudo *et al.* [81] ; c) Méthode de synthèse de tétraguadinine aromatique [82].

Le seul exemple d'oligoguanidines aliphatiques a été réalisé par Fan *et al.* Ils ont synthétisé sur support solide des homooligomères de guanidines *N,N'*-disubstituées énantiopurs à partir de monomères azido-thiourées activés par un groupement de type 2,2,4,6,7-pentaméthyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyle (Pbf), avec la formation de carbodiimides intermédiaires (Schéma II.8) [83].

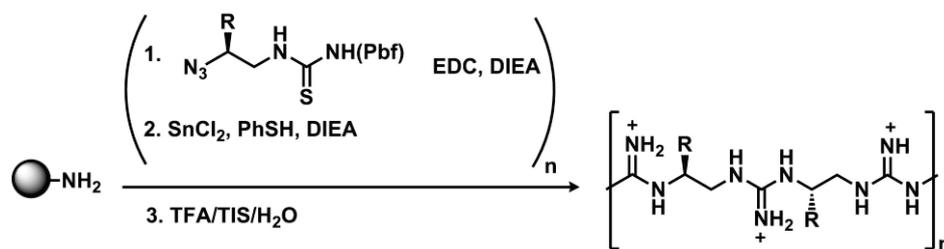


Schéma II.8 : Méthode de synthèse d'homooligomères guanidines sur support solide développée par Fan *et al.* [83].

Toutefois, à notre connaissance, il n'y a pas d'exemple d'hétéro-oligomères aliphatiques, contenant un ou plusieurs groupements guanidines sur leur squelette dont la structuration secondaire est bien définie.

b) Introduction du motif guanidine en solution

La modification post-synthèse du motif thiourée ($\text{NHC}(=\text{S})\text{NH}$) en motif guanidine ($\text{NHC}(=\text{NHR})\text{NH}$) dans les hybrides oligo(thio)urée a été initialement développée en solution

par le Dr. Pulka. Parmi les différentes méthodes existantes, les conditions de réaction en phase solide rapportés par Fan *et al.* [83] ont notamment été testées. En effet cette approche utilisant des monomères de type azoture nous apparaissait adaptée, puisque nous utilisons déjà au laboratoire l'azoture comme amine masquée lors de la synthèse de nos oligourées sur support solide. Malheureusement, la faible stabilité du 2,2,4,6,7-pentaméthylidihydrobenzofuran-5-sulfonyl isothiocyanate (PbfNCS) nécessaire à l'obtention des monomères a été la principale limitation à l'utilisation de cette approche. D'autres stratégies ont alors été envisagées comme l'utilisation du mélange sulfate de cuivre-silice [84] ou encore de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) [85] mais c'est finalement l'activation de la fonction thiourée par l'iodure de méthane suivie de sa substitution en motif guanidinium par l'attaque nucléophile d'une amine, qui a donné les meilleurs résultats [86].

En premier lieu, la méthylation de la thiourée est tout d'abord réalisée dans un mélange CH₃CN/THF en présence de 10 équivalents d'iodure de méthane à 40-45 °C sous azote. La réaction est suivie par HPLC et une conversion totale est observée entre 2 heures et 5 heures. Le brut est ensuite directement engagé dans la seconde étape de guanylation sans purification (Figure II.35a).

Au cours de la seconde étape de guanylation l'obtention de sous-produits a conduit à l'optimisation des conditions. En effet, l'utilisation d'une solution commerciale concentrée (7 M) d'ammoniac dans le méthanol conduit à la formation à hauteur de 70-80 % d'un sous-produit cyclique (Figure II.35a). De nouveau, il est possible de constater la réactivité particulière des thiourées avec la formation de sous-produits cycliques, tel qu'il a pu être observé durant l'étape de réduction de la synthèse des thiourées sur support solide par stratégie azoture.

Pour éviter sa formation, un acide γ -aminé en position *i*-1 a été inséré et une solution d'ammoniac commerciale à 0,5 M dans le dioxane a été utilisée avec succès (Figure II.35b). L'utilisation d'ammoniac commerciale (7 M) dans le méthanol conduisait dans ce cas-là, à la formation de sous-produits secondaires qui n'ont pas été identifiés.

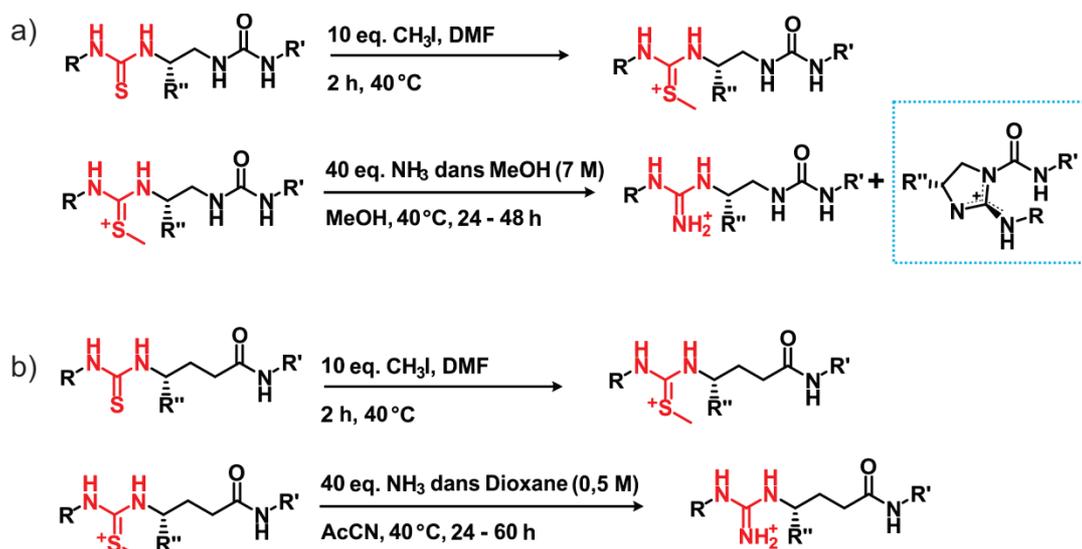


Figure II.35 : Représentation schématique des différentes conditions d'obtentions de guanidine en solution et des produits obtenus.

A titre d'exemples, les oligomères **OL17** et **OL18** ont pu être synthétisés en solution à partir du substrat oligo(thio)urée **OL16** correspondant avec des rendements respectifs de 92 % et 60 % (Figure II.36). L'oligo(thio)urée **OL16** a été synthétisé à partir des conditions précédemment décrites dans la première partie avec un rendement de 72 % puis est totalement méthylée avec 10 équivalents d'iodométhane à 40-45 °C. L'utilisation de 20 équivalents d'ammoniac dans le dioxane durant 60 heures à 40-45 °C dans CH_3CN permet d'obtenir **OL17** avec une conversion HPLC de 98 %. **OL18** est pour sa part obtenu à partir de l'utilisation de 20 équivalents d'isopropyle amide durant 60 heures à 40-45 °C dans CH_3CN avec une conversion HPLC de 96 %.

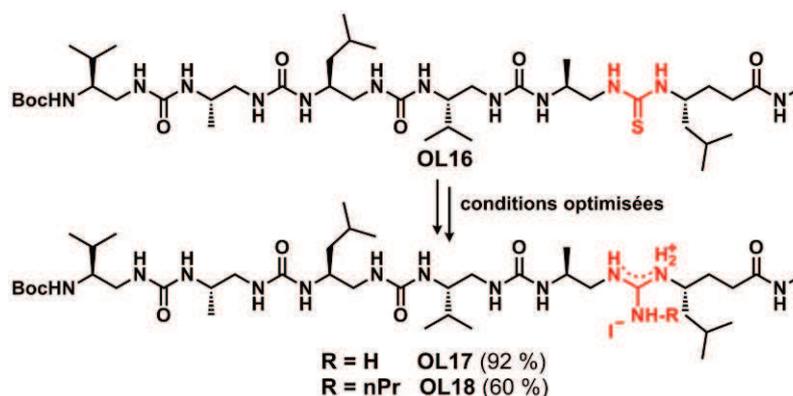


Figure II.36: Structures chimiques de molécules **OL16**, **OL17** et **OL18**.

c) Introduction du motif guanidine sur support solide

i) Mise au point de la synthèse

Dans le but de vérifier la compatibilité de cette méthodologie avec le support solide, la synthèse d'un nouveau oligomère de référence **OL19** calqué sur **OL8** a alors été entrepris (Figure II.37).

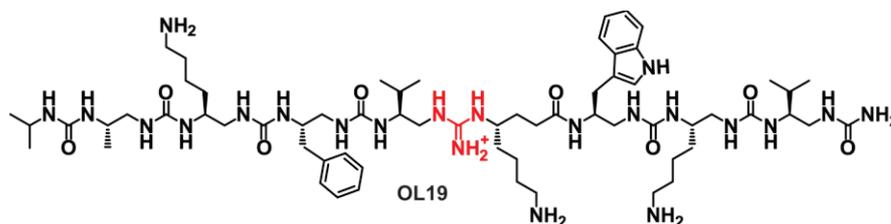


Figure II.37 : Structure chimique d'OL19.

Tout d'abord, l'activation en présence d'iodure de méthane nécessite de protéger tous les autres sites d'alkylation possibles de la séquence, notamment le noyau indole des résidus de type tryptophane généralement laissé libre dans les synthèses d'oligourées et d'hybrides thiourées. Le monomère **M8** dont le noyau indole est protégé par un groupement de type Boc a alors été préparé avec un rendement global de 47 % (Schéma II.9).

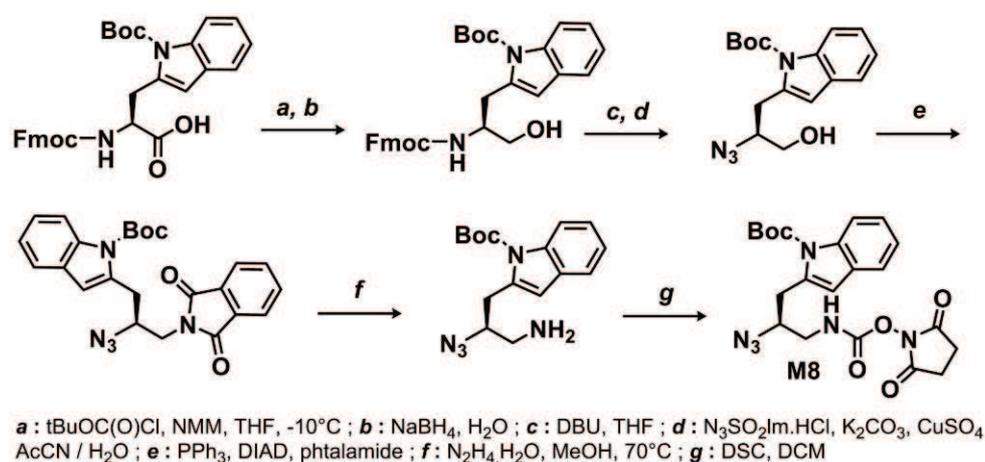


Schéma II.9 : Synthèse du monomère **M8** de type N₃-Trp(Boc)-CH₂NHOSu.

Par la suite, un suivi systématique de chaque étape par clivage d'une petite quantité de résine a été réalisé et a permis d'optimiser les conditions de réaction (Figure II.38). Premièrement, la synthèse du composé hybride thiourée intermédiaire **OL20** a été réalisée avec le Fmoc isothiocyanate **M7**, en suivant la nouvelle méthodologie de synthèse précédemment décrite dans la deuxième partie de ce chapitre. L'analyse du chromatogramme HPLC ainsi que l'analyse par masse du produit brut confirment la bonne préparation de la résine porteuse de l'octamère (**OL20-R**) de référence (Figure II.38a).

Pour les deux étapes suivantes (méthylation de la thiourée et attaque nucléophile), les tests préliminaires ont mis en évidence que la cinétique sur support solide était bien plus lente qu'en solution. L'alkylation complète de la thiourée nécessite un traitement de la résine avec 10 équivalents d'iodure de méthane 30 min à 40°C sous champ micro-ondes répété quatre fois (Figure II.38b). La deuxième étape a demandé plus de mises au point. En effet, la solution commerciale d'ammoniac dans du dioxane à 0,5 M s'est avérée trop peu concentrée pour obtenir une cinétique convenable (et cela sans dégradation liée au

chauffage). L'utilisation d'ammoniac gaz directement bullée dans le milieu réactionnel a permis l'obtention du motif guanidine sous 48 h à 50°C de manière très satisfaisante (Figure II.38c). Ces conditions de synthèse ont pu être appliquées par la suite avec succès à la synthèse d'oligomères à visée antimicrobienne et ont montré leur reproductibilité (cf chapitre 3).

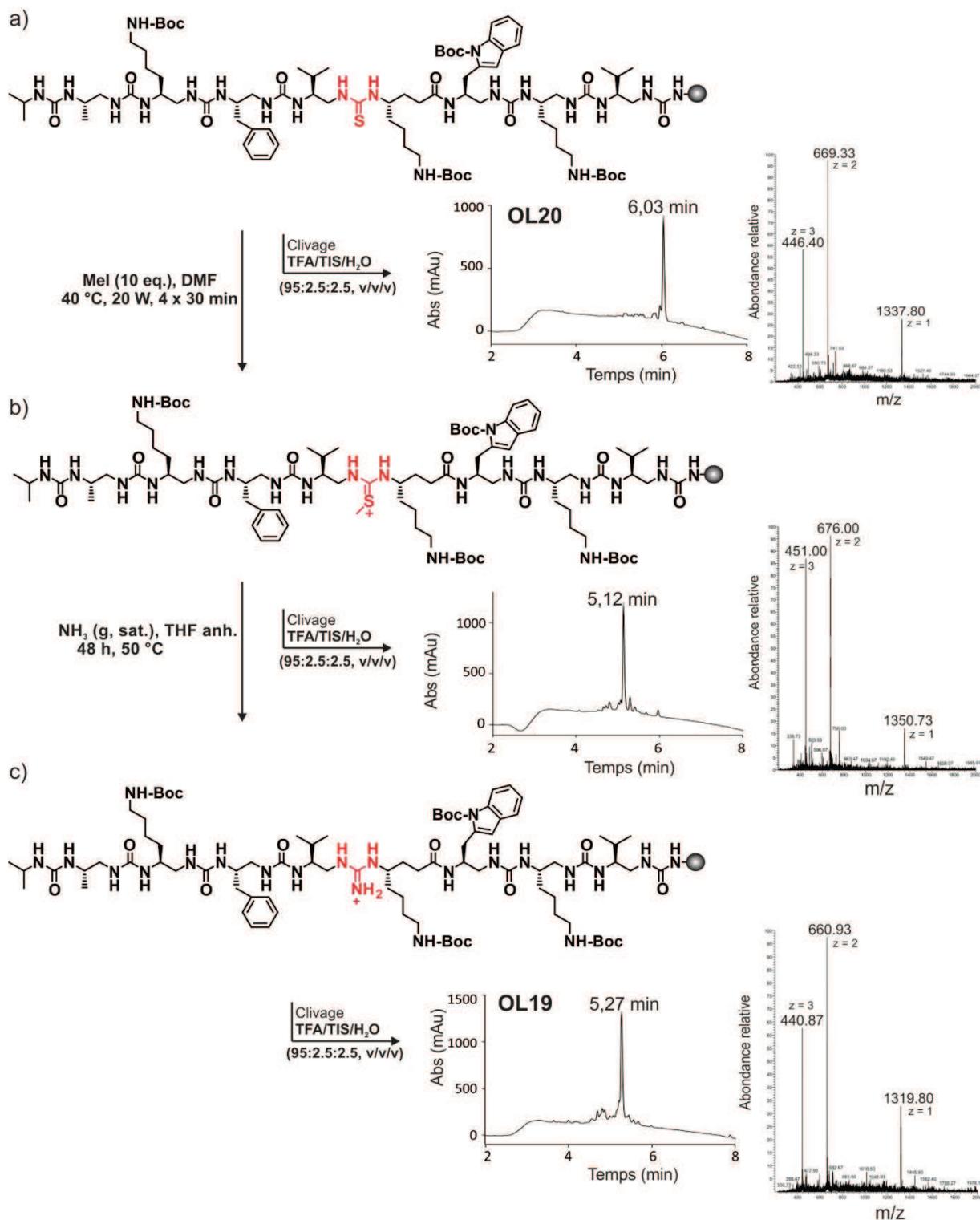


Figure II.38 : Suivi par clivage et analyse du produit brut par HPLC et ESI-MS de la synthèse d'**OL19** sur support solide.

i) Etude conformationnelle

L'étude conformationnelle préliminaires des oligomères hybrides, synthétisés en solution, **OL16** (urée/thiourée), **OL17** et **OL18** (urée/guanidine) réalisée par le Dr. Pulka montre que l'insertion en position « C-terminale » de lien guanidinium n'impacte que légèrement l'hélicité du composé par : (i) des écarts de déplacement chimiques des méthylènes des résidus urées de ces trois oligomères mesurés par RMN du proton égaux ou supérieures à 1 ppm ; (ii) l'analyse par dichroïsme circulaire dans le TFE des oligomères montrant la présence des deux bandes caractéristiques de l'hélice 2,5 à 188 nm et 203 nm.

Suivant le même raisonnement, l'analyse conformationnelle des composés **OL19** et **OL20** a été réalisée. Ils pourront être comparés à l'homo-oligourée **I.71** de séquence extrêmement proche, décrite dans le chapitre 1 (Figure II.40).

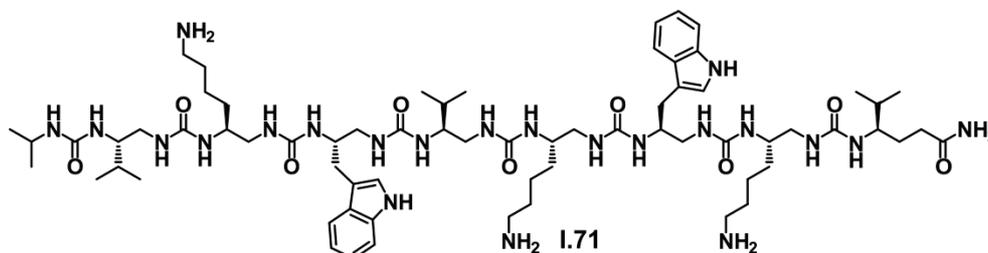


Figure II.39 : Rappel de la structure chimique de l'oligourée **I.71** décrite dans le chapitre 1.

Tout d'abord, les spectre CD de **OL19** et **OL20**, réalisé à 0,2 mM dans le 2,2,2 trifluoroéthanol possèdent la signature CD caractéristique de l'hélice-2,5 avec un maximum d'ellipticité molaire positif aux environs de 203 nm ainsi qu'un maximum négatif d'intensité plus faible à 188 nm (malgré la présence de bruit non négligeable) (Figure II.39). Dans le cas du composé hybride thiourée **OL20**, une bande positive à 225 nm est une fois de plus constatée. Toutefois, la présence des nouveaux chromophores empêche toute possibilité d'approfondir la comparaison à un composé de type homo-oligourée.

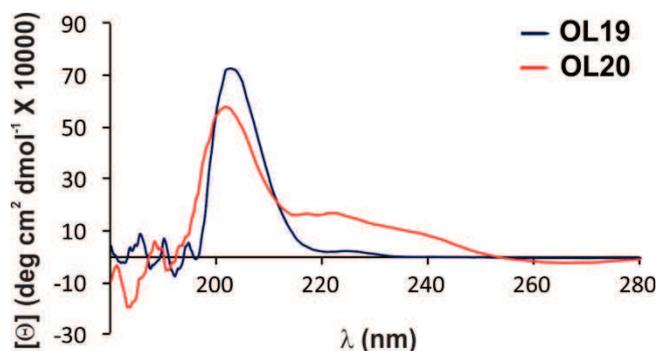


Figure II.39 : Spectres CD obtenus pour les composés **OL19**, **OL20** dans le 2,2,2-trifluoroéthanol à 0,2 mM.

Ensuite, l'attribution complète de tous les systèmes de spin a été réalisée par des expériences RMN à deux dimensions : COSY, TOCSY et ROESY dans le CD₃OH à 2,5 mM. De la manière similaire à ce qui a été réalisé en solution, l'écart de déplacements chimiques $\Delta\delta$ entre les protons ^αCH₂ pour chaque résidu de la chaîne principale a été mesuré (Table II.5).

Composé	Ala ₈ ^u	Lys ₇ ^u	Phe ₆ ^u	Val ₅ ^x	Lys ₄ ^γ	Trp ₃ ^u	Lys ₂ ^u	Val ₁ ^u
OL19	0,82	0,76	1,10	0,71	0,27	0,60	1,00	0,72
OL20	0,88	1,085	1,24	1,80	0,22	0,87	1,11	0,95

Composé	Val ₈ ^u	Lys ₇ ^u	Trp ₆ ^u	Val ₅ ^u	Lys ₄ ^u	Trp ₃ ^u	Lys ₂ ^u	Val ₁ ^γ
I.71	1,07	1,15	1,28	1,33	1,47	1,24	1,26	0,49

Table II.5 : Ecart des déplacements chimiques des protons ^αCH₂ mesurés pour chaque résidu des composés **OL19** à **OL20**, comparés aux écarts observés pour la séquence homo-oligourée **I.71**. Les écarts des liens urées à comparer en bleu.

Pour le composé hydride urée/thiourée **OL20**, ces résultats confirment la déstabilisation de l'hélice-2,5 par l'insertion de lien thiourée en position centrale. On note ainsi une nette diminution de la valeur de $\Delta\delta$ du résidu de type tryptophane (Trp₃^u) en position *i*-2 de la thiourée. Pour le composé hydride urée/guanidine **OL19**, les valeurs des $\Delta\delta$ s ont diminué pour tous les résidus urées de la séquence (Lys₂^u, Trp₃^u, Ala₈^u, Lys₇^u, Phe₆^u). L'introduction du lien guanidine perturbe toutes les liaisons hydrogène dans lesquelles il devrait être impliqué. Ainsi, le faible écart de déplacement chimique du résidu de type valine (Val₅^{gua}) montre que le lien guanidinium gêne à la formation de liaisons hydrogène entre le carbonyle en *i*+2 du résidu de type lysine et les NHs de la guanidine. L'écart de déplacement chimique du résidu type tryptophane (Trp₃^u) en position *i*-2 chute pour sa part à 0,60 ppm. Contrairement à ce qui a pu être observé pour l'insertion en position « C-terminale », l'introduction du lien guanidine en position centrale perturbe donc fortement la structuration en hélice-2,5 de notre squelette d'oligourée.

En conclusion, après avoir développé la synthèse d'oligo(thio)urées en solution puis sur support solide, le motif guanidine a pu être à son tour obtenu à en substituant un lien thiourée à l'unique condition qu'un acide γ -aminé soit installé en position *i*-1. L'étude conformationnelle réalisée montre que si l'hélicité n'est que faiblement perturbée en position « C-terminale » par l'introduction de ce nouveau lien isostère, elle l'est fortement en position centrale. Nous disposons à présent d'une large variété d'outils synthétiques afin de moduler l'hélicité des oligourées *N,N'*-liées et d'augmenter leur diversité structurale (*un manuscrit est aussi en cours de préparation*).

Bibliographie

- [1] P. Chen, J. Qu, Backbone modification of β -hairpin-forming tetrapeptides in asymmetric acyl transfer reactions, *J. Org. Chem.*, 76 (2011) 2994-3004.
- [2] M. De Zotti, B. Biondi, C. Peggion, M. De Poli, H. Fathi, S. Oancea, C. Toniolo, F. Formaggio, Partial thioamide scan on the lipopeptaibiotic trichogin GA IV. Effects on folding and bioactivity, *Beilstein J. Org. Chem.*, 8 (2012) 1161-1171.
- [3] J. Xie, A. Okano, J.G. Pierce, R.C. James, S. Stamm, C.M. Crane, D.L. Boger, Total synthesis of $[\psi[C(=S)NH]Tpg4]$ vancomycin aglycon, $[\psi[C(=NH)NH]Tpg4]$ vancomycin aglycon, and related key compounds: Reengineering vancomycin for dual D-Ala-D-Ala and D-Ala-D-Lac binding, *J. Am. Chem. Soc.*, 134 (2012) 1284-1297.
- [4] P.A. Wiget, L.A. Manzano, J.M. Pruet, G. Gao, R. Saito, A.F. Monzingo, K.R. Jasheway, J.D. Robertus, E.V. Anslyn, Sulfur incorporation generally improves ricin inhibition in pterin-appended glycine-phenylalanine dipeptide mimics, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 23 (2013) 6799-6804.
- [5] T. Sifferlen, M. Rueping, K. Gademann, B. Jaun, D. Seebach, β -thiopeptides: Synthesis, NMR solution structure, CD spectra, and photochemistry, *Helv. Chim. Acta*, 82 (1999) 2067-2093.
- [6] D. Wildemann, C. Schiene-Fischer, T. Aumüller, A. Bachmann, T. Kiefhaber, C. Lücke, G. Fischer, A nearly isosteric photosensitive amide-backbone substitution allows enzyme activity switching in ribonuclease s, *J. Am. Chem. Soc.*, 129 (2007) 4910-4918.
- [7] F.G. Bordwell, Equilibrium acidities in dimethyl sulfoxide solution, *Acc. Chem. Res.*, 21 (1988) 456-463.
- [8] J.T. Lenthall, J.A. Foster, K.M. Anderson, M.R. Probert, J.A.K. Howard, J.W. Steed, Hydrogen bonding interactions with the thiocarbonyl π -system, *CrystEngComm*, 13 (2011) 3202-3212.
- [9] D.C. Schroeder, Thioureas, *Chem. Rev.*, 55 (1955) 181-228.
- [10] S. Sharma, Thiophosgene in organic synthesis, *Synthesis*, 1978 (1978) 803-820.
- [11] H.A. Staab, New methods of preparative organic chemistry iv. Syntheses using heterocyclic amides (azolides), *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1 (1962) 351-367.
- [12] Y. Takikawa, N. Inoue, R. Sato, S. Takizawa, A convenient method for the preparation of *N,N'*-disubstituted thioureas using 2-chloropyridinium salt, sodium trithiocarbonate and amines, *Chem. Lett.*, (1982) 641-642.
- [13] F. Kurzer, K. Douraghi-Zadeh, Advances in the chemistry of carbodiimides, *Chem. Rev.*, 67 (1967) 107-152.
- [14] V.V. Sureshbabu, S.A. Naik, H.P. Hemantha, N. Narendra, U. Das, T.N. Guru Row, *N*-urethane-protected amino alkyl isothiocyanates: Synthesis, isolation, characterization, and application to the synthesis of thioureidopeptides, *J. Org. Chem.*, 74 (2009) 5260-5266.
- [15] Y. Tamura, M. Adachi, T. Kawasaki, Y. Kita, New method for converting amines into 1,1-disubstituted thioureas by using a combined reagent of triphenylphosphine and thiocyanogen, *Tetrahedron Lett.*, (1978) 1753-1754.
- [16] H. Sugimoto, I. Makino, K. Hirai, Activation of dithiocarbamate by 2-halothiazolium salts, *J. Org. Chem.*, 53 (1988) 2263-2267.
- [17] K. Ramadas, N. Srinivasan, N. Janarthanan, A facile conversion of symmetrical to unsymmetrical thioureas, *Tetrahedron Lett.*, 34 (1993) 6447-6450.
- [18] K. Ramadas, N. Srinivasan, A convenient route to substituted thiocarbamides, *Synth. Commun.*, 25 (1995) 3381-3387.
- [19] M. Xian, X. Zhu, Q. Li, J.-P. Cheng, A high-yielding and facile preparation of *N*-substituted thioureas by substitution of nitrosothioureas with alkylamines, *Tetrahedron Lett.*, 40 (1999) 1957-1960.
- [20] N. Yamazaki, T. Tomioka, F. Higashi, Studies on reactions of *N*-phosphonium salts of pyridines .16. Trisubstituted ureas and thioureas from hexaalkylphosphorous triamides, primary amines, and carbon-dioxide or carbon-disulfide, *Synthesis-Stuttgart*, (1975) 384-385.
- [21] M.R. Maddani, K.R. Prabhu, A concise synthesis of substituted thiourea derivatives in aqueous medium, *J. Org. Chem.*, 75 (2010) 2327-2332.
- [22] P.K. Mohanta, S. Dhar, S.K. Samal, H. Ila, H. Junjappa, 1-(methylthiocarbonyl)imidazole: A useful thiocarbonyl transfer reagent for synthesis of substituted thioureas, *Tetrahedron*, 56 (2000) 629-637.
- [23] A.R. Katritzky, K.N.B. Le, L. Khelashvili, P.P. Mohapatra, Alkyl, unsaturated, (hetero)aryl, and *N*-protected α -amino ketones by acylation of organometallic reagents, *J. Org. Chem.*, 71 (2006) 9861-9864.
- [24] O. Mitsunobu, M. Wada, T. Sano, Stereospecific and stereoselective reactions. I. Preparation of amines from alcohols, *J. Am. Chem. Soc.*, 94 (1972) 679-680.
- [25] H.R. Ing, R.H.F. Manske, CCCXII.-a modification of the gabriel synthesis of amines, *J. Chem. Soc.*, 129 (1926) 2348-2351.
- [26] N. Pendem, C. Douat, P. Claudon, M. Laguerre, S. Castano, B. Desbat, D. Cavagnat, E. Ennifar, B. Kauffmann, G. Guichard, Helix-forming propensity of aliphatic urea oligomers incorporating noncanonical residue substitution patterns, *J. Am. Chem. Soc.*, 135 (2013) 4884-4892.
- [27] D. Cavagnat, P. Claudon, L. Fischer, G. Guichard, B. Desbat, Experimental and theoretical study of the vibrational spectra of oligoureas: Helical versus β -sheet-type secondary structures, *J. Phys. Chem. B*, 115 (2011) 4446-4452.

- [28] A. Violette, M.C. Averlant-Petit, V. Semetey, C. Hemmerlin, R. Casimir, R. Graff, M. Marraud, J.-P. Briand, D. Rognan, G. Guichard, *N,N'*-linked oligoureas as foldamers: Chain length requirements for helix formation in protic solvent investigated by circular dichroism, NMR spectroscopy, and molecular dynamics, *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (2005) 2156-2164.
- [29] M.T. Oakley, G. Guichard, J.D. Hirst, Calculations on the electronic excited states of ureas and oligoureas, *J. Phys. Chem. B*, 111 (2007) 3274-3279.
- [30] J. Solà, G.A. Morris, J. Clayden, Measuring screw-sense preference in a helical oligomer by comparison of ^{13}C NMR signal separation at slow and fast exchange, *J. Am. Chem. Soc.*, 133 (2011) 3712-3715.
- [31] J. Maury, B.A.F. Le Bailly, J. Raftery, J. Clayden, Conformational cooperativity between helical domains of differing geometry in oligoamide-oligourea foldamer chimeras, *Chem. Commun.*, 51 (2015) 11802-11805.
- [32] A. Reiner, D. Wildemann, G. Fischer, T. Kiefhaber, Effect of thiopeptide bonds on α -helix structure and stability, *J. Am. Chem. Soc.*, 130 (2008) 8079-8084.
- [33] J. Fremaux, C. Dolain, B. Kauffmann, J. Clayden, G. Guichard, Influence of achiral units with gem-dimethyl substituents on the helical character of aliphatic oligourea foldamers, *Chem. Commun.*, 49 (2013) 7415-7417.
- [34] M.L. Filleux-Blanchard, A. Durand, Barrières de rotation autour des liaisons C-N dans la série des urées. Influence du remplacement de C=O par C=S, *Org. Magn. Reson.*, 3 (1971) 187-191.
- [35] C.O. Mellet, A.M. Marín, J.L. Jiménez Blanco, J.M. García Fernández, J. Fuentes, Influence of intramolecular hydrogen-bonding on the conformational properties of sugar thioureas, *Tetrahedron: Asymmetry*, 5 (1994) 2325-2334.
- [36] K.A. Haushalter, J. Lau, J.D. Roberts, An NMR investigation of the effect of hydrogen bonding on the rates of rotation about the C-N bonds in urea and thiourea, *J. Am. Chem. Soc.*, 118 (1996) 8891-8896.
- [37] A. Bondi, Van der waals volumes and radii, *J Phys. Chem.*, 68 (1964) 441-451.
- [38] J.T. Rotruck, A.L. Pope, H.E. Ganther, A.B. Swanson, D.G. Hafeman, W.G. Hoekstra, Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase, *Science*, 179 (1973) 588-590.
- [39] M. Muttenthaler, P.F. Alewood, Selenopeptide chemistry, *J. Pept. Sci.*, 14 (2008) 1223-1239.
- [40] G. Chennakrishnareddy, G. Nagendra, H.P. Hemantha, U. Das, T.N. Guru Row, V.V. Sureshbabu, Isoselenocyanates derived from Boc/Z-amino acids: Synthesis, isolation, characterization, and application to the efficient synthesis of unsymmetrical selenoureas and selenouroidopeptidomimetics, *Tetrahedron*, 66 (2010) 6718-6724.
- [41] Y.-R. Nelli, C. Douat-Casassus, P. Claudon, B. Kauffmann, C. Didierjean, G. Guichard, An activated building block for the introduction of the histidine side chain in aliphatic oligourea foldamers, *Tetrahedron*, 68 (2012) 4492-4500.
- [42] C. Douat-Casassus, K. Pulka, P. Claudon, G. Guichard, Microwave-enhanced solid-phase synthesis of *N,N'*-linked aliphatic oligoureas and related hybrids, *Org. Lett.*, 14 (2012) 3130-3133.
- [43] H. Rink, Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin, *Tetrahedron Lett.*, 28 (1987) 3787-3790.
- [44] S. Mukherjee, H. Verma, J. Chatterjee, Efficient site-specific incorporation of thioamides into peptides on a solid support, *Org. Lett.*, 17 (2015) 3150-3153.
- [45] T. Høeg-Jensen, M. Havsteen Jakobsen, C.E. Olsen, A. Holm, Formation of peptide thioamides by use of Fmoc amino monothioacids and Pybop, *Tetrahedron Lett.*, 32 (1991) 7617-7620.
- [46] G. Guichard, V. Semetey, M. Rodriguez, J.P. Briand, Solid phase synthesis of oligoureas using *O*-succinimidyl-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)ethylcarbamate derivatives as activated monomers, *Tetrahedron Lett.*, 41 (2000) 1553-1557.
- [47] S. Mondal, E. Fan, Mild and efficient synthesis of Fmoc-protected amino azides from Fmoc-protected amino alcohols, *Synlett*, 2006 (2006) 306-308.
- [48] R.G.S. Berlinck, A.E. Trindade-Silva, M.F.C. Santos, The chemistry and biology of organic guanidine derivatives, *Nat. Prod. Rep.*, 29 (2012) 1382-1406.
- [49] R.G.S. Berlinck, A.C.B. Burtoloso, M.H. Kossuga, The chemistry and biology of organic guanidine derivatives, *Nat. Prod. Rep.*, 25 (2008) 919-954.
- [50] R.G.S. Berlinck, Natural guanidine derivatives, *Nat. Prod. Rep.*, 16 (1999) 339-365.
- [51] R.G.S. Berlinck, M.H. Kossuga, Natural guanidine derivatives, *Nat. Prod. Rep.*, 22 (2005) 516-550.
- [52] E. Ruoslahti, M.D. Pierschbacher, New perspectives in cell-adhesion - RGD and integrins, *Science*, 238 (1987) 491-497.
- [53] E. Ruoslahti, RGD and other recognition sequences for integrins, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 12 (1996) 697-715.
- [54] J.-P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S.L. Goodman, M.A. Arnaout, Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand, *Science*, 296 (2002) 151-155.
- [55] J. Smith, K. Ariga, E.V. Anslyn, Enhanced imidazole-catalyzed RNA cleavage induced by a bis-alkylguanidinium receptor, *J. Am. Chem. Soc.*, 115 (1993) 362-364.
- [56] D.M. Perreault, L.A. Cabell, E.V. Anslyn, Using guanidinium groups for the recognition of RNA and as catalysts for the hydrolysis of RNA, *Biorg. Med. Chem.*, 5 (1997) 1209-1220.
- [57] J.S. Albert, M.W. Pecuh, A.D. Hamilton, Design, synthesis and evaluation of synthetic receptors for the recognition of aspartate pairs in an α -helical conformation, *Biorg. Med. Chem.*, 5 (1997) 1455-1467.

- [58] A. Metzger, V.M. Lynch, E.V. Anslyn, A synthetic receptor selective for citrate, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 36 (1997) 862-865.
- [59] M. Segura, V. Alcázar, P. Prados, J. de Mendoza, Synthetic receptors for uronic acid salts based on bicyclic guanidinium and deoxycholic acid subunits, *Tetrahedron*, 53 (1997) 13119-13128.
- [60] M.D. Best, S.L. Tobey, E.V. Anslyn, Abiotic guanidinium containing receptors for anionic species, *Coord. Chem. Rev.*, 240 (2003) 3-15.
- [61] Y. Feng, K. Burgess, D. Pledger, N. Cairns, D.S. Linthicum, A labeled guanidine ligand for studying sweet taste, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8 (1998) 881-884.
- [62] A. Tanatani, H. Kagechika, I. Azumaya, R. Fukutomi, Y. Ito, K. Yamaguchi, K. Shudo, Helical aromatic urea and guanidine, *Tetrahedron Lett.*, 38 (1997) 4425-4428.
- [63] M. Green, P.M. Loewenstein, Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein, *Cell*, 55 (1988) 1179-1188.
- [64] A.D. Frankel, C.O. Pabo, Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency virus, *Cell*, 55 (1988) 1189-1193.
- [65] P.A. Wender, W.C. Galliher, E.A. Goun, L.R. Jones, T.H. Pillow, The design of guanidinium-rich transporters and their internalization mechanisms, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 60 (2008) 452-472.
- [66] J.B. Rothbard, S. Garlington, Q. Lin, T. Kirschberg, E. Kreider, P.L. McGrane, P.A. Wender, P.A. Khavari, Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin a facilitates topical delivery and inhibition of inflammation, *Nat. Med.*, 6 (2000) 1253-1257.
- [67] T.B. Potocky, A.K. Menon, S.H. Gellman, Effects of conformational stability and geometry of guanidinium display on cell entry by β -peptides, *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (2005) 3686-3687.
- [68] P.A. Wender, D.J. Mitchell, K. Pattabiraman, E.T. Pelkey, L. Steinman, J.B. Rothbard, The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97 (2000) 13003-13008.
- [69] S. Tahir, A. Badshah, R.A. Hussain, Guanidines from 'toxic substances' to compounds with multiple biological applications – detailed outlook on synthetic procedures employed for the synthesis of guanidines, *Bioorg. Chem.*, 59 (2015) 39-79.
- [70] P.-J. Vig Hjarnaa, E. Jonsson, S. Latini, S. Dhar, R. Larsson, E. Bramm, T. Skov, L. Binderup, Chs 828, a novel pyridyl cyanoguanidine with potent antitumor activity *in vitro* and *in vivo*, *Cancer research*, 59 (1999) 5751-5757.
- [71] Y. Kim, S. Binauld, M.H. Stenzel, Zwitterionic guanidine-based oligomers mimicking cell-penetrating peptides as a nontoxic alternative to cationic polymers to enhance the cellular uptake of micelles, *Biomacromolecules*, 13 (2012) 3418-3426.
- [72] C. Sinz, J. Chang, A.R. Lins, E. Brady, M. Candelore, Q. Dallas-Yang, V. Ding, G. Jiang, Z. Lin, S. Mock *et al.* Discovery of cyclic guanidines as potent, orally active, human glucagon receptor antagonists, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21 (2011) 7131-7136.
- [73] G.H. Jana, S. Jain, S.K. Arora, N. Sinha, Synthesis of some diguanidino 1-methyl-2,5-diaryl-1H-pyrroles as antifungal agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15 (2005) 3592-3595.
- [74] S.E. Blondelle, E. Crooks, J.M. Ostresh, R.A. Houghten, Mixture-based heterocyclic combinatorial positional scanning libraries: Discovery of bicyclic guanidines having potent antifungal activities against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43 (1999) 106-114.
- [75] K. Andreev, C. Bianchi, J.S. Laursen, L. Citterio, L. Hein-Kristensen, L. Gram, I. Kuzmenko, C.A. Olsen, D. Gidalevitz, Guanidino groups greatly enhance the action of antimicrobial peptidomimetics against bacterial cytoplasmic membranes, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1838 (2014) 2492-2502.
- [76] J.C. Manimala, E.V. Anslyn, Solid-phase synthesis of guanidinium derivatives from thiourea and isothioureia functionalities, *Eur. J. Org. Chem.*, 2002 (2002) 3909-3922.
- [77] S.E. Schneider, P.A. Bishop, M.A. Salazar, O.A. Bishop, E.V. Anslyn, Solid phase synthesis of oligomeric guanidiniums, *Tetrahedron*, 54 (1998) 15063-15086.
- [78] K. Burgess, J. Chen, *Solid-phase syntheses of guanidines*, John Wiley & Sons Inc, New York, 2000.
- [79] C. Alonso-Moreno, A. Antinolo, F. Carrillo-Hermosilla, A. Otero, Guanidines: From classical approaches to efficient catalytic syntheses, *Chem. Soc. Rev.*, 43 (2014) 3406-3425.
- [80] A.R. Katritzky, B.V. Rogovoy, Recent developments in guanidylating agents, *Arkivoc*, (2005) 49-87.
- [81] M. Kudo, A. Tanatani, Conformational properties of aromatic multi-layered and helical oligoureas and oligoguanidines, *New J. Chem.*, 39 (2015) 3190-3196.
- [82] A. Tanatani, K. Yamaguchi, I. Azumaya, R. Fukutomi, K. Shudo, H. Kagechika, *N*-methylated diphenylguanidines: Conformations, propeller-type molecular chirality, and construction of water-soluble oligomers with multilayered aromatic structures, *J. Am. Chem. Soc.*, 120 (1998) 6433-6442.
- [83] Z. Zhang, E. Fan, Solid-phase and solution-phase syntheses of oligomeric guanidines bearing peptide side chains, *J. Org. Chem.*, 70 (2005) 8801-8810.

- [84] K. Ramadas, N. Srinivasan, An expedient synthesis of substituted guanidines, *Tetrahedron Lett.*, 36 (1995) 2841-2844.
- [85] E.J. Iwanowicz, S.H. Watterson, C. Liu, H.H. Gu, T. Mitt, K. Leftheris, J.C. Barrish, C.A. Fleener, K. Rouleau, N.Z. Sherbina, D.L. Hollenbaugh, Novel guanidine-based inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12 (2002) 2931-2934.
- [86] V.P. Taori, H. Lu, T.M. Reineke, Structure–activity examination of poly(glycoamidoguanidine)s: Glycopolycations containing guanidine units for nucleic acid delivery, *Biomacromolecules*, 12 (2011) 2055-2063.

CHAPITRE 3

Relation structure-activité sur le
modèle de *Bacillus anthracis*

Après avoir développé dans le chapitre précédent de nouveaux outils synthétiques nécessaires à la création de motifs isostères du lien urée (de type thiourée et guanidine) et étudié les conséquences sur la structuration en hélice-2,5 de l'insertion de telles modifications, ce troisième chapitre est axé sur le principal objectif de cette thèse à savoir l'étude de la relation structure-activité de nos foldamères sur la bactérie *Bacillus anthracis*. Evoquée précédemment dans le chapitre 1, la conception de structures amphipathiques d'oligourée a conduit à de bonnes activités antimicrobiennes sur des bactéries de type Gram-positif et Gram-négatif (*E. coli*, *P. aeruginosa* ainsi qu'une souche résistante à la méticilline *S. aureus* (MRSA)) avec de surcroît une sélectivité pour les cellules bactériennes face aux cellules eucaryotes [1,2]. Parmi les oligourées testées, le composé **I.68** et son analogue **I.71**, dont les structurations en hélice-2,5 amphipathique ont été confirmées par dichroïsme circulaire et des études RMN de dynamique dans l'eau, possèdent les activités les plus intéressantes. Pour plus de simplicité dans ce chapitre, ils seront renommés **OL21** et **OL22**.

En collaboration avec l'équipe du Dr. Goossens du laboratoire Pathogénies des Toxi-infections bactériennes à l'Institut Pasteur, **OL22** a été testé sur une bactérie Gram-positif, *Bacillus anthracis*, considérée à l'heure actuelle comme une arme biologique potentielle et dont les caractéristiques structurales et physiologiques seront présentées en introduction de ce troisième chapitre. De faibles valeurs de CMI et CMB (données d'autant plus importantes lorsqu'on s'intéresse à ce type de pathogène mortel) ont été obtenues. Ces résultats ont donc constitué le point de départ de la conception d'une nouvelle génération d'oligourées à visée antimicrobienne contre *B. anthracis* dérivants de la séquence de **OL22**. Chaque nouvelle oligourée synthétisée a été conçue dans le but de modifier l'un des paramètres démontrés indispensables à l'interaction entre les mimes synthétiques des peptides naturels antimicrobiens et les bactéries (c'est à dire la structure secondaire, ou, l'une des faces hydrophobes ou cationiques de la structure amphipathique). Ces composés ont ensuite été testés pour leur activité *in vitro* contre *B. anthracis*. Des études *in vivo* de PK/PD des composés les plus intéressants et l'étude de la biodistribution du composé **OL22** ont été par la suite réalisées. Au regard du nombre limité d'évaluations *in vivo* de mimes synthétiques de peptides antimicrobiens naturels publiées, celles réalisées avec nos oligourées sur le modèle d'infection par *B. anthracis* montrent le fort potentiel thérapeutique de ce type d'architecture repliée non naturelle.

1. L'infection par *Bacillus anthracis*

a) La bactérie

Mis en évidence pour la première fois par C. Davaine en 1863, *Bacillus anthracis* est l'agent étiologique de la maladie du charbon, dénommée aussi « anthrax » (terme anglo-saxon). A la fin du 19^e siècle, l'étude de *B. anthracis* par R. Koch et L. Pasteur a permis le fondement des concepts actuels de la microbiologie médicale [3-6]. Maladie infectieuse aiguë, la maladie du charbon est connue depuis l'antiquité et doit son nom au sang noir, poisseux et incoagulable des animaux morts contaminés. *Bacillus anthracis* est un bacille en forme de bâtonnet de type Gram-positif, capsulé, non mobile, aéro-anaérobie et sporulant. Il possède un cycle de vie bien particulier en existant sous plusieurs formes : la forme végétative, dans l'organisme de l'hôte, et la forme sporulée, dans le sol ou les déchets d'animaux infectés (os, peau, laine...) (revues sur *B. anthracis* [7-11], Figure III.1).

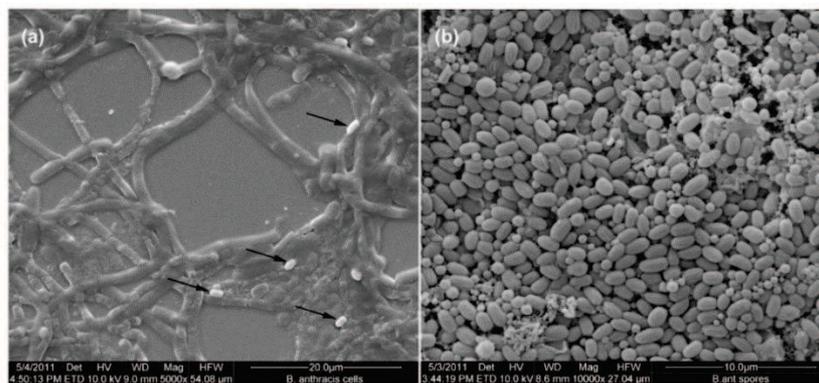


Figure III.1 : Images par microscopie électronique à balayage de a) *B. anthracis* sous sa forme végétative (image agrandie à 5 000x), les flèches indiquent les quelques spores présentes dans le milieu de culture et en b) des spores de *B. anthracis* (image magnifiée par 10 000x) [12].

Les spores [13,14], phases dormantes de *B. anthracis*, possèdent une résistance élevée à des conditions environnementales défavorables tels que la chaleur, les rayonnements ionisants ultra-violets, la pression, et les agents chimiques. Ils peuvent survivre pendant de longues périodes dans les sols souillés, qui sont le principal réservoir de cette bactérie.

En infectant un mammifère, les spores se retrouvent dans un environnement approprié (à 37°C et riche en nutriments), le processus de germination peut alors débuter. Ce processus, durant lequel la bactérie prend sa forme végétative, est extrêmement rapide (de quelques minutes) mais son déclenchement, environnement-dépendant, peut s'étendre jusqu'à 60 jours. Une fois à l'état végétatif, les bacilles se multiplient et l'infection finit par provoquer la mort de l'organisme hôte. Les bacilles, rejetés par la mort du mammifère, vont sporuler en contact de l'oxygène de l'air. Les bacilles sporulants portent en leur cœur des

spores, qui après maturation vont être libérées après autolyse des cellules mères. La sporulation exige la présence d'oxygène libre et l'efficacité du processus est influencée par les conditions environnementales [7] (Figure III.2).

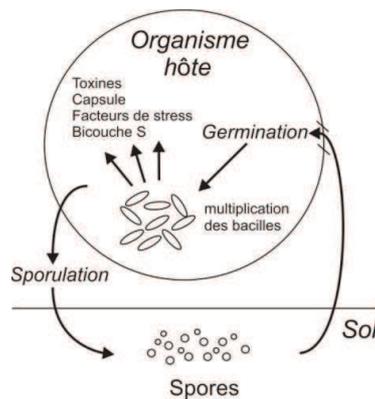


Figure III.2 : Cycle de vie de *Bacillus anthracis* [7].

b) L'infection

La maladie du charbon est principalement une maladie des herbivores, mais tous les mammifères, y compris les humains sont susceptibles d'être infectés. La maladie débute toujours par l'entrée des spores dans le corps de l'organisme hôte. Celle-ci peut se produire par l'intermédiaire d'une abrasion mineure ou d'une piqûre d'insectes, par la consommation de viande contaminée et enfin par l'inhalation de spores. Il y a alors trois types de voie d'infections : cutanée, gastro-intestinale, et pulmonaire. La forme cutanée est la plus fréquente (dans 85 % des cas) mais aussi la moins grave (moins de 1 % de mortalité avec une antibiothérapie adaptée) [10,15]. Elle se traduit par l'apparition d'un petit bouton qui se développe en quelques jours en une escarre noir indolore caractéristique de l'anthrax. Celui-ci peut être accompagné d'œdèmes dans la zone de l'infection [10,15]. Les formes gastro-intestinales [10,16] et pulmonaires [10,17] de la maladie, plus sévères et plus rares, se caractérisent par des symptômes plus communs donc moins repérables : gastroentérite, légère fièvre, symptômes grippaux. La maladie peut alors se développer abruptement en forme systémique rapidement mortelle, avec des symptômes comme un choc septique et un échec respiratoire.

La dynamique de la toxi-infection reste encore mal connue. Néanmoins, il semblerait que *B. anthracis* migre systématiquement du site d'infection vers les ganglions lymphatiques. Il y a ensuite dissémination lymphatique vers la rate, le foie et les poumons, avec une septicémie terminale [18]. Une discordance reste sur le site de germination de la bactérie [19]. Longtemps, il était établi que les spores étaient ingérées par les macrophages

résidents et les cellules dendritiques, qui les transportaient des sites périphériques aux ganglions lymphatiques. Les spores germaient en intracellulaire. Une fois les bactéries devenues végétatives, elles se multipliaient, provoquaient la lyse du macrophage et se retrouvaient alors libérées dans le système lymphatique. Le macrophage avait notamment été dénommé comme le cheval de Troie de *B. anthracis* par Guidi-Rontani *et al.* [20,21]. Cependant plus récemment, des travaux de Glomski *et al.* (équipe du Dr. Goossens) ont démontré que la germination pouvait avoir lieu en réalité sur le site même de l'infection, surmontant l'immunité innée par un mécanisme dit « d'évasion » [18,22,23] (Figure III.3).

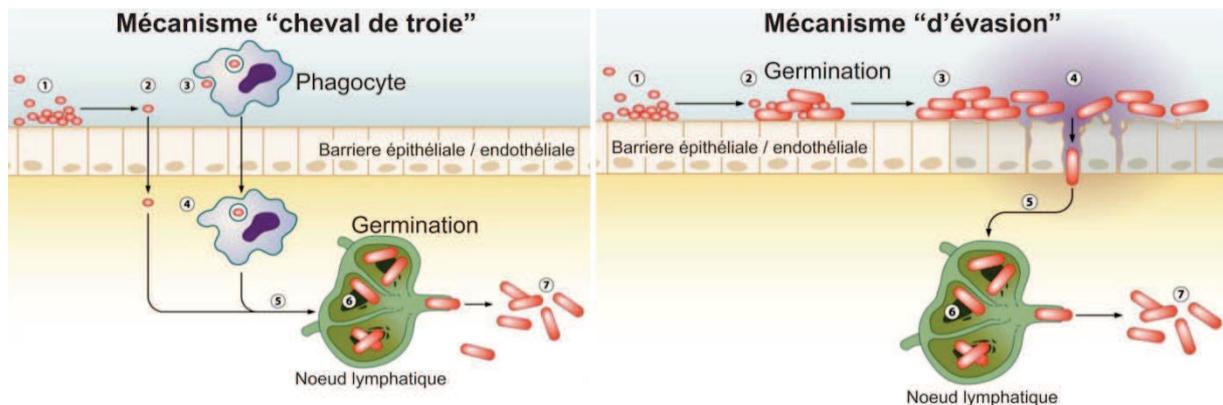


Figure III.3 : Cycle de vie de *Bacillus anthracis* [7].

B. anthracis produit un certain nombre de facteurs de virulence, critiques pour l'établissement de l'infection et de la pathogénèse. Parmi les principaux facteurs, la capsule, formée d'un polymère d'acide γ -(D)-glutamique, permet à la bactérie d'échapper à la phagocytose. Elle est ainsi responsable de la septicémie de l'infection. Sa synthèse est régulée par l'opéron *cap* comportant les gènes *capB*, *capC*, *capA*, *capD* et *capE* présents sur le plasmide pXO2 [24,25].

La bactérie sécrète également deux toxines, codées par des gènes présents sur le plasmide pXO1: la toxine oedématogène et la toxine létale, toutes deux responsables de la toxémie (intoxication du sang) de la toxi-infection. Ces deux exotoxines sont en réalité composées de trois protéines: l'antigène protecteur (PA), qui joue le rôle de facteur d'adhésion cellulaire, le facteur létal (LF) et le facteur oedémateux (EF). La toxine oedématogène est constituée du complexe PA-EF et la toxine létale du complexe PA-LF [8,26,27]. PA est une protéine multifonctionnelle qui permet l'assemblage des complexes et la délivrance des deux enzymes LF et EF dans le cytosol de la cellule.

L'enzyme LF est une métalloprotéase à Zinc capable de cliver un groupe de protéines très important, impliqué dans le système complexe de communication à l'intérieur de la cellule : les kinases de kinases activées par les agents mitogènes (MAPKKs) [28]. Ce système

de communication joue en particulier un rôle important dans l'activation des cellules du système immunitaire, comme les macrophages, et dans l'expression des cytokines et chimiokines. Ainsi, il a été démontré que la protéine LF active le mécanisme du stress oxydatif et module l'expression de cytokines impliquées dans l'inflammation systémique telles que la cytokine facteur de nécrose tumorale α (TNF α) et la cytokine Interleukine 1 β (IL-1 β) [29-32].

L'enzyme EF est une adénylate cyclase, activée par Ca²⁺ ainsi que par la calmoduline cytoplasmique de la cellule hôte. Elle transforme l'adénosine triphosphate (ATP), réserve d'énergie principale de la cellule, en adénosine monophosphate cyclique (AMPc) [33,34]. Un niveau cellulaire élevé d'AMP cyclique modifie l'équilibre hydroélectrolytique de la cellule et serait donc responsable des œdèmes rencontrés dans le cas de l'infection cutanée. De surcroît, l'accumulation d'AMPc provoque des dérèglements cellulaires, à travers une série de mécanismes qui restent encore peu connus. On sait toutefois que, dans les macrophages, l'AMPc inhibe la production de plusieurs facteurs inflammatoires dont les cytokines, ce qui suggère une route par laquelle les deux toxines collaborent pour déstabiliser les défenses immunitaires de l'hôte et promouvoir la mort des macrophages [29,30,32].

Pour s'attaquer aux cellules de l'hôte infecté, le bacille procède par un remarquable mécanisme propre à *B. anthracis*, en sécrétant ses toxines (Figure III.4a). PA se fixe sur un récepteur cellulaire ubiquitaire (soit ANTXR1 ou ANTXR2) [35]. PA est ensuite clivé par l'action de protéases cellulaires de type furine et libère son fragment N-terminal PA₂₀. Le fragment actif PA₆₃ s'oligomérisse en heptamère (Figure III.4b) [36], qui charge jusqu'à trois facteurs EF ou LF pour les acheminer dans le cytosol, par endocytose. La baisse du pH à l'intérieur de la vacuole d'endocytose, déclenche un changement conformationnel de l'heptamère, qui devient un pore permettant la translocation des entités enzymatiques à travers la membrane endosomale. Une fois dans le cytosol de la cellule, les facteurs peuvent exercer leurs activités toxiques.

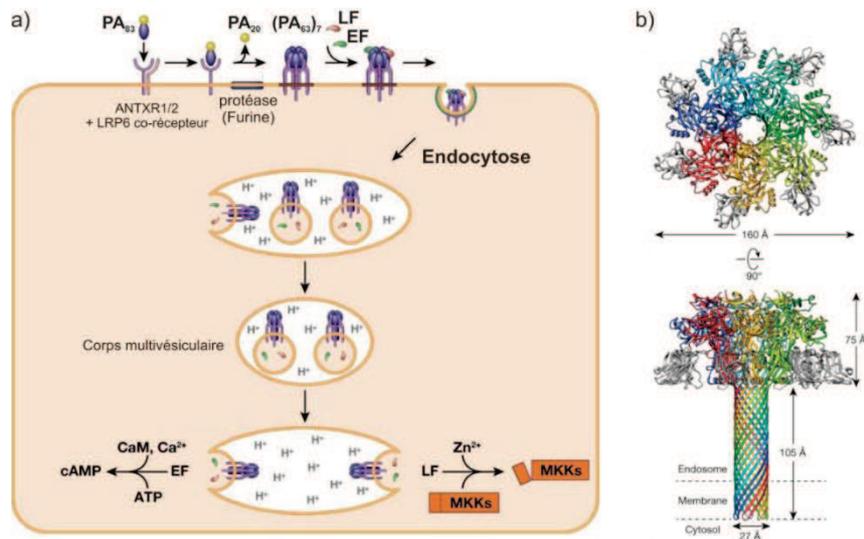


Figure III. 4 : a) Modèle du mode d'entrée dans la cellule des deux toxines de l'anthrax [37] ; b) Vue de haut et de face de la résolution atomique à 2,9 Å de l'heptamère formé par PA obtenu par cryo-microscopie électronique par Zhou *et al.* [36].

Enfin, les deux plasmides pXO2 et pXO1 portant les gènes codant pour la capsule et les toxines respectivement, sont nécessaires à la pleine virulence de *B. anthracis*. La perte de l'un ou l'autre résulte en une souche atténuée. La souche atténuée appelée « Sterne » ne porte pas le plasmide pXO2, elle peut synthétiser les composants des exotoxines, mais n'a pas de capsule. Cette souche atténuée a été découverte par Max Sterne en 1937 et est utilisée en vaccination.

c) Les préventions et traitements actuels

La prévention de la maladie du charbon passe tout d'abord par les vaccins [38]. Historiquement, c'est la première maladie pour laquelle le principe d'une vaccination bactérienne s'est avéré efficace. En 1881, Louis Pasteur fut le premier à concevoir un vaccin utilisant des bactéries vivantes préalablement atténuées par un traitement par la chaleur. Par la suite, un vaccin, obtenu à partir de la souche Sterne a été employé avec succès durant de nombreuses années sur les animaux. Bien qu'efficace, il reste cependant toxigénique puisque seule la formation de la capsule a été enlevée [7,39,40]. Par la suite, des vaccins acellulaires désignés « AVA » et « AVP » pour l'homme ont été étudiés dans les années 1960 par les américains et les britanniques. Ils reposent sur l'utilisation d'un surnageant de souches dérivés Sterne contenant principalement la protéine Antigène Protecteur (PA). Cependant, ce vaccin pose des problèmes d'efficacité et doit être administré plusieurs fois car les niveaux d'anticorps à PA doivent excéder un certain seuil pour inciter et maintenir l'immunité. De plus, son utilisation est extrêmement controversée : il est en effet associé à

de nombreuses plaintes d'effets secondaires et soupçonné d'être l'une des causes du syndrome de la Guerre du Golfe chez les soldats américains vaccinés [41].

Diverses approches sont depuis employées pour développer une nouvelle génération de vaccins contre la maladie du charbon. On retrouve ainsi des formulations alternatives utilisant des recombinaisons génétiques, des souches atténuées, des adjuvants, ou encore l'incorporation de la capsule [38]. En rajoutant des spores inactivées à l'antigène protecteur PA, l'équipe de l'Institut Pasteur a obtenu une composition vaccinale efficace en cours d'évaluation en phase clinique I [42].

A l'heure actuelle, le seul traitement post-infection de l'anthrax repose sur l'emploi précoce d'antibiotiques tels que l'ampicilline (de la famille des pénicillines), la doxycycline (les cyclines), et la ciprofloxacine (les fluoroquinolones) [43] (Figure III.5). L'ampicilline inhibe la synthèse de la paroi pendant la division cellulaire des bactéries; les cellules n'étant pas complètement formées en fin de division, s'autodétruisent. La doxycycline interagit avec les sous-unités ribosomiques 30S et 50S et inhibent la synthèse protéique [44]. Pour sa part, la ciprofloxacine inhibe l'activité enzymatique des topoisomérases de type II, enzymes capables de contrôler la structure de l'ADN en générant des coupures transitoires dans celui-ci et essentiels à la réplication de l'ADN de la bactérie [45,46]. *B. anthracis* est sensible aux antibiotiques à l'unique condition d'une administration rapide après l'infection, car le traitement doit débiter avant l'apparition des premiers symptômes et la sécrétion des toxines dans le corps. La maladie est régie selon un principe de « non-retour », à partir duquel aucune dose ou molécule n'est active. Dans le cas d'infection respiratoire ou digestive, ce point est atteint 24 heures après apparition des symptômes. De plus, les antibiotiques ne sont pas actifs sur les spores, il faut alors avoir recours à une période de traitement prolongée afin d'éviter toute germination tardive.

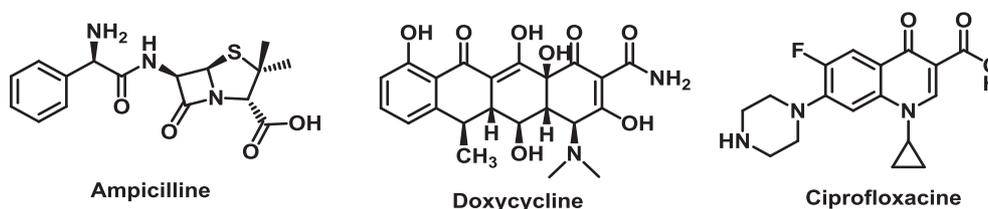


Figure III.5 : Structure chimique des antibiotiques actuels administrés en cas d'anthrax.

B. anthracis est actuellement considéré comme un agent majeur du risque NRBC (nucléaire, radiologique, biologique, chimique), à cause de sa forte létalité lors d'une diffusion par voie aérienne, de sa grande résistance dans l'environnement sous forme de spores et de sa possible utilisation détournée à des fins terroristes [47]. De plus, l'émergence

de résistances naturelles et l'ingénierie de souches résistantes soulignent le besoin de développer des traitements moins susceptibles d'induire des résistances [48,49] .

A ce jour, de nombreuses pistes sont envisagées pour le développement de nouveaux traitements sans antibiothérapie contre *B. anthracis* et notamment dans le cas de l'infection pulmonaire majoritairement mortelle [50]. De manière non exhaustive, certaines stratégies sont décrites ci-après.

La plus grande attention a ainsi été portée au blocage de l'antigène protecteur. Tout d'abord, Migone *et al.* ont par exemple utilisé des anticorps qui bloquent l'interaction de PA avec les récepteurs cellulaires [51]. Une autre approche, mise au point par le groupe de Fischetti, consiste en l'utilisation d'enzymes lytiques produites par les bactériophages de bactéries, appelées « Lysins » [52-54]. Ces enzymes causent la lyse de la paroi cellulaire bactérienne, permettent la libération des bactériophages et possèdent le grand avantage par rapport aux antibiotiques « traditionnels » de n'affecter que les souches bactériennes visées.

L'inhibition de l'activité enzymatique de LF fait également partie des stratégies envisagées. Des résultats convaincants (confirmés par des données *in vivo*) ont été obtenus par des polyphénols (de type catéchine) extraits du thé vert [55] et de petites molécules cycliques dérivés de la rhodanine (associées à un traitement antibiotique par cyprofloxacine) [56,57]. L'inhibition de LF a aussi été observée par les peptides naturels antimicrobiens de type défensines, qui sont divisés en deux sous familles les α - et β -défensines [58] (*cf.* Figure 1.1).

Chez l'humain, ils existent six différentes α -défensines : (i) les peptides neutrophiles de l'humain HNPs-1,2,3,4, stockés dans des granules cytoplasmiques des polynucléaires neutrophiles et les (ii) défensines humaines HD-5,6 sécrétées par les cellules de Paneth de l'intestin grêle. Les deux β -défensines sont, pour leur part, sécrétées par de nombreuses cellules épithéliales dans le milieu extracellulaire immédiatement après leur synthèse. Ces peptides sont considérés comme la première ligne de défense contre les intrusions microbiennes et virales et jouent un rôle critique dans la défense des muqueuses des régions respiratoires, gastro-intestinales, et génito-urinaires. Des travaux de Kim *et al.* ont montré que les HNP-1 et 2 sont des inhibiteurs non-compétitifs efficaces de l'activité de métalloprotéase de LF. Il a été également mis en évidence que ces α -défensines protègent *in vitro* les macrophages murins des effets de la toxine létale et fournissent une protection *in vivo* [58]. Par la suite, Wang *et al.* ont étudié une sous-famille de défensines, les

octadécapeptides cycliques, dénommées θ -défensines, et les rétrocyclines qui sont des analogues humanisés des θ -défensines exprimés par les leucocytes de plusieurs primates. Cette nouvelle classe de peptides antimicrobiens possèdent de meilleures activités anthracidales que les HNPs, et ceci, toujours en inhibant l'activité enzymatique du facteur létal [59,60]. De faibles concentrations de θ -défensines 1, 2 et 3 et de rétrocycline-1 (concentration minimale efficace < 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) tuent les cellules végétatives mais aussi de manière remarquable les spores de *B. anthracis*. Une étude récente montre que ces rétrocyclines sont efficaces *in vivo*, notamment en stimulant l'activité des macrophages [60].

Enfin, dans la littérature, peu d'études relatent le développement de peptides antimicrobiens à l'activité membranolytique pour *B. anthracis*. Dawson *et al.* ont testé une série de 39 peptides antimicrobiens parmi lesquels les peptides Omiganan, Pexiganan (*cf.* chapitre 1) pour leurs activités antimicrobiennes sur *B. anthracis*. La majorité est inactive sur ce pathogène. De surcroît, pour les quelques peptides possédant une activité anthracidale, un fort pouvoir hémolytique leurs sont associés [61]. Ensuite des travaux de Lisanby *et al.* ont montré une activité anthracidale par les peptides antimicrobiens naturels cathélicidines [62]. Le groupe a étudié l'activité *in vitro* et *in vivo* de trois cathélicidines : humaine (LL-37), murine (CRAMP) et porcine (la Protégrine-1) lors de l'infection chez la souris par la souche non capsulée Sterne. *In vitro*, aucune des trois cathélicidines n'est active sur les spores dormantes. Seule la cathélicidine porcine permet de tuer les spores dès induction de la germination (bacilles naissants) et ce, avant leur croissance végétative. Par contre, la forme végétative est sensible à l'activité bactéricide des trois cathélicidines (concentration de l'ordre du micromolaire) et cette activité n'est pas inhibée par la présence de la capsule. *In vivo*, aucune protection n'est obtenue par les cathélicidines administrées par inhalation. Dans le cas de l'infection sous-cutanée, d'intéressants résultats ont été constatés. En effet, si la Protégrine-1 agit principalement par bactéricidie directe, l'efficacité *in vivo* de LL-37 et de CRAMP est indirecte. Ils semblent agir par stimulation du recrutement des neutrophiles, sans avoir d'activité anti-toxine comme il peut être le cas pour les défensines [58]. Toutefois de manière regrettable, cette étude ne permet pas de tirer des conclusions quant à leur utilisation potentielle en thérapeutique sur *B. anthracis* puisque les souches utilisées *in vivo* n'étaient pas capsulées. De plus, Thwaite *et al.* avait montré auparavant que *B. anthracis* produit des métalloprotéases capables de dégrader LL-37, ce qui participerait alors à la forte virulence de la bactérie [63].

Pour finir, parmi les mimes synthétiques de peptides antimicrobiens naturels, seul le groupe de Cai a publié des activités antimicrobiennes sur *B. anthracis* à partir de leur γ -AApeptides (cf. chapitre 1) [64]. La meilleure activité est obtenue avec le composé **I.38** qui possède une CMI *in vitro* de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2. Relation structure fonction : approche *In vitro*

Après avoir présenté le pathogène ciblé *B. anthracis* et les différentes possibilités de traitements lors de son infection, cette partie relate les résultats obtenus *in vitro* avec la nouvelle génération d'oligomères d'urées synthétisés au cours de ma thèse. Dans l'objectif à terme d'optimiser l'activité bactéricide et la sélectivité de la molécule de référence **OL22**, plusieurs séries d'oligourées comportant des modifications chimiques variées ont été synthétisées à partir des différents blocs éthylène diamine activés préparés, soit par stratégie de type Boc ou par stratégie azoture [65,66]. Ils ont été ensuite testés sur *B. anthracis* pour déterminer leur activité *in vitro*.

a) Les mesures d'activité bactéricide et de toxicité

Les mesures de l'activité anthracidale (réalisées à intervalle régulier au cours de la thèse en fonction de l'avancée des synthèses) ont été effectuées à l'Institut Pasteur par l'équipe du Dr. Goossens. Grâce à mon financement de thèse, j'ai eu l'opportunité d'être formée par l'équipe du Dr. Goossens et de réaliser, moi-même, la première série de mesures durant un séjour réalisé à l'institut en Octobre 2013. Les tests de bactéricidie peuvent être réalisés sur différentes formes de différenciation de *B. anthracis* : les spores non-germées, les spores après induction de germination, les bacilles capsulés et non capsulés. Les souches utilisées pour les expériences *in vitro* sont la 9602P (pXO1⁺ Δ pagA pXO2⁺) [67] et la 9602PR (pXO1⁺ Δ pagA pXO2) [68] dérivées de l'isolat naturel humain 9602 [69]. Dans ces deux souches, le gène du *pagA* porté par le plasmide pXO1⁺ et codant pour PA est absent. Les deux toxines fonctionnelles ne peuvent donc pas être produites.

Les spores après induction de germination sont produites par incubation dans un milieu de culture riche, bouillon cerveau-cœur (BHI) pendant 5 minutes à 37°C. La germination est vérifiée de manière semi-quantitative par microscopie de contraste de phase et rétrospectivement par le décompte des Unités Formant une Colonie (CFU) (> 85 %).

Pour obtenir des bacilles capsulés et non capsulés, les spores germées sont ensuite incubées 75 minutes à 37 °C dans un milieu de culture (appelé « milieu R ») respectivement avec ou sans NaHCO₃ (0,6 %) et avec ou sans CO₂ (5 %) [70]. La capsulation est vérifiée par

photomicroscopie, en utilisant la coloration à l'encre de Chine. Le test de bactéricidie consiste à incuber une concentration de bactéries donnée ($\sim 10^5$ CFU par mL final) avec des concentrations croissantes de l'agent bactéricide (de 0,3 à 20 $\mu\text{g/mL}$ final pour les oligourées) en tampon phosphaté salin (PBS) 0,15 M, pH 7,2, Ca^{2+} 10 mM, à 37 °C. Après différents temps d'incubation, le nombre de bactéries (spores et bacilles) viables peut être énuméré dans la suspension bactérienne par étalement de différentes dilutions sur boîte de pétri BHI. De plus, l'étalement des dilutions après chauffage à 65 °C pendant 30 min permet de quantifier le nombre de spores. Chaque série d'expérience été réalisée au minimum deux fois.

Le nombre de bacilles est calculé par soustraction à partir du nombre de spores et du nombre total de CFU. Le pourcentage de destruction bactérienne est alors calculé en comparant la diminution du nombre de bacilles après incubation avec l'agent bactéricide avec la valeur calculée pour le témoin négatif incubé dans les mêmes conditions sans le composé bactéricide.

$$\text{Pourcentage de destruction} = \frac{\text{Moyenne des bacilles}_{\text{témoins}} - \text{Moyenne des bacilles}_{\text{oligourée}}}{\text{Moyenne des bacilles}_{\text{témoins}}} \times 100.$$

Les composés ont aussi été testés pour leurs toxicités sur cellules eucaryotes. Cette quantification a été mesurée sur une lignée de macrophages de souris, appelé RAW 264.7 par l'utilisation du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (test de cytotoxicité MTT) [71]. Ce sel de tétrazolium est réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes, en formazan qui forme un précipité dans la mitochondrie de couleur violette. La quantité de précipité formé est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes (mais également à l'activité métabolique de chaque cellule). Les macrophages sont incubés avec du MTT et une certaine quantité d'oligourées pendant 4 heures à 37 °C dans un milieu de culture cellulaire. Le dosage spectroscopique de la densité optique à 550 nm permet de connaître la quantité relative de cellules vivantes et actives métaboliquement.

b) Activité anthracidale *in vitro* du composé « tête de série » OL22

Comme nous l'avons présenté précédemment, **OL22 (I.71)**, composé de liens urée et d'un résidu γ -valine en position « C-terminale », possède des chaînes latérales de type tryptophane et valine afin d'induire la face hydrophobe (deux tiers de la surface totale) et de chaînes latérales de type lysine afin de créer la face hydrophile (un tiers de la surface totale).

OL22 a été synthétisé en stratégie Boc. La synthèse réalisée sur une échelle de 0,1 mmole permet d'obtenir l'oligomère attendu avec un rendement isolé de 31 % (Figure III.7). La stratégie de type Boc étant à ce jour la stratégie la plus robuste et la plus reproductible pour la synthèse d'oligourées, **OL22** est devenu le composé de référence pour cette étude de relation structure-activité sur *B. anthracis*.

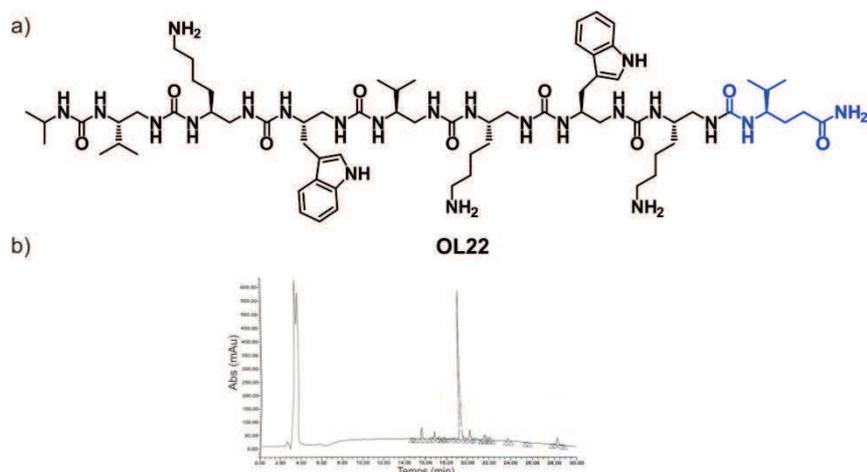


Figure III.7 : a) structure chimique de **OL22** ; b) Chromatogramme du brut de synthèse (UV 200 nm, 20-80 % CH₃CN (+ 0.1 % TFA) dans H₂O (+ 0.1 % TFA) en 30 min.

Dans un premier temps, **OL22** a été testé sur les différentes formes bactériennes de *B. anthracis* qui pourraient être produites *in vivo*, c'est-à-dire la spore, la spore en phase de germination et le bacille encapsulé. Aucune activité n'a été détectée sur la spore non-germée ($5,26 \pm 0,04$ contre $5,28 \pm 0,02$ de CFU pour les spores traitées et non-traitées respectivement). Mais une forte activité bactéricide a été détectée sur les spores dès que la germination a été déclenchée et sur les bacilles encapsulés (Figure III.8a, ronds pleins et vides). La forme non-encapsulée de *B. anthracis* a été également examinée afin d'évaluer le rôle de la capsule dans l'activité antimicrobienne de **OL22** (Figure III.8a, triangles vides).

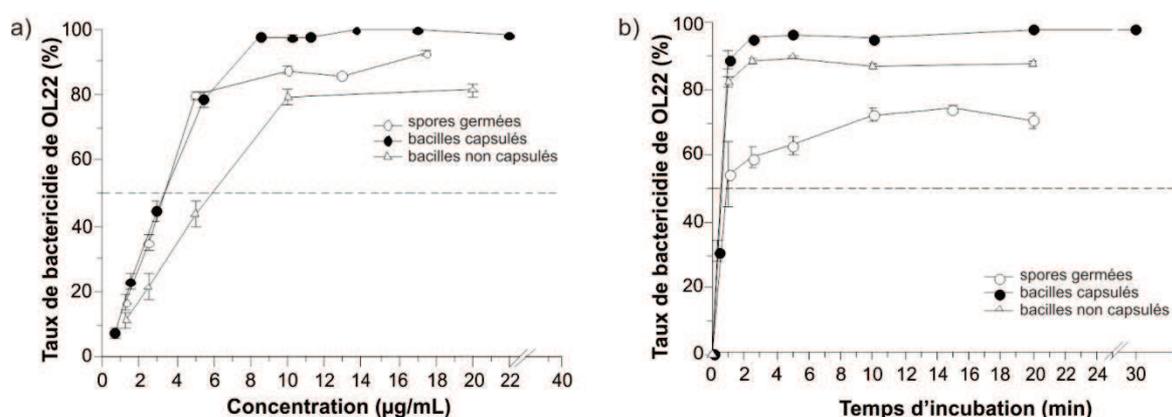


Figure III.8 : Taux de bactéricidie de **OL22** en a) en fonction de la concentration, en b) en fonction du temps d'incubation sur spores germées (ronds vides), bacilles capsulés (ronds noirs) et bacilles non capsulés (triangles).

Une EC₅₀ à 3,3 µg/mL est obtenue pour les spores après germination et pour les bacilles encapsulés. Les éléments extérieurs de la spore et la capsule d'acide poly-γ-(D)-glutamique entourant le bacille de *B. anthracis* n'interfèrent pas dans l'accès à la membrane bactérienne de **OL22**. De plus, on note une légère réduction de l'efficacité de **OL22** pour les bacilles non encapsulés (EC₅₀ de à 6 µg/mL), semblant ici suggérer que la capsule d'acide poly-γ-(D)-glutamique, négativement chargée, améliore l'interaction du bacille avec notre oligourée. Des résultats similaires avaient déjà été obtenus lors de l'étude de l'activité anthracidale des cathélicidines par Lisanby *et al.* [62].

La cinétique de l'activité antimicrobienne a été aussi évaluée et se révèle être extrêmement rapide (Figure III.8b). 95 % de bacilles encapsulés sont détruits en moins de 2 minutes. Le temps d'incubation nécessaire pour atteindre 50 % de l'effet bactéricide maximal au plateau (temps de demi-vie) a été estimé à 60 secondes pour les spores en germination et à 30-35 secondes pour les bacilles. Ces différents résultats *in vitro* très encourageants nous ont conduits à réaliser une étude *in vivo* avec **OL22**.

De plus, on peut mentionner que l'analogue **I.68 (OL21)**, de séquence identique à **OL22** mais composé exclusivement de liens urées détient une activité antimicrobienne similaire à celle de **OL22**. Difficilement obtenu par la stratégie Fmoc, **OL21** a pu être synthétisé grâce à la stratégie azoture sur une échelle de 0,1 mmole avec un rendement isolé de 12 % et une pureté du brut à hauteur de 31 % (*cf.* partie expérimentale).

Pour finir, tous les composés, après leurs synthèses, ont été purifiés par HPLC préparative utilisant de l'acide trifluoroacétique comme source d'acide (TFA, 0,1%). L'oligomère **OL22** est donc obtenu sous forme d'un sel de trifluoroacétate. Nous avons supposé que ce contre-ion pourrait peut-être avoir un impact sur l'activité et sur la toxicité. Un échange en ion chlorure a alors été réalisé par multiples lyophilisations en présence de HCl 0,1 M (Figure III.10a). L'oligomère obtenu ne montre pas de changements significatifs d'activité et de cytotoxicité (Figure III.10b, c).

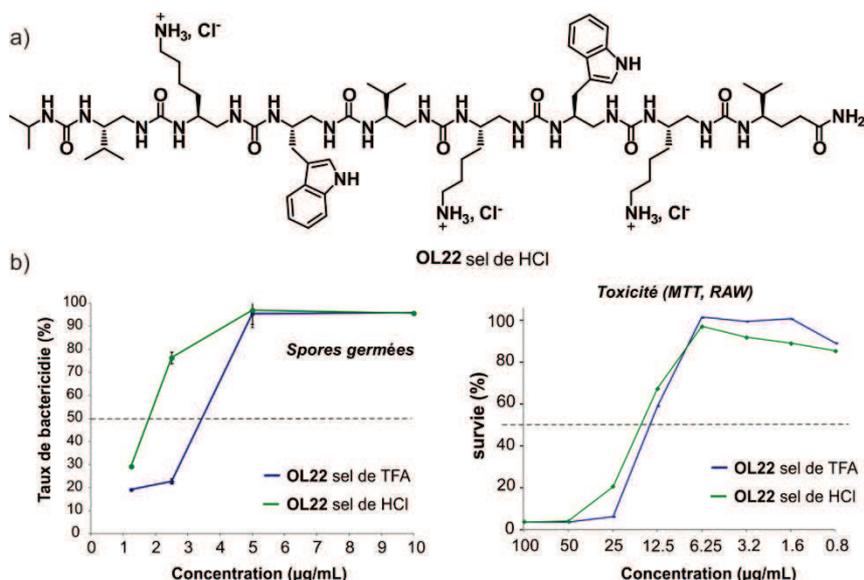


Figure III.10 : a) Structure chimique de **OL22** en sel de chlorhydrate ; b) Taux de bactéricidie sur spores germées et mesure de la toxicité sur macrophage de souris par test MTT (RAW) de **OL22** en sel de TFA et sel de HCl.

c) Modification de la chaîne latérale

De par leur prédictibilité structurale, les oligourées adoptent une conformation hélicoïdale en solution et présentent des chaînes latérales à leur surface, reproduisant la diversité des chaînes latérales des acides α -aminés protéinogéniques. Toutefois, à la différence des α -peptides pour lesquels des modifications réalisées sur la séquence primaire ont une incidence directe sur la structure secondaire de la molécule, les chaînes latérales présentes sur les oligourées sont davantage interchangeables, ce qui autorise des variations de la séquence primaire sans affecter pour autant le principe de structuration en hélice. Pour débiter cette étude de relation structure-activité, il a été alors proposé d'évaluer l'impact d'autres chaînes latérales et de cette manière, d'évaluer la variation du rapport hydrophobicité/hydrophilicité, facteur clé de l'interaction entre les AMPs et les pathogènes hôtes, sur l'activité de nos oligourées contre *B. anthracis*.

i) Evaluation de la face cationique de type imidazole

De nouveaux oligomères **OL23**, **OL24** et **OL25** équipés de manière séquentielle d'un résidu méthyle-imidazole en lieu et place d'une chaîne latérale 1-butylamine ont été préparés (Figure III. 11a). L'évaluation de cette nouvelle face cationique de type imidazole a, en effet, été proposée pour différentes raisons.

Tout d'abord, le résidu histidine est connu pour son rôle en catalyse [72,73] et pour sa liaison à des métaux (comme par exemple dans les motifs en doigt de Zinc constitués d'un site Cys₂His₂ lié à Zn(II)[74]). Le groupe de Degradó a notamment utilisé cette spécificité dans le but de stabiliser des faisceaux d' α -hélices grâce à la création de sites de liaison entre deux

histidines et d'un cofacteur heme, permettant de la même manière les premiers design *de novo* de métalloprotéines [75-77]. Enfin, il possède aussi un rôle d'éponge à proton utilisé lors de la préparation de séquences peptidiques dédiées à la transfection d'acides nucléiques [78]. Les résultats prometteurs obtenus avec les séquences oligourées antimicrobiennes ont notamment incité le groupe à utiliser ces mêmes brins hélicoïdaux pour la délivrance de macromolécules d'intérêt biologique et en particulier d'ADN plasmidiques [79]. De plus, il a en effet été récemment mise en évidence que des peptides antimicrobiens comportaient un certain nombre de similitudes avec les peptides pénétrant les cellules appelés CPPs, et pouvaient être utilisés pour délivrer des molécules cargos à l'intérieur des cellules [80,81]. Par exemple le peptide antimicrobien naturel hélicoïdal LL-37, de la famille des cathélicidines de l'humain, a ainsi été utilisé pour transférer de l'ADN plasmidique dans des cellules humaines [82]. Nous avons donc voulu vérifier si de telles modifications étaient compatibles avec nos séquences et avec l'activité bactéricide.

Ensuite, l'acide aminé histidine possède théoriquement un pKa d'environ 6,00 pour le noyau imidazole [78,83]. Des valeurs de pKa respectivement de 6,80 et de 6,93 en milieu aqueux et de 7,00 et 7,01 en milieu lipidique pour les résidus de type histidine présents sur une séquence voisine de celle de **OL22** ont été déterminées par RMN du proton lors de la conception de séquences oligourées pour la transfection [79] (Figure III.11).

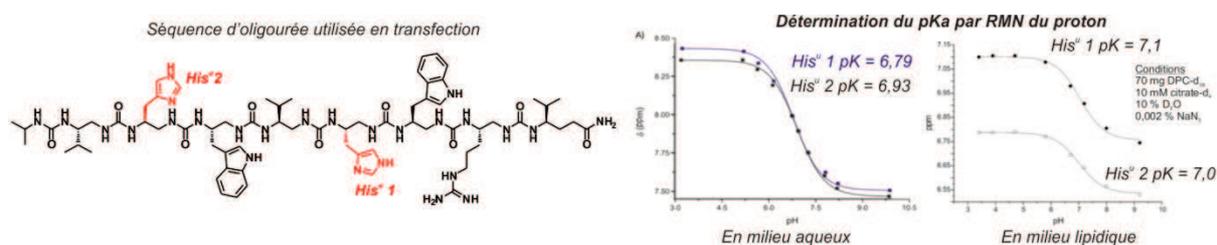


Figure III.11 : Séquence développée pour la transfection de gène et détermination des pKas des résidus méthyle-imidazole par RMN du proton [79].

On pourrait donc déduire que dans les conditions du test de bactéricidie, à un pH de 7,2, les résidus méthyle-imidazole ne seront pas chargés et que les nouveaux composés synthétisés **OL23-OL25** (Figure III.12a) posséderont alors une charge nette globale de +2, inférieure à celle de **OL22** qui possède une charge nette globale de +3. Comme évoqué dans le chapitre 1, la plupart des peptides antimicrobiens sont caractérisés par une charge nette positive s'étalant de +2 à +9. Cette propriété est très importante puisque la charge globale de l'oligomère permet l'attraction avec les têtes phosphates des phospholipides constituant la membrane bactérienne, première étape d'interaction avec le pathogène hôte. Il a été démontré qu'il existe une forte corrélation entre la charge cationique d'un peptide et son

pouvoir antimicrobien [84]. En suivant ce raisonnement, ces oligourées devraient donc posséder des activités antimicrobiennes moins importantes que **OL22**.

Afin de réaliser notre étude, le monomère éthylène diamine histidine **M9**, protégé par un groupement Boc et activé par un groupement carbamate de succinimide a été synthétisé avec succès avec un rendement global de 40 % selon la procédure récemment publiée par l'équipe [66] (synthèse détaillée dans la partie expérimentale). Les oligomères **OL23**, **OL24** et **OL25** ont été synthétisés sur support solide en stratégie Boc avec des rendements respectifs de 10 %, 14 % et 16 % après purification par HPLC semi-préparative. L'activité bactéricide de ces oligourées a ensuite été testée sur spores germées et bacilles capsulés (Figure III.12b).

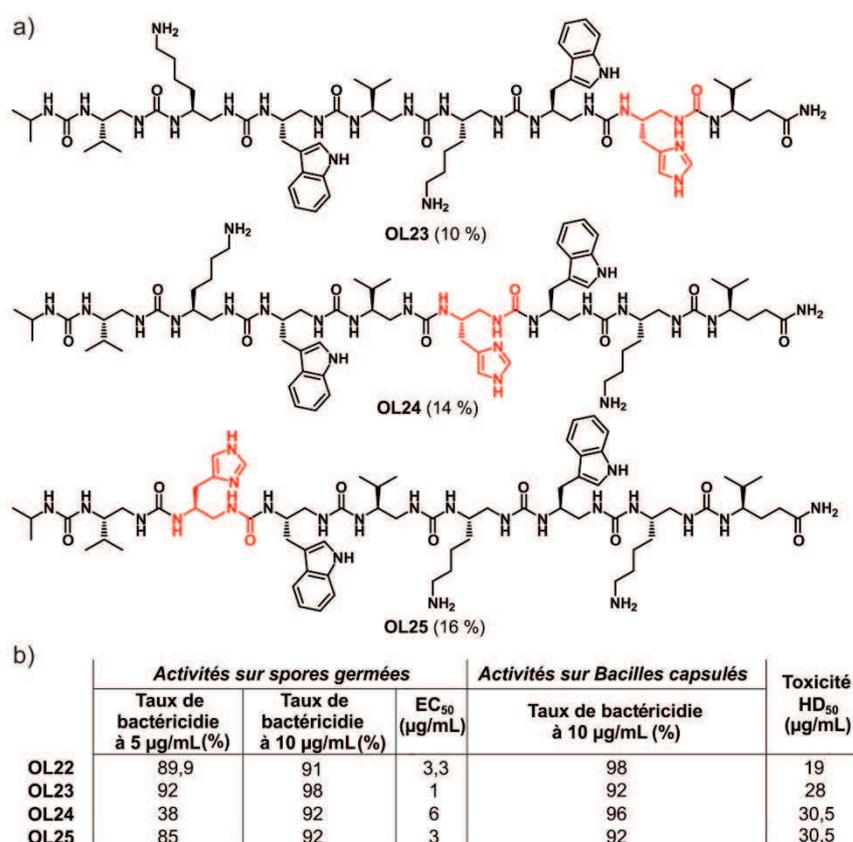


Figure III.12 : a) Structures chimiques et rendements entre parenthèses après purification de **OL23**, **OL24** et **OL25** ; b) Activité antibactérienne sur spores germées, sur bacilles capsulés et mesure de la toxicité sur des macrophages RAW de souris par test MTT.

Alors que le composé **OL24** possède une activité anthracidale moins forte qu'**OL22**, une augmentation significative de l'activité antimicrobienne pour **OL23** est constatée avec une valeur EC₅₀ de 1 µg/mL. **OL25** possède pour sa part une activité similaire à celle de **OL22**. Cependant, le test de cytotoxicité MTT n'a pu être malheureusement réalisé qu'une seule fois et même si une légère baisse de toxicité est observée nous ne sommes pas en mesure de dire que cette différence soit significative. L'ensemble de ces résultats laisse ainsi suggérer que les positions de la charge cationique ne sont pas équivalentes le long de la

séquence vis-à-vis de l'activité antimicrobienne et qu'il existe des phénomènes plus complexes qu'une simple attraction électrostatique qui gouvernent l'interaction avec la membrane bactérienne. La perte d'activité obtenue avec **OL23** dont l'unité de type lysine centrale a été substituée par une unité de type histidine, semble montrer que le résidu cationique en position centrale est important.

Enfin, l'évaluation de la structuration hélicoïdale de ces nouveaux oligomères réalisée par dichroïsme circulaire à une concentration de 20 μ M dans un tampon phosphate à pH 7,4 confirme qu'il y a aucune différence significative d'hélicité entre les oligomères (Figure III.13).

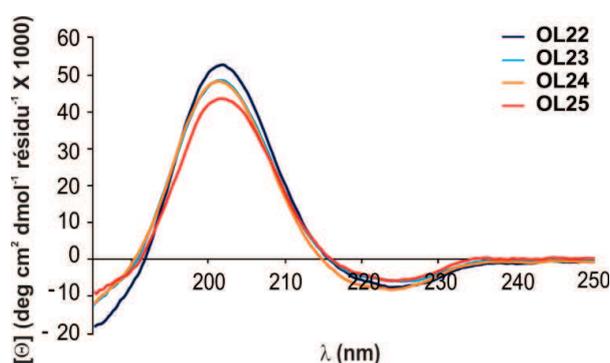


Figure III.13 : Spectres CD obtenus pour les composés **OL22**, **OL23**, **OL24**, **OL25**.

Il est intéressant de noter que la substitution des chaînes latérales 1-butylamine en 1-propylguanidine dans la séquence de **OL22** avait aussi donnée de moins bons résultats lors de la précédente étude structure-activité réalisée sur *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* [85]. Une perte de bactéricidie accompagnée d'une augmentation de l'activité hémolytique avait été constatée alors que cette fois la charge nette globale de +3 avait, elle, été conservée (pKa du motif guanidine de l'arginine de 12,5). De manière similaire à ce qui a été rapporté pour le peptide naturel maganine-2 par Dathe *et al.* [84,86], l'augmentation de la charge ne peut s'effectuer que jusqu'à un certain seuil au-delà duquel une perte de pouvoir antimicrobien et un gain d'activité hémolytique sont observés. L'interaction électrostatique devenue trop importante (dans le cas de nos oligomères, par un pKa plus élevé et une interaction bidentate des groupements guanidines avec les têtes polaires de lipides) empêcherait les interactions hydrophobes d'avoir lieu et donc la perturbation de la membrane (Figure III.13). La plus forte toxicité proviendrait pour sa part d'une meilleure interaction avec la paroi interne négativement chargée des cellules eucaryotes et de la translocation des composés à l'intérieur des cellules, un peu à la manière des poly-arginines en tant que « peptides vecteurs » [87](cf. chapitre 2.3.a).

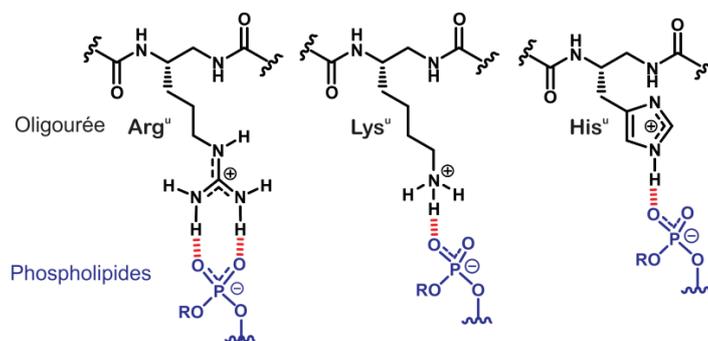


Figure III.13 : Coordination bidentate supposée des guanidines latérales des résidus arginine avec les oxo-anions-phosphate par interaction de charge et liaisons hydrogène en comparaison avec les résidus de type lysine et histidine.

ii) Modification de la face hydrophobe

Parmi les différents paramètres qu'il est possible de faire varier, l'hydrophobicité est considérée comme cruciale. Dans la littérature, les différentes études de l'influence de ce paramètre sur différents AMPs structurés en hélice- α , notamment celles de Dathe [84] et de Hodges [88], concluaient qu'une augmentation générale de l'hydrophobicité permet de favoriser l'interaction hydrophobe avec le cœur hydrophobe de la bicouche lipidique, de faciliter la déstabilisation de membranes et donc d'améliorer l'activité antimicrobienne. Toutefois cette amélioration est aussi accompagnée d'une forte augmentation de la toxicité, comme il a pu être constaté lors de l'étude structure-activité des β -peptides [89] ou encore les peptoïdes [90] (*cf.* chapitre 1).

(1) Introduction du groupement de type tyrosine

Afin d'étudier l'impact de l'hydrophobicité sur l'activité, les résidus de type tryptophane ont été remplacés par des résidus de type tyrosine. Le composé **OL26** a été synthétisé en stratégie azoture avec un rendement de 14 % après purification par HPLC semi-préparative (Figure III.14). Une perte significative de l'activité antimicrobienne a été constatée et rend compte de l'importance du résidu de type tryptophane, qui est fréquemment retrouvé dans les séquences des peptides antimicrobiens naturels [91].

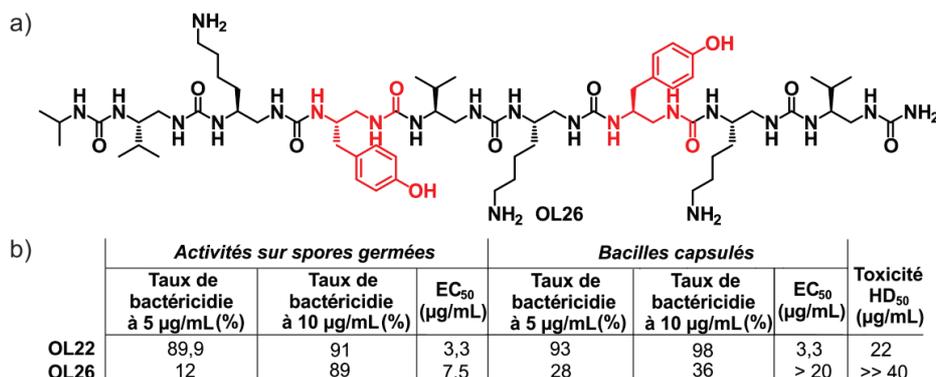


Figure III.14 : a) Structure chimique de **OL26** ; b) Taux de bactéricidie obtenus sur spores germées, bacilles capsulés et toxicité sur des macrophages RAW de souris par test MTT.

(2) Introduction du motif de type trifluorométhylène

Des travaux préliminaires sur l'introduction d'un motif de type trifluorométhylène (CF₃) ont été initiés en collaboration avec le Dr. Pytkowicz (Laboratoire LCB, Université de Cergy-Pontoise).

Les groupements fluorés ont souvent été introduits dans les séquences peptidiques pour améliorer la résistance à la protéolyse [92,93]. De tels groupements permettent aussi d'augmenter l'hydrophobicité et ainsi pourraient potentiellement améliorer le passage dans les membranes cytoplasmiques. Enfin, le fluor permet l'accès à un nouvel outil analytique : la RMN du fluor. Le déplacement chimique du ¹⁹F étant sensible à son environnement, l'étude de l'interaction entre les analogues fluorés et des modèles membranaires mimant la membrane de la bactérie pourraient donc être envisagés afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de nos oligourées [94].

La synthèse d'oligourées comportant des chaînes latérales de type trifluorométhylène n'a jamais été décrite et leurs réalisations semblent être fortement compromises par la forte électronégativité du groupe CF₃ qui diminue la basicité des amines et leur réactivité. Le pKa du groupement NH₃⁺ d'une trifluoroalanine est 4 unités de pKa plus bas que celui de l'alanine [95]. Par ailleurs, une importante gêne stérique doit être aussi envisagée.

Le Dr. Pytkowicz a réalisé la synthèse des blocs éthylène diamine activés de type Boc **M10** et de type azoture **M11** en utilisant la stratégie de synthèse développée dans son laboratoire. Cette dernière décrit la synthèse des deux énantiomères de trifluoroalaninol sous forme énantiopure par réduction d'oxazolidines chirales (FOX) préparées à partir d'éthyltrifluoropyruvate et de (*R*)-phénylglycinol [96] (Schéma III.1 et III.2, résultats non publiés).

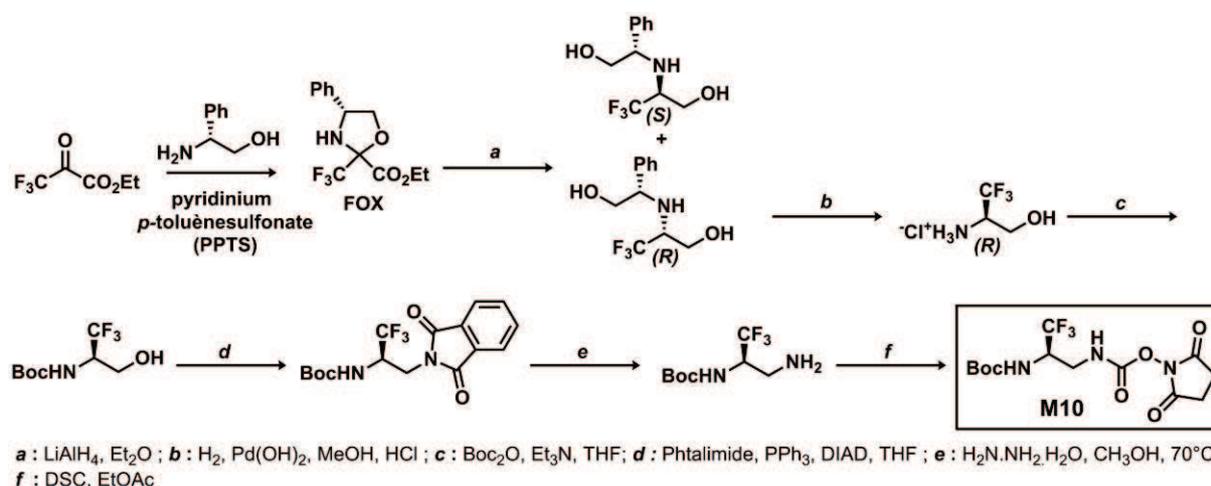


Schéma III.1 : Synthèse du monomère activé **M10** pour la stratégie de type Boc.

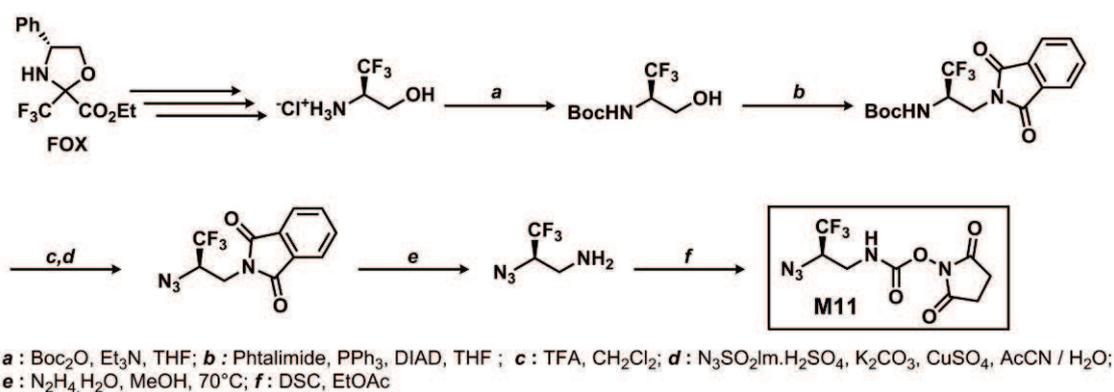


Schéma III.2 : Synthèse du monomère activé **M11** pour la stratégie de type azoture.

Par la suite, ces deux monomères ont été engagés dans la synthèse d'oligourée dont les résidus de type Valine ont été tour à tour remplacés avec ces nouveaux résidus « CF₃ ».

En stratégie Boc, les essais de réaction de couplage sur support solide du monomère **M10** soit directement sur la résine, soit sur l'amine libre d'une chaîne oligourée, sont restés sans succès, aussi bien sous champs micro-ondes qu'à température ambiante. Il est aussi à noter que le suivi de cette réaction n'était possible que par de tests colorimétriques (chloranil ou Kaiser) le clivage d'un échantillon de résine étant rendu impossible par l'usage de la résine MBHA.

En stratégie azoture, l'utilisation du monomère activé **M11** a permis d'obtenir de meilleurs résultats. La synthèse de l'oligomère **OL27** comportant un groupement CF₃ en position centrale a été réalisée (Figure III.15). Les étapes de couplages du bloc **M11**, du résidu de type tryptophane en *i*+1 du trifluorométhylène ainsi que la réduction du bloc **M11** ont pu être suivies par clivage. Chaque brut de synthèse obtenu a été analysé par HPLC et spectrométrie de masse.

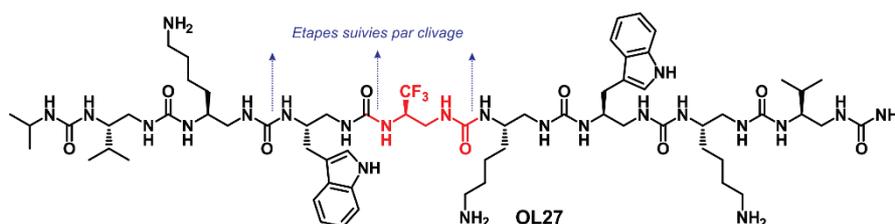


Figure III.15 : Structure chimique de **OL27**.

L'insertion du bloc **M10** a été obtenue de manière satisfaisante sous champs micro-ondes deux fois 30 minutes à 70 °C, 25 W. De même, l'étape de réduction de la fonction azote en amine a été réalisée dans les conditions standards en présence de triméthylphosphine (2 fois 30 min, 70°C, 25 W). Ensuite, d'infructueuses tentatives de couplage du monomère de type tryptophane en position *i*+1 ont mis en évidence la désactivation de l'amine libre formée par la présence du groupement trifluorométhylène en

position γ . Il a cependant été possible de réaliser ce couplage en présence de 5 équivalents de monomère activé et de 15 équivalents de DIEA à 50°C pendant 12 heures.

Il est possible de mentionner que cette faible réactivité qui résulte de l'acidité fortement augmentée du NH amine des acides α -aminés α -trifluorométhylés a été observée à plusieurs reprises lors de la synthèse de peptides trifluorométhylés, imposant l'activation préalable des acides aminés à coupler en anhydrides mixtes ou en halogénures d'acyle [97-99]. Ainsi par exemple, lors de la synthèse de précurseurs tripeptidiques en vue de la préparation de dérivés de l'alaméthicine et de leur étude par RMN du fluor 19, l'acide aminé en position $i+1$ activé sous forme d'anhydride mixte a été couplé à température ambiante entre 3 et 5 jours avec des rendements moyens compris entre 50 et 70 % par Maisch *et al.* [98].

Le composé **OL27** a pu être obtenu après purification avec un rendement isolé de 7 %. La pureté du chromatogramme du brut réactionnel reste néanmoins largement améliorable (Figure III.16). Le sous-produit à 4,1 min, isolé et analysé par ESI-MS, correspond à une réduction partielle du tétramère. Une manipulation non optimale (synthèse stoppée à l'étape du tétramère non réduit durant 96 h) pourrait en être la cause. De plus, il est à noter qu'en raison des propriétés physicochimiques particulières (hydrophobicité accrue) de cet oligomère trifluorométhylé, une quantité non négligeable de produit est restée dans la phase étherée.

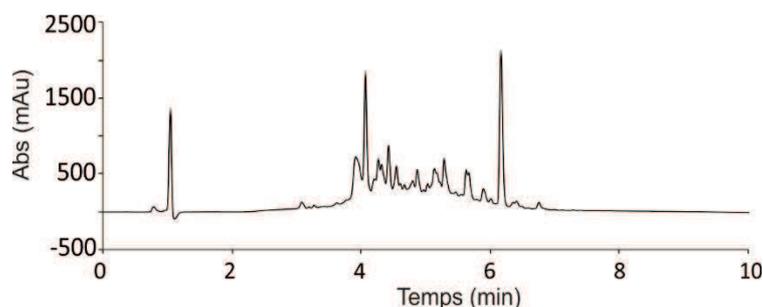


Figure III.16 : Chromatogramme du brut de synthèse après précipitation à l'éther et centrifugation (UV 214 nm, 10-100 % CH₃CN (+ 0.1 % TFA) dans H₂O (+ 0.1 % TFA) en 10 min.

Une fois les conditions de synthèse optimisées, les oligomères **OL28** et **OL29** ont pu être à leur tour préparés (Figure III.17). Néanmoins, malgré plusieurs tentatives, les rendements de synthèse et les profils HPLC des bruts après clivage de la résine sont restés décevants. Afin d'augmenter les rendements (1 %), il serait donc nécessaire de réaliser une étude plus approfondie sur les conditions de synthèse de ces dérivés fluorés.

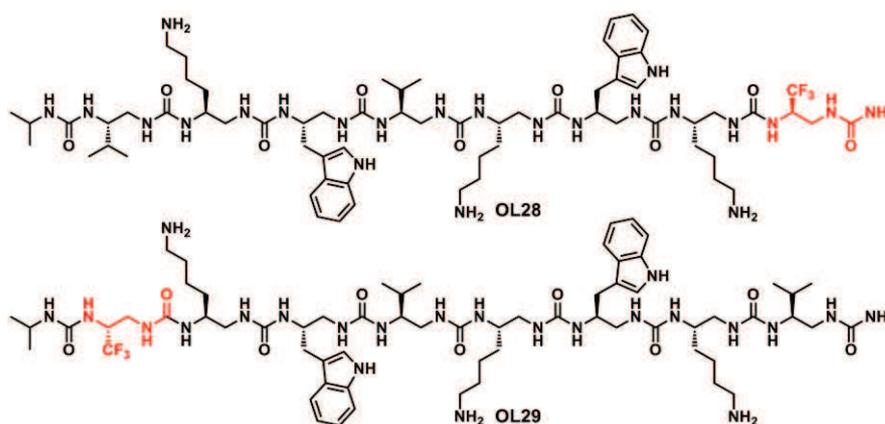


Figure III.17 : Structures chimiques des oligomères **OL28** et **OL29**.

Enfin, des EC_{50} préliminaires sur spores germées de 2,5, 2,9 et 2,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour **OL27**, **OL28** et **OL29** respectivement ont été obtenues. Ces résultats confirment que l'introduction de groupement de type trifluorométhylène est potentiellement une nouvelle sonde moléculaire pour l'étude de l'interaction de nos oligomères avec des modèles membranaires pertinents par RMN du fluor 19.

iii) Variation de l'hélicité : introduction du groupement pyrrolidine

L'introduction d'unités de type pyrrolidine dans le squelette d'urées N,N' -liées a été initialement développée dans le groupe afin de faciliter la synthèse de long oligomères en solution par couplage de fragments (jusqu'à des 20mères comportant plusieurs résidus pyrrolidines non consécutifs). Lors de cette étude, il a été mis en évidence que les résidus pyrrolidines sont largement compatibles avec la géométrie de l'hélice canonique (à la différence des prolines dans les peptides). En effet, la valeur de l'angle dièdre $C(=O)-N-C^{\beta}-C^{\alpha}$ (ϕ) environ -96° imposée par le cycle pyrrolidine est très proche de la valeur généralement observée ($\phi \sim -101^{\circ}$) dans l'hélice canonique 2,5 des oligomères. Néanmoins, l'introduction de résidus pyrrolidine conduit à une déstabilisation locale de l'hélice résultant de la perte d'une liaison hydrogène au niveau de l'urée trisubstituée [100,101]. Nous avons voulu mettre à profit de cette observation afin d'évaluer la relation entre la stabilité de l'hélice et l'activité antibactérienne sur *Bacillus anthracis* en introduisant un ou deux résidus pyrrolidines au sein de la séquence de **OL22**. Dans le cadre de la relation structure-activité des AMPs hélicoïdaux et de leurs mimes synthétiques, examinée dans le détail dans le chapitre 1, les variations de ce paramètre structural sur l'activité antimicrobienne ont été intensément examinées. Les travaux de Gellman sur les β -peptides ont ainsi révélé que l'apport de flexibilité dans le squelette des peptidomimes antimicrobiens n'est pas dommageable pour l'activité antimicrobienne tant que le composé peut se structurer de

manière amphipathique à la surface des membranes [102,103]. De plus, les travaux du groupe de Shai, confirmés par la suite par ceux de Tossi, ont montré que la propension de structuration en hélice et les effets hémolytiques des peptides antimicrobiens naturels sont étroitement liés. En effet, l'incorporation de (D)-acides aminés sur les parties « N-terminale » et « C-terminale » hélicoïdales de la mélittine qui induit une forte déstructuration de ses segments hélicoïdaux, n'altère que très peu l'activité antimicrobienne mais provoque la perte de l'activité hémolytique des analogues synthétisés [104,105].

Dans le cadre de notre étude, une série d'analogues possédant une ou deux unités pyrrolidines par séquence (**OL30-OL33**) a été synthétisée en stratégie Boc (Figure III.18). Puis l'évaluation de la structuration en hélice-2,5 de cette nouvelle famille d'oligourées a été réalisée par dichroïsme circulaire et comparée à celle de l'oligourée de référence à savoir **OL22**. Les spectres CD ont été enregistrés dans du tampon phosphate à 10 mM à un pH de 7,4 avec une concentration d'oligourées fixée à 20 μ M (Figure III.19).

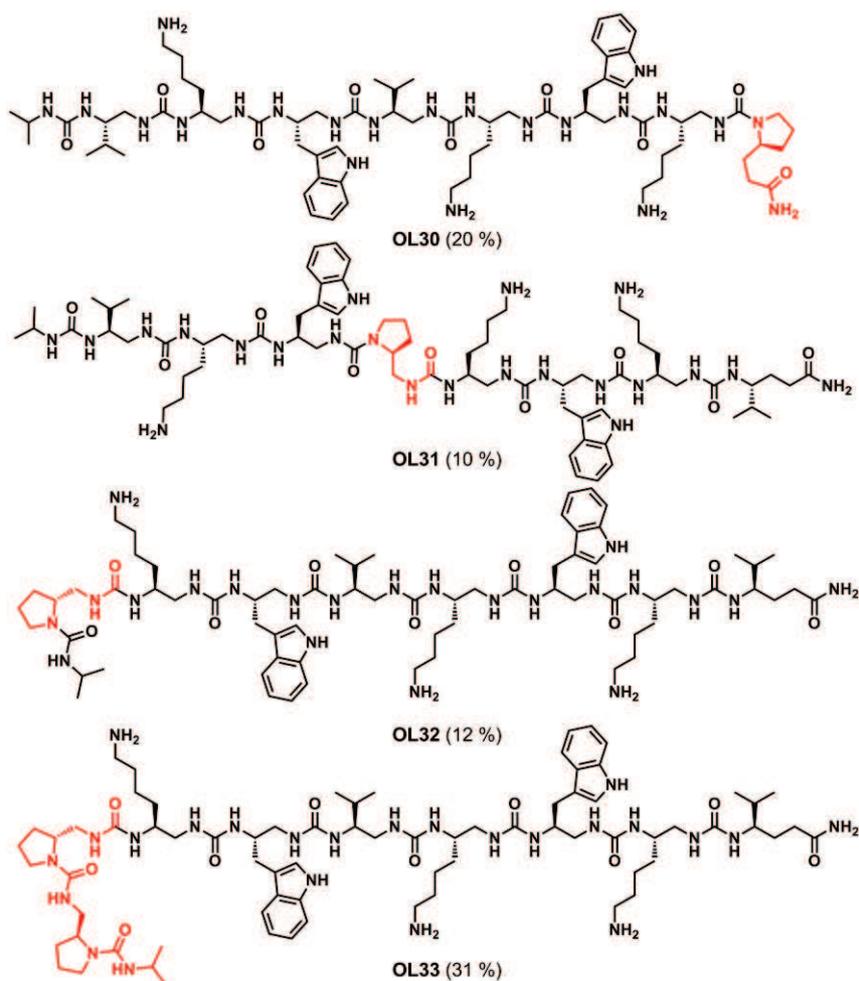


Figure III.18 : Structures chimiques et rendements entre parenthèses après purification des oligomères **OL30-OL33**.

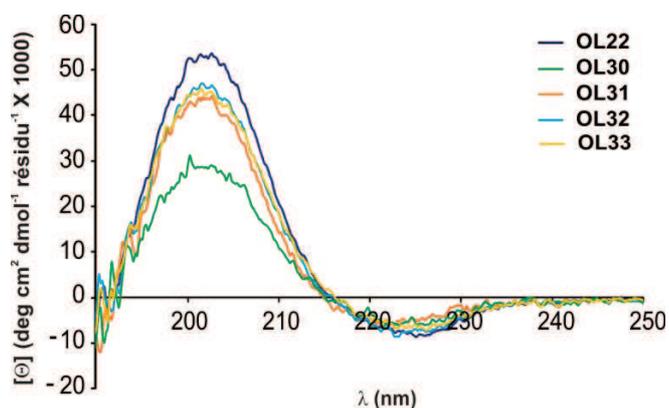


Figure III.19: Spectres CD obtenus pour les composés **OL22**, **OL30-OL33**.

Premièrement, on constate que le maximum positif d'ellipticité molaire par résidu à 203 nm du composé **OL30** porteur d'une pyrrolidine en début de séquence chute significativement comparé au maximum positif d'ellipticité molaire de **OL22**. Ainsi en bloquant les deux premiers sites de liaisons hydrogène, l'introduction d'une unité pyrrolidine sur l'extrémité « C-terminale » diminue fortement la propension de structuration en hélice-2,5 de l'oligourée. Pour le composé **OL31**, l'introduction d'une unité pyrrolidine au centre de la séquence de l'oligourée modèle **OL22** n'induit qu'une déstabilisation locale de l'hélice avec une légère baisse constatée du maximum d'ellipticité molaire. Enfin, l'introduction d'unités pyrrolidines en position « N-terminale » (**OL32** et **OL33**) a peu d'effet sur la structuration hélicoïdale, les maximums positifs d'ellipticité molaire à 203 nm n'étant que légèrement inférieurs à celui de **OL22**. *A Posteriori*, ce résultat peut s'expliquer par (i) une possible stabilisation de l'hélice liée à la restriction angulaire induite par le cycle pyrrolidine ($\phi \sim -96^\circ$) et à la contribution canonique des groupements carbonyles de ces résidus au réseau de liaison hydrogène, mais contrebalancée par (ii) une isomérisation *cis/trans* potentiellement déstabilisante et accentuée dans les urées trisubstituées.

Cette série d'analogues a ensuite été testée pour son activité anthracidale et son activité lytique sur les macrophages de souris (Figure III.20).

	<i>Activités sur spores germées</i>			<i>Bacilles capsulés</i>		Toxicité HD ₅₀ (µg/mL)
	Taux de bactéricidie à 5 µg/mL (%)	Taux de bactéricidie à 10 µg/mL (%)	EC ₅₀ (µg/mL)	Taux de bactéricidie à 10 µg/mL (%)	EC ₅₀ (µg/mL)	
OL22	89,9	91	3,3	98	3,3	22
OL30	20	35	14,5	52	9,2	> 40
OL31	72	92	3,6	85	5,2	37
OL32	28	78	5,8	92	5,3	> 40
OL33	17	46	10,9	70	7,2	50

Figure III.20 : Taux de bactéricidie obtenus sur spores germées, bacilles capsulés et toxicité sur des macrophages RAW de souris par test MTT.

Les données d'activité antimicrobienne et de toxicité obtenues pour cette famille de composés sont intéressantes. En particulier, on constate que l'introduction d'une unité pyrrolidine en partie centrale de la séquence de **OL22 (OL31)** à la faible influence sur le repliement en hélice, ne modifie que très peu l'activité bactéricide. En revanche, l'introduction d'un motif pyrrolidine à l'extrémité « C-terminale » (**OL30**) provoque une perte significative de la structuration hélicoïdale et est associée à une forte diminution de l'activité bactéricide. Il semblerait donc que pour ce composé **OL30**, l'activité antimicrobienne soit en étroite corrélation avec la structuration hélicoïdale. Enfin, l'introduction d'une ou de même deux unités pyrrolidines au sommet de l'hélice (**OL32-OL33**) (extrémité « N-terminale ») induit une forte perte d'activité et cela d'autant plus pour le composé **OL33** possédant les deux unités pyrrolidines. Pourtant l'étude par dichroïsme circulaire montre que l'hélicité de ce composé n'est que faiblement perturbée par cette (ces) modification(s).

De plus, afin de conforter ces résultats, l'attribution complète de tous les systèmes de spin a été réalisée pour les oligomères **OL22** et **OL33** à partir des spectres RMN (COSY, TOCSY et ROESY) à 5,5 mM dans le CD₃OH dans le but de comparer les écarts de déplacements chimiques $\Delta\delta$ de chacun des protons $^{\alpha}\text{CH}_2$ le long de la chaîne principale (Table III.1). Comme évoqué dans les chapitres précédents, ces protons, placés dans un environnement hélicoïdal, possèdent en effet un fort degré d'anisochronicité [106,107]. Toutefois l'interprétation des spectres de **OL33** dans CD₃OH (table présentée en partie expérimentale) s'est révélée très délicate (et ce, même à basse température), par une mauvaise résolution des signaux des résidus pyrrolidines et des chevauchements importants. Pour pallier cette difficulté, les spectres RMN (COSY, TOCSY et ROESY) de **OL33** ont été également réalisés dans la pyridine-d₅ (table présentée en partie expérimentale). La pyridine permet en effet d'obtenir des déplacements chimiques plus dispersés et de stabiliser les hélices d'oligourées *N,N'*-liées [108]. Les valeurs des écarts de déplacements chimiques $\Delta\delta$ sont reportées dans la table III.1. Elles montrent que l'anisochronicité des protons CH₂ des résidus 1-7 est conservée entre **OL22** et **OL33** suggérant que l'hélice se développe de manière très similaire avec une face occupée par les résidus cationiques hydrophiles. Par contre les valeurs mesurées pour les résidus pyrrolidine en position 7 et 8 suggèrent une perturbation de la conformation canonique et une certaine flexibilité de cette partie de l'hélice.

Composé	X_9^u	X_8^u	Lys_7^u	Trp_6^u	Val_5^u	Lys_4^u	Trp_3^u	Lys_2^u	Val_1^y
OL22	∅	1,07	1,15	1,28	1,33	1,47	1,24	1,26	0,49
OL33 (CD₃OH)	ND	ND	1,06	1,27	1,34	1,44	1,25	1,24	0,49
OL33 (pyridine-d₅)	0,39	0,89	1,25	1,43	1,38	1,40	1,53	1,49	0,52

Table III.1 : Ecarts des déplacements chimiques des protons $^{\alpha}CH_2$ mesurés pour chaque résidu des composés **OL22** et **OL33** dans le CD₃OH à 5,5 mM et la pyridine-d₅ à 5 mM avec $X_8^u = Val$ ou Pro , $X_9^u = Pro$ uniquement pour **OL33** et avec ND = non déterminé.

Il est difficile d'attribuer à cette seule déformation locale de l'hélice d'**OL33**, la perte importante d'activité anthracidale alors que la distribution des chaînes cationiques et hydrophobes à la surface de l'hélice est conservée dans une large mesure. Une hypothèse permettant de rendre compte de cette différence, serait une contribution (directe ou indirecte) à l'activité membranolytique de **OL22** des NH urées ne participant pas au réseau de liaisons hydrogène terminales du côté du pôle positif de l'hélice. On pourrait ainsi imaginer (i) une interaction directe entre ces urées terminales et les têtes polaire de la membrane bactérienne (hypothèse renforcée par des études réalisées au laboratoire montrant que le site constitué des deux urées terminales permet la reconnaissance spécifique d'anions) ; ou encore penser (ii) à une participation de ces urées terminales dans un processus d'agrégation des hélices à la membrane (Figure III.21). Ces deux hypothèses seraient donc contrariées par l'introduction d'unités pyrrolidine comme dans **OL33**.

Afin d'approfondir cette étude, une série d'analyses biophysiques et des expériences de RMN du solide du proton et du phosphore ont été initiées et sont décrites dans le chapitre suivant.

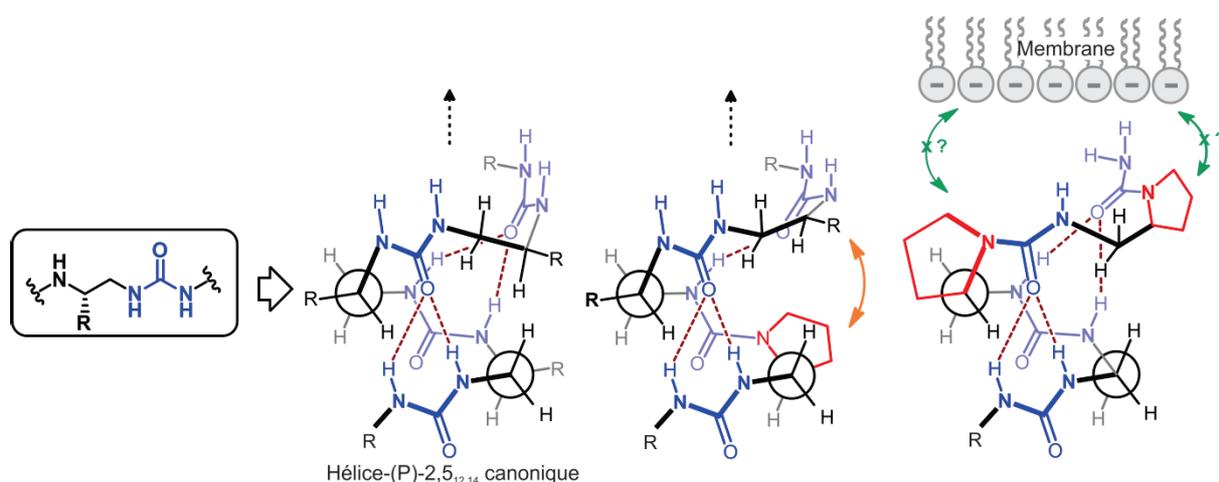


Figure III.21 : Représentation schématique de l'hypothèse d'une perturbation de l'interaction avec la membrane bactérienne induite par la présence de d'unités pyrrolidines au sommet de l'hélice d'oligourée.

d) Modification du squelette

i) Introduction de liens amides

Les précédents travaux de Claudon *et al.* dans le groupe ont montré que le remplacement des liens urée par des liens amides conduisait à la perte de l'activité bactéricide sur *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* [1]. Nous avons voulu tout d'abord vérifier ces résultats sur *B. anthracis* et confirmer que le squelette urée est un contributeur central de l'activité antimicrobienne sur *B. anthracis*.

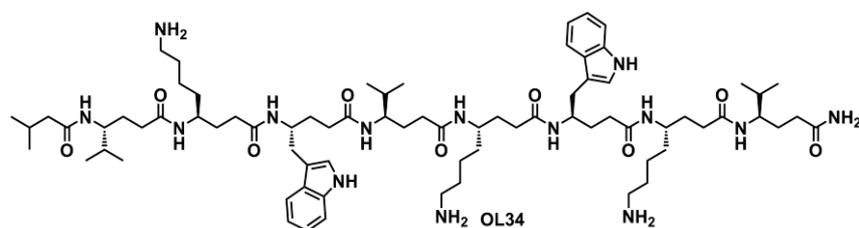


Figure III.22: Structure chimique de **OL34**.

OL34 qui a été synthétisé par stratégie Fmoc par le Dr. Claudon (Figure III.22), a été testé sur spores germées et bacilles capsulés. Une perte complète d'activité antimicrobienne est une fois de plus constatée, avec un taux de bactéricidie inférieur à 30 % sur spores germées et bacilles capsulés pour une concentration de γ -peptide **OL34** de 22,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

ii) Introduction du lien isostère thiourée

Dans un second temps, nous avons cherché à déterminer quelles étaient les conséquences de l'insertion ponctuelle de motifs thiourées dans nos foldamères à base d'urées sur l'activité contre *B. anthracis*. Comme précédemment démontré dans le chapitre 2, l'introduction d'une jonction thiourée, isostère du lien urée, modifie selon sa position les propriétés de repliement en hélice-2,5 de l'oligourée. De plus, la présence du soufre augmente l'hydrophobicité du composé. En comparaison, Zhang *et al.* ont été les seuls, à notre connaissance, à publier une étude de relation structure-activité comportant une telle substitution sur des analogues d'un peptide antimicrobien naturel (Polybia-MPI (MPI)) [109]. Fait intéressant, le nouvel analogue thioxo-peptide possède une meilleure stabilité enzymatique mais aussi de plus fortes activités lytiques envers des cellules cancéreuses et des cellules du sang *in vitro*. Ces dernières ont été attribuées à une plus forte hydrophobicité du thioxo-peptide.

Dans le cadre de cette étude, quatre nouveaux oligomères possédant un lien thiourée à des positions clés de la séquence ont été envisagés. Tout d'abord, l'oligomère **OL35** possédant un lien thiourée sur l'extrémité « C-terminale » de la séquence a été

préparé. Cette modification, comme nous l'avons conclu dans le chapitre précédent, n'altère que très peu le repliement en hélice-2,5. Néanmoins, si l'extrémité « C-terminale » joue un rôle clé dans la reconnaissance des membranes bactériennes, cette interaction pourra être affectée par la présence de l'atome de soufre plus gros et plus hydrophobe. **OL35** a ainsi été synthétisé en stratégie azoture en utilisant le monomère azoture thiocarbamoylé de type valine **M5** (décrit dans le chapitre 2). **OL35** a été obtenu avec une pureté du brut réactionnel de 31 % et un rendement isolé de 6 % (Figure III.23).

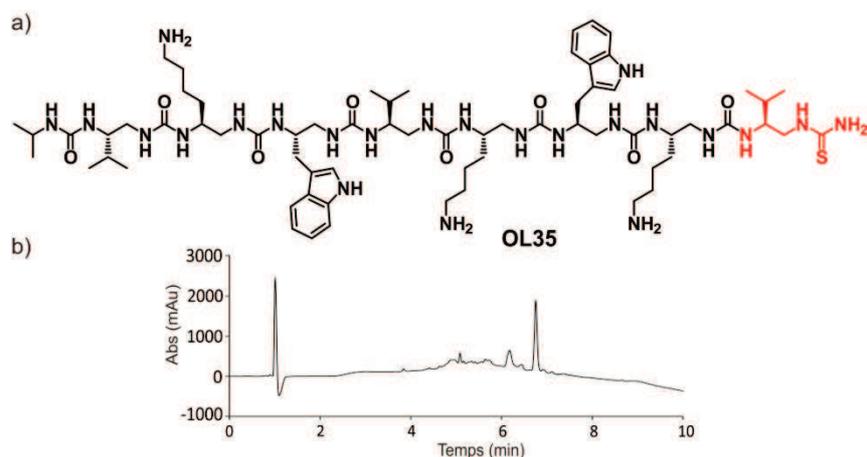


Figure III.23 : Structure chimique du composé **OL35** et chromatogramme HPLC du brut de synthèse (UV 200 nm, 10-100 % CH₃CN (+ 0.1 % TFA) dans H₂O (+ 0.1 % TFA) en 10 min.

Nous avons ensuite voulu incorporer la thiourée sur le résidu de type lysine en *i*+1 de l'extrémité « C-terminale » en préparant l'oligomère hybride **OL36** (Figure III.24a). Toutefois, des difficultés de préparation du monomère azoture lysine nous ont conduit à utiliser la stratégie de type Boc. Par la même occasion, il était ainsi possible de valider l'utilisation des conditions conventionnelles de la stratégie Boc sous champs micro-ondes pour l'introduction de lien thiourée sur les séquences d'oligourées. Un nouveau monomère de type dérivé de la Boc lysine **M12** a été préparé (détaillé dans la partie expérimentale). Après synthèse sur support solide et coupure finale au HF, l'oligomère **OL36** a été obtenu avec un rendement isolé de 7 % pour une pureté du brut réactionnel de 23 %.

Enfin, deux autres oligomères possédant cette fois un lien thiourée en position centrale **OL37** ou en extrémité « N-terminale » **OL38**, ont été préparés suivant la stratégie azoture (Figure III.24a). Comme il a été précédemment démontré dans le chapitre 2, ces substitutions ont une forte incidence sur le repliement des oligourées. Les faibles rendements (< 5 %) et les nombreux sous-produits observés durant leurs synthèses en stratégie azoture conventionnelle, nous ont amenés à identifier une nouvelle méthodologie de synthèse sur support solide qui a été présentée dans le chapitre 2.

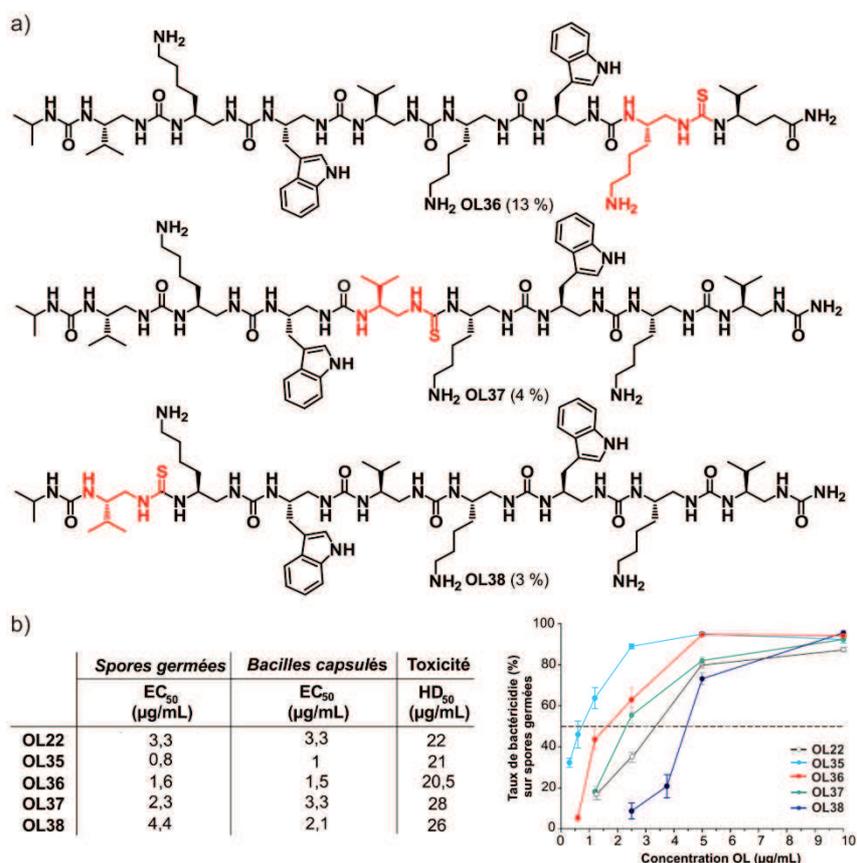


Figure III.24 : a) Structures chimiques et rendements après purification entre parenthèses des oligomères hydrides urée/thiourée **OL36-OL38** ; b) Taux de bactéricidie obtenus sur spores germées, bacilles capsulés et toxicité sur des macrophages RAW de souris par test MTT.

Les oligo(thio)urées ont pu être ensuite criblées pour leur activité bactéricide (Figure III.24b). Il apparaît clairement que l'introduction de motif thiourée n'annihile pas l'activité bactéricide voire l'augmente significativement pour **OL35** et **OL36**. De manière encore plus intéressante les valeurs d'activité observées sont en accord avec l'étude structurale : à savoir que l'introduction de motif thiourée au niveau du pôle négatif de l'hélice, ayant un effet stabilisateur sur l'hélice permet d'augmenter l'activité bactéricide. **OL35** possède ainsi une EC₅₀ plus de trois fois inférieure à celle de **OL22** sur spores germées. Pour les oligomères **OL37** et **OL38**, les tendances sont moins marquées et devront être reconfirmées.

Ce phénomène est intéressant puisque les travaux de Gellman sur les β-peptides [102] ou encore ceux de Barron sur les peptoïdes [90] ont montré que l'apport de flexibilité dans les squelettes améliorerait les activités bactéricides et diminuait la toxicité des composés résultants. Dans notre cas, nos activités antimicrobiennes semblent être améliorées par une stabilisation de l'hélice et une légère augmentation de l'hydrophobicité.

iii) Introduction du lien isostère guanidine

Bien que l'insertion de chaînes latérales 1-propyl-guanidine n'ait pas permis d'accroître les activités antimicrobiennes, l'insertion dans le squelette de liens de type guanidine a été réalisée afin d'étudier l'influence d'une telle modification sur *B. anthracis* et permettait de cette manière de mettre à profit la nouvelle méthodologie développée sur support solide décrite dans le chapitre précédent. Trois oligomères **OL39**, **OL40** et **OL41** ont ainsi été synthétisés à partir de leurs analogues thiourées immobilisés sur support solide (Figure III.25). Le détail de leur synthèse est présenté dans la partie expérimentale.

Ces derniers analogues ont été testés pour leurs activités antimicrobiennes de manière préliminaire. Des EC_{50} de 0,9 $\mu\text{g/mL}$, 9,5, 12,4, $\mu\text{g/mL}$ pour **OL39**, **OL40** et **OL41** respectivement ont été obtenues sur spores germées. Des EC_{50} de 1,25 $\mu\text{g/mL}$, 9,7, 9,25 $\mu\text{g/mL}$ pour **OL39**, **OL40** et **OL41** respectivement ont été obtenues sur bacilles capsulés. Seul **OL39** conserverait une forte activité antimicrobienne. On peut, à nouveau, remarquer que la position « C-terminale » n'est pas équivalente au reste de la séquence.

Comme l'a démontré l'étude conformationnelle sur les composés hybrides urée/guanidine dans le chapitre 2, l'introduction d'un lien guanidine n'est pas sans conséquence sur l'hélicité de notre composé. Insérée en position centrale, elle perturbe fortement la structuration en hélice-2,5, ce qui pourrait expliquer la perte d'activité antimicrobienne. Pour l'insertion en position « N-terminale » similairement à ce qui a été observé avec l'introduction du lien isostère thiourée, l'hélice est aussi perturbée provoquant derechef la perte de l'activité antimicrobienne.

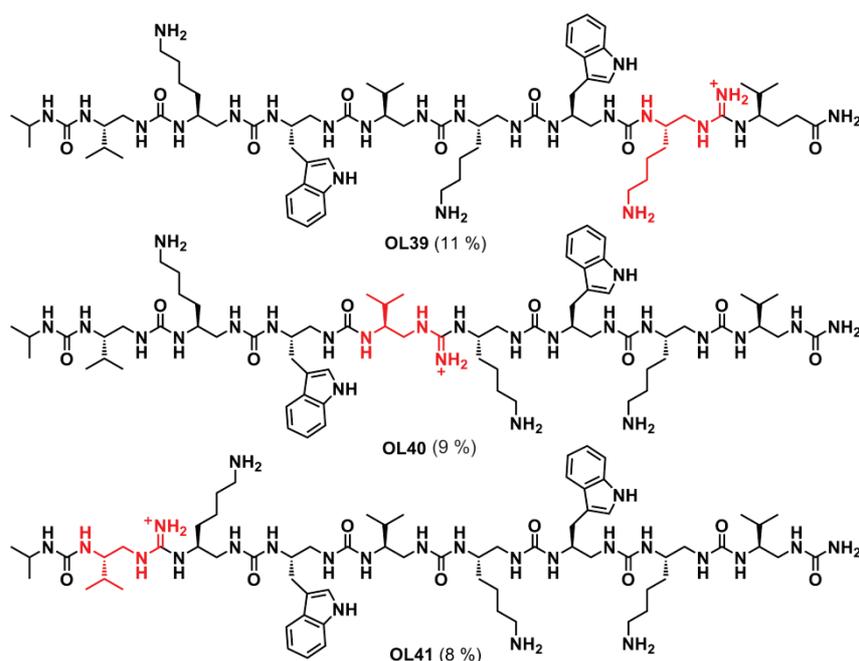


Figure III.25 : Structures chimiques des oligomères hybrides urée/guanidine **OL39-OL41**.

3. Relation structure-activité : approche *In vivo*

A la lumière des activités antimicrobiennes et de la bonne sélectivité obtenues *in vitro* avec l'oligomère **OL22**, des études *in vivo* ont été réalisées sur ce composé par l'équipe de P. Goossens à l'Institut Pasteur avec l'objectif de caractériser pour la première fois chez l'animal les propriétés pharmacocinétiques et pharmacologiques d'un foldamère à base d'urées. Discutées dans le chapitre 1, les études *in vivo* sont d'autant plus pertinentes lorsque des modèles d'infection proches de la physiologie et faciles à manipuler sont utilisés. Or, l'infection systémique de la souris par *Bacillus anthracis* permet d'obtenir une infection létale par voie cutanée et par inhalation contrairement aux infections par *S. aureus* ou *P. aeruginosa* qui exigent elles des animaux immunodéprimés ainsi que des voies d'infection et/ou un inoculum non physiologiques [22].

L'efficacité du traitement par **OL22** a été évaluée sur différentes souches de *B. anthracis* par différentes voies d'administration : la voie par inhalation (intra-nasale, i.n.) et la voie sous-cutanée. Les propriétés pharmacocinétiques de **OL22** ainsi que la biodistribution par un marquage isotopique au tritium de **OL22** ont été évaluées par voie intraveineuse et par inhalation.

a) Etude pharmacocinétique et de la distribution tissulaire de OL22

Afin de réaliser l'étude de la stabilité métabolique et de la distribution tissulaire de **OL22**, un marquage isotopique au tritium ^3H a été réalisé. Cette tritiation, réalisée au CEA (l'Institut de Biologie et Technologie de Saclay, iBiTec-S) par le Dr. Christophe Dugave, s'effectue par une réaction catalytique d'échange isotopique avec de l'eau tritiée en milieu acide (TFA). Ce procédé est rendu possible par la présence dans l'oligourée **OL22** de résidus de type tryptophane, les protons du noyau indole étant connus pour s'échanger rapidement (ce qui n'est pas le cas pour les autres acides aminés) [110,111]. L'oligourée tritiée [^3H]-**OL22** ainsi obtenue possède une activité spécifique de 40-45 Ci/mmol, correspondant à un seul tritium incorporé par molécule.

La stabilité métabolique de **OL22** dans le sang a été mesurée après injection intraveineuse rétro-orbitale de [^3H]-**OL22** (0.5×10^6 « Count Per Minute » (CPM)/100 μg /souris) chez deux souris adultes seines. Le sang a ensuite été repris par la veine rétro-orbitale à des temps successifs déterminés et la radioactivité de chaque échantillon a été mesurée. La concentration en oligourée totale [^3H]-**OL22** (et de ses possibles dérivés formés après dégradation enzymatique) dans le plasma suit un modèle biphasique. Ce modèle est

couramment observé après l'administration d'antibiotique et a été décrit lors de l'étude pharmacocinétique de β -peptides et peptoïdes [112,113] (Figure III.26).

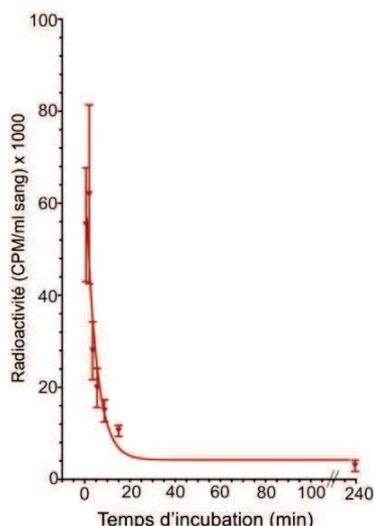


Figure III.26 : Mesure de la radioactivité moyennée sur 240 minutes dans la circulation sanguine chez deux souris après injection par voie intraveineuse de $[^3\text{H}]\text{-OL22}$ (0.5×10^6 CPM/100 μg /souris).

Après avoir atteint son niveau maximal en moins de deux minutes, la radioactivité dans la circulation sanguine diminue rapidement pendant une période 20 min, période durant laquelle le composé est distribué de la circulation sanguine aux différents tissus périphériques. A partir de 20 min, une deuxième phase de diminution beaucoup plus lente apparaît. Elle peut être attribuée majoritairement au métabolisme et à l'excrétion de $[^3\text{H}]\text{-OL22}$. Le temps de demi-vie pour la première phase est de 3-5 minutes et atteint 99 à 103 minutes pour la deuxième phase. La radioactivité excrétée dans les urines au cours de temps de l'expérience a été estimée à environ 2-4 % et éliminée sur une période de 240 minutes, ce qui est très faible.

La biodistribution de l'oligourée **OL22** dans les différents organes et tissus des souris a été ensuite étudiée. Après injection du composé tritié, les animaux sont sacrifiés à un temps déterminé et des coupes sagittales des animaux entiers sont réalisées et analysées par macro-autoradiographie. L'étude de la biodistribution de $[^3\text{H}]\text{-OL22}$ a eu lieu après administration de 100 μg (5 μCi) de $[^3\text{H}]\text{-OL22}$ dans 50 μL de PBS par les voies intra-nasale et intraveineuse. Trois différents points post-dose ont été choisis pour déterminer la distribution de $[^3\text{H}]\text{-OL22}$: 4 h (déterminant la sélectivité de la substance active par des tissus cibles), 30 h et 48 h (déterminant la stabilité de la substance active dans ces tissus cibles).

Par voie intraveineuse, une accumulation importante de la radioactivité et donc de l'oligourée marquée (zone rouge) est observée dans le rein (et plus précisément dans le cortex rénal, la partie périphérique du rein) et dans une moindre mesure dans le foie (zone

bleue) (Figure III.27). Cette absorption tissulaire est stable jusqu'à 48 h. En outre, aucune radioactivité n'a été détectée dans les tissus des poumons, du cerveau ou de l'intestin.

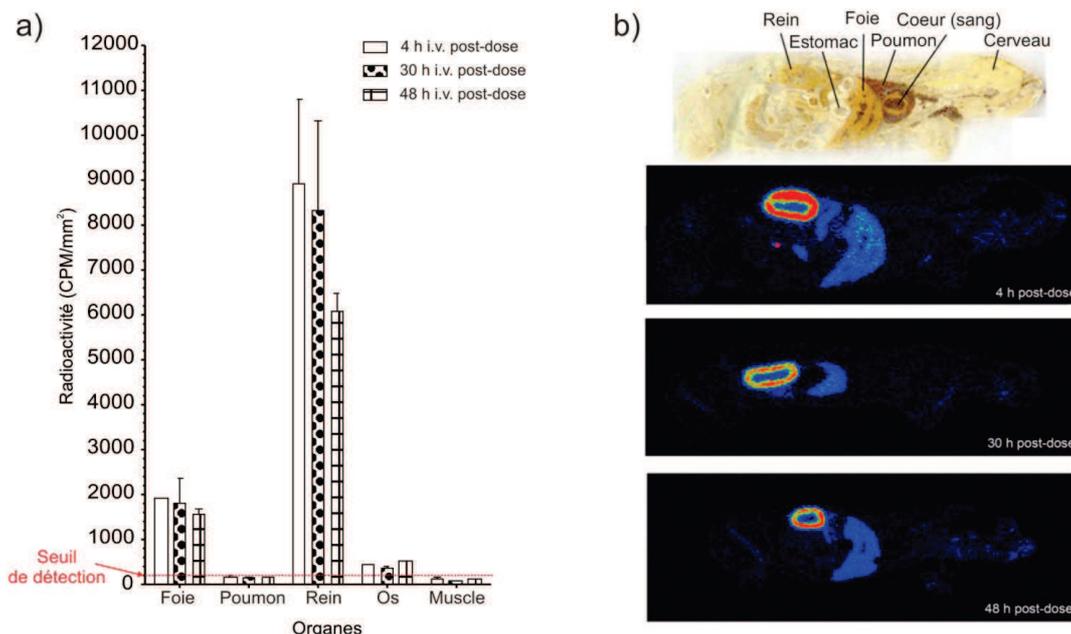


Figure III.27 : a) Profil quantitatif de la radioactivité accumulée à 4, 30 et 48 h dans les différents tissus de la souris après injection i.v. de $[^3\text{H}]\text{-OL22}$ à hauteur de 100 $\mu\text{g}/5 \mu\text{Ci}$ $[^3\text{H}]\text{-OL22}/50 \mu\text{l}$ PBS ; b) Coupes sagittales médianes et latérales de souris entière, à 4, 30 et 48 h après l'injection i.v. de $[^3\text{H}]\text{-OL22}$ (images obtenues par β -radio imager à haute résolution).

Après administration intra-nasale (20 $\mu\text{g}/5 \mu\text{Ci}$ $[^3\text{H}]\text{-OL22}$), des résultats similaires ont été obtenus. Comme l'indique la figure III.28, une accumulation majoritaire a lieu dans le rein. La voie aérienne supérieure (pharynx) séquestre toujours une importante quantité de radioactivité 4h après inhalation de $[^3\text{H}]\text{-OL22}$. En revanche, dans les poumons, une radioactivité « ponctuelle » est quantifiable jusqu'à 4 h après administration de la dose.

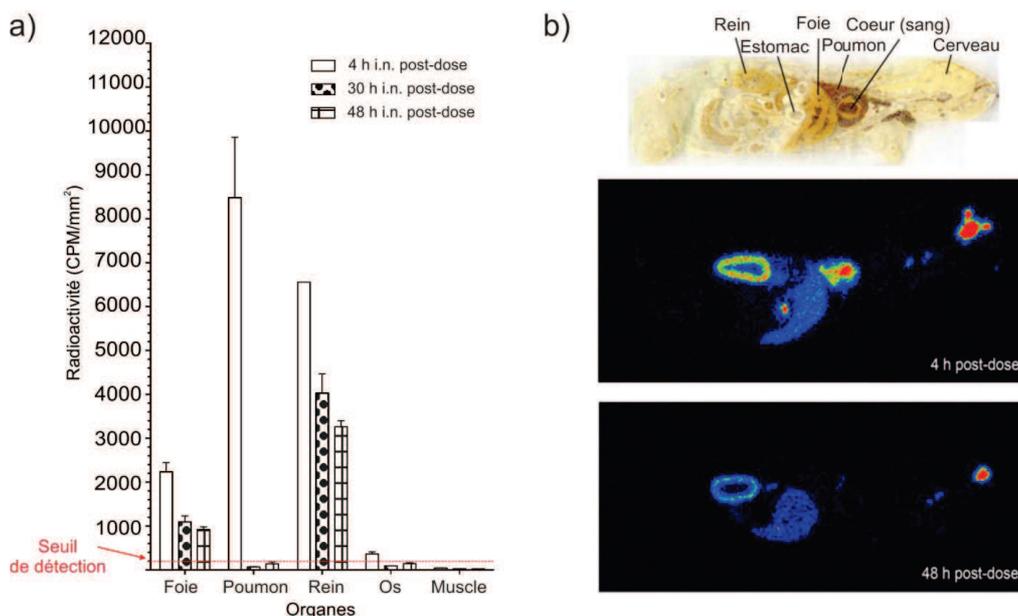


Figure III.28 : a) Profil quantitatif de la radioactivité accumulée à 4, 30 et 48 h dans les différents tissus de la souris après injection i.n. de 100 μg $[^3\text{H}]\text{-OL22}$ du composé contenant du tritium à hauteur de 100 $\mu\text{g}/5 \mu\text{Ci}$; b) Coupes sagittales médianes et latérales de souris entière, à 4, 30 et 48 h après l'injection i.n. de $[^3\text{H}]\text{-OL22}$ (images obtenues par β -radio imager à haute résolution).

Enfin, des analyses par HPLC du composé récupéré des organes corrélaient avec l'HPLC de référence de [³H]-**OL22**. De surcroît, de premiers examens histologiques du rein par l'utilisation de l'oligomère **OL22** biotinylé (**OL22-biot**, décrit en partie expérimentale) ne montrent pas de cytotoxicité apparente.

Ces expériences de pharmacocinétique chez la souris permettent de conclure que l'oligomère **OL22** possède une demi-vie de distribution plasmatique très courte puisqu'il est rapidement éliminé du compartiment sanguin pour être distribué et capturé de manière sélective, majeure et stable dans le cortex rénal et légèrement dans le foie. Fait intéressant, l'oligomère n'en est pas pour autant éliminée dans les urines. Nos résultats se rapprochent alors de ceux obtenus par le groupe de Seebach avec une séquence de type β -peptidique [114]. Le temps de demi-vie du β -peptide H(β^3 -HAla- β^3 -HLys- β^3 -HPhe)₃-OH est d'environ une heure et une forte accumulation est détectée dans les reins. Afin de mieux comprendre les différents phénomènes mis en jeu, l'histologie complète du rein doit être poursuivie et l'étude de l'élimination par les selles de notre oligomère pourra être envisagée.

b) Efficacité du traitement de l'infection par OL22

Chez la souris, *B. anthracis* est naturellement virulente, nous avons donc tiré profit de ce modèle naturel d'infection pour examiner *in vivo* l'efficacité de ces nouvelles molécules (Figure III.30). Après infection sous cutanée (sur la partie externe de l'oreille), une augmentation significative du temps de survie et une protection partielle comparée aux souris témoins a été observée après l'administration de **OL22** par voie intraveineuse (20 μ g dans 10 μ l de PBS 15 min, 6 h, 24 h et 48 h après l'infection). Au bout de 3 jours, alors que toutes les souris témoins sont mortes, plus de 70 % des souris traitées par le composé **OL22** sont restées en vie. Au bout de 14 jours, une survie de 30 % des souris traitées a été observée. De manière similaire, un retard de mortalité est obtenu dans le cas de l'infection par inhalation de spores avec des doses identiques de **OL22**. Mais aucune souris ne survie après 5 jours. Chacun de ces tests de pharmacodynamie a été réalisé sur des lots comportant 6 souris.

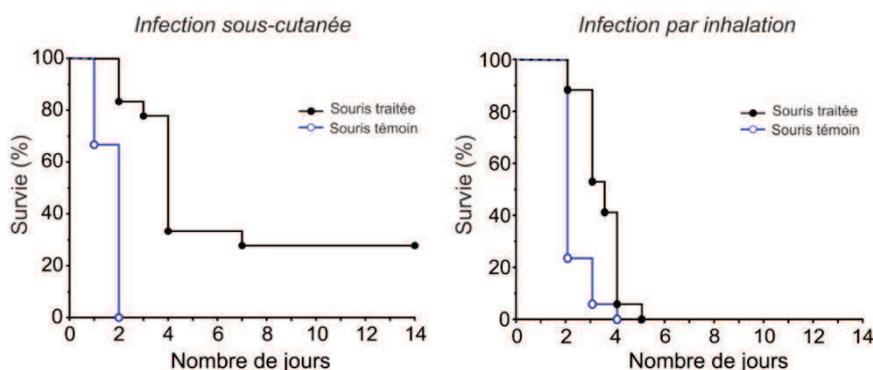


Figure III.30 : Efficacité *in vivo* de l'oligourée **OL22** (20 µg dans 10 µl de PBS 15 min, 6 h, 24 h et 48 h après infection) sur l'infection sous-cutanée et par inhalation par *B. anthracis*.

c) Modification de la longueur et du caractère amphiphile

Toujours dans le but d'améliorer potentiellement l'activité antimicrobienne, la dimérisation de **OL22** a été envisagée. En effet, dans le cadre du projet visant la conception de séquences d'oligourées amphipathiques originales pour le transport des acides nucléiques dans les cellules, l'équipe a récemment démontré que la dimérisation *via* un pont disulfure permettait de potentialiser ce transport sans cytotoxicité apparente [79].

Une première approche a donc consisté à suivre cette stratégie *via* la formation d'un pont disulfure de l'oligourée **OL42**, analogue de **OL22** (Figure III.31). L'oligomère **OL42** a été synthétisé par stratégie Boc avec un rendement après purification de 31 %. La terminaison cystéamine en extrémité « N-terminale » a été obtenue par le couplage du 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl(2-(tritylthio)éthyl)carbamate **M13** sous champs micro-ondes. Une fois purifié, **OL42** permet l'accès à l'homodimère **OL43** (Figure III.X) *via* l'activation du soufre par l'intermédiaire d'un nucléophile relais de type Bis(5-nitro-2-pyridyl) disulfide (NPYS)₂ en milieu tamponné [79]. Un rendement de 30 % après purification par HPLC est obtenu.

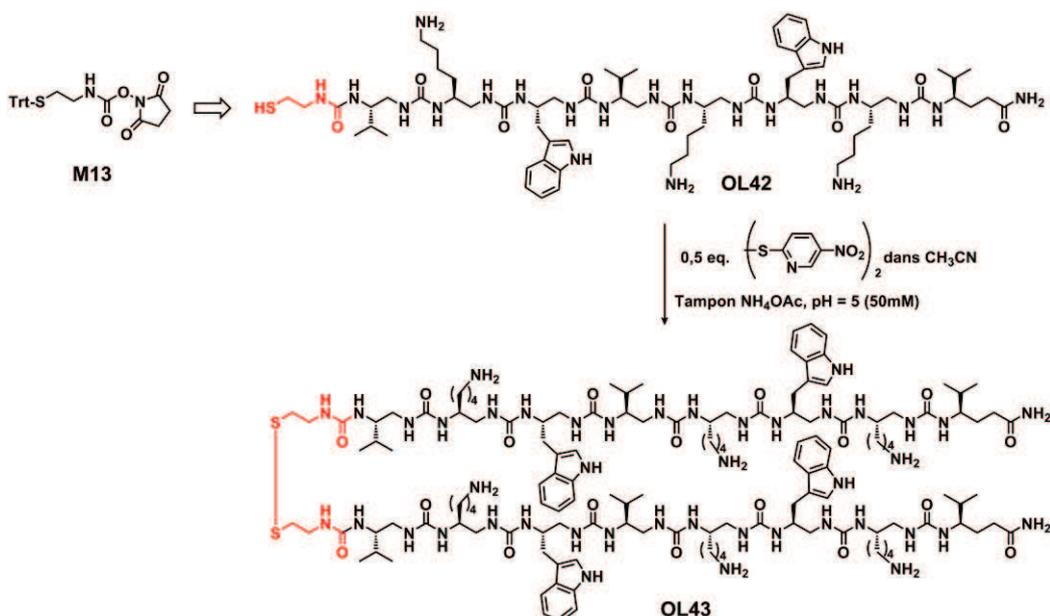


Figure III.31 : Structure chimique du composé **M13** et schéma de synthèse du dimère **OL43** à partir de **OL42**.

Une fois le composé **OL43** en main, l'activité anthracidale et sa toxicité *in vitro* ont pu être évaluées. D'excellents résultats ont été obtenus : des EC₅₀ de 0,2 µg/mL sur spores germées et de 1,2 µg/mL sur bacilles capsulés sont observées, soit une dose quinze fois inférieure au composé « monomérique » **OL22**. Toutefois, bien que très prometteuse *in vitro*, l'activité *in vivo* a été décevante. Aucune amélioration par rapport à **OL22** n'a été observée. Nous avons alors supposé qu'une dégradation du pont disulfure trop rapide *in vivo* (par des réactions d'échange thiol-disulfide par exemple) pourrait en être l'une des principales causes.

Pour pallier cette instabilité biologique, le composé **OL44** présentant cette fois un lien synthétique de type thioéther non réductible a été synthétisé. **OL44** a été préparé suivant les travaux publiés par le groupe de Horne avec l'utilisation d'un lien bis-bromoacétamide **M14** préalablement préparé (Schéma III.3) [115]. Après une mise au point nécessaire du procédé de dimérisation sur petite quantité (0,01 mmol), le dimère possédant un lien non-réductible a été isolé avec un rendement de 55 % après purification par HPLC semi-préparative.

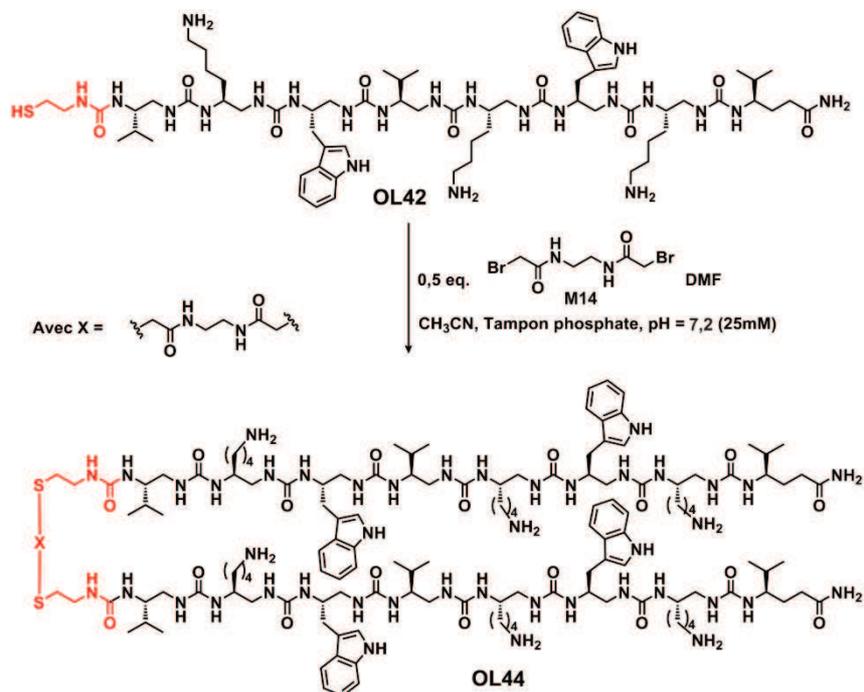


Schéma III.3 : Structure chimique du composé **M14** et schéma de synthèse du dimère **OL44** à partir de **OL42**.

Une fois de plus, d'excellents résultats ont été obtenus *in vitro* confirmant ici l'intérêt de la dimérisation de la séquence de **OL22** sur l'activité antimicrobienne. Des EC₅₀ de 0,2 µg/mL sur spores germées et de 0,5 µg/mL sur bacilles capsulés ont été obtenues (Figure III.32a). De

plus, le composé **OL44** possède une toxicité moins élevée par rapport à **OL22** par test MTT sur les macrophages de souris (Figure III.32b).

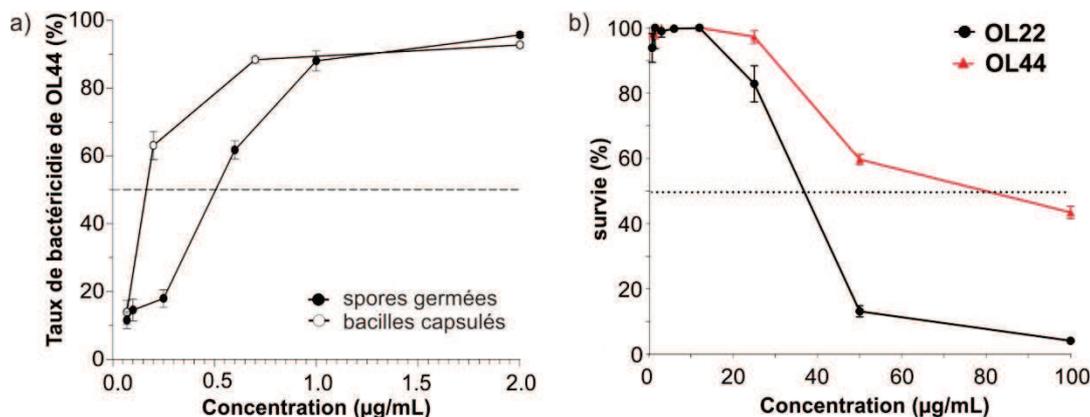


Figure III.32 : a) Taux de bactéricidie en fonction de la concentration du dimère **OL42** (rond plein sur spores germées ; rond vide sur bacilles capsulés) ; b) Mesure de la toxicité sur macrophage de souris (RAW) de **OL44** et **OL22** par test MTT.

Cependant l'activité *in vivo* de **OL44** bien que meilleure que celle de **OL41**, est derechef décevante comparée à l'amélioration obtenue *in vitro* (Figure III.33). L'activité de **OL44** est similaire à celle de l'unité « monomérique » **OL22**. Ce résultat démontre la difficulté de transposer des résultats *in vitro* à l'*in vivo*, qui a déjà été abordée dans le chapitre 1.

En effet, avec des doses d'oligourée identiques (c'est à dire 20 µg dans 10 µl de PBS 15 min, 6 h, 24 h et 48 h après infection) et après infection sous cutanée (sur la partie externe de l'oreille), la survie des souris est légèrement inférieure à celle obtenue avec **OL22**. Une protection partielle est toute de même obtenue puisque 20 % des souris traitées survivent à l'infection. Si l'infection a lieu par les voies respiratoires, de moins bons résultats sont obtenus. Aucune souris ne survie après 4 jours et le traitement par **OL44** ne permet de retarder la mort de la souris que d'un seul jour. Ces tests de pharmacodynamie ont également été réalisés sur un lot de 6 souris.

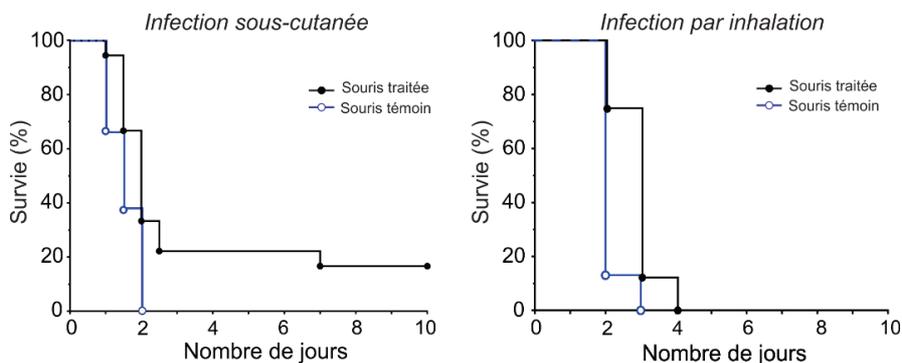


Figure III.33 : Efficacité *in vivo* de l'oligourée **OL44** (20 µg dans 10 µl de PBS 15 min, 6 h, 24 h et 48 h après infection) sur l'infection sous-cutanée et par inhalation par *B. anthracis*.

d) Développement de surfaces antimicrobiennes

Parallèlement à l'étude de relation structure-activité sur *Bacillus anthracis*, et en utilisant notre « savoir-faire » en chimie des thiols, nous avons cherché à fonctionnaliser des surfaces avec des oligomères antimicrobiens. La fonctionnalisation des hélices amphiphiles cationiques par une cystéamine terminale a donc été exploitée pour créer des surfaces d'or aux propriétés antimicrobiennes. Ce projet a été réalisé en collaboration avec le Dr. Humblot du laboratoire de réactivité de surface de l'UMPC à Paris. Nous avons souhaité réaliser le greffage de deux oligomères : **OL42** possédant la fonction thiol en «N-terminale» et **OL45** possédant la fonction thiol en position «C-terminale» (Figure III.34). La fonctionnalisation en position « C-terminale » est le fruit d'une méthodologie originale de synthèse sur support solide, inspirée des travaux de Quideau *et al.* [116].

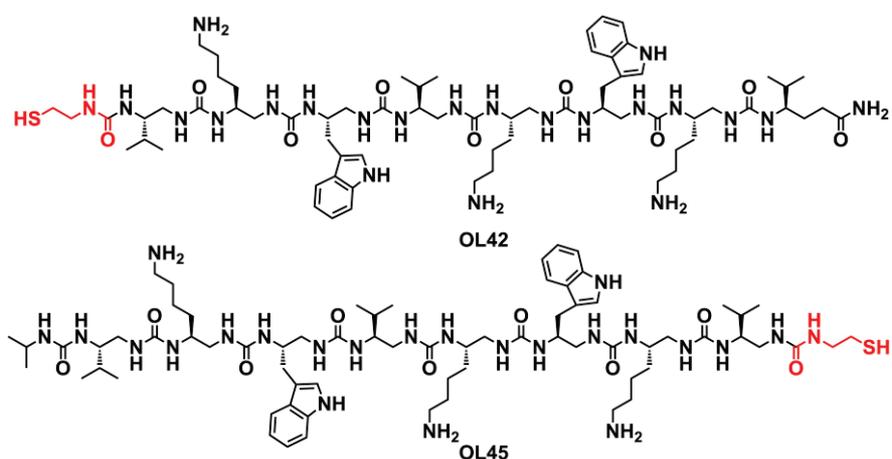


Figure III. 34 : Structures chimiques des oligomères **OL42** à **OL45**.

La préparation de l'oligomère **OL45** procède par le couplage de la cystéamine mono-protégée par un groupement Boc **M15** (préalablement préparée [117]), sur une résine de type MBHA, fonctionnalisée par une fonction acide carboxylique après condensation de l'anhydride succinique (schéma III.4). Une fois cette nouvelle résine fonctionnalisée, la synthèse de l'oligomère est réalisée sous champs micro-ondes de manière classique. L'oligomère thiol sera finalement « libéré » de la résine par la réduction du pont disulfure. Cette méthodologie a nécessité la mise au point d'une nouvelle protection temporaire de nos résidus de type lysine, qui étaient précédemment protégés sous forme de carbamate de chloro-benzyle (2-ClZ). En effet, le traitement post-synthèse par hydrogénolyse s'est avéré inefficace (même en présence de palladium sur sulfate de barium). Nous avons alors décidé d'utiliser une protection temporaire de type allyloxycarbonyl (alloc) compatible avec un traitement sur support solide et qui est facilement enlevée avec du phénylsilane et du palladium de (triphénylphosphine)tétrakis. Une fois le monomère Boc-Lys(Alloc)-Osu **M16**

(dont la synthèse est détaillée en partie expérimentale) en main, **OL45** a pu être synthétisé sur une échelle de 50 μmol avec un rendement après purification de 7 %. Le couplage de la cystamine sur la résine semble être l'étape limitante de cette méthodologie et son couplage avec l'anhydride succinique pourra être effectué au préalable en solution afin d'améliorer le rendement de synthèse.

Pour finir, le greffage des surfaces, la caractérisation des surfaces greffées avec ces deux oligomères par des techniques de spectroscopie de photoélectron (XPS) et d'infrarouge (PM-IRRAS) ainsi que la mesure de leurs efficacités antimicrobiennes sont actuellement en cours de réalisation.

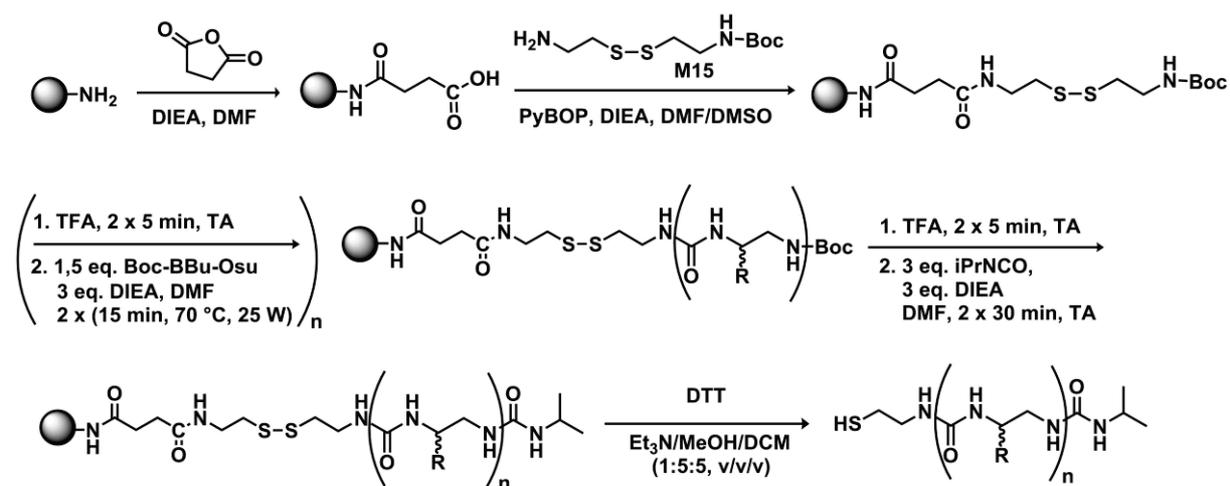


Schéma III. 4 : Schéma de synthèse de l'oligourée **OL45**.

En conclusion de ce chapitre, nous avons montré l'activité bactéricide *in vitro* et *in vivo* de plusieurs séquences innovantes de foldamères à base d'urées. Cette étude valide ainsi l'usage potentiel d'oligomères d'urées *N,N'*-liées en tant qu'agent thérapeutique antibactérien, notamment dans une potentielle application contre les résistances bactériennes aux antibiotiques. Nous avons appliqué les nouvelles méthodologies de synthèse développées dans le chapitre 2 afin de préparer de nouveaux analogues de **OL22**. Même s'il est toujours difficile de tirer des conclusions en matière de relation structure-activité au vue des phénomènes complexes et des multiples paramètres mis en jeu par ses oligomères membranolytiques, on remarque que l'activité anthracidale de nos composés est étroitement liée à la structuration hélicoïdale et que la composition du squelette aux extrémités « C-terminale » et « N-terminale » est déterminante. Plusieurs modifications de la partie « C-terminale » ont conduit à des composés plus efficaces, mais il reste à vérifier si ces effets sont additifs (comme par exemple en cumulant un lien thiourée et une chaîne imidazole en position 2). Les composés **OL23**, **OL35** possèdent des activités *in vitro* très

intéressantes et leurs applications *in vivo* pourront être envisagées. De plus, le développement de la synthèse d'oligourées comportant un groupement trifluorométhylène pourrait s'avérer utile pour l'étude du mode d'interaction de nos composés avec des modèles membranaires pertinents par RMN du fluor.

La première étude *in vivo* réalisée avec des composés antimicrobiens de type oligourée a été réalisée sur un modèle d'infection systémique chez la souris (*un manuscrit est en cours de finalisation*). L'étude pharmacocinétique de l'oligourée de référence tritiée [³H]-**OL22** montre qu'après injection par voie intraveineuse, une distribution rapide de la circulation sanguine aux organes puis une accumulation stable et sélective dans le rein de la souris ont lieu. Lors du traitement par **OL22** de l'infection par voie sous-cutanée et intranasale par *B. anthracis*, un retard de décès des souris est systématiquement observé. Une survie de 30 % est obtenue lors du traitement de l'infection en sous-cutanée. L'effet de la longueur de la chaîne a aussi été étudié par dimérisation de **OL22**. Si une nette amélioration des activités *in vitro* est observée, l'activité *in vivo* des dimères (**OL43-OL44**) est équivalente à celle de **OL22**. Ce résultat démontre l'importance des études *in vivo* dans le cadre de la recherche de nouveaux agents thérapeutiques et la difficulté de transposer les études *in vitro* à l'*in vivo*.

Enfin une nouvelle application des oligourées à visée antimicrobienne, à savoir la conception de surfaces d'or greffées a été initiée. Ce projet, toujours en cours, a permis la mise au point d'une nouvelle méthodologie de synthèse en stratégie Boc sur support solide qui permettrait à terme de s'affranchir de la coupure HF, limitation majeure de cette stratégie. De surcroît, cette nouvelle méthodologie pourra aussi être utilisée dans le cadre d'un projet visant à concevoir de nouvelles séquences oligourées amphipathiques originales pour le transport des acides nucléiques dans les cellules et de leurs multimérisations.

Bibliographie

- [1] P. Claudon, A. Violette, K. Lamour, M. Decossas, S. Fournel, B. Heurtault, J. Godet, Y. Mély, B. Jamart-Grégoire, M.-C. Averlant-Petit, J.-P. Briand, G. Duportail, H. Monteil, G. Guichard, Consequences of isostructural main-chain modifications for the design of antimicrobial foldamers: Helical mimics of host-defense peptides based on a heterogeneous amide/urea backbone, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49 (2010) 333-336.
- [2] A. Violette, S. Fournel, K. Lamour, O. Chaloin, B. Frisch, J.-P. Briand, H. Monteil, G. Guichard, Mimicking helical antibacterial peptides with nonpeptidic folding oligomers, *Chem. Biol.*, 13 (2006) 531-538.
- [3] J.A. Witkowski, L.C. Parish, The story of anthrax from antiquity to the present: A biological weapon of nature and humans, *Clinics in Dermatology*, 20 (2002) 336-342.
- [4] C. Davaine, Nouvelles recherches sur les infusoires du sang dans la maladie connue sous le nom de sang de rate, *C. R. Acad. Sci.*, 57 (1863) 220-223.
- [5] C. Davaine, Nouvelles recherches sur les infusoires du sang dans la maladie connue sous le nom de sang de rate, *C. R. Acad. Sci.*, 57 (1863) 351-353, 386-387.
- [6] P. Berche, Louis pasteur, from crystals of life to vaccination, *Clinical Microbiology and Infection*, 18, Supplement 5 (2012) 1-6.
- [7] M. Mock, A. Fouet, Anthrax, *Annu. Rev. Microbiol.*, 55 (2001) 647-671.
- [8] M. Mourez, D.B. Lacy, K. Cunningham, R. Legmann, B.R. Sellman, J. Mogridge, R.J. Collier, 2001: A year of major advances in anthrax toxin research, *Trends Microbiol.*, 10 (2002) 287-293.
- [9] F.M. LaForce, Anthrax, *Clinical Infectious Diseases*, 19 (1994) 1009-1014.
- [10] T.C. Dixon, M. Meselson, J. Guillemin, P.C. Hanna, Anthrax, *N. Engl. J. Med.*, 341 (1999) 815-826.
- [11] C.A. Hart, N.J. Beeching, A spotlight on anthrax, *Clinics in Dermatology*, 20 (2002) 365-375.
- [12] P. Pandey, M.S. Packiyaraj, H. Nigam, G.S. Agarwal, B. Singh, M.K. Patra, Antimicrobial properties of CuO nanorods and multi-armed nanoparticles against *B. anthracis* vegetative cells and endospores, *Beilstein J. Nanotechnol.*, 5 (2014) 789-800.
- [13] H. Liu, N.H. Bergman, B. Thomason, S. Shallom, A. Hazen, J. Crossno, D.A. Rasko, J. Ravel, T.D. Read, S.N. Peterson, J. Yates, P.C. Hanna, Formation and composition of the *Bacillus anthracis* endospore, *J. Bacteriol.*, 186 (2004) 164-178.
- [14] A. Driks, The *Bacillus anthracis* spore, *Mol. Aspects Med.*, 30 (2009) 368-373.
- [15] A.M. Friedlander, Diagnosis and treatment of cutaneous anthrax, *Jama-Journal of the American Medical Association*, 288 (2002) 43-44.
- [16] M.E. Beatty, D.A. Ashford, P.M. Griffin, R.V. Tauxe, J. Sobel, Gastrointestinal anthrax: Review of the literature, *Archives of Internal Medicine*, 163 (2003) 2527-2531.
- [17] J.E.C. Holty, D.M. Bravata, H. Liu, R.A. Olshen, K.M. McDonald, D.K. Owens, Systematic review: A century of inhalational anthrax cases from 1900 to 2005, *Ann. Intern. Med.*, 144 (2006) 270-280.
- [18] I.J. Glomski, A. Piris-Gimenez, M. Huerre, M. Mock, P.L. Goossens, Primary involvement of pharynx and peyer's patch in inhalational and intestinal anthrax, *PLoS Pathog*, 3 (2007) e76.
- [19] Z.P. Weiner, I.J. Glomski, Updating perspectives on the initiation of *Bacillus anthracis* growth and dissemination through its host, *Infect. Immun.*, 80 (2012) 1626-1633.
- [20] C. Guidi-Rontani, M. Weber-Levy, E. Labruyère, M. Mock, Germination of *Bacillus anthracis* spores within alveolar macrophages, *Mol. Microbiol.*, 31 (1999) 9-17.
- [21] C. Guidi-Rontani, The alveolar macrophage: The trojan horse of *Bacillus anthracis*, *Trends Microbiol.*, 10 (2002) 405-409.
- [22] P.L. Goossens, Animal models of human anthrax: The quest for the holy grail, *Mol. Aspects Med.*, 30 (2009) 467-480.
- [23] J.-P. Corre, A. Piris-Gimenez, M. Moya-Nilges, G. Jouvion, A. Fouet, I.J. Glomski, M. Mock, J.-C. Sirard, P.L. Goossens, In vivo germination of *Bacillus anthracis* spores during murine cutaneous infection, *J. Infect. Dis.*, 207 (2013) 450-457.
- [24] T. Candela, A. Fouet, *Bacillus anthracis* capd, belonging to the γ -glutamyltranspeptidase family, is required for the covalent anchoring of capsule to peptidoglycan, *Mol. Microbiol.*, 57 (2005) 717-726.
- [25] M. Drysdale, S. Heninger, J. Hutt, Y. Chen, C.R. Lyons, T.M. Koehler, Capsule synthesis by *Bacillus anthracis* is required for dissemination in murine inhalation anthrax, 2005.
- [26] M. Moayeri, S.H. Leppla, The roles of anthrax toxin in pathogenesis, *Curr. Opin. Microbiol.*, 7 (2004) 19-24.
- [27] S. Liu, M. Moayeri, S.H. Leppla, Anthrax lethal and edema toxins in anthrax pathogenesis, *Trends Microbiol.*, 22 (2014) 317-325.
- [28] F. Tonello, C. Montecucco, The anthrax lethal factor and its MAPK kinase-specific metalloprotease activity, *Mol. Aspects Med.*, 30 (2009) 431-438.
- [29] F. Tonello, M. Seveso, O. Marin, M. Mock, C. Montecucco, Pharmacology: Screening inhibitors of anthrax lethal factor, *Nature*, 418 (2002) 386-386.

- [30] J.N. Tournier, A. Quesnel-Hellmann, J. Mathieu, C. Montecucco, W.J. Tang, M. Mock, D.R. Vidal, P.L. Goossens, Anthrax edema toxin cooperates with lethal toxin to impair cytokine secretion during infection of dendritic cells, *J. Immunol.*, 174 (2005) 4934-4941.
- [31] R. Pellizzari, C. Guidi-Rontani, G. Vitale, M. Mock, C. Montecucco, Anthrax lethal factor cleaves MKK3 in macrophages and inhibits the LPS/IFN γ -induced release of NO and TNF α , *FEBS Lett.*, 462 (1999) 199-204.
- [32] P. Ascenzi, P. Visca, G. Ippolito, A. Spallarossa, M. Bolognesi, C. Montecucco, Anthrax toxin: A tripartite lethal combination, *FEBS Lett.*, 531 (2002) 384-388.
- [33] S.H. Leppla, Anthrax toxin edema factor: A bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79 (1982) 3162-3166.
- [34] M. Mock, A. Ullmann, Calmodulin-activated bacterial adenylate cyclases as virulence factors, *Trends Microbiol.*, 1 (1993) 187-192.
- [35] K.A. Bradley, J. Mogridge, M. Mourez, R.J. Collier, J.A.T. Young, Identification of the cellular receptor for anthrax toxin, *Nature*, 414 (2001) 225-229.
- [36] J. Jiang, B.L. Pentelute, R.J. Collier, Z.H. Zhou, Atomic structure of anthrax protective antigen pore elucidates toxin translocation, *Nature*, 521 (2015) 545-549.
- [37] J.A.T. Young, R.J. Collier, Anthrax toxin: Receptor binding, internalization, pore formation, and translocation, *Annu. Rev. Biochem.*, 76 (2007) 243-265.
- [38] A.M. Friedlander, S.F. Little, Advances in the development of next-generation anthrax vaccines, *Vaccine*, 27, Supplement 4 (2009) D28-D32.
- [39] M. Sterne, Avirulent anthrax vaccine, *The Onderstepoort journal of veterinary science and animal industry*, 21 (1946) 41-43.
- [40] P.C.B. Turnbull, Anthrax vaccines: Past, present and future, *Vaccine*, 9 (1991) 533-539.
- [41] R.N. Brey, Molecular basis for improved anthrax vaccines, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 57 (2005) 1266-1292.
- [42] Y.P. Gauthier, J.-N. Tournier, J.-C. Paucod, J.-P. Corre, M. Mock, P.L. Goossens, D.R. Vidal, Efficacy of a vaccine based on protective antigen and killed spores against experimental inhalational anthrax, *Infect. Immun.*, 77 (2009) 1197-1207.
- [43] D.G. Bouzianas, Current and future medical approaches to combat the anthrax threat, *J. Med. Chem.*, 53 (2010) 4305-4331.
- [44] I. Chopra, P.M. Hawkey, M. Hinton, Tetracyclines, molecular and clinical aspects, *J. Antimicrob. Chemother.*, 29 (1992) 245-277.
- [45] X.S. Pan, J. Ambler, S. Mehtar, L.M. Fisher, Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *streptococcus pneumoniae*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40 (1996) 2321-2326.
- [46] A. Sugino, C.L. Peebles, K.N. Kreuzer, N.R. Cozzarelli, Mechanism of action of nalidixic acid: Purification of *escherichia coli nalA* gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74 (1977) 4767-4771.
- [47] G. Hess, U.S. Not ready for bioattack cleanup, in: *Chemical & Engineering News*, vol. April 26, American Chemical Society, 2010, pp. 30.
- [48] L.B. Price, A. Vogler, T. Pearson, J.D. Busch, J.M. Schupp, P. Keim, *In vitro* selection and characterization of *Bacillus anthracis* mutants with high-level resistance to ciprofloxacin, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47 (2003) 2362-2365.
- [49] I. Brook, T.B. Elliott, H.I. Pryor, T.E. Sautter, B.T. Gnade, J.H. Thakar, G.B. Knudson, *In vitro* resistance of *Bacillus anthracis* Sterne to doxycycline, macrolides and quinolones, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 18 (2001) 559-562.
- [50] D. Zakowska, M. Bartoszcze, M. Niemcewicz, A. Bielawska-Drozd, J. Knap, P. Cieslik, K. Chomiczewski, J. Kocik, *Bacillus anthracis* infections - new possibilities of treatment, *Ann. Agr. Env. Med.*, 22 (2015) 202-207.
- [51] T.-S. Migone, G.M. Subramanian, J. Zhong, L.M. Healey, A. Corey, M. Devalaraja, L. Lo, S. Ullrich, J. Zimmerman, A. Chen, M. Lewis, G. Meister, K. Gillum, D. Sanford, J. Mott, S.D. Bolmer, Raxibacumab for the treatment of inhalational anthrax, *N. Engl. J. Med.*, 361 (2009) 135-144.
- [52] R. Schuch, D. Nelson, V.A. Fischetti, A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*, *Nature*, 418 (2002) 884-889.
- [53] P. Yoong, R. Schuch, D. Nelson, V.A. Fischetti, Plyph, a bacteriolytic enzyme with a broad pH range of activity and lytic action against *Bacillus anthracis*, *J. Bacteriol.*, 188 (2006) 2711-2714.
- [54] V.A. Fischetti, D. Nelson, R. Schuch, Reinventing phage therapy: Are the parts greater than the sum?, *Nat. Biotechnol.*, 24 (2006) 1508-1511.
- [55] Dell, I. Aica, M. Donà, F. Tonello, A. Piris, M. Mock, C. Montecucco, S. Garbisa, Potent inhibitors of anthrax lethal factor from green tea, *EMBO reports*, 5 (2004) 418-422.
- [56] M. Moayeri, D. Crown, G.-S. Jiao, S. Kim, A. Johnson, C. Leysath, S.H. Leppla, Small-molecule inhibitors of lethal factor protease activity protect against anthrax infection, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57 (2013) 4139-4145.

- [57] M. Forino, S. Johnson, T.Y. Wong, D.V. Rozanov, A.Y. Savinov, W. Li, R. Fattorusso, B. Becattini, A.J. Orry, D. Jung, R.A. Abagyan, J.W. Smith, K. Alibek, R.C. Liddington, A.Y. Strongin, M. Pellecchia, Efficient synthetic inhibitors of anthrax lethal factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102 (2005) 9499-9504.
- [58] C. Kim, N. Gajendran, H.-W. Mittrücker, M. Weiwad, Y.-H. Song, R. Hurwitz, M. Wilmanns, G. Fischer, S.H.E. Kaufmann, Human α -defensins neutralize anthrax lethal toxin and protect against its fatal consequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102 (2005) 4830-4835.
- [59] W. Wang, C. Mulakala, S.C. Ward, G. Jung, H. Luong, D. Pham, A.J. Waring, Y. Kaznessis, W. Lu, K.A. Bradley, R.I. Lehrer, Retrocyclins kill bacilli and germinating spores of *Bacillus anthracis* and inactivate anthrax lethal toxin, *J. Biol. Chem.*, 281 (2006) 32755-32764.
- [60] S. Welkos, C.K. Cote, U. Hahn, O. Shastak, J. Jedermann, J. Bozue, G. Jung, P. Ruchala, P. Pratikhya, T. Tang, R.I. Lehrer, W. Beyer, Humanized θ -defensins (retrocyclins) enhance macrophage performance and protect mice from experimental anthrax infections, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 55 (2011) 4238-4250.
- [61] R.M. Dawson, M.A. Fox, H.S. Atkins, C.-Q. Liu, Potent antimicrobial peptides with selectivity for *Bacillus anthracis* over human erythrocytes, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 38 (2011) 237-242.
- [62] M.W. Lisanby, M.K. Swiecki, B.L.P. Dizon, K.J. Pflughoeft, T.M. Koehler, J.F. Kearney, Cathelicidin administration protects mice from *Bacillus anthracis* spore challenge, *J. Immunol.*, 181 (2008) 4989-5000.
- [63] J.E. Thwaite, S. Hibbs, R.W. Titball, T.P. Atkins, Proteolytic degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Bacillus anthracis* may contribute to virulence, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50 (2006) 2316-2322.
- [64] Y. Niu, S. Padhee, H. Wu, G. Bai, L. Harrington, W.N. Burda, L.N. Shaw, C. Cao, J. Cai, Identification of γ -AApeptides with potent and broad-spectrum antimicrobial activity, *Chem. Commun.*, 47 (2011) 12197-12199.
- [65] C. Douat-Casassus, K. Pulka, P. Claudon, G. Guichard, Microwave-enhanced solid-phase synthesis of *N,N'*-linked aliphatic oligoureas and related hybrids, *Org. Lett.*, 14 (2012) 3130-3133.
- [66] Y.-R. Nelli, C. Douat-Casassus, P. Claudon, B. Kauffmann, C. Didierjean, G. Guichard, An activated building block for the introduction of the histidine side-chain in aliphatic oligourea foldamers, *Tetrahedron*, (2012) in press.
- [67] F. Brossier, M. Weber-Levy, M. Mock, J.-C. Sirard, Role of toxin functional domains in anthrax pathogenesis, *Infect. Immun.*, 68 (2000) 1781-1786.
- [68] A. Piris-Gimenez, J.-P. Corre, G. Jouvion, T. Candela, H. Khun, P.L. Goossens, Encapsulated *Bacillus anthracis* interacts closely with liver endothelium, *J. Infect. Dis.*, 200 (2009) 1381-1389.
- [69] M. Berthier, J.-L. Fauchère, J. Perrin, B. Grignon, D. Oriot, Fulminant meningitis due to *Bacillus anthracis* in 11-year-old girl during ramadan, *The Lancet*, 347 (1996) 828.
- [70] J.D. Ristroph, B.E. Ivins, Elaboration of *Bacillus-anthraxis* antigens in a new, defined culture-medium, *Infect. Immun.*, 39 (1983) 483-486.
- [71] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, 65 (1983) 55-63.
- [72] C. Douat-Casassus, T. Darbre, J.-L. Reymond, Selective catalysis with peptide dendrimers, *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (2004) 7817-7826.
- [73] B.S. Fowler, P.J. Mikochik, S.J. Miller, Peptide-catalyzed kinetic resolution of formamides and thioformamides as an entry to nonracemic amines, *J. Am. Chem. Soc.*, 132 (2010) 2870-2871.
- [74] C.O. Pabo, E. Peisach, R.A. Grant, Design and selection of novel Cys₂His₂ zinc finger proteins, *Annu. Rev. Biochem.*, 70 (2001) 313-340.
- [75] Y. Lu, N. Yeung, N. Sieracki, N.M. Marshall, Design of functional metalloproteins, *Nature*, 460 (2009) 855-862.
- [76] D.E. Robertson, R.S. Farid, C.C. Moser, J.L. Urbauer, S.E. Mulholland, R. Pidikiti, J.D. Lear, A.J. Wand, W.F. DeGrado, P.L. Dutton, Design and synthesis of multi-haem proteins, *Nature*, 368 (1994) 425-432.
- [77] C.T. Choma, J.D. Lear, M.J. Nelson, P.L. Dutton, D.E. Robertson, W.F. DeGrado, Design of a heme-binding four-helix bundle, *J. Am. Chem. Soc.*, 116 (1994) 856-865.
- [78] P. Midoux, A. Kichler, V. Boutin, J.-C. Maurizot, M. Monsigny, Membrane permeabilization and efficient gene transfer by a peptide containing several histidines, *Bioconjugate Chem.*, 9 (1998) 260-267.
- [79] C. Douat, C. Aisenbrey, S. Antunes, M. Decossas, O. Lambert, B. Bechinger, A. Kichler, G. Guichard, A cell-penetrating foldamer with a bio-reducible linkage for intracellular delivery of DNA, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 127 (2015) 11285-11289.
- [80] Sónia T. Henriques, Manuel N. Melo, Miguel A R B. Castanho, Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: How different are they?, *Biochem. J.*, 399 (2006) 1-7.
- [81] J.G. Rodriguez Plaza, R. Morales-Nava, C. Diener, G. Schreiber, Z.D. Gonzalez, M.T. Lara Ortiz, I. Ortega Blake, O. Pantoja, R. Volkmer, E. Klipp, A. Herrmann, G. Del Rio, Cell penetrating peptides and cationic antibacterial peptides: Two sides of the same coin, *J. Biol. Chem.*, (2014).
- [82] S. Sandgren, A. Wittrup, F. Cheng, M. Jonsson, E. Eklund, S. Busch, M. Belting, The human antimicrobial peptide LL-37 transfers extracellular DNA plasmid to the nuclear compartment of mammalian cells *via* lipid rafts and proteoglycan-dependent endocytosis, *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 17951-17956.

- [83] J.L. Markley, Observation of histidine residues in proteins by nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Acc. Chem. Res.*, 8 (1975) 70-80.
- [84] M. Dathe, T. Wieprecht, Structural features of helical antimicrobial peptides: Their potential to modulate activity on model membranes and biological cells, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1462 (1999) 71-87.
- [85] P. Claudon, Synthèse, structure, et propriétés d'interaction de foldamères d'urée à repliement hélicoïdal contrôlé, in, Université de Strasbourg, 2010.
- [86] M. Dathe, H. Nikolenko, J. Meyer, M. Beyermann, M. Bienert, Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge, *FEBS Lett.*, 501 (2001) 146-150.
- [87] P.A. Wender, W.C. Galliher, E.A. Goun, L.R. Jones, T.H. Pillow, The design of guanidinium-rich transporters and their internalization mechanisms, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 60 (2008) 452-472.
- [88] Y. Chen, M.T. Guarnieri, A.I. Vasil, M.L. Vasil, C.T. Mant, R.S. Hodges, Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of α -helical antimicrobial peptides, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51 (2007) 1398-1406.
- [89] D. Liu, W.F. DeGrado, *De novo* design, synthesis, and characterization of antimicrobial β -peptides, *J. Am. Chem. Soc.*, 123 (2001) 7553-7559.
- [90] J.A. Patch, A.E. Barron, Helical peptoid mimics of magainin-2 amide, *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (2003) 12092-12093.
- [91] D.I. Chan, E.J. Prenner, H.J. Vogel, Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1758 (2006) 1184-1202.
- [92] B. Koksich, N. Sewald, H.J. Hofmann, K. Burger, H.D. Jakubke, Proteolytically stable peptides by incorporation of α -Tfm amino acids, *J. Pept. Sci.*, 3 (1997) 157-167.
- [93] J. Xiao, B. Weisblum, P. Wipf, Electrostatic versus steric effects in peptidomimicry: Synthesis and secondary structure analysis of gramicidin S analogues with (E)-alkene peptide isosteres, *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (2005) 5742-5743.
- [94] K. Koch, S. Afonin, M. Ieronimo, M. Berditsch, A. Ulrich, Solid-state ^{19}F -NMR of peptides in native membranes, in: J.C.C. Chan (Ed.) *Solid state NMR*, vol. 306, Springer Berlin Heidelberg, 2012, pp. 89-118.
- [95] H.N. Christensen, D.L. Oxender, The acid strength of the amino group as a factor in the transport of amino acids, *Biochim. Biophys. Acta*, 74 (1963) 386-391.
- [96] J. Pytkowicz, O. Stephany, S. Marinkovic, S. Inagaki, T. Brigaud, Straightforward synthesis of enantiopure (R)- and (S)-trifluoroalaninol, *Org. Biomol. Chem.*, 8 (2010) 4540-4542.
- [97] A. DalPozzo, M. Ni, L. Muzi, A. Caporale, R. de Castiglione, B. Kaptein, Q.B. Broxterman, F. Formaggio, Amino acid bromides: Their n-protection and use in the synthesis of peptides with extremely difficult sequences, *J. Org. Chem.*, 67 (2002) 6372-6375.
- [98] D. Maisch, P. Wadhvani, S. Afonin, C. Böttcher, B. Koksich, A.S. Ulrich, Chemical labeling strategy with (R)- and (S)-trifluoromethylalanine for solid state ^{19}F NMR analysis of peptaibols in membranes, *J. Am. Chem. Soc.*, 131 (2009) 15596-15597.
- [99] G. Chaume, N. Lensen, C. Caupène, T. Brigaud, Convenient synthesis of N-terminal Tfm-dipeptides from unprotected enantiopure α -Tfm-proline and α -Tfm-alanine, *Eur. J. Org. Chem.*, 2009 (2009) 5717-5724.
- [100] J. Fremaux, L. Fischer, T. Arbogast, B. Kauffmann, G. Guichard, Condensation approach to aliphatic oligourea foldamers: Helices with N-(pyrrolidin-2-ylmethyl)ureido junctions, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50 (2011) 11382-11385.
- [101] J. Fremaux, B. Kauffmann, G. Guichard, Synthesis and folding propensity of aliphatic oligoureas containing repeats of proline-type units, *J. Org. Chem.*, 79 (2014) 5494-5502.
- [102] M.A. Schmitt, B. Weisblum, S.H. Gellman, Unexpected relationships between structure and function in α,β -peptides: Antimicrobial foldamers with heterogeneous backbones, *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (2004) 6848-6849.
- [103] B.P. Mowery, S.E. Lee, D.A. Kissounko, R.F. Eppard, R.M. Eppard, B. Weisblum, S.S. Stahl, S.H. Gellman, Mimicry of antimicrobial host-defense peptides by random copolymers, *J. Am. Chem. Soc.*, 129 (2007) 15474-15476.
- [104] I. Zelezetsky, A. Tossi, Alpha-helical antimicrobial peptides—using a sequence template to guide structure–activity relationship studies, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1758 (2006) 1436-1449.
- [105] Z. Oren, Y. Shai, Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin: Structure–function study, *Biochemistry*, 36 (1997) 1826-1835.
- [106] J. Solà, G.A. Morris, J. Clayden, Measuring screw-sense preference in a helical oligomer by comparison of ^{13}C NMR signal separation at slow and fast exchange, *J. Am. Chem. Soc.*, 133 (2011) 3712-3715.
- [107] J. Maury, B.A.F. Le Bailly, J. Raftery, J. Clayden, Conformational cooperativity between helical domains of differing geometry in oligoamide-oligourea foldamer chimeras, *Chem. Commun.*, 51 (2015) 11802-11805.
- [108] V. Semetey, D. Rognan, C. Hemmerlin, R. Graff, J.-P. Briand, M. Marraud, G. Guichard, Stable helical secondary structure in short-chain N,N'-linked oligoureas bearing proteinogenic side chains, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41 (2002) 1893-1895.
- [109] W. Zhang, J. Li, L.-W. Liu, K.-R. Wang, J.-J. Song, J.-X. Yan, Z.-Y. Li, B.-Z. Zhang, R. Wang, A novel analog of antimicrobial peptide polybia-MPI, with thioamide bond substitution, exhibits increased therapeutic efficacy against cancer and diminished toxicity in mice, *Peptides*, 31 (2010) 1832-1838.

- [110] B. Bak, C. Dambmann, F. Nicolaisen, Hydrogen-deuterium exchange in tryptophan, *Acta Chem. Scand.*, 21 (1967) 1674-1675.
- [111] B. Bak, J.J. Led, E.J. Pedersen, Isotopic labelling of tryptophan and tryptophan residues in polypeptides, *Acta Chem. Scand.*, 23 (1969) 3051-3054.
- [112] H. Wiegand, B. Wirz, A. Schweitzer, G.P. Camenisch, M.I. Rodriguez Perez, G. Gross, R. Woessner, R. Voges, P.I. Arvidsson, J. Frackenpohl, D. Seebach, The outstanding metabolic stability of a ¹⁴C-labeled β -nonapeptide in rats – *in vitro* and *in vivo* pharmacokinetic studies, *Biopharm. Drug Dispos.*, 23 (2002) 251-262.
- [113] J. Seo, G. Ren, H. Liu, Z. Miao, M. Park, Y. Wang, T.M. Miller, A.E. Barron, Z. Cheng, *In vivo* biodistribution and small animal PET of ⁶⁴Cu-labeled antimicrobial peptoids, *Bioconjugate Chem.*, 23 (2012) 1069-1079.
- [114] H. Wiegand, B. Wirz, A. Schweitzer, G. Gross, M.I.R. Perez, H. Andres, T. Kimmerlin, M. Rueping, D. Seebach, Pharmacokinetic investigation of a ¹⁴C-labelled β^3/α tetrapeptide in rats, *Chem. Biodivers.*, 1 (2004) 1812-1828.
- [115] J.K. Staples, K.M. Oshaben, W.S. Horne, A modular synthetic platform for the construction of protein-based supramolecular polymers *via* coiled-coil self-assembly, *Chem. Sci.*, 3 (2012) 3387-3392.
- [116] S. Quideau, C. Douat-Casassus, D.M. Delannoy López, C. Di Primo, S. Chassaing, R. Jacquet, F. Saltel, E. Genot, Binding of filamentous actin and winding into fibrillar aggregates by the polyphenolic C-glucosidic ellagitannin vescalagin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50 (2011) 5099-5104.
- [117] Q. Sun, Z. Kang, L. Xue, Y. Shang, Z. Su, H. Sun, Q. Ping, R. Mo, C. Zhang, A collaborative assembly strategy for tumor-targeted siRNA delivery, *J. Am. Chem. Soc.*, 137 (2015) 6000-6010.

CHAPITRE 4

Etude du mécanisme d'interaction des
oligourées *N,N'*-liées avec des
membranes lipidiques modèles

Après avoir étudié la relation structure-activité des oligourées *N,N'*-liées sur *B. anthracis* et riche des différentes expertises mises à disposition au laboratoire CBMN, nous avons tenté de mieux comprendre leurs interactions avec des modèles membranaires lipidiques simples. De manière plus précise, nous avons voulu étudier les interactions des oligourées **OL22** et **OL33** (cf. chapitre 3, Figure IV.4). Il existe en effet entre ces deux composés une différence significative d'activité antimicrobienne (EC_{50} de 3 et 10,9 $\mu\text{g/mL}$ pour **OL22** et **OL33** respectivement avec un taux de bactéricidie à 10 $\mu\text{g/mL}$ de 90 % et 46 % pour **OL22** et **OL33** respectivement) et ce malgré une propension hélicoïdale comparable (étudiée par CD et RMN du proton), laissant à penser que la diminution du nombre et de l'accessibilité des NHs urées en position « N-terminale » (sites de reconnaissance d'anions) imposée par la présence des pyrrolidines pourrait diminuer l'interaction de ces molécules avec les membranes bactériennes.

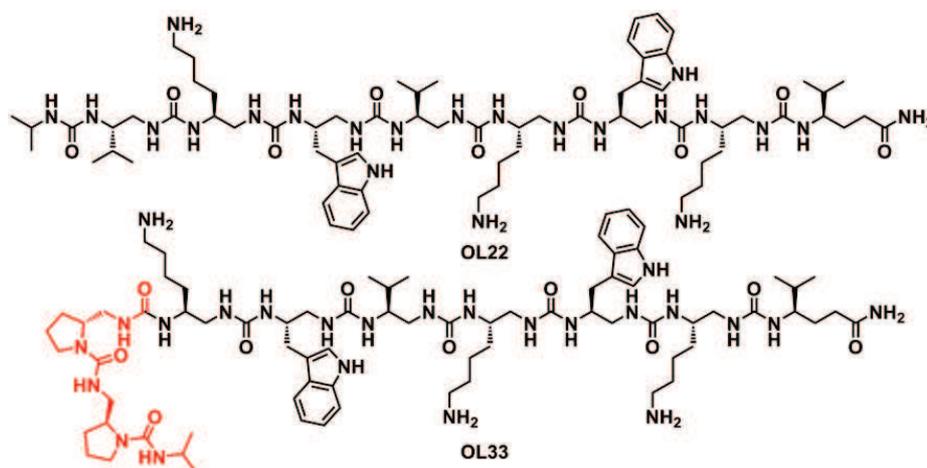


Figure IV.1 : Structures chimiques des deux oligourées étudiées **OL22** et **OL33**.

L'étude détaillée de l'interaction de peptides antimicrobiens naturels et notamment des AMPs hélicoïdaux avec des lipides membranaires fait état d'un grand nombre de publications. Cependant, jusqu'à aujourd'hui peu de travaux ont été réalisés à partir de mimes synthétiques d'AMPs. Pourtant, une meilleure compréhension des aspects généraux de l'interaction entre les lipides constituant les membranes mais aussi de la relation entre ces interactions et leurs fonctions biologiques permettraient à terme de pouvoir prédire et d'optimiser les séquences pour une activité bien définie. Dans le cadre de cette thèse et afin d'étudier l'interaction des foldamères à base d'urées avec des modèles membranaires, différentes techniques spectroscopiques ont été mises en œuvre tels que la fluorescence, la Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier en Réflexion Totale Atténuée (ATR-FTIR), et la RMN à l'état solide. Ce dernier volet est le fruit de plusieurs collaborations : avec l'équipe de Spectroscopie et Imagerie de Peptides Actifs sur les Membranes, dirigée par le

Dr. Lecomte à CBMN et avec l'équipe Biophysique des Assemblages Membranaires, dirigée par le Dr. Dufourc à CBMN.

1. Les membranes biologiques

a) La membrane cellulaire des mammifères

Le modèle de membrane cellulaire aujourd'hui communément accepté est celui de la « mosaïque fluide », proposé en 1972 par Singer et Nicolson [1,2]. Ce concept envisage la membrane comme un double feuillet fluide et dynamique, composé de phospholipides et de cholestérol, et associé à des protéines (périphériques ou intégrales) distribuées asymétriquement à la surface de la membrane (Figure IV.2a). La distribution des lipides est asymétrique entre le feuillet exoplasmique et le feuillet cytoplasmique (Figure IV.2b) [3,4]. Le feuillet lipidique externe de la membrane est majoritairement composé de lipides zwitterioniques de type phosphatidylcholine (PC) et de sphingomyélines (SM). Le lipide zwitterionique de type phosphatidyléthanolamine (PE) et le lipide phosphatidylsérine (PS) chargé négativement composent principalement le feuillet interne de la bicouche lipidique (les séquences chimiques de ces lipides sont décrites en partie expérimentale, Figure EP.52). Plus récemment, Simons *et al.* ont suggéré la présence de «radeaux lipidiques» ("rafts") [1,5]. Ce sont des micro-domaines enrichis en cholestérol et SM mais appauvris en PC, qui sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires, allant du trafic membranaire, de la morphogenèse cellulaire à la transduction des signaux.

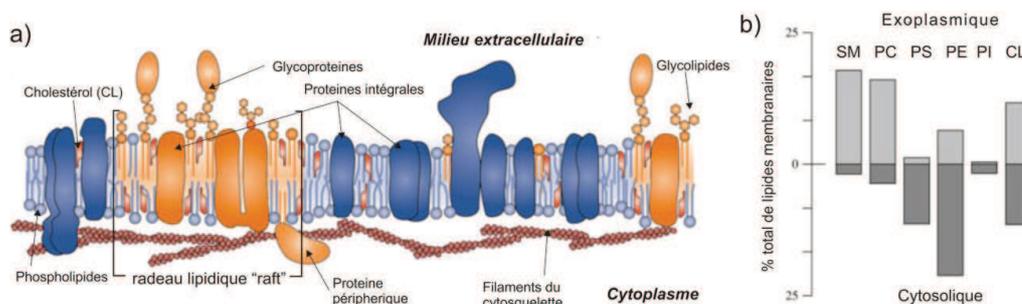


Figure IV.2 : a) Modèle d'une membrane cellulaire mammalienne [6] ; b) Distribution asymétrique des lipides dans la membrane [3].

b) La membrane bactérienne

La composition membranaire entre les parois des bactéries de type Gram-positif et Gram-négatif sont différentes (Figure IV.3) [7,8]. De manière non exhaustive, les bactéries de type Gram-négatif contiennent deux membranes discrètes alors que les bactéries de type Gram-positif n'en contiennent qu'une. La membrane externe des bactéries Gram-négatif est une bicouche asymétrique. Le feuillet externe de cette bicouche est composé de lipopolysaccharides de glycolipides (LPS), lipide complexe chargé négativement alors que le

feuillet interne est constitué de phospholipides identiques à ceux de la membrane cytoplasmique intérieure. Au sein de cette « membrane externe » se trouvent associés au moins deux types de protéines spécifiques : certaines sont dites protéines de structure car elles consolident la membrane externe ; d'autres, appelées « porines » permettent le passage des petites molécules hydrophiles et en particulier des antibiotiques (β -lactamines, tétracyclines, quinolones *etc.*). Enfin, les bactéries Gram-négatif ne possèdent qu'une seule ou au plus, deux couches de peptidoglycane.

Le peptidoglycane est un polymère formé de trois éléments différents : une épine dorsale faite d'une alternance de *N*-acétylglucosamine et d'acide *N*-acétylmuramique, et de chaînes latérales peptidiques identiques. L'ensemble est ramifié par des « ponts inter-peptidiques ». L'épine dorsale est la même pour toutes les espèces bactériennes tandis que les chaînes latérales peptidiques et les ponts inter-peptidiques varient d'une espèce à l'autre. Les lipoprotéines de Braun sont le lien entre le peptidoglycane et la « membrane externe ». Enfin, le LPS est composé du lipide A, d'un noyau polysaccharidique et d'une chaîne O très variable (Figure IV.3). Le « lipide A » est toxique. Cette endotoxine spécifique aux bactéries Gram-négatif est libérée dans le milieu environnant lors de la lyse bactérienne sous l'effet, le plus souvent, du système immunitaire.

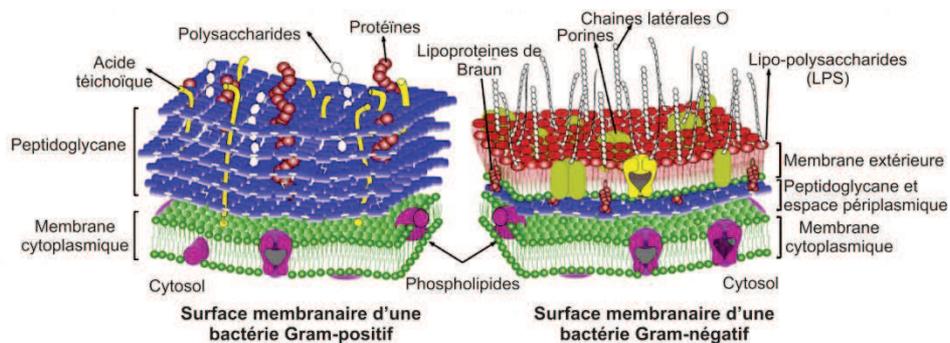


Figure IV.3 : Représentation schématique des membranes des bactéries Gram-positif et Gram-négatif [9].

La bactérie de type Gram-positif possède, quant à elle, de nombreuses couches de peptidoglycane qui peuvent représenter jusqu'à 90 % des constituants de la paroi bactérienne. Celle-ci contient aussi un feutrage d'acides téichoïques associés étroitement au peptidoglycane et faisant parfois saillie à la surface de la bactérie. En général, il n'y a pas ou peu de protéines dans la paroi des bactéries à Gram-positif.

Pour les deux types de bactéries, Gram-négatif ou Gram-positif, les membranes cytoplasmiques sont composées majoritairement de lipides anioniques de type PG et de lipides zwitterioniques de type PE [10] (les séquences chimiques de ces lipides sont décrites en partie expérimentale, Figure EP.52).

c) La surface de *B. anthracis*

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre 3, la bactérie d'intérêt de ce sujet de thèse, *B. anthracis*, est une bactérie sporulante de type Gram-positif. Sa forme végétative est alors constituée d'une seule membrane cytoplasmique. *B. anthracis* possède un peptidoglycane épais (de 20-50 nm), caractéristique des organismes de type Gram-positif et dont la composition reste classique avec une chaîne peptique de séquence : Ala-(D)-Glu-Dap-(D)-Ala-(D)-Ala. La membrane cytoplasmique est la partie la moins étudiée chez *B. anthracis* et sa composition reste incertaine [11]. Néanmoins, cette membrane reste majoritairement composée de phospholipides et d'acides gras. *B. subtilis*, une bactérie très proche de *B. anthracis*, est quant à elle composée à 80 % des lipides PG et PE [11]. Contrairement aux autres bactéries de Gram-positif, *B. anthracis* semble ne pas contenir d'acides lipotéichoïques mais de nombreuses protéines de surface attachées à la membrane cytoplasmique ont été rapportées dans la littérature [12].

Deux autres structures sont présentes à la surface de *B. anthracis*, à savoir la capsule, polymère d'acide γ -(D)-glutamique, (déjà présenté dans le chapitre 3) et une couche appelée "couche S", rarement présentes de manière conjointe dans l'enveloppe bactérienne (Figure IV.4) [11,12]. La couche dite "S" est constituée de deux protéines Sap et EA1 qui forment une maille cristalline bidimensionnelle.

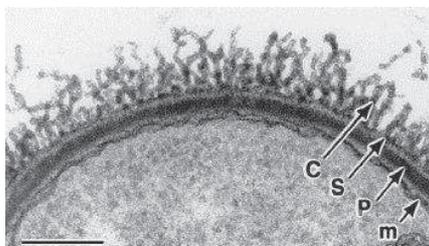


Figure IV.4 : Mince section d'une cellule de *B. anthracis* encapsulée avec S : "Couche S"; p : peptidoglycane, m : membrane cytoplasmique, c : capsule. Echelle : 250 nm [13].

d) Mimer les membranes biologiques

Afin de mimer la membrane cellulaire, des modèles lipidiques utilisant les différentes caractéristiques intrinsèques des lipides ont été développés. En phase aqueuse au-dessus de leurs concentrations micellaires critiques, les lipides s'auto-assemblent, de par leurs propriétés amphiphiles. Selon les conditions, ils peuvent s'organiser en différentes phases structurées et compactes pour que les répulsions entre la partie hydrophobe des lipides et l'eau soient minimisées. On parle alors du polymorphisme des lipides. Les travaux majeurs d'Israelachvili *et al.* ont montré que la morphologie des phases lipidiques formées dépendaient principalement de la forme géométrique du lipide (cylindrique, conique ou bien

de cône inversé), et pouvaient être représentées par le paramètre de compactage p (Figure IV.5) [14]. Toutefois, d'autres paramètres tels que la concentration et/ou les conditions expérimentales (température, force ionique, taux d'hydratation, pH, pression *etc.*) sont aussi à prendre en compte. Les lipides cylindriques (avec p très proche de 1, comme PC) préféreront la phase lamellaire tandis que des lipides tels que PE ($p > 1$) de forme conique (due à une petite tête polaire et un volume de ses chaînes acyles important) adopteront des phases non lamellaires (cubique ou hexagonale) en induisant une courbure négative (Figure IV.5).

En milieu biologique, les lipides adoptent de façon presque exclusive la phase lamellaire. Néanmoins, les structures lipidiques non lamellaires telles que les phases hexagonales de type II ou les phases cubiques sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires fondamentaux impliquant un réarrangement des membranes tels que la fusion, fission, ou encore le trafic vésiculaire de protéines [15-17].

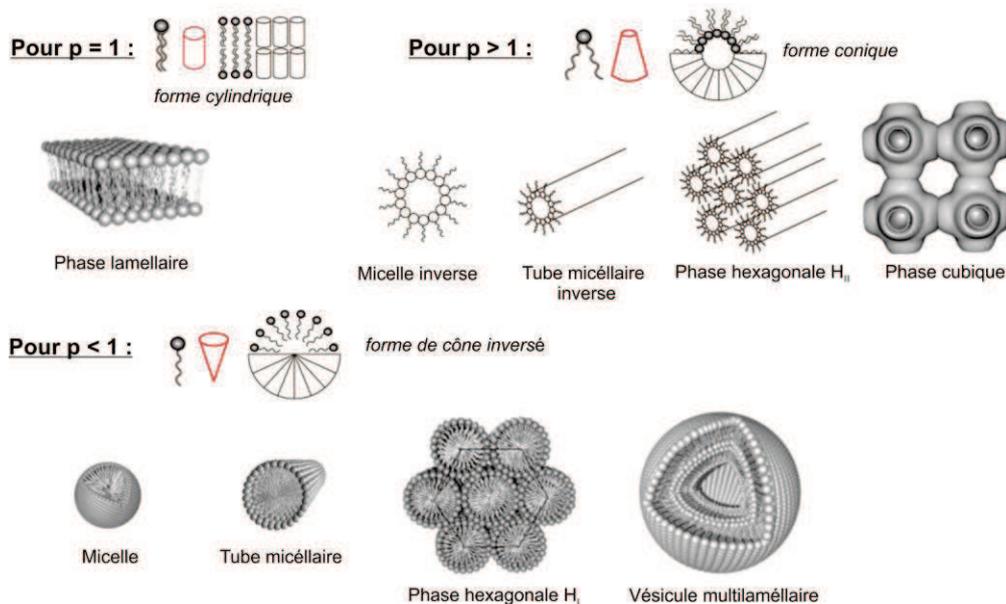


Figure IV.5 : Morphologie lipidique et phase formée en fonction du paramètre de compactage p [18,19].

La phase lamellaire existe sous différents états : L_c (état gel), $L_{\beta'}$ (état gel incliné), $P_{\beta'}$ (état gel ondulé), L_{α} (état fluide) (Figure IV.6). La température de phase d'un lipide, notée T_c , traduit le passage d'un état lamellaire gel compact à un état lamellaire fluide mobile.

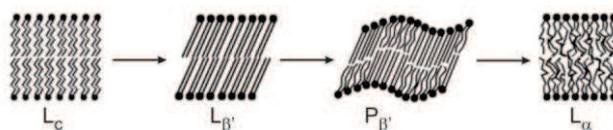


Figure IV.6 : Les différentes phases lamellaires lipidiques [20].

Afin de mimer les membranes cellulaires, différents modèles lipidiques ont été développés : (i) les monocouches de Langmuir, (ii) les micelles et bicelles, (iii) les liposomes

(ou vésicules) et (vi) les bicouches lipidiques. Dans le cadre de cette étude, nous avons principalement travaillé avec des liposomes et des bicouches lipidiques. Il existe plusieurs sous familles de liposomes. Tout d'abord, les vésicules multi-lamellaires (ou MLV) sont constituées d'une succession de bicouches de phospholipides imbriquées les unes dans les autres (structure en « oignon ») et sont essentiellement utilisées en RMN du solide. La seconde famille est celle des liposomes unilamellaires. Il existe trois types de liposomes répertoriés en fonction de leurs tailles : les petites vésicules unilamellaires (SUVs) de taille inférieure à 100 nm, les larges vésicules unilamellaires (LUVs) de taille comprise entre 100 nm et 1 µm et enfin les vésicules unilamellaires géantes (GUVs) de taille supérieure à 1 µm (Figure IV.7). La majorité des études spectroscopiques nécessitent l'utilisation de LUVs ou de SUVs.

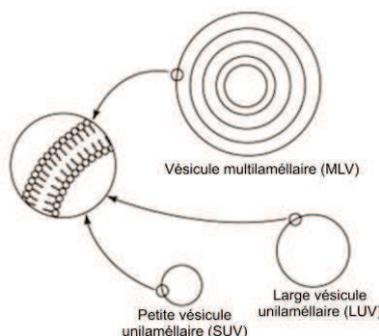


Figure IV.7 : Représentation schématique des différentes familles de liposomes utilisés dans le cadre de notre étude [18].

Bien que la pertinence de ces modèles soit évidemment discutable du fait de leur grande simplicité comparée aux membranes naturelles, l'utilisation de tels systèmes permet d'examiner l'influence de paramètres simples, comme l'effet de la composition en phospholipides, de la courbure de la surface ou encore du rapport [lipide]/[substance active] sur l'interaction.

2. Les mécanismes d'interaction des peptides naturels antimicrobiens

Déjà évoqué dans le chapitre 1, la grande majorité des peptides antimicrobiens antibactériens interagissent, contrairement aux antibiotiques actuels, avec la membrane cytoplasmique en modifiant l'organisation de la bicouche phospholipidique, provoquant la perte de l'intégrité membranaire, la fuite du matériel intracellulaire jusqu'à la lyse bactérienne. Plus récemment, il a été rapporté que certains AMPs (notamment les peptides riches en proline) posséderaient des cibles intracellulaires et donc une action antimicrobienne indirecte [21-24]. Néanmoins, même dans cette situation, l'interaction du peptide avec la membrane cytoplasmique reste un paramètre important puisque ce dernier doit être capable de franchir cette barrière naturelle de manière non-disruptive pour

atteindre sa cible intracellulaire. Le mécanisme d'action des peptides naturels antimicrobiens, que de nombreux groupes se sont efforcés d'élucider, se divise en trois phases : l'attraction, l'attachement et l'insertion [23,25].

a) Les premières phases : l'attraction et l'attachement

L'attraction, régie par les interactions électrostatiques entre le peptide et la paroi bactérienne, est la base de concept de la sélectivité [25]. La différence de composition de la paroi des bactéries par rapport aux parois des érythrocytes de mammifères (dont le feuillet externe ne contient pas de charge prédominante à la surface) confère aux peptides antimicrobiens (de manière générale chargés positivement) leurs sélectivités pour les bactéries (Figure IV.8).

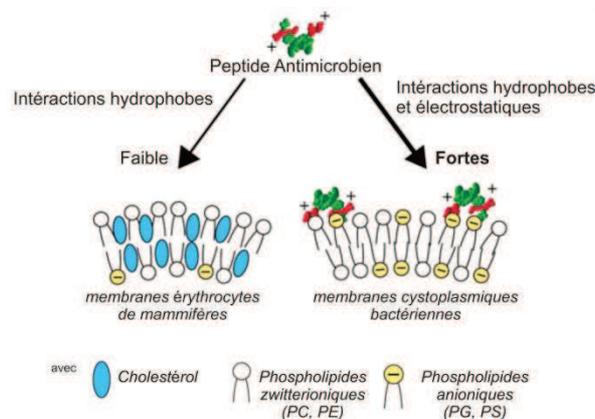


Figure IV.8 : Les membranes : cibles des peptides antimicrobiens des organismes multicellulaires et base de leurs spécificités [26].

L'attachement est la deuxième étape du processus. Après avoir traversé les éléments externes des membranes bactériennes (LPS, acides téichoïques, lipotéichoïques et peptidoglycane) (de manière, encore aujourd'hui, mal définie), l'attachement à la surface s'effectue de deux manières consécutives : un état inactif appelé « état S » et un état actif appelé « état I » [27]. Pour des rapports de lipide/peptide élevés, les peptides (structurés en hélice- α amphiphiles comme la magainine ou la mélittine et en feuillet- β comme la protégrine) s'attachent à la membrane en s'enfouissant horizontalement entre les têtes polaires des lipides. Cette configuration est l'état dit de surface « S » et provoque l'amincissement de la membrane [28]. On peut souligner que pour les bactéries Gram négatif, le groupe d'Hancock a proposé un mécanisme permettant d'expliquer le passage du peptide à travers le LPS, nommé voie de translocation auto-induite (« self-promoted uptake »). Ce mécanisme met en jeu une compétition entre les peptides et des cations divalents (Mg^{2+} , Ca^{2+}) liés aux groupements phosphates présents à la surface du LPS [29]. Le

remplacement des ions par les peptides, plus volumineux, perturbe la membrane externe et cause l'apparition de fissures dans celle-ci, permettant le passage du peptide.

b) Les différents mécanismes de pénétration des AMPs

Pour des rapports de lipide/peptide élevés, les peptides sont dans l'état « S » orientés parallèlement à la surface. Lorsque ce rapport diminue, l'accumulation asymétrique sur le feuillet externe conduit à une réorganisation afin de diminuer la tension asymétrique. Les peptides s'insèrent dans la membrane et passent à l'état « I ». Il existe deux types de modèles, les modèles membranolytiques et les non-membranolytiques pour lesquels nous ne donnerons qu'un bref aperçu [23,30,31] (Figure IV.9).

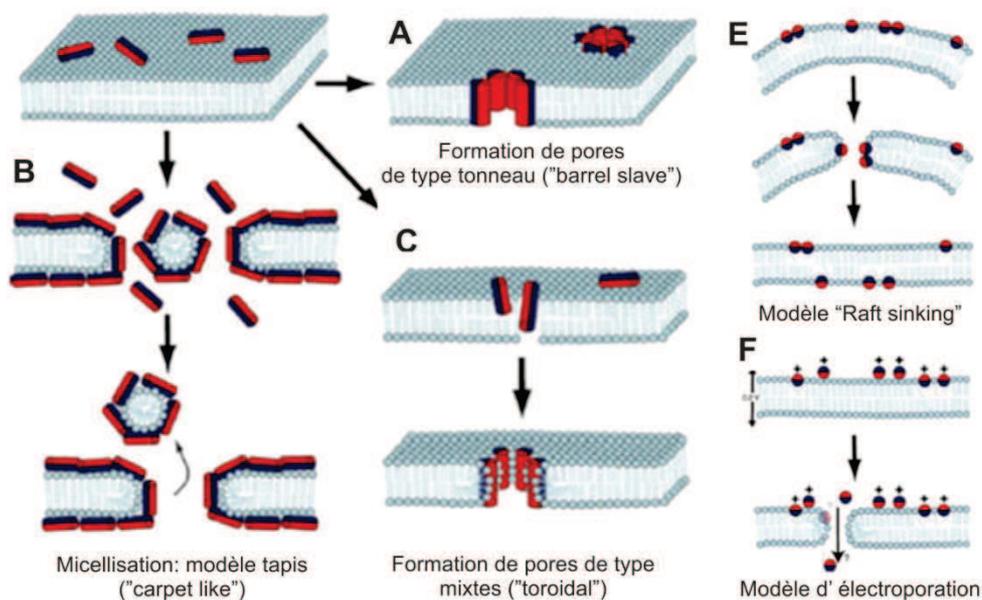


Figure IV.9 : Différents modèles de mécanismes d'action des peptides antimicrobiens [30].

Dans la première famille, on retrouve les modèles historiques regroupés sous l'appellation du modèle Shaï-Matsuzaki-Huang : le modèle de type « douves de tonneaux » (« barrel slave »), le modèle « tapis » (« carpet-like ») et la formation de pores de types mixtes (« toroïdal ») [26]. Décrit par Ehrenstein *et al.*, le modèle « barrel slave » est uniquement valable pour les peptides antimicrobiens capables de se replier en hélice et décrit la formation de pores transmembranaires formés par des bundles d'hélices- α amphipathiques, dans lesquelles les surfaces hydrophobes des peptides interagissent avec le noyau lipidique de la membrane et où les têtes hydrophiles forment l'intérieur du pore [23,32-34] (Figure IV.9a). Les interactions mises en jeu seraient essentiellement hydrophobes et la taille de l'hélice doit correspondre à l'épaisseur de la membrane. Les peptides qui agissent selon ce modèle sont généralement toxiques envers tous les types de cellules (bactériennes et eucaryotes). Le deuxième modèle de type « tapis » décrit le

recouvrement de la membrane par les peptides (sous forme de monomères ou d'oligomères), qui, à partir d'une concentration seuil et d'une tension locale trop importante à la surface aboutit à la désorganisation des phospholipides et à la rupture de la membrane de manière détergente (formation de micelles) (Figure IV.9b) [23,32,34-36]. Dans ce type de mécanisme, les peptides, n'ont pas nécessairement besoin d'adopter une structure hélicoïdale et les interactions électrostatiques semblent jouer un rôle clé car le peptide interagit pendant le processus entier avec la tête polaire des phospholipides et ne s'insère pas dans le cœur hydrophobe de la membrane. Ce modèle expliquerait l'activité antibactérienne de nombreux peptides comme les cécropines [37].

Avant l'étape de désagrégement de la membrane dans le modèle « tapis », la formation des pores transitoires dans la membrane, appelés « pores toroïdaux » peut avoir lieu (Figure IV.9c). A la différence des pores formés dans le modèle « barrel slave », les chaînes peptidiques et les têtes lipidiques forment ensemble l'intérieur du pore. En s'insérant perpendiculairement à la membrane, les peptides induisent une réorientation de la monocouche lipidique entraînant une courbure de la tête polaire des phospholipides contribuant ainsi à la stabilisation du pore et réduisant les interactions répulsives entre les charges positives des peptides. De nombreux AMPs agiraient selon ce modèle, on peut citer la magainine [38], la mélittine [33], le peptide antimicrobien humain LL-37 [39] ou encore le peptide protégrine-1 [40]. Plus récemment, une réévaluation de ce modèle suggère la formation de « pores toroïdaux désordonnés ». Les molécules de lipides sont encore courbées vers l'intérieur mais la formation de pores est plus chaotique, avec seulement une ou deux molécules à l'intérieur de chaque pore. De plus, les peptides resteraient en grande partie parallèles à la surface de la bicouche lipidique, seul une petite inclinaison serait observée [41,42]. Enfin le modèle de type tapis est souvent vu comme l'extension du modèle des pores toroïdaux.

Au cours de ces dernières années, un certain nombre de modèles dans lesquels la membrane cytoplasmique n'est pas désintégrée a vu le jour. De manière non exhaustive, on peut citer : (i) le modèle du « sinking raft » dans lequel le peptide s'agrègeant de manière préférentielle à un lipide déséquilibre la membrane qui s'affaisse et le fait passer avec son orientation initiale directement à l'intérieur du cytoplasme (Figure IV.9e) [43] ; (ii) le modèle d'électroporation décrit pour les peptides de densité de charge suffisante pour induire un potentiel électrostatique d'au moins 0,2 V à travers la bicouche et provoquant ainsi la formation de pores transitoires (Figure IV.9f) [44] ; (iii) le modèle d'agrégat membranaire où de petits agrégats non structurés de peptides forment des canaux par lesquels les ions et

autres matériels intracellulaires peuvent fuir à travers la membrane [45] ; (iv) de ségrégation des lipides avec la formation de domaines membranaires rigides et enrichis en phospholipides anioniques qui provoqueraient la genèse de zones de plus faibles épaisseurs dans la membrane à l'origine de défauts membranaires et de la fuite du matériel intracellulaire [46] ; et enfin (v) la formation de phases transitoires non lamellaires [47].

3. Les mécanismes d'interaction des mimes synthétiques antibactériens

L'étude des mécanismes d'interaction avec des modèles membranaires a été réalisée pour les β -peptides (*cf.* chapitre 1.a.i), les α/β peptides mixtes développés par Gellman *et al.* (*cf.* chapitre 1.a.ii), les foldamères d'arylamides de Degrado *et al.* (*cf.* chapitre 1.b.i) et les oligomères de phénylène-éthynylène de Tew *et al.* (*cf.* chapitre 1.b.ii) [48]. On constate qu'il est très difficile de schématiser leurs interactions : chacun des composés possédant souvent un mécanisme qui lui est propre.

Tout d'abord, Epanand *et al.* ont étudié l'interaction du β -peptide **I.6 (APC40)** développé par le groupe de Gellman (Figure IV.10a, *cf.* chapitre 1.a.i), par rapport au peptide naturel magainine avec différents types de phospholipides et en utilisant des techniques de calorimétrie, des expériences de fuite et de dichroïsme circulaire [49]. Ces travaux révèlent que le β -peptide **I.6** facilite la formation de phase non-lamellaire en favorisant une courbure négative des lipides, contrairement à la magainine qui induit pour sa part une courbure positive à la membrane. La sélectivité d'**I.6** pour les membranes bactériennes a été confirmée par son interaction préférentielle avec les membranes anioniques.

L'interaction de deux autres β -peptides, se structurant en une hélice-14 amphipathique en milieu lipidique a été également évaluée par Epanand *et al.* [50]. Ces deux β -peptides possèdent une activité antimicrobienne significative et ne montrent pas d'effet hémolytique. De nouveau, la sélectivité de ces β -peptides a été confirmée par leur attachement puis leur perméabilisation spécifique des membranes négativement chargées. Ces β -peptides agiraient selon le modèle Shai-Matsuzaki-Huang précédemment évoqué avec la formation de pores « toroïdaux ». En effet, ils induisent, sous forme de petits agrégats, la libération de fluorophores mais aussi la fusion et le « flip-flop » des lipides composant des vésicules de type PC/PG (1:2), caractéristiques de la formation de pores.

Plus récemment, Epanand *et al.* ont étudié dans le détail le mécanisme d'interaction de deux composés hybrides α/β peptides. Ces deux hybrides se structurent en une hélice 14/15 mais seul l'un des deux est capable de se structurer en une hélice 14/15 amphipathique

[51,52]. Deux mécanismes distincts ont été observés pour chacun de ces hybrides. Alors que l' α/β peptide de structure amphipathique induit la formation de phases non-lamellaire dans les milieux enrichis en lipides PE, l'autre α/β -peptide interagit par un mécanisme de ségrégation des phases anioniques et d'agrégation de vésicules, pouvant s'expliquer par une disposition de ses charges positives dans sa séquence en « clusters ».

Ensuite, Su *et al.* ont étudié par RMN du phosphore et du fluor en milieu orienté le mécanisme d'interaction du composé arylamide **I.30** développé par le groupe de Degradó (Figure IV.10a) [53]. Leurs travaux montrent que cet arylamide, comparé aux peptides antimicrobiens typiques, a des effets plus subtils et moins disruptifs. En effet, l'oligomère ne perturbe pas l'ordre lamellaire des lipides mais perturbe la tête phosphate des lipides et modifie le potentiel électrique de la membrane. **I.30** s'insère avec un angle de 20-30° par rapport à la normale de la bicouche et au niveau de l'interface eau-membrane juste au-dessous des têtes lipidiques à la manière d'un « couteau ». De plus, la RMN du fluor a permis de démontrer que l'arylamide tourne autour de son axe de symétrie, créant ainsi des défauts passagers dans la membrane (Figure IV.10b).

Enfin, Tew *et al.* ont démontré que les oligomères de phénylène-éthynylène (le composé **I.31**₁ et son analogue aux chaînes latérales de type méthyle-amines, Figure IV.10a) interagissent de manière sélective avec des membranes possédant un certain rapport de lipides PE (à hauteur d'un minimum de 60 %) en induisant une phase hexagonale inversée (H_{II}). Ce mécanisme de changement de phase permet d'expliquer la sélectivité de ces oligomères puisque contrairement aux bactéries, les cellules eucaryotes ne possèdent pas de lipides PE sur leurs feuillettes externes [54,55]. De surcroît, il est possible de souligner que ce mécanisme d'induction de phase non-lamellaire a été retrouvé pour les polymères de 3-nylon récemment développés par Gellman *et al.* [56].

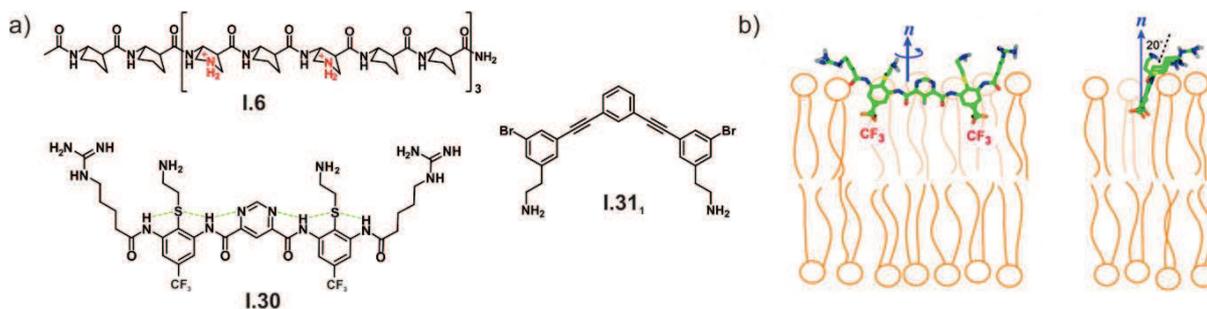


Figure IV.10 : a) Structures chimiques des mimes synthétiques étudiés ; b) Vue de face et de côté du composé **I.30** en interaction avec une bicouche de lipides zwitterioniques de type PC. L'arylamide est incliné d'un angle de 20° par rapport à la normale de la bicouche [53].

4. Interaction des oligourées avec des membranes modèles

a) Expériences de fuite de calcéïne

La perturbation de l'intégrité des membranes suite à l'action de nos oligourées a été évaluée grâce à des expériences classiques de fuite de calcéïne par fluorescence sur des liposomes de type LUVs de différentes compositions.

i) Méthode

La calcéïne est un fluorophore puissant qui est excité à une longueur d'onde de 485 nm et qui émet de la fluorescence à 515 nm (Figure IV.11a). A fortes concentrations (concentration > 10 mM), la fluorescence de la calcéïne est auto-inhibée et une faible fluorescence basale est observée. Lorsque la calcéïne est diluée (concentration < 10 mM) elle émet une forte fluorescence grâce à un rendement quantique élevé (Figure IV.11b). L'hydratation des films lipidiques de compositions choisies est réalisée avec un tampon à pH 7,4 constitué de 50 mM de calcéïne, 10 mM trishydroxyméthylaminométhane (Tris), 10 mM NaCl, 1 mM d'acide éthylène glycol tétraacétique (EGTA). Puis les LUVs sont séparées de la calcéïne présente en solution par chromatographie d'exclusion stérique. On obtient ainsi des LUVs de compositions lipidiques définies, de diamètres compris entre 100-140 nm (vérifiés par de la diffusion dynamique de la lumière (DLS)) et chargées en calcéïne. Un dosage phosphate d'après la méthode décrite par Rouser *et al.*, est ensuite réalisé pour mesurer la concentration des lipides [57]. L'oligourée est ajoutée aux liposomes (concentration en lipides fixée à 50 μ M) à une concentration calculée (entre 10 et 100 μ M) afin de faire varier le rapport lipide/oligourée (L/O) de 100 à 10. L'intensité de la fluorescence est ensuite mesurée jusqu'à l'équilibre (plus de calcéïne libérée par les LUVs). L'addition finale d'une solution de détergent (Triton X-100 à 1 % dans l'eau) provoque la lyse complète des vésicules, permettant d'obtenir la valeur de fuite maximale.

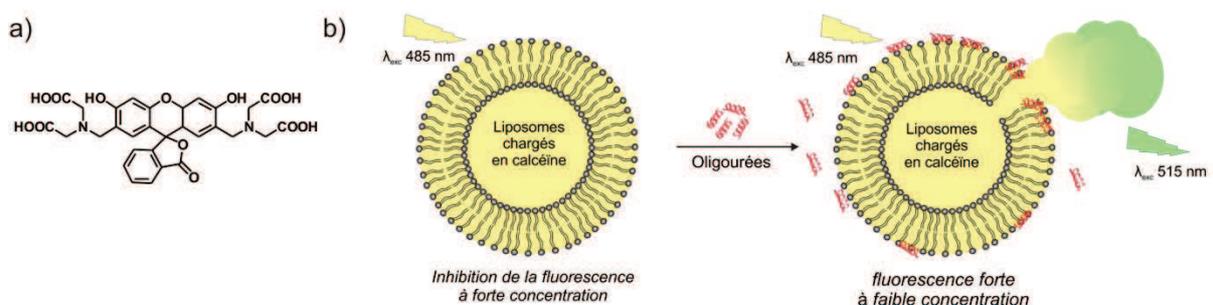


Figure IV.11: a) Structure chimique de la calcéïne ; b) Représentation schématique du principe des expériences de fuite de calcéïne.

Le pourcentage de fuite de calcéïne est ainsi calculé en pourcentage du relargage total, selon l'équation suivante:

$$\% \text{ fuite de calcéïne} = \frac{F_t - F_0}{F_f - F_0} \times 100$$

Avec F_t qui correspond à l'intensité de fluorescence mesurée à un temps t , F_0 qui correspond à l'intensité de fluorescence au temps $t=0$ et F_f est l'intensité de fluorescence après l'ajout final de Triton X-100. Une correction de dilution a été appliquée sur l'intensité de fluorescence mesurée après l'injection de Triton X-100. Chaque expérience a été réalisée au minimum trois fois.

ii) Résultats

Les composés **OL22** et **OL33** ont été ajoutés à des LUVs de différentes compositions chargées en calcéïne :

- (i) purement zwitterioniques, composées d'extraits naturels du jaune d'œuf des lipides zwitterionique de type L- α -phosphatidylcholine (EggPC) et de diamètre 133 nm ;
- (ii) composées d'un mélange de lipides zwitterioniques/anioniques : contenant EggPC et des extraits naturels du jaune d'œuf de type L- α -phosphatidylglycérol (EggPG) (avec un ratio de 7:3, mol/mol) et de diamètre 145 nm ;
- (iii) composées d'un mélange de lipides zwitterioniques/anioniques : contenant la 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine (POPE) et du EggPG (avec un ratio de 7:3, mol/mol) et de diamètre 142 nm ;
- (iv) composées d'un mélange de trois lipides POPE/EggPC/EggPG (avec un ratio de 3:4:3, mol/mol/mol) et de diamètre 155 nm.

De manière générale, nous avons pu observer que la cinétique de fuite de calcéïne après ajout de l'oligourée est très rapide. Les liposomes commencent à fuir en quelques secondes puis l'équilibre du système est atteint en moins de 20 minutes (Figure IV.12). On remarque également que la fuite induite par **OL22** sur le système POPE/EggPG (iii) est plus longue à se stabiliser et que l'équilibre du système n'est pas forcément atteint avec une fuite complète des liposomes.

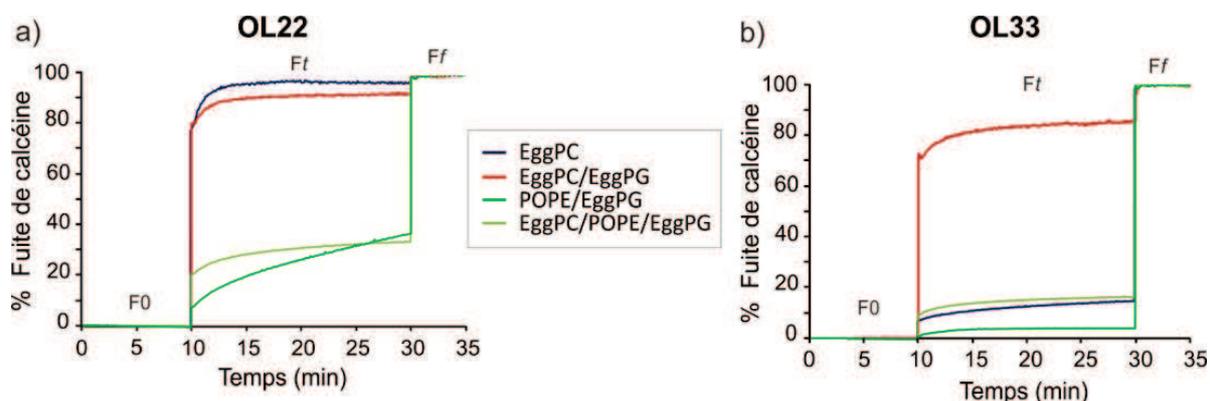


Figure IV.12: Cinétique de la libération de calcéine pour des liposomes de EggPC (i), EggPC/EggPG (ii), POPE/EggPG (iii) et EggPC/POPE/EggPG (iv) induite par l'ajout en a) de **OL22** et en b) de **OL33** pour un rapport L/O de 20. La fuite de calcéine est exprimée en pourcentage par rapport à la fuite de calcéine maximale (Ff) observée en présence de Triton X-100.

Nous avons ensuite cherché à comparer la fuite observée pour chaque système lipidique et pour chaque oligourée en fonction de la concentration d'oligourée ajoutée (Figure IV.13). Plus le rapport L/O est faible et plus la concentration d'oligourées ajoutée aux liposomes est importante.

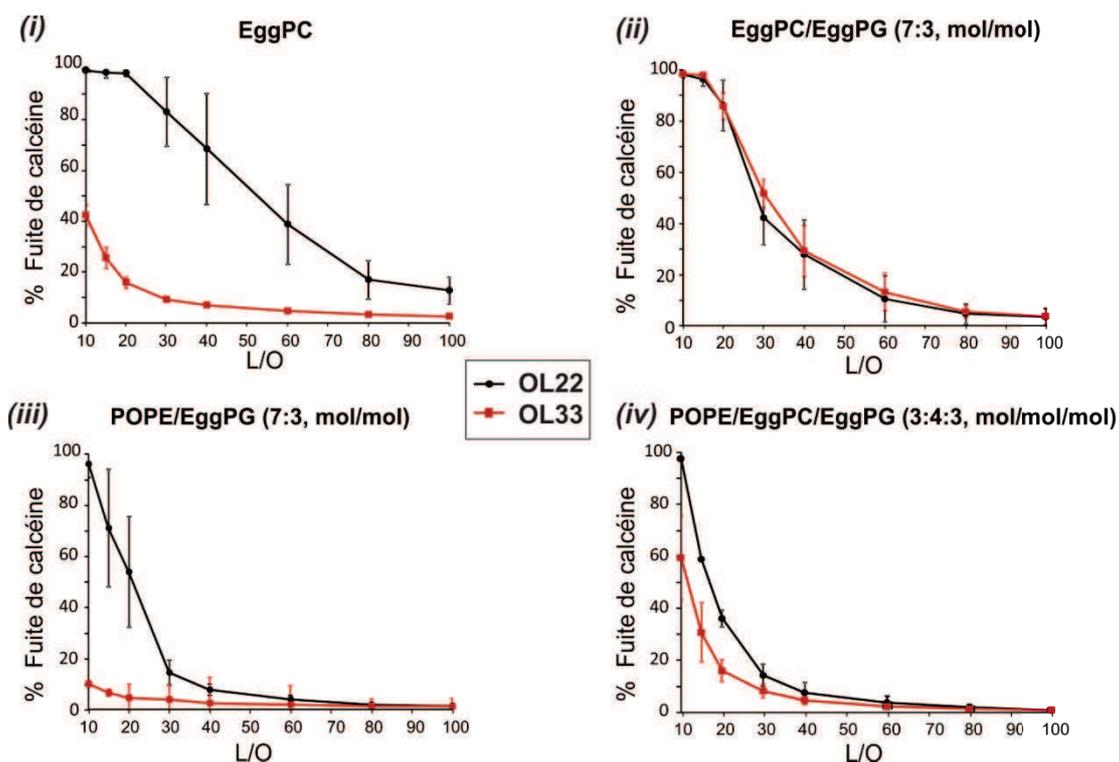


Figure IV.13: Pourcentage de fuite de calcéine pour chaque liposome de composition différente en fonction du rapport L/O.

De manière générale, on constate que quelle que soit la composition lipidique des liposomes, nos oligourées n'induisent une fuite significative qu'à partir d'un rapport L/O de 50, le système le plus sensible étant le mélange EggPC/EggPG avec une libération de calcéine débutant à partir d'un rapport de 60. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec le peptide antimicrobien naturel magainine [58]. Ils sont aussi meilleurs que ceux obtenus avec les β -peptides antimicrobiens dont la libération de fluorophores a été décrite en présence de

liposomes de type PC, PC/PG et PE/PG avec des rapports lipide/peptide compris en 2,5 et 10, soit des concentrations 6 à 25 fois plus élevées [50]. Néanmoins il reste à noter que ces rapports restent faibles en comparaison des activités du peptide mélittine, qui induit de la fuite de la calcéïne sur des liposomes zwitterioniques et anioniques pour une gamme de rapports entre 100 et 1000 soit à des concentrations 1,5 à 15 fois plus faibles [59]. On remarque aussi que la présence dans la composition de liposomes de lipide PE (systèmes lipidiques (iii) et (iv)), diminue l'interaction de nos oligourées avec ces derniers, la fuite observée n'ayant lieu qu'à de fortes concentrations d'oligourée ajoutées.

Pour finir, la capacité d'induction du relargage du fluorophore peut être comparée pour les deux oligourées. **OL33** semble moins perturber l'intégrité des liposomes zwitterioniques (i) et enrichis en PE (iii et iv), comparé à **OL22**. En revanche, pour le système EggPC/EggPG (ii), les deux oligourées induisent la libération de calcéïne de manière équivalente, et ce, à partir de faibles concentrations.

b) Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (ATR-FTIR)

Des expériences de spectrométrie infrarouge vibrationnelle à transformée de Fourier ont été réalisées sur les deux oligourées **OL22** et **OL33** en présence de lipides. Cette technique de spectroscopie possède l'avantage de renseigner à la fois sur la structure et l'orientation des oligourées et sur l'organisation des lipides durant leurs interactions avec ces dernières.

i) Méthode

La spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FT-IR) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet *via* la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau. Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de liaison (dépendante du type de vibration et de la nature de la liaison), cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistrera une diminution de l'intensité réfléchiée ou transmise. Le domaine moyen infrarouge entre 4000 et 400 cm^{-1} correspondant au domaine d'énergie des vibrations fondamentales des molécules organiques. Il existe deux types de spectroscopie infrarouge par transmission et par réflexion. Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé la spectroscopie ATR-FTIR (Infrarouge à Transformée de Fourier en Réflexion Totale Atténuée) qui permet l'analyse en milieu aqueux de multicouches membranaires.

La spectroscopie ATR-FTIR est basée sur un phénomène optique appelé réflexion totale interne (Figure IV.14a). Ce phénomène se produit lorsque de la lumière se propage à travers un milieu d'indice de réfraction élevé (n_1) et frappe une interface avec un indice de réfraction plus faible (n_2). La réflexion totale interne se produit uniquement si l'angle d'incidence θ est supérieur à l'angle d'incidence critique θ_c dérivée de la loi de Snell ($\sin \theta_c = n_2/n_1$). Si le deuxième milieu est absorbant et même s'il y a réflexion totale interne, une onde évanescente du champ électrique émerge vers le deuxième milieu. On parle alors de réflexion totale atténuée (ATR).

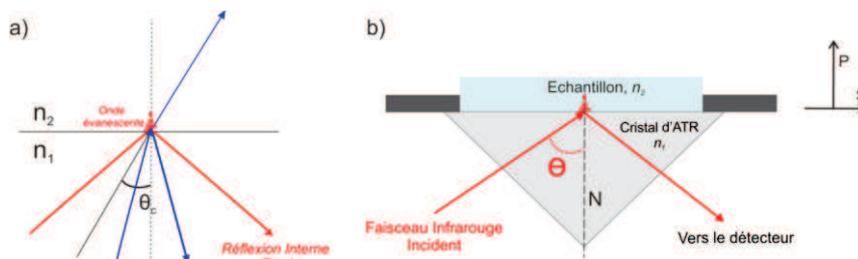


Figure IV.14 : a) Principe de la réflexion interne totale ; b) Schéma du montage GoldenGate utilisé au cours de ces expériences.

Dans le montage utilisé (Golden Gate®, Specac), le faisceau IR se propage dans un cristal de Germanium ($n_1=4$), transparent en IR (Figure IV.14b). Au-delà de l'angle d'incidence critique θ_c , le faisceau se réfléchit totalement à l'interface cristal/échantillon. La réflexion totale interne crée une onde évanescente qui rentre en contact avec l'échantillon à la surface du cristal. Cette onde évanescente se propage perpendiculairement au plan du cristal et son amplitude s'amortit de manière exponentielle. Sa profondeur de pénétration dépend de l'angle d'incidence du faisceau IR, de la longueur d'onde et des indices des différents milieux. Elle permet de sonder les molécules dans l'échantillon.

D'autre part, l'utilisation de l'ATR-FTIR en mode polarisé donne accès à l'orientation de l'axe de symétrie moléculaire par rapport à la normale au cristal en mesurant le rapport dichroïque $R_{ATR} = A_p/A_s$ où A_p et A_s représentent les absorbances d'une bande donnée pour les polarisations parallèle (p) et perpendiculaire (s) au plan d'incidence.

Il est ainsi possible d'étudier la structure de molécules en solution et en présence de membranes modèles orientées déposées à la surface du cristal (obtenues par éclatement de SUVs). De plus, les phospholipides, organisés en bicouche orientée, possèdent des bandes très caractéristiques en IR (Figure IV.15). Les intensités des bandes d'absorption des vibrations anti-symétriques des CH_2 renseignent, elles, sur la quantité de matière déposée sur le cristal. De précédents résultats ont, en effet, montré que pour une bicouche lipidique d'environ 40 Å déposée sur le cristal, une intensité autour de 1.3×10^{-3} en polarisation p est

attendue [60]. D'autre part, le rapport des intensités d'absorbance en p (A_p) et s (A_s) permet de déterminer l'orientation des lipides dans la membrane en donnant accès à l'angle d'inclinaison des chaînes lipidiques par rapport à la normale du cristal (*cf.* partie expérimentale, Figure EP.53a). Ce rapport doit être inférieur à 2 pour que l'on puisse conclure à une orientation des chaînes. Plus ce rapport tend vers 2 et plus la membrane lipidique est désorganisée et inversement.

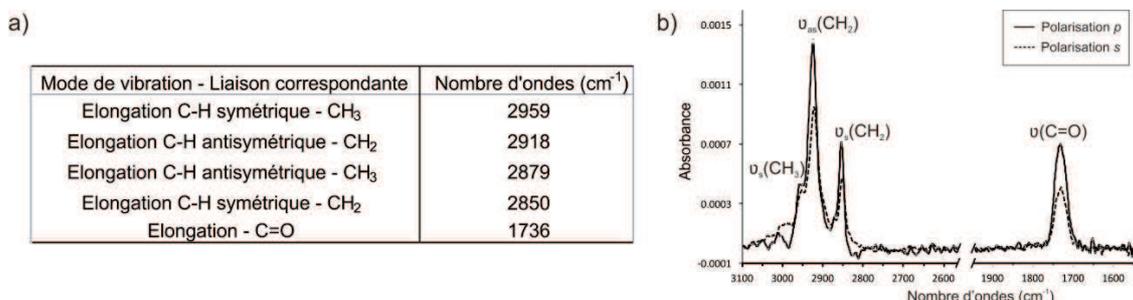


Figure IV.15 : a) Table des bandes caractéristiques d'une bicouche lipidique orientée ; b) Exemple de spectre ATR-FTIR et des bandes caractéristiques obtenues pour une bicouche lipidique en polarisation p (courbe continue) et s (courbe pointillée).

L'ajout de molécules, telles que les oligourées, peut ainsi entraîner des modifications de ces bandes d'absorption caractéristiques et livrer des informations sur l'organisation de la bicouche supportée.

ii) Résultats

Les spectres ATR de membranes de EggPC et d'un mélange EggPC/1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-1'-*rac*-glycérol (DOPG) (7:3, mol/mol) ont été enregistrés après l'ajout de différentes concentrations d'oligourées **OL22** et **OL33**. Un tampon Tris (20 mM), NaCl (150 mM) dans du D_2O (afin de s'affranchir des bandes de l'eau gênantes pour la réalisation de cette étude), à pH 7,4 a été utilisé. Afin de réaliser ces spectres, une bicouche orientée est obtenue par éclatement de SUVs sur le cristal. Son épaisseur et son orientation sont contrôlées en calculant le rapport dichroïque R_{ATR} des chaînes aliphatiques des lipides (*cf.* partie expérimentale, Figure EP.53a). L'oligourée est ensuite ajoutée à la concentration souhaitée. Après 30 min d'incubation, le système est rincé (afin d'éliminer l'oligourée sans interaction spécifique avec la membrane) puis les spectres en polarisation (p) et (s) sont enregistrés (*cf.* partie expérimentale, Figure EP.53b).

Compte tenu d'un nombre d'expériences élevées nécessaires à la validation et reproductibilité de ces données, certaines des expériences résumées ci-après devront être reproduites pour être totalement confirmées.

La figure IV.16 présente un exemple de spectres obtenus pour des concentrations croissantes d'**OL22** sur des membranes orientées de EggPC et EggPC/DOPG (7:3, mol/mol). En premier lieu et pour les deux systèmes lipidiques, les bandes de l'oligourée « urée I » et « urée II » apparaissent à partir de 5 µg/mL (3,6 µM) attestant de la forte interaction de **OL22** avec les bicouches. Comme précédemment observé par dichroïsme circulaire par Violette *et al.*, [61] ces deux bandes, centrées à 1612 cm⁻¹ et à 1495 cm⁻¹, correspondent aux bandes observées pour l'oligourée seule dans D₂O et confirment la structure hélicoïdale durant l'interaction avec les membranes. Toutefois, l'attribution de la bande « urée II » a souvent été perturbée par l'apparition de la bande de déformation de l'eau (δ(OH)) vers 1640 cm⁻¹, provenant d'un échange isotopique D/H (par l'humidité de l'air avec le tampon).

De plus, ces spectres montrent clairement des effets différents de **OL22** en contact avec la membrane lipidique selon sa composition lipidique (Figure IV.16).

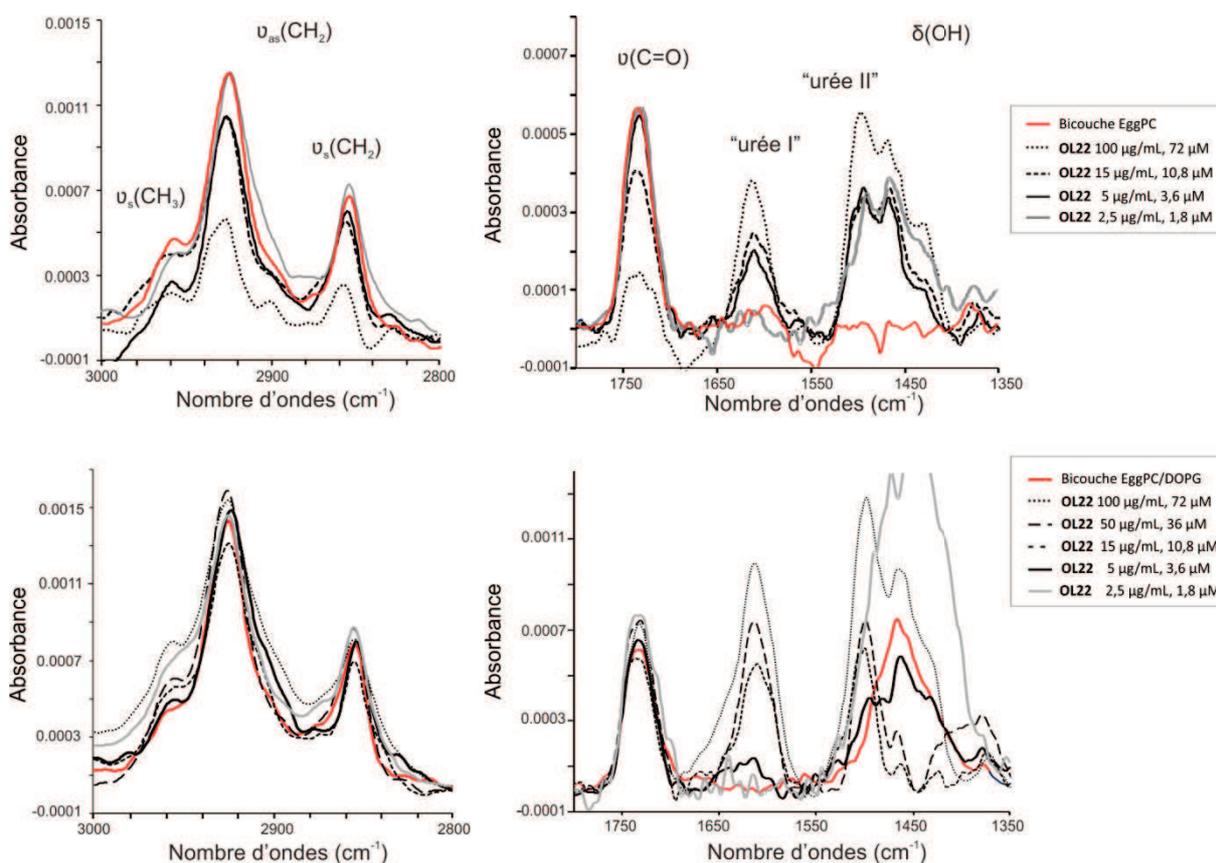


Figure IV.16 : Régions 1350-1800 cm⁻¹ et 2800-3000 cm⁻¹ des spectres ATR obtenus après rinçage en présence de concentrations croissantes d'oligourée **OL22** sur des bicouches de EggPC et EggPC/DOPG (7:3, mol/mol) en polarisation (*p*).

En système purement zwitterionique (bicouche EggPC), à partir d'une concentration de 15 µg/mL (10,8 µM), une forte diminution des bandes des CH₂ de la chaîne hydrocarbonée des lipides est constatée, et ce, de manière proportionnelle à la concentration d'oligourée ajoutée. Cette perte d'intensité des bandes des lipides peut être

due à un phénomène de « détergence » et/ou de « concentration » des lipides sur le cristal. Ce phénomène de « concentration » proviendrait de l'insertion profonde de l'oligourée dans les lipides qui seraient alors « poussés » hors de la surface enregistrée du cristal et qui induirait donc la diminution de leurs bandes caractéristiques. Ce phénomène est accompagné d'une désorganisation de la membrane, visible par le net élargissement des bandes et leurs déplacements vers des nombres d'ondes plus élevés (Table IV.1). Pour des concentrations plus faibles d'oligourée (5 µg/mL et 2,5 µg/mL), un déplacement vers des nombres d'ondes plus faibles est observé, signe d'une possible rigidification du système. Ces déplacements, présentés en table IV.1, ont été calculés en réalisant la somme des spectres obtenus suivant les deux polarisations (p) et (s) avant et après ajout de l'oligourée.

Concentration OL22	$\nu_{as}(CH_2)$ avant (cm^{-1})	$\nu_{as}(CH_2)$ après (cm^{-1})	D (cm^{-1})	$\nu_s(CH_2)$ avant (cm^{-1})	$\nu_s(CH_2)$ après (cm^{-1})	D (cm^{-1})
100 µg/mL, 72 µM	2924,85 ± 0,58	2926,78 ± 0,19	1,94 ± 0,40	2854,07 ± 0,32	2856,81 ± 0,01	2,73 ± 0,32
50 µg/mL, 36 µM	2924,95	2926,19	1,24	2853,70	2854,32	0,62
15 µg/mL, 10,8 µM	2925,05 ± 0,51	2926,43 ± 0,03	1,37 ± 0,48	2853,76 ± 0,02	2854,99 ± 0,48	1,22 ± 0,46
5 µg/mL, 3,6 µM	2925,19 ± 0,57	2924,28 ± 0,35	-0,91 ± 0,70	2853,98 ± 0,34	2853,43 ± 0,61	-0,55 ± 0,46
2,5 µg/mL, 1,8 µM	2924,33 ± 1,96	2922,94 ± 1,07	-1,39 ± 0,88	2853,71 ± 1,03	2852,52 ± 0,29	-1,19 ± 0,74

Table IV.1 : Tables des déplacements (D) des nombres d'ondes observés avant et après ajout d'oligourée **OL22** de la somme (p) + (s) des bandes d'élongation antisymétriques et symétriques des CH₂ des lipides EggPC.

Pour le système EggPC/DOPG, aucune perte d'intensité des bandes des CH₂ de la chaîne hydrocarbonée des lipides n'est observée, même à concentration élevée. Cette fois ci, de par l'interaction électrostatique, l'accumulation de l'oligourée se réaliserait à la surface de la bicouche, au niveau des têtes polaires. A partir de 15 µg/mL (10,8 µM), il est aussi possible de constater un faible déplacement des bandes des CH₂ de la chaîne hydrocarbonée vers des nombres d'ondes plus faibles signe d'une « rigidification » de la bicouche (Table IV.2). A plus faibles concentrations, ces déplacements ne sont pas significatifs.

Concentration OL22	$\nu_{as}(CH_2)$ avant (cm^{-1})	$\nu_{as}(CH_2)$ après (cm^{-1})	D (cm^{-1})	$\nu_s(CH_2)$ avant (cm^{-1})	$\nu_s(CH_2)$ après (cm^{-1})	D (cm^{-1})
100 µg/mL, 72 µM	2926,37 ± 0,89	2925,12 ± 2,07	-1,25 ± 1,18	2854,91 ± 0,45	2853,95 ± 1,09	-0,97 ± 0,65
50 µg/mL, 36 µM	2924,75 ± 0,46	2924,18 ± 1,12	-0,57 ± 0,67	2854,07 ± 0,35	2853,85 ± 0,89	-0,22 ± 0,37
15 µg/mL, 10,8 µM	2924,32 ± 0,59	2923,24 ± 0,07	-1,09 ± 0,53	2853,93 ± 0,58	2853,78 ± 0,03	-0,16 ± 0,55

Table IV.2 : Tables des déplacements (D) des nombres d'ondes observés avant et après ajout d'oligourée **OL22** de la somme (p) + (s) des bandes d'élongation antisymétriques et symétriques des CH₂ des lipides EggPC/DOPG.

Le rapport dichroïque, calculé pour les bandes « urée I », $R_{ATR}(\text{urée I})$, pour chaque système lipidique donne accès à l'orientation moyenne sur le cristal de l'oligomère qui peut être comparée aux valeurs obtenues par simulations réalisées par Cavagnat *et al.* [62]. Dans les bicouches composées de EggPC, le $R_{ATR}(\text{urée I})$ moyen est de $1,21 \pm 0,11$ quelle que soit la

concentration. Cette valeur correspond à un angle de l'axe de l'hélice par rapport à la normale du cristal compris entre 45° et 60° (pour une bicouche de 15 Å, Cavagnat *et al.* ont rapporté une valeur de R_{ATR} simulé de 1,28 pour un angle de 45° et de 1,12 pour 60° respectivement). Ce résultat est en accord avec de précédents travaux sur **OL22** réalisés dans le groupe, par ^{15}N -RMN en milieu orienté. Un marquage à l'azote ^{15}N du résidu central de type valine a pu en effet donner accès à l'orientation périplanare de **OL22** par rapport à une bicouche lipidique de 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (POPC), pour un rapport L/O de 36 à température ambiante [63].

Enfin la valeur de R_{ATR} (urée I) a aussi été calculée sur la base des spectres de EggPC/DOPG à partir de 15 µg/mL. Une valeur moyenne de $1,43 \pm 0,13$ est obtenue. Ce rapport correspond à un angle pour l'oligourée légèrement plus faible par rapport à la normale du cristal compris entre 30° et 45°.

De la même manière, les spectres ATR pour des concentrations croissantes d'**OL33** sur des membranes orientées de EggPC et EggPC/DOPC (7:3, mol/mol) ont été enregistrés (Figure IV.17).

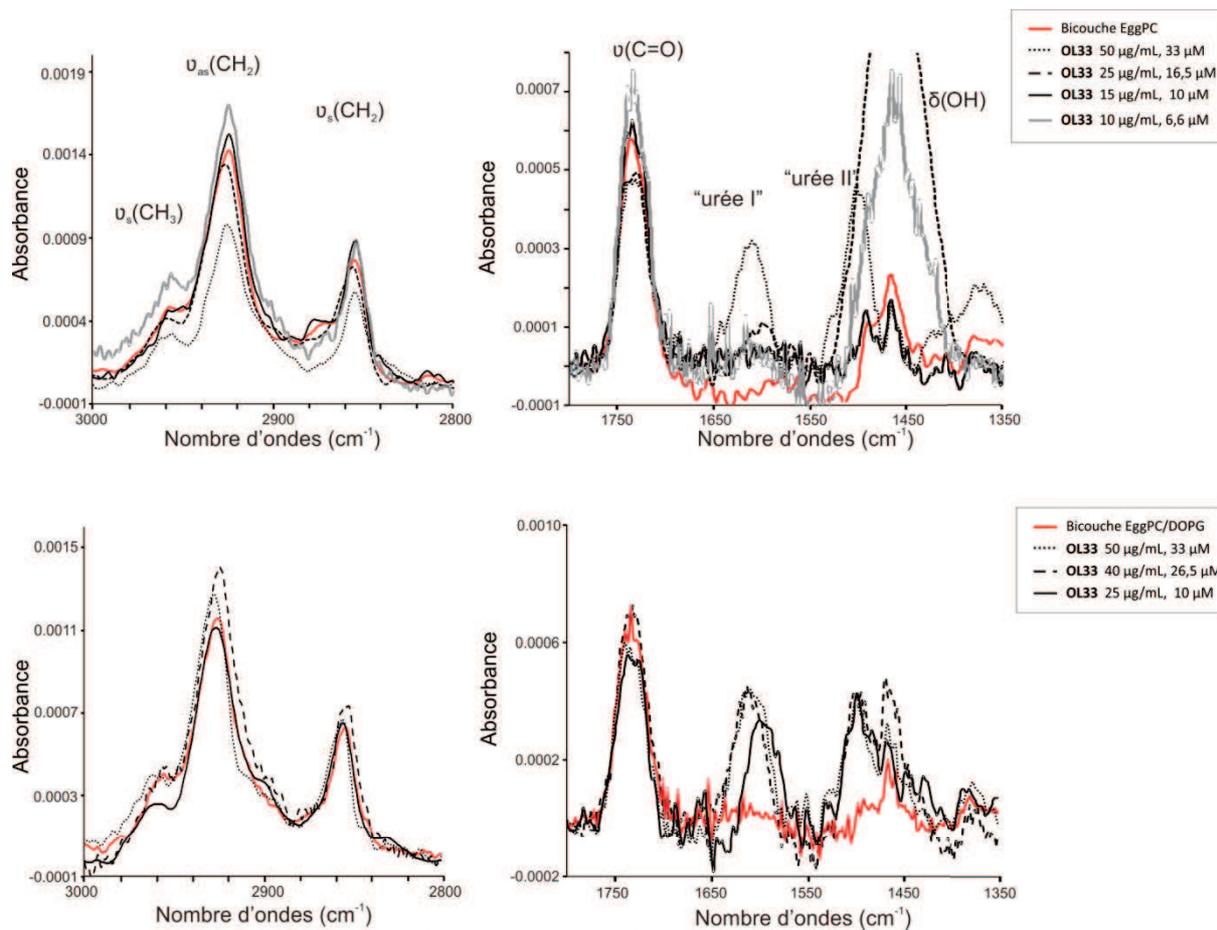


Figure IV.17 : Régions 1350-1800 cm^{-1} et 2800-3000 cm^{-1} des spectres ATR obtenus après rinçage en présence de concentrations croissantes d'oligourée **OL33** sur des bicouches de EggPC et EggPC/DOPG en polarisation (p).

Premièrement, les bandes de l'oligourée urée I et urée II, pour le système lipidique purement zwitterionique, n'apparaissent clairement qu'à des concentrations élevées (dès 50 µg/mL (33 µM)). Des bandes de très faible intensité sont identifiables à 25 µg/mL (33 µM) mais doivent encore être confirmées. L'interaction de **OL33** avec la membrane zwitterionique est donc beaucoup moins forte que celle observée avec **OL22**, mais reste d'un effet similaire. En effet, il est à nouveau possible de constater une perte d'intensité des bandes des lipides et ce phénomène (de « détergence » et/ou de « concentration ») est encore accompagnée d'une désorganisation des lipides, comme le montre le déplacement de la somme des bandes d'élongation des CH₂ symétriques et antisymétriques en polarisation (*p*) et (*s*) vers des nombres d'ondes plus élevés (Table IV.3).

Concentration OL33	$\nu_{as}(CH_2)$ avant (cm ⁻¹)	$\nu_{as}(CH_2)$ après (cm ⁻¹)	D (cm ⁻¹)	$\nu_s(CH_2)$ avant (cm ⁻¹)	$\nu_s(CH_2)$ après (cm ⁻¹)	D (cm ⁻¹)
50 µg/mL, 33 µM	2924,27 ± 0,46	2925,11 ± 0,54	0,83 ± 0,08	2853,52 ± 0,74	2854,37 ± 0,49	0,85 ± 0,25
25 µg/mL, 16,5 µM	2925,82 ± 0,95	2926,50 ± 0,53	0,68 ± 0,43	2853,74 ± 0,55	2854,69 ± 0,31	0,95 ± 0,24

Table IV.3 : Tables des déplacements (*D*) des nombres d'ondes observés avant et après ajout d'oligourée **OL33** de la somme (*p*) + (*s*) des bandes d'élongation antisymétriques et symétriques des CH₂ des lipides EggPC.

Ensuite, pour le système EggPC/DOPG, il n'y a toujours pas de perte d'intensité des bandes lipidiques, et ce, même à concentration élevée. A nouveau, de faibles déplacements des bandes des CH₂ de la chaîne hydrocarbonée vers des nombres d'ondes plus faibles sont constatés. Un nombre moins important d'expériences a pu être exploité de par des difficultés rencontrées inhérentes à la formation des bicouches PC/PG.

Concentration OL33	$\nu_{as}(CH_2)$ avant (cm ⁻¹)	$\nu_{as}(CH_2)$ après (cm ⁻¹)	D (cm ⁻¹)	$\nu_s(CH_2)$ avant (cm ⁻¹)	$\nu_s(CH_2)$ après (cm ⁻¹)	D (cm ⁻¹)
50 µg/mL, 33 µM	2926,34 ± 1,39	2926,09 ± 1,46	-0,26 ± 0,08	2854,95 ± 1,21	2854,51 ± 0,80	-0,45 ± 0,41
40 µg/mL, 26,5 µM	2925,27 ± 1,06	2924,53 ± 0,14	-0,73 ± 0,91	2854,26 ± 0,04	2853,55 ± 0,32	-0,71 ± 0,36
25 µg/mL, 16,5 µM	2925,85 ± 0,30	2925,56 ± 0,29	-0,30 ± 0,01	2854,85 ± 0,65	2854,69 ± 0,31	-0,62 ± 0,70

Table IV.4 : Tables des déplacements (*D*) des nombres d'ondes observés avant et après ajout d'oligourée **OL33** de la somme (*p*) + (*s*) des bandes d'élongation antisymétriques et symétriques des CH₂ des lipides EggPC/DOPG.

Enfin il a été possible de calculer l'orientation moyennée sur le cristal de l'oligourée **OL33**. Sur l'ensemble des spectres en EggPC/DOPG, une faible variation est constatée avec un rapport moyen de 1,45 ± 0,11. Ce rapport correspond de nouveau à un angle de l'oligourée par rapport à la normale du cristal compris entre 30° et 45°. Pour le système lipidique EggPC, le R_{ATR} calculé sur les expériences à 50 µg/mL est de 1,36 ± 0,11.

Dans un second temps, des expériences avec l'ajout d'oligourée **OL33** de manière incrémentale sur la même bicouche (donc sans rinçage entre chaque ajout) ont été réalisées et sont présentées en figure IV.18. Ces expériences pourront être réalisées par la suite avec l'oligourée **OL22**.

On constate que les bandes de l'oligourée apparaissent à partir de 5 μM (concentration cumulée). Ces deux bandes sont centrées sur 1609 et 1497 cm^{-1} et sont donc caractéristiques d'une structure hélicoïdale. Sans rinçage intermédiaire, ces bandes traduisent la présence de l'oligourée en interaction spécifique avec la membrane mais aussi celle au voisinage proche la membrane. La saturation du système est atteinte à partir de 40 μM . Après le rinçage final, une perte d'intensité de 50 % des bandes urées est constatée. Une partie importante de l'oligourée n'était donc pas en interaction spécifique avec les lipides. Au niveau de la chaîne hydrocarbonée des lipides, les effets restent à nouveau discrets et aucune concentration seuil n'est constatée.

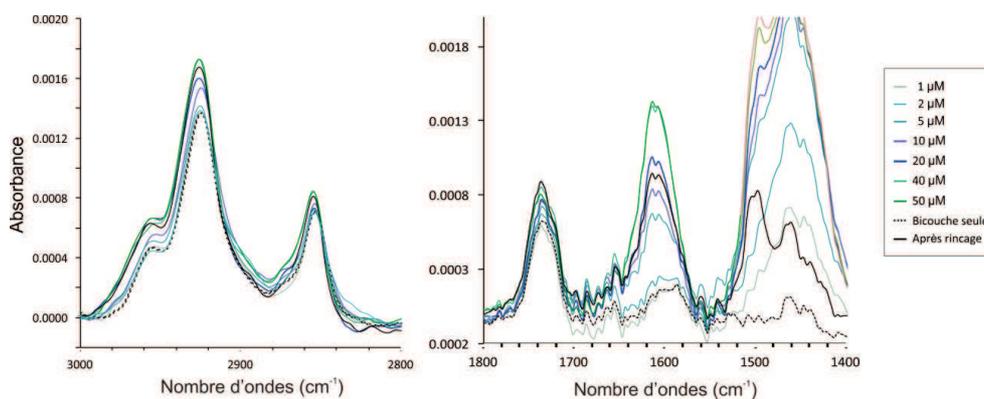


Figure IV.18: Régions 1350-1800 cm^{-1} et 2800-3000 cm^{-1} des spectres ATR obtenus par ajout de manière incrémentale d'oligourée **OL33** sur une bicouche de EggPC/DOPG en polarisation (*p*).

b) RMN solide du phosphore ^{31}P et du deutérium ^2H

La RMN à l'état solide fait partie des méthodes de choix pour la caractérisation de l'interaction de molécules avec des modèles lipidiques. L'étude du mécanisme d'action des peptides antimicrobiens par RMN du solide fait état d'un grand nombre de publications dans la littérature [32,64-66]. Dans le cadre de nos études, les RMN du phosphore ^{31}P et du deutérium ^2H (ou D) ont été réalisées avec les oligourées **OL22** et **OL33** en présence de vésicules multi-lamellaires de compositions lipidiques choisies.

i) Méthode

De manière non exhaustive, le phosphore ^{31}P est un noyau particulièrement sensible en RMN et donc généralement utilisé lors de l'étude de lipides en RMN du solide. En particulier, la RMN du ^{31}P permet d'obtenir des informations sur l'interaction de molécules avec les têtes phosphates des lipides et les spectres obtenus possèdent des signaux caractéristiques de la phase lipidique adoptée mais aussi de la forme des objets observés (Figure IV.19).

En ^{31}P -RMN des solides, les spectres enregistrés en mode statique correspondent en effet à la somme de toutes les orientations des groupements phosphates par rapport au

champ magnétique B_0 (de 0° à 90°). Dans le cas des vésicules multi-lamellaires (MLVs), les mouvements des phospholipides au sein des membranes induisent une moyenne partielle de l'anisotropie de déplacement chimique (CSA) des phospholipides, le spectre obtenu est ainsi moins large que le spectre de poudre. (Le détail de la mesure du CSA est expliquée en partie expérimentale). Dans le cas d'objets de type micelle, leur mouvement rapide se traduit sur les spectres par un seul pic fin, on parle de déplacement chimique isotrope. Les spectres obtenus permettent aussi d'obtenir le rapport (r), défini comme le paramètre de déformation qui est égal au rapport des valeurs des rayons c (selon le champ magnétique) et a (perpendiculaire au champ magnétique) (Figure IV.19).

Caractéristiques de la RMN du ^{31}P

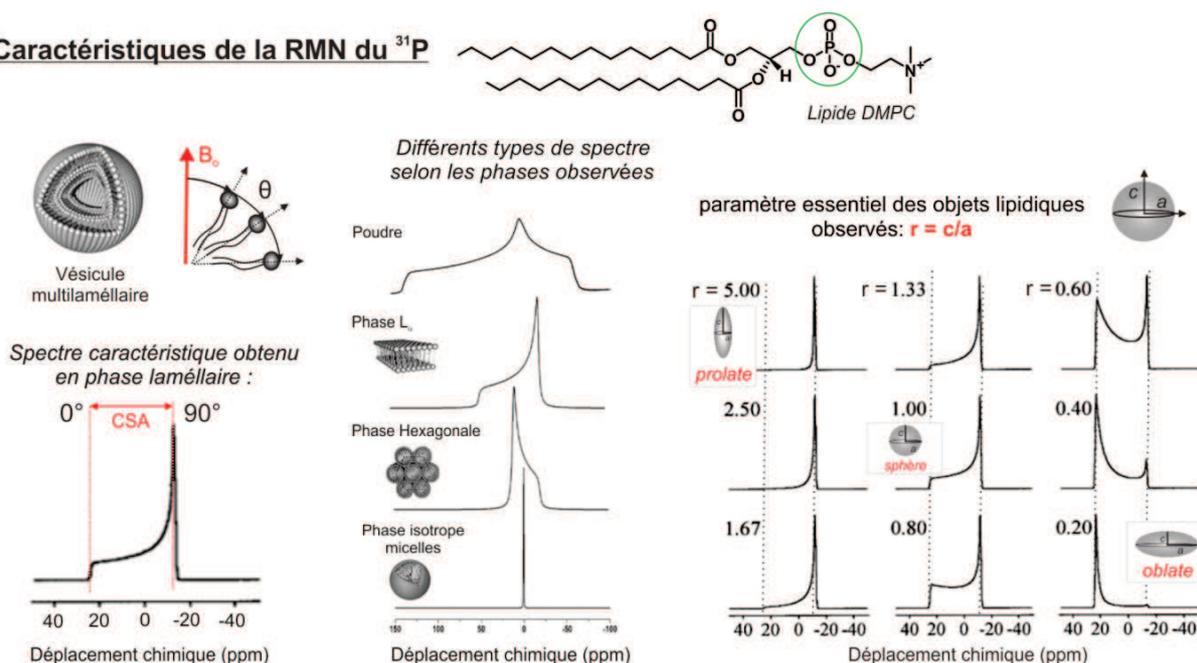


Figure IV.19 : Spectres caractéristiques obtenus par ^{31}P -RMN à l'état solide, selon les différentes phases lipidiques (en solution, en bicouche orientée dans le sens opposé du champs magnétique puis dans le même sens et enfin en phase lamellaire) ; définition de l'anisotropie de déplacement chimique (CSA) et du paramètre de déformation r des objets observés et ses conséquences sur le spectre obtenu [67].

L'étude de la région hydrophobe des systèmes membranaires est, quant à elle, réalisée par la RMN du ^2H . Elle est rendue possible par le marquage au deutérium des chaînes acyles des phospholipides (Figure IV.20). Le ^2H est un noyau de spin 1, l'interaction majoritaire est donc l'interaction quadripolaire. Tout comme les spectres du phosphore, la RMN du ^2H permet d'obtenir des signaux très caractéristiques pour chaque type de phase lipidique. L'éclatement quadripolaire ($\Delta\nu_Q$) mesuré pour chaque position marquée dépend de l'orientation de la liaison carbone-deuteron (C-D) par rapport à la direction au champ magnétique. De plus, $\Delta\nu_Q$ est aussi directement proportionnel au paramètre d'ordre. Les CD_3

de bout de chaîne, à la forte dynamique, possèdent le plus faible $\Delta\nu_Q$ alors que les CD_2 à proximité du squelette glycérol sont très immobilisés et voient leur $\Delta\nu_Q$ augmenter.

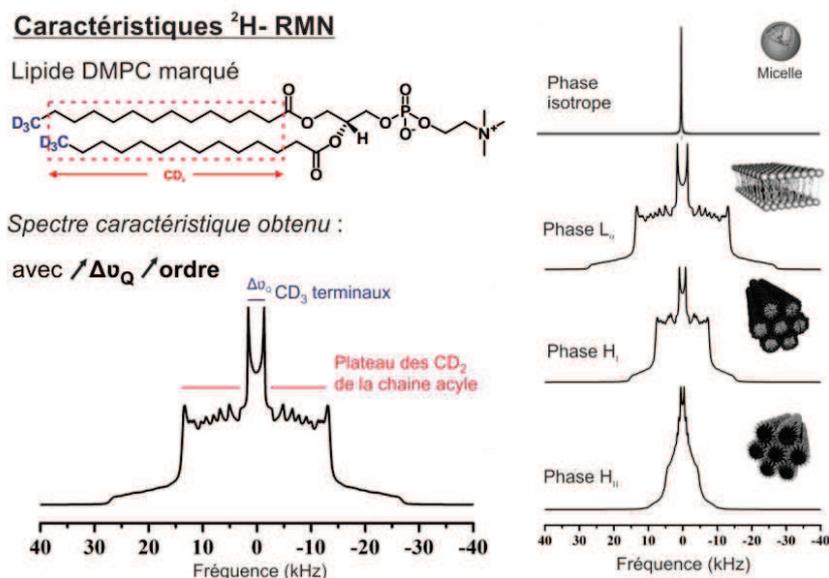


Figure IV.20 : Spectres caractéristiques obtenus par 2H -RMN à l'état solide, selon les différentes phases lipidiques (micellaire, lamellaire et hexagonale) [68].

ii) Résultats

(1) Interaction de OL22 et OL33 avec des MLVs de DMPC

Des liposomes MLVs de DMPC en présence de **OL22** ou de **OL33** avec un rapport L/O de 20 ont été analysés par RMN du ^{31}P à 283 MHz et 2H à 107 MHz en faisant varier la température entre 288 K et 313 K par pas de 10 et 5 K. Les différents spectres obtenus sont présentés en figure IV.21 et figure IV.22.

En RMN du ^{31}P et du 2H , à 288 K, on constate pour les deux oligomères l'apparition d'une phase isotrope avec un pic fin centré sur 0 ppm caractéristique de petits objets. Cette phase perdure à 298 K en présence d'**OL22**. À 298 K, **OL33** présente, pour sa part un spectre caractéristique de MLVs très déformées. À 308 K, des spectres caractéristiques de MLVs très déformées sont constatés pour les deux oligomères. La déformation induite par **OL22** est moins importante que pour **OL33**, mais on note, sur le spectre de **OL22**, la présence de 2 environnements différents pour la tête phosphate avec des valeurs différentes d'anisotropie de déplacement chimique (CSA) de 32 ppm (93 % du signal, annoté CSA 2 sur le spectre) et de 18 ppm (7 % du signal, annoté CSA 1 sur le spectre) indiquant que le mélange n'est pas homogène (probablement un mélange d'objets différemment déformés). Enfin, ce phénomène de micellisation en phase gel est réversible, la descente en température permet de reformer les petits objets.

Ce phénomène particulier a déjà été décrit pour le peptide méllittine par Dufourc *et al.* [69,70]. Il peut s'expliquer par une fragmentation de la bicouche en petits disques en phase gel, qui sous l'effet du changement de température refusionnent en phase fluide. Des études de diffusion de la lumière ou de microscopie électronique par transmission pourront être réalisées afin de confirmer le phénomène de fragmentation et d'approfondir la caractérisation des objets observés.

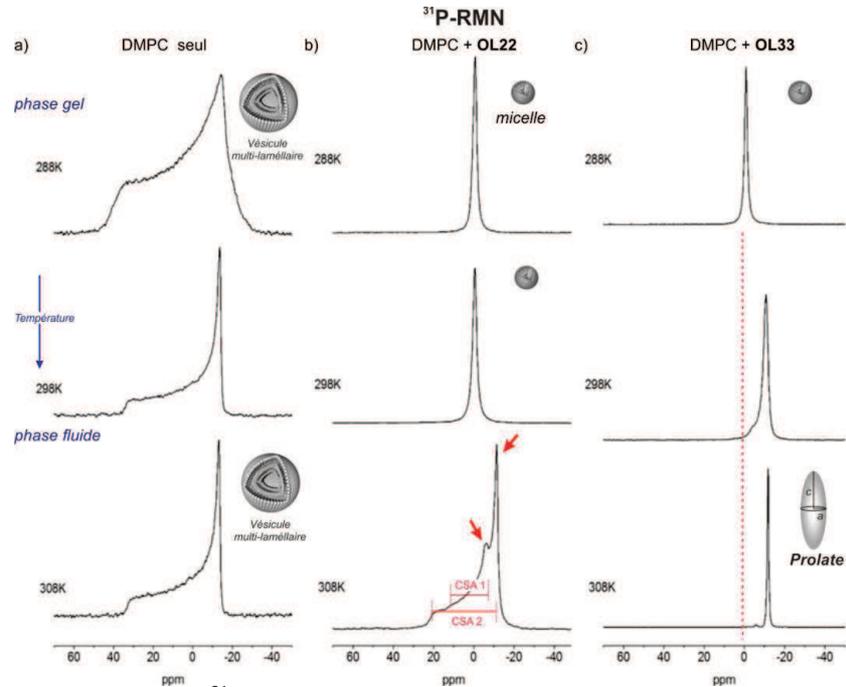


Figure IV.21 : Spectres de RMN du ^{31}P de MLVs de DMPC en a) en absence, puis en présence d'oligourée en b) **OL22**, en c) **OL33**, à un rapport L/O de 20. La température a été variée entre 288 K et 308 K.

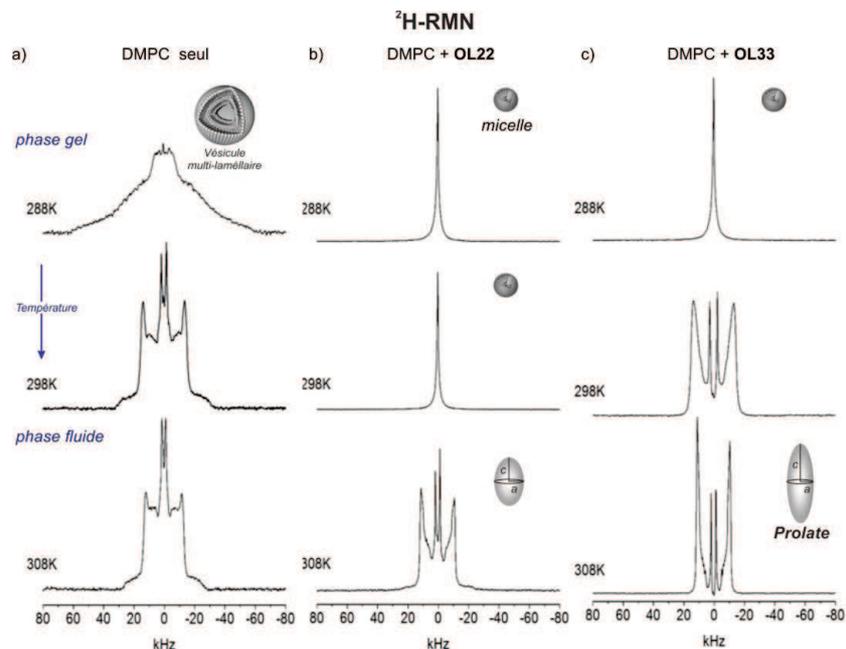


Figure IV.22 : Spectres de RMN du ^2H de MLVs de DMPC en a) en absence, puis en présence d'oligourée en b) **OL22**, en c) **OL33**, à un rapport L/O de 20. La température a été variée entre 288 K et 308 K.

Précédemment évoqués, les variations de $\Delta\nu_Q$ des chaînes deutérées observées en ^2H -RMN, reflètent la mobilité de la chaîne acyle du lipide et alors un possible changement

d'ordre au sein de la membrane lipide. Nous avons donc mesuré les éclatements quadripolaires pour les spectres obtenus en DMPC pur et en présence d'oligourées selon la méthode décrite par Grelard *et al.* (par simulation des spectres) [68]. Consécutivement les profils des paramètres d'ordre S^{CD} relatifs à la position de l'une des chaînes aliphatiques du DMPC- d_{54} pour les lipides en présence d'oligourée à 308 K ont pu être comparés à celui du DMPC pur (Figure IV.23). Pour les deux oligourées, on constate que plus on remonte sur la chaîne aliphatique des lipides de la position 14 à 2 et plus le paramètre d'ordre S^{CD} , caractéristique de la dynamique du système augmente. De plus, les groupements aliphatiques en bout de chaîne (position 2 à 9) associé au paramètre d'ordre le plus faible, présente le plus de mobilité tandis que les positions plus proches de la tête phosphate possèdent des S^{CD} plus élevés et sont plus rigides. Les oligourées se seraient donc intercalées au niveau des têtes phosphates, offrant ainsi un degré de liberté plus important aux chaînes acyles.

Pour finir, le degré de déformation des objets a aussi pu être calculé en ^2H -RMN (selon la méthode décrite par Pott et Dufourc [71]). Un rapport de c/a de 2,3 est obtenu pour **OL22** et de 5,3 pour **OL33**. La présence de **OL33** déforme donc très fortement la vésicule formée, en lui conférant une forme de prolate. Le sens de déformation reste le même mais de manière beaucoup moins prononcée pour **OL22**. Enfin, le calcul des rapports c/a obtenus par les spectres en ^{31}P -RMN corrélient avec ces résultats (*cf.* partie expérimentale Figure EP.55).

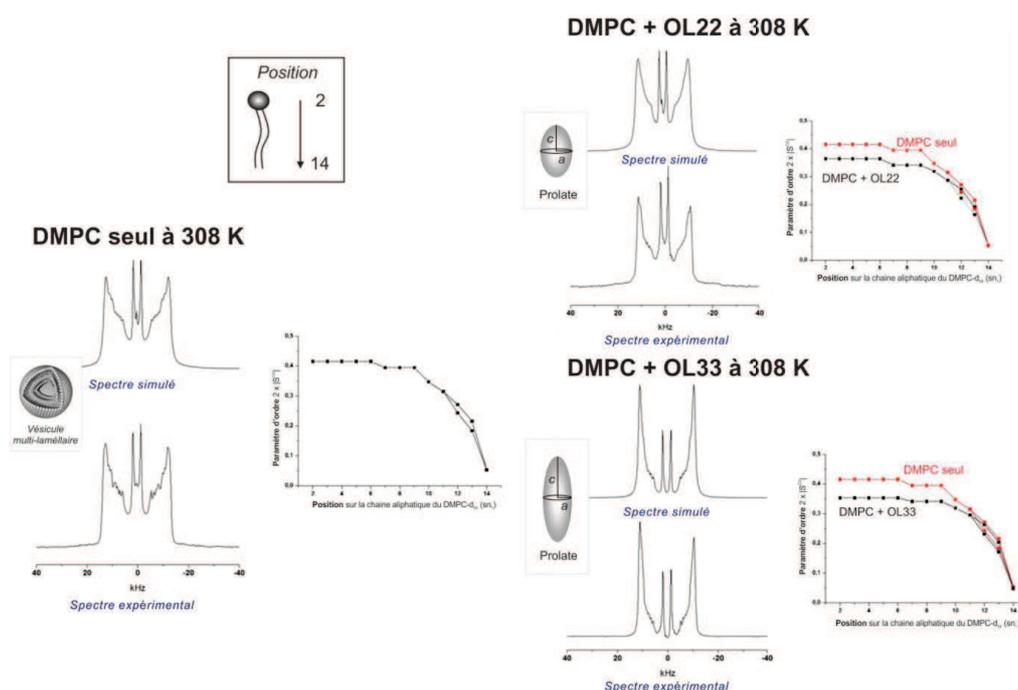


Figure IV.23 : Spectres simulés et expérimentaux pour chaque composition lipidique afin d'obtenir le profil d'ordre relatif à la chaîne aliphatique (s_{n_1}) deutérée du DMPC- d_{54} à 308 K. La simulation de DMPC seul permet de confirmer l'intégrité de la simulation.

(2) Interaction de OL22 et OL33 avec des MLVs de DMPC/DMPG

De manière identique, des liposomes MLVs constitués d'un mélange DMPC/DMPG (7:3, mol/mol) en présence de **OL22** ou de **OL33** avec un rapport L/O de 20 ont été étudiés par RMN du ^{31}P à 283 MHz et ^2H à 107 MHz. Les différents spectres obtenus sont présentés dans les figures IV.24 et IV.25.

En RMN du ^{31}P , on observe une apparition significative de deux environnements différents pour la tête phosphate et donc la ségrégation des deux têtes polaires du DMPG et du DMPC. En effet, alors que le CSA est de 45 ppm à 298 K pour les MLVs en absence d'oligourée, des CSA de 24,8 ppm (annoté sur le spectre à 308 K par CSA 1) et de 38,3 ppm (annoté sur le spectre à 308 K par CSA 2) sont observés pour les MLVs en présence de **OL22** et de 24,4 ppm et 38,2 ppm en présence de **OL33** respectivement (Figure IV.24).

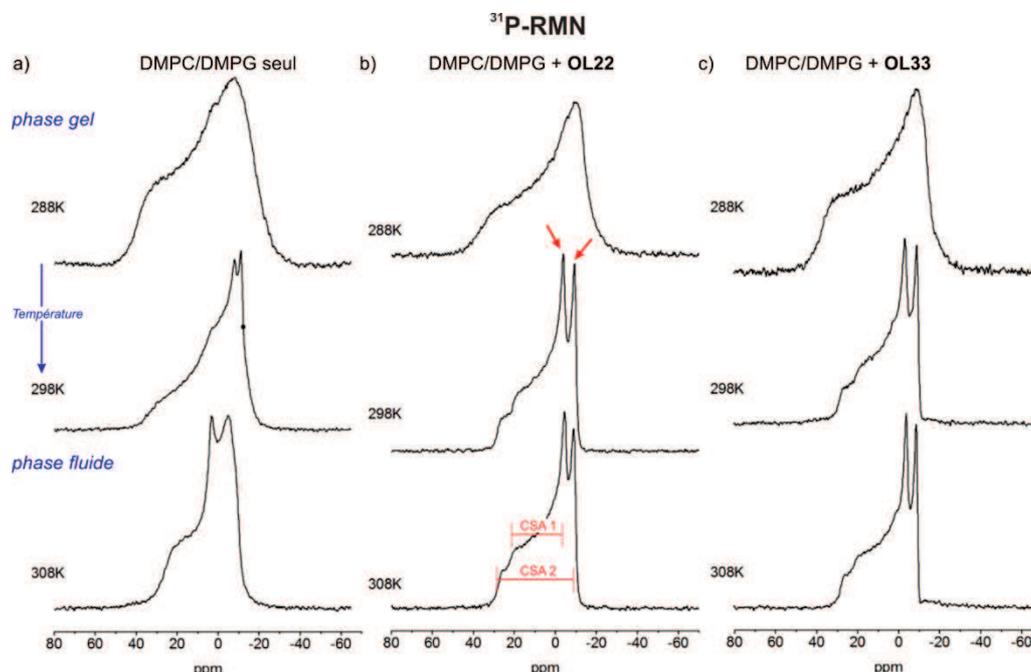


Figure IV.24 : Spectres de RMN du ^{31}P de MLVs de DMPC/DMPG (7:3, mol/mol) en a) en absence, puis en présence d'oligourée en b) **OL22**, en c) **OL33**, à un rapport L/O de 20. La température a été variée entre 288 K et 308 K.

En RMN du ^2H , les différences des écarts des éclatements quadripolaires entre les MLVs sans et avec oligourée ne sont que peu marquées (Figure IV.25). Mais on note toute de même une augmentation de ces éclatements à température ambiante (soit une diminution de la fluidité des chaînes acyles) puis leurs diminutions en phase fluide (soit l'augmentation de la fluidité des chaînes acyles). Contrairement à ce qui a pu être obtenu avec le DMPC pur, ces faibles changements de morphologie montrent une plus forte interaction électrostatique de nos oligourées avec les têtes phosphates, cette fois chargées négativement, empêchant la pénétration de l'oligourée dans le cœur hydrophobe des MLVs et alors la formation de petits

objets. A température ambiante, la forte accumulation de l'oligourée à la surface des MLVs pourrait expliquer leurs rigidités légèrement plus importantes.

Pour finir, l'allure des spectres en RMN du ^{31}P et du ^2H laisse apercevoir d'erechef une légère déformation des vésicules sous forme de prolates.

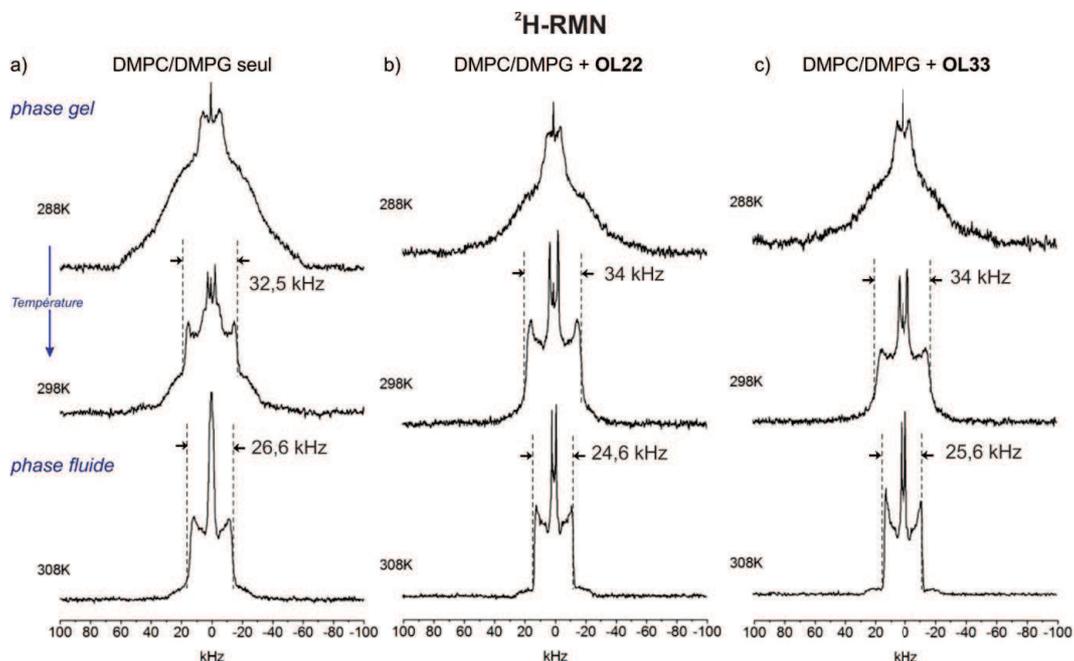


Figure IV.25 : Spectres de RMN du ^2H de MLVs de DMPC/DMPG (7:3, mol/mol) en a) en absence, puis en présence d'oligourée en b) **OL22**, en c) **OL33**, à un rapport L/O de 20. La température a été variée entre 288 K et 308 K.

(3) Interaction de OL22 et OL33 avec des MLVs de POPE/DMPG

Nous avons souhaité mettre à profit l'utilisation de la RMN afin de mimer un peu plus la membrane bactérienne en utilisant le lipide PE, constituant principal des membranes bactériennes. Ce dernier ne peut pas être utilisé en infrarouge car sa forme conique particulière induit une courbure négative et empêche la formation de bicouches supportées.

Des liposomes MLVs constitués d'un mélange POPE/DMPG (7:3, mol/mol) en présence de **OL22** ou de **OL33** avec un rapport L/O de 20 ont donc, à leur tour, été analysés par RMN du ^{31}P à 283 MHz et ^2H à 107 MHz en faisant varier à nouveau la température entre 288 K (15 °C) et 313 K (40 °C) par pas de 10 et 5 K. Les différents spectres obtenus à 298 K sont présentés sur la figure IV.26. L'ensemble des spectres est présenté en partie expérimentale (Figures EP.56 et EP.57). Aucune modification drastique de morphologie n'est induite par l'addition d'oligourées en variant la température. Les spectres de RMN du ^{31}P , en phase fluide, indiquent une augmentation du rapport c/a et la déformation en prolates orientées suivant le champ magnétique des vésicules. Le CSA de 37 ppm à 298 K pour les MLVs sans présence d'oligourée augmente à 40 ppm et 38 ppm en présence de **OL22** et

OL33 respectivement. Il est aussi possible de remarquer une légère ségrégation de la tête polaire du DMPG pour l'oligomère **OL22**. Enfin en ^2H -RMN, une différence significative d'écart des éclatements quadripolaires est observée entre les spectres avec et sans oligourée. Cette diminution des écarts de déplacements chimiques renseigne d'une plus grande fluidité des chaînes acyles des lipides et corrobore avec la déformation des objets observés en RMN du phosphore.

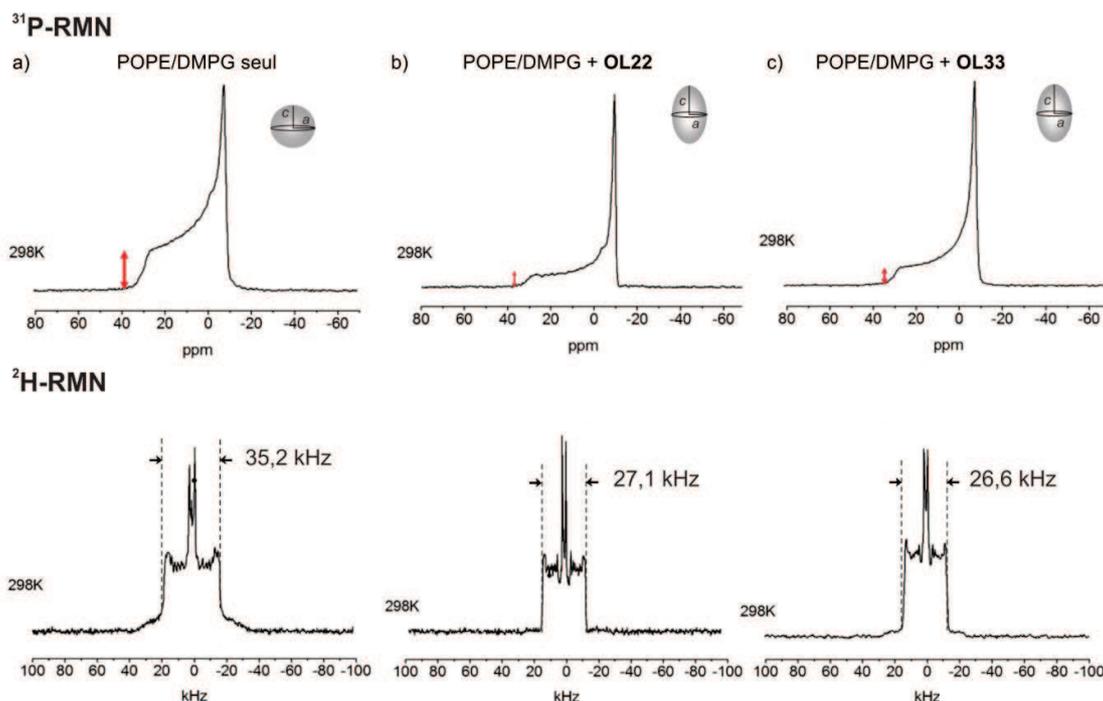


Figure IV.26 : Spectres de RMN du ^{31}P et du ^2H à 298 K, de MLVs de POPE/DMPG (7:3, mol/mol) en a) en absence, en présence d'oligourée en b) **OL22** et en c) **OL33** à un rapport L/O de 20.

4. Discussion et perspectives

L'ensemble de ces résultats démontre la capacité des oligourées **OL22** et **OL33** à interagir avec les membranes lipidiques et nous apporte de nombreuses informations.

Tout d'abord, la spectroscopie ATR-FTIR et la RMN du solide montrent clairement une différence de mécanismes selon la présence ou non de charges anioniques au sein de la membrane. Ainsi, la perte d'absorption des bandes lipides avec des membranes purement zwitterioniques en ATR-FTIR, peut être associée à un effet de « détergence » et/ou de « concentration », mais révèle dans tous les cas l'insertion profonde de l'oligourée au sein de la bicouche. En RMN du solide (en ^{31}P et ^2H), la micellisation en petits objets des MLVs de DMPC pur en dessous de la phase gel confirme cette interaction en profondeur de nos oligourées. Dans de tels systèmes non chargés, il est alors possible de conclure que ce sont les effets hydrophobes qui prédominent lors des différents processus.

En comparaison, aucun de ces phénomènes n'est observé pour les membranes chargées négativement. En ATR-FTIR, alors que l'oligourée apparaît se fixer sur la bicouche de manière sélective, il n'y a aucune diminution de l'intensité des bandes des lipides même pour de fortes concentrations. Les oligourées, de charge net positive, s'accumulent alors à la surface de la bicouche lipidique négativement chargée grâce à de fortes interactions électrostatiques, et ce, de manière non-disruptive. Cette accumulation est visible par la « rigidification » des bandes de la chaîne hydrocarbonée des lipides. De plus, la RMN met en évidence l'apparition d'un phénomène de ségrégation des lipides anioniques. Cette ségrégation, déjà constatée pour les peptides antimicrobiens naturels, pourrait être suffisante pour provoquer la fuite constatée de calcéïne (qui remarquablement démarre à de faibles concentrations ajoutées d'oligourée). Enfin cette interaction privilégiée avec les lipides anioniques est intéressante puisque le lipide PG est l'un des principaux constituants de la membrane de *B. anthracis* et que nous avons constaté que la présence de la capsule, polymère d'acide γ -(D)-glumatique négativement chargé, améliorerait les activités anthracidales *in vitro* de nos oligourées (cf. chapitre 3).

Fait intéressant, on constate que nos foldamères sont capables d'interagir de manière très disruptive avec les membranes zwitterioniques, membranes supposées mimer les membranes eucaryotes. Bien que pouvant être corrélé à l'effet observé des oligourées sur les cellules eucaryotes *in vitro*, ce résultat peut aussi traduire la simplicité du modèle membranaire employé. L'ajout de cholestérol, élément clé de la membrane eucaryote mais absent de nos modèles, pourrait être notamment envisagé. Il y a été de nombreuses fois rapporté dans la littérature que le cholestérol diminue les interactions entre les peptides antimicrobiens et les membranes, car il les rigidifie et donc les rend plus difficiles à déstabiliser et à pénétrer [72,73].

Enfin, il est aussi possible de souligner qu'une telle « dichotomie » de mécanismes d'interactions a été décrite dans la littérature pour le peptide mélittine, avec lequel nous avons déjà constaté une similarité de comportement en RMN du solide [74,75].

Cette série d'expériences nous a aussi permis d'évaluer l'impact du lipide zwitterionique PE sur l'interaction de nos oligourées avec des membranes modèles. Tout d'abord, la libération de fluorophore des liposomes riches en PE nécessite une concentration en oligourée beaucoup plus importante (soit des rapports L/O nettement plus faibles) que pour les systèmes riches en PC. Il semblerait alors que la présence de ce lipide particulier, qui induit une courbure négative aux lipides, diminue l'interaction de nos oligourées avec les

membranes. En RMN du ^2H et ^{31}P , les spectres montrent toutefois une déformation des objets observés en prolata mais on ne constate aucune formation de phase non-lamellaire comme il a pu être rapporté dans la littérature pour certains mimes synthétiques (de type phénylène éthynylène ou encore les chimères α/β peptides). L'interaction de nos oligomères d'urées ne repose pas donc sur une interaction privilégiée avec le lipide PE.

Un autre point sur lequel ces expériences ont pu nous renseigner, est l'orientation de nos oligourées lors des différents processus. Quelle que soit la composition de la membrane (chargée ou non), une orientation planaire (légèrement déviée) de nos oligomères **OL22** et **OL33** a été observée par ATR-FTIR et confirme les précédents travaux d'Aisenbrey *et al.* [76].

Finalement, cette première série d'expériences nous a aussi permis de comparer les deux oligourées **OL22** et **OL33**. Les trois techniques employées dans notre étude corroborent pour une plus faible interaction de l'oligomère **OL33** avec les membranes purement zwitterioniques par rapport à celle de **OL22**. En revanche, en présence de membranes négativement chargées, **OL22** et **OL33** interagissent de manière similaire. Ils posséderaient ainsi la même capacité à s'accumuler à la surface des membranes chargée négativement de par des interactions électrostatiques, mais ne détiendraient pas la même capacité à interagir en profondeur avec une membrane zwitterionique. De ce fait, ces résultats soulèvent alors la question d'une possible différence d'hydrophobicité entre les oligourées **OL22** et **OL33** mais surtout, d'une potentielle différence de capacité à s'oligomériser à la surface de la membrane (possiblement due à l'absence des deux sites de reconnaissance d'anions en position « N-terminale » bloqués par la présence des pyrrolidines). En effet, la capacité de nos oligomères à former des agrégats pourrait fortement influencer sur l'interaction avec les membranes. De plus, de récents travaux dans le groupe ont confirmé la forte potentialité de nos oligourées *N,N'*-liées de nature amphipathique à former des assemblages supramoléculaires [77]. Pour répondre à ces nouvelles interrogations, des expériences de fluorescence des noyaux indoles présents sur nos oligomères pourraient être réalisées afin de connaître ainsi leur capacité à s'oligomériser.

Un dernier point concerne l'ajout du lipide PE dans la composition des membranes modèles. Contrairement à **OL22**, l'interaction de **OL33** semble être annihilée par la présence de ce lipide, comme le démontrent l'absence de relargage de marqueur fluorescent des liposomes et les spectres obtenus en RMN du solide. Cette différence d'interaction avec les systèmes lipidiques PE/PG est intéressante puisqu'elle permettrait d'expliquer la perte d'activité observée *in vitro* sur *B. anthracis*. Toutefois à l'heure actuelle, il reste impossible de comprendre dans le détail ce que provoque l'insertion de ces deux pyrrolidines en

position « N-terminale ». Afin d'approfondir cette étude, de nombreuses pistes sont envisageables. Tout d'abord, des expériences de résonance plasmonique aux ondes guidées, technique analogue de la résonance plasmonique des surfaces, ont été initiées [78]. Ensuite, des expériences de diffusion de la lumière permettraient de caractériser les petits objets formés en RMN du solide avec les vésicules de DMPC et l'encapsulation de marqueurs fluorescents de différents tailles (de type Dextran) permettrait l'évaluation de la taille des « pores » formés durant les différentes interactions.

Bibliographie

- [1] W. Stillwell, Chapter 8 - from lipid bilayers to lipid rafts, in: W. Stillwell (Ed.) An introduction to biological membranes, Elsevier, San Diego, 2013, pp. 117-129.
- [2] S.J. Singer, G.L. Nicolson, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, 175 (1972) 720-731.
- [3] W. Stillwell, Chapter 9 - basic membrane properties of the fluid mosaic model, in: W. Stillwell (Ed.) An introduction to biological membranes, Elsevier, San Diego, 2013, pp. 131-174.
- [4] Bretschke, Ms, Asymmetrical lipid bilayer structure for biological-membranes, *Nature, New Biol.*, 236 (1972) 11-&.
- [5] K. Simons, E. Ikonen, Functional rafts in cell membranes, *Nature*, 387 (1997) 569-572.
- [6] K. Simons, M.J. Gerl, Revitalizing membrane rafts: New tools and insights, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11 (2010) 688-699.
- [7] W.W. Navarre, O. Schneewind, Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63 (1999) 174-229.
- [8] T.J. Beveridge, Structures of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles, *J. Bacteriol.*, 181 (1999) 4725-4733.
- [9] P. Tripathi, A. Beaussart, G. Andre, T. Rolain, S. Lebeer, J. Vanderleyden, P. Hols, Y.F. Dufrêne, Towards a nanoscale view of lactic acid bacteria, *Micron*, 43 (2012) 1323-1330.
- [10] K. Matsuzaki, Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1462 (1999) 1-10.
- [11] A. Fouet, S. Mesnage, Bacillus anthracis cell envelope components, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 271 (2002) 87-113.
- [12] A. Fouet, The surface of bacillus anthracis, *Mol. Aspects Med.*, 30 (2009) 374-385.
- [13] S. Mesnage, E. Tosi-Couture, P. Gounon, M. Mock, A. Fouet, The capsule and S-layer: Two independent and yet compatible macromolecular structures in bacillus anthracis, *J. Bacteriol.*, 180 (1998) 52-58.
- [14] J.N. Israelachvili, D.J. Mitchell, B.W. Ninham, Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 470 (1977) 185-201.
- [15] V. Luzzati, Biological significance of lipid polymorphism: The cubic phases, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 7 (1997) 661-668.
- [16] J.M. Seddon, Structure of the inverted hexagonal (H_{II}) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids, *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.*, 1031 (1990) 1-69.
- [17] R.M. Epand, Lipid polymorphism and protein-lipid interactions, *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.*, 1376 (1998) 353-368.
- [18] D.D. Lasic, Novel applications of liposomes, *Trends Biotechnol.*, 16 (1998) 307-321.
- [19] C. Loudet, A. Diller, A. Grélard, R. Oda, E.J. Dufourc, Biphenyl phosphatidylcholine: A promoter of liposome deformation and bicelle collective orientation by magnetic fields, *Prog. Lipid Res.*, 49 (2010) 289-297.
- [20] R. Winter, C. Jeworrek, Effect of pressure on membranes, *Soft Matter*, 5 (2009) 3157-3173.
- [21] C.B. Park, K.-S. Yi, K. Matsuzaki, M.S. Kim, S.C. Kim, Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: The proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97 (2000) 8245-8250.
- [22] A.C. Seefeldt, F. Nguyen, S. Antunes, N. Perebaskine, M. Graf, S. Arenz, K.K. Inampudi, C. Douat, G. Guichard, D.N. Wilson, C.A. Innis, The proline-rich antimicrobial peptide onc112 inhibits translation by blocking and destabilizing the initiation complex, *Nature structural & molecular biology*, advance online publication (2015).
- [23] K.A. Brogden, Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?, *Nat. Rev. Microbiol.*, 3 (2005) 238-250.
- [24] D. Yang, O. Chertov, S.N. Bykovskaia, Q. Chen, M.J. Buffo, J. Shogan, M. Anderson, J.M. Schröder, J.M. Wang, O.M.Z. Howard, J.J. Oppenheim, B-defensins: Linking innate and adaptive immunity through dendritic and T-cell CCR6, *Science*, 286 (1999) 525-528.
- [25] G. Diamond, N. Beckloff, A. Weinberg, K.O. Kisich, The roles of antimicrobial peptides in innate host defense, *Curr. Pharm. Des.*, 15 (2009) 2377-2392.
- [26] M. Zasloff, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature*, 415 (2002) 389.
- [27] H.W. Huang, Action of antimicrobial peptides: Two-state model, *Biochemistry*, 39 (2000) 8347-8352.
- [28] F.Y. Chen, M.T. Lee, H.W. Huang, Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation, *Biophys. J.*, 84 (2003) 3751-3758.
- [29] R.E.W. Hancock, Peptide antibiotics, *The Lancet*, 349 (1997) 418-422.
- [30] V. Teixeira, M.J. Feio, M. Bastos, Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes, *Prog. Lipid Res.*, 51 (2012) 149-177.
- [31] L.T. Nguyen, E.F. Haney, H.J. Vogel, The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action, *Trends Biotechnol.*, 29 (2011) 464-472.

- [32] B. Bechinger, The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1462 (1999) 157-183.
- [33] L. Yang, T.A. Harroun, T.M. Weiss, L. Ding, H.W. Huang, Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores, *Biophys. J.*, 81 (2001) 1475-1485.
- [34] H. Sato, J.B. Feix, Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1758 (2006) 1245-1256.
- [35] Y. Shai, Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1462 (1999) 55-70.
- [36] Y. Shai, Z. Oren, From "carpet" mechanism to *de-novo* designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides, *Peptides*, 22 (2001) 1629-1641.
- [37] E. Gazit, A. Boman, H.G. Boman, Y. Shai, Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles, *Biochemistry*, 34 (1995) 11479-11488.
- [38] K. Matsuzaki, O. Murase, N. Fujii, K. Miyajima, An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation, *Biochemistry*, 35 (1996) 11361-11368.
- [39] K.A. Henzler Wildman, D.-K. Lee, A. Ramamoorthy, Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, Il-37, *Biochemistry*, 42 (2003) 6545-6558.
- [40] S. Yamaguchi, T. Hong, A. Waring, R.I. Lehrer, M. Hong, Solid-state NMR investigations of peptide-lipid interaction and orientation of a β -sheet antimicrobial peptide, protegrin, *Biochemistry*, 41 (2002) 9852-9862.
- [41] D. Sengupta, H. Leontiadou, A.E. Mark, S.-J. Marrink, Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1778 (2008) 2308-2317.
- [42] H. Leontiadou, A.E. Mark, S.J. Marrink, Antimicrobial peptides in action, *J. Am. Chem. Soc.*, 128 (2006) 12156-12161.
- [43] A. Pokorny, T.H. Birkbeck, P.F.F. Almeida, Mechanism and kinetics of δ -lysin interaction with phospholipid vesicles, *Biochemistry*, 41 (2002) 11044-11056.
- [44] M. Miteva, M. Andersson, A. Karshikoff, G. Otting, Molecular electroporation: A unifying concept for the description of membrane pore formation by antibacterial peptides, exemplified with nk-lysin, *FEBS Lett.*, 462 (1999) 155-158.
- [45] R.E.W. Hancock, D.S. Chapple, Peptide antibiotics, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43 (1999) 1317-1323.
- [46] R.M. Epand, R.F. Epand, Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents, *J. Pept. Sci.*, 17 (2011) 298-305.
- [47] E.F. Haney, S. Nathoo, H.J. Vogel, E.J. Prenner, Induction of non-lamellar lipid phases by antimicrobial peptides: A potential link to mode of action, *Chem. Phys. Lipids*, 163 (2010) 82-93.
- [48] A. Som, S. Vemparala, I. Ivanov, G.N. Tew, Synthetic mimics of antimicrobial peptides, *Pept. Sci.*, 90 (2008) 83-93.
- [49] R.F. Epand, N. Umezawa, E.A. Porter, S.H. Gellman, R.M. Epand, Interactions of the antimicrobial β -peptide β -17 with phospholipid vesicles differ from membrane interactions of magainins, *Eur. J. Biochem.*, 270 (2003) 1240-1248.
- [50] R.F. Epand, L. Raguse, S.H. Gellman, R.M. Epand, Antimicrobial 14-helical β -peptides: Potent bilayer disrupting agents, *Biochemistry*, 43 (2004) 9527-9535.
- [51] R.F. Epand, M.A. Schmitt, S.H. Gellman, A. Sen, M. Auger, D.W. Hughes, R.M. Epand, Bacterial species selective toxicity of two isomeric α/β -peptides: Role of membrane lipids, *Mol. Membr. Biol.*, 22 (2005) 457-469.
- [52] R.F. Epand, M.A. Schmitt, S.H. Gellman, R.M. Epand, Role of membrane lipids in the mechanism of bacterial species selective toxicity by two α/β -antimicrobial peptides, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1758 (2006) 1343-1350.
- [53] Y. Su, W.F. DeGrado, M. Hong, Orientation, dynamics, and lipid interaction of an antimicrobial arylamide investigated by ^{19}F and ^{31}P solid-state NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, 132 (2010) 9197-9205.
- [54] W. Hu, A. Som, G.N. Tew, Interaction between lipids and antimicrobial oligomers studied by solid-state NMR, *J. Phys. Chem. B*, 115 (2011) 8474-8480.
- [55] L. Yang, V.D. Gordon, A. Mishra, A. Som, K.R. Purdy, M.A. Davis, G.N. Tew, G.C.L. Wong, Synthetic antimicrobial oligomers induce a composition-dependent topological transition in membranes, *J. Am. Chem. Soc.*, 129 (2007) 12141-12147.
- [56] M.W. Lee, S. Chakraborty, N.W. Schmidt, R. Murgai, S.H. Gellman, G.C.L. Wong, Two interdependent mechanisms of antimicrobial activity allow for efficient killing in nylon-3-based polymeric mimics of innate immunity peptides, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1838 (2014) 2269-2279.
- [57] G. Rouser, S. Fleischer, A. Yamamoto, Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots, *Lipids*, 5 (1970) 494-496.
- [58] K. Matsuzaki, M. Harada, T. Handa, S. Funakoshi, N. Fujii, H. Yajima, K. Miyajima, Magainin 1-induced leakage of entrapped calcein out of negatively-charged lipid vesicles, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 981 (1989) 130-134.
- [59] T. Benachir, M. Lafleur, Study of vesicle leakage induced by melittin, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1235 (1995) 452-460.

- [60] S. Castano, B. Desbat, Structure and orientation study of fusion peptide FP23 of GP41 from HIV-1 alone or inserted into various lipid membrane models (mono-, bi- and multi-layers) by FT-IR spectroscopies and Brewster angle microscopy, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1715 (2005) 81-95.
- [61] A. Violette, S. Fournel, K. Lamour, O. Chaloin, B. Frisch, J.-P. Briand, H. Monteil, G. Guichard, Mimicking helical antibacterial peptides with nonpeptidic folding oligomers, *Chem. Biol.*, 13 (2006) 531-538.
- [62] D. Cavagnat, P. Claudon, L. Fischer, G. Guichard, B. Desbat, Experimental and theoretical study of the vibrational spectra of oligoureas: Helical versus β -sheet-type secondary structures, *J. Phys. Chem. B*, 115 (2011) 4446-4452.
- [63] C. Aisenbrey, N. Pendem, G. Guichard, B. Bechinger, Solid state NMR studies of oligourea foldamers: Interaction of ^{15}N labelled amphiphilic helices with oriented lipid membranes, *Org. Biomol. Chem.*, 10 (2012) 1440-1447.
- [64] E. Strandberg, A.S. Ulrich, NMR methods for studying membrane-active antimicrobial peptides, *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, 23A (2004) 89-120.
- [65] E.F. Haney, H.J. Vogel, Chapter 1 NMR of antimicrobial peptides, in: *Annual reports on NMR spectroscopy*, vol. Volume 65, Academic Press, 2009, pp. 1-51.
- [66] B. Bechinger, E.S. Salnikow, The membrane interactions of antimicrobial peptides revealed by solid-state NMR spectroscopy, *Chem. Phys. Lipids*, 165 (2012) 282-301.
- [67] F. Picard, M.-J. Paquet, J. Levesque, A. Bélanger, M. Auger, ^{31}P NMR first spectral moment study of the partial magnetic orientation of phospholipid membranes, *Biophys. J.*, 77 (1999) 888-902.
- [68] A. Grélard, P. Guichard, P. Bonnafous, S. Marco, O. Lambert, C. Manin, F. Ronzon, E.J. Dufourc, Hepatitis B subvirus particles display both a fluid bilayer membrane and a strong resistance to freeze drying: A study by solid-state NMR, light scattering, and cryo-electron microscopy/tomography, *FASEB J.*, 27 (2013) 4316-4326.
- [69] E.J. Dufourc, I.C.P. Smith, J. Dufourcq, Molecular details of melittin-induced lysis of phospholipid-membranes as revealed by deuterium and phosphorus NMR, *Biochemistry*, 25 (1986) 6448-6455.
- [70] E.J. Dufourc, J.F. Faucon, G. Fourche, J. Dufourcq, T. Gulikkrzywicki, M. Lemaire, Reversible disk-to-vesicle transition of melittin-dppc complexes triggered by the phospholipid acyl chain melting, *FEBS Lett.*, 201 (1986) 205-209.
- [71] T. Pott, E.J. Dufourc, Action of melittin on the DPPC-cholesterol liquid-ordered phase: A solid state ^2H - and ^{31}P -NMR study, *Biophys. J.*, 68 (1995) 965-977.
- [72] E.M. Tytler, G.M. Anantharamaiah, D.E. Walker, V.K. Mishra, M.N. Palgunachari, J.P. Segrest, Molecular basis for prokaryotic specificity of magainin-induced lysis, *Biochemistry*, 34 (1995) 4393-4401.
- [73] H. Raghuraman, A. Chattopadhyay, Cholesterol inhibits the lytic activity of melittin in erythrocytes, *Chem. Phys. Lipids*, 134 (2005) 183-189.
- [74] A.S. Ladokhin, S.H. White, 'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1514 (2001) 253-260.
- [75] N. Papo, Y. Shai, Exploring peptide membrane interaction using surface plasmon resonance: Differentiation between pore formation versus membrane disruption by lytic peptides, *Biochemistry*, 42 (2003) 458-466.
- [76] C. Aisenbrey, P. Nagendar, G. Guichard, B. Bechinger, Solid state NMR studies of oligourea foldamers: Interaction of ^{15}N -labelled amphiphilic helices with oriented lipid membranes, *Org. Biomol. Chem.*, 10 (2011) 1440-1447.
- [77] G.W. Collie, K. Pulka-Ziach, C.M. Lombardo, J. Fremaux, F. Rosu, M. Decossas, L. Mauran, O. Lambert, V. Gabelica, C.D. Mackereth, G. Guichard, Shaping quaternary assemblies of water-soluble non-peptide helical foldamers by sequence manipulation, *Nat. Chem.*, 7 (2015) 871-878.
- [78] Z. Salamon, G. Tollin, Optical anisotropy in lipid bilayer membranes: Coupled plasmon-waveguide resonance measurements of molecular orientation, polarizability, and shape, *Biophys. J.*, 80 (2001) 1557-1567.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les peptides antimicrobiens naturels (biomolécules amphipathiques de charge nette généralement positive) sont d'importants effecteurs de l'immunité innée. De par leur large spectre d'activité antimicrobienne et leur mode d'action (en entraînant la perméabilisation de la membrane bactérienne), ils présentent en théorie un faible potentiel d'induction de résistance et ont donc suscité un intérêt croissant pour des développements thérapeutiques innovants au cours de ces deux dernières décennies. Néanmoins, ils possèdent aussi plusieurs inconvénients qui entravent leurs valorisations comme des activités hémolytiques importantes, une faible stabilité protéolytique et une potentielle désactivation en milieu salin.

Pour pallier ces limitations, la synthèse *de novo* de mimes synthétiques de peptides naturels antimicrobiens s'est récemment développée. Ce vaste domaine d'exploration a largement bénéficié de l'intérêt croissant pour la conception de nouvelles architectures moléculaires, inspirées par les biopolymères, que l'on appelle foldamères. Les foldamères combinent différentes propriétés leur permettant d'être de très intéressants candidats pour cibler des macromolécules biologiques (taille moyenne, surface de contact importante adaptée à la reconnaissance des surfaces biologiques étendues, très forte prédictibilité de repliement, modularité, diversité et résistance à la protéolyse). Ainsi, afin de reproduire la structure et la fonction des peptides tout en augmentant leur potentiel thérapeutique, la conception de foldamères a été envisagée, tels que les β -peptides, les peptoïdes et les arylamides. Des structures plus flexibles ont aussi vu le jour comme les oligomères de phénylène-éthynylène, les oligoacylsines, les AA-peptides, les polymères antimicrobiens, pour finir jusqu'à des structures globulaires avec les dendrimères. Malgré leur grande pluralité de structures, les relations structure-activité, résumées dans le chapitre 1, mettent toutes en évidence le rôle clé du rapport hydrophobicité/hydrophilicité afin de garantir une activité antimicrobienne et une certaine sélectivité vis-à-vis des cellules eucaryotes.

Au laboratoire, nous nous intéressons à une famille de foldamères peptidomimétiques à base d'urées capables d'adopter des structures en hélice de type 2,5 et stabilisées par un réseau de liaisons hydrogène à trois centres. De précédents travaux ont mis en évidence que des oligourées à huit résidus de conformation hélicoïdale et conçues pour mimer le caractère amphiphile de peptides antimicrobiens (et notamment **OL22**, Figure 1a) possédaient une activité antimicrobienne *in vitro* contre des bactéries Gram-négatif et Gram-positif, tout en restant sélectives vis-à-vis des cellules eucaryotes. Cette forte activité antimicrobienne a ensuite été retrouvée contre différentes souches de *B. anthracis*, bactérie Gram-positif considérée à l'heure actuelle comme une arme biologique potentielle, avec une

EC₅₀ pour l'oligourée **OL22** de 3,3 µg/mL sur spores après germination et sur bacilles encapsulés et une cinétique de l'effet bactéricide extrêmement rapide (Figure 1b).

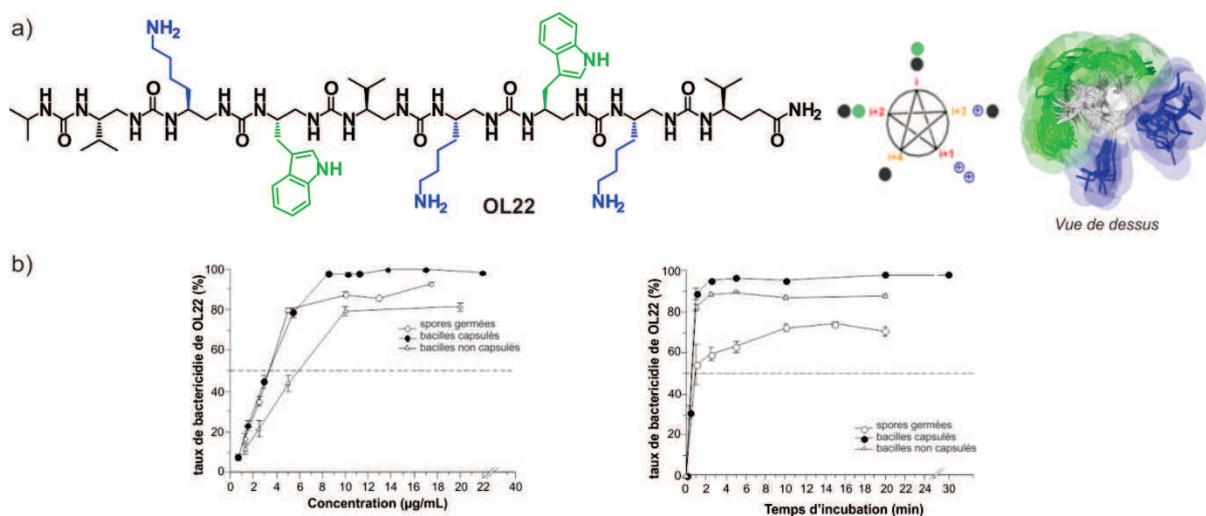


Figure. 1 : a) Séquence de l'octamère **OL22** conçue pour adopter une structure hélicoïdale amphiphile ; b) Taux de bactéricidie de **OL22** en fonction de la concentration et en fonction du temps d'incubation sur spores germées (ronds vides), bacilles capsulés (ronds noirs) et bacilles non capsulés (triangles).

Ces résultats ont constitué la base de ce travail de thèse pour le développement d'une nouvelle génération de composés dans le but d'optimiser la molécule **OL22** en termes d'activité anthracidale mais également en termes de sélectivité. A cet effet, plusieurs séries de modifications chimiques ont été envisagées pour moduler les propriétés physicochimiques et biologiques des oligourées. Le premier volet de cette thèse, résumé en chapitre 2, a été ainsi consacré à la conception de nouveaux squelettes originaux par insertion de motifs isostères (thiourées (NHC(=S)NH)) et guanidines (NH(C=NH)NH)).

La synthèse des nouveaux monomères activés de type thiocarbamoylbenzotriazole correspondants et des oligomères hybrides urée/thiourée a tout d'abord été réalisée en solution. L'étude conformationnelle approfondie (par dichroïsme circulaire, RMN ¹H et cristallographie aux rayons X) de ces différents oligomères préparés en solution a permis de comprendre l'impact de telles substitutions sur le squelette de l'hélice-2,5 formée par les urées *N,N'*-liées. Il a ainsi été démontré que l'hélice canonique n'est pas affectée par l'insertion de motif thiourée près du pôle négatif du macrodipôle de l'hélice mais l'est très fortement près du pôle positif.

Ensuite la stratégie de synthèse de ces molécules hybrides a pu être étendue à la synthèse sur phase solide (Figure 2). Si la stratégie Boc, développée en solution, a été facilement transposée à la phase solide grâce à l'utilisation de monomère thiocarbamoylbenzotriazole activé, il n'en a pas été le cas pour la stratégie de type azoture. Des problèmes d'instabilité du monomère de type azoture benzotriazole en conditions micro-ondes et la formation de produits secondaires cycliques ont été constatés. Ces

difficultés nous ont alors amenés à utiliser une protection temporaire de type *N*-Fmoc pour pouvoir insérer simplement le lien thiourée. Fait majeur, l'utilisation du monomère *N*-Fmoc isothiocyanate **M7** a permis de contourner les problèmes de sur-insertion des blocs *N*-Fmoc protégés et d'obtenir de très bons résultats.

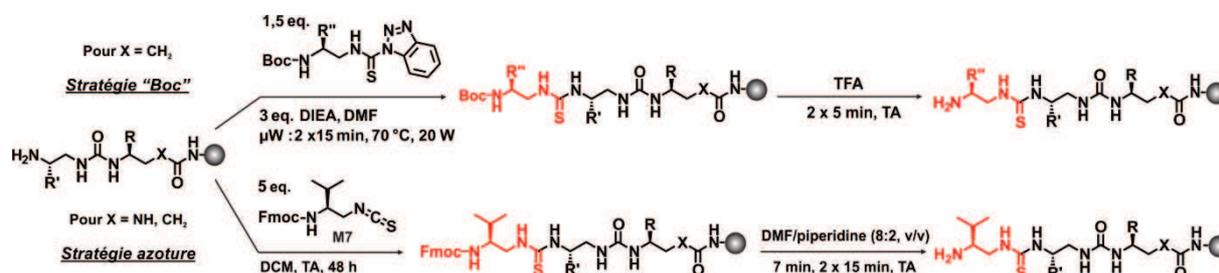


Figure. 2 : Méthodologie de synthèse développée pour l'insertion de lien thiourée sur support solide.

Une fois l'insertion du lien thiourée maîtrisée, le motif isostère de type guanidine a pu être inséré à son tour en solution puis sur support solide, par substitution du lien thiourée, précédemment installé. La nouvelle méthodologie développée utilise l'activation de la fonction thiourée par l'iodure de méthane suivie de sa substitution en motif guanidinium par l'attaque nucléophile d'une amine. Durant le développement de cette nouvelle méthodologie, il a été mis en avant que l'installation en position *i*-1 d'un acide γ -aminé est toutefois nécessaire pour pallier une cyclisation intramoléculaire au cours de l'activation.

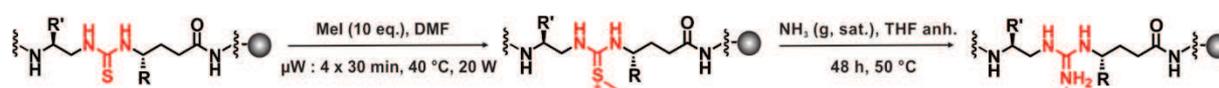


Figure. 3 : Méthodologie de synthèse développée pour l'insertion de lien guanidine sur support solide.

Une fois ces nouveaux oligomères « guanidines » préparés, leurs études conformationnelles ont montré que, de manière similaire à l'insertion de lien thiourée, l'hélicité est faiblement perturbée en position « C-terminale » mais l'est fortement en position centrale.

Après la mise en place de ces nouveaux outils synthétiques, ils ont pu être valorisés lors de l'étude de relation structure-activité ciblant *B. anthracis* et nous ont permis d'évaluer l'impact de telles modifications du squelette sur l'hélicité des oligourées et par conséquent sur l'activité antimicrobienne.

Par la suite, des modifications de la séquence primaire de l'oligourée **OL1** afin d'évaluer l'impact de différentes chaînes latérales dans la relation structure-activité ont été envisagées. L'évaluation des chaînes latérales de type imidazole mais aussi la modification

de la face hydrophobe par l'introduction de chaînes latérales de type tyrosine ou par l'introduction de groupements trifluorométhylènes ont été réalisées. L'incidence de modification du squelette et de l'hélicité des composés a pu aussi être évaluée par l'insertion de groupements de type carbamate et pyrrolidine.

La relation structure-activité a mis en évidence l'étroite corrélation entre l'activité anthracidale de nos oligomères et leurs structurations hélicoïdales. La composition du squelette aux extrémités « C-terminale » et « N-terminale » semble aussi particulièrement déterminante. Enfin, grâce à cette étude, l'activité antimicrobienne de l'oligomère de référence, **OL22** a pu être améliorée : **OL23** et **OL35** par exemple, possèdent respectivement des EC₅₀ de 1 et 0,8 µg/mL sur spores après germination.

Parallèlement à la relation structure-activité, la première étude *in vivo* sur un modèle d'infection systémique par *B. anthracis* chez la souris a été réalisée avec l'oligourée **OL22** (Figure 3). L'étude pharmacocinétique, réalisée par tritiation montre qu'après injection par voie intraveineuse, une distribution rapide de la circulation sanguine dans les organes puis une accumulation stable et sélective dans le rein de la souris ont lieu. Lors de l'infection sous-cutanée et par inhalation par *B. anthracis*, le traitement par **OL22** sur le même site d'infection permet de retarder le décès de la souris. Dans le cas de l'infection sous-cutanée, une survie à hauteur de 30 % est obtenue après traitement.

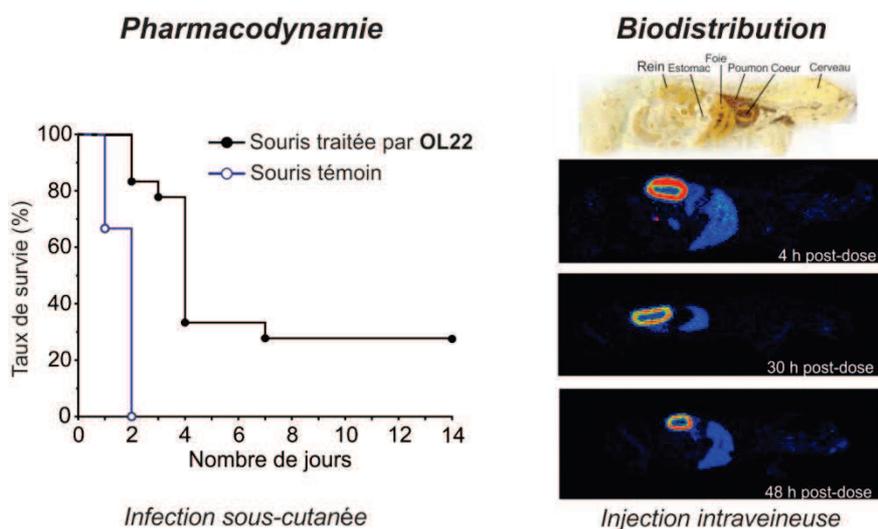


Figure. 3 : Efficacité *in vivo* de l'oligourée **OL22** sur l'infection cutanée par *B. anthracis* et étude de la biodistribution : coupes sagittales médianes et latérales de souris entière, à 4, 30 et 48 h après l'injection intraveineuse de l'oligourée tritiée [³H]-**OL22**.

Enfin, l'influence de la longueur des oligourées *via* la dimérisation des séquences a été examinée sur l'activité *in vitro* et *in vivo*. Toutefois, si une nette amélioration des activités *in vitro* est observable, l'activité *in vivo* des dimères est équivalente à celle de **OL22**. Au regard du nombre limités d'évaluations *in vivo* de mimes synthétiques de peptides

antimicrobiens naturels publiées, ces études sur le modèle d'infection par *B. anthracis* montrent le fort potentiel thérapeutique de ce type d'architecture repliée non naturelle.

La dernière partie de cette thèse consistait à l'étude des propriétés d'interaction de ces nouvelles générations de molécules avec des modèles de membranes par différentes méthodes spectroscopiques (Infra-Rouge par Transformée de Fourier, fluorescence) et par des expériences par RMN du solide (en phosphore et deutérium). Les premiers résultats semblent montrer que la présence de lipides négativement chargés dans la membrane induit un mécanisme d'interaction différent de celui en présence de membrane zwitterionique. Tandis que l'oligourée s'insère profondément dans les membranes zwitterioniques, provoquant à terme sa micellisation, l'oligourée s'accumule à la surface des membranes anioniques sans effet disruptif.

Cette thèse a permis d'initier un certain nombre de nouveaux projets, qui vont être poursuivis, comme l'étude de l'interaction de nos composés avec des membranes modèles, la création de surfaces d'or greffées avec nos oligourées antimicrobiennes mais aussi le développement de la synthèse d'oligourée comportant des motifs fluorés permettant l'utilisation de la RMN du fluor dans l'étude du mécanisme d'action de nos composés avec des modèles membranaires pertinents.

De plus, l'ensemble des données recueillies au cours de cette thèse forment une base solide pour la conception de nouveaux foldamères de type oligourée capable d'interagir avec des macromolécules biologiques et tout particulièrement pour de possibles applications de nos oligourées *N,N'*-liées comme transporteurs membranaires. Il existe en effet une étroite relation entre les peptides vecteurs et les peptides antimicrobiens, lien notamment mis en exergue par la similitude des séquences utilisées dans le cadre du projet de transfection d'acides nucléiques dont les travaux ont été récemment publiés par le groupe.

Enfin, la découverte de cibles intracellulaires pour les peptides antimicrobiens naturels pourrait aussi être étendue à l'approche foldamères avec lesquels des interactions protéine/protéine vitales pour la bactérie pourraient être évaluées.

PARTIE
EXPERIMENTALE

1. General methods

Commercially available reagents were used throughout without purification. The solvents were purchased from Sigma-Aldrich. THF, DCM and Toluene were preliminary dried by passing through solvent drying system (SPS 800 Manual from MBraun). TFA was purchased from Alfa Aesar. DMF and DCM for solid phase synthesis were purchased from Carlo ERBA. RP-HPLC-quality acetonitrile (CH₃CN) and MilliQ water were used for RP-HPLC analyses and purification. *N*-protected amino acids were purchased from Polypeptide Laboratories or Iris Biotech. NovaPEG Rink amide resin was purchased from Novabiochem and 4-methylbenzhydrylamine (MBHA) from PolyPeptide laboratories.

Thin layer chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 F254 (Merk) with detection by UV light and charring with 1% w/w ninhydrin in ethanol followed by heating. Flash Column chromatographies were carried out on silica gel (40-63 μm, Merck). Purifications by automated combiflash were performed with the Teledyne Isco Combiflash Rf[†].

Solid phase oligourea syntheses with microwave irradiation were carried out on DiscoverR System, or when notified on the DiscoverBio system, from CEM (CEM μWaves S.A.S., Orsay, France).

Analytical RP-HPLC analyses were performed on a Dionex ultimate U3000 using a Macherey-Nagel Nucleodur column (4.6 × 100 mm, 3 μm) at a flow rate of 1 mL/min. The mobile phase was composed of 0.1% (v/v) TFA-H₂O (Solvent A) and 0.1% (v/v) TFA-CH₃CN (Solvent B). Semi-preparative purifications of oligoureas were performed on a Dionex ultimate U3000 using a Macherey-Nagel Nucleodur VP250/10 100-16 C18ec column (10 × 250 mm, 16 μm) at a flow rate of 4 mL/min. Preparative purifications of oligoureas were performed on a Gilson GX-281 using a Macherey-Nagel Nucleodur VP250/21 100-5 C18ec column (21 × 250 mm, 5 μm) at a flow rate of 20 mL/min.

¹H NMR and ¹³C NMR spectra were recorded on three different NMR spectrometers: (1) an Avance II NMR spectrometer (Bruker Biospin) with a vertical 7.05T narrow-bore/ultrashield magnet operating at 300 MHz for ¹H observation and 75 MHz for ¹³C observation by means of a 5-mm direct BBO 1H/19F_XBB_H probe with Z gradient capabilities; (2) a DPX-400 NMR spectrometer (Bruker Biospin) with a vertical 9.4T narrow-bore/ultrashield magnet operating at 400 MHz for ¹H observation by means of a 5-mm direct QNP ¹H/¹³C/³¹P/¹⁹F probe with gradient capabilities; (3) an Avance III NMR spectrometer (Bruker Biospin) with a vertical 16.45T narrowbore/ultrashield magnet operating at 700 MHz for ¹H observation by means of a 5-mm TXI ¹H/¹³C/¹⁵N probe with Z gradient capabilities. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm, δ) relative to the ¹H or ¹³C residual signal of the deuterated solvent used. ¹H NMR splitting patterns with observed first-order coupling are designated as singlet (s), broad singlet (brs), doublet (d), triplet (t), or quartet (q). Not defined ¹H NMR splitting patterns are designated as multiplet (m). Coupling constants (J) are reported in hertz (Hz).

ESI-HRMS analyses were carried out on a Thermo Exactive with an ion trap mass analyzer from the Mass Spectrometry Laboratory at the European Institute of Chemistry and Biology (UMS 3033 - IECB), Pessac, France.

All Circular dichroism (CD) spectra were recorded on a J-815 Jasco dichrographe (Jasco France, Nantes, France) using a quartz cell with a path length of 1 mm or 2mm

(Hellma, Paris, France). Samples temperature was regulated at 25°C. Data were collected in continuous scan mode with a data pitch of 0.1 nm, a scanning speed of 50 nm/min, 2 nm bandwidth and two accumulations per sample. Samples Data were collected as raw ellipticity (ψ in mdeg) and converted to pear residue mean ellipticity (PRME with $[\theta] = \text{ellipticity}$) in $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}\cdot\text{residue}^{-1}$ using the following equation:

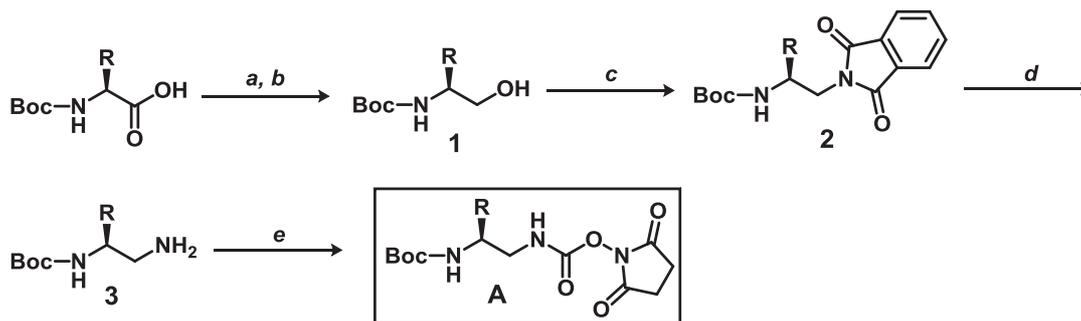
$$[\theta] = \frac{\psi \times 10^{-3}}{\text{res} \times l \times c}$$

Where *res* is the number of residues in the oligomer, *l* is the pathlength in cm, and *c* is the oligourea concentration in $\text{dmol}\cdot\text{cm}^{-3}$.

For X-Ray diffractions studies, collections were performed at the IECB X-ray facility (UMS3033) on two different high flux microfocus Rigaku rotating anodes at the copper α wavelength. Data were collected on a micromax MM07 (800W) equipped with osmic Varimax mirrors and semi-cylindrical R-Axis spider IP detector or on a FRX (2.7 kW) equipped with osmic Varimax mirrors and a Dectris Pilatus 200 K hybrid detector. The crystals were mounted on cryo-loops after quick soaking on Paratone-N oil from Hampton research and flash-frozen. Both diffractometers have partial chi geometry goniometer allowing omega-scan data collections. The data were processed with the CrystalClear suite version 1.36 and 2.1b25 (CrystalClear (Rigaku/MS), 2006). All crystal structures were solved using direct methods implemented in SHELXD [1] and were refined using SHELXL 2013 version. Full-matrix least-squares refinement were performed on F^2 for all unique reflections, minimizing $w(F_o^2 - F_c^2)^2$, with anisotropic displacement parameters for non-hydrogen atoms. Hydrogen atoms were positioned in idealized positions and refined with a riding model, with Uiso constrained to 1.2 Ueq value of the parent atom (1.5 Ueq when CH_3). The positions and isotropic displacement parameters of the remaining hydrogen atoms were refined freely. SIMU and DELU commands were used to restrain some side chains as rigid groups and restrain their displacement parameters.

Melting points were measured in open capillary tubes on a Büchi Melting point B-545. Optical rotations were determined on a Jasco P-2000 polarimeter and are given as $[\alpha]_D^{25}$ (concentration in mg/mL solvent).

a) General procedure A to access to *N*-Boc protected *O*-succinimidyl carbamates monomers

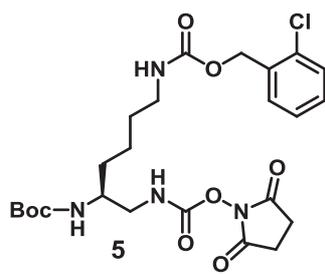


a: $t\text{BuOC(O)Cl}$, NMM, THF, -10°C ; **b:** NaBH₄, H₂O; **c:** Phtalimide, PPh₃, DIAD, THF; **d:** H₂N.NH₂.H₂O, CH₃OH, 70°C ; **e:** DSC, DCM

N-protected α -amino acid was dissolved in anhydrous THF under N₂ atmosphere and the solution was cooled down to -10°C . After addition of NMM (1.1 eq.) and isobutyl chloroformate (1.0 eq.), the mixture was stirred at -10°C for 45 min. The precipitated *N*-methylmorpholine hydrochloride was removed by filtration and washed with THF. The filtrate and washings were added to a solution of NaBH₄ (2.0 eq.) in water at 0°C and the resulting solution was stirred at room temperature overnight. The THF was removed under vacuum and the residue was quenched with an aqueous solution of 1M KHSO₄. The organic layer was diluted in EtOAc and washed with saturated NaHCO₃ solution, water and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure to give the expected alcohol **1**.

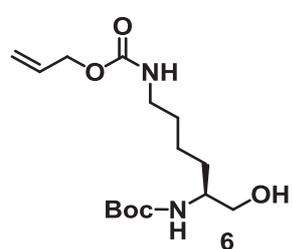
To an ice-cooled solution of *N*-Boc-protected amino alcohol **1** in anhydrous THF (15 mL) under N₂ were successively added phthalimide (1.2 eq.) and PPh₃ (1.2 eq.). The reaction mixture was stirred for 10 min and DIAD (1.2 eq.) was then added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. After removal of the solvent under vacuum, the reaction mixture was engaged in the following step without purification.

To a solution of phthalimide derivative **2** in MeOH (100-200 mL) was added hydrazine hydrate (3.0 eq.). The reaction mixture was heated to reflux and heating was maintained for 4 h with apparition of a white precipitate. The reaction mixture was filtered off, washed with MeOH and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude material was dissolved in EtOAc (100 mL). The organic layer was washed two times with 1M HCl aqueous solution (30 mL). The combined aqueous phases were again washed with EtOAc (2 \times 20 mL) and were neutralized by addition of solid NaHCO₃ until pH 8. The aqueous phase was evaporated under reduced pressure then the salts extracted with DCM (5 \times 30 mL), dried over Na₂SO₄, concentrated under reduced pressure to give the expected amine **3**. To an ice-cooled solution of the Boc-protected amine **3** dissolved in anhydrous DCM, was added a solution of *N,N'*-disuccinimidyl carbonate (DSC) (1.2 eq.) in DCM and the mixture was stirred for 4 h at room temperature. The insoluble were removed by filtration and the solvent was removed under reduced pressure. The organic layer was then washed with saturated 1M KHSO₄ and brine, dried over Na₂SO₄ before to be concentrated under reduced pressure. The expected activated building block A was precipitated in a mixture of Et₂O/pentane and recovered by filtration.

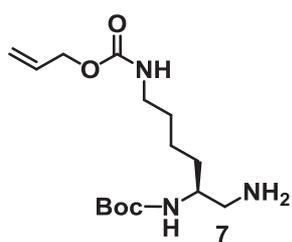
(S)-2-chlorobenzyl (2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) isopropyl hexane-1,2,6-triyltricarbamate 5

Boc).

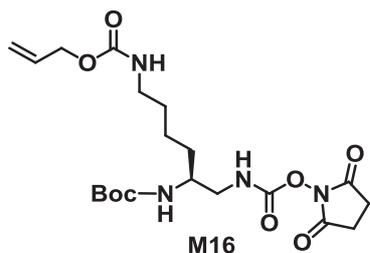
Boc-Lys(2-ClZ)-OH (12 g, 28.92 mmol) was transformed according to the general procedure **A**. The product was precipitated in Et₂O to afford 7.1 g of Boc-Lys(2-ClZ)^u-OSu **5** as a yellow powder in a 47% overall yield. ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7.43-7.29 (m, 4H, Ar), 6.25 (s, 1H, NH), 5.22 (s, 2H, CH₂Ar), 4.99 (s, 1H, NH), 4.77 (s, 1H, NH), 3.70 (s, 1H, CHN), 3.46-3.15 (m, 4H, CH₂ and CH₂N), 2.82 (s, 4H, CH₂ OSu), 1.64-1.47 (m, 6H, 3 CH₂) 1.47 (s, 9H,

i) Synthesis of the activated monomer M16**(S)-allyl tert-butyl (6-hydroxyhexane-1,5-diyl)dicarbamate 6**

Boc-Lys(Alloc)-O⁻DCHA⁺ (15 g, 29.31 mmol) was removed from its salt by trituration in EtOAc (50 mL) with 1M KHSO₄ (150 mL) for 1 h. After extraction and washing of the organic phase with water (50 mL) and brine (50 mL), the organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure to give the amino acid in a quantitative yield. The amino acid was then transformed according to the first step of general procedure **A** to afford 7.7 g of the expected alcohol intermediate **6** after silica gel flash chromatography (50% EtOAc in cyclohexane) as a white powder, yielded 83%. ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 5.95 (1H, m, CH Alloc), 5.33 (1H, dq, *J* = 17.2, 1.55 Hz, CH₂ Alloc), 5.26 (1H, dq, *J* = 10.4, 1.35 Hz, CH₂ Alloc), 4.81 (1H, brs, NH), 4.59 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, CH₂ Alloc), 3.56-3.69 (3H, m, CH₂-CH), 3.23 (2H, m, CH₂), 1.38-1.70 (15H, m, Boc and 3 CH₂); ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 156.61, 156.62, 132.95, 117.63, 79.61, 65.54, 65.48, 52.53, 40.35, 30.80, 29.79, 28.41, 22.77.

(S)-allyl tert-butyl (6-aminohexane-1,5-diyl)dicarbamate 7

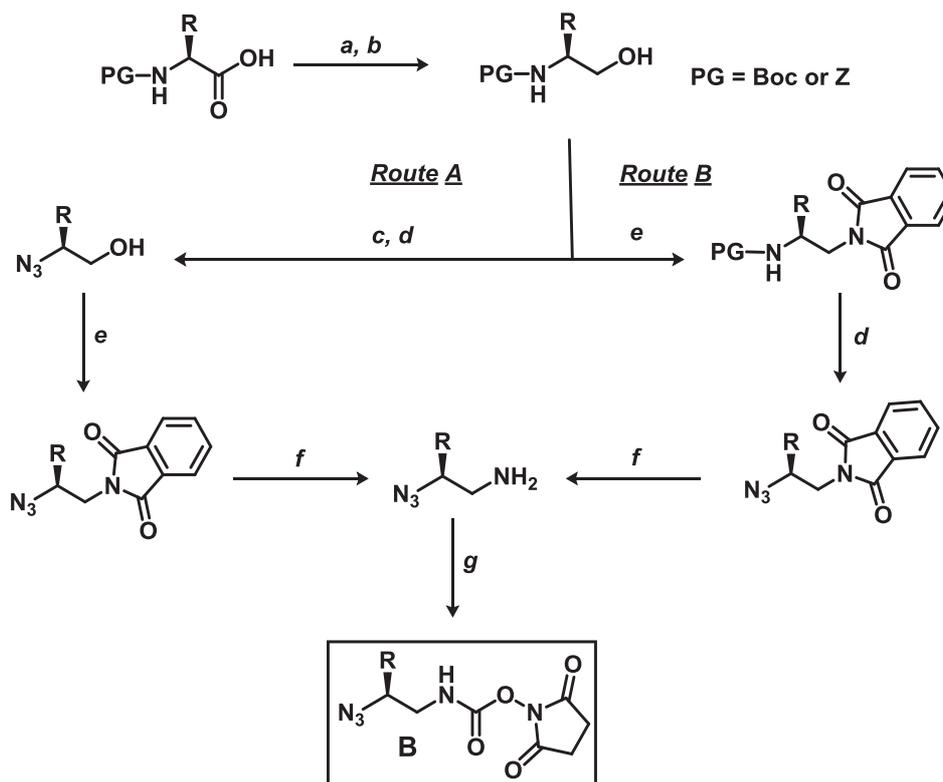
N-Boc-protected alcohol **6** was engaged in the Mitsunobu reaction followed by hydrazinolysis as indicated in procedure **A** to furnish 6.4g of the expected *N*-Boc-protected amine intermediate **7** as a pale yellow foam, with 84% yield over two steps. ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 5.94 (1H, m, CH Alloc), 5.32 (1H, dq, *J* = 17.2, 1.55 Hz, CH₂ Alloc), 5.23 (1H, dq, *J* = 10.4, 1.3 Hz, CH₂ Alloc), 4.88 (brs, 1H, NH), 4.68 (brs, 1H, NH), 4.58 (2H, d, *J* = 5.4 Hz, CH₂ Alloc), 3.56 (brs, 1H, CH), 3.21 (2H, q, *J* = 6.44 Hz, CH₂), 2.64-2.83 (2H, m, CH₂-CH), 1.66-1.33 (15H, m, Boc and 3 CH₂); ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 156.47, 156.25, 133.03, 117.53, 79.37, 65.44, 52.10, 45.64, 40.60, 32.26, 29.63, 28.44, 22.93.

(S)-allyl tert-butyl (2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) hexane-1,2,6-triyltricarbamate M16

N-Boc-protected amine intermediate **7** (6.4 g, 21.46 mmol) was activated in presence of DSC according to the last step of procedure **A**. The product was precipitated twice in a mixture Et₂O/pentane (1:1, v/v) to afford 8.7 g of Boc-Lys(Alloc)^u-OSu **M16** as a yellow powder in 88% yield; mp = 103-106 °C; ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 6.23 (brs, 1H, NH), 5.95 (1H, m, CH Alloc), 5.33 (1H, dd, *J* = 17.2, 1.5 Hz, CH₂ Alloc), 5.23 (1H, dd, *J* = 10.4, 1.2 Hz, CH₂ Alloc), 4.91 (brs, 1H, NH), 4.82 (1H, d, *J* = 6.63 Hz, NH), 4.59 (2H, d, *J* = 5.28 Hz, CH₂ Alloc), 3.70 (brs, 1H, CH), 3.20-3.44 (4H, m, 2 CH₂), 2.84 (4H, s, CH₂ OSu), 1.35-1.65 (15H, m, Boc and 3 CH₂); ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 169.91, 156.61, 156.46, 152.07, 133.00, 117.61, 80.02, 65.54, 50.47, 46.57, 40.16, 31.55, 29.65, 28.35, 25.49, 22.57; HRMS-ESI *m/z*: calcd for C₂₀H₃₂N₄O₈Na [M+Na]⁺: 479.21124, found 479.21052; [α]_D²⁵ = -12.54 (*c* = 1 in MeOH).

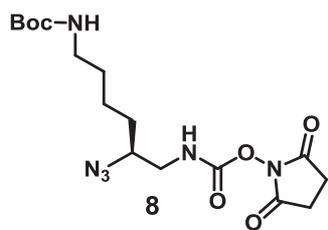
b) Preparation of the azide protected O-succinimidyl carbamates monomers

This general procedure has been described previously in literature by Douat *et al.* [2].

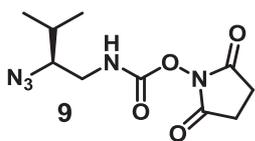


a: *t*BuOC(O)Cl, NMM, THF, -10°C; **b:** NaBH₄, H₂O; **c:** TFA or H₂, Pd/C; **d:** N₃SO₂Im.HCl, K₂CO₃, CuSO₄, AcCN/H₂O; **e:** PPh₃, DIAD, phthalimide, THF; **f:** N₂H₄.H₂O, MeOH, 70°C; **g:** DSC, DCM

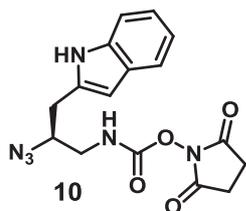
Two different routes have been described for the synthetic procedure of the preparation of azido carbamates depending on the nature of side chain residue. Pathway B will be preferred when high volatility of the azido alcohol intermediate is suspected.

(S)-tert-butyl (2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) (2-azidohexane-1,6-diyl)dicarbamate 8

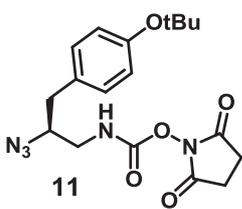
Z-Lys(Boc)-OH (10 g, 26.28 mmol) was transformed according to route **A** to afford after precipitation in a mixture Et₂O/pentane (1:3, v/v) 2 g of N₃-Lys(Boc)^u-OSu **8** as a white powder in a 18% overall yield. ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 5.76 (brs, 1H, NH), 4.58 (brs, 1H, NH), 3.61 (m, 1H, CHN), 3.46 (ddd, *J* = 4.5, 6.5, 13.9 Hz, 1H, CH₂N), 3.26 (1H, m, CH₂N), 3.17 (q, 2H, *J* = 6.1 Hz, CH-CH₂-CH₂), 2.86 (s, 4H, CH₂ OSu), 1.69-1.47 (m, 19H, Boc, CH₂ and H₂O).

(S)-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl (2-azido-4-methylpentyl)carbamate 9

Boc-Val-OH (7 g, 32.22 mmol) was transformed according to route **B** to afford 2.1 g of N₃-Val^u-OSu **9** as a white powder in a 25% overall yield. ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 5.57 (brd, 1H, NH), 3.57 (1 H, ddd, *J* = 3.5, 7.1, 13.8 Hz, CHN₃), 3.41 (m, 1H, CH₂NH), 3.17 (m, 1H, CH₂NH), 2.86 (s, 4H, CH₂ OSu), 1.92 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1.05 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H, 2 CH₃).

(S)-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl (2-azido-3-(1H-indol-2-yl)propyl)carbamate 10

Boc-Trp-OH (7 g, 23 mmol) was transformed according to route **B** to afford 3.69 g of N₃-Trp^u-OSu **10** as a light brown powder in a 47% overall yield. Note: in this case, the corresponding TFA salt intermediate was purified by precipitation with diethyl ether, filtered and dried. ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 8.15 (brd, 1H, NHAr), 7.62 (m, 1H, Ar), 7.42 (m, 1H, Ar), 7.28-7.16 (m, 3H, Ar), 5.51 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, NH), 3.99 (m, 1H, CHN₃), 3.50 (ddd, *J* = 3.9, 6.2, 13.9 Hz, 1H, CH₂NH), 3.27 (m, 1H, CH₂NH), 3.11 (m, 2H, CH₂Ar), 2.85 (s, 4H, CH₂ OSu).

(S)-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl (2-azido-3-(4-(tert-butoxy)phenyl)propyl)carbamate 11

Z-Tyr(*t*Bu)-OH (10 g, 27 mmol) was transformed according to route **A** to afford after precipitation in a mixture Et₂O/Cyclohexane (1:1, v/v) 2.6 g of N₃-Tyr(*t*Bu)^u-OSu **11** as a pale yellow powder in a 30% overall yield. ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7.16 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, Ar), 6.99 (m, 2H, Ar), 5.54 (brs, 1H, NH), 3.83 (m, 1H, CH-N₃), 3.50 (m, 1H, CH₂Ar), 3.18 (m, 1H, CH₂Ar), 2.94-2.79 (m, 6H, CH₂ OSu and CH₂N), 1.37 (s, 9H, *t*Bu).

c) General procedure C: solid phase oligourea synthesis under microwave irradiation using a Boc strategy

Oligomers were synthesized in a glass reactor using Boc chemistry with microwave assistance, on 50 to 200 μmol scale starting from 4-methylbenzhydrylamine (MBHA) resin (0.1 mmol/g). The first coupling step is performed with a solution of *N*-Boc-protected γ-amino acid (1.5 eq.) in DMF (1-2 mL), with BOP (1.5 eq.), HOBt (1.5 eq.) and DIEA (5.0 eq.) and the suspension was stirred for 30 minutes at room temperature. This step was performed twice and completion of the coupling was monitored by a Kaiser test [3]. For each

following coupling step, the succinimidyl carbamate (1.5 eq.) and DIEA (3.0 eq.) in DMF (1-2 mL) were successively added to the resin, and the glass reactor was then placed inside the microwave reactor (CEM Discover) and irradiated (25 W, maximum power, 70 °C, ramp 5 min, hold 15 min). A double coupling was performed systematically. The resin was then filtered off and successively washed with DMF (2 × 2 mL), DCM (2 × 2 mL) then DMF (2 × 2 mL) again. The Boc removal was performed twice using TFA (1 mL) during 5 min at room temperature. The resin was then filtered off and washed with DCM (3 × 2 mL), then DMF (2 × 2 mL). The coupling and deprotection efficiency was monitored with the chloranil test [4]. End-capping was carried out twice in presence of isopropylisocyanate (3.0 eq.) and DIEA (3.0 eq.) at room temperature for 30 min. The resin was finally filtered off, washed with DMF (3 × 2 mL), DCM (3 × 2 mL) and Et₂O (2 × 2 mL) then dried under high vacuum. Side chain deprotection and cleavage of the oligomers from the resin were performed simultaneously by treatment with HF (containing 10% *p*-cresol as a scavenger) for 60 min at 0 °C. The crude oligomer was finally purified by preparative or semi-preparative RP-HPLC using the appropriate gradient to a final purity ≥ 95% and lyophilized.

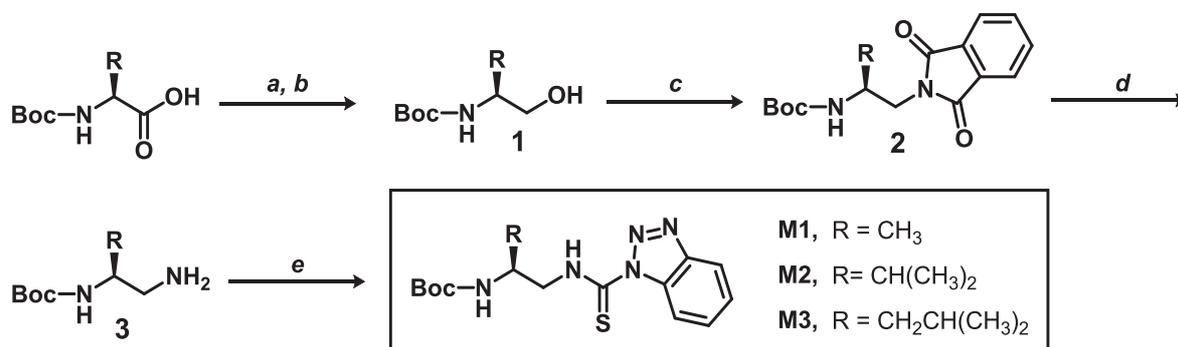
d) General procedure D for solid phase oligourea synthesis under microwave irradiation using azide strategy

Oligomers were prepared on a 25 to 100 μmol scale. The NovaPEG Rink amide resin [5] (loading 0.035-0.045 mmol/g) was placed in a polypropylene SPE tube (CEM), and pre-swelled with DMF. For each following coupling step, the azide protected succinimidyl carbamate monomer (1.5 eq.) and DIEA (3.0 eq.) in DMF (1-2mL) were successively added to the resin, and the reactor was then placed inside the microwave oven (CEM Discover) to be irradiated (25 W, maximum power, 70 °C, ramp 5 min, hold 15 min). A double coupling was performed systematically. The resin was then filtered off and washed with DMF (2 × 2 mL), DCM (2 × 2 mL) then DMF (2 × 2 mL) again. Reduction of the azide group was next done under microwave assistance by swelling the resin in a mixture of dioxane/water (7:3, v/v, 2 mL) and adding 1M PMe₃ solution in THF (10.0 eq. relative to the resin loading), irradiating with 25 W power, heating at 70 °C for 30 min. The reaction was repeated once. The resin was then filtered off, washed with the dioxane/water mixture (2 × 2 mL) and DMF (3 × 2 mL). The coupling and reduction efficiency was monitored with the chloranil test [4]. End-capping was carried out twice in presence of isopropylisocyanate (3.0 eq.) and DIEA (3.0 eq.) at room temperature for 30min. Resin was filtered off, washed with DMF (2 × 2 mL) and DCM (2 × 2 mL) and dried. The resin was finally swelled in a mixture TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5, v/v/v) and left to react for 120 min. After that time, the resin was filtered off, washed with TFA (2 × 2 mL), DCM (2 × 2 mL) and the filtrate was evaporated under reduced pressure. After precipitation with cold Et₂O, the crude oligomers were finally purified by preparative or semi-preparative RP-HPLC using the appropriate gradient to a final purity ≥ 95% and lyophilized.

2. Experimental data of chapter 2

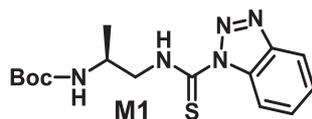
a) Experimental part of the thiourea insertion linkage in solution

i) Synthesis of activated monomers



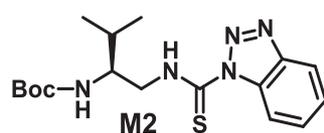
a: $t\text{BuOC(O)Cl}$, NMM, THF, -10°C ; **b:** NaBH_4 , H_2O ; **c:** Phthalimide, PPh_3 , DIAD, THF; **d:** $\text{H}_2\text{N.NH}_2.\text{H}_2\text{O}$, CH_3OH , 70°C ; **e:** $\text{SC}(\text{Bt})_2$, DCM

(S)-tert-butyl (1-(1H-benzo[d][1,2,3]triazole-1-carbothioamido)propan-2-yl)carbamate M1



To a stirred solution of Bis(benzotriazolyl)methanethione ($\text{SC}(\text{Bt})_2$) (1.0 eq., 1.6 g, 5.74 mmol) in DCM (20 mL) at 0°C was added a solution of the corresponding amine **3** obtained from the general procedure **A** (1.0 eq., 1.0 g, 5.74 mmol) in DCM (10 mL) and the reaction mixture was left under stirring for 24 h. After reaction completion, the solvent was evaporated and the crude was purified by silica gel flash chromatography (30-35% EtOAc in cyclohexane) to afford **M1** (0.80 g, 42%) as an off white solid; mp= $100\text{-}103^\circ\text{C}$; ^1H NMR: (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 10.00 (s, 1H, NH-C(=S)), 8.91 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, Ar), 8.10 (dt, $J = 8.3$, 0.9 Hz, 1H, Ar), 7.64 (ddd, $J = 8.4$, 5.5, 1.1 Hz, 1H, Ar), 7.47 (ddd, $J = 8.2$, 7.1, 1.0 Hz, 1H, Ar), 4.76 (brs, 1H, NH), 4.20 (brs, 1H, CH), 4.06-3.68 (m, 2H, CH_2), 1.44 (s, 9H, Boc), 1.33 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3); ^{13}C NMR: (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 175.03, 156.41, 147.04, 132.44, 130.07, 125.54, 120.23, 116.06, 80.44, 52.28, 45.69, 28.29, 18.82; HRMS-ESI m/z : calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_2\text{SNa}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 358.13082, found 358.13204; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +13.43$ ($c = 1$ in MeOH).

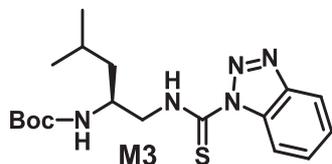
(S)-tert-butyl(1-(1H-benzo[d][1,2,3]triazole-1-carbothioamido)-3-methylbutan-2-yl)carbamate M2



To a stirred solution of $\text{SC}(\text{Bt})_2$ (1.0 eq., 0.68 g, 2.44 mmol) in DCM (15 mL) at 0°C was added a solution of the corresponding amine **3** obtained from the general procedure **A** (1 eq., 0.49 g, 2.44 mmol) in DCM (10 mL) and the reaction mixture was left under stirring for 24 h. After reaction completion, the solvent was evaporated and the crude was purified by silica gel flash chromatography (10% EtOAc in cyclohexane) to afford **M2** (0.69 g, 78%) as an off white solid; mp : $106\text{-}107^\circ\text{C}$; ^1H NMR: (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 9.82 (brs, 1H, NH-C(=S)), 8.91 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, Ar), 8.10 (dt, $J = 8.3$, 0.9 Hz, 1H, Ar), 7.64 (ddd, $J = 8.4$, 7.1, 1.1 Hz, 1H, Ar), 7.47 (ddd, $J = 8.2$, 7.1, 1.0 Hz, 1H, Ar), 4.73 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, NH-C(=O)), 4.20-3.58 (m, 3H, CH-CH_2), 2.11-1.82 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.42 (s, 9H, Boc), 1.05 (t, $J = 6.7$ Hz, 6H, 2 CH_3); ^{13}C NMR: (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 175.01, 156.83, 147.04, 132.42, 130.05,

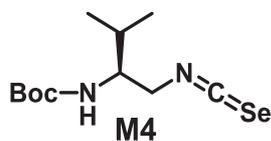
125.52, 120.23, 115.99, 80.30, 54.80, 49.01, 30.72, 28.26, 19.34, 18.34; HRMS-ESI m/z : cald for $C_{17}H_{25}N_5O_2SNa$ $[M+Na]^+$: 386.16212; found 386.16274 ; $[\alpha]_D^{25} = -12.63$ ($c = 1$ in MeOH).

(S)-tert-butyl-1-(1H-benzo[d][1,2,3]triazole-1-carbothioamido)-4-methylpentan-2-yl carbamate M3



To a solution of $SC(Bt)_2$ (1.0 eq., 0.83 g, 2.96 mmol) in DCM (15 mL) at $0^\circ C$ was added a solution of the corresponding amine **3** obtained with the general procedure **A** (0.64 g, 2.96 mmol) in DCM (10 mL) and the reaction mixture was left under stirring for 24 h. After reaction completion, the solvent was evaporated and the crude was purified by silica gel flash chromatography (10% EtOAc in cyclohexane) to afford **M3** (0.87 g, 78%) as a solid; mp=107-108°C; 1H NMR: (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 9.94 (s, 1H, $NH-C(=S)$), 8.93 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, Ar), 8.12 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, Ar), 7.71-7.59 (m, 1H, Ar), 7.55-7.44 (m, 1H, Ar), 4.59 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NH), 4.13 (m, 1H, $CH-CH_2$), 3.98 (ddd, $J = 14.0, 4.9, 3.5$ Hz, 1H, $CH-CH_2$), 3.83-3.66 (m, 1H, $CH-CH_2$), 1.81 (m, 1H, $CH(CH_3)$), 1.56-1.41 (m, 2H, $CH-CH_2-CH$), 1.44 (s, 9H, Boc), 0.99 (dd, $J = 6.5, 5.3$ Hz, 6H, 2 CH_3); ^{13}C NMR: (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 175.41, 157.03, 147.46, 132.85, 130.46, 125.93, 120.64, 116.42, 80.82, 51.93, 48.49, 42.50, 28.68, 25.28, 23.34, 22.46; HRMS-ESI m/z : cald for $C_{18}H_{27}N_5O_2SNa$ $[M+Na]^+$: 400.17777; found 400.17860; $[\alpha]_D^{25} = -11.17$ ($c = 1$ in MeOH).

(S)-tert-butyl 1-isoselenocyanato-3-methylbutan-2-ylcarbamate M4

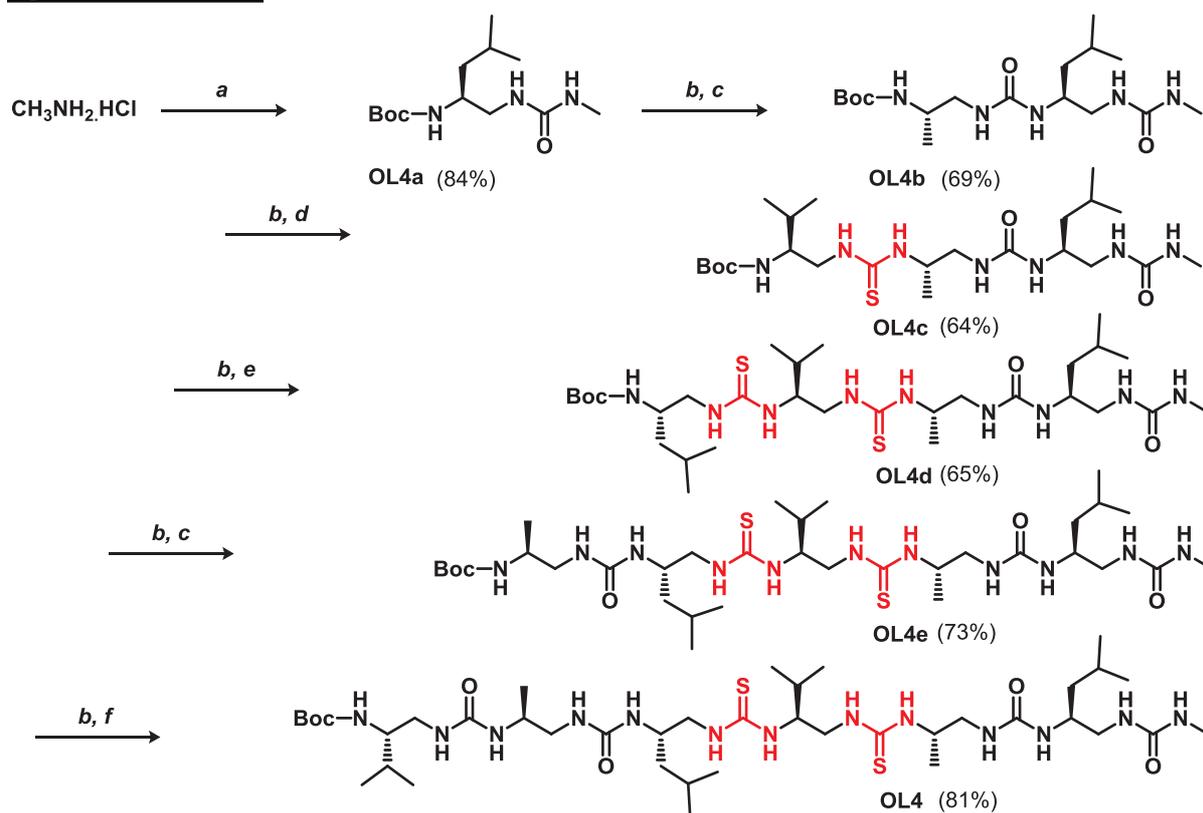


M4 was obtained starting from the corresponding amine **3** (0.4 mmol) according to the procedure of G. Chennakrishnareddy *et al.* [6] with 65% yield. 1H NMR: (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 4.61 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH), 3.77 (d, $J = 3.3$ Hz, 2H, CH_2), 3.67 (ddd, $J = 12.9, 8.6, 4.4$ Hz, 1H, $CH-CH_2$), 1.88 (dq, $J = 13.6, 6.8$ Hz, 1H, $CH(CH_3)$), 1.49 (s, 9H, Boc), 1.01 (dd, $J = 6.72, 2.63$ Hz, 6H, 2 CH_3).

ii) Synthesis of the oligomers

OL1 has been prepared by Dr. Salaun, **OL2**, **OL3**, **OL5** and **OL6** by Dr. Nelly according to the procedure described by Nelly *et al.* [7] and Fischer *et al.* [8].

Synthesis of OL4



a: Boc-Leu^U-OSu, Et₃N, DCM; **b:** TFA; **c:** Boc-Ala^U-OSu, DIEA, DMF; **d:** **M2**, DIEA, CH₃CN; **e:** **M3**, DIEA, CH₃CN; **f:** Boc-Val^U-OSu, DIEA, CH₃CN;

Monomer OL4a

OL4a has been prepared according to the procedure described by Fischer *et al.* [8]. To a stirred solution of HCl.NH₂CH₃ (1.5 eq., 0.83 g, 12.23 mmol) in CH₃CN (30 mL) at 0°C was added Et₃N (3.0 eq., 4.25 mL, 24.47 mmol) and after 5 min the carbamate Boc-Leu^U-OSu (1.0 eq., 2.9 g, 8.16 mmol) in CH₃CN (15 mL). The reaction mixture was stirred for 12 h and then evaporated under reduced pressure. The crude material was diluted with EtOAc (50 mL) and washed with saturated solution of 1M KHSO₄ (3 x 50 mL), water (50 mL), saturated solution of NaHCO₃ (2 x 50 mL) water (50 mL) again and brine (50 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure. After purification by silica gel flash chromatography (100% EtOAc) compound **OL4a** (1.87 g, 84%) was isolated as a colorless oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5.07 (s, 1H, NH), 4.62 (s, 2H, NH), 3.70 (m, 1H, CH-CH₂), 3.21 (brs, 2H, CH₂), 2.79 (s, 3H, CH₃), 1.78 – 1.64 (m, 3H, CH-CH₂), 1.47 (s, 9H, Boc), 0.94 (dd, *J* = 6.5, 5.5 Hz, 6H, 2 CH₃).

Dimer OL4b

OL4b has been prepared according to the procedure described by Fischer *et al.* [8]. Compound **OL4a** (1.0 eq., 1.5 g, 5.49 mmol) was treated with TFA (10 mL) and stirred at RT for 2 h. After reaction completion, the solvent was co-evaporated under reduced pressure with cyclohexane. The resulting TFA salt was dissolved in CH₃CN solvent mixture (10 mL) and DIEA (3.0 eq., 2.8 mL, 16.5 mmol) was added. After 10 minutes, the reaction mixture was further treated with Boc-Ala^U-OSu (1.1 eq, 1.90 g, 6.04 mmol) and stirred overnight at RT. After completion of the reaction, CH₃CN was removed under reduced pressure. The crude

material was diluted with EtOAc (50 mL) and washed with saturated solution of 1M KHSO₄ (3 x 50 mL), water (50 mL), saturated solution of NaHCO₃ (2 x 50 mL) water (50 mL) again and brine (50 mL), dried over MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. The compound **OL7b** (1.41 g, 69%) as obtained as a white solid after precipitation with cold Et₂O. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 6.66 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, NH), 6.06-5.64 (m, 4H, NH), 3.56 (m, 1H, CH), 3.45 (m, 1H, CH), 3.07-2.86 (m, 4H, 2 CH₂), 2.55 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H, CH₃), 1.60 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1.39 (s, 9H, Boc), 1.18 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₂ Leu), 0.98 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃ Ala), 0.86 (dd, *J* = 9.5, 6.6 Hz, 6H, 2 CH₃ Leu).

Trimer OL4c

Compound **OL4c** (1.0 eq., 1 g, 2.68 mmol) was treated with TFA (10 mL) and stirred at RT for 2 h. After reaction completion, the solvent was co-evaporated under reduced pressure with cyclohexane. The resulting TFA salt was dissolved in CH₃CN solvent mixture (10 mL) and DIEA (3.0 eq., 1.4 mL, 8.03 mmol) was added. After 10 minutes, the reaction mixture was further treated with **M2** (1.05 eq, 1.02 g, 2.81 mmol) and stirred overnight at RT. After completion of the reaction, the CH₃CN was removed under reduced pressure. The crude material was diluted with EtOAc (50 mL) and washed with saturated solution of 1M KHSO₄ (3 x 50 mL), water (50 mL), saturated solution of NaHCO₃ (2 x 50 mL) water (50 mL) again and brine (50 mL), dried over MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. After purification by silica gel flash chromatography (5% MeOH in DCM), the expected compound **OL4c** (0.88 g, 64%) was isolated as a colorless oil. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 7.49 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, NH), 7.21 (brs, 1H, NH), 6.78-6.40 (m, 1H, NH), 6.07-5.87 (m, 1H, NH), 5.87-5.76 (m, 3H, NH), 4.31-3.93 (m, 1H, CH), 3.80-3.49 (m, 2H, CH), 3.48-3.35 (m, 1H, CH), 3.29-3.15 (m, 1H, CH₂), 3.15-2.96 (m, 3H, CH₂), 2.96-2.79 (m, 1H, CH₂), 2.53 (m, 3H, NH-CH₃), 1.76-1.51 (m, 2H, CH(CH₃)₂), 1.38 (s, 9H, Boc), 1.17 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂ Leu), 1.03 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃ Ala), 0.90-0.79 (m, 12H, CH₃ Val, Leu); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OH): δ (ppm) = 160.53, 159.85, 157.53, 78.75, 55.77, 45.07, 44.98, 41.77, 30.60, 27.46, 25.72, 24.58, 22.38, 20.98, 18.54, 17.12, 16.75; ESI-MS *m/z* : 556.0 [M+Na]⁺, 533.9 [M+H]⁺.

Tetramer OL4d

Compound **OL4c** (1.0 eq., 0.88 g, 1.7 mmol) was treated with TFA (10 mL) and stirred at RT for 2 h. After reaction completion, the solvent was co-evaporated under reduced pressure with cyclohexane. The resulting TFA salt was dissolved in a CH₃CN/DMF solvent mixture (10 mL: 0.5 mL) and DIEA (6.0 eq., 1.9 mL, 10.2 mmol) was added. After 10 minutes, the reaction mixture was further treated with **M3** (1.5 eq, 0.9 g, 2.55 mmol) and stirred overnight at RT. CH₃CN was then evaporated under reduced pressure. The crude material was diluted with EtOAc (50 mL) and washed with saturated solution of 1M KHSO₄ (3 x 50 mL), water (50 mL), saturated solution of NaHCO₃ (2 x 50 mL) water (50 mL) again and brine (50 mL), dried over MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. After purification by silica gel flash chromatography (5% MeOH in DCM) compound **OL4d** (0.74 g, 65%) as obtained as an off-white solid. ¹H NMR: (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 7.49-7.12 (m, 4H, NH), 6.69 (s, 1H, NH), 6.07-5.68 (m, 4H, NH), 4.35-4.10 (m, 2H, CH), 3.82-3.49 (m, 2H, CH), 3.19 (s, 2H, CH₂), 3.15-2.99 (m, 4H, CH₂), 2.98-2.82 (m, 2H, CH₂), 2.55 (m, 3H, NH-CH₃), 1.88 (brs, 1H, CH(CH₃)₂), 1.71-1.50 (m, 2H, CH(CH₃)₂), 1.40 (s, 9H, Boc), 1.31-1.24 (m, 2H, CH₂ Leu), 1.19 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂ Leu), 1.05 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃ Ala), 0.97-0.77 ppm (m, 18H, CH₃ Leu, Val); ¹³C NMR:

(75 MHz, CD₃OH) δ (ppm) = 185.74, 184.98, 162.02, 161.14, 159.17, 81.34, 80.61, 61.04, 51.61, 47.06, 43.34, 42.86, 32.54, 32.24, 29.55, 28.00, 26.51, 26.37, 24.64, 24.39, 22.97, 20.59, 19.70, 19.17; ESI-MS: m/z 1372.5 [M+Na]²⁺, 698.4 [M+Na]⁺, 676.5 [M+H]⁺.

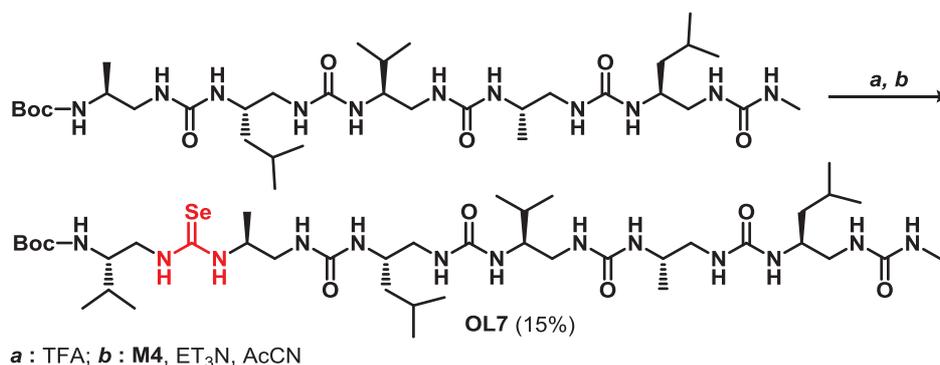
Pentamer OL4e

Compound **OL4d** (1.0 eq., 0.74 g, 1.1 mmol) was treated with TFA (10 mL) and stirred at RT for 2 h. After reaction completion, the solvent was co-evaporated under reduced pressure with cyclohexane. The resulting TFA salt was dissolved in CH₃CN/DMF solvent mixture (10 mL: 2 mL) and DIEA (6.0 eq., 1.2 mL, 6.6 mmol) was added. After 10 minutes, the reaction mixture was further treated with Boc-Ala^u-OSu (2.0 eq., 0.69 g, 2.2 mmol) and stirred overnight at RT. After completion of the reaction, the CH₃CN was removed under reduced pressure. The crude material was diluted with EtOAc (50 mL) and washed with saturated solution of 1M KHSO₄ (3 x 50 mL), water (50 mL), saturated solution of NaHCO₃ (2 x 50 mL) water (50 mL) again and brine (50 mL), dried over MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. After purification by silica gel flash chromatography (5% MeOH in DCM) compound **OL7e** (0.62 g, 73%) as obtained as a white solid. ¹H NMR: (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 7.48-7.25 (m, 4H, NH), 6.72 (d, *J*=6.9 Hz, 1H, NH), 6.10-5.66 (m, 6H, NH), 4.51-4.05 (m, 2H, CH), 3.80 (brs, 2H, CH), 3.66-3.38 (m, 2H, CH₂, CH), 3.21-2.80 (m, 9H, CH₂), 2.54 (m, 3H, NH-CH₃), 1.85 (brs, 1H, CH(CH₃)₂), 1.63 (m, 2H, CH(CH₃)₂), 1.40 (s, 9H, Boc), 1.25-1.16 (m, 4H, CH₂ Leu), 1.04 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, CH₃ Ala), 0.97 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃ Ala), 0.90-0.83 ppm (m, 18H, CH₃ Leu, Val); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OH) δ (ppm) = 184.61, 183.29, 160.48, 160.43, 159.63, 159.59, 159.48, 159.40, 157.57, 79.21, 58.70, 50.04, 46.60, 46.42, 46.18, 46.01, 45.53, 45.30, 45.10, 44.99, 41.96, 41.05, 30.47, 27.71, 26.07, 25.94, 22.61, 22.49, 21.25, 18.64, 17.37, 17.11; ESI-MS: m/z 1573.1 [M+Na]²⁺ 1551.1 [M+2H]²⁺, 798.5 [M+Na]⁺, 776.4 [M+H]⁺.

Hexamer OL4

Compound **OL4e** (1.0 eq., 0.62 g, 0.80 mmol) was treated with TFA (10 mL) and stirred at RT for 2 h. After reaction completion, the solvent was co-evaporated under reduced pressure with cyclohexane. The resulting TFA salt was dissolved in a CH₃CN/DMF solvent mixture (10 mL: 2 mL), DIEA (3.0 eq., 1.25 mL, 2.4 mmol) was added. After 10 minutes, the reaction mixture was further treated with Boc-Val^u-OSu (3.0 eq., 0.82 g, 2.4 mmol) and stirred overnight at RT. After completion of the reaction, CH₃CN was removed under reduced pressure. The crude material was diluted with EtOAc (50 mL) and washed with saturated solution of 1M KHSO₄ (3 x 50 mL), water (50 mL), saturated solution of NaHCO₃ (2 x 50 mL) water (50 mL) again and brine (50 mL), dried over MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. After purification by silica gel flash chromatography (5% MeOH in DCM) compound **OL4** (0.58 g, 81%) as obtained as a white solid. ¹H NMR: (400 MHz, CD₃OH) δ (ppm) = see table; ¹³C NMR: (100 MHz, CD₃OH) δ (ppm) = 184.66, 183.35, 160.49, 160.44, 160.40, 159.94, 159.90, 159.51, 159.46, 159.42, 158.36, 158.31, 79.05, 58.59, 56.53, 56.44, 49.93, 48.70, 47.00, 45.52, 45.08, 44.97, 42.77, 42.01, 41.46, 31.05, 30.71, 27.64, 26.02, 25.89, 25.01, 24.92, 24.59, 22.58, 22.47, 21.29, 21.22, 18.95, 18.58, 17.91, 17.40, 17.01; HRMS-ESI: m/z calcd for C₄₀H₈₂N₁₃O₆S₂ [M+H]⁺ 904.59470; found 904.59438.

Synthesis of oligomer **OL7**



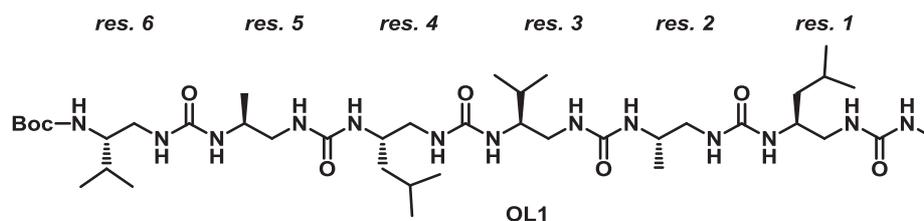
Pentamer **OL7a**

OL7a has been prepared according to the procedure described by Fischer *et al.* [8].

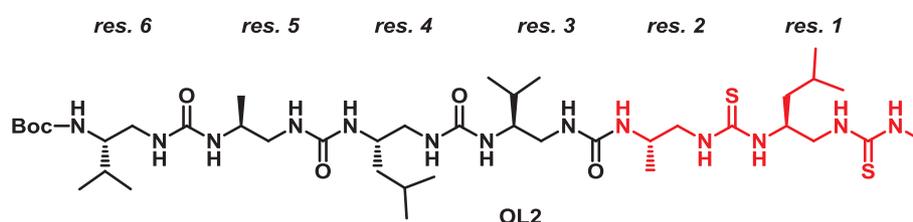
Hexa seleno-urea **OL7**

Boc-pentaurea **OL7a** (1.0 eq., 0.08 g, 0.11 mmol) was treated with TFA (1 mL) at 0° C and allowed to stir at RT. After reaction completion, TFA was evaporated under reduced pressure and co-evaporated with cyclohexane. The resulting TFA salt was dissolved in a $\text{CH}_3\text{CN}/\text{DMF}$ solvent mixture (10 mL: 2 mL) and DIEA (3.0 eq., 0.05 mL, 0.32 mmol) was added at 0° C, followed by isoselenocyanate derivative **M4** (1.0 eq., 0.03 g, 0.11 mmol). The reaction mixture was allowed to stir at RT for 5 h. After reaction completion, the CH_3CN was evaporated under reduced pressure. The crude material was diluted with EtOAc (50 mL) and washed with saturated solution of 1M KHSO_4 (3 x 50 mL), water (50 mL), saturated solution of NaHCO_3 (2 x 50 mL) water (50 mL) again and brine (50 mL), dried over MgSO_4 and evaporated under reduced pressure. After purification by silica gel flash chromatography (6-10% MeOH in DCM) **OL7** (0.052 g, 52%) was obtained as an off-white solid. ^1H NMR: (400 MHz, CD_3OH) δ (ppm) = see table; ^{13}C NMR: (75 MHz, CD_3OH) δ (ppm) = 160.67, 160.60, 160.16, 160.00, 159.82, 157.84, 78.93, 56.16, 55.32, 46.00, 45.01, 43.40, 42.43, 41.36, 30.72, 27.46, 25.59, 24.85, 24.55, 22.24, 21.23, 21.13, 18.81, 18.58, 17.57, 17.30, 16.80; ESI-MS: m/z 958.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 936.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

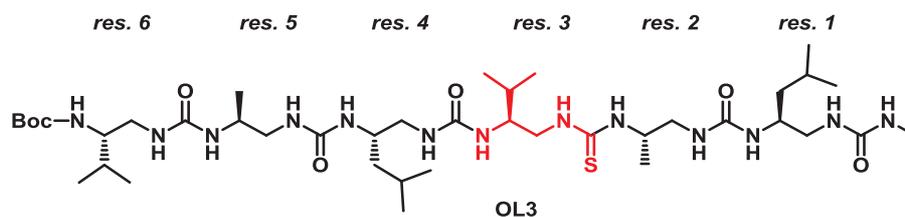
iii) Chemical shift tables of oligomers OL1-OL5 and OL7



Residue	NH	N'H	α CH ¹	α CH ²	β CH	γ CH	δ CH	ϵ CH	TermCH	$\Delta\delta$ (α CH)
NHMe	6.22								2.72	
Leu ^u 1	6.06	6.40	3.61	2.65	3.89	1.25	1.72	0.95		0.96
Ala ^u 2	5.98	6.43	3.57	2.35	4.07	1.04				1.22
Val ^u 3	6.23	6.50	3.65	2.40	3.60	1.20	0.88			1.25
Leu ^u 4	5.97	6.58	3.69	2.35	3.93	1.20	1.74	0.93		1.34
Ala ^u 5	5.89	5.85	3.61	2.34	3.91	1.06				1.27
Val ^u 6	6.66	6.02	3.65	2.57	3.52	1.65	0.96			1.08
Boc									1.5	

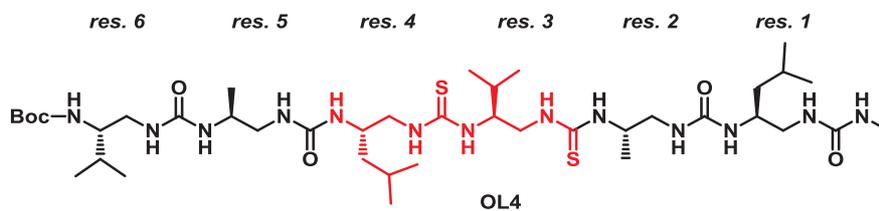
Table EP.1: ¹H NMR Chemical shifts (ppm) of OL1 in CD₃OH at 293K (5 mM).

Residue	NH	N'H	α CH ¹	α CH ²	β CH	γ CH	δ CH	ϵ CH	Term CH	$\Delta\delta$ (α CH)
NHMe	7.7								2.98	
Leu ^s 1	7.50	7.42	4.18	3.17	4.75	1.37	1.74	0.96		1.01
Ala ^s 2	6.06	7.68	4.24	2.65	4.27	1.08				1.59
Val ^u 3	6.25	6.47	3.61	2.39	3.59	1.60	0.89			1.22
Leu ^u 4	5.97	6.59	3.67	2.34	3.93	1.19	1.71	0.91		1.33
Ala ^u 5	5.89	5.85	3.62	2.34	3.88	1.05				1.28
Val ^u 6	6.65	6.02	3.65	2.57	3.51	1.66	0.96			1.08
Boc									1.49	

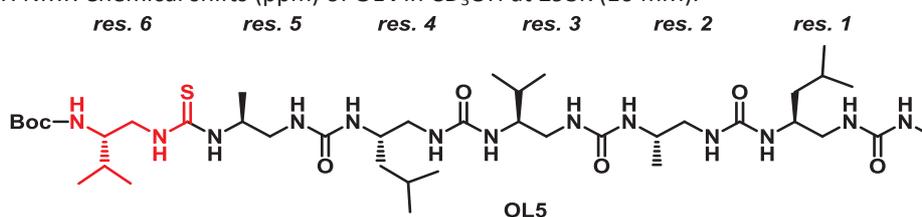
Table EP.2: ¹H NMR Chemical shifts (ppm) of OL2 in CD₃OH at 293K (5 mM).

Residue	NH	N'H	α CH ¹	α CH ²	β CH	γ CH	δ CH	ϵ CH	Term CH	$\Delta\delta$ (α CH)
NHMe	5.89								2.72	
Leu ^u 1	6.19	6.07	3.39	2.94	3.80	1.29	1.72	0.94		0.45
Ala ^u 2	7.36	6.22	3.61	2.65	4.74	1.12				0.96
Val ^s 3	6.29	7.74	4.40	2.69	3.81	1.68	0.92			1.71
Leu ^u 4	6.01	6.56	3.63	2.33	3.96	1.18	1.71	0.91		1.30
Ala ^u 5	5.91	5.88	3.59	2.35	3.88	1.06				1.24
Val ^u 6	6.66	6.03	3.64	2.59	3.50	1.67	0.96			1.05
Boc									1.49	

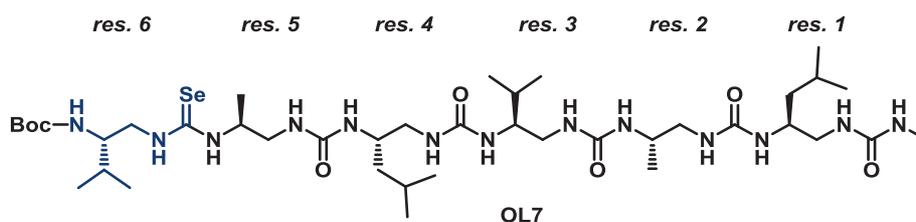
Table EP.3: ¹H NMR Chemical shifts (ppm) of OL3 in CD₃OH at 293K (10 mM).



Residue	NH	N'H	α CH ¹	α CH ²	β CH	γ CH	δ CH	ϵ CH	Term CH	$\Delta\delta$ (α CH)
NHMe	5.92								2.73	
Leu ^u 1	5.80	6.00	3.32	3.02	3.80	1.32	1.73	0.93		0.30
Ala ^u 2	7.42	6.01	3.48	2.86	4.60	1.14				0.62
Val ^s 3	7.67	7.50	4.49	2.82	4.62	1.76	0.99			1.67
Leu ^s 4	6.01	7.86	4.31	2.60	4.22	1.21	1.72	0.92		1.71
Ala ^u 5	5.93	5.83	3.54	2.31	3.84	1.02				1.23
Val ^u 6	6.67	6.07	3.63	2.57	3.50	1.66	0.96			1.06
Boc									1.5	

Table EP.4: ¹H NMR Chemical shifts (ppm) of **OL4** in CD₃OH at 293K (10 mM).

Residue	NH	N'H	α CH ¹	α CH ²	β CH	γ CH	δ CH	ϵ CH	Term CH	$\Delta\delta$ (α CH)
NHMe	6.21								2.73	
Leu ^u 1	6.07	6.35	3.62	2.65	3.91	1.24	1.72	0.94		0.97
Ala ^u 2	6.00	6.34	3.57	2.37	4.04	1.03				1.20
Val ^u 3	5.74	6.41	3.68	2.51	3.61	1.61	0.91			1.17
Leu ^u 4	5.94	6.11	3.60	2.40	3.99	1.21	1.72	0.93		1.20
Ala ^u 5	7.30	5.85	3.62	2.72	4.51	1.14				0.90
Val ^s 6	6.62	7.26	4.07	3.12	3.69	1.75	0.99			0.95
Boc									1.46	

Table EP.5: ¹H NMR Chemical shifts (ppm) of **OL5** in CD₃OH at 293K (10 mM).

Residue	NH	N'H	α CH ¹	α CH ²	β CH	γ CH	δ CH	ϵ CH	Term CH	$\Delta\delta$ (α CH)
NHMe	6.21								2.72	
Leu ^u 1	6.09	6.36	3.58	2.65	3.99	1.24	1.71	0.94		0.93
Ala ^u 2	6.00	6.34	3.55	2.37	4.05	1.04				1.18
Val ^u 3	5.84	6.41	3.66	2.55	3.59	1.61	0.91			1.11
Leu ^u 4	5.92	6.18	3.58	2.43	3.99	1.21	1.72	0.92		1.15
Ala ^u 5	ND	5.90	3.60	2.80	4.57	1.16				0.80
Val ^{Se} 6	6.64	7.54	4.15	3.22	3.76	1.77	0.98			0.93
Boc							1.01		1.47	

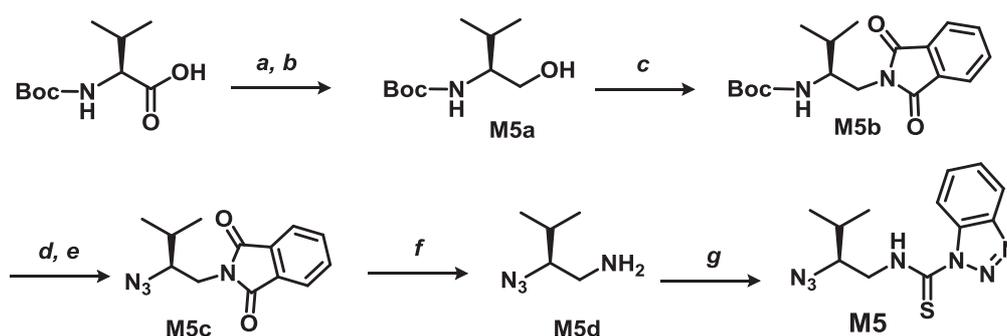
Table EP.6: ¹H NMR Chemical shifts (ppm) of **OL7** in CD₃OH at 293K (10 mM).

iv) X-ray diffraction studies

Compounds	OL1	OL2	OL3	OL5	OL7
Crystal System	triclinic	monoclinic	monoclinic	monoclinic	orthorhombic
Space Group	P1	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Z	1	2	4	2	4
Unit Cell Parameters a, Å	9.7976(8)	9.574(2)	11.863(2)	11.780(3)	9.9728(9)
Unit Cell Parameters b, Å	11.9614(10)	20.183(3)	20.498(4)	17.769(5)	11.5433(16)
Unit Cell Parameters c, Å	13.2301(12)	13.679(6)	21.799(4)	36.681(9)	51.274(5)
Unit Cell Parameters α, °	113.125(6)	90	90	90	90
Unit Cell Parameters β, °	94.681(6)	98.26(3)	100.67(3)	91.04(6)	90
Unit Cell Parameters γ, °	95.746(6)	90	90	90	90
Temperature, K	213	123	110	110	110
Volume, Å ³	1406.3(2)	2615.9	5209.2(19)	7676.6(7)	5902.6(11)
FW, g.mol ⁻¹	989.14	904.3	887.73	2664.70	1090.38
ρ, g.cm ⁻³	1.168	1.148	1.132	1.153	1.227
λ, E	1.481	1.350	0.998	0.986	1.942
θ min	6.549	6.540	3.967	2.763	1.723
θ max	67.679	71.980	71.629	64.149	70.069
Radiation	Cu	Cu	Cu	Cu	Cu
Reflections Measured	20056	36597	35099	30398	64967
Reflections Unique ([Fo > 2σFo])	8743	9681	17445	19084	10481
Parameters/restraints	597/3	550/1	1076/39	1648/7	622/0
GOF	1.09	0.993	1.415	0.925	1.951
R1 (I > 2σ(I))	0.0841	0.0618	0.1067	0.0813	0.1447
wR2 (all data)	0.2081	0.1444	0.3101	0.1959	0.3754
CCDC#	CCDC 1026125	CCDC 1026127	CCDC 1026128	CCDC 1026143	CCDC 1026129

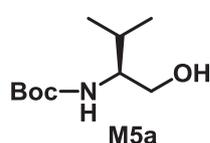
b) Experimental part of the thiourea insertion linkage on solid support

i) Synthesis of the azide activated monomer M5



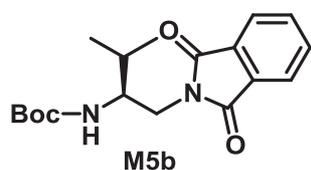
a: $t\text{BuOC(O)Cl}$, NMM, THF, -10°C ; b: NaBH_4 , H_2O ; c: Phthalimide, PPh_3 , DIAD, THF; d: TFA; e: ImSO_2Cl , CuSO_4 , KHSO_4 , $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$; f: $\text{H}_2\text{N.NH}_2.\text{H}_2\text{O}$, CH_3OH , 70°C ; g: $\text{SC}(\text{Bt})_2$, DCM

(S)-tert-butyl (1-hydroxy-3-methylbutan-2-yl)carbamate M5a



M5a was obtained from Boc-Val-OH according to the procedure of Rodriguez *et al.* [9], with 70% yield. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 4.68 (brs, 1H, NH), 3.75-3.63 (m, 2H, CH_2), 3.51-3.43 (m, 1H, CH-CH_2), 1.84 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.48 (s, 9H, Boc), 0.97 (t, 6H, 2 CH_3).

(S)-tert-butyl (1-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)-3-methylbutan-2-yl)carbamate M5b



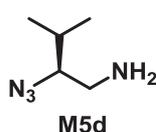
M5b was obtained from the alcohol M5a according to the procedure of Douat *et al.* [10] and used without further purification for the next step. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7.88-7.73 (m, 4H, Ar), 4.58 (brd, 1H, NH), 3.73-3.69 (m, 2H, CH_2), 3.86 (m, 1H, CH-CH_2), 1.84 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.19 (s, 9H, Boc), 1.02 (t, 6H, 2 CH_3).

(S)-2-(2-azido-3-methylbutyl)isoindolin-1,3-dione M5c

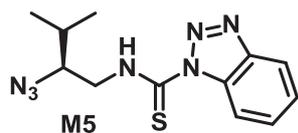


M5c was obtained from the phthalamide protected amine M5b according to the procedure of Douat *et al.* [10], with 68% yield over three steps. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7.91 (m, 2H, Ar), 7.77 (m, 2H, Ar), 3.92-3.63 (m, 3H, CH-CH_2), 1.95 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.11 (dd, $J = 9.0, 6.8$ Hz, 6H, 2 CH_3).

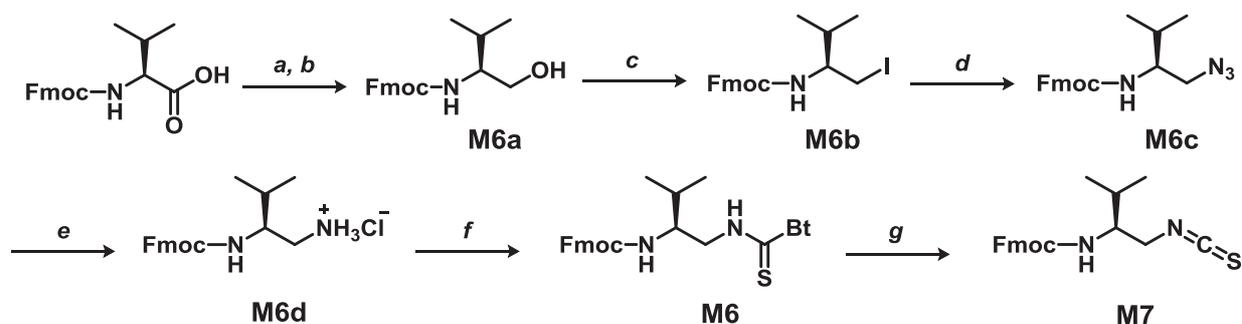
(S)-2-azido-3-methylbutan-1-amine M5d



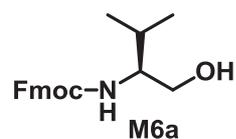
M5d was obtained from the alcohol M5c according to the procedure of Douat *et al.* [10] and used without further purification for the next step. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 3.25-3.31 (m, 1H, CH-CH_2), 2.99-2.93 (m, 1H, CH-CH_2), 2.81-2.74 (m, 1H, CH-CH_2), 1.92 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.03 (d, $J = 6.7$ Hz, 6H, 2 CH_3).

(S)-N-(2-azido-3-methylbutyl)-1H-benzo[d][1,2,3]triazole-1-carbothioamide M5

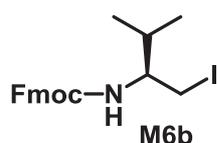
To a stirred solution of SC(Bt)₂ (1.0 eq., 0.67 mg, 2.9 mmol) in DCM (5 mL) at 0° C was added the azide amine **M5d** (1.0 eq., 2.9 mmol) in DCM (5 mL). The brown reaction mixture was left under magnetic stirring for 4 h with disappearance of the solid. After reaction completion, the solvent was evaporated under reduce pressure and the crude material was purified by silica gel flash chromatography (5% EtOAc in cyclohexane) to afford **M5** as an off white solid (0.69 mg, 79% over two steps); mp: 76-77°C; ¹H NMR (300 Hz, CDCl₃) δ (ppm) = 9.35 (brs, 1H, NH), 8.94 (dt, *J* = 8.5, 0.9 Hz, 1H, Ar), 8.16 (dt, *J* = 8.3, 1.0 Hz, 1H, Ar), 7.70 (m, 1H, Ar), 7.54 (m, 1H, Ar), 4.33 (ddd, *J* = 13.6, 6.7, 3.2 Hz, 1H, CH-CH₂), 3.83-3.59 (m, 2H, CH-CH₂), 2.05 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1.15 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H, 2 CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 174.91, 147.18, 132.46, 130.49, 125.84, 120.44, 116.01, 66.83, 46.27, 31.56, 19.14, 18.39. HRMS (ESI) : *m/z* calcd for C₁₂H₁₅N₇SNa [M+Na]⁺: 312,10019, found 312,10165; [α]_D²⁵ = 18.73 (*c* = 1 in MeOH).

ii) Synthesis of the Fmoc activated monomers M6, M7

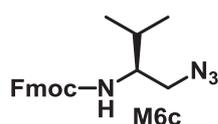
a: tBuOC(O)Cl, NMM, THF, -10°C; **b:** NaBH₄; **c:** Imidazole, PPh₃, I₂, CH₂Cl₂; **d:** NaN₃, DMF; **e:** H₂, Pd/C, MeOH, CHCl₃; **f:** SC(Bt)₂, DCM; **g:** DIEA, DCM

(S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl (1-hydroxy-3-methylbutan-2-yl)carbamate M6a

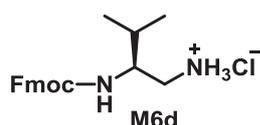
M6a was obtained from Fmoc-Val-OH according to the procedure of Liskamp *et al.* [11], with 62% yield. ¹H NMR (300 Hz, CDCl₃) δ (ppm) = 7.80 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar), 7.64 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar), 7.44 (m, 2H, Ar), 7.36 (m, 2H, Ar), 4.87 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, NH), 4.50 (m, 2H, Fmoc CH₂), 4.26 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, Fmoc CH), 3.72 (m, 2H, CH-CH₂), 3.51 (brs, 1H, CH-CH₂), 1.90 (m, 1H, CH-CH₃), 0.98 (m, 6H, 2 CH₃).

(S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl (1-iodo-3-methylbutan-2-yl)carbamate M6b

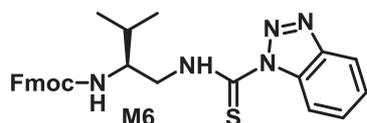
M6b was obtained from the alcohol **M6a** according to the procedure of Sureshbabu *et al.* [12], with 90% yield. ¹H NMR (300 Hz, CDCl₃) δ (ppm) = 7.81 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar), 7.65 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, Ar), 7.50-7.31 (m, 4H, Ar), 4.81 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, NH), 4.28 (m, 2H, Fmoc CH₂), 4.48 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, Fmoc CH), 3.41 (ddd, *J* = 27.6, 10.4, 4.3 Hz, 2H, CH-CH₂), 3.20 (m, 1H, CH-CH₂), 1.83 (m, 1H, CH-CH₃), 1.04-0.89 (dd, *J* = 10.5, 6.7 Hz 6H, 2 CH₃).

(S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl (1-azido-3-methylbutan-2-yl)carbamate M6c

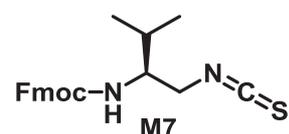
M6c was obtained from the iodine **M6b** according to the procedure of Sureshbabu *et al.* [12], with 83% yield. $^1\text{H NMR}$ (300 Hz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 7.91 (d, J = 7.4 Hz, 2H, Ar), 7.73 (d, J = 7.3 Hz, 2H, Ar), 7.46-7.31 (m, 4H, Ar), 4.40-4.22 (m, 3H, Fmoc CH CH_2), 3.50-3.27 (m, 3H, CH- CH_2), 1.74 (m, 1H, CH- CH_3), 0.85 (dd, J = 6.7, 4.3 Hz, 6H, 2 CH_3).

(S)-2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-methylbutan-1-aminium chloride M6d

M6d was obtained from the amine **M6c** according to the procedure of Liskamp *et al.* [11], with 90% yield. $^1\text{H NMR}$ (300 Hz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 7.95-7.90 (m, 5H, Ar and NH_2), 7.75 (m, 2H, Ar), 7.46-7.26 (m, 4H, Ar), 4.49 (dd, J = 12.8, 9.6 Hz, 1H, Fmoc CH), 4.25 (m, 2H, Fmoc CH_2), 3.57-3.48 (m, 1H, CH- CH_2), 2.94 (m, 2H, CH- CH_2), 1.75 (m, 1H, CH- CH_3), 0.84 (m, 6H, 2 CH_3).

(S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl(1-(1H-benzo[d][1,2,3]triazole-1-carbothioamido)-3-methylbutan-2-yl)carbamate M6

The Fmoc protected Valine amine salt **M6d** (1.0 eq., 1.32 g, 3.65 mmol) was diluted in anhydrous DCM (20 mL) under nitrogen atmosphere. NMM (1.0 eq, 0.4 mL, 3.65 mmol) was added followed by $\text{SC}(\text{Bt})_2$ (1.0 eq., 1 g, 3.65 mmol). The yellow reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was evaporated under reduced pressure, diluted in a minimum of DCM then washed with water. The organic phase was evaporated under reduced pressure to furnish **M6** as white solid after DCM recrystallization (1.61 g, 91% yield); mp: 136-138°C; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 10.84 (s, 1H, NH), 8.69 (d, J = 8.4 Hz, 1H, Ar), 8.22 (d, J = 8.3 Hz, 1H, Ar Bt), 7.84 (d, J = 7.4 Hz, 2H, Ar Bt), 7.76-7.55 (m, 4H, Ar Fmoc), 7.40-7.22 (m, 4H, Ar Fmoc), 4.17-4.33 (m, 3H, Fmoc CH CH_2), 3.96 (m, 2H, CH- CH_2), 3.76 (m, 1H, CH- CH_2), 1.87 (m, 1H, CH- CH_3), 0.93 (t, J = 6.4 Hz, 6H, 2 CH_3). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 175.23, 157.17, 147.00, 143.79, 143.72, 141.27, 132.47, 130.18, 127.62, 126.99, 125.66, 124.97, 120.23, 119.90, 116.02, 66.84, 56.02, 53.53, 47.75, 47.21, 30.870, 19.31, 18.32; HRMS (ESI) : m/z calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 484.18017 found 484.18073; $[\alpha]_D^{25}$ = 19.26 (c = 1 in MeOH).

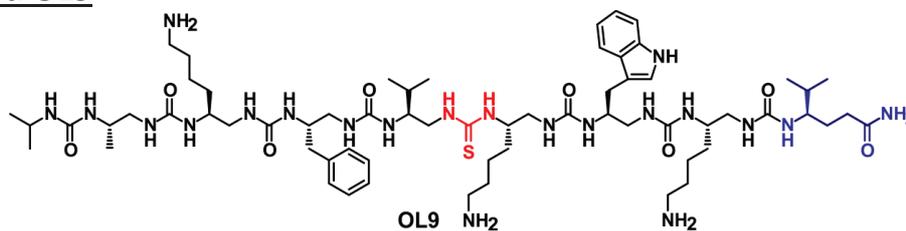
(S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl (1-isothiocyanato-3-methylbutan-2-yl)carbamate M7

M7 has been already described by Sureshbabu *et al.* [12]. **M6** (1.0 eq., 0.25 mg, 0.51 mmol) was diluted in 15 mL of anhydrous DCM. DIEA (1.0 eq., 90 μl , 0.51 mmol) was added followed. The reaction mixture became yellow and stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was evaporated under reduced pressure and purified by silica gel flash chromatography (5% EtOAc in cyclohexane). 0.137 mg of the pure expected compound **M7** was obtained as white solid, yielded 72%; mp: 124.2-124.9 °C; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7.82 (d, J = 6.9 Hz, 2H, Ar), 7.64 (d, J = 7.3 Hz, 2H, Ar), 7.47-7.34 (m, 4H, Ar), 4.89 (d, J = 8.5 Hz, 1H, NH), 4.51 (m, 2H, Fmoc CH_2), 4.28 (t, J = 6.6 Hz, 1H, Fmoc CH), 3.70-3.56 (m, 3H, CH- CH_2), 1.89 (m, 1H, CH- CH_3), 1.02 (t, J = 6.0 Hz, 6H, 2 CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 155.94, 143.79, 141.41, 132.73, 127.78, 127.15, 127.10, 125.09, 120.01, 66.82,

56.56, 47.35, 47.29, 29.49, 19.42, 18.71; HRMS (ESI) : m/z calcd for $C_{21}H_{23}N_2O_2S$ $[M+H]^+$ 367.14748 found 367.14894.

iii) Synthesis of the oligomers

Compound OL9



OL9 was synthesized using Boc chemistry under microwave assistance, on a 50 μ mol scale following the general procedure **C** and starting from 4-methylbenzhydrylamine (MBHA) resin (50 mg, 0.1 mmol/g). The coupling of Boc-protected monomer **M2** (1.5 eq.) was performed twice in presence of 3.0 eq of DIEA in DMF (1 mL), with microwave irradiation (25 W, maximum power, 70 $^{\circ}$ C, ramp 5 min, hold 30 min). The Boc removal was performed twice using TFA (1 mL) during 5 min at room temperature. After HF-cleavage, the crude product was purified by preparative RP-HPLC (30-45% of B in 20 min at 20 mL/min) to furnish 12.9 mg of pure **OL9**. RP-HPLC purity of crude product 33%; yield after cleavage/precipitation 66%; yield after isolation 19%; RP-HPLC t_R 5.31 min (gradient 10-100% of B in 10 min, UV 200 nm); HRMS (ESI): m/z calcd for $C_{64}H_{113}N_{21}O_8S$ $[M+H]^+$: 1336.88745, found 1336.89151.

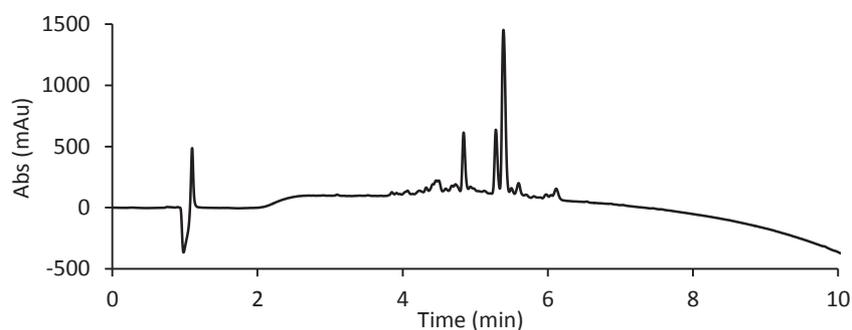


Figure EP.1: RP-HPLC trace of crude **OL9** (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

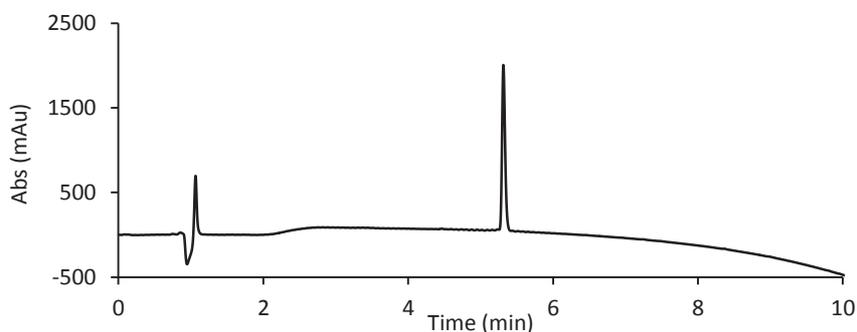
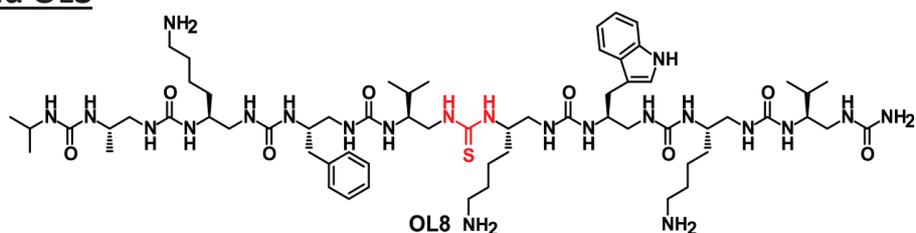


Figure EP.2: RP-HPLC trace of **OL9** after purification (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

Compound OL8**a) Azide strategy**

OL8 was synthesized using the azide strategy and following the general procedure **D** under microwave assistance (carried out on DiscoverBio system), on a 50 μmol scale and starting from NovaPeg Rink Amine resin (111 mg, 0.45 mmol/g) [5]. The coupling of the azide monomer **M5** (5.0 eq.) was performed twice in presence of 20.0 eq of DIEA in anhydrous DCM (1 mL) for 48 h at room temperature. Reduction of the azide was done three times under microwave assistance by swelling the resin in a mixture of dioxane/water (7:3, v/v, 1 mL) and adding 1 M PMe_3 solution in THF (0.5 mL, 10.0 eq. relative to the resin loading), irradiating with 25 W power, heating at 70 $^\circ\text{C}$ for 30 min. After the coupling of the thiourea moitie, reduction times were reduced at 15 min each. After cleavage, the crude product was precipitated with cold Et_2O then purified by semi-preparative RP-HPLC (25-50% of B in 20 min at 4 mL/min) to furnish 2.9 mg of pure **OL8**. RP-HPLC purity of crude product 13%; yield after cleavage/precipitation 53%; yield after isolation 4%; RP-HPLC t_R 5.63 min (gradient 10-100% of B in 10 min); HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{63}\text{H}_{112}\text{N}_{22}\text{O}_8\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1337.88270, found 1337.88790.

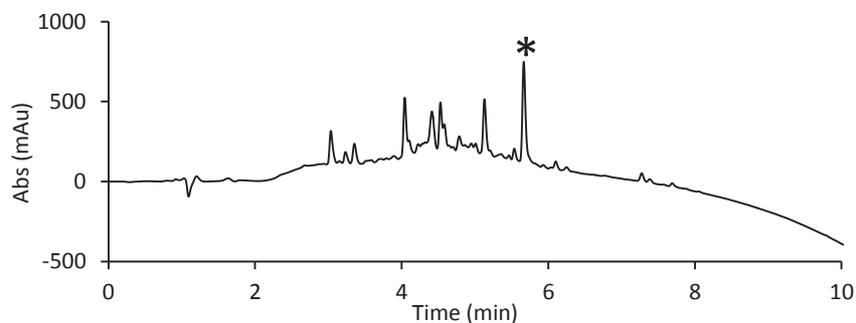


Figure EP.3: RP-HPLC trace of crude **OL8** after azide solid phase synthesis (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm). Expected product designed by an asterisk.

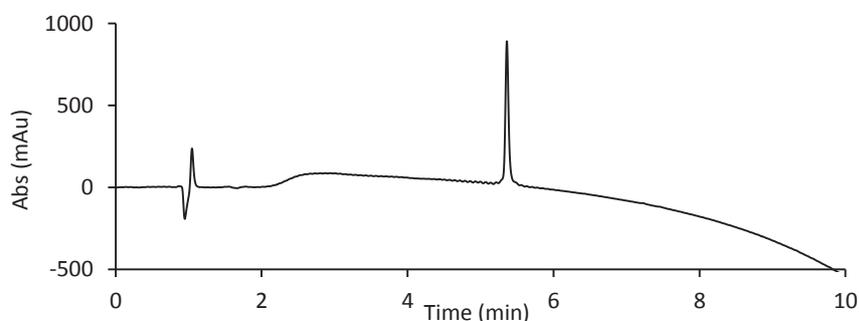


Figure EP.4: RP-HPLC trace of **OL8** after purification (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

b) Punctual use of N-Fmoc protected monomer M7

The synthesis was performed 50 μmol scale following the general procedure **D** (carried out on the DiscoverBio system), and by alternatively coupling the *N*-Fmoc Valine isothiocyanate monomer **M7**. The coupling was performed with 5.0 eq. of **M7** in anhydrous DCM (2 mL) for 48 h at room temperature. The *N*-Fmoc protecting group was removed with a DMF/piperidine (8:2, v/v) solution successively 7 min then three times 15 min at room temperature. After the coupling of the thiourea moiety, reduction times were reduced at 15 min each. After cleavage, cold Et₂O precipitation and purification, 8.5 mg of **OL8** was obtained. RP-HPLC purity of crude product 52%; yield after cleavage/precipitation 55%; yield after isolation 13%.

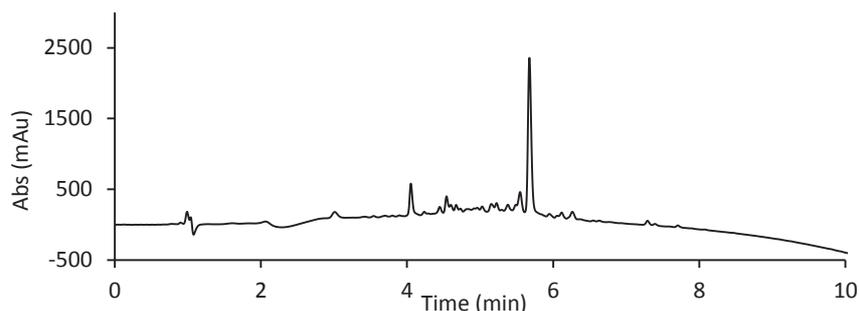


Figure EP.5: RP-HPLC trace of crude **OL8** with *N*-Fmoc punctual protection (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

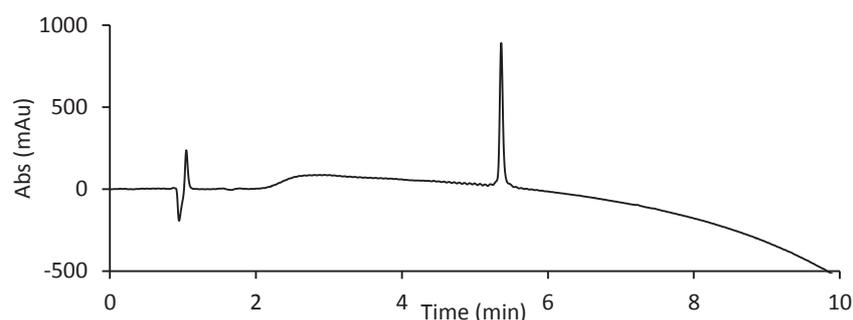
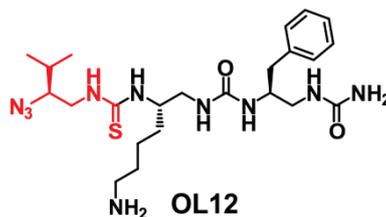


Figure EP.6: RP-HPLC trace of **OL8** after purification (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

Compound OL12

The synthesis was performed on a 25 μ mol scale using the general procedure **D** (carried out on the DiscoverBio system) by alternatively coupling of the azide monomer **M5**. The coupling was performed with 5.0 eq. of **M5** in presence of 20.0 eq. of DIEA in anhydrous DCM (2 mL) for 48 h at room temperature. After cleavage, the crude was lyophilized then purified by semi-preparative RP-HPLC (20-45% of B in 20 min at 4 mL/min at 50°C) to furnish 3.7 mg of pure **OL12**. RP-HPLC purity of crude product 50%; yield after cleavage/precipitation 92%; yield after isolation 28%; RP-HPLC t_R 7.53 min (gradient 10-50% of B in 10 min); HRMS (ESI): m/z calcd for $C_{23}H_{41}N_{10}O_2S$ $[M+H]^+$: 521.31292, found 521.31435.

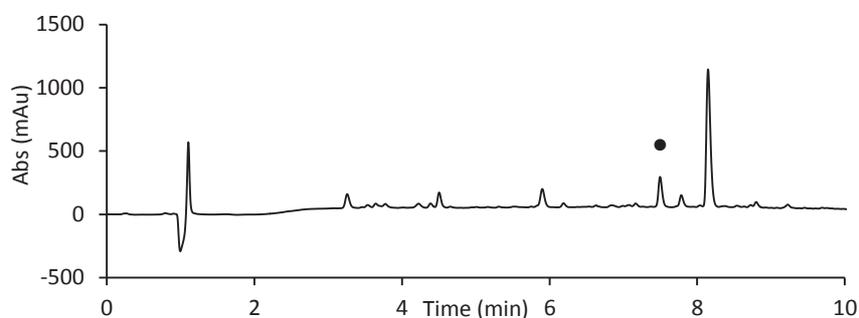


Figure EP.7: RP-HPLC trace of crude **OL12** (10-50% of B in 10 min, UV 200 nm).

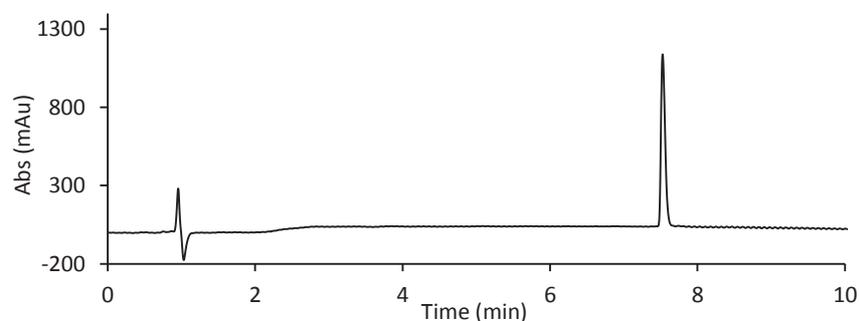
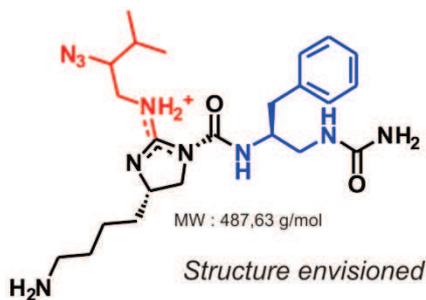
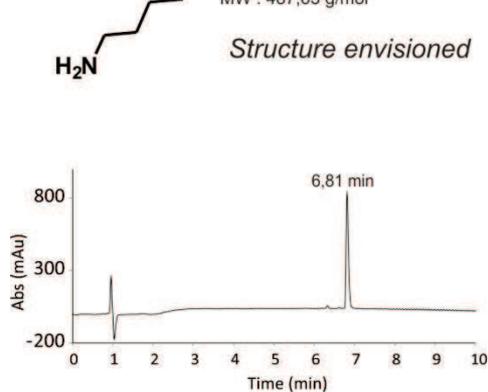


Figure EP.8: RP-HPLC trace of **OL12** after purification (10-50% of B in 10 min, UV 200 nm).

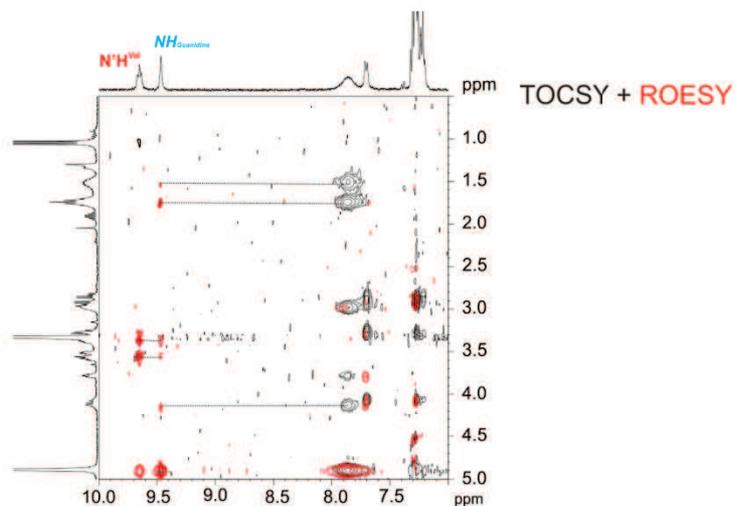
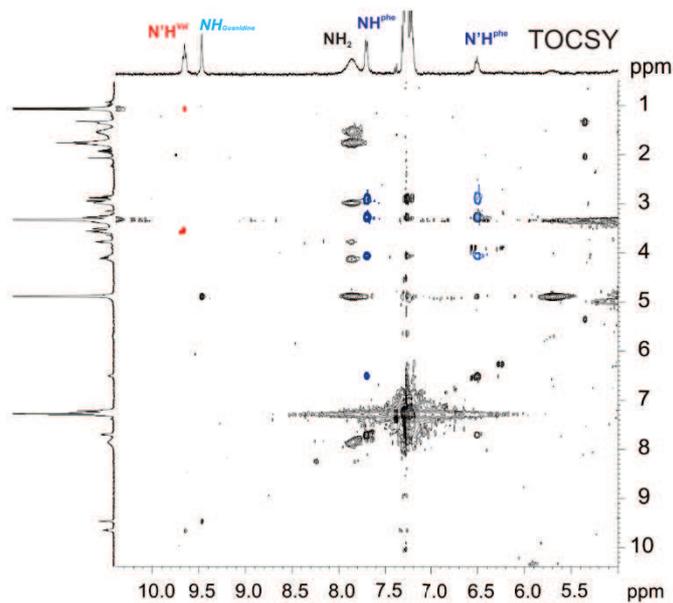
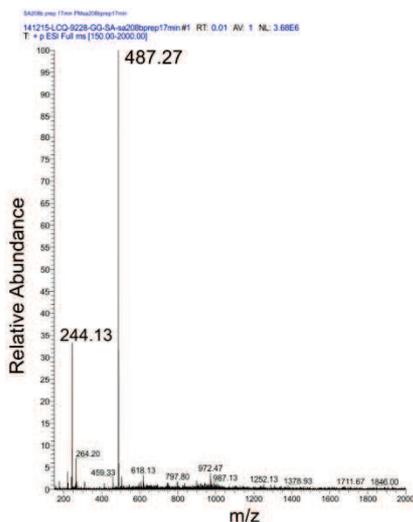
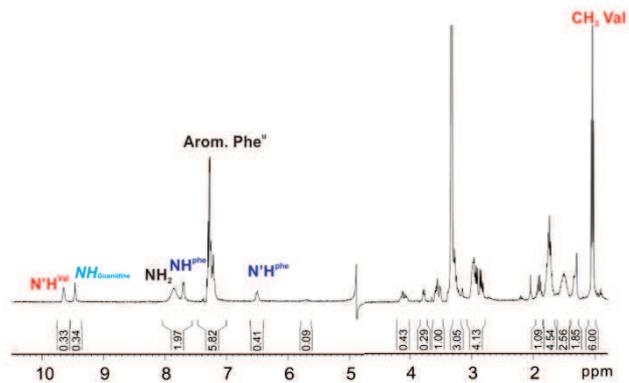
Side product designed by (•)



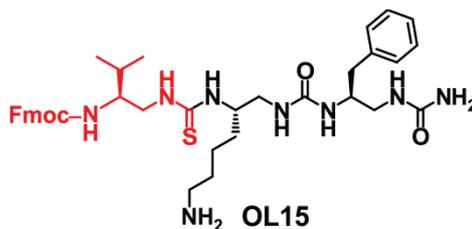
Residus	NH	N'H	$^{\alpha}\text{CH}^1$	$^{\alpha}\text{CH}^2$	$^{\beta}\text{CH}$	$^{\gamma}\text{CH}$	$^{\delta}\text{CH}$	$^{\epsilon}\text{CH}$	Others
Phe ⁱ 1	7,70	6,50	3,28	-	4,06	2,91/2,86	-	-	Arom: 7,29/7,26/7,21
Lyscyclique 2	-	-	3,78	-	4,13	1,74	1,50	1,74	2,98 NH ₂ : 7,87, NH _{quaternaire} : 9,45
Val 3	-	9,65	3,36	-	3,56	1,90	1,04	-	NH _{quaternaire} : 9,45



10-50 % CH₃CN (+ 0.1 % TFA) in H₂O (+ 0.1 % TFA)



Compound OL15



The synthesis was performed on a 20 μ mol scale using the general procedure **D** (carried out on the DiscoverBio system) by alternatively coupling *N*-Fmoc Valine isothiocyanate monomer **M7**. The coupling was performed with 5.0 eq. of **M7** in anhydrous DCM (1 mL) for 48 h at room temperature. After cleavage, the crude was lyophilized then purified by semi-preparative RP-HPLC (10-65% of B in 30 min at 4 mL/min) to furnish 7 mg of pure **OL15**. RP-HPLC purity of crude product 72%; yield after cleavage/precipitation 85%; yield after isolation 50%; RP-HPLC t_R 6.47 min (gradient 10-100% of B in 10 min); HRMS (ESI): m/z calcd for $C_{38}H_{53}N_8O_4S$ $[M+H]^+$ 717.39050, found 717.39352.

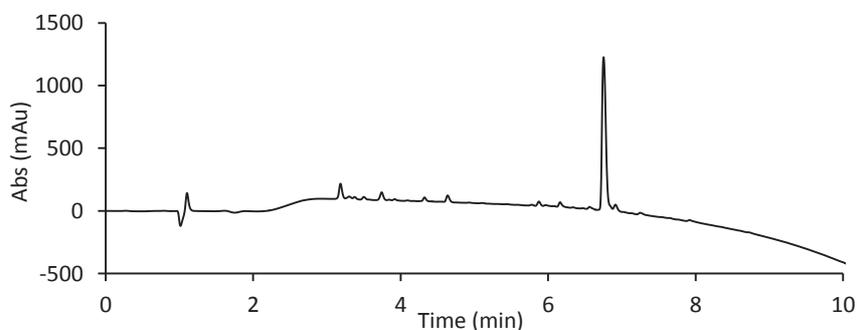


Figure EP.9: RP-HPLC trace of crude **OL15** (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

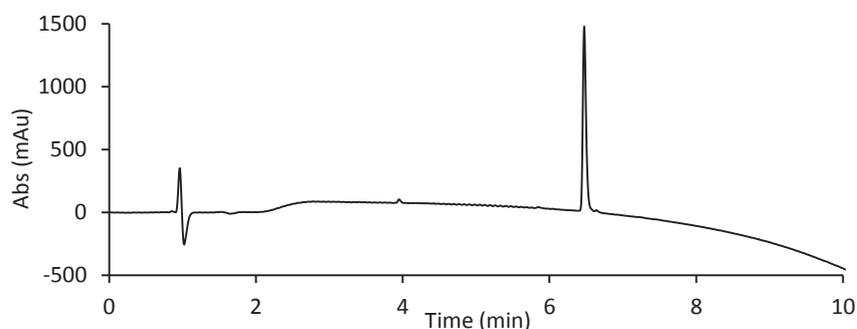
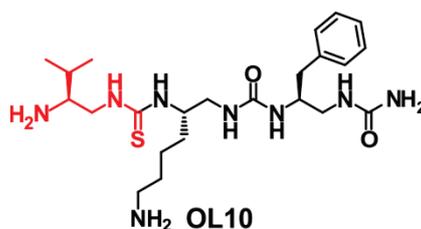


Figure EP.10: RP-HPLC trace of **OL15** after purification (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

Compound OL10**c) Azide strategy**

The synthesis of **OL10** was performed on a 100 μ mol scale using the same procedure as **OL8**. The coupling of the azide monomer was performed with 5.0 eq. of **M5** in presence of 20.0 eq of DIEA in anhydrous DCM (2 mL) for 48 h at room temperature. Reduction of the azide was performed twice by swelling the resin in a mixture of dioxane/water (7:3, v/v, 1 mL) and adding 1 M PMe_3 solution in THF (1 mL, 10.0 eq. relative to the resin loading), irradiating with 25 W power, heating at 70 $^\circ\text{C}$ for 30 min. After cleavage and precipitation with cold Et_2O , the crude was purified by semi-preparative HPLC (10-40% of B in 30 min at 4 mL/min) to give 10 mg of pure **OL10**. RP-HPLC purity of crude product 30%; yield after cleavage/precipitation 90%; yield after isolation 21%. RP-HPLC t_R 5.17 min (gradient 10-50 % of B in 10 min); HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{N}_8\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 495.32242, found 495.32382.

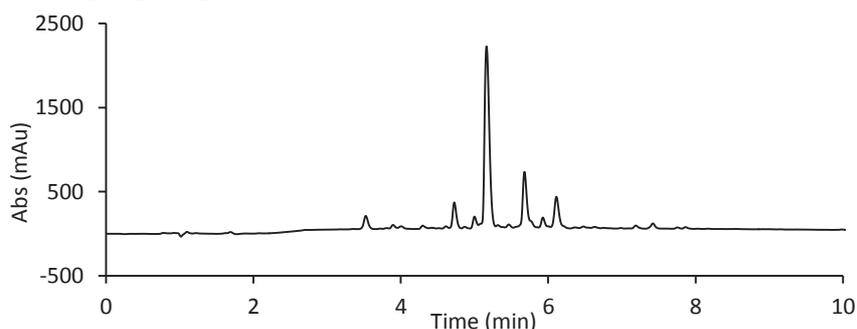


Figure EP.11: RP-HPLC trace of the crude **OL10** after azide strategy (10-50% of B in 10 min, UV 200 nm).

d) Punctual use of N-Fmoc protected monomer M7

The synthesis was performed on a 15 μ mol scale using the same procedure as **OL15**. Coupling of **M7** was performed with 5.0 eq. of building block in anhydrous DCM (2 mL) for 48 h at room temperature. The *N*-Fmoc protecting group was removed with a DMF/piperidine (8:2, v/v) solution successively 7 min then three times 15 min. After cleavage and precipitation with cold Et_2O , the crude was purified by semi-preparative HPLC (10-45% of B in 20 min at 4 mL/min) to give 2.5 mg of pure **OL10**. RP-HPLC purity of crude product 63%; yield after cleavage/precipitation quant.; yield after isolation 34%.

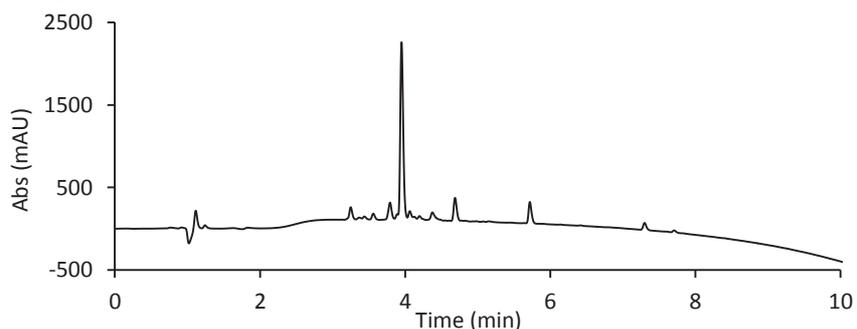


Figure EP.12: RP-HPLC trace of crude **OL10** through Fmoc punctual insertion (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

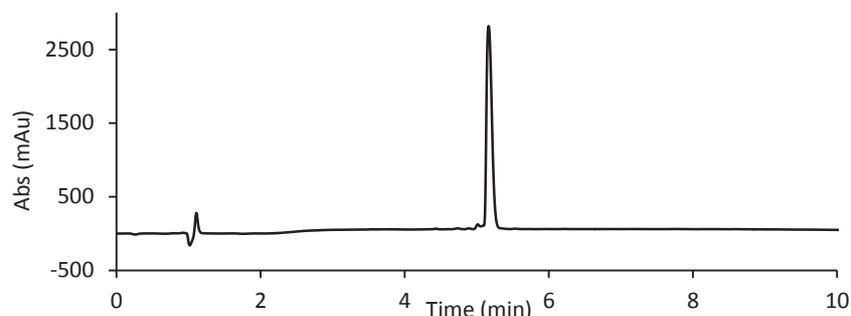
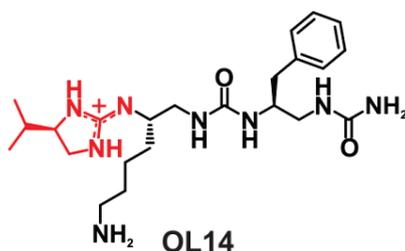


Figure EP.13: RP-HPLC trace of **OL10** after purification (10-50% of B in 10 min, UV 200 nm).

Residue	NH	N'H	α CH ¹	α CH ²	β CH	γ CH	δ CH	ϵ CH	Term CH	$\Delta\delta$ (α CH)
Phe ^u 1	6.01	6.39	3.44	3.00	3.92	2.83/2.70			Arom.:7.24	0.43
Lys ^u 2	7.44	6.19	3.63	2.96	4.41	1.58/1.53	1.47	1.69	2.92 NH ₂ :7.80	0.67
Val ^{thiou} 3	7.92	7.64	4.16	2.93	3.46	1.97	1.07			1.23

Table EP.7: ¹H NMR Chemical shifts (ppm) of **OL10** in CD₃OH at 293K (10 mM).

Compound OL14



OL14 was isolated during the synthesis of the compound **OL10** after reduction by PMe₃. 2.06 mg obtained after purification; RP-HPLC t_R 5.68 min (gradient 10-50% of B in 10 min); HRMS (ESI): m/z calcd for C₂₃H₄₁N₈O₂ [M+H]⁺ 461.33470, found 461.33663.

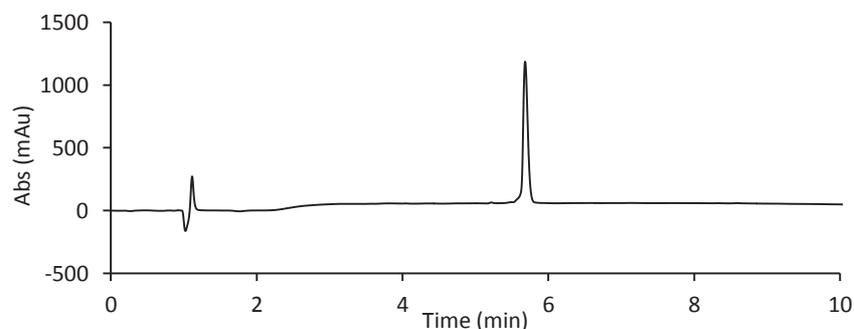


Figure EP.14: RP-HPLC trace of **OL14** after purification (10-50% of B in 10 min, UV 200 nm).

Residue	NH	N'H	α CH ¹	α CH ²	β CH	γ CH	δ CH	ϵ CH	Term CH	$\Delta\delta$ (α CH)
Phe ^u 1	6.05	6.36	3.28	3.11	3.93	2.83/2.71			Arom.: 7.26	0.13
Lys ^u 2		6.39	3.19	3.13	3.37	1.48	1.43	1.69	2.93NH ₂ :7.80	0.06
Val ^{cyclic} 3			3.74	3.44	3.84	1.82	0.98			

Table EP.8: ¹H NMR Chemical shifts (ppm) of **OL14** in CD₃OH at 293K (10 mM).

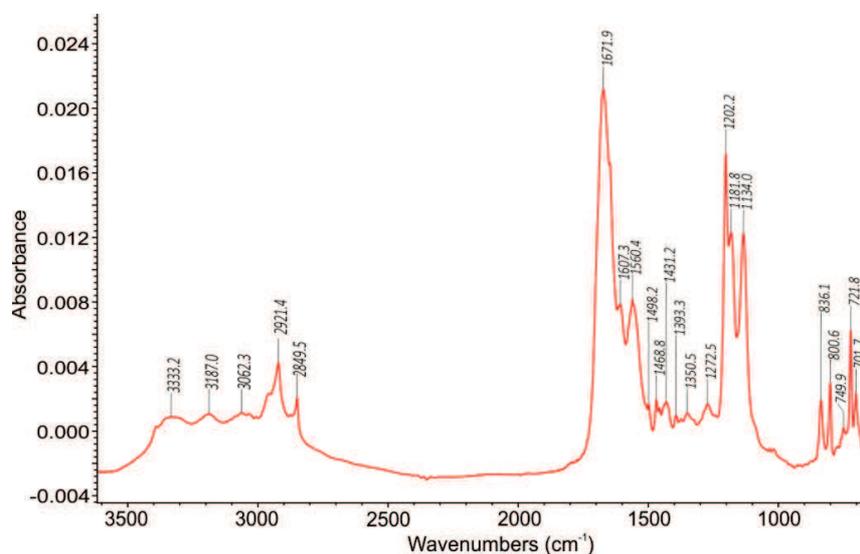
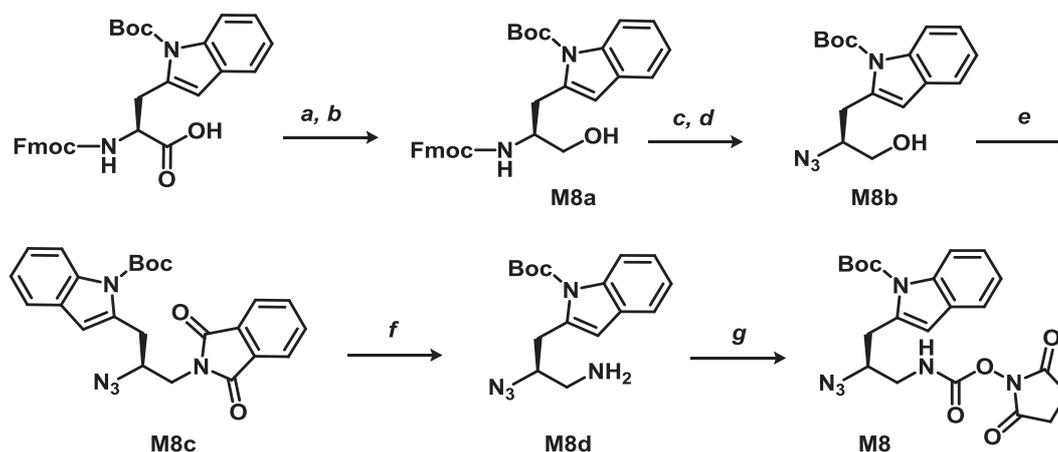


Figure EP.15: FT-IR spectra of oligourea **OL14** in the solid state (evaporation of the solvent directly on the germanium crystal by N₂ flow).

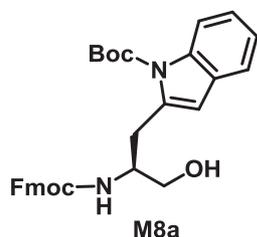
c) Experimental part of the guanidine insertion linkage in solution

i) Synthesis of activated monomer M8



a: tBuOC(O)Cl, NMM, THF, -10°C; **b:** NaBH₄, H₂O; **c:** DBU, THF; **d:** N₃SO₂Im.HCl, K₂CO₃, CuSO₄ AcCN/H₂O/MeOH; **e:** PPh₃, DIAD, phthalimide, THF; **f:** N₂H₄.H₂O, MeOH, 70°C; **g:** DSC, DCM.

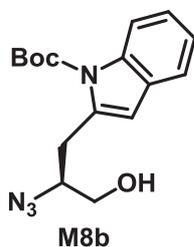
(S)-tert-butyl 2-(2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-hydroxypropyl)-1H-indole-1-carboxylate M8a



Fmoc-Trp(Boc)-OH (1.0 eq., 10 g, 0.02 mmol) was dissolved in anhydrous THF (30 mL) under N₂ and the solution was cooled down to 0 °C. After addition of NMM (1.1 eq., 2.3 mL, 0.021 mmol) followed by isobutyl chloroformate (1.0 eq., 2.6 mL, 0.02 mmol), the mixture was stirred at -10°C for 30 min. The precipitated *N*-methylmorpholine hydrochloride was removed by filtration and washed with THF (2 x 50 mL). The filtrate and washings were added to a solution of NaBH₄ (2.0 eq., 1.15 mg, 0.03 mmol) in water at 0°C and the resulting solution was stirred at room temperature for 30 min. Excess of water was added, the expected compound precipitated. After filtration, the product was purified by silica gel flash chromatography (20% EtOAc in cyclohexane) in order to furnish **M8a** as a white solid (7.36 g, 76%). ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 8.17 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar), 7.79 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar), 7.69-7.26 (m, 10H, Ar), 5.19 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, NH), 4.45 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂ Fmoc), 4.23 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, CH Fmoc), 4.10 (brs, 1H, CH),

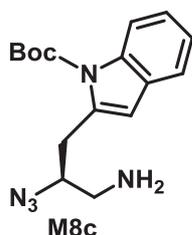
3.70-3.72 (brd, $J = 4.7$ Hz, 2H, CH₂), 3.02 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, CH₂), 2.05 (brs, 1H, OH), 1.69 (s, 9H, Boc); ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 156.52, 149.69, 143.87, 141.35, 135.54, 130.57, 127.72, 127.09, 125.06, 124.61, 123.97, 122.74, 120.00, 119.08, 116.52, 115.35, 83.72, 66.81, 63.83, 52.75, 47.28, 28.23, 26.74.

(S)-tert-butyl 2-(2-azido-3-hydroxypropyl)-1H-indole-1-carboxylate M8b



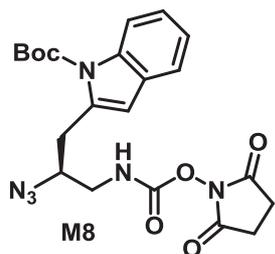
M8a was dissolved in 20 mL of THF in presence of DBU (1.0 eq., 2.15 mL, 0.014 mmol) and left to react for 30 min. THF was removed under reduced pressure and the amine was dried overnight under high vacuum. The amine was directly engaged in the next step without further purification. To a solution of amine in CH₃CN/H₂O/MeOH mixture (30 mL) were successively added K₂CO₃ ($n \times \text{Acid} + 0.5$ mmol, 3.07 g, 0.022 mmol), CuSO₄·5H₂O (0.01 eq., 36 mg, 0.14 μ mol) and imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride (1.2 eq., 3.61 g, 0.017 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h then concentrated under reduced pressure and re-dissolved in EtOAc (50 mL). The organic layer was then washed with 1M HCl aqueous solution (2 x 50 mL), brine (50 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure to furnish after silica gel flash chromatography (20% EtOAc in cyclohexane) the azide **M8b** as pure compound (3.75 g, 83% over two steps). ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 8.18 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, Ar), 7.63-7.24 (m, 4H, Ar); 3.95-3.61 (m, 3H, CH-CH₂), 3.00 (m, 2H, CH₂-Ar), 1.71 (s, 9H, Boc); ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 149.65, 135.51, 130.24, 124.63, 124.20, 122.66, 118.71, 115.81, 115.44, 83.80, 64.62, 63.65, 28.24, 26.30.

(S)-tert-butyl 2-(3-amino-2-azidopropyl)-1H-indole-1-carboxylate M8d



To a solution of triphenylphosphine (1.2 eq., 3.73 g, 0.014 mmol) and phthalimide (1.2 eq., 2.09 g, 0.014 mmol) in anhydrous THF at 0°C and under positive N₂ atmosphere pressure, was added DIAD (1.2 eq., 2.8 mL, 0.014 mmol). A solution of **M8c** in anhydrous THF (40 mL) was next added dropwise and the reaction mixture was stirred for 4 h and allowed to reach room temperature. THF was evaporated under reduced pressure and the crude material was directly engaged in the following step. To a solution of azido phthalimide derivative in MeOH (250 mL) was added hydrazine hydrate (3.0 eq., 1.8 mL, 0.035 mmol). The reaction mixture was heated to reflux and heating was maintained for 4 h with apparition of a white precipitate. The reaction mixture was filtered off, washed with cold EtOAc and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by silica gel flash chromatography (10% MeOH in DCM) to furnish pure azide compound **M8d** as a yellow foam (3.24 g, 87% over two steps). ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 8.52 (brs, 2H, NH₂), 8.15 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, Ar), 7.69-7.14 (m, 5H, Ar), 4.34 (brs, 1H, CH), 3.52-2.74 (br, 4H, 2 CH₂), 1.67 (s, 9H, Boc), ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 149.56, 135.45, 129.95, 124.82, 124.71, 122.85, 118.91, 115.40, 114.46, 83.88, 59.33, 43.28, 28.35, 28.20.

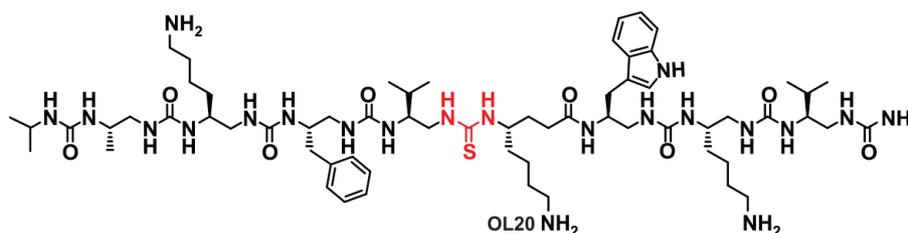
(S)-tert-butyl 2-(2-azido-3-(((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)carbonyl)amino)propyl)-1H-indole-1-carboxylate M8



To a stirred suspension of DSC (1.2 eq., 3.16 g, 0.012 mmol) in anhydrous DCM (20 mL) was added dropwise a solution of the azido amine **M8d** in anhydrous DCM (20 mL). After 3 h, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the crude material was dissolved in EtOAc (50 mL) and washed with 1M KHSO₄ (2 x 50 mL), brine (50 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure to furnish activated carbamate **M8** as a yellow solid. (4.05 g, 86%); mp= 70-73.5°C; ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 8.17 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar), 7.51 (m, 2H, Ar), 7.33 (m, 2H, Ar), 5.75 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, NH), 3.98 (m, 1H, CH CH₂), 3.50-3.58 (m, 1H, CH₂N), 3.23-3.28 (m, 1H, CH₂N), 3.01 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂ Ar), 2.80 (s, 4H, CH₂ Osu), 1.70 (s, 9H, Boc); ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 170.06, 151.82, 149.63, 135.47, 130.10, 124.67, 124.48, 122.75, 118.70, 115.43, 115.18, 83.86, 61.35, 45.16, 28.22, 27.72, 25.47; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₁H₂₄N₆O₆Na [M+Na]⁺ 479.16495, found 479.16434; [α]_D²⁵ = 17.45 (*c* = 1 in MeOH).

ii) Synthesis of the oligomers

Compound OL20



OL20 was synthesized according to the procedure used for **OL8** and by introducing **M7** on azide strategy under microwave assistance (carried out on the DiscoverBio system), on a 16.7 μmol scale, starting from NovaPeg Rink Amine resin [5] (37 mg, 0.45 mmol/g). The coupling the amino acid Fmoc γ-(Boc)-Lysine was performed with 1.5 eq. of monomer (0.025 mmol, 1.5 equiv relative to resin loading) in DMF (0.5 mL), DIEA (3.0 eq.) and BOP (3.0 eq) and irradiated (50 W, maximum power, 50 °C, ramp 5 min, hold 15 min). Fmoc removal was done with a solution of DMF/piperidine (8:2, v/v) successively three times 20 min. After cleavage, the crude product (15.8 mg) was precipitated in the presence of Et₂O and purified twice by semi-preparative HPLC (10-45% then 30-42% of B in 20 min at 4 mL/min) to afford 3.9 mg of **OL20**; yield after isolation 16.6%; RP-HPLC *t_R* 6.04 min (gradient 10-100% of B in 10 min); HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₆₄H₁₁₃N₂₁O₈S [M+H]⁺ 1336.88799, found 1336.89038.

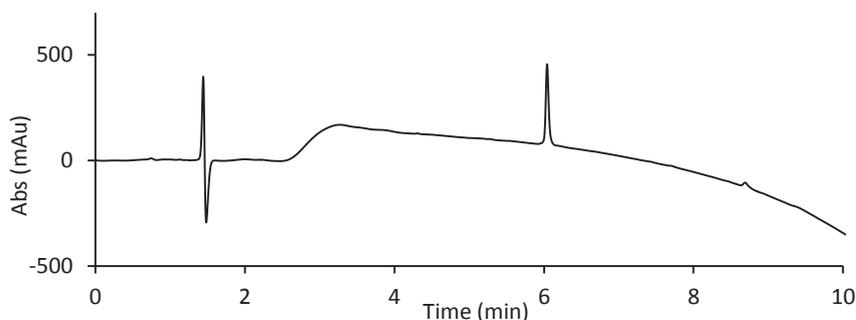
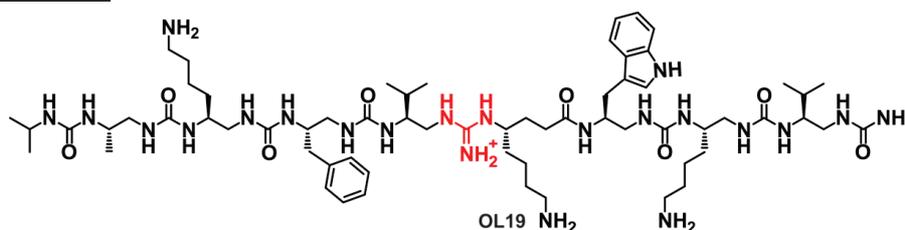


Figure EP.16: RP-HPLC chromatogram of **OL20** after purification (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

Residue	NH	N'H	α CH ¹	α CH ²	β CH	γ CH	δ CH	ϵ CH	NH side chain	Arom	$\Delta\delta(\alpha$ CH)
Val ^u 1	6.16	6.46	3.50	2.55	3.61	1.58	0.79 0.88				0.95
Lys ^u 2	5.66	6.0	3.58	2.47	3.92	1.68 1.33	1.50 1.49	2.93	7.8		1.11
Trp ^u 3	8.25	6.38	3.71	2.84	4.44	2.88			10.36	7.10/7.61 7.32/7.03	0.87
Lys ^y 4	7.32	2.43 1.98	1.46	1.25	4.21	1.63 1.38	1.64	2.88	7.8		0.22
Val ^s 5	6.18	7.85	4.46	2.66	3.77	1.70	0.95 1.01				1.79
Phe 6	6.42	6.42	3.62	2.38	4.028	2.45			10.2	7.03/7.03 7.16	1.24
Lys 7	5.97	6.36	3.51	2.42	3.768	1.65 1.31	1.51 1.45	2.90	7.80		1.08
Ala ^u 8	5.68	6.17	3.46	2.5	3.9	1.08					0.88
lprNH	5.74				3.83	1.17					

Table EP.9: ¹H NMR Chemical Shifts (ppm) of **OL20** in CD₃OH at 293K (2.5 mM).

Compound OL19



26.09 μ mol of the hybrid thiourea/urea oligomer **OL20** on resin was engaged in methylation activation with CH₃I (10.0 eq.) in 0.5 mL of DMF. The reaction was performed four times with microwave irradiation at 40 °C, 20 W, hold 15 min. The resin was washed before and after each reaction with DMF (3 x 3 mL) and DCM (3 x 3 mL). The S-methylated oligomer was then washed with anhydrous THF (3 x 3 mL) then transferred in a sealed reactor. 5 mL of anhydrous THF were added and ammonia gas was bubbled into the reactor during 30 min. The reactor was then sealed and stirred for 48 h at 50 °C. Cleavage of the oligomer from the resin was performed according to the general procedure **D**. After cold Et₂O precipitation, the crude was purified by semi-preparative RP-HPLC (15-41% of B in 20 min at 4 mL/min) to furnish 6 mg of pure **OL19**; yield after isolation 17.4%; RP-HPLC t_R 5.35 min (gradient 10-100% of B in 10 min); HRMS (ESI): m/z calcd for C₆₄H₁₁₅N₂₂O₈ [M+H]⁺ 1319.92682, found 1319.92627.

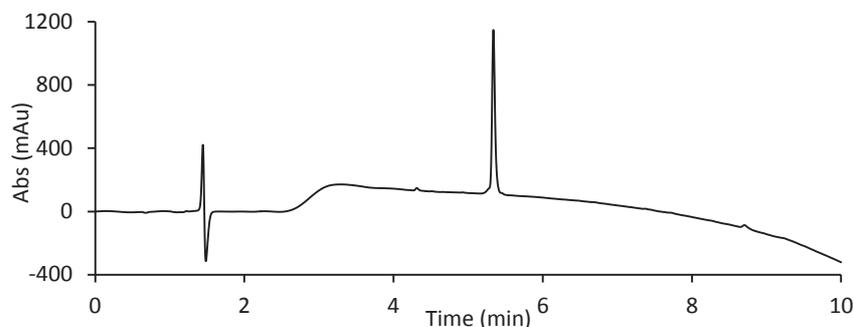


Figure EP.17: RP-HPLC chromatogram of **OL19** after purification (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

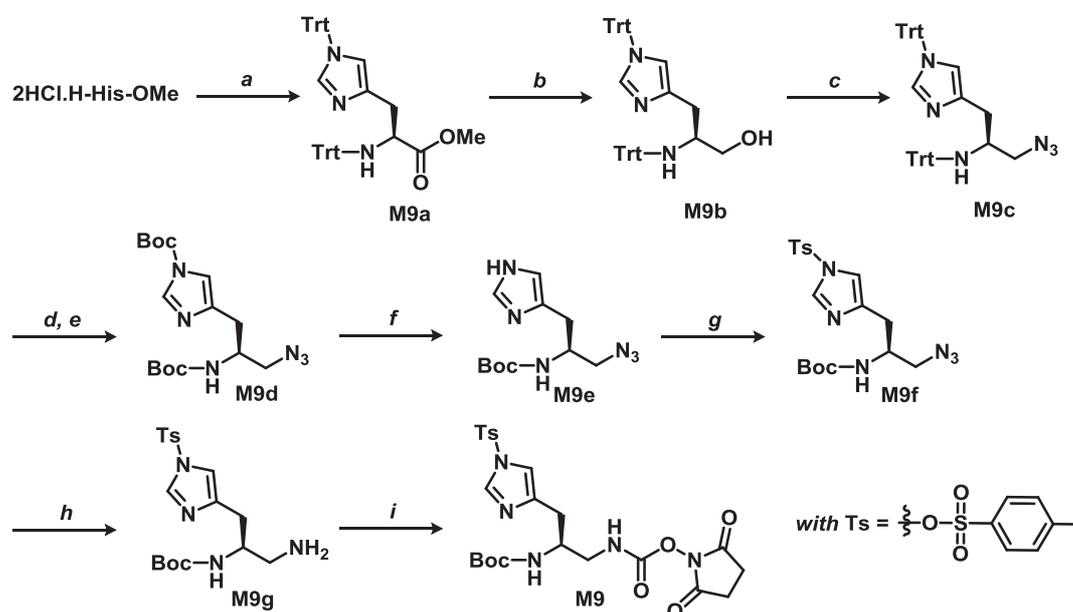
Residue	NH	N'H	α CH ¹	α CH ²	β CH	γ CH	δ CH	ϵ CH	NH Side chain	Arom	$\Delta\delta$ (α CH)
Val ^u 1	5.94	6.38	3.45	2.74	3.56	1.61	0.89 0.83				0.72
Lys ^u 2	5.95	6.35	3.44	2.44	3.74	1.62 1.29	1.48 1.43	2.88	7.82		1.00
Trp ^u 3	8.09	6.27	3.57	2.97	4.39	2.88			10.38	7.12/7.35 7.59	0.60
Lys ^y 4	ND	CH ₂ = 2.25 2.31	1.62	1.5	3.35		1,56, 1.26 overlapping signals	2.83			0.27
Val ^{gua} 5	6.32	ND	3.55	2.84	3.72	1.76	0.90 0.98		7.82		0.71
Phe 6	6.39	6.51	3.57	2.47	3.99	2.56				7.15/7.18 7.23	1.14
Lys 7	5.95	5.99	3.45	2.68	3.86	1.65 1.37	1.49	2.90	7.81		0.76
Ala ^u 8	5.67	6.17	3.41	2.59	3.85	1.04					0.82
lprNH	5.74				3.81	1.16					x

Table EP.10: ¹H NMR Chemical shifts (ppm) of **OL19** in CD₃OH at 293K (2.5 mM).

3. Experimental data of chapter 3

a) Synthesis of the activated monomers

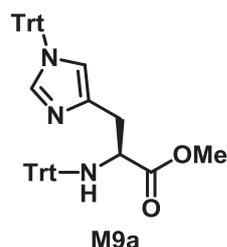
i) Synthesis of the Histidine building block M9



a : Trt-Cl, Et₃N, AcCN; **b** : LiAlH₄ powder, THF; **c** : DPPA, DBU, NaN₃, DMF, 65°C; **d** : 6M HCl, THF; **e** : (Boc)₂O, Et₃N, DMAP, AcCN/H₂O, 70°C; **f** : K₂CO₃, MeOH/H₂O; **g** : TsCl, Et₃N, DMAP, DCM; **h** : Pd/BaSO₄, EtOAc; **i** : DSC, DCM

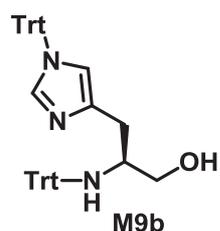
This experimental part was based on the synthesis procedure published by *Nelli et al.* [13]. In the context on this PhD thesis, a scale up of **M9** synthesis was realized.

(S)-methyl 3-(1-trityl-1H-imidazol-4-yl)-2-(tritylamino) propanoate M9a



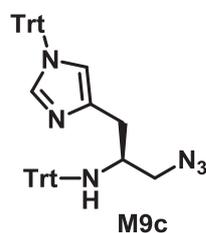
2HCl·H-His-OMe (15 g, 61.98 mmol) was transformed according to the procedure published by *Nelli et al.* [13] to afford the expected product **M9a** (40.5 g, quantitative yield) as a yellow solid which was used for next step without further purification.

(S)-3-(1-trityl-1H-imidazol-4-yl)-2-(tritylamino)propan-1-ol M9b

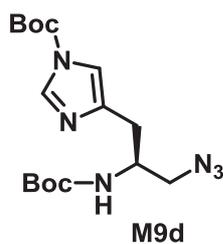


To a stirred suspension of LiAlH_4 (4 eq., 9.39 g, 247.90 mmol) in anhydrous THF (100 mL) at 0°C in Argon, the di-trytil compound (1.0 eq., 40.5 g, 61.97 mmol) dissolved in anhydrous THF (300 mL) was added slowly and the reaction mixture was allowed to stir a room temperature for 2 h. The reaction mixture was carefully quenched with cold aqueous saturated solution of Na_2SO_4 for 4 h, diluted with EtOAc (400 mL) and filtered over celite bed. The filtrate was washed with water (100 mL), brine (100 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. **M9b** was precipitated and washed with cyclohexane, then used as it without further purification (44 g).

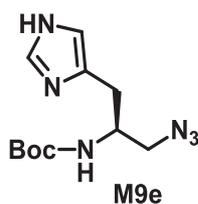
(S)-1-azido-N-trityl-3-(1-trityl-1H-imidazol-4-yl)propan-2-amine M9c



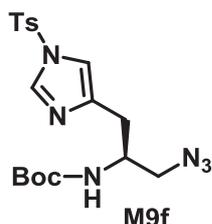
To a stirred solution of alcohol **M9b** (1.0 eq., 25 g, 30.92 mmol) in DMF (125 mL) at 65°C, were successively added DPPA (1.5 eq., 9.7 mL, 46.38 mmol), DBU (1.5 eq., 6.4 mL, 46.38 mmol) and after 6 h, NaN_3 (2 eq., 4 g, 60.92 mmol). The reaction was stirred at 65°C for 12 h. 2 additional eq. of NaN_3 were added. After 5 h, the reaction mixture was stopped and cooled down to room temperature, diluted with EtOAc (150 mL) and washed with saturated solution of NaHCO_3 (3 x 60 mL), water (2 x 60 mL), brine (60 mL), dried over Na_2SO_4 , and concentrated under reduced pressure. After silica gel flash chromatography (6% EtOAc in cyclohexane), **M9c** was obtained as an off white solid, which was dried on high vacuum (13 g, 65%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.52-7.55 (m, 6H, Trityl and Ar), 7.09-7.35 (m, 25H, Trityl and CDCl_3), 6.41 (d, J = 1.2 Hz, 1H, Ar), 3.05 (dd, J = 11.7, 3.3 Hz, 1H, CH_2), 2.94 (m, 1H, CH), 2.73 (dd, J = 11.7, 6.3 Hz, 1H, CH_2), 2.48 (dd, J = 14.5, 4.5 Hz, 1H, CH_2), 2.38 (d, J = 7.6 Hz, 1H, CH_2), 2.20 (dd, J = 14.3, 7.1 Hz, 1H, CH_2).

(S)-tert-Butyl 4-(3-azido-2-(tert-butoxycarbonylamino)-propyl)-1H-imidazole-1-carboxylate M9d

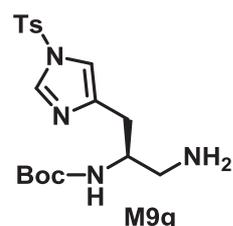
M9c (16.3 g, 25.2 mmol) was transformed according to the procedure published by *Nelli et al.* [13] to furnish the expected product **M9d** after silica gel flash chromatography (6% EtOAc in cyclohexane) (6.64 g, 79%) as a white solid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 8.04 (d, J = 1.2 Hz, 1H, Ar), 7.21 (d, J = 1.0 Hz, 1H, Ar), 5.42 (brs, 1H, NH), 4.05 (m, 1H, CH), 3.40 (ddd, J = 18.4, 12.2, 5.7 Hz, 2H, CH- $\text{CH}_2\text{-N}_3$), 2.83 (d, J = 5.8 Hz, 2H, CH_2), 1.64 (s, 9H, Boc-His), 1.47 (s, 9H, Boc).

(S)-tert-butyl-1-azido-3-(1H-imidazol-4-yl)propan-2-ylcarbamate M9e

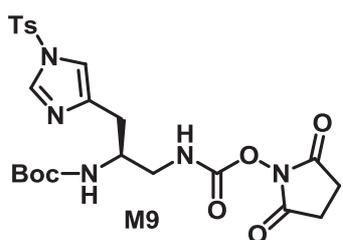
M89d (3.44 g, 10.28 mmol) was transformed according to the procedure published by *Nelli et al.* [13] to furnish the expected product **M9e** (1.61 g, 71%) as a white solid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.63 (d, J = 1.1 Hz, 1H, Ar), 6.90 (s, J = 0.93 Hz, 1H, Ar), 5.48 (brs, 1H, NH), 4.0 (m, 1H, CH), 3.42-3.27 (ddd, J = 18.4, 12.2, 5.6 Hz, 2H, CH- $\text{CH}_2\text{-N}_3$), 2.86 (m, 2H, CH_2), 1.42 (s, 9H, Boc).

(S)-tert-butyl-1-azido-3-(1-tosyl-1H-imidazol-4-yl)propan-2-ylcarbamate M9f

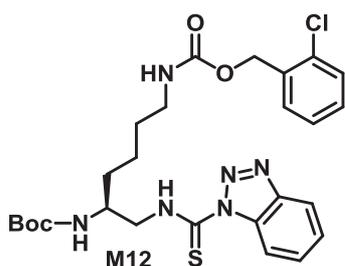
To a stirred solution of **M9e** (1.0 eq., 3.53 g, 14.10 mmol) in DCM (100 mL) at 0 °C, Et_3N (1.4 eq., 2.5 mL, 19.64 mmol), followed by Tosyl chloride (1.2 eq., 3.14 g, 16.47 mmol) and DMAP (1.05 eq., 0.182 g, 14.89 mmol) were added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. The reaction mixture was then diluted with DCM (15 mL), washed with molar aqueous solution of KHSO_4 (50 mL), water (50 mL), brine (50 mL) dried with MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. After silica gel flash chromatography (15% EtOAc in cyclohexane), **M9f** was obtained as white solid (4.88 g, 82%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.97 (d, 1H, J = 1.3 Hz, CH Ar), 7.85 (d, J = 8.4 Hz, 2H, 2 CH Tosyl), 7.39 (d, J = 8.0 Hz, 2H, 2 CH Tosyl), 7.13 (d, J = 1.3 Hz, 1H, CH Ar), 5.27 (brs, 1H, NH), 4.0 (m, 1H, CH), 3.35 (ddd, 1H, J = 18.3, 12.3, 5.4 Hz, 2H, CH- $\text{CH}_2\text{-N}_3$), 2.79 (d, J = 5.7 Hz, 2H, CH_2), 2.48 (s, 3H, CH_3 Tosyl), 1.45 (s, 9H, Boc).

(S)-tert-butyl 1-amino-3-(1-tosyl-1H-imidazol-4-yl)propan-2-ylcarbamate M9g

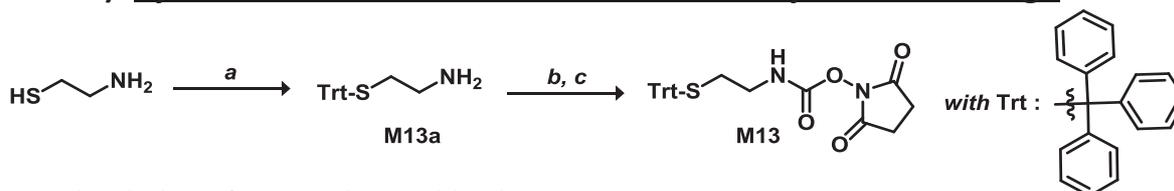
M9f (2.5 g, 5.9 mmol) was transformed according to the procedure published by *Nelli et al.* [13] to furnish the expected product **M9g** as a pale yellow liquid which was directly engaged to the next step without characterization.

(S)-tert-butyl (2,5 dioxopyrrolidin-1-yl) (3-(1-tosyl-1H-imidazol-4-yl)propane-1,2-diyl) carbamate M9

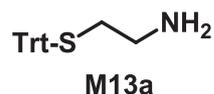
To a stirred suspension of DSC (3.0 eq., 1.8 g, 17.7 mmol) in DCM (20 mL), a solution of amine **M9f** (1.0 eq., 5.9 mmol) in DCM (20 mL) was added dropwise at 0 °C and left to react at room temperature for 3 h. The reaction mixture was filtered off, the filtrate was washed with 1M KHSO₄ (2 × 50 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. Compound **M9** was isolated after recrystallization with a pentane/Et₂O (3:2, v/v) solution as a white solid (2.49 g, 80% over two steps). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.96 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, CH Ar), 7.85 (m, 2H, 2 CH Tosyl), 7.40 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, 2 CH Tosyl), 7.14 (s, 1H, CH Ar), 6.51 (brs, 1H, NH), 5.43 (brs, 1H, NH), 3.98 (m, 1H, CH), 3.39-3.17 (m, 2H, CH-CH₂-NH), 2.84 (s, 4H, 2 CH₂ OSu), 2.80 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, CH₂), 2.47 (s, 3H, CH₃ Tosyl), 1.45 (s, 9H, Boc).

ii) Synthesis of actived monomer M12**(S)-tert-butyl 2-chlorobenzyl (6-(1H-benzo[d][1,2,3]triazole-1-carbothioamido)hexane-1,5-diyl)dicarbamate**

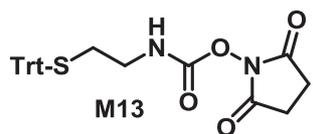
To a stirred solution of SC(Bt)₂ (1.0 eq., 1.02 g, 3.62 mmol) in DCM (20 mL) at 0° C was added the amine corresponding obtained with the general Boc procedure **A** (1.0 eq., 1.45 g, 3.62 mmol) in DCM (20 mL) and the reaction mixture was left under stirring for 24 h. After reaction completion, the solvent was evaporated and the crude was purified by silica gel flash chromatography (20% EtOAc in cyclohexane) followed by a trituration in Et₂O/Pentane (1:1, v/v) to afford **M15** (0.35 g, 17%) as a white solid; mp = 111-112°C; ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 9.88 (s, 1H, NH-C(=S)), 8.93 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar), 8.13 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar), 7.67 (m, *J* = 2.77 Hz, 1H, Ar), 7.47 (m, *J* = 2.69 Hz, 2H, Ar), 7.30 (m, 2H, Ar + CDCl₃), 5.26 (2H, s, CH₂Ar), 4.82-4.89 (1H, m, NH), 4.04-3.97 (m, 2H, CH₂N), 3.79 (m, 1H, CHN), 3.28 (m, 2H, CH₂N), 1.61 (m, 14H, 3 CH₂ and H₂O), 1.45 (s, 9H, Boc); ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 175.07, 156.78, 156.42, 147.08, 134.29, 133.62, 132.46, 130.11, 129.83, 129.54, 129.40, 126.88, 125.58, 120.27, 116.03, 80.43, 64.02, 51.00, 49.83, 40.44, 32.25, 29.73, 28.30, 22.84. HRMS-ESI *m/z*: calcd for C₂₆H₃₄ClN₆O₄S [M+H]⁺: 561,20453; found 561.20529 ; [α]_D²⁵ = +11.96 (c = 1 in MeOH).

ii) Synthesis of M13 linker for dimerisation by disulfure bridge

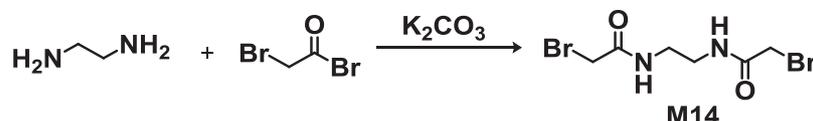
a: Trt-Cl, DCM/DMF; **b:** NMM, DCM; **c:** DSC, DCM

(Trityl)cysteamine hydrochloride M13a

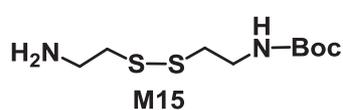
M13a was synthesized following the procedure described by Di Maro *et al.*[14]. The product was precipitated in a mixture MeOH/H₂O. The white solid obtained was washed two times with DCM and the product was directly engaged in the next step without further purification (quantitative yield). ¹H NMR: (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 7.96 (brs, 2H, NH₂), 7.41-7.20 (m, 15H, Trityl), 2.53-2.48 (m, 4H, 2 CH₂).

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl (2-(tritylthio)ethyl)carbamate M13

To a solution of **M13a** in anhydrous DCM (40 mL) was added NMM (2.0 eq., 31.8 mmol). After pH validation (8-9), DSC (1.2 eq., 16.86 mmol) was added and reaction was stirred for 2 h. The solvent was concentrated under reduced pressure and the crude material, dissolved in 100 mL of EtOAc, was washed with 1M KHSO₄ (2 x 50 mL), H₂O (50 mL), dried over NaHCO₃ then concentrated under reduced pressure to give **M13** as white solid in a quantitative yield. ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7.47-7.23 (m, 15H, Trityl), 5.30 (brd, 1H, NH), 3.01 (q, *J* = 6.38 Hz, 2H, CH₂-NH), 2.82 (s, 4H), 2.50 (t, *J* = 6.60 Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 170.39, 151.40, 144.65, 129.63, 128.18, 126.98, 67.00, 40.84, 31.56, 25.50 ppm; HRMS-ESI *m/z*: calcd for C₂₆H₂₄N₂O₄SNa [*M*⁺+Na]: 438.13490; 493.13661 found.

iii) Synthesis of M14 linker for dimerisation by thioether linkage

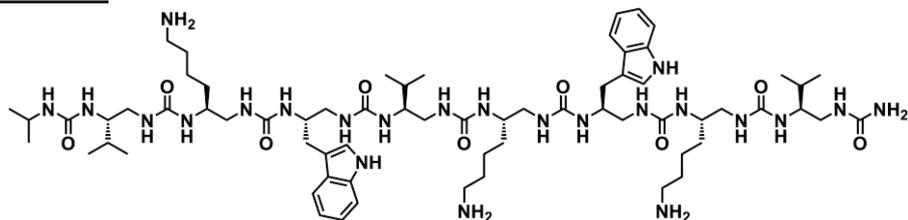
M14 was synthesized as a white powder on a 10 mmol scale, following the procedure described by Kim *et al.* [15], with 36% yield. ¹H NMR: (300 MHz, D₂O) δ (ppm) = 8.34 (brs, 2H, NH), 3.85 (s, 4H, 2 CH₂), 3.35 (s, 4H, 2 CH₂).

iv) Boc-mono protected cystamine M15

M15 was synthesized by adapting a recent procedure described by Q. Sun *et al.* [16] on a 10.3 mmol scale using 2.2 eq. of DIEA and 0.3 eq. Boc₂O, with 58% yield. ¹H NMR: (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 7.97 (1H, t, *J* = 2.70 Hz, NH), 4.34 (2H, s, NH₂), 4.22 (2H, q, *J* = 6.50 Hz, CH₂), 3.77 (2H, t, *J* = 6.90 Hz, CH₂), 3.53 (4H, m, *J* = 1.80 Hz, 2 CH₂), 2.41 (9H, s, Boc).

b) Synthesis of the oligomers on solid phase synthesis

Compound OL21



OL21 was synthesized on 0.1 mmol scale, according to the general procedure **D** on azide strategy. 58 mg were recovered after cleavage with 31% purity; purification gradient: 20-100% of B in 20 min at 20 mL/min on preparative RP-HPLC; isolated mass 7 mg; yield after isolation 12%; RP-HPLC t_R : 6.63 min (gradient 10-100% of B in 10 min); ESI-HRMS (m/z): calcd for $C_{67}H_{118}N_{23}O_9$ $[M+H]^+$: 1388.94774, found 1388.95305, with $[M+2H]^{2+}$ 694.98146, $[M+3H]^{3+}$ 463.65605.

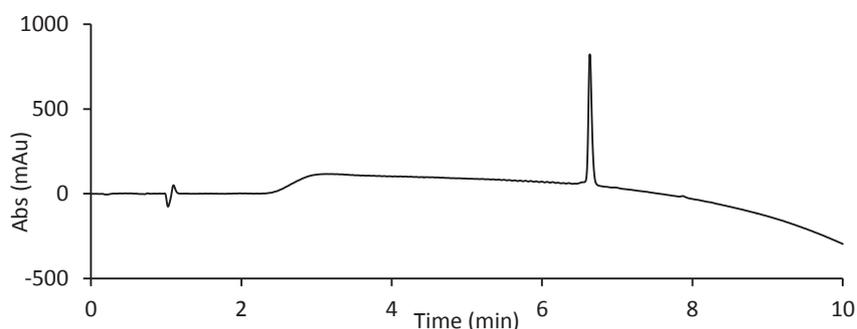
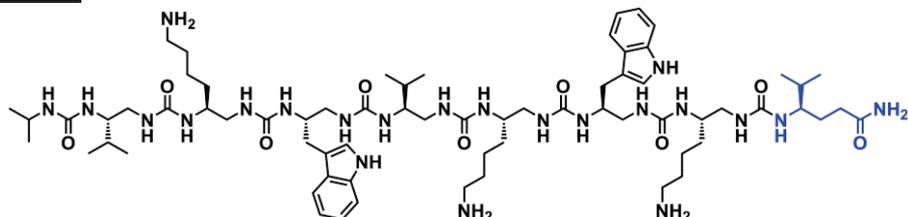


Figure EP.18: RP-HPLC chromatogram of **OL21** after purification (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

Oligomer OL22



OL22 was synthesized on 0.1 mmol scale according to the general procedure **C** on Boc strategy. 88 mg were recovered after HF cleavage with 69% purity; purification gradient: 40-55% of B in 20 min at 20 mL/min on preparative RP-HPLC; isolated mass 43.9 mg; yield after isolation 31%; RP-HPLC t_R : 6.59 min (linear gradient 10- 100% of B in 10 min, UV 200 nm); ESI-HRMS (m/z): calcd for $C_{68}H_{119}N_{22}O_9$ $[M+H]^+$: 1387.95249, found 1387.965563, with $[M+2H]^{2+}$ 694.48731.

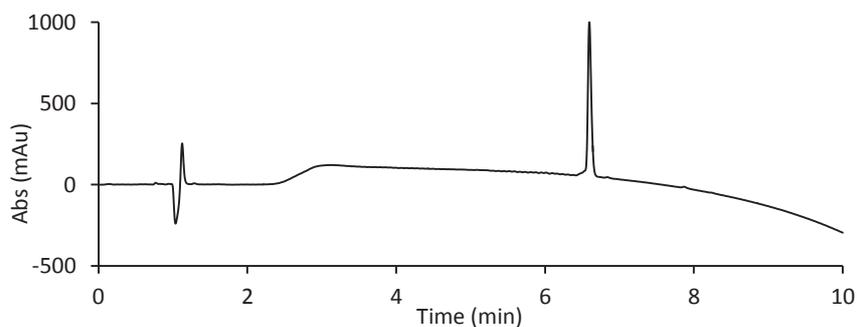
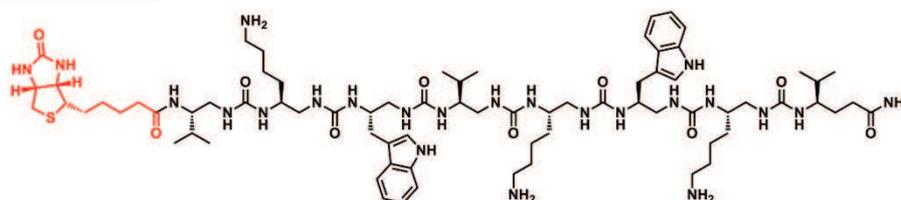


Figure EP.19: RP-HPLC chromatogram of **OL22** after purification (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

Residue	NH	N'H	α CH ¹	α CH ²	β CH	γ CH	δ CH	ϵ CH	NH side chain	Arom	$\Delta\delta(\alpha$ CH)
Val^y 1	6.19	CH ₂ = 2.28 2.2	1.83	1.33	3.46	1.61	0.84				
Lys ^u 2	5.95	6.54	3.61	2.36	3.78	1.61 1.28	1.42	2.87	7.78		1.25
Trp ^u 3	6.20	6.32	3.7	2.47	4.2	2.85 2.79			10.22	7.54/7.05 7.28/6.97	1.23
Lys ^u 4	5.82	6.51	3.28	1.8	3.62	1.25 0.98	1.51	2.78	7.74		1.48
Val ^u 5	6.12	6.47	3.62	2.29	3.44	1.49	0.77				1.33
Trp ^u 6	6.48	6.45	3.77	2.49	3.91	2.67 2.50			10.17	7.04/7.28 6.93/7.51	1.28
Lys ^u 7	5.95	6.33	3.53	2.36	3.7	1.66 1.25	1.41	2.85	7.78		1.17
Val ^u 8	5.61	6.05	3.6	2.53	3.66	1.66	0.92				1.07
NHlpr	5.76				3.8	1.14					

Table EP.11: ¹H NMR Chemical shifts (ppm) of **OL22** in CD₃OH at 293K (10 mM).

Oligomer OL22-Biot



OL22-Biot was synthesized on 0.2 mmol scale according to the general procedure **C** on Boc strategy. The end-capping with biotine (1.5 eq.) was coupled twice at room temperature for 30 min, with 3.0 eq. of DIEA, 3.0 eq. BOP and 3.0 eq. HOBt in DMF (2 mL). 116 mg were recovered after HF cleavage with 72% purity; purification gradient: 35-75% of B in 20 min at 20 mL/min on preparative RP-HPLC; isolated mass 43 mg; yield after isolation 12%; RP-HPLC t_R : 5.26 min (linear gradient 20-100% of B in 10 min, UV 200 nm); ESI-HRMS (m/z): calcd for C₇₄H₁₂₆N₂₃O₁₀S, 1528.98, found 1529.97578, with [M+2H]²⁺ 765.49225, [M+3H]³⁺ 510.66409.

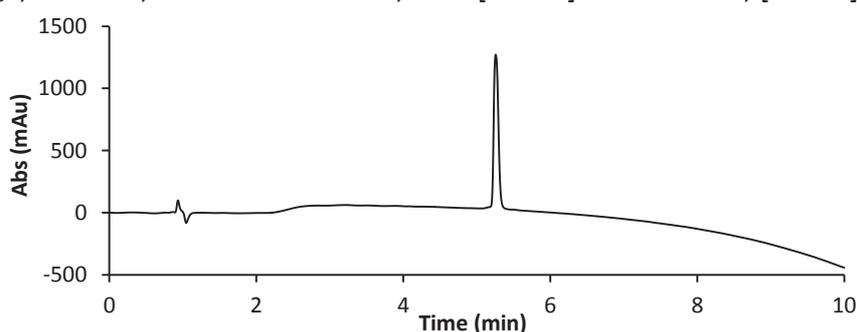
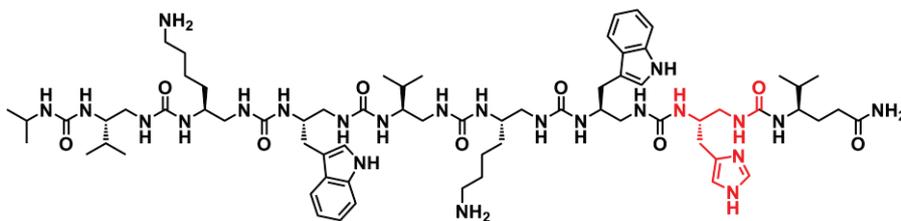


Figure EP.20: RP-HPLC chromatogram of **OL22-Biot** after purification (20-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

Oligomer OL23



OL23 was synthesized on 0.1 mmol scale according to the general procedure **C** on Boc strategy. Removal of the tosyl protection on the imidazole moieties was proceeded twice in presence of 10.0 eq. of HOBt in DMF (2 mL) with shaking at RT for 30 min. 95 mg were recovered after HF cleavage with 39% purity; purification gradient: 40-80% of B in 20 min at 20 mL/min on preparative RP-HPLC; isolated mass 14.1 mg; yield after isolation 10%; RP-HPLC t_R : 5.63 min (gradient 20-100% of B in 10 min); ESI-HRMS (m/z): calcd for $C_{68}H_{114}N_{23}O_9$ $[M+H]^+$, 1396.91644, found 1396.92092, with $[M+2H]^{2+}$ 698.96525, $[M+3H]^{3+}$ 466.31211.

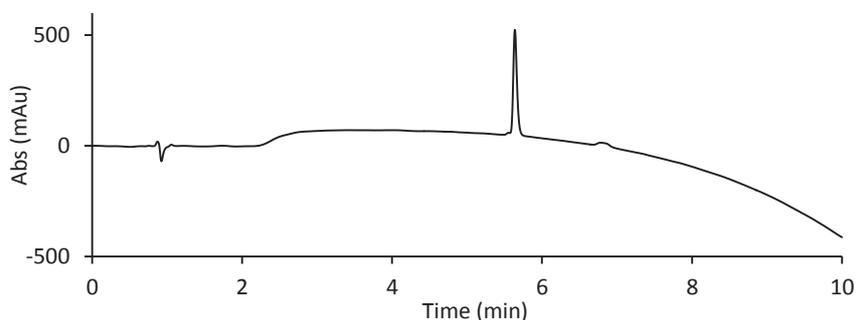
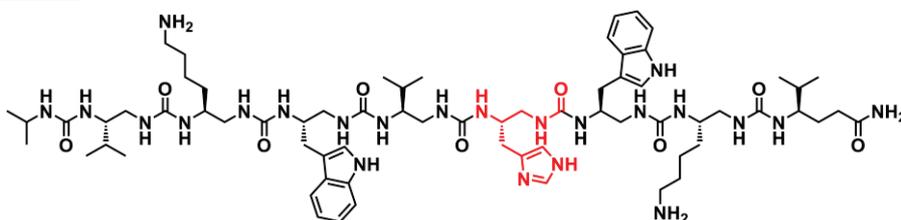


Figure EP.21: RP-HPLC chromatogram of **OL23** after purification (20-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

Oligomer OL24



OL24 was synthesized on 0.1 mmol scale according to the general procedure **C** on Boc strategy. Removal of the tosyl protection on the imidazole moieties was proceeded twice in presence of 10.0 eq. of HOBt in DMF (2 mL) with shaking at RT for 30 min. 97 mg were recovered after HF cleavage with 30% purity; purification gradient: 30-70% of B in 20 min at 20 mL/min on preparative RP-HPLC; isolated mass 19.4 mg; yield after isolation 14%; RP-HPLC t_R : 6.24 min (gradient 20-75% of B in 10 min); ESI-HRMS (m/z): calcd for $C_{68}H_{114}N_{23}O_9$ $[M+H]^+$: 1396.91644, found 1396.91571, with $[M+2H]^{2+}$ 698.96276, $[M+3H]^{3+}$ 466.31038.

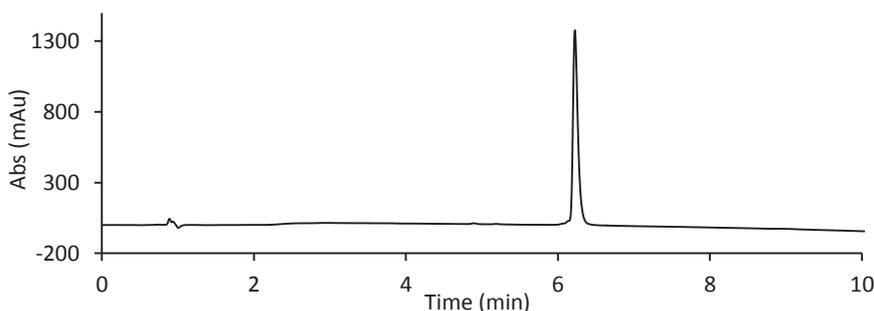
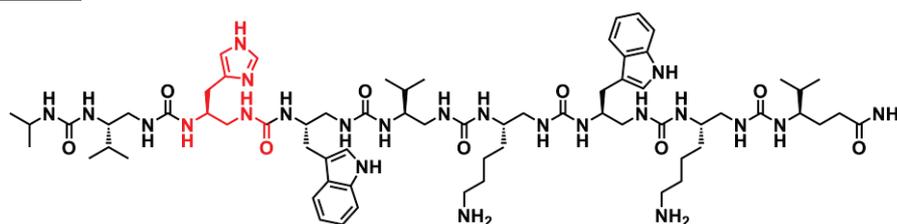


Figure EP.22: RP-HPLC chromatogram of **OL24** after purification (20-75% of B in 10 min, UV 200 nm).

Oligomer OL25



OL25 was synthesized on 0.1 mmol scale according to the general procedure **C** on Boc strategy. Removal of the tosyl protection on the imidazole moieties was proceeded twice in presence of 10.0 eq. of HOBT in DMF (2 mL) with shaking at RT for 30 min. 103 mg were recovered after HF cleavage with 26% purity; purification gradient: 30-70% of B in 20 min at 20 mL/min on preparative RP-HPLC; isolated mass 21.8 mg; yield after purification 15.6%; RP-HPLC t_R : 6.13 min (gradient 20-75% of B in 10 min); ESI-HRMS (m/z): calcd for $C_{68}H_{114}N_{23}O_9$ $[M+H]^+$: 1396.91644, found 1397.91861, with $[M+2H]^{2+}$ 699.46383, $[M+3H]^{3+}$ 466.31253.

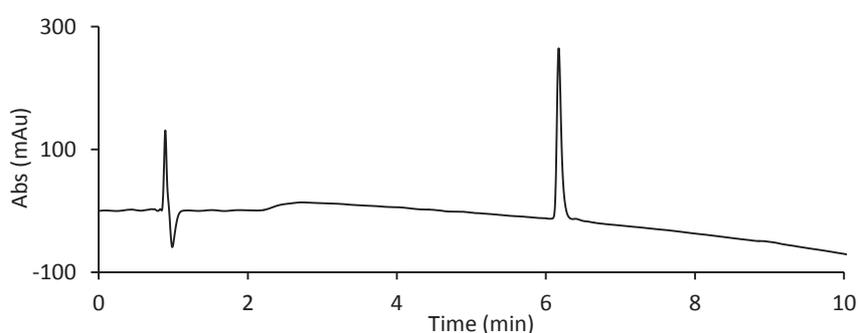
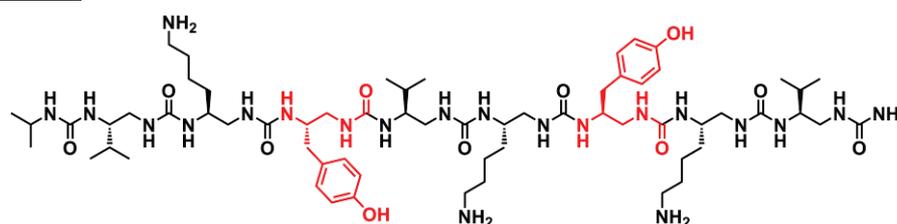


Figure EP.23: RP-HPLC chromatogram of **OL25** after purification (20-75% of B in 10 min, UV 200 nm).

Oligomer OL26



OL26 was synthesized on 0.1 mmol scale, according to the general procedure **D** on azide strategy. 83.9 mg were recovered after cleavage with 21% purity; purification gradient: 20-70% of B in 20 min at 20 mL/min on preparative RP-HPLC; isolated mass 18.9 mg; 14% yield; RP-HPLC t_R : 5.69 min (gradient 20-100% of B in 10 min); ESI-HRMS (m/z): calcd for $C_{63}H_{116}N_{21}O_{11}$ $[M+H]^+$: 1342.91577, found 1342.92059, with $[M+2H]^{2+}$ 671.96508, $[M+3H]^{3+}$ 448.31190.

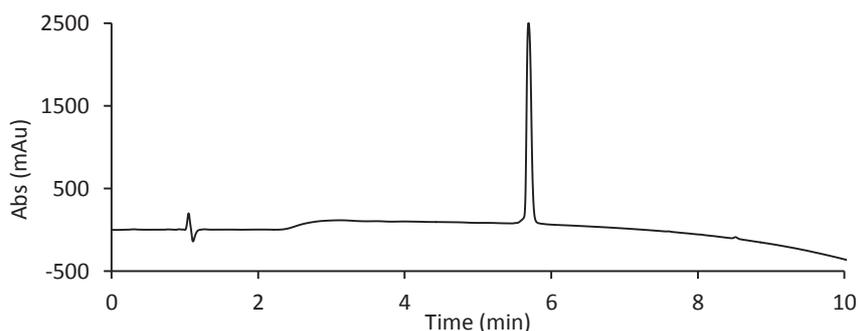
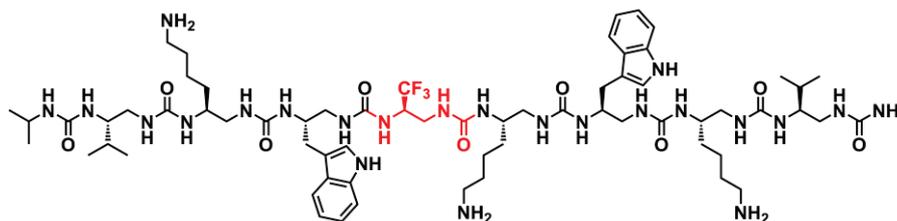


Figure EP.24: RP-HPLC chromatogram of **OL26** after purification (20-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

Oligomer OL27

OL27 was synthesized on 0.05 mmol according to the general procedure **D** (carried out on the DiscoverBio system) on azide strategy. Coupling of **M11** was performed twice under microwave assistance by swelling the resin in 1 mL of DMF and adding 1.5 eq. of **M11**, 3.0 eq. DIEA, irradiating with 25 W power, heating at 70 °C for 30 min. The resin was then filtered off, washed with DCM (2 × 2 mL) and DMF (2 × 2 mL). Reduction of the azide group was next done under microwave assistance by swelling the resin in a mixture of dioxane/water (7:3, v/v, 2 mL) and adding 1M PMe₃ solution in THF (10.0 eq. relative to the resin loading), irradiating with 25 W power, heating at 70 °C for 30 min. The reaction was repeated three times. The resin was then filtered off, washed with the dioxane/water mixture (2 × 2 mL) and DMF (2 × 2 mL). The coupling of the following monomer tryptophan-like side chain was performed at 50°C overnight by swelling the resin in 1 mL of DMF and adding 5.0 eq. of activated monomer and 10.0 eq. in DIEA. The rest of the synthesis was proceeding as the general procedure. 61 mg were recovered after cleavage with 10% purity; purification gradient: 20 to 55% of B in 20 min at 4 mL/min at 50°C on semi-preparative RP-HPLC; isolated mass 5.4 mg; yield after isolation 7%; RP-HPLC *t_R*: 6.17 min (linear gradient 10-100% of B in 10 min); ESI-HRMS (*m/z*): calcd for C₆₅H₁₁₁F₃N₂₃O₉ [M+H]⁺: 1414.88817, found 1414.89389, with [M+2H]²⁺ 707.95159, [M+3H]³⁺ 472.30311.

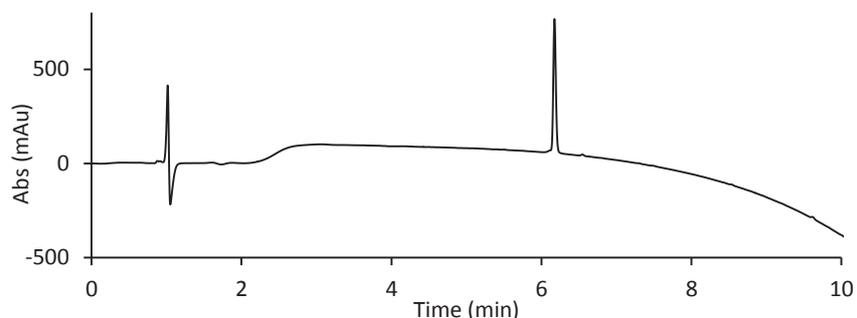
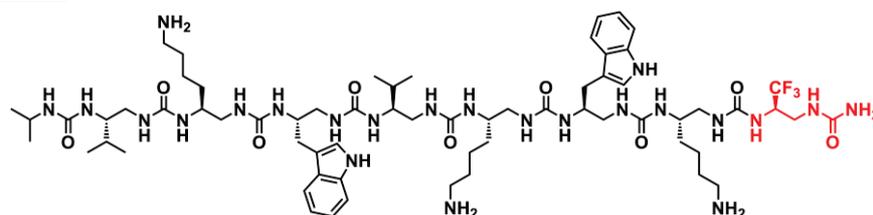


Figure EP.25: RP-HPLC chromatogram of **OL30** after purification (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

Residue		NH	N'H	α CH ¹	α CH ²	β CH	γ CH	δ CH	ϵ CH	NH side chain	Arom	$\Delta\delta(\alpha$ CH)
Val ^u	1	6.20	6.47	3.56	2.57	3.6	1.58	0.88				0.99
Lys ^u	2	5.81	6.53	3.60	2.30	3.91	1.67 1.24	1.46	2.92	7.8		1.3
Trp ^u	3	6.09	6.35	3.76	2.47	4.16	2.74 2.90			10.27	7.57/7.32 7.00/7.08	1.29
Lys ^u	4	5.97	6.21	3.32	1.82	3.62	1.25 1.10	1.64	2.84	7.75		1.50
CF ₃ ^u	5	6.81	6.63	3.88	2.62	4.41						1.26
Trp ^u	6	6.53	6.77	3.7	2.54	3.90	2.66 2.80			10.21	6.93/6.95 7.03/7.30 7.50	1.16
Lys ^u	7	6.01	6.41	3.54	2.41	3.75	1.64 1.31	1.51	2.90	7.8		1.13
Val ^u	8	5.63	6.11	3.64	2.55	3.64	1.68	0.94				1.09
IPrNH		5.8				3.80	1.14					

Table EP.12: ¹H NMR Chemical shifts (ppm) of **OL22** in CD₃OH at 293K (10 mM).

Oligomer OL28



OL28 was synthesized on 0.05 mmol according to the general procedure **D** (carried out on the DiscoverBio system) on azide strategy. Coupling of **M10** was performed twice under microwave assistance by swelling the resin in 1 mL of DMF and adding 1.5 eq. of **M10**, 3.0 eq. DIEA, irradiating with 25 W power, heating at 70 °C for 30 min. The resin was then filtered off, washed with DCM (2 × 2 mL) and DMF (2 × 2 mL). Reduction of the azide group was next done under microwave assistance by swelling the resin in a mixture of dioxane/water (7:3, v/v, 2 mL) and adding 1M PMe₃ solution in THF (10 eq. relative to the resin loading), irradiating with 25 W power, heating at 70 °C for 30 min. The reaction was repeated three times. The resin was then filtered off, washed with the dioxane/water mixture (2 × 2 mL) and DMF (2 × 2 mL). The coupling of the following monomer lysine-like side chain was performed at 50°C overnight by swelling the resin in DMF (1 mL) and adding 5.0 eq. of the activated monomer, 10.0 eq. in DIEA. The resin was then filtered off, washed with DCM (2 × 2 mL) and DMF (2 × 2 mL). The rest of the synthesis proceeded following general procedure **D**. 67 mg were recovered after cleavage; purification gradient: 20-53% of B in 20 min at 4 mL/min at 50 °C on semi-preparative RP-HPLC; isolated mass 0.3 mg; yield after isolation 1%; RP-HPLC *t*_R: 6.76 min (linear gradient 10-100 % of B in 10 min); ESI-HRMS (*m/z*): calcd for C₆₅H₁₁₁F₃N₂₃O₉ [M+H]⁺: 1414.88817, found 1414.88796, with [M+2H]²⁺+707.97884, [M+3H]³⁺+472.30138.

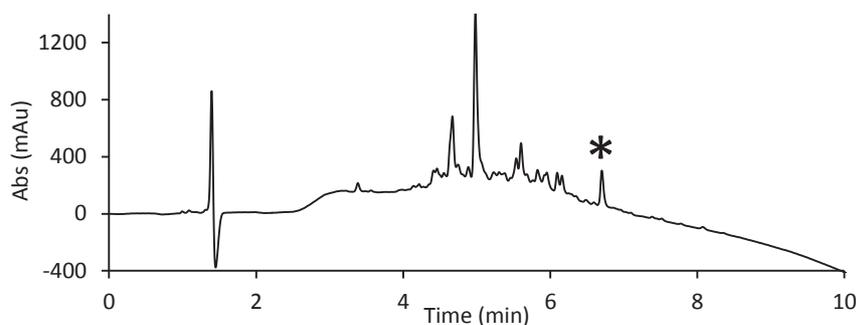


Figure EP.26: RP-HPLC chromatogram of the crude precipitate of **OL28** (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm). Expected compound designed by an asterisk.

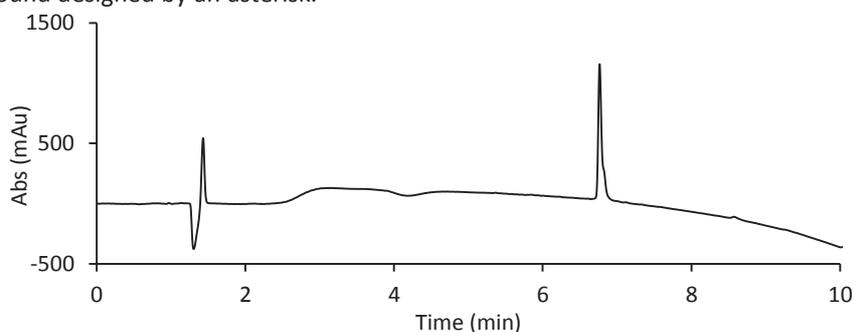
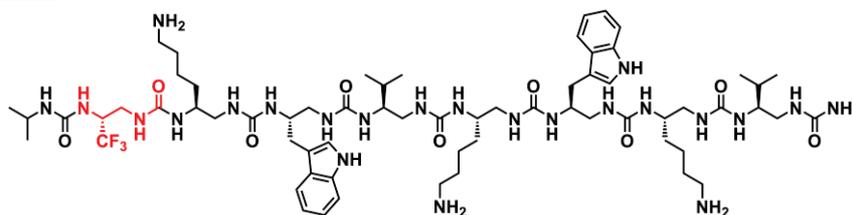


Figure EP.27: RP-HPLC chromatogram of **OL28** after purification (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

Oligomer OL29



OL29 was synthesized on 0.05 mmol according to the general procedure **D** (carried out on the DiscoverBio system) on azide strategy. Coupling of **M10** was performed twice under microwave assistance by swelling the resin in DMF (1 mL) and adding 1.5 eq. of **M10**, 3.0 eq. DIEA, irradiating with 25 W power, heating at 70 °C for 30 min. The resin was then filtered off, washed with DCM (2 × 2 mL) and DMF (2 × 2 mL). Reduction of the azide group was next done under microwave assistance by swelling the resin in a mixture of dioxane/water (7:3, v/v, 2 mL) and adding 1M PMe_3 solution in THF (10.0 eq. relative to the resin loading), irradiating with 25 W power, heating at 70 °C for 30 min. The reaction was repeated three times. The resin was then filtered off, washed with the dioxane/water mixture (2 × 2 mL) and DMF (2 × 2 mL). The coupling of the isopropylisocyanate was at RT for 15 min twice by swelling the resin in DMF (1 mL) and adding 3.0 eq. of the isopropylisocyanate, 6.0 eq. in DIEA. As the chloranil test was inconclusive, the coupling was performed two more times under microwave assistance irradiating with 25 W power, heating at 70 °C for 7 min. 25 mg were recovered after cleavage; purification gradient: 20-53% of B in 20 min at 4 mL/min at 50 °C on semi-preparative RP-HPLC; isolated mass 0.26 mg; yield after isolation <1%; RP-HPLC t_R : 6.70 min (linear gradient 10-100% of B in 10 min); ESI-HRMS (m/z): calcd for $\text{C}_{65}\text{H}_{111}\text{F}_3\text{N}_{23}\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1414.88817, found 472.30217, with $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 707.95004, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1414.88898.

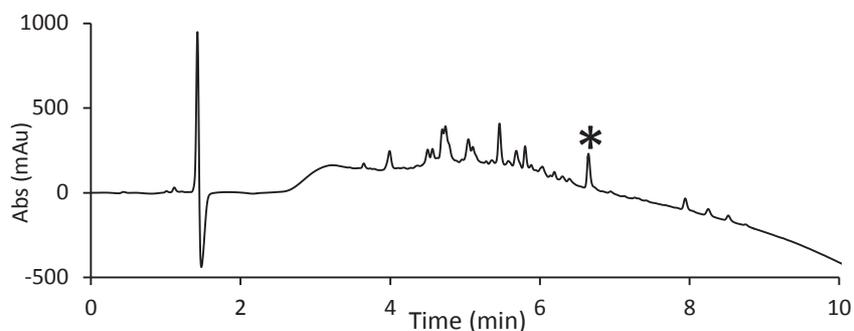


Figure EP.28: RP-HPLC chromatogram of the crude precipitate of **OL29** (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm). Expected compound designed by an asterisk.

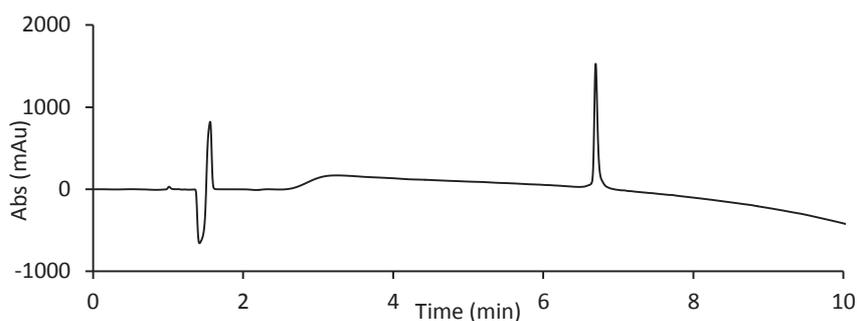
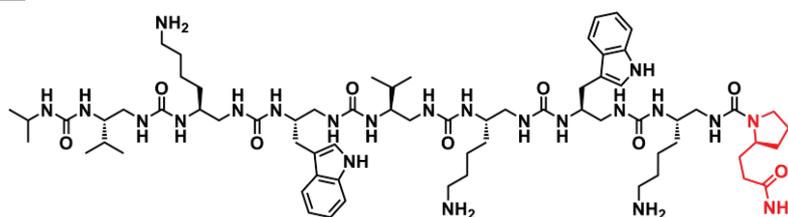


Figure EP.29: RP-HPLC chromatogram of **OL29** after purification (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

Oligomer OL30



OL30 was synthesized on 0.075 mmol scale according to the general procedure **C** on Boc strategy. 68 mg were recovered after HF cleavage with 50% purity; purification gradient: 30-55% of B in 20 min at 4 mL/min on semi-preparative RP-HPLC; isolated mass 20.5 mg; yield after purification 20% yield; RP-HPLC t_R : 5.69 min (gradient 10-100% of B in 10 min); ESI-HRMS (m/z): calcd for $C_{68}H_{117}N_{22}O_9$ $[M+H]^+$: 1385.93684, found 1385.94024, with $[M+2H]^{2+}$ 693.47477, $[M+3H]^{3+}$ 462.651195.

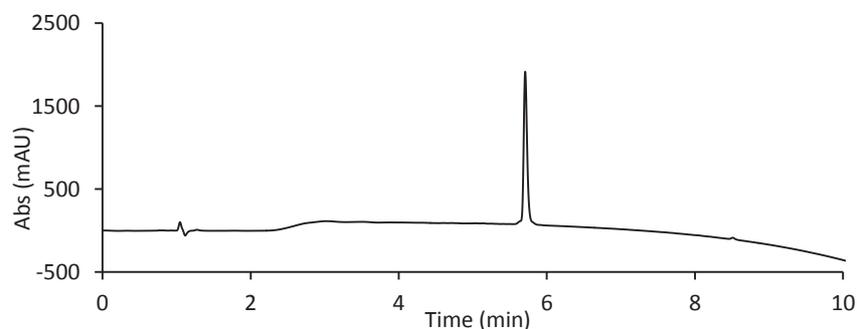
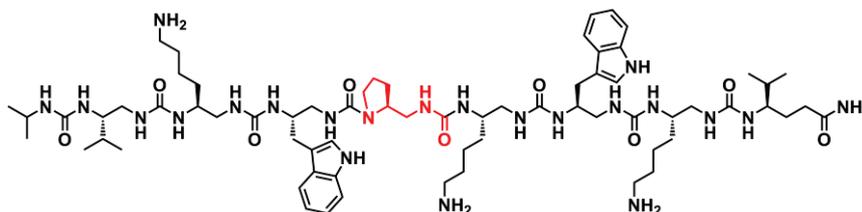


Figure EP.30: RP-HPLC chromatogram of **OL30** after purification (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

Oligomer OL31

OL31 was synthesized on 0.075 mmol scale according to the general procedure **C** on Boc strategy. 41 mg were recovered after HF cleavage with 37 % purity; purification gradient: 35-75% of B in 20 min at 20 mL/min on preparative RP-HPLC; isolated mass 10.5 mg; yield after purification 10%; RP-HPLC t_R : 5.98 min (gradient 10-100 % of B in 10 min); ESI-HRMS (m/z): calcd for $C_{68}H_{117}N_{22}O_9$ $[M+H]^+$: 1385.9384, found 1395.94188, with $[M+2H]^{2+}$ 693.47518, $[M+3H]^{3+}$ 462.65248.

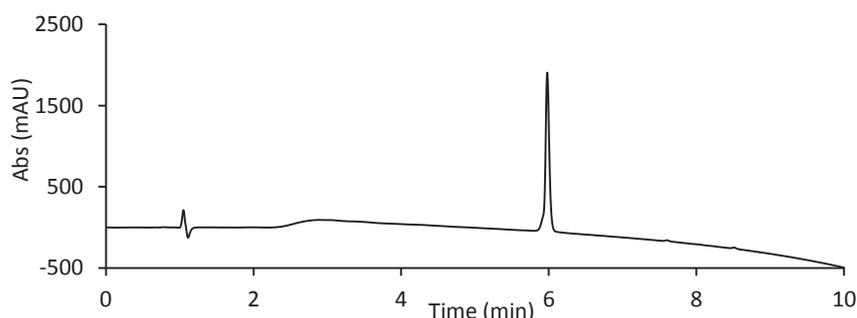
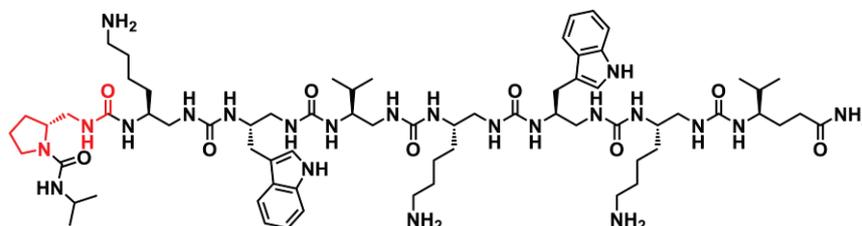


Figure EP.31: RP-HPLC chromatogram of **OL31** after purification (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

Oligomer 32

OL32 was synthesized on 0.075 mmol scale according to the general procedure **C** on Boc strategy. 101 mg were recovered after HF cleavage with 41% purity; purification gradient: 30-70% of B in 20 min at 20 mL/min on semi-preparative RP-HPLC; isolated mass 12 mg; yield after purification 11.5 %; RP-HPLC t_R : 5.07 min (gradient 30-70 % of B in 10 min); ESI-HRMS (m/z): calcd for $C_{68}H_{117}N_{22}O_9$ $[M+H]^+$: 1385.9384, found 1385.94203, with $[M+2H]^{2+}$ 693.47552, $[M+3H]^{3+}$ 462.65252.

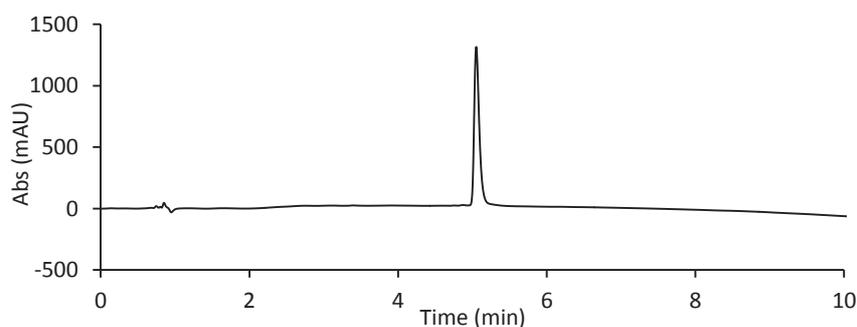
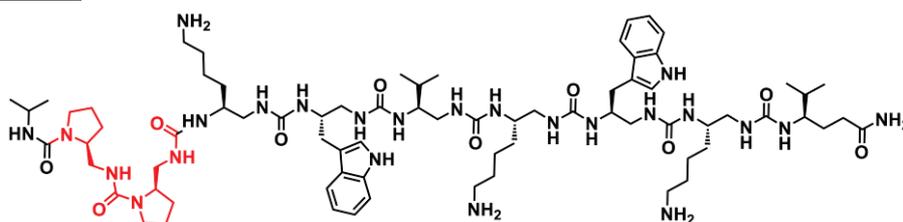


Figure EP.32: RP-HPLC chromatogram of **OL32** after purification (30-70% of B in 10 min, UV 200 nm).

Oligomer OL33

OL33 was synthesized on 0.1 mmol scale according to the general procedure **C** on Boc strategy. 141 mg were recovered after HF cleavage with 61% purity; purification gradient: 30-50% of B in 20 min at 20 mL/min on preparative RP-HPLC; isolated mass 46.5 mg; yield after purification 31%; RP-HPLC t_R : min (gradient 10-100% of B in 10 min); ESI-HRMS (m/z): calcd for $C_{74}H_{127}N_{24}O_{10}$ $[M+H]^+$: 1512.01615, found 1512.02133, with $[M+2H]^{2+}$ 756.51467, $[M+3H]^{3+}$ 504.67916.

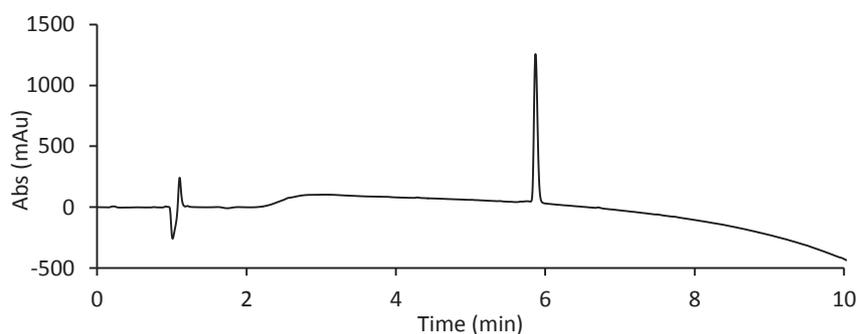


Figure EP.33: RP-HPLC chromatogram of **OL33** after purification (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

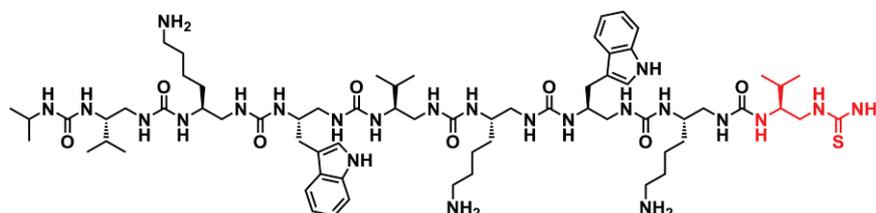
Residue	NH	N'H	α CH ¹	α CH ²	β CH	γ CH	δ CH	ϵ CH	NH side chain	Arom	$\Delta\delta(\alpha$ CH)
Val^y 1	6.23	CH ₂ = 2.30 2.25	1.86	1.37	3.50	1.64	0.87		6.77 7.90		
Lys^u 2	5.98	6.60	3.65	2.41	3.82	1.67 1.31	1.46	2.915	7.79		1.24
Trp^u 3	6.30	6.36	3.75	2.50	4.24	2.84 2.88			10.28	7.05/7.09 7.32/7.58	1.25
Lys^u 4	5.91	6.60	3.37	1.93	3.68	1.58 1.24	1.35	2.85	7.81		1.44
Val^u 5	6.07	6.54	3.68	2.34	3.48	1.51	0.80				1.34
Trp^u 6	6.22	6.44	3.78	2.51	4.01	2.87 2.76			10.22	6.95/7.06 7.31/7.53	1.27
Lys^u 7	5.95	6.71	3.56	2.45	3.76	1.65 1.50	1.33	2.90			1.06
IPrNH	5.91				3.91	1.19					
Pro^u ND		6.32 (br)	3.32	ND	3.99	1.63	ND	ND			ND
Pro^u ND		6.5 (br)	3.18	3.01	4.17	1.88	1.76 1.98	3.42			0.17

Table EP.13: ¹H NMR Chemical Shifts (ppm) of **OL33** in CD₃OH at 293K (5 mM).

Residue	NH	N'H	α CH ¹	α CH ²	β CH	γ CH	δ CH	ϵ CH	NH side chain	Arom	$\Delta\delta(\alpha$ CH)
Val^r 1	6.59	CH ₂ = 2.94 2.87	2.31	1.79	4.12	1.69	0.92				0.52
Lys^u 2	6.44	7.07	4.18	2.69	4.39	1.52/1.46 1.27/1.18	1.77/1.71	3.09			1.49
Trp^u 3	6.86	7.00	4.41	2.87	5.00	3.16			11.87	7.65/7.88 7.46/7.25	1.53
Lys^u 4	6.64	7.28	3.86	2.46	4.23	1.65/1.50 1.32/1.19	1.86/1.83	3.16			1.40
Val^u 5	6.76	7.18	4.08	2.70	3.97	1.56	0.86				1.38
Trp^u 6	6.90	7.19	4.29	2.86	4.64	3.13/3.01			11.82	7.80/7.55 7.23	1.43
Lys^u 7	6.88/6.85(br)		3.85	2.60	4.13	1.76(br) 1.57(br) 1.39/1.38	1.90/1.83	3.19			1.25
Pro^u 8	x	7.36 (br)	3.68	2.80	4.17		1.43/1.50	3.44/3.31			0.90
Pro^u 9	x	7.45	3.50	3.11	4.54		1.69/1.56	3.32/3.26			0.39
IPrNH	6.33				4.16	1.19					

Table EP.14: ¹H NMR Chemical Shifts (ppm) of **OL33** in Pyridine-d₅ at 293K (5 mM).

Oligomer OL35



OL35 was synthesized on 0.075 mmol according to the general procedure **D** on azide strategy. Insertion of the thiourea moiety was realized thank to the use of azide monomer **M5**. Coupling and reduction of **M5** were performed following the general procedure **D**. 53 mg were recovered after cleavage with 31% purity; purification gradient: 30-60% of B in 20 min at 20 mL/min on semi-preparative RP-HPLC; isolated mass 7 mg; yield after isolation 6%; RP-HPLC t_R : 6.73 min (linear gradient 10 to 100% of B in 10 min); ESI-HRMS (m/z): calcd for C₆₇H₁₁₈N₂₃O₈S [M+H]⁺: 1403.91707, found 1404.93226, with [M+2H]²⁺702.97020, [M+3H]³⁺462.99692.

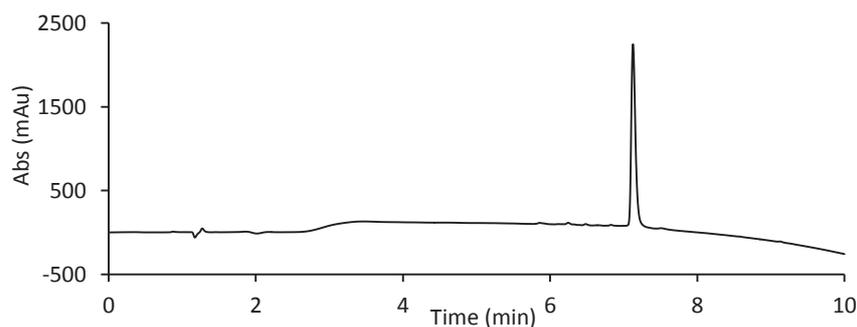


Figure EP.34: RP-HPLC chromatogram of **OL35** after purification (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

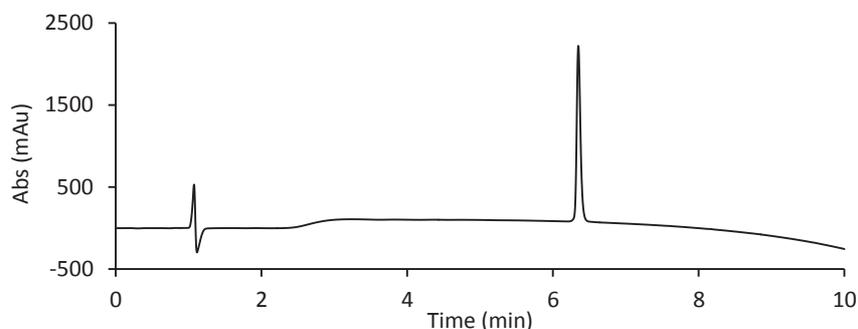
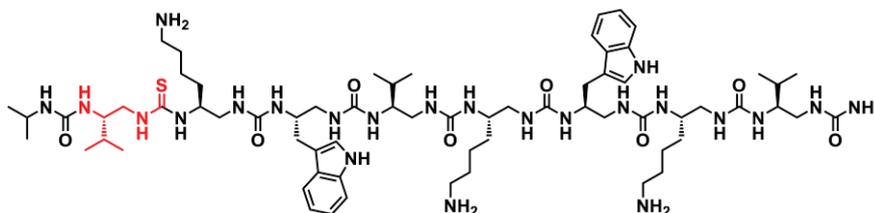


Figure EP.36: RP-HPLC chromatogram of **OL37** after purification (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

Oligomer OL38



OL38 was synthesized on 0.05 mmol according to the general procedure **D** on azide strategy. Coupling and reduction of **M5** were performed following the general procedure **D**. 27 mg were recovered after cleavage; purification gradient: 20-50% of B in 20 min at 4 mL/min on semi-preparative RP-HPLC; isolated mass 2 mg; yield after isolation 3%; RP-HPLC t_R : 6.73 min (linear gradient 10 to 100% of B in 10 min); ESI-HRMS (m/z): calcd for $C_{67}H_{118}N_{23}O_8S$ $[M+H]^+$: 1404.92489, found 1404.93404, with $[M+2H]^{2+}$ 702.97079, $[M+3H]^{3+}$ 448.31277.

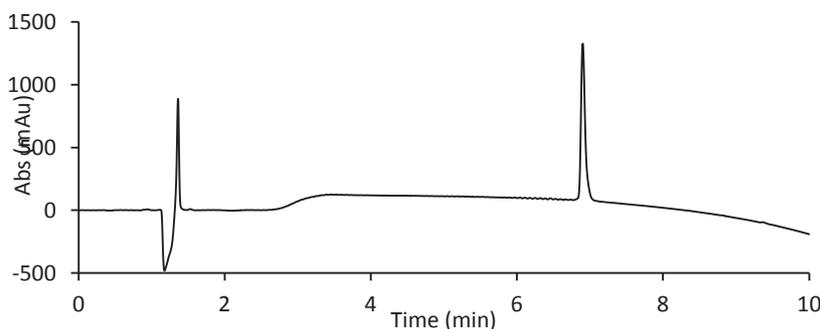
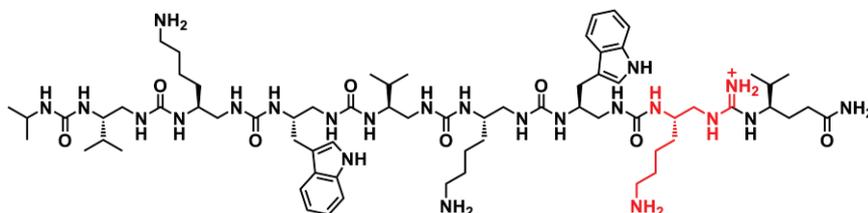


Figure EP.37: RP-HPLC chromatogram of **OL38** after purification (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

Oligomer OL39



OL39 was synthesized on 0.075 mmol scale with the use of **M12** following the procedure described for **OL9**. After completion of the synthesis, the beads were treated with Boc_2O (2.0 eq., 40 μ L), DMAP (0.5 eq., 5 mg) in 5 mL of DCM under N_2 at room temperature for 3 h, then washed with DCM (3 x 3 mL) and DMF (3 x 3 mL). The S-methylation was performed with CH_3I (10.0 eq.) in DMF (1 mL) under microwave assistance for 30 min at 40°C, 20 W and the beads were washed DCM (3 x 3 mL) and DMF (3 x 3 mL). The beads were then transferred in a flask under N_2 , with 37.0 eq. of NH_3 in dioxane (0.5 M, 5.5 mL) and 2 mL of DMF, stirred at 45°C for 30 h. The resin was filtered off, washed with DMF (5 x 2 mL) and DCM (5 x 2 mL),

Et₂O and dried under high vacuum. 45 mg (including 31 mg from ether phase) were recovered after HF cleavage with 13% purity (19% of the thio-methylated thiourea intermediate); purification gradient: 30-45% of B in 20 min at 20 mL/min on preparative RP-HPLC; isolated mass < 11,5 mg (hydrophilic), < 11% yield; RP-HPLC t_R : 7.07 min (gradient 30 to 60% of B in 10 min); ESI-HRMS (m/z): calcd for C₆₈H₁₂₀N₂₃O₈ [M+H]⁺: 1386.96847, found 1386.97555, with [M+2H]²⁺ 693.99191, [M+3H]³⁺ 462.99662.

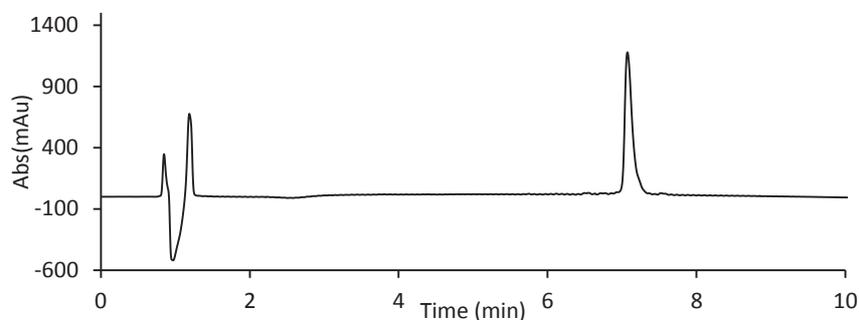
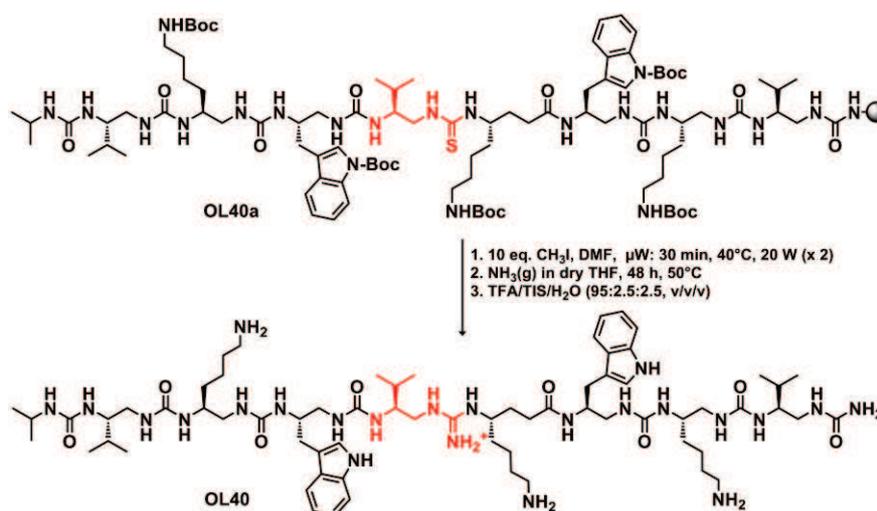


Figure EP.38: RP-HPLC chromatogram of **OL39** after purification (30-60% of B in 10 min, UV 200 nm)

Oligomer OL40



OL40a was synthesized using azide strategy (carried out on the DiscoverBio system), on a 50 μ mol scale starting from NovaPeg Rink Amine resin (111 mg, 0.45 mmol/g) following the procedure described for **OL8** with the use of *N*-Fmoc Valine isothiocyanate monomer **M7**. The coupling the amino acid Fmoc γ -(Boc)-Lysine was performed with 1.5 eq. of monomer (0.025 mmol, 1.5 equiv relative to resin loading) in DMF (0.5 mL), DIEA (3.0 eq.) and BOP (3.0 eq) and irradiated (50 W, maximum power, 50 °C, ramp 5 min, hold 15 min). The *N*-Fmoc protecting group was removed with a DMF/piperidine (8:2, v/v) successively three times 20 min. **OL40a** was transformed in guanylated oligomer **OL40** following the procedure described for **OL19**. 10 mg of resin at each stage of the synthesis were taken and cleaved with TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5, v/v/v) to check the purity of the synthesis.

After completion of the guanidylation reaction and cleavage, the crude product was precipitated with cold Et₂O (32.4 mg) and purified by semi-preparative HPLC (25-38% of B in 20 min at 4 mL/min) to furnish 5 mg of pure **OL40**. Yield after isolation 8.5%; RP-HPLC t_R 5.35

min (gradient 10-100% of B in 10 min); ESI-HRMS (m/z): calcd for $C_{68}H_{120}N_{23}O_8$ $[M+H]^+$: 1386.96847, found 1386.96959, with $[M+2H]^{2+}$ 693.98921, $[M+3H]^{3+}$ 462.99502.

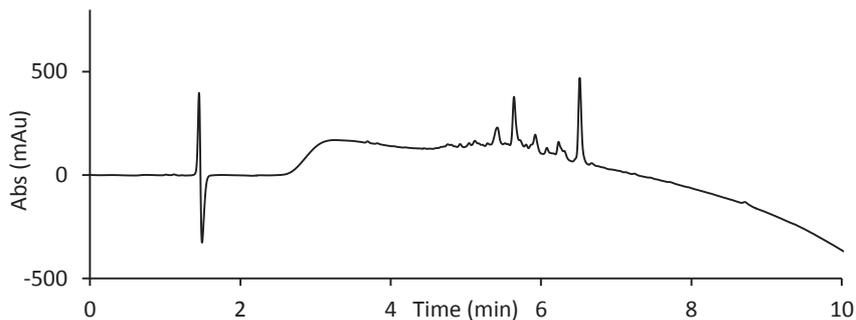


Figure EP.39: RP-HPLC chromatogram of the **crude precipitate of OL40a** (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

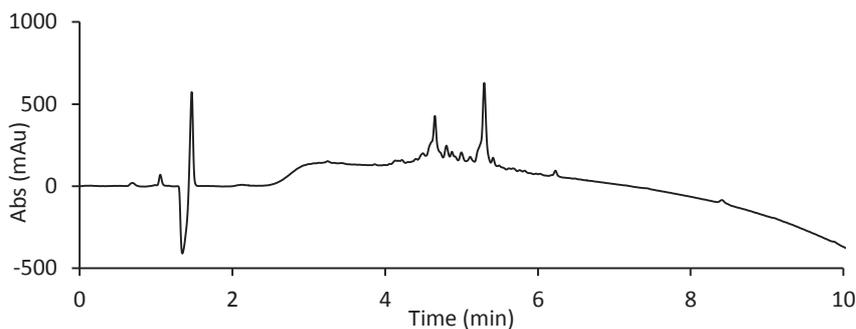


Figure EP.40: RP-HPLC chromatogram of the **crude precipitate on the thiourea alkylated stage** (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

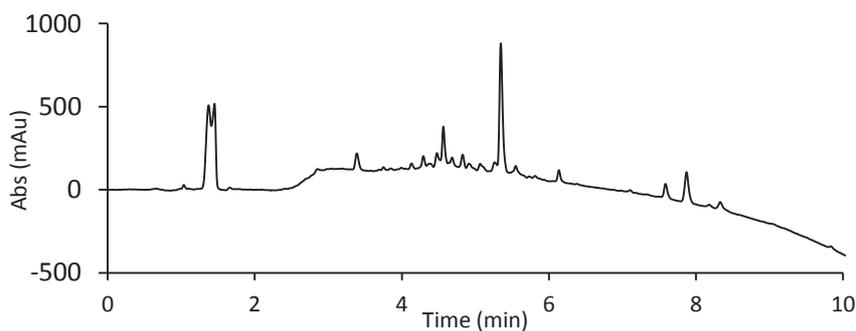


Figure EP.41: RP-HPLC chromatogram of the **crude precipitate of OL40** (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

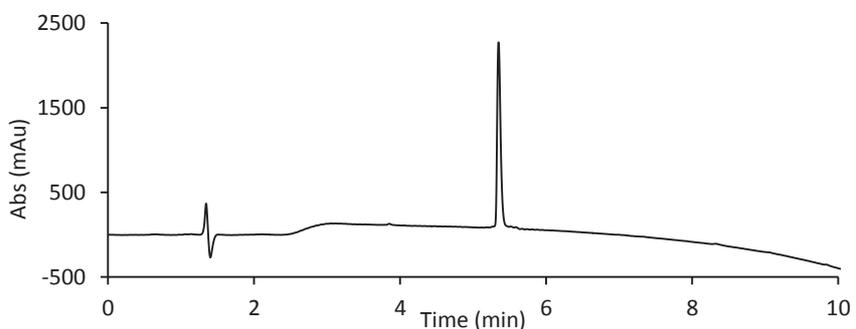
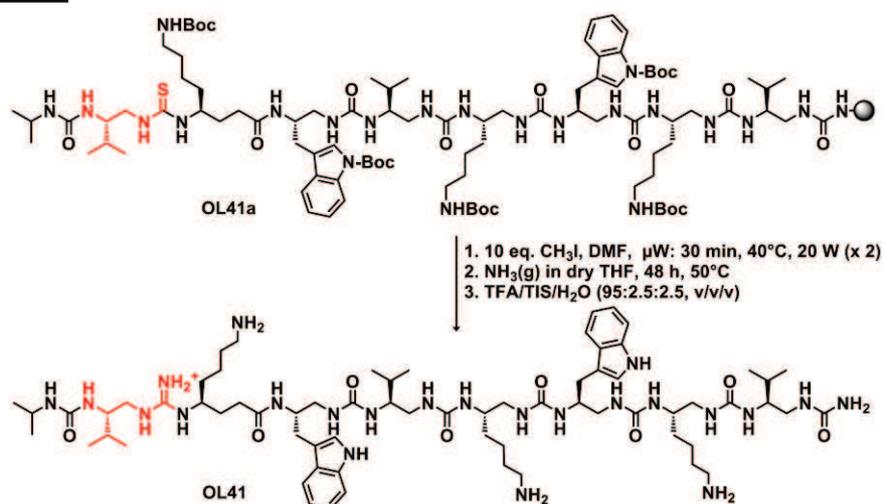


Figure EP.42: RP-HPLC chromatogram of **OL40** after purification (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

Oligomer OL41

OL41a was synthesized using azide strategy (carried out on the DiscoverBio system), on a 50 μmol scale starting from NovaPeg Rink Amine resin (111 mg, 0.45 mmol/g) following the procedure describe for **OL8** with the use of *N*-Fmoc Valine isothiocyanate monomer **M7**. The coupling of *N*-Fmoc γ-(Boc)-Lysine was performed with 1.5 eq. of monomer (0.025 mmol, 1.5 equiv relative to resin loading) in DMF (0.5 mL), DIEA (3.0 eq.) and BOP (3.0 eq) and irradiated (50 W, maximum power, 50 °C, ramp 5 min, hold 15 min). The *N*-Fmoc protecting group was removed with a solution of DMF/piperidine (8:2, v/v) successively three times 20 min. **OL41a** was transformed in guanylated oligomer **OL41** following the procedure described for **OL19**. 10 mg of resin at each stage of the synthesis were taken and cleaved with TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5, v/v/v) to check the purity of the synthesis. After completion of the guanidylation reaction and cleavage, the crude product was precipitated with cold Et₂O (32.4 mg) and purified using the appropriate gradient (25-38% of B in 20 min at 4 mL/min) by semi-preparative RP-HPLC to furnish 4.3 mg of pure **OL41**; yield after isolation 8%; RP-HPLC *t_R* 5.32 min (linear gradient 10-100% of B in 10 min); ESI-HRMS (*m/z*): calcd for C₆₈H₁₂₀N₂₃O₈ [M+H]⁺: 1386.96847, found 1386.96996, with [M+2H]²⁺ 693.98940, [M+3H]³⁺ 462.99517.

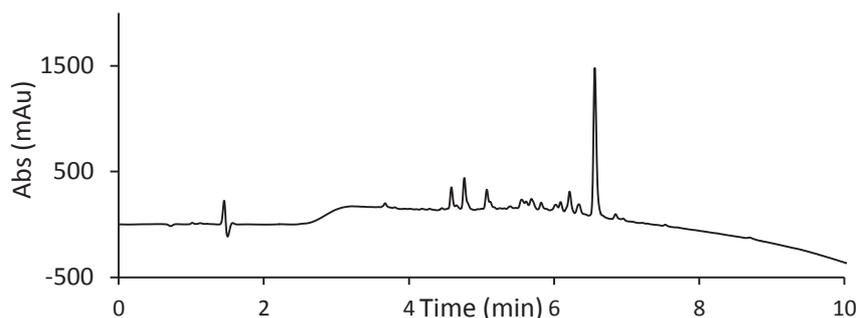


Figure EP.43: RP-HPLC chromatogram of the crude precipitate of **OL41a** (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

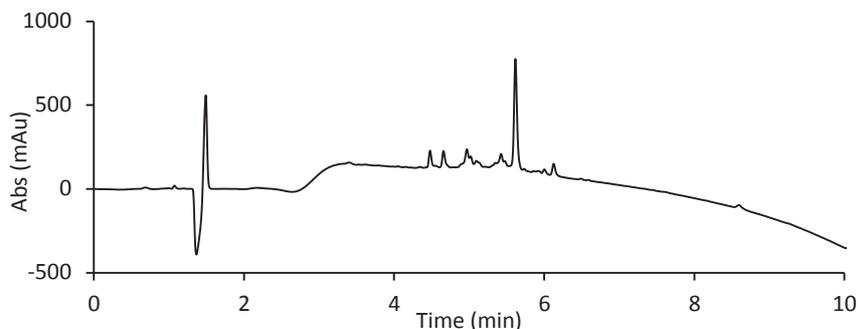


Figure EP.44: RP-HPLC chromatogram of **crude precipitate on the thiourea alkylated stage** (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

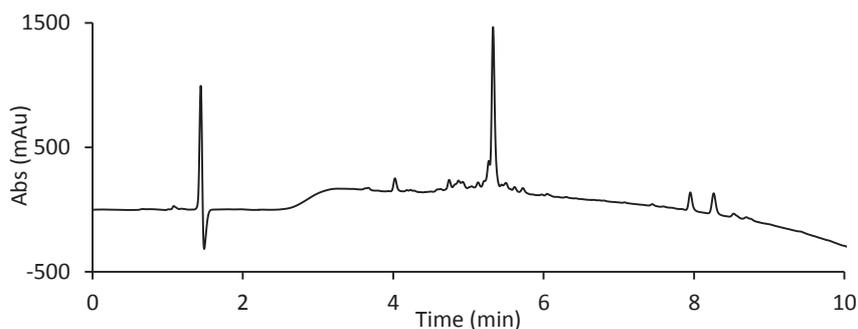


Figure EP.45: RP-HPLC chromatogram of **crude precipitate of OL41** (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

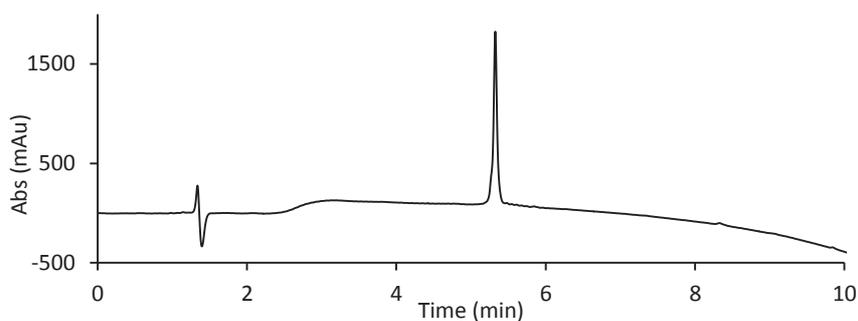
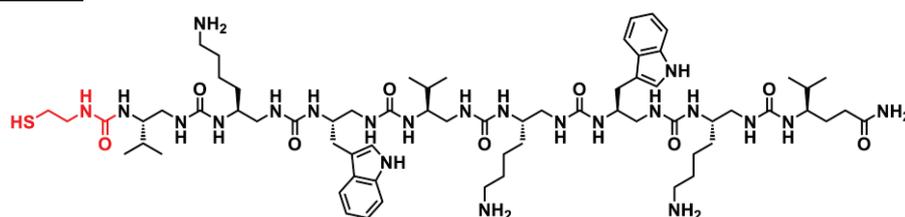


Figure EP.46: RP-HPLC chromatogram of **OL41** after purification (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

Oligomer OL42



Oligomer **OL42** was synthesized on 0.133 mmol scale according to the general procedure **C**. The end-capping with cysteamine was realized twice by coupling 1.5 eq. of **M13** with 3.0 eq. of DIEA in DMF (2mL) under microwave conditions (70 °C, 25 W, 15 min then 30 min). 191 mg (including 73 mg of the ether phase) were recovered after HF cleavage with 51% purity; purification gradient: 30-65% of B in 20 min at 20 mL/min on preparative RP-HPLC; isolated mass 58.8 mg; yield after purification 31%; RP-HPLC t_R : 6.27 min (linear gradient 10-100% of B in 10 min); ESI-HRMS (m/z): calcd for $C_{67}H_{117}N_{22}O_9S$ $[M+H]^+$: 1405.90891, found 1405.91284, with $[M+2H]^{2+}$ 703.46144, $[M+3H]^{3+}$ 469.30972.

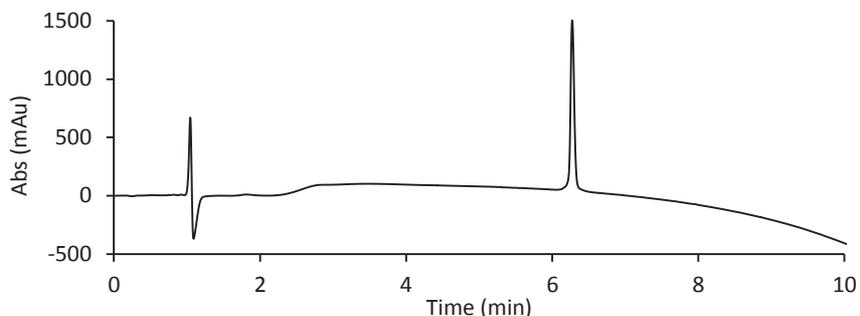
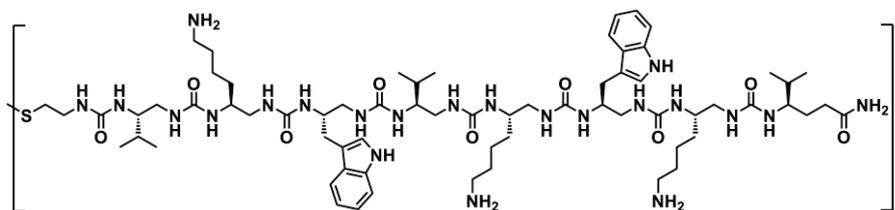


Figure EP.47: RP-HPLC chromatogram of **OL42** after purification (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm)

Oligomer OL43



16 mg of Oligomer **OL42** (1.0 eq., 0.011 mmol) was dissolved in 200 μL of pure in milliQ water and 2 x 80 μL of 50 mM solution of NH_4HCO_3 (20 mM) was added to reach a pH of 8. 80 μL of Bis(5-nitro-2-pyridyl) disulfide(NPyS)₂ (0.5 eq., 45.4 mM in acetonitrile) was next added and the reaction was left 4 h to ensure a complete dimerization to occur. Completion of the reaction was checked by HPLC and the reaction mixture was lyophilized. The lyophilized crude was directly purified on semi-preperative RP-HPLC (30-65% of B in 20 min). 5 mg of pure compound was obtained (30% yield). RP-HPLC t_R : 6.41 min (linear gradient 30-65% of B in 10 min); HRMS (ESI) m/z : found 1405.40 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 937.27 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 703.21 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, 562.77 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$

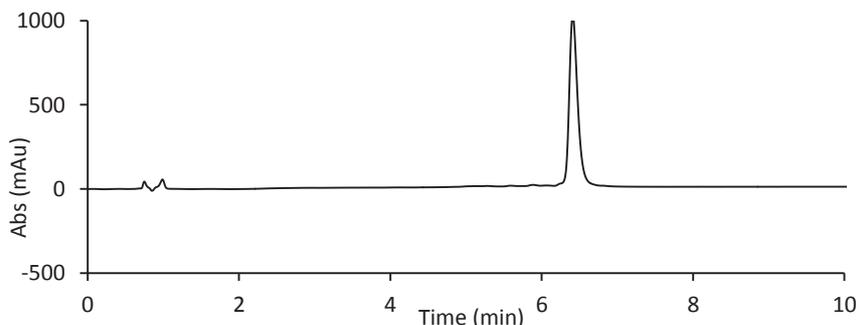
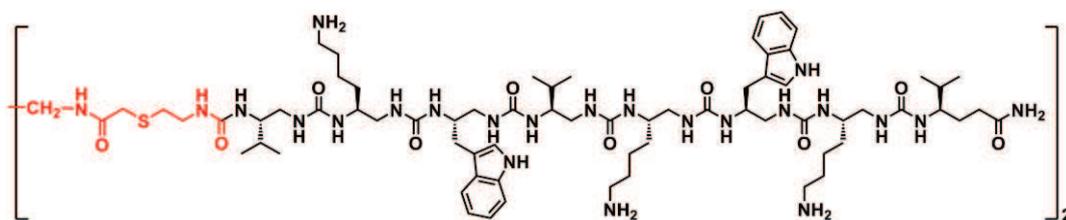


Figure EP.48: RP-HPLC chromatogram of **OL43** after purification (30-65% of B in 10 min, UV 200 nm).

Oligomer OL44



Oligomer **OL44** was synthesized according to the procedure published by Staples *et al.* [17]. 14 mg of Oligomer **OL42** (0.01 mmol) was solubilized in 1 mL of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) and 250 μ L of AcCN to obtain a clear solution. A fresh solution of linker was prepared in DMF (5.3 mg in 53 μ L). One aliquot of the linker solution (5 μ L) was added immediately. The reaction was placed in a dry bath at 65°C and allowed to stir for 2 h with four additional aliquots of linker being added in 15 min intervals for the first hour (25 μ L linker total). The pH (around 7.5) was checked overtime and the reaction was followed by HPLC. The reaction was lyophilized then purified using semi-preparative RP-HPLC (35-45% of B in 30 min at 50°C). 7.7 mg of pure compound was obtained (55% yield). RP-HPLC t_R : 5.97 min (linear gradient 10-100% of B in 10 min); ESI-HRMS (m/z): found 1476.95.70 $[M+2H]^{2+}$, 984.63 $[M+3H]^{3+}$, 738.73 $[M+4H]^{4+}$

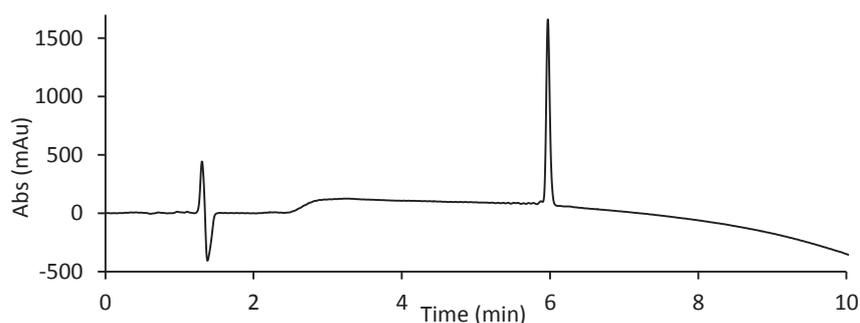
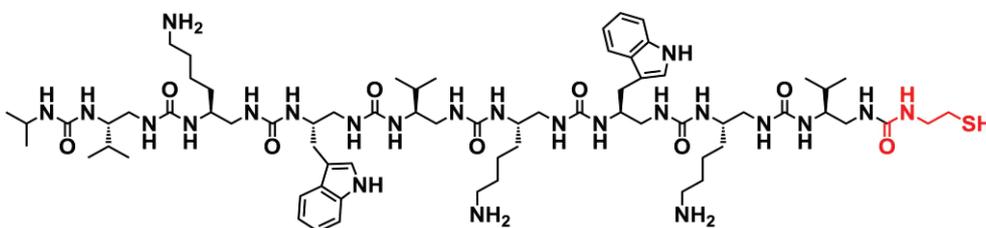


Figure EP.49: RP-HPLC chromatogram of **OL44** after purification (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

Oligomer OL45



MBHA resin (50 mg, 0.050 mmol, loading : 0.1 mmol/g) was pre-swelled overnight in DCM (5 mL) after which time succinic anhydride (11 eq. relative to the resin loading, 55 mg, 0.55 mmol) and DIEA (10.0 eq., 87 μ L, 0.5 mmol) were added. The resin was shaken for 2 h and was successively washed (2 \times 5 mL each) with DMF, MeOH, DCM and again with DMF. After these washings, the TNBS test was uncoloured, thus revealing completion of the coupling reaction. To the resulting resin swelled in DMF (5 mL) were added PyBOP (5.0 eq., 130 mg, 0.25 mmol) and DIEA (5.0 eq., 43.6 μ L, 0.25 mmol). Shaking was maintained for 20 min, after which time a solution of mono Boc-cystamine dihydrochloride (10.0 eq., 143.4 mg, 0.5

mmol) and DIEA (20.0 eq., 175 μ L, 1.00 mmol) in DMSO (5 mL) was added. The resin was shaken overnight, the reaction mixture was filtered off and the resin was washed as described above. The resulting resin was then engaged in solid phase oligourea synthesis using general procedure **C**. At the end of the synthesis the resin was dried overnight under high vacuum then swelled under Ar for 1 h in anhydrous DCM (2 mL). Allyloxycarbonyl protecting group were then removed by treatment with phenylsilane (25.0 eq.) and Pd(PPh₃)₄ (0.5 eq.) in anhydrous DCM (2 mL). The reaction mixture was shaken for 1 h under Ar and became dark brown. The beads were rinsed (2 \times 5 mL each) with DMF, DCM, DMF + 5% H₂O, DMF + 5% DIEA, DMF and DCM. Then the expected thiol was released from the resin by adding twice 5 mL of a 50 mM dithiothreitol (DTT) solution in MeOH-DCM-Et₃N (5:1:1, v/v/v) and shaking for 15 min. The resin was washed several times with MeOH (2 \times 3 mL) and the combined MeOH washings were concentrated under reduced pressure. The crude was lyophilized (62.4 mg obtained) then purified using semi-preparative RP-HPLC (40-55% of B in 20 min at 50°C). 4.5 mg of pure compound was obtained (7% yield). RP-HPLC t_R : 7.72 min (linear gradient 10-100% of B in 10 min); HRMS (ESI): m/z calcd for C₆₉H₁₂₂N₂₃O₉S [M+H]⁺: 1448.95111, found 1448.95533, with 724.98225 [M+2H]²⁺, 483.65678 [M+3H]³⁺.

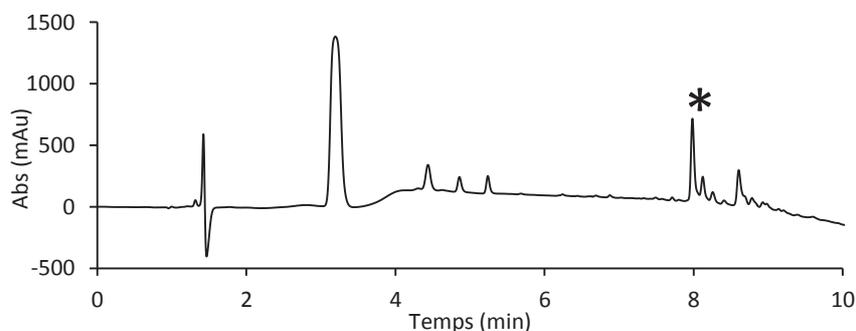


Figure EP.50: RP-HPLC chromatogram of the crude precipitate of **OL45** (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm). Expected compound designed by an asterisk.

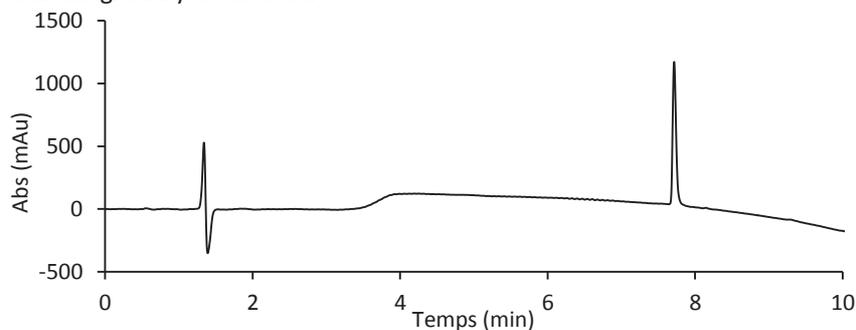


Figure EP.51: RP-HPLC chromatogram of **OL45** after purification (10-100% of B in 10 min, UV 200 nm).

4. Experimental data of chapter 4

a) Materials

The egg yolk L-alpha-phosphatidylcholine (EggPC) was purchased either from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) or Sigma-Aldrich. The egg yolk L-alpha-phosphatidyl-DL-glycerol (EggPG) was purchased from Sigma-Aldrich. Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE), POPE- d_{31} , dioleoyl phosphatidylglycerol (DOPG), Dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC), DMPC- d_{54} , dimyristoyl phosphatidylglycerol (DMPG), were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Chloroform, MeOH and deuterium-depleted water were purchased from Sigma-Aldrich.

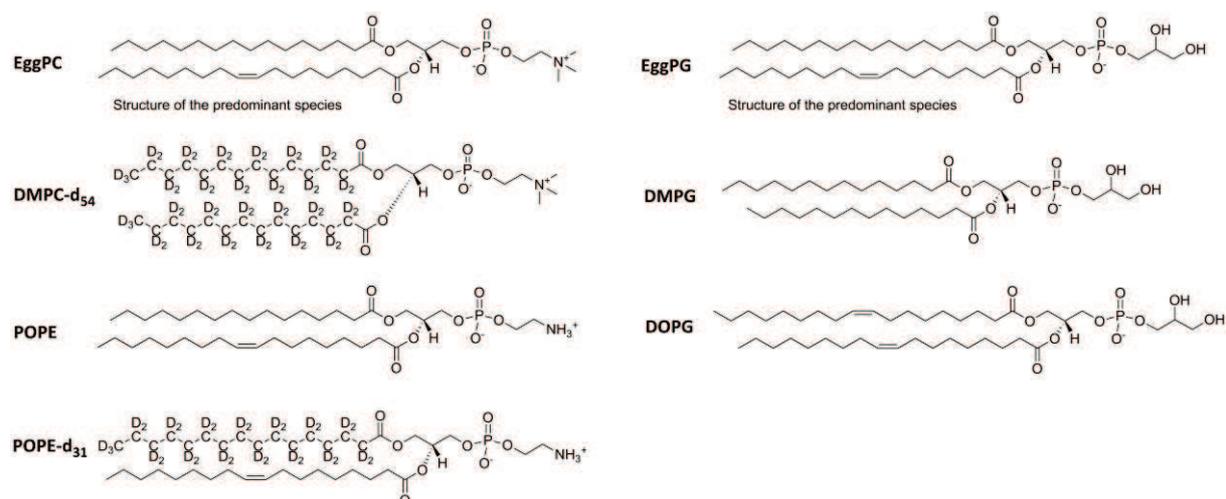


Figure EP.52: Chemical structures of the lipids used.

b) Calcein Leakage assay

i) Preparation of calcein encapsulated LUVs

Lipids films of the appropriate amount and molar composition of phospholipids were prepared by dissolving the right amount of lipids $CHCl_3/MeOH$ (8:2, v/v) (to ensure the complete mixing of the components) and by removing the solvent using a stream of N_2 (g) followed by overnight high vacuum. The film were hydrated with 10 mM Tris, 10 mM NaCl, 1 mM EGTA (pH 7.4) in presence of 50 mM calcein. To form large unilamellar vesicles (LUVs), the MLVs were subjected to five freeze/thawing cycles. For low concentration of lipids (~ 2 mg/mL), the homogeneous lipid suspension was passed at least 20 times through a mini-extruder (Avanti Alabaster, AL) equipped with 100 nm polycarbonate membranes at a temperature above the phase transition temperature of the lipid. Free calcein was separated from the calcein containing LUVs using size exclusion column chromatography (Sephadex G-75) with a 10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EGTA (pH 7.4) as elution buffer. The concentration of lipids was estimated using the Rouser protocol [18]. Diameters of the LUVS obtained were checked by DLS measurements of the liposomes (VASCO γ -2, Courdan technologie, CBMN).

For the series of assays, the lipid concentration was set at 50 μM and oligourea concentration was incremented to allow Lipid/Oligourea ratios of 100 to 10. Oligourea dilutions (100 to 10 μM) were prepared freshly from a stock solution of oligourea in milliQ water. Stock solution concentration was confirmed before each experiment with a nanodrop

measurement with $\epsilon = 11.400$ and $MW = 1387.8$ g/mol for **OL22** and $MW = 1511.9$ g/mol for **OL33**. All measurements were performed with an Infinite M1000 PRO Tecan 96-well plate reader. For each experiment, 8 wells are done simultaneously, adding the expected volume with an 8 multichannel pipette. Each experiment was made in triplicate. Data were collected at room temperature using a λ_{exc} at 480 nm and λ_{em} at 518 nm with an emission and excitation slit of 5 nm. Shaking of the plate was done during 2 to 5 s before each cycle of measurements. After 10 min acquisition of the liposomes alone (to confirm their stabilities), 10 μ l of the appropriate oligourea concentration was added to 200 μ l of liposomes at 50 μ M (volume final of 210 μ l). After 20 min of acquisition, complete leakage of LUVs was induced by adding 10 μ L of 10% Triton X-100 which dissolved the lipid membrane without interfering with the fluorescence signal (volume final 220 μ l). The fluorescence was then recorded for 5 min. The percentage of calcein release was calculated according to the following equation:

$$\% \text{ Calcein leakage} = (F_t - F_o) / (F_t - F_o) * 100$$

A dilution correction was applied on the fluorescence intensity after injection of the oligourea (10 μ L on 200 μ L, correction factor of 1.05) and of the Triton X-100 (10 μ L in 210 μ L, correction factor of 1.05).

c) ATR-FTIR Spectroscopy

The liposomes were prepared by initially dissolving the appropriate amount of phospholipids, to obtain the expected concentration, in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (8:2, v/v) to ensure the complete mixing of the components. A lipid film was then formed by removing the solvent using a stream of N_2 (g) followed by overnight drying under high vacuum. A MLVs solution of 3 mg/mL was prepared after direct hydration of lipid films of the appropriate lipid film with a solution of D_2O containing 150 mM NaCl and 20mM TRIS (pH adjusted around 7.5). SUVs were obtained by MLV tip sonication (5 times, 10 min, 40 W, pulse of 3 s) using a titanium rod sonifier in an ice-water bath to avoid lipid thermal degradation. Titanium traces were removed by centrifugation (6000 rpm, 2 min).

The ATR-FTIR spectra were recorded with a Nicolet 6700 FT-IR spectrometer (Nicolet Instrument, Madison, WI) equipped with Mercury-Cadmium-Telluride detector cooled with liquid nitrogen at 77 K on a Germanium crystal with mono-reflexion at room temperature. Since ATR spectroscopy is sensitive to the orientation of the structures, spectra were recorded with parallel (*p*) and perpendicular (*s*) polarizations of the incident light with respect to the ATR plate. 400 scans were recorded at a resolution of 4 cm^{-1} .

To form the supported bilayer, the SUVs were then burst on the ATR crystal to form a single bilayer which is controlled by the measurement of the absolute IR intensity. 20 μ L of 3 mg/mL SUVs solution was deposited on the crystal containing the Teflon cell. After 15 min, the non-adsorbed lipids were rinsed several times with buffer, following addition of 20 μ L of deuterated buffer (D_2O , 150 mM NaCl and 20mM TRIS) before the polarized (*s*) and (*p*) ATR-FTIR spectra were recorded. The single bilayer formation was controlled both by the measurement of the absolute IR intensity and by comparison of the obtained dichroic ratio of $\nu(\text{CH}_2)$ band at 2853 cm^{-1} and previous simulations (Figure EP.53a).

Once the bilayer is formed, 20 μ L of the expected concentration of the oligourea were added. After 30 min and rinsing the cell with buffer to remove all the unbound material, spectra were recorded for both polarizations (Figure EP.53b). Oligourea studied

having a significant number of charges, a TFA/HCl exchange has been realized prior their study in order to prevent in their spectra the signal of TFA which presents an important absorption band around 1673 cm^{-1} . Spectra were analyzed with Omnic software. Based line treatment and smoothing of the spectra were performed when needed.

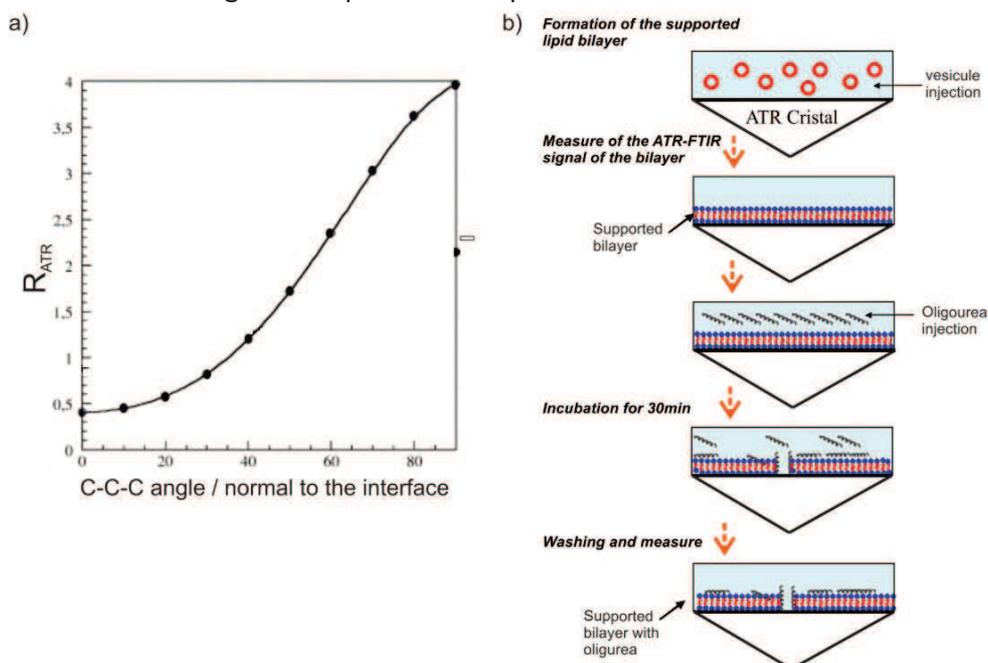


Figure EP.53: a) Simulations of the evolution of the dichroic ratio R_{ATR} of $\nu(\text{CH}_2)$ band at 2853 cm^{-1} versus C–C–C angle of the acyl chains with respect to the normal to the interface for a bilayer on germanium ATR crystal [19]. b) Method used for the measurement of the spectra for the oligourea interaction with lipid membrane.

d) Solid state NMR

i) Preparation of MLVs, LUVs and SUVs

Multilamellar vesicles (MLVs) were prepared by co-dissolving in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2 mL, 2:8, v/v) 15 mg of lipids with 5 mg of deuterated lipid with the corresponding amount for each molar composition. For experiments on DMPC vesicles, the total amount of lipids was 10 mg DMPC and 5 mg DMPC- d_{54} . For experiments on DMPC/DMPG (7:3) vesicles, the total amount of lipids was 5 mg DMPC- d_{54} and 5.56 mg DMPC and 4.44 mg of DMPG. For experiments on POPE/DMPG (7:3) vesicles, the total amount of lipids was 5 mg POPE- d_{31} and 5.69 mg DMPC and 4.4 mg of DMPG.

The lipids films were dried under a stream of nitrogen and then stored overnight under high vacuum to completely remove any residual solvent. The dry samples were then hydrated in 1 mL of milliQ water and the right amount of oligourea (with concentration first confirmed by nanodrop measurement) dissolved in milliQ water was added. The sample was shaken and the dispersion was lyophilized overnight, leading to 15 mg of a fluffy white powder. Deuterium-depleted water (100 μL) was added to the powder, which gave rise to a 150mg/mL suspension. For all NMR samples, 5 freeze-thaw (-196°C , 50°C) cycles and shaking in a vortex mixer were performed to ensure sample equilibrium; samples were transferred into 50 to 100 μL 4-mm zirconia rotors for NMR analyses.

ii) NMR spectroscopy measurements

NMR experiments were carried out at 107.4 MHz on a BrukerAvance III 700 SB spectrometer. The 700 MHz spectrometer was equipped with a CP-MAS triple 4-mm¹H/²H/³¹P probe. Static spectra were acquired by means of a quadrupolar echo pulse sequence $90^\circ x - \tau - 90^\circ y - \tau - \text{acq}$ [20]. The acquisition parameters on the 700-MHz spectrometer were as follows: spectral window of 500 kHz, $\pi/2$ pulse width of 3.5 μs , recycle delay of 1.5s, echo delay that separates pulses of 30s. Samples were allowed to equilibrate for 30 min at a given temperature before the NMR signal was acquired. Typical experimental temperatures were 15, 25 and 35°C. The number of acquisitions was dependent on sample concentration, and ranged from 10,000 to 40,000. Lorentzian noise filtering with a width of 100 Hz was applied prior to Fourier transformation from the top of the echo signal. Quadrupolar splittings, $\Delta\nu_Q$, and S^{CD} order parameters has been measured using the procedure of Grelard *et al.* [21].

The chemical shift anisotropy (CSA) tensor is defined by three principal values, δ_{xx} , δ_{yy} , δ_{zz} , whose average is the isotropic shift $\delta_{\text{iso}} = (\delta_{xx} + \delta_{yy} + \delta_{zz})/3$. The anisotropy parameter δ is defined as $\delta = \delta_{zz} - \delta_{\text{iso}}$, and the asymmetry parameter η is defined as $\eta = (\delta_{yy} - \delta_{xx})/(\delta_{zz} - \delta_{\text{iso}})$. The δ_{yy} principal value is the closest to the isotropic chemical shift while δ_{zz} is the furthest. Powder patterns with $\eta = 0$ due to identical δ_{yy} and δ_{xx} frequencies are called uniaxial powder patterns. Another indicator of the size of the CSA is the span $\Delta\sigma = \delta_{zz} - \delta_{xx}$. For $\eta=0$ CSA patterns, which are observed for all uniaxially diffusive molecules in lipid bilayers, the frequency position $\delta_{xx} = \delta_{yy}$ is called the 90° edge since they result from molecules whose bilayer normal is perpendicular to the magnetic field, while the δ_{zz} frequency is called the 0° edge [22].

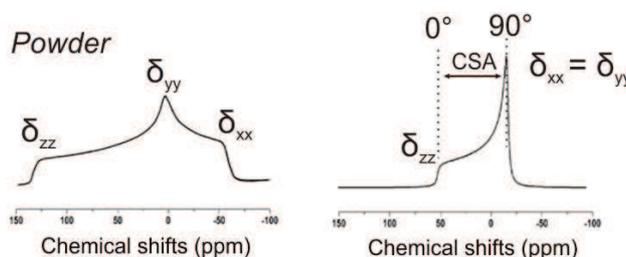


Figure EP.54: CSA measurement.

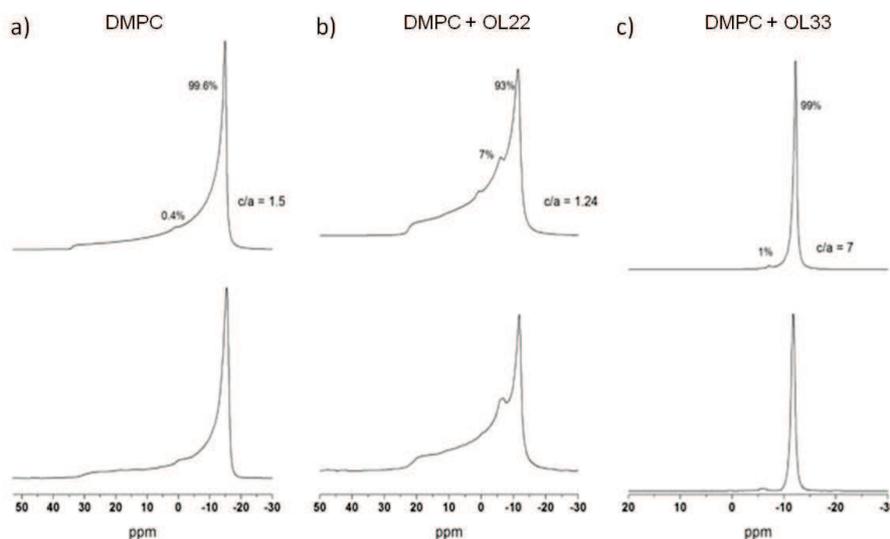


Figure EP.55: Simulated (top) and experimental spectra (bottom) obtained by ³¹P-RMN with DMPC MLVs in a) without oligourea, in b) with oligourea **OL22** and in c) with oligourea **OL33** (ratio L/O =20).

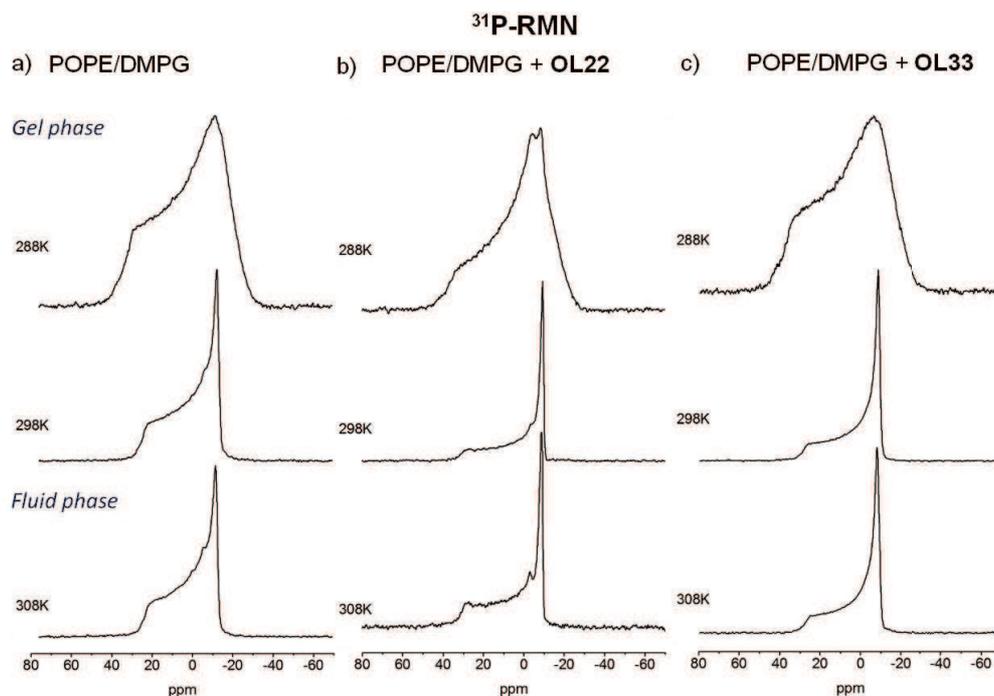


Figure EP.56: ³¹P-RMN spectra of POPE/DMPG (7:3, mol/mol) MLVs in a) without, in b) with oligourea **OL22** and in c) with oligourea **OL33** (ratio L/O = 20). Temperature was varied between 288 K and 308 K.

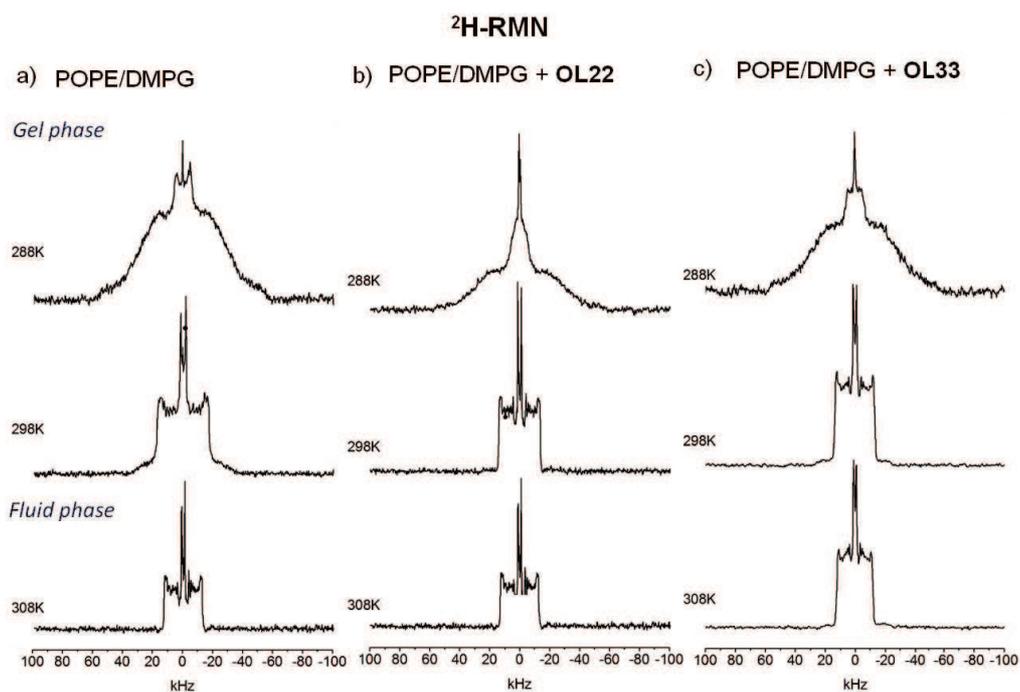


Figure EP.57: ²H-RMN spectra of POPE/DMPG (7:3, mol/mol) MLVs in a) without, in b) with oligourea **OL22** and in c) with oligourea **OL33** (ratio L/O = 20). Temperature was varied between 288 K and 308 K.

Bibliographie

- [1] G.M. Sheldrick, *Acta Cryst. A*, **A64** (2008) 112-122.
- [2] Y.-R. Nelli, C. Douat-Casassus, P. Claudon, B. Kauffmann, C. Didierjean, G. Guichard, An activated building block for the introduction of the histidine side chain in aliphatic oligourea foldamers, *Tetrahedron*, **68** (2012) 4492-4500.
- [3] E. Kaiser, R.L. Colecott, C.D. Bossinger, P.I. Cook, Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides, *Anal. Biochem.*, **34** (1970) 595-598.
- [4] T. Vojkovsky, Detection of secondary-amines on solid-phase, *Peptide Res.*, **8** (1995) 236-237.
- [5] H. Rink, Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin, *Tetrahedron Lett.*, **28** (1987) 3787-3790.
- [6] G. Chennakrishnareddy, G. Nagendra, H.P. Hemantha, U. Das, T.N. Guru Row, V.V. Sureshbabu, Isoselenocyanates derived from Boc/Z-amino acids: Synthesis, isolation, characterization, and application to the efficient synthesis of unsymmetrical selenoureas and selenoureidopeptidomimetics, *Tetrahedron*, **66** (2010) 6718-6724.
- [7] Y.R. Nelli, S. Antunes, A. Salaün, E. Thinon, S. Massip, B. Kauffmann, C. Douat, G. Guichard, Isosteric substitutions of urea to thiourea and selenourea in aliphatic oligourea foldamers: Site-specific perturbation of the helix geometry, *Chem. Eur. J.*, **21** (2015) 2870-2880.
- [8] L. Fischer, P. Claudon, N. Pendem, E. Miclet, C. Didierjean, E. Ennifar, G. Guichard, The canonical helix of urea oligomers at atomic resolution. Insight into folding-induced axial organization, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49** (2010) 1067-1070.
- [9] M. Rodriguez, M. Llinares, S. Doulut, A. Heitz, J. Martinez, A facile synthesis of chiral *N*-protected β -amino alcohols, *Tetrahedron Lett.*, **32** (1991) 923-926.
- [10] C. Douat-Casassus, K. Pulka, P. Claudon, G. Guichard, Microwave-enhanced solid-phase synthesis of *N,N'*-linked aliphatic oligoureas and related hybrids, *Org. Lett.*, **14** (2012) 3130-3133.
- [11] A. Boeijen, J. van Ameijde, R.M.J. Liskamp, Solid-phase synthesis of oligourea peptidomimetics employing the fmoc protection strategy, *J. Org. Chem.*, **66** (2001) 8454-8462.
- [12] V.V. Sureshbabu, S.A. Naik, H.P. Hemantha, N. Narendra, U. Das, T.N. Guru Row, *N*-urethane-protected amino alkyl isothiocyanates: Synthesis, isolation, characterization, and application to the synthesis of thioureidopeptides, *J. Org. Chem.*, **74** (2009) 5260-5266.
- [13] Y.-R. Nelli, C. Douat-Casassus, P. Claudon, B. Kauffmann, C. Didierjean, G. Guichard, An activated building block for the introduction of the histidine side-chain in aliphatic oligourea foldamers, *Tetrahedron*, (2012) in press.
- [14] S. Di Maro, R.C. Pong, J.T. Hsieh, J.M. Ahn, Efficient solid-phase synthesis of FK228 analogues as potent antitumoral agents, *J. Med. Chem.*, **51** (2008) 6639-6641.
- [15] Y.H. Kim, W.E. Stites, Effects of excluded volume upon protein stability in covalently cross-linked proteins with variable linker lengths, *Biochemistry*, **47** (2008) 8804-8814.
- [16] Q. Sun, Z. Kang, L. Xue, Y. Shang, Z. Su, H. Sun, Q. Ping, R. Mo, C. Zhang, A collaborative assembly strategy for tumor-targeted sirna delivery, *J. Am. Chem. Soc.*, **137** (2015) 6000-6010.
- [17] J.K. Staples, K.M. Oshaben, W.S. Horne, A modular synthetic platform for the construction of protein-based supramolecular polymers via coiled-coil self-assembly, *Chem. Sci.*, **3** (2012) 3387-3392.
- [18] G. Rouser, S. Fleischer, A. Yamamoto, Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots, *Lipids*, **5** (1970) 494-496.
- [19] S. Castano, B. Desbat, Structure and orientation study of fusion peptide FP23 of GP41 from HIV-1 alone or inserted into various lipid membrane models (mono-, bi- and multibi-layers) by FT-IR spectroscopies and brewster angle microscopy, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, **1715** (2005) 81-95.
- [20] J.H. Davis, K.R. Jeffrey, M. Bloom, M.I. Valic, T.P. Higgs, Quadrupolar echo deuteron magnetic resonance spectroscopy in ordered hydrocarbon chains, *Chem. Phys. Lett.*, **42** (1976) 390-394.
- [21] A. Grélard, P. Guichard, P. Bonnafous, S. Marco, O. Lambert, C. Manin, F. Ronzon, E.J. Dufourc, Hepatitis B subvirus particles display both a fluid bilayer membrane and a strong resistance to freeze drying: A study by solid-state NMR, light scattering, and cryo-electron microscopy/tomography, *FASEB J.*, **27** (2013) 4316-4326.
- [22] Y. Su, W.F. DeGrado, M. Hong, Orientation, dynamics, and lipid interaction of an antimicrobial arylamide investigated by ^{19}F and ^{31}P solid-state NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, **132** (2010) 9197-9205.