



HAL
open science

Synthèse et caractérisation d'enchaînements de mimes peptidiques triés par modélisation moléculaire : application à la synthèse d'analogues du hCRF

Nicolas Raynal

► **To cite this version:**

Nicolas Raynal. Synthèse et caractérisation d'enchaînements de mimes peptidiques triés par modélisation moléculaire : application à la synthèse d'analogues du hCRF. Autre. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2002. Français. NNT : . tel-00128540

HAL Id: tel-00128540

<https://theses.hal.science/tel-00128540>

Submitted on 1 Feb 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Chimie Organique, Minérale et Industrielle
Formation doctorale : Chimie des biomolécules: synthèse, structure et réactivité
Ecole doctorale : Chimie des biomolécules et chimie du solide

Présentée et soutenue publiquement par

Nicolas RAYNAL

le 12 décembre 2002

**Synthèse et caractérisation d'enchaînements de mimes
peptidiques triés par modélisation moléculaire :
application à la synthèse d'analogues du hCRF**

Jury

M. Jean-Louis Montéro	Professeur, Université Montpellier II	Président
M. Michel Marraud	Professeur, ENSIC Nancy	Rapporteur
M. Gilles Guichard	Chargé de recherche CNRS, Strasbourg	Rapporteur
M. Jean Martinez	Professeur, Université Montpellier I	Examineur
Mme Muriel Amblard	Chargé de recherche CNRS, Montpellier I	Examineur

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire des Aminoacides, Peptides et Protéines, à la Faculté de Pharmacie de Montpellier.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Professeur Jean Martinez pour m'avoir accordé sa confiance, pour m'avoir permis de mener à bien ce travail, et pour m'avoir guidé au cours de ces quatre années.

Que Messieurs le professeur Michel Marraud et Gilles Guichard trouvent ici l'expression de toute ma considération et de toute ma gratitude pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie tout particulièrement Muriel Amblard qui m'a encadré durant ces quatre années. Elle a su me soutenir dans les moments difficiles, se montrer disponible, et me faire part de son expérience. Qu'elle soit convaincue de toute mon amitié et de toute ma reconnaissance.

Je ne veux pas oublier Gilbert Bergé qui a encadré la totalité du travail de modélisation et Nicole Bernad, pour sa persévérance dans la mise en place des tests biologiques.

Mes remerciements s'adressent enfin à tous les étudiants et permanents du LAPP, qui ont toujours su maintenir une excellente ambiance.

Merci pour ces quatre années passées en votre compagnie, je ne les oublierai pas.

ABREVIATIONS

I Hormones peptidiques

CRF	Corticotropin-Releasing Factor
CRH	Corticotropin-Releasing Hormone
CRF-BP	Corticotropin-Releasing Factor Binding Protein
ACTH	AdrenoCorticoTropic Hormone

II Autres abréviations

AMPC	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ADNC	Acide DésoxyriboNucléique cyclique
ARN	Acide RiboNucléique
EC ₅₀	constante d'efficacité sur 50% des sites d'action
IC ₅₀	constante d'inhibition de 50% des sites d'action
Ki	constante de liaison

III Aminoacides :

Ala	alanine (A)
Arg	arginine (R)
Asn	asparagine (N)
Asp	acide aspartique (D)
Cys	cystéine (C)
Gln	glutamine (Q)
Glu	acide glutamique (E)
Gly	glycine (G)
His	histidine (H)
Ile	isoleucine (I)
Leu	leucine (L)
Lys	lysine (K)
Met	méthionine (M)
Phe	phénylalanine (F)
Pro	proline (P)
Ser	sérine (S)
Thr	thréonine (T)
Tyr	tyrosine (Y)
Trp	tryptophane (W)
Val	valine (V)

IV Groupements protecteurs

Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyle
Fmoc	9-fluorénylméthyloxycarbonyle
Piv	pivaloyle
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydro-benzofuran-5-sulfonyl
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl
2ClZ	2-Chlorobenzoyloxycarbonyle

Tos	tosyle
OBzl	ester benzylique
OtBu	ester <i>tert</i> -butylique
OMe	ester méthylique
Ochx	ester cyclohexyle
Trt	trityle
Bzl	éther benzylique
tBu	éther <i>tert</i> -butylique

V Réactifs d'activation

BOP	hexafluorophosphate de N-oxytris[(diméthylamino)phosphonium] benzotriazole
HBTU	hexafluorophosphate de O-(1H-benzotriazol-1-yne)-1,1,3,3- tétraméthyl-uronium

VI Réactifs :

Pd/C	palladium sur charbon
NBS	N-bromosuccinimide
Fmoc-Cl	chlorure de fluorénylméthoxy-carbonyle
Fmoc-OSu	succinimide fluorénylméthoxy-carbonyle
Piv-Cl	chlorure de pivaloyle
Boc ₂ O	pyrocarbonate de tertio-butyle

VII Solvants

DCM	dichlorométhane
DMF	N,N'-diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
NMP	N-méthylpyrrolidone
π	pyridine
ACN	acétonitrile
MeOH	méthanol
EtOH	éthanol

VIII Acides et bases

NMM	N-méthylmorpholine
DIEA	N,N'-diisopropyléthylamine
TFA	acide trifluoroacétique
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéca-7-diène
Pip	pipéridine

IX Résines

PAL-PEG-PS	peptide acide linker-polyethylene glycol-polystyrène
MBHA	paraméthylbenzhydramine

X Autres abréviations

CCM	chromatographie sur couche mince
HPLC	chromatographie liquide haute performance
ES	électrospray
LC/MS	couplage chromatographie liquide/spectrométrie de masse
CD	dichroïsme circulaire
RMN	résonance magnétique nucléaire
IR	infra-rouge
LC-MS	liquid chromatographie-mass spectroscopy
UV	ultraviolet
CRE	CyclicAMP Responsive Element
RIA	Radio Immuno Assay
EDTA	Ethylènediaminetetraacetic Acid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium

INTRODUCTION

Les structures tridimensionnelles des protéines sont dictées par l'enchaînement des acides aminés qui les composent. Elles sont composées de plusieurs unités remarquables comme les coudes, les feuillets et les hélices qui constituent la structure secondaire des protéines. Elles sont généralement reliées entre elles par des interactions non covalentes qui permettent aux protéines de conserver leur cohésion.

Dans ce travail, nous avons axé notre recherche sur les structures en hélice en cherchant à synthétiser des hélices artificielles construites à partir de motifs conformationnellement contraints décrits dans la littérature. Plusieurs équipes ont synthétisé des hélices artificielles constituées par l'enchaînement d'unités répétitives pseudo-peptidiques comme les β -peptides, γ -peptides et δ -peptides qui sont appelés des « Foldamers ».

Dans un premier temps, notre but était de sélectionner dans la littérature des mimes contraints de di- et de tri-peptides pouvant conduire par oligomérisation à des structures secondaires organisées en hélice. Cette sélection a été réalisée au moyen de calculs théoriques de modélisation moléculaire.

Dans un deuxième temps, nous avons souhaité remplacer l'hélice naturelle d'une protéine dont le rôle est structurant et non interactif par différentes hélices sélectionnées en modélisation moléculaire. Nous avons choisi comme support le hCRF (human Corticotropin Releasing Factor) qui est une hormone peptidique amidée constituée de 41 résidus d'acides aminés et qui est responsable de la libération d'ACTH (AdrenoCorticoTropic Hormone). Elle possède une hélice α centrale (6-36) qui est décrite pour espacer et orienter les extrémités de la protéine vers les sites actifs du récepteur. Cette hormone répondait donc aux critères de sélection.

Nous avons ensuite synthétisé les monomères sélectionnés et les oligomères correspondants. Nous avons réalisé d'une part des analyses structurales de certains de ces oligomères et nous avons introduit tout les oligomères sélectionnés dans la séquence du hCRF.

Ces travaux de thèse sont présentés en quatre parties :

- La première partie regroupe les données bibliographiques concernant les structures secondaires des peptides et plus particulièrement les hélices, les hélices artificielles et le hCRF.
- La deuxième est consacrée à l'étude de modélisation moléculaire, qui permet de trier les motifs non peptidiques susceptibles de donner des hélices artificielles.
- La troisième partie décrit la synthèse des monomères, des oligomères et des hybrides du hCRF.
- La quatrième est consacrée à l'analyse structurale et aux résultats biologiques.

Abréviations	3
Introduction	6

Partie I : Bibliographie **15**

Chapitre 1 : Structure secondaire des peptides	16
I : Introduction	16
II : Les turns (coudes)	18
II 1 : Les β -turns	18
II 2 : Les γ -turns	20
III : Les feuillets	21
IV : Les hélices	23
IV 1 : L'hélice α	23
IV 2 : L'hélice 3_{10}	25
IV 3 : La π -hélice	26
IV 4 : L'hélice polyPro I	27
IV 5 : L'hélice polyPro II	27
IV 6 : L'hélice polyGly II	28
V : Identification des structures secondaires	29
V 1 : La cristallographie	30
V 2 : La RMN	30
V 3 : La spectroscopie Infra-Rouge (IR)	31
V 4 : Le dichroïsme circulaire	31
VI : Conclusion	35
Chapitre 2 : Hélices artificielles	36
I : Présentation	36
I 1 : Introduction et définitions	36
I 2 : Repliement en hélice des foldamers	37
I 3 : Synthèse, purification et caractérisation des foldamers	38
II : Modèles peptidomimétiques des foldamers	41
II A : Famille des α -peptides	42
II A 1 : Les peptoides	42
II A 2 : Les oligopyrrolinones	44
II A 3 : Les oxazolidinones	46
II A 4 : Les azatides	46
II B : Famille des β -peptides	47
II B 1 : Les β -peptides	47
II B 1 1 : Propriétés conformationnelles générales des β -peptides	47
II B 1 2 : Conformations hélicales des β -peptides	49
II B 1 3 : Conformation de type hélice 14 des β -peptides	51
II B 1 4 : Conformation de type hélice 12 des β -peptides	54
II B 1 5 : Conformation de type hélice 10/12 des β -peptides	56
II B 1 6 : Conformation de type hélice 10 des β -peptides	57
II B 1 7 : Conformation de type hélice 8 des β -peptides	59
II B 1 8 : Conformation d'hélices de β -peptides ne mettant pas en jeu de liaisons hydrogènes	59
II B 1 9 : Propriétés biologiques des β -peptides	60

II B 2 : Les α -aminoxy-acides	60
II B 3 : Les analogues de β -peptides contenant un atome de soufre	61
II B 4 : Les hydrazino-peptides	61
II C : Famille des γ -peptides	62
II C 1 : Les γ -peptides	62
II C 1 1 : Propriétés conformationnelles générales des γ -peptides	62
II C 1 2 : Conformation de type H ₁₋₁₄ des γ -peptides	63
II C 1 3 : Conformation de type H ₁₋₉ des γ -peptides	65
II C 1 4 : Conformation des γ -peptides possédant une amide tertiaire	65
II C 1 5 : Propriétés biologiques des γ -peptides	65
II C 2 : Les oligourées	66
II D : Famille des δ -peptides	67
II D 1 : Structures générales des δ -peptides	67
II D 2 : Carbopeptoïdes de structure pyranosique	67
II D 3 : Carbopeptoïdes de structure furanosique	69
III : Conclusion	70
Chapitre 3 : hCRF	71
I : Structures et généralités	71
I 1 : Structure primaire du CRF	71
I 2 : Structure secondaire du CRF	73
I 3 : Localisation sur le gène du CRF	74
I 4 : Stabilité enzymatique du CRF	74
II : Etude de relation structure-activité	75
II 1 : Interactions peptidiques agonistes-récepteurs	75
II 1 1 : Détermination de la séquence minimale active	75
II 1 2 : Implication de la nature des chaînes latérales	76
II 1 2 1 : Ala-scan	76
II 1 2 2 : D-scan	77
II 1 2 3 : Substitution par des analogues structuraux	77
II 1 3 : Introduction de contraintes conformationnelles	78
II 1 4 : Rôle connecteur de l'hélice α	79
II 1 5 : conclusion	80
II 2 : Antagonistes peptidiques du hCRF	81
II 2 1 : Implication de la nature des chaînes latérales	81
II 2 2 : Introduction de contraintes conformationnelles	82
II 2 3 : conclusion	83
II 3 : Antagonistes non-peptidiques	84
II 3 1 : Série d'antagonistes cycliques	84
II 3 1 1 : Famille de cycles à 5 chaînons	84
II 3 1 2 : Famille de cycles à 6 chaînons	85
II 3 2 : Série d'antagonistes polycycliques	86
II 3 2 1 : Antagonistes bicycliques	86
II 3 2 2 : Série d'antagonistes polycycliques	87
II 3 3 : Série d'antagonistes acycliques	87
III : Les récepteurs CRF	88
III 1 : Le récepteur CRF1	88
III 2 : Le récepteur CRF2	90
III 2 1 : Le récepteur CRF2 α	91

III 2 2 : Le récepteur CRF2 β	91
III 2 3 : Le récepteur CRF2 γ	91
III 3 : Le récepteur CRF3	92
III 4 : Les récepteurs chimériques	92
III 5 : Le « CRF-binding protein »	94
IV : Rôles physiologiques et physiopathologiques du CRF	96
IV 1 : Rôles physiologiques	96
IV 2 : Implications du CRF dans les pathologies humaines	98

Partie II : Modélisation 100

Chapitre 1 : Protocole de modélisation	101
I : Minimisation du motif unitaire	101
II : Etude de la variation des angles dièdres	102
II 1 : Construction du motif Ac-C5-NHMe	102
II 2 : Etude de la variation des angles dièdres	102
III : Construction et comparaison des oligomères	104
III 1 : Constructions des décamères	104
III 2 : Minimisation moléculaire	105
III 3 : Dynamique moléculaire par chauffage à 300 K	105
IV : Incorporation dans la séquence du hCRF et dynamique	106
IV 1 : Incorporation de l'hélice dans la séquence	106
IV 2 : Dynamique moléculaire	109
IV 3 : Comparaison avec la molécule naturelle	109
Chapitre 2 : Liste des molécules modélisées	111
Chapitre 3 : Les molécules candidates	121
I : Le monomère C5	121
II : Le monomère C7	122
II 1 : Minimisation	122
II 2 : Variation des angles dièdres	122
II 3 : Construction et comparaison des oligomères	123
III : Le monomère Ortho	125
III 1 : Minimisation	125
III 2 : Variation des angles dièdres	125
III 3 : Construction et comparaison des oligomères	126
III 4 : Incorporation de l'hélice dans la séquence	127
Chapitre 4 : Validation du protocole	128
I : Etude de l'oxétane	128
II : Etude de l'ACPC	130
III : Conclusion	131

Partie III : Stratégie de synthèse **132**

Chapitre 1 : Synthèse des monomères	134
I : Stratégie de synthèse	134
I 1 : Lactame C5	134
I 2 : Synthon Ortho	135
II : Partie expérimentale	136
I 1 : Motif C5	136
I 2 : Motif Ortho	138
Chapitre 2 : Synthèse des fragments	141
I : Présentation	141
II : Généralités sur la synthèse peptidique en phase solide	142
II 1 : Appareillages	142
II 1 1 : Réacteur manuel	142
II 1 2 : Synthétiseurs automatisés	143
II 1 2 1: Synthétiseur Perseptive Pioneer	143
II 1 2 2: Synthétiseur Advance Chem Tech (ACT)	143
II 2 : Couplages	143
II 2 1 : Couplage au BOP	143
II 2 2 : Couplage à l'HBTU	143
II 3 : Les stratégies de synthèse	143
II 3 1 : La stratégie Boc	144
II 3 2 : La stratégie Fmoc	146
II 4 : Tests colorimétriques	146
III : Stratégie de synthèse	147
III 1 : Synthèse des poly-C5	147
III 1 1 : Stratégie de synthèse des fragments de type Ac-(C5) _n -OH	147
III 1 2 : Stratégie de synthèse des fragments de type Ac-(C5) _n -NH ₂	149
III 1 3 : Stratégie de synthèse du fragment de type Fmoc-(C5) ₅ -OH	150
III 2 : Synthèse des dérivés du motif ortho	150
III 2 1 : Présentation des dérivés du motif Ortho	150
III 2 2 : Stratégie de synthèse des dérivés du motif Ortho	151
IV : Mode opératoire	153
IV 1 : Synthèse des poly-C5	153
IV 1 1 : Fonctionnalisation de la résine	153
IV 1 2 : Synthèse des oligomères Ac-(C5) _n -OH	153
IV 1 3 : Synthèse des oligomères Ac-(C5) _n -NH ₂	154
IV 1 4 : Synthèse du fragment Fmoc-(C5) ₅ -OH	155
IV 2 : Mode opératoire des dérivés du motif Ortho	155
Chapitre 3 : Synthèse des analogues du CRF	159
I : Stratégie de synthèse	159
I 1 : Synthèse des peptides de référence	159
I 2 : Synthèse des molécules hybrides analogues du hCRF	160
I 2 1 : Les hybrides peptidiques (Modèle 1)	161
I 2 1 1: Incorporation de (Ala-Gly) _x	161
I 2 1 2: Incorporation de (Gly-Pro) _x	161
I 2 2 : Incorporation de (C5) _x dans la séquence du hCRF (Modèle 1)	162

I 2 3 : Incorporation de Ortho _x dans la séquence du hCRF (Modèle 1)	166
I 2 3 1: Stratégie Fmoc	166
I 2 3 2: Stratégie Boc	169
I 2 4 : Incorporation de (C5) _x et Ortho _x dans la séquence du hCRF (Modèle 2)	172
I 3 : Synthèse des molécules hybrides analogues du ₉₋₄₁ hCRF	173
I 3 1 : Incorporation de (C5) _x dans la séquence du ₉₋₄₁ hCRF	174
I 3 2 : Incorporation de (ortho) _x dans la séquence du ₉₋₄₁ hCRF	175
II : Mode opératoire	178
II 1 : Synthèse des peptides de référence	178
II 1 1 : Le hCRF	178
II 1 2 : Le ₉₋₄₁ hCRF	172
II 2 : Synthèse des peptides de référence	180
II 2 1 : Incorporation de (Ala-Gly) _x	180
II 2 2 : Incorporation de (Gly-Pro) _x	181
II 3 : Les hybrides pseudo-peptidiques du hCRF	182
II 3 1 : Incorporation de (C5) _x (Modèle 1)	182
II 3 2 : Incorporation de (Ortho) _x (Modèle 1)	184
II 3 3 : Incorporation de (C5) _x et de (Ortho) _x (Modèle 2)	187
II 4 : Les hybrides pseudo-peptidiques du ₉₋₄₁ hCRF	188
II 4 1 : Incorporation de (C5) _x	188
II 4 2 : Incorporation de (Ortho) _x	189

Partie IV : Résultats **190**

Chapitre 1 : Analyses conformationnelles	191
I : Caractérisation des monomères	191
I 1 : Le monomère C5	191
I 2 : Le monomère Ortho	193
I 2 1 : Cristallographie de Boc-Ortho-OH	193
I 2 2 : Cristallographie de Boc-Ortho-NHiPr	195
I 2 3 : Infrarouge	197
II : Caractérisation des oligomères	198
II 1 : Les oligomères C5	198
II 2 : Les oligomères Ortho	200
II 2 1 : Etudes des dimères	200
II 2 2 : Etudes des trimères	203
III : Caractérisation des hybrides du hCRF	206
III 1 : Dichroïsme du hCRF	206
III 2 : Dichroïsme des hybrides du hCRF	207
III 2 1 : Etudes des hybrides peptidiques	207
III 2 2 : Etudes des hybrides C5	210
III 2 3 : Etudes des hybrides Ortho	211
IV : Conclusion	212
Chapitre 2 : Résultats biologiques	213
I : Introduction	213
II : Résultats et discussion	213
III : Partie expérimentale	215
III 1 : Préparation des membranes d'hypophyse de rat	215
III 2 : Extraction des membranes	215
III 3 : Déplacement de la liaison	215
III 4 : Activité biologique	216
Conclusion	217
Annexes	220
Annexe A : Appareillages et matériels	221
Annexe B : Programmes de modélisation	223
Annexe C : Données cristallographiques	238

PARTIE I:

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1 : Structure secondaire des peptides

I : Introduction

La première organisation structurale des protéines a été mise en évidence en 1957 par Kendrew¹ qui proposa une représentation tridimensionnelle de la myoglobine. Cependant c'est en 1951 que Pauling et Corey² ont proposé les premières conformations des structures en hélice.

En 1959, Linderstrom-Lang³ a établi la hiérarchie des structures des protéines en quatre niveaux (primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire) que Berndt a étayé en ajoutant deux niveaux (super secondaire et de domaines). Les peptides possèdent donc six niveaux d'organisation qui découlent les uns des autres.

- **La structure primaire** est la séquence linéaire du peptide dont la nature des acides aminés qui le compose est en grande partie responsable de la super structure finale.
- **La structure secondaire** (hélices, feuillets et coudes) que pourra adopter le peptide est dictée par la longueur du peptide et la nature des résidus. L'environnement de la molécule au moment de sa structuration, joue un rôle majeur ; ainsi de nombreux peptides possèdent des structures secondaires différentes en fonction de la nature du milieu. C'est le cas de peptides amphiphiles qui se structurent en hélice au niveau des membranes lipidiques et qui n'ont pas de structures ordonnées dans le cytoplasme ou dans le milieu extracellulaire.
- **La structure super secondaire** associe les divers éléments de structures secondaires par les interactions entre les chaînes latérales.
- **Les domaines** représentent les différentes régions ordonnées de la structure tertiaire.
- **La structure tertiaire** est composée par l'arrangement tridimensionnel de tous les atomes de la chaîne polypeptidique. Cet arrangement représente chez les petites et moyennes protéines, l'état natif et chez les grosses protéines, une des sous-unités.
- **La structure quaternaire** est l'association des plusieurs structures tertiaires dont la cohésion est parfois assurée par une molécule non-peptidique ou un ion (hémoglobine).

¹ Kendrew, J.C. ; Bodo, G. ; Dintzis, H.M. ; Parrish, R.G. ; Wyckoff, H. ; Phillips, D.C. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* **1958**, *161*, 662-666.

² Pauling, L.; Corey, R.B.; Branson, H.R. Two Hydrogen-Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1951**, *37*, 205-211.

³ Linderstrøm-Lang, K.U.; Schellman, J.A. (1959) Protein Structure and Enzyme Activity in "The Enzymes" Vol 1 Second Ed. **1959**, 443-510 Boyer, Lardy, Myrbæk Eds. Academic Press, New York.

Pour définir les différents types de structures secondaires, Ramachandran⁴ a étudié la conformation des acides aminés en fonction de la valeur des angles dièdres Phi et Psi et il en a déduit que toutes les valeurs d'angles dièdres n'étaient pas possibles pour les acides aminés. Il a donc établi un diagramme qui porte son nom et qui impose des valeurs d'angles pour chaque type de structure **Figure 1**.

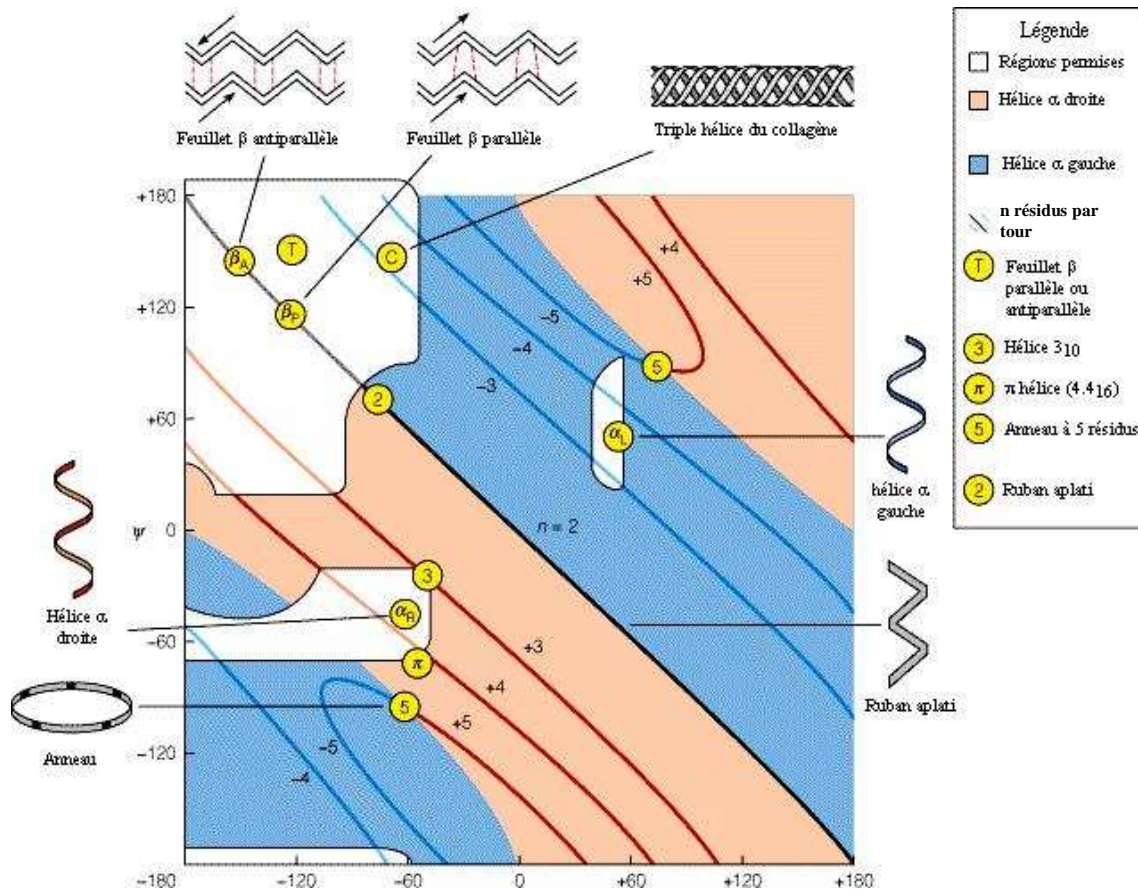


Figure 1 : Diagramme de Ramachandran

Dans ce chapitre, nous verrons les conformations qu'adoptent les différentes structures secondaires. Et nous nous attarderons plus spécialement sur les structures en hélice.

⁴ Ramachandran, G.N.; Sasisekharan, V. Conformation of Polypeptides and Proteins. *Adv. Prot Chem.* 1968, 23, 283-437.

II : Les coudes (turns)

II 1 : Les coudes- β

Les coudes- β ont été découverts par Venkatachalam en 1968⁵. Ils sont composés de motifs térapeptidiques caractérisés par la présence d'une liaison hydrogène entre le carbonyle i et le proton amidique $i+3$. Ils ont comme particularité d'inverser la direction de la chaîne peptidique. Plus de huit sous-types différents ont été caractérisés en fonction des valeurs des angles dièdres^{6,7}. La nomenclature de ces angles est celle des peptides. Les angles dièdres sont caractérisés par $\Phi 1$, $\Psi 1$, $\Phi 2$, $\Psi 2$ **Tableau 1**.

Type de turns	$\Phi 1$ (°)	$\Psi 1$ (°)	$\Phi 2$ (°)	$\Psi 2$ (°)
I	-60	-30	-90	0
II	-60	120	80	0
III	-60	-30	-60	-30
I'	60	30	90	0
II'	60	-120	-80	0
III'	60	30	60	30
VIa1	-60	120	-90	0
VIa2	-120	120	-90	0
VIb	-120	120	-60	160
VIII	-60	-30	-120	120
IV	-60	10	-50	20

Tableau 1 : Valeurs des angles caractéristiques des β -turns

Les plus communs possèdent une liaison amide de configuration trans dont la distance entre les carbones α des résidus i et $i+3$ est inférieure à 7 Å (coudes- β de type I, II et leurs opposés I' et II')⁸. Les deux structures les plus courantes (I et II) sont représentés dans la figure qui suit **Figure 2**.

⁵ Venkatachalam, C. M. Stereochemical Criteria for Polypeptides and Proteins. V Conformation of a System of Three Linked Peptide Units. *Biopolymers* **1968**, *6*, 1425-1436.

⁶ Venkatachalam, C.M. ; Ramachandran, G.M. Conformation of polypeptide chains. *Ann. Rev. Biochemistry* **1969**, *38*, 45-82.

⁷ Rose, G.D. ; Gierasch, L.M. ; Smith, J.A. Turns in peptides and proteins. *Advances in Protein Chemistry* **1985**, *37*, 1-109.

⁸ Kabsch, W. ; Sander, C. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen bonded and geometrical features. *Biopolymers* **1983**, *22*, 2577-2637.

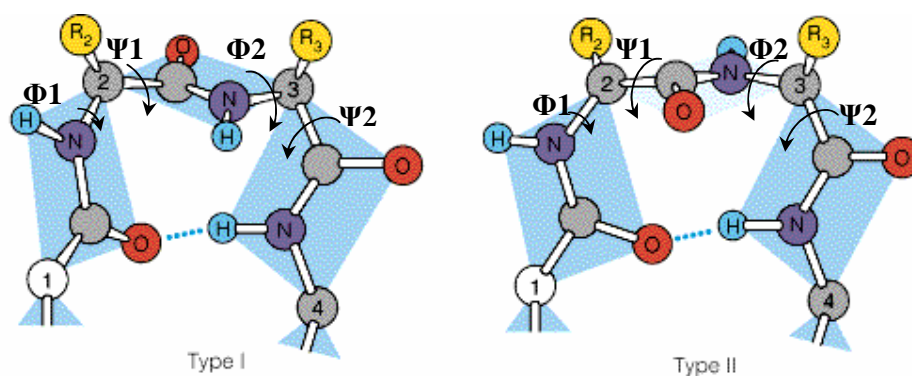


Figure 2 : Exemples de coudes- β

Le type I est très fréquent et le type I' est plus rare, il est néanmoins présent dans les β -hairpins courts⁹. Le type I peut tolérer tous les acides aminés des positions i à $i+3$ sauf la proline en position $i+2$. Cette dernière est plutôt présente en $i+1$ et la glycine en $i+3$ dans les coudes de type I et II. Les acides aminés comportant des chaînes polaires comme l'asparagine, l'acide aspartique, la sérine et la cystéine sont souvent présents en position i et peuvent faire des liaisons hydrogènes avec le NH du résidu $i+2$. Les coudes de type I' adoptent préférentiellement deux glycines en position $i+1$ et $i+2$.

Les coudes de type II n'ont pas de résidus préférentiels pour la position i ¹⁰. La proline est favorisée en position $i+1$, la glycine en $i+2$ et la cystéine, la lysine et la sérine sont prédominantes en $i+3$.

Comme les I', les II' sont surtout présents dans les β -hairpins. Il y a une préférence en position i pour la tyrosine ; pour $i+1$ la glycine et l'acide aspartique ; pour $i+2$ l'asparagine et la sérine et pour la position $i+3$ la thréonine et la glycine.

Les coudes de type III possèdent les mêmes valeurs d'angles dièdres que l'hélice 3_{10} . Cette structure fût aussi mise en évidence par Venkatachalam. Elle sera abordée dans le chapitre concernant les hélices 3_{10} .

Les coudes qui ne correspondaient pas au critères de Lewis ont été placés dans la classe IV¹¹. Ils représentent 35% des coudes existant dans les protéines.

Il existe d'autres coudes peu rencontrés dans les protéines (VIa1, VIa2 et VIb).

Les coudes de type VIII sont les plus communs des turns non-classiques. Les valeurs des angles Phi1 et Psi1 sont les même que pour le type I. La première position montre une préférence pour la proline et la glycine.

⁹ Sibanda, B.L. ; Thornton, J.M. Beta-hairpin families in globular proteins. *Nature* **1985**, 316, 170-174.

¹⁰ Hutchinson, E.G. ; Thornton, J.M. A revised set of potentials for beta-turn formation in proteins. *Prot. Sci* **1994**, 3, 2207-2216.

¹¹ Lewis, P.N. ; Momany, F.A. ; Scheraga, H.A. Chain reversals in proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, 303, 211-229.

Les coudes- β ont le rôle de connecteur entre des structures régulières comme les hélices ou les feuillets β . Ils sont souvent présents à la surface des protéines, contiennent souvent des résidus chargés et jouent un rôle important dans les interactions ligand-récepteur. C'est par exemple le cas dans les récepteurs à sept domaines trans-membranaires où les boucles extra-cellulaires possèdent des structures de type coude- β et sont responsables de la reconnaissance entre le peptide et le récepteur. Ils sont aussi impliqués dans la reconnaissance des anticorps, la phosphorylation, la glycosylation, l'hydroxylation et l'épissage des exons.

II 2 : Les coudes- γ

Les coudes- γ sont des motifs tripeptidiques dont la structure est stabilisée par une liaison hydrogène entre le carbonyle i et le proton amidique $i+2$ **Figure 3**. Il existe deux types de structures en fonction de l'orientation de deux angles dièdres Φ_1 et Ψ_1 qui sont donnés dans le tableau suivant **Tableau 2**.

Coudes- γ	Φ_1 (°)	Ψ_1 (°)
classique	70 à 85	-60 à 70
inversé	-70 à -85	60 à 70

Tableau 2 : Valeurs des angles caractéristiques des coudes- γ

Dans les coudes- γ classiques, la glycine est souvent présente en position i et $i+1$. L'histidine, la lysine et la sérine préfèrent la position $i+2$ qui peuvent former une liaison hydrogène supplémentaire par leur chaîne latérale avec le squelette. La proline est toujours en position $i+1$ en raison de la valeur de l'angle ϕ_1 . Ils ont été classés en quatre familles en fonction des liaisons hydrogènes rencontrés¹².

Dans les coudes inversés, près d'un quart des positions $i+2$ est occupée par l'asparagine qui fait une autre liaison hydrogène par sa chaîne latérale avec l'oxygène i du squelette. La proline peut être dans les deux positions.

¹² Milner-White, E.J. ; Ross, B.M. ; Ismail, R. ; Belhadj-Mostefa, K.; Poet, R. One type of gamma-turn, rather than the other gives rise to chain-reversal in proteins. *J. Mol. Biol.* **1988**, *204*, 777-782.

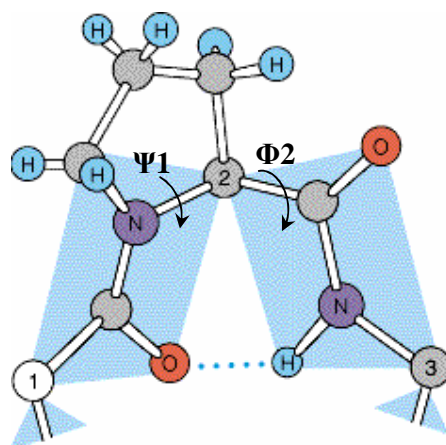


Figure 3 : Conformation d'un coude- γ classique

Les coudes- γ ont pour propriété d'inverser le sens de progression de la chaîne peptidique et on les retrouve souvent dans les boucles et à la fin des β -hairpins. Les coudes- γ inversés sont souvent présents à la fin des hélices α et aux extrémités des feuillets β .

III : Les feuillets

Les feuillets β représentent une structure majeure dans les protéines globulaires, ils représentent un quart des structures régulières rencontrées⁸. L'unité de base du feuillet β est le brin qui possède des valeurs d'angles dièdres de signes opposés. Le feuillet peut être considéré comme une hélice aplatie composée de deux résidus par tour. Les caractéristiques conformationnelles sont données dans le tableau suivant **Tableau 3**.

Feuillet β	Φ (°)	Ψ (°)	Nombre de résidus par tour	Rayon (Å)	Pitch (Å)
antiparallèle	-139	135	2	3.4	6.8
parallèle	-119	113	2	3.2	6.4

Tableau 3 : Valeurs caractéristiques des feuillets β

Les feuillets β sont présents sous deux formes, antiparallèle et parallèle basées sur la direction relative des deux brins. La longueur moyenne des feuillets est constituée de six résidus par brin et ils sont généralement formés de moins de six brins. Les chaînes latérales de deux résidus adjacents sont de part et d'autre du feuillet et comme les hélices α , ils peuvent avoir un potentiel amphiphile (une face hydrophile et une hydrophobe). La cohésion entre les brins est possible grâce à de nombreuses liaisons hydrogènes. Les feuillets β sont formés à partir de la combinaison de différentes régions de la chaîne polypeptidique qui sont souvent éloignés les unes des autres.

Il existe des différences entre les feuillets parallèles et antiparallèles.

Les feuillets antiparallèles sont généralement les plus fréquents car ils sont induits par la présence de boucles ou coudes à leurs extrémités. Les feuillets antiparallèles sont plus stables que les parallèles, cela est dû à une orientation des liaisons hydrogènes entre les chaînes qui est plus favorable. **Figure 4.**

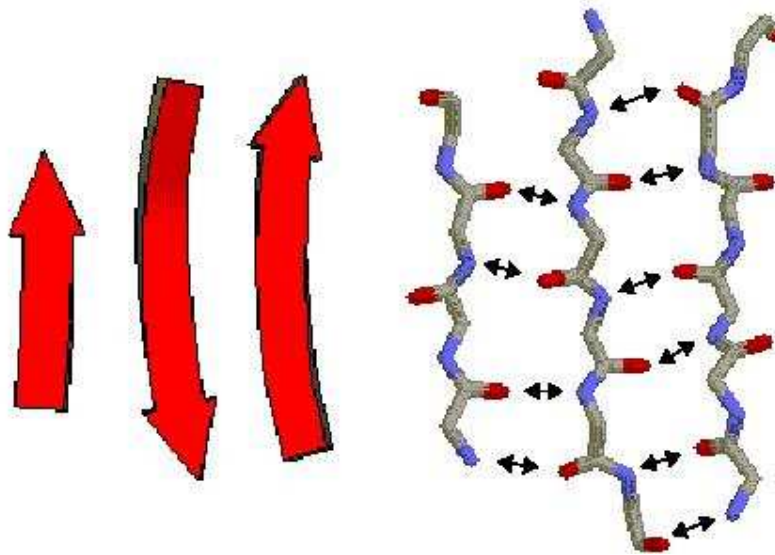


Figure 4 : Représentations des feuillets β antiparallèles

Les feuillets parallèles n'ont pas de liaisons hydrogène perpendiculaires à l'axe du brin, cela a pour effet la formation d'une plus faible interaction dipolaire **Figure 5.**

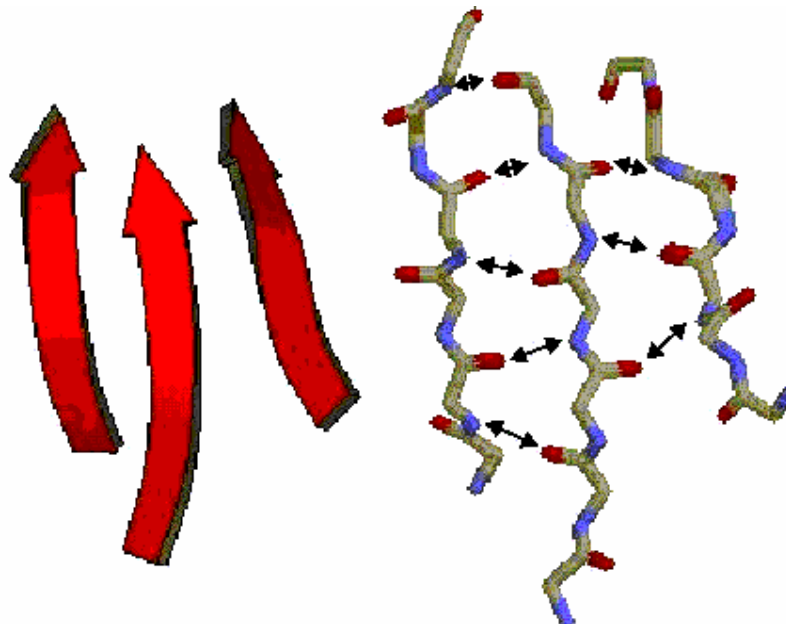


Figure 5 : Représentations des feuillets β parallèles

IV : Les hélices

Les hélices constituent le type de structure secondaire le plus abondant dans les protéines globulaires avec 32 à 38 % des résidus mis en jeu. Les hélices sont construites à partir d'un enchaînement de conformations élémentaires dont les valeurs respectives des angles dièdres Phi et Psi sont répétés. Pour décrire les hélices le long de l'axe de propagation, deux paramètres sont pris en compte, « n » le nombre de résidus par tour d'hélice et « r » la translation par résidu. Le signe positif de la valeur de n décrit par convention une hélice avec un pas à droite.

Dans les protéines, il existe plusieurs types d'hélices, dont la plus abondante est l'hélice α . On rencontre aussi de courts segments d'hélice 3_{10} et les hélices- π sont très rares. D'autres structures hélices sont possibles mais n'ont jamais été mises en évidence dans les protéines, c'est le cas des hélices- γ . D'autres structures homooligomériques de type polyprolines existent dans les peptides.

Dans le tableau suivant les paramètres physiques des différentes hélices sont donnés dans le tableau suivant : **Tableau 4**

Structure	φ°	ψ°	ω°	r Å	p Å	d Å	n	Liaison Hydrogène (CO, HN)	Atomes dans la liaison hydrogène	Nomenclature
α	-57	-47	180	1.5	5.4	4.6	3.6	i, i+4	13	3.6 ₁₃
3_{10}	-49	-26	180	2	6	3.8	3	i, i+3	10	3 ₁₀
π	-57	-70	180	1.2	5	5.6	4.4	i, i+5	16	4.4 ₁₆
PolyPro I	-83	158	0	1.9	6.4		3.38	-	-	
PolyPro II	-78	149	180	3.12	9.3		-3	-	-	
PolyGly II	-80	150	180	3.1	9.3		3	i, i+2		

Tableau 4 : Paramètre des caractéristiques des hélices protéiniques. r : translation par résidu, p : pitch, d : diamètre du squelette, n : nombre de résidus par tour.

IV 1 : L'hélice α

L'hélice α fut décrite par Pauling² en 1951 qui prédit que cette structure devait être stable et énergétiquement favorable dans les protéines.

Elle possède 3,6 résidus par tour d'hélice soit une translation de 5,4 Å. Elle est stabilisée par des liaisons hydrogènes de 2.86 Å entre le carbonyle en position i et le proton amidique en position i+4 **Figure 6**. Tous les CO et NH sont impliqués dans des liaisons hydrogènes à l'exception des trois premier NH et des trois derniers CO de l'hélice. Comme toutes les liaisons hydrogènes sont parallèles et orientées dans le même sens, l'hélice α est très polarisée (formation d'un macrodipôle). Son moment dipolaire correspond à une charge de

0.5-0.7 Debye à chaque extrémité. Le compactage des atomes est favorable aux interactions de Van Der Waals. Le diamètre de l'hélice est de 4.6 Å et ne permet pas de laisser passer une molécule ou un ion. Les chaînes latérales sont dirigées vers l'extérieur. Les valeurs d'angles dièdres idéaux théoriques données dans le tableau sont, dans les protéines compris entre -57° et -71° pour φ et -34° et -48° pour ψ . Cela est fonction de la nature des résidus et de la solvation.

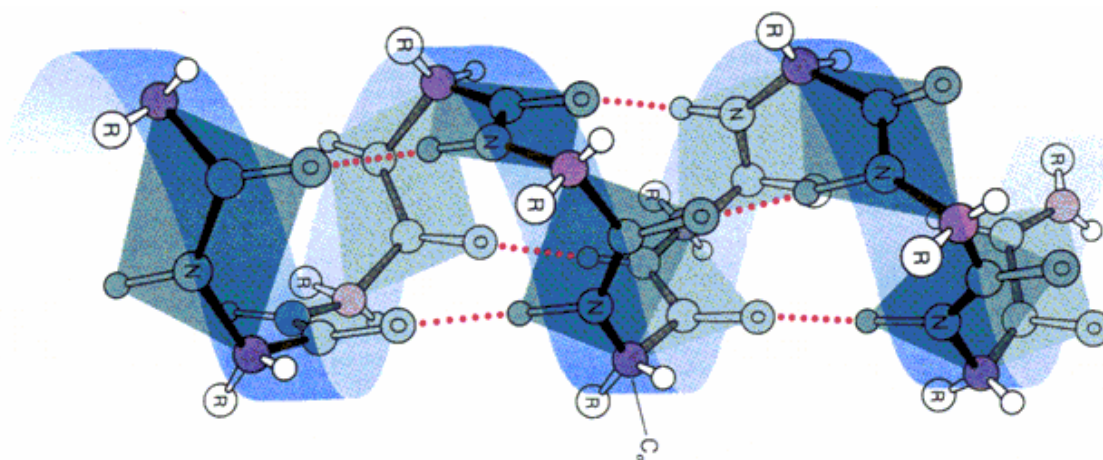


Figure 6 : Représentation de l'hélice α .

La stabilité des hélices est fonction de plusieurs paramètres :

- La nature des acides aminés est grandement impliquée ; ainsi Ala, Arg, Lys, Glu, Leu et Met sont très favorables à la formation d'hélice. Par contre Gly est très défavorable (souvent rencontré en fin d'hélice) et Pro est un briseur d'hélice mais qui est souvent présent avant le premier tour de l'hélice du côté C-terminal.
- La longueur de l'hélice α est importante. La plupart des hélices présentes dans les protéines contiennent entre 10 et 15 résidus ; en dessous de cette longueur c'est la forme 3_{10} qui prédomine. Dans les solvants protiques comme le méthanol ou l'eau, 15 résidus sont nécessaires pour obtenir une structure en hélice α ¹³.
- La répartition des résidus dans l'hélice est primordiale. La nature hydrophile et hydrophobe des chaînes latérales est responsable de la structuration de l'hélice. Ainsi de nombreuses hélices globulaires ont un caractère amphiphile avec une face hydrophobe (dirigée vers l'intérieur) et une face hydrophile (dirigée vers l'extérieur). L'organisation de la séquence du peptide est donc responsable de l'amphiphilie de l'hélice.

¹³ Quinkert, G. ; Egert, E. ; Griesinger, C. Peptides: synthesis, structure and applications. Gutte, B., Ed.; Academic Press: San Diego, 1995

- L'environnement de l'hélice est souvent responsable de sa formation. Ainsi l'augmentation de la concentration en peptide (*in-vitro*) favorise la forme structurée au dépend de la pelote statistique. Les autres motifs peptidiques adjacents jouent le même rôle que la concentration et les interactions hydrophobes jouent probablement un rôle important dans la formation des structures secondaires¹⁴.

IV 2 : L'hélice 3₁₀

L'hélice 3₁₀ n'est pas un élément structural fréquent dans les protéines. Elle fut proposé par Huggins en 1943¹⁵. Selon la base de données de Kabsch et Sander¹⁶ seulement 3.4 % des résidus sont dans cette conformation.

Elle possède 3 résidus par tour d'hélice avec une translation de 6 Å. Elle est stabilisée par des liaisons hydrogènes entre le carbonyle en position *i* et le proton amidique en position *i*+3. Elle est donc plus longue que l'hélice α , pour le même nombre de résidus **Figure 7**.

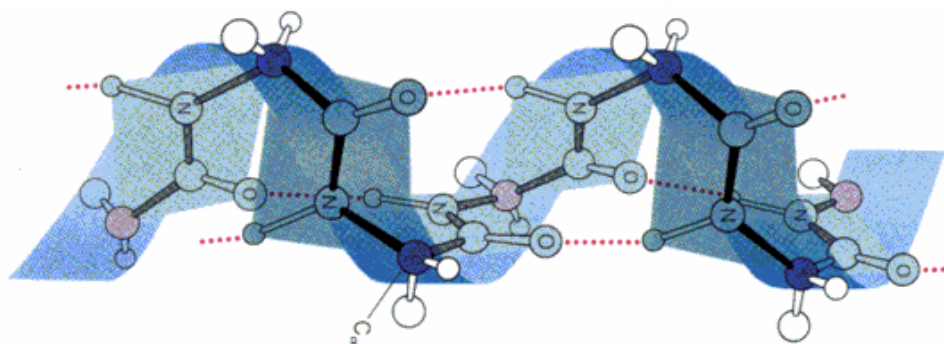


Figure 7 : Représentation de l'hélice 3₁₀.

L'orientation des liaisons hydrogènes forme un dipôle, mais ces dernières ont un décalage de 30° par rapport à l'axe de l'hélice.

Les hélices 3₁₀ sont souvent rencontrées dans les protéines aux extrémités C et N terminales des hélices α ¹⁷ et comportent entre 4 et 6 résidus¹⁸. Pour les petites séquences, la forme 3₁₀ est prédominante sur la forme α ¹⁹. Il existe des différences entre les résidus qui composent l'hélice 3₁₀ et l'hélice α , cela a été observé dans des structures cristallines²⁰.

¹⁴ De Grado, W.F. Desing of peptides and proteins. *Adv. Prot. Chem.*, **1988**, 39, 51-124.

¹⁵ Huggins, M.L. The structure of fibrous proteins. *Chem. Rev.*, **1943**, 32, 195-218.

¹⁶ Kabsch, W.; Sander, C. Dictionary of protein structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, **1983**, 22, 2577-2637.

¹⁷ Némethy, G.; Phillips, D.C.; Leach, S.J.; Scheraga, H.A. A second right-handed helical structure with parameters of the Pauling-Corey alpha-helix. *Nature*, **1967**, 214, 363-365.

¹⁸ Bolin, K.A.; Millhauser, G.L. α and 3₁₀: The Split Personality of Polypeptide Helices. *Acc. Chem. Commum.*, **1999**, 32, 1027-1033.

¹⁹ Barlow, D.J.; Thornton, J.M. Helix geometry in proteins. *J. Mol. Biol.*, **1988**, 201, 601-619.

²⁰ Karpen, M.E.; De Haset, P.L.; Neet, K.E. Differences in the amino acid distributions of 3₁₀-helices and alpha-helices. *Protein Sci* **1992**, 1, 1333-1342.

IV 3 : L'hélice π

L'hélice π ou hélice 4.4_{16} est une structure secondaire extrêmement rare dans les protéines. Elle a été prédite par Donohue en 1953²¹ et découverte dans une catalase²² et dans quelques enzymes très récemment.

Elle possède 4,4 résidus par tour d'hélice avec une translation de 5 Å. Elle est stabilisée par des liaisons hydrogènes entre le carbonyle en position i et le proton amidique en position $i+5$. Elle est donc plus courte que l'hélice α , pour le même nombre de résidus **Figure 8**.

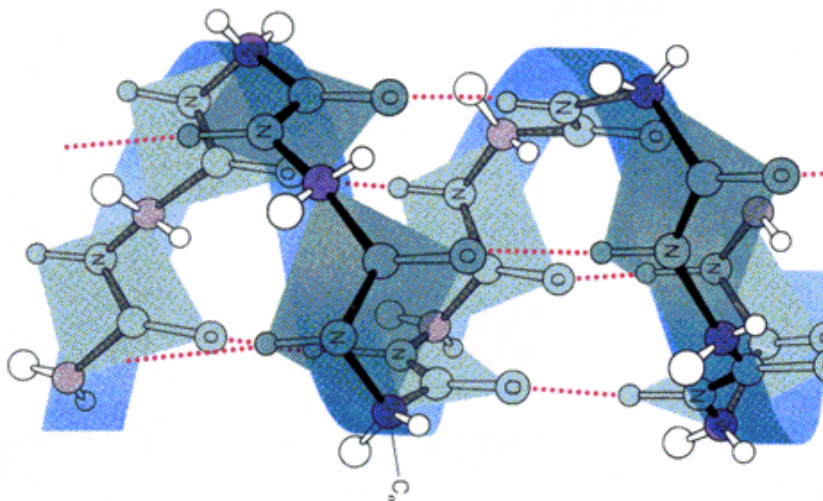


Figure 8 : Représentation de la π -hélice.

L'hélice π est très défavorable pour trois raisons : La valeur des angles dièdres est énergétiquement défavorable par rapport à l'hélice α ²³, le trou central de 1 Å de diamètre est trop petit pour accepter une molécule d'eau et engendre une perte des interactions de Van Der Waals, et quatre résidus doivent être correctement alignés pour permettre la création de la liaison hydrogène $i, i+5$ ²⁴.

²¹ Donohue, J. Hydrogen bonded helical configuration of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1953**, 39, 470-478.

²² Vainshtein, B.K.; Melik-Adammyan, W.R.; Barynin, V.V.; Grebenko, A.I.; Borisov, V.V. three-dimensional structure of catalase from penicillium vitale at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biom.* **1986**, 188, 49-61.

²³ Low, B.W.; Greenville-Wells, H.J. Generalized mathematical relationships for polypeptide chain helices. The coordinates of the pi-helix. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1953**, 39, 785-801.

²⁴ Rohl, C.A.; Doig, A.J. Models for the 3_{10} -helix/coil, pi-helix/coil, and alpha-helix/ 3_{10} -helix/coil transitions isolated in peptides. *Protein Sci* 1996, 5, 1687-1696.

IV 4 : L'hélice polyPro I

La structure polyproline I^{25,26} a la particularité de ne posséder que des liaisons amides cis dont la valeur des angles dièdres est de -83° et 158° pour φ et ψ . La forme I est une hélice avec un pas à droite et possède 3,3 résidus par tour **Figure 9**. Cette forme est prédominante dans le propanol et le butanol. Cette structure n'a jamais été observée dans les protéines.

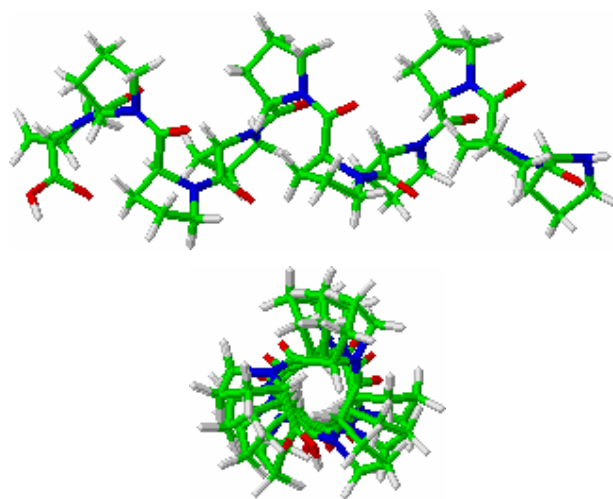


Figure 9 : Représentations de l'hélice polyproline I

IV 5 : L'hélice polyPro II

La structure polyproline II²⁷ ne possède que des liaisons amides trans dont la valeur des angles dièdres est de -78° et 149° pour φ et ψ . C'est une hélice avec un pas à gauche et possède 3 résidus par tour **Figure 10**. Cette forme est prédominante dans l'eau, l'acide acétique et l'alcool benzylique.

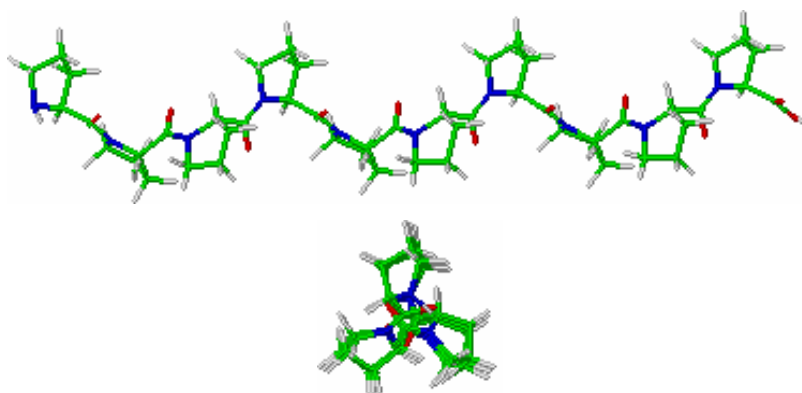


Figure 10 : Représentations de l'hélice polyproline II

²⁵ Traub, W., Schmueli, U. Aspect of protein structure, Ramachandran, G.N.; *Academic Press, London*, **1963**, 81

²⁶ Ramachandran, G.N.; Sasisekharan, V. Conformation of polypeptides and proteins. *Advan. Protein Chem.*, **1968**, 23, 283-438.

²⁷ Cowan, P.M. ; Mc Gavin, S. Structure of poly-l-proline. *Nature*, **1955**, 176, 470-478.

Cette structure est présente dans un grand nombre de protéines²⁸ mais ne représente que 2 % des résidus. La longueur des segments de PPII (PolyProline II) est généralement courte (4 à 8 résidus)²⁹. La PPII est plus flexible que l'hélice α du fait de l'absence de liaisons hydrogènes. Les PPII sont surtout présentes à la surface des protéines et ont une préférence pour les résidus hydrophiles (Gln, Ser et Arg) et pour les prolines. Les PPII sont souvent des connecteurs entre d'autres structures secondaires.

Elles jouent un rôle important dans les interactions protéine-protéine, c'est le cas avec les domaines SH3 qui interagissent avec les régions riches en proline^{30,31}.

IV 6 : L'hélice polyGly II

Comme pour la polyproline, il existe deux formes régulières pour cet homooligomère, la forme I qui est en feuillet β et la forme II qui est en hélice qui est très semblable à la polyproline II. Cette structure a été prédite par Ramachandran³². Elle possède deux angles dièdres dont la valeur (ϕ , ψ) est de -80° et 150° et trois résidus par tour.

²⁸ Williamson, M.P. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.*, **1994**, 297, 249-260.

²⁹ Adzhubei, A.A.; Sternberg, M.J.E. Left-handed polyproline II helices commonly occur in globular proteins. *J. Mol. Biom.* **1993**, 229, 472-493.

³⁰ Pawson, T. SH2 and SH3 domains in signal transduction. *Adv. Cancer Res.*, **1994**, 64, 87-110.

³¹ Pawson, T. Protein modules and signaling networks. *Nature*, **1995**, 373, 573-580.

³² Ramachandran, G.N. ; Sasisekharan, V. ; Ramakrishnan, G.N. Molecular structure of polyglycine II. *Biochim. Biophys. Acta* , **1966**, 112, 168-170.

V : Identification des structures secondaires

La détermination de la structure secondaire des protéines est un exercice difficile mais des outils performants sont à la disposition des chercheurs. Il existe plusieurs techniques pour réaliser des analyses à l'état solide ou en solution.

V 1 : La cristallographie

La cristallographie a été une des premières méthodes pour identifier les structures des protéines et reste l'outil le plus performant pour connaître la structure exacte d'une molécule.³³

La première condition pour pouvoir résoudre la structure tri-dimensionnelle d'une protéine par cristallographie rayon X est d'avoir un cristal bien ordonné qui diffracte correctement.³⁴ Le problème rencontré avec les protéines est la difficulté d'obtenir des cristaux réguliers.

Il existe deux techniques qui sont applicables en fonction de la structure à étudier.

La diffraction de fibres où la technique consiste à placer une fibre dans le faisceau de rayon-X et un film photographique plus loin. L'empreinte de la diffraction est composée de points ou de taches alignées qui permettent de reconstruire la structure de l'hélice.

La diffraction du cristal où la technique consiste à placer un cristal au milieu du faisceau de rayon-X et un détecteur électronique enregistre les taches de diffraction recueillies et un traitement informatique permet d'obtenir la structure tri-dimensionnelle de la protéine.

V 2 : La RMN

La spectroscopie RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) est un outil alternatif puissant à la cristallographie pour la détermination des structures macromoléculaires^{35,36}. Le principal avantage de la RMN est l'utilisation de cette technique en solution³⁷ mais cette technique est limitée aux structures de moins de 40 kD et elle nécessite une grande quantité de produit.

³³ Wilson, H.R. Diffraction of x-rays by proteins, nucleic acids and viruses. **1966**, London: Edward Arnold.

³⁴ Mc Pherson, A. and al. The science of macromolecular crystallization. *Structures*, **1995**, 3, 835-844.

³⁵ Wagner, G.; Braun, W.; Havel, T.F.; Schaumann, T.; Nobuhiro, G.; Wuthrich, K. Protein structures in solution by nuclear magnetic resonance and distance geometry. The polypeptide fold of the bovine pancreatic trypsin inhibitor determined using two different algorithms, DISGEO and DISMAN. *J. Mol. Biol.* **1987**, 196, 611-639.

³⁶ Clore, G.M.; Gronenborn, A.M. Determination of three-dimensional structures of proteins and nucleic acids in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Crit. Rev. Biochem.*, **1989**, 24, 479-564.

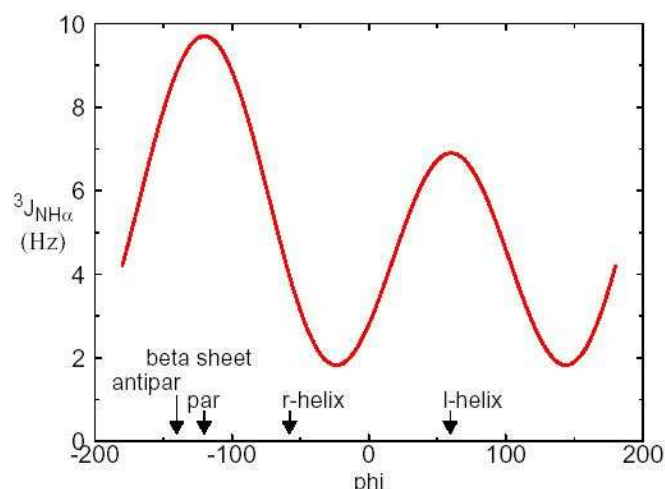
³⁷ Wuthrich, K. Protein structure determination in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Science*, **1989**, 243, 45-50.

La détermination de structure par RMN est basée sur la mesure des interactions entre les noyaux des spins, observés à travers l'espace (effets Overhauser nucléaires NOE)³⁸ et les liaisons chimiques (couplage scalaire)³⁹.

La constante de couplages entre les protons séparés par trois ou plusieurs liaisons covalentes peut être mesurée. Cette valeur donne une information sur l'angle de torsion grâce à l'équation de Karplus où A, B et C sont des constantes empiriques pour chaque type de constante de couplage.

$${}^3J = A\cos(\phi) + B\cos(2\phi) + C$$

Malheureusement, l'angle de torsion ne peut généralement pas être attribué sans ambiguïté par cette équation car plusieurs angles correspondent à une valeur de 3J **graphe 1**.



graphe 1 : Diagramme de Karplus

Des constantes de couplage 3J entre le proton α et le proton β , apportent des informations sur la valeur de l'angle dièdre de la chaîne latérale χ_1 . Les valeurs des angles ϕ et χ_1 sont des paramètres importants pour la détermination de la structure tridimensionnelle.

Les effets NOE permettent de mesurer la distance entre deux protons séparés de moins de 5 Å. Il existe deux types d'effets NOE : ceux entre les protons d'un même résidu et ceux avec les protons de résidus adjacents.

³⁸ Wright, P. What can two-dimensional NMR tell us about proteins? *Trends Biochem. Sci.*, **1989**, *14*, 255-260.

³⁹ Karplus, M. ; Mc Cammon, J.A. Dynamics of proteins: elements and function. *Annu. Rev. Biochem.*, **1983**, *53*, 263-300.

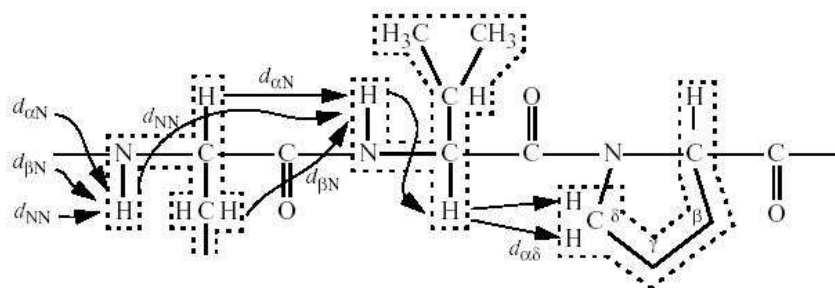


Figure 11 : Segment d'une chaîne polypeptidique avec les différents effets NOE possibles

Ces informations courtes distances aident à déterminer la structure tri-dimensionnelle des peptides et des protéines. Dans les hélices, nous sommes en présence de courtes distances entre le proton α du résidu i et le proton amidique du résidu $i+3$.

V 3 : La spectroscopie Infra-Rouge (IR)

La spectroscopie infrarouge mesure l'excitation vibrationnelle des atomes autour des liaisons qui les unissent. L'empreinte observée dépend de la nature du groupe fonctionnel et de l'environnement proche. Il existe plusieurs modes de vibrations ; celles d'élongations et de déformations angulaires. Celles qui nous intéressent sont les vibrations d'élongations qui sont plus intenses. La liaison amide possède plusieurs bandes qui dépendent de la nature de la source⁴⁰. La bande I ($1600-1690\text{ cm}^{-1}$) dérive de l'élongation de la liaison CO, elle est la plus utilisée pour déterminer la structure secondaire. La bande II ($1480-1575\text{ cm}^{-1}$) dérive de l'élongation de CN et à la liaison de NH mais elle est peu employée car cette bande coïncide avec celle de l'eau. La bande III ($1229-1301\text{ cm}^{-1}$) est moins intense, elle correspond aussi à l'élongation de CN et à la liaison de NH. Les fréquences observées sont donc différentes en fonction de la nature de la structure secondaire.⁴¹ **Tableau 5**

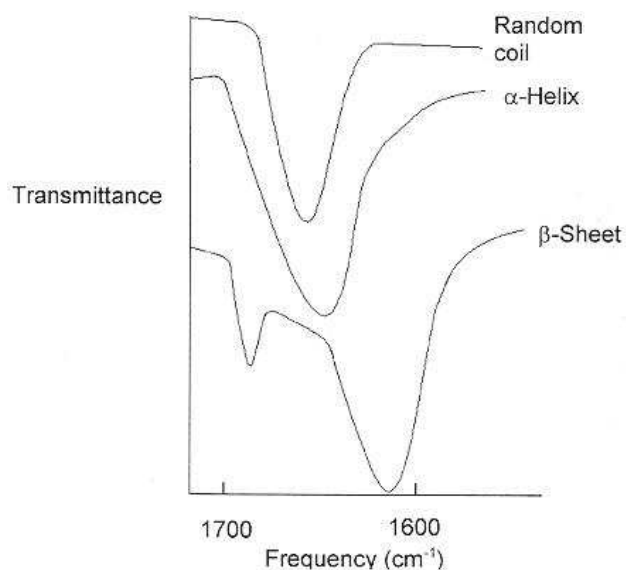
Fréquence cm^{-1}	Bande	force	Structure secondaire
1665-1672	Amide I	Intense	Feuillet β
1660-1670	Amide I	Intense	random coil
1645-1655	Amide I	Intense	Hélice α
1270-1300	Amide III	Faible	Hélice α
1243-1253	Amide III	modérée	random coil
1229-1235	Amide III	Intense	Feuillet β

Tableau 5 : Fréquences IR des différentes structures secondaires

⁴⁰ Susi, H.; Byler, D.M. Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy of enzymes. *Methods Enzymol.*, **1986**, 130, 290-311.

⁴¹ Krimm, S.; Bondekar, J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv. Prot. Chem.*, **1986**, 38, 181-364.

Dans le graphe qui suit sont représentés les spectres IR des différentes structures secondaires.



graphe 2 : Types de structures secondaires des peptides en fonction de la fréquence vibrationnelle

La spectroscopie IR ne permet que de donner des informations sur la nature des structures secondaires qui composent la protéine.

V 4 : Le dichroïsme circulaire

La spectroscopie de dichroïsme circulaire⁴² est un outil très sensible pour détecter les structures secondaires des peptides et protéines. Il mesure la différence d'absorption de la lumière polarisée circulairement à gauche et à droite. Les protéines ont une absorption dans la région ultraviolet par les liaisons amides et les chaînes latérales. Il existe plusieurs transitions pour un chromophore, ainsi pour un peptide, la transition de plus basse énergie est observée pour la transition $n \rightarrow \pi^*$ entre 210 et 220 nm et une autre $\pi \rightarrow \pi^*$ plus forte en énergie entre 185 et 190 nm. Les propriétés optiques des protéines sont fonctions de la nature des structures secondaires qui la composent.

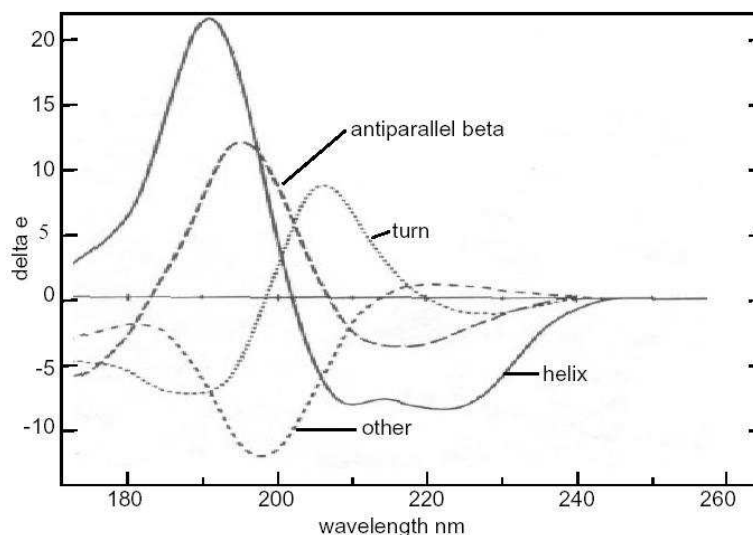
L'hélicité mesurée est donnée en degrés $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$.

$$[\Theta] = \Theta M / (10000cl)$$

Où M est la masse molaire (g.mol^{-1}), c est la concentration (g.ml^{-1}) et l est la longueur de la cuve (cm).

⁴² Johnson, W.C. Protein secondary structure and circular dichroism : A practical guide. *Proteins Struct. Funct. Genet.*, **1990**, 7, 205-214.

Ainsi chaque structure secondaire possède un profil caractéristique en dichroïsme circulaire **graphe 3** :



graphe 3 : Spectres de dichroïsme circulaire de structures secondaires pures

L'hélice α ^{43,44} possède une bande négative vers 222 nm correspondant à une transition $n \rightarrow \pi^*$, une vers 208 nm résultant de la somme des deux transitions, un zéro vers 202 nm et une bande positive intense vers 192 nm. Lorsque l'on veut déterminer le pourcentage d'hélicité d'un peptide⁴⁵, on le fait à 222 nm en utilisant la formule suivante :

$$\text{Hélicité (\%)} = ([\Theta]_{222} - [\Theta]_{222}^{\circ}) / [\Theta]_{222}^{100}$$

Où $[\Theta]_{222}$ est l'hélicité mesurée à 222 nm, $[\Theta]_{222}^{\circ}$ et $[\Theta]_{222}^{100}$ représentent 0 et 100 % de la forme hélice dont la valeur est de -2340 et -30300 deg cm² dmol⁻¹.

Le feuillet β ⁴⁶ antiparallèle possède une bande négative vers 216 nm, un zéro vers 207 nm et une positive vers 195 nm.

Les coudes- β ^{47,48} n'ont pas tous le même profil, ainsi ceux de type II possèdent une faible bande négative vers 225 nm, une forte bande positive entre 200 et 205 nm et une forte

⁴³ Moffitt, W.J. Optical rotatory dispersion of helical polymers. *J. Chem. Phys.*, **1956**, 25, 467-478.

⁴⁴ Moffitt, W.J.; Fitts, D.D.; Kirkwood, J.G. Theory of optical activity of helical polymers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1957**, 43, 723-730.

⁴⁵ Chen, Y.H. ; Yang, J.T. ; Martinez, H.M. Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion. *Biochemistry*, **1972**, 11, 4120-4131.

⁴⁶ Woody, R.W. Optical properties of polypeptides in the β -conformation. *Biopolymers*, **1969**, 8, 669-683.

⁴⁷ Woody, R.W. Circular Dichroism of peptides. *The peptides. Academic Press, New York*, **1985**, 15-144.

⁴⁸ Perczel, A. ; Hollosi, M. Circular Dichroism and the conformational analysis of biomolecules. *Fasman, G.D.; Plenum Press, New York*, **1996**, 285-380.

bande négative entre 180 et 190 nm. Les profils dichroïques des coudes- β de type I et III ressemblent à celui de l'hélice α .

En ce qui concerne le profil dichroïque de l'hélice de polyproline⁴⁹, il existe deux conformères différents donc deux types d'hélices distinctes. L'hélice polypro I possède une bande unique positive intense à 215 nm. Le profil de l'hélice polypro II a une ressemblance avec le spectre de la triple hélice du collagène. Elle est composée d'une bande négative intense à 205 nm.

Les formes non-organisées (random-coil) possèdent un profil avec une bande positive faible vers 218 nm et une bande négative intense vers 200 nm.

Les informations obtenues par dichroïsme circulaire d'une protéine sont la somme des fractions de structures secondaires qui la composent. Des programmes informatiques sont capables de déterminer la proportion de chaque type de structures secondaires⁵⁰.

Le dichroïsme circulaire donne des indications sur le type et la proportion de structures secondaires présents dans la molécule, il ne permet pas de donner une représentation tri-dimensionnelle.

⁴⁹ Manning, M.C. ; Woody, R.W. Theoretical CD studies of polypeptide helices: examination of important electronic and geometric factors. *Biopolymers*, **1991**, *31*, 569-586.

⁵⁰ Bode, K.A. ; Applequist, J. Globular Protein Ultraviolet Circular Dichroic Spectra. Calculation from Crystal Structures via the Dipole Interaction Model *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 10938-10946.

VI : Conclusion

Les peptides et les protéines sont constitués d'un arrangement de structures secondaires (hélices, feuillets, coudes...) qui confèrent à la molécule des propriétés particulières (protéines fibreuses ou globulaires). Nous nous sommes attachés dans ce chapitre à faire l'inventaire des différentes structures secondaires présentes dans les peptides et de montrer quelques techniques de caractérisation.

Dans ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à des structures secondaires de type hélice. Nous avons exploré la possibilité de construire des hélices artificielles à partir d'enchaînements de motifs pseudo-peptidiques ou peptidomimétiques.

Chapitre 2 : Hélices artificielles

I : Présentation

I 1 : Introduction et définitions

Les oligomères artificiels qui adoptent des conformations similaires à celles des protéines, des polysaccharides et des acides ribonucléiques ou désoxyribonucléiques sont des sujets très intéressants pour les chimistes et ont un large éventail d'applications. Dans ce travail, nous avons axé nos recherches sur des structures proches de celles des peptides ou des protéines, c'est à dire des structures peptidomimétiques.

Le terme de « foldamer⁵¹ » a été employé pour la première fois par Samuel Gellman en 1996 pour désigner les nouveaux polymères qui ont une tendance intrinsèque à se replier. En 1998 il donne la première définition de foldamer⁵² : « *tout polymère qui a une forte tendance à adopter une conformation compacte spécifique* ». ⁵³

Hill et al⁵⁴ ont remarqué que toutes les molécules décrites dans la littérature comme « foldamers » sont du fait des oligomères et non pas des polymères, que le mot « compact » est ambigu et désigne généralement des protéines globulaires à haut poids moléculaire et qu'il n'est pas tenu compte de l'aspect dynamique du phénomène de repliement. Ils ont alors restreint la définition à : « *tout oligomère qui se replie dans un état conformationnel ordonné en solution. Les structures obtenues sont stabilisées par des interactions non-covalentes entre unités monomériques non-adjacentes. Il y a deux classes principales de foldamers : les mono-caténaires qui se replient seulement (peptidomimétiques et leurs analogues non-naturels) et les multi-caténaires qui à la fois se replient et s'associent (nucléotidomimétiques et leurs analogues non-naturels)* ». ⁵⁵ Il suggère que les foldamers ne peuvent pas être de bons mimes de biomacromolécules, il propose alors un autre terme, « tylogomer » qui s'applique aux molécules artificielles de haut poids moléculaire et qui est spécifique des structures tertiaires et quaternaires.

⁵¹ Appella, D. H. ; Christianson, L. A. ; Karle, I. L. ; Powell, D. R. ; Gellman, S. H. β -Peptide foldamers: robust helix formation in a new family of β -amino acid oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13071-13072.

⁵² Gellman, S. H. Foldamer: a manifesto. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173-180.

⁵³ « any polymer with a strong tendency to adopt a specific compact conformation ».

⁵⁴ Hill, J. S. ; Mio, M. J. ; Prince, R. B. ; Hughes, T. S. ; Moore, J. S. A field guide to foldamers. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3893-4011.

⁵⁵ any oligomer that folds into a conformationally ordered state in solution, the structures of which are stabilized by a collection of noncovalent interactions between nonadjacent monomer units. There are two major classes of foldamers: single-stranded foldamers that only fold (peptidomimetics and their abiotic analogues) and multi-stranded foldamers that both associate and fold (nucleotidomimetics and their abiotic analogues).

D'autres types structuraux ne correspondant pas à la définition proposée par Moore sont capables de générer des structures de type hélice en absence de liaisons hydrogène. Les forces mises en jeu pour conférer à la molécule une cohésion sont de toute autre nature.

Elles peuvent mettre en jeu des interactions de type solvophobiques entre des groupements aromatiques (interactions π/π) comme cela a été mis en évidence par Lokey et Iverson⁵⁶ qui ont baptisés ce type de structure des « aedamers » (aromatic electron donor-acceptor interactions). Il en est de même pour certains oligo-guanidiniums,⁵⁷ *N*-benzyl phenylpyridinium cyclophanes,⁵⁸ oligothiophènes⁵⁹ et oligo *m*-phénylène éthylnylènes.⁶⁰

D'autres polymères adoptent des structures régulières sans mettre en jeu de liaisons hydrogène mais en utilisant un métal de coordination pour donner des molécules de type « hélicates ». ⁶¹ Enfin certaines molécules ont des structures rigides qui les contraignent à adopter des structures ordonnées en hélice. C'est le cas par exemple des polyprolines,⁶² de certains polyisocyanides,⁶³ polyisocyanates,⁶⁴ poly[(triarylméthyl) métacrylates]⁶⁵ et polyaldehydes.^{66,67}

I 2 : Repliement en hélice des foldamers

Le mode de repliement des structures artificielles en hélice peut être expliqué selon un processus thermodynamique. Il existe une transition entre l'état déplié le plus haut en énergie et l'état replié le plus stable. C'est une phase coopérative de transition qui est initiée par un

⁵⁶ Lokey, R. S.; Iverson, B. L. Synthetic molecules that fold into a pleated secondary structure in solution. *Nature* **1995**, *375*, 303-305.

⁵⁷ Tanatani, A.; Kagechika, H.; Azumaya, I.; Yamaguchi, K.; Shudo, K. (cis)-Preference of *N,N'*-dimethyl-*N,N'*-diphenylguanidine and the guanidinium salt. Construction of a water-soluble aromatic layered structure. *Chem. Pharm. Bull.*, **1996**, *44*, 1135-1137.

⁵⁸ Martin, C.B.; Patrick, B.O.; Cammers-Goodwin, A. Contributions of the Ionic Lattice, Nonangular Substituents, and Perfluoroaromatic μ -Stacking to the Solid States of Derivatives of *N*-Benzyl-2-phenylpyridinium Bromide *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 7807-7812.

⁵⁹ Sakurai, S.; Goto, H.; Yasjima, E. Synthesis and Chiroptical Properties of Optically Active, Regioregular Oligothiophenes *Org. Lett.*, **2001**, *3*, 2379-2382.

⁶⁰ Moore, J.S.; Nelson, J.C.; Prince, R.B. fourth french symposium, Brussel, Belgium, **1999**, 263-290.

⁶¹ Lehn, J.-M.; Rigault, A.; Siegel, J.; Harrowfield, J.; Chevrier, B.; Moras, D. Spontaneous assembly of double-stranded helicates from oligopyridine ligands and copper(I) cations: structure of an inorganic double helix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1987**, *84*, 2565-2569.

⁶² Berger, A.; Kurtz, J.; Katchalski, E. Poly-L-proline. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 5552-5554.

⁶³ Kramer, P.C.J.; Nolte, R.J.M.; Drenth, W. Screw sense selective polymerization of achiral isocyanides catalyzed by optically active nickel(II) complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6818-6825.

⁶⁴ Grenn, M. M.; Peterson, N. C.; Sato, T.; Teramoto, A.; Cook, R.; Lifson, S. A helical polymer with a cooperative response to chiral information. *Science*, **1995**, *268*, 1860-1866.

⁶⁵ Nakano, T.; Okamoto, Y.; Hatada, K. Asymmetric polymerization of triphenylmethyl methacrylate leading to a one-handed helical polymer: mechanism of polymerization. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1318-1329.

⁶⁶ Ute, K.; Hirose, K.; Kashimoto, H.; Hatada, K.; Vogl, O. Haloaldehyde polymers. 51. Helix-sense reversal of isotactic chloral oligomers in solution. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6305-6306.

⁶⁷ Noe, C.R.; Miculka, C.; Bats, J.W. Helicity of oligomeric formaldehyde. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1994**, *33*, 1476-1478.

modèle de nucléation-propagation.⁶⁸ On considère un oligomère qui forme une hélice avec N_i segments par tour avec ω conformations possibles pour chaque segments. Si les contacts interchaînes de chaque résidu contribuent à abaisser l'énergie ε du système, on peut alors considérer un changement d'entropie et d'énergie du système à chaque étape. Le choix conformationnel ω pour le résidu suivant est ainsi réduit, la conformation est ordonnée par l'étape précédente ce qui tend à abaisser à chaque étape l'entropie totale du système. Chaque arrangement d'un segment diminue l'entropie conformationnelle de $k_B \ln(\omega)$ et lorsque qu'un tour d'hélice est construit, nous avons une perte d'entropie de $N_i k_B \ln(\omega)$. C'est le phénomène de nucléation de formation de l'hélice. Une fois que cette nucléation est terminée, le processus de propagation se met en place en convertissant les segments non ordonnés en segments ordonnés en hélice. Ainsi il y a une accélération de la formation de l'hélice, ce qui explique qu'elle se forme en quelques microsecondes.⁶⁹

A noter aussi que la formation de l'hélice sera d'autant plus rapide que le nombre de segments par tour d'hélice sera faible. L'environnement de la molécule joue un rôle important pour la formation de l'hélice, que ce soit la molécule voisine (concentration) ou les propriétés du solvant. A rappeler aussi, l'importance de la température qui augmente l'énergie totale du système et qui est un facteur important pour la dénaturation des structures régulières.

I 3 : Synthèse, purification et caractérisation des foldamers

Ici, le challenge du chimiste est d'obtenir des molécules de haut poids moléculaire avec des longueurs de chaînes contrôlées mais cela est impossible dès que la longueur devient trop importante. Il ne peut pas contrôler la pureté des produits, et comme dans le cas de la polymérisation, il a tendance à obtenir une répartition gaussienne autour de la masse souhaitée. Cela complique d'autant plus les étapes de la purification. Ainsi le champs d'application est restreint à des molécules de taille moyenne.

Trois approches différentes pour obtenir des oligomères ont été développées : pas à pas, itérative et polymérique :

- L'extension pas à pas de la chaîne oligomérique est longue et nécessite pour les longues séquences des contrôles réguliers.
- La croissance itérative (par blocs) permet d'obtenir plus rapidement la chaîne oligomérique mais cela impose une séquence adaptée.⁷⁰

⁶⁸ Poland, D. ; Scheraga, H. theory of helix-coil transitions in biopolymers. *Academic Press*, New-York, **1970**.

⁶⁹ Clarke, D.T. ; Doig, A.J. ; Stapley, B.J. ; Gareth, R.J. The α -helix folds on the millisecond time scale. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, *96*, 7232-7237.

⁷⁰ Tour, J. M. Conjugated Macromolecules of Precise Length and Constitution. Organic Synthesis for the Construction of Nanoarchitectures. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 537-554.

- L'approche par croissance polymérique est très rapide mais ne permet pas de contrôler la taille et la séquence du polymère. Cette stratégie n'est pas une méthode de choix pour l'obtention de foldamers.

En ce qui concerne la purification : la synthèse par la méthode pas à pas peut conduire, si les rendements de chaque étape n'est pas total, à un brut réactionnel très hétérogène. Cela complique donc la purification, cependant cette stratégie reste la plus employée car elle est automatisable.

Pour la synthèse par blocs, l'inconvénient majeur est la racémisation (pour les peptides et certains pseudo-peptides) ; il y a aussi le choix de l'orthogonalité entre les protections chimiques temporaires et permanentes qui peut poser quelques problèmes. Deux autres facteurs contraignants sont l'encombrement des blocs qui diminuent généralement les rendements de synthèse et la solubilité des fragments. Néanmoins la purification des oligomères est facilitée par cette méthode, car les bruts réactionnels sont généralement d'une plus grande pureté.

En ce qui concerne la purification des oligomères obtenus par polymérisation, elle est impossible (dans le but d'obtenir un seul composé) car il y a une distribution mathématique de la taille des molécules autour d'une taille centrale qui est difficilement prévisible.

La caractérisation des foldamers se fait en deux étapes :

- la première est de déterminer la structure et la pureté. Cela est réalisé en routine par des techniques telles que la spectrométrie de masse, la chromatographie et les analyses RMN.

- la deuxième, est de déterminer la conformation des molécules, mais tous les foldamers n'ont pas de signatures spectroscopiques des structures secondaires. De plus, plusieurs paramètres sont responsables des changements de repliements comme : la longueur du polymère,⁷¹ la concentration⁷² et l'environnement (température, pression, solvant). Dans le tableau qui suit, sont représentés quelques exemples de caractérisation des structures secondaires. **Tableau 6**

⁷¹ Prince, R. B.; Saven, J. G.; Wolynes, P. G.; Moore, J. S. Cooperative Conformational Transitions in Phenylene Ethynylene Oligomers: Chain-Length Dependence. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3114-3121.

⁷² Berl, V.; Huc, I.; Khoury, R. G.; Krische, M. J.; Lehn, J.-M. Interconversion of single and double helices formed from synthetic molecular strands. *Nature* **2000**, *407*, 720-723.

Techniques	Informations structurales	Exemple de types de structures
<i>Méthodes spectroscopiques</i>		
Dichroïsme circulaire ⁷³	Interactions des chromophores ; conformation locale du chromophore	Hélice de β -peptides
Fluorescence ⁷⁴	Interactions des chromophores ; conformation locale du chromophore	Hélice d'oligo <i>m</i> -phénylène éthynylènes
Infrarouge ⁷⁵	Agrégation ; liaisons hydrogènes	Mimes de β -turn
RMN (1D) ⁷⁶	Agrégation ; liaisons hydrogènes ; interactions aromatiques	Hélice d'oligo (2'-pyridyl-2- pyridinecarboximide)
RMN (2D) ⁷⁶	Arrangement 3D du squelette en solution	Hélice de β -peptides
UV-visible ⁷⁷	Interactions des chromophores ; conformation locale du chromophore	aedamers
<i>Méthodes non-spectroscopiques</i>		
Microscopie électronique ⁷⁸	Visualisation de la morphologie et arrangement des chaînes à l'état solide	Oligo (pyridine-pyridazine)
Microcalorimétrie ⁷⁹	Thermodynamique de repliement et d'association	Hélice d'oligo <i>m</i> -phénylène éthynylènes
Cristallographie (Rayons X) ⁸⁰	Arrangement 3D des atomes dans l'état solide	Triple hélice d'hélicates

Tableau 6 : Technique de caractérisation des structures secondaires des foldamers

⁷³ Johnson, J., W. C. *Methods Biochem. Anal.* **1985**, 31, 61-163⁷⁴ Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence*, 2nd ed; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, **1999**.⁷⁵ Nakanishi, K.; Solomon, P. H. *Infrared Absorption Spectroscopy*; Emerson-Adams Press: New York, **2000**.⁷⁶ Gunther, H. *NMR Spectroscopy*; John Wiley & Sons: New York, **1995**.⁷⁷ Thomas, M. J. K. *Ultraviolet and Visible Spectroscopy*; John Wiley & Sons: New York, **1996**.⁷⁸ Watt, I. M. *The Principle and Practice of Electron Microscopy*; Cambridge University Press: New York, **1996**.⁷⁹ Calvet, E.; Prat, H. *Recent Progress in Microcalorimetry*; Macmillan: New York, **1963**.⁸⁰ Stout, G. H.; Jensen, L. H. *X-ray Structure Determination: A Practical Guide*; John Wiley & Sons: New York, **1989**.

II : Modèles peptidomimétiques des foldamers

Nous nous sommes intéressés dans ce travail à la recherche de molécules peptidomimétiques. C'est la raison pour laquelle nous ne traiterons ni les oligomères abiotiques, ni les molécules nucleotidomimétiques.

La recherche de foldamers consiste à développer des molécules qui se structurent de manière ordonnée en solution et qui conserve une cohérence au moyen d'interactions non-covalentes. Dans cette partie, nous décrirons les différentes familles de composés qui miment la chaîne peptidique. Les structures secondaires générées par ces différents oligomères sont décrites et commentées pour chaque motif.

Dans la figure⁵⁴ qui suit, les différentes lignées structurales sont classées par famille de squelette peptidomimétique. **Figure 12**

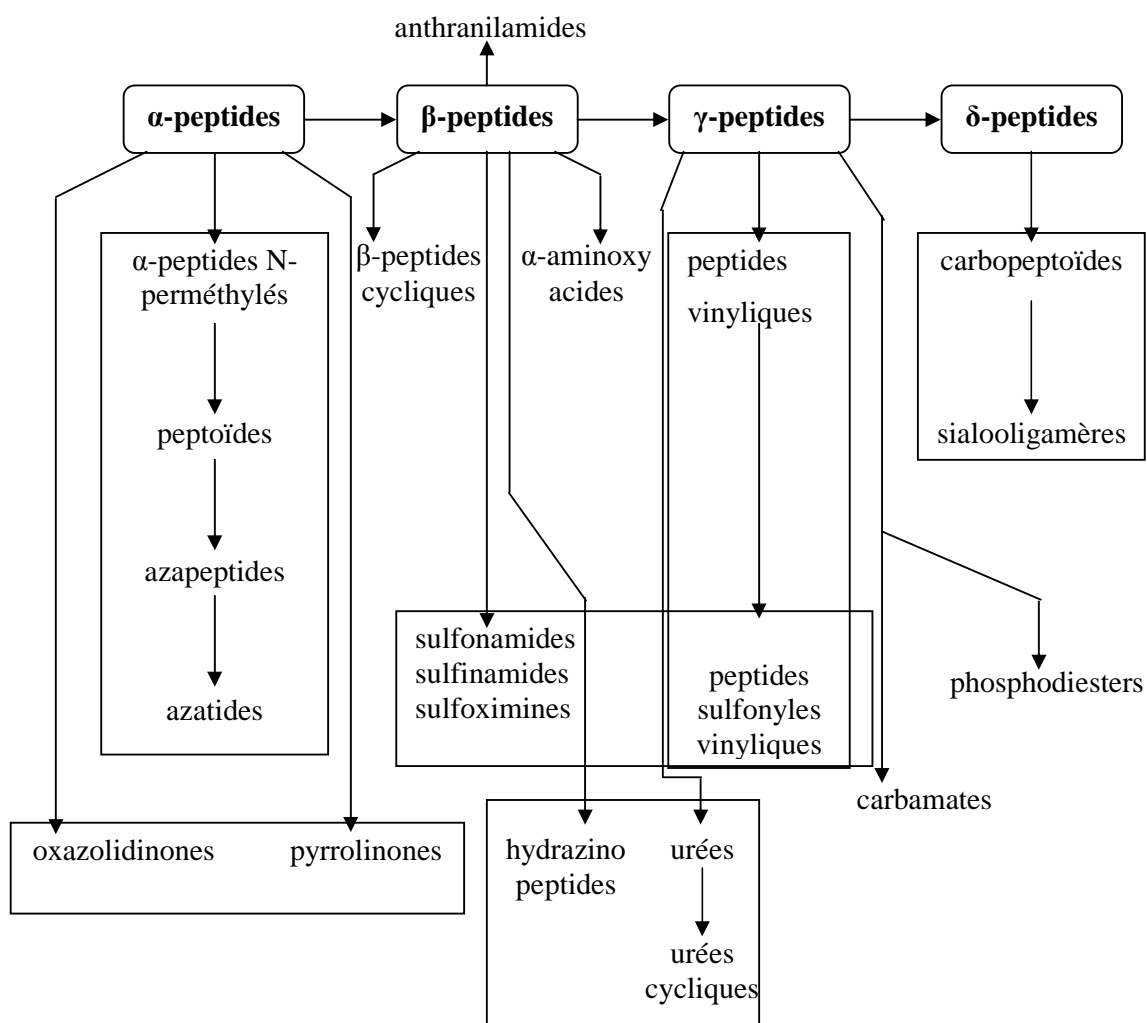


Figure 12 : Lignées structurales classées par squelette peptidomimétique

II A : Famille des α -peptides

II A 1 : Les peptoïdes

Les poly-glycines N-substituées ou peptoïdes^{81,82} ont un squelette structural de type acide α -aminé, mais portent les chaînes latérales sur les atomes d'azote **Figure 13**. Ces oligomères peptidomimétiques possèdent leurs chaînes latérales à des distances équivalentes de celles des peptides naturels. Par contre l'absence d'atome d'hydrogène amidique, exclue la présence de liaisons hydrogène intramoléculaires comme dans les peptides. Cependant, des études de modélisation^{81,83} et de RMN⁸⁴ ont montré la présence de liaisons peptidiques cis et trans des amides tertiaires permettant ainsi à l'oligomère d'adopter des conformations stables. D'autres calculs ont montré que les peptoïdes ayant un carbone chiral adjacent à l'azote avaient un nombre limité de conformations possibles.⁸⁵ Sur la base de ces prédictions, les auteurs ont émis l'hypothèse qu'ils devaient adopter une conformation cis rappelant celle de l'hélice de la polyproline de type I.

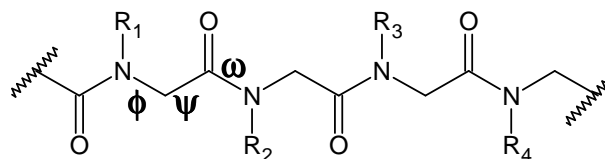


Figure 13 : Squelette général des peptoïdes

Certains oligomères de peptoïdes adoptent une structure de type hélice en solution.⁸⁶ Cela a été montré en réalisant la synthèse de plusieurs oligomères de tailles et de natures différentes **Figure 14**. Ils ont ainsi montré qu'à partir des 5 résidus, le profil en dichroïsme circulaire n'était plus modifié et qu'il ressemblait à celui de l'hélice α des peptides. Dans le méthanol, le spectre de dichroïsme du pentapeptoïde possède les mêmes caractéristiques que

⁸¹ Simon, R. J.; Kania, R. S.; Zuckermann, R. N.; Huebner, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S.; Ng, S.; Wang, L.; Rosenberg, S.; Marlowe, C. K.; Spellmeyer, D. C.; Tan, R.; Frankel, A. D.; Santi, D. V.; Cohen, F. E.; Bartlett, P. A. Peptoïds: A modular approach to drug discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, 89, 9367-9371.

⁸² Simon, R. J.; Kania, R. S.; Zuckermann, R. N.; Huebner, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S.; Ng, S.; Wang, L.; Rosenberg, S.; Marlowe, C. K.; Spellmeyer, D. C.; Tan, R.; Frankel, A. D.; Santi, D. V.; Cohen, F. E.; Bartlett, P. A. Peptoïds: A modular approach to drug discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, 89, 9367-9371.

⁸³ Möhle, K.; Hofmann, H.-J. Peptides and peptoïds - A quantum chemical structure comparison. *Biopolymers* **1996**, 38, 781-790.

⁸⁴ Bradley, E.K.; Kerr, J.M.; Richter, L.S.; Figliozzi, G.M.; Goff, D.A.; Zuckermann, R.N.; Spellmeyer, D.C.; Blaney, J.M. NMR structural characterization of oligo-N-substituted glycine lead compounds from a combinatorial library. *Mol. Diversity*, **1997**, 3, 1-15.

⁸⁵ Armand, P.; Kirshenbaum, K.; Falicov, A.; Dunbrack, R. L.; Dill, K. A.; Zuckermann, R. N.; Cohen, F. E. Chiral N-substituted glycines can form stable helical conformations. *Folding Des.* **1997**, 2, 369-375.

⁸⁶ Kirshenbaum, K.; Barron, A. E.; Goldsmith, R. A.; Armand, P.; Bradley, E. K.; Truong, K. T. V.; Dill, K. A.; Cohen, F. E.; Zuckermann, R. N. Sequence-specific polypeptoids: A diverse family of heteropolymers with stable secondary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, 95, 4303-4308.

celui de l'hélice α des peptides, avec deux bandes négatives intenses à 207 et 222 nm **graphe**

4.

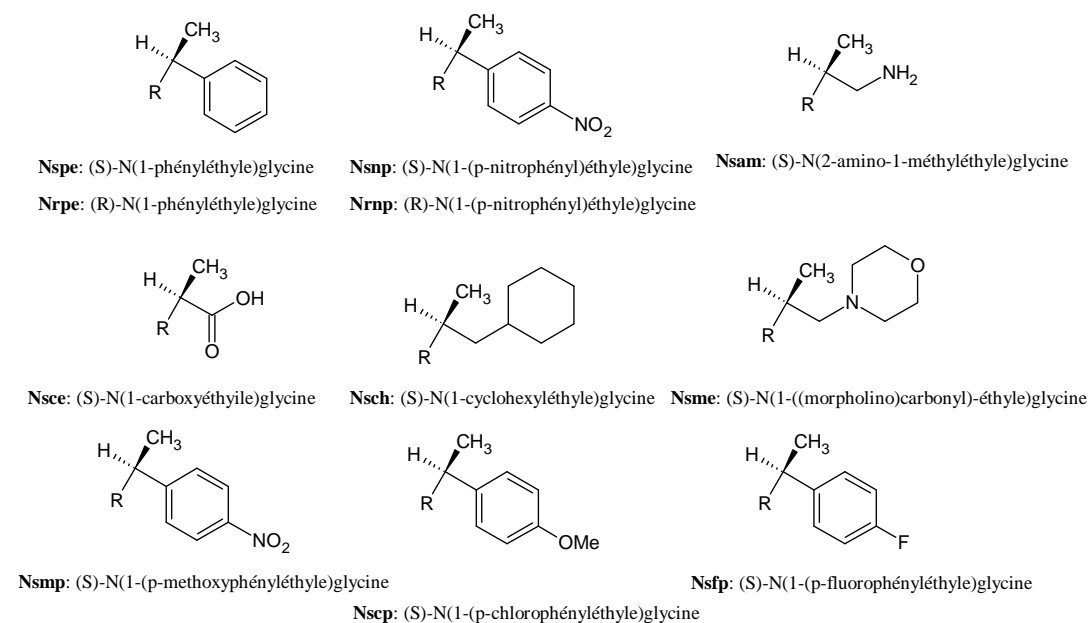
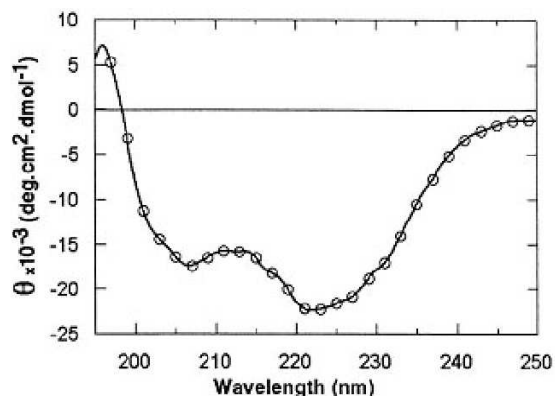


Figure 14 : Monomères de peptoides utilisés pour la synthèse des oligomères

Le pentamer ($Nsnp^1-Nsmp^2-Nsnp^3-Nscp^4-Nsfp^5$) qui possède une bonne résolution et une bonne dispersion des signaux en RMN- H^1 a été choisie pour une étude plus approfondie.⁸⁷ L'étude dans le méthanol a montré que toutes les liaisons sont de géométrie cis et que l'hélice possède un pas à droite, trois résidus par tour et un pas de 6 Å. De plus, ces molécules possèdent une grande résistance vis à vis de la dénaturation thermique et leurs conformations sont stables dans une fourchette de pH compris entre 3 et 7.



graphe 4 : Spectre de dichroïsme circulaire dans le méthanol du pentapeptide $Nsnp^1-Nsmp^2-Nsnp^3-Nscp^4-Nsfp^5$ à 10°C et à une concentration de 0.1mM

⁸⁷ Armand, P.; Kirshenbaum, K.; Goldsmith, R. A.; Farr-Jones, S.; Barron, A. E.; Truong, K. T. V.; Dill, K. A.; Mierke, D. F.; Cohen, F. E.; Zuckermann, R. N.; Bradley, E. K. NMR determination of the major solution conformation of a peptoid pentamer with chiral side chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1998**, 95, 4309-4314.

Des travaux récents^{88,89} sur la nature et la taille des oligomères ont montré une augmentation de la stabilité des hélices quand celle-ci est composée en majorité de motifs aromatiques possédants un centre d'asymétrie. D'autres facteurs stabilisants entrent en jeu comme la présence du côté C terminal de substituants chiraux, ainsi que les séquences qui permettent la formation d'interactions aromatiques le long de l'axe de la molécule. Ces facteurs sont très importants pour la stabilité des petits oligomères (inférieur à 12), mais influent peu sur ceux dont la taille est supérieure à 15 résidus.

Goodman et al⁹⁰ ont incorporé le peptoïde Nleu (N-isobutylglycine) dans une série de mimes du collagène $-(\text{Gly-Nleu-Nleu})_3-$. Cette séquence a permis de maintenir une structure de type triple hélice.

Ce modèle hélical peut former une base structurale pour la synthèse de nouvelles molécules biomimétiques comme par exemple, mimer les hélices polypro II reconnaissant les domaines SH3.

II A 2 : Les oligopyrrolinones

Les oligopyrrolinones ont été classées parmi la famille des α -peptides bien qu'il n'y ait pas de liaison amidique appartenant au squelette primaire, mais les groupes carbonyles sont séparés par deux atomes et ont la même orientation que dans la chaîne peptidique.⁹¹ **Figure 15**

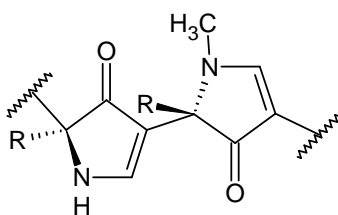


Figure 15 : Motif bispyrrolinone

Les 3,5-pyrrolinones ont été décrites pour mimer des structures de type feuillet β . En revanche, les bispyrrolinones N-méthylés adoptent un angle dièdre Φ qui peut permettre aux

⁸⁸ Wu, C. W.; Sanborn, T. J.; Zuckermann, R. N.; Barron, A. E. . Peptoid Oligomers with α -Chiral, Aromatic Side Chains: Effects of Chain Length on Secondary Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2958-2963.

⁸⁹ Wu, C. W.; Sanborn, T. J.; Huang, K.; Zuckermann, R. N.; Barron, A. E. Peptoid Oligomers with α -Chiral, Aromatic Side Chains: Sequence Requirements for the Formation of Stable Peptoid Helices *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6778-6784.

⁹⁰ Kwak, J.; Jefferson, E.A.; Bhumralkar, M.; Goodman, M. Triple helical stabilities of guest-host collagen mimetic structures. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 153-160.

⁹¹ Smith, A. B. I.; Keenan, T. P.; Holcomb, R. C.; Sprengeler, P. A.; Guzman, M. C.; Wood, J. L.; Carroll, P. J.; Hirschmann, R. Design, synthesis, and crystal structure of a pyrrolinone-based peptidomimetic possessing the conformation of a beta-strand: potential application to the design of novel inhibitors of proteolytic enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10672-10674.

oligomères assez long d'adopter une structure en hélice.⁹² C'est ainsi que le bispyrrolinone composé d'un motif N-méthylé et non-méthylé permet à la molécule de se structurer en hélice à l'état cristallin.

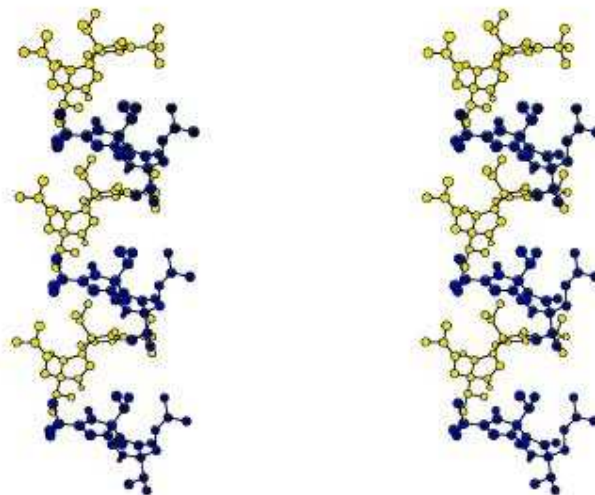


Figure 16 : Vues stéréo de la structure aux rayons X de la bispyrrolinone

Aux vues des résultats obtenus par l'analyse aux rayons X, les auteurs ont synthétisé un motif tétrapyrrolinone **Figure 17**. L'analyse des résultats RMN- H^1 de ce composé est en accord avec ceux obtenus par RX et montre que l'hélice possède un pas à gauche qui est stabilisé par une liaison hydrogène CO---NH 1-14.

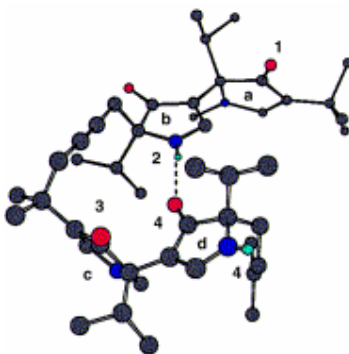


Figure 17 : Structure aux rayons X de la tétrapyrrolinone

Ces résultats montrent que le motif 3,5-pyrrolin-4-one est un candidat potentiel pour générer des structures de type hélice.

⁹² Smith, A. B. I.; Favor, D. A.; Sprengeler, P. A.; Guzman, M. C.; Carroll, P. J.; Furst, G. T.; Hirschmann, R. Molecular modeling, synthesis, and structure of *N*-methylated 3,5-linked pyrrolin-4-ones toward the creation of a privileged nonpeptide scaffold. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 9-22.

II A 3 : Les oxazolidinones

Les oligomères d'oxazolidin-2-ones appartiennent à la famille des α -peptides.^{93,94} Le squelette rappelle celui d'une structure de type pseudoproline **Figure 18**.

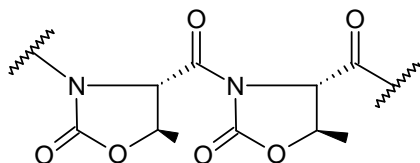


Figure 18 : Structure d'un dimère d'oxazolidin-2-one

La molécule dimérique adopte une conformation où les deux cycles sont perpendiculaires l'un par rapport à l'autre ; ceci a été déterminé sur la base de calcul en modélisation et des déplacements chimiques en RMN- H^1 . Les molécules tri et tétramériques adoptant le même profil RMN, les auteurs ont donc émis l'hypothèse que tout oligomère de ce type donne des structures ordonnées.

II A 4 : Les azatides

Les azatides appartiennent eux aussi à la famille des α -aminoacides. Le carbone α est ici remplacé par un atome d'azote **Figure 19**. Ils ont été introduits pour la première fois dans la séquence d'un peptide sous forme monomérique par Hess et al.⁹⁵ et sont dénommés dans ce cas là azapeptides.

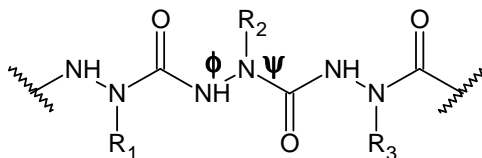


Figure 19 : Squelette général des azatides

Comme les peptides, ils sont caractérisés par deux angles phi et psi, mais dans ce cas le nombre de conformations est réduit du fait de la nature amidique de l'angle dièdre psi. Des travaux sur les propriétés conformationnelles réalisés par Hofmann et al.⁹⁶ ont montré que les azatides ont un très fort potentiel à se structurer en β -turn et ils ont supposé que les longues séquences étaient susceptibles de former des hélices mais aucune autre étude n'est venue

⁹³ Lucarini, S.; Tomasini, C. Synthesis of oligomers of trans-(4S-5S)-4-carboxybenzyl 5-methyl oxazolidin-2-one : An approach to new foldamers. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 727-732.

⁹⁴ Lucarini, S.; Tomasini, C. *Chem Eur. J.* **2002**, *8*, 2516-2525.

⁹⁵ Hess, H.-J. ; Moreland, W.T. ; Laubach, J. N-[2-Isopropyl-3-(L-aspartyl-L-arginyl)-carbazoyl]-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phenylalanine, an isostere of bovine angiotensin II. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 4040-4041.

⁹⁶ Thormann, M.; Hofmann, H.-J. Conformational properties of azapeptides. *J. Mol. Struct.* **1999**, *469*, 63-76.

conforter cela. De plus les azatides sont très résistants vis à vis des protéases⁹⁷ et sont donc de très bons candidats comme nouveaux inducteurs de structures secondaires.

II B : Famille des β -peptides

II B 1 : Les β -peptides

Les β -peptides sont les foldamers qui ont été les plus étudiés et dont les structures secondaires sont les mieux décrites. Ils représentent les premiers homologues supérieurs des peptides et sont capables eux aussi de former des liaisons hydrogènes intramoléculaires qui stabilisent les structures secondaires.

Nous donnerons dans ce chapitre les caractéristiques structurales des β -peptides et leurs éventuelles applications biologiques.

II B 1 1 : Propriétés conformationnelles générales des β -peptides

Les β -peptides possèdent un angle dièdre supplémentaire (par rapport aux peptides); la nomenclature des angles dièdres (ω , ϕ , θ et ψ) a été proposée par Balaram.⁹⁸ Le squelette général des β -peptides est représenté ci dessous **Figure 20**.

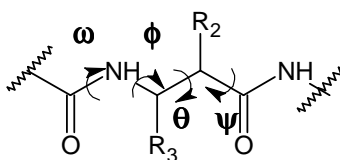


Figure 20 : Squelette général des β -peptides

Les premières études réalisées sur des β -peptides polymériques ont montré qu'ils étaient capables d'adopter des structures stables en hélice ; ils ont ainsi déterminé les premières géométries pour les hélices de β -peptides.^{99,100,101,102,103}

⁹⁷ Gante, J. Azapeptides. *Synthesis* 1989, 405-413.

⁹⁸ Banerjee, A.; Balaram, P. Stereochemistry of peptides and polypeptides containing omega amino acids. *Curr. Science* 1997, 73, 1067-1077.

⁹⁹ Kovacs, J.; Ballina, R.; Rodin, R. L.; Balasubramanian, D.; Applequist, J. Poly-beta-L-aspartic acid. Synthesis through pentachlorophenyl active ester and conformational studies. *J. Am. Chem. Soc.* 1965, 87, 119-120.

¹⁰⁰ Fernandez-Santin, J. M.; Aymami, J.; Rodriguez-Galan, A.; Munoz-Guerra, S.; Subirana, J. A. A pseudo α -helix from poly(α -isobutyl-L-aspartate), a Nylon-3 derivative. *Nature* 1984, 311, 53-54.

¹⁰¹ Fernandez-Santin, J. M.; Munoz-Guerra, S.; Rodriguez-Galan, A.; Aymami, J.; Lloveras, J.; Subirana, J. A. Helical conformation in a polyamide of the Nylon-3 family. *Macromolecules* 1987, 20, 62-68.

¹⁰² Bella, J.; Aleman, C.; Fernandez-Santin, J. M.; Alagre, C.; Subirana, J. A. Conformation of the helical polyamide poly(α -isobutyl L-aspartate). *Macromolecules* 1992, 25, 5225-5230.

¹⁰³ Lopez-Carrasquero, F.; Aleman, C.; Munoz-Guerra, S. Conformational analysis of helical poly(α -L-aspartate)s by IR dichroism. *Biopolymers* 1995, 36, 263-271.

Afin d'obtenir des structures de type turn ou hélice, la conformation des β -peptides autour de l'axe C2-C3 doit être de type gauche **Figure 21**. L'effet des substituants sur les conformations des β -amino acides a fait l'objet de nombreuses études expérimentales.

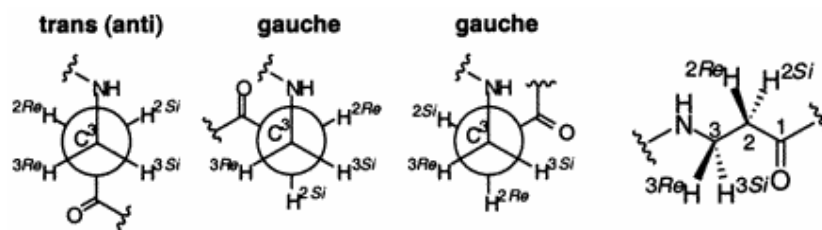


Figure 21 : Rotamers autour de l'axe C2-C3

Les substituants en position 2 ou 3 favorisent ce type de conformation, du fait de l'encombrement stérique qu'ils engendrent.¹⁰⁴ Les β_2 - β_3 disubstitués sont conformationnellement encore plus contraints et favorisent une conformation gauche lorsque les substituants sont anti. Cette conformation est d'autant plus favorisée que les C₂ et C₃ sont inclus dans un cycle cyclopentanique¹⁰⁵ ou cyclohexanique.⁵¹ Comme la glycine pour les peptides, la β -alanine qui n'est pas substituée, a un haut degré de flexibilité. Les différentes conformations sont compilées dans le **Tableau 7**.

Structure	Substitution	Conformation favorisée
	Aucune	Flexible
	Résidu β_3	Gauche
	Résidu β_2	Gauche
	Résidu $\beta_{2,3}$ anti	Gauche (forte)
	Résidu $\beta_{2,3}$ syn	Trans
	Résidu $\beta_{2,3}$ cyclique trans	Gauche

Tableau 7 : Effet des substituants sur la conformation

¹⁰⁴ Seebach, D.; Abele, S.; Gademann, K.; Guichard, G.; Hintermann, T.; Jaun, B.; Matthews, J. L.; Schreiber, J. V.; Oberer L.; Hommel, U.; Widmer, H. 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.* **1998**, *81*, 932-982.

¹⁰⁵ Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Klein D. A.; Powell, D. R.; Huang, X.; Barchi J. J.; Gellman, S. H. Residue-based control of helix shape in β -peptide oligomers. *Nature* **1997**, *387*, 381-384.

L'incorporation d'acides aminés α disubstitués sur le carbone α favorisent l'induction d'hélices α et de turns.¹⁰⁶ Les β amino acides disubstitués en position 2 ou 3 stabilisent seulement les coudes.¹⁰⁷

II B 1 2 : Conformations hélicales des β -peptides

Les β -peptides peuvent adopter des conformations hélicoïdales différentes en fonction de la nature des résidus qui les composent. Afin de pouvoir comparer les différents types d'hélices, plusieurs auteurs ont proposé des nomenclatures qui prennent en compte différents critères. Le tableau ci-dessous résume ces différentes nomenclatures **Tableau 8**.

Applequist	Gellman	Seebach	Autre nomenclature
R ₊₂	14	(P) 3 ₁	3 ₁₄
R ₊₃	18		
R ₋₃	12	(P) 2.5 ₁	2.5 ₁₂
R ₋₄	16		
R ₋₅	20		
L ₊₂	14	(M) 3 ₁	3 ₁₄
L ₊₃	18		
L ₋₃	12	(M) 2.5 ₁	2.5 ₁₂
L ₋₄	16		
L ₋₅	20		

Tableau 8 : Nomenclature pour les hélices de β -peptides

Applequist¹⁰⁸ décrit l'hélice en prenant en compte deux critères, le sens de progression de l'hélice (R ou L) et le nombre de motifs entre le donneur de liaison hydrogène et l'atome accepteur ; ainsi R \pm n désigne une hélice avec un pas à droite dans laquelle NH_i fait une liaison H avec le CO_{i \pm n}. Gellman⁵¹ utilise pour décrire son hélice le nombre d'atomes constituant le cycle formé par la liaison hydrogène mise en jeu, ce type de nomenclature ne décrit pas la topologie de l'hélice, mais elle est la plus facile à utiliser. Seebach¹⁰⁹ utilise une nomenclature mettant en jeu la symétrie de l'hélice (nombre de résidus par tour) et la topologie P et M pour droite et gauche. Une autre nomenclature prend à la fois en compte le nombre d'atome séparant la liaison hydrogène et la symétrie de l'hélice.

¹⁰⁶ Balaram, P. De novo design: backbone conformational constraints in nucleating helices and beta-hairpins. *J. Pept. Res.* **1999**, *54*, 195-199.

¹⁰⁷ Seebach, D.; Abele, S.; Sifferlen, T.; Hanggi, M.; Gruner, S.; Seiler, P. Preparation and structure of β -peptides consisting of geminally disubstituted β - and β -amino acids: a turn motif for β -peptides. *Helv. Chim. Acta.* **1998**, *81*, 2218-2243.

¹⁰⁸ Bode K. A.; Applequist, J. Poly(β -amino acid) helices. Theoretical π - π * absorption and circular dichroic spectra. *Macromolecules* **1997**, *30*, 2144-2150.

¹⁰⁹ Seebach, D.; Ciceri, P. E.; Overhand, M.; Jaun, B.; Rigo, D.; Oberer L.; Hommel, U.; Amstutz, R.; Widmer, H. Probing the helical secondary structure of short-chain β -peptides. *Helv. Chim. Acta.* **1996**, *79*, 2043-2066.

Les différents types d'hélices que nous allons rencontrer, sont représentés ci dessous et nous avons utilisé la nomenclature de Gellman pour les illustrer **Figure 22**.

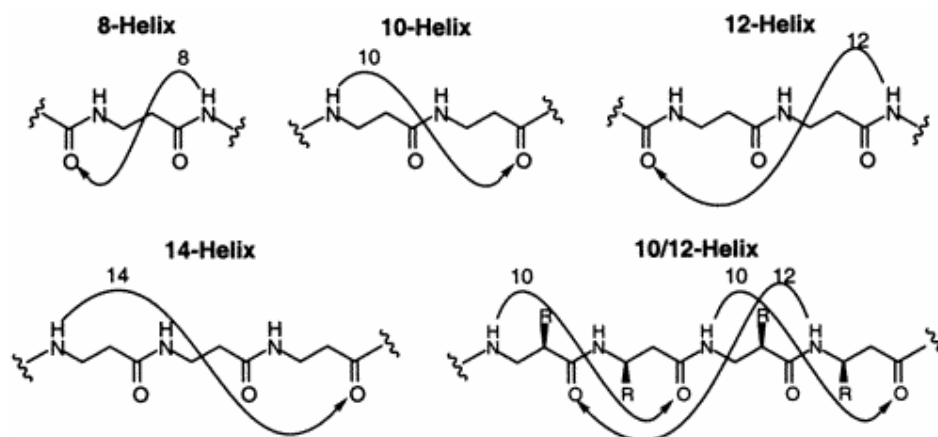


Figure 22 : Représentation des différents types d'hélices des β -peptides

II B 1 3 : Conformation de type hélice 14 des β -peptides

La première détermination de structure de type hélice 14 a été réalisée par diffraction et infra-rouge sur le poly(α -isobutyl-L-aspartate) dans les années 1980¹⁰⁰. Plus récemment, en 1996, Gellman⁵¹ a montré par des études de RMN-H¹ que l'hexamère de l'acide *trans*-2-aminocyclohexanecarboxylique (ACHC) **Figure 23** qui appartient à la famille des $\beta_{2,3}$ -aminoacides cycliques, adopte une telle structure à l'état solide¹¹⁰ et dans le méthanol.

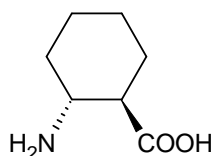


Figure 23 : Acide *trans*-2-aminocyclohexanecarboxylique (ACHC)

Au même moment le groupe de Seebach^{109,111} a montré qu'une série de β_3 -peptides linéaires adoptent eux aussi cette structure dans les solvants organiques. Il a ainsi montré par détermination RMN dans la pyridine, dichroïsme circulaire et rayons X que l'hexa- β -peptide H-(β_3 -Val- β_3 -Ala- β_3 -Leu)₂-OH donne une hélice de type « 14 » avec un pas à gauche de 5Å.

¹¹⁰ Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. Synthesis and characterization of *trans*-2-aminocyclopentanecarboxylic acid oligomers: an unnatural helical secondary structure and implications for β -peptide tertiary structure. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6206-6212.

¹¹¹ Seebach, D.; Overhand, M.; Kühnle, F. N. M.; Martinoni, B.; Oberer L.; Hommel, U.; Widmer, H. β -Peptides: synthesis by *Arndt-Eistert* homologation with concomitant peptide coupling. Structure determination by NMR and CD spectroscopy and X-ray crystallography. Helical secondary structure of a β -hexapeptide in solution and its stability towards pepsin. *Helv. Chim. Acta.* **1996**, *79*, 913-941.

De plus cette molécule s'est avéré être résistante vis à vis de la dégradation enzymatique pour la pepsine.

Les premières conclusions qu'ont pu émettre les deux équipes, sont que les β -peptides ont des structures secondaires plus stables que les α -peptides correspondants, car six résidus sont suffisants pour obtenir une hélice alors qu'il en faut entre 15 et 20 pour les peptides. Ils ont découvert une nouvelle voie pour obtenir des structures ordonnées à partir de résidus non-naturels.

L'hélice 14 est stabilisée par des liaisons hydrogènes entre le proton amidique du résidu i et le carbonyle du résidu en position $i+2$ formant une série de cycles à 14 atomes et possèdent un pas à gauche pour les homologues de la série L. Le dipôle formé par ces liaisons hydrogènes est inversé par rapport à celui rencontré dans une hélice α . Le **Tableau 9** donne les caractéristiques conformationnelles rencontrées dans ces hélices. Le modèle de cette hélice 14 est formée à partir d'un poly- β_3 -hAla **Figure 24**.

	φ (°)	θ (°)	ψ (°)	ω (°)	rayon (Å)	Résidus/tour	Progression/résidu (Å)
hélice 14	-134.3	60	-139.9	180.0	2.7	3.0	1.56

Tableau 9 : Caractéristiques conformationnelles de l'hélice 14

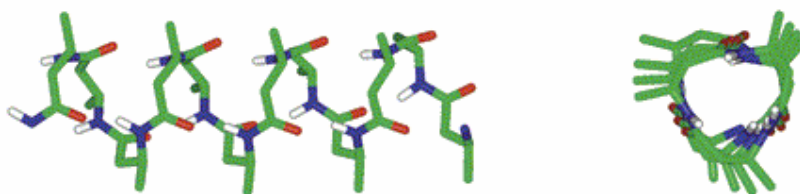


Figure 24 : Structure de l'hélice 14

Afin de déterminer la structure d'un oligomère de β -peptide, le moyen qui semble le plus rapide est d'utiliser le dichroïsme circulaire (CD). Le spectre CD de plusieurs hexa et hepta β -peptides, qui adoptent une hélice 14 avec un pas à gauche a été déterminé par RMN ou cristallographie, montre une bande intense positive vers 195 nm et une négative à 215 nm (et inversement pour les hélices 14 avec un pas à droite). Mais le CD de l'hexamère d'ACHC qui possède la même structure d'hélice 14 n'a pas le même profil dichroïque, il ne présente qu'une seule bande large positive avec un maximum à 217 nm. De plus, des travaux récents ont montré que des oligomères qui ne pouvant pas se structurer en hélice 14 peut présenter un fort effet Cotton à 215 nm similaire à celui de l'hélice 14.¹¹² L'interprétation du spectre de CD

¹¹² Seebach, D.; Sifferlen, T.; Mathieu, P. A.; Häne, A. M.; Krell, C. M.; Bierbaum, D. J.; Abele, S. CD spectra in methanol of β -oligopeptides consisting of β -amino acids with functionalized side chains, with alternating configuration, and with geminal backbone substituents – Fingerprints of new secondary structure? *Helv. Chim. Acta.* **2000**, 83, 2849-2864.

doit passer après la détermination de la structure par RMN ; mais dans le cas de longs oligomères la détermination de structure par RMN devient très complexe.

Afin de tester l'effet du groupe thiamide (NH-C=S) sur la stabilité des structures secondaires des β -peptides, Seebach et al¹¹³ ont synthétisé trois analogues du peptide modèle H-(β_3 -Val- β_3 -Ala- β_3 -Leu)₂-OH avec un, deux et trois C=S du côté N-terminal. Les résultats de RMN ont montré dans le méthanol que l'analogue possédant trois liaisons C=S a une structure secondaire de type hélice 14 comme le β -peptide parent. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour la recherche de structures régulières des β -thiopeptides.

Un moyen de stabiliser l'hélice 14 est de créer un pont disulfure entre deux résidus β -cystéine ou β -homocystéine de la séquence. Seebach et al ont montré par CD que pour l'hélice 14, ce pontage est possible entre les résidus i et $i+3$ mais pas entre i et $i+4$.¹¹⁴ Cela a été aussi constaté par RMN dans le méthanol et dans l'eau pour le macrocycle comportant un pont β -Cys i et $i+3$.¹¹⁵

Dans l'optique d'utiliser cette famille de molécules dans des milieux biologiques, plusieurs équipes ont synthétisé des séquences chargées dans le but d'obtenir une structuration identique en milieu aqueux. L'équipe de Seebach a été la première à synthétiser des β -peptides ayant une structure secondaire stable et soluble en milieu aqueux.^{116,117} Afin d'augmenter la solubilité dans l'eau, ils incorporent des résidus β -lysine ou β -sérine. Les spectres de dichroïsme des β -peptides ainsi obtenus, H- β_3 -Phe- β_3 -Ala- β_3 -Ser- β_3 -Phe- β_3 -Ala- β_3 -Ser- β_3 -Phe-OH et H- β_2 -Phe- β_3 -Ala- β_3 -Lys- β_2 -Phe- β_3 -Ala- β_3 -Lys- β_2 -Phe-OH montrent que ces molécules ont un profil typique des hélices 14 mais dont l'intensité est réduite. Cela est d'autant plus visible chez les β -peptides ne contenant que des résidus lysines. Les auteurs concluent que les chaînes cationiques déstabilisent les structures secondaires, il en est de même chez les α -peptides.¹¹⁸ De leur côté, Gung et Zou¹¹⁹ ont montré par CD que plusieurs

Glattli, A.; Daura, X.; Seebach, D.; van Gunsteren, W. F. Can One Derive the Conformational Preference of a β -Peptide from Its CD Spectrum? *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 112972-12978.

¹¹³ Sifferlen, T.; Rueping, M.; Gademann, K.; Jaun, B.; Seebach, D. β -thiopeptides: synthesis, NMR solution structure, CD spectra and photochemistry. *Helv. Chim. Acta.* **1999**, *82*, 2067-2093.

¹¹⁴ Jacobi, A.; Seebach, D. How stabilize or break β -peptidic helices by disulfide bridges: synthesis and CD investigation of β -peptides with cysteine and homocysteine side chains. *Helv. Chim. Acta.* **1999**, *82*, 1150-1172.

¹¹⁵ Rueping, M.; Jaun, B.; Seebach, D. NMR structure in methanol of a β -hexapeptide with a disulfide clamp. *Chem. Comm.* **2000**, *3*, 2267-2268.

¹¹⁶ Guichard, G.; Abele, S.; Seebach, D. Preparation of N-Fmoc-protected β_2 - and β_3 -amino acids and their use as building blocks for the solid-phase synthesis of β -peptides. *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 187-206.

¹¹⁷ Abele, S.; Guichard, G.; Seebach, D. (S)- β -homolysine- and (S)- β -homoserine-containing β -peptides: CD spectra in aqueous solution. *Helv. Chim. Acta.* **1998**, *81*, 2141-2156.

¹¹⁸ Fasman, G. D. In *Poly- α -Amino Acids*; Fasman, G. D., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1967.

¹¹⁹ Gung, B. W.; Zou, D. Characterization of a water-soluble, helical β -peptide. *J. Med. Chem.* **1999**, *64*, 2176-2177.

hepta β -peptides possédants un ou deux β_3 -Glu adoptent une structure hélice 14 et leur solubilité dans l'eau est accrue. Gellman et al¹²⁰ montrent que la faible stabilité des hélices 14 en milieu aqueux des β -peptides est sûrement dû à la rigidité de ses molécules. Pour y remédier, il a intercalé soit des résidus flexibles chargés entre les motifs cyclohexyles soit des résidus cyclohexyles chargés (Acide *R,R,R*-2,5-diaminocyclohexanecarboxylique, DCHC¹²¹)

Figure 25.

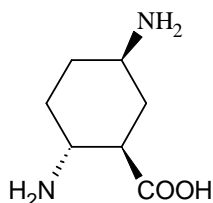


Figure 25 : Acide *R,R,R*-2,5-diaminocyclohexanecarboxylique, DCHC

Les hexa β -peptides synthétisés montrent en CD un maximum à 215 nm caractéristique des hélices 14. Les remplacements successifs des groupements cyclohexyles entraînent une diminution de l'intensité à 215 nm suggérant une déstabilisation de l'hélice 14 dans l'eau. Les études RMN corroborent les résultats obtenus par CD.

Seebach a incorporé deux $\beta_{2,3}$ -Ser et $\beta_{2,3}$ -Cys dans deux séquences d'hexa β_3 -peptides et d'hepta β_3 -peptides¹²². Les résultats observés en CD montrent une conformation hélice 14 dans l'eau. Mais en RMN, les effets NOE sont peu visibles, on peut donc penser qu'on est en présence d'un mélange de forme linéaire et en hélice.

Le développement des β -peptides solubles en milieu aqueux ont conduit Seebach¹²³ et DeGrado¹²⁴ à introduire un pont salin pour stabiliser l'hélice 14. Les deux études montrent par CD et RMN que les interactions électrostatiques entre les chaînes latérales des β -amino acides stabilisent l'hélice 14. Seebach a étudié un hepta β -peptide où les deux ponts salins sont formés entre deux β_2 -Glu et deux β_2 -Orn qui fait apparaître deux faces hydrophiles et une face hydrophobe. Il en est de même pour le β -peptide incorporant les résidus β -Glu et β -Lys. De

¹²⁰ Appella, D. H. ; Barchi, J. J. ; Durell, S. T. ; Gellman, S. H. Formation of short, stable helices in aqueous solution by β -amino acid hexamers. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2309-2310.

¹²¹ Appella, D. H.; LePlae, P. R.; Raguse, T. L.; Gellman, S. H. (*R,R,R*)-2,5-Diaminocyclohexanecarboxylic acid, a building block for water-soluble, helix-forming β -peptides. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4766-4769.

¹²² Seebach, D.; Jacobi, A.; Rueping, M.; Gademann, K.; Ernst, M.; Jaun, B. Synthesis of β -hexa and β -heptapeptides containing novel β -amino acids with two serines or two cysteine side chains -CD- and NMR-spectroscopic evidence for 3_{14} -helical secondary structures in water. *Helv. Chim. Acta.* **2000**, *83*, 2115-2140.

¹²³ Arvidsson, P. I.; Rueping, M.; Seebach, D. Design, machine synthesis, and NMR-solution structure of a β -heptapeptide forming a salt-bridge stabilised 3_{14} -helix in methanol and in water. *Chem. Comm.* **2001**, *7*, 649-650.

¹²⁴ Cheng, R. P.; DeGrado, W. F. De novo design of a monomeric helical β -peptide stabilized by electrostatic interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5162-5163.

plus l'augmentation de la concentration en NaCl du milieu augmente la proportion de structure secondaire.

Les résultats observés montrent qu'en milieu organique les β -peptides étudiés forment une structure hélice 14 avec plus de facilité qu'en milieu aqueux. Cependant, la formation de ponts salins ou des ponts dissulfures permettent de stabiliser cette structure.

II B 1 4 : Conformation de type hélice 12 des β -peptides

Le groupe de Gellman a réalisé une étude systématique de modélisation moléculaire⁵¹ pour sélectionner des oligo β -peptides susceptibles de donner des structures de type hélice. A partir de cette étude, ils ont prédit que l'oligomère *trans* d'ACPC (**Figure 26**) devait avoir une structure de type hélice 12.¹²⁵

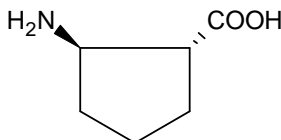


Figure 26 : Acide R,R-2-aminocyclopentane carboxylique (ACPC)

Ce résultat théorique a été validé par divers résultats expérimentaux. En effet l'octamère et l'hexamère montrent à l'état solide une structuration de type hélice 12 où toutes les liaisons hydrogènes possibles sont présentes. L'analyse du spectre de CD pour l'hexamère dans le méthanol fait apparaître une structuration, avec un maximum à 204 nm et un minimum vers 221 nm. La concentration ne change pas le profil dichroïque. La structure hélice 12 a été confirmée par RMN-2D. Les effets NOE observés montrent une liaison hydrogène entre l'amide du groupe carbonyle en position *i* et le proton amidique en position *i*+3. Le dipôle formé par ces liaisons hydrogènes a la même orientation que dans l'hélice α ; elle possède un pas à gauche chez les homologues de la série L. Une étude conformationnelle systématique a été réalisée sur les monomères et oligomères d'ACHC et ACPC et ont montré des préférences de structuration différente chez les deux motifs allant dans le sens des observations déjà réalisées.¹²⁶ Toutes les prédictions réalisés ont été confirmées dans d'autres études de CD¹²⁷ et RMN.¹²⁸

¹²⁵ Appella, D. H. ; Christianson, L. A. ; Klein D. A. ; Powell, D. R. ; Huang, X.;Barchi J. J.; Gellman, S. H. Residue-based control of helix shape in β -peptide oligomers. *Nature* **1997**, 387, 381-384.

¹²⁶ Christianson, L. A.; Lucero, M. J.; Appella, D. H.; Klein, D. A.; Gellman, S. H. Improved treatment of cyclic β -amino-acids and successful prediction of β -peptide secondary structure using a modified force field: AMBER**C. J. Comput. Chem.* **2000**, 21, 763-773.

¹²⁷ Appellequist, J.; Bode, K. A.; Appella, D. H. ; Christianson, L. A. ; Gellman, S. H. theoretical and experimental circular dichroic spectra of the novel helical foldamer Poly[(1*R*,2*R*)-*trans*-2-aminocyclopentanecarboxylic acid]. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4891-4892.

Le **Tableau 10** résume les caractéristiques conformationnelles rencontrées dans ces hélices. Le modèle de cette hélice 12 formé à partir d'un poly- β -hAla est représenté en **Figure 27**.

	φ (°)	θ (°)	ψ (°)	ω (°)	rayon (Å)	Résidus/tour	Progression/résidu (Å)
12-helix	95.0	-94.3	103.0	-180	2.3	2.5	2.1

Tableau 10: Caractéristiques conformationnelles de la 12-helix

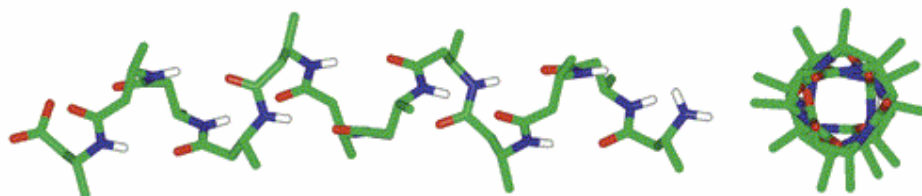


Figure 27 : Structure de la 12-helix

Aucun des β -peptides n'est soluble en milieu aqueux. Pour remédier à cela, Gellman a préparé l'acide *trans*-3-amino-pyrrolidine-4-carboxylique (APC) et l'a incorporé dans les séquences d'oligomères d'ACPC.¹²⁹ **Figure 28**

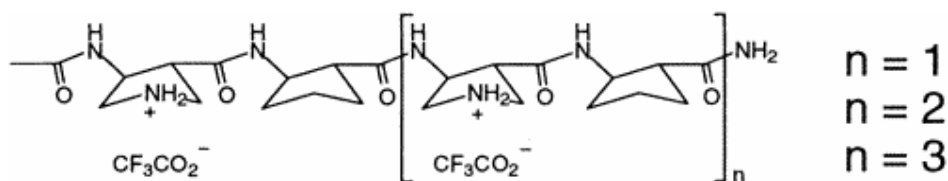
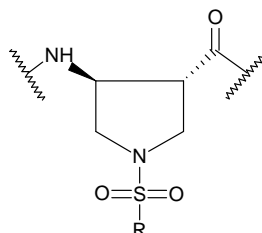


Figure 28 : Oligomères de β -peptides solubles en milieu aqueux

Les études de CD et de RMN montrent que les oligomères formés de plus de quatre résidus ont une structure secondaire de type hélice 12 dans l'eau et cette stabilité augmente avec la taille de l'oligomère. L'avantage de l'utilisation du motif APC est la possibilité de fonctionnaliser l'azote du cycle afin de créer une diversité chimique. Cela a été réalisé en introduisant des groupements sulfonylés¹³⁰. **Figure 29**



¹²⁸ Barchi, J. J.; Huang, X.; Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Durell, S. T.; Gellman, S. H. Solution conformations of helix-forming β -amino acid homo-oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2711-2718.

¹²⁹ Wang, X.; Espinosa, J. F.; Gellman S. H. 12-Helix formation in aqueous solution of short β -peptides containing pyrrolidine-based residues. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4821-4822.

¹³⁰ Lee, H.-S.; LePlae, P. R.; Porter, E. A.; Gellman, S. H. An efficient route to either enantiomer of orthogonally protected *trans*-3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3597-3599.

Figure 29 : Structure du résidu β -peptidique S-APC ($R=CH(CH_3)_2$; $=C_6H_4-p-OCH_3$)

Les oligomères construits avec ces résidus ont eux aussi une conformation de type hélice 12 dans l'eau, cela a été vérifié par CD et RMN.¹³¹

II B 1 5 : Conformation de type hélice 10/12 des β -peptides

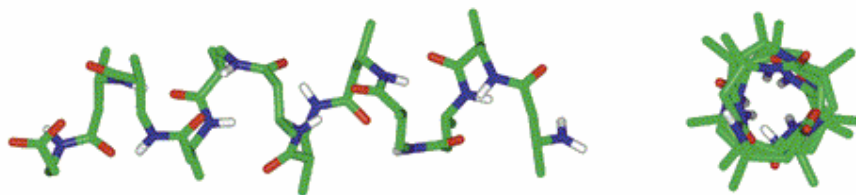
Seebach^{132,104} a découvert que les β -peptides formés à partir d'une alternance de β_2 - et β_3 -amino-acides ou de blocs de β_2 et de β_3 adoptent une nouvelle structure irrégulière alternant des liaisons hydrogène fermant un cycle à 10 atomes entre le proton amidique i et le carbonyle $i+2$, et un cycle à 12 atomes entre le carbonyle i et $i+3$ (comme dans l'hélice 12).

Figure 22. L'hélice 10/12 a été étudiée dans par CD et RMN dans plusieurs solvants organiques. La signature dichroïque de cette hélice montre une bande intense unique à 205 nm. Les liaisons hydrogènes de l'hélice et l'orientation des liaisons amides sont différentes dans les deux cycles ; pour le cycle à 10, il y a une orientation perpendiculaire alors que pour le cycle à 12, l'orientation des liaisons amides est dans le sens de progression de l'hélice. Elle possède un pas à droite chez les homologues de la série L. Le **Tableau 11** récapitule les caractéristiques conformationnelles rencontrées dans ces hélices.

12/10/12-helix	φ (°)	θ (°)	ψ (°)	rayon (Å)	Résidus/tour	Progression/résidu (Å)
β_3	85.0	65	71	2.3	2.5	2.1
β_2	-100	56	-84			

Tableau 11 : Caractéristiques conformationnelles de l'hélice 10/12

Le modèle de cette hélice 10/12 formée à partir d'un poly- β_3 -hAla est représenté en **Figure 30**.

**Figure 30** : Structure de l'hélice 10/12

¹³¹ Lee, H-S.; Syud, F. A.; Wang, X.; Gellman S. H. Diversity in short β -peptide 12-helices: High-resolution structural analysis in aqueous solution of a hexamer containing sulfonylated pyrrolidine residues. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7721-7722.

¹³² Seebach, D.; Gademann, K.; Schreiber, J. V.; Matthews, J. L.; Hintermann, T.; Jaun, B.; Oberer L.; Hommel, U.; Widmer, H. „Mixed“ β -peptides: a unique secondary structure in solution. *Helv. Chim. Acta.* **1997**, *80*, 2033-2038.

En milieu aqueux, quelques β -peptides comprenant une β_3 -lysine exhibent en CD un effet Cotton élevé à 205 nm, caractéristique de l'hélice 10/12 dont la proportion est dépendante du pH.¹³³

La solvation de certains β -peptides influe énormément sur la structure secondaire.¹³⁴ En effet, un β_3 -dodécapeptide incluant plusieurs β -lys possède une structure de type hélice 14 dans le méthanol et un 10/12-helix dans l'eau. Cela a été aussi observé sur d'autres β -peptides en fonction de la présence ou non des groupements protecteurs N-terminaux.¹⁰⁴

II B 1 6 : Conformation de type hélice 10 des β -peptides

Une conformation de type hélice 10 a été découverte par Fleet dans un hexa- β peptide contenant un cycle oxétane.¹³⁵ Dans les β -peptides contenant un cycle (cyclohexane, cyclopentane et pyrrolidine), tous les groupements amines et acides sont en conformation trans alors que dans le cas de l'oxétane, la conformation est cis. La structure a été élucidée par RMN dans des solvants organiques apolaires (chloroforme et benzène). Avec le monomère (2R,3S) on obtient une hélice avec un pas à gauche et avec le (2S,3R) une hélice avec un pas à droite. Les liaisons hydrogène entre le proton amidique i et le carbonyle en position $i+1$ sont représentées dans la **Figure 31**.

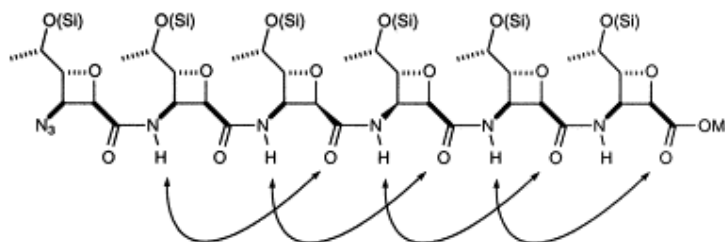


Figure 31 : Liaisons hydrogènes 1-10 présentes dans l'hexa- β -peptide. Si= TertioButyldiMéthylSilane.

Seebach¹³⁶ de son côté, a constaté que le $\beta_{3,3}$ tripeptide totalement protégée formé à partir de l'acide 1-(aminométhyl)cyclohexanecarboxylique possède une liaison hydrogène H1-10. Elle possède les mêmes caractéristiques que celle rencontrée dans la liaison H1-10 de

¹³³ Seebach, D.; Schreiber, J. V.; Abele, S.; Daura, X.; van Gunsteren, W. F. Structure and conformation of β -oligopeptide derivatives with simple proteinogenic side chain: circular dichroism and molecular dynamics investigations. *Helv. Chim. Acta.* **2000**, *83*, 34-57.

¹³⁴ Schreiber, J. V.; Seebach, D. Solid-phase synthesis of a β -dodecapeptide with seven functionalized side chains and CD-spectroscopic evidence for a dramatic structural switch when going from water to methanol solution. *Helv. Chim. Acta.* **2000**, *83*, 3139-3152.

¹³⁵ Claridge, T. D. W.; Goodman, J. M.; Moreno, A.; Angus, D.; Barker, S. F.; Taillefumier, M. R.; Watterson, M. P.; Fleet, G. W. J. 10-Helical conformations in oxetane β -amino acid hexamers. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4251-4255.

¹³⁶ Seebach, D.; Abele, S.; Sifferlen, T.; Hanggi, M.; Gruner, S.; Seiler, P. Preparation and structure of β -peptides consisting of geminally disubstituted β - and β -amino acids: a turn motif for β -peptides. *Helv. Chim. Acta.* **1998**, *81*, 2218-2243.

l'hélice 10/12. Mais à ce jour il n'a pas réussi à mettre en évidence une structuration complète dans des oligomères plus longs.

II B 1 7 : Conformation de type hélice 8 des β -peptides

Abele et al.¹³⁷ ont observé que des structures cristallines de courts oligomères d'acide 1-(aminométhyl)cyclopropane carboxylique ($\beta_{2,2}$) formaient des liaisons hydrogène de type 1-8 entre le carbonyle i et le proton amidique en position $i+1$. Il a suggéré que de plus longs oligomères devaient adopter une structure régulière de type hélice 8 dont les caractéristiques sont données dans le tableau ci dessous **Tableau 12**.

Des calculs ont permis, en utilisant les données des rayons X, de déterminer une structure modèle de type ruban aplati **Figure 32**.

	φ (°)	θ (°)	ψ (°)	ϕ (°)
8-helix	120.0	-72	0	-180

Tableau 12: Caractéristiques conformationnelles de la 8-helix

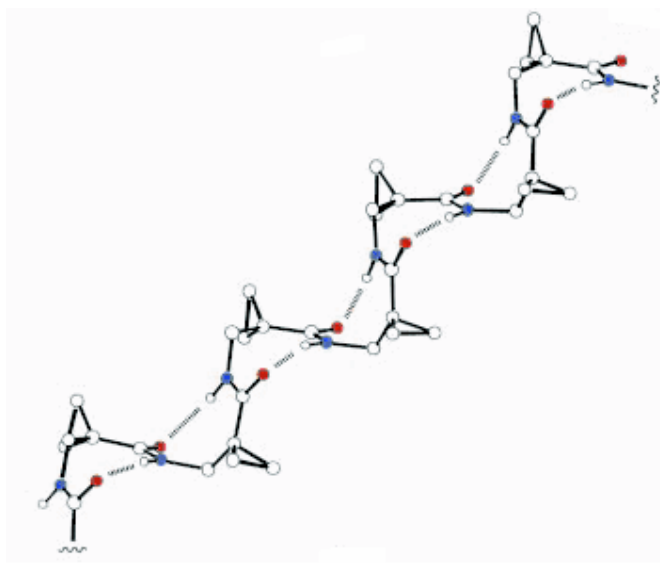


Figure 32 : Conformation de l'hélice 8

II B 1 8 : Conformation d'hélices de β -peptides ne mettant pas en jeu de liaisons hydrogènes.

Les β -amino-acides cycliques suivants : l'acide pyrrolidine-3-carboxylique (Pca) et l'acide nipécotique (Nip) ; homologues β de la proline et de l'acide pipécologique devraient

¹³⁷ Abele, S.; Seiler, P. Seebach, D. Synthesis, crystal structures, and modelling of β -oligopeptides consisting of 1-(aminométhyl)cyclopropanecarboxylic acid: ribbon-type arrangement of eight-membered H-bonded rings. *Helv. Chim. Acta.* **1999**, *82*,1559-1571.

avoir des propriétés conformationnelles similaires à celles α -amino-acides. Gellman et al.,¹³⁸ dans une étude de dichroïsme circulaire dans le méthanol, ont montré qu'à partir de quatre résidus, une structuration secondaire des poly-(S)-Pca et poly-(S)-Nip s'organise. Ils n'ont pas le même profil dichroïque ; le poly-(S)-Nip a un faible maximum à 228 nm et une bande intense négative à 208 nm qui est proche de ce que l'on peut observer dans l'hélice II de la (S)-polyproline. Le poly-(S)-Pca a un minimum à 214 nm. Seebach et al.,¹³⁹ ont étudié par CD dans le méthanol, que le poly-(S)- β_3 -Hpro présente, à partir de quatre résidus, une bande minimum intense à 202 nm et un maximum à 223 nm. Les calculs réalisés en modélisation moléculaire donne pour ce motif une hélice de type 10_3 (selon la nomenclature de Seebach) avec des angles dièdres dont les valeurs sont les suivantes : $\varphi = -72^\circ$, $\psi = 180^\circ$, $\theta = 180^\circ$.

II B 1 9 : Propriétés biologiques des β -peptides

Les β -peptides de par leur nature, sont résistants vis à vis de nombreuses enzymes,^{111,140,141,142} de plus ils sont capables d'adopter une structure en hélice en milieu aqueux et ainsi augmenter leur stabilité. Seebach a montré que certains β -peptides amphiphiles formant des hélices 14 sont des inhibiteurs de l'adsorption des graisses et du cholestérol.¹⁴³

Les β -peptides linéaires conçus pour adopter une conformation hélicoïdale amphiphile présentent une activité antimicrobienne à large spectre.^{144,145,146} Ils détruisent la membrane de certaines bactéries. Un mécanisme d'action supposé de ces molécules est le suivant ; elles s'insèrent dans la membrane lipidique et forment un canal ionique qui déstabilise la double

¹³⁸ Huck, B. R.; Langenhan, J. M.; Gellman, S. H. Non-Hydrogen-bonded secondary structure in β -peptides: evidence from circular dichroism of (S)-Pyrrolidine-3-carboxylic acid oligomers and (S)-nipecotic acids oligomers. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1717-1720.

¹³⁹ Abele, S.; Vogtli, K.; Seebach, D. Oligomers of β - and β -homoproline: what are the secondary structures of β -peptides lacking H-bonds? *Helv. Chim. Acta.* **1999**, *82*, 1539-1558.

¹⁴⁰ Hintermann, T.; Seebach, D. The biological stability of β -peptides: no interactions between α - and β -peptidic structures? *Chimia* **1997**, *51*, 244-247.

¹⁴¹ Seebach, D.; Abele, S.; Schreiber, J. V.; Martinoni, B.; Nussbaum, A. K.; Schild, H.; Schulz, H.; Hennecke, H.; Woessner, R.; Bitsch, F. Biological and pharmacokinetic studies with β -peptides. *Chimia* **1998**, *52*, 734-739.

¹⁴² Frackenpohl, J.; Arvidsson, P. I.; Schreiber, J. V.; Seebach, D. The outstanding biological stability of β - and γ -peptides toward proteolytic enzymes: An in vitro investigation with fifteen peptidases. *Chem. Biochem.* **2001**, *2*, 445-455.

¹⁴³ Werder, M.; Hauser, H.; Abele, S.; Seebach, D. β -Peptides as inhibitors of small-intestinal cholesterol and fat absorption. *Helv. Chim. Acta.* **1999**, *82*, 1774-1783.

¹⁴⁴ Hamuro, Y.; Scheider, J. P.; DeGrado, W. J. De novo design of antibacterial β -peptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 12200-12201.

¹⁴⁵ Lui, D.; DeGrado, W. F. De novo design, synthesis and characterization of antimicrobial β -peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7553-7559.

¹⁴⁶ LePlae, P.R.; Fisk, J.D.; Porter, E.A.; Weisblum, B.; Gellman, S.H. Tolerance of acyclic residues in the β -peptides 12-helix: access to diverse side-chain arrays for biological applications. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6820-6821.

couche lipidique conduisant à la destruction de la membrane.^{147,148} Les β -peptides possédant une structure de type hélice 12 sont aussi de bons antimicrobiens¹⁴⁹ (contre les Gram-positifs et les Gram-négatifs). Ainsi récemment, Gellman et al¹⁴⁹ ont montré que β -oligomère composé de 17 résidus adoptant une structure hélice 12 avait le même champs d'action que la magainine.

Les propriétés biologiques potentielles des β -peptides représentent un avenir intéressant pour la recherche.

II B 2 : Les α -aminoxy-acides

Les α -aminoxy-acides appartiennent à la famille des β -peptides et sont obtenus par le remplacement du $C\alpha$ par un oxygène. Cette structure est isostère de celle des β_2 -amino-acides. Les caractéristiques de la liaison N-O entraîne une répulsion de la paire électronique qui rigidifie le squelette.¹⁵⁰

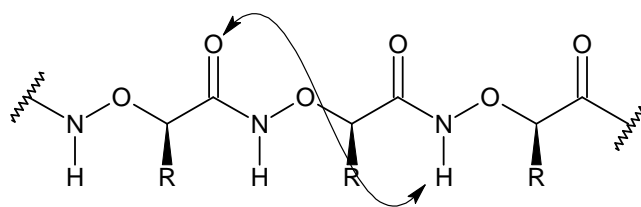


Figure 33 : Squelette des α -aminoxy-peptides et représentation de la liaison hydrogène 1-8.

Des études de RMN et d'IR ont montré, sur une série de peptides modèles la présence d'une liaison hydrogène possible entre le CO i et le NH $i+1$ dans un tripeptide qui rappelle la structure de type γ -turn des peptides **Figure 33**. Les études de RMN, de CD, de rayons X et de modélisation sur de oligomères plus longs montrent qu'ils se structurent en hélice 8 avec un pas à droite.¹⁵¹ Cette structure en hélice a été observée sur de courts oligomères et semble être indépendante de la taille du peptide. Les calculs en modélisation donnent une conformation de 1.8 résidus par tour d'hélice.¹⁵² Les α -aminoxy-acides sont des candidats potentiels pour la synthèse d'hélices artificielles.

¹⁴⁷ Oren, Z.; Shai, Y. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **1998**, *47*, 451-463.

¹⁴⁸ Tossi, A.; Sandri, L.; Giangaspero, A. Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **2000**, *55*, 4-30.

¹⁴⁹ Porter, E. A.; Wang, X.; Lee, H-S.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. Antibiotics - Non-haemolytic beta-Amino-Acid Oligomers. *Nature* **2000**, *404*, 565.

¹⁵⁰ Yang, D.; Ng, F-F.; Li, Z-J.; Wu, Y-D.; Chan, K. W. K.; Wang, D-P. An unusual turn structure in peptides containing α -aminoxy acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9794-9795.

¹⁵¹ Yang, D.; Qu, J.; Li, B.; Ng, F-F.; Wang, X-C.; Cheung, K-K.; Wang, D-P.; Wu, Y-D. Novel turns and helices in peptides of chiral α -aminoxy acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 589-590.

¹⁵² Wu, Y.-D.; Wang, D.-P.; Chan, K. W. K.; Yang, D. Theoretical study of peptides formed by aminoxy acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11189-11196.

II B 3 : Les analogues de β -peptides contenant un atome de soufre

Plusieurs analogues de β -peptides contenant un atome de soufre dans le squelette peptidique ont été étudiés. Ces dérivés sont des sulfonopeptides (sulfonamides),^{153,154,155,156} des sulfinopeptides (sulfinamides)¹⁵⁴ et des sulfoximines¹⁵⁷ susceptibles de constituer une classe de foldamers **Figure 34**. Il a été montré par RMN et IR, l'existence d'une liaison hydrogène 1-12 chez les β -sulfomanides.¹⁵⁸

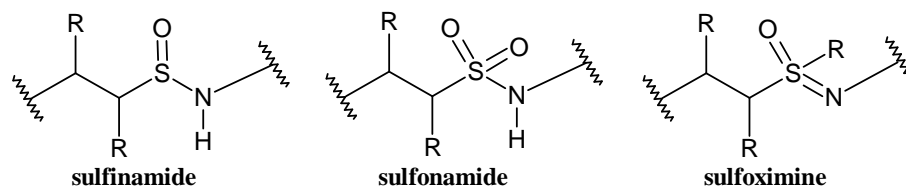


Figure 34 : Différentes structures de β -peptides soufrés

Cependant, il existe peu d'études à ce jour permettant de dire si ces molécules adoptent des structures secondaires organisées.

II B 4 : Les hydrazino-peptides

Dans les hydrazino-peptides le carbone β des β -amino-acides est remplacé par un atome d'azote. Cette modification entraîne d'autres possibilités de créer des liaisons hydrogènes qui sont représentés ci-après **Figure 35**.

¹⁵³ Gennari, C.; Salom, B.; Potenza, D.; Williams, A. Synthesis of sulfonamido pseudo-peptides: new chiral synthetic oligomers. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2067-2069.

¹⁵⁴ Moree, W. J.; van der Marel, G. A.; Liskamp, R. J. Synthesis of Peptidosulfinamides and Peptidosulfonamides: Peptidomimetics Containing the Sulfinamide or Sulfonamide Transition-State Isostere. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5157-5169.

¹⁵⁵ Gude, M.; Piarilli, U.; Potenza, D.; Salom, B.; Gennari, C. A new method for the solution and phase synthesis of chiral β -sulfonopeptides under mild conditions. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8589-8592.

¹⁵⁶ Monnee, M. C. F.; Marijine, M. F.; Brouwer, A. J.; Liskamp, R. M. J. A practical solid phase synthesis of oligopeptidosulfonamide Foldamers. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7991-7995.

¹⁵⁷ Bolm, C.; Moll, G.; Kahmann, J. D. Synthesis of pseudo-peptides with sulfoximines as chiral backbone modifying elements. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1118-1128.

¹⁵⁸ Gennari, C.; Gude, M.; Potenza, D.; Piarulli, U. Hydrogen-bonding donor/acceptor scales in β -sulfonamidopeptides. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1924-1931.

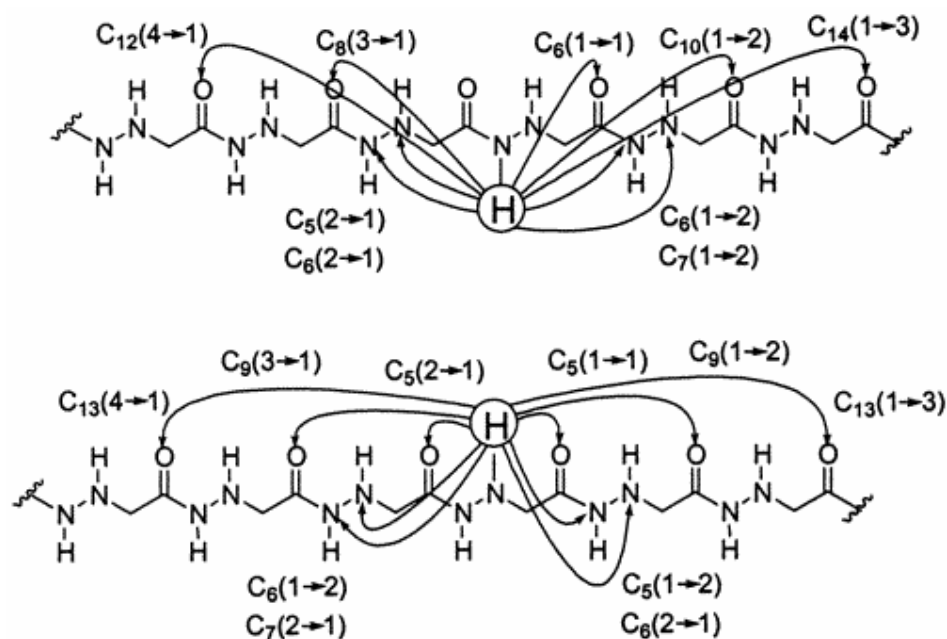


Figure 35 :Squelette des hydrazino-peptides et liaisons hydrogènes possibles

Des calculs¹⁵⁹ de modélisation ont montré que certains motifs conduisaient à des turns où des hélices de type 1-14 mais différentes de celles rencontrés dans les β -peptides, elle posséderait un pas de 5 Å et 3,3 résidus par tour. Mais à ce jour, aucune donnée expérimentale ne peut l'affirmer.

II C : Famille des γ -peptides

II C 1 : Les γ -peptides

Les γ -peptides représentent une nouvelle classe de foldamers. Ils correspondent aux seconds homologues supérieurs des peptides et sont capables eux aussi de former des liaisons intramoléculaires qui stabilisent des structures secondaires.

II C 1 1 : Propriétés conformationnelles générales des γ -peptides

Les γ -peptides possèdent deux angles dièdres de plus par rapport aux peptides. La nomenclature est la suivante ($\varphi, \xi_1, \xi_2, \psi$). Le squelette général des γ -peptides est représenté ci-dessous **Figure 36**.

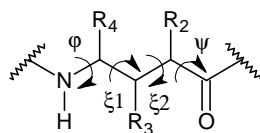


Figure 36 : Squelette général des γ -peptides

¹⁵⁹ Günther, R.; Hofmann, H.-J. Hydrazino peptides as foldamers: an extension of the β -peptide concept. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 247-255.

Les homopolymères des γ -peptides ont longuement été étudiés dans le but de connaître leur structure secondaire.^{160,161,162} Mais à l'inverse des poly- β -peptides, les préférences structurales des poly- γ -peptides n'ont pas été clairement définies. Deux modèles hélicaux avec un pas à gauche ont été proposés pour l'acide poly- γ -D-glutamique.¹⁶¹ Les deux possèdent trois résidus par tour mais diffèrent par la nature des liaisons hydrogènes mises en jeu (H_{1-17} ou H_{1-19}). Des calculs de dynamique moléculaire et des calculs par quantification moléculaires ont récemment montré¹⁶³ une préférence pour une stabilisation de l'hélice par des liaisons H_{1-19} entre le carbonyle i et le proton amidique $i+3$. Une autre étude réalisée sur l'acide poly- γ -L-glutamique, n'a pu mettre en évidence telle structuration.¹⁶⁰

II C 1 2 : Conformation de type H_{1-14} des γ -peptides

Comme pour les β -peptides, l'addition d'un angle dièdre laissait présager un plus haut degré de liberté chez les γ -peptides ; mais Seebach¹⁶⁴ a montré que la stabilité des hélices augmente avec l'homologation. Ainsi les γ -peptides sont plus stables que les β - et que les α -peptides pour un nombre de résidus égal. Dans son étude, il a repris les premiers travaux qu'il avait réalisés sur la séquence H-(Val-Ala-Leu)₂-OH utilisant les γ -amino acides correspondants. L'analyse du spectre CD ne donne aucune caractéristique. Cependant l'étude RMN-2D dans la pyridine et le méthanol révèle que H-(γ_4 Val- γ_4 Ala- γ_4 Leu)₂-OH adopte une structure en hélice de type (P)-2.6₁₄ avec un pas de 5 Å qui est stabilisée par une liaison H1-14 entre le proton amidique i et le carbonyle $i+3$. Le dipôle formé est dans le même sens que dans les peptides. Dans les modèles moléculaires, les substituants sont orientés perpendiculairement par rapport à l'hélice **Figure 37**.

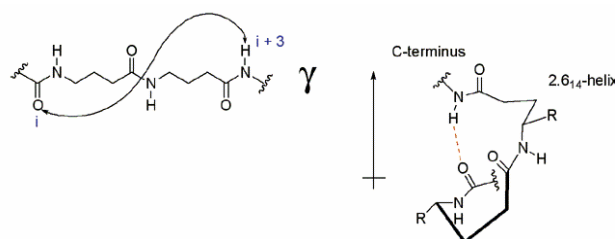


Figure 37 : Liaison hydrogène H1-14 des γ -peptides

¹⁶⁰ Kajtár, M.; Bruckner, V. Optical rotatory dispersion of γ -linked oligo and polypeptides of glutamic acid. *Tetrahedron Lett.* **1966**, 7, 4813-4818.

¹⁶¹ Rydon, H. N. Polypeptides. X. Optical rotatory dispersion of poly- γ -D-glutamic acid. *J. Chem. Soc.* 1964, 1328-1333.

¹⁶² Watanabe, T.; Ina, T.; Ogawa, K.; Matsumoto, T.; Sawa, S.; Ono, S. Conformation of acid form γ -poly(glutamic acid). *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1970**, 43, 3939-3940.

¹⁶³ Zanuy, D.; Aleman, C.; Muñoz-Guerra, S. On helical conformation of un-ionized poly(γ -D-glutamic acid). *J. Bio. Macro.* **1998**, 23, 175-184.

¹⁶⁴ Hintermann, T.; Gademann, K.; Jaun, B.; Seebach, D. 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.* **1998**, 81, 983-1002.

Hanessian¹⁶⁵ a étudié la structure en solution des analogues tétra-, hexa- et octa- γ -peptides de la séquence Ala-Val. Tous ces γ_4 -peptides adoptent une structure en hélice (P)-2.6₁ identique à celle identifiée par Seebach. Comme lui, il a constaté que le spectre de dichroïsme circulaire ne fait pas apparaître de structure secondaire. La représentation 3D qui suit, montre la structure de type (P)-2.6₁₄ d'un γ_4 -hexapeptide **Figure 38**.

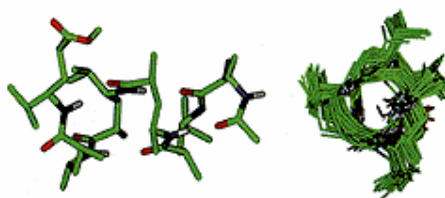


Figure 38 : Structure de l'hélice (P)-2.6₁

Les γ -peptides peuvent être substitués en position 2, 3 ou 4 mais peu ont pu être caractérisés à ce jour. Hanessian a étudié des γ -peptides 2,4-disubstitués. Il a observé que la substitution en position α pouvait stabiliser ou déstabiliser la structure de l'hélice en fonction de la stéréochimie. Par exemple l'introduction en α (position 2) d'un (S)-méthyle n'a pas d'incidence sur la conformation en hélice, par contre un (R)-méthyle donne une conformation de type turn.¹⁶⁵ Il a aussi étudié cette préférence conformationnelle sur un autre γ -peptide et les résultats RMN-2D ont là aussi montré que l' α (S) substitution favorise la structure en hélice.¹⁶⁶

Seebach¹⁶⁷ a aussi étudié des γ -peptides substitués en position 2 et 4 en s'intéressant aux orientations « like » et « unlike » des substituants. Ceux en position « unlike », déstabilisent l'hélice et induisent des turns et ceux en position « like » la stabilisent. Quant aux substituants en position β (position 3), ils n'induisent pas de gênes stériques quelque soit l'orientation par rapport à l'hélice. Ainsi le (R,R,R)- γ -peptide préparé par Seebach¹⁶⁸ a une structure (M)-2.6₁₄ à l'état cristallin et dans le méthanol.

Les γ -peptides qui possèdent un groupement hydroxyle en position 3 et un groupe alkyle (Ala, Val, Leu) en position 4, présentent en milieu aqueux, un spectre dichroïque avec un faible maximum à 220 nm et un minimum intense à 198 nm.¹⁶⁷ Ces résultats montrent pour la première fois une structuration des γ -peptides dans l'eau.

¹⁶⁵ Hanessian, S.; Luo, X.; Schaum, R.; Michnick, S. Design of secondary structures in unnatural peptide: stable helical γ -tetra-, hexa-, and octapeptides and consequences of α -substitution. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8569-8570.

¹⁶⁶ Hanessian, S.; Luo, X.; Schaum, R. Synthesis and folding preferences of γ -amino acid oligopeptides: stereochemical control in the formation of a reverse turn and a helix. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 4925-4929.

¹⁶⁷ Brenner, M.; Seebach, D. Synthesis and CD spectra in MeCN, MeOH, and H₂O of γ -oligopeptides with hydroxy groups on the backbone. *Helv. Chim. Acta.* **2001**, *84*, 1181-1189.

¹⁶⁸ Seebach, D.; Brenner, M.; Rueping, M.; Schweizer, B.; Jaun, B. Preparation and determination of X-ray-crystal and NMR-solution structures of $\gamma^{2,3,4}$ -peptides. *Chem. Comm.* **2001**, 207-208.

II C 1 3 : Conformation de type H_{1,9} des γ -peptides

Très récemment Seebach¹⁶⁹ a découvert qu'un di- $\gamma_{2,3,4}$ -peptide trisubstitué adopte une nouvelle structure en hélice, à l'état cristallin, stabilisée par des liaisons hydrogène de type H_{1,9} entre le carbonyle *i* et le proton amidique *i*+2 **Figure 39**.



Figure 39 : Liaison hydrogène H_{1,9} du γ -dipeptide à l'état cristallin

II C 1 4 : Conformation des γ -peptides possédant un amide tertiaire

Des γ -peptides formés à partir d'amides tertiaires ont été préparés.¹⁷⁰ Ils sont composés d'un enchaînement de bicycles formés à partir de l'acide tartrique et ne peuvent pas donner des structures régulières stabilisées par des liaisons hydrogène **Figure 40**.

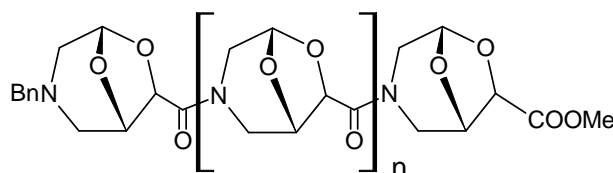


Figure 40 : γ -peptides formés à partir d'amides tertiaires

Néanmoins, comme pour les peptoides, les poly-prolines et les β -peptides formés à partir d'amides tertiaires, ils présentent en dichroïsme circulaire, un spectre intense qui laisse penser que ces molécules peuvent former une structure secondaire ordonnée en solution. Mais à ce jour, aucune étude n'est en mesure d'affirmer ou d'infirmer que ces molécules forment des hélices.

II C 1 5 : Propriétés biologiques des γ -peptides

Cinq γ -peptides (γ_2 , γ_3 , γ_4 , $\gamma_{2,3,4}$) ont été testés dans le but de connaître leur résistance vis à vis d'une quinzaine de peptidases.¹⁴² Il ressort de cette étude que tous, après une période

¹⁶⁹ Seebach, D.; Brenner, M.; Rueping, M.; Jaun, B. γ^2 -, γ^3 - and $\gamma^{2,3,4}$ -Amino Acids, coupling to γ -hexapeptides: CD spectra, NMR solution and X-ray crystal structures of γ -peptides. *Chem. Eur. J.* **2002**, 573-584.

¹⁷⁰ Machetti, F.; Ferrali, A.; Menchi, G.; Occhiato, E. G.; Guarna, A. Oligomers of Enantiopure Bicyclic γ/δ -Amino Acids (BTAA). 1. Synthesis and Conformational Analysis of 3-Aza-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane-7-carboxylic Acid Oligomers (PolyBTG). *Org. Lett.* **2000**, 2, 3987-3990.

d'incubation de 48 heures, ont résisté à la dégradation. De plus, les γ -peptides n'ont pas d'action inhibitrice vis à vis d'enzymes comme la chymotrypsine.

A la différence des β -peptides, aucun test d'activité biologique n'a été pour le moment publié sur l'intérêt médical des γ -peptides.

II C 2 : Les oligourées

D'autres molécules appartenant à la famille des γ -peptides ont été étudiés, il s'agit des oligourées.^{171,172,173,174} Nowick¹⁷⁴ a synthétisé des N-alkyl-N,N'-oligourées et il a émis l'hypothèse que ces molécules pouvaient adopter une structure secondaire stable en solution. Des études de cristallographie indiquent que ces composés forment des hélices stabilisées par des liaisons hydrogènes H₁₋₁₀ **Figure 41**.

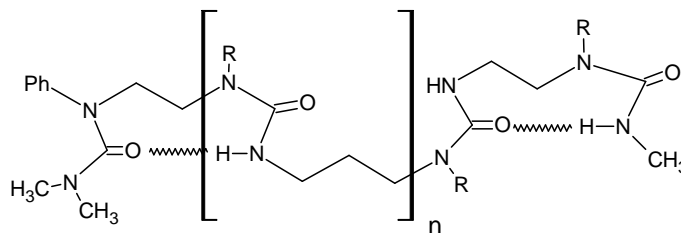


Figure 41 : Structure des N-alkyl-N,N'-oligourées

Les résultats en infra-rouge montrent une augmentation du nombre de liaisons hydrogènes sur les molécules α -substituées dans le chloroforme. Mais à ce jour, aucune autre étude n'a été réalisée pour apporter des éléments de réponse.

Guichard et al¹⁷⁵ ont montré par des études de RMN dans la pyridine que des oligomères d'urées N, N'-liées adoptent une structure stable en hélice. Elle est caractérisée par un pas de 5.1 Å, 2.5 résidus par tour et un pas à droite. Les liaisons hydrogène mises en jeu forment deux cycles de nature différente. Un cycle à 12 atomes entre le CO en position i et le HN' en position i+2 et un cycle à 14 atomes entre le CO i et le HN i+3. Les calculs de modélisation moléculaires suggèrent que la force des liaisons n'est pas équivalente ; la première liaison hydrogène a une longueur comprise entre 3.10 et 3.46 Å, la seconde, une longueur comprise entre 2.91 et 3.13 Å.

¹⁷¹ Kim, J.-M.; Paikoff, S. J.; Schultz, P. G. The solid phase synthesis of oligoureas *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 5305-5308.

¹⁷² Kruijtzter, J. A. W.; Lefeber, D. J.; Liskamp, R. M. J. Approaches to the synthesis of ureapeptoid peptidomimetics. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 5335-5338.

¹⁷³ Stigers, K. D.; Soth, M. J.; Nowick, J. S. Designed molecules that fold to mimic protein secondary structures. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 714-723.

¹⁷⁴ Wilson, M. E.; Nowick, J. S. An efficient synthesis of N, N'-linked oligoureas. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 6613-6616.

¹⁷⁵ Semetey, V.; Rognan, D.; Hemmerlin, C.; Graff, R.; Briand, J.-P.; Marraud, M.; Guichard, G. stable helical secondary structure in short-chain N,N'-linked oligoureas bearing proteinogenic side chains. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1893-1895.

II D : Famille des δ -peptides

II D 1 : Structures générales des δ -peptides

Les δ -peptides représentent des molécules isostériques, d'unités dipeptidiques **Figure 42**.

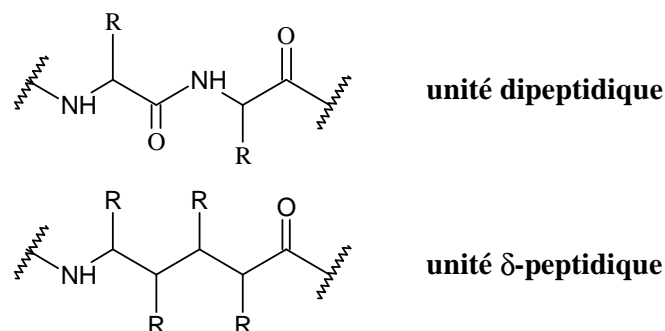


Figure 42 : Comparaison de l'isostérie des structures des δ -peptides et des α -dipeptides

Cette structure particulière a été utilisée dans un premier temps pour remplacer les β -turns présent dans les peptides et les protéines.¹⁷⁶ Pour conserver la géométrie de la liaison amide manquante, certains auteurs l'ont substituée par une liaison alcène ;^{177,178,179} cette variante permettant de réduire la flexibilité de la molécule.

II D 2 : Carbopeptoïdes de structure pyranosique

Les premières utilisations de δ -peptides l'ont été sous forme d'homooligomères de carbopeptoïdes.¹⁸⁰ Mais aucune étude de structuration n'avait été réalisée lors de ces travaux.

Les premières études de structuration des carbopeptoïdes a été réalisé par l'équipe de Gervay sur des oligomères de δ -peptides formés à partir de dérivés de sucres pyranosiques.¹⁸¹ Ils ont travaillé sur des (1 \rightarrow 5) sialooligomères (des acides N-neuraminiques) de longueurs

¹⁷⁶ Rodriguez, M.; Heitz, A.; Martinez, J. "Carba" peptide bond surrogates: synthesis of Boc--Leu-...(CH₂-CH₂)-Phe-OH and Boc-Leu--(CH₂-CH₂)-Phe-OH through a horner-emmons reaction. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 7319-7322.

Casimir JR, Didierjean C, Aubry A, Rodriguez M, Briand JP, Guichard G. Stereoselective alkylation of N-Boc-protected-5-substituted delta-lactams: synthesis of alpha, delta-disubstituted delta-amino acids. *Org.Lett.* **2000**, *2*, 895-897.

¹⁷⁷ Cox, M. T.; Heaton, D. W.; Horbury, J. Preparation of protected trans-olefinic dipeptide isosteres. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1980**, 799-800.

Hann, M. M.; Sammes, P. G.; Kennewell, P. D.; Taylor, J. B. On double bond isosteres of the peptide bond; an enkephalin analog. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1980**, 234-235.

¹⁷⁸ Wipf, P.; Henninger, T. C.; Geib, S. J. Methyl- and (trifluoromethyl)alkene peptide isosteres: synthesis and evaluation of their potential as β -turn promoters and peptide mimetics. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6088-6089.

¹⁷⁹ Gardner, R. R.; Liang, G.-B.; Gellman, S. H. β -turn and b-hairpin mimicry with tetrasubstitued alkenes. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1806-1816.

¹⁸⁰ Nicolaou, K. C.; Flörke, H.; Egan, M. G.; Barth, T.; Estevez, V. A. Carbonucleotoids and carbopeptoïdes: new carbohydrate oligomers. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1775-1778.

¹⁸¹ Gervay, J.; Flaherty, T. M.; Nguyen, C. Solution Phase Synthesis of (1 \rightarrow 5)-Amide Linked Sugar Amino Acid Dimers Derived from Sialic Acids. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1493-1496.

différentes et ont montré, aux vues des résultats obtenus en dichroïsme circulaire et en RMN 2D, qu'à partir de trois résidus, il y avait une structure secondaire stable qui s'établissait en milieu aqueux.¹⁸² La combinaison des résultats d'échange de protons NH/ND par RMN et de dichroïsme circulaire (dans l'eau) montrent une disparité entre des oligomères de longueurs différentes.¹⁸³ En effet, les protons amidiques des tétra, penta et hexamères ont un échange lent caractéristique d'une liaison hydrogène forte alors que ceux de l'heptamère ont un échange rapide. Quant à l'octamère, il présente lui aussi en échange lent des protons amidiques. Pour élucider ces disparités, les auteurs ont aussi comparé les spectres dichroïques et ont remarqué que l'octamère avait un profil légèrement différent de ceux de plus faibles longueurs. Avec l'aide de la modélisation moléculaire, deux structures ont été proposées **Figure 43**:

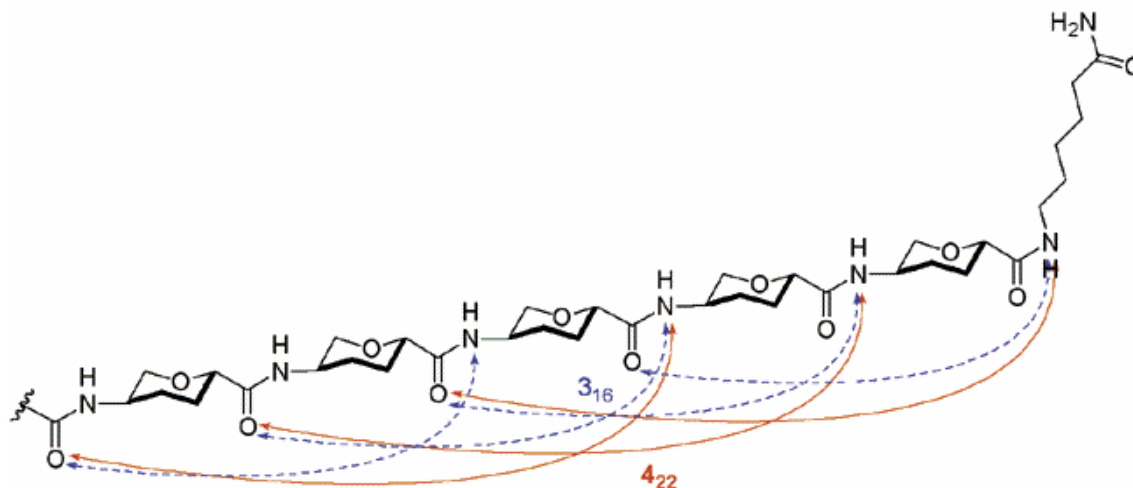


Figure 43 : Liaisons hydrogènes possibles pour les sialooligomères

- une de type 3_{16} (ou $S(16)$) pour les oligomères courts avec des liaisons hydrogènes entre le carbonyle i et le proton amidique $i+3$.

- une de type 4_{22} (ou $S(22)$) pour les oligomères formés de plus de huit résidus avec des liaisons hydrogènes $CO\ i \cdots NH\ i+4$. Quant aux heptamères, ils peuvent exister sous les deux formes.

¹⁸² Szabo, L.; Smith B. L.; Mac Reynolds, K. D.; Parrill, A. L.; Morris, E. R.; Gervay, J. Solid phase synthesis and secondary structural studies of (1→5) amide-linked sialooligomers. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1074-1078.

¹⁸³ McReynolds, K. D.; Gervay-Hague, J. Examining the secondary structures of unnatural peptides and carbohydrate-based compounds utilizing circular dichroism. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 337-362.

II D 3 : Carbopeptoïdes de structure furanosique

L'équipe de Fleet a travaillé sur des carbopeptoïdes dont la structure est de type furanosique.¹⁸⁴ Il a découvert grâce à des études RMN-2D que les 1,4-cis oligomères formaient une structure de type β -turn avec une liaison hydrogène de type H1-10 entre le carbonyle i et le proton amidique $i+2$. Cette géométrie entraîne donc la formation d'une hélice de type (S)10 **Figure 44**.

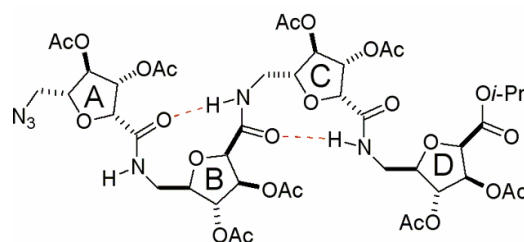


Figure 44 : Représentation de la structure H1-10 des cis-furanosialooligomères

La structure en hélice de ces molécules est très dépendante de la séquence et de la stéréochimie du cycle furanose.¹⁸⁵

Une autre structure secondaire en hélice est présente chez certains oligomères de configuration 1,4-trans, ceci a été déterminé par des études RMN-2D. Ainsi l'octamère suivant forme une hélice avec un pas à gauche, stabilisée par des liaisons hydrogènes H1-16 entre le carbonyle i et le proton $i+3$.¹⁸⁶

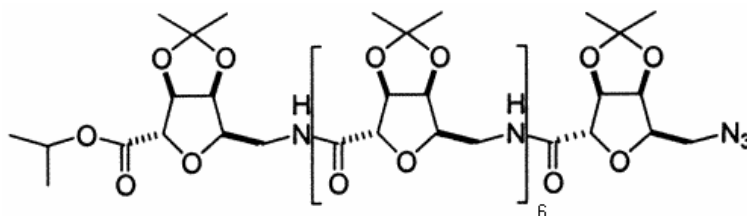


Figure 45 : Octamère qui exhibe une structure hélice H1-16

Ces structures ont un haut degré de fonctionnalité, la synthèse est assez aisée et la solubilité en milieu aqueux est importante. Ces caractéristiques en font des candidats potentiels pour mimer des structures secondaires organisées.

¹⁸⁴ Smith, M. D.; Timothy, D. W.; Tranter, G. E.; Sansom, M. S. P.; Fleet, G. W. Secondary structure in oligomers of carbohydrate amino acids. *Chem. Commun.* **1998**, 2041-2042.

¹⁸⁵ Brittain, D. E. A.; Watterson, M. P.; Claridge, T. D. W.; Smith, M. D.; Fleet, G. W. J. Tetrahydrofuran amino acids-versatile building blocks for unnatural biopolymers: lack of secondary structure in oligomeric carbopeptoids derived from a D-galacto-5-(aminomethyl) tetrahydrofuran-2-carboxylic acid. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 3655-3665.

¹⁸⁶ Claridge, T. D. W.; Long, D. D.; Hungerford, N. L.; Aplin, R. T.; Smith, M. D.; Marquess, D. G.; Fleet, G. W. An octameric carbopeptoid; secondary structure in octameric and tetrameric 5-aminomethyl-tetrahydrofuran-2-carboxylates. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 2199-2202.

III : Conclusion

Les études réalisées sur les foldamers montrent l'intérêt que portent de nombreux chercheurs à la structure de ces hélices artificielles ainsi qu'à la découverte de nouveaux oligomères susceptibles de former des structures secondaires organisées. Elles représentent un nouvel intérêt pour la synthèse de molécules biomimétiques. Le contrôle de la conformation de telles molécules permettrait de comprendre les mécanismes mis en jeu lors des interactions moléculaires entre un récepteur et son ligand par exemple, mais aussi sur les processus de repliements des protéines.

La nature a créé des peptides et des protéines de tailles très variables qui possèdent des hélices α ou d'autres types d'hélices que les chimistes et les biologistes voudraient substituer. Goodman,⁹⁰ dans cette optique a modifié la structure élémentaire du collagène tout en conservant la structure tridimensionnelle en triple hélice.

Nous avons donc cherché un peptide substrat qui possède une hélice naturelle dans lequel nous avons cherché à remplacer cette hélice par une hélice artificielle. Le peptide que nous avons sélectionné est le hCRF.

Chapitre 3 : hCRF

I : Structures et généralités

En 1948 Sir Geoffrey Harris mis en évidence l'existence d'une substance présente dans l'hypothalamus (qui sera nommée par la suite CRF) qui serait responsable de la libération de l'hormone adrénocorticotropine (ACTH).¹⁸⁷ Dans les années 50 Guillemin et Rosenberg¹⁸⁸ et Saffran et Schally¹⁸⁹ ont observés dans un extrait d'hypothalamus, la présence d'un composé qui stimulait la sécrétion d'ACTH (d'où le nom de Corticotropin Releasing Factor).

Ce n'est qu'en 1981 que W. Vale et col^{190,191} ont isolé le CRF de l'hypothalamus de mouton. Ils l'ont caractérisé et synthétisé. Le CRF est une hormone peptidique de 41 résidus amino acides.

I 1 : Structure primaire du CRF

La séquence du CRF diffère en fonction de l'espèce mais les homologues de séquence sont élevées. Ils possèdent tous une extrémité C terminale amidée. Les différents CRF ont été identifiés chez le rat,^{192,193} l'Homme,¹⁹⁴ la chèvre,¹⁹⁵ la vache,¹⁹⁶ le porc,¹⁹⁷ le « suckerfish »¹⁹⁸ et la grenouille¹⁹⁹ par des méthodes chimiques ou par clonage de leur ARN

¹⁸⁷ Harris, G. Neural Control of the Pituitary Gland. *Physiol Rev*, **1948**, 28, 139.

¹⁸⁸ Guillemin, R.; Rosenberg, B. Humoral hypothalamic control of anterior pituitary: a study with combined tissue cultures. *Endocrinology*, **1955**, 57, 599-607.

¹⁸⁹ Saffran, M.; Schally, A. V. The release of corticotrophin by anterior pituitary tissue *in-vitro*. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1955**, 33, 408-415.

¹⁹⁰ Spiess, J.; Rivier, J.; Rivier, C.; Vale, W. Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1981**, 78, 6517-6521.

¹⁹¹ Vale, W.; Spiess, J.; Rivier, C.; Rivier, J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*, **1981**, 213, 1394-1397.

¹⁹² Spiess, J.; Rivier, J.; Vale, W. Sequence analysis of rat hypothalamic corticotropin-releasing factor with the orthophthaldehyde strategy. *Biochemistry*, **1983**, 22, 4341-4346.

¹⁹³ Rivier, J.; Spiess, J.; Vale, W. Characterization of rat hypothalamic corticotropin-releasing factor precursor. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1983**, 80, 4851-4855.

¹⁹⁴ Shibahara, S.; Morimoto, Y.; Furutani, Y.; Notake, M.; Takahashi, H.; Shimizu, S.; Horikawa, S.; Numa, S. Isolation and sequence analysis of the human corticotropin-releasing factor precursor gene. *Embo J*, **1983**, 2, 775-779.

¹⁹⁵ Ling, N.; Esch, F.; Bohlen, P.; Baird, A.; Guillemin, R. Isolation and characterization of caprine corticotropin-releasing factor. *Biochem Biophys Res Commun*, **1984**, 122, 1218-1224.

¹⁹⁶ Esch, F.; Ling, N.; Bohlen, P.; Baird, A.; Benoit, R.; Guillemin, R. Isolation and characterization of the bovine hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Biochem Biophys Res Commun*, **1984**, 122, 899-905.

¹⁹⁷ Patthy, M.; Horvath, J.; Mason-Garcia, M.; Szoke, B.; Schlesinger, D.H.; Schally, A.V. Isolation and amino acid sequence of corticotropin-releasing factor from pig hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1985**, 82, 8762-8766.

¹⁹⁸ Okawara, Y.; Morley, S.D.; Burzio, L.O.; Zwiars, H.; Lederis, K.; Richter, D. Cloning and sequence analysis of cDNA for corticotropin-releasing factor precursor from the teleost fish *Catostomus commersoni*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1988**, 85, 8439-8443.

messagers dans un plasmide. Cette homologie est aussi observée avec l'urotensine-I²⁰⁰ (isolée dans l'urophyse extraite du « suckerfish » *Castostomus commersoni*) et la sauvagine^{201,202} (isolée d'un extrait de peau de la grenouille arboricole d'Amérique du sud *Phyllomedusa sauvegei*). Ces espèces possédant aussi le CRF de nombreux laboratoires ont recherché la présence de molécules « CRF-like » chez les mammifères.

En 1995, une molécule de la famille de l'urotensine a été isolée dans les noyaux d'Edinger-Westphal de cerveau de rat²⁰³ et nommée urocortine. Chez l'homme²⁰⁴, l'urocortine a été identifiée par clonage d'ARNm issus d'une bibliothèque de cerveau humain. Les séquences CRF des différentes espèces conservent une grande homologie de 81 à 95% **Figure 46**, avec une meilleure conservation du côté N-terminal que du côté C-terminal et les résidus 3-21, 24, 26-32, et 34-37 sont complètement conservés.

	1	5	10	15	20	25	30	35	40																																		
humain/rat CRF	S	E	E	P	P	I	S	L	D	L	T	F	H	L	L	R	E	V	L	E	M	A	R	A	E	Q	L	A	Q	Q	A	H	S	N	R	K	L	M	E	I	I	-NH ₂	100%
suckerfish CRF	S	E	E	P	P	I	S	L	D	L	T	F	H	L	L	R	E	V	L	E	M	A	R	A	E	Q	L	A	Q	Q	A	H	S	N	R	K	M	M	E	I	F	-NH ₂	95%
porc CRF	S	E	E	P	P	I	S	L	D	L	T	F	H	L	L	R	E	V	L	E	M	A	R	A	E	Q	L	A	Q	Q	A	H	S	N	R	K	L	M	E	N	F	-NH ₂	95%
grenouille CRF	A	E	E	P	P	I	S	L	D	L	T	F	H	L	L	R	E	V	L	E	M	A	R	A	E	Q	L	A	Q	Q	A	H	S	N	R	K	L	M	D	I	I	-NH ₂	95%
ovin/capin CRF	S	Q	E	P	P	I	S	L	D	L	T	F	H	L	L	R	E	V	L	E	M	T	K	A	D	Q	L	A	Q	Q	A	H	S	N	R	K	L	L	D	I	A	-NH ₂	83%
bovin CRF	S	Q	E	P	P	I	S	L	D	L	T	F	H	L	L	R	E	V	L	E	M	T	K	A	D	Q	L	A	Q	Q	A	H	N	N	R	K	L	L	D	I	A	-NH ₂	81%
rat/sourie urocortin	D	D	P	L	S	I	D	L	T	F	H	L	L	R	T	L	L	E	L	A	R	T	Q	S	Q	R	E	R	A	E	Q	N	R	I	I	F	D	S	V	-NH ₂	44%		
humain urocortin	D	N	P	S	L	S	I	D	L	T	F	H	L	L	R	T	L	L	E	L	A	R	T	Q	S	Q	R	E	R	A	E	Q	N	R	I	I	F	D	S	V	-NH ₂	39%	
urotensin I	N	D	D	P	P	I	S	I	D	L	T	F	H	L	L	R	N	M	I	E	M	A	R	I	E	N	E	R	E	Q	A	G	L	N	R	K	Y	L	D	E	V	-NH ₂	61%
sauvagine	Z	G	P	P	I	S	I	D	L	S	L	E	L	L	R	K	M	I	E	I	E	K	Q	E	K	E	K	Q	Q	A	A	N	N	L	L	L	D	T	I	-NH ₂	44%		

Figure 46 : Famille du CRF. Homologies en %. Le symbole Z correspond à l'acide pyroglutamique.

¹⁹⁹ Stenzel-Poore, M.P.; Heldwein, K.A.; Stenzel, P.; Lee, S.; Vale, W.W. Characterization of the genomic corticotropin-releasing factor *Crf* gene from *Xenopus Laevis* two members of *Crf* family exist in amphibians. *Mol Endocrinol*, **1992**, *6*, 1716-1724.

²⁰⁰ Lederis, K.; Letter, A.; McMaster, D.; Moore, G.; Schlesinger, D. Complete amino acid sequence of urotensin-I, a hypotensive and corticotropin-releasing neuropeptide from *Castostomus* *Science*, **1982**, *218*, 162-164.

²⁰¹ Montecucchi, P.C.; Anastasi, A.; de Castiglione, R.; Erspamer, V. Isolation and amino acid composition of sauvagine. An active polypeptide from methanol extracts of the skin of the South American frog *Phyllomedusa sauvegei*. *Int J Pept Protein Res*, **1980**, *16*, 191-199.

²⁰² Montecucchi, P.C.; Henschen, A. Amino acid composition and sequence analysis of sauvagine, a new active peptide from the skin of *phyllomedusa sauvegei*. *Int J Pept Protein Res*, **1981**, *18*, 113-120.

²⁰³ Vaughan, J.; Donaldson, C.; Bittencourt, J.; Perrin, M.H.; Lewis, K.; Sutton, S.; Chan, R.; Turnbull, A.V.; Lovejoy, D.; Rivier, C.; *et al.* Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin-I and to corticotropin-releasing factor. *Nature*, **1995**, *378*, 287-292.

²⁰⁴ Donaldson, C.J.; Sutton, S.W.; Perrin, M.H.; Corrigan, A.Z.; Lewis, K.A.; Rivier, J.E.; Vaughan, J.M.; Vale, W.W. Cloning and characterization of human urocortin *Endocrinology*, **1996**, *137*, 2167.

I 2 : Structure secondaire du CRF

Les structures secondaires des différentes molécules de la famille du CRF ont été déterminées selon la théorie de Chou et Fasman,²⁰⁵ ainsi que par des analyses de dichroïsme circulaire,²⁰⁶ IR et de RMN.^{207,208}

Dathe et col.²⁰⁷ montrent qu'en milieu aqueux le CRF existe de manière prédominante sous la forme d'une pelote statistique. A une concentration supérieure à 1 μ M, le peptide montre une forte tendance à s'auto-agrégier avec une légère augmentation de structure hélice α déterminée par dichroïsme. La proportion d'hélice α est également dépendante du pH. Le hCRF se lie fortement à la surface de la bicouche des vésicules de phosphatidylcholine d'œuf probablement par la face hydrophobe de l'hélice amphipathique.²⁰⁹

La détermination de structure secondaire par dichroïsme circulaire montre qu'il existe une légère différence entre les caractéristiques de oCRF et de hCRF. Le spectre de oCRF en solution aqueuse diluée montre deux bandes négatives à 200 nm (intense) et 222 nm et une bande positive à 190 nm, ce qui est caractéristique des peptides à haut degré de flexibilité. Par contre le spectre de hCRF montre deux bandes négatives à 207 (intense) et 222 nm et une bande positive à 192 nm qui caractérise une forme plus ordonnée. La structure secondaire du hCRF est très sensible aux variations de pH, avec une augmentation du taux de forme hélicoïdale vers pH 7 (42%) alors qu'à pH 2.3, il n'est que de 15%, pour retomber à 30% à pH 11.3.

En présence de 40 % de TFE (inducteur de structures secondaires), les deux CRF présentent respectivement 87 % d'hélicité pour hCRF et 75 % pour oCRF. Dans ces études, l'hélice est induite par le TFE et *in-vivo* par la membrane au niveau des récepteurs.

²⁰⁵ Montecucchi, P.C.; Gozzini, L. Secondary structure prediction of sauvagine, a novel biologically active polypeptide from a frog. *Int J Pept Protein Res*, **1982**, *20*, 139-143.

²⁰⁶ Pallai, P.V.; Mabilia, M.; Goodman, M.; Vale, W.; Rivier, J. Structural homology of corticotropin-releasing factor, sauvagine, and urotensin I: circular dichroism and prediction studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1983**, *80*, 6770-6774.

²⁰⁷ Dathe, M.; Fabian, H.; Gast, K.; Zirwer, D.; Winter, R.; Beyermann, M.; Schumann, M.; Bienert, M. Conformational differences of ovine and human corticotropin releasing hormone- a CD, IR, NMR and dynamic light scattering study. *Int J Pept Protein Res*, **1996**, *47*, 383-393.

²⁰⁸ Romier, C.; Brenassau, J-M.; Cambillau, C.; Darbon, H.; Solution structure of human corticotropin releasing factor by ¹H NMR and distance geometry with restrained molecular dynamics. *Protein Engineering* **1993**, *6*, 149-156.

²⁰⁹ Pallai, P. V.; Mabilia, M.; Goodman, M.; Vale, W.; Rivier, J. Structural homology of corticotropin-releasing factor, sauvagine and urocortin I: Circular dichroism and prediction studies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1983**, *80*, 6770-6774.

Les prédictions de structures secondaires par la méthode de Chou et Fasman²¹⁰ donnent pour le oCRF une hélicité de 78% en accord avec les résultats obtenus avec le dichroïsme circulaire. Les résidus de 8 à 34 et 38 à 42 seraient impliqués dans l'hélice.

Une étude RMN²⁰⁸ réalisée dans un mélange eau-trifluoroéthanol (34-66%) a permis de confirmer que le hCRF est composé d'une hélice α centrale comprenant les acides aminés de 6 à 36. L'hélice est initiée par la présence des deux prolines 4 et 5 et sa structuration est facilitée par la nature amphiphile des résidus 6 et 20.

La structure du hCRF est donc la suivante : une partie N-terminale étendue, une hélice α centrale des résidus 6 à 36 et une partie C-terminale « random-coil ».

I 3 : Localisation sur le gène du CRF

Les séquences nucléotidiques qui codent pour les précurseurs d'ADNc ovin ou de rat, ainsi que pour les gènes du CRF humain, ovin et de rat ont été déterminés. Le locus du gène du CRF est situé sur le chromosome 8q13 pour l'homme.²¹¹ Les gènes sont similaires d'une espèce à l'autre, avec deux exons séparés par un intron de 686 à 800 paires de bases. Le premier exon code pour la partie non traduite de l'ARNm et le second exon code pour le polypeptide pré-proprécurseur du CRF avec une séquence de 187 à 196 résidus. La partie C-terminale du précurseur contient les 41 amino-acides du CRF. Le haut degré d'homologie des différentes espèces suggère que le gène a été hautement conservé au cours de l'évolution.

I 4 : Stabilité enzymatique du CRF

Le CRF comme tous les peptides de l'organisme est dégradé par des peptidases. La dégradation du CRF a notamment été observée au niveau du cerveau et de la glande pituitaire,²¹² ce qui est d'un grand intérêt car les récepteurs sont présents en grande quantité dans ces deux régions. Des études pharmacocinétiques du CRF ont été réalisées chez l'homme²¹³ et chez la rat,²¹⁴ et il a été constaté qu'il existe une importante dégradation

²¹⁰ Chou, P. Y. ; Fasman, G. D. Empirical predictions of protein conformation. *Annu. Rev. Biochem.*, **1978**, *47*, 251-276.

²¹¹ Furutani, Y.; Morimoto, Y.; Shibahara, S.; Noda, M.; Takahashi, H.; Hirose, T.; Asai, M.; Inayama, S.; Hayashida, H.; Miyata, T.; Numa, S. Cloning and sequence analysis of cDNA for ovine corticotropin-releasing factor precursor. *Nature.*, **1983**, *301*, 537-540.

²¹² Petrusz, P.; Merchenthaler, I.; The corticotropin-releasing factor system. *Neuroendocrinology.*, **1992**, *56*, 129-183.

²¹³ Saphier, P.W.; Faria, M.; Grossman, A.; Coy, D.H.; Besser, G.M.; Hodson, B.; Parkes, M.; Linton, E.A.; Lowry, P.J. A comparison of the balance of the clearance of ovine and human corticotropin-releasing hormone (CRH) in man and sheep: a possible role for CRH-binding protein. *J. Endocrinol.*, **1992**, *133*, 487-495.

²¹⁴ Candas, B.; Lalonde, J.; Normand, M. Distribution and metabolism of corticotropin-releasing factor in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **1985**, *64*, 683-688.

enzymatique dans les tissus et les fluides corporels.^{215,216} Il existe des différences dans la séquence de oCRF et h/rCRF, c'est le cas aussi pour l'affinité pour CRF-BP mais aussi pour le temps de demi-vie chez l'homme.²¹³ Peu de choses ont été découvertes sur l'effet des séquences partielles du CRF et de leur implication dans la libération d'ACTH.²¹⁷

Le sites de clivages principaux et secondaire ont été mis en évidence chez hCRF et oCRF grâce à l'utilisation de la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide haute résolution (LC-MS).²¹⁸ Le site primaire (P1) de clivage est au niveau de Leu₁₅, les sites secondaires sont ensuite localisées au niveau de Ser₁, Thr₁₁, His₁₃, Arg₂₃(hCRF), Arg₃₅ et Lys₃₆.

II : Etude de relation structure-activité

De nombreuses études de relation structure-affinité ont été réalisées par les équipes de Rivier et Bienert qui ont permis de déterminer la séquence minimale nécessaire pour obtenir une activité.

II 1 : Interactions peptidiques agonistes-récepteurs

II 1 1 : Détermination de la séquence minimale active

La première étude de relation structure-activité²¹⁹ a été réalisée en préparant deux séries de peptides issus du oCRF ; l'un en supprimant progressivement les amino-acides du côté N terminal et l'autre du côté C terminal. La délétion des trois premiers résidus du côté N terminal ne diminue ni l'affinité, ni l'activité de ces analogues à stimuler la sécrétion d'ACTH. Ces tests ont été réalisés sur les cellules pituitaires de rat²²⁰ et comparés à l'activité de oCRF. Après plusieurs délétions successives du côté N terminal, il y a une perte totale d'activité après la délétion du 8^{ième} résidu (leucine). Ainsi le peptide oCRF(9-41)NH₂ est capable de se lier aux récepteurs mais il inhibe la sécrétion d'ACTH, il a donc un caractère antagoniste.

²¹⁵ Linton, E.A.; McLean, C.; Nieuwenhuyzen Kruseman, A.C.; Tilders, F.J.; Van der Veen, E.A.; Lowry, P.J. Direct measurement of human plasma corticotropin-releasing hormone by "two-site" immunoradiometric assay. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, **1987**, *64*, 1047-1053.

²¹⁶ Ulisse, S.; Fabbri, A.; Dudau, M.L. Corticotropin-releasing factor receptors and action in rat Leydig cells. *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 2156-2163.

²¹⁷ Diamant, M.; De Wied, D. Structure-related effects of CRF and CRF-derived peptides: dissociation of behavioural, endocrine and autonomic activity. *Neuroendocrinology.*, **1993**, *57*, 1071-1081.

²¹⁸ Kertscher, U.; Beyermann, M.; Krause, E.; Furkert, J.; Berger, H.; Biernert, M.; Mehli, B. The degradation of corticotropin-releasing factor by enzymes of the rat brain studied by liquid chromatography-mass spectrometry. *Peptides*, **1998**, *19*, 649-658.

²¹⁹ Rivier, J.; Rivier, C.; Vale, W. Synthetic competitive antagonists of corticotropin-releasing factor: Effect on ACTH secretion in the rat. *Science* **1984**, *224*, 889-891.

²²⁰ Vale, W.; Grant, G.; Amoss, M.; Blackwell, R.; Guillemin, R. Culture of enzymatically dispersed pituitary cells: functional validation of a method. *Endocrinology* **1972**, *91*, 562-572.

Cette étude a permis de montrer que les résidus 4 à 8 sont importants pour l'activation du récepteur. Cependant, oCRF(9-41)NH₂ se lie toujours au récepteur du CRF avec une bonne affinité, ce qui permet de dire que les résidus 1 à 8 ne sont pas impliqués dans la liaison au récepteur.

Par contre la délétion du coté C terminal entraîne une perte importante de l'activité.²²¹ Le fait de remplacer la fonction amide par la fonction acide correspondante entraîne une perte d'activité supérieure à 99.9% par rapport à oCRF. Il en est de même lorsque l'on supprime les deux derniers résidus (oCRF(1-39) NH₂).

II 1 2 : Implication de la nature des chaînes latérales

Trois autres séries d'analogues de oCRF ont été synthétisées, afin de déterminer quelles sont les chaînes latérales responsables de l'affinité avec le récepteur et de l'activité. Ces tests ont été réalisés sur les cellules pituitaires et des préparations membranaires de cerveau de rat.

II 1 2 1 : Ala-scan

Dans un premier temps un « alascan » a été réalisé en substituant chaque résidu de la séquence 5-40 de oCRF²²¹.

- Une perte totale de l'activité est constatée lorsque l'on substitue les résidus hydrophobes de la région N terminale (5-19) [Ile₆, Leu₈, Leu₁₀, Phe₁₂, Leu₁₄] à l'exception de Val₁₈, et Leu₁₉ où il persiste une activité mais deux fois moins élevée.
- Un gain, pour la substitution des résidus hydrophiles [Thr₂₂, His₃₂, Ser₃₃].
- Pour la partie C terminale (20-41), 13 analogues ont une activité supérieure ou égale.

Pour résumer, la substitution par une alanine d'un résidu hydrophobe entraîne une perte dramatique de l'activité alors que pour un résidu hydrophile, on observe un gain d'affinité. Il ressort aussi que la partie 5-19 est à la fois importante pour l'affinité au récepteur et pour son activation.

²²¹ Kornreich, W.D.; Galyean, R.; Hernandez, J-F.; Craig, A.G.; Donaldson, C.J.; Yamamoto, G.; Rivier, C.; Rivier, J. Alanine Series of ovine Corticotropin Releasing Factor (oCRF): A Structure-Activity relationship study. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1870-1876.

II 1 2 2 : D-scan

Dans une seconde étude, l'équipe de Rivier a substitué chaque résidu de la séquence 5-40 de oCRF par l'acide aminé de configuration D correspondant.²²²

Les analogues ont été testés pour leur capacité à stimuler la sécrétion d'ACTH.

Les résultats montrent qu'il y a dans la plupart des cas, une perte de l'activité à l'exception des substitutions de la phénylalanine en position 12 et l'acide glutamique en position 20. Aucun de ces analogues ne se comporte comme un antagoniste, mais lorsque l'on substitue Phe₁₂ par D-Phe dans plusieurs fragments de oCRF délétés du côté N terminal, il y a une augmentation du potentiel antagoniste de ces molécules et notamment pour [D-Phe₁₂,Nle_{21, 38}]hCRF(12-41)NH₂.

II 1 2 3 : Substitution par des analogues structuraux

Une troisième étude de l'équipe de Bienert basée sur le remplacement des acides aminés de même nature a mis en évidence une disparité des réponses biologiques par rapport aux résultats de l'Ala-scan réalisé par Rivier pour certains résidus.²²³

Ils ont donc substitué dans la séquence de oCRF chaque position (Ser par Thr, Gln par Asn, Glu par Asp, Arg par Lys et inversement, Pro par N-MeAla, Ile par Leu, Leu par Nleu, Phe par Trp, His par Ala, Val par Leu, Met par Nle, Ala par Leu). Ils ont testé ces analogues pour leur capacité à déplacer le CRF marqué lié aux récepteurs des membranes de cerveau de rat et pour leur capacité à stimuler la sécrétion d'ACTH.

Les auteurs ont constaté pour l'affinité :

- Que l'on pouvait remplacer sans perte importante, les séquences 1-4, 21-29, 32-33 et 36-41.
- Que la partie 5-20 était dans l'ensemble plus sensible à ces légères altérations. Ainsi le remplacement des résidus hydrophobes comme hydrophiles entraîne une perte dramatique de l'affinité, à l'exception des leucines en position 15 et 19 remplacé par des norleucines, et de la phénylalanine et de la valine remplacées respectivement par le tryptophane et la leucine en position 12 et 18 qui ont une affinité supérieure.

En ce qui concerne l'activité de ces analogues :

²²² Rivier, J.; Rivier, C.; Galyean, R.; Miranda, A.; Miller, C.; Craig, A.G.; Yamamoto, G.; Brown, G.; Vale W. Single point D-substituted corticotropin-releasing factor analogues: Effects on potency and Physicochemical characteristics. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2851-2859.

²²³ Beyermann, M.; Fechner, K.; Furkert, J.; Krause, E.; Bienert, M. A single-point slight alteration set as a tool for structure-activity relationship studies of ovine Corticotropin releasing Factor. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3324-3330.

- A l'exception de Leu₁₅ tous les amino-acides de la région N terminale 5-17 sont sensible à une légère altération.
- Alors que pour la région 18-41 seuls les résidus Gln₃₀, Ala₃₁, Asn₃₄ et Arg₃₅ semblent être sensibles à ces altérations.

En résumé, il ressort de cette étude que la séquence 5-17 est très affectée par ces altérations, à la fois pour la liaison au récepteur mais aussi pour son activation. A la différence de l'Ala-scan, la substitution des résidus Ser, Arg, Glu et Asn entraîne une perte importante de l'affinité et de l'activité. Les résidus Ser et Arg semblent être impliqués dans les interactions avec le récepteur. L'Ala-scan du Glu et Asn a conduit à des composés ayant des activités biologiques comparables au hCRF, ces acides aminés auraient des effets stériques ou conformationnels.

II 1 3 : Introduction de contraintes conformationnelles

Différentes études basées sur des travaux réalisés sur des antagonistes (Astressine par exemple) qui seront développés dans le chapitre II 2 2, ont été appliquées aux agonistes, avec l'introduction d'un pont lactame entre les résidus Glu₃₀ et Lys₃₃ *i*-(*i*+3), dans le but de stabiliser l'hélice α .²²⁴

Nous avons vu dans des études précédentes que la délétion des trois premiers résidus n'affectait pas l'activité et que l'acétylation rendait les molécules plus puissantes. Gulyas et col.²²⁴ ont réalisé diverses modifications en se basant sur un puissant agoniste le [Ac-Pro₄,D-Phe₁₂, Nle_{21,38}]hCRF₄₋₄₁. Il a ainsi découvert que l'analogue cyclo(30-33)[Ac-Pro₄,D-Phe₁₂, Nle_{21,38},Glu₃₀,Lys₃₃]hCRF₄₋₄₁ se comporte comme un puissant agoniste encore plus puissant.

A la vue de ces résultats, ils ont ensuite étudié l'influence de l'incorporation successive d'un pont lactame entre Glu et Lys *i*-(*i*+3) et Lys et Glu *i*-(*i*+3) de l'[Ac-Pro₄,D-Phe₁₂,Nle_{21,38}]hCRF₄₋₄₁ entre les résidus 4 à 14.²²⁵ On constate que l'introduction du pont lactame mettant en jeu les résidus 5 à 8 induit une perte d'activité biologique. Les mêmes auteurs ont aussi voulu mettre en avant l'importance de la partie N terminale, en étudiant la délétion pas à pas jusqu'au résidu 8 dans les séries cyclo(30-33)[Ac-AA_x,D-Phe₁₂, Nle_{21,38},Glu₃₀,Lys₃₃]hCRF_{x-41} et cyclo(30-33)[H-AA_x,D-Phe₁₂, Nle_{21,38},Glu₃₀,Lys₃₃]hCRF_{x-41}.

Les résultats montrent que :

²²⁴ Gulyas, J.; Rivier, C. ; Perrin, M.; Koerber, S. C.; Sutton, S.; Corrigan, A. ; Lahrichi, A. G.; Craig, A.; Vale, W.; Rivier, J. Potent, structurally constrained agonists and competitive antagonists of corticotropin-releasing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 10575-10579.

²²⁵ Rivier, J.; Lahrichi, S. L.; Gulyas, J.; Erchegyi, J.; Koerber, S. C.; Craig, A. G. ; Corrigan, A. Rivier, C. ; Vale, W. Minimal-size, constrained corticotropin-releasing factor agonist with *i*-(*i*+3) Glu-Lys and Lys-Glu bridges. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2614-2620.

- L'activité décroît à chaque délétion.
- Les analogues contenant le cycle (30-33) Glu-Lys sont plus puissantes que les molécules linéaires.
- Les molécules acétylées sont plus actives que les non-acétylées car l'acétylation stabilise l'hélice α ^{226,227}.
- Cyclo(30-33)[Ac-Leu₈,D-Phe₁₂, Nle_{21,38},Glu₃₀,Lys₃₃]hCRF₈₋₄₁ est 100 fois plus puissant que [Ac-Leu₈,D-Phe₁₂, Nle_{21,38},Glu₃₀,Lys₃₃]hCRF₈₋₄₁.

Cela montre donc que la délétion de la partie N terminale entraîne une baisse de l'hélicité et donc de l'activité. Avec la délétion, il y a une destruction de l'hélice amphipathique des analogues. Mais l'introduction du pont lactame entre les résidus Glu₃₀ et Lys₃₃ permet de stabiliser l'hélice des agonistes.

Les mêmes auteurs ont étudié l'influence de l'introduction d'un D amino-acide en position i+2 du pont lactame pour tester l'hypothèse que la conformation de ces lactames est sous la forme d'hélice α et non pas sous la forme d'un turn.²²⁸ Ils ont donc synthétisés les composés cyclo(20-23)[Ac-Pro₄,D-Phe₁₂,Glu₂₀,Nle_{21,38},D-Ala₂₂,Lys₂₃]hCRF₄₋₄₁ et cyclo(30-33)[Ac-Pro₄,D-Phe₁₂,Nle_{21,38},D-His₃₂,Glu₃₀,Lys₃₃]hCRF₄₋₄₁ qui se sont avérés être deux fois moins puissants que les diastéréoisomères respectifs. D'autres modifications comme l'introduction de deux ponts lactames avec des D-amino-acides en position i+2, se sont avérés être encore moins puissants. En conclusion, ce type de modification structurale déstabilise l'hélice α en formant une structure de type « hélice-turn-hélice » et entraîne une diminution de l'activité des analogues agonistes.

II 1 4 : Rôle connecteur de l'hélice α

Michael Beyermann²²⁹ et son équipe ont mis en évidence le rôle de l'hélice α entre les deux sites de liaisons de l'urocortine au récepteur. L'urocortine appartient à la famille du hCRF avec une homologie de séquence de 44%. Il a une meilleure affinité que le hCRF pour le récepteur et induit une meilleure réponse biologique (production de testostérone). La séquence de l'urocortine est la suivante:

²²⁶ Fairman, R.; Shoemaker, K.R.; York, E.J.; Stewart, J.M.; Baldwin, R.L. Further studies of the helix dipole model: effects of a free α -NH₃⁺ or α -COO⁻ group on the helix stability. *Proteins*. **1989**, *5*, 1-7.

²²⁷ Shoemaker, K.R.; Kim, P.S.; York, E.J.; Stewart, J.M.; Baldwin, R.L. Test of the helix dipole model for stabilization of α -helices. *Nature*. **1987**, *326*, 563-567.

²²⁸ Koerber, S. C.; Gulyas, J.; Lahrichi, S. L.; Corrigan, A.; Craig, A. G.; Rivier, C.; Rivier, J.; Vale, W. Constrained corticotropin-releasing factor (CRF) agonist and antagonists with *i*-(*i*+3) Glu-Xaa-D_nXbb-Lys bridges. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 5002-5011.

²²⁹ Beyermann, M.; Rothmund, S.; Heinrich, N.; Fechner, K.; Furkert, J.; Dathe, M.; Winter, R.; Krause, E.; Bienert, M. A role for a helical connector between two receptor binding sites of a long-chain peptide hormone. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 5702-5709.

DDPPLSIDLTFHLLRTLLELARTQSQRERAEQNRIIFDSV-NH₂

Dans un premier temps, il a modifié la séquence en réalisant une molécule chimérique qui reprend des modifications issues d'autres études. Puis il a connecté les extrémités C et N terminales par une ou plusieurs molécules hautement flexibles, l'acide ϵ -aminocaproïque (acp). Les résultats montrent que ces molécules sont de faibles agonistes (EC_{50} : 100-300 nM) et cela est indépendant du nombre de motifs acp (0 à 5) introduits.

Par contre en utilisant comme connecteur, un peptide hélical approprié, il obtient de puissants agonistes pour la production de testostérone chez le rat qu'il a nommé UEK (EC_{50} : 0.6-50 nM). Ces molécules adoptent une structure secondaire stable en milieu aqueux. Elles sont représentées dans le tableau suivant. **Tableau 13**

		EC_{50} nM
UEK	DDPPLSIDLTFHLLRTLDEIEKEKEKEKRRKEQNRKLLDEV	0.6
Des(23)-UEK	DDPPLSIDLTFHLLRTLDEIEKEKEKEKRRKEQNRKLLDEV	25
Des(23-25)-UEK	DDPPLSIDLTFHLLRTLDEIEKKEKRRKEQNRKLLDEV	0.9
Des(23-29)-UEK	DDPPLSIDLTFHLLRTLDEIEKKEQNRKLLDEV	4.6

Tableau 13 : EC_{50} (nM) des analogues de l'urocortine

Ces résultats montrent que la partie centrale 20-33 n'est pas essentielle pour l'activité biologique mais elle l'est pour positionner correctement les extrémités C et N-terminales.

II 1 5 : conclusion

Il ressort de cette étude de relation structure activité que le CRF doit exister sous une conformation de type hélice α entre les résidus 6 et 36 pour pouvoir se lier et activer le récepteur.

Cette hélice permet de positionner et d'orienter les régions C et N-terminales du peptide afin d'induire une réponse biologique.

Les deux régions de liaisons au récepteur du CRF sont les résidus 1 à 20 et 35 à 41.

Aux vues de ces conclusions nous pouvons dire que l'hélice α ne sert qu'à espacer et à positionner les sites de liaison. Pour augmenter ce potentiel il faut modifier la stabilité de l'hélice en jouant sur la nature des résidus ou en introduisant une hélice autre que peptidique. Ce concept est une nouvelle voie pour la synthèse d'analogues peptidiques et l'étude des interactions ligand-récepteur.

II 2 : Antagonistes peptidiques du hCRF

Un des intérêts de la recherche d'antagonistes est que le CRF joue un rôle important dans un grand nombre de maladies neuropsychiatriques comme les désordres affectifs, l'anxiété, l'anorexie nerveuse et la maladie d'Alzheimer. C'est la raison pour laquelle plusieurs équipes ont travaillé sur la recherche d'antagonistes puissants pouvant discriminer les différents sous-types de récepteurs.

II 2 1 : Implication de la nature des chaînes latérales

Comme cela a été exposé précédemment, l'équipe de Rivier²¹⁹ a mis en évidence le premier antagoniste peptidique en déléant la partie N terminale 1-8 du CRF pour obtenir l'oCRF(9-41)NH₂ qui inhibe la sécrétion d'ACTH.

En 1993²²² Rivier a montré que la double substitution des méthionines en position 21 et 38 par deux norleucines dans le hCRF₉₋₄₁ et le hCRF₁₂₋₄₁ induisait une augmentation du caractère antagoniste, respectivement de 6.7 et 12 fois celui du hCRF₉₋₄₁. Ils ont ensuite ajouté comme modification, la substitution de Phe₁₂ par son énantiomère de la série D, en s'appuyant sur les résultats obtenus dans la série agoniste, et la molécule ainsi obtenue [D-Phe₁₂,Nle_{21,38}]hCRF₁₂₋₄₁ s'est avéré être 18 fois plus active que hCRF₉₋₄₁. L'antagoniste obtenu sera souvent utilisé comme référence (« standard ») pour un grand nombre d'études.

Afin d'augmenter le potentiel antagoniste de [D-Phe₁₂,Nle_{21,38}]hCRF₁₂₋₄₁, les résidus alanines et les leucines ont été successivement remplacés par leurs homologues C-méthylés sur le carbone α .²³⁰ Ces modifications ont été introduites afin d'optimiser la formation de l'hélice α qui est essentielle pour une bonne interaction avec le récepteur. Les hélices α induites par de tels acides aminés²³¹ peuvent aussi permettre de conférer aux peptides une meilleure résistance à la dégradation enzymatique.^{232,233,234,235}

²³⁰ Hernandez, J-F ; Korneich, W. ; Rivier, C.; Miranda, A.; Yamamoto, G.; Andrews, J.; Taché, Y.; Vale, W.; Rivier, J. Synthesis and relative potencies of new constrained CRF antagonist. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2860-2867.

²³¹ Marshall, G. Angiotensin II. Studies on the biologically active conformation. *Circulation Research, Supplement II.* **1972**, *31*, 143-150.

²³² Baker, C.G. ; Fu, S.-C.J. ; Birnbaum, S.M. ; Sober, H.A. ; Greenstein, J.P. Optical enantiomorphes of isovaline. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 4701-4702.

²³³ Payne, J.W. ; Jakes, R. ; Hartley, B.S. The primary structure of alamethicin. *J. Biochem.* **1970**, *117*, 757-766.

²³⁴ Turk, J. ; Marshall, G. α -Methyl substrates of carboxypeptidases A. a steric probe of active site. *Biochemistry.* **1975**, *14*, 2631-2635.

²³⁵ Khosla, M.C. ; Stachowiak, K. ; Smeby, R.R. ; Bumpus, F.M. ; Piriou, F. ; Lintner, K. ; Femandjian, F. synthesis of [α -methyltyrosine-4]angiotensine II : studies of its conformation, pressor activity and mode of enzymatique degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, *78*, 757-760.

Seuls [D-Phe₁₂,CαMeLeu₁₅,Nle_{21,38}]hCRF₁₂₋₄₁ et [D-Phe₁₂,CαMeLeu₁₇,Nle_{21,38}]hCRF₁₂₋₄₁ se sont avérés être de meilleurs antagonistes que [D-Phe₁₂,Nle_{21,38}]hCRF₁₂₋₄₁. Cependant un analogue, [D-Phe₁₂,Nle_{21,38},CαMeLeu₃₇]hCRF₁₂₋₄₁ a une action plus forte et prolongée que la molécule parente. Cela a été mis en évidence dans deux tests *in-vivo* mesurant la production d'ACTH après administration intraveineuse à des rats adrenalectomisés et sur la vidange gastrique en réponse au retard du stress induit chez le rat. Ceci peut s'expliquer du fait que les peptides contenant des aminoacides Cα-méthylés sont plus résistants à la dégradation. Dans ce cas, la présence du groupement Cα-Methyl à coté de deux résidus basiques Arg₃₅-Lys₃₆ (qui sont connus pour être une séquence cible importante dans l'hydrolyse enzymatique) doit gêner l'approche du site protéolytique par l'enzyme de dégradation.

II 2 2 : Introduction de contraintes conformationnelles

Une série d'analogues cycliques a été synthétisée en incorporant un acide glutamique et une lysine ou une ornithine dans la séquence, suivie d'une cyclisation des chaînes latérales pour former un pont lactame²³⁶ Parmi les 38 analogues testés, deux sont plus puissants que le composé parent [DPhe₁₂,Nle_{21,38}]h/rCRF₁₂₋₄₁ : cyclo(20-23)[DPhe₁₂,Glu₂₀,Lys₂₃,Nle_{21,38}]h/rCRF₁₂₋₄₁ et cyclo(20-23)[DPhe₁₂,Glu₂₀,Orn₂₃,Nle_{21,38}]h/rCRF₁₂₋₄₁, (respectivement 2 et 3 fois). Six analogues sont deux fois moins puissants. Les résultats de dichroïsme circulaire ont montré que l'hélicité doit être un facteur important pour la reconnaissance des analogues du CRF au niveau du récepteur mais peu de corrélation a été mise en évidence entre le pourcentage d'hélicité et l'activité biologique *in-vitro*.

Un autre analogue, cyclo(30-33)[DPhe₁₂,Nle_{21,38},Glu₃₀,Lys₃₃]h/rCRF₁₂₋₄₁ (Astressine) s'est avéré être 32 fois plus puissant que le « standard ». Il a une faible affinité pour le CRF-Binding Protein mais une haute affinité pour le récepteur CRF1 cloné.²²⁴

L'introduction du pont lactame Glu et Lys *i*-(*i*+3) dans les positions 14/17, 23/26 et 33/36 ne conduit pas à l'augmentation de l'effet antagoniste. Il est mutiplié par trois en positions 20/23, 26/29, 28/31 et 29/32 et par 32 en 30/33 (astressine).²³⁷ Les auteurs ont voulu augmenter le potentiel antagoniste de la molécule en introduisant deux cycles lactames en position 20/23 et 30/33 mais le dicyclo(20-23,30-33)[DPhe₁₂,Glu₂₀,Nle₂₁,Lys₂₃,Glu₃₀,Lys₃₃,

²³⁶ Miranda, A. ; Koerber, S.C. ; Gulyas, J. ; Lahrichi, S.L. ; Craig, A.G. ; Corrigan, A. ; Hagler, A. ; Rivier, C. ; Vale, W. ; Rivier, J. Conformationally restricted competitive antagonists of human/rat corticotropin-releasing factor. *J. Med. Chem.* **1998**, *37*, 1450-1459.

²³⁷ Miranda, A. ; Lahrichi, S. L. ; Gulyas, J. ; Koerber, S. C. ; Craig, A. G. ; Corrigan, A. Rivier, C. ; Vale, W. ; Rivier, J. Constrained corticotropin-releasing factor antagonists with *i*-(*i*+3) Glu-Lys bridges. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3651-3658.

Nle₃₈]h/rCRF₁₂₋₄₁ n'est que 8 fois plus actif que le standard alors que l'on aurait pu s'attendre à une molécule 96 fois plus puissante (32x3). Ces résultats montrent que le récepteur CRF peut discriminer une différence minime de conformation et cela montre le rôle que jouent les structures secondaires et tertiaires dans la reconnaissance au récepteur. Felix²³⁸ a lui aussi observé l'effet négatif du cumul de deux cycles lactames sur des analogues du GHRH (Growth Hormone Releasing Hormone) alors qu'une augmentation de l'hélicité des molécules ait été observée. Il en conclut que l'analogue bicyclique était trop rigide pour interagir au mieux avec le récepteur.

Comme pour les agonistes,²²⁸ l'introduction d'un D aminoacide en position i+2 du pont lactame a aussi été étudié. Le remplacement de His₃₂ par D-His₃₂ dans l'Astressine pour donner le composé cyclo(30-33)[DPhe₁₂,Nle_{21,38}Glu₃₀,Dhis₃₂,Lys₃₃] h/rCRF₁₂₋₄₁ augmente par deux la capacité de l'analogue à inhiber la sécrétion d'ACTH ; alors que pour les agonistes il n'y avait pas d'amélioration de l'activité. Cette dualité de réponse biologique, pour une même modification structurale est difficilement explicable.

II 2 3 : conclusion

Comme pour les agonistes, les antagonistes doivent posséder une hélice α centrale. Afin d'augmenter le potentiel de ces molécules il faut contraindre la molécule à conserver un haut degré d'hélicité.

Les parties importantes pour la liaison au récepteur sont les parties C-terminale 35 à 41 et la partie 12 à 20. Cette dernière étant amphipatique, cela permet à la molécule de se structurer en hélice au contact des membranes lipidiques.

Nous pouvons ainsi, comme dans les agonistes, envisager d'augmenter l'hélicité de la molécule soit en imposant des contraintes conformationnelles par l'introduction de ponts lactames et en réalisant des modifications ciblées soit en substituant l'hélice naturelle par une hélice artificielle.

²³⁸ Felix, A.M. ; Heimer, E.P. ; Wang, C.T. ; Lambros, T.J. ; Fournier, A. ; Mowles, T.F. ; Maines, S. ; Campbell, R.M. ; Wegrzynski, B.B. ; Toome, V. ; Fry, D. ; Madison, V.S. Synthésis, biological activity and conformational analysis of cyclic GRF analogues. *J. Pept. Protein Res.* **1988**, 32, 441-543.

II 3 : Antagonistes non-peptidiques

Durant les dix dernières années plusieurs ligands non-peptidiques se sont avérés être de puissants antagonistes des récepteurs CRF1. Malgré le grand nombre de brevets concernant ces ligands, peu de publications sont reportées dans la littérature. A ce jour, peu de ligands non-peptidiques pour les récepteurs CRF2, pour CRF-« Binding-Protein » sont décrits.

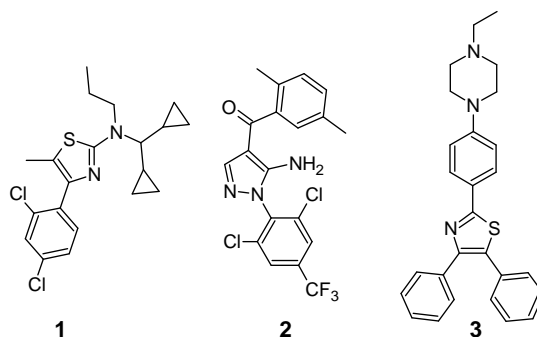
Les molécules sont présentées par famille chimique. A titre d'information, quelques exemples sont donnés ci-dessous.

II 3 1 : Série d'antagonistes cycliques

II 3 1 1 : Famille de cycles à 5 chaînons

La première molécule antagoniste du récepteur CRF1 appartient à la famille des thiocyanates d'oxopyrazoline qui a une faible affinité (IC_{50} : 3-70 μ M).²³⁹ Depuis d'autres molécules contenant un squelette thiazole et un groupe propyle (**1**) ont montré une meilleure affinité.^{240,241,242} Il en est de même pour certaines molécules de la famille des pyrazoles (**2**).^{243,244}

Récemment, un brevet japonais²⁴⁵ a décrit des thiazoles très lipophiles (**3**) comme antagonistes des récepteurs CRF2. Plusieurs composés contiennent une chaîne latérale avec un azote basique, ce qui est souvent le cas chez les antagonistes de CRFR1. Ces résultats ouvrent la voie à la mise au point d'antagonistes commun à CRFR1 et CRFR2.



²³⁹ Abreu, M.E.; Rzeszotarski, W.; Kyle, D.J.; Elliot, R.L. *United States Patent*; 5,063,245 to Nova Pharmaceutical Corporation: USA, 1991.

²⁴⁰ Courtemanche, G.; Gautier, C.; Gully, D.; Roger, P.; Valette, G.; Wermuth, C.G. *European Patent Application*; 576,350 to Elf Sanofi, 1993.

²⁴¹ Gully, D.; Roger, P.; Wermuth, C.G. *United States Patent*; 5,880,135 to Elf Sanofi: USA, 1999.

²⁴² Wermuth, C.-G. *Sixth International Symposium on the Chemistry and Pharmacology of Pyridazines*: Clearwater Beach, FL, 1998; pp Abstract PL.

²⁴³ Yuan, J. *US Patent*; 6,127,399 to Neurogen Corporation: USA, 2000

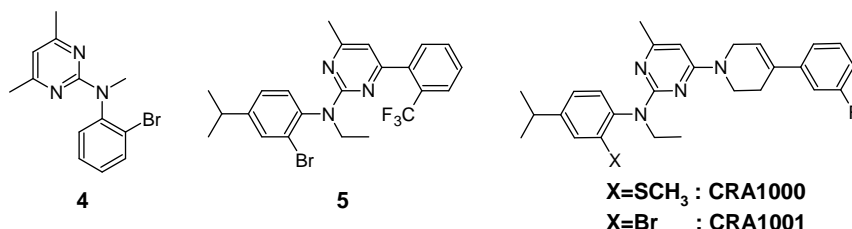
²⁴⁴ Bright, G.M.; Welch, W.M.J *World Patent Application PCT*; 95/33727 to Pfizer Inc., 1995.

²⁴⁵ Naoki, I.; Hiroyuki, M.; Masakasu, I.; Hidenobu, Y.: Japanese Patent, 11180958.

II 3 1 2 : Famille de cycles à 6 chaînons

Les 2-anilinopyrimidines et triazines (**4**) ont été développés par deux équipes indépendantes comme antagonistes des récepteurs CRF.^{246,247} Après plusieurs études de relation structure-activité des modifications structurales ont été apportées en position 4, pour donner des composés puissants (K_i : 2-22 nM) (**5**).^{248,249} Ces composés se sont avérés trop hydrophobes pour un développement clinique et l'introduction de groupes polaires a conduit à une baisse de l'affinité.^{250,251} L'optimisation de la série des pyrimidines a conduit à un composé antagoniste (NBI 27914) sélectif de CRFR1 (K_i : 2 nM), il inhibe l'activité de l'adénylate cyclase (EC₅₀ : 150 nM) et la production d'ACTH (EC₅₀ : 70 nM).²⁵²

Plus récemment, deux antagonistes sélectifs de CRFR1 ont été développés : CRA1000 et CRA1001 (IC₅₀ : 20 et 22 nM).²⁵³ Ces composés montrent des propriétés anxiolytiques et anti-dépressives.



²⁴⁶ Chen, C.; Dagnino, R., Jr.; De Souza, E.B.; Grigoriadis, D.E.; Huang, C.Q.; Kim, K.I.; Liu, Z.; Moran, T.; Webb, T.R.; Whitten, J.P.; Xie, Y.F.; McCarthy, J.R. Design and synthesis of a series of non-peptide high-affinity human corticotropin-releasing factor1 receptor antagonists. *J Med Chem*, **1996**, 39, 4358-4360.

²⁴⁷ Arvanitis, A.G.; Gilligan, P.J.; Chorvat, R.J.; Cheeseman, R.S.; Christos, T.E.; Bakthavatchalam, R.; Beck, J.P.; Cocuzza, A.J.; Hobbs, F.W.; Wilde, R.G.; Arnold, C.; Chidester, D.; Curry, M.; He, L.; Hollis, A.; Klaczkwicz, J.; Krenitsky, P.J.; Rescinito, J.P.; Scholfield, E.; Culp, S.; De Souza, E.B.; Fitzgerald, L.; Grigoriadis, D.; Tam, S.W.; Shen, H.L.; *et al.* Non-peptide corticotropin-releasing hormone antagonists: syntheses and structure-activity relationships of 2-anilinopyrimidines and -triazines. *J Med Chem*, **1999**, 42, 805-818.

²⁴⁸ Cocuzza, A.J.; Chidester, D.R.; Culp, S.; Fitzgerald, L.; Gilligan, P. Use of the Suzuki reaction for the synthesis of aryl-substituted heterocycles as corticotropin-releasing hormone (CRH) antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*, **1999**, 9, 1063-1066.

²⁴⁹ Nakazato, A.; Kumagai, T.; Okubo, T.; Tanaka, H.; Chaki, S.; Okuyama, S.; Tomisawa, K. Design, synthesis and structure-affinity relationships of 4-methylidenepiperidine and 4-aryl-1,2,3,6-tetrahydropyridine derivatives as corticotropin-releasing factor1 receptor antagonists. *Bioorg Med Chem*, **2000**, 8, 1183-1193.

²⁵⁰ Arvanitis, A.; Aldrich, P.E.; Arnold, C.; Bakthavatchalam, R.; Beck, J.; Bouchard, P.J.; Cheeseman, R.S.; Chidester, D.; Chorvat, R.J.; Christos, T.E.; Cocuzza, A.J.; Culp, S.J.; Curry, M.; Fitzgerald, L.W.; Gilligan, P.J.; Hartig, P.R.; He, L.; Hobbs, F.W.; Hodge, C.N.; Krenitsky, P.J.; McCall, D.E.; Rescinito, J.T.; Scholfield, E.L.; Tam, S.W.; Trainor, G.L.; Wasserman, Z.R.; Wilde, J.A.; Yarem, J.A.; Zaczek, R. *212th ACS National Meeting*: Orlando FL, 1996; pp MEDI 194.

²⁵¹ Wilde, R.G.; Klaczkwicz, J.D.; Carter, K.L.; Scholfield, E.L.; Olson, R.E.; Hobbs, F.W.; Cocuzza, A.J.; Chidester, D.R.; Fitzgerald, L.W.; Zaczek, R.C. *220th ACS National Meeting*: Washington DC, 2000; pp MEDI 116.

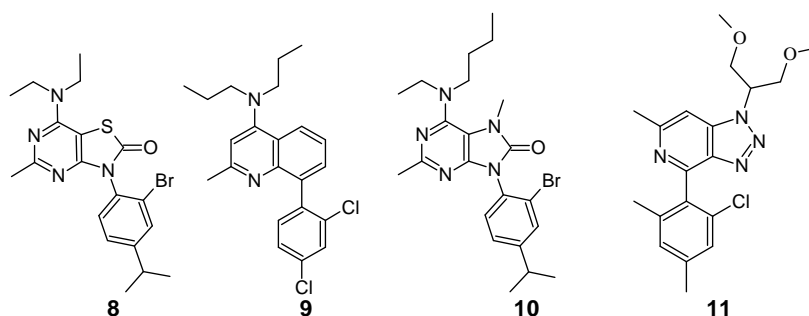
²⁵² Lorang, M.T.; C., C.; McCarthy, J.R.; De Souza, E.B.; Grigoriadis, D.E. *Society for Neuroscience*: New Orleans, LA, 1997; pp 689.10.

²⁵³ Lorang, M.T.; C., C.; McCarthy, J.R.; De Souza, E.B.; Grigoriadis, D.E. Receptor binding, behavioral, and electrophysiological profiles of nonpeptide corticotropin-releasing factor subtype 1 receptor antagonists CRA1000 and CRA1001. *Society for Neuroscience*: New Orleans, LA, 1997; pp 689.10.

II 3 2 : Série d'antagonistes polycycliques

II 3 2 1 : Antagonistes bicycliques

Les découvertes d'antagonistes bicycliques du récepteur CRF1 découlent des travaux réalisés sur les cycles à 6 chaînons. C'est le cas des 6-arylpurines qui se sont avérées être de puissants antagonistes (K_i : 0.93nM).²⁵⁴ D'autres variantes de cycles à 5-6 accolés ont été décrites comme antagonistes.^{255,256} Il en est de même pour les Thiazolo-(4,5-d)pyrimidinones (**8**),²⁵⁷ les 8-arylquinolines (**9**),²⁵⁸ purinones (**10**)²⁵⁹ et les triazolopyrimidines (**11**)²⁶⁰ (K_i : 0.6-9.7 nM).



Le motif bicyclique pyrazolopyrimidine a fait l'objet de nombreuses études de relations structures-activités qui ont découlées sur de nombreux composés actifs par administration par voie orale.^{261,262,263} Deux d'entre eux, (NBI 30545 et DMP904) ont de très

²⁵⁴ Wilde, R.G.; Carter, K.L.; Klaczkiwicz, J.D.; Gilligan, P.J.; Olson, R.E.; Frieze, W.E.; Buckner, W.H.; Beck, J.P.; Curry, M.A.; Arvanitis, A.G.; Mical, A.J.; Robertson, D.W.; Trainor, G.L.; Fitzgerald, L.W.; McElroy, J.F.; Ward, K.A.; Arneric, S.P.; Grossman, S.J.; Bai, S.A. *220th ACS National Meeting*: Washington, DC, 2000; pp MEDI 123.

²⁵⁵ Hodge, C.N.; Aldrich, P.E.; Wasserman, Z.R.; Fernandez, C.H.; Nemeth, G.A.; Arvanitis, A.; Cheeseman, R.S.; Chorvat, R.J.; Ciganek, E.; Christos, T.E.; Gilligan, P.J.; Krenitsky, P.; Scholfield, E.; Strucely, P. Corticotropin-releasing hormone receptor antagonists: framework design and synthesis guided by ligand conformational studies. *J Med Chem*, **1999**, *42*, 819-832.

²⁵⁶ Wilde, R.G.; Klaczkiwicz, J.D.; Carter, K.L.; Gilligan, P.J.; Olson, R.E.; Frieze, W.E.; Buckner, W.H.; Curry, M.A.; Robertson, D.W.; Sun, J.H.; Arneric, S.P.; Hartig, P.; Fitzgerald, L.W.; Marshal, W.J. *219th ACS National Meeting*: San Francisco, CA, 2000; pp MEDI 317.

²⁵⁷ Yuan, J.; Yoon, T. *United States Patent*; 5,804,685 to Neurogen Corporation, 1998.

²⁵⁸ Huang, C.Q.; Haddach, M.; Chen, C.; Wilcoxon, K.; Xie, Y.F.; Grigoriadis, D.E.; De Souza, E.B.; McCarthy, J.R. *217th ACS National Meeting*: Anaheim, CA, 1999; pp MEDI 3.

²⁵⁹ Beck, J.P.; Arvanitis, A.G.; Curry, M.A.; Rescinito, J.T.; Fitzgerald, L.W.; Gilligan, P.J.; Zaczek, R.; Trainor, G.L. Purin-8-ones as corticotropin-releasing hormone (CRH-R1) receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*, **1999**, *9*, 967-972.

²⁶⁰ Bakthavatchalam, R.; A.G., A.; Gilligan, P.J.; Olson, R.E.; Robertson, D.W.; Trainor, G.L.; Christ, D.D. *216th ACS National Meeting*: Boston, MA, 1998; pp MEDI 134.

²⁶¹ Wilcoxon, K.; Chen, C.; Huang, C.; Haddach, M.; Xie, Y.F.; Wing, L.; Grigoriadis, D.E.; De Souza, E.B.; McCarthy, J.R. *217th ACS National Meeting*: Anaheim, CA, 1999; pp MEDI 2.

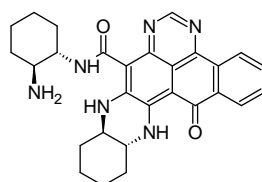
²⁶² Gilligan, P.J.; Baldauf, C.; Cocuzza, A.; Chidester, D.; Zaczek, R.; Fitzgerald, L.W.; McElroy, J.; Smith, M.A.; Shen, H.S.; Saye, J.A.; Christ, D.; Trainor, G.; Robertson, D.W.; Hartig, P. The discovery of 4-(3-pentylamino)-2,7-dimethyl-8-(2-methyl-4-methoxyphenyl)-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidine: a corticotropin-releasing factor (hCRF1) antagonist. *Bioorg Med Chem*, **2000**, *8*, 181-189.

hautes affinités pour CRFR1 et une biodisponibilité orale acceptable. Un autre composé, (DMP696)²⁶⁴ est très puissant et possède une meilleure biodisponibilité orale que les deux molécules précédentes (50% chez le chien). Un nouveau composé plus hydrosoluble a été élaboré, (R121919).²⁶⁵ Il est sélectif du récepteur CRF1 et possède un excellent profil pharmacologique.

Les premiers bicycles de type imidazolo(4,5-c)pyrazole synthétisés, ont donné une bonne affinité (K_i : 4nM).^{266,267}

II 3 2 2 : Série d'antagonistes polycycliques

Un dérivé de l'acide oxo-7H-benzo(e)pyrimidine-4-carboxylique (**12**) est un antagoniste des récepteurs CRFR1 (K_i :110 nM) et CRFR2 (K_i :20 nM).²⁶⁸ Ce dérivé ne ressemble pas aux pharmacophores décrits pour les antagonistes de CRFR1, cela indiquerait l'existence d'un nouveau site de liaison qui accepterait des antagonistes moins lipophiles.²⁶⁹



12

II 3 3 : Série d'antagonistes acycliques

Deux molécules de type N-benzimidazolyméthyle (**13**) et N indolylmethyle benzamides (**14**) ont été décrites comme des antagonistes de CRFR1.²⁷⁰ Elles présentent la

²⁶³ Wustrow, D.J.; Capiris, T.; Rubin, R.; Knobelsdorf, J.A.; Akunne, H.; Davis, M.D.; MacKenzie, R.; Pugsley, T.A.; Zoski, K.T.; Heffner, T.G.; Wise, L.D. Pyrazolo[1,5-a]pyrimidine CRF-1 receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*, **1998**, 8, 2067-2070.

²⁶⁴ He, L.; Gilligan, P.J.; Zaczek, R.; Fitzgerald, L.W.; McElroy, J.; Shen, H.S.; Saye, J.A.; Kalin, N.H.; Shelton, S.; Christ, D.; Trainor, G.; Hartig, P. 4-(1,3-Dimethoxyprop-2-ylamino)-2,7-dimethyl-8-(2, 4-dichlorophenyl)pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazine: a potent, orally bioavailable CRF(1) receptor antagonist. *J Med Chem*, **2000**, 43, 449-456.

²⁶⁵ Grigoriadis, D.E.; Chen, C.; Wilcoxon, K.; Chen, T.; Lorang, M.T.; Bozigian, H.; Liu, X.-J.; Ling, N.; McCarthy, J.R.; De Souza, E.B.; Vale, W.W. *Society for Neuroscience*: New Orleans, LA, 2000; pp Abstr. 807.4.

²⁶⁶ Beck, J.; Tivitmahaisoon, P.; Folmer, B.K.; Curry, M.; Fitzgerald, L.W.; Gilligan, P.J.; Zaczek, R.; Robertson, D.W.; Marshal, M. *217th ACS National Meeting*: Anaheim, CA, 1999; pp MEDI 1.

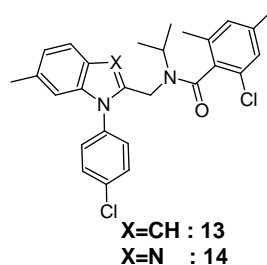
²⁶⁷ Beck, J.; Folmer, B.K.; Curry, M.; Tivitmahaisoon, P.; Fitzgerald, L.W.; Gilligan, P.J.; Zaczek, R.; Robertson, D.W.; Marshal, M. *217th ACS National Meeting*: Anaheim, CA, 1999; pp MEDI 106.

²⁶⁸ Luthin, D.R.; Rabinovich, A.K.; Bhumralkar, D.R.; Youngblood, K.L.; Bychowski, R.A.; Dhanoa, D.S.; May, J.M. Synthesis and biological activity of oxo-7H-benzo[e]pyrimidine-4-carboxylic acid derivatives as potent, nonpeptide corticotropin releasing factor (CRF) receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*, **1999**, 9, 765-770.

²⁶⁹ Keller, P.A.; Bowman, M.; Dang, K.H.; Garner, J.; Leach, S.P.; Smith, R.; McCluskey, A. Pharmacophore development for corticotropin-releasing hormone: new insights into inhibitor activity. *J Med Chem*, **1999**, 42, 2351-2357.

²⁷⁰ Horvath, R.F.; Yoon, T.; Hutchinson, A. In *World Patent Application, PCT*; 00/59888 to Neurogen Corporation, 2000.

particularité de posséder un oxygène amidique capable d'accepter une liaison hydrogène. Cela pourrait représenter une nouvelle classe d'antagonistes pour CRFR1.



III : Les récepteurs du CRF.

Les récepteurs du CRF appartiennent à la grande famille des récepteurs à sept domaines trans-membranaire couplés aux protéines G.²⁷¹ Il existe trois types de récepteurs, CRFR1,²⁷² CRFR2²⁷³ et CRFR3²⁷⁴ et une protéine soluble CRFBP^{275,276} (Binding Protein) qui sont capables de lier le CRF.

III 1 : Le récepteur CRF1

Le récepteur CRF1, découvert dans un premier temps chez l'homme lie avec une haute affinité le CRF (en particulier oCRF) ainsi que l'urocortine, l'urotensine1 et la sauvagine.²⁷⁷

L'ARNm du récepteur CRF1 est largement présent dans le cerveau, où il est exprimé dans les régions corticales, hypothalamiques, limbiques et du cervelet.^{278,279} Il est aussi exprimé dans la glande pituitaire²⁷⁶ et dans d'autres tissus périphériques.²⁷⁵

²⁷¹ Segre, G.V.; Goldring, S.R. Receptors of secretin, calcitonin, parathyroid (PTH)/PTH-related peptide, vasoactive intestinal peptide, glucagonlike peptide 1, growth hormone releasing hormone, and glucagon belong to a newly discovered G-protein-linked receptor family. *Trends in endocrinological Metabolism* **1993**, *90*, 309-314.

²⁷² Perrin, M.H.; Donaldson, C.J.; Chen, R.; Lewis, K.A.; Vale, W.W. Cloning and functional expression of a rat brain corticotropin releasing factor (CRF) receptor. *Endocrinology* **1993**, *133*, 3058-3061.

²⁷³ Lovenberg, T.W.; Liaw, C.W.; Grigoriadis, D.E.; Clevenger, W.; Chalmers, D.T.; De Souza, E.B.; Oltersdorf, T. Cloning and characterization of functionally distinct corticotropin releasing-factor receptor subtype from rat brain. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, **1995**, *92*, 836-840.

²⁷⁴ Maya, A.; Iman, Q.A.; Abdul, B.A-S. Characterization of three Corticotropin releasing-factor Receptor in Catfish : A novel third receptor is predominantly expressed in pituitary and urophysis. *Endocrinology* **2001**, *142*, 446-454.

²⁷⁵ Linton, E.A.; Wolfe, C.D.; Behan, D.P.; Lowry, P.J. A specific carrier substance for human corticotropin releasing-factor in late gestational maternal plasma which could mask the ACTH-releasing activity. *Clin.Endocrinol* **1988**, *28*, 315-324.

²⁷⁶ Behan, D.P.; Linton, E.A.; Lowry, P.J. Isolation of the human plasma corticotropin releasing factor-binding protein. *J. Endocrinol* **1989**, *122*, 23-31.

²⁷⁷ Dietrich, K.D.; Lehnert, H.; De Souza, E.B. Corticotropin releasing-factor receptors : an overview. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **1997**, *105*, 65-82.

²⁷⁸ Potter, E.; Sutton, S.; Donaldson, C.; Chen, R.; Perrin, M.; Lewis, K.; Sawchenko, P.E.; Vale, W.W. Distribution of corticotropin releasing factor mRNA expression in the rat brain and the pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 8777-8781.

Il est composé des 415 acides aminés. **Figure 47** Il comporte dans la première et la deuxième boucle intracellulaire ainsi que dans la partie C-terminale, des sites potentiels de N-glycosylation et de phosphorylation *via* des protéines kinases C. Dans la troisième boucle intracellulaire, il possède des sites de phosphorylation *via* des protéines kinases A et des caséines kinases II.²⁸⁰ Ce récepteur a été aussi identifié chez la souris et le rat. Dans ces trois espèces les ARNm codent pour 415 acides aminés avec une homologie de séquence de 98 %.

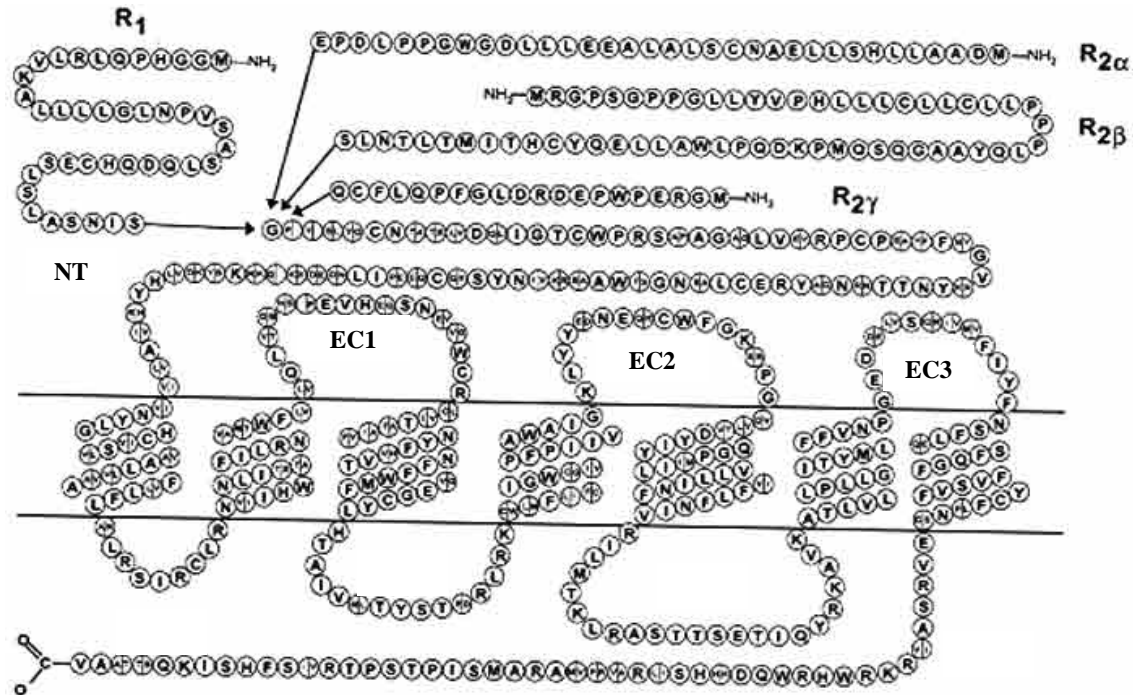


Figure 47 : Représentation des différents sous-types de récepteur (pour les différences : le CRF1 est à droite et le CRF2 est à gauche)

Chez les mammifères, le récepteur CRF1 n'est pas sélectif vis à vis du CRF de la sauvagine, de l'urotensine1 et de l'urocortine.²⁸¹ Tous ces peptides se lient au CRFR1 avec la même affinité et ont la même capacité à stimuler la production intracellulaire d'AMPc.²⁸² En

²⁷⁹ Wong, M.L. ; Licinio, J. ; Pasternak, K.I.; Gold, P.W. Localization of corticotropin releasing hormone (CRH) receptor mRNA In adult rat brain by in situ hybridisation histochemistry. *Endocrinology* **1994**, *135*, 2275-2278.

²⁸⁰ Chang, C.P. ; Pearse, R.V. ; O'Connel, S. ; Rosenfled M.G. Identification of a seven menbrane helix receptor for corticotropin releasing factor and sauvagine in mammalian brain. *Neuron*, **1993**, *11*, 1187-95.

²⁸¹ Speiss, J.; Radulovic, J.; Sydow, S. Characterization of native corticotropin-releasing factor receptor type 1 (CRFR1) in the rat and mouse central nervous system. *J. Neurosci. Res.*, **1998**, *54*, 507-521.

²⁸² Chalmers, D.T.; Lovenberg, T.W.; Grigoriadis, D.E.; Behan, D.P.; De Souza, E.B. Corticotrophin-releasing factor receptors: from molecular biology to drug design. *Trends Pharmacol Sci*, **1996**, *17*, 166-172.

revanche, le CRFR1 du Xénope est le seul récepteur sélectif connu car il lie h/rCRF, xCRF, l'urotensine I et l'urocortine avec une meilleure affinité que oCRF et la sauvagine.²⁸³

Tableau 14

Sous-type de récepteur	Acides aminés	% Homologie par rapport au hCRF ₁	% Homologie par rapport au rCRF ₁	Liaison (K _i , nM)			Production d'AMPC (EC ₅₀ , nM)		
				r/hCRF	urocortine	sauvagine	r/hCRF	urocortine	sauvagine
hCRF ₁	415	100	97.1	10	0.6	1.6	1.1	0.8	1.7
hCRF _{2α}	411	68	67.5	416	2.0	5.2	10	0.2	0.2
hCRF _{2β}	431	66.5	64.9	50.1	1.6	3.2	3.0	0.1	0.3
hCRF _{2γ}	397	67.3	68	25	1.4	---	32	3.0	4.0
rCRF ₁	415	97.1	100	4.1	1.7	4.3	4.0	---	4.0
rCRF _{2α}	411	68.2	67.5	192	2.8	5.2	20	---	0.5
rCRF _{2β}	431	65.7	65.5	297	1.8	4.3	3.0	---	0.1
cfCRF ₃	428	---	88 _a	1.4	---	7.1	0.6	---	1.6

Tableau 14 : Caractéristiques des sous-types de récepteurs du CRF chez l'homme et le rat. (a) :souris

III 2 : Le récepteur CRF2

Le récepteur CRF2 possède trois variantes structurales distinctes, CRF2 α , CRF2 β et CRF2 γ .

Ils ont une meilleure affinités pour les urocortines (I, II²⁸⁴ et III²⁸⁵), l'urotensine I et la sauvagine que pour le CRF^{203,277}. Les urocortines I et II constituent les deux ligands endogènes spécifiques pour le récepteur CRF2.

Chez le rat et la souris, CRFR2 est seulement exprimé dans le bulbe olfactif, le septum latéral, le noyau ventromédial hypothalamique, les noyaux corticaux médians et postérieurs des amygdales et le noyau mésencéphalique.^{286,287}

²⁸³ Dautzenberg, F.M.; Dietrich, K.; Palchaudhuri, M.R.; Spiess, J. Identification of two corticotropin-releasing factor receptors from *Xenopus laevis* with high ligand selectivity: unusual pharmacology of the type 1 receptor. *J Neurochem*, **1997**, *69*, 1640-1649.

²⁸⁴ Reyes, T.M.; Lewis, K.; Perrin, M.H.; Kunitake, K.S.; Vaughan, J.; Arias, C.A.; Hogenesch, J.B.; Gulyas, J.; Rivier, J.; Vale, W.W. Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*, 2843-2848.

²⁸⁵ Lewis, K.; Li, C.; Perrin, M.H.; Blount, K.; Kunitake, K.; Donaldson, C.; Vaughan, J.; Reyes, T.M.; Gulyas, J.; Fischer, W.; Bilezikjian, L.; rivier, J.; Sawchenko, P.E.; Vale, W.W. Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin releasing-factor (CRF) family with high affinity for CRF2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*, 7570-7575.

III 2 1 : Le récepteur CRF2 α

Le récepteur CRF2 α n'est pas seulement présent dans le cerveau, chez l'homme il a été aussi découvert dans des cellules mononucléaires dans le colon²⁸⁸.

Il est composé de 411 acides aminés avec une homologie de séquence de 70% par rapport au récepteur CRFR1 humain. **Figure 47**

Dans des cellules stables transfectées, le récepteur hCRF2 α a les mêmes caractéristiques pharmacologiques que le récepteur CRF2 α de rat, le niveau d'AMPc intracellulaire augmente en présence d'urocortine ou de CRF.

III 2 2 : Le récepteur CRF2 β

Le récepteur CRF2 β n'est pas exprimé dans le parenchyme. Chez le rat, l'ARNm du récepteur est présent dans le cœur, les muscles du squelette, tractus gastro-intestinal, les artérioles cérébrales et dans les artères du plexus.²⁸⁶

Il est composé de 431 acides aminés avec une homologie de séquence de 66% par rapport au récepteur CRFR1 humain.

Le récepteur humain CRF2 β lie l'urocortine avec une meilleure affinité que la sauvagine (5 fois) et le CRF (30 fois), cela suggère que l'urocortine est son ligand naturel.^{273,289}

III 2 3 : Le récepteur CRF2 γ

Le récepteur CRF2 γ n'a été décelé que dans le cerveau humain.²⁹⁰

Il est composé de 397 acides aminés avec une homologie de séquence de 67 % par rapport au hCRFR1.

Il possède une affinité comparable aux autres isoformes du récepteur CRF2 pour l'urocortine, mais il est 10 fois moins actif pour induire la libération d'AMPc.

²⁸⁶ Lovenberg, T.W.; Chalmers, D.T.; Liu, C. De Souza, E.B. CRF2 α and CRF2 β receptor mRNAs are differently distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. *Endocrinology*, **1995**, *136*, 4139-4142.

²⁸⁷ Van Pett, K.; Viau, V.; Bittencourt, J.C.; Chan, R.K.; Li, H.Y.; Arias, C.; Prins, G.S.; Perrin, M.; Vale, W.; Sawchenko, P.E. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J. Comp. Neurol.*, **2000**, *428*, 191-212.

²⁸⁸ Muramatsu, Y.; Fukushima, K.; Iino, K.; Totsune, K.; Takahashi, K.; Suzuki, T.; Hirasawa, T.; Takeyama, J.; Ito, M.; Nose, M.; Tashiro, A.; Hongo, M.; Oki, Y.; Nagara, H.; Sasano, H. Urocortin and corticotropin-releasing factor receptor expression in the human colonic mucosa. *Peptides*, **2000**, *21*, 1799-1809.

²⁸⁹ Valdenaire, O.; Giller, T.; Breu, V.; Gottowik, J.; Kilpatrick, G. A new functional isoform of the human CRF2 receptor for corticotropin-releasing factor. *Biochim Biophys Acta*, **1997**, *1352*, 129-132.

²⁹⁰ Kostich, W.A.; Chen, A.; Sperle, K.; Largent, B.L. Molecular identification and analysis of a novel human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: The CRF2 gamma receptor. *Mol Endocrinol*, **1998**, *12*, 1077-1085.

III 3 : Le récepteur CRF3

Trois récepteurs du CRF ont été récemment découverts chez une espèce de poisson-chat (*Ameiurus nebulosus*).²⁹¹ Parmi ces récepteurs, le cfCRF1 (cf pour catfish) qui a une homologie de séquence de 93 % avec le récepteur mCRF1 ; le cfCRF2 qui a une homologie de 88 % avec le récepteur mCRF2 et le cfCRF3 qui est majoritairement présent.

L'ARNm du récepteur cfCRF3 est présent en abondance dans la glande pituitaire mais il est aussi exprimé dans l'urophyse.

Il est composé de 428 acides aminés et a une homologie de séquence de 89% avec le récepteur mCRFR1.

Il possède une bonne affinité vis à vis du CRF, de l'urotensine et de la sauvagine (Ki : 1.4, 6.5 et 7.1 nM) et induit la libération d'AMPc (EC₅₀ : 0.6, 0.7 et 1.6).

III 4 : Les récepteurs chimériques

Afin de déterminer les sites de liaisons des molécules sur les récepteurs, plusieurs équipes ont mis en place la construction de récepteurs chimériques.²⁹²

Ces chimères ont permis de mettre en évidence que les résidus 70 à 89 sont impliqués dans la liaison au récepteur CRF1.

La contribution de la troisième boucle extracellulaire à la liaison du CRFR1 a été étudié en détail par la construction d'un récepteur chimérique.²⁹³ Le remplaçant de cette boucle par la troisième boucle du récepteur du glucagon, entraîne une perte totale de l'affinité pour les ligands oCRF, h/rCRF et urocortine. Ces résultats, sont en accord avec les résultats obtenus en construisant un récepteur chimère entre le CRF et celui GHRH. Vale et col pensent que le domaine N terminal et la troisième boucle extracellulaire sont indispensables pour la liaison au récepteur CRF1.²⁹⁴ Cette boucle est impliquée dans l'affinité ainsi que l'activation du récepteur CRF1 ; elle a donc un rôle capital. Elle doit probablement interagir avec les résidus 1 à 11 de la partie N terminale du CRF.

²⁹¹ Arai, M. ; Assil, I.Q. ; Abou-Samra, A.B. Characterization of three corticotropin_releasing factor receptors in catfish: A novel third receptor is predominantly expressed in pituitary and urophysis. *Endocrinology*, **2001**, *142*, 446-454.

²⁹² Dautzenberg, F.M.; Wille, S.; Lohmann, R.; Spiess, J. Mapping of the ligand-selective domain of the *Xenopus laevis* corticotropin releasing factor receptor: implications for the ligand-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, 4941-4946.

²⁹³ Sydow, S.; Flaccus, A.; Fischer, A.; Spiess, J. The role of the fourth extracellular domain of the rat corticotropin-releasing factor receptor. *J. Eur J Biochem*, **1999**, *259*, 55.

²⁹⁴ Perrin, M.H.; Sutton, S.; Bain, D.L.; Berggren, W.T.; Vale, W.W. The first extracellular domain of corticotropin releasing factor receptor1 contains major binding determinants for urocortine and astressin. *Endocrinology*, **1998**, *139*, 566-570.

Afin de déterminer les acides aminés de la partie N terminale du récepteur CRF1 responsables de la liaison aux analogues du CRF, des récepteurs mutés ont été construits en remplaçant spécifiquement les résidus de hCRFR1 par ceux correspondant aux positions du domaine N terminal du récepteur de type 2 du VIP humain (Vasoactive Intestinal Peptide).²⁹⁵ Deux régions se sont avérées être importantes aussi bien pour la liaison des agonistes et des antagonistes que pour l'activation par des agonistes : celles des résidus 43 à 50 et 76 à 84. Cette deuxième région est aussi impliquée dans la sélectivité du récepteur CRFR1 du xénope vis à vis des ligands peptidiques du CRF.²⁹²

La délétion de la partie C terminale du récepteur CRF1 de 38 résidus entraîne une diminution notable de la liaison avec oCRF alors que l'activité n'est que légèrement affectée.²⁹⁶ La partie C terminale et en particulier la région adjacente au domaine transmembranaire 7 semble être impliquée dans le couplage aux protéines G.

Cette stratégie a aussi été employée pour déterminer les sites de liaisons au niveau des récepteurs CRF2.²⁹⁷ Les récepteurs chimériques dans lesquels les domaines N terminaux de hCRFR2 ou xCRFR2 remplacent celui du hCRFR1, lient tous les peptides CRF sans aucune sélectivité et avec une haute affinité. Par contre quand le domaine N terminal de hCRFR2 α ou xCRFR2 remplace celui de xCRFR1 il y a une baisse significative de l'affinité.

Les récepteurs chimères incorporant le domaine N terminal de xCRFR1 en lieu et place de hCRFR2 et xCRFR2 montrent un profil pharmacologique similaire à celui des deux protéines parentes CRFR2. Cela montre que la sélectivité de CRFR2 réside dans les 3 premières boucles extracellulaires. Les récepteurs chimériques où le domaine N terminal de xCRFR1 remplace ceux de hCRFR2 et xCRFR2 ont de nouveaux profils pharmacologiques et lient h/rCRF, urocortine et sauvagine avec une meilleure affinité que le oCRF.

La fonction essentielle du domaine N terminal dans le récepteur est de fixer la partie C terminale du ligand et d'orienter la partie N terminale de ce ligand vers la troisième boucle extracellulaire du récepteur. Cette hypothèse a été validée par la préparation d'un récepteur

²⁹⁵ Wille, S.; Sydow, S.; Palchaudhuri, M.R.; Spiess, J.; Dautzenberg, F.M. Identification of amino acids in the N-terminal domain of corticotropin-releasing factor receptor 1 that are important determinants of high-affinity ligand binding. *J Neurochem*, **1999**, 72, 388-395.

²⁹⁶ Sydow, S.; Radulovic, J.; Dautzenberg, F.M.; Spiess, J. Structure function relationship of different domains of the rat corticotropin-releasing factor receptor type 1 in ligand binding. *Mol Brain Res*, **1997**, 52, 182-193.

²⁹⁷ Dautzenberg, F.M.; Kilpatrick, G.J.; Wille, S.; Hauger, R.L. The ligand-selective domains of corticotropin-releasing factor type 1 and type 2 receptor reside in different extracellular domains: generation of chimeric receptors with a novel ligand-selective profile. *J Neurochem*, **1999**, 73, 821-829.

hCRFR1 activé.²⁹⁸ Ainsi un chimère du hCRFR1 a été modifié en remplaçant les résidus N-terminaux 1 à 111 du récepteur par la séquence N-terminale 1 à 16 du ligand h/rCRF. Les résultats ont montré que le récepteur chimère s'auto-active, car il y a une augmentation de production d'AMPC 25 fois supérieure au niveau basal et 20 fois supérieure en présence d'un puissant antagoniste non peptidique sélectif de CRF1.

Pour conclure nous pouvons dire que le domaine N-terminal et la troisième boucle extracellulaire forment le site de reconnaissance initial du ligand et la troisième boucle est responsable de la sélectivité entre les agonistes et antagonistes peptidiques. Le domaine C-terminal et la troisième boucle intracellulaire sont responsables de la transduction du signal. Les boucles extracellulaires 2 et 3 du CRFR2 semblent impliquées dans la liaison de l'urocortine.

III 5 : Le « CRF-binding protein »

CRF-BP est une protéine soluble de 37 kDa qui a été dans un premier temps identifiée, isolée et purifiée du plasma humain.^{275,276}

L'ADNc du récepteur hCRF-BP code pour une protéine contenant 322 acides aminés qui possède un site de N glycosylation et 11 résidus cystéines. Chez le rat, les caractéristiques sont les mêmes avec une homologie de séquence de 85%.^{299,300} CRF-BP n'a pas de similitudes structurales avec les récepteurs du CRF connus.

En ce qui concerne l'affinité des ligands de la famille du CRF pour CRF-BP, l'ordre est le suivant : urotensine > urocortine > h/rCRF > sauvagine > oCRF.^{301,302} L'analyse biochimique des ligands capables d'interagir avec CRF-BP montre que la partie importante du CRF requise pour la liaison au CRF-BP est comprise entre les résidus 9 à 28. La séquence requise est distincte de l'affinité pour CRFR1 qui nécessite comme séquence minimale les résidus 12 à 41.^{303,304} A noté aussi que les analogues non-amidés de h/rCRF, h/rCRF(1-41),

²⁹⁸ Nielsen, S. M.; Nielsen, L. Z.; Hjorth, S. A.; Perrin, M. H.; Vale, W. W. Constitutive activation of tethered-peptide: corticotropin-releasing factor receptor chimeras. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 10277-10281.

²⁹⁹ Potter, E.; Behan, D.P.; Fischer, W.H.; Linton, E.A.; Lowry, P.J.; Vale, W.W. Cloning and characterization of the cDNAs for human and rat corticotropin-releasing factor binding proteins. *Nature*, **1991**, *349*, 423-426.

³⁰⁰ Behan, D.P.; Potter, E.; Lewis, K.A.; Jenkins, N.A.; Copeland, N.; Lowry, P.J.; Vale, W.W. Cloning and structure of the human corticotropin-releasing factor binding protein gene (CRFBP) *Genomics*, **1993**, *16*, 63-68.

³⁰¹ Kemp, C.F.; Woods, R.J.; Lowry, P.J. The corticotrophin-releasing factor binding-protein: an act of several parts. *Peptides*, **1998**, *19*, 1119-1128.

³⁰² Sutton, S.W.; Behan, D.P.; Lahrichi, S.L.; Kaiser, R.; Corrigan, A.; Lowry, P.J.; Potter, E.; Perrin, M.H.; Rivier, J.; Vale, W.W. Ligand requirement of the human corticotropin-releasing factor-binding protein. *Endocrinology*, **1995**, *136*, 1097-1102.

³⁰³ Behan, D.P.; Heinrichs, S.C.; Troncoso, J.C.; Liu, X.J.; Kawas, C.H.; Ling, N.; De Souza, E.B. Displacement of corticotropin-releasing factor from its binding protein as a possible treatment for Alzheimer's disease. *Nature*, **1995**, *378*, 284-287.

h/rCRF(9-33) et h/rCRF(6-33) se lient au CRF-BP et sont inactifs sur les récepteurs du CRF^{302,119}.

En revanche, le fait que l'astressine, un antagoniste construit à partir de h/rCRF(12-41) se lie mal au CRF-BP met en évidence l'importance des résidus 9 à 11²²⁴. Ce manque d'affinité pour CRF-BP est utilisé pour contrôler la qualité des molécules antagonistes utilisées *in-vivo*.

L'expression de CRF-BP dans le cerveau et la glande pituitaire est commune à toutes les espèces³⁰⁵ et chez les primates il est aussi localisé dans le placenta,³⁰⁶ le sang^{275,276} et le foie.²⁹⁹

Le rôle physiologique de CRF-BP résulte de la différence cinétique d'association et de dissociation entre le CRF et les deux types de récepteurs (CRF-BP et CRFR1).³⁰⁷ Alors que le taux d'association est sensiblement le même pour CRF-BP et CRFR1, celui de dissociation est de 2.2 minutes pour CRFR1 et 64 minutes pour CRF-BP. Cela conduit à une diminution du taux de CRF libre dans le milieu. Le CRF-BP peut jouer un rôle de modulateur du taux circulant de CRF.³⁰⁸

A ce jour, le rôle de ce récepteur n'est pas clairement défini et aucune étude n'explique les raisons de la formation du complexe entre le CRF et le CRF-BP.

³⁰⁴ Behan, D.P.; Grigoriadis, D.E.; Lovenberg, T.; chalmers, D.; Heinrichs, S.; Liaw, C.; De Souza, E.B. Neurology of corticotropin-releasing factor (CRF) receptors and CRF-binding protein: implications for the treatment of CNS disorders. *Mol. Psychiatry*, **1996**, *1*, 265-277.

³⁰⁵ Potter, E. ; Behan, D.P.; Linton, E.A.; Lowry, P.J.; Sawchenko, P.E.; Vale, W.W. The central distribution of a corticotropin-releasing factor (CRF)-binding protein predicts multiple sites and modes of interactions with CRF. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89*, 4192-4196.

³⁰⁶ Petraglia, F. ; Potter, E. ; Cameron, V.A.; Sutton, S.. Behan, D.P.; Woods, R.J.; Sawchenko, P.E.; Lowry, P.J.; Vale, W.W. Corticotropin-releasing factor-binding protein is produced by human placenta and intrauterine tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, **1993**, *77*, 919-924.

³⁰⁷ De Souza, E.B. Corticotropin-releasing factor receptors in the rat central nervous system: characterization and regional distribution. *J. Neuroscience.*, **1987**, *7*, 88-100.

³⁰⁸ Turnbull, A.V. ; Rivier, C. Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein and related peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *215*, 1-10.

IV : Rôles physiologiques et physiopathologiques du CRF

Le CRF joue un rôle important dans la régulation de l'axe adreno-pituitaire³⁰⁹ et au niveau du système nerveux central^{190,191}. Mais il est aussi impliqué entre autres dans les systèmes cardiovasculaire,³¹⁰ gastrointestinal,³¹¹ dans l'inflammation,³¹² la reproduction³¹³ et les problèmes d'anorexie³¹⁴ et d'obésité³¹⁵ et dans la régulation de la balance énergétique.³¹⁶ Il est aussi responsable de désordres psychologiques et il est impliqué dans la maladie d'Alzheimer.³¹⁷

IV 1 : Rôles physiologiques

Le CRF est impliqué dans la régulation d'un certain nombre d'hormones neuroendocriniennes au niveau de la glande pituitaire et de l'hypothalamus. C'est le principal régulateur physiologique de la sécrétion d'ACTH lié au stress,³¹⁸ de β -endorphine et d'autres peptides de la glande pituitaire.¹⁹⁰ L'administration de CRF inhibe la sécrétion de la lutéine et de l'hormone de croissance. Les récepteurs muscariniques et cholinergiques sont impliqués dans les effets de l'acétylcholine sur la sécrétion du CRF ; la sérotonine serait également impliquée.

L'utilisation d'opiacés ou de benzodiazépines inhibe la production de CRF. Les glucocorticoïdes qui sont impliqués dans le rétro contrôle négatif de l'axe hypothalamique-adrenocortical-pituitaire sont aussi de puissants inhibiteurs.

³⁰⁹ Rivier, J.; Plotsky, P.M. Mediation by corticotropin-releasing factor (CRF) of adenohipophysial hormone secretion. *Annual review of Physiology*, **1986**, *48*, 475-494.

³¹⁰ Fisher, L.A.; Rivier, J.; Rivier, C.; Spiess, J.; Vale, W.W.; Brown, M.R. Corticotropin-releasing factor (CRF): central effects on mean arterial pressure and heart rate. *Endocrinology*, **1982**, *110*, 2222-2224.

³¹¹ Tache, Y.; Goto, Y.; Gunion, M.; Vale, W.; Rivier, J.; Brown, M. Inhibition of gastric acid secretion in rat by intracerebral injection of corticotropin-releasing factor. *Science*, **1983**, *222*, 935-937.

³¹² Karalis, K.; Sano, H.; Redwine, J.; Listwak, S.; Wilder, R.L.; Chrousos, G.P. Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone *in-vivo*. *Science*, **1991**, *254*, 421-423.

³¹³ Rivier, C.; Vale, W.W. influence of the corticotropin-releasing factor on reproductive functions in the rat. *Endocrinology*, **1984**, *114*, 914-928.

³¹⁴ Uehara, A.; Sekiya, C.; Takasugi, Y.; Namiki, M.; Arimura, A. Anorexia induced by interleukin-1: involvement of corticotropin releasing factor. *Am. J. Physiol*, **1989**, *257*, 612-617.

³¹⁵ Rohner-Jeanrenaud, F.; Walker, C.D.; Greco-Perotto, R.; Jeanrenaud, B. Central corticotropin releasing factor administration prevents the excessive body weight of genetically obese (fa/fa) rats. *Endocrinology*, **1989**, *124*, 733-739.

³¹⁶ Richard, D. Role of CRH system in the regulation of the energy balance. *M. S. Med. Sci.*, **1998**, *14*, 877-888.

³¹⁷ Bisette, G.; Reynolds, G.P.; Kilts, C.D.; Widerlov, E.; Nemeroff, C.B. Corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in senile dementia of the Alzheimer type. Reduced cortical and striatal concentration. *J. A. M. A.*, **1985**, *254*, 3067-3069.

³¹⁸ Vale, W.; Rivier, C.; Brown, M.R.; Spiess, J.; Koob, G.; Swanson, L.; Bilezikjian, L.; Bloom, F.; Rivier, J. Chemical and biological characterization of corticotropin-releasing factor. *Recent Prog. Horm. Res.*, **1983**, *39*, 245-270.

Le CRF est aussi impliqué dans la stimulation de l'activité électrique des neurones dans plusieurs parties du cerveau, entre autre le cervelet,³¹⁹ l'hypothalamus³²⁰ et l'hippocampe.³²¹ Il est ainsi responsable de l'augmentation de l'activité électrique du cerveau et il augmente la vigilance et diminue le temps de sommeil. A haute dose, il est responsable d'attaques cérébrales.³²²

Les études menées sur les effets gastro-intestinaux du CRF montrent qu'il inhibe la sécrétion gastrique.³²³

Des actions pro-inflammatoires ont été mises en évidence chez le rat.³¹² Cela se traduit par une dégranulation des cellules mastocytaires de la peau et par une augmentation de la perméabilité vasculaire.^{324,325}

De nombreuses études ont aussi mis en évidence que le CRF et ses récepteurs étaient largement impliqués dans les fonctions reproductives chez l'homme. Il est produit dans le placenta,³²⁶ l'endomètre,³²⁷ les ovaires³²⁸ et les testicules.³²⁹ Chez le mâle il exerce une régulation inhibitrice de la production de stéroïdes dans les cellules de Leydig.³³⁰ Chez la femelle, il aurait un rôle inhibiteur dans la régulation des estrogènes et des glucocorticoïdes,

³¹⁹ Fox, E.A. ; Gruol, D.L. Corticotropin-releasing factor suppresses the afterhyperpolarization in cerebellar purkinje neurons. *Neurosci. Lett.*, **1993**, 149, 103-107.

³²⁰ Yamashita, H. ; Kasai, M. ; Inenaga, K. Effects of corticotropin-releasing factor on neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus *in-vitro*. *Brain Res. Bull.*, **1991**, 27, 321-326.

³²¹ Siggins, G.R. ; Guol, D.L. ; Aldenhoff, J. ; Pittman, Q. Electrophysiological actions of corticotropin-releasing factor in the central nervous system. *Fed. Proc.*, **1985**, 44, 237-242.

³²² Ehlers, C.L. ; Henriksen, S.J. ; Wang, M. ; Rivier, J. ; Vale, W.W. ; Bloom, F.E. Corticotropin-releasing factor produces increases in brain excitability and convulsive seizures in rats. *Brain Res.*, **1983**, 278, 332-336.

³²³ Konturek, S.J. ; Yanaihara, C. ; Yanaihara, N. ; Mochizuki, T. ; Bilski, J. ; Dembinski, A. Effects of human corticotropin-releasing factor (CRF) on gastric and pancreatic secretion *in-vivo* and *in-vitro*. *Peptides*, **1987**, 8, 575-577.

³²⁴ Theoharides, T.C. ; Singh, L.K. ; Boucher, W. ; Pang, X. ; Letourneau, R. ; Webster, E. ; Chrousos, G. Corticotropin-releasing hormone induces skin mast cell degranulation and increased vascular permeability, a possible explanation for its proinflammatory effects. *Endocrinology*, **1998**, 139, 403-413.

³²⁵ Singh, L.K. ; Boucher, W. ; Pang, X. ; Letourneau, R. ; Seretakis, D. ; Green, M. ; Theoharides, T.C. Potent mast cell degranulation and vascular permeability triggered by urocortin through activation of corticotropin-releasing hormone receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, **1999**, 288, 1349-1356.

³²⁶ Grino, M. ; Chrousos, G.P. ; Margioris, A.N. The corticotropin-releasing hormone gene is expressed in human placenta. *Biochem Biophys Res Commun*, **1987**, 148, 1208-1214.

³²⁷ Makrigiannakis, A. ; Zoumakis, E. ; Margioris, A.N. ; Theodoropoulos, P. ; Stournaras, C. ; Gravanis, A. The corticotropin-releasing hormone in normal and tumoral epithelial cells of human endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **1995**, 80, 185-189.

³²⁸ Mastorakos, G. ; Webster, E. ; Friedman, T. ; Chrousos, G. Immunoreactive corticotropin-releasing hormone and its binding in the rat ovaries. *J Clin. Invest*, **1993**, 92, 961-968.

³²⁹ Yoon, D.J. ; Sklar, C. ; David, R. Presence of corticotropin-releasing factor in rat testis. *Endocrinology*, **1988**, 122, 759-761.

³³⁰ Fabbri, A. ; Tinajero, J.C. ; Dufau, M.L. Corticotropin-releasing factor is produced by rat Leydig cells and has a major antireproductive role in testis. *Endocrinology*, **1990**, 127, 1541-1543.

et induirait la production de prostaglandine (PGE₂),³³¹ il entrerait aussi dans les mécanismes de contraction du myomètre.³³²

IV 2 : Implications du CRF dans les pathologies humaines

De nombreuses études cliniques ont montré que la dérégulation de l'axe hypothalamique-adrenocortical-pituitaire joue un rôle primordial dans la dépression ainsi que les désordres liés à l'anxiété.^{333,334,335} On peut donc suggérer qu'il existe un dysfonctionnement dans le système de régulation du CRF chez ces patients. Ils ont ainsi découvert un taux élevé de CRF³³⁶ dans le liquide cérébro-spinal ainsi qu'une diminution du nombre des récepteurs du CRF dans le cerveau.³³⁷ Ce taux peut être ramené à la normale par une thérapie électroconvulsive.³³⁸

Dans les maladies comme la dépression, l'action d'antidépresseurs a pour effet, dans certaines zones du cerveau, de diminuer la production de CRF et d'augmenter celle des récepteurs (cette production de récepteurs est sûrement mise en place par l'organisme pour compenser la suppression chronique de sécrétion de CRF).³³⁹

Le CRF serait aussi impliqué dans les phénomènes de dépendance aux drogues.³⁴⁰ Les patients en cours de sevrage sont généralement soumis à une irritabilité, un stress et ont

³³¹ Zoumakis, E.; Makrigiannakis, A.; Margioris, A.; Stournaras, C.; Gravanis, A. Corticotropin-releasing hormone (CRH) in normal and pregnant uterus, Physiological implication. *Frontiers in Bioscience*, **1996**, *1*, 1-8.

³³² Benedetto, C.; Petraglia, F.; Marozio, L.; Chiarolini, L.; Florio, P.; Genazzani, A.R.; Massobrio, M. Corticotropin-releasing hormone increases prostaglandin F2 alpha activity on human myometrium *in-vitro*. *Am J Obstet Gynecol*, **1994**, *171*, 126-131.

³³³ Banki, C.M. ; Bissette, G. ; Arato, M.; O'Connor, L.; Nemeroff, C.B. CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depression and schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*, **1987**, *144*, 873-877.

³³⁴ France, R.D. ; Urban, B. ; Krishnan, R.R. ; Bissette, G. ; Banki, C.M. ; Nemeroff, C.B. ; Spielman, F.J. CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in chronic pain patients with and without major depression. *Biol. Psychiatry*, **1988**, *23*, 86-88.

³³⁵ Arato, M. ; Banki, C.M. ; Bissette, G. ; Nemeroff, C.B. Elevated CSF CRF in suicide victims. *Biol. Psychiatry*, **1989**, *25*, 355-359.

³³⁶ Bremner, J.D.; Licinio, J.; Darnell, A.; Krystal, J.H.; Owens, M.J.; Southwick, S.M.; Nemeroff, C.B.; Charney, D.S. Elevated CSF corticotropin-releasing factor concentration posttraumatic stress disorder. *American Journal of Psychiatry*, **1997**, *154*, 624-629.

³³⁷ Nemeroff, C.B.; Owens, M.J.; Bissett, G.; Andorn, A.C.; Stanley, M. Reduced corticotropin-releasing factor binding sites in the frontal cortex of suicide victims. *Archives of General Psychiatry*, **1988**, *45*, 577-579.

³³⁸ Nemeroff, C.B.; Bissette, G.; Akil, H.; Fink, M. Neuropeptide concentrations in the cerebrospinal fluid of depressed patients treated with electroconvulsive therapy. Corticotropin-releasing factor, beta-endorphin and somatostatine. *British Journal of Psychiatry*, **1991**, *158*, 59-63.

³³⁹ Grigoriadis, D.E.; Pearsall, D.M.; De Souza, E.B. Effects of chronic antidepressant and benzodiazepine treatment on corticotropin-releasing-factor receptors in rat brain and pituitary. *Neuropsychopharmacology*, **1989**, *2*, 53-60.

³⁴⁰ Sarnyai, Z.; Bíró, É.; Penke, B.; Telegdy, G. The cocaine-induced elevation of plasma corticosterone is mediated by endogenous corticotropin-releasing factor (CRF) in rats. *Brain Research*, **1992**, *589*, 154-156.

généralement tendance à déprimer. L'exposition au stress chez des rats sevrés à pour effet d'augmenter le taux de CRF et provoque chez eux un processus de recherche de drogue.³⁴¹

Plusieurs études ont montré une corrélation entre le CRF et la maladie l'Alzheimer.³¹⁷ Une diminution du taux de CRF supérieure à 50% a été observée dans le liquide cébro-spinal et une augmentation du nombre des récepteurs a été constatée dans plusieurs zones du cerveau comme les lobes temporaux, pariétaux et occipitaux.^{342,343} Ce dysfonctionnement serait peut être dû à un problème de dissociation du complexe CRF/CRF-BP qui empêcherait de relarguer le CRF dans le milieu.^{344,345} Le CRF serait aussi impliqué dans d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson.³⁴⁶

³⁴¹ Shaham, Y.; Rajabi, H.; Stewart, J. Relapse to heroin-seeking in rats under opioid maintenance: the effects of stress, heroin priming, and withdrawal. *Journal of Neuroscience*, **1996**, *16*, 1957-1963.

³⁴² De Souza, E.B.; Xhitehouse, P.J.; Kuhar, M.J.; Price, D.L.; Vale; W.W. Reciprocal changes in corticotropin-releasing factor (CRF)-like immunoreactivity and CRF receptors in cerebral cortex of Alzheimer's disease. *Nature*, **1986**, *319*, 593-595.

³⁴³ Mouriadian, M.M.; Farah, J.M.Jr; Mohr, E.; Fabbrini, G.; O'Donohue, T.L., Chase T.N. Spinal fluid CRF reduction in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*, **1986**, *8*, 393-400.

³⁴⁴ Behan, D.P.; Heinrichs, S.C.; Troncoso, J.C.; Liu, X.J.; Kawas, C.H.; Ling, N.; De Souza, E.B. Displacement of corticotropin-releasing factor from its binding protein as a possible treatment for Alzheimer's disease. *Nature*, **1995**, *378*, 284-287.

³⁴⁵ Behan, D.P.; Khongsaly, O.; Owens, M.J.; Chung, H.D.; Nemeroff, C.B.; De Souza, E.B. Corticotropin-releasing factor (CRF), CRF-Binding Protein (CRF-BP), and CRF/CRF-BP complex in Alzheimer's disease and control postmortem human brain. *J Neurochem*, **1997**, *68*, 2053-2060.

³⁴⁶ Jolkkonen, J.; Hartikainen, P.; Soikkeli, R.; Bissette, G.; Nemeroff, C.; Riekkinen, P. A correlation study of CSF neuropeptides in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Neuropeptides*, **1991**, *19*, 97-102.

PARTIE II:

MODELISATION

Chapitre 1 : Protocole de modélisation

Le protocole de modélisation moléculaire est décrit en utilisant l'acide 3(S)-amino-2-oxo-1-pyrrolidinacétique (motif C5) **Figure 1**.

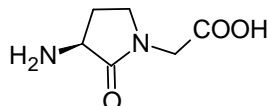


Figure 1 : Motif C5

Pour tous les autres monomères, le même protocole a été appliqué, afin de pouvoir comparer les aptitudes des oligomères obtenus à se structurer en hélice stable. Toutes les simulations ont été réalisées dans le vide.

I : Minimisation du motif unitaire

Cette première étape consiste à réaliser une famille conformationnelle. Pour cela nous avons soumis le motif unitaire (sous la forme aldéhydique) à un algorithme qui alterne une dynamique moléculaire à haute température (1000 K) et une minimisation d'énergie. Cet algorithme est répété 100 fois et permet d'obtenir 100 conformères énergétiquement stables. Nous choisissons comme candidat, le conformère le plus bas en énergie donc le plus stable. Celui-ci sert de point de départ pour la deuxième étape. Le fichier est nommé « C5_0 »

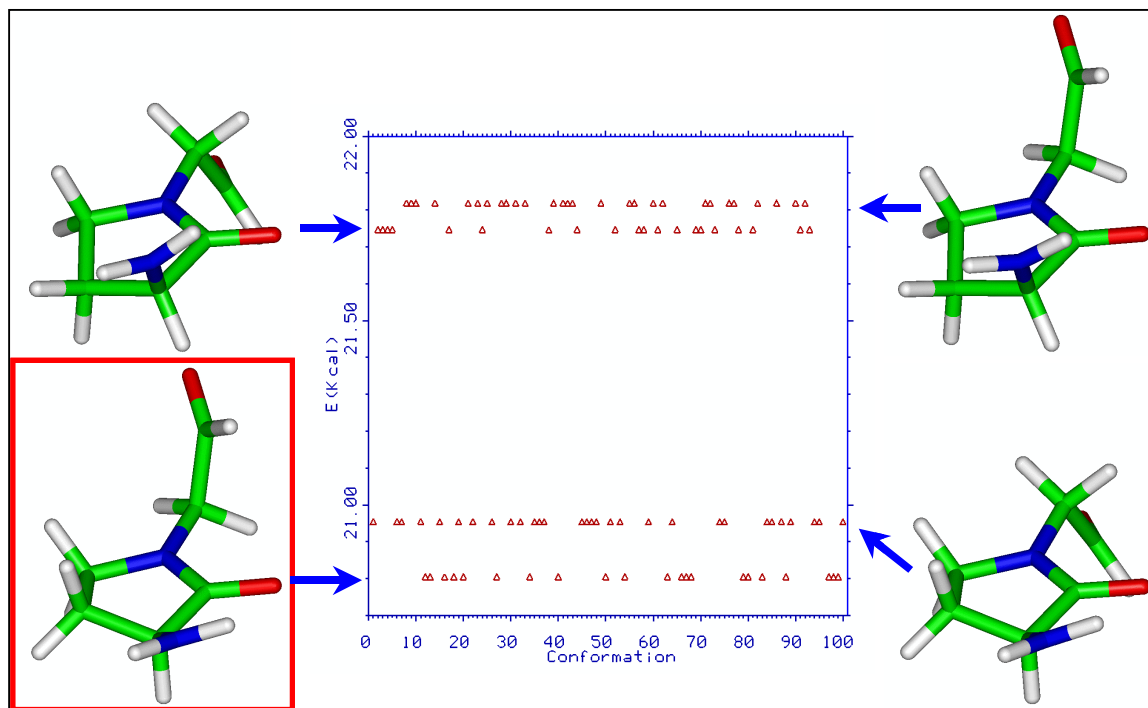


Figure 2 : Famille conformationnelle du motif C5

Dans ce cas, la molécule prend 4 conformations différentes qui sont fonctions de l'orientation du bras acide et de la torsion du cycle. Nous avons sélectionné le monomère le plus stable (frame 12, E : 20,8050 kcal/mol) pour le point de départ de la deuxième étape.

II : Etude de la variation des angles dièdres

II 1 : Construction du motif Ac-C5-NHMe

La deuxième étape du protocole consiste à faire varier les angles dièdres de la molécule. Pour cela, il faut dans un premier temps modifier les extrémités du monomère en ajoutant du côté N terminal un groupement acétyle et du côté C-terminal un groupement aminométhyle (**Figure 3**). Le fichier obtenu est appelé « mecoC5nhme_1 ».

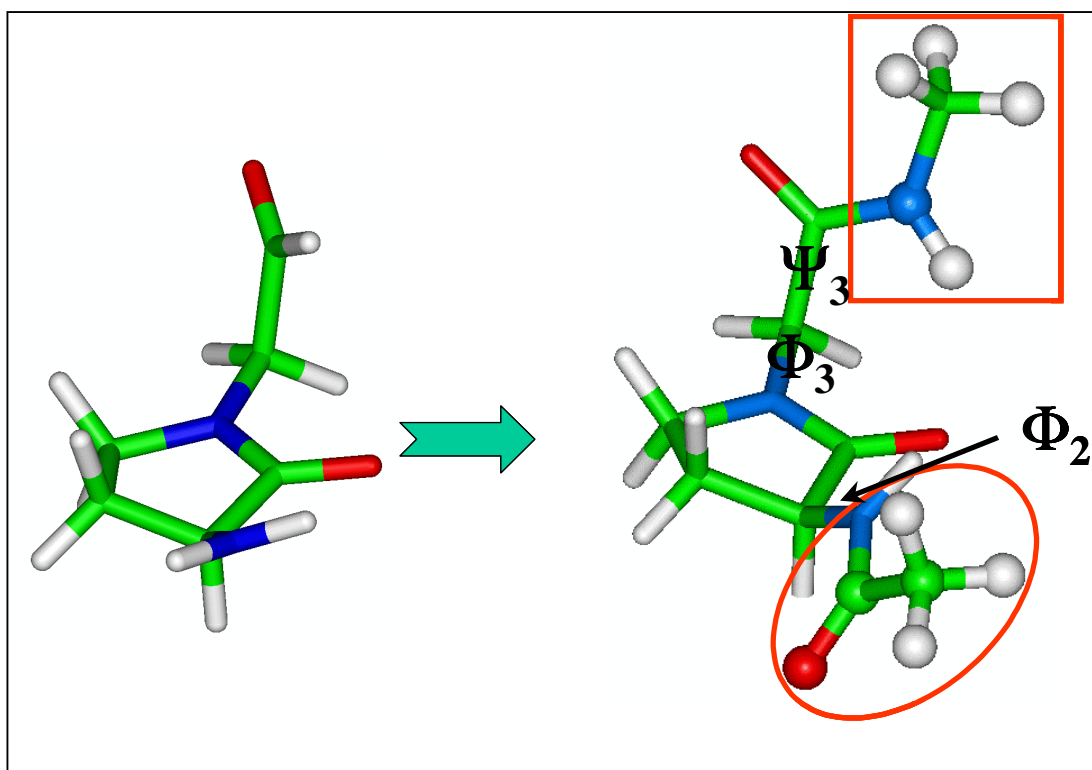


Figure 3 : modification des extrémités C et N terminales

Les angles dièdres ainsi générés sont appelés Phi2, Phi3 et Psi3 par homologie avec la nomenclature des angles dans la chaîne peptidique. L'angle Psi2 est constitutif du cycle à cinq chaînons et ne peut pas varier, il n'est donc pas pris en compte et les liaisons amidiques ont des angles de 180°.

II 2 : Etude de la variation des angles dièdres

L'étude consiste à faire varier les angles avec un pas de 30° afin de générer un grand nombre de conformères. Avec cet intervalle, on génère 13 positions par angles et donc 13³,

soit 2197 conformations. Les conformations générées ne sont que des fichiers de construction, chaque fichier est ensuite minimisé. Ainsi le fichier de construction mecoC5nhme_1.14 donne le fichier minimisé mecoC5nhme_1.2211 (2197+14).

Dans le tableau ci dessous, sont représentés le nombre de conformères et la valeur du pas utilisé en fonction du nombre d'angles. (**Tableau 1**).

Nombre d'angles	Pas de l'angle	Nombre de fichiers de construction	Nombre total de fichiers
2	10°	1369	2738
3	30°	2197	4394
4	45°	6561	13122

Tableau 1 : Nombre de fichiers en fonction du nombre et du pas de l'angle

Du fait de l'élaboration du fichier de construction par incrémentation de la valeur de l'angle, les énergies sont généralement très proches. Le fichier de minimisation généré conduit à très peu de structures qui correspondent à des puits de potentiel.

Pour comparer les différents monomères on s'appuie sur la variation de la distance **d** entre le C du carbonyle du groupement acétyle et le N du NHMe ; sur l'angle dièdre **Tau** entre les liaisons CH₃-CO et NH-Me et **E** la variation d'énergie (**Figure 4**). On obtient donc un graphe fonction de d, Tau et l'énergie que l'on écrête à 5 kcal/mol (**Graphique 1**).

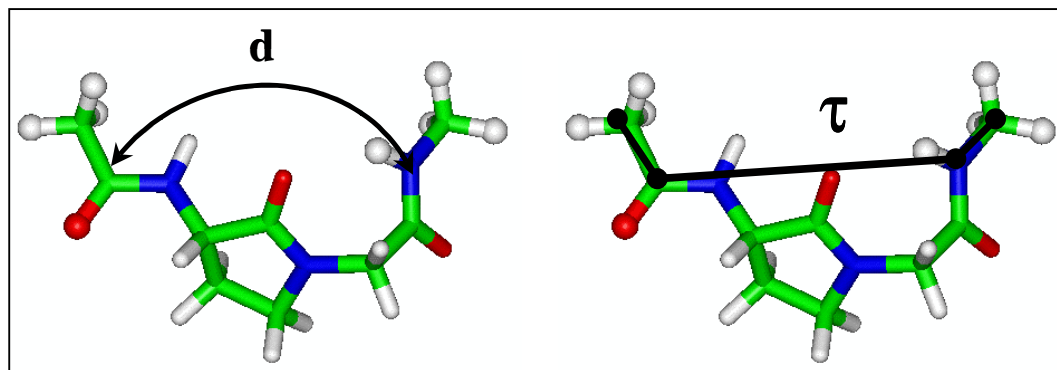
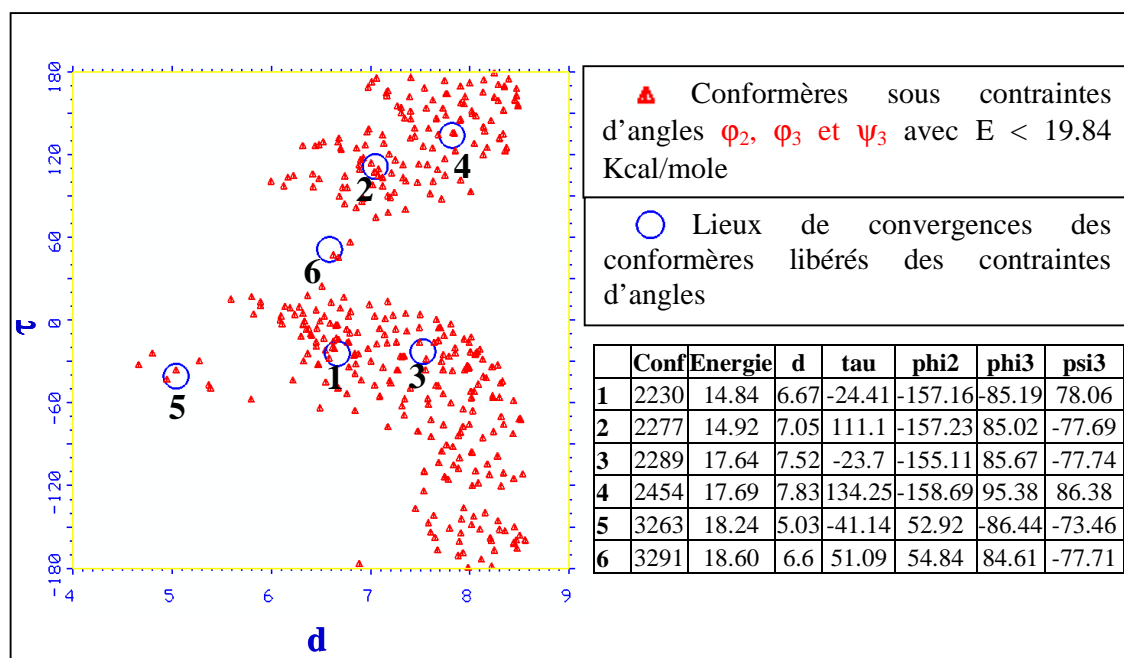


Figure 4 : Représentation de la distance d et de l'angle dièdre τ

Sur le graphique 1, les conformères sous contrainte d'angle sont représentés en triangles rouges. Lorsqu'on libère ces contraintes, on obtient des points de convergences représentés par des cercles bleus.

Graphique 1 : Graphe f(d, τ , E)

Nous avons classé les conformères libérés des contraintes d'angle par énergie croissante et ils nous servent de point de départ pour la troisième étape du protocole.

III : Construction et comparaison des oligomères

Les conformères les plus stables ont été sélectionnés pour être oligomérisés. Ainsi nous allons pouvoir comparer leur aptitude à adopter une structure régulière de type hélice.

III 1 : Constructions des décimères

Pour construire les décimères nous utilisons le motif unitaire MeCOC5NHMe le plus stable que nous assemblons pour obtenir, MeCO(C5)₁₀NHMe. On applique les contraintes d'angles Phi2, Phi3 et Psi3 obtenus à la deuxième étape (**Graphique 1**) sur l'ensemble de l'oligomère (**Figure 5**). Nous obtenons ainsi un fichier de construction appelé C5_10_X.1 (X représentant un des points de convergence de l'étude précédente).

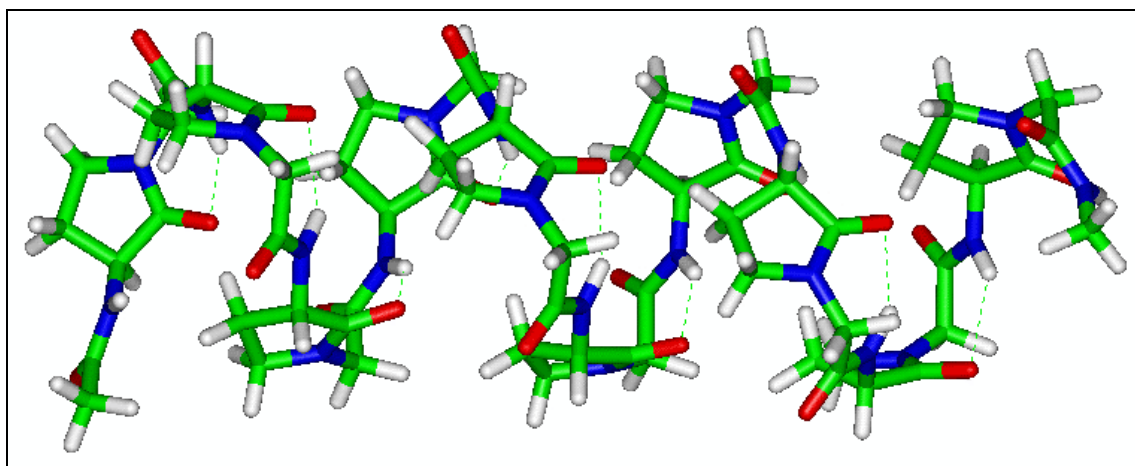


Figure 5 : hélice de construction de l'oligomère n°1 correspondant au monomère n°1

III 2 : Minimisation moléculaire

La deuxième partie de cette construction consiste à appliquer un algorithme de minimisation moléculaire sans contrainte sur le fichier précédent. Cela permet à la molécule de s'affranchir des valeurs d'angles imposées. Il en résulte une nouvelle conformation du type C5_10_X.2 dont l'énergie et la structure nous servent de critères pour comparer les différents polymères entre eux. (Figure 6)

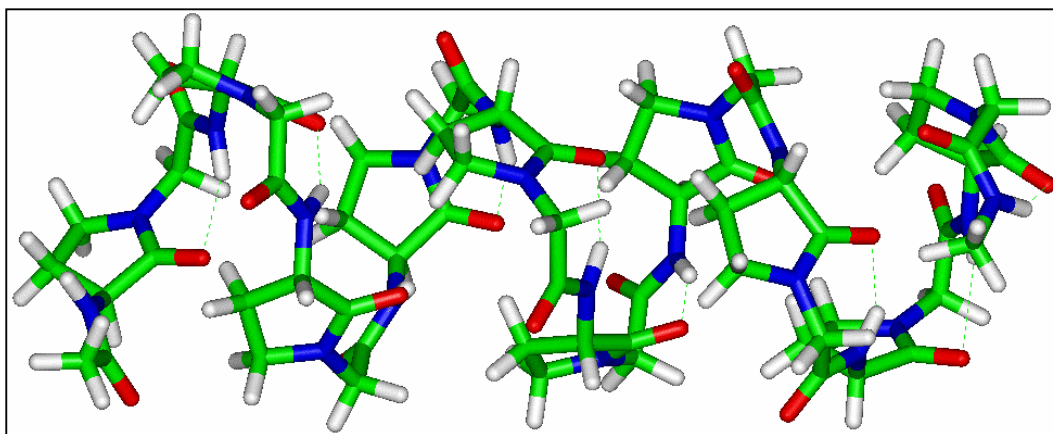


Figure 6 : Minimisation sans contrainte de l'oligomère N°1 162,3 Kcal/mole

III 3 : Dynamique moléculaire par chauffage à 300 K

Nous réalisons une dynamique moléculaire à 300 K afin de déterminer la stabilité des structures générées lors de la minimisation sans contrainte. Le fichier ainsi généré est du type C5_10_X.3. Nous pouvons donc déterminer si une structure en hélice est possible, peu probable ou improbable. Si la différence entre les structures des parties 2 et 3 est minime, on peut présumer que la structure pourra exister. Si cela n'est pas le cas, on éliminera ce choix de molécule. Pour le polyC5, l'allure de la molécule « chauffée » est comparable à celle de la molécule minimisée (Figure 7).

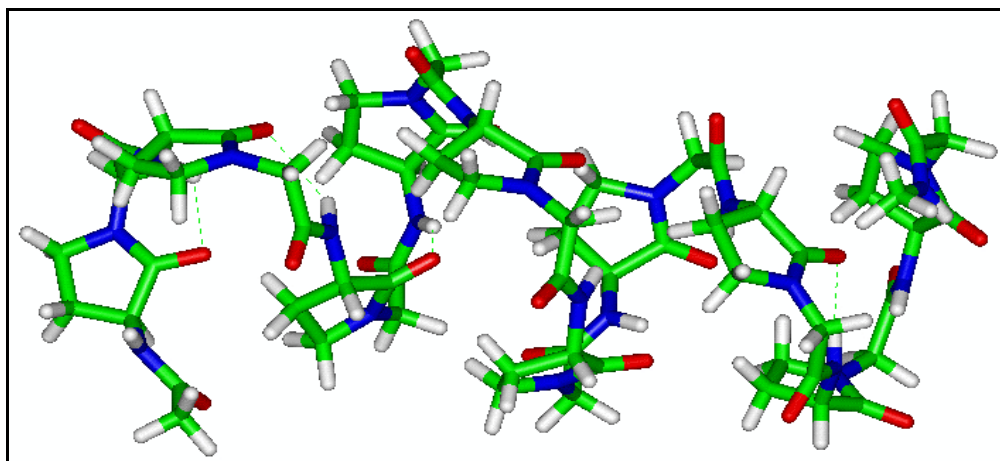


Figure 7 : Oligomère n°1, chauffé à 300 K

Dans le tableau ci-dessous sont représentés tous les conformères structurés obtenus dans la deuxième partie de la troisième étape dont la structure a été confirmée ou non par chauffage.

N°	E _{motif} Kcal/mole	d _{motif} Å	τ _{motif}	E _{oligo} Kcal/mole	d _{oligo} Å	τ _{oligo}	ε
1	14.84	6.67	-24.41°	162.27	6,22(0.22)	-13.51(7.24)	0.70
2	14.92	7.05	111.10	201.04	6,95(0.03)	109.21(1.11)	1.21
3	17.64	7.52	-23.73°	225.16	7,47(0.03)	-25,41(0.64)	1.88
4	17.69	7.83	134.27°	228.77	cassé		
5	18.24	5.03	-41.14°	-41.14	cassé		
6	18.60	6.60	51.08°	236.73	5,06(0.29)	-36,36(24.47)	0.90

Tableau 2 : Comparaison des différents conformères d'oligomères de C5

Le conformère le plus stable est le n°1 (162,27 kcal/mol). Ce conformère régulier est lui-même issu du monomère le plus stable (14,81 kcal/mol). L'hélice obtenue possède un pas

à droite avec un pas de 2,23 Å et le diamètre du squelette est de 5.62 Å. L'épsilon (ϵ) représente le rapport entre la longueur de l'hélice obtenue et celle de la décaalanine (13,79 Å). Nous avons représenté dans le tableau ci-après, les caractéristiques conformationnelles de l'hélice n°1, on peut ainsi remarquer l'homogénéité des valeurs d'angles et de distance de chacun des résidus qui composent l'hélice.

c5s10_1	d	tau	phi2	phi3	psi3
Motif unitaire	6.67	-24.41	-157.16	-85.19	78.06
Oligomère					
	6.59	2.86	-104.21	-76.10	68.44
	7.10	-14.00	-166.58	-75.68	68.60
	7.08	-18.01	-167.56	-80.12	66.03
	7.12	-15.56	-168.29	-77.31	67.02
	7.10	-11.47	-169.92	-78.98	65.92
	7.11	-14.17	-169.53	-76.27	67.06
	7.08	-12.81	-170.38	-80.25	64.62
	7.16	-11.04	-170.01	-73.32	72.10
	6.93	-19.41	-167.54	-85.98	62.61
	7.48	-25.11	-173.84	-87.28	82.33
Moyenne	7.08	-13.87	-162.79	-79.13	68.47
Ecart-type	0.22	7.24	20.68	4.50	5.49
Distance N2---C9	17.10				

Tableau 3 : Caractéristiques de l'hélice C5

IV : Incorporation dans la séquence du hCRF et dynamique

Nous avons décidé de remplacer l'hélice α du hCRF par un enchaînement de mimes contraints de dipeptides. Il nous a donc fallu déterminer le nombre d'acides aminés que nous voulions remplacer, tout en conservant une orientation des extrémités C et N terminales du CRF. Pour cela nous avons dû faire un ajustement sur la longueur de l'hélice, dans le but de conserver l'orientation observée dans le CRF.

IV 1 : Incorporation de l'hélice dans la séquence

Avant de remplacer les acides aminés de la séquence du hCRF, nous avons modélisé le peptide naturel afin de déterminer les orientations préférentielles des extrémités C et N-terminales (**Figure 8**). Dans un premier temps, les acides aminés de 6 à 34 ont été remplacés (longueur de 44,21 Å). Les résidus 35 et 36 sont l'arginine et la lysine et jouent un rôle important pour la liaison au récepteur, c'est la raison pour laquelle nous avons décidé de les conserver.

SEEPPIISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMEII-NH₂

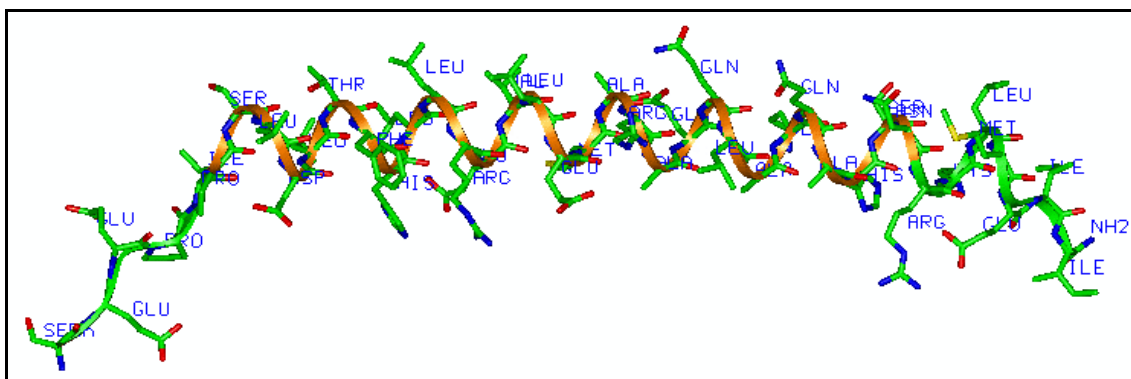


Figure 8 : Minimisation du hCRF

Pour déterminer le nombre de monomères à incorporer, nous avons mesuré les longueurs de toutes les hélices des molécules sélectionnées qui sont compilées dans le chapitre 3. Pour le motif C5 nous avons calculé qu'il fallait 21 monomères pour substituer les 29 acides aminés.

Nous avons construit une nouvelle hélice de 21 résidus à partir du décimère n°1 que nous avons ensuite minimisé par le même algorithme de construction des polymères. Nous avons ensuite ajouté les extrémités N-terminale (H-Ser-Glu-Glu-Pro-Pro-) et C-terminale (-Arg-Lys-Leu-Glu-Ile-Ile-NH₂) que nous avons orientées comme pour le hCRF. Un algorithme de minimisation a été appliqué à cet analogue.

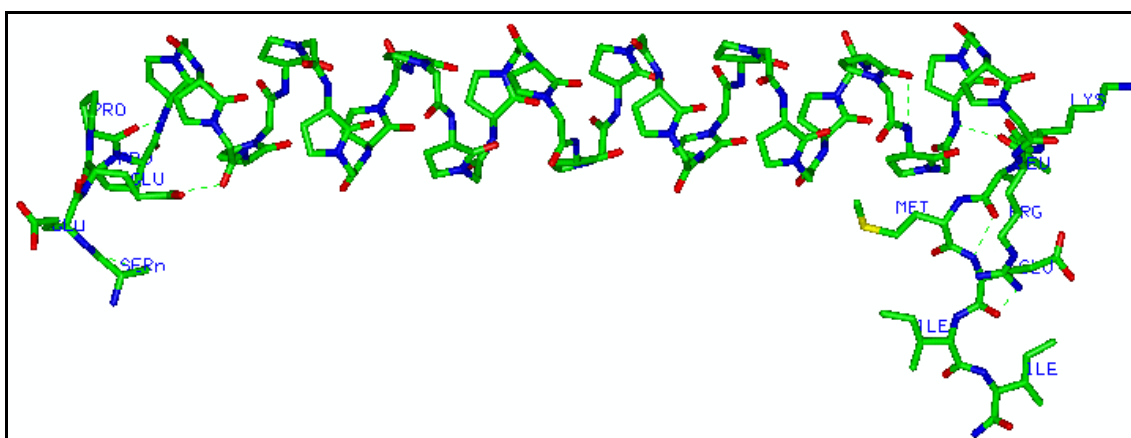


Figure 9 : Hybride du hCRF, SEEPP-(C5)₂₁-RKLMEII-NH₂ minimisé sans contraintes

A cette étape, on peut superposer manuellement le CRF et l'analogue afin de comparer la longueur de l'hélice et l'orientation des extrémités. Nous nous sommes aperçus que l'hybride comprenant 20 résidus avait une meilleure cohérence de structure et se superposait plus efficacement au hCRF. Pour pouvoir s'assurer de la stabilité de l'hybride et ensuite le comparer à la molécule naturelle nous avons appliqué un algorithme dynamique.

IV 2 : Dynamique moléculaire

Cet algorithme est un recuit simulé, qui consiste à chauffer la molécule à 300 K pendant 5 ps (picoseconde) avec un prélèvement toute les 0.1 ps. Il en résulte donc 51 fichiers qui sont ensuite superposés en utilisant comme critère de superposition le centre de masse de la molécule. Nous n'avons arbitrairement représenté qu'un fichier sur quatre afin de faciliter la visualisation.

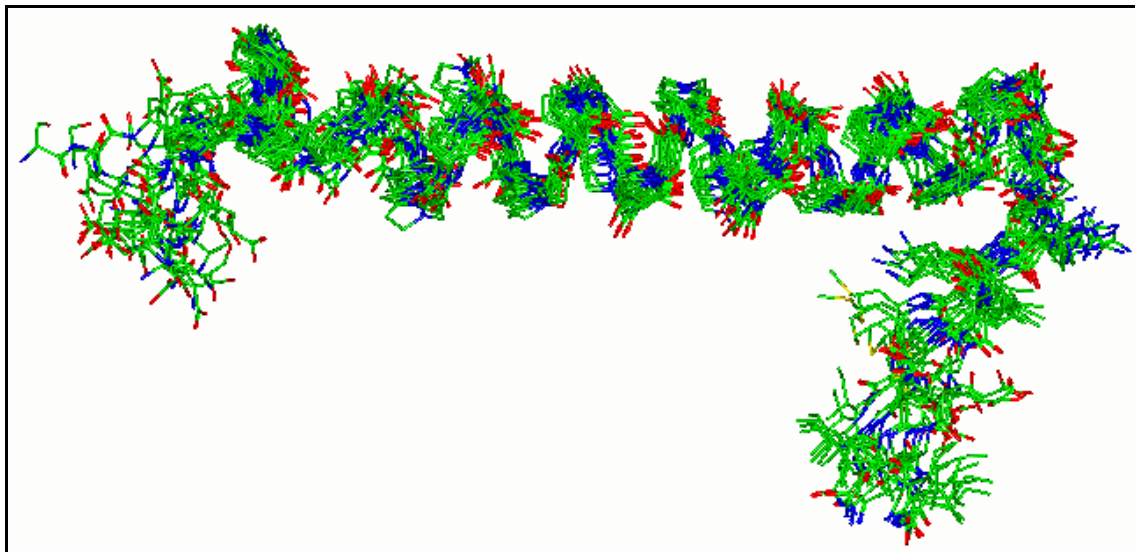


Figure 10 : Dynamique sur SEEPP-(C5)₂₀-RKLMEII-NH₂

L'orientation de la partie C-terminale ne varie pas beaucoup lors du chauffage. En effet si on compare les valeurs de RMS (root mean square derivation), on remarque qu'elles sont faibles, ce qui correspond à une bonne superposition des conformères et donc à une stabilité de la structure.

L'hélice artificielle n'est pas déformée par l'énergie apportée par le chauffage. Cela montre une stabilité de ce type de structure hélice pour l'enchaînement de poly C5.

Pour la partie N-terminale, l'orientation varie beaucoup plus que la partie C-terminale, mais reste dans une zone assez restreinte et ne balaye pas un très grand espace. Pour pouvoir comparer les orientations, les mêmes calculs sont appliqué au CRF.

IV 3 : Comparaison avec la molécule naturelle

On peut donc comparer le hCRF et l'analogue à partir des deux dynamiques moléculaires réalisées.

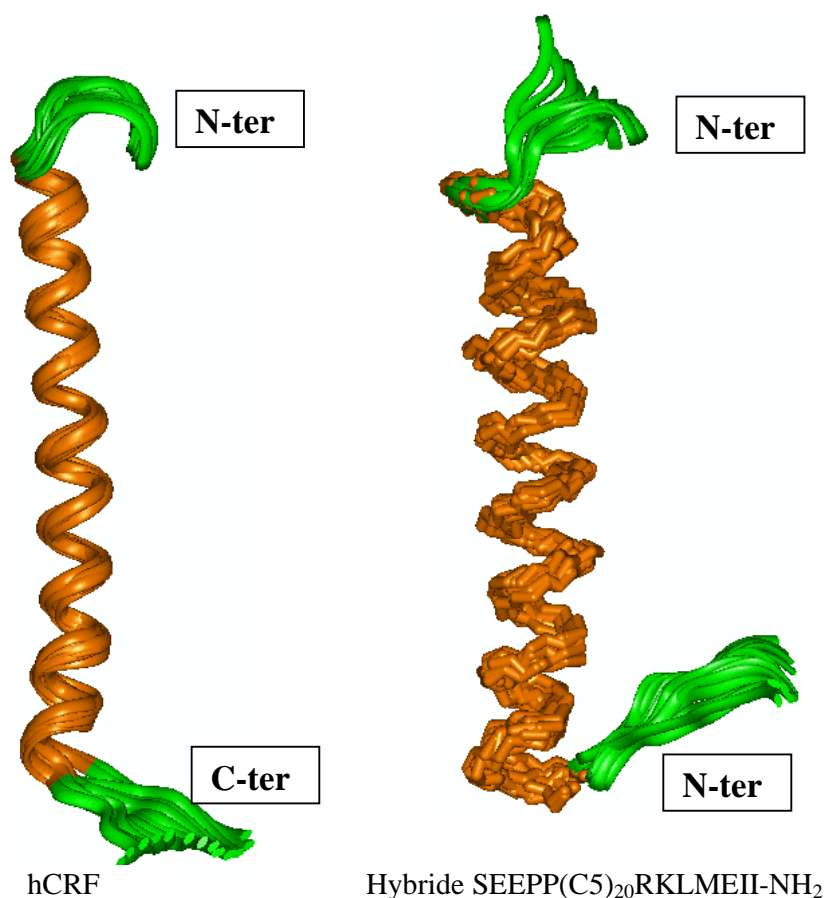


Figure 11 : représentation en ruban des dynamiques moléculaires du hCRF et de l'analogue SEEPP(C5)₂₀RKLMEII-NH₂

Il ressort de cette étude de dynamique moléculaire que l'homologie entre le CRF et l'analogue est grande. Le diamètre apparent de l'hélice artificielle est plus important que celui de l'hélice α , mais l'absence de chaînes latérales dans l'hélice de l'hybride compense l'augmentation de volume. L'extrémité C terminale a une orientation comparable à celle du CRF, quant à celle de la partie N terminale, elle semble un peu plus décalée.

Aux vues de ces résultats, on peut donc envisager la mise en place de la synthèse chimique de la molécule hybride SEEPP(C5)₂₀RKLMEII-NH₂.

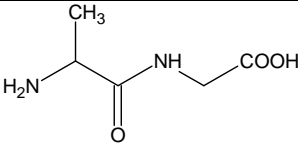
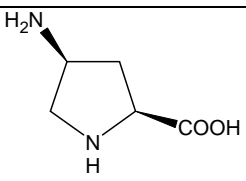
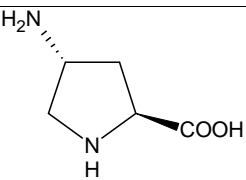
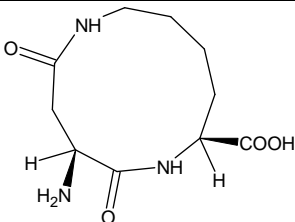
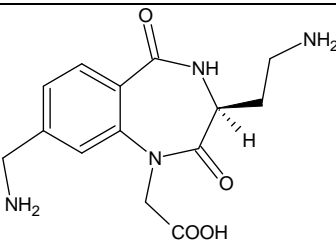
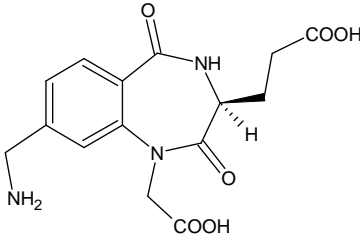
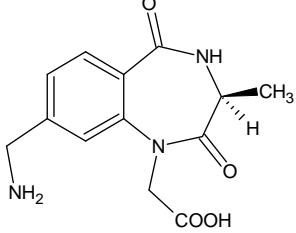
Ce protocole est appliqué à toutes les molécules que nous avons sélectionnées pour la synthèse d'hydrides non peptidique du CRF qui seront présentés dans les prochains chapitres.

Chapitre 2 : Liste des molécules modélisées

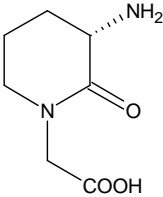
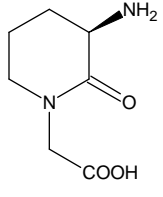
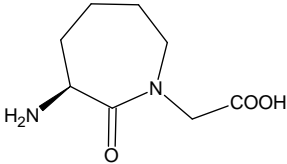
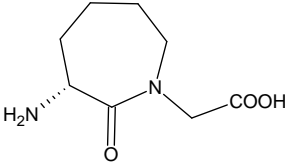
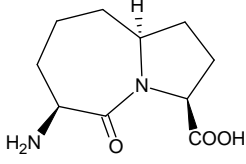
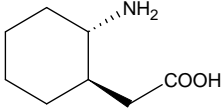
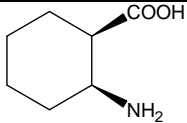
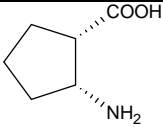
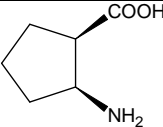
Les motifs contraints sélectionnés dans la littérature (mimes de dipeptides et de tripeptides) ont tous été soumis à une étude de modélisation moléculaire. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant **Tableau 4**.

Ce tableau compile les résultats avec dans la première colonne le nom du fichier et la nomenclature chimique ; dans la deuxième, la structure ; dans la troisième, les caractéristiques des décimères et dans la dernière, le choix de la sélection.

N°	Nom du fichier et nomenclature	Structure des motifs	Caractéristiques structurales	Sélection et détermination du nombre de motifs
1	A2buDglu (2 <i>R</i> ,9 <i>S</i>)-9-amino-5,10-dioxo-1,6-diazecane-2-carboxylic acid		Hélice irrégulière et compacte	Trop de motifs sont nécessaires
2	A2buglu (2 <i>S</i> ,9 <i>S</i>)-9-amino-5,10-dioxo-1,6-diazecane-2-carboxylic acid		Hélice très compacte	Trop de motifs sont nécessaires
3	ACDN [(3 <i>R</i> ,7 <i>S</i>)-7-amino-1,4-dioxooctahydropyrrolo[1,2- <i>a</i>]pyrazin-3-yl]acetic acid		Hélice tordue ne résiste pas à la dynamique	NON
4	ACHC (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-2-aminocyclohexanecarboxylic acid		On ne retombe pas sur une structure régulière comme Gellman	???
5	ACPC (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-2-aminocyclopentanecarboxylic acid		Hélice H1-12 pas à gauche	OUI

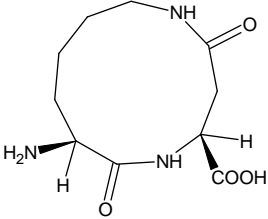
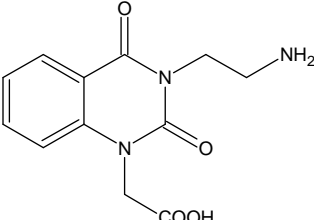
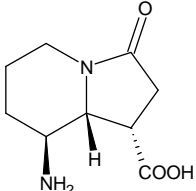
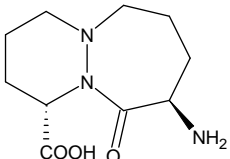
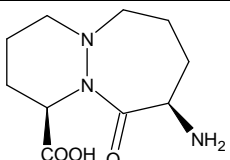
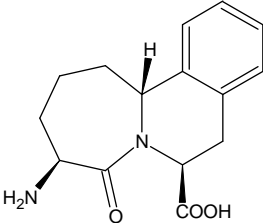
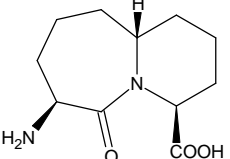
6	AlaGly (Alanylglycine) [(2aminopropanoyl)amino] acetic acid		Hélice	Oui ≈20 motifs
7	Aminoprocis (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-4-aminopyrro lidine-2-carboxylic acid		Couplage par l'anime primaire Hélice très étirée	NON
8	Aminoprotrans (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-aminopyrro lidine-2-carboxylic acid		Pas d'hélices structurées	NON
9	AspLys (4 <i>S</i> ,7 <i>S</i>)-4-amino-2,5-dioxo -1,6-diazacycloundecane-7- carboxylic acid		Hélice	OUI
10	Bena2bu [(3 <i>S</i>)-3-(2-aminoethyl)-8- (aminométhyl)-2,5-dioxo- 2,3,4,5-tetrahydro-1 <i>H</i> -1,4- benzodiazépin-1-yl]acetic acid		Couplage par NH ₂ sur l'aromatique Hélice H1-12, pas à droite, résiste assez bien à la dynamique	Oui ≈13 motifs
11	Benglu 3-[(3 <i>S</i>)-8-(aminométhyl)-1- (carboxyméthyl)-2,5-dioxo- -2,3,4,5-tetrahydro-1 <i>H</i> -1,4- benzodiazépin-3-yl] propanoic acid		Couplage par l'acide N-acétique Hélice H1-7, pas à gauche, ne résiste pas à la dynamique	NON
12	Benlact [(3 <i>S</i>)-8-(aminométhyl)-3- méthyl-2,5-dioxo-2,3,4,5- tetrahydro-1 <i>H</i> -1,4-benzo diazépin-1-yl]acetic acid		Hélice H1-12, pas à droite, résiste à la dynamique	Oui ≈13 motifs

13	Benphe [(3 <i>S</i>)-8-(aminométhyl)-3-benzyl-2,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1 <i>H</i> -1,4-benzodiazépin-1-yl]acétique acid		Hélice irrégulière, pas à gauche, ne résiste pas à la dynamique	NON
14	Benzo 3-(aminométhyl)benzoic acid		Hélice très compacte, pas à droite.	NON
15	BETHA [(4 <i>S</i>)-4-amino-2-oxo piperidin-1-yl]acétique acid		Hélice trop lâche	NON
16	C5 (R) [(3 <i>R</i>)-3-amino-2-oxo pyrrolidin-1-yl]acétique acid		Pas d'hélice	NON
17	C5 (S) [(3 <i>S</i>)-3-amino-2-oxo pyrrolidin-1-yl]acétique acid		Hélice	Oui ≈20 motifs
18	C5Ala (2 <i>S</i>)-2-[(3 <i>S</i>)-3-amino-2-oxopyrrolidin-1-yl] propanoic acid		Hélice étirée	NON
19	C5AlaR (2 <i>R</i>)-2-[(3 <i>S</i>)-3-amino-2-oxopyrrolidin-1-yl] propanoic acid		Hélice trop lâche	NON
20	C5Asp (2 <i>S</i>)-2-[(3 <i>S</i>)-3-amino-2-oxopyrrolidin-1-yl]succinic acid		Couplage par l'acide en β de N Hélice pas à droite H 1-7 et H _{asp-asp} Ne résiste pas à la dynamique	NON
21	C5Lys (2 <i>S</i>)-3-amino-2-[(3 <i>S</i>)-3-amino-2-oxopyrrolidin-1-yl] propanoic acid		Couplage par l'acide en β de N Hélice tordue, pas à droite, ne résiste pas à la dynamique	NON

22	C6 [(4 <i>S</i>)-4-amino-2-oxopiperidin-1-yl]acetic acid		Hélice assez compacte et régulière	Trop de motifs sont nécessaires
23	C6R [(4 <i>R</i>)-4-amino-2-oxopiperidin-1-yl]acetic acid		Hélice assez compacte et régulière	Trop de motifs sont nécessaires
24	C7 [(3 <i>S</i>)-3-amino-2-oxoazepan-1-yl]acetic acid		Hélice compacte	Oui ≈30 motifs
25	C7R [(3 <i>R</i>)-3-amino-2-oxoazepan-1-yl]acetic acid		Hélice compacte	OUI
26	CargPro (3 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,9 <i>aS</i>)-6-amino-5-oxooctahydro-1 <i>H</i> -pyrrolo[1,2- <i>a</i>]azepine-3-carboxylic acid		Hélice aplatie ne résiste pas à la dynamique	NON
27	CHACSR [(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-2-aminocyclohexyl]acetic acid		Hélice compacte, pas à droite, ne résiste pas à la dynamique	NON
28	CHEX (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-2-aminocyclohexanecarboxylic acid		Pas d'hélice régulière	NON
29	CPENT (RS) (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-2-aminocyclopentanecarboxylic acid		Hélice H1-14 pas à gauche	OUI
30	CPENT (SR) (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-2-aminocyclopentanecarboxylic acid		Pas d'hélice	NON

31	Cys (3 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>aS</i>)-6-amino-5-oxohexahydro-5 <i>H</i> -[1,3]thiazolo[3,2- <i>a</i>]pyridine-3-carboxylic acid		Hélice H 1-7 pas à droite, ne résiste pas à la dynamique	NON
32	Da2buDglu (2 <i>R</i> ,9 <i>R</i>)-9-amino-5,10-dioxo-1,6-diazecane-2-carboxylic acid		Hélice irrégulière et compacte	Trop de motifs sont nécessaires
33	Da2buglu (2 <i>S</i> ,9 <i>R</i>)-9-amino-5,10-dioxo-1,6-diazecane-2-carboxylic acid		Hélice très compacte	Trop de motifs sont nécessaires
34	DBC [(3 <i>R</i>)-3-amino-2-oxo-2,3,4,5-tetrahydro-1 <i>H</i> -1-benzazepin-1-yl]acetic acid		Hélice pas à gauche, H 1-7.	OUI ≈17 motifs
35	DBT [(3 <i>S</i>)-3-amino-2-oxo-2,3,4,5-tetrahydro-1 <i>H</i> -1-benzazepin-1-yl]acetic acid		Hélice	Oui ≈8 motifs
36	DBTCF ₃ [(3 <i>S</i>)-3-amino-4-oxo-7-(trifluoromethyl)-3,4-dihydro-1,5-benzothiazepin-5(2 <i>H</i>)-yl]acetic acid		Hélice	Oui ≈15 motifs
37	DBTCH ₃ (2 <i>S</i>)-2-[(3 <i>S</i>)-3-amino-4-oxo-3,4-dihydro-1,5-benzothiazepin-5(2 <i>H</i>)-yl]propanoic acid		Hélice H1-7	NON
38	DBTMet [(3 <i>S</i>)-3-amino-8-methyl-4-oxo-3,4-dihydro-1,5-benzothiazepin-5(2 <i>H</i>)-yl]acetic acid		Hélice	Oui ≈8 motifs

39	Gamaac [(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-2-aminocyclohexyl]acetic acid		Hélice avec un pas à gauche, ne résiste pas à la dynamique	NON
40	Gamaactr [(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-2-aminocyclohexyl]acetic acid		Hélice avec un pas à gauche, ne résiste pas à la dynamique	NON
41	Gamahex (1 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-3-aminocyclohexanecarboxylic acid		Hélice tordue	NON
42	HEX41 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-2-aminocyclopentanecarboxylic acid		Pas d'hélice	NON
43	Lact29R [(4 <i>R</i>)-4-amino-2-oxopyrrolidin-1-yl]acetic acid		Hélice très étirée	NON
44	Lact29S [(4 <i>S</i>)-4-amino-2-oxopyrrolidin-1-yl]acetic acid		Hélice très étirée	NON
45	LBT [(3 <i>R</i>)-3-amino-4-oxo-3,4-dihydro-1,5-benzothiazepin-5(2 <i>H</i>)-yl]acetic acid		Hélice	Oui ≈8 motifs
46	LBTCF ₃ [(3 <i>R</i>)-3-amino-4-oxo-7-(trifluoromethyl)-3,4-dihydro-1,5-benzothiazepin-5(2 <i>H</i>)-yl]acetic acid		Hélice assez compacte de type triangle	Oui ≈15 motifs
47	LBTMet [(3 <i>R</i>)-3-amino-8-methyl-4-oxo-3,4-dihydro-1,5-benzothiazepin-5(2 <i>H</i>)-yl]acetic acid		Hélice	Oui ≈8 motifs

48	LysAsp (2 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-10-amino-4,11-dioxo-1,5-diazacyclo undecane-2-carboxylic acid		Hélice	OUI mais trop de motifs sont nécessaires
49	M100 [3-(2-aminoethyl)-2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(2 <i>H</i>)-yl]acetic acid		Pas d'hélice	NON
50	M103 (1 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,8 <i>aR</i>)-8-amino-3-oxooctahydroindolizine-1-carboxylic acid		Hélice assez compacte	Trop de motifs sont nécessaires
51	M120RS (1 <i>S</i> ,9 <i>R</i>)-9-amino-10-oxooctahydro-6 <i>H</i> -pyridazino [1,2- <i>a</i>][1,2]diazepine-1-carboxylic acid		Pas d'hélice	NON
52	M120SS (1 <i>S</i> ,9 <i>S</i>)-9-amino-10-oxooctahydro-6 <i>H</i> -pyridazino [1,2- <i>a</i>][1,2]diazepine-1-carboxylic acid		Hélice compacte, pas à gauche, H 1-7, ne résiste pas à la dynamique	NON
53	M121 (4 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,12 <i>bR</i>)-4-amino-5-oxo-1,2,3,4,5,7,8,12b-octahydroazepino[2,1- <i>a</i>]isoquinoline-7-carboxylic acid		Pas d'hélice	NON
54	M121mod (4 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,10 <i>aR</i>)-7-amino-6-oxodecahydropyrido[1,2- <i>a</i>]azepine-4-carboxylic acid		feuille linéaire	NON

55	M35OH [(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-3-amino-4-hydroxy-2-oxopyrrolidin-1-yl] acetic acid		Pas d'hélice	NON
56	M36 (2 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-5-amino-6-oxo piperidine-2-carboxylic acid		Hélice très étirée	NON
57	M38 (3 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>aS</i>)-6-amino-5-oxooctahydroindolizine-3-carboxylic acid		Hélice très étirée	NON
58	M39 (1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-amino-3-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-1-carboxylic acid		Pas d'hélice	NON
59	M41 (1 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,8 <i>aS</i>)-8-amino-3-oxooctahydroindolizine-1-carboxylic acid		Pas d'hélice	NON
60	M41CR (1 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,8 <i>aR</i>)-8-amino-3-oxooctahydroindolizine-1-carboxylic acid		Pas d'hélice	NON
61	M42 8-amino-3-oxooctahydroindolizine-2-carboxylic acid		Hélice compacte carrée	Trop de motifs sont nécessaires
62	M55 (2 <i>R</i>)-2-[(3 <i>S</i>)-3-amino-2-oxopyrrolidin-1-yl]-3-phenylpropanoic acid		Hélice tordue	NON

63	M59 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-6-(aminométhyl)-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-carboxylique acid		Hélice très étirée	NON
64	ORTHO [2-(aminométhyl)phényl]acetic acid		Hélice	Oui ≈12 motifs
65	OXETANE (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-3-amino-4-[(1 <i>S</i>)-1-hydroxyéthyl]oxétane-2-carboxylique acid		Hélice H1-10	OUI
66	PDB [(2 <i>S</i> ,11 <i>aS</i>)-2-amino-5,11-dioxo-2,3,11,11 <i>a</i> -tétrahydro-1 <i>H</i> -pyrrolo[2,1- <i>c</i>][1,4]benzodiazépin-10(5 <i>H</i>)-yl]acetic acid		Hélice irrégulière	NON
67	Phényl (3-aminophényl)acetic acid		Hélice très étirée	NON
68	Pip piperidin-4-ylacetic acid		Hélice très étirée ne résiste pas à la dynamique	NON
69	Proene (1 <i>R</i> ,2 <i>Z</i>)-2-[(2 <i>S</i>)-2-amino-propylidène]cyclopentane-carboxylique acid		Hélice pas à droite H 1-16 avec la même orientation	Oui ≈18 motifs
70	ProGly (Prolylglycine) [(pyrrolidin-2-ylcarbonyl)amino]acetic acid		Hélice	Oui ≈18 motifs
71	Prophen (1 <i>R</i> ,2 <i>Z</i>)-2-[(2 <i>S</i>)-2-amino-3-phénylpropylidène]cyclopentane-carboxylique acid		Hélice tordue ne résiste pas à la dynamique	NON

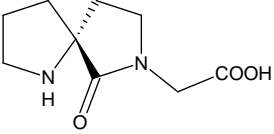
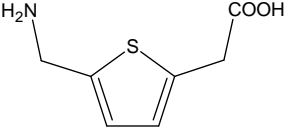
72	Spiro [(5 <i>R</i>)-6-oxo-1,7-diaza spiro[4.4]non-7-yl] acetic acid		Hélice irrégulière	NON
73	Thio [5-(aminométhyl)thien-2- yl]acetic acid		Hélice étirée pas à gauche. H 1-16	Oui ≈22 motifs

Tableau 4 : Compilation des résultats de modélisation

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux molécules (28) dont l'enchaînement est susceptible de conduire à des structures secondaires organisées. Ces candidats (5, 6, 9, 10, 12, 17, 22, 23, 24, 25, 29, 32, 33, 34, 35, 36, 38, 45, 46, 47, 48, 50, 61, 64, 65, 69, 70, 73) ont été étudiés plus en détail. Nous avons voulu connaître l'homogénéité des angles et des distances qui les caractérisent.

Chapitre 3 : Les molécules candidates

Dans ce chapitre, les caractéristiques conformationnelles des molécules qui ont été synthétisées sont présentées en détail. Nous exposerons les différentes étapes du protocole pour chaque monomère. Parmi les molécules modélisées, certaines ont retenues notre attention. Le premier critère de sélection était la capacité de ces oligomères à se structurer en hélice stable. Le second critère est l'utilisation du nombre de monomère le plus bas pour construire les hélices artificielles. D'autres critères de choix ont dicté notre sélection. Il fallait que la synthèse des monomères soit rapide (un maximum de 8 étapes), qu'elle ne comporte pas d'étape limitante en fin de synthèse, qu'elle soit énantiospécifique et que les synthons de départ soient peu onéreux.

Le respect de ces critères nous a permis de sélectionner 12 molécules parmi lesquelles huit mimes contraints de dipeptides (DBT (35), LBT (45), DBTMet (38), DBTCF₃ (36), C5 (17), C7 (24), DBC (34) et Ortho (64)), deux dipeptides (AlaGly (6), ProGly (70)) et deux dipeptides cycliques (AspLys (9), LysAsp (48)). Les synthèses de trois de ces molécules se sont avérées trop contraignantes ; DBC nécessitait une étape de déracémisation à la dernière étape ; la cyclisation finale de AspLys et de LysAsp conduisait à l'obtention largement préférentielle de molécules dimériques, de plus elles possédaient une très faible solubilité dans les solvants utilisés pour réaliser la cyclisation. Ces raisons nous ont poussé à abandonner la synthèse des ces trois molécules.

La synthèse des analogues du hCRF incorporant les motifs DBT, LBT, MeDBT et DBTCF₃ fait parti de la thèse de Delphine MAUX. Nous n'aborderons donc pas leurs études.

Les motifs que nous avons étudié en détail sont donc : C5 (17), C7 (24) et Ortho (64). Les dipeptides AlaGly (6), ProGly (70) ont été incorporés dans la séquence du hCRF, mais l'étude détaillé de ces molécules n'a pas été réalisée.

I : Le monomère C5

Le monomère C5 nous a servi de modèle pour le protocole, il est donc présenté dans le chapitre 1.

II : Le monomère C7

II 1 : Minimisation

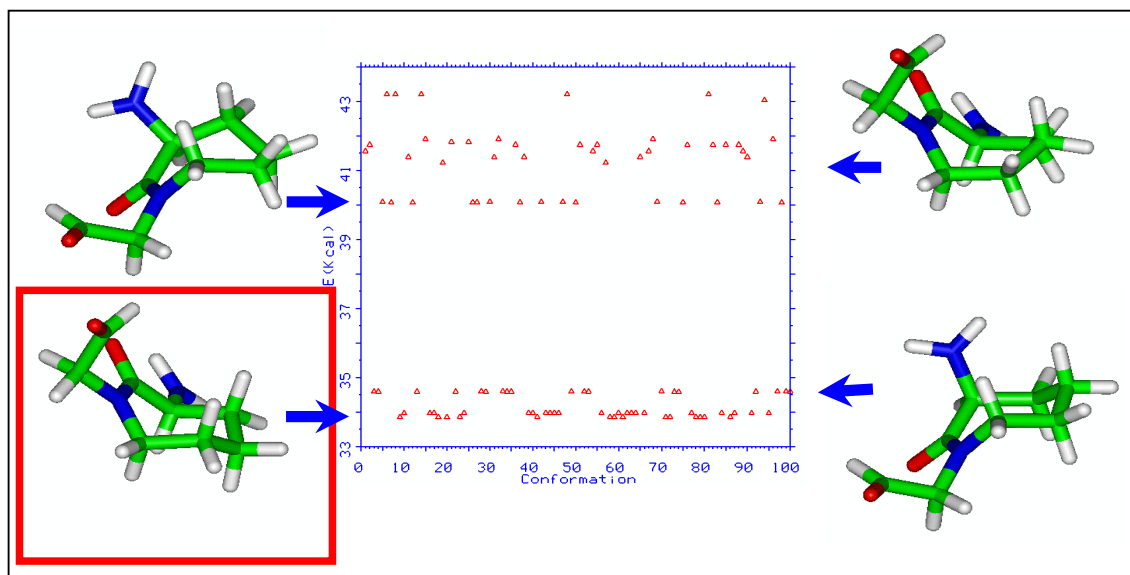


Figure 12 : Famille conformationnelle du motif C7

Nous avons sélectionné le motif le plus stable (frame 60, E : 33,8741 kcal/mol) pour la suite de l'étude.

II 2 : Variation des angles dièdres

Pour l'étude de variations des angles dièdres, nous avons modifié les extrémités C et N-terminales comme pour le motif C5 et avons fait varier les angles avec un pas de 30°. Le diagramme obtenu est le suivant.

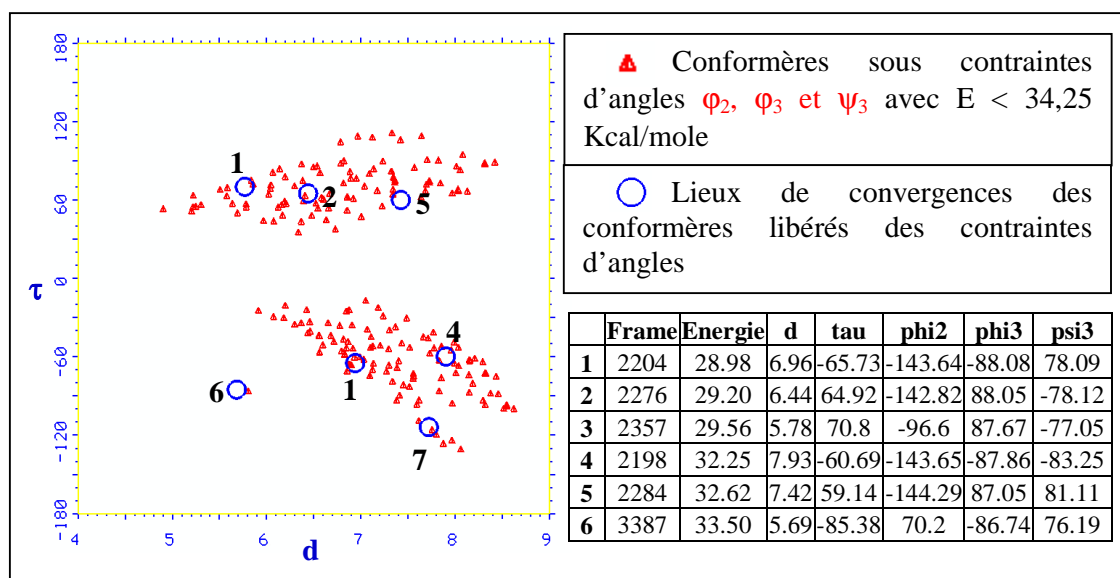


Figure 13 : Graphe f (d, τ , E) et tableau d'identification des points de convergences.

II 3 : Construction et comparaison des oligomères

Parmi les sept conformères obtenus, seulement six étaient compris dans la fourchette de 5 kcal/mol. Ils ont donc servi de points de départ pour générer les décimères.

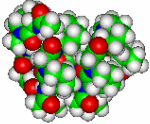
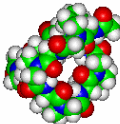
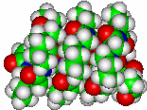
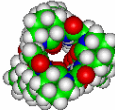
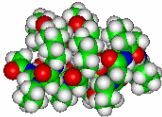
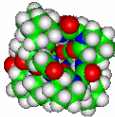
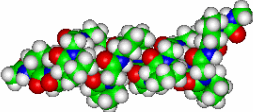
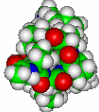


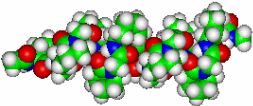
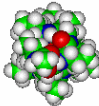
N°	E _{motif} Kcal/mole	d _{motif} Å	τ _{motif}	E _{oligo} Kcal/mole	d _{oligo} Å	τ _{oligo}	ε
1	28,99	6,96	-65,73°	305,27	6,95(0.30)	-66.47(20.27)	0.50
							
2	29,21	6,44	64,92	285,83	6,79(0.11)	46,81(6.62)	0.50
							
3	29,56	5,78	70,80°	300,90	6,71(0.73)	49,08(16.65)	0,52
							
4	32,26	7,93	-60,69°	363,59	6,80(0.64)	-4,19(3509)	0.81
							
5	32,63	7,42	59,14°	389,12	7,36(0.05)	56,14(2.10)	2.07
							
6	33,50	5,69	-85,38°	367,04	5,06(0.29)	-36,36(24.47)	0.90
							

Tableau 5 : Comparaison des différents conformères d'oligomères de C7

Le conformère le plus stable est le n°2 (285,83 kcal/mol) alors que le monomère dont il découle n'est que le deuxième en énergie ; mais la différence d'énergie est faible, elle n'est

que de 0,22 kcal/mol. L'hélice obtenue possède un pas à gauche avec un pitch de 4,75 Å et le diamètre du squelette est de 6,38 Å. Nous avons représenté dans le tableau ci-dessous les caractéristiques conformationnelles de l'hélice n°2. Les résultats montrent l'homogénéité des valeurs d'angles et de distances de chacun des résidus qui composent l'hélice.

c7s10_2	d	tau	phi2	phi3	psi3
Motif unitaire	6.44	64.92	-142.82	88.05	-78.12
Oligomère					
	6.94	63.17	-140.69	82.73	-115.17
	6.75	46.78	-151.77	78.65	-104.57
	6.99	42.15	-153.06	76.86	-114.24
	6.74	47.20	-144.65	75.14	-106.60
	6.74	45.85	-154.23	73.83	-100.89
	6.84	42.19	-155.44	72.06	-105.77
	6.72	45.36	-151.30	73.91	-100.63
	6.68	42.14	-155.80	71.97	-94.85
	6.80	41.22	-155.97	71.53	-97.15
	6.67	52.04	-157.07	82.95	-80.49
Moyenne	6.79	46.81	-152.00	75.96	-102.04
Ecart-type	0.11	6.62	5.34	4.25	10.03
Distance N---C	13.21				

Tableau 6 : Caractéristiques de l'hélice C7

Nous avons calculé qu'il faudrait 30 résidus C7 (dont la représentation est donnée ci-dessous) pour remplacer l'hélice α du hCRF.

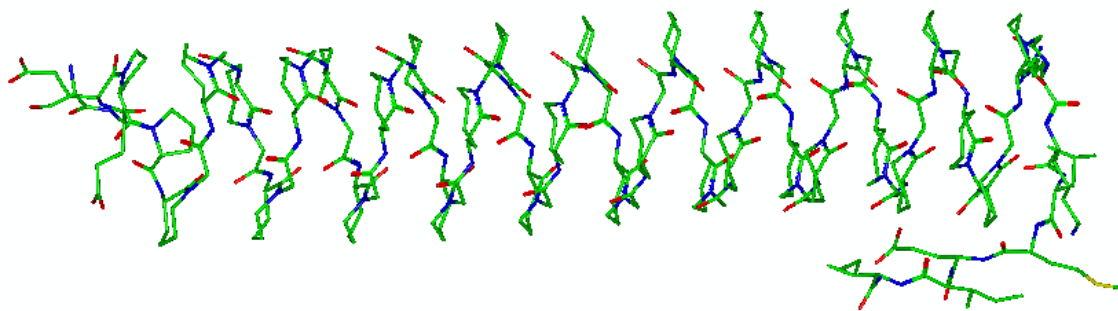


Figure 14 : Représentation de l'hybride SEEPP-(C7)₃₀-RKLMEII-NH₂.

Le grand nombre de motifs C7 à incorporer, nous a amené à exclure la mise en place de la synthèse de l'hybride SEEPP-(C7)₃₀-RKLMEII-NH₂.

III : Le monomère Ortho

III 1 : Minimisation

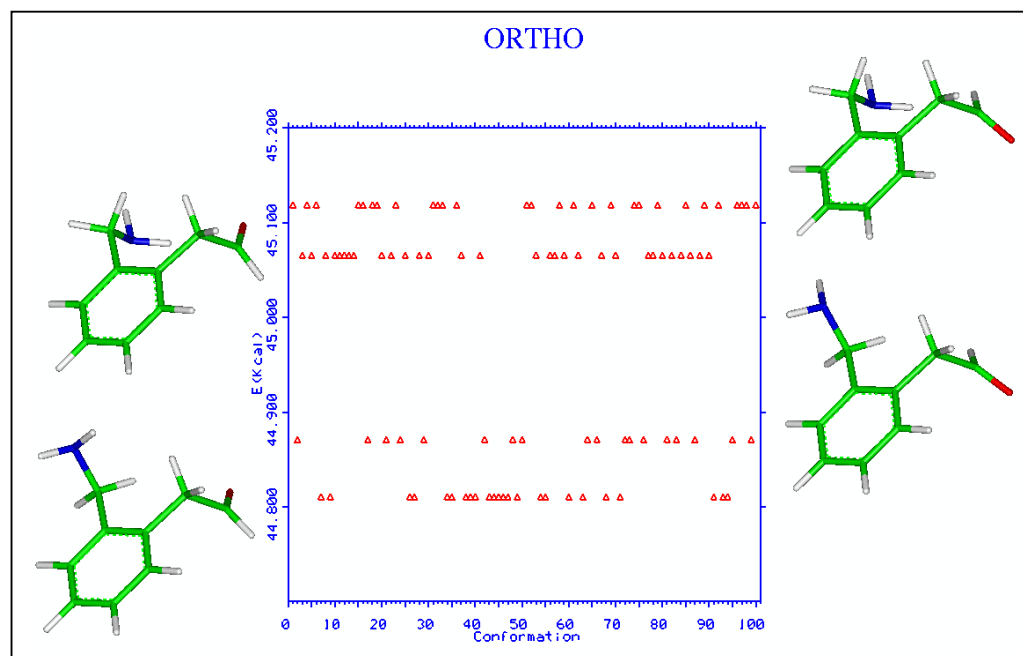


Figure 15 : Famille conformationnelle du motif Ortho

La rigidité du cycle aromatique conduit la molécule à adopter seulement 4 conformations. Nous avons sélectionné le motif le plus stable (Frame 7, E : 44,8105 kcal/mol) pour la suite de l'étude.

III 2 : Variation des angles dièdres

Nous avons modifié les extrémités C et N-terminales comme pour le motif C5 et avons fait varier les quatre angles avec un pas de 45°. Le diagramme obtenu est le suivant.

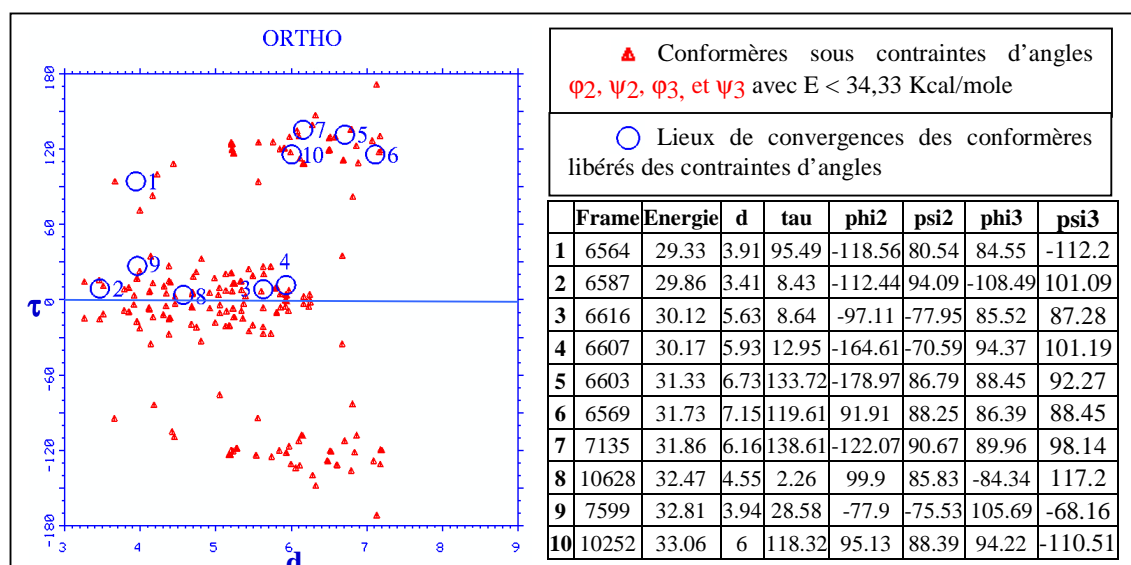


Figure 16 : Graphe f (d, τ , E) et tableau d'identification des points de convergences.

L'absence de centre d'asymétrie dans la molécule a pour conséquence, la présence d'une symétrie des conformères générés par la variation des angles dièdres. Dans le graphe, nous n'avons arbitrairement représentés que ceux dont la valeur de Tau est positive et nous n'exploiterons que ces conformères. Nous pensons que l'environnement du résidu induira l'orientation de la conformation (Droite ou Gauche).

III 3 : Construction et comparaison des oligomères

Parmi les conformères obtenus, peu ont donné des structures résistant à la dynamique moléculaire. Nous allons seulement présenter le conformère Ortho10_1 qui se structure pour donner l'hélice la plus stable. Il s'agit d'une hélice droite avec un pas de 3,36 Å et le diamètre du squelette est de 3,55 Å. Elle possède 3.8 résidus par tour stabilisé par des liaisons hydrogènes de type H1-10 entre le carbonyle i et le proton amidique i+2, c'est donc une hélice de type 3.8₁₀. Nous avons représenté dans le tableau ci-dessous les caractéristiques conformationnelles de l'hélice n°1.

ortho10_1	d	tau	phi2	psi2	phi3	psi3
Motif unitaire	3.91	95.49	-118.56	80.54	84.55	-112.20
Oligomère						
	3.84	108.60	-119.66	77.95	82.84	-109.25
	3.77	119.79	-115.94	76.90	81.13	-109.66
	3.78	119.49	-115.78	77.37	80.91	-109.96
	3.78	119.56	-115.62	77.52	80.83	-110.06
	3.78	119.57	-115.55	77.57	80.82	-110.07
	3.78	119.57	-115.57	77.55	80.83	-110.06
	3.78	119.61	-115.56	77.58	80.80	-110.11
	3.78	119.74	-115.51	77.72	80.63	-110.34
	3.79	120.51	-115.15	78.24	80.08	-111.04
	3.86	107.93	-113.84	80.28	82.40	-112.65
Moyenne	3.79	117.44	-115.82	77.87	81.13	-110.32
Ecart-type	0.03	4.85	1.47	0.92	0.84	0.94
Distance N---C	33.76					

Tableau 7 : Caractéristiques de l'hélice ortho

Nous avons représenté l'hélice n°1 minimisée sans contraintes, on remarque la présence de liaisons hydrogènes 1-10. Le décalage entre chaque résidu est de 95°.

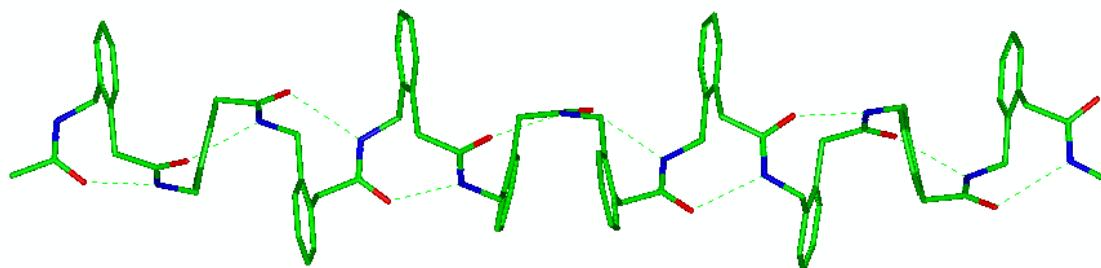


Figure 17 : Hélice n°1 ortho_10_1.2 (vue horizontale)

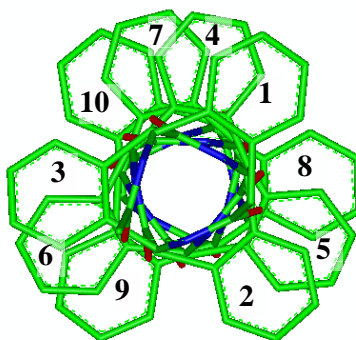


Figure 18 : Hélice n°1 ortho_10_1.2 (vue de face)

Nous avons calculé qu'il faudrait 12 résidus ortho pour remplacer l'hélice α du hCRF.

III 4 : Incorporation de l'hélice dans la séquence

Le protocole suivi est le même que pour le motif C5.

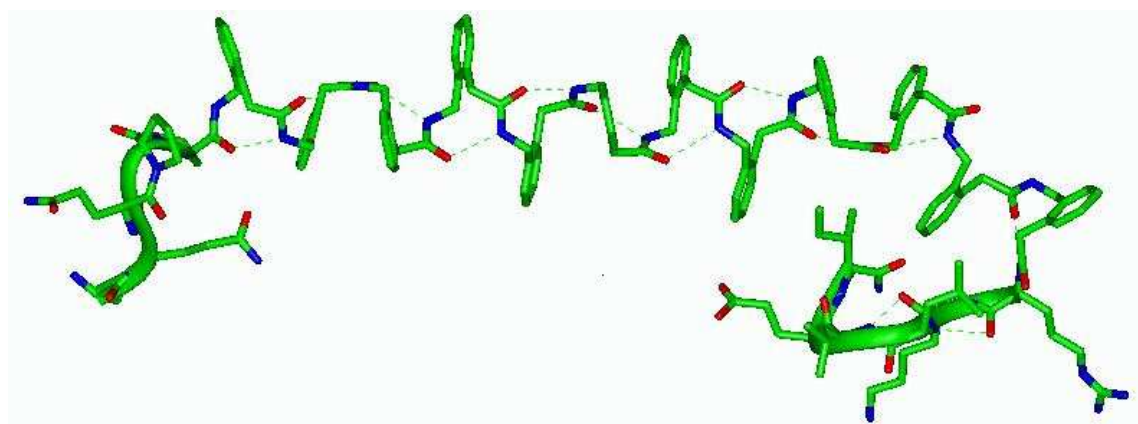


Figure 19 : Hybride du hCRF, SEEPP-(Ortho)₁₂-RKLMEII-NH₂ minimisé sans contraintes

La modélisation montre que l'hélice conserve la majorité des liaisons hydrogènes malgré la déformation due au repliement de la partie peptidique C-terminale. Cela semble être causé par la liaison qui se crée entre le CO du neuvième résidu ortho et le proton amidique de l'arginine. La formation de cette liaison est responsable de l'absence de liaison H entre le CO du résidu en 8 et le NH en 10.

Néanmoins, la conformation que prend la molécule est compatible avec l'orientation des extrémités C et N-terminales du hCRF.

Chapitre 4 : Validation du protocole

Le protocole utilisé pour la minimisation des monomères et les études par variation des angles dièdres a été employé par l'équipe d'Olson³⁴⁷ dans l'étude conformationnelle de mimes de β -turn. Ils ont voulu déterminer les caractéristiques des différents mimes (valeurs des angles dièdres et distances) pour pouvoir remplacer les β -turns peptidiques présents dans les peptides par des mimes contraints capables d'induire les mêmes orientations que celles de la chaîne peptidique.

Afin de valider le protocole de modélisation moléculaire pour la construction des hélices, nous avons sélectionné deux hélices artificielles décrites par les équipes de Fleet¹³⁵ et de Gelmann¹²⁷ qui ont été caractérisées par RMN et nous les avons soumises à notre protocole de modélisation moléculaire.

I : Etude de l'oxétane

L'équipe de Fleet¹³⁵ a synthétisé un oligomère de six résidus composé de motifs oxétane (l'acide (2*R*,3*S*,4*R*)-3-amino-4-[(1*S*)-1-hydroxyethyl] oxetane-2-carboxylique). Les études RMN et IR ont mis en évidence la présence de liaisons hydrogène entre le proton amidique en position *i* et le carbonyle en *i*+1 formant quatre liaisons de type 1-10 (cf : Partie I, Chapitre 2, II B 1 6 : Conformation de type hélice 10 des β -peptides).

Nous avons appliqué notre protocole au monomère ainsi qu'à l'hexamère. Nous avons dans un premier temps, minimisé le motif unitaire et nous avons sélectionné le conformère le plus stable (frame 17, E :37,3433 kcal/mol). Nous lui avons ensuite ajouté les extrémités C et N-terminales et nous avons fait varier les angles Phi2 et Psi3 avec un pas de 10°. Après minimisation, nous avons obtenu cinq conformères de convergence dont les caractéristiques sont données dans le tableau ci-dessous.

	Frame	Energie	d	tau	phi2	psi3
1	1375	28.8312	5.05	26.09	-141.61	-106.79
2	1390	29.87809	5.26	7.75	-141.59	137
3	1499	30.09057	3.49	13.87	-87.19	76.24
4	2365	30.25736	5.03	26.07	-146.14	-106.61
5	2612	31.32434	5.12	8.59	-143.69	133.2

Tableau 8 : Caractérisation des points de convergence

Nous avons ensuite construit l'hexamère en appliquant les contraintes d'angle, libéré ces contraintes et réalisé une dynamique moléculaire pour contrôler la stabilité des structures. Les résultats obtenus montrent que les oligomères 1 et 4 issus des conformères de

³⁴⁷ Gillespie, P. ; Cicariello, J. ; Olson, G.L. Conformational analysis of dipeptide mimetics. *Biopolymers*, **1997**, *43*, 191-217

convergence 1 et 4 (**Tableau 8**) donnent la même structure en hélice (**Figure 20**) et possèdent les mêmes caractéristiques (**Tableau 9**) que l'hélice décrite par Fleet. Les valeurs des angles des motifs unitaires des conformères 1 et 4 sont très proches, c'est l'orientation de la chaîne latérale qui est responsable de la différence d'énergie des monomères. Les oligomères 2, 3 et 5 ne donnent pas de structure en hélice.

Oxe6_1	d	tau	phi2	psi3
Motif unitaire	5.05	26.09	-141.61	-106.79
Oligomère				
	4.80	22.60	-156.13	-83.95
	4.74	8.31	-98.98	-108.97
	4.76	1.21	-102.57	-109.90
	4.59	-0.40	-98.42	-98.49
	4.82	-3.02	-111.73	-108.74
	5.08	11.31	-122.81	-126.64
Moyenne	4.77	6.21	-112.12	-105.57
Ecart-type	0.14	9.06	17.03	10.84

Tableau 9 : Caractéristiques de l'hélice oxétane

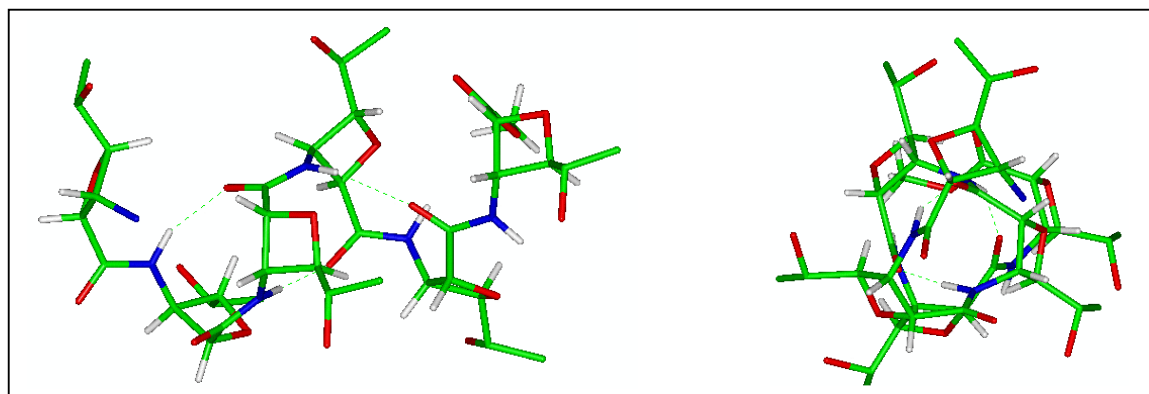


Figure 20 : Hélice oxétane6_1.2 (vues de profil et de face)

Nous avons aussi réalisé l'étude sur le décimère (**Figure 21**) et les résultats concordent avec ceux obtenus avec la molécule de Fleet ; c'est à dire que les structures les plus stables obtenues, l'on été avec les conformères 1 et 4. Les hélices générées à partir de ces conformères qui possèdent elles aussi les caractéristiques de l'hélice 1-10.

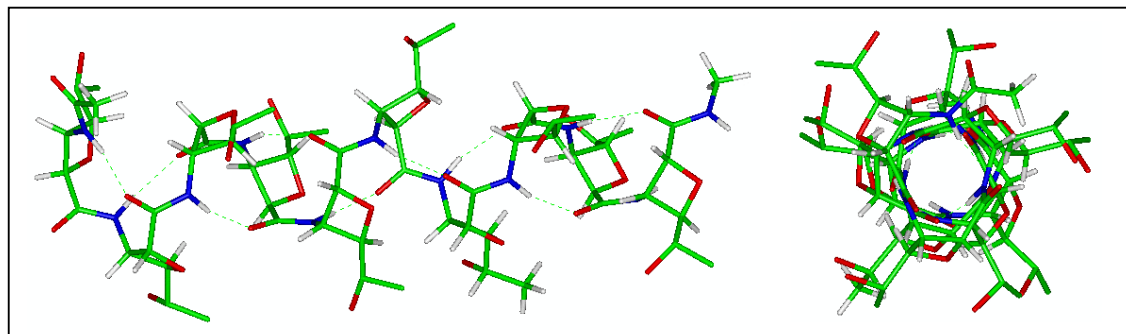


Figure 21 : Hélice oxétane10_1.2 (vues de profil et de face)

Nos calculs ont permis de définir comme meilleure prédiction de structure, une structure qui est en total accord avec celle obtenu expérimentalement par Fleet.

II : Etude de l'ACPC

L'équipe de Gellman¹²⁷ a synthétisé des oligomères (6 et 8) composés de motifs ACPC (acide (1*R*,2*R*)-*trans*-2-aminocyclopentanecarboxylique) dont la configuration au niveau des cycles est *trans*. Les études de RMN, de cristallographie et de CD ont mis en évidence la présence de liaisons hydrogènes entre le carbonyle en position *i* et le proton amidique en *i*+3 formant des liaisons de type 1-12 (cf : Partie I, Chapitre 2, II B 1 4 : Conformation de type hélice 12 des β -peptides).

Nous avons appliqué notre protocole au monomère ainsi qu'au décimère. Nous avons dans un premier temps, minimisé le motif unitaire et nous avons sélectionné le conformère le plus stable (frame 2, E :13,6078 kcal/mol). Nous lui avons ensuite ajouté les extrémités C et N-terminales et nous avons fait varier les angles Phi2 et Psi3 avec un pas de 10°. Après minimisation, nous avons obtenu sept conformères de convergence dont les caractéristiques sont données dans le Tableau 10.

	Frame	Energie	d	tau	phi2	psi3
1	1370	2.377706	3.82	-75.15	97.41	105.5
2	1374	2.480319	3.44	-41.84	103.48	-5.71
3	1390	2.607933	3.66	-71.45	80.48	71.87
4	1505	2.756454	4.94	-66.7	150.77	127.39
5	1375	3.055856	4	-43.93	101.73	-54.99
6	1388	3.372693	4.64	-44.3	147.52	-61.9
7	1614	4.848695	3.94	-10.09	-53.37	108.78

Tableau 10 : Caractérisation des points de convergence

Nous avons ensuite construit le décimère en appliquant les contraintes d'angle, libéré ces contraintes et réalisé une dynamique moléculaire pour contrôler la stabilité des structures. Les résultats obtenus montrent que les oligomères 1 et 3 issus des conformères de convergence 1 et 3 (**Tableau 10**) donnent une structure en hélice de type H 1-12 (**Figure 22**) qui possède les mêmes caractéristiques (**Tableau 11**) que l'hélice décrite par Gellman.

acpc10_1	d	tau	phi2	psi3
Motif unitaire	3.82	-75.15	97.41	105.50
Oligomère				
	3.40	-78.95	98.61	90.23
	3.48	-71.69	93.33	99.10
	3.37	-77.76	90.57	99.89
	3.45	-74.49	93.94	98.21
	3.42	-75.86	91.84	100.22
	3.43	-76.42	93.74	97.79
	3.44	-74.29	91.77	101.15
	3.39	-77.78	93.36	96.30
	3.44	-73.22	93.56	97.27
	3.42	-78.11	89.29	103.87
Moyenne	3.42	-75.86	93.00	98.40
Ecart-type	0.03	2.38	2.49	3.60

Tableau 11 : Caractéristiques de l'hélice ACPC

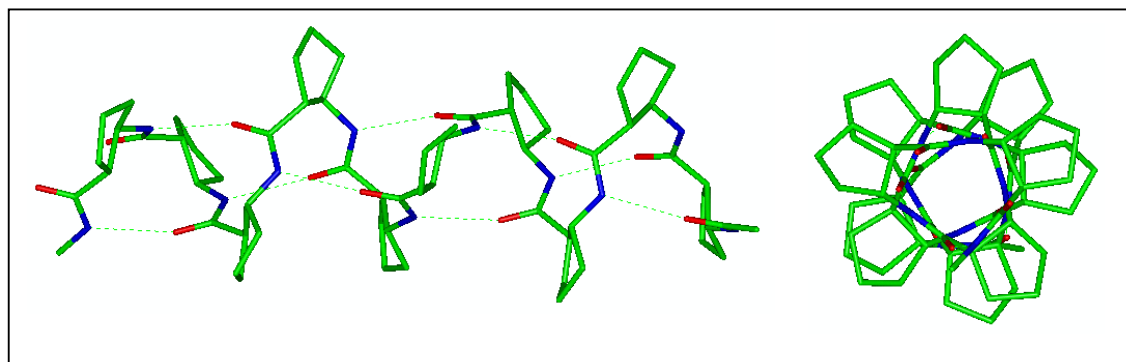


Figure 22 : Hélice ACPC10_1.2 (vues de profil et de face)

Nos calculs ont permis de définir comme meilleure prédiction de structure, une structure qui est en total accord avec celle obtenue expérimentalement par Gellman.

III : Conclusion

Nous avons vu qu'avec ces deux exemples de la littérature, les structures données par leurs auteurs étaient en accord avec les prédictions de structure que nous avons réalisées au laboratoire. Nous pouvons considérer que le protocole que nous avons mis en place est un bon outil pour la prédiction des structures en hélice concernant les mimés contraints de motifs pseudo-peptidiques.

Après le tri réalisé, nous pouvons mettre en place la synthèse de ces oligomères et leur incorporation dans la séquence du hCRF à la place de l'hélice naturelle. Nous espérons pouvoir caractériser par différentes méthodes (RMN, IR, CD et cristallographie), les structures ainsi générées.

PARTIE III:

PARTIE EXPERIMENTALE

Les résultats obtenus en modélisation moléculaire nous ont permis de sélectionner plusieurs molécules conformationnellement contraintes dont l'enchaînement est susceptible de générer des structures en hélice. Parmi les candidats potentiels, deux molécules, le lactame C5 et le résidu Ortho ont été sélectionnés.

Cette partie est consacrée à la synthèse de motifs contraints, de leurs oligomères correspondants et des analogues du hCRF.

Le chapitre 1 décrit la synthèse des monomères utilisés pour obtenir des oligomères et pour insérer dans la séquence du hCRF.

Le chapitre 2 est consacrée à la synthèse des oligomères. Pour cela, un rappel sur synthèse peptidique en phase solide est présenté qui donne les différents appareillages, conditions de couplage et stratégies de synthèse utilisés dans ce travail. Les oligomères du lactame C5 ont été synthétisés sur support dans le but de réaliser des analyses structurales et pour être introduit par bloc dans la séquence du hCRF. Les oligomères du motif Ortho n'ont été synthétisés que pour les analyses structurales en phase homogène.

Dans le chapitre 3, la synthèse de toutes les molécules de la famille du hCRF est présentée. Dans un premier temps, le hCRF et le ₉₋₄₁ hCRF qui ont été synthétisés comme molécule de référence, dans un deuxième temps, les différentes stratégies utilisées en fonction de la nature du résidu incorporé (C5 ou Ortho) et de la séquence et dans une dernière partie l'ensemble des modes opératoires sont décrits.

Chapitre 1 : synthèse des monomères

Les synthèses des monomères préparés au laboratoire sont décrites dans ce chapitre. Ils seront utilisés pour la synthèse des oligomères et des analogues pseudo-peptidiques du hCRF.

I : Stratégie de synthèse

I 1: Lactame C5

Le lactame C5 est synthétisé selon la méthode décrite par Freidinger et al.³⁴⁸ et la stratégie est présentée dans le **Schéma 1**.

Le couplage peptidique entre la méthionine N-protégée par un groupement *tert*-butyloxycarbonyle (Boc) et l'ester éthylique de la glycine en utilisant comme agent de couplage le BOP en présence d'une base (NMM) permet d'obtenir le dipeptide (**1**) avec un rendement quantitatif. La méthylation du soufre de la méthionine par un large excès d'iodométhane conduit à un sulfonium qui, en milieu anhydre, en présence d'hydrure de sodium conduit au lactame (**2**) après une saponification *in-situ*. Un traitement du lactame (**2**) par de l'acide trifluoroacétique permet de déprotéger la fonction amine qui est ensuite protégée par un groupement fluorométhylxycarbonyle au moyen de Fmoc-Cl en milieu basique pour obtenir le lactame (**3**).

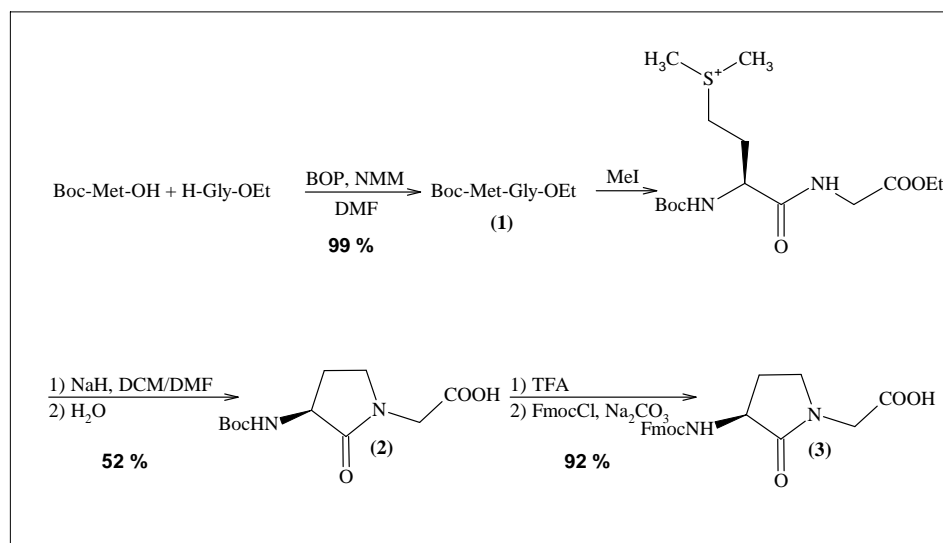


Schéma 1 : Synthèse du lactame C5

³⁴⁸ Freidinger, R.M. ; Veber, D.F. ; Perlow, D.S. ; Brooks, J.R. ; Saperstein, R. Bioactive conformation of luteinizing hormone-releasing hormone : evidence from the conformationally constrained analog. *Science.*, **1980**, *210*, 656-658.

I 2 : Synthon Ortho

Le synthon ortho est synthétisé selon la méthode décrite par Zhilian et al.³⁴⁹ et la stratégie est présentée dans le **Schéma 2**.

Le groupement méthyle du 2-méthylphénylacétate d'éthyle est bromé par réaction radicalaire par le N-bromosuccinimide en présence catalytique de peroxyde de benzoyle dans le chloroforme pour donner le composé (4). La substitution nucléophile du brome est réalisée par l'azide de sodium pour donner le composé (5). La saponification de l'ester éthylique est réalisé au moyen de lithine pour conduire au composé (6). L'hydrogénation de l'azide par l'hydrogène en présence de catalyseur au palladium conduit au composé (7) totalement déprotégé. Le groupement amine de (7) est protégé par un groupement fluorométhoxy-carbonyle au moyen de Fmoc-OSu en milieu basique pour donner le composé (8) ; il est protégé par un groupement *tert*-butyloxy-carbonyle (Boc) à l'aide de Boc₂O pour conduire au composé (9).

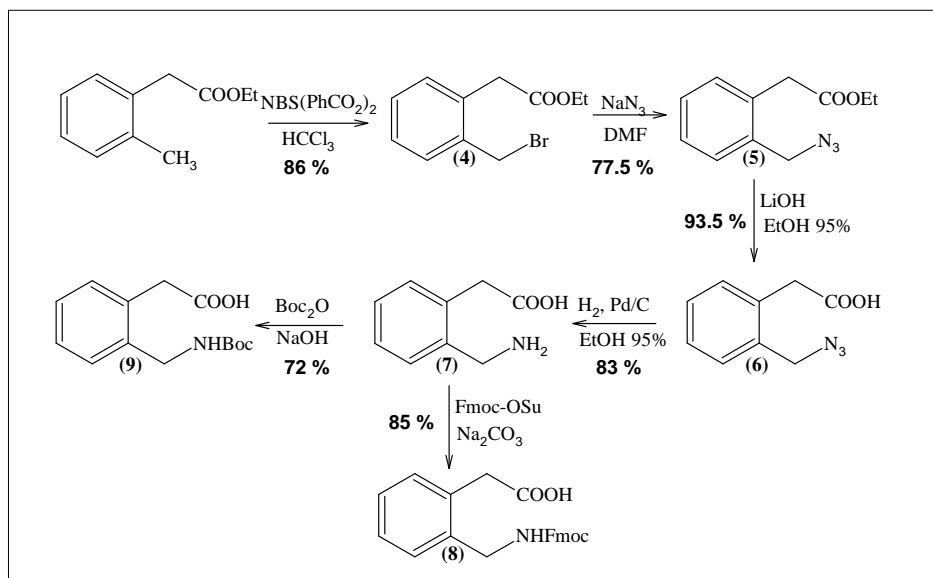


Schéma 2 : Synthèse du synthon Ortho

³⁴⁹ Zhilian, T. ; Pelletier, J.C. Preparation of amides from acids and resin bound azides: Suppression of intramolecular lactam formation. *Tetrahedron. Lett.*, **1998**, 39, 4773-4776.

II : Partie expérimentale

II 1 : Motif C5 :

Synthèse de Boc-Met-Gly-OH (1)

Dans un ballon de 500 ml, on introduit Boc-Met-OH (10 g – 40 mmol), HCl, H-Gly-OEt (5.6 g – 40 mmol), BOP (17.72 g – 40 mmol) que l'on dissout dans 40 ml de DMF, on ajoute ensuite la NMM (9.8 ml – 88 mmol). On vérifie que le pH est basique et on l'ajuste si cela est nécessaire en ajoutant de la NMM. Après 2 heures de réaction, on ajoute au milieu réactionnel une solution saturée de bicarbonate de sodium, puis on extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est ensuite lavée à l'eau puis avec une solution aqueuse 1M d'hydrogénosulfate de potassium. La phase organique est alors séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée puis concentré sous pression réduite. Le produit ainsi obtenu est purifié sur gel de silice, élué par un mélange acétate d'éthyle/hexane (1/4). On obtient un solide blanc (13.37 g – 39.9 mmol).

Rendement : 99%

$M+H^+$: 335.43 ; Rf (3/7) : 0.5.

Synthèse de l'acide 3(S)-tert-butyloxycarbonylamino-2-oxo-1-pyrrolidine acétique.

(Boc-(C5)-OH).(2).

Dans un ballon de 500 ml on introduit Boc-Met-Gly-OH (1) (13.37 g – 39.9 mmol) puis on ajoute l'iodométhane (80 ml), le mélange réactionnel est agité une nuit puis l'iodométhane en excès est éliminé sous pression réduite et co-éaporé à l'éther.

Le sulfonium ainsi formé est séché une nuit sous vide puis dissous sous atmosphère inerte dans 200 ml d'un mélange DMF/DCM (1/1). Le milieu réactionnel est refroidi à 0°C puis on ajoute l'hydrure de sodium à 60% en suspension dans l'huile (3.2 g – 80 mmol) par petites fractions. On laisse agiter 2 heures à température ambiante puis on ajoute 100 ml d'eau au milieu réactionnel et on vérifie que le pH est basique. Au bout d'une demi heure, tout l'ester a été saponifié, le DCM est alors évaporé, le mélange est lavé à l'éther, acidifié avec une solution aqueuse 1M d'hydrogénosulfate de potassium et on extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec une solution 1M de thiosulfate de sodium, à l'eau, puis par une solution aqueuse saturée en NaCl, séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et évaporée. On obtient un solide légèrement jaunâtre, qui est lavée par un mélange acétate d'éthyle/éther (1/4) pour conduire au produit pur (5.35 g - 20.7 mmol).

Rendement : 52 %

$M+H^+$: 259.28; $T^{\circ}\text{fus}$: 168°C ; $[\alpha]_{\text{D}}^{\text{MeOH}}(\text{C}=1) = -51$; Rf (120/10/5):0.43

RMN¹H (DMSOd₆, 400 MHz): 1.38 ppm (9H, s, CH₃Boc), 1.81 ppm (1H, m, proton de CH en β de N du cycle), 2.22 ppm (1H, m, proton de CH en β de N du cycle), 3.30 ppm (2H, m, protons en α de N du cycle), système AB: 3.81 ppm (1H, d, proton en α de l'acide, J=17.5 Hz) et 4.01 ppm (1H, d, proton en α de l'acide, J=17.5 Hz), 4.09 ppm (1H, dd, proton α du cycle, J=9 Hz et J=19.4 Hz), 7.14 ppm (1H, d, proton de l'amide, J=8.8 Hz).

Synthèse de l'acide Fmoc(S)-3-amino-2-oxo-1-pyrrolidine acétique.(Fmoc-(C5)-OH).(3)

Dans un ballon de 250 ml on introduit le Boc-(C5)-OH (**2**) (5 g – 19.38 mmol) et l'acide trifluoroacétique (20 ml), après 30 minutes le TFA est évaporé sous pression réduite et co-évaporé avec de l'éther.

Le sel de TFA formé est repris dans 50 ml d'eau et 30 ml de dioxane, le milieu réactionnel est refroidi à 0°C. On ajoute ensuite le carbonate de sodium (5.13 g – 48.45 mmol) et on agite 15 minutes, ensuite on introduit Fmoc-Cl (6.51 g – 25.2 mmol). La réaction est ramenée à température ambiante et au bout de 3 heures le dioxane est éliminé sous vide. On ajoute de l'eau et on vérifie que le pH est basique. La phase aqueuse est lavée avec de l'éther puis acidifiée avec une solution aqueuse 1M d'hydrogénosulfate de potassium et on extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est ensuite lavée avec de l'eau et avec une solution aqueuse saturée en NaCl, séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et évaporée. On obtient un solide légèrement jaunâtre, qui est lavée par un mélange acétate d'éthyle/éther (1/9) pour donner le produit pur (6.78 g - 17.8 mmol).

Rendement : 92%

M+H⁺ : 381; R_f (120/10/5): 0.3

RMN¹H (DMSOd₆, 400 MHz): 1.79 ppm (1H, m, proton de CH en β de N du cycle), 2.18 ppm (1H, m, proton de CH en β de N du cycle), 2.60 ppm (1H, m, proton du CH du Fmoc), 3.25 ppm (2H, m, protons en α de N du cycle), système AB: 3.76 ppm (1H, d, proton en α de l'acide, J=17.5 Hz) et 3.93 ppm (1H, d, proton en α de l'acide, J=17.5 Hz), 4.10 ppm (1H, m, proton α du cycle), 7.22 ppm (2H, m, protons aromatiques du Fmoc), 7.31 ppm (2H, m, protons aromatiques du Fmoc), 7.60 ppm (3H, m, protons aromatiques du Fmoc et le proton de l'amide), 7.79 ppm (2H, m, protons aromatiques du Fmoc), 12.70 ppm (1H, s large, proton de l'acide).

II 2 : Motif Ortho :

Synthèse du 2-bromométhylphénylacétate d'éthyle (4).

Dans un monocol d'un litre, on introduit le 2-méthylphénylacétate d'éthyle (25 g – 140 mmol) que l'on dilue dans 600 ml de chloroforme. On ajoute ensuite le N-bromosuccinimide (50 g – 280 mmol) et le peroxyde de benzoyle (200 mg – 0.82 mmol). Le milieu réactionnel est porté à reflux sous atmosphère inerte (argon) pendant 2 heures. Le chloroforme est alors évaporé et le tout est repris dans l'acétate d'éthyle, qui est lavé trois fois avec une solution saturée de bicarbonate de sodium et ensuite trois fois avec une solution aqueuse 1M d'hydrogénosulfate de potassium puis avec une solution saturée de bicarbonate de sodium. La phase organique est ensuite lavée avec de l'eau et avec une solution aqueuse saturée en NaCl, séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et évaporée. On obtient une huile qui est purifiée sur colonne de gel de silice et éluée avec un mélange acétate d'éthyle/hexane (1/9) pour conduire au produit pur (4) (31.06 g – 120 mmol).

Rendement : 86 %

M+H⁺ : 257 et 259; Rf (1/9): 0.5.

Synthèse du 2-azidométhylphénylacétate d'éthyle (5).

Dans un monocol d'un litre, on solubilise le produit (4) (31 g – 120 mmol) dans 600 ml de DMF auquel on ajoute l'azidure de sodium (78 g – 1.2 mol). Le milieu réactionnel est chauffé à 60 C° pendant deux heures, et le DMF est ensuite évaporé. Le résidu est repris dans 300 ml d'eau et extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée trois fois avec de l'eau et avec une solution aqueuse saturée en NaCl, séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et évaporée. On obtient une huile qui est purifiée sur colonne de gel de silice et éluée avec un mélange acétate d'éthyle/hexane (1/5) pour conduire au produit pur (5) (20.5 g – 93 mmol).

Rendement : 77.5 %

M+H⁺ : 220; Rf (1/4): 0.65.

Synthèse de l'acide 2-azidométhylphénylacétique (6).

Dans un ballon de 500 ml, on solubilise le produit (5) (20.5 g – 93 mmol) dans 200 ml d'éthanol 95 % auquel on ajoute 120 ml de LiOH 1M. Au bout de 30 minutes, l'éthanol est évaporé et on ajoute de l'eau. La phase aqueuse est lavée deux fois à l'éther, acidifiée avec une solution aqueuse 1M d'hydrogénosulfate de potassium et extraite avec de l'acétate

d'éthyle. La phase organique est ensuite lavée une fois avec une solution aqueuse 1M d'hydrogénosulfate de potassium, lavée avec de l'eau et avec une solution aqueuse saturée en NaCl, séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et évaporée. On obtient un brut réactionnel avec une pureté HPLC de 95.3 % ($\lambda=214$ nm)(16.51 g – 86.5 mmol).

Rendement : 93.5 %

M+H⁺ : (6) ne s'ionise pas ; Rf (180/10/5): 0.55.

Synthèse de l'acide 2-aminométhylphénylacétique (7).

Dans un ballon de 500 ml, on dissout le produit (6) (16.5 g – 86.5 mmol) dans 300 ml d'éthanol à 95 % auquel on ajoute une quantité catalytique de palladium à 10% sur charbon. On fait barboter un courant d'hydrogène une nuit. On filtre le catalyseur et le filtrat est évaporé. On co-évapore à l'éthanol et on obtient un solide qui est lavé avec de l'éther froid puis filtré pour conduire au produit pur (7) (11.93 g – 72.3 mmol).

Rendement : 83 %

M+H⁺ : 166 ; Rf (80/20/50/10): 0.3.

Synthèse de l'acide Fmoc-2-aminométhylphénylacétique.(8).

Dans un ballon de 250 ml, on dissout le produit (7) (5 g – 30.3 mmol) dans 50 ml d'eau et 30 ml de dioxane, le milieu réactionnel est refroidi à 0°C. On ajoute le carbonate de sodium (4.82 g – 45.5 mmol) et on agite 15 minutes, ensuite on introduit Fmoc-OSu (11.24 g – 33,3 mmol). La réaction est ramenée à température ambiante et après une nuit, le dioxane est éliminé sous vide. On ajoute de l'eau et on vérifie que le pH est basique. La phase aqueuse est lavée avec de l'éther, acidifiée avec une solution aqueuse 1M d'hydrogénosulfate de potassium puis on extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est ensuite lavée avec de l'eau et avec une solution aqueuse saturée en NaCl, séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et évaporée. On obtient un solide légèrement jaunâtre, qui est lavé à l'éther froid pour donner le produit pur (9.96 g – 25.8 mmol).

Rendement : 85 %

M+H⁺ : 388; T°fus : 151 - 153°C ; Rf (180/10/5):0.45

RMN¹H (DMSO-d₆, 400 MHz): 2.61 ppm (1H, t, proton du CH du Fmoc), 3.68 ppm (2H, s, CH₂ en α de l'acide), 4.14 ppm (2H, dd, CH₂ en α de l'amide, J=6 Hz et J=12 Hz), 4.35 ppm (2H, d, proton en α de l'O), 7.21 ppm (4H, m, protons du noyau phényle), 7.33 ppm (2H, m, protons aromatiques du Fmoc), 7.43 ppm (2H, m, protons aromatiques du Fmoc), 7.71 ppm

(2H, m, protons aromatiques du Fmoc), 7.78 ppm (1H, t, proton de l'amide, J=6 Hz), 7.90 ppm (2H, m, protons aromatiques du Fmoc), 12.36 ppm (1H, s large, proton de l'acide).

Synthèse de l'acide Boc-2-aminométhylephénylacétique.(9).

Dans un ballon de 250 ml, on dissout le produit (7) (6.2 g – 37.5 mmol) dans 50 ml d'eau et 30 ml de dioxane, le milieu réactionnel est refroidi à 0°C. On ajoute ensuite 41.3 ml de soude 1N et on agite 15 minutes, ensuite on introduit Boc₂O (9 g – 41.2 mmol). La réaction est ramenée à température ambiante et au bout de 2 heures le dioxane est éliminé sous vide. On ajoute de l'eau et on vérifie que le pH est basique. La phase aqueuse est lavée avec de l'éther, acidifiée avec une solution aqueuse 1M d'hydrogénosulfate de potassium et on extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est ensuite lavée avec de l'eau et avec une solution aqueuse saturée en NaCl, séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et évaporée. On obtient un solide légèrement jaunâtre, qui est lavé à l'éther froid pour donner le produit pur (7.13 g – 22.0 mmol).

Rendement : 72 %

M+H⁺ : 265; T°fus : 111-113°C ; Rf (180/10/5):0.5

RMN¹H (DMSOd₆, 400 MHz): 1.38 ppm (9H, s, CH₃Boc), 3.66 ppm (2H, s, CH₂ en α de l'acide), 4.14 ppm (2H, d, CH₂ en α de l'amide, J=6 Hz), 7.20 ppm (4H, m, protons du noyau phényle), 7.28 ppm (1H, t, proton de l'amide, J=6 Hz), 12.36 ppm (1H, s large, proton de l'acide).

Chapitre 2 : synthèse des oligomères

I : Présentation

Les oligomères ont été synthétisés pour réaliser des analyses structurales (cristallographie, dichroïsme circulaire, RMN, IR) et ainsi d'étudier la capacité de telles molécules à se structurer en hélice en fonction de la longueur et de la nature des groupements terminaux. Nous avons aussi synthétisé des fragments N-protégés pour les introduire dans la séquence du hCRF.

Les divers oligomères du motif C5 dont les formules générales sont $\text{Ac}-(\text{C5})_n\text{-OH}$ et $\text{Ac}-(\text{C5})_n\text{-NH}_2$ ont été synthétisés pour des analyses structurales. Ces composés ont tous acétylés. La partie C-terminale est sous la forme d'un acide libre ou amidée, nous espérons ainsi pouvoir faciliter la cristallisation de ces oligomères.

Les fragments synthétisés sont :

- $\text{Ac}-(\text{C5})_3\text{-OH}$ (**10**)
- $\text{Ac}-(\text{C5})_4\text{-OH}$ (**11**)
- $\text{Ac}-(\text{C5})_5\text{-OH}$ (**12**)
- $\text{Ac}-(\text{C5})_5\text{-NH}_2$ (**13**)
- $\text{Ac}-(\text{C5})_7\text{-NH}_2$ (**14**)
- $\text{Ac}-(\text{C5})_9\text{-NH}_2$ (**15**)
- $\text{Ac}-(\text{C5})_{11}\text{-NH}_2$ (**16**)

Le fragment $\text{Fmoc}-(\text{C5})_5\text{-OH}$ (**17**) a été préparé en grande quantité pour être introduit par bloc dans la séquence du hCRF.

Tous les oligomères du lactame C5 ont été synthétisés en utilisant une chimie supportée, une partie sera donc consacrée aux généralités de la synthèse peptidique en phase solide que nous avons utilisé.

Les dérivés du motif Ortho dont les formules générales sont $\text{Boc-Ortho}_n\text{-NHMe}$, $\text{Piv-Ortho}_n\text{-NHMe}$ et Boc-Ortho-NHiPr ont été préparés en phase homogène. Ces composés ont été synthétisés en vue d'être cristallisés. Nous souhaitons aussi, à partir d'études RMN, CD et IR sur ces molécules de taille croissante, mettre en évidence une structuration progressive en hélice comme nous l'a prédit l'étude de modélisation moléculaire.

Ils sont composés entre un et trois motifs Ortho.

- Boc-ortho-NHMe (18)
- Piv-ortho-NHMe (19)
- Boc-ortho-NHiPr (20)
- Boc-(ortho)₂-NHMe (21)
- Piv-(ortho)₂-NHMe (22)
- Boc-(ortho)₃-NHMe (23)
- Piv-(ortho)₃-NHMe (24)

Pour des problèmes de solubilité, à l'inverse du fragment Fmoc-(C5)₅-OH, aucun bloc Ortho n'a été préparé pour être incorporé dans la séquence du hCRF.

II : Généralités sur la synthèse peptidique en phase solide

Les généralités présentées dans ce chapitre ne couvrent pas le large éventail de la synthèse peptidique en phase solide, mais la totalité des appareils, des stratégies de synthèse et des conditions de couplage qui ont été utilisés dans ce travail. Cela concerne aussi bien la synthèse des oligomères que des molécules hybrides du hCRF.

II 1 : Appareillages

II 1 1 : Réacteur manuel

Les synthèses peptidiques sont réalisées dans des réacteurs en verre cylindriques composés d'un fritté de porosité n°2 prolongé par un robinet de vidange et muni d'un bouchon à vis (Schéma 3). Le réacteur est fixé perpendiculairement à l'axe d'un moteur et l'agitation s'effectue par rotation. La vidange du réacteur est réalisée par aspiration et les effluents sont collectés dans un erlenmeyer faisant office de poubelle.

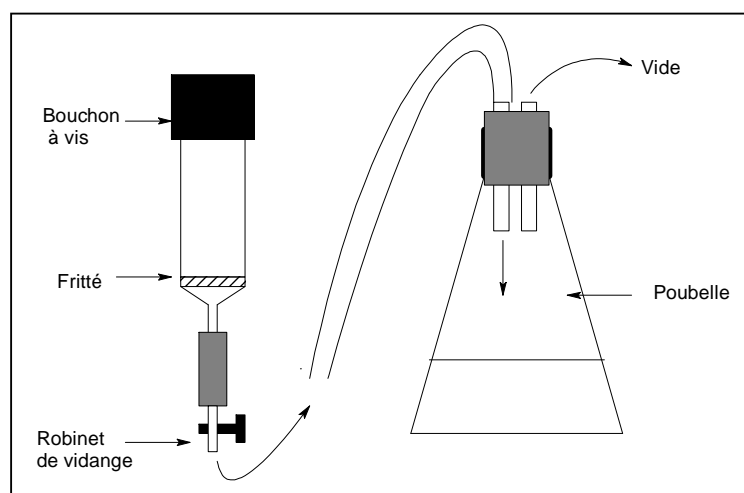


Schéma 3 : Réacteur manuel pour la synthèse peptidique en phase solide

II 1 2 : Synthétiseurs automatisés

II 1 2 1 : Synthétiseur Perceptive Pioneer

La résine est placée dans un réacteur cylindrique en verre fermé par deux frittés aux extrémités. Les réactifs et les solvants sont distribués sous atmosphère inerte (azote) et l'agitation de la résine se fait par flux continu.

II 1 2 2 : Synthétiseur Advance ChemTech (ACT)

La résine est placée dans des puits de synthèses dont le fond est composé d'un fritté. La distribution des réactifs et des solvants est réalisée sous atmosphère inerte par le haut du puit à l'aide d'un bras robot. L'agitation mécanique est transversale par vas et vient.

II 2 : Couplages

II 2 1 : Couplage au BOP

La résine est mise en suspension dans le DCM, on ajoute n+1 équivalents de DIEA par rapport à la charge de la résine, n équivalents d'acide aminé N-protégé, n équivalents de BOP. Le réacteur est agité pendant 30 minutes à plusieurs heures (en fonction de la difficulté de couplage). La solution de couplage est filtrée, la résine est lavée 3 fois au DCM, 2 fois à l'isopropanol, puis 3 fois au DCM.

II 2 1 : Couplage à l'HBTU

La résine est mise en suspension dans le DMF. On ajoute n+1 équivalents de DIEA par rapport à la charge de la résine, n équivalents d'acide aminé N-protégé, n équivalents de HBTU. Le réacteur est agité pendant 30 minutes à plusieurs heures (en fonction de la difficulté de couplage). La solution de couplage est filtrée, la résine est lavée 3 fois au DMF, 1 fois à l'isopropanol, puis 3 fois au DCM.

II 3 : Les stratégies de synthèse

Les deux stratégies de synthèse peptidique utilisées en phase solide (Boc et Fmoc) font appel à un même schéma : Accrochage du premier résidu N-protégé (par un Boc ou un Fmoc), déprotection de l'amine N-protégée, couplage d'un autre résidu N-protégé, etc. Le décrochage et la déprotection des chaîne latérale est réalisé généralement lors de la même étape **Schéma 4**.

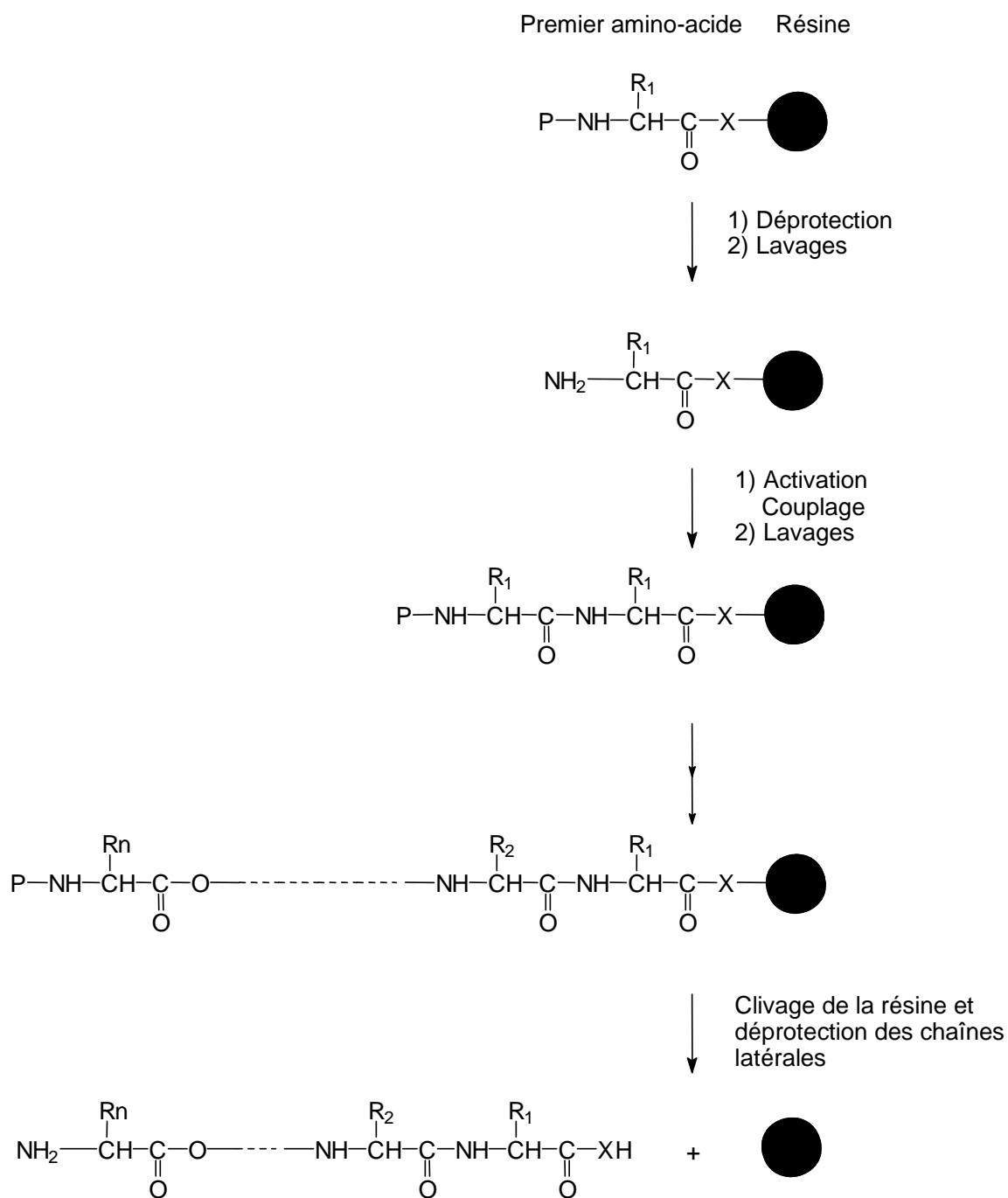


Schéma 4 : Schéma général de la synthèse peptidique en phase solide (X= O, NH)

II 3 1 : La stratégie Boc

Dans une stratégie Boc, les acides aminés ou les synthons sont protégés sur l'azote N terminal par un groupement temporaire de type *tert*-butyloxycarbonyle (Boc). Les chaînes latérales quant à elles, sont protégées par des groupements dits « orthogonaux » qui sont des

protections permanentes qui ne seront enlevées qu'en fin de synthèse. Le groupement Boc est éliminé par un traitement à l'acide trifluoroacétique (TFA). Les protections permanentes doivent résister à ce traitement ; on peut donc utiliser des groupements acidolabiles n'étant pas sensibles au TFA, ou des groupements basolabiles.

Les résines utilisés sont de deux types :

- La résine MBHA (paraméthylbenzylamine) est une résine dite « amide » qui va conduire à l'obtention d'un peptide amide après décrochage de la résine. La résine est placée dans le réacteur, lavée au DCM, puis lavée pendant 5 minutes par un mélange DCM/DIEA afin de neutraliser le chlorhydrate et donc générer l'amine libre. Elle est ensuite lavée au DCM, MeOH et DCM.
- La résine de Merrifield³⁵⁰ (chlorométhylpolystyrène) doit être fonctionnalisée par estérification en utilisant la méthode de Gisin³⁵¹ pour ancrer le premier résidu. La résine est mise en présence du premier résidu N-protégé (Boc) qui est sous forme de sel de césium. Après 72 heures d'agitation dans le DMF à 55°C, la résine est filtrée, lavée puis séchée sous vide. Le taux de fonctionnalisation est évalué par gain de poids.

Elimination du groupement Boc :

La résine est traitée par un mélange TFA/DCM (50/50) pendant 2 minutes puis rincée par du DCM et traitée à nouveau pendant 28 minutes par le mélange TFA/DCM. La solution est filtrée, la résine est lavée 2 fois par du DCM, 2 fois par de l'isopropanol et deux fois par du DCM.

Décrochage du peptide et déprotection des chaînes latérales :

La résine est placée dans le réacteur en téflon d'une rampe à HF, sous agitation en présence d'1 ml d'anisole par gramme de résine. 10 ml de HF sont distillés sous vide et condensés dans le réacteur refroidi à l'azote liquide. On laisse le HF revenir à l'état liquide, puis le mélange est agité pendant 1 heure dans un bain de glace. Le HF est distillé sous vide et piégé dans un autre réacteur placé dans l'azote liquide. Le peptide totalement déprotégé est précipité dans l'éther et récupéré par filtration, il est ensuite solubilisé dans un mélange eau /acétonitrile /TFA (50/50/0.1), puis lyophilisé.

³⁵⁰ Merrifield, R.B. Solid phase peptide synthesis. I The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149-2154.

³⁵¹ Gisin, B.F. Preparation of Merrifield resins through total esterification with cesium salts. *Helv. Chim. Acta.* **1973**, 56, 1476-1482.

II 3 2 : La stratégie Fmoc

Dans une stratégie Fmoc, les acides aminés ou les synthons sont protégés sur l'azote N terminal par un groupement temporaire de type 9-fluorénylméthylloxycarbonyl (Fmoc). Les chaînes latérales quant à elles, sont protégées par des groupements acidolabiles sensibles au TFA. Le groupement Fmoc est éliminé par un traitement à la pipéridine.

Avec une stratégie Fmoc, toutes les résines acidolabiles peuvent être utilisées, mais les plus employées sont généralement celles dont le peptide final est décroché par du TFA (Rink amide, Trityle).

La résine a été utilisée est une Rink amide³⁵² protégée par un groupement Fmoc, il doit être éliminé. Pour cela la résine est traitée par un mélange DMF/Pipéridine pendant 2 minutes puis rincée par du DMF et traitée à nouveau pendant 8 minutes par la solution de déprotection. La solution est filtrée, la résine est lavée 2 fois par du DMF, 2 fois par du méthanol et deux fois par du DCM.

Le décrochage du peptide est effectué en traitant pendant 2 à 5 heures (en fonction de la nature des protections des chaînes latérales) par un mélange TFA/DCM/TIS (49/49/2). Le mélange réactionnel est ensuite concentré sous vide, précipité à l'éther et récupéré par filtration. Comme pour la stratégie Boc, le peptide est ensuite solubilisé dans un mélange eau /acétonitrile /TFA (50/50/0.1), puis lyophilisé.

II 4 : Tests colorimétriques

Des tests colorimétriques spécifiques permettent de suivre l'avancement de la réaction de couplage ou de déprotection.

- Le test de Kaiser³⁵³ :

Il permet de mettre en évidence la présence d'amines primaires libres présentes sur les billes de résine. Trois solutions sont préparés :

- Ninhydrine : 500 mg de ninhydrine sont dissous dans 10 ml d'éthanol.
- Phénol : 80 g de phénol sont dissous dans 20 ml d'éthanol.
- KCN/Pyridine : 2 ml d'une solution aqueuse 0.001 M de cyanure de potassium sont ajoutés à 98 ml de pyridine.

Quelques billes de résine sont placées dans un tube en verre, une goutte de chaque solution est ajoutée. Le tube est chauffé 3 minutes à 120°C. En présence d'amines libres, les billes et la solution prennent une couleur violette sombre.

³⁵² Rink, H. Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tet. Lett.*, **1987**, 28, 3787-3790.

³⁵³ Kaiser, E. ; Colecott, R.L. ; Bossinger, C.D. ; Cook, P.I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.*, **1970**, 34, 595-598.

- Le test au TNBS³⁵⁴ :

Comme le test de Kaiser il permet de mettre en évidence les amines primaires libres. Les deux solutions de réactifs sont :

- DIEA à 10 % dans le DMF.
- Acide 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique dans le DMF

Quelques billes de résine sont placées dans un tube en verre, une goutte de chaque solution est ajoutée. En présence d'amines libres, les billes prennent une couleur rouge-orangée.

- Le test au chloranil³⁵⁵

Ce test permet de mettre en évidence la présence d'amines secondaires (ex : proline). Les deux solutions de réactifs sont :

- Acétaldéhyde à 2 % dans le DMF.
- Chloranil à 2 % dans le DMF.

Quelques billes de résine sont placées dans un tube en verre, une goutte de chaque solution est ajoutée. En présence d'amines secondaires libres, les billes prennent une couleur verte.

III : Stratégie de synthèse

III 1 : Synthèse des poly-C5.

III 1 1 : Stratégie de synthèse des oligomères de type Ac-(C5)_n-OH

Pour construire les fragments de type Ac-(C5)_n-OH, nous avons utilisé une synthèse sur support avec une résine de Merrifield en stratégie Boc et le BOP comme agent de couplage. La première étape consiste à fonctionnaliser la résine. Nous avons tout d'abord introduit le motif Boc-C5-OH par la méthode au sel de Césium décrite par Gisin dont le schéma réactionnel est décrit dans la **Figure 1**.

³⁵⁴ Hancock, W.S. ; Battersby, J.E. A new micro-test for the detection in incomplete coupling reactions in solid-phase peptide synthesis using 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal. Biochem.*, **1976**, *71*, 260-264.

³⁵⁵ Vojkovsky, T. Detection of secondary amines on solid phase. *Pept. Res.*, **1995**, *8*, 236-237.

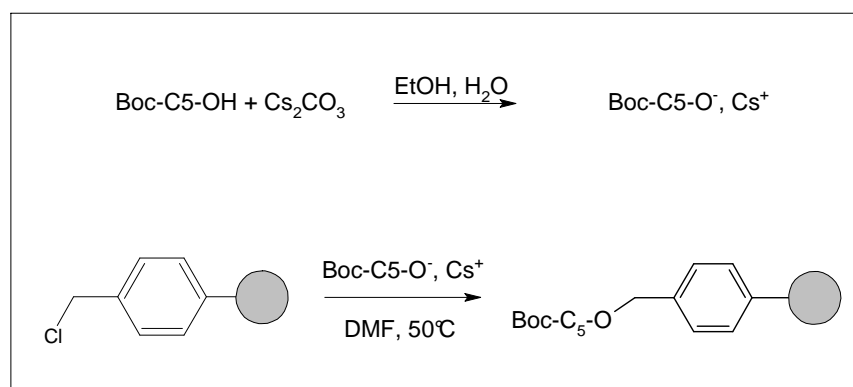


Figure 1 : Fonctionnalisation de la résine de Merrifield par la méthode de Gisin

La synthèse des oligomères est réalisée selon une méthode pas à pas. Chaque fois que cela était nécessaire, c'est à dire après la déprotection du troisième et du quatrième C5, une quantité définie de résine était prélevée pour être acylé par l'anhydride acétique avant le décrochage par de l'acide fluorhydrique. Cette stratégie nous a permis d'obtenir les trois oligomères (Ac-(C5)₃-OH (**10**), Ac-(C5)₄-OH (**11**) et Ac-(C5)₅-OH (**12**)) avec un seul lot de résine.

Le **Schéma 5** est donc valable pour les trois oligomères que nous avons synthétisés.

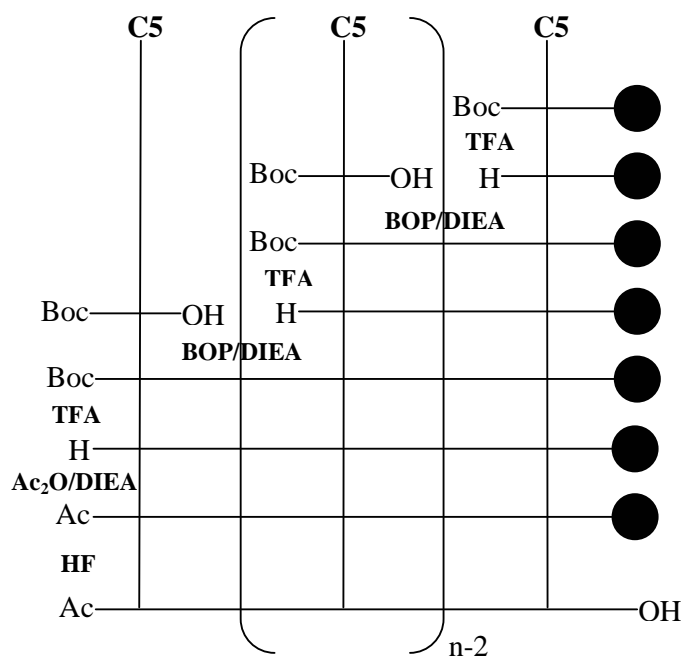


Schéma 5 : Synthèse générale des fragments Ac-(C5)_n-OH

La pureté des trois composés bruts ainsi obtenus allait de 97 à 99 %. Nous les avons utilisés tels quels pour les études conformationnelles qui seront traités dans la quatrième partie.

III 1 2 : Stratégie de synthèse des fragments de type $\text{Ac}-(\text{C5})_n\text{-NH}_2$

Pour synthétiser les fragments de type $\text{Ac}-(\text{C5})_n\text{-NH}_2$, nous avons utilisé une synthèse sur support avec une résine de type MBHA en stratégie Boc et l'agent de couplage est le BOP. Le protocole d'ancrage de tous les synthons est identique. Comme pour la synthèse des fragments $\text{Ac}-(\text{C5})_n\text{-OH}$, une partie de la résine est prélevée au cours de l'élongation de la séquence, acylé par l'anhydride acétique avant le décrochage par de l'acide fluorhydrique. Nous avons ainsi obtenu les quatre oligomères ($\text{Ac}-(\text{C5})_5\text{-NH}_2$ (**13**), $\text{Ac}-(\text{C5})_7\text{-NH}_2$ (**14**), $\text{Ac}-(\text{C5})_9\text{-NH}_2$ (**15**) et $\text{Ac}-(\text{C5})_{11}\text{-NH}_2$ (**16**)) avec un seul lot de résine.

Le **Schéma 6** est valable pour les quatre oligomères.

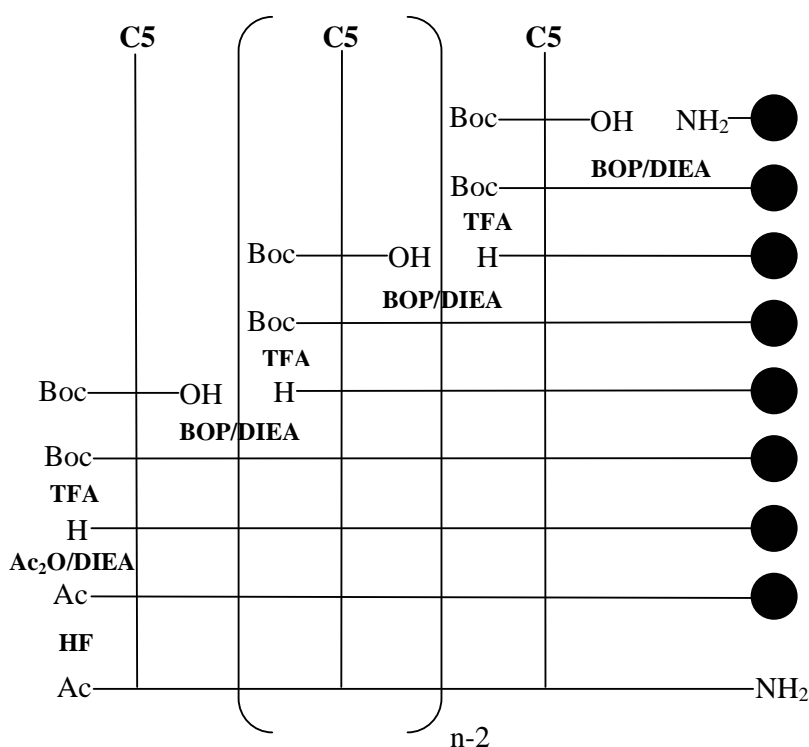


Schéma 6 : Synthèse générale des oligomères $\text{Ac}-(\text{C5})_n\text{-NH}_2$

La pureté HPLC brute (65 à 88 %) et les rendements (16 à 46 % après purification) obtenus avec la résine MBHA sont moins bons que ceux obtenus avec la résine de Merrifield. Cela peut s'expliquer du fait que la résine MBHA est moins bien solvatée que la Merrifield, réduisant l'accessibilité des fonctions de la résine aux réactifs.

III 1 3 : Stratégie de synthèse du fragment de type Fmoc-(C5)₅-OH (17)

Nous avons synthétisé une grande quantité de Fmoc-(C5)₅-OH (940 g.mol⁻¹) dans le but de coupler les fragments sur une chaîne peptidique en croissance. Afin d'éviter une purification finale et aux vues des puretés obtenues avec la résine de Merrifield lors de la synthèse des fragments Ac-(C5)_n-OH, nous avons utilisé le même type résine en stratégie Boc. L'agent de couplage est le BOP, le dernier résidu couplé, l'a été sous forme Fmoc-C5-OH car ce groupement protecteur résiste aux conditions de clivage par HF.

Le **Schéma 7** de synthèse est présenté ci-dessous.

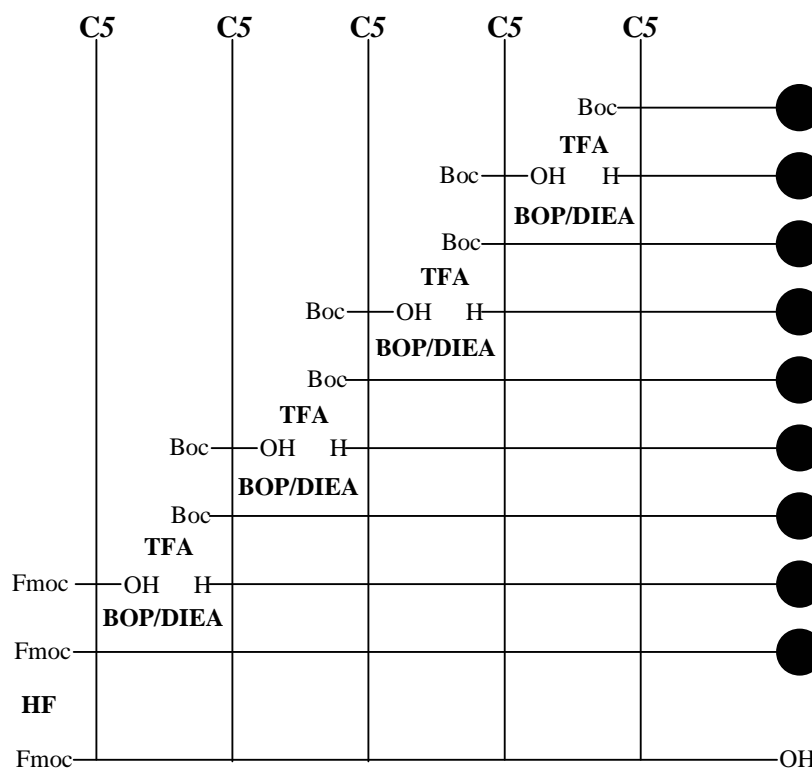


Schéma 7 : Synthèse générale du fragment Fmoc-(C5)₅-OH

Nous avons réalisé cette synthèse en plusieurs lots et les puretés HPLC ont été très bon (92 à 99 %) et les rendements acceptables (59 à 68 %). Cela nous a donc permis d'utiliser ces blocs lors de la synthèse des hybrides du hCRF.

III 2 : Synthèse des dérivés du motif Ortho

III 2 1 : Présentation des dérivés du motif Ortho

Nous avons synthétisé des dérivés monomériques, dimériques et trimériques de l'acide 2-aminométhylphénylacétique (ortho) afin de caractériser la conformation de ces molécules. En effet, il n'existe pas d'études conformationnelles de ce résidu et nous espérons pouvoir

crystalliser ces molécules en apportant différentes variations aux extrémités C- et N-terminales. Elles sont toutes protégées sur leurs partie N-terminale par un groupement Boc ou Piv et sur leur partie C-terminale par un groupement aminométhyle ou aminoisopropyle.

Ces molécules sont :

- Boc-ortho-NHMe (**18**)
- Piv-ortho-NHMe (**19**)
- Boc-ortho-NHiPr (**20**)
- Boc-(ortho)₂-NHMe (**21**)
- Piv-(ortho)₂-NHMe (**22**)
- Boc-(ortho)₃-NHMe (**23**)
- Piv-(ortho)₃-NHMe (**24**)

III 2 2 : Stratégie de synthèse des dérivés du motif Ortho

Les synthèses ont été réalisées en phase homogène car dans le cas présent, la synthèse supportée apportait plus de contraintes que d'avantages.

Pour cette synthèse multiple, nous sommes partis de la molécule Boc-Ortho-OH (**9**). Tous les composés synthétisés possèdent un groupement N-méthylamide à l'exception du Boc-Ortho-NHiPr (**20**) qui est le seul à posséder un groupement N-isopropylamide. Pour la synthèse de ce composé nous sommes donc partis du Boc-Ortho-OH (**9**) et d'isopropylamine qui en présence de BOP en milieu basique conduit à Boc-Ortho-NHiPr (**20**).

Boc-Ortho-NHMe (**18**) est obtenu partis du Boc-Ortho-OH (**9**) et de méthylamine en présence de BOP en milieu basique.

Un traitement Boc-Ortho-NHMe (**18**) par de l'acide chlorhydrique 4N dans l'acétate d'éthyle permet de déprotéger la fonction amine. Ce composé est acylé par le chlorure de pivaloyl en présence de DIEA pour donner Piv-Ortho-NHMe (**19**), ou couplé avec le Boc-Ortho-OH en présence de BOP comme agent de couplage en milieu basique pour donner Boc-(ortho)₂-NHMe (**21**).

Le traitement Boc-(ortho)₂-NHMe (**21**) par de l'acide chlorhydrique 4N dans l'acétate d'éthyle permet de déprotéger la fonction amine. Ce composé est acylé par le chlorure de pivaloyl en présence de DIEA pour donner Piv-(ortho)₂-NHMe (**22**), ou couplé avec le Boc-Ortho-OH en présence de BOP comme agent de couplage en milieu basique pour donner Boc-(ortho)₃-NHMe (**23**).

Boc-(ortho)₃-NHMe (**23**) est traité par de l'acide chlorhydrique 4N dans l'acétate d'éthyle permet de déprotéger la fonction amine qui est acylé par le chlorure de pivaloyl en présence de DIEA pour donner Piv-(ortho)₃-NHMe (**24**).

La synthèse est représenté de façon intégrale dans le **Schéma 8**.

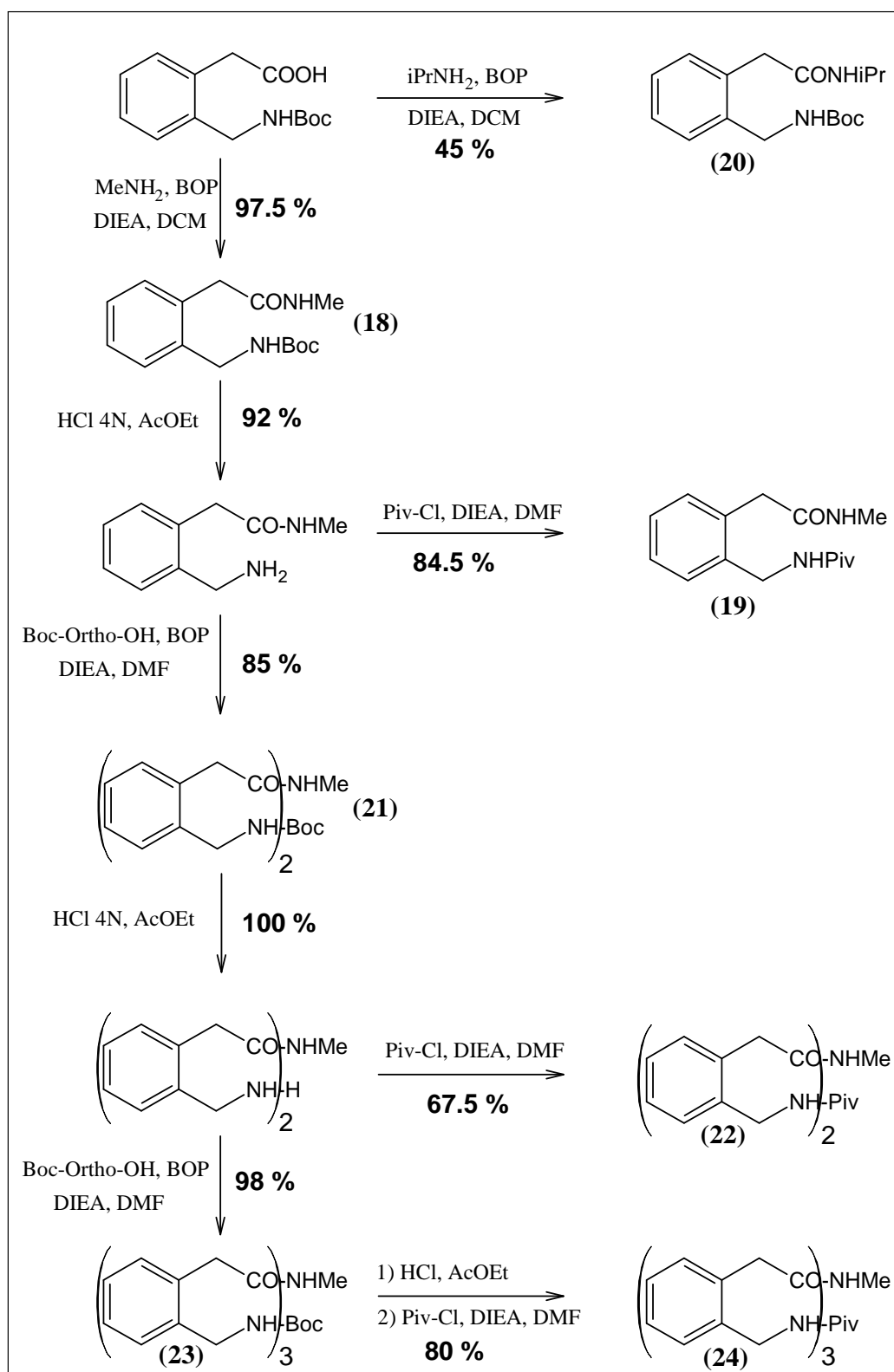


Schéma 8 : Schéma de synthèse des dérivés de l'acide 2-aminométhylphénylacétique

IV : Mode opératoire

IV 1 : Synthèse des poly-C5.

IV 1 1 : Fonctionnalisation de la résine

10 mmol de Boc-C5-OH (2.58 g) sont dissoutes dans l'éthanol 95% auquel on ajoute de l'eau jusqu'à la limite de précipitation. On ajoute 5 mmol de carbonate de césium (1.63 g), (le pH doit rester neutre). Après 30 minutes d'agitation l'éthanol est évaporé et la solution est lyophilisée. On obtient 3.92 g de sel de Boc-C5-O⁻ Cs⁺ qui sont ajoutés à 8 g de résine de Merrifield fonctionnalisée de 1 à 2 mmol/g dans le DMF, la solution est agitée à 55°C pendant 72 heures. La résine est filtrée et lavée au DMF, à l'eau, au méthanol, à l'isopropanol, et au dichlorométhane avant d'être séchée sous vide. On obtient 9.72 g (gain de poids : 1.72 g). La résine obtenue est fonctionnalisée à 0.96 mmol/g (estimé par gain de poids).

IV 1 2 : Synthèse des oligomères Ac-(C5)_n-OH

Nous sommes partis d'un lot de 750 mg (72 mmol) de résine Boc-C5-O-Merrifield où nous avons prélevé au cours de la synthèse, une quantité de 300 mg de résine Boc-(C5)₃-O-Merrifield, puis 300 mg de résine Boc-(C5)₄-O-Merrifield que nous avons déprotégé et acétylé par de l'anhydride acétique à 50 % dans le DCM en présence de DIEA pendant 10 minutes. Le lot final de résine Boc-(C5)₅-O-Merrifield a été traité de la même manière et tous ces composés sont décrochés par de l'acide fluorhydrique. L'agent de couplage utilisé est le BOP, les temps de couplage sont de 3 heures et les conditions de couplage et les quantités obtenus sont données dans le tableau suivant.

	Conditions de couplage	Masse brute	Rdt	Pureté HPLC	M (g.mol ⁻¹)
Boc-(C5) ₂ -O-Merrifield	2 eq, 1.44 mmol, 372 mg				
Boc-(C5) ₃ -O-Merrifield	2 eq, 1.44 mmol, 372 mg	300 mg de résine sont prélevés			
Ac-(C5)₃-OH (10)		75 mg	69 %	99 %	480
Boc-(C5) ₄ -O-Merrifield	2 eq, 0.95 mmol, 245 mg	300 mg de résine sont prélevés			
Ac-(C5)₄-OH (11)		82 mg	64 %	99 %	620
Boc-(C5) ₅ -O-Merrifield	2 eq, 0.63 mmol, 162 mg	460 mg de résine			
Ac-(C5)₅-OH (12)		150 mg	68 %	97 %	760

Tableau 1 : Conditions de synthèse et quantités de produits obtenus

IV 1 3 : Synthèse des oligomères Ac-(C5)_n-NH₂

Nous sommes partis d'1 gramme de résine substitué à 0,8 mmol/g, avec 2 eq de Boc-C5-OH pour chaque étape et l'agent de couplage est le BOP. Afin d'optimiser la substitution de la résine, on réalise un double couplage de 4 heures pour ancrer le premier résidu et un capping à l'Ac₂O est effectué à la fin de cette première étape. Les temps de couplage des autres résidus sont compris entre 6 heures et une nuit. Comme pour la synthèse des fragments Ac-(C5)_n-OH, une partie de la résine est prélevée au cours de l'élongation de la séquence afin de pouvoir générer les fragments suivants :

Dans le tableau ci-dessous sont donnés les conditions de couplages et les quantités obtenues.

	Conditions de couplage	Masse brute	Pureté HPLC	Masse purifiée	Rdt purifiée	M (g.mol ⁻¹)
Boc-C5-MBHA	(X2) 2 eq, 1.6 mmol, 413 mg					
Boc-(C5) ₂ -MBHA à Boc-(C5) ₅ -MBHA	2 eq, 1.6 mmol, 413 mg	435 mg de résine sont prélevés				
Ac-(C5)₅-NH₂ (13)		130 mg	74 %	80 mg	46 %	759
Boc-(C5) ₆ -MBHA et Boc-(C5) ₇ -MBHA	2 eq, 1.14 mmol, 294 mg	320 mg de résine sont prélevés				
Ac-(C5)₇-NH₂ (14)		113 mg	88 %	63 mg	42 %	1039
Boc-(C5) ₈ -MBHA et Boc-(C5) ₉ -MBHA	(X2) 2 eq, 0.83 mmol, 214 mg	700 mg de résine sont prélevés				
Ac-(C5)₉-NH₂ (15)		232 mg	70 %	110 mg	30 %	1319
Boc-(C5) ₁₀ -MBHA et Boc-(C5) ₁₁ -MBHA	(X2) 2 eq, 0.63 mmol, 162 mg	320 mg de résine				
Ac-(C5)₁₁-NH₂ (16)		142 mg	65 %	35 mg	16 %	1599

Tableau 2 : Conditions de synthèse et quantités de produits obtenus

IV 1 4 : Synthèse du fragment Fmoc-(C5)₅-OH

Nous sommes partis de deux lots (3 et 1.77 g) de résine de Merrifield substituée à 0.96 mmol/g et un autre lot (3 g) substitué à 0.86 mmol/g.

Les conditions de synthèse sont résumés sous forme de tableaux.

Lots de résine Boc-C5-O-Merrifield	Conditions de couplage	Masse brute	Rdt	Pureté HPLC
Sur 3 g à 0.96 mmol/g				
Boc-C5-OH	2 eq, 5.76 mmol, 1.48 g			
Fmoc-C5-OH	2 eq, 5.76 mmol, 2.19 g			
1 ^{er} HF sur 1.05 g de résine		360 mg	58 %	
2 ^{ème} HF sur 1.10 g de résine		445 mg	68 %	
3 ^{ème} HF sur 1.10 g de résine		445 mg	68 %	
4 ^{ème} HF sur 1.30 g de résine		595 mg	77 %	
Total		1.845 g	68 %	99 %
Sur 1.77 g à 0.96 mmol/g				
Boc-C5-OH	2 eq, 3.39 mmol, 0.88 g			
Fmoc-C5-OH	2 eq, 3.39 mmol, 1.29 g			
HF sur 1.96 g de résine		1 g	61 %	92 %
Sur 3 g à 0.86 mmol/g				
Boc-C5-OH	2 eq, 5.16 mmol, 1.33 g			
Fmoc-C5-OH	2 eq, 5.16 mmol, 1.96 g			
1 ^{er} HF sur 1.3 g de résine		460 mg	54 %	
2 ^{ème} HF sur 1.3 g de résine		520 mg	61 %	
3 ^{ème} HF sur 1.1 g de résine		460 mg	64 %	
Total		1.440 g	59 %	94 %

Tableau 3 : Conditions de synthèse et quantités de produits obtenus

IV 2 : Mode opératoire des dérivés du motif Ortho**Synthèse de *tert*-butyl 2-[2-(isopropylamino)-2-oxoethyl]benzylcarbamate (20)****(Boc-ortho-NHiPr) :**

Dans un ballon de 100 ml, on introduit Boc-ortho-OH (0.5 g – 1.88 mmol), iPr-NH₂ (0.241 ml – 2.82 mmol), BOP (0.910 g – 2.07 mmol) que l'on dissout dans 20 ml de DCM, on ajoute ensuite la DIEA (0.646 ml – 3.76 mmol). On vérifie que le pH est basique. Après une nuit de réaction, on évapore de DCM, et le tout est repris dans de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée trois fois avec une solution saturée de bicarbonate de sodium, trois fois avec une solution aqueuse 1M d'hydrogénosulfate de potassium, avec une solution saturée de bicarbonate de sodium, de l'eau et une solution aqueuse saturée en NaCl, séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et évaporée. On obtient un solide qui est lavé à l'éther. On obtient donc un solide pur (264 mg – 86.3 mmol). M+H⁺ : 307.18 ; Rf (5/5) : 0.7.

Rendement : 45 %

Synthèse de *tert*-butyl 2-[2-(méthylamino)-2-oxoéthyl]benzylcarbamate (18)(Boc-ortho-NHMe) :

Dans un ballon de 50 ml, on introduit Boc-ortho-OH (0.5 g – 1.88 mmol), Me-NH₂, HCl (253 mg – 3.73 mmol), BOP (0.910 g – 2.07 mmol) que l'on dissout dans 20 ml de DMF, on ajoute ensuite la DIEA (1.30 ml – 7.52 mmol). On vérifie que le pH est basique. Après une nuit de réaction on ajoute de l'eau puis on extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée trois fois avec une solution saturée de bicarbonate de sodium, trois fois avec une solution aqueuse 1M d'hydrogénéosulfate de potassium, avec une solution saturée de bicarbonate de sodium, de l'eau et une solution aqueuse saturée en NaCl, séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et évaporée. On obtient un solide qui est lavé à l'éther. On obtient donc un solide pur (510 mg – 1.83 mmol). M+H⁺ : 279.19 ; Rf (5/5) : 0.7.

Rendement : 97,5 %

Synthèse de 2-[2-(aminométhyl)phényl]-*N*-méthylacetamide(H-ortho-NHMe) :

Dans un ballon de 50 ml, on introduit Boc-ortho-NHMe (0.51 g – 1.83 mmol) auquel on ajoute une 5 ml d'une solution d'HCl 4N dans l'AcOEt. Après 30 minutes, on évapore le solvant, le mélange réactionnel est repris dans l'éther, filtré et séché. On obtient donc un solide pur (360 mg – 1.68 mmol). M+H⁺ : 179.9.

Rendement : 92 %

Synthèse de 2,2-diméthyl-*N*-{2-[2-(méthylamino)-2-oxoéthyl]benzyl}propanamide(Piv-ortho-NHMe) (19):

Dans un ballon de 50 ml, on introduit H-ortho-NHMe, HCl (154 mg – 0.71 mmol), Piv-Cl (132 µl – 1.08 mmol) que l'on dissout dans 3 ml de DMF, on ajoute ensuite la DIEA (371 µl – 2.15 mmol). On vérifie que le pH est basique. Après 2 heures de réaction, on ajoute de l'eau puis on extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée trois fois avec une solution saturée de bicarbonate de sodium, trois fois avec une solution aqueuse 1M d'hydrogénéosulfate de potassium, avec une solution saturée de bicarbonate de sodium, de l'eau et une solution aqueuse saturée en NaCl, séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et évaporée. On obtient un solide qui est lavé à l'éther. On obtient donc un solide pur (157 mg – 0.6 mmol). M+H⁺ : 263.50.

Rendement : 84,5 %

Synthèse de Boc-(ortho)₂-NHMe (21):

Dans un ballon de 100 ml, on introduit H-ortho-NHMe (360 mg – 1.68 mmol), Boc-ortho-OH (491 mg – 1.85 mmol) et BOP (817 mg – 1.85 mmol) que l'on dissout dans 20 ml de DMF, on ajoute ensuite la DIEA (818 µl – 5.04 mmol). On vérifie que le pH est basique. Après une heure de réaction, on ajoute de l'eau puis on extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée trois fois avec une solution saturée de bicarbonate de sodium, trois fois avec une solution aqueuse 1M d'hydrogénosulfate de potassium, avec une solution saturée de bicarbonate de sodium, de l'eau et une solution aqueuse saturée en NaCl, séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et évaporée. On obtient un solide qui est lavé à l'éther. On obtient donc un solide pur (607 mg – 1.42 mmol). M+H⁺ : 426,3.

Rendement : 85 %

Synthèse de H-(ortho)₂-NHMe :

Dans un ballon de 50 ml, on introduit Boc-(ortho)₂-NHMe (400 mg – 0.94 mmol) auquel on ajoute une 5 ml d'une solution d'HCl 4N dans l'AcOEt. Après 30 minutes, on évapore le solvant, le mélange réactionnel est repris dans l'éther, filtré et séché. On obtient donc un solide pur (340 mg – 0.94 mmol). M+H⁺ : 326,2.

Rendement : 100 %

Synthèse de Piv-(ortho)₂-NHMe (22):

Dans un ballon de 100 ml, on introduit H-(ortho)₂-NHMe, HCl (140 mg – 0.38 mmol), Piv-Cl (51 µl – 0.43 mmol) que l'on dissout dans 3 ml de DMF, on ajoute ensuite la DIEA (371 µl – 2.15 mmol). On vérifie que le pH est basique. Le traitement est le même que pour Piv-ortho-NHMe. On obtient donc un solide pur (105 mg – 0.26 mmol). M+H⁺ : 410,2.

Rendement : 67,5 %

Synthèse de Boc-(ortho)₃-NHMe (23):

Dans un ballon de 30 ml, on introduit H-(ortho)₂-NHMe, HCl (140 mg – 0.39 mmol), Boc-ortho-OH (114 mg – 0.43 mmol) et BOP (190 mg – 0.43 mmol) que l'on dissout dans 3 ml de DMF, on ajoute ensuite la DIEA (150 µl – 0.86 mmol). On vérifie que le pH est basique. Le traitement est le même que pour Boc-(ortho)₂-NHMe. On obtient donc un solide pur (219 mg – 0.38 mmol). M+H⁺ : 573,3.

Rendement : 98 %

Synthèse de Piv-(ortho)₃-NHMe (24):

Dans un ballon de 30 ml, on introduit Boc-(ortho)₃-NHMe (100 mg – 0.175 mmol) auquel on ajoute une 2 ml d'une solution d'HCl 4N dans l'AcOEt. Après 30 minutes, on évapore le solvant, le mélange réactionnel est repris dans l'éther, filtré et séché. H-(ortho)₃-NHMe, HCl obtenu est placé dans un ballon de 30 ml, auquel on ajoute Piv-Cl (24 µl – 0.193 mmol) que l'on dissout dans 2 ml de DMF, on ajoute ensuite la DIEA (67 µl – 0.385 mmol). On vérifie que le pH est basique. Le traitement est le même que pour Piv-ortho-NHMe. On obtient donc un solide pur (77 mg – 0.14 mmol). M+H⁺ : 557,09.

Rendement : 80 %

Chapitre 3 : Synthèse des analogues du CRF

Ce chapitre est consacré à la synthèse des molécules hybrides du CRF qui ont été réalisées au cours de ce travail. Les synthèses de toutes les molécules de type agoniste [(mime)_x]⁶⁻³⁴CRF et [(mime)_x]²⁰⁻³⁴CRF et de type antagoniste [(mime)_x]⁹⁻³⁴CRF(9-41) sont décrites.

Les stratégies de synthèse diffèrent en fonction du mime utilisé et de la séquence à synthétiser.

I : Stratégie de synthèse

I 1 : Synthèse des peptides de référence

Le hCRF et l'antagoniste ₉₋₄₁ hCRF ont été synthétisés comme référence pour la mise en place des tests biologiques. Le ₉₋₄₁ hCRF possède la même séquence que la molécule naturelle mais il est délété des 8 premiers résidus du côté N-terminal.

Pour la synthèse de ces deux peptides, nous avons mis en place la synthèse en stratégie Fmoc. Notre choix a porté sur cette stratégie car la synthèse pouvait être automatisée en utilisant les robots de synthèse que nous avons à disposition. Le hCRF de 41 acides aminés a été synthétisé sur un synthétiseur Pioneer et l'antagoniste ₉₋₄₁ hCRF de 33 acides aminés sur un robot ACT.

Les séquences des deux peptides sont les suivantes :

hCRF : **SEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMEII-NH₂ (25)**

₉₋₄₁hCRF : **DLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMEII-NH₂ (26)**

Les deux robots utilisent l'HBTU comme agent de couplage et de la DIEA comme base. Les acides aminés qui possèdent des chaînes latérales qui seraient susceptibles de réagir au cours de la synthèse sont protégées par des groupements stables. Ils seront enlevés au moment du décrochage de la résine. Les acides aminés le sont sous la forme de Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH et Fmoc-Lys(Boc)-OH.

Pour la synthèse du hCRF, la résine est de type Fmoc-PAL-PEG-PS (conçue pour le flux continue) et les temps de couplage sont d'une heure et celui de la déprotection du groupement Fmoc est de 5 minutes. Des doubles couplages ont été mis en place chaque fois que nous estimé que cela était nécessaire.

Pour la synthèse du ₉₋₄₁ hCRF, la résine est de type Rink amide (conçue pour l'agitation), les temps de couplage sont de 90 minutes et celui de la déprotection du groupement Fmoc est de 20 minutes. Des doubles couplages sont réalisés à chaque étape.

Ces résines sont clivées par le TFA en présence de scavengers. Le schéma de synthèse suivit pour ces deux peptides est le même que celui décrit dans le chapitre consacré aux généralités sur la synthèse peptidique en phase solide.

I 2 : Synthèse des molécules hybrides analogues du hCRF

La synthèse des molécules hybrides du hCRF a été réalisée sur support solide. Nous avons axé nos recherches sur les hybrides de type agoniste dont les résultats pharmacologiques seront présentés dans la quatrième partie.

Dans le modèle agoniste, nous avons exploré deux voies :

Dans un premier temps, nous avons décidé de substituer la totalité de l'hélice α qui représente la séquence 6-34 du hCRF (**Modèle 1**). Nous avons opté pour cette stratégie car nous voulions remplacer la totalité de l'hélice et ainsi voir s'il y avait une affinité pour le récepteur.



En appliquant ce modèle, nous avons synthétisés les molécules suivantes :

- **SEAPP-(AG)₁₄-ARKLMEII-NH₂** (27)
- **SEAPP-(AG)₂₀-RKLMEII-NH₂** (28)
- **SEAPP-(GP)₁₄-GRKLMEII-NH₂** (29)
- **SEAPP-(GP)₁₈-RKLMEII-NH₂** (30)
- **SEAPP-(C5)₂₀-RKLMEII-NH₂** (31)
- **SEAAA-(C5)₂₁-RKLMEII-NH₂** (32)
- **SEAPP-(Φ)₁₂-RKLMEII-NH₂** (33)
- **SEAAA-(Φ)₁₂-RKLMEII-NH₂** (34)
- **SEAPP-(Φ)₁₁-RKLMEII-NH₂** (35)
- **SEAPP-(Φ)₁₃-RKLMEII-NH₂** (36)

Dans un deuxième temps, nous n'avons remplacé que les acides aminés qui ne semblent pas avoir un rôle primordial pour l'affinité au récepteur, c'est la raison pour laquelle nous avons restreint la substitution à la séquence 20-34 (**Modèle 2**).



En appliquant ce modèle, nous avons synthétisés les molécules suivantes :

- **SEPPISLDLTFHLLREVL-(C5)₁₀-RKLMEII-NH₂ (37)**
- **SEPPISLDLTFHLLREVL-(Φ)₅-RKLMEII-NH₂ (38)**

I 2 1 : Les hybrides peptidiques (Modèle 1)

Nous avons déterminé par l'étude de modélisation moléculaire que les motifs dipeptidiques Ala-Gly et Pro-Gly se structurent en hélice. Nous avons donc décidé d'incorporer ces résidus dans la séquence du hCRF dans le but de déterminer si une hélice peptidique ne possédant pas de chaînes latérales spécifiques permettait d'induire la réponse biologique du hCRF.

I 2 1 1 : Incorporation de (Ala-Gly)_x

Nous avons calculé par modélisation, en utilisant le protocole que nous avons mis en place, que le nombre de résidus à introduire pour remplacer les 29 acides aminés était de 40. Nous n'obtenons pas une hélice α mais une structure plus compacte qui ne ressemble à aucune structure décrite. Nous avons donc décidé d'incorporer 20 résidus Ala-Gly mais aussi une séquence (Ala-Gly)₁₄-Ala qui correspond aux 29 acides aminés de la séquence naturelle.

Pour la synthèse de ces deux peptides, nous avons mis en place la synthèse en stratégie Fmoc sur le robot Pioneer en utilisant une résine de type Fmoc-PAL-PEG-PS. Les stratégies sont les mêmes que pour la synthèse du hCRF et des doubles couplages ont été mis en place chaque fois que nous estimions que cela était nécessaire.

Les séquences des deux peptides sont les suivantes :

- **SEPP-(AG)₁₄-ARKLMEII-NH₂ (27)**
- **SEPP-(AG)₂₀-RKLMEII-NH₂ (28)**

I 2 1 2 : Incorporation de (Gly-Pro)_x

Comme pour le dipeptide Ala-Gly, nous avons déterminé par modélisation qu'il fallait 18 motifs Pro-Gly pour remplacer l'hélice α du hCRF. Là aussi, les caractéristiques des angles

dièdres obtenus (-78° , 50° , 125° , 17°) ne correspondent pas à des structures standards. Nous avons là aussi substitué l'hélice naturelle de 29 acides aminés par (Gly-Pro)₁₄-Gly.

Pour la synthèse de ces deux peptides, nous avons mis en place la synthèse en stratégie Fmoc sur le robot Pioneer en utilisant une résine de type Fmoc-PAL-PEG-PS. Les stratégies sont les mêmes que pour la synthèse du hCRF et des doubles couplages ont été mis en place chaque fois que nous estimé que cela était nécessaire et notamment plus les glycines car le couplage sur une proline est toujours délicat.

Les séquences des deux peptides sont les suivantes :

- **SEEPP-(GP)₁₄-GRKLMEII-NH₂ (29)**
- **SEEPP-(GP)₁₈-RKLMEII-NH₂ (30)**

I 2 2 : Incorporation de (C5)_x dans la séquence du hCRF (Modèle 1)

Nous avons incorporé les oligomères du motif C5 dans la séquence 6-34 du hCRF. Nous avons aussi réalisé une petite modification dans la séquence 6-34 en substituant les deux prolines par deux alanines dans le but de conférer à la molécule une meilleure flexibilité de la partie N-terminale. Des études de relation structure-activité ont montrées que les deux prolines avaient un rôle d'inducteur pour l'hélice α du hCRF. Dans notre cas, nous synthétisons des molécules qui ne possèdent pas d'hélice α , nous avons donc pensé que nous pouvons remplacer ces deux prolines.

- **Synthèse de SEEPP-(C5)₂₀-RKLMEII-NH₂ (31)**
 - Par Blocs (stratégie Fmoc) :

La synthèse de cet hybride constitue la première synthèse de tous les hydrides du hCRF que nous avons réalisé. Nous avons décidé d'utiliser une stratégie Fmoc et de réaliser la synthèse des parties peptidiques sur le synthétiseur automatique. Nous avons choisi d'introduire manuellement dans la séquence les motifs C5, sous la forme de quatre fragments Fmoc-(C5)₅-OH qui ont été préalablement préparés en utilisant le BOP comme agent de couplage. Nous avons choisi cette stratégie afin que la purification de la molécule finale soit moins contraignante.

Nous avons utilisé une résine de type Fmoc-PAL-PEG-PS et afin d'avoir la meilleure pureté possible de la partie C-terminale, nous avons réalisé des doubles couplages à chaque étape, il en a été de même pour la partie N-terminale **Schéma 9**.

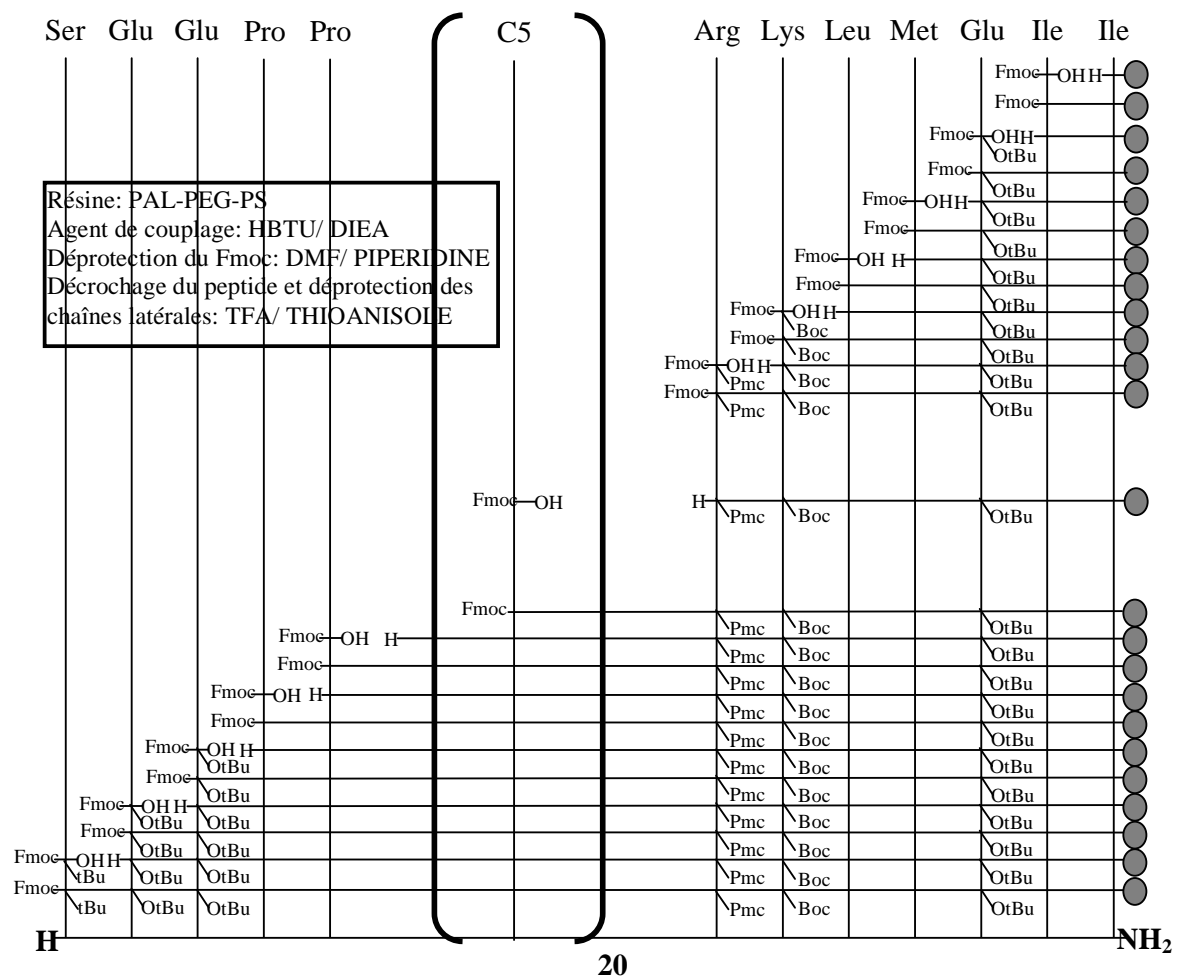


Schéma 10 : Schéma de synthèse de SEEPP-(C₅)₂₀-RKLMEII-NH₂ en stratégie Fmoc pas à pas.

Après purification par HPLC, le composé est analysé. L'analyse ESI (**Figure 2**) montre qu'il y a trois composés dont les masses sont : 4102 g/mol ; 4242 g/mol et 4382 g/mol dans les proportions 29 % ; 51,5 % et 19,5 %. Ces masses correspondent aux hybrides avec 19 C₅, 20 C₅ et 21 C₅. La molécule qui contient 19 résidus C₅ s'explique par une délétion lors du couplage, la molécule avec 20 C₅ est celle attendue quant à la molécule contenant 21 résidus C₅, une déprotection prématurée du groupement Fmoc est intervenue au cours d'un cycle de synthèse, cela a engendré le couplage de deux motifs C₅ au cours de ce cycle.

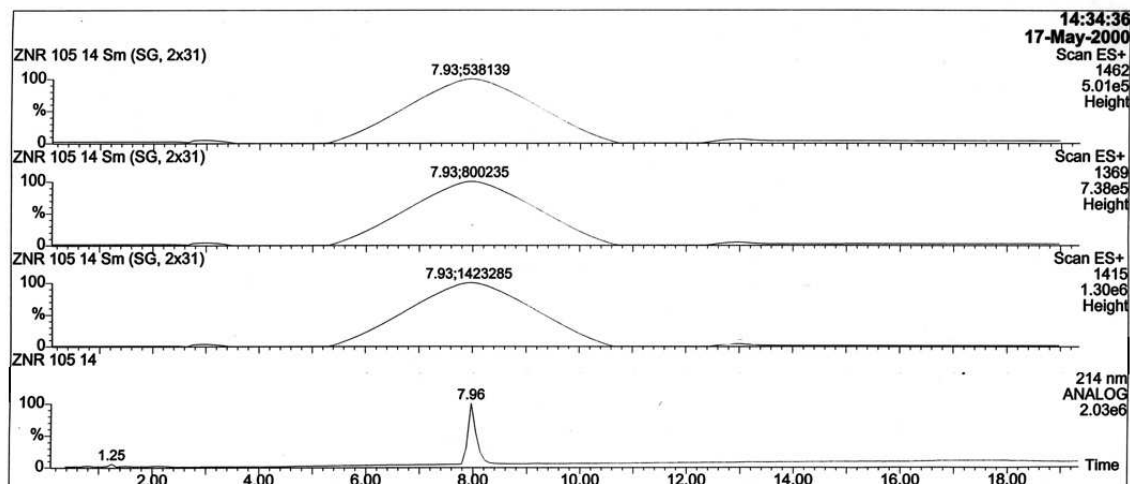


Figure 2 : LC-MS de SEEPP-(C5)₂₀-RKLMEII-NH₂ après purification.

Les craintes que nous avons de délétions lors de la synthèse, avaient dirigé notre choix vers une stratégie par fragments qui ne s'est pas avéré être aussi efficace que nous le pensions du fait de l'encombrement des groupements Fmoc-(C5)₅-OH. Les résultats obtenus avec la stratégie pas à pas, montrent que ces craintes étaient fondées. De plus, nous avons eu des difficultés à obtenir des composés pur après l'étape de purification HPLC en raison de la trop faible différence de masse et de polarité des molécules présentes dans le brut réactionnel.

▪ Synthèse de SEEAA-(C5)₂₁-RKLMEII-NH₂ (32)

Nous avons déterminé par modélisation moléculaire que le nombre de résidus C5 nécessaire à introduire dans le cas où les deux prolines sont remplacées par deux alanines et de 21. Cette modification permet d'orienter correctement les extrémités C-et N-terminales de l'hybride.

Les différentes conditions que nous avons utilisées précédemment, ont montré les avantages et les inconvénients des deux méthodes (blocs et pas à pas). Pour réaliser la synthèse de ce nouvel hybride en stratégie Fmoc, nous avons réalisé la synthèse des parties peptidiques ainsi que des 11 derniers C5 sur le synthétiseur en utilisant comme agent de couplage l'HBTU et les 10 premiers C5 ont été incorporés sous forme de deux blocs Fmoc-(C5)₅-OH manuellement en utilisant comme agent de couplage le BOP. Nous avons réalisé des doubles couplages à chaque étape.

Après purification, nous avons obtenus 11,8 mg (3 %) de produit, mais nous sommes en présence de deux molécules, celle que nous attendions (75 %) et une avec la délétion d'un résidu C5 (25 %).

L'utilisation combinée des deux stratégies au cours de la même synthèse, a permis de limiter la délétion et la déprotection accidentelle du groupement Fmoc en cours de synthèse.

I 2 3 : Incorporation de Ortho_x dans la séquence du hCRF (Modèle 1)

Comme pour le motif C5, nous avons incorporé le motif ortho dans la séquence 6-34 du hCRF. Nous avons là aussi réalisé une petite modification dans la séquence 6-34 en substituant les deux prolines par deux alanines comme cela a été réalisé pour le lactame C5.

La première stratégie mise en place, a été une stratégie Fmoc car nous souhaitons automatiser les réactions. Nous avons ensuite opté pour un stratégie Boc afin d'augmenter les rendements.

I 2 3 1 : Stratégie Fmoc

- **Synthèse de SEEPP-(Φ)₁₂-RKLMEII-NH₂ (33)**

- Stratégie Fmoc sur le synthétiseur

Les synthèses réalisées en utilisant le dérivé Fmoc-C5-OH nous ont conduit à utiliser le même protocole pour l'incorporation des résidus ortho dans la séquence du hCRF. Néanmoins l'idée d'incorporer ces résidus sous forme de blocs a été rapidement abandonnée à cause de leur faible solubilité dans les solvants de synthèse.

Les monomères ont été introduits sous forme de Fmoc-Ortho-OH en utilisant une méthode pas à pas réalisé sur le synthétiseur automatique. Des doubles couplages ont été réalisés à chaque étape. Le peptide est décroché du support et les protections des chaînes latérales sont éliminés par l'action du mélange TFA/Thioanisole (95/5) **Schéma 11**.

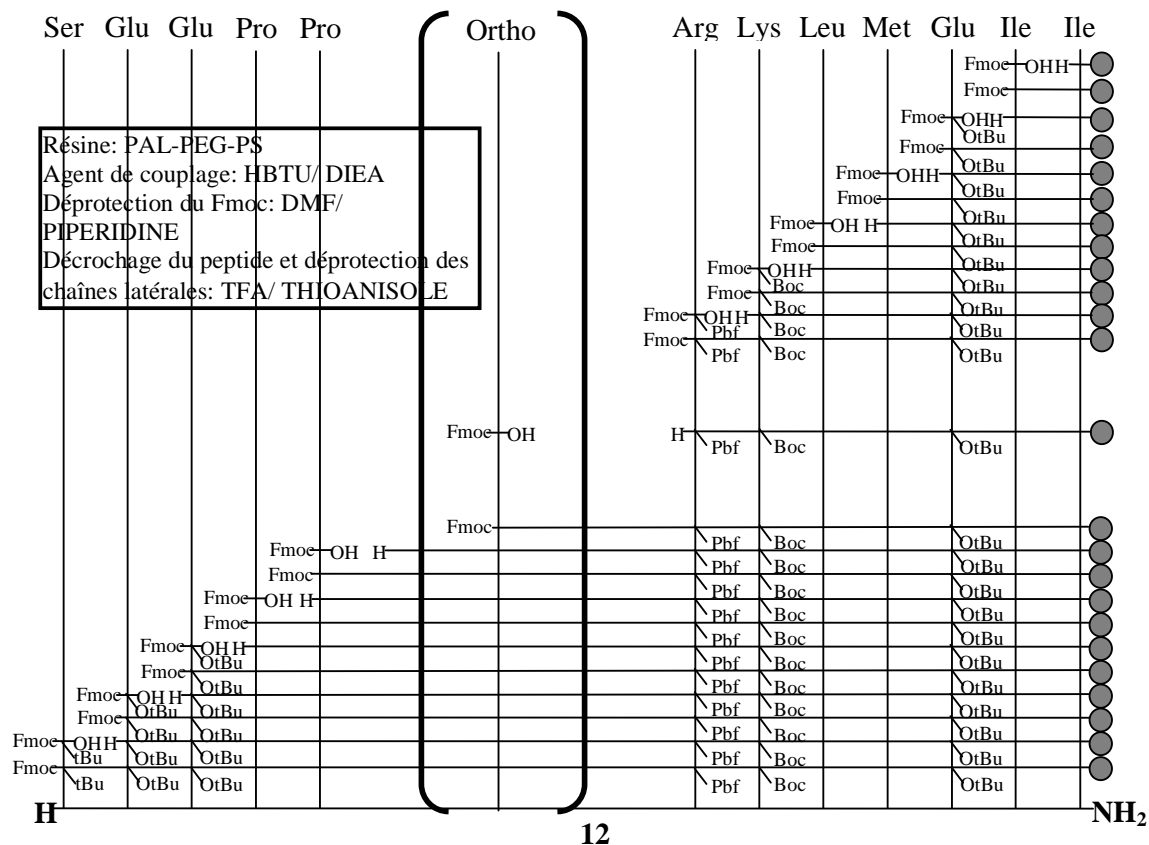
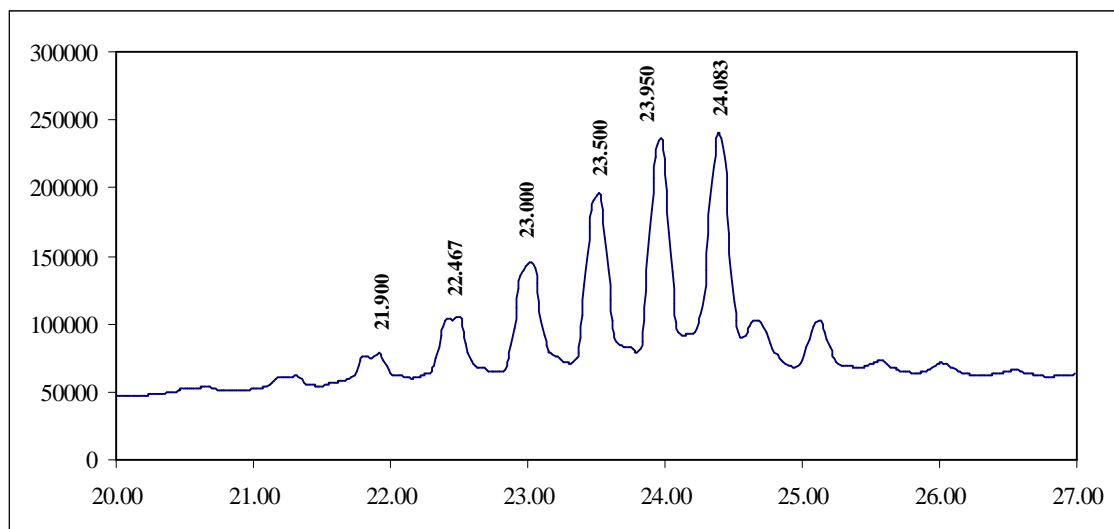


Schéma 11 : Schéma de synthèse de SEEPP-(Ortho)₁₂-RKLMEII-NH₂ en stratégie Fmoc pas à pas

Le profil HPLC du brut réactionnel (**Graph 1**) et l'analyse LC-MS (**Tableau 4**) donne un profil avec des délétions de 147 Daltons entre les pics principaux ce qui correspond à la masse du résidu ortho.



Graph 1 : Profil HPLC ($\lambda=214$ nm ; 0 à 100 % d'ACN en 50 min)

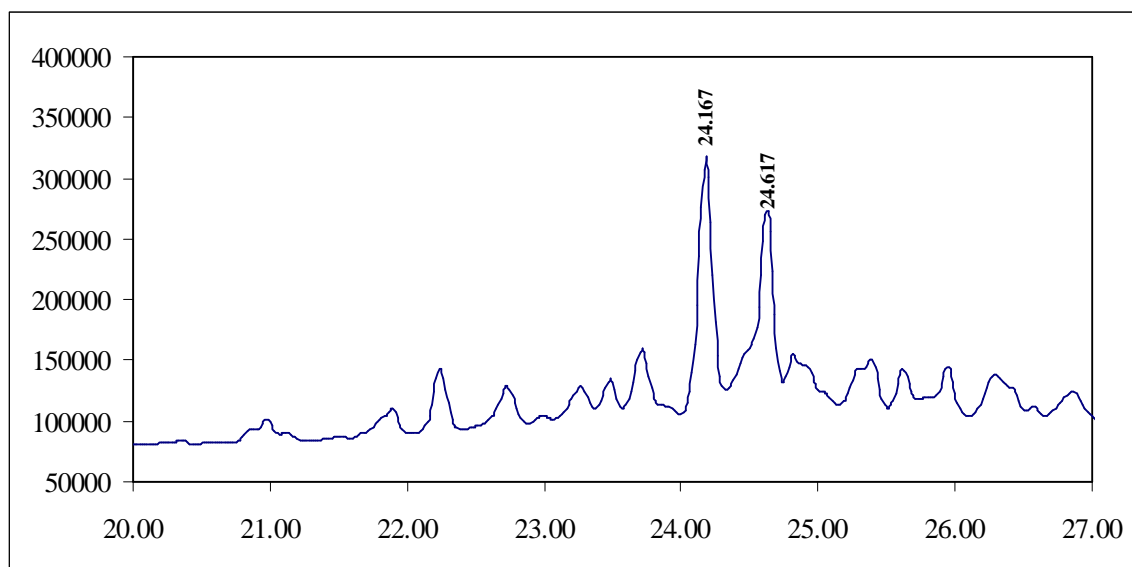
Pics	7-ortho	8-ortho	9-ortho	10-ortho	11-ortho	12-ortho
Temps de rétention (min)	21.900	22.467	23.000	23.500	23.950	24.083
Masse (g/mol)	2468	2615	2762	2909	3056	3203
Intensité relative (%)	6.80	9.90	13.71	16.32	20.12	33.16

Tableau 4 : Caractéristiques des pics correspondants aux délétions des résidus ortho.

Cela signifie que les couplages des Fmoc-ortho-OH n'ont pas été quantitatifs. Les purifications HPLC n'ont pas permis de séparer les différents composés avec une pureté acceptable. C'est la raison pour laquelle nous avons décidé d'améliorer les couplages en réalisant les couplages des Fmoc-Ortho-OH dans un réacteur manuel.

o Stratégie Fmoc sur un réacteur manuel

Nous avons utilisé la même résine et nous avons synthétisé la partie peptidique C-terminale sur le synthétiseur. Les résidus Fmoc-ortho-OH ont été introduits manuellement ainsi que la partie peptidique N-terminale en utilisant comme agent de couplage le BOP. Les conditions de décrochage du peptide et de traitement sont les mêmes que celles utilisées précédemment. Le profil HPLC et l'analyse LC-MS nous donne un profil avec 2 pics majoritaires correspondant au peptide attendu (30 %) et au peptide délété d'un résidu ortho (70 %).



graphe 2 : Zoom sur le profil HPLC ($\lambda=214$ nm ; 0 à 100 % d'ACN en 50 min)

La mise en place de couplages manuels des Fmoc-ortho-OH a permis de limiter la délétion et l'emploi du BOP comme agent de couplage pour le motif Ortho est plus adapté. Le problème de solubilité de ce composé (DMF ou DMSO) et donc de son injection HPLC, ne nous a pas permis de purifier le produit. Par contre, dans une autre synthèse réalisée en

parallèle qui incorpore deux alanines à la place des deux prolines la purification a été possible.

▪ **Synthèse de SEEAA-(Φ)₁₂-RKLMEII-NH₂ (34)**

Nous avons déterminé par modélisation moléculaire que le nombre de résidus Ortho nécessaire à introduire dans le cas où les deux prolines sont remplacées par deux alanines reste de 12. Les extrémités C-et N-terminales de l'hybride conservent les orientations du hCRF.

La stratégie de synthèse utilisée est la même que pour la synthèse de SEEPP-(Ortho)₁₂-RKLMEII-NH₂ en réacteur manuel. La purification a pu être mise en place en solubilisant le brut réactionnel obtenu dans un minimum de TFA. Nous avons obtenu 5,5 mg (2,3 %) de composé avec une pureté HPLC de 86 %.

Cependant, les rendements obtenus en stratégie Fmoc sont très faibles donc, afin d'améliorer les rendements de couplage, nous avons décidé de changer de stratégie et d'utiliser une stratégie Boc.

I 2 3 2 : Stratégie Boc

Pour utiliser une stratégie Boc, nous devons changer de résine et utiliser une résine de type MBHA qui résiste au traitement par la TFA et se clive au HF. N'étant pas équipé d'un synthétiseur automatique compatible avec l'emploi du TFA nous avons dû nous servir d'un réacteur manuel pour toute la synthèse.

Comme pour la stratégie Fmoc, les acides aminés qui possèdent des chaînes latérales qui seraient susceptibles de réagir au cours de la synthèse doivent être protégées par des groupements stables. Ils seront enlevés au moment du décrochage de la résine. Les acides aminés le sont sous la forme de Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(Ochx)-OH, Boc-Arg(Toz)-OH et Boc-Lys(2ClZ)-OH. Nous avons donc utilisé une résine MBHA pour la synthèse du composé, le décrochage du peptide et la déprotection des chaînes latérales sont effectués par l'acide fluorhydrique **Schéma 12**.

La première synthèse a été mise en place pour obtenir SEEPP-(Φ)₁₂-RKLMEII-NH₂ qui n'avait pas pu être purifié lors de la synthèse en stratégie Fmoc.

Les résultats obtenus avec cette nouvelle stratégie, nous ont poussé à mettre en place la synthèse des homologues inférieurs et supérieurs (SEEPP-(Φ)₁₁-RKLMEII-NH₂ (**35**) et SEEPP-(Φ)₁₃-RKLMEII-NH₂ (**36**)).

La synthèse de ces composés correspond au même schéma de synthèse.

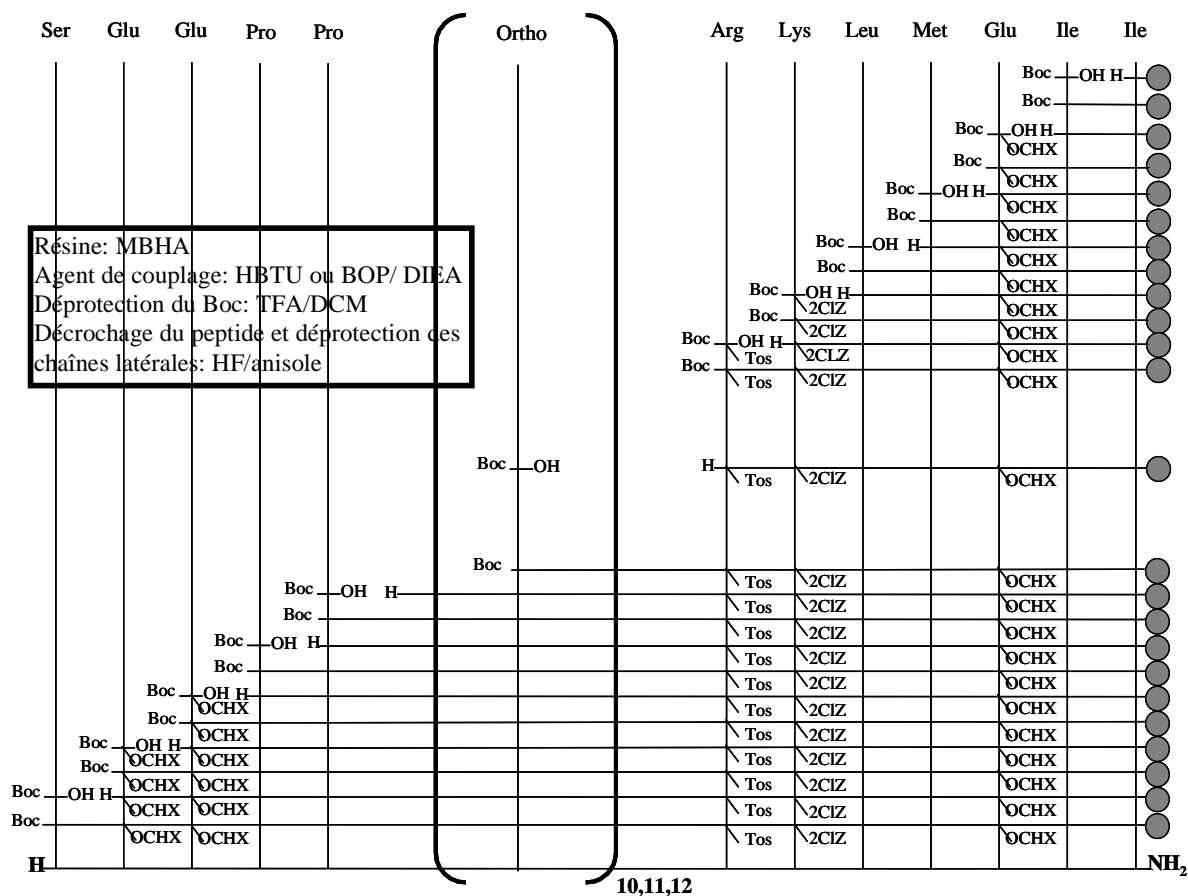
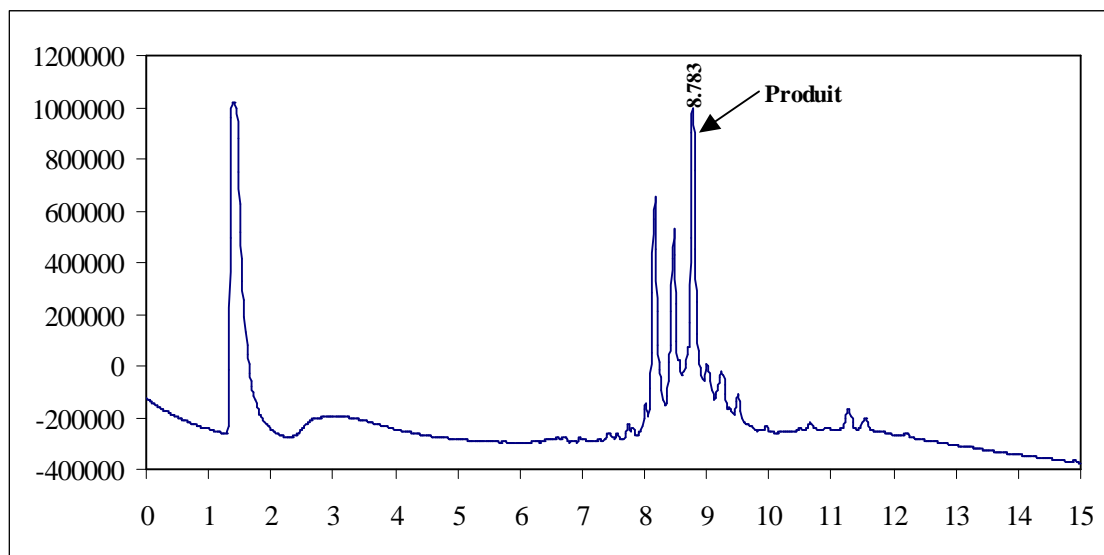


Schéma 12 : Schéma de synthèse de SEEPP-(Ortho)₁₂-RKLMEII-NH₂ en stratégie Boc pas à pas

▪ Synthèse de SEEPP-(Φ)₁₂-RKLMEII-NH₂ (**33**)

Pour la synthèse de ce composé nous avons utilisé l'HBTU comme agent de couplage pour les acides aminés de la partie C-terminale. Nous avons aussi utilisé cet agent pour la synthèse du premier Boc-Ortho-OH qui a été inséré dans la séquence lors d'un double couplage. L'emploi du BOP s'est avéré être plus efficace pour les autres Boc-ortho-OH car un seul couplage de 3 heures était suffisant. Toutes les conditions sont présentées dans la partie du mode opératoire.

On notera ici que le profil HPLC et l'analyse LC-MS ne font pas apparaître de délétions d'un résidu ortho. Cela signifie qu'en stratégie Boc, le couplage de Boc-ortho-OH est quantitatif.



graphe 3 : Profil HPLC ($\lambda=214$ nm ; 0 à 100 % d'ACN en 15 min)

Ces résultats encourageant ne résolvent pas le problème de la solubilisation du brut réactionnel. Néanmoins nous sommes parvenus à injecter 200 mg de brut et nous avons recueilli 4,2 mg de composé pur (rdt : 1,4 %).

Aux vues des résultats obtenus nous avons considéré que cette stratégie était la meilleure et nous l'avons mis en place pour les autres séquences mettant en jeu le résidu ortho.

- Synthèse de SEEPP-(Φ)₁₁-RKLMEII-NH₂ (**35**)
SEEPP-(Φ)₁₂-RKLMEII-NH₂ (**33**)
SEEPP-(Φ)₁₃-RKLMEII-NH₂ (**36**)

La stratégie de synthèse que nous avons mis en place est la même que pour la synthèse précédente. Les seules modifications apportées sont l'utilisation du BOP comme agent de couplage pour toute la synthèse et une étape de capping avec de l'anhydride acétique après chaque étape de couplage du résidu Boc-Ortho-OH. Nous espérons ainsi obtenir des bruts réactionnels très propres. Une quantité définie de résine est prélevé au cours de l'élongation de la séquence pour la synthèse des trois composés (SEEPP-(Φ)₁₁-RKLMEII-NH₂ (**35**), SEEPP-(Φ)₁₂-RKLMEII-NH₂ (**33**) et SEEPP-(Φ)₁₃-RKLMEII-NH₂ (**36**)). Les rendements obtenus (bruts et purifiés) ainsi que la pureté HPLC des bruts de synthèse sont compilés dans le **Tableau 5**.

	Masse brute	Rdt	Pureté HPLC	Masse purifiée	Rdt purifié	M (g.mol ⁻¹)
SEPP-(Φ)₁₁-RKLMEII-NH₂ (35)	426 mg	93 %	82 %	24.4 mg	5.3 %	3056
SEPP-(Φ)₁₂-RKLMEII-NH₂ (33)	258 mg	54 %	51 %	5.8 mg	1.2 %	3203
SEPP-(Φ)₁₃-RKLMEII-NH₂ (36)	320 mg	64 %	79 %	6.2 mg	1.2 %	3350

Tableau 5 : Quantités, rendements et puretés obtenues

L'utilisation de BOP comme agent de couplage et l'acétylation après chaque couplage de résidus Boc-Ortho-OH ont permis de limiter les délétions lors des synthèses des composés. En effet les résultats obtenus montrent que les rendements bruts sont très bon pour (35), corrects pour (36) et acceptables pour (33). La pureté HPLC obtenue pour (35) est de 82 % et de 79 % pour (36) ; la stratégie Boc est donc la plus efficace pour l'incorporation du résidu Ortho dans une chaîne peptidique.

I 2 4 : Incorporation de (C5)_x et Ortho_x dans la séquence du hCRF (Modèle 2)

Nous avons incorporé les oligomères du motif C5 et Ortho dans la séquence 20-34 du hCRF. Cette modification a été réalisé en s'inspirant des travaux de Beyermann²²⁹ où il a remplacé dans un analogue de l'Urocortine, seulement une partie de l'hélice α . Nous avons alors décidé de substituer la partie peptidique 20-34 du hCRF. Les différentes études de relation structure-activité ont montré que les modifications apportées aux amino-acides de cette séquence (ala-scan, D-scan, substitution contrôlée) affectaient peu l'activité de ces analogues.

La modélisation moléculaire nous a permis de déterminer le nombre de résidus C5 et Ortho à incorporer pour remplacer les 15 amino-acides de la séquence 20-34 ; nous avons donc utilisé 10 motifs C5 et 5 motifs Ortho.

Aux vues des résultats obtenus précédemment nous avons décidé d'utiliser une stratégie Boc pour les deux synthèses. L'agent de couplage BOP qui s'est avéré être le plus efficace pour l'introduction de ces résidus en stratégie Boc a été utilisé et une étape de capping avec de l'anhydride acétique a été réalisé après chaque couplage des monomères Boc-C5-OH et Boc-Ortho-OH. La résine amide employée est de type MBHA. Tous les acides aminés qui portent une fonction sur la chaîne latérale susceptible de réagir au cours de l'élongation sont protégés (Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Glu(Ochx)-OH, Boc-Asp(Ochx)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-His(Tos)-OH, Boc-Arg(Tos)-OH et Boc-Lys(2CIz)-OH). Ces groupements protecteurs sont éliminés et les deux peptides sont décrochés de leur support en fin de synthèse par l'anhydride fluorhydrique.

Le schéma de synthèse utilisé est le même que pour la synthèse des dérivés SEEPP-(Ortho)_x-RKLMEII-NH₂ en stratégie Boc. Les molécules obtenues sont :

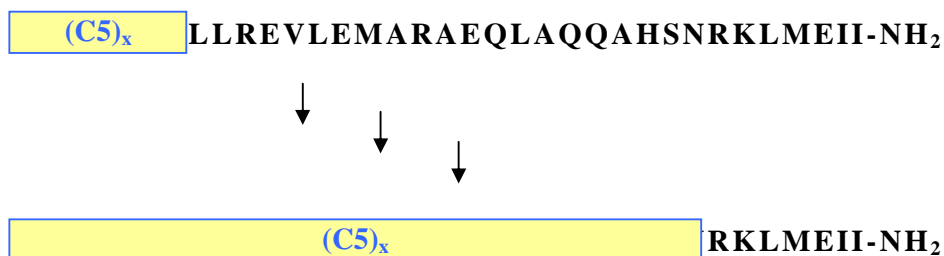
- SEEPPISLDLTFHLLREVL-(C5)₁₀-RKLMEII-NH₂ (37)
- SEEPPISLDLTFHLLREVL-(Φ)₅-RKLMEII-NH₂ (38)

Après le clivage, ces composés ont été purifiés (ici la purification de **38** a été facilitée par la présence plus importante d'acides aminés dans la chaîne peptidique) et on obtient 14.2 mg (2.2 %) de **(37)** et 11.5 mg (2 %) de **(38)**.

I 3 : Synthèse des molécules hybrides analogues du 9-41 hCRF

Afin de générer des hybrides pseudo-peptidiques du 9-41 hCRF, nous nous sommes appuyés sur les résultats de la littérature concernant les analogues peptidiques de l'hélicale 9-41 CRF. Comme pour le hCRF, nous avons dans tous les cas conservé la partie C-terminale composée des sept derniers résidus. Nous avons mis en place deux stratégies différentes en fonction de la nature du motif qui compose l'hélice artificielle.

Pour le motif C5, nous avons réduit au fur et à mesure la longueur de la partie peptidique en compensant cette perte de taille par des séquences de plus en plus longues de poly C5.



En appliquant ce modèle, nous avons synthétisés les molécules suivantes :

- H-(C5)₄-LLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMEII-NH₂ (39)
- H-(C5)₈-LEMARAEQLAQQAHSNRKLMEII-NH₂ (40)
- H-(C5)₁₁-AEQLAQQAHSNRKLMEII-NH₂ (41)
- H-(C5)₁₄-QQAHSNRKLMEII-NH₂ (42)
- H-(C5)₁₈-NRKLMEII-NH₂ (43)

Pour le motif ortho, nous avons seulement conservé les sept derniers acides aminés et nous avons graduellement augmenté la taille des poly-ortho afin d'obtenir des séquences de différentes longueurs.



En appliquant ce modèle, nous avons synthétisés les molécules suivantes :

- $\text{H-(}\Phi\text{)}_{11}\text{-RKLMEII-NH}_2$ (46)
- $\text{H-(}\Phi\text{)}_{10}\text{-RKLMEII-NH}_2$ (45)
- $\text{H-(}\Phi\text{)}_9\text{-RKLMEII-NH}_2$ (44)
- $\text{H-(}\Phi\text{)}_8\text{-RKLMEII-NH}_2$ (50)
- $\text{H-(}\Phi\text{)}_7\text{-RKLMEII-NH}_2$ (49)
- $\text{H-(}\Phi\text{)}_5\text{-RKLMEII-NH}_2$ (48)
- $\text{H-(}\Phi\text{)}_3\text{-RKLMEII-NH}_2$ (47)

La synthèse des molécules hybrides du $_{9-41}$ hCRF a été réalisée sur support solide. Nous avons ici axé nos recherches sur les hybrides de type antagoniste dont les résultats pharmacologiques seront présentés dans la quatrième partie.

I 3 1 : Incorporation de (C5)_x dans la séquence du $_{9-41}$ hCRF

Nous sommes partis de la séquence du 9-41hCRF et nous avons substitué des longueurs croissantes d'acides aminés de l'extrémité N-terminale par des enchaînements de motifs C5 de longueur croissante afin de conserver une taille totale du peptide équivalente à celle de l'hybride peptidique.

Nous voulions automatiser la synthèse, nous avons donc choisi d'utiliser une stratégie Fmoc. Les synthèses ont été réalisées sur le robot ACT en utilisant les mêmes conditions que pour la synthèse du 9-41hCRF. Pour la synthèse du $_{9-41}$ hCRF, la résine est de type Rink amide, les temps de couplage sont de 90 minutes et celui de la déprotection du groupement Fmoc est de 20 minutes. Des doubles couplages sont réalisés à chaque étape.

Ces résines sont clivées par le TFA en présence de scavengers. Le schéma de synthèse suivit pour ces molécules est le même que celui décrit dans le chapitre consacré aux généralités sur la synthèse peptidique en phase solide.

Les rendements obtenus sont compilés dans le **Tableau 6**.

	Masse Brute (mg)	Rdt (%)	Masse Purifiée (mg)	Rdt Purifié (%)	M (g.mol ⁻¹)
(39) H-(C5) ₄ -LLREVLEMARAEQLAQQAHNRKLM EII-NH ₂	265	82	10.5	3.2	3847
(40) H-(C5) ₈ -LEMARAEQLAQQAHNRKLM EII-NH ₂	286	89	12	3.7	3797
(41) H-(C5) ₁₁ -AEQLAQQAHNRKLM EII-NH ₂	246	80	22.9	7.4	3617
(42) H-(C5) ₁₄ -QQAHNRKLM EII-NH ₂	264	89	16.6	5.6	3525
(43) H-(C5) ₁₈ -NRKLM EII-NH ₂	251	87	32.7	11.3	3434

Tableau 6 : Quantités, rendements et puretés obtenues

Le double couplage et le temps de mise en réaction (90 min) ont permis de réduire les délétions des résidus C5. Les rendements sont corrects pour des séquences de cette taille et de cette nature.

I 3 1 : Incorporation de (ortho)_x dans la séquence du 9-41 hCRF

Nous avons choisis dans le cas de l'incorporation de motifs ortho dans la séquence du 9-41 hCRF en gardant comme partie peptidique, les 7 derniers résidus de la partie C-terminale et d'introduire des longueurs variables d'enchaînements de résidus ortho. Nous avons dans un premier temps, synthétisé selon une stratégie Fmoc des hybrides contenant 9, 10 et 11 ortho et dans un deuxième temps, synthétisé en stratégie Boc, ceux contenant 3, 5, 7 et 8 ortho.

▪ **Synthèse de H-(Φ)₉-RKLMEII-NH₂ (44), H-(Φ)₁₀-RKLMEII-NH₂ (45) et H-(Φ)₁₁-RKLMEII-NH₂ (46)**

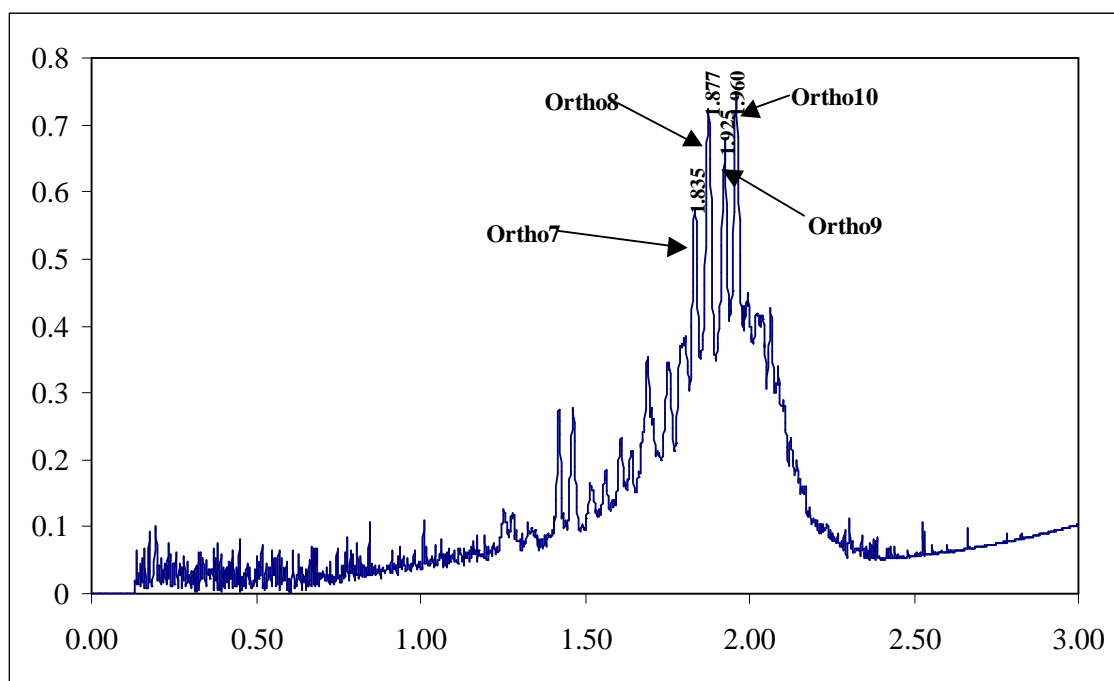
Nous voulions dans un premier temps, synthétiser les hybrides contenant 10 et 11 résidus ortho ; mais les délétions obtenues lors des synthèses (**Graphes 4 et 5**), ont permis lors de la purification, de pouvoir isoler du brut réactionnel le composé possédant 9 ortho (**44**).

La partie peptidique a été montée sur le synthétiseur et les résidus ortho ont été insérés manuellement sous la forme de Fmoc-ortho-OH. L'agent de couplage est l'HBTU pour toute la synthèse.

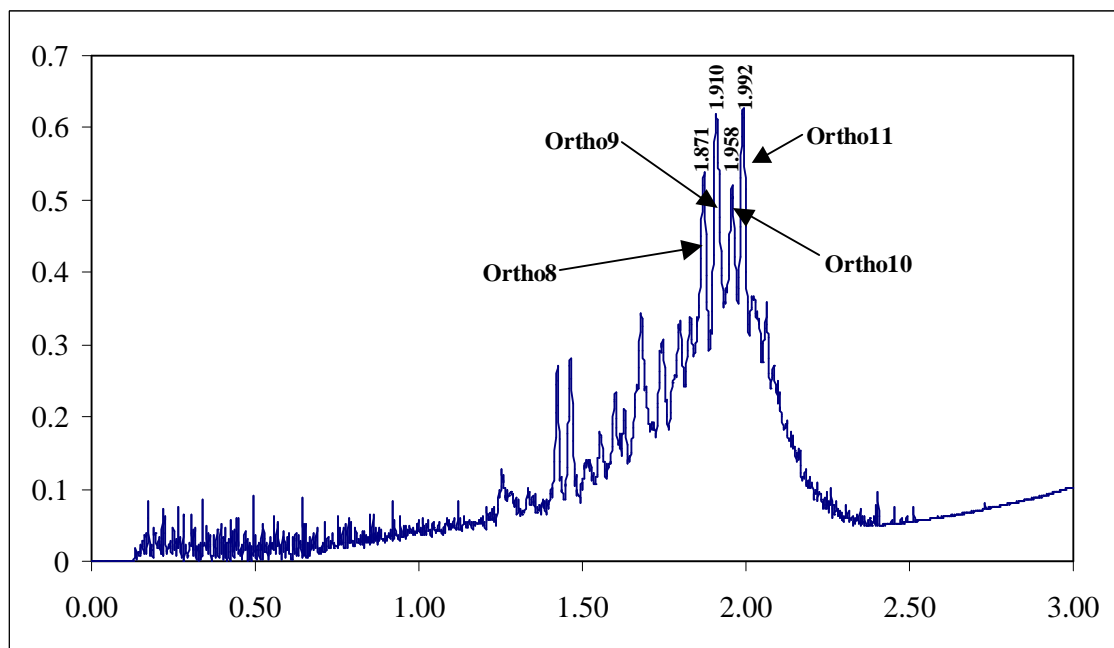
Les rendements obtenus sont compilés dans **Tableau 7**.

	Masse Brute (mg)	Rdt (%)	Masse Purifiée (mg)	Rdt Purifié (%)	M (g.mol ⁻¹)
(43) H-(Φ) ₉ -RKLMEII-NH ₂			5.5		2225
(44) H-(Φ) ₁₀ -RKLMEII-NH ₂	110	51	7.4	3.5	2372
(45) H-(Φ) ₁₁ -RKLMEII-NH ₂	106	47	5.5	2.4	2519

Tableau 7 : Quantités, rendements et puretés obtenues



graphe 4 : Profil HPLC de H-(Φ)₁₀-RKLMEII-NH₂ (λ=214 nm ; 0 à 100 % d'ACN en 3 min)



graphe 5 : Profil HPLC de H-(Φ)₁₁-RKLMEII-NH₂ (λ=214 nm ; 0 à 100 % d'ACN en 3 min)

Les deux profils HPLC (ci-dessus) montrent que les rendements des couplages des résidus ortho n'ont pas été quantitatifs. Nous avons cependant pu séparer lors des purifications les molécules les plus abondantes.

- Synthèse de H-(Φ)₃-RKLMEII-NH₂ (47), H-(Φ)₅-RKLMEII-NH₂ (48), H-(Φ)₇-RKLMEII-NH₂ (49) et H-(Φ)₈-RKLMEII-NH₂ (50)

Les profils HPLC obtenues lors des synthèses précédentes, nous ont emmené à changer de stratégie. Nous avons donc utilisé une stratégie Boc qui s'est avérée être la plus efficace pour incorporer les résidus Ortho lors des synthèses des hybrides du hCRF.

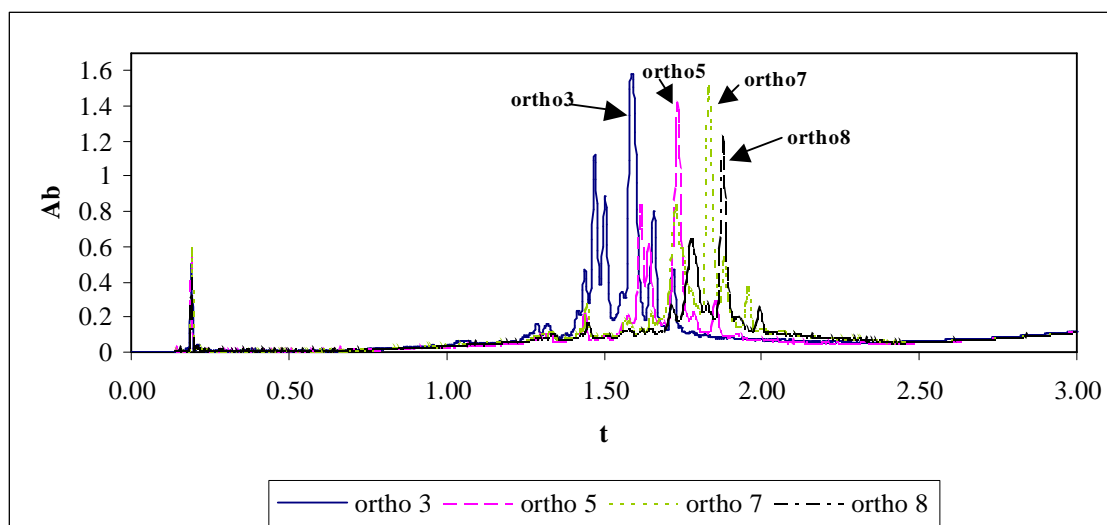
Nous avons utilisé une résine MBHA, l'agent de couplage pour toute la synthèse est le BOP et nous avons utilisé 4 eq d'acide aminé et 3 eq de Boc-ortho-OH. Après chaque couplage d'un résidu Boc-ortho-OH nous avons réalisé un capping par Ac₂O.

Les peptides sont décrochés de leur support par un traitement au HF sans anisole. Les rendements obtenus sont compilés dans le **Tableau 8**.

	Masse Brute (mg)	Rdt (%)	Masse purifiée	Rdt purifié	M (g.mol ⁻¹)
(46) H-(Φ) ₃ -RKLMEII-NH ₂	130	84	18	11.6	1343
(47) H-(Φ) ₅ -RKLMEII-NH ₂	170	83	54	26.3	1635
(48) H-(Φ) ₇ -RKLMEII-NH ₂	150	68	35	15.9	1931
(49) H-(Φ) ₈ -RKLMEII-NH ₂	150	63	25.7	10.8	2078

Tableau 8 : Quantités, rendements et puretés obtenues

Les différents résultats obtenus montrent que la stratégie Boc augmente nettement les rendements et que les synthèses sont plus propres. Cela est vérifiable dans le graphe ci-dessous, où sont représentés les quatre profils HPLC des bruts réactionnels.



graphe 6 : Profils HPLC de 47, 48, 49 et 50 ($\lambda=214$ nm ; 0 à 100 % d'ACN en 3 min)

Tous ces composés ont été testés pour leur affinité pour le récepteur du CRF et certains d'entre eux ont été testés pour leur activité biologique.

II : mode opératoire

II 1 : synthèse des peptides de référence

II 1 1 : Le hCRF (25)

La séquence du hCRF est la suivante :



Nous avons utilisé 400 mg de résine de type Fmoc-PAL-PEG-PS substituée à 0,360 mmol/g (0.144 mmol), 4 équivalents d'acides-amino, l'HBTU comme agent de couplage et de la DIEA comme base. Les temps de couplage sont d'une heure et celui de la déprotection du groupement Fmoc est de 5 minutes. Les lavages sont effectués par du DMF.

La synthèse est présentée dans le **Tableau 9**.

n	AA	Dérivé	DC	quantité	n	AA	Dérivé	DC	quantité
1	Ile	Fmoc-Ile-OH	oui	204 mg	22	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH		245 mg
2	Ile	Fmoc-Ile-OH		204 mg	23	Leu	Fmoc-Leu-OH		204 mg
3	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	oui	245 mg	24	Val	Fmoc-Val-OH		195 mg
4	Met	Fmoc-Met-OH		214 mg	25	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	oui	245 mg
5	Leu	Fmoc-Leu-OH		204 mg	26	Arg	Fmoc-Arg(Pmc)-OH		382 mg
6	Lys	Fmoc-Lys(Boc)-OH		270 mg	27	Leu	Fmoc-Leu-OH		204 mg
7	Arg	Fmoc-Arg(Pmc)-OH	oui	382 mg	28	Leu	Fmoc-Leu-OH		204 mg
8	Asn	Fmoc-Asn(Trt)-OH		344 mg	29	His	Fmoc-His(Trt)-OH	oui	357 mg
9	Ser	Fmoc-Ser(tBu)-OH		221 mg	30	Phe	Fmoc-Phe-OH		223 mg
10	His	Fmoc-His(Trt)-OH		357 mg	31	Thr	Fmoc-Thr(tBu)-OH		229 mg
11	Ala	Fmoc-Ala-OH		179 mg	32	Leu	Fmoc-Leu-OH		204 mg
12	Gln	Fmoc-Gln(Trt)-OH		352 mg	33	Asp	Fmoc-Asp(OtBu)-OH		237 mg
13	Gln	Fmoc-Gln(Trt)-OH		352 mg	34	Leu	Fmoc-Leu-OH		204 mg
14	Ala	Fmoc-Ala-OH		179 mg	35	Ser	Fmoc-Ser(tBu)-OH		221 mg
15	Leu	Fmoc-Leu-OH		204 mg	36	Ile	Fmoc-Ile-OH		204 mg
16	Gln	Fmoc-Gln(Trt)-OH	oui	352 mg	37	Pro	Fmoc-Pro-OH	oui	194 mg
17	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH		245 mg	38	Pro	Fmoc-Pro-OH	oui	194 mg
18	Ala	Fmoc-Ala-OH		179 mg	39	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	oui	245 mg
19	Arg	Fmoc-Arg(Pmc)-OH		382 mg	40	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH		245 mg
20	Ala	Fmoc-Ala-OH		179 mg	41	Ser	Fmoc-Ser(tBu)-OH		221 mg
21	Met	Fmoc-Met-OH		214 mg					

Tableau 9 : Nature et quantité des résidus utilisés. AA : Acide Aminé ; DC : Double Couplage

Après une dernière étape de déprotection du Fmoc, la résine est séchée puis le peptide est décroché de son support et les protections des chaînes latérales sont éliminées par l'action du mélange TFA/TIS/EAU (95/2.5/2.5) pendant 4 heures. On obtient 502 mg de produit brut (rdt : 73 %) avec une pureté HPLC de 42 %. La purification HPLC préparative est réalisée en deux lots (240 et 260 mg), on obtient 120mg de peptide pur (rdt : 17.5 %).

Caractérisation ESI : (M+4H⁺)/4 : 1190.1 ; (M+5H⁺)/5 : 952.5 → **M : 4757 g.mol⁻¹**

II 1 2 : Le ₉₋₄₁ hCRF (26)

La séquence du ₉₋₄₁ hCRF est la suivante :

H-DLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMEII-NH₂ (25)

Nous sommes partis de 120 mg de résine Rink amide substituée à 0,7 mmol/g (0,084 mmol), l'agent de couplage est l'HBTU, 4 équivalents d'une solution 0,5M d'acide aminé dans la NMP sont utilisés et un double couplage pour chaque étape. Le temps d'un couplage est de 90 minutes et celui de déprotection de 20 minutes. Les conditions sont résumées dans le

Tableau 10

H-DLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMEII-NH₂ (25)								
n	AA	Dérivé	n	AA	Dérivé	n	AA	Dérivé
1	Ile	Fmoc-Ile-OH	12	Gln	Fmoc-Gln(Trt)-OH	23	Leu	Fmoc-Leu-OH
2	Ile	Fmoc-Ile-OH	13	Gln	Fmoc-Gln(Trt)-OH	24	Val	Fmoc-Val-OH
3	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	14	Ala	Fmoc-Ala-OH	25	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH
4	Met	Fmoc-Met-OH	15	Leu	Fmoc-Leu-OH	26	Arg	Fmoc-Arg(Pmc)-OH
5	Leu	Fmoc-Leu-OH	16	Gln	Fmoc-Gln(Trt)-OH	27	Leu	Fmoc-Leu-OH
6	Lys	Fmoc-Lys(Boc)-OH	17	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	28	Leu	Fmoc-Leu-OH
7	Arg	Fmoc-Arg(Pmc)-OH	18	Ala	Fmoc-Ala-OH	29	His	Fmoc-His(Trt)-OH
8	Asn	Fmoc-Asn(Trt)-OH	19	Arg	Fmoc-Arg(Pmc)-OH	30	Phe	Fmoc-Phe-OH
9	Ser	Fmoc-Ser(tBu)-OH	20	Ala	Fmoc-Ala-OH	31	Thr	Fmoc-Thr(tBu)-OH
10	His	Fmoc-His(Trt)-OH	21	Met	Fmoc-Met-OH	32	Leu	Fmoc-Leu-OH
11	Ala	Fmoc-Ala-OH	22	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	33	Asp	Fmoc-Asp(OtBu)-OH

Tableau 10 : Nature des résidus utilisés. AA : Acide Aminé

Pour décrocher le peptide de son support, on utilise le même protocole que pour le hCRF. On obtient 153 mg de produit brut (rdt : 46.7 %) avec une pureté HPLC de 42 %. Après purification, on obtient 5.2 mg de peptide pur (rdt : 1.6 %).

Caractérisation ESI : $(M+3H^+)/3$: 1302.3 ; $(M+4H^+)/4$: 977.0 → **M : 3904 g.mol⁻¹**

II 2 : Les hybrides peptidiques

II 2 1 : Incorporation de (Ala-Gly)_x

▪ SEEPP-(AG)₁₄-ARKLMEII-NH₂ (27)

Nous avons utilisé 400 mg de résine de type Fmoc-PAL-PEG-PS substituée à 0,360 mmol/g (0.144mmol), 4 équivalents d'amino-acides, l'HBTU comme agent de couplage et de la DIEA comme base. Les conditions sont résumées dans le **Tableau 11**

n	AA	Dérivé	DC	quantité	n	AA	Dérivé	DC	quantité
1	Ile	Fmoc-Ile-OH	oui	204 mg	impair 9 à 35	Gly	Fmoc-Gly-OH		171 mg
2	Ile	Fmoc-Ile-OH		204 mg	36	Ala	Fmoc-Ala-OH	oui	179 mg
3	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH		245 mg	37	Pro	Fmoc-Pro-OH	oui	194 mg
4	Met	Fmoc-Met-OH		214 mg	38	Pro	Fmoc-Pro-OH		194 mg
5	Leu	Fmoc-Leu-OH		204 mg	39	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH		245 mg
6	Lys	Fmoc-Lys(Boc)-OH		270 mg	40	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH		245 mg
7	Arg	Fmoc-Arg(Pmc)-OH		382 mg	41	Ser	Fmoc-Ser(tBu)-OH		221 mg
pair 8 à 34	Ala	Fmoc-Ala-OH		179 mg					

Tableau 11 : Nature et quantité des résidus utilisés. AA : Acide Aminé ; DC : Double Couplage

Pour décrocher le peptide de son support, on utilise le même protocole que pour le hCRF. On obtient 260 mg de produit brut (rdt : 54 %) avec une pureté HPLC de 82 %. Après purification, on obtient 58 mg de peptide pur (rdt : 12.2 %).

Caractérisation ESI : (M+3H⁺)/3 : 1102.7 ; (M+4H⁺)/4 : 827.3 → **M : 3305 g.mol⁻¹**

▪ SEEPP-(AG)₂₀-RKLMEII-NH₂ (28)

Nous avons utilisé 400 mg de résine de type Fmoc-PAL-PEG-PS substituée à 0,360 mmol/g (0.144 mmol), 4 équivalents d'amino-acides, l'HBTU comme agent de couplage et de la DIEA comme base. Les conditions sont résumées dans le **Tableau 12**

n	AA	Dérivé	DC	quantité	n	AA	Dérivé	DC	quantité
1	Ile	Fmoc-Ile-OH	oui	204 mg	impair 8 à 46	Gly	Fmoc-Gly-OH		171 mg
2	Ile	Fmoc-Ile-OH		204 mg	pair 9 à 47	Ala	Fmoc-Ala-OH		179 mg
3	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH		245 mg	48	Pro	Fmoc-Pro-OH	oui	194 mg
4	Met	Fmoc-Met-OH		214 mg	49	Pro	Fmoc-Pro-OH	oui	194 mg
5	Leu	Fmoc-Leu-OH		204 mg	50	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH		245 mg
6	Lys	Fmoc-Lys(Boc)-OH		270 mg	51	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH		245 mg
7	Arg	Fmoc-Arg(Pmc)-OH		382 mg	52	Ser	Fmoc-Ser(tBu)-OH		221 mg

Tableau 12 : Nature et quantité des résidus utilisés. AA : Acide Aminé ; DC : Double Couplage

Pour décrocher le peptide de son support, on utilise le même protocole que pour le hCRF. On obtient 312 mg de produit brut (rdt : 54 %) avec une pureté HPLC de 78 %. Après purification, on obtient 42 mg de peptide pur (rdt : 7.3 %).

Caractérisation ESI : $(M+3H^+)/3$: 1335.0 ; $(M+4H^+)/4$: 1001.6 \rightarrow **M : 4003 g.mol⁻¹**

II 2 2 : Incorporation de (Gly-Pro)_x

▪ SEEPP-(GP)₁₄-GRKLMEII-NH₂ (29)

Nous avons utilisé 300 mg de résine de type Fmoc-PAL-PEG-PS substituée à 0,360 mmol/g (0.108 mmol), 4 équivalents d'acides-amino, l'HBTU comme agent de couplage et de la DIEA comme base. Les conditions sont résumées dans le **Tableau 13**

n	AA	Dérivé	DC	quantité	n	AA	Dérivé	DC	quantité
1	Ile	Fmoc-Ile-OH	oui	153 mg	pair 8 à 36	Gly	Fmoc-Gly-OH	oui	128 mg
2	Ile	Fmoc-Ile-OH		153 mg	impair 9 à 35	Pro	Fmoc-Pro-OH		146 mg
3	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH		184 mg	37	Pro	Fmoc-Pro-OH	oui	146 mg
4	Met	Fmoc-Met-OH		160 mg	38	Pro	Fmoc-Pro-OH		146 mg
5	Leu	Fmoc-Leu-OH		153 mg	39	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	oui	184 mg
6	Lys	Fmoc-Lys(Boc)-OH		202 mg	40	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH		184 mg
7	Arg	Fmoc-Arg(Pmc)-OH		286 mg	41	Ser	Fmoc-Ser(tBu)-OH		221 mg

Tableau 13 : Nature et quantité des résidus utilisés. AA : Acide Aminé ; DC : Double Couplage

Pour décrocher le peptide de son support, on utilise le même protocole que pour le hCRF. On obtient 310 mg de produit brut (rdt : 78 %) avec une pureté HPLC de 91 %. Après purification, on obtient 116 mg de peptide pur (rdt : 29.4 %).

Caractérisation ESI : $(M+3H^+)/3$: 1219.3 ; $(M+4H^+)/4$: 914.8 \rightarrow **M : 3656 g.mol⁻¹**

▪ SEEPP-(GP)₁₈-RKLMEII-NH₂ (30)

Nous avons utilisé 300 mg de résine de type Fmoc-PAL-PEG-PS substitués à 0,360 mmol/g (0.108 mmol), 4 équivalents d'acides-amino, l'HBTU comme agent de couplage et de la DIEA comme base. Les conditions sont résumées dans le **Tableau 14**

n	AA	Dérivé	DC	quantité	n	AA	Dérivé	DC	quantité
1	Ile	Fmoc-Ile-OH	oui	153 mg	impair 8 à 42	Pro	Fmoc-Pro-OH		146 mg
2	Ile	Fmoc-Ile-OH		153 mg	pair 9 à 43	Gly	Fmoc-Gly-OH	oui	128 mg
3	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH		184 mg	44	Pro	Fmoc-Pro-OH	oui	146 mg
4	Met	Fmoc-Met-OH		160 mg	45	Pro	Fmoc-Pro-OH		146 mg
5	Leu	Fmoc-Leu-OH		153 mg	46	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	oui	184 mg
6	Lys	Fmoc-Lys(Boc)-OH		202 mg	47	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH		184 mg
7	Arg	Fmoc-Arg(Pmc)-OH		286 mg	48	Ser	Fmoc-Ser(tBu)-OH		221 mg

Tableau 14 : Nature et quantité des résidus utilisés. AA : Acide Aminé ; DC : Double Couplage

Pour décrocher le peptide de son support, on utilise le même protocole que pour le hCRF. On obtient 402 mg de produit brut (rdt : 88 %) avec une pureté HPLC de 85 %. Après purification, on obtient 95 mg de peptide pur (rdt : 20.8 %).

Caractérisation ESI : $(M+3H^+)/3$: 1405.9 ; $(M+4H^+)/4$: 1054.8 \rightarrow **M : 4215 g.mol⁻¹**

II 3 : Les hybrides pseudo-peptidiques du hCRF

II 3 1 : Incorporation de (C5)_x (Modèle 1)

▪ Synthèse de SEEPP-(C5)₂₀-RKLMEII-NH₂ (31)

○ Par Blocs (stratégie Fmoc)

Nous sommes donc partis de 600 mg d'une résine type PAL-PEG-PS substituée à 190 mmol/g (114 mmol). Les couplages des fragments Fmoc-(C5)₅-OH ont été longs (2 fois 24 heures). Les conditions sont résumées dans le **Tableau 15**.

n	AA	Dérivé	Agent de couplage	Temps de couplage	Eq	quantité
1	Ile	Fmoc-Ile-OH	HBTU	2 x 1 Heure	5	201 mg
2	Ile	Fmoc-Ile-OH	HBTU	2 x 1 Heure	5	201 mg
3	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	HBTU	2 x 1 Heure	5	243 mg
4	Met	Fmoc-Met-OH	HBTU	2 x 1 Heure	5	212 mg
5	Leu	Fmoc-Leu-OH	HBTU	2 x 1 Heure	5	201 mg
6	Lys	Fmoc-Lys(Boc)-OH	HBTU	2 x 1 Heure	5	267 mg
7	Arg	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	HBTU	2 x 1 Heure	5	370 mg
8 à 12	(C5) ₅	Fmoc-(C5) ₅ -OH	BOP	2 x 24 Heures	2	228 mg
13 à 17	(C5) ₅	Fmoc-(C5) ₅ -OH	BOP	2 x 24 Heures	2	228 mg
18 à 22	(C5) ₅	Fmoc-(C5) ₅ -OH	BOP	2 x 24 Heures	2	228 mg
23 à 27	(C5) ₅	Fmoc-(C5) ₅ -OH	BOP	2 x 24 Heures	2	228 mg
28	Pro	Fmoc-Pro-OH	HBTU	2 x 1 Heure	4	154 mg
29	Pro	Fmoc-Pro-OH	HBTU	2 x 1 Heure	4	154 mg
30	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	HBTU	2 x 1 Heure	4	194 mg
31	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	HBTU	2 x 1 Heure	4	194 mg
32	Ser	Fmoc-Ser(tBu)-OH	HBTU	2 x 1 Heure	4	175 mg

Tableau 15 : Nature et quantité des résidus utilisés. AA : Acide Aminé ; Eq : nombre d'équivalents

Le peptide est décroché de son support et les protections des chaînes latérales sont éliminées par l'action du mélange TFA/Thioanisole (95/5) pendant 2 heures. Le reste du traitement est le même que pour le hCRF. On obtient 253mg de produit brut (rdt : 52 %) ; le profil HPLC et l'analyse LC-MS nous donne une pureté de 26.9 % pour le produit attendu dont les pics caractéristiques en masse sont : (M+3H⁺)/3 :1415,55 ; (M+4H⁺)/4 :1061,84 ; (M+5H⁺)/5 :849,59 → **M : 4242 g.mol⁻¹**.

○ Pas à pas (stratégie Fmoc)

Nous avons utilisé 500 mg de résine de type Fmoc-PAL-PEG-PS substituée à 0,190 mmol/g (0.095 mmol), 4 équivalents pour chaque résidu et l'HBTU comme agent de couplage. Les conditions sont résumées dans le **Tableau 16**.

n	AA	Dérivé	Temps de couplage	quantité
1	Ile	Fmoc-Ile-OH	2 x 1 Heure	134 mg
2	Ile	Fmoc-Ile-OH	2 x 1 Heure	134 mg
3	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	2 x 1 Heure	162 mg
4	Met	Fmoc-Met-OH	2 x 1 Heure	141 mg
5	Leu	Fmoc-Leu-OH	2 x 1 Heure	134 mg
6	Lys	Fmoc-Lys(Boc)-OH	2 x 1 Heure	178 mg
7	Arg	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	2 x 1 Heure	247 mg
8 à 27	C5	Fmoc-C5-OH	2 x 1 Heure	144 mg
28	Pro	Fmoc-Pro-OH	2 x 1 Heure	128 mg
29	Pro	Fmoc-Pro-OH	2 x 1 Heure	128 mg
30	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	2 x 1 Heure	162 mg
31	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	2 x 1 Heure	162 mg
32	Ser	Fmoc-Ser(tBu)-OH	2 x 1 Heure	146 mg

Tableau 16 : Nature et quantité des résidus utilisés. AA : Acide Aminé

Pour décrocher le peptide de son support, on utilise le même protocole que la stratégie par blocs. On obtient 240 mg de produit brut (rdt : 60 %) ; le profil HPLC et l'analyse LC-MS nous donne une pureté de 65,3 % pour le produit attendu. Nous n'avons purifié que la moitié du produit obtenu et nous avons obtenu 25.4 mg (rdt : 12.7 %). L'analyse ESI (ci-dessous) montre qu'il y a trois composés dont les masses sont : 4102 g/mol ; 4242 g/mol et 4382 g/mol dans les proportions 29 % ; 51,5 % et 19,5 %.

▪ **Synthèse de SEEAA-(C5)₂₁-RKLMEII-NH₂ (32)**

Nous avons utilisé 500 mg de résine de type Fmoc-PAL-PEG-PS substituée à 0,190 mmol/g (0.095 mmol). Les conditions sont résumées dans le **Tableau 17**.

n	AA	Dérivé	Agent de couplage	Temps de couplage	Eq	quantité
1	Ile	Fmoc-Ile-OH	HBTU	2 x 1 Heure	4	134 mg
2	Ile	Fmoc-Ile-OH	HBTU	2 x 1 Heure	4	134 mg
3	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	HBTU	2 x 1 Heure	4	162 mg
4	Met	Fmoc-Met-OH	HBTU	2 x 1 Heure	4	141 mg
5	Leu	Fmoc-Leu-OH	HBTU	2 x 1 Heure	4	134 mg
6	Lys	Fmoc-Lys(Boc)-OH	HBTU	2 x 1 Heure	4	178 mg
7	Arg	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	HBTU	2 x 1 Heure	4	247 mg
8 à 12	(C5) ₅	Fmoc-(C5) ₅ -OH	BOP	2 x 24 Heures	3	268 mg
13 à 17	(C5) ₅	Fmoc-(C5) ₅ -OH	BOP	2 x 24 Heures	3	268 mg
18 à 29	(C5) ₅	Fmoc-C5-OH	HBTU	2 x 1 Heure	4	228 mg
29	Ala	Fmoc-Ala-OH	HBTU	2 x 1 Heure	4	118 mg
30	Ala	Fmoc-Ala-OH	HBTU	2 x 1 Heure	4	118 mg
31	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	HBTU	2 x 1 Heure	4	194 mg
32	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	HBTU	2 x 1 Heure	4	194 mg
33	Ser	Fmoc-Ser(tBu)-OH	HBTU	2 x 1 Heure	4	175 mg

Tableau 17 : Nature et quantité des résidus utilisés. AA : Acide Aminé ; Eq : nombre d'équivalents

Pour décrocher le peptide de son support, on utilise le même protocole que la stratégie par blocs. On obtient 240 mg de produit brut (rdt : 58 %) ; le profil HPLC et l'analyse LC-MS nous donne une pureté de 45,6 % pour le produit attendu dont les pics caractéristiques en

masse sont : $(M+3H^+)/3$: 1444,5 ; $(M+4H^+)/4$: 1083,9 ; $(M+5H^+)/5$: 867,4 → **M : 4327 g.mol⁻¹**.

II 3 2 : Incorporation de (Ortho)_x (Modèle 1)

▪ Synthèse de SEEPP-(Φ)₁₂-RKLMEII-NH₂ (33)

○ Stratégie Fmoc sur synthétiseur

Nous avons donc synthétisé SEEPP-(Φ)₁₂-RKLMEII-NH₂ en utilisant 500 mg de résine PAL-PEG-PS substituée à 0,190 mmol/g (0,095 mmol), 5 eq pour chaque résidu avec comme agent de couplage le HBTU en présence de DIEA sur le synthétiseur automatique. Les conditions sont résumées dans le **Tableau 18**.

n	AA	Dérivé	Temps de couplage	quantité
1	Ile	Fmoc-Ile-OH	2 x 1 Heure	168 mg
2	Ile	Fmoc-Ile-OH	2 x 1 Heure	168 mg
3	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	2 x 1 Heure	202 mg
4	Met	Fmoc-Met-OH	2 x 1 Heure	176 mg
5	Leu	Fmoc-Leu-OH	2 x 1 Heure	168 mg
6	Lys	Fmoc-Lys(Boc)-OH	2 x 1 Heure	223 mg
7	Arg	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	2 x 1 Heure	308 mg
8 à 19	Ortho	Fmoc-ortho-OH	2 x 1 Heure	184 mg
20	Pro	Fmoc-Pro-OH	2 x 1 Heure	160 mg
21	Pro	Fmoc-Pro-OH	2 x 1 Heure	160 mg
22	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	2 x 1 Heure	202 mg
23	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	2 x 1 Heure	202 mg
24	Ser	Fmoc-Ser(tBu)-OH	2 x 1 Heure	182 mg

Tableau 18 : Nature et quantité des résidus utilisés. AA : Acide Aminé

Le peptide est décroché de son support et les protections des chaînes latérales sont éliminées par l'action du mélange TFA/Thioanisole (95/5) pendant 2 heures. La faible solubilité dans l'acétonitrile, nous a obligé à ajouter une grande quantité de DMF pour solubiliser le peptide. On obtient 146 mg de produit brut (rdt : 48 %).

○ Stratégie Fmoc dans un réacteur manuel

Nous sommes partis de 800 mg de résine PAL-PEG-PS substituée à 0,190 mmol/g (0,152 mmol). La partie peptidique N-terminale a été synthétisé sur la moitié de la résine (500 mg ; 0,076 mmol). Les conditions sont résumées dans le **Tableau 19**.

n	AA	Dérivé	Agent de couplage	Temps de couplage	Eq	quantité
1	Ile	Fmoc-Ile-OH	HBTU	2 x 1 Heure	4	215 mg
2	Ile	Fmoc-Ile-OH	HBTU	2 x 1 Heure	4	215 mg
3	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	HBTU	2 x 1 Heure	4	259 mg
4	Met	Fmoc-Met-OH	HBTU	2 x 1 Heure	4	226 mg
5	Leu	Fmoc-Leu-OH	HBTU	2 x 1 Heure	4	215 mg
6	Lys	Fmoc-Lys(Boc)-OH	HBTU	2 x 1 Heure	4	285 mg
7	Arg	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	HBTU	2 x 1 Heure	4	394 mg
8 et 9	Ortho	Fmoc-ortho-OH	BOP	1 x 3 Heures	3	176 mg
10 à 16	Ortho	Fmoc-ortho-OH	BOP	1 x 12 Heures	3	176 mg
17 à 19	Ortho	Fmoc-ortho-OH	BOP	2 x 12 Heures	3	176 mg
20	Pro	Fmoc-Pro-OH	BOP	2 x 2 Heures	3	77 mg
21	Pro	Fmoc-Pro-OH	BOP	2 x 2 Heures	3	77 mg
22	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	BOP	2 x 2 Heures	3	84 mg
23	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	BOP	2 x 2 Heures	3	84 mg
24	Ser	Fmoc-Ser(tBu)-OH	BOP	2 x 2 Heures	3	87 mg

Tableau 19 : Nature et quantité des résidus utilisés. AA : Acide Aminé ; Eq : nombre d'équivalents

Les conditions de clivages sont les mêmes que celle utilisées précédemment. On obtient 124 mg de produit brut (rdt : 51 %).

▪ **Synthèse de SEEAA-(Φ)₁₂-RKLMEII-NH₂ (34)**

○ Stratégie Fmoc dans un réacteur manuel

Nous avons réalisé la synthèse sur l'autre moitié du lot de résine utilisée précédemment (500 mg ; 0,076 mmol). Les conditions sont résumées dans le **Tableau 20**.

n	AA	Dérivé	Agent de couplage	Temps de couplage	Eq	quantité
20	Ala	Fmoc-Ala-OH	BOP	2 x 2 Heures	3	71 mg
21	Ala	Fmoc-Ala-OH	BOP	2 x 2 Heures	3	71 mg
22	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	BOP	2 x 2 Heures	3	84 mg
23	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	BOP	2 x 2 Heures	3	84 mg
24	Ser	Fmoc-Ser(tBu)-OH	BOP	2 x 2 Heures	3	87 mg

Tableau 20 : Nature et quantité des résidus utilisés. AA : Acide Aminé ; Eq : nombre d'équivalents

Les conditions de décrochage du peptide et de traitement sont les mêmes que celles utilisées précédemment. On obtient 95 mg de produit brut (rdt : 40 %) dont les pics caractéristiques en masse sont : (M+3H⁺)/3 : 1052,1 ; (M+4H⁺)/4 : 789,7 ; → **M : 3203 g.mol⁻¹**.

Produit purifié : 5,5 mg (2,3 %) avec une pureté HPLC de 86 %.

▪ **Synthèse de SEEPP-(Φ)₁₂-RKLMEII-NH₂**

○ Stratégie Boc dans un réacteur manuel

Nous avons utilisé 400 mg de résine MBHA substituée à 0.8 mmol/g (0,32 mmol). Les conditions sont résumées dans le **Tableau 21**.

n	AA	Dérivé	Agent de couplage	Temps de couplage	Eq	quantité
1	Ile	Boc-Ile-OH	HBTU	1+1 H	5	384 mg
2	Ile	Boc-Ile-OH	HBTU	1+1 H	5	384 mg
3	Glu	Boc-Glu(Ochx)-OH	HBTU	1+12 H	5	525 mg
4	Met	Boc-Met-OH	HBTU	1+1 H	5	390 mg
5	Leu	Boc-Leu-OH	HBTU	1,5+1 H	5	390 mg
6	Lys	Boc-Lys(2CIZ)-OH	HBTU	1+12 H	5	665 mg
7	Arg	Boc-Arg(Tos)-OH	HBTU	1+2+1 H	5	685 mg
8	Ortho	Boc-ortho-OH	HBTU	3+3 H	2	170 mg
9 à 19	Ortho	Boc-ortho-OH	BOP	3 H	2	170 mg
20	Pro	Boc-Pro-OH	HBTU	1+1 H	5	344 mg
21	Pro	Boc-Pro-OH	BOP	1+1 H	5	344 mg
22	Glu	Boc-Glu(Ochx)-OH	BOP	1+1 H	5	525 mg
23	Glu	Boc-Glu(Ochx)-OH	BOP	1+1 H	5	525 mg
24	Ser	Boc-Ser(Bzl)-OH	BOP	1+1 H	5	472 mg

Tableau 21 : Nature et quantité des résidus utilisés. AA : Acide Aminé ; Eq : nombre d'équivalents

Le peptide est décroché de son support par un traitement au HF en présence d'anisole. On obtient 693 mg de produit brut (rdt : 68 %) dont les pics caractéristiques en masse sont : $(M+2H^+)/2$: 1603,3 ; $(M+3H^+)/3$: 1069,7 ; $\rightarrow M$: 4327 g.mol⁻¹.

- Synthèse de SEEPP-(Φ)₁₁-RKLMEII-NH₂ (35)
SEEPP-(Φ)₁₂-RKLMEII-NH₂ (33)
SEEPP-(Φ)₁₃-RKLMEII-NH₂ (36)

Nous avons utilisé 400 mg de résine MBHA substituée à 0.9 mmol/g (0,45 mmol), l'agent de couplage pour toute la synthèse a été le BOP. Après chaque couplage d'un résidu Boc-ortho-OH nous avons réalisé un capping par Ac₂O. Au cours de la synthèse la résine a été séparée en 3 lots de 0,15 mmol. Les conditions de synthèse sont résumées dans les **Tableau 22** et **Tableau 23**.

n	AA	Dérivé	Temps	Eq	quantité
1	Ile	Boc-Ile-OH	3+3 H	4	346 mg
2	Ile	Boc-Ile-OH	1.5 H	4	346 mg
3	Glu	Boc-Glu(Ochx)-OH	1.5 H	4	474 mg
4	Met	Boc-Met-OH	1.5 H	4	360 mg
5	Leu	Boc-Leu-OH	12 H	4	336 mg
6	Lys	Boc-Lys(2CIZ)-OH	1.5 H	4	596 mg
7	Arg	Boc-Arg(Tos)-OH	12 H	4	692 mg
8 à 18	Ortho	Boc-ortho-OH	5 H	3	357 mg
Un tier de la résine est conservée (0.15 mmol)					
19	Pro	Boc-Pro-OH	2 H	4	129 mg
20	Pro	Boc-Pro-OH	2+1 H	4	129 mg
21	Glu	Boc-Glu(Ochx)-OH	1+1 H	4	197 mg
22	Glu	Boc-Glu(Ochx)-OH	1 H	4	197 mg
23	Ser	Boc-Ser(Bzl)-OH	1 H	4	177 mg

Tableau 22 : tableau de synthèse de SEEPP-(Φ)₁₁-RKLMEII-NH₂

SEEPP-(Φ) ₁₂ -RKLMEII-NH ₂						SEEPP-(Φ) ₁₃ -RKLMEII-NH ₂					
n	AA	Dérivé	Temps	Eq	quantité	n	AA	Dérivé	Temps	Eq	quantité
Sur 0.30 mmol de résine Boc-(Φ) ₁₁ -RKLMEII-NH ₂						Sur 0.15 mmol de résine Boc-(Φ) ₁₂ -RKLMEII-NH ₂					
19	Ortho	Boc-ortho-OH	5 H	3	238 mg	20	Ortho	Boc-ortho-OH	5 H	3	119 mg
La moitié de la résine est conservée (0.15 mmol)											
20	Pro	Boc-Pro-OH	2 H	4	129 mg	21	Pro	Boc-Pro-OH	1+1 H	4	129 mg
21	Pro	Boc-Pro-OH	2+1 H	4	129 mg	22	Pro	Boc-Pro-OH	1+1 H	4	129 mg
22	Glu	Boc-Glu(Ochx)-OH	1+1 H	4	197 mg	23	Glu	Boc-Glu(Ochx)-OH	1+1 H	4	197 mg
23	Glu	Boc-Glu(Ochx)-OH	1 H	4	197 mg	24	Glu	Boc-Glu(Ochx)-OH	1 H	4	197 mg
24	Ser	Boc-Ser(Bzl)-OH	1 H	4	177 mg	25	Ser	Boc-Ser(Bzl)-OH	1 H	4	177 mg

Tableau 23 : tableau de synthèse de SEEPP-(Φ)₁₂-RKLMEII-NH₂ et SEEPP-(Φ)₁₃-RKLMEII-NH₂

Les conditions de décrochage du peptide et de traitement sont les mêmes que celles utilisées précédemment.

II 3 3 : Incorporation de (C5)_x et de (Ortho)_x (Modèle 2)

▪ Synthèse de SEPPISLDLTFHLLREVL-(C5)₁₀-RKLMEII-NH₂ (37)

133 mg de résine MBHA substituée à 0.9 mmol/g (0,15 mmol) est utilisé, l'agent de couplage est le BOP et nous avons utilisé 4 eq d'acide aminé et 3 eq de Boc-C5-OH. Après chaque couplage d'un résidu Boc-C5-OH un capping par Ac₂O est effectué. Les conditions de couplage sont résumées dans le **Tableau 24**.

n	AA	Dérivé	Temps	quantité	n	AA	Dérivé	Temps	quantité
1	Ile	Boc-Ile-OH	3+3 H	150 mg	24	His	Boc-His(Tos)-OH	4+12 H	245 mg
2	Ile	Boc-Ile-OH	1.5 H	150 mg	25	Phe	Boc-Phe-OH	12 H	159 mg
3	Glu	Boc-Glu(Ochx)OH	1.5 H	197 mg	27	Thr	Boc-Thr(Bzl)-OH	12 H	186 mg
4	Met	Boc-Met-OH	1.5 H	161 mg	27	Leu	Boc-Leu-OH	4 H	150 mg
5	Leu	Boc-Leu-OH	12 H	150 mg	28	Asp	Boc-Asp(Ochx)-OH	12 H	189 mg
6	Lys	Boc-Lys(2ClZ)-OH	1.5 H	248 mg	29	Leu	Boc-Leu-OH	4 H	150 mg
7	Arg	Boc-Arg(Tos)-OH	12 H	288 mg	30	Ser	Boc-Ser(Bzl)-OH	12 H	177 mg
8 à 17	C5	Boc-C5-OH	5 H	101 mg	31	Ile	Boc-Ile-OH	4 H	150 mg
18	Leu	Boc-Leu-OH	5 H	150 mg	32	Pro	Boc-Pro-OH	12 H	129 mg
19	Val	Boc-Val-OH	12 H	130 mg	33	Pro	Boc-Pro-OH	4 H	129 mg
20	Glu	Boc-Glu(Ochx)-OH	3 H	197 mg	34	Glu	Boc-Glu(Ochx)-OH	12 H	197 mg
21	Arg	Boc-Arg(Tos)-OH	2x12 H	288 mg	35	Glu	Boc-Glu(Ochx)-OH	12 H	197 mg
22	Leu	Boc-Leu-OH	4 H	150 mg	36	Ser	Boc-Ser(Bzl)-OH	12 H	177 mg
23	Leu	Boc-Leu-OH	4 H	150 mg					

Tableau 24 : Nature et quantité des résidus utilisés. AA : Acide Aminé

Le peptide est décroché de son support par un traitement au HF en présence d'anisole. On obtient 288 mg de produit brut (rdt : 44 %) dont les pics caractéristiques en masse sont : (M+3H⁺)/3 :1451.9 ; (M+4H⁺)/4 :1089.1 ; (M+5H⁺)/5 :871.6; → **M : 4352 g.mol⁻¹**. Après purification, nous avons obtenus 14,2 mg (2,2 %).

▪ **Synthèse de SEEPPISLDLTFHLLREVL-(Φ)₅-RKLMEII-NH₂ (38)**

133 mg de résine MBHA substituée à 0.9 mmol/g (0,15 mmol) est utilisé l'agent de couplage est le BOP et nous avons utilisé 4 eq d'acide aminé et 3 eq de Boc-ortho-OH. Après chaque couplage d'un résidu Boc-ortho-OH un capping par Ac₂O est effectué. Les conditions de couplage sont résumés dans le **Tableau 25**.

n	AA	Dérivé	Temps	quantité	n	AA	Dérivé	Temps	quantité
1	Ile	Boc-Ile-OH	3+3 H	150 mg	19	His	Boc-His(Tos)-OH	4+12 H	245 mg
2	Ile	Boc-Ile-OH	1.5 H	150 mg	20	Phe	Boc-Phe-OH	12 H	159 mg
3	Glu	Boc-Glu(Ochx)OH	1.5 H	197 mg	21	Thr	Boc-Thr(Bzl)-OH	12 H	186 mg
4	Met	Boc-Met-OH	1.5 H	161 mg	22	Leu	Boc-Leu-OH	4 H	150 mg
5	Leu	Boc-Leu-OH	12 H	150 mg	23	Asp	Boc-Asp(Ochx)-OH	12 H	189 mg
6	Lys	Boc-Lys(2ClZ)-OH	1.5 H	248 mg	24	Leu	Boc-Leu-OH	4 H	150 mg
7	Arg	Boc-Arg(Tos)-OH	12 H	288 mg	25	Ser	Boc-Ser(Bzl)-OH	12 H	177 mg
8 à 12	Ortho	Boc-ortho-OH	5 H	120 mg	27	Ile	Boc-Ile-OH	4 H	150 mg
13	Leu	Boc-Leu-OH	5 H	150 mg	27	Pro	Boc-Pro-OH	12 H	129 mg
14	Val	Boc-Val-OH	12 H	130 mg	28	Pro	Boc-Pro-OH	4 H	129 mg
15	Glu	Boc-Glu(Ochx)-OH	3 H	197 mg	29	Glu	Boc-Glu(Ochx)-OH	12 H	197 mg
16	Arg	Boc-Arg(Tos)-OH	2x12 H	288 mg	30	Glu	Boc-Glu(Ochx)-OH	12 H	197 mg
17	Leu	Boc-Leu-OH	4 H	150 mg	31	Ser	Boc-Ser(Bzl)-OH	12 H	177 mg
18	Leu	Boc-Leu-OH	4 H	150 mg					

Tableau 25 : Nature et quantité des résidus utilisés. AA : Acide Aminé

Le peptide est décroché de son support par un traitement au HF en présence d'anisole. On obtient 290 mg de produit brut (rdt : 51 %) dont les pics caractéristiques en masse sont : (M+3H⁺)/3 :1276,6 ; (M+4H⁺)/4 :957,8 ; (M+5H⁺)/5 :766,4; → **M : 3822 g.mol⁻¹**.
¹. Après purification, nous avons obtenus 11,5 mg (2 %).

II 4 : Les hybrides pseudo-peptidiques du ₉₋₄₁ hCRF

II 4 1 : Incorporation de (C5)_x

Nous sommes partis de 120 mg de résine Rink amide substituée à 0,7 mmol/g (0,084 mmol) pour chaque composé, l'agent de couplage est l'HBTU, 4 équivalents d'une solution 0,5M d'acide aminé et de Fmoc-(C5)-OH dans la NMP sont utilisés et un double couplage pour chaque étape. Le temps d'un couplage est de 90 minutes et celui de déprotection de 20 minutes. Pour décrocher le peptide de son support, on utilise le même protocole que pour le hCRF.

II 4 2 : Incorporation de (Ortho)_x

- Synthèse de H-(Φ)₉-RKLMEII-NH₂ (44), H-(Φ)₁₀-RKLMEII-NH₂ (45) et H-(Φ)₁₁-RKLMEII-NH₂ (46)

Nous sommes partis d'un lot de 500 mg de résine PAL-PEG-PS fonctionnalisée à 0.360 mmol/g (0.180 mmol). L'agent de couplage est l'HBTU pour toute la synthèse et après l'encrage du dixième ortho la résine a été partagée en deux lots. Les conditions de couplage sont résumées dans le **Tableau 26**

n	AA	Dérivé	Temps de couplage	Eq	quantité
1	Ile	Fmoc-Ile-OH	2 x 1 Heure	4	254 mg
2	Ile	Fmoc-Ile-OH	2 x 1 Heure	4	254 mg
3	Glu	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	2 x 1 Heure	4	306 mg
4	Met	Fmoc-Met-OH	2 x 1 Heure	4	267 mg
5	Leu	Fmoc-Leu-OH	2 x 1 Heure	4	254 mg
6	Lys	Fmoc-Lys(Boc)-OH	2 x 1 Heure	4	337 mg
7	Arg	Fmoc-Arg(Pmc)-OH	2 x 1 Heure	4	477 mg
8 à 17	ortho	Fmoc-ortho-OH	3 Heures	3	209 mg
La moitié de la résine est prélevée soit 0.090 mmol et clivée pour donner H-(Φ) ₁₀ -RKLMEII-NH ₂					
18	ortho	Fmoc-ortho-OH	2 x 3 Heures	3	105 mg

Tableau 26 : Tableau de synthèse de H-(Φ)₁₀-RKLMEII-NH₂ et de H-(Φ)₁₀-RKLMEII-NH₂

Le décrochage a été réalisé grâce au TFA/TIS/eau (95/2.5/2.5) pendant 4 heures.

- Synthèse de H-(Φ)₃-RKLMEII-NH₂ (47), H-(Φ)₅-RKLMEII-NH₂ (48), H-(Φ)₇-RKLMEII-NH₂ (49) et H-(Φ)₈-RKLMEII-NH₂ (50)

Nous avons utilisé 500 mg de résine MBHA substituée à 0.9 mmol/g (0,45 mmol), l'agent de couplage pour toute la synthèse a été le BOP et nous avons utilisé 4 eq d'acide aminé et 3 eq de Boc-ortho-OH. Après chaque couplage d'un résidu Boc-ortho-OH nous avons réalisé un capping par Ac₂O. Les conditions de couplage sont résumées dans le **Tableau 27**.

n	AA	Dérivé	Temps de couplage	Eq	quantité
1	Ile	Boc-Ile-OH	2 x 1 Heure	4	448 mg
2	Ile	Boc-Ile-OH	2 x 1 Heure	4	448 mg
3	Glu	Boc-Glu(Ochx)OH	2 x 1 Heure	4	592 mg
4	Met	Boc-Met-OH	2 x 1 Heure	4	448 mg
5	Leu	Boc-Leu-OH	2 x 1 Heure	4	448 mg
6	Lys	Boc-Lys(2ClZ)-OH	2 x 1 Heure	4	747 mg
7	Arg	Boc-Arg(Tos)-OH	2 x 1 Heure	4	865 mg
8 à 10	ortho	Boc-ortho-OH	5 Heures	3	357 mg
Le quart de la résine est prélevée soit 0.115 mmol et clivée pour donner H-(Φ) ₃ -RKLMEII-NH ₂					
11 et 12	ortho	Boc-ortho-OH	5 Heures	3	268 mg
Le quart de la résine est prélevée soit 0.115 mmol et clivée pour donner H-(Φ) ₅ -RKLMEII-NH ₂					
13 et 14	ortho	Boc-ortho-OH	5 Heures	3	179 mg
Le quart de la résine est prélevée soit 0.115 mmol et clivée pour donner H-(Φ) ₇ -RKLMEII-NH ₂					
15	ortho	Boc-ortho-OH	5 Heures	3	90 mg
Le reste de la résine est clivé soit 0.115 mmol pour donner H-(Φ) ₈ -RKLMEII-NH ₂					

Tableau 27 : Tableau de synthèse de 47, 48, 49, 50

PARTIE IV:

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Chapitre 1 : Analyses conformationnelles

Nous avons cherché à déterminer les conformations que prenaient les molécules que nous avons synthétisées. Pour cela, nous avons utilisé différentes méthodes d'analyse comme le dichroïsme circulaire, la cristallographie, la RMN ainsi que l'infrarouge. Ces études ont été réalisées en collaboration avec le groupe du professeur Michel Marraud à Nancy.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé ces monomères qui ont pu être cristallisés et dont la structure n'avait pas été préalablement décrite dans la littérature. Dans un deuxième temps, nous nous attarderons sur les différentes structures des oligomères et enfin sur celles des hybrides du hCRF et du $_{9-41}$ hCRF.

I : Caractérisation des monomères

I 1 : Le monomère C5

Le monomère C5 sous forme de Boc-C5-NHMe (**Figure 1**) a pu être cristallisé. Les cristaux ont été obtenus par lent refroidissement/évaporation d'un mélange AcOEt/EtOH contenant un minimum de éthanol. Leur taille est de 0,2 x 0,1 x 0,1 mm de coté. L'analyse de diffraction des rayons X a été effectuée par un rayonnement de longueur d'onde de 0.71070 Å. L'acquisition des données est effectuée par un balayage des valeurs de l'angle Théta compris entre 3 et 25.27°. 4509 réflexions ont été collectées. L'ensemble des données est disponible en annexe.

La maille cristalline est monoclinique, et les paramètres sont donnés dans le **Tableau 1**.

Longueur des côtés	Paramètres angulaires
a = 6.88 Å	$\alpha = 90^\circ$
b = 9.62 Å	$\beta = 99.88^\circ$
c = 11.72 Å	$\gamma = 90^\circ$

Tableau 1 : Paramètres de la maille cristalline

Les données ont été affinées par la méthode des moindres carrés (Full-matrix least-square on F^2) et les atomes d'hydrogènes ont été placés ultérieurement par calcul.

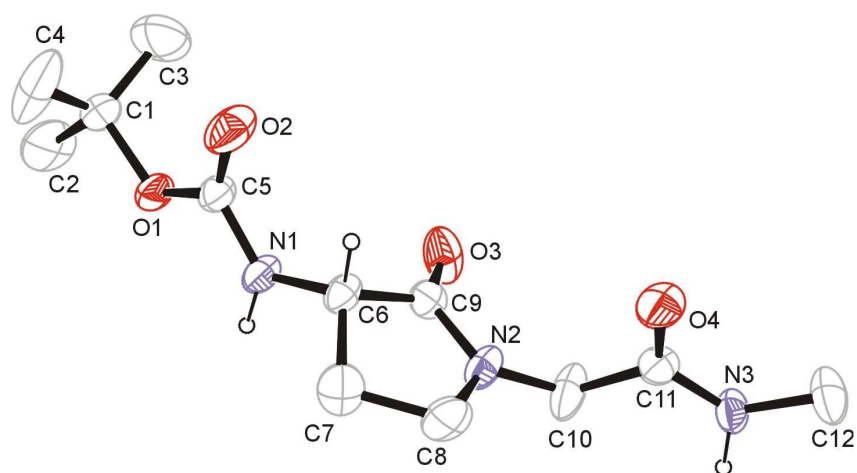


Figure 1 : Représentation ORTEP de Boc-C5-NHMe avec numérotation des atomes

L'analyse des données montre que les molécules sont étirées et reliées à quatre molécules voisines par des liaisons hydrogènes impliquant les atomes N1-H, N3-H, O3 et O4. Les caractéristiques des liaisons hydrogènes engagées sont données dans le **Tableau 2**.

D-H...A	Symétrie	d(H...A)	d(D...A)	Angle(DHA)
N3-H...O3	-x, y-1/2, -z	1.92	2.897	159°
N1-H...O4	x-1, y, z	1.91	2.898	162°

Tableau 2 : Caractéristiques des liaisons hydrogènes mises en jeu

Les caractéristiques des angles dièdres de la structure ($\Phi_1 = -110^\circ$, $\Psi_1 = -142^\circ$, $\Phi_2 = 108^\circ$, $\Psi_2 = 161^\circ$) ne correspondent pas aux angles dièdres que nous avons obtenus par modélisation. Dans le cristal, les liaisons hydrogènes entre les molécules favorisent une structure étirée alors qu'en modélisation, les calculs sont réalisés dans le vide sur une molécule isolée qui ne peut pas avoir d'interactions avec une molécule voisine.

La structure de la molécule au sein du cristal est représentée (**Figure 2**), sous forme stéréoscopique.

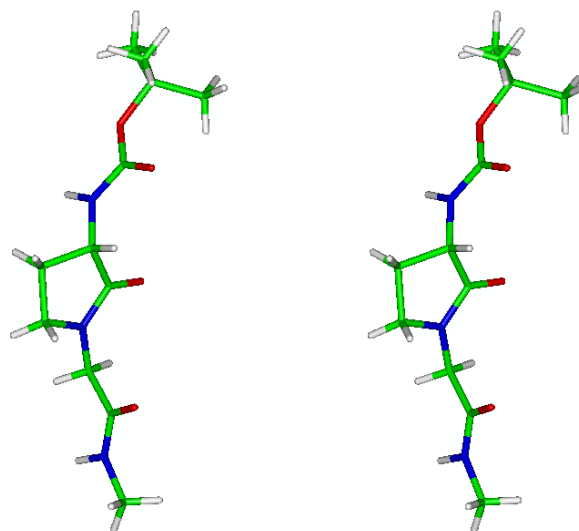


Figure 2 : Vue stéréoscopique de Boc-C5-NHMe dans le cristal

Le cycle à 5 de notre molécule possède une orientation C7-endo par rapport à N1 et l'angle de torsion formé par les atomes C7, C6, C9, N2 est de -17.6° ; les atomes C6, C9, O3, N2, C8 et C10 sont coplanaires.

I 2 : Le monomère Ortho

I 2 1 : Cristallographie de Boc-Ortho-OH

Le monomère Ortho sous la forme de Boc-Ortho-OH (**Figure 3**) a pu être cristallisé, après une lente évaporation dans l'éther. Nous avons obtenu des cristaux en forme d'aiguilles dont la taille est comprise entre 2 et 4 mm. L'analyse de diffraction des rayons a été effectuée par un rayonnement de longueur d'onde de 0.71073 \AA . L'acquisition des données est effectuée par un balayage des valeurs de l'angle Théta compris entre 0.95 et 26.17° . 8934 réflexions ont été collectées. L'ensemble des données est disponible en annexe.

La maille cristalline est monoclinique, et les paramètres sont donnés dans le **Tableau 3**.

Longueur des côtés	Paramètres angulaires
$a = 12.639 \text{ \AA}$	$\alpha = 90^\circ$
$b = 5.147 \text{ \AA}$	$\beta = 107.74^\circ$
$c = 22.545 \text{ \AA}$	$\gamma = 90^\circ$

Tableau 3: Paramètres de la maille cristalline

Les données ont été affinées par la méthode des moindres carrés (Full-matrix least-square on F^2) et les atomes d'hydrogènes ont été placés ultérieurement par calcul.

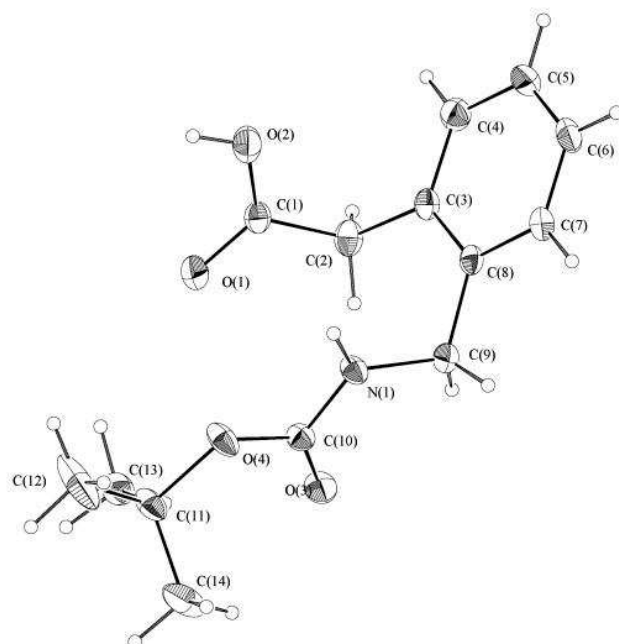


Figure 3 : Représentation ORTEP de Boc-Ortho-OH avec numérotation des atomes

L'analyse des données montre que des liaisons hydrogène se forment entre O1 et H2' de H2'-O2' d'une autre molécule et inversement, formant un angle de 165°. (« Prime » (') désigne une seconde molécule, « seconde » ('') désigne une troisième molécule et « troisième » (''') désigne une quatrième molécule) Cet arrangement forme un dimère au niveau de la fonction carboxylique entraînant une symétrie centrale d'ordre C2. Les distances O1C1 et O2C1 sont égales, ce qui confirme la présence d'une molécule dimérique avec un échange des protons H2 et H2' entre les deux molécules.

Deux autres liaisons hydrogène sont présentes entre N1-H1 et O3'' d'une troisième molécule et O3 et H1'''-N1''' d'une quatrième molécule. Ces liaisons hydrogènes sont moins fortes que celles engagées entre les fonctions carboxyliques, elles connectent les molécules entre elles, le long de l'axe b de la maille dans le cristal. Elles semblent essentielles à la cohésion du cristal car on ne détecte aucune interaction coplanaire, les distances entre les chaînes étant supérieures à la somme de rayons des Van der Waals. Les caractéristiques des liaisons hydrogènes engagées sont données dans le **Tableau 4**.

D-H...A	d(DH)	d(H...A)	d(D...A)	Angle(DHA)
O2-H2...O1'	0.82	1.87	2.669	165°
N1-H1...O3''	0.86	2.18	3.004	160°

Tableau 4 : Caractéristiques des liaisons hydrogènes mises en jeu

Comme pour la molécule Boc-C5-NHMe, les caractéristiques des angles dièdres de la structure ($\Phi_1 = 35.1^\circ$, $\Psi_1 = 95.2^\circ$, $\Phi_2 = -63.5^\circ$, $\Psi_2 = 140.27^\circ$) ne correspondent pas aux angles dièdres que nous avons obtenus par modélisation. Dans le cristal, les liaisons hydrogènes de la fonction carboxylique favorisent une structure dimérique et les autres liaisons hydrogènes favorisent l'empilement alors qu'en modélisation, les calculs sont réalisés sur une molécule isolée.

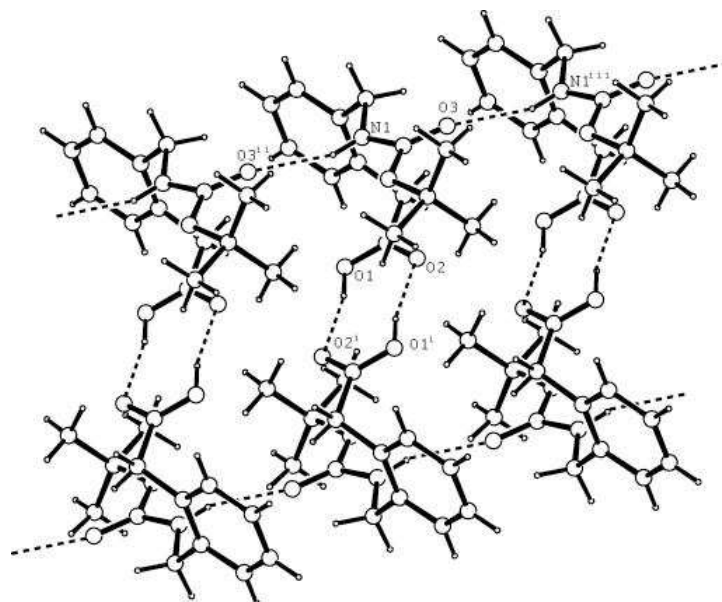


Figure 4 : Empilement des résidus Boc-Ortho-OH dans le cristal

I 2 2 : Cristallographie de Boc-Ortho-NHiPr

Le monomère Ortho sous la forme d'un Boc-Ortho-NHiPr (**20**) a lui aussi été cristallisé. L'analyse de diffraction des rayons a été effectuée par un rayonnement de longueur d'onde de 0.71073 \AA . L'acquisition des données est effectuée par un balayage des valeurs de l'angle Θ compris entre 3.43 et 23.25° . 4323 réflexions ont été collectées. L'ensemble des données est disponible en annexe.

La maille cristalline est triclinique, et les paramètres sont donnés dans le **Tableau 5**.

Longueur des côtés	Paramètres angulaires
$a = 5.1411 \text{ \AA}$	$\alpha = 82.93^\circ$
$b = 11.5197 \text{ \AA}$	$\beta = 89.537^\circ$
$c = 15.236 \text{ \AA}$	$\gamma = 78.52^\circ$

Tableau 5 : Paramètres de la maille cristalline

Les données ont été affinées par la méthode des moindres carrés (Full-matrix least-square on F^2) et les atomes d'hydrogènes ont été placés ultérieurement par calcul.

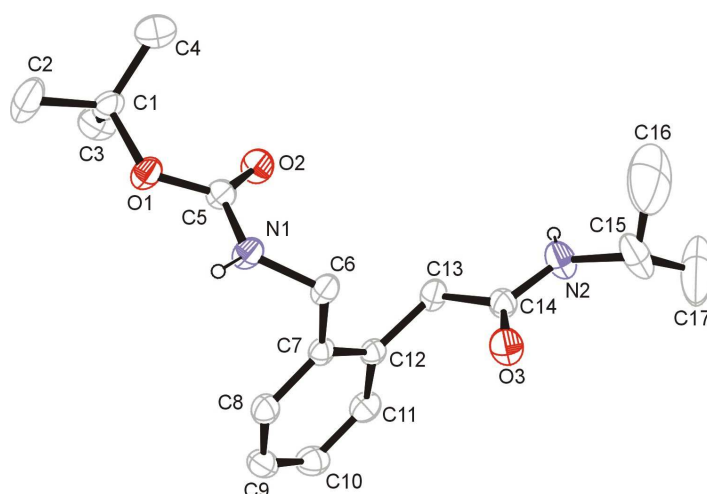


Figure 5 : Représentation ORTEP de Boc-Ortho-NHiPr

L'analyse montre qu'il y a un empilement des résidus qui est stabilisé par des liaisons hydrogène. Chaque résidu engage deux liaisons hydrogène avec deux molécules voisines entre le CO du Boc et le NH' d'un autre résidu et entre le CO amidique et le NH'' amidique d'un troisième résidu. Les caractéristiques des liaisons hydrogène engagées sont données dans le **Tableau 6**.

D-H...A	d(DH)	d(H...A)	d(D...A)	Angle(DHA)
N(1)-H(1)...O(2)	0.86	2.15	2.934	151.6°
N(2)-H(2)...O(3)	0.86	2.23	3.082	173.8°

Tableau 6 : Caractéristiques des liaisons hydrogènes mises en jeu

La cohésion dans le cristal est apportée par stacking entre les noyaux benzéniques qui sont séparés de 3.4 Å.

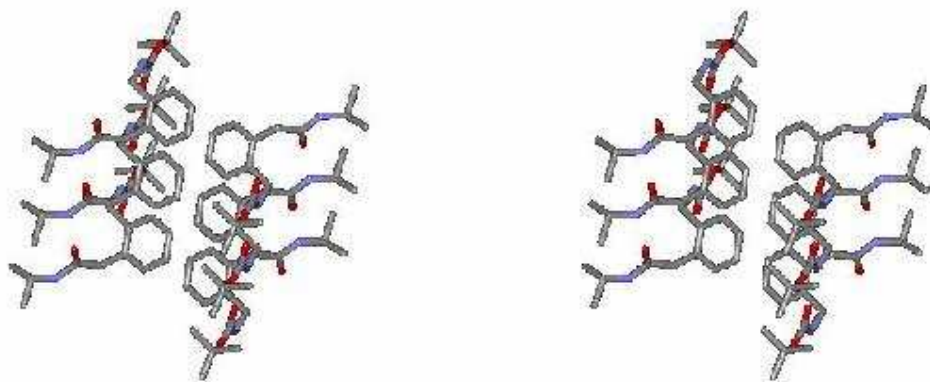


Figure 6 : Représentation stéréoscopique des résidus Boc-Ortho-NHiPr dans le cristal

La présence du groupement amidique NH*Pr* engendre une nouvelle structure cristalline différente de celle de Boc-Ortho-OH. Il n'y a plus de formation de dimère. Comme pour Boc-Ortho-OH, les liaisons hydrogène ne sont pas intramoléculaires.

I 2 3 : Infrarouge

Nous avons voulu déterminer la capacité des monomères Boc-ortho-NHMe (**18**), Boc-ortho-NH*Pr* (**20**) et Piv-ortho-NHMe (**19**) à former des liaisons hydrogène intramoléculaires en solution. Nous avons choisi ces molécules car nous voulions déterminer si la présence d'un groupement plus encombré (isopropyl) et un groupement plus basique (pivaloyl) engendraient une modification de la nature des liaisons hydrogène. Des analyses IR ont été réalisées dans un premier temps dans le dichlorométhane à une concentration de 10 mM et dans le tétrachlorure de carbone à une concentration de 2 mM et dans un deuxième temps Boc-ortho-NHMe (**18**) et Piv-ortho-NHMe (**19**) ont été étudiés dans le dichlorométhane à une concentration de 3 mM pour qu'il y ait une homogénéité de concentration par rapport à l'étude des oligomères.

Dans CH₂Cl₂ à 10 mM, **18** et **20** donnent deux spectres très voisins constitués d'un massif de bandes fines aux alentours de 3440 cm⁻¹, caractéristiques de la présence de NH libres et une large bande de faible intensité vers 3350 cm⁻¹ qui correspond à un NH engagé dans une liaison hydrogène intramoléculaire. La position exacte de cette bande est de 3356 cm⁻¹ pour **18** et 3339 cm⁻¹ pour **20**; cette différence est due à la nature de NHMe et NH*Pr*. Le carbonyle du groupe accepteur Boc-CO ne présente qu'une seule bande à 1707 cm⁻¹ (fréquence libre).

Dans le CCl₄, la bande caractéristique du NH engagé (3372 cm⁻¹ pour **18** et 3354 cm⁻¹ pour **20**) devient plus intense. Le carbonyle du groupe accepteur Boc-CO est éclaté en deux bandes, une à 1716 cm⁻¹ (fréquence libre) et 1703 cm⁻¹ (fréquence liée).

On peut déduire de ces résultats que dans le CH₂Cl₂, on a une faible proportion de molécules stabilisées par une liaison hydrogène entre le NH et le CO formant un cycle à 10 atomes. Dans le CCl₄, ce pourcentage augmente, cela est dû à la nature du solvant qui est moins polaire et favorise probablement les liaisons intramoléculaires.

Les résultats obtenus en solution montrent que le monomère ortho est capable de former une liaison hydrogène 1-10 alors que dans le cristal, se sont des liaisons intermoléculaires qui sont présentes. Nous avons réalisé une famille conformationnelle en modélisation de ces deux monomères et les deux minima énergétiques possèdent eux aussi une liaison hydrogène 1-10. La représentation de ces molécules est donné dans la **Figure 7** où

les valeurs des angles dièdres (ϕ_1 , ψ_1 , ϕ_2 , ψ_2) sont pour Boc-ortho-NHMe : 118.07°, -79.83°, -84.66°, 111.87° et la liaison hydrogène est de 1.95 Å ; et pour Boc-ortho-NHiPr : -119.65°, 78.69°, 84.10°, -110.98° et la longueur de la liaison hydrogène est de 1.92 Å. Ces valeurs (en valeur absolue) sont en accord avec celles mesurées lors de l'étude de modélisation du décamère ortho (-115.82, 77.87, 81.13, -110.32) qui se structurerait en hélice en formant des liaisons H1-10.

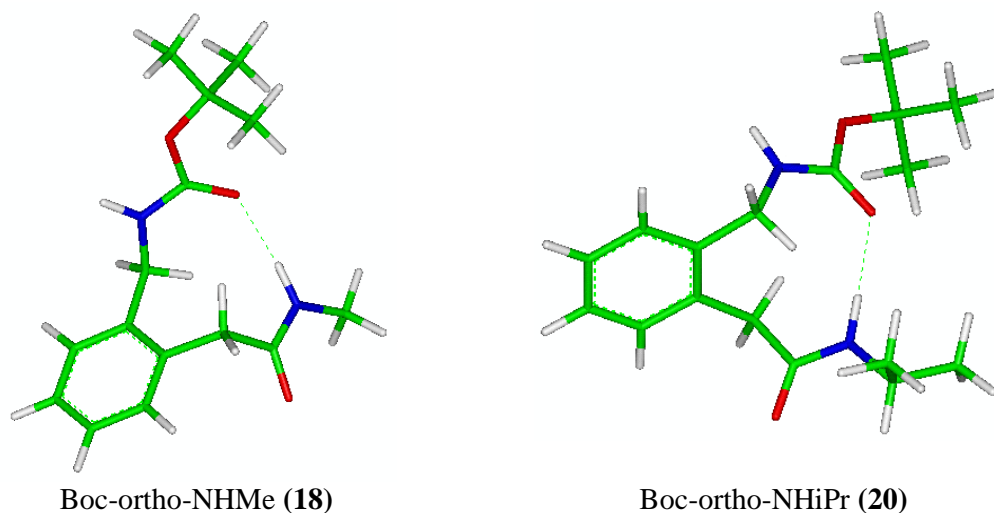


Figure 7 : Représentation des deux minima obtenus en modélisation pour 18 et 19

L'étude des oligomères formés à partir de ce motif unitaire a ensuite été réalisée.

II : Caractérisation des oligomères

Afin de pouvoir caractériser la conformation des oligomères en solution, nous avons utilisé le dichroïsme circulaire, ainsi que l'IR et la RMN. Aucun oligomère synthétisé n'a pu être cristallisé, cela n'a donc pas permis de réaliser une étude aux rayons X.

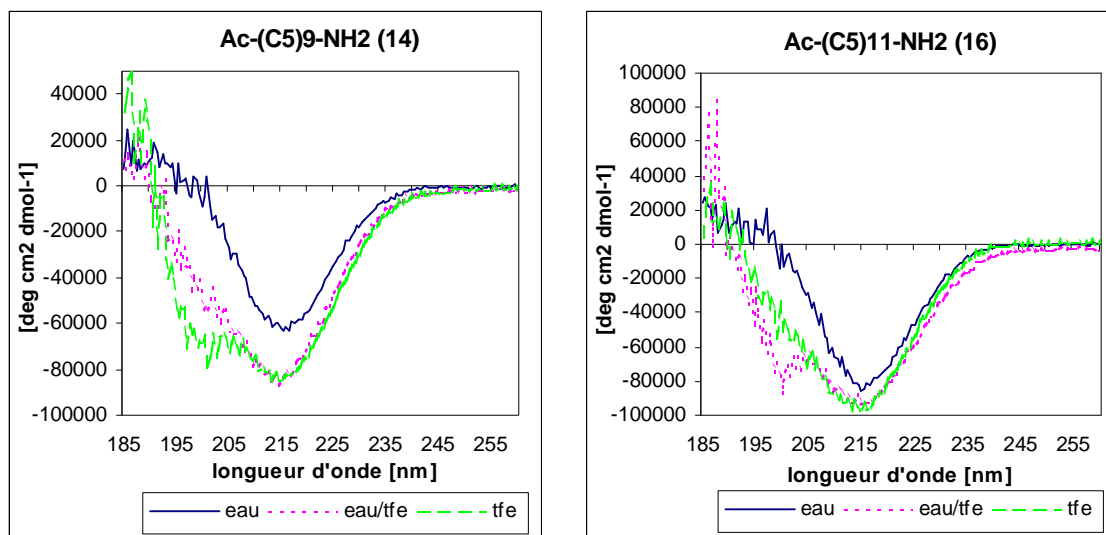
II 1 : Les oligomères C5

Nous avons étudié la conformation des poly C5 en utilisant le dichroïsme circulaire. Cette technique a été utilisée par d'autres équipes (Partie Bibliographie, Chapitre II) sur des hélices artificielles pour connaître la propension de leurs molécules à se structurer. Les hélices construites à partir de molécules non-naturelles possèdent des bandes caractéristiques qui leurs sont propres, elles n'ont parfois pas de signatures spectrales caractéristiques.

Nous avons réalisé les mesures à une concentration de 0.2 mg/l dans une cuve de 0.1 cm. Les solvants utilisés sont l'eau, un mélange 50/50 eau/TFE et dans le TFE pur. Le TFE

étant connu pour aider à la structuration des protéines. Les analyses ont été réalisées sur deux molécules : Ac-(C5)₉-NH₂ (**14**) et Ac-(C5)₁₁-NH₂ (**16**).

Ils possèdent tous les deux, les mêmes bandes caractéristiques (**graphe 1**) avec des minima à 215 nm et coupent l'axe des abscisses vers 199 nm dans l'eau et 190 nm dans le TFE. Les profils dans l'eau et dans le TFE sont sensiblement les mêmes avec comme seule différence une intensité plus importante pour le TFE. La contribution à l'intensité d'absorption de chaque résidu pour les deux molécules est sensiblement la même. A 215 nm chaque résidu semble contribuer pour 9000 deg cm² dmol⁻¹ dans le TFE et 7000 deg cm² dmol⁻¹ dans l'eau.



graphe 1 : Dichroïsme circulaire de Ac-(C5)₉-NH₂ (14**) et Ac-(C5)₁₁-NH₂ (**16**)**

Si l'on se réfère aux données de la littérature, il ne semble pas que ces molécules aient une structure régulière. Cependant, Seebach a montré par RMN que des γ -peptides¹⁶⁴ se structurent en hélice alors que le profil dichroïque ne faisait pas apparaître de structuration. Il est difficile de donner une conclusion concernant la structuration des poly-C5 aux vues des résultats obtenus.

Pour plus de certitude, nous avons donc envisagé de réaliser une étude cristallographique sur plusieurs poly-C5 (Ac-(C5)₃-OH (**10**), Ac-(C5)₄-OH (**11**), Ac-(C5)₅-OH (**12**), Ac-(C5)₅-NH₂ (**13**), Ac-(C5)₇-NH₂ (**14**), Ac-(C5)₉-NH₂ (**15**), Ac-(C5)₁₁-NH₂ (**16**)). Malheureusement, aucun des composés n'a pu être cristallisé dans les solvants usuels : EtOH, MeOH, DMSO, ACN...

II 2 : Les oligomères Ortho

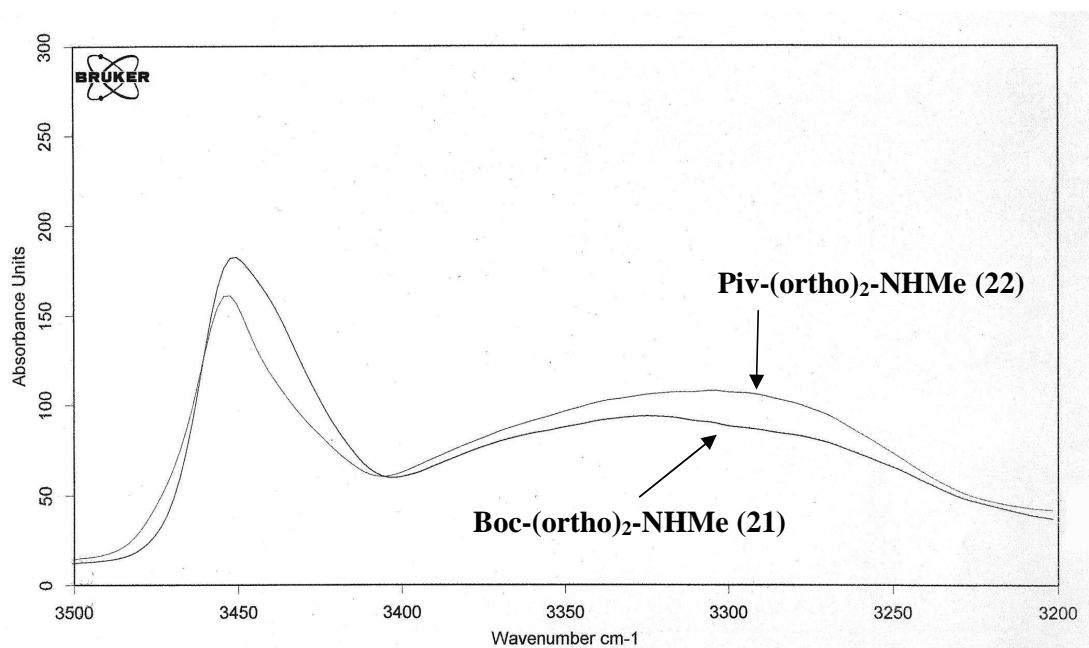
En ce qui concerne les études conformationnelles sur les oligomères de motifs Ortho nous avons été rapidement confrontés à un problème de solubilité dans les solvants classiques d'analyse. En effet, les poly-Ortho ont une faible solubilité dès que la longueur est supérieure à trois résidus. A nouveau, aucun de ces composés n'a pu être cristallisé dans les solvants utilisés.

Nous avons donc décidé d'étudier les dimères et les trimères par des analyses IR et RMN. Nous avons synthétisé les molécules Boc-(ortho)₂-NHMe (**21**), Piv-(ortho)₂-NHMe (**22**), Boc-(ortho)₃-NHMe (**23**) et Piv-(ortho)₃-NHMe (**24**).

II 2 1 : Etudes des dimères

En raison de la faible solubilité dans le CCl₄, les analyses IR ont été réalisées à une concentration de 3 mM dans le CH₂Cl₂.

Les analyses IR font apparaître pour les deux dimères (**Graph 2**), une bande de très basse fréquence vers 3280 cm⁻¹ qui correspond à la présence d'une liaison hydrogène de forte intensité entre le CO du N terminal et le proton amidique du deuxième Ortho. La bande vers 3450 cm⁻¹ diminue d'intensité. Dans Piv-(ortho)₂-NHMe (**22**) l'intensité la bande de plus basse fréquence est plus intense que celle observée dans Boc-(ortho)₂-NHMe (**21**), cela est dû à la plus grande basicité du groupement pivaloyl. La bande vers 3330 cm⁻¹ présente dans les monomères est aussi présente dans les dimères mais son intensité est moindre.



Graph 2 : Spectre infra-rouge de la zone des protons amidiques de Boc-(ortho)₂-NHMe (**21**), Piv-(ortho)₂-NHMe (**22**)

Cela signifie que la force de la liaison hydrogène H1-10 entre le proton amidique de NHMe et le carbonyle du premier résidu Ortho est moins intense que la liaison H1-10 entre le NH du deuxième résidu et le carbonyle du pivaloyle ou du Boc (**Figure 8**). Les dimères forment bien des liaisons hydrogènes H1-10, mais la proportion de NH libres montre qu'il existe un équilibre entre les formes ordonnées et désordonnées.

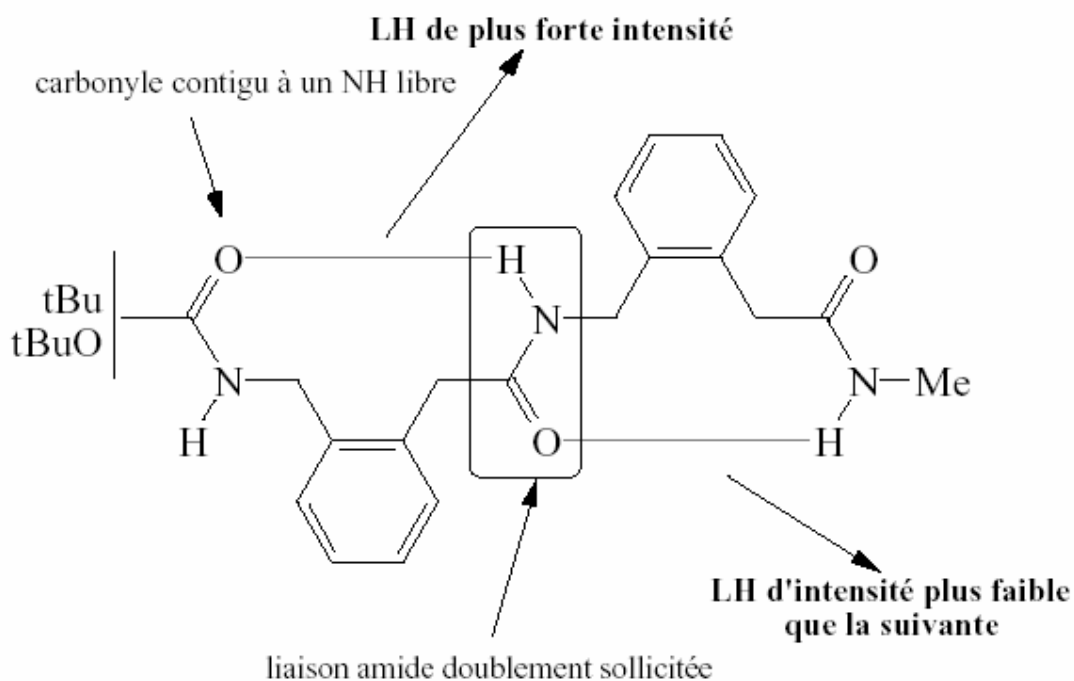
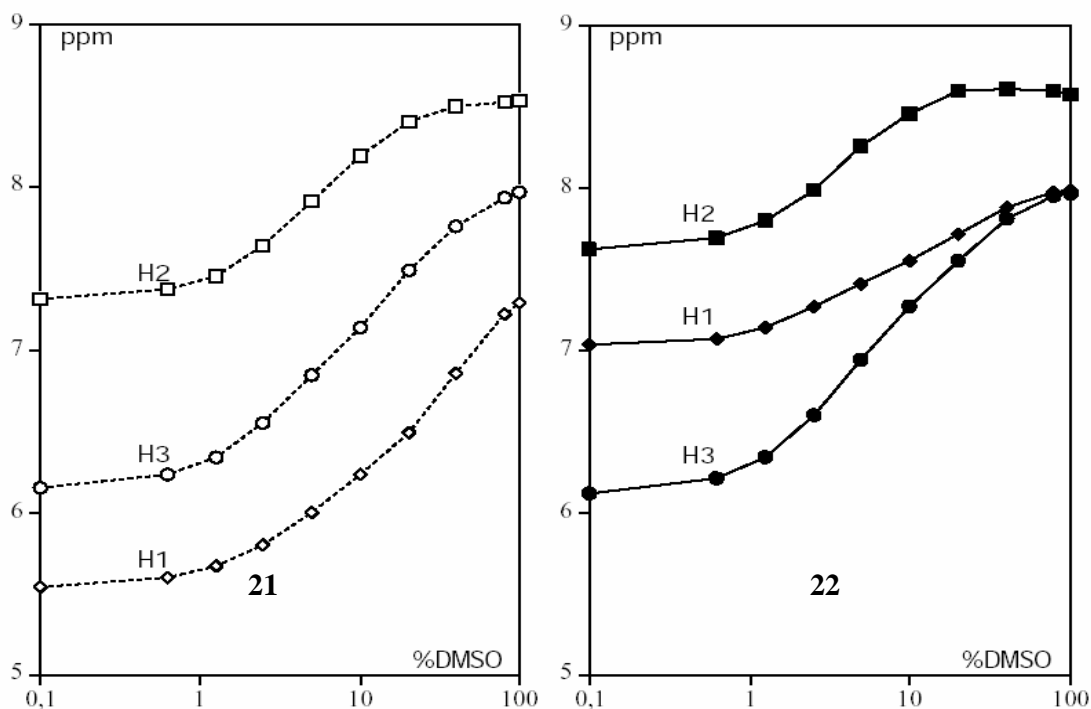
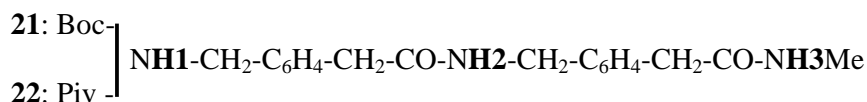


Figure 8 : Représentation des liaisons hydrogènes H1-10 dans les dimères

Les mesures RMN ont été réalisées dans le CDCl_3 avec différentes proportions de DMSO afin de déterminer l'accessibilité des protons amidiques au solvant. L'effet du DMSO sur les déplacements des différents protons NH est donné dans le **Graph 3**.



Graph 3 : Effets du DMSO sur le déplacement chimique des protons amidiques. (CDCl₃/DMSO-d₆)

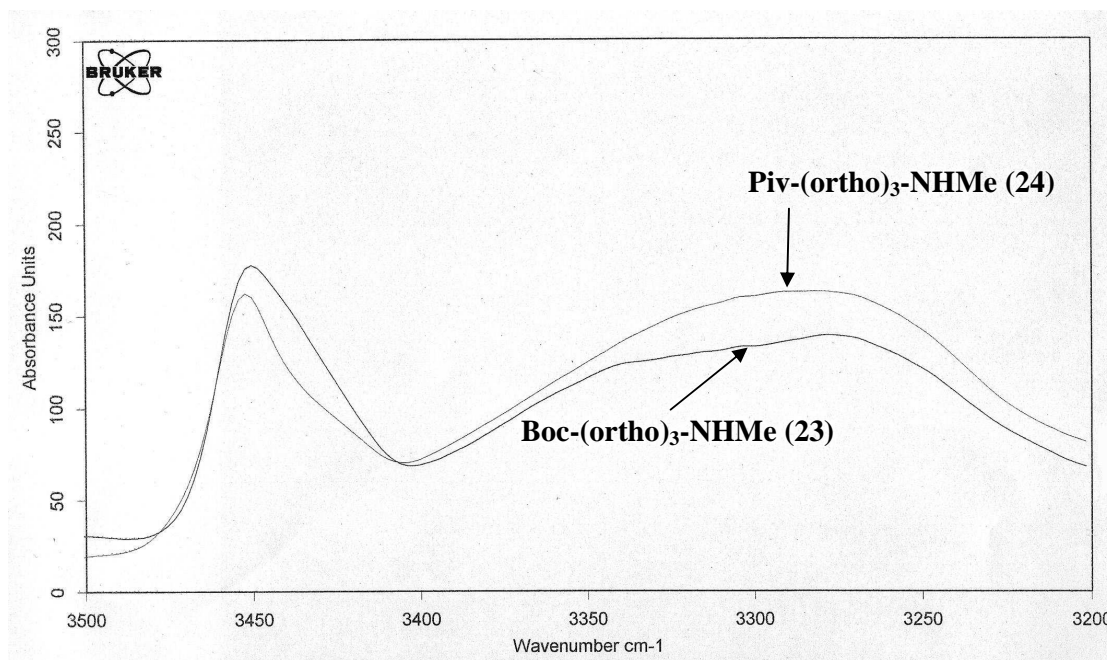
Lorsque le déplacement du proton amidique est inférieur à 6.5 ppm dans le CDCl₃, cela signifie que le proton n'est pas engagé dans une liaison hydrogène. Un déplacement supérieur à 7 ppm dans le CDCl₃ signifie qu'il est peu accessible au solvant. Les résultats montrent que dans pour Boc-(ortho)₂-NHMe, seul H2 est impliqué dans une liaison H, alors que pour Piv-(ortho)₂-NHMe H1 et H2 sont peu accessibles au solvant et la variation du déplacement chimique de H1 est inférieure à celle de H2. La faible accessibilité de H1 est sûrement dû à la présence du groupement pivaloyle qui masque H1 mais il ne semble pas être engagé dans une liaison hydrogène. A la vue de ces résultats, H2 de **21** ne peut être engagé que dans une liaison H1-10 ou H1-8 ; mais les données observées en IR ont montré que les seules liaisons hydrogènes possibles sont de nature H1-10. L'interprétation est la même pour **22**.

Les données obtenues nous permettent de déterminer les conformations que prennent **21** et **22** en solution. Nous avons mis en évidence la présence de liaisons hydrogènes intramoléculaires H1-10 dans les dimères, nous allons étudier la nature des interactions dans les trimères.

II 2 2 : Etudes des trimères

Les analyses IR ont aussi été réalisées à une concentration de 3 mM dans le CH₂Cl₂.

Les analyses IR (**Graph 4**) font apparaître que Boc-(ortho)₃-NHMe (**23**) et Piv-(ortho)₃-NHMe (**24**) possèdent des bandes de plus basses fréquences que les dimères, vers 3270 cm⁻¹ et de plus forte intensité. La bande correspondant aux NH libres diminue et celle vers 3330 cm⁻¹ présente dans les monomères et les dimères et toujours présente. Comme pour les dimères, l'intensité de la bande de très basse fréquence et plus intense pour Piv-(ortho)₃-NHMe (**24**).



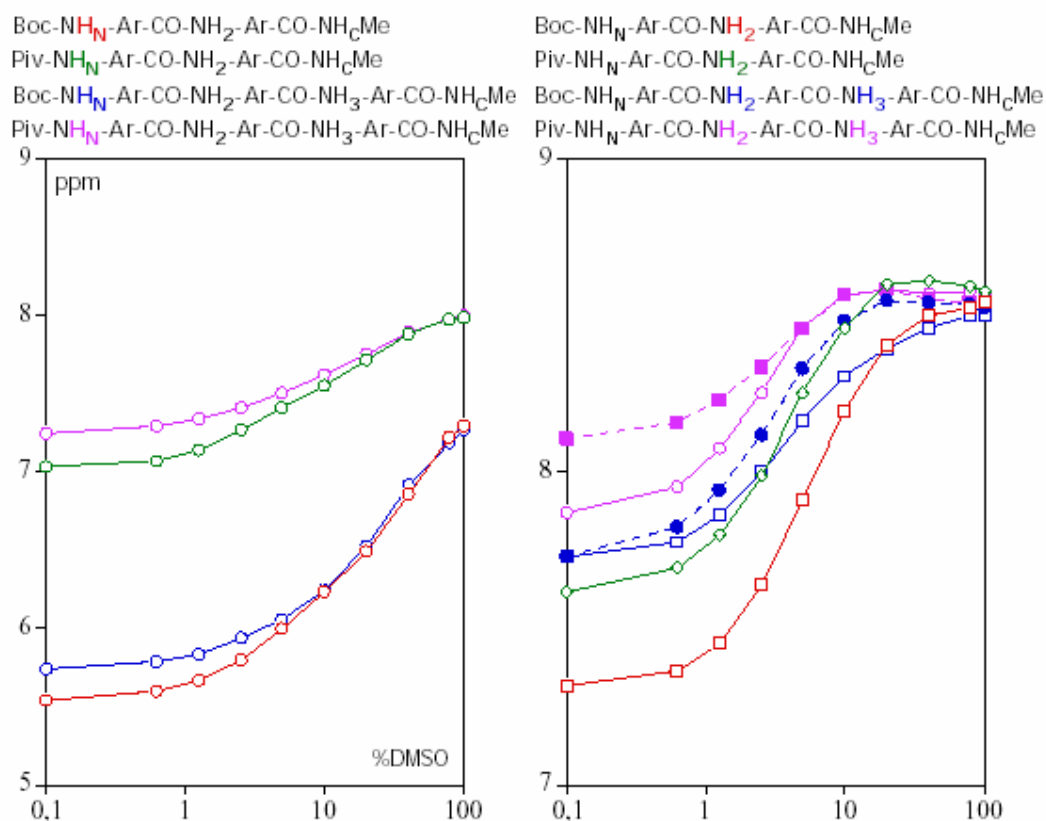
Graph 4 : Spectre infra-rouge de la zone des protons amidiques de Boc-(ortho)₃-NHMe (23), Piv-(ortho)₃-NHMe (24)

Ces résultats montrent que la molécule se structure progressivement avec l'augmentation du nombre de résidus Ortho, que la proportion de molécules non structurée diminue et que la nature des liaisons mise en jeu est de type H1-10.

Des mesures RMN ont donc été réalisées sur les trimères dans le CDCl₃ avec différentes proportions de DMSO, pour étayer les résultats obtenus en IR et avec les dimères.

23: Boc-NH_N-CH₂-Ph-CH₂-CO-NH₂-CH₂-Ph-CH₂-CO-NH₃-CH₂-Ph-CH₂-CO-NH_CMe

24: Piv-NH_N-CH₂-Ph-CH₂-CO-NH₂-CH₂-Ph-CH₂-CO-NH₃-CH₂-Ph-CH₂-CO-NH_CMe



Graphe 5 : Effets du solvant sur le déplacement chimique des protons amidiques. (CDCl₃/DMSO-d₆)

Nous n'avons pas représenté le déplacement chimique des protons amidiques C-terminaux car dans le CDCl₃, ils ne sont pas impliqués dans une liaison H. Les déplacements des NH amidiques des dimères sont également reportés sur le **Graphe 5** afin de pouvoir les comparer à ceux des trimères.

On constate que H₂ et H₃ de **23** sont impliqués dans une liaison H et que H_N ne l'est pas (comme dans le dimère **21**). On remarque aussi que l'environnement de H₂ du dimère **21** est différent de celui de H₂ et H₃ du trimère **23**. Les protons H₂ et H₃ se superposent, appuyant la thèse d'un début de structuration de l'oligomère. Ces deux protons semblent engagés dans des liaisons des liaisons hydrogènes de type H1-10.

En ce qui concerne H₂ et H₃ de **24**, ils sont impliqués dans une liaison H et sont quasiment superposés. H_N est là aussi, peu accessible au solvant mais cela est sûrement dû à l'encombrement stérique du groupement pivaloylé. On peut donc conclure que ces deux protons sont aussi engagés dans des liaisons H1-10 (**Figure 9**).

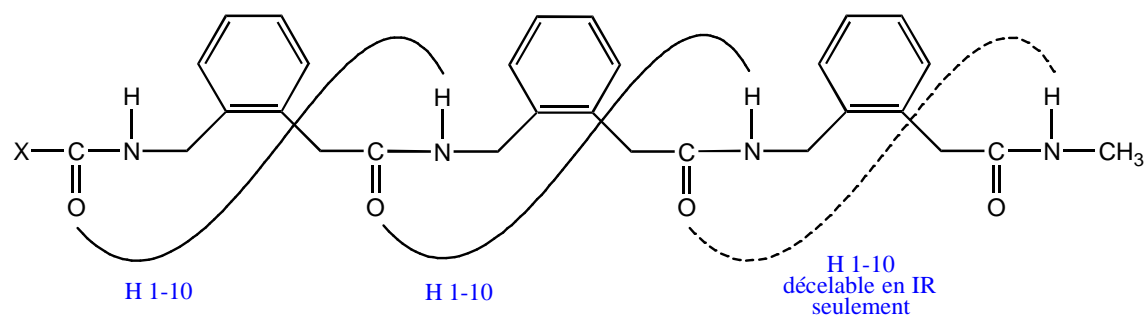


Figure 9 : Représentation des liaisons hydrogènes possibles (X= O-tBu (Boc), = tBu (Piv))

On observe que l'accessibilité des H médians diminue quand la taille de la molécule augmente. C'est l'indice d'une structuration progressive des oligomères par l'augmentation du nombre de liaisons hydrogènes dont la nature ne peut être que de type H1-10. La liaison hydrogène H1-10 entre le NH du groupement NHMe et le carbonyle du résidu Ortho n'est décelé que dans le dichlorométhane en IR en très faible proportion. Ce proton amidique est plus sensible à la solvataion que les autres car il est situé à l'extrémité de l'hélice.

III : Caractérisation des hybrides du hCRF

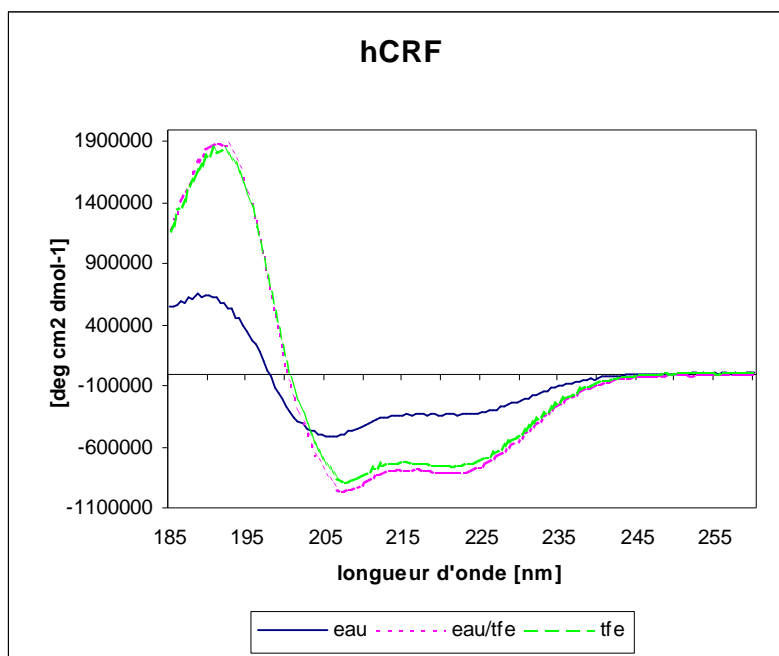
Cette partie est consacrée à la caractérisation des analogues du hCRF incorporant des oligomères de mimes contraints. Nous avons utilisé le dichroïsme circulaire comme outil afin de déterminer si la structuration des hybrides est en accord avec les prévisions que nous avons en modélisation moléculaire.

Bien que la structure du hCRF ait été déterminée par RMN et CD, nous avons réalisé une étude dichroïque sur ce peptide.

III 1 : Dichroïsme du hCRF

Nous avons vu, dans la partie bibliographie consacrée au hCRF que la molécule possède une hélice α centrale des acides aminés 6 à 36²⁰⁸. Les études de CD²⁰⁶ montrent que la molécule présente deux bandes négatives à 207 (intense) et 222 nm et une bande positive à 192 nm quelle que soit la proportion en TFE. L'hélicité augmente avec la proportion en TFE et attend un maximum de 87% d'hélicité pour 40% de TFE.

Nous avons réalisé les mesures à une concentration de 0.2 mg/l dans une cuve de 0.1 cm. Les solvants utilisés sont l'eau, un mélange 50/50 eau/TFE et le TFE. Les courbes de dichroïsme circulaire obtenues sont représentées dans le **Graphe 6**.



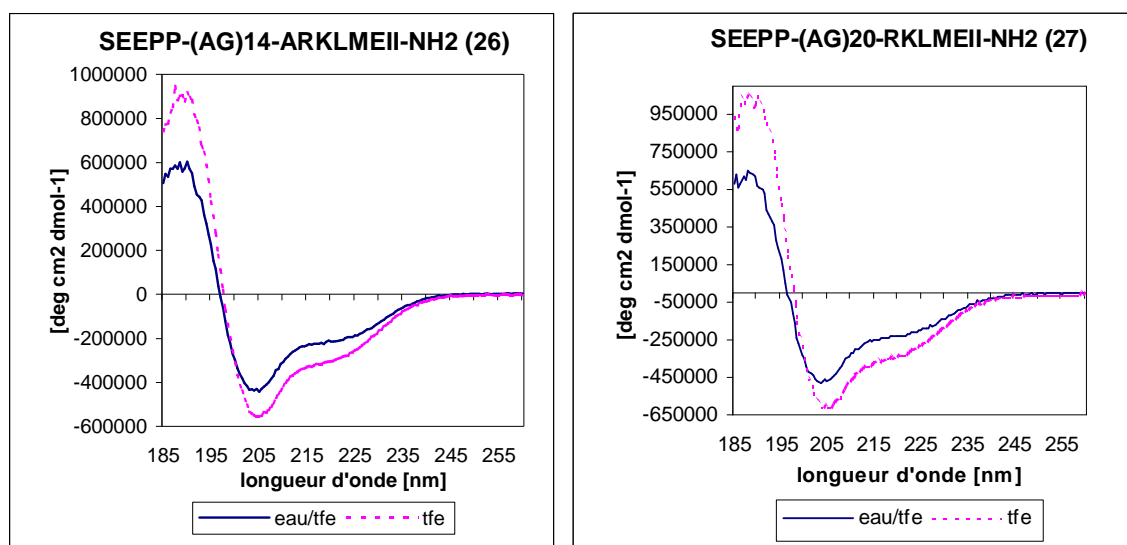
Graphe 6 : Dichroïsme circulaire du hCRF

On retrouve dans le spectre de dichroïsme, les mêmes caractéristiques que celles décrites dans la littérature. Nous allons nous attarder sur les profils obtenus avec les hydrides de hCRF.

III 2 : Dichroïsme des hybrides du hCRF

III 2 1 : Etudes des hybrides peptidiques

Nous avons réalisé les analyses sur les hybrides contenant les motifs dipeptidiques Ala-Gly et Pro-Gly : SEEPP-(AG)₁₄A-RKLMEII-NH₂ (**26**), SEEPP-(AG)₂₀-RKLMEII-NH₂ (**27**), SEEPP-(GP)₁₄G-RKLMEII-NH₂ (**28**) et SEEPP-(GP)₁₈-RKLMEII-NH₂ (**29**). Les conditions d'analyses sont les mêmes que pour le hCRF mais les composés **26** et **27** ne sont pas solubles dans l'eau et ils ont donc été analysés que dans un mélange eau/TFE (50/50) et dans le TFE. Pour **26**, les 29 AA naturels ont été remplacés par 14 motifs dipeptidiques Ala-Gly et 1 résidu Ala, pour **27** nous avons remplacé ces 29 AA naturels par un enchaînement de 20 motifs dipeptidiques Ala-Gly. Cette valeur a été déterminée en appliquant le même protocole de modélisation moléculaire que pour les mimes peptidiques non-naturel.

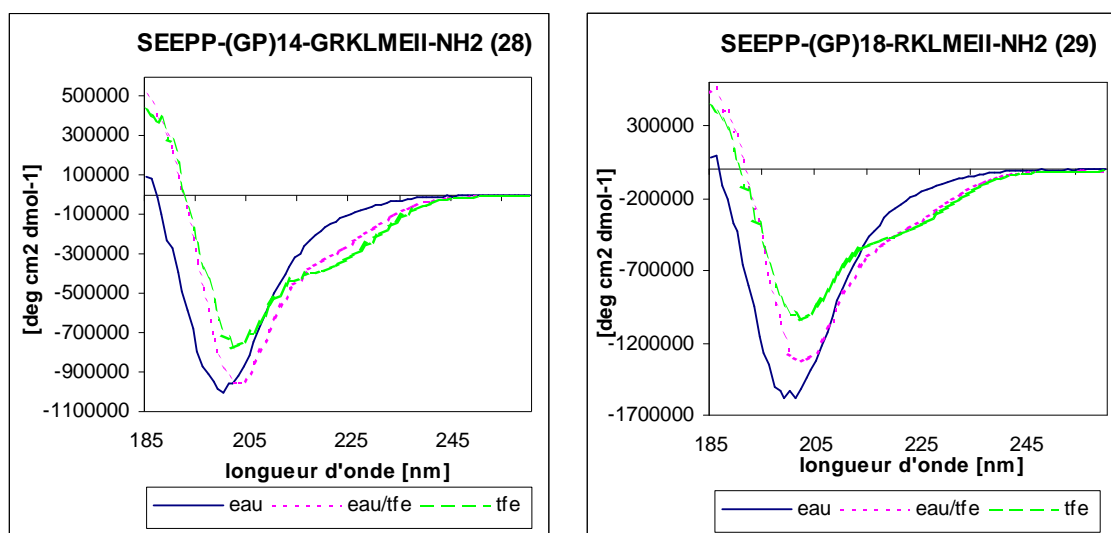


Graph 7 : Dichroïsme circulaire de SEEPP-(AG)₁₄-ARKLMEII-NH₂ (**26**), SEEPP-(AG)₂₀-RKLMEII-NH₂ (**27**)

Les profils dichroïques (**Graph 7**) sont identiques et montrent la présence d'une structure de type hélice α . Le fait d'obtenir ce profil CD, cela indique que l'enchaînement de motifs dipeptidiques Ala-Gly donne une hélice α , comme pour le hCRF. Il faut donc substituer les 29 aminoacides de l'hélice naturelle par autant de résidus. La séquence à incorporer pour obtenir la même longueur est de 14 motifs dipeptidiques Ala-Gly et 1 résidu

Ala. Nous avons calculé par le protocole de modélisation moléculaire qu'il fallait 20 motifs dipeptidiques Ala-Gly, il semble donc que le protocole mis en place ne peut s'appliquer aux acides aminés.

Nous avons ensuite réalisé les analyses sur **28** et **29** avec les mêmes conditions d'analyse que pour hCRF (**Graph 8**).



Graph 8 : Dichroïsme circulaire de SEEPP-(GP)₁₄-GRKLMEII-NH₂ (28), SEEPP-(GP)₁₈-RKLMEII-NH₂ (29)

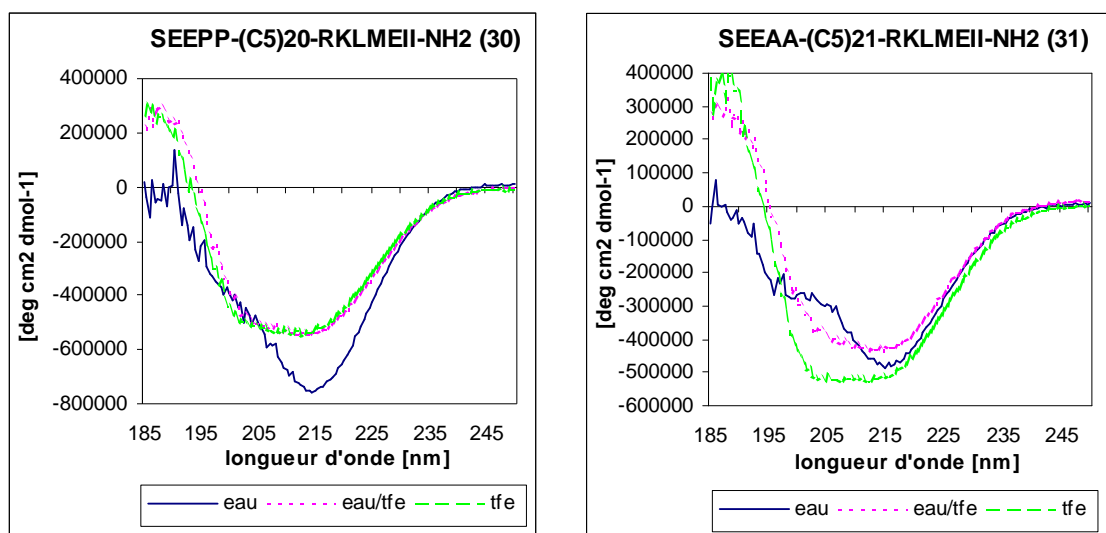
Quelle que soit la molécule et la proportion en TFE, le profil CD est le même. L'enchaînement du motif dipeptidique Pro-Gly donne un spectre de CD avec une bande intense négative vers 200 nm. On retrouve ce profil dans poly(Pro) II (hélice avec un pas à gauche).

La solvatisation par des molécules d'eau semble jouer un rôle dans la conformation des hélices puisqu'en présence d'eau, le profil CD ressemble à celui du poly(Pro) II, avec une seule bande négative à 200 nm. Dans le TFE pur, une bande supplémentaire de moindre intensité apparaît vers 220 nm. L'absence de solvatisation par les molécules d'eau peut favoriser la formation de liaisons hydrogènes intramoléculaires. Cela pourrait expliquer la différence de profils dichroïques.

Dans le cas d'un enchaînement de type Pro-Gly, il est difficile de déterminer le nombre de motifs nécessaire pour remplacer l'hélice α du hCRF car la présence ou l'absence d'eau conduit à une conformation différente de la molécule. Cela montre la limitation de la modélisation moléculaire dans le vide. Néanmoins les deux molécules seront testées pour leur affinité pour le récepteur du hCRF.

III 2 2 : Etudes des hybrides C5

Nous avons vu dans la partie II 1 que les oligomères de C5 ne semblent pas donner de structures régulières dans les milieux étudiés. Nous avons réalisé des analyses dichroïques sur les hybrides C5 du hCRF afin de déterminer si leur incorporation dans la séquence du hCRF favorise une structure en hélice. Nous avons étudié les molécules SEEPP-(C5)₂₀-RKLMEII-NH₂ (**30**) et SEEAA-(C5)₂₁-RKLMEII-NH₂ (**31**). Les courbes de dichroïsme circulaire obtenues sont représentées dans le **Graph 9**.



Graph 9 : Dichroïsme circulaire de SEEPP-(C5)₂₀-RKLMEII-NH₂ (**30**) et SEEAA-(C5)₂₁-RKLMEII-NH₂ (**31**)

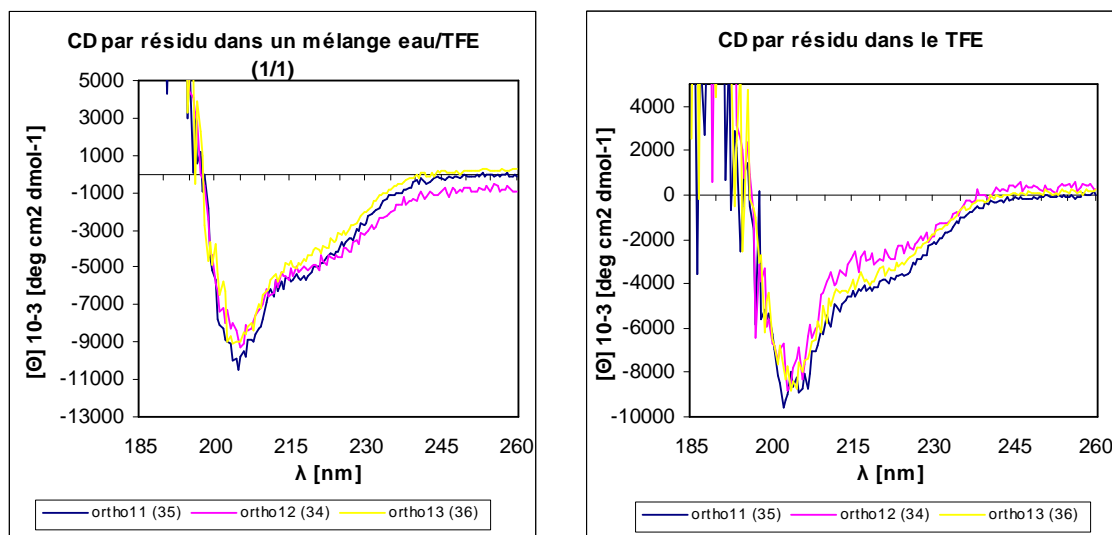
Les profils dichroïques dans l'eau présentent une bande négative unique à 215 nm comme les oligomères **14** et **16**. Les hybrides **30** et **31** n'ont donc pas de structure en hélice en milieu aqueux. Lorsque la proportion de TFE augmente, on constate une diminution de la bande d'absorption à 215 nm, une augmentation de la bande négative à 205 nm et la formation d'une bande positive vers 187 nm.

Les résultats obtenus montrent qu'il y a une différence de profil dichroïque dans l'eau et en présence de TFE. L'apparition d'une bande positive vers 187 nm correspond à une transition $\pi \rightarrow \pi^*$ d'amides secondaires qui n'est pas observé dans les oligomères C5. Cette différence pourrait être due à la présence des résidus peptidiques des extrémités C et N-terminales. Il est impossible de conclure sur la nature de cette structuration, car on ne connaît pas la signature dichroïque de cette famille de résidus.

III 2 3 : Etudes des hybrides Ortho

Nous avons vu dans la partie II 2 que les oligomères de motifs Ortho formaient des liaisons intramoléculaires 1-10 dans le chloroforme et le dichlorométhane. On peut supposer qu'un enchaînement de motifs supérieur à celui étudié pourrait conduire à une structure de type hélice H 1-10. Nous avons réalisé des analyses dichroïques sur les hybrides Ortho du CRF afin de déterminer si les prévisions sur les oligomères étaient valables pour les hybrides dans un mélange eau/TFE (50/50) et dans le TFE. Nous avons étudié deux séries de molécules :

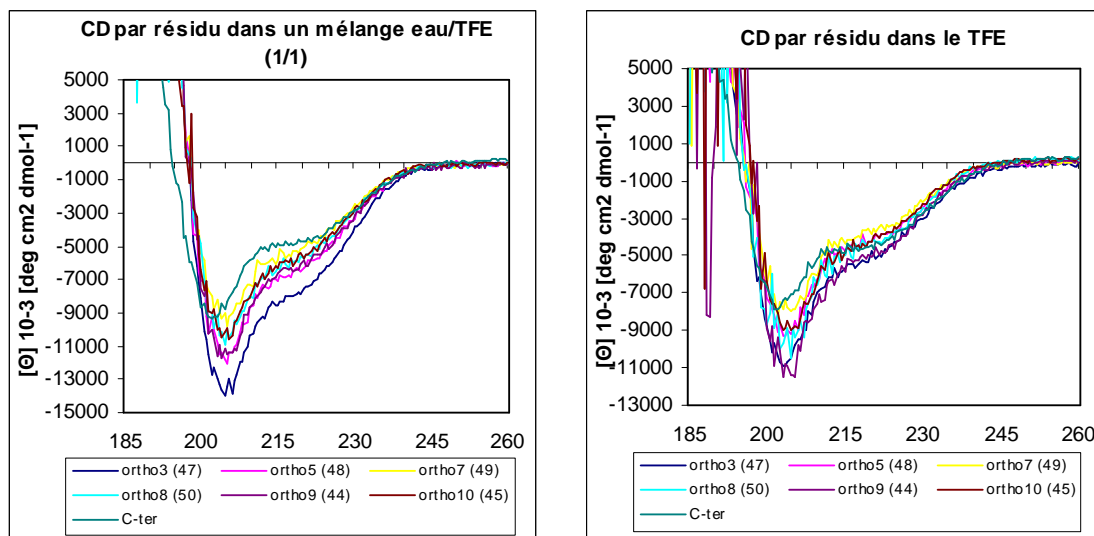
- La série des analogues du hCRF (**Grappe 10**) : SEEPP-(Ortho)₁₁-RKLMEII-NH₂ (**35**), SEEPP-(Ortho)₁₂-RKLMEII-NH₂ (**34**) et SEEPP-(Ortho)₁₃-RKLMEII-NH₂ (**36**).
- La série des analogues du ₉₋₄₁ hCRF (**Grappe 11**) : H-(Ortho)₃-RKLMEII-NH₂ (**47**), H-(Ortho)₅-RKLMEII-NH₂ (**48**), H-(Ortho)₇-RKLMEII-NH₂ (**49**), H-(Ortho)₈-RKLMEII-NH₂ (**50**), H-(Ortho)₉-RKLMEII-NH₂ (**44**) et H-(Ortho)₁₀-RKLMEII-NH₂ (**45**) que nous avons comparé au peptide C-terminal (H-RKLMEII-NH₂).



Grappe 10 : Dichroïsme circulaire de 34, 35 et 36.

On observe en CD dans le TFE et le mélange eau/TFE 50/50 deux bandes négatives de faible intensité vers 220 nm et une autre un peu plus intense vers 205 nm. Avec un 0 à 197 nm et une bande positive vers 185 nm (limite de l'appareillage). L'implication de chaque chromophore amide est le même dans les deux cas de l'analyse. L'épaule à 220 nm pourrait être due à la forme hélicoïdale de la partie peptidique C-terminale. Le minimum

observé à 205 nm est compris entre deux valeurs remarquables, 200 nm (qui est une valeur caractéristique d'une pelote statistique) et 207 nm (qui est significatif de la présence d'une hélice α ou 3_{10}). Il est difficile de définir avec certitude, l'absence ou la présence d'une structure en hélice. Nous ne savons pas si le résidu Ortho possède une signature dichroïque.



Graph 11 : Dichroïsme circulaire de 44, 45, 47, 48, 49, 50 et C-terminale.

Dans les deux cas de l'analyse, on remarque la présence d'eau ne modifie pas le profil dichroïque d'un composé. Cela laisse supposer que la forme tridimensionnelle définitive de chaque composé pourrait être obtenue pour une proportion en TFE inférieure à 50 %. Dans les deux cas, l'effet Cotton à 205 nm est supérieur pour les composés possédant des résidus Ortho que pour la molécule C-terminale (**Tableau 7**).

205 nm	ortho3 (47)	ortho5 (48)	ortho7 (49)	ortho8 (50)	ortho9 (44)	ortho10 (45)	C-ter
Eau/TFE	-13459	-12012	-9800	-10007	-11516	-9967	-8342
TFE	-10075	-9010	-7852	-8916	-11357	-8903	-7041

Tableau 7 : Valeur de l'hélicité molaire à 205 nm

Aux vues des résultats, on remarque que les analogues incluant des résidus Ortho semblent montrer une structure secondaire plus ordonnée que la partie C-terminale isolée. L'étude dichroïque des oligomères de motifs Ortho aurait pu enrichir ce travail, malheureusement la mauvaise solubilité n'a pas permis de les analyser.

IV : Conclusion

Les études cristallographiques sur les monomères Boc-C5-NHMe, Boc-Ortho-OH et Boc-Ortho-NHiPr ont mis en évidence, l'absence de liaisons hydrogènes intramoléculaires.

Les études dichroïques des oligomères du lactame C5, n'a pas mis en évidence la présence de structure secondaire en hélice dans les milieux étudiés, une forme en feuillet serait la plus vraisemblable. Des études RMN des effets NOE pourraient apporter une réponse définitive à la structure qu'adopte l'enchaînement de lactames C5.

Les analyses IR et RMN des dimères et trimères du motif Ortho à mis en évidence une structuration progressive de la molécule en hélice avec l'accroissement de taille par la présence de liaisons hydrogènes intramoléculaires de type H1-10 dans le CH₂Cl₂ et CDCl₃.

L'étude des analogues du CRF réalisée par dichroïsme circulaire a montré pour l'enchaînement Ala-Gly, une structure de type hélice α et pour Pro-Gly, une structure de type poly(Pro) II. Le profil obtenu avec le lactame C5, rappelle aussi une structure de type feuillet. Pour le motif Ortho, le profil dichroïque rappelant celui de l'hélice α où 3_{10} laisse penser que l'enchaînement possède, une régularité structurale. Là aussi l'étude RMN des effets NOE pourrait apporter des informations pour confirmer ou infirmer la présence d'une structure en hélice stabilisée par la présence de liaisons hydrogènes 1-10.

Chapitre 2 : Résultats biologiques

I : Introduction

Les analogues du hCRF et du $_{9-41}$ hCRF synthétisés, ont été testés pour leur capacité à déplacer le hCRF radiomarqué lié (2-[125]iodohistidyl 32) au récepteur. Le choix d'un tel modèle réside dans le fait que la séquence du récepteur CRF humain est identique à celle du rat. Les tests d'affinité ont été réalisés sur plusieurs modèles (membranes d'hypophyse de rat, de cellules AtT20 (tumeur d'hypophyse de souris)). Cependant, dans un souci d'élargie cette étude, ce même type de travail a été réalisé sur des préparations membranaires de cellules LLcPK1 (cellules de rein de cochon) préalablement transfectées de façon transitoire avec le vecteur d'expression du récepteur CRF1.

L'objectif de ce travail était de déterminer le meilleur modèle biologique en testant le hCRF et le $_{9-41}$ hCRF à titre de contrôle.

L'activité agoniste ou antagoniste de certaines molécules a été quantifiée par mesure de la libération d'AMPC et par la luciférase.

II : Résultats et discussion

Parmi les molécules synthétisées qui ont été testées (**Tableau 9 et 9**), seuls le ligand naturel (hCRF) et l'antagoniste peptidique ($_{9-41}$ hCRF) sont capable de déplacer le hCRF radiomarqué.

Analogues du hCRF	Références du manuscrit	Références du laboratoire	Ic50 Mol/g	Ec50 AMPc Mol/g	Ec50 Luci Mol/g
H-SEEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLA QQAHSNRKLMEEI-NH ₂	25	hCRF	7 10 ⁻⁹	5 10 ⁻⁸	5 10 ⁻⁸
SEEPP-(AG) ₁₄ -ARKLMEEI-NH ₂	27	JMV 2293	ND	-	-
SEEPP-(AG) ₂₀ -RKLMEI-NH ₂	28	JMV 2290	ND	-	-
SEEPP-(GP) ₁₄ -GRKLMEI-NH ₂	29	JMV 2297	ND	> 10 ⁻⁵	-
SEEPP-(GP) ₁₈ -RKLMEI-NH ₂	30	JMV 2298	ND	-	-
SEEPP-(C5) ₂₀ -RKLMEI-NH ₂	31	JMV 2149	ND	-	-
SEEAA-(C5) ₂₁ -RKLMEI-NH ₂	32	JMV 2231	ND	-	-
SEEPP-(Ortho) ₁₂ -RKLMEI-NH ₂	33	JMV 2233	ND	> 10 ⁻⁵	-
SEEAA-(Ortho) ₁₂ -RKLMEI-NH ₂	34	JMV 2275	ND	> 10 ⁻⁵	-
SEEPP-(Ortho) ₁₁ -RKLMEI-NH ₂	35	JMV 2389	ND	-	-
SEEPP-(Ortho) ₁₃ -RKLMEI-NH ₂	36	JMV 2390	ND	-	-
SEEPPISLDLTFHLLREVL-(C5) ₁₀ -RKLMEI-NH ₂	37	JMV 2439	ND	-	-
SEEPPISLDLTFHLLREVL-(Ortho) ₅ -RKLMEI-NH ₂	38	JMV 2428	ND	-	-

Tableau 8 : Séquences d'analogues du hCRF et Ic50, Ec50 correspondantes sur les modèles des cellules LLcPK1 exprimant transitoirement le récepteur CRF1. (ND : Non-déplacement)

Analogues du 9_{-41} hCRF	Références du manuscrit	Références du laboratoire	Ic50 Mol/g	Ec50 AMPc Mol/g	Ec50 Luci Mol/g
H-DLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMEII-NH ₂	26	JMV 2338	5 10 ⁻⁷	-	-
H-(C5) ₄ -LLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMEII-NH ₂	39	JMV 2339	ND	-	-
H-(C5) ₈ -LEMARAEQLAQQAHSNRKLMEII-NH ₂	40	JMV 2340	ND	-	-
H-(C5) ₁₁ -AEQLAQQAHSNRKLMEII-NH ₂	41	JMV 2341	ND	-	-
H-(C5) ₁₄ -QQAHSNRKLMEII-NH ₂	42	JMV 2342	ND	-	-
H-(C5) ₁₈ -NRKLMEII-NH ₂	43	JMV 2343	ND	-	-
H-(Ortho) ₁₁ -RKLMEII-NH ₂	46	JMV 2350	ND	> 10 ⁻⁵	-
H-(Ortho) ₁₀ -RKLMEII-NH ₂	45	JMV 2348	ND	-	-
H-(Ortho) ₉ -RKLMEII-NH ₂	44	JMV 2349	ND	> 10 ⁻⁵	-
H-(Ortho) ₈ -RKLMEII-NH ₂	50	JMV 2426	ND	-	-
H-(Ortho) ₇ -RKLMEII-NH ₂	49	JMV 2425	ND	-	-
H-(Ortho) ₅ -RKLMEII-NH ₂	48	JMV 2419	ND	-	-
H-(Ortho) ₃ -RKLMEII-NH ₂	47	JMV 2418	ND	-	-

Tableau 9 : Séquences d'analogues du 9_{-41} hCRF et Ic50, Ec50 correspondantes sur les modèles des cellules LLcPK1 exprimant transitoirement le récepteur CRF1. (ND : Non-déplacement)

Les raisons de ces résultats négatifs peuvent avoir des origines diverses :

- Les enchaînements Ala-Gly, Pro-Gly, (C5)_x et (Ortho)_x ne forment pas d'hélices en milieu biologique et ne peuvent pas orienter correctement les extrémités C- et N-terminales de la molécule.
- La partie peptidique 6-34 ainsi que 20-34 n'ont pas qu'un rôle structurant et le remplacement de certains amino acides essentiels pour l'affinité pour le récepteur n'est pas autorisé. Beyermann²²⁹ avait obtenu des résultats encourageants en remplaçant dans une molécule de la famille de l'urocortine (famille du CRF), la partie structurante de l'hélice α par d'autres hélices comme nous avons procédé en ne substituant que la partie 20-34.

L'absence de résultats biologiques est sûrement due au fait que nous n'avons plus de chaînes latérales sur notre hélice. Cela rend impossible les interactions indispensables à la reconnaissance ligand-récepteur. Une étude de relation structure-activité pourrait être alors envisagée en incorporant des motifs contraints porteur de chaînes latérales. Hamilton³⁵⁶ a utilisé ce moyen pour fonctionnaliser une hélice artificielle construite à partir de molécules terphénylques substituées qui se lient aux protéines anti apoptiques Bcl-x_L.

³⁵⁶ Kutzki, O. ; Park, H.S. ; Ernst, J.T. ; Orner, B.P. ; Yin, H. ; Hamilton, A.D. Development of a potent Bcl-x_L antagonist based on α -helix mimicry. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 11838-11839.

III : Partie expérimentale

Les tests ont été réalisés sur des préparations membranaires de cellules LLcPK1 préalablement transfectées avec le vecteur d'expression du récepteur CRF1 qui s'est avéré être le meilleur modèle. Dans un premier temps, les cellules sont transfectées puis les membranes sont extraites après la lyse des cellules par choc thermique et la quantité de protéine est déterminée par le réactif Biorad Protein Assay.

III 1 : Transfection des cellules LLcPK1

Les cellules sont cultivées de façon classique en présence de milieu DMEM supplémenté en SVF, glutamine, pénicilline et streptomycine. Au moment de la transfection, les cellules sont décollées à l'aide d'une solution de trypsine/EDTA. Elles doivent ensuite être abondamment lavées. Cette opération est réalisée à l'aide de centrifugations successives dans un tampon « cytomix ». Pour une transfection typique, le culot de dix millions de cellules est repris par 0.5 ml de cytomix alors supplémenté en ATP, glutathion et vecteur d'expression codant pour le récepteur CRF1 (5 à 10 µg). Ceci est transfecté dans une cuvette à électroporation. Après 10 minutes, l'électroporation est déclenchée dont les conditions ont été adaptées aux cellules LLcPK1. Après le choc électrique (20 msec), 0.5 ml de DMEM sans rouge de phénol contenant 10 % de sérum sont ajoutés. Après 10 minutes, le milieu est complété à 40 ml et ensemencé dans des boîtes de Pétri de 100 mm 48 heures. Les cellules peuvent être utilisées pour la préparation des membranes et détecter la capacité d'analogues du hCRF et du ${}_{9-41}$ hCRF à déplacer la liaison du CRF* au récepteur CRF1.

III 2 : Extraction des membranes

Les cellules sont lavées, scrapées et déposées dans un tube Eppendorf. Le tube est congelé dans l'azote liquide et décongelé, l'opération est réalisée deux fois. Il est ensuite centrifugé pendant 20 minutes à 10000 g à 0°C. Les culots sont repris dans un minimum de solution tampon. La teneur de la préparation membranaire en protéine est évaluée à l'aide du réactif Biorad Protein Assay.

III 3 : Déplacement de la liaison

Les membranes sont repressent à une concentration de 0.05 mg/ml dans le tampon avec 0.1 % de BSA. Les expériences de déplacement du 125 IhCRF (environ 50000 cpm) sont réalisées dans un volume final de 500 µl (400 µl de suspension de membrane, 50 µl de hCRF

froid ou de molécules à tester ou de tampon et 50 µl de I¹²⁵hCRF). La préparation est incubée pendant 2 heures à 25°C dans un tube en verre (le CRF* est adsorbé sur de nombreux supports plastiques), puis on arrête le déplacement par l'ajout de 2 ml d'une solution tampon contenant 2 % de BSA et on centrifuge pendant 15 minutes à 3000 TPM. Le surnageant est aspiré et la radioactivité associée au culot membranaire est quantifiée par un compteur gamma.

La valeur de la liaison spécifique est obtenue par différence entre la liaison totale et la liaison non spécifique. Les courbes de déplacement (liaison en fonction de la concentration) ainsi obtenues permettent de déterminer l'IC₅₀ qui correspond à la concentration de produit qui déplace 50 % de la liaison spécifique.

III 4 : Activité biologique

Cette étude a également été complétée en caractérisant la nature agoniste ou antagoniste des différents analogues.

Pour cela nous avons utilisé les données de la littérature qui indiquent que le hCRF via son récepteur est capable d'augmenter le taux d'AMPc et ainsi contribuer à l'activation de facteurs transcriptionnels au niveau de la séquence du CRE. Le travail qui a été entamé, a consisté à tester ces analogues vis à vis de ces deux réponses biologiques. Le taux d'AMPc a été déterminé à l'aide d'un kit RIA, tandis que l'activation de facteurs transcriptionnels au niveau de la séquence a été étudiée à l'aide de la stratégie « gène reporteur » (CRE)n luciférase. L'activité luciférase est quantifiée en présence de luciférine et d'ATP par bioluminescence.

CONCLUSION

Le but de ce travail était de synthétiser des oligomères de mimes contraints de dipeptides susceptibles de former des structures secondaires organisées de type hélice. Pour cela, nous avons sélectionné dans la littérature 70 motifs que nous avons soumis à un protocole de modélisation moléculaire afin de réaliser un tri informatique. Ce tri nous a permis de sélectionner 12 molécules parmi lesquelles huit mimes contraints de dipeptides (DBT (35), LBT (45), DBTMet (38), DBTCF₃ (36), C5 (17), C7 (24), DBC (34), Ortho (64)), deux dipeptides (AlaGly (6), ProGly (70)) et deux dipeptides cycliques (AspLys (9), LysAsp (48)).

Différentes équipes ont réalisé des travaux dans ce sens et ont mis en évidence la difficulté d'obtenir de telles structures appelées « Foldamers ». Ces travaux ont montré que certaines hélices artificielles sont capables de résister aux dégradations enzymatiques et possèdent également des propriétés antibactériennes ou antitumorales.

Parmi les molécules sélectionnées en modélisation moléculaire, certaines ont été synthétisées : l'acide 3(S)-amino-2-oxo-1-pyrrolidinacétique (motif C5) et l'acide-2-méthylamino phénylacétique (Ortho). Elles ont permis de synthétiser différents oligomères en utilisant une chimie classique en solution et la synthèse supportée.

La caractérisation des motifs unitaires et de leurs oligomères correspondants a été réalisée. La structure des monomères Boc-C5-NHMe, Boc-Ortho-OH et Boc-Ortho-NHiPr a été déterminée par des études cristallographiques. Des analyses conformationnelles par dichroïsme circulaire ont été réalisées sur les oligomères de C5. Les résultats montrent des différences avec les prédictions obtenues par modélisation moléculaire, la présence de structure en hélice n'a pu être observée. Par contre, les analyses de RMN et d'IR réalisées sur les oligomères du motif Ortho ont mis en évidence qu'une structure de type hélice H1-10 s'amorce avec les molécules dimériques Boc-(Ortho)₂-NHMe et Piv-(Ortho)₂-NHMe et se confirme avec les trimères Boc-(Ortho)₃-NHMe et Piv-(Ortho)₃-NHMe, comme cela avait été prédit lors des études de modélisation.

L'objectif que nous nous étions fixé de remplacer une partie ainsi que la totalité de l'hélice α du hCRF par des oligomères contraints a été réalisé. Pour cela nous avons développé différentes stratégies de synthèse en phase solide. Cependant, les résultats pharmacologiques ont montré que les séquences 6-34 et 20-34 du hCRF ne pouvaient être remplacées sans perte totale d'affinité pour le récepteur CRF1. Il en est de même pour les analogues de l'antagoniste du ₉₋₄₁hCRF où la partie 9-34 a été également substituée, entraînant une perte de l'affinité.

La recherche de structures remarquables comme des hélices artificielles construites à partir de molécules pseudo-peptidiques présente un intérêt certain. Les propriétés antibiotiques, par exemple, de telles molécules ouvrent une nouvelle voie de recherche thérapeutique. Des molécules comme les peptaïbols qui sont constitués d'une extrémité C-terminale alcool et d'une hélice peptidique pourraient tirer partie des recherches actuelles sur les Foldamers. La stabilité, vis à vis de la dégradation enzymatique de certaines hélices pourrait être développé dans l'optique d'obtenir des biomatériaux.

ANNEXES

Appareillages et matériels

Point de fusion

Les points de fusion sont mesurés sur un appareil de type *Büchi* à capillaire.

Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les chromatographies sur couche mince sont effectuées sur des plaques *Merck* 60F₂₅₄. Elles sont révélées par chauffage à 100°C après pulvérisation d'une solution éthylique de ninhydrine à 10% et par carbonisation à 150°C après pulvérisation de "Charring reagent" (solution de 20 g de sulfate d'ammonium dans 100 ml d'eau + 4 ml d'acide sulfurique concentré). Les proportions données sont : AcOEt/Hexane (x/y).

Chromatographie sur gel de silice

Les chromatographies sur gel de silice sont effectuées avec la silice *Kieselguhr Merck* G 0,05-0,2 mm.

Le polarimètre

Les pouvoirs rotatoires sont déterminés à 20°C avec un polarimètre Perkin-Elmer 341. Le pouvoir rotatoire est donné en degré et la concentration de produit dans le solvant est donné entre parenthèse.

HPLC analytique

Les analyses HPLC sont effectuées sur une système *Beckman* 168 à détection par barrette de diodes. La détection UV est effectuée à 214 et 254 nm avec un gradient d'éluants ACN/0.1% TFA (A) et eau/0.1% TFA (B) : 0% (B) → 100% (B).

Les colonnes employées sont :

- une symmetry-shield *Waters* RP18, 5 µm, 3.9x150 mm. Le débit est de 1ml/min en 15 ou 50 min.
- une symmetry-shield *Waters* RP18, 3.5 µm, 4.6x50 mm. Le débit est de 1ml/min en 15 min.
- une Chromolith speedROD RP18 *Merck*, 4.6x50 mm. Le débit est de 5ml/min en 3 min.

HPLC Préparative

Les purifications par HPLC préparative sont réalisées sur un appareil Waters 486 delta prep 4000 avec une colonne Delta-Pak C18 (15 µm) 100 Å 40x100 mm, un détecteur UV à 214 nm et un débit de 50 ml/min en gradient d'éluant ACN/0.1% TFA (A) et eau/0.1% TFA (B).

Spectrométrie de masse

Les analyses par spectrométrie de masse sont effectuées sur un spectromètre electrospray Platform II Micromass, équipé du système alliance de Waters permettant le couplage LC/MS.

RMN

Les analyses RMN ¹H sont effectuées sur un spectromètre *Brüker* 400 MHz.

Dichroïsme Circulaire

Infrarouge

Les analyses ont été réalisées sur

Cristallographie

Les expériences de cristallisation ont été réalisées sur :

- Brucker Kappa CCDMaXus

Robots de synthèse peptidique

Les robots de synthèses utilisés sont :

- Pioneer Peptide Synthesis System, Perseptive Biosystems
- Advanced Chemtech 496 Ω MOS

Modélisation

Les calculs ont été réalisés avec “Discover Molecular Simulation Program”, version 2.98 de Biosym/MSI, sur une station Silicon Graphics Octane de 2 processeurs R10000 à 225 Mhz. Le champ de force utilisé pour tous les calculs est cvff.

Programmes de modélisation

```

! PROGRAMME DE RECHERCHE CONFORMATIONNELLE A TEMPERATURE FIXE À 2000 K
!
!
  begin simulation
*   add-automatic bond torsion valence out-of-plane
*   coordinate file = "c5.car"
*   molecular data file = "c5.mdf"
  reduce
  set dielectric = 1.000000*r
  constrain prochiral
  nsave = 100
!
!
!   MINIMISATION DE LA STRUCTURE INITIALE POUR SUPPRIMER LES ARTEFACTS
!
  iter = 1
  ites = 1
  Minimize
* no cross terms
* no morse
* for 50 iterations
* using steep descents
* until the maximum derivative is less than 0.10 kcal/A
  Minimize
* no cross terms
* no morse
* for 100000 iterations
* using conjugate gradient
* until the maximum derivative is less than 0.010 kcal/A

      archive as file number iter "c5.arc"
!
!   INITIALISATION DES PARAMETRES DYNAMIQUES
!
  temp = 2000.0
  ibou = 1
100      retrieve file number ibou "c5.arc"
  initialize dynamics
* for 1000 iterations
* at temp
* steps of 1.000
* no cross terms
* no morse
* write history file every 100 steps
!
!   BOUCLES DYNAMIQUES
!
200  resume dynamics
* for 1000 iterations
* no cross terms
* no morse
!

```



```
!           MINIMISATION
!
  Minimize
* no cross terms
* no morse
* for 50 iterations
* using steep descents
* until the maximum derivative is less than 0.10 kcal/A
  Minimize
* no cross terms
* no morse
* for 100000 iterations
* using conjugate gradient
* until the maximum derivative is less than 0.010 kcal/A

!
!           IMPRESSION DES RESULTATS
!
  iter = iter + 1
                    archive as file number iter "c5.arc"
  ites = ites + 1
  if ites .le. 100 then 200

  print timings
end
```

```
! PROGRAMME DE VARIATION DES ANGLES DIÈDRES PHI2, PHI3 ET PSI3
!
! Récupération du fichier
! MODELISATION/NICOLAS/MIMES_TURNS/C5.arc FRAME 12
! Addition de CH3CO et NHCH3
! => mecoc5nhme.car
!
! overlap = 0.01
!
! begin simulation
! * add-automatic bond torsion valence out-of-plane
! * coordinate file = "mecoc5nhme.car"
! * molecular data file = "mecoc5nhme.mdf"
! reduce
!
! set dielectric = 1.000000*r
! constrain prochiral
! nsave = 100
!
! LES ANGLES 0 ET 4 SONT FIXÉS
! angle0 = 180.00
! angle4 = -16.32
! ifnum = 1
!
! Assign the torsion name d to
! * residue GLYN 2 atom N
! * residue ALAn 1 atom C
! * residue ALAn 1 atom CA
! * residue ALAn 1 atom CB
!
! force d in ALAn 1 to angle4 using 100.000000
!
! Assign the torsion name R1 to
! * residue METH 1D atom C1
! * residue ALHD 1C atom C1
! * residue ALAn 1 atom N
! * residue ALAn 1 atom CA
!
! force R1 in ALHD 1C to angle0 using 100.000000
!
! Assign the torsion name phi2 to
! * residue ALHD 1C atom C1
! * residue ALAn 1 atom N
! * residue ALAn 1 atom CA
! * residue ALAn 1 atom C
!
! Assign the torsion name phi3 to
! * residue ALAn 1 atom C
! * residue GLYN 2 atom N
! * residue GLYN 2 atom CA
! * residue GLYN 2 atom C
!
! Assign the torsion name psi3 to
! * residue GLYN 2 atom N
! * residue GLYN 2 atom CA
! * residue GLYN 2 atom C
! * residue AMDE 1E atom N1
```

```

!
    loop1 = 1
    angle1 = -180.00
!
L1  force  phi2 in  ALAn 1  to angle1 using 100.000000
    loop2 = 1
    angle2 = -180.00
!
L2  force  phi3 in  GLYN 2  to angle2 using 100.000000
    loop3 = 1
    angle3 = -180.00
!
L3  force  psi3 in  GLYN 2  to angle3 using 100.000000
!
    Minimize
*    no cross terms
*    no morse
*    for 100000 iterations
*    using conjugate gradient
*    until the maximum derivative is less than 0.1000000 kcal/A
!
!
    archive as file number ifnum "mecoc5nhme.arc"
    ifnum = ifnum + 1
!
!
R0  loop3 = loop3 + 1
    angle3 = angle3 + 30.00
    if loop3 .le. 13 then L3
    loop2 = loop2 + 1
    angle2 = angle2 + 30.00
    if loop2 .le. 13 then L2
    loop1 = loop1 + 1
    angle1 = angle1 + 30.00
    if loop1 .le. 13 then L1
!
    iter2 = ifnum
    iter1 = 1
!
    TOUTES LES CONTRAINTES APPLIQUÉES AUX ANGLES 0,1,2,3 ET 4 SONT ENLEVÉES

    force nothing
100  retrieve file number iter1 "mecoc5nhme.arc"
    Minimize
*    no cross terms
*    no morse
*    for 100000 iterations
*    using conjugate gradient
*    until the maximum derivative is less than 0.001000000 kcal/A
    archive as file number iter2 "mecoc5nhme.arc"
    iter1 = iter1 + 1
    iter2 = iter2 + 1
    if iter1 .le. 2197 then 100
end

```

```
! PROGRAMME DE CONSTRUCTION AUTOMATIQUE DES DÉCAMÈRES
!
!
! c5_10_x.inp
!
! MODELISATION/NICOLAS/MIMES_TURNS/c5.12
! ajout de MeCO et NHMe
! => mecoc5nhme.2230
! polymérisation x10
! contraintes d'angles dièdres du mecoc5nhme.Frame
! (d=Distance° T=Tau° Energie Kcal/mole)
! phi2=PHI2° phi3=PHI3° psi3=PSI3°
! => c5_10_.1
! DÉCAMÈRE MINIMISÉ SANS CONTRAINTES
! => c5_10_.2
! DYNAMIQUE MOLÉCULAIRE À TEMPÉRATURE AMBIANTE
! => c5_10_.3
!
! overlap = 0.01
!
! begin simulation
! * add-automatic bond torsion valence out-of-plane
! * coordinate file = "c5_10_.car"
! * molecular data file = "c5_10_.mdf"
! reduce
!
! set dielectric = 1.000000*r
! constrain prochiral
! nsave = 100
!
! angle1 = 180
! angle2 = PHI2
! angle3 = PHI3
! angle4 = PSI3
! angle0 = 16.32
!
! Assign the torsion name d1 to
! * residue GLYN 2 atom N
! * residue ALAn 1 atom C
! * residue ALAn 1 atom CA
! * residue ALAn 1 atom CB
!
! Assign the torsion name d2 to
! * residue GLYN 2B atom N
! * residue ALAn 1D atom C
! * residue ALAn 1D atom CA
! * residue ALAn 1D atom CB
!
! Assign the torsion name d3 to
! * residue GLYN 2C atom N
! * residue ALAn 1H atom C
! * residue ALAn 1H atom CA
! * residue ALAn 1H atom CB
```

Assign the torsion name d4 to
* residue GLYN 2D atom N
* residue ALAn 1J atom C
* residue ALAn 1J atom CA
* residue ALAn 1J atom CB

Assign the torsion name d5 to
* residue GLYN 2E atom N
* residue ALAn 1L atom C
* residue ALAn 1L atom CA
* residue ALAn 1L atom CB

Assign the torsion name d6 to
* residue GLYN 2F atom N
* residue ALAn 1N atom C
* residue ALAn 1N atom CA
* residue ALAn 1N atom HA

Assign the torsion name d7 to
* residue GLYN 2G atom N
* residue ALAn 1P atom C
* residue ALAn 1P atom CA
* residue ALAn 1P atom CB

Assign the torsion name d8 to
* residue GLYN 2H atom N
* residue ALAn 1R atom C
* residue ALAn 1R atom CA
* residue ALAn 1R atom CB

Assign the torsion name d9 to
* residue GLYN 2I atom N
* residue ALAn 1T atom C
* residue ALAn 1T atom CA
* residue ALAn 1T atom CB

Assign the torsion name d10 to
* residue GLYN 2J atom N
* residue ALAn 1X atom C
* residue ALAn 1X atom CA
* residue ALAn 1X atom CB

Assign the torsion name r1 to
* residue METH 1F atom C1
* residue ALHD 1E atom C1
* residue ALAn 1 atom N
* residue ALAn 1 atom CA

Assign the torsion name r2 to
* residue GLYN 2 atom CA
* residue GLYN 2 atom C
* residue ALAN 1D atom N
* residue ALAN 1D atom CA

Assign the torsion name r3 to
* residue GLYN 2B atom CA
* residue GLYN 2B atom C
* residue ALAN 1H atom N
* residue ALAN 1H atom CA

Assign the torsion name r4 to
* residue GLYN 2C atom CA
* residue GLYN 2C atom C
* residue ALAN 1J atom N
* residue ALAN 1J atom CA

Assign the torsion name r5 to
* residue GLYN 2D atom CA
* residue GLYN 2D atom C
* residue ALAN 1L atom N
* residue ALAN 1L atom CA

Assign the torsion name r6 to
* residue GLYN 2E atom CA
* residue GLYN 2E atom C
* residue ALAN 1N atom N
* residue ALAN 1N atom CA

Assign the torsion name r7 to
* residue GLYN 2F atom CA
* residue GLYN 2F atom C
* residue ALAN 1P atom N
* residue ALAN 1P atom CA

Assign the torsion name r8 to
* residue GLYN 2G atom CA
* residue GLYN 2G atom C
* residue ALAN 1R atom N
* residue ALAN 1R atom CA

Assign the torsion name r9 to
* residue GLYN 2H atom CA
* residue GLYN 2H atom C
* residue ALAN 1T atom N
* residue ALAN 1T atom CA

Assign the torsion name r10 to
* residue GLYN 2I atom CA
* residue GLYN 2I atom C
* residue ALAN 1X atom N
* residue ALAN 1X atom CA

Assign the torsion name r11 to
* residue GLYN 2J atom CA
* residue GLYN 2J atom C
* residue AMDE 1V atom N1
* residue METH 1U atom C1

Assign the torsion name a1 to
* residue ALHD 1E atom C1
* residue ALAN 1 atom N
* residue ALAN 1 atom CA
* residue ALAN 1 atom C

Assign the torsion name a2 to
* residue GLYN 2 atom C
* residue ALAN 1D atom N
* residue ALAN 1D atom CA
* residue ALAN 1D atom C

Assign the torsion name a3 to
* residue GLYN 2B atom C
* residue ALAN 1H atom N
* residue ALAN 1H atom CA
* residue ALAN 1H atom C

Assign the torsion name a4 to
* residue GLYN 2C atom C
* residue ALAN 1J atom N
* residue ALAN 1J atom CA
* residue ALAN 1J atom C

Assign the torsion name a5 to
* residue GLYN 2D atom C
* residue ALAN 1L atom N
* residue ALAN 1L atom CA
* residue ALAN 1L atom C

Assign the torsion name a6 to
* residue GLYN 2E atom C
* residue ALAN 1N atom N
* residue ALAN 1N atom CA
* residue ALAN 1N atom C

Assign the torsion name a7 to
* residue GLYN 2F atom C
* residue ALAn 1P atom N
* residue ALAn 1P atom CA
* residue ALAn 1P atom C

Assign the torsion name a8 to
* residue GLYN 2G atom C
* residue ALAn 1R atom N
* residue ALAn 1R atom CA
* residue ALAn 1R atom C

Assign the torsion name a9 to
* residue GLYN 2H atom C
* residue ALAn 1T atom N
* residue ALAn 1T atom CA
* residue ALAn 1T atom C

Assign the torsion name a10 to
* residue GLYN 2I atom C
* residue ALAn 1X atom N
* residue ALAn 1X atom CA
* residue ALAn 1X atom C

Assign the torsion name b1 to
* residue ALAn 1 atom C
* residue GLYN 2 atom N
* residue GLYN 2 atom CA
* residue GLYN 2 atom C

Assign the torsion name b2 to
* residue ALAn 1D atom C
* residue GLYN 2B atom N
* residue GLYN 2B atom CA
* residue GLYN 2B atom C

Assign the torsion name b3 to
* residue ALAn 1H atom C
* residue GLYN 2C atom N
* residue GLYN 2C atom CA
* residue GLYN 2C atom C

Assign the torsion name b4 to
* residue ALAn 1J atom C
* residue GLYN 2D atom N
* residue GLYN 2D atom CA
* residue GLYN 2D atom C

Assign the torsion name b5 to
* residue ALAn 1J atom C
* residue GLYN 2D atom N
* residue GLYN 2D atom CA
* residue GLYN 2D atom C

Assign the torsion name b5 to
* residue ALAn 1L atom C
* residue GLYN 2E atom N
* residue GLYN 2E atom CA
* residue GLYN 2E atom C

Assign the torsion name b6 to
* residue ALAn 1N atom C
* residue GLYN 2F atom N
* residue GLYN 2F atom CA
* residue GLYN 2F atom C

Assign the torsion name b7 to
* residue ALAn 1P atom C
* residue GLYN 2G atom N
* residue GLYN 2G atom CA
* residue GLYN 2G atom C

Assign the torsion name b8 to
* residue ALAn 1R atom C
* residue GLYN 2H atom N
* residue GLYN 2H atom CA
* residue GLYN 2H atom C

Assign the torsion name b9 to
* residue ALAn 1T atom C
* residue GLYN 2I atom N
* residue GLYN 2I atom CA
* residue GLYN 2I atom C

Assign the torsion name b10 to
* residue ALAn 1X atom C
* residue GLYN 2J atom N
* residue GLYN 2J atom CA
* residue GLYN 2J atom C

Assign the torsion name c1 to
* residue GLYN 2 atom N
* residue GLYN 2 atom CA
* residue GLYN 2 atom C
* residue ALAn 1D atom N

Assign the torsion name c2 to
* residue GLYN 2B atom N
* residue GLYN 2B atom CA
* residue GLYN 2B atom C
* residue ALAN 1H atom N

Assign the torsion name c3 to
* residue GLYN 2C atom N
* residue GLYN 2C atom CA
* residue GLYN 2C atom C
* residue ALAN 1J atom N

Assign the torsion name c4 to
* residue GLYN 2D atom N
* residue GLYN 2D atom CA
* residue GLYN 2D atom C
* residue ALAN 1L atom N

Assign the torsion name c5 to
* residue GLYN 2E atom N
* residue GLYN 2E atom CA
* residue GLYN 2E atom C
* residue ALAN 1N atom N

Assign the torsion name c6 to
* residue GLYN 2F atom N
* residue GLYN 2F atom CA
* residue GLYN 2F atom C
* residue ALAN 1P atom N

Assign the torsion name c7 to
* residue GLYN 2G atom N
* residue GLYN 2G atom CA
* residue GLYN 2G atom C
* residue ALAN 1R atom N

Assign the torsion name c8 to
* residue GLYN 2H atom N
* residue GLYN 2H atom CA
* residue GLYN 2H atom C
* residue ALAN 1T atom N

Assign the torsion name c9 to
* residue GLYN 2I atom N
* residue GLYN 2I atom CA
* residue GLYN 2I atom C
* residue ALAN 1X atom N

Assign the torsion name c10 to

```
* residue GLYN      2J atom N
* residue GLYN      2J atom CA
* residue GLYN      2J atom C
* residue AMDE      1V atom N1

L0  force   d1 in  ALAn 1  to angle0 using 100.000000
L1  force   d2 in  ALAn 1D to angle0 using 100.000000
L2  force   d3 in  ALAn 1H to angle0 using 100.000000
L3  force   d4 in  ALAn 1J to angle0 using 100.000000
L4  force   d5 in  ALAn 1L to angle0 using 100.000000
L5  force   d6 in  ALAn 1N to angle0 using 100.000000
L6  force   d7 in  ALAn 1P to angle0 using 100.000000
L7  force   d8 in  ALAn 1R to angle0 using 100.000000
L8  force   d9 in  ALAn 1T to angle0 using 100.000000
L9  force  d10 in  ALAn 1X to angle0 using 100.000000
L10 force   r1 in  ALHD 1E  to angle1 using 100.000000
L11 force   r2 in  GLYN 2  to angle1 using 100.000000
L12 force   r3 in  GLYN 2B  to angle1 using 100.000000
L13 force   r4 in  GLYN 2C  to angle1 using 100.000000
L14 force   r5 in  GLYN 2D  to angle1 using 100.000000
L15 force   r6 in  GLYN 2E  to angle1 using 100.000000
L16 force   r7 in  GLYN 2F  to angle1 using 100.000000
L17 force   r8 in  GLYN 2G  to angle1 using 100.000000
L18 force   r9 in  GLYN 2H  to angle1 using 100.000000
L19 force  r10 in  GLYN 2I  to angle1 using 100.000000
L20 force  r11 in  GLYN 2J  to angle1 using 100.000000
L21 force   a1 in  ALAn 1  to angle2 using 100.000000
L22 force   a2 in  ALAn 1D  to angle2 using 100.000000
L23 force   a3 in  ALAn 1H  to angle2 using 100.000000
L24 force   a4 in  ALAn 1J  to angle2 using 100.000000
L25 force   a5 in  ALAn 1L  to angle2 using 100.000000
L26 force   a6 in  ALAn 1N  to angle2 using 100.000000
L27 force   a7 in  ALAn 1P  to angle2 using 100.000000
L28 force   a8 in  ALAn 1R  to angle2 using 100.000000
L29 force   a9 in  ALAn 1T  to angle2 using 100.000000
L30 force  a10 in  ALAn 1X  to angle2 using 100.000000
L31 force   b1 in  GLYN 2  to angle3 using 100.000000
L32 force   b2 in  GLYN 2B  to angle3 using 100.000000
L33 force   b3 in  GLYN 2C  to angle3 using 100.000000
L34 force   b4 in  GLYN 2D  to angle3 using 100.000000
L35 force   b5 in  GLYN 2D  to angle3 using 100.000000
L36 force   b5 in  GLYN 2E  to angle3 using 100.000000
L37 force   b6 in  GLYN 2F  to angle3 using 100.000000
L38 force   b7 in  GLYN 2G  to angle3 using 100.000000
L39 force   b8 in  GLYN 2H  to angle3 using 100.000000
L40 force   b9 in  GLYN 2I  to angle3 using 100.000000
L41 force  b10 in  GLYN 2J  to angle3 using 100.000000
L42 force   c1 in  GLYN 2  to angle4 using 100.000000
L43 force   c2 in  GLYN 2B  to angle4 using 100.000000
L44 force   c3 in  GLYN 2C  to angle4 using 100.000000
L45 force   c4 in  GLYN 2D  to angle4 using 100.000000
L46 force   c5 in  GLYN 2E  to angle4 using 100.000000
L47 force   c6 in  GLYN 2F  to angle4 using 100.000000
L48 force   c7 in  GLYN 2G  to angle4 using 100.000000
L49 force   c8 in  GLYN 2H  to angle4 using 100.000000
L50 force   c9 in  GLYN 2I  to angle4 using 100.000000
L51 force  c10 in  GLYN 2J  to angle4 using 100.000000
```

```

Minimize
*   no cross terms
*   no morse
*   for 100000 iterations
*   using conjugate gradient
*   until the maximum derivative is less than 0.001000000 kcal/A
!
!
    iter = 1
    archive as file number iter "c5_10_.arc"
    iter = iter + 1

force nothing

Minimize
*   no cross terms
*   no morse
*   for 100000 iterations
*   using conjugate gradient
*   until the maximum derivative is less than 0.001000000 kcal/A
!
!
    archive as file number iter "c5_10_.arc"

initialize dynamics
*   for 100 iterations
*   at 300.000 K
*   steps of 1.000
*   no cross terms
*   no morse
*   write history file every 100 steps
resume dynamics
*   for 5000 iterations
*   no cross terms
*   no morse

    iter = iter + 1
    archive as file number iter "c5_10_.arc"

print timings
end

```

Pour pouvoir utiliser ce programme il faut créer 4 fichiers dans le dossier où est lancé le programme. Ces fichiers sont NOM, NOM2, NOMBRE et NOMBRE2 qui contiennent des informations qui seront automatiquement modifiées pour tout nouveau calcul.

```

echo " PROGRAMME AUTOMATIQUE POUR GENENER LES x DÉCAMÈRES À PARTIR "
echo " DU MODÈLE C5_10_x.car "
echo " "
echo " Automatismel "
echo " "
echo " Le fichier identifications doit être fait"
echo " "
echo " "
echo " Nom du fichier => \c"
read Nomdefichier
echo " "
echo " Nombre de fichiers => \c"
read Nombredefichiers
echo " "
i=0
j=0
while
[ $i -lt $Nombredefichiers ]
do
i=`expr $i + 1`
j=`expr $j + 1`
cp c5_10_x.car $Nomdefichier$i\car
cp c5_10_x.mdf $Nomdefichier$i\mdf
cp c5_10_x.inp $Nomdefichier$i\inp
echo " "
echo " LE FICHIER identifications COMPORTE TOUTES LES CARACTÉRISTIQUES
CONFORMATIONELLES "
echo " DES Puits DE POTENTIEL DE L ÉTUDE DE VARIATION DES ANGLES DIÈDRES. "
echo " "
Frame=`sed -n ${j}p identifications`
j=`expr $j + 1`
Energie=`sed -n ${j}p identifications`
j=`expr $j + 1`
Distance=`sed -n ${j}p identifications`
j=`expr $j + 1`
Tau=`sed -n ${j}p identifications`
j=`expr $j + 1`
PHI2=`sed -n ${j}p identifications`
j=`expr $j + 1`
PHI3=`sed -n ${j}p identifications`
j=`expr $j + 1`
PSI3=`sed -n ${j}p identifications`

sed < $Nomdefichier$i\inp -e s/c5_10_/$Nomdefichier$i/g > temp1
sed < temp1 -e s/Frame/$Frame/g > temp2
sed < temp2 -e s/Distance/$Distance/g > temp1
sed < temp1 -e s/Tau/$Tau/g > temp2
sed < temp2 -e s/Energie/$Energie/g > temp1
sed < temp1 -e s/PHI2/$PHI2/g > temp2
sed < temp2 -e s/PHI3/$PHI3/g > temp1
sed < temp1 -e s/PSI3/$PSI3/g > $Nomdefichier$i\inp

rm temp*

done

q=0

```

```
sed < NOM -e s/Nomdefichier/$Nomdefichier/g > NOM2

sed < NOMBRE -e s/Nombredefichiers/$Nombredefichiers/g > NOMBRE2

echo "      Lancez les discover differes"
echo " "
echo " LE LANCEMENT DES DISCOVER DIFFÉRÉS PERMET DE CRÉER LES FICHIERS .car
ET .mdf "
echo " "
echo "      Puis lancer Automatisation2"
```

Le programme Automatisation2 permet de lister les fichiers .csh et de lancer les calculs les uns après les autres.

```
echo "      Automatisation2"
echo "      "
echo "      Lancement des discover"

j=1
Nomdefichier=`sed -n ${j}p NOM2`

cat $Nomdefichier*.csh > Automatisation3
chmod +x Automatisation3
Automatisation3
```

Données cristallographiques de Boc-Ortho-OH

[2-(tertbutylcarbonylmethyl-amino)-phenyl]acetic acid
 _chemical_formula_moiety 'C14 H19 N O4 '
 _chemical_formula_sum 'C14 H19 N O4 '
 _chemical_formula_weight 265.309
 _chemical_compound_source 'Chemical Synthesis'

#=====

CRYSTAL DATA

_symmetry_cell_setting 'Monoclinic'
 _symmetry_space_group_name_H-M 'P 21/c'
 _symmetry_space_group_name_Hall '-P 2ybc'
 _symmetry_equiv_pos_as_xyz
 '+X,+Y,+Z'
 '-X,-Y,-Z'
 '-X,+Y+ 1/2,-Z+ 1/2'
 '+X,-Y+ 1/2,+Z+ 1/2'

_cell_length_a 12.6392(6)
 _cell_length_b 5.1470(2)
 _cell_length_c 22.5450(1)
 _cell_angle_alpha 90.00
 _cell_angle_beta 107.744(3)
 _cell_angle_gamma 90.00
 _cell_volume 1396.85(9)
 _cell_formula_units_Z 4
 _cell_measurement_temperature 293(2)
 _cell_measurement_reflns_used 8934
 _cell_measurement_theta_min 0.95
 _cell_measurement_theta_max 26.17

_exptl_crystal_description 'Prism'
 _exptl_crystal_colour 'Colourless'
 _exptl_crystal_size_max 0.40
 _exptl_crystal_size_mid 0.30
 _exptl_crystal_size_min 0.20
 _exptl_crystal_density_diffn 1.262

_exptl_crystal_density_meas ?
 _exptl_crystal_density_method 'not measured'

_exptl_crystal_F_000 568
 _exptl_absorpt_coefficient_mu 0.092
 _exptl_absorpt_correction_type none
 _exptl_absorpt_correction_T_min ?
 _exptl_absorpt_correction_T_max ?

#=====

EXPERIMENTAL DATA

_exptl_special_details
 _diffn_ambient_temperature 293(2)

```

_diffrn_radiation_wavelength 0.71073
_diffrn_radiation_type      'MoK\alpha'
_diffrn_radiation_source    'X-ray tube'
_diffrn_measurement_device  'Kappa CCD area-detector'
_diffrn_measurement_method  '\f-scan'
_diffrn_reflns_number      8934
_diffrn_reflns_av_R_equivalents 0.033
_diffrn_reflns_av_sigmaI/netI 0.0328
_diffrn_reflns_limit_h_min  -15
_diffrn_reflns_limit_h_max   15
_diffrn_reflns_limit_k_min   -6
_diffrn_reflns_limit_k_max    6
_diffrn_reflns_limit_l_min  -27
_diffrn_reflns_limit_l_max   26
_diffrn_reflns_theta_min     0.95
_diffrn_reflns_theta_max    26.17
_diffrn_reflns_theta_full    26.17
_diffrn_measured_fraction_theta_max 0.991
_diffrn_measured_fraction_theta_full 0.991

_computing_cell_refinement
'HKL Scalepack (Otwinowski & Minor 1997)'
_computing_data_collection
'Kappa CCD (Kappa CCD Reference Manual)'
_computing_data_reduction
'Denzo and Scalepak (Otwinowski & Minor, 1997)'
_computing_structure_solution
'SIR92 (Altomare et al., 1994)'
_computing_structure_refinement
'SHELXL-97 (Sheldrick, 1997)'
_computing_molecular_graphics
'Ortep II (Johnson, 1976), Platon (Spek, 2001)'
_computing_publication_material
'MaXus (Mackay et al., 1999)'
#=====

# REFINEMENT DATA

_reflns_number_total      2705
_reflns_number_gt        2358
_reflns_threshold_expression I>2\sigma(I)
_refine_ls_structure_factor_coef Fsqd
_refine_ls_matrix_type    full
_refine_ls_weighting_scheme calc
_refine_ls_weighting_details 'calc w=1/[\sigma^2(Fo^2)+(0.0973P)^2+0.4408P]
where P=(Fo^2+2Fc^2)/3'

_atom_sites_solution_primary      direct
_atom_sites_solution_secondary    difmap
_atom_sites_solution_hydrogens    geom
_refine_ls_hydrogen_treatment     constr
_refine_ls_number_reflns          2705
_refine_ls_number_parameters      176
_refine_ls_number_restraints      0
_refine_ls_R_factor_all            0.0666
_refine_ls_R_factor_gt            0.0541
_refine_ls_wR_factor_ref          0.1775
_refine_ls_wR_factor_gt          0.1564
_refine_ls_goodness_of_fit_ref    1.080
_refine_ls_restrained_S_all       1.080

```



```

_refine_ls_shift/su_max      0.003
_refine_ls_shift/su_mean    0.001
_refine_diff_density_max    0.247
_refine_diff_density_min    -0.210
_refine_diff_density_rms    0.063

```

```
_refine_special_details
```

```
;
```

Refinement of F^2 against ALL reflections. The weighted R-factor wR and goodness of fit S are based on F^2 , conventional R-factors R are based on F, with F set to zero for negative F^2 . The threshold expression of $F^2 > 2\sigma(F^2)$ is used only for calculating R-factors(gt) etc. and is not relevant to the choice of reflections for refinement. R-factors based on F^2 are statistically about twice as large as those based on F, and R-factors based on ALL data will be even larger.

```

#=====
# ATOMIC COORDINATES AND THERMAL PARAMETERS
#=====

```

Table 2. Atomic coordinates and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for cif1. $U(\text{eq})$ is defined as one third of the trace of the orthogonalized U^{ij} tensor.

		x	y	z	U	
O1	O	0.93658(14)	0.7231(3)	0.01449(8)	0.0697(5)	Uani
O2	O	0.96234(18)	1.0957(3)	0.06512(9)	0.0798(6)	Uani
O3	O	0.65702(13)	0.4087(2)	-0.02753(7)	0.0565(4)	Uani
O4	O	0.68141(14)	0.7223(2)	-0.09295(6)	0.0548(4)	Uani
N1	N	0.66060(13)	0.8348(3)	-0.00268(7)	0.0434(4)	Uani
C1	C	0.92843(14)	0.8667(4)	0.05781(9)	0.0464(4)	Uani
C2	C	0.88086(17)	0.7487(4)	0.10502(10)	0.0525(5)	Uani
C3	C	0.81683(14)	0.9377(4)	0.13196(8)	0.0426(4)	Uani
C4	C	0.87292(17)	1.0975(5)	0.18128(9)	0.0568(5)	Uani
C5	C	0.81738(19)	1.2787(5)	0.20630(9)	0.0594(6)	Uani
C6	C	0.70467(18)	1.3014(4)	0.18240(9)	0.0546(5)	Uani
C7	C	0.64750(16)	1.1431(4)	0.13372(8)	0.0473(5)	Uani
C8	C	0.70137(13)	0.9614(3)	0.10766(7)	0.0388(4)	Uani
C9	C	0.63375(16)	0.7943(4)	0.05495(8)	0.0476(5)	Uani
C10	C	0.66576(14)	0.6343(3)	-0.04009(8)	0.0404(4)	Uani
C11	C	0.69467(19)	0.5404(4)	-0.14072(9)	0.0540(5)	Uani
C12	C	0.7134(5)	0.7223(5)	-0.18922(15)	0.1285(18)	Uani
C13	C	0.79464(18)	0.3714(5)	-0.11467(11)	0.0644(6)	Uani
C14	C	0.5900(2)	0.3843(6)	-0.16677(13)	0.0858(9)	Uani
H2	H	0.9993	1.1258	0.0416	0.096	Uiso
H1	H	0.6734	0.9897	-0.0131	0.052	Uiso
H2A	H	0.9410	0.6764	0.1387	0.063	Uiso
H2B	H	0.8320	0.6068	0.0856	0.063	Uiso
H4	H	0.9496	1.0824	0.1979	0.068	Uiso
H5	H	0.8566	1.3840	0.2392	0.071	Uiso
H6	H	0.6667	1.4227	0.1988	0.065	Uiso
H7	H	0.5707	1.1587	0.1179	0.057	Uiso
H9A	H	0.6461	0.6132	0.0669	0.057	Uiso
H9B	H	0.5556	0.8313	0.0477	0.057	Uiso
H12A	H	0.7197	0.6233	-0.2241	0.193	Uiso
H12B	H	0.7805	0.8192	-0.1715	0.193	Uiso
H12C	H	0.6518	0.8400	-0.2029	0.193	Uiso
H13A	H	0.8577	0.4779	-0.0945	0.097	Uiso
H13B	H	0.8093	0.2753	-0.1478	0.097	Uiso
H13C	H	0.7810	0.2527	-0.0850	0.097	Uiso
H14A	H	0.5930	0.2940	-0.2035	0.129	Uiso
H14B	H	0.5270	0.4987	-0.1772	0.129	Uiso
H14C	H	0.5832	0.2608	-0.1362	0.129	Uiso

Table 3. Anisotropic displacement parameters (\AA^2) for cif1. The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2\text{h}^2\text{a}^2\text{U}^{11} + \dots + 2\text{hka}^*\text{b}^*\text{U}^{12}$]

	U11	U22	U33	U23	U13	U12
O1	0.0765(10)	0.0722(10)	0.0773(10)	-0.0228(8)	0.0485(9)	-0.0128(8)
O2	0.1084(14)	0.0657(11)	0.0913(13)	-0.0197(9)	0.0693(11)	-0.0235(9)
O3	0.0822(10)	0.0304(7)	0.0636(9)	0.0012(6)	0.0324(7)	-0.0028(6)
O4	0.1004(11)	0.0287(6)	0.0397(7)	-0.0008(5)	0.0279(7)	0.0070(6)
N1	0.0631(9)	0.0312(7)	0.0392(7)	-0.0003(5)	0.0207(7)	0.0002(6)
C1	0.0394(8)	0.0515(11)	0.0525(10)	-0.0035(8)	0.0204(7)	0.0062(7)
C2	0.0521(10)	0.0533(11)	0.0576(11)	0.0104(9)	0.0249(9)	0.0145(8)
C3	0.0463(9)	0.0467(10)	0.0391(8)	0.0075(7)	0.0196(7)	0.0041(7)
C4	0.0498(10)	0.0743(14)	0.0455(10)	0.0000(9)	0.0134(8)	-0.0020(9)
C5	0.0727(13)	0.0680(14)	0.0409(10)	-0.0108(9)	0.0223(9)	-0.0127(10)
C6	0.0722(13)	0.0548(12)	0.0459(10)	-0.0045(8)	0.0319(9)	0.0050(9)
C7	0.0505(9)	0.0532(11)	0.0447(9)	0.0029(8)	0.0239(8)	0.0065(8)
C8	0.0459(9)	0.0393(9)	0.0362(8)	0.0057(6)	0.0201(7)	0.0011(7)
C9	0.0520(10)	0.0501(11)	0.0464(9)	-0.0022(8)	0.0235(8)	-0.0072(8)
C10	0.0484(9)	0.0312(8)	0.0411(8)	0.0006(6)	0.0130(7)	0.0017(6)
C11	0.0875(14)	0.0344(9)	0.0417(9)	-0.0052(7)	0.0224(9)	0.0075(9)
C12	0.297(6)	0.0514(15)	0.0697(17)	0.0022(13)	0.105(3)	0.018(2)
C13	0.0597(12)	0.0664(14)	0.0688(14)	-0.0196(11)	0.0222(10)	0.0023(10)
C14	0.0672(14)	0.095(2)	0.0786(17)	-0.0461(15)	-0.0019(12)	0.0170(13)

Table 4. Bond lengths [\AA] and angles [$^\circ$] for cif1.

O1 - C1	1.254(2)
O2 - C1	1.248(2)
O3 - C10	1.209(2)
O4 - C10	1.345(2)
O4 - C11	1.475(2)
N1 - C10	1.347(2)
N1 - C9	1.455(2)
C1 - C2	1.501(3)
C2 - C3	1.507(3)
C3 - C4	1.391(3)
C3 - C8	1.399(2)
C4 - C5	1.386(3)
C5 - C6	1.366(3)
C6 - C7	1.381(3)
C7 - C8	1.388(2)
C8 - C9	1.504(2)
C11 - C13	1.499(3)
C11 - C14	1.506(4)
C11 - C12	1.512(3)
O2 - H2	0.8200
N1 - H1	0.8600
C2 - H2A	0.9700
C2 - H2B	0.9700
C4 - H4	0.9300
C5 - H5	0.9300
C6 - H6	0.9300
C7 - H7	0.9300
C9 - H9A	0.9700
C9 - H9B	0.9700
C12 - H12A	0.9600
C12 - H12B	0.9600

C12 - H12C	0.9600
C13 - H13A	0.9600
C13 - H13B	0.9600
C13 - H13C	0.9600
C14 - H14A	0.9600
C14 - H14B	0.9600
C14 - H14C	0.9600
C10 O4 C11	120.92(14)
C10 N1 C9	121.25(15)
O2 C1 O1	123.59(18)
O2 C1 C2	118.95(18)
O1 C1 C2	117.36(18)
C1 C2 C3	113.89(16)
C4 C3 C8	118.56(16)
C4 C3 C2	119.91(17)
C8 C3 C2	121.51(17)
C5 C4 C3	121.67(19)
C6 C5 C4	119.59(19)
C5 C6 C7	119.55(18)
C6 C7 C8	121.90(18)
C7 C8 C3	118.72(16)
C7 C8 C9	119.05(16)
C3 C8 C9	122.22(15)
N1 C9 C8	113.12(14)
O3 C10 O4	125.43(16)
O3 C10 N1	124.35(17)
O4 C10 N1	110.21(14)
O4 C11 C13	110.61(16)
O4 C11 C14	109.97(18)
C13 C11 C14	112.28(19)
O4 C11 C12	102.27(16)
C13 C11 C12	110.1(2)
C14 C11 C12	111.2(3)
C1 O2 H2	109.5
C10 N1 H1	119.4
C9 N1 H1	119.4
C1 C2 H2A	108.8
C3 C2 H2A	108.8
C1 C2 H2B	108.8
C3 C2 H2B	108.8
H2A C2 H2B	107.7
C5 C4 H4	119.2
C3 C4 H4	119.2
C6 C5 H5	120.2
C4 C5 H5	120.2
C5 C6 H6	120.2
C7 C6 H6	120.2
C6 C7 H7	119.0
C8 C7 H7	119.0
N1 C9 H9A	109.0
C8 C9 H9A	109.0
N1 C9 H9B	109.0
C8 C9 H9B	109.0
H9A C9 H9B	107.8
C11 C12 H12A	109.5
C11 C12 H12B	109.5
H12A C12 H12B	109.5
C11 C12 H12C	109.5
H12A C12 H12C	109.5
H12B C12 H12C	109.5

C11 C13 H13A	109.5
C11 C13 H13B	109.5
H13A C13 H13B	109.5
C11 C13 H13C	109.5
H13A C13 H13C	109.5
H13B C13 H13C	109.5
C11 C14 H14A	109.5
C11 C14 H14B	109.5
H14A C14 H14B	109.5
C11 C14 H14C	109.5
H14A C14 H14C	109.5
H14B C14 H14C	109.5

Table 5. Torsion angles [°] for cif1.

O2 C1 C2 C3	35.1(3)
O1 C1 C2 C3	-148.22(18)
C1 C2 C3 C4	-83.4(2)
C1 C2 C3 C8	95.2(2)
C8 C3 C4 C5	-0.4(3)
C2 C3 C4 C5	178.29(19)
C3 C4 C5 C6	0.3(3)
C4 C5 C6 C7	0.2(3)
C5 C6 C7 C8	-0.6(3)
C6 C7 C8 C3	0.5(3)
C6 C7 C8 C9	179.65(17)
C4 C3 C8 C7	0.0(2)
C2 C3 C8 C7	-178.65(16)
C4 C3 C8 C9	-179.15(17)
C2 C3 C8 C9	2.2(2)
C10 N1 C9 C8	140.27(17)
C7 C8 C9 N1	117.30(18)
C3 C8 C9 N1	-63.5(2)
C11 O4 C10 O3	-2.9(3)
C11 O4 C10 N1	177.42(16)
C9 N1 C10 O3	-5.5(3)
C9 N1 C10 O4	174.19(16)
C10 O4 C11 C13	-61.0(2)
C10 O4 C11 C14	63.6(2)
C10 O4 C11 C12	-178.2(3)

Table 6. Hydrogen bonds for cif1 [Å and °].

DHA	distance DH	distance HA	distance DA	angle DHA	site symmetry A
O2 H2 O1	0.82	1.87	2.669(2)	165.0	2_775
N1 H1 O3	0.86	2.18	3.004(2)	160.0	1_565

Données cristallographiques de Boc-C5-NHMe

Table 1. Crystal data and structure refinement for cif1.

Identification code	shelxl	
Empirical formula	C12 H21 N3 O4	
Formula weight	271.32	
Temperature	293(2) K	
Wavelength	0.71070 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P21	
Unit cell dimensions	a = 6.8810(4) Å	∠ = 90°.
	b = 9.6200(10) Å	∠ = 99.881(5)°.
	c = 11.7220(11) Å	∠ = 90°.
Volume	764.43(12) Å ³	
Z	2	
Density (calculated)	1.179 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.089 mm ⁻¹	
F(000)	292	
Crystal size	.2 x .1 x .1 mm ³	
Theta range for data collection	3.00 to 25.27°.	
Index ranges	0<=h<=8, 0<=k<=11, -14<=l<=13	
Reflections collected	4509	
Independent reflections	1463 [R(int) = 0.0600]	
Completeness to theta = 25.27°	99.2 %	
Absorption correction	None	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	1463 / 3 / 178	
Goodness-of-fit on F ²	1.021	
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0581, wR2 = 0.1245	
R indices (all data)	R1 = 0.1031, wR2 = 0.1399	
Largest diff. peak and hole	0.115 and -0.128 e.Å ⁻³	

Table 2. Atomic coordinates (x 10⁴) and equivalent isotropic displacement parameters (Å² x 10³) for cif1. U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized U^{ij} tensor.

	x	y	z	U(eq)
O(1)	-4813(4)	12340(3)	3086(3)	75(1)
O(4)	4487(4)	8651(4)	1609(3)	93(1)
N(3)	4052(4)	7171(4)	106(3)	70(1)
N(2)	479(5)	8519(4)	1749(3)	67(1)
O(3)	-698(4)	10570(5)	1021(3)	101(1)
C(5)	-2949(6)	11877(5)	3350(4)	62(1)
C(11)	3426(6)	7983(5)	871(4)	66(1)
C(6)	-950(6)	9907(5)	2971(4)	61(1)
C(9)	-390(5)	9756(5)	1802(4)	60(1)
C(1)	-5364(8)	13741(6)	3389(5)	85(2)
C(12)	6133(6)	7003(8)	66(5)	96(2)
C(7)	-884(8)	8425(6)	3432(5)	89(2)
C(10)	1188(6)	8019(7)	745(5)	100(2)
C(8)	578(8)	7710(6)	2794(6)	94(2)
C(2)	-7562(9)	13757(8)	2897(8)	151(3)
C(3)	-4299(12)	14788(9)	2794(9)	151(3)
C(4)	-5008(17)	13905(12)	4677(8)	183(4)
N(1)	-2807(5)	10603(4)	2930(3)	65(1)
O(2)	-1614(5)	12517(4)	3907(3)	109(2)

Table 3. Bond lengths [Å] and angles [°] for cif1.

O(1)-C(5)	1.343(5)
O(1)-C(1)	1.461(6)
O(4)-C(11)	1.216(5)
N(3)-C(11)	1.316(6)
N(3)-C(12)	1.450(5)
N(3)-H(3)	1.028(10)
N(2)-C(9)	1.338(6)
N(2)-C(10)	1.431(6)
N(2)-C(8)	1.443(7)
O(3)-C(9)	1.196(5)
C(5)-O(2)	1.201(5)
C(5)-N(1)	1.330(6)
C(11)-C(10)	1.522(6)
C(6)-N(1)	1.436(5)
C(6)-C(9)	1.493(6)
C(6)-C(7)	1.522(8)
C(6)-H(6)	0.9800
C(1)-C(3)	1.488(9)
C(1)-C(4)	1.496(10)
C(1)-C(2)	1.523(9)
C(12)-H(12A)	0.9600
C(12)-H(12B)	0.9600
C(12)-H(12C)	0.9600
C(7)-C(8)	1.518(8)
C(7)-H(7A)	0.9700
C(7)-H(7B)	0.9700
C(10)-H(10A)	0.9700
C(10)-H(10B)	0.9700
C(8)-H(8A)	0.9700
C(8)-H(8B)	0.9700
C(2)-H(2A)	0.9600
C(2)-H(2B)	0.9600
C(2)-H(2C)	0.9600
C(3)-H(3A)	0.9600
C(3)-H(3B)	0.9600
C(3)-H(3C)	0.9600
C(4)-H(4A)	0.9600
C(4)-H(4B)	0.9600
C(4)-H(4C)	0.9600
N(1)-H(1)	1.027(11)
C(5)-O(1)-C(1)	121.9(4)
C(11)-N(3)-C(12)	121.9(4)
C(11)-N(3)-H(3)	121(3)
C(12)-N(3)-H(3)	116(3)
C(9)-N(2)-C(10)	123.7(5)
C(9)-N(2)-C(8)	113.3(4)
C(10)-N(2)-C(8)	122.9(5)
O(2)-C(5)-N(1)	125.1(4)
O(2)-C(5)-O(1)	124.5(5)
N(1)-C(5)-O(1)	110.4(4)
O(4)-C(11)-N(3)	124.9(4)
O(4)-C(11)-C(10)	122.0(4)
N(3)-C(11)-C(10)	113.1(3)
N(1)-C(6)-C(9)	112.5(3)
N(1)-C(6)-C(7)	114.8(4)
C(9)-C(6)-C(7)	103.7(4)
N(1)-C(6)-H(6)	108.5

C(9)-C(6)-H(6)	108.5
C(7)-C(6)-H(6)	108.5
O(3)-C(9)-N(2)	124.6(4)
O(3)-C(9)-C(6)	126.8(4)
N(2)-C(9)-C(6)	108.5(4)
O(1)-C(1)-C(3)	109.9(5)
O(1)-C(1)-C(4)	109.8(6)
C(3)-C(1)-C(4)	113.2(8)
O(1)-C(1)-C(2)	101.5(5)
C(3)-C(1)-C(2)	110.7(6)
C(4)-C(1)-C(2)	111.2(6)
N(3)-C(12)-H(12A)	109.5
N(3)-C(12)-H(12B)	109.5
H(12A)-C(12)-H(12B)	109.5
N(3)-C(12)-H(12C)	109.5
H(12A)-C(12)-H(12C)	109.5
H(12B)-C(12)-H(12C)	109.5
C(8)-C(7)-C(6)	103.4(4)
C(8)-C(7)-H(7A)	111.1
C(6)-C(7)-H(7A)	111.1
C(8)-C(7)-H(7B)	111.1
C(6)-C(7)-H(7B)	111.1
H(7A)-C(7)-H(7B)	109.0
N(2)-C(10)-C(11)	114.2(4)
N(2)-C(10)-H(10A)	108.7
C(11)-C(10)-H(10A)	108.7
N(2)-C(10)-H(10B)	108.7
C(11)-C(10)-H(10B)	108.7
H(10A)-C(10)-H(10B)	107.6
N(2)-C(8)-C(7)	103.6(4)
N(2)-C(8)-H(8A)	111.0
C(7)-C(8)-H(8A)	111.0
N(2)-C(8)-H(8B)	111.0
C(7)-C(8)-H(8B)	111.0
H(8A)-C(8)-H(8B)	109.0
C(1)-C(2)-H(2A)	109.5
C(1)-C(2)-H(2B)	109.5
H(2A)-C(2)-H(2B)	109.5
C(1)-C(2)-H(2C)	109.5
H(2A)-C(2)-H(2C)	109.5
H(2B)-C(2)-H(2C)	109.5
C(1)-C(3)-H(3A)	109.5
C(1)-C(3)-H(3B)	109.5
H(3A)-C(3)-H(3B)	109.5
C(1)-C(3)-H(3C)	109.5
H(3A)-C(3)-H(3C)	109.5
H(3B)-C(3)-H(3C)	109.5
C(1)-C(4)-H(4A)	109.5
C(1)-C(4)-H(4B)	109.5
H(4A)-C(4)-H(4B)	109.5
C(1)-C(4)-H(4C)	109.5
H(4A)-C(4)-H(4C)	109.5
H(4B)-C(4)-H(4C)	109.5
C(5)-N(1)-C(6)	122.6(4)
C(5)-N(1)-H(1)	124(3)
C(6)-N(1)-H(1)	113(3)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

Table 4. Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for cif1. The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2h^2 a^2 U^{11} + \dots + 2hk a^* b^* U^{12}$]

	U ¹¹	U ²²	U ³³	U ²³	U ¹³	U ¹²
O(1)	61(2)	54(2)	114(2)	-15(2)	23(2)	12(2)
O(4)	64(2)	93(3)	113(3)	-43(2)	-10(2)	-8(2)
N(3)	43(2)	89(3)	78(2)	-25(3)	16(2)	-4(2)
N(2)	56(2)	71(3)	70(2)	-19(2)	0(2)	19(2)
O(3)	76(2)	124(3)	110(3)	52(3)	34(2)	36(2)
C(5)	60(3)	60(3)	67(3)	-15(2)	10(2)	0(2)
C(11)	47(2)	66(3)	79(3)	-16(3)	-7(2)	-4(2)
C(6)	57(2)	62(3)	61(3)	-17(2)	2(2)	6(2)
C(9)	49(2)	60(3)	68(3)	9(3)	5(2)	7(2)
C(1)	91(4)	54(3)	115(4)	-10(3)	36(3)	6(3)
C(12)	50(2)	146(6)	95(3)	-20(4)	20(2)	-5(3)
C(7)	94(3)	93(5)	80(3)	30(3)	14(3)	27(3)
C(10)	51(2)	140(5)	106(4)	-60(4)	3(2)	19(3)
C(8)	96(4)	60(4)	125(5)	17(3)	14(3)	30(3)
C(2)	103(5)	89(5)	266(10)	0(6)	46(5)	51(4)
C(3)	159(7)	83(5)	219(9)	31(6)	54(6)	-8(5)
C(4)	232(9)	181(9)	152(8)	-40(7)	81(6)	87(8)
N(1)	54(2)	59(3)	78(2)	-24(2)	4(2)	8(2)
O(2)	81(2)	105(3)	132(3)	-60(3)	-4(2)	7(2)

Table 5. Hydrogen coordinates ($\times 10^4$) and isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for cif1.

	x	y	z	U(eq)
H(3)	3120(60)	6480(40)	-380(40)	90
H(6)	74	10451	3461	79
H(12A)	6292	6358	-537	125
H(12B)	6800	6654	796	125
H(12C)	6686	7885	-89	125
H(7A)	-432	8405	4262	116
H(7B)	-2172	7989	3258	116
H(10A)	667	8608	92	130
H(10B)	681	7088	572	130
H(8A)	1897	7727	3247	123
H(8B)	199	6752	2617	123
H(2A)	-7766	14152	2134	196
H(2B)	-8243	14306	3389	196
H(2C)	-8063	12824	2860	196
H(3A)	-3573	15401	3358	197
H(3B)	-5233	15315	2262	197
H(3C)	-3403	14322	2377	197
H(4A)	-5783	13237	5010	238
H(4B)	-5377	14826	4872	238
H(4C)	-3635	13758	4976	238
H(1)	-3980(50)	10060(50)	2480(30)	84

Table 6. Torsion angles [°] for cif1.

C(1)-O(1)-C(5)-O(2)	4.7(7)
C(1)-O(1)-C(5)-N(1)	-176.7(4)
C(12)-N(3)-C(11)-O(4)	-0.6(8)
C(12)-N(3)-C(11)-C(10)	179.2(5)
C(10)-N(2)-C(9)-O(3)	1.2(7)
C(8)-N(2)-C(9)-O(3)	-176.9(4)
C(10)-N(2)-C(9)-C(6)	179.3(4)
C(8)-N(2)-C(9)-C(6)	1.2(5)
N(1)-C(6)-C(9)-O(3)	35.8(6)
C(7)-C(6)-C(9)-O(3)	160.5(4)
N(1)-C(6)-C(9)-N(2)	-142.3(4)
C(7)-C(6)-C(9)-N(2)	-17.6(5)
C(5)-O(1)-C(1)-C(3)	61.9(7)
C(5)-O(1)-C(1)-C(4)	-63.2(7)
C(5)-O(1)-C(1)-C(2)	179.1(5)
N(1)-C(6)-C(7)-C(8)	149.3(4)
C(9)-C(6)-C(7)-C(8)	26.1(5)
C(9)-N(2)-C(10)-C(11)	108.5(5)
C(8)-N(2)-C(10)-C(11)	-73.5(7)
O(4)-C(11)-C(10)-N(2)	-18.7(8)
N(3)-C(11)-C(10)-N(2)	161.5(5)
C(9)-N(2)-C(8)-C(7)	15.8(6)
C(10)-N(2)-C(8)-C(7)	-162.4(4)
C(6)-C(7)-C(8)-N(2)	-25.3(5)
O(2)-C(5)-N(1)-C(6)	-8.4(7)
O(1)-C(5)-N(1)-C(6)	173.0(3)
C(9)-C(6)-N(1)-C(5)	-110.3(5)
C(7)-C(6)-N(1)-C(5)	131.4(5)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

Table 7. Hydrogen bonds for cif1 [Å and °].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(3)-H(3)...O(3)#1	1.028(10)	1.92(2)	2.897(5)	159(4)
N(1)-H(1)...O(4)#2	1.027(11)	1.905(19)	2.898(5)	162(4)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 -x,y-1/2,-z #2 x-1,y,z

INFORMATIONS SUR LE PUCKERING DU CYCLE A 5 ATOMES :

1: Ring of 5 atoms: N2 C9 C6 C7 C8

?

Centre of gravity at: -.158 8.526 3.016

Average distance of atoms from c.o.g.: 1.235

Sigma = .1195, Direction cosines: .8675 .3680 .3347

Atoms after transformation

name	x	y	z
N2	0.0000	1.1778	.0454
C9	1.1271	.4570	.0633
C6	.7752	-.9790	-.1421
C7	-.7148	-1.0335	.1659
C8	-1.1875	.3777	-.1325

Bonds, angles, and torsion angles in ring

----	N2	----	C9	----	C6	----	C7	----	C8	----	N2	----
	1.338		1.493		1.522		1.518		1.443			
	113.34		108.53		103.73		103.40		103.59			
	1.22		-17.62		26.06		-25.31		15.75			

Puckering parameters: Q = .267, q2 = .267, phi2 = 284.9

Puckering is 17% T1+ and 83% E4+

17% twist with axis through N2 and C9 pointing up

83% envelope with flap at C7 pointing up

Données cristallographiques de Boc-Ortho-NHMe

Table 1. Crystal data and structure refinement for boc-o-nh.

Identification code	boc-o-nh	
Empirical formula	c ₁₇ h ₂₆ n ₂ o ₃	
Formula weight	306.40	
Temperature	293(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Triclinic	
Space group	P -1	
Unit cell dimensions	a = 5.1411(4) Å	α = 82.930(3)°.
	b = 11.5197(10) Å	β = 89.537(2)°.
	c = 15.236(2) Å	γ = 78.520(7)°.
Volume	877.42(15) Å ³	
Z	2	
Density (calculated)	1.160 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.079 mm ⁻¹	
F(000)	332	
Crystal size	0.2 x 0.1 x 0.1 mm ³	
Theta range for data collection	3.43 to 23.25°.	
Index ranges	-5 ≤ h ≤ 5, -11 ≤ k ≤ 12, -16 ≤ l ≤ 16	
Reflections collected	4323	
Independent reflections	2474 [R(int) = 0.0340]	
Completeness to theta = 23.25°	98.2 %	
Absorption correction	None	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	2474 / 0 / 199	
Goodness-of-fit on F ²	1.024	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0635, wR2 = 0.1611	
R indices (all data)	R1 = 0.1234, wR2 = 0.1931	
Largest diff. peak and hole	0.351 and -0.261 e.Å ⁻³	

Table 2. Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for boc-o-nh. $U(\text{eq})$ is defined as one third of the trace of the orthogonalized U^{ij} tensor.

	x	y	z	U(eq)
O(2)	6777(5)	-2114(2)	2266(2)	66(1)
O(1)	10307(4)	-3566(2)	1995(2)	61(1)
O(3)	8722(5)	1862(2)	3438(2)	73(1)
N(1)	10999(5)	-1869(2)	2387(2)	56(1)
N(2)	4446(6)	2108(3)	3831(2)	71(1)
C(7)	9811(6)	285(3)	1810(2)	46(1)
C(1)	8714(6)	-4470(3)	1874(3)	59(1)
C(13)	5580(6)	1351(3)	2462(3)	56(1)
C(11)	7290(7)	2054(3)	992(3)	62(1)
C(12)	7599(6)	1225(3)	1751(3)	46(1)
C(5)	9145(7)	-2485(3)	2223(3)	51(1)
C(9)	11287(8)	1085(4)	399(3)	66(1)
C(6)	10296(7)	-651(3)	2605(3)	54(1)
C(14)	6424(7)	1801(3)	3282(3)	53(1)
C(8)	11644(7)	234(3)	1129(3)	57(1)
C(10)	9115(8)	1991(4)	328(3)	68(1)
C(3)	6872(7)	-4056(4)	1080(3)	78(1)
C(4)	7279(8)	-4764(4)	2717(3)	79(1)
C(15)	4802(8)	2535(6)	4677(3)	94(2)
C(2)	10857(8)	-5530(4)	1699(4)	100(2)
C(17)	2910(18)	3689(7)	4740(5)	204(4)
C(16)	4350(20)	1661(7)	5401(5)	240(6)

Table 3. Bond lengths [\AA] and angles [$^\circ$] for boc-o-nh.

O(2)-C(5)	1.211(4)
O(1)-C(5)	1.355(4)
O(1)-C(1)	1.476(4)
O(3)-C(14)	1.224(4)
N(1)-C(5)	1.338(4)
N(1)-C(6)	1.456(4)
N(1)-H(1)	0.8600
N(2)-C(14)	1.332(4)
N(2)-C(15)	1.461(5)
N(2)-H(2)	0.8600
C(7)-C(8)	1.395(5)
C(7)-C(12)	1.400(4)
C(7)-C(6)	1.506(5)
C(1)-C(3)	1.511(5)
C(1)-C(4)	1.512(6)
C(1)-C(2)	1.521(5)
C(13)-C(12)	1.494(5)
C(13)-C(14)	1.510(5)
C(13)-H(13A)	0.9700
C(13)-H(13B)	0.9700
C(11)-C(10)	1.374(5)
C(11)-C(12)	1.394(5)
C(11)-H(11)	0.9300
C(9)-C(10)	1.363(5)
C(9)-C(8)	1.376(5)
C(9)-H(9)	0.9300
C(6)-H(6A)	0.9700
C(6)-H(6B)	0.9700
C(8)-H(8)	0.9300
C(10)-H(10)	0.9300
C(3)-H(3A)	0.9600
C(3)-H(3B)	0.9600
C(3)-H(3C)	0.9600
C(4)-H(4A)	0.9600
C(4)-H(4B)	0.9600
C(4)-H(4C)	0.9600
C(15)-C(16)	1.449(8)
C(15)-C(17)	1.496(8)
C(15)-H(15)	0.9800
C(2)-H(2A)	0.9600
C(2)-H(2B)	0.9600
C(2)-H(2C)	0.9600
C(17)-H(17A)	0.9600
C(17)-H(17B)	0.9600
C(17)-H(17C)	0.9600
C(16)-H(16A)	0.9600
C(16)-H(16B)	0.9600
C(16)-H(16C)	0.9600
C(5)-O(1)-C(1)	120.8(2)
C(5)-N(1)-C(6)	121.7(3)
C(5)-N(1)-H(1)	119.2
C(6)-N(1)-H(1)	119.2
C(14)-N(2)-C(15)	123.6(3)
C(14)-N(2)-H(2)	118.2
C(15)-N(2)-H(2)	118.2
C(8)-C(7)-C(12)	119.2(4)
C(8)-C(7)-C(6)	119.3(3)

C(12)-C(7)-C(6)	121.5(3)
O(1)-C(1)-C(3)	110.3(3)
O(1)-C(1)-C(4)	110.0(3)
C(3)-C(1)-C(4)	113.2(3)
O(1)-C(1)-C(2)	101.6(3)
C(3)-C(1)-C(2)	110.7(4)
C(4)-C(1)-C(2)	110.5(4)
C(12)-C(13)-C(14)	115.5(3)
C(12)-C(13)-H(13A)	108.4
C(14)-C(13)-H(13A)	108.4
C(12)-C(13)-H(13B)	108.4
C(14)-C(13)-H(13B)	108.4
H(13A)-C(13)-H(13B)	107.5
C(10)-C(11)-C(12)	122.0(4)
C(10)-C(11)-H(11)	119.0
C(12)-C(11)-H(11)	119.0
C(11)-C(12)-C(7)	117.9(3)
C(11)-C(12)-C(13)	119.8(3)
C(7)-C(12)-C(13)	122.3(4)
O(2)-C(5)-N(1)	124.4(3)
O(2)-C(5)-O(1)	125.5(3)
N(1)-C(5)-O(1)	110.1(3)
C(10)-C(9)-C(8)	120.4(4)
C(10)-C(9)-H(9)	119.8
C(8)-C(9)-H(9)	119.8
N(1)-C(6)-C(7)	114.0(3)
N(1)-C(6)-H(6A)	108.8
C(7)-C(6)-H(6A)	108.8
N(1)-C(6)-H(6B)	108.8
C(7)-C(6)-H(6B)	108.8
H(6A)-C(6)-H(6B)	107.6
O(3)-C(14)-N(2)	123.0(4)
O(3)-C(14)-C(13)	123.2(3)
N(2)-C(14)-C(13)	113.8(3)
C(9)-C(8)-C(7)	120.9(3)
C(9)-C(8)-H(8)	119.6
C(7)-C(8)-H(8)	119.6
C(9)-C(10)-C(11)	119.5(4)
C(9)-C(10)-H(10)	120.2
C(11)-C(10)-H(10)	120.2
C(1)-C(3)-H(3A)	109.5
C(1)-C(3)-H(3B)	109.5
H(3A)-C(3)-H(3B)	109.5
C(1)-C(3)-H(3C)	109.5
H(3A)-C(3)-H(3C)	109.5
H(3B)-C(3)-H(3C)	109.5
C(1)-C(4)-H(4A)	109.5
C(1)-C(4)-H(4B)	109.5
H(4A)-C(4)-H(4B)	109.5
C(1)-C(4)-H(4C)	109.5
H(4A)-C(4)-H(4C)	109.5
H(4B)-C(4)-H(4C)	109.5
C(16)-C(15)-N(2)	110.2(5)
C(16)-C(15)-C(17)	109.2(5)
N(2)-C(15)-C(17)	110.3(5)
C(16)-C(15)-H(15)	109.0
N(2)-C(15)-H(15)	109.0
C(17)-C(15)-H(15)	109.0
C(1)-C(2)-H(2A)	109.5
C(1)-C(2)-H(2B)	109.5

H(2A)-C(2)-H(2B)	109.5
C(1)-C(2)-H(2C)	109.5
H(2A)-C(2)-H(2C)	109.5
H(2B)-C(2)-H(2C)	109.5
C(15)-C(17)-H(17A)	109.5
C(15)-C(17)-H(17B)	109.5
H(17A)-C(17)-H(17B)	109.5
C(15)-C(17)-H(17C)	109.5
H(17A)-C(17)-H(17C)	109.5
H(17B)-C(17)-H(17C)	109.5
C(15)-C(16)-H(16A)	109.5
C(15)-C(16)-H(16B)	109.5
H(16A)-C(16)-H(16B)	109.5
C(15)-C(16)-H(16C)	109.5
H(16A)-C(16)-H(16C)	109.5
H(16B)-C(16)-H(16C)	109.5

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

Table 4. Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for boc-o-nh. The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2 \square^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{23}	U^{13}	U^{12}
O(2)	34(2)	66(2)	99(2)	-19(2)	3(1)	-5(1)
O(1)	38(1)	47(2)	101(2)	-20(2)	4(1)	-10(1)
O(3)	42(2)	103(2)	83(2)	-37(2)	2(1)	-22(1)
N(1)	36(2)	46(2)	87(3)	-14(2)	-1(1)	-8(1)
N(2)	44(2)	112(3)	60(3)	-30(2)	2(2)	-16(2)
C(7)	41(2)	47(2)	53(3)	-15(2)	-1(2)	-14(2)
C(1)	50(2)	49(2)	84(3)	-15(2)	4(2)	-22(2)
C(13)	47(2)	54(2)	70(3)	-22(2)	-1(2)	-7(2)
C(11)	64(3)	56(3)	66(3)	-6(2)	-9(2)	-13(2)
C(12)	43(2)	48(2)	51(3)	-15(2)	0(2)	-16(2)
C(5)	40(2)	50(2)	63(3)	-7(2)	0(2)	-7(2)
C(9)	70(3)	86(3)	53(3)	-20(3)	12(2)	-38(2)
C(6)	55(2)	43(2)	65(3)	-14(2)	-1(2)	-11(2)
C(14)	48(2)	56(2)	56(3)	-13(2)	4(2)	-11(2)
C(8)	52(2)	60(3)	62(3)	-20(2)	3(2)	-16(2)
C(10)	79(3)	71(3)	57(3)	2(2)	-3(2)	-27(2)
C(3)	72(3)	100(3)	70(3)	-11(3)	-3(2)	-35(2)
C(4)	80(3)	75(3)	80(4)	8(3)	-9(2)	-23(2)
C(15)	59(3)	170(5)	59(3)	-44(4)	11(2)	-20(3)
C(2)	71(3)	61(3)	179(6)	-55(3)	8(3)	-14(2)
C(17)	335(12)	145(6)	120(6)	-76(5)	-14(7)	19(7)
C(16)	494(17)	140(6)	63(5)	-6(5)	-40(7)	-9(9)

Table 5. Torsion angles [°] for boc-o-nh.

C(5)-O(1)-C(1)-C(3)	66.7(4)
C(5)-O(1)-C(1)-C(4)	-58.8(4)
C(5)-O(1)-C(1)-C(2)	-175.8(4)
C(10)-C(11)-C(12)-C(7)	-2.0(5)
C(10)-C(11)-C(12)-C(13)	178.7(3)
C(8)-C(7)-C(12)-C(11)	1.9(5)
C(6)-C(7)-C(12)-C(11)	-179.9(3)
C(8)-C(7)-C(12)-C(13)	-178.8(3)
C(6)-C(7)-C(12)-C(13)	-0.7(5)
C(14)-C(13)-C(12)-C(11)	-105.3(4)
C(14)-C(13)-C(12)-C(7)	75.5(4)
C(6)-N(1)-C(5)-O(2)	-2.3(6)
C(6)-N(1)-C(5)-O(1)	176.9(3)
C(1)-O(1)-C(5)-O(2)	-7.3(6)
C(1)-O(1)-C(5)-N(1)	173.4(3)
C(5)-N(1)-C(6)-C(7)	-85.6(4)
C(8)-C(7)-C(6)-N(1)	-48.2(4)
C(12)-C(7)-C(6)-N(1)	133.7(3)
C(15)-N(2)-C(14)-O(3)	-0.7(7)
C(15)-N(2)-C(14)-C(13)	178.2(4)
C(12)-C(13)-C(14)-O(3)	-12.6(5)
C(12)-C(13)-C(14)-N(2)	168.5(3)
C(10)-C(9)-C(8)-C(7)	-0.5(5)
C(12)-C(7)-C(8)-C(9)	-0.8(5)
C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	-179.0(3)
C(8)-C(9)-C(10)-C(11)	0.5(6)
C(12)-C(11)-C(10)-C(9)	0.8(6)
C(14)-N(2)-C(15)-C(16)	-111.6(6)
C(14)-N(2)-C(15)-C(17)	127.7(5)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

Table 6. Hydrogen bonds for boc-o-nh [\AA and $^\circ$].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	\angle (DHA)
N(1)-H(1)...O(2)#1	0.86	2.15	2.934(3)	151.6
N(2)-H(2)...O(3)#2	0.86	2.23	3.082(4)	173.8

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 $x+1,y,z$ #2 $x-1,y,z$

Résumé :

Ce travail est consacré à la synthèse d'hélices artificielles construites à partir d'un enchaînement de mimes contraints de dipeptides triés dans la littérature. La sélection des molécules candidates susceptibles de donner par leur enchaînement des structures en hélice a été réalisée à l'aide de la modélisation moléculaire.

Parmi ces molécules, l'acide-2-méthylaminophénylacétique (Ortho) a été utilisé pour construire différents oligomères. Les conformations des monomères Boc-Ortho-OH et Boc-Ortho-NHiPr ont été caractérisées par des études cristallographiques. Les analyses conformationnelles réalisées par RMN sur Boc-(Ortho)₂-NHMe, Piv-(Ortho)₂-NHMe, Boc-(Ortho)₃-NHMe et Piv-(Ortho)₃-NHMe semblent être en accord avec les prédictions des études de modélisation qui donne une structuration en hélice de type H1-10.

Le remplacement d'une partie et de la totalité de l'hélice α du hCRF (une hormone peptidique de 41 acides aminés) par des enchaînements de molécules contraintes a été réalisé en développant différentes stratégies en phase solide. Cependant, les tests de liaison des molécules au récepteur ont montré que les séquences 6-34 et 20-34 du hCRF ne pouvaient être remplacées sans perte totale de la liaison. Le même travail a été réalisé pour l'antagoniste ₉₋₄₁hCRF où la substitution de la partie 9-34 entraîne une perte de la liaison au récepteur.

Synthesis and design of oligomer derived from constrained peptide mimetic sorted by molecular modeling. Application to the hCRF analogue synthesis.

Abstract :

This work was dedicated to the synthesis of unnatural helical oligomers derived from constrained dipeptide mimetics described in the literature. The computational analysis allowed us to establish a pre-selection of motifs from which we constructed oligomers.

Among this compounds, the 2-methylaminophenylacetic acid (Ortho) has been used to build several oligomers. The conformation of Boc-Ortho-OH and Boc-Ortho-NHiPr monomers have been studied by X-ray diffraction. NMR Conformational analysis of Boc-(Ortho)₂-OH, Piv-(Ortho)₂-OH, Boc-(Ortho)₃-OH and Piv-(Ortho)₃-OH were in accordance with the molecular modeling study predictions giving an H1-10 helical structure.

We selected the human corticotropin-releasing factor (hCRF) which is a 41-amino acid peptide amide hormone. A part (20-34) and whole (6-34) α -helix substitution of hCRF by selected sequences have been synthesized by several strategies in solid phase. Compounds were tested for their ability to bind to the receptor. However, all synthesized compounds did not show any affinity for the hCRF receptor.

The same strategy was applied to the synthesis of 9-41 hCRF antagonist. However, the substitution of the 9-34 sequence by artificial helix led to a lost of binding to the receptor.

Mots-clés : mimes contraints de dipeptides, Foldamer, hélice, modélisation moléculaire, hCRF

UMR 5810, LAPP, Faculté de pharmacie
15, avenue Charles Flahault, 34060 Montpellier