



HAL
open science

Nouvelles organisations supramoléculaires à base de cycloptides

Marie-Laure Bodelec

► **To cite this version:**

Marie-Laure Bodelec. Nouvelles organisations supramoléculaires à base de cycloptides. Chimie. Université Paris Sud - Paris XI, 2008. Français. NNT: . tel-00447083

HAL Id: tel-00447083

<https://theses.hal.science/tel-00447083>

Submitted on 14 Jan 2010

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.

ORSAY
N° D'ORDRE :

<p>Université de Paris Sud U.F.R. Scientifique d'Orsay</p>
--

THÈSE de DOCTORAT

Présentée par :

Marie-Laure BODOLEC-THURIER

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI ORSAY
Spécialité Chimie Organique

***Nouvelles organisations supramoléculaires à base de
cyclopeptides***

Soutenue le 3 Octobre 2008 devant la commission d'examen :

*M. Alberto Bianco
M. Philippe Mesini
M. Philippe Roger
M. Jean-Christophe Cintrat
M. Bernard Rousseau*

*Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse*

ORSAY
N° D'ORDRE :

<p>Université de Paris Sud U.F.R. Scientifique d'Orsay</p>
--

THÈSE de DOCTORAT

Présentée par :

Marie-Laure BODOLEC-THURIER

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI ORSAY
Spécialité Chimie Organique

***Nouvelles organisations supramoléculaires à base de
cyclopeptides***

Soutenue le 3 Octobre 2008 devant la commission d'examen :

*M. Alberto Bianco
M. Philippe Mesini
M. Philippe Roger
M. Jean-Christophe Cintrat
M. Bernard Rousseau*

*Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Bernard Rousseau et Charles Mioskowski qui sont à l'origine de cette thèse. Sans eux, je n'aurais pas vécu cette expérience. Ils ont accepté de me prendre sous leur responsabilité et je leur en serais toujours reconnaissante.

Cette thèse n'aurait pas été possible sans l'aide de Jean-Christophe Cintrat qui m'a entraîné toujours plus loin au quotidien. Merci à toi, je sais que je n'étais pas facile tous les jours.

Je remercie également les membres du jury. Tout d'abord, Alberto Bianco et Philippe Mésini pour avoir accepté d'être mes rapporteurs et d'avoir jugé mon travail. Ensuite, Philippe Roger pour avoir accepté d'être président de ce jury. Leurs remarques et conseils vont beaucoup apporter à la suite de cette thèse.

Au cours de ces trois ans, j'ai eu la chance d'avoir de l'aide de plusieurs chercheurs. Ils ont tous accepté de me consacrer de leur temps si précieux. Tout d'abord, Maïté Paternostre, qui m'a non seulement apporté ses connaissances en analyse mais également de très bon conseil et beaucoup d'aide. Ensuite, Jean-Marc Verbavatz sans qui je n'aurais pu développé mon travail en imagerie. Franck Artzner, chez qui j'ai pu passer quelques jours afin d'éclairer mes recherches et qui a été toujours présent lorsqu'on avait besoin de lui. Enfin, François Fennaille ou Denis Rouchon qui ont passé du temps sur mes travaux à essayer d'analyser mes cailloux. Merci à tous, vous m'avez apporté énormément.

Je n'oublie naturellement pas le laboratoire tritium où j'ai passé ses trois années. Merci tout d'abord aux permanents, Eric, Christelle et Florence qui font tourner ce laboratoire. Ensuite, merci aux « non permanents » et tout particulièrement Stéphane. J'ai découvert en ce voisin de pailleuse un véritable ami et il est difficile de dire ici tout ce que je lui dois. Bien sur, il y a Fabien, Alex, Emerson et Aude qui vont encore entendre parlé de moi. D'autres naturellement ont compté pour le quotidien comme Sébastien, Chloé, Quentin, François, Mélinda, Ténin, Christine ou Kathalyn. Merci de leur bon humeur et pour leur amitié.

Et puis, merci à tout le service SCBM. Je ne pourrais citer ici tout le monde mais j'ai quelques pensées pour certains. Tout d'abord l'équipe d'analyse : Elisabeth, Estelle et David. Je vous remercie tous les trois pour l'aide que vous m'avez apportée, mais surtout David, pour

les bons moments extra-cea, Elisabeth pour tous ces bavardages et Estelle pour les bons plans sortie théâtre !! Ensuite, il y a eu Virginie ou Sandra avec qui j'ai aimé discuter dans les couloirs de temps en temps. Et puis Chantal, notre secrétaire adorée qui est toujours présente !! Enfin, je n'oublie pas mes copines de la recherche : Julie, Maude et Elodie, on a bien rigolé !

Maintenant que je pense avoir fait le tour de mes collègues de travail, je tiens à m'adresser tous les autres, et pas les moindres. La première personne que j'aurais dû remercier c'est mon mentor, l'homme de ma vie, Cyril, sans qui je n'aurais pas pu en arriver là. Ca a été encore une sacré aventure qu'on a vécu là... La prochaine n'est pas mal non plus, elle (notre petite crevette) va arriver bientôt et nous l'attendons de pied ferme. Merci mon amour de m'aimer comme ça.

Ensuite, merci à mes parents qui m'ont soutenue, aidée et aimée. Vous êtes les meilleurs. Je n'ai fait que suivre l'exemple de mes frères et sœurs, et Dieu sait combien il est difficile de passer après ces trois là, ils ont mis la barre un peu haut. Merci de leur soutien et puis d'avoir apporté encore des merveilles à la vie durant ces trois ans, que de bonheur de les voir tous grandir. Une petite, non une grande, pensée pour toi ma Juliette qui a été du coup privé de sa marraine durant ces trois années, tu est devenue si grande maintenant...

Je tiens également à remercier mes amis. Tout d'abord Elisabeth, mon amie de toujours. Ensuite, ceux de la fac de Rennes : on y est arrivé ! Et puis tous les autres. J'ai de la chance de vous avoir, merci de votre amitié.

Enfin, je termine ces remerciements en m'adressant à vous, lecteur, qui aborder ici trois ans de ma vie. Merci et bonne lecture.

Abréviations.

AFM : microscope à force atomique

All : allyle

AOP : 7-azabenzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)-phosphonium hexafluorophosphate

ATR-FTIR : infrarouge à transformé de Fourier à réflexion totale atténuée.

Boc : t-butyle oxycarbonyle

BOP : benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)-phosphonium hexafluorophosphate

Bzl : benzyle

CCM : chromatographie sur couche mince

CVD : chemical vapor deposition

DCC : n,n'-dicyclohexyle carbodiimide

DCM : dichlorométhane

DIC : 1-3,diisopropyle carbodiimide

DIEA : diisopropyle éthyle amine

Dmab : 4-(N-[1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)-3-méthylbutyl]amino)benzyl

DMAP : 4-diméthyle amino pyridine

DMF : diméthyle formamide

DMSO : diméthyle sulfoxyde

EDC.HCl : 1-(3-diméthylaminopropyle)-3-éthyle carbodiimide hydrochloride

ESI-MS : electrospray - mass spectrometry

Et : éthyle

EtOH : éthanol

Fmoc : fluoreneméthoxycarbonyle

HAPyU : o-(azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-bis(tétraméthylène)uronium hexafluorophosphate

HATU : 2-(7-aza-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyle uronium hexafluorophosphate

HBPYU : o-(benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-bis(tétraméthylène)uronium hexafluorophosphate

HBTU : 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyle uronium hexafluorophosphate

HOAt : 1-hydroxyazabenzotriazole

HOBt : 1-hydroxybenzotriazole

ivDde : (4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidène)-3-méthylbutyl

LC/MS : chromatographie liquide/ spectrométrie de masse

Me : méthyle

MEB : microscope électronique à balayage
MeOH : méthanol
MWNT : multiwall carbon nanotubes
NMP : n-méthyle-2-pyrrolidinone
PIP : pipéridine
PyAOP : (3-hydroxy-3h-1,2,3-triazolo(4,5-b)pyridinato-o)tri-1-pyrrilidinylphosphonium hexafluorophosphate
PyBOP : benzotriazole-1-yl-oxypyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
PyBrOP : bromo-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate
PyClOP : chloro-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate
Rdt : rendement
RMN : résonance magnétique nucléaire
SAXS : Small Angle X-ray Scatering
SWNT : single wall carbon nanotubes
tBu : tert-butyle
TEA : triéthyle amine
TEM : microscope électronique à transmission
TFA : acide tri-fluoro acétique
THF : tétrahydrofurane
TIS : triisopropyle silane
TOM : microscope optique à transmission
Trt : trityle
UV : ultraviolet
UV/Vis : ultraviolet/visible

Sommaire

<u>Introduction</u> : Introduction aux nanotechnologies et assemblages supramoléculaires.	21
<u>A. Synthèse de nanomatériaux et applications...</u>	23
I/ Approches Bottom-up.	24
1. <i>La synthèse chimique.</i>	24
2. <i>L'auto-assemblage.</i>	25
II/ Auto-assemblage et propriétés.	26
1. <i>Auto-assemblages formés à partir de molécules linéaires.</i>	26
a. <i>A partir de lipides.</i>	26
b. <i>A partir de polymères.</i>	27
c. <i>A partir de peptides ou analogues.</i>	28
2. <i>Nanostructures formés à partir de molécules cycliques.</i>	30
a. <i>A partir de molécules variées.</i>	30
b. <i>A partir de peptides ou analogues.</i>	30
<u>B. Les nanotubes de peptides de type Ghadiri.</u>	32
I/ Description des nanotubes de peptides.	32
1. <i>Introduction.</i>	32
2. <i>Composition du nanotube de peptides.</i>	33
a. <i>Nombre et nature des acides aminés.</i>	33
b. <i>Assemblage en feuillets β antiparallèles.</i>	34
3. <i>Variété de cyclopeptides constituant les nanotubes.</i>	35
a. <i>Modification du squelette de base.</i>	36
b. <i>Modification au niveau des chaînes latérales.</i>	38
4. <i>Conclusion.</i>	39
II/ Applications des nanotubes de Ghadiri.	39
1. <i>Introduction.</i>	39
2. <i>Utilisation comme pores ou canaux transmembranaires.</i>	39

3. Propriétés optiques et électroniques.....	42
4. Propriété de biocapteur.....	44
5. Propriétés antibactérienne et antivirale.....	44
6. Propriété photosensible applicable en optique, électronique et à des appareils capteur.....	45
7. Matériaux hybrides.....	46
8. Conclusion.....	47
Partie I : Synthèse de matériaux hybrides en solution.....	55
<u>A. Introduction générale.....</u>	57
<u>B. Synthèse de peptides sur support solide.....</u>	59
I. La synthèse peptidique.....	59
1. Couplage peptidique.....	59
2. La synthèse sur support solide.....	59
3. Comparaison avec la synthèse en solution.....	59
4. Choix de la stratégie.....	60
5. Choix de l'agent de couplage pour les couplages peptidiques.....	60
II. Synthèse sur support solide, description générale des étapes.....	62
1. Présentation du projet.....	62
2. Schéma de synthèse.....	62
3. Fonctionnalisation de la résine.....	63
4. Couplage peptidique.....	65
5. Tests de suivi de réaction.....	66
a. <u>Test UV permettant de suivre la déprotection de la fonction amine.....</u>	66
b. <u>Suivi de réaction de couplage par test de Kaiser.....</u>	67
6. Les groupements protecteurs.....	68
7. Cyclisation.....	69
8. Clivage de la résine.....	70
9. Conclusion.....	70
III. Description des synthèses de cyclopeptides.....	70
1. Le cyclo[(-D-Ala-Glu-D-Ala-Gln) ₂ -].....	70
a. <u>Synthèse.....</u>	71

b. <u>Purification</u>	72
c. <u>Caractérisations</u>	72
i. <i>RMN¹H et LC/MS</i>	72
ii. <i>Solubilité</i>	73
d. <u>Conclusion</u>	73
2. <i>Le cyclo[-D-Ala-Glu-(D-Ala-Gln)₃-]</i>	74
a. <u>Description générale du cyclopeptide</u>	74
b. <u>Synthèse et purification</u>	74
c. <u>Conclusion</u>	75
3. <i>Le cyclo[-(D-Ala-Lys-D-Ala-Gln)₂-]</i>	75
a. <u>Description générale</u>	75
b. <u>Synthèses</u>	75
c. <u>Conclusion</u>	77
4. <i>Les cyclo[-(D-Phe-Glu-D-Phe-Gln)₂-] et cyclo[-D-Phe-Glu-(D-Phe-Gln)₃-]</i>	77
a. <u>Description générale des cyclopeptides</u>	78
b. <u>Synthèse</u>	78
c. <u>Conclusion</u>	78
5. <i>Les cyclo[-(D-Ala-Glu-D-Ala-Gln)₂-D-Ala-Glu-] et cyclo[-(D-Ala-Glu-D-Ala-Gln)₃-]</i>	79
a. <u>Description générale des cyclopeptides</u>	79
b. <u>Synthèse</u>	79
c. <u>Conclusion</u>	80
6. <i>Le cyclo[-(D-N^{Me}-Ala-Glu-D-N^{Me}-Ala-Gln)₂-]</i>	80
a. <u>Description générale du cyclopeptide</u>	80
b. <u>Synthèse</u>	81
c. <u>Conclusion</u>	81
7. <i>Conclusions</i>	81
IV. Caractérisation de l'auto-assemblage	82
1. <i>Introduction</i>	82
2. <i>Caractérisations possibles (ATR, TEM, SAXS, Diffusion de la lumière)</i>	82
a. <u>ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection-Fourier Transform InfraRed spectroscopy)</u>	82
b. <u>MET (Microscopie Electronique à Transmission)</u>	83

c. Diffusion de la lumière.....	83
d. SAXS (Small Angle X-ray Scatering).....	83
3. <i>Cas du cyclopeptide [1]</i>	83
a. Introduction.....	83
b. Formation de l'auto-assemblage.....	84
c. Solubilité aqueuse des nanotubes de peptides.....	84
d. Caractérisation de l'assemblage.....	85
e. Peut-on isoler un nanotube ?.....	86
f. Conclusion.....	86
4. <i>Cas du cyclopeptide [2]</i>	87
a. Introduction.....	87
b. La modification d'un acide aminé change-t-elle la taille des cristaux ?.....	87
c. Conclusion.....	89
5. <i>Conclusion</i>	89
V. Conclusion	90
<u>C. Les nanostructures carbonées</u>	91
I. Description des nanostructures carbonées	91
II. Les Fullerènes	93
1. <i>Introduction</i>	93
2. <i>Fullerènes fonctionnalisés par bras espaceurs contenant une amine primaire terminale</i>	94
a. Bras espaceurs envisagés.....	95
b. <u>Fonctionnalisation du fullerène C₆₀</u>	97
c. <u>Conclusion</u>	97
3. <i>Fullerènes fonctionnalisés par bras espaceurs contenant un acide carboxylique terminal</i>	98
4. <i>Conclusion</i>	98
III. Les nanotubes de carbones	99
1. <i>Introduction</i>	99
2. <i>Description de la synthèse des bras espaceurs</i>	99
3. <i>Fonctionnalisation des nanotubes de carbone</i>	101

4. Conclusion.....	102
IV. Conclusion.....	102
<u>D. Couplages en solution.....</u>	103
I. Introduction.....	103
II. Couplages entre peptides et fullerènes.....	103
1. Couplage avec le cyclo[-(D-Ala-Gln) ₃ -D-Ala-Glu-] [2].....	103
2. Couplage avec le cyclo[-(D-Ala-Gln-D-Ala-Glu) ₂ -] [1].....	104
III. Conclusion.....	105
<u>Partie II : Voie alternative envisagée.....</u>	109
<u>A. Introduction.....</u>	111
<u>B. Les cyclopeptides.....</u>	112
I. Introduction.....	112
II. Synthèse du cyclopeptide sur support solide [42].....	113
1. Synthèse.....	113
2. Conclusion.....	114
III. Synthèse du cyclopeptide sur support solide [46].....	114
1. Description générale.....	114
2. Synthèse.....	115
a. Synthèse classique.....	115
b. Synthèse à l'aide des micro-ondes.....	116
3. Conclusion.....	117
IV. Conclusion.....	117
<u>C. Couplages sur support solide.....</u>	118
I. Introduction.....	118
II. Couplages du cyclopeptide [42] avec un fullerène.....	118
1. Introduction.....	118
2. Réactions.....	119
a. Première stratégie.....	119
b. Seconde stratégie.....	119
3. Conclusion.....	121
III. Couplage à l'aide du cyclopeptide [46].....	121

1. <i>Introduction</i>	121
2. <i>Couplages</i>	121
3. <i>Caractérisations de l'essai réalisé à l'aide de PyAOP</i>	122
a. <u>Par UV</u>	122
b. <u>Par Microscopie TEM</u>	123
c. <u>Conclusion</u>	124
3. <i>Conclusion</i>	124
IV. Analyse de la nature des organisations supramoléculaires en branches	124
1. <i>Introduction</i>	124
2. <i>Réaction de couplage sans fullerène</i>	124
3. <i>Etude TEM</i>	125
a. <u>Sur support solide</u>	125
b. <u>Cyclopeptides</u>	126
4. <i>Conclusion</i>	127
<u>D. Conclusion</u>	128
Partie III : Nouvelles architectures supramoléculaires à base de cyclopeptides	129
<u>A. Introduction</u>	130
<u>B. Organisations supramoléculaires en fonction des contre-ions alcalins portés par le cyclopeptide [1]</u>	131
I. Introduction	131
II. Le sodium	131
1. <i>Utilisation de solution de soude</i>	131
2. <i>Étude de la formation du mono-sel et du di-sel de sodium du cyclopeptide [1]</i>	133
a. <u>Stratégies</u>	133
b. <u>Salification lente</u>	133
c. <u>Salification rapide</u>	134
3. <i>Étude de la dynamique de cristallisation</i>	136
4. <i>Conclusion</i>	137
III. Les autres alcalins	137
1. <i>Le lithium</i>	137
a. <u>La salification</u>	137

b. <u>Dynamique de cristallisation</u>	139
c. <u>Conclusion</u>	140
2. <i>Le potassium, le rubidium et le césium</i>	140
3. <i>Conclusion</i>	142
IV. Caractérisation des assemblages supramoléculaires	143
1. <i>Introduction</i>	143
2. <i>Analyse des solutions</i>	143
a. <u>ATR-FTIR</u>	143
b. <u>Par diffusion de la lumière</u>	144
3. <i>Etudes des solutions cristallisées</i>	145
a. <u>Analyse par ATR-FTIR</u>	145
i. <i>Analyse du cyclopeptide sous forme de poudres lyophilisées</i>	145
ii. <i>Cristallisation sur l'appareil d'ATR-FTIR</i>	146
iii. <i>Analyse de la cristallisation sur plaques de verres</i>	147
iv. <i>Conclusion</i>	148
b. <u>Analyse par diffraction des électrons</u>	149
4. <i>Conclusion</i>	150
<u>C. Les contre-ions organiques</u>	151
I. Introduction	151
II. La quinuclidine	151
III. Conclusion	153
<u>D. Le groupe II du tableau périodique</u>	154
I. Introduction	154
II. Le magnésium	154
III. Le calcium	155
IV. Conclusion	155
<u>E. Les autres groupes du tableau périodique</u>	156
I. Introduction	156
II. Les bases envisagées	156
III. Conclusion	157
<u>F. Conclusions et perspectives</u>	158
I. Conclusion	158

II. Perspectives	158
<u>Conclusions et perspectives</u>	163
<u>A. Conclusions</u>	165
<u>B. Perspectives</u>	166
<u>Partie expérimentale</u>	169
I. Généralités	171
II. Partie 1	176
1. <i>Détermination du loading</i>	176
2. <i>Tests de suivi de réaction</i>	177
a. <u>Test UV permettant de suivre la déprotection de la fonction amine</u>	177
b. <u>Suivi de réaction de couplage par test de Kaiser</u>	177
3. <i>Le cyclo[(-D-Ala-Glu-D-Ala-Gln)₂-] [1]</i>	178
a. <u>Fonctionnalisation de la résine</u>	178
b. <u>Détermination du loading</u>	178
c. <u>Couplages peptidiques du peptide linéaire protégé</u>	178
d. <u>Déprotections de la chaîne principale donnant le peptide linéaire déprotégé</u>	180
e. <u>Cyclisation et clivage de la résine donnant le cyclopeptide [1]</u>	181
f. <u>Traitement acido basique pour la purification du cyclopeptide [1]</u>	182
4. <i>Le cyclo[-D-Ala-Glu-(D-Ala-Gln)₃-] [2]</i>	183
a. <u>Fonctionnalisation de la résine</u>	183
b. <u>Détermination du loading</u>	183
c. <u>Couplages peptidiques du peptide linéaire protégé</u>	183
d. <u>Déprotections de la chaîne principale donnant le peptide linéaire déprotégé</u>	185
e. <u>Cyclisation et clivage de la résine donnant le cyclopeptide [2]</u>	186
f. <u>Traitement acido basique pour la purification du cyclopeptide [2]</u>	187
5. <i>Le cyclo[(-D-Ala-Lys-D-Ala-Gln)₂-] [3]</i>	188
a. <u>Fonctionnalisation de la résine</u>	188
b. <u>Détermination du loading</u>	188
c. <u>Couplages peptidiques du peptide linéaire protégé</u>	188
d. <u>Clivage de la résine</u>	190

e. <u>Cyclisation pour donner le cyclopeptide [3]</u>	191
6. <i>Les cyclo[(-D-Phe-Glu-D-Phe-Gln)₂-] [4] et cyclo[-D-Phe-Glu-(D-Phe-Gln)₃-] [5]</i>	192
Synthèse commune	192
a. <u>Fonctionnalisation de la résine</u>	192
b. <u>Détermination du loading</u>	192
c. <u>Couplages peptidiques du peptide linéaire protégé</u>	192
Synthèse du cyclopeptide [4]	194
a. <u>Couplages peptidiques</u>	194
b. <u>Déprotections de la chaîne principale donnant le peptide linéaire déprotégé</u>	195
c. <u>Essais de cyclisation</u>	196
Synthèse du cyclopeptide [5]	197
a. <u>Couplages peptidiques</u>	197
b. <u>Déprotections de la chaîne principale donnant le peptide linéaire déprotégé</u>	198
c. <u>Essais de cyclisation</u>	198
7. <i>Les cyclo[(-D-Ala-Glu-D-Ala-Gln)₂-D-Ala-Glu-] [6] et cyclo[-(D-Ala-Glu-D-Ala-Gln)₃-] [7]</i>	199
Synthèse du cyclopeptide [6]	199
a. <u>Couplages peptidiques du peptide linéaire protégé</u>	199
b. <u>Déprotections de la chaîne principale donnant le peptide linéaire déprotégé</u>	200
c. <u>Cyclisation</u>	201
d. <u>Traitement acido basique pour la purification cyclopeptide [6]</u>	201
Synthèse du cyclopeptide [7]	202
a. <u>Couplages peptidiques du peptide linéaire protégé</u>	202
b. <u>Déprotections de la chaîne principale donnant le peptide linéaire déprotégé</u>	203
c. <u>Cyclisation</u>	204
d. <u>Traitement acido basique pour la purification du cyclopeptide [7]</u>	205
8. <i>Le cyclo[-(D-N^{Me}-Ala-Glu-D-N^{Me}-Ala-Gln)₂] [8]</i>	206
a. <u>Fonctionnalisation de la résine</u>	206
b. <u>Détermination du loading</u>	206

c. <u>Couplages peptidiques du peptide linéaire protégé</u>	206
d. <u>Déprotections de la chaîne principale donnant le peptide linéaire déprotégé</u>	208
e. <u>Essais de cyclisations</u>	209
9. <i>Fullerènes fonctionnalisés par des bras espaceurs contenant une amine primaire terminale</i>	210
Synthèse du bras espaceur [11]	210
a. <u>Première étape : composé [9]</u>	210
b. <u>Seconde étape : composé [10]</u>	210
c. <u>Seconde et troisième étapes : composé [12]</u>	211
d. <u>Quatrième étape : composé [13]</u>	212
e. <u>Cinquième étape : composé [11]</u>	212
Synthèse du bras espaceur [17]	213
a. <u>Première étape : composé [14]</u>	213
b. <u>Seconde et troisième étapes : composé [15]</u>	214
c. <u>Quatrième étape : composé [16]</u>	215
d. <u>Cinquième étape : composé [17]</u>	216
10. <i>Fonctionnalisation du fullerène C₆₀</i>	217
Synthèse du fullerène fonctionnalisé [19]	217
a. <u>Première étape : composé [18]</u>	217
b. <u>Seconde étape : composé [19]</u>	218
Synthèse du fullerène fonctionnalisé [21]	219
a. <u>Première étape : composé [20]</u>	219
b. <u>Seconde étape : composé [21]</u>	220
11. <i>Fullerènes fonctionnalisés par bras espaceurs contenant un acide carboxylique terminal</i>	221
Synthèse du composé [23]	221
a. <u>Première étape : composé [22]</u>	221
b. <u>Seconde étape : composé [23]</u>	221
Synthèse du composé [25]	222
a. <u>Première étape : composé [24]</u>	222
b. <u>Seconde étape : composé [25]</u>	223
12. <i>Synthèse des bras espaceurs pour les nanotubes de carbone</i>	224
Synthèse du 4-hydroxyphényle carbamate de méthyle [26]	224

Description du bras espaceur à x=2 [32] réalisé par Haiyan Li	225
a. Première étape : composé [27].....	225
b. Seconde étape : composé [28].....	225
c. Troisième étape : composé [29].....	226
d. Quatrième étape : composé [30].....	227
e. Cinquième étape : composé [31].....	228
f. Sixième étape : composé [32].....	228
Description du bras espaceur à x=7 [36]	229
a. Première étape : composé [33].....	229
b. Seconde étape : composé [34].....	230
c. Troisième étape : composé [35].....	231
13. <i>Fonctionnalisation des nanotubes de carbone</i>	232
Synthèse du composé [40]	232
a. Première étape : composé [39].....	232
b. Seconde étape : composé [40].....	233
c. Détermination du taux de chargement.....	233
14. <i>Analyses</i>	234
a. Analyse RMN ¹ H du cyclopeptide [1].....	234
b. Analyse ATR-FTIR de l'assemblage du cyclopeptide [1] en nanotubes de peptides par interactions de liaisons hydrogène en feuillets β antiparallèles.....	235
c. Analyse de spectrométrie de masse MALDI-TOF du cyclopeptide [1].....	236
d. Analyses SAXS des cyclopeptides [1] et [2].....	237
III. Partie 2	238
1. <i>Synthèse du cyclopeptide [42]</i>	238
a. <i>Fonctionnalisation de la résine</i>	238
b. <i>Détermination du loading</i>	238
c. <i>Couplages peptidiques du peptide linéaire protégé</i>	238
d. <i>Déprotections de la chaîne principale donnant le peptide linéaire déprotégé</i>	239
e. <i>Cyclisation pour l'obtention du cyclopeptide [41]</i>	240
f. <i>Déprotection de la lysine</i>	241

2. <i>Synthèse du cyclopeptide [46]</i>	243
a. <i>Fonctionnalisation de la résine</i>	243
b. <i>Détermination du loading</i>	243
c. <i>Couplages peptidiques du peptide linéaire protégé</i>	243
d. <i>Déprotections de la chaîne principale donnant le peptide linéaire déprotégé</i>	244
e. <i>Cyclisation pour l'obtention du cyclopeptide [45]</i>	245
f. <i>Déprotection de la lysine</i>	246
3. <i>Synthèse du composé [47]</i>	247
4. <i>Caractérisation du couplage fullerène [19] avec le cyclopeptide [46]</i>	249
IV. Partie 3	250
1. <i>Cristallisation sur grille de TEM des assemblages supramoléculaires de sels alcalins du cyclopeptide [1]</i>	250
2. <i>Cristallisation sur plaque de verre des assemblages supramoléculaires de sels alcalins du cyclopeptide [1]</i>	250

Introduction

Introduction aux nanotechnologies et assemblages supramoléculaires

Les travaux présentés dans ce manuscrit s'intéressent à un domaine récent aux interfaces de la chimie et de la physique : les nanotechnologies. Ce terme vaste est employé dans un grand nombre de problématiques de recherche. Il est donc difficile d'en faire une synthèse.

En revanche, si les problématiques et les domaines d'application sont nombreux, les techniques permettant de réaliser des nanomatériaux peuvent être classés en seulement deux grandes familles : la technique ascendante (ou Bottom-up) et descendante (ou Top-down). En d'autres termes, on peut réaliser des nanomatériaux à partir de matériaux massifs par dégradation (méthode descendante) ou bien par assemblage d'atomes, molécules (méthode ascendante). Les deux approches font appel, à la fois, à des principes physiques, mécaniques ou chimiques : diffusion, contraintes mécaniques, réaction chimique, changements de phase et auto-organisation à partir de matériaux gazeux, liquides ou solides.¹

A. Synthèse de nanomatériaux et applications.

Après avoir résumé brièvement l'approche top-down, on s'attardera sur les différents nanomatériaux issus des approches bottom-up dont l'auto-assemblage fait partie (méthode envisagée pour la synthèse de nouveaux matériaux hybrides) et des exemples d'applications seront présentés.

L'approche Top-down consiste en la synthèse de nanomatériaux à partir de matériaux massifs, soit par lithographie, soit par découpage ou gravure. La microélectronique en tire de nombreuses applications. Nous ne rentrerons pas dans les détails ici.

Par contre, on peut se poser la question de savoir en quoi l'échelle nanométrique est ici si importante.

Les recherches actuelles ont pu mettre en évidence que les propriétés d'un même matériau dépendaient de la taille des particules, ce qui est surtout vrai à l'échelle nanométrique. Ces différences peuvent intervenir sur les propriétés mécaniques, électroniques, magnétiques, optiques ou encore chimiques. Deux raisons peuvent expliquer cela. La première est que bon nombre de propriétés chimiques comme physiques sont dépendantes du nombre d'électrons disponibles à la surface d'un matériau. L'augmentation de la surface spécifique entraîne le fait que les nanomatériaux vont présenter des caractéristiques spécifiques à l'échelle nanométrique. La seconde raison est due au fait que les effets

quantiques deviennent dominants lorsque les dimensions diminuent, ce qui a un effet sur les propriétés optiques, électriques et magnétiques.²

I/ Approches Bottom-up.

Les approches Bottom-up permettent de réaliser des nanomatériaux à partir d'atomes ou de molécules. On peut les séparer en deux grandes familles, soit par synthèse chimique, soit par auto-assemblage.

1. La synthèse chimique.

Le principe consiste à prendre des particules ou molécules et d'en faire un nanomatériau avec une étape faisant intervenir une réaction chimique. Le précurseur peut être indifféremment à l'état solide, liquide ou gazeux. Un changement d'état permet alors à une réaction chimique de se faire pour donner naissance aux nanoparticules.

C'est ainsi que la préparation des nanotubes de carbone, ou plus anciennement des fullerènes, ont pu être développées.³ En effet, les fullerènes sont synthétisés par vaporisation du graphite sous atmosphère d'hélium.⁴ On retrouve par exemple des applications de nanomatériaux dans la limitation optique⁵ ou l'électrochimie.⁶

Les nanotubes de carbone, à l'origine produit secondaire de la synthèse de fullerènes⁷, sont aujourd'hui fabriqués par deux procédés différents respectant le principe de synthèse chimique bottom-up.⁸ Le premier dit de haute température consiste à sublimer le graphite, avec différentes méthodes : arc électrique⁹, vaporisation par ablation laser¹⁰ ou four solaire¹¹. Le second procédé dit de moyenne température fait intervenir des réactions chimiques de décomposition catalytique, par CVD¹² (Chemical Vapor Deposition) ou par HiPCO¹³ (High Pressure Dismutation of CO).

Les nanotubes de carbone ont des propriétés de conduction électrique, mécaniques, thermiques et chimiques. Ces propriétés résultent directement de leur filiation structurale avec le graphite mais également des conditions imposées par l'enroulement.¹⁴

2. *L'auto-assemblage.*

Cette technique Bottom-up consiste à réaliser des nanoobjets par interactions non covalentes de particules ou molécules. Le terme d'auto-assemblage se définit par un procédé réversible dans lequel des parties préexistantes, ou bien des composants désordonnés d'un système préexistant, forment des structures avec un plus haut degré d'organisation.

L'autoassemblage nécessite des composants moléculaires qui contiennent au moins deux sites d'interactions.¹⁵ De plus, la réversibilité d'un tel système implique la nécessité d'avoir des interactions faibles (comparées aux liaisons covalentes), celles-ci pouvant être de différents types. L'élément de cohésion entre les molécules peut être électrostatique, induit par des liaisons hydrogène, par des interactions entre dipôles (fixes ou induits) par π -stacking ou interactions hydrophobe. Une organisation peut résulter de plusieurs types d'interactions en même temps. Par exemple, la structure quaternaire d'une protéine résulte entre autres d'interactions hydrophobes et d'un réseau de liaisons hydrogène.

Les interactions les plus importantes ici sont sans doute les liaisons hydrogène. En effet, les énergies de liaisons hydrogène intermoléculaires (10 à 40 kJ.mol⁻¹) sont seulement 20 fois plus faibles que les énergies de la plupart des liaisons covalentes (200 à 800 kJ.mol⁻¹), et sont plus fortes que celle des liaisons de Van der Waals habituelles (1 à 4 kJ.mol⁻¹).¹⁶

On définit une liaison hydrogène comme un type de force dipôle-dipôle qui existe entre un atome électronégatif et un atome d'hydrogène, lui-même porté par un atome électronégatif.¹⁷

Les liaisons de Van der Waals sont des forces électriques attractives ou répulsives entre deux entités moléculaires ou groupes de molécules. Ces liaisons n'entrent pas dans le cadre des liaisons chimiques en ce sens qu'il n'y a pas d'échange d'électrons entre les atomes. Dans la perspective de l'auto-assemblage, ce type d'interaction est trop faible et ne peut constituer l'essentiel des forces d'assemblage. On définit trois types de liaisons de Van der Waals : les forces de Keesom ou effet d'orientation dipôle-dipôle, les forces de Debye ou effet d'induction dipôle-dipôle induit et les forces de London ou effet de dispersion dipôle induit-dipôle induit. Il existe tout de même une exception pour les interactions π -stacking, que l'on peut considérer comme des interactions dipôle-dipôle, qui font intervenir des orbitales p des liaisons π . Elles sont nettement plus fortes en énergie que les liaisons de Van der Waals classiques et sont suffisamment importantes pour permettre un auto-assemblage stable.

De la même manière que les liaisons de Van der Waals, les liaisons ioniques aident à l'assemblage de l'édifice mais sont trop faibles à elles seules pour permettre la stabilité de l'assemblage.

Enfin, et dans le cas de conditions aqueuses uniquement, les interactions hydrophobes peuvent être considérées comme importantes pour l'auto-assemblage. Les solutés dits hydrophobes sont constitués de molécules neutres non polaires (alcanes, hydrocarbures, huiles, composés fluorocarbonés). Lors de l'hydratation, les molécules d'eau s'organisent autour des entités hydrophobes en structure quasiment cristalline, ce qui explique la forte diminution de l'entropie. La vitesse de diffusion des molécules hydrophobes se retrouve alors très ralentie par cette couche d'hydratation, ces dernières possèdent alors une très forte affinité mutuelle qui les pousse à s'auto-assembler et former des amas au sein du milieu.

Ainsi, il faut considérer en priorité les interactions les plus énergiquement favorisées pour l'auto-assemblage, comme les liaisons hydrogène, les interactions hydrophobes ou les π -stacking. Les autres interactions sont à considérer comme participant à la stabilité de l'édifice.

II/ Auto-assemblage et propriétés.

Le but de ce chapitre est de développer plus en détail cette partie de la chimie supramoléculaire afin de mettre en évidence l'intérêt que peut porter la synthèse de nouveaux nanomatériaux par cette voie.

Le procédé d'auto-assemblage est utilisé dans bien des domaines, la nature en étant le premier utilisateur avec la bicouche lipidique, les fibres amyloïdes, l'enroulement de l'ADN, les interactions des protéines et bien d'autres. Les techniques de formation de nanoobjets peuvent se diviser en deux parties : à partir de molécules linéaires ou à partir de molécules non linéaires.

1. Auto-assemblages formés à partir de molécules linéaires.

a. A partir de lipides.

L'exemple le plus ancien d'auto-assemblage de lipides est la bicouche lipidique.

Ces derniers peuvent prendre des formes différentes: vésicules, micelles, bicouches ou micelles inverse (Schéma 1) en fonction des paramètres utilisés: température, pression, densité de matière.

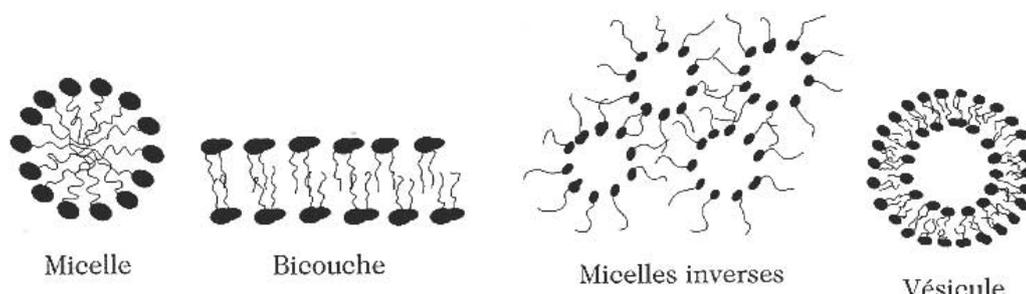


Schéma 1: Représentation schématique des différentes formes d'assemblage de lipides dans l'eau : micelle, bicouche, micelle inverse ou vésicule.

Ces assemblages sont régis par des interactions hydrophobes qui proviennent de la présence dans la molécule d'une partie faiblement soluble dans l'eau.

Depuis quelques années, des laboratoires s'intéressent à un nouveau type d'assemblage sous la forme de nanotube (sous forme de phase hexagonale¹⁸, hexagonale inverse¹⁹, etc.).

L'intérêt des lipides pour la conception d'assemblages supramoléculaire réside dans la grande variété de type d'assemblage possible et dans le caractère amphiphile des lipides. Leur biocompatibilité est un atout majeur pour leurs applications, ce qui permet de les utiliser fréquemment. Entre autre, les lipides sont souvent utilisés pour l'encapsulation.

b. A partir de polymères

Les différentes études décrites dans la littérature montrent que l'assemblage de ce type de nanotube repose sur les propriétés hydrophobes des polymères. Si l'assemblage se fait le plus souvent en solvant organique, en présence²⁰ ou non²¹ d'eau, on trouve tout de même un exemple d'assemblage stable dans l'eau²². Mais quelques soient les exemples de la littérature, les nanotubes sont de diamètres prédéfinis par la longueur du polymère et sont généralement accompagnés par des sphères ou vésicules.

On leur trouve des applications potentielles dans l'électronique comme nanocomposites²³, mais également des propriétés biologiques d'excipients²⁴ ou de microélectrodes²⁵.

c. A partir de peptides ou analogues.

Les exemples d'assemblage de peptides sont nombreux. Les éléments de cohésion pouvant être les liaisons hydrogène²⁶, l'hydrophobicité²⁷, le π -stacking²⁸, et montrent la richesse des possibilités d'auto-assemblage. Ils peuvent se présenter sous forme d'hélices²⁹, de fibres³⁰, de nanotubes³¹.

On ne s'attardera dans cette partie que sur deux exemples d'auto assemblage sous forme de nanotubes.

Le laboratoire de Matsui a mis au point des nanotubes de peptides à partir du dicarboxylate de bis(*N*, α -amino-glycylglycine)-1-7-heptane.³² (**Schéma 2**) La présence des deux fonctions carboxyliques dans la structure permet un contrôle de l'assemblage par le pH. En effet, l'assemblage des monomères entre eux décrit une courbure. Cette courbure est accentuée lorsque les liaisons hydrogène entre les monomères sont fortes donc à pH acide (pH 5). L'assemblage se retrouve alors sous forme de tube (Matsui compare cet assemblage aux cigares enroulés). En revanche, lorsque les liaisons hydrogène sont perturbées par des contre-ions s'insérant dans la maille ou à pH basique (pH 8), la courbure est faible et l'auto-assemblage se retrouve sous forme de fibre.

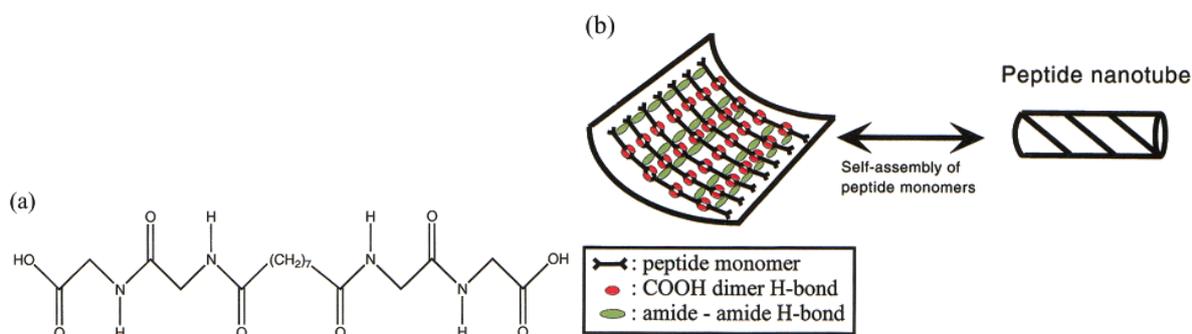


Schéma 2 : a/ Structure semi développée du dicarboxylate de bis(*N*, α -amino-glycylglycine)-1-7-heptane, b/ Représentation schématique de l'auto-assemblage des monomères en nanotubes.³²

Les nanotubes ont une grande polydispersité de taille (de 1 à 200 nm) et ont tendance à s'assembler entre eux. Il a tout de même été possible d'individualiser les nanotubes par ajout de quantité contrôlé d'ions³³ et de contrôler leur diamètre par croissance dans des pores membranaires.³⁴

Les applications possibles de ce type d'assemblage sous forme tubulaire, se trouvent en microélectronique. En effet, il est possible de fonctionnaliser ces nanotubes et de capturer des particules métalliques telles que Pt, Pd, Cu, Co et Ni.³⁵ Il est possible également de capturer ou incorporer des molécules biologiques comme l'ADN, des protéines ou des porphyrines via les liaisons hydrogène.³⁶

Le laboratoire de Gazit a quant à lui mis en évidence la formidable facilité pour un tout petit peptide, le diphényle alanine, à s'auto-assembler en nanotube.³⁷ (**Schéma 3**) La découverte résulte de l'observation qu'une grande partie des peptides contenant ces deux acides aminés adjacents avaient une facilité pour former des fibres. C'est en effet en étudiant les fibres β -amyloïdes de la maladie d'Alzheimer qu'ils en sont venus à cette conclusion.

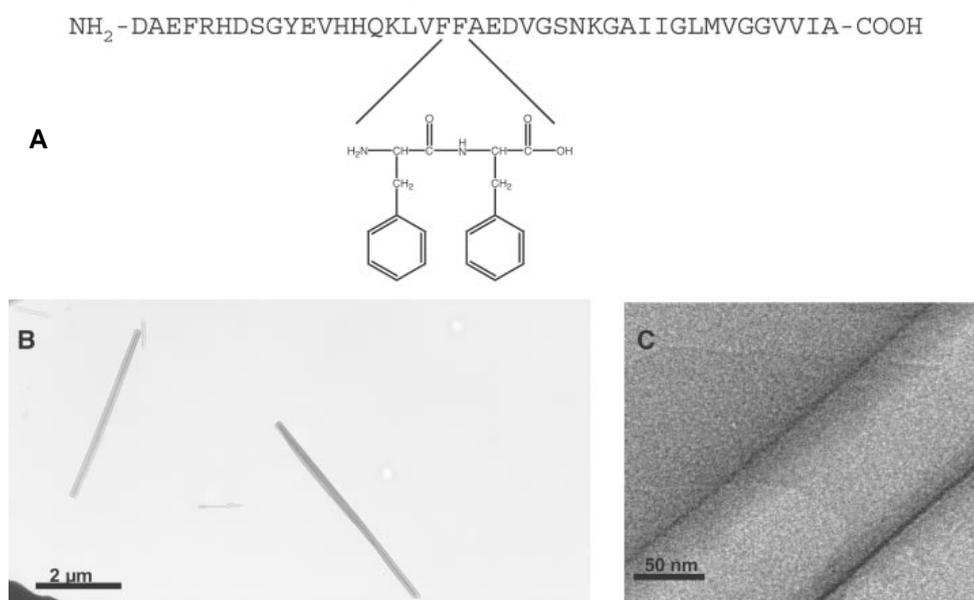


Schéma 3 : a/ Peptide β -Amyloïde contenant le diphényle alanine, b/ image TEM du nanotube de diphényle alanine, c/ image HR-TEM.³⁸

Le mécanisme d'auto assemblage n'est pas encore totalement élucidé mais il semblerait que ce soient les interactions de π -stacking qui engendreraient la structure tubulaire.³⁹ Ces nanotubes ont une grande stabilité thermique et chimique⁴⁰, et sont particulièrement rigides.⁴¹ Il est possible de contrôler l'assemblage en nanotubes à l'aide de dendrimers⁴² puis de les aligner sous l'effet d'un champ magnétique lorsque les tubes sont recouverts de particules métalliques⁴³.

De nombreux analogues ont été ensuite synthétisés⁴⁴ et métallisés en surface⁴⁵, ce qui confère à ces nanotubes de remarquables applications en micro et nanoélectronique⁴⁶, mais également en électrochimie comme bio-capteurs⁴⁷.

En conclusion, les peptides linéaires permettent d'obtenir une grande variété d'assemblages supramoléculaires, fibres, hélices, nanotubes, mettant en jeu différents types d'interactions, liaisons hydrogène, interactions hydrophobes, π -stacking.

En choisissant les acides aminés, il est possible d'ajuster ces différents types d'interactions et de contrôler l'assemblage de manière plus fine que dans le cas des lipides ou des polymères l'assemblage tridimensionnel.

2. Nanostructures formés à partir de molécules cycliques.

a. A partir de molécules variées.

On trouve quelques exemples d'auto assemblage de molécules cycliques faisant intervenir des interactions π -stacking^{48,49,50} ou des liaisons hydrogène⁵¹.

b. A partir de peptides ou analogues.

La bibliographie sur les peptides cycliques montre la variété d'auto-assemblage possible avec ce type de substrat. On peut ainsi former des fibres, des nanotubes de tailles et d'organisation très différentes⁵².

Un exemple remarquable que constituent le Lanréotide et ses dérivés est développé au laboratoire. Le Lanréotide, inhibiteur de l'hormone de croissance, est un octapeptide qui forme des hydrogels sous forme de nanotubes monodisperses⁵³. La synthèse de dérivés de ce composé a permis de réaliser des fibres ou des nanotubes de diamètres très différents.

Ce type d'assemblage fait intervenir un ensemble d'interactions comme les liaisons hydrogène, des interactions hydrophobes et des π -stacking. Quatre ordres hiérarchiques sont mis en évidence au sein du nanotube. (**Schéma 4**) Par recouvrement entre les zones aliphatiques de deux peptides (effet hydrophobe) et les zones aromatiques (interactions π - π), le monomère lanréotide est assemblé sous forme de dimères. Son positionnement « face à face » permet de minimiser les forces répulsives entre les charges positives (**Schéma 4, a/**).

Deux molécules de lanréotide forment donc l'épaisseur de la paroi du tube. Des liaisons hydrogène intermoléculaires stabilisent l'assemblage des dimères sous forme de filaments hélicoïdaux (**Schéma 4, b/**). L'effet hydrophobe stabilise les interactions latérales des filaments entre eux. Le tube peut donc être considéré comme constitué de filaments de dimères (**Schéma 4, c/**). Les nanotubes monodisperses, de 3 à 28 % de Lanréotide en masse, sont organisés spatialement avec une maille hexagonale (**Schéma 4, d/**).

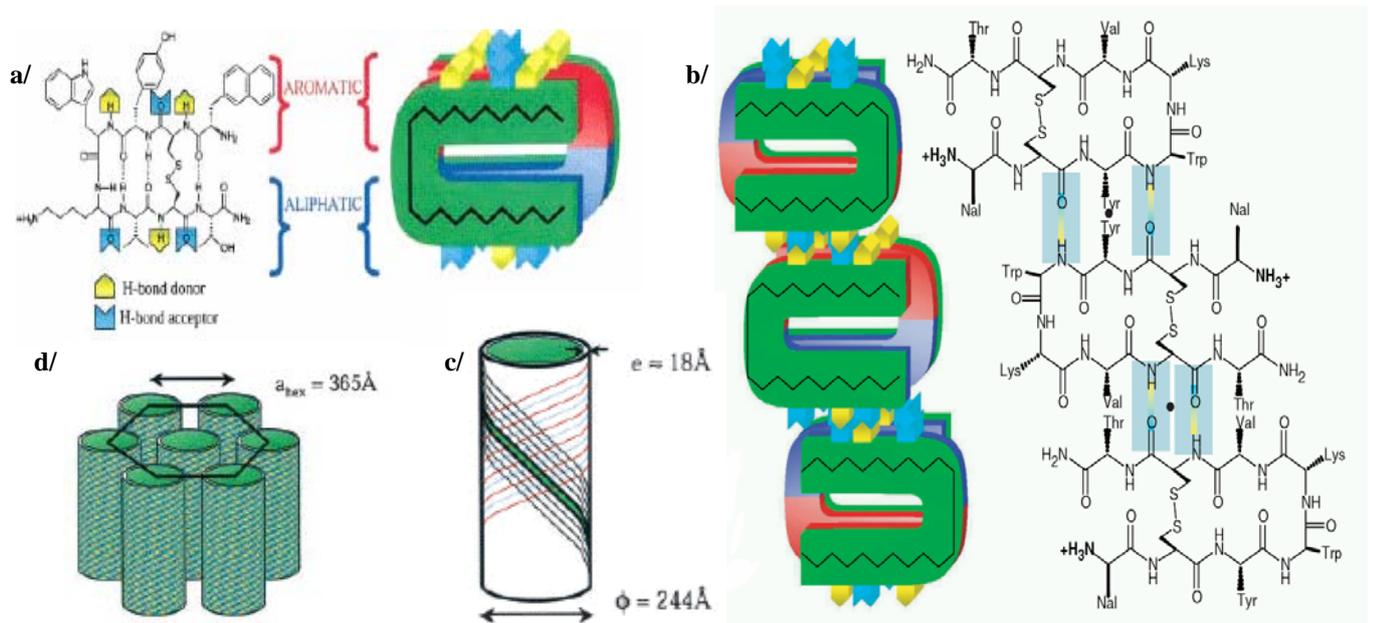


Schéma 4 : Ordres hiérarchiques des nanotubes de lanréotide. (a) Dimère de lanréotide. (b) Filaments assemblés par liaisons H. (c) Nanotubes. (d) Réseau hexagonal de nanotubes.

Il existe également d'autres types de nanotubes formés par des cyclopeptides et développés par Ghadiri⁵⁴. Ces cyclopeptides sont constitués d'un nombre pair d'acides aminés alternés D et L capables de s'auto-assembler par liaisons hydrogène en feuillet β antiparallèles. Le diamètre du nanotube est cette fois-ci déterminé par le nombre d'acides aminés dans le cyclopeptide.

Les applications sont nombreuses dans le domaine biologique et dans les nanomatériaux.

Ces nanotubes sont décrits de manière détaillée dans la partie suivante.

B. Les nanotubes de peptides de type Ghadiri.

I/ Description des nanotubes de peptides.

1. Introduction.

L'assemblage tubulaire basé sur l'empilement de peptides cycliques (appelé également sous-unités ou bagues) a été suggéré pour la première fois en 1972 par Hassal.⁵⁵ (Schéma 5) Cette prédiction a été validée en 1974 par des études cristallographiques du térapeptide *cyclo*[-(L-Ser(OtBu)-β-Ala-Gly-β-Asp(OMe))-]. D'après les analyses théoriques de DeSantis, les peptides cycliques constitués d'un nombre pair d'amino acides alternés D et L, ont la possibilité de s'associer entre eux par des liaisons hydrogène afin de former une structure tubulaire.⁵⁶

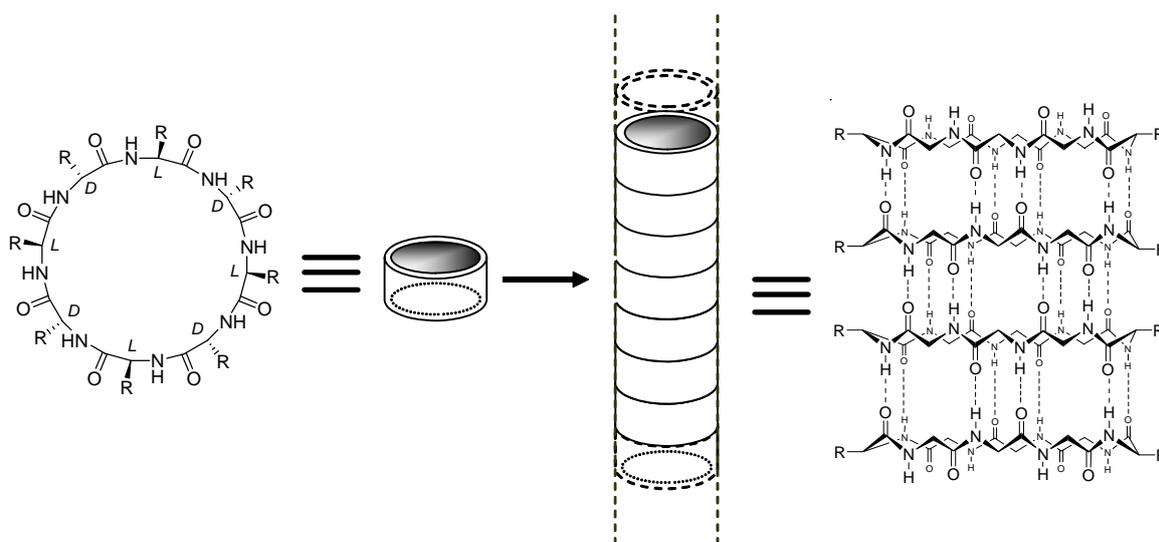


Schéma 5 : Diagramme schématique d'assemblage de peptides cycliques, alternant des amino acides D et L en nanotubes. Pour simplifier, la majorité des chaînes secondaires du peptide a été omise.

En 1989, des études cristallographiques (RX) par Lorenzi des hexapeptides *cyclo*[-(L-Phe-D-Phe)₃-] et *cyclo*[-(L-Val-D-Val)₃-] n'ont pas permis pas de mettre en évidence des interactions entre les sous-unités mais simplement l'association de bagues et de molécules

d'eau cocrystallisées.⁵⁷ Ils n'ont ainsi pu mettre en évidence la formation tubulaire de leurs cyclopeptides.

La même année, le laboratoire de Heitz a étudié le cas du *cyclo*[-(Ala-D-Ala-Ala-D-Pro)₂-] parmi d'autres peptides cycliques.⁵⁸ Malgré des résultats intéressants, la possibilité d'assemblages supramoléculaires de ce peptide n'a pas été abordée alors.

C'est en 1993 que le laboratoire de Ghadiri a démontré la formation de tels nanotubes en solution avec un octapeptide le *cyclo*[-(D-Ala-Glu-D-Ala-Gln)₂-] et envisagé le potentiel que pouvait avoir ce type d'assemblage.⁵⁹ Un grand nombre de nanotubes de peptides a été depuis synthétisé et de nombreuses propriétés ont été démontrées, s'appliquant à une grande variété de domaines.

2. Composition du nanotube de peptides.

a. Nombre et nature des acides aminés.

D'après les calculs théoriques de Hassal, le cyclopeptide doit être constitué d'un nombre paire d'acides aminés alternés D et L. (**Schéma 6**) Dans ce cas, le peptide est considéré comme plan ($\psi = 180^\circ$)⁶⁰, les liaisons C=O et N-H de la liaison peptidique sont approximativement perpendiculaires au plan de la bague, mais de manière diamétralement opposée. Cet arrangement permet une distribution homogène des liaisons hydrogène de part et d'autre des bagues (au total 16 liaisons hydrogène par bagues). Les chaînes latérales sont en position équatoriale permettant de ne pas intervenir dans l'édifice.⁶¹

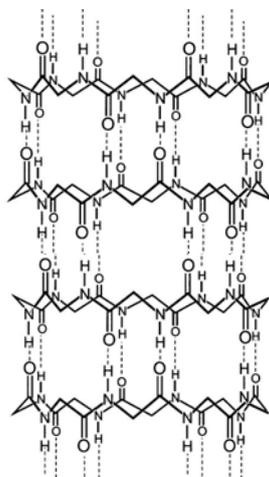


Schéma 6 : Représentation schématique de l'auto-assemblage de cyclopeptides. Pour simplifier, les chaînes latérales ne sont pas représentées.

La distance, calculée par modélisation moléculaire, entre deux bagues est de 4,73 Å.⁶²

En se basant sur cette théorie, de nombreux peptides ont été synthétisés et ont démontré la véracité de ces données (soutenus par des analyses tels que la RMN, l'ATR-FTIR et différentes techniques de Microscopie).

En 2005, le laboratoire de Takeru a démontré en théorie comme en pratique que le *cyclo*[-(L-Gln)₅] formait des nanotubes alors qu'il est constitué d'un nombre impair d'acides aminés et qu'ils sont tous L.⁶³ La répétition des motifs identiques dans l'espace permet un rapprochement optimal des bagues entre elles. Le réseau de liaisons hydrogène qui se crée alors est suffisant pour permettre l'auto-assemblage.

Le nombre d'acides aminés possible est borné entre 6 et 12. En effet, les bagues constituées de moins de six aminoacides alternés D, L ont un diamètre interne trop petit. La planéité ne peut pas être respectée du fait des contraintes de cycle et cela ne favorise pas l'interaction des sous-unités entre elles.⁶⁴ Cette non planéité n'étant pas identique sur chaque bague, le réseau de liaisons hydrogène ne peut alors pas se créer. De même pour les bagues trop larges, une trop grande flexibilité du peptide conduit à un réseau de liaisons hydrogène trop faible. Les bagues ne peuvent pas s'auto-assembler en nanotube de manière stable. De plus, les modélisations moléculaires et les études expérimentales ont montré que les cyclopeptides de huit résidus possèdent une taille optimale pour former des nanotubes.

A titre indicatif, les diamètres internes des nanotubes sont de 5,9 Å pour les hexacyclopeptides, 8,1 Å pour les octacyclopeptides, 10,8 Å pour les decacyclopeptides et 13,1 Å pour les dodecacyclopeptides.⁶⁵

b. Assemblage en feuillets β antiparallèles

Les interactions dues aux liaisons hydrogène intermoléculaires peuvent résulter d'arrangements parallèles ou antiparallèles des cyclopeptides. (**Schéma 7, a/**)

De Santis a démontré que les arrangements parallèles sont comparables à ceux d'une hélice α selon les calculs théoriques (tels que la DFT (Density Functional Theory)).⁵⁹ (**Schéma 7, b/**)

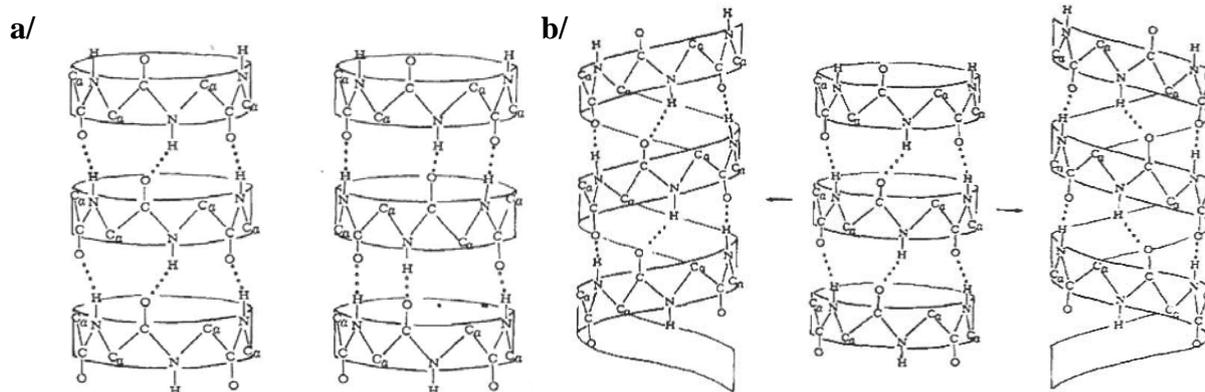


Schéma 7: a/ Représentations schématiques des arrangements parallèles (à gauche) et antiparallèle (à droite) des cyclopeptides, b/ Comparaison des arrangements parallèles de cyclopeptides (au centre) avec les hélices droite et gauche de peptides linéaires.⁵⁹

Or, les différentes observations expérimentales suggèrent une préférence marquée pour l'arrangement antiparallèle. En effet, dès la description du premier nanotube de peptides de Ghadiri, les analyses ATR-FTIR réalisées sur les cristaux montrent un déplacement de la bande amide I, caractéristique des carbonyles, correspondant aux feuillets β antiparallèles.⁵⁹

De plus, d'autres travaux de Ghadiri ont montré que l'arrangement était très majoritairement antiparallèle. L'arrangement antiparallèle est thermodynamiquement favorisé.⁶⁶

Ainsi, les cyclopeptides de type Ghadiri s'auto-assemblent en nanotube par un réseau de liaisons hydrogène en feuillets β antiparallèles.

3. Variété de cyclopeptides constituant les nanotubes.

S'il existe des règles établies permettant à des cyclopeptides de s'auto-assembler en nanotubes il est tout de même possible de réaliser des modifications sans altérer ses propriétés d'assemblage. Ces modifications peuvent être portées sur deux parties du peptide, la chaîne principale ou les chaînes latérales. Après une description des modifications possibles, quelques exemples significatifs seront présentés.

a. Modification du squelette de base.

Des acides aminés naturels peuvent être utilisés pour la synthèse de nanotubes de type Ghadiri. L'utilisation d'acides aminés non naturels comme les amino acides N-méthylés, les β^3 aminoacides ou encore les α ou γ aminoacides cycliques ont permis d'obtenir également des nanotubes.

Dans le cas de la N-méthylation des acides aminés, le *cyclo*[(D-Me-N-Ala-Phe)₄] est décrit par Ghadiri.⁶⁷ Les analyses montrent que ce peptide s'auto-assemble en solution sous la forme d'un dimère et que l'assemblage supramoléculaire est stable en solution dans le temps.

(Schéma 8)

La séquence du peptide implique la présentation des méthyles sur la même face de la bague. A cause de l'encombrement stérique, aucune liaison hydrogène ne peut avoir lieu sur cette face. Les feuilletts β sont en arrangement antiparallèle et le réseau de liaisons hydrogène est maintenu sur la face disponible de la bague. Les conditions permettant l'auto-assemblage en feuilletts β sont donc remplies dans ce cas.

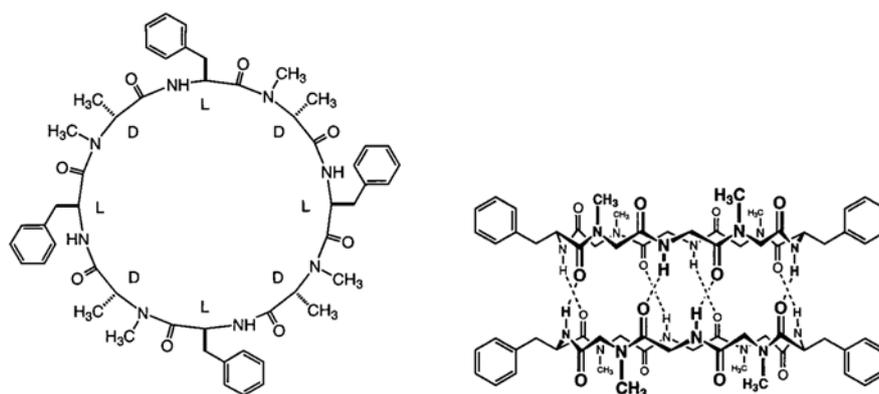


Schéma 8 : Structure du *cyclo*[(D-Me-N-Ala-Phe)₄] et représentation schématique de l'assemblage sous la forme de dimère.⁶⁷

Cependant, cette approche n'est pas générale car toutes les modifications ne sont pas possibles.⁶⁸ En effet, il a été mis en évidence que la N-alkylation peut dans certains cas empêcher l'assemblage d'avoir lieu. Il faut donc envisager cette modification avec prudence.

Dans le cas des β^3 -amino acides, Seebach a montré pour la première fois que les tétracyclopeptides pouvaient adopter des conformations similaires et s'empiler pour donner les structures tubulaires.⁶⁹ (Schéma 9) Quelques exemples depuis semblent montrer que ce n'est pas un cas particulier.⁷⁰

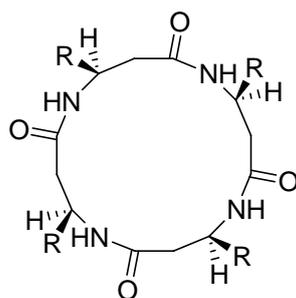


Schéma 9 : a/ Structure chimique des β^3 cyclo-peptides représentés avec leur conformation.

Ainsi, on a la possibilité dans ce cas de réaliser des nanotubes à l'aide d'un plus petit nombre d'acides aminés (non naturels). L'angle de courbure de la bague n'étant pas trop élevée, la planéité est encore cette fois respectée. De plus, la composition du peptide modifié conduit à une bonne rigidité, le réseau hydrogène reste alors suffisant pour permettre une organisation supramoléculaire stable en feuillet β et l'arrangement est cette fois encore antiparallèle.

Enfin, Granja, a développé un autre type de nanotube (**Schéma 10**) à l'aide de dérivés d'acides aminés.⁷¹

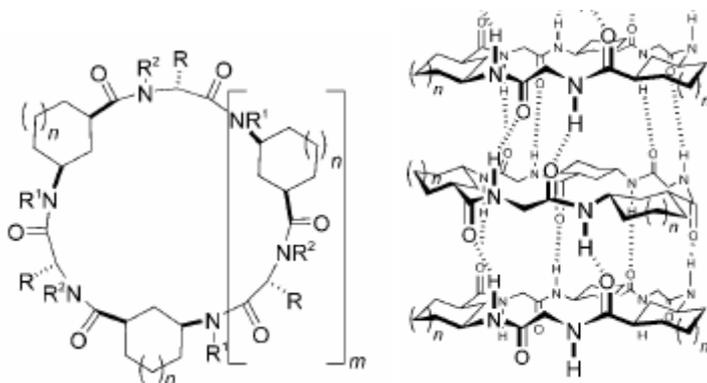


Schéma 10 : Représentation schématique de l'auto-assemblage de nanotubes de peptides à base de α et γ amino acides ($R_1, R_2 = H, Me, n=0, 1$ et $m=1, 2$). Les chaînes latérales ont été omises afin de clarifier le dessin.⁷¹

L'utilisation de ces acides aminés non naturels ne perturbe pas le réseau de liaisons hydrogène et permet une organisation supramoléculaire en feuillets β antiparallèles.

Ainsi, ces modifications du cyclopeptide montrent qu'il est possible d'utiliser des acides aminés naturels ou non pour l'obtention de nanotubes.

b. Modification au niveau des chaînes latérales.

Comme nous l'avons décrit précédemment, le squelette des cyclopeptides alternés D et L d'un nombre pair d'acides aminés est inscrit dans un plan. Les chaînes latérales, dans cette conformation, sont en position équatoriale des bagues, perpendiculaires à l'axe du nanotube. Ainsi, les encombrements stériques entre les chaînes latérales des bagues sont minimisés et leur nature ne doit pas ou très peu interférer dans l'auto-assemblage.

Pourtant, dans le cas des hexacyclopeptides, les chaînes latérales ont leur importance. Par exemple, certains hexacyclopeptides ont la possibilité de s'auto-assembler en nanotube, alors que le *cyclo[-(D-Ala-Val)₃-]* ne le peut pas.⁵⁷

En revanche, les octacyclopeptides ont montré une plus grande flexibilité. Les 20 acides aminés naturels ont été utilisés pour réaliser des nanotubes. De plus, bon nombre d'acides aminés non naturels et des groupements chimiques ont été greffés sans perturber l'auto-assemblage.

Néanmoins, les chaînes latérales jouent un rôle clé dans le mécanisme d'auto-assemblage. Dans le cas du premier cyclopeptide décrit par Ghadiri⁵⁹, le *cyclo[-(D-Ala-Glu-D-Ala-Gln)₂-]*, les fonctions acides de l'acide glutamique (Glu) jouent le rôle de médiateur de l'assemblage. En effet, la formation des sels de carboxylate empêche totalement l'auto-assemblage d'avoir lieu. De plus, les chaînes latérales des Glu et Gln participent au mécanisme d'auto-assemblage en interagissant avec les chaînes latérales d'autres cyclopeptides au moyen de liaisons hydrogène.^{61,72}

Un second exemple souligne l'importance des chaînes latérales, le *cyclo[-(Trp-D-Leu)₃-Gln-D-Leu-]*.⁷³ L'autoassemblage en nanotubes est réalisé dans une bicouche lipidique. En effet, les peptides ne sont pas structurellement prédisposés pour former des nanotubes dans l'eau. Par contre, ils sont énergétiquement favorisés pour s'auto-assembler dans une bicouche lipidique et ainsi fournir les structures transmembranaires voulues. En effet, la force de l'auto-assemblage est due dans un premier temps à la contribution enthalpique des nombreuses liaisons hydrogène qui se créent (favorisées par la faible constante diélectrique qui règne dans

la bicouche lipidique) puis dans un second temps, à l'augmentation de l'entropie de la chaîne lipidique qui provient des interactions entre les chaînes latérales et les chaînes lipidiques.

Les chaînes latérales interviennent alors dans le mécanisme d'auto-assemblage. De plus, il a été mis en évidence que l'assemblage était dépendant des conditions opérationnelles comme la nature du solvant.

4. Conclusion.

Les cyclopeptides alternés D et L s'auto-assemblent en nanotubes selon des règles qui sont bien définies aujourd'hui.

Ces nanotubes ont trouvé des applications en biologie et en nanotechnologies tout à fait remarquables. Les exemples les plus pertinents seront présentés dans le chapitre suivant. Ce qui en fait des candidats de choix pour la conception de nouveaux matériaux hybrides.

II/ Applications des nanotubes de Ghadiri.

1. Introduction.

Par un choix judicieux des acides aminés, on peut envisager de nombreuses applications pour ces nanotubes de peptides. Ce chapitre va faire l'inventaire des applications (en électronique, biologie, nanomatériaux...) développés grâce à leurs propriétés.

2. Utilisation comme pores ou canaux transmembranaires.

La possibilité d'utiliser ces nouveaux nanotubes de peptides comme pores ou canaux transmembranaires a été très vite envisagée par l'équipe de Ghadiri avec le *cyclo*[-(Trp-D-Leu)₃-Gln-D-Leu-].⁷³ Ce nanotube de peptides s'organisant dans la bicouche lipidique est comparé à des protéines membranaires naturelles ayant les propriétés biologiques de canaux ioniques : la gramicidine A⁷⁴ ou l'amphotéricine B. Dans le cas des nanotubes, ceux-ci sont

alignés parallèlement aux chaînes des lipides assurant une orientation dans la membrane qui permet le transport médian.⁷⁵ (**Schéma 11**)

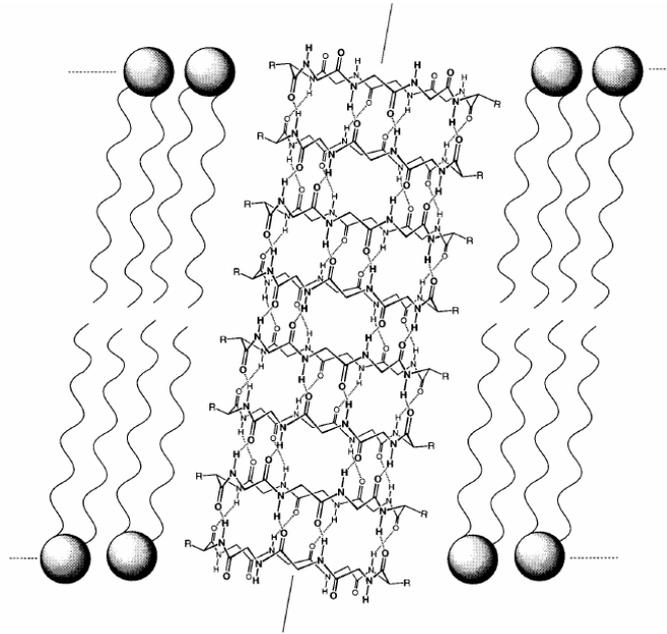


Schéma 11 : Représentation schématique de l'assemblage en nanotube dans la bicouche lipidique. Pour simplifier, certaines chaînes latérales ne sont pas représentées.⁷⁵

Les résultats obtenus montrent une conductance différente entre les cations K^+ et Na^+ .⁷⁶ Les barrières diélectriques à l'entrée du nanotube étant équivalentes entre les deux cations, les différences de perméabilité doivent plutôt provenir du puits énergétique à l'intérieur du tube. Ayant un puits énergétique plus profond, le cation Na^+ est retenu plus longtemps et sa vitesse de diffusion est plus lente que pour K^+ . De plus, les modélisations moléculaires sembleraient montrer que Na^+ serait plus solvaté par des molécules d'eau augmentant la taille de l'ensemble et rendant son passage dans le tube plus difficile.

Afin d'améliorer ces résultats, l'utilisation de cyclopeptides chargés à l'extrémité des nanotubes a été réalisée.⁷⁷ (**Schéma 12**)

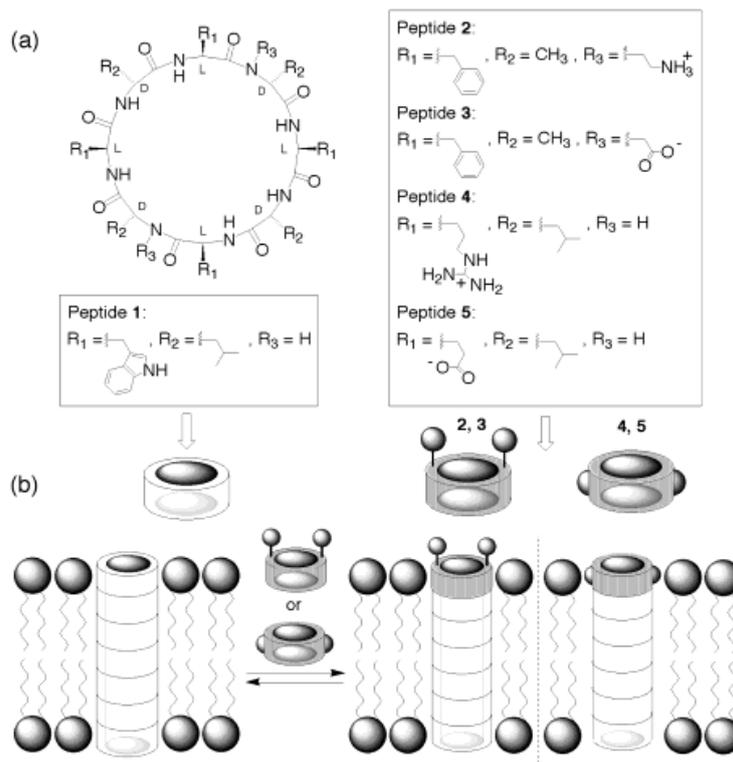


Schéma 12 : Représentation schématique du principe, a/ les différents peptides synthétisés, b/ leur positionnement dans une bicouche lipidique.⁷⁷

Le principe a consisté à introduire des cyclopeptides chargés, différents de ceux utilisés pour la formation du nanotube inséré dans la membrane lipidique. Ces cyclopeptides chargés peuvent interagir avec la partie hydrophile de la membrane et modifier la conductance ionique de cette dernière. Les résultats ont montré que le tube dont le « chapeau » est chargé négativement augmentait les propriétés de conductance de 10 à 15% pour le K^+ .

En ce qui concerne les pores, des études de modélisation suggèrent que les bagues de 10 résidus, ou plus, pourraient former de larges pores transmembranaires suffisant pour un transport médian de petites molécules hydrophiles à travers la bicouche lipidique. Afin de vérifier ces hypothèses, le *cyclo*[-(Trp-D-Leu)_n-Gln-D-Leu] n=4, qui possède un diamètre interne de 10 Å, a été synthétisé.⁷⁸ Le peptide comportant deux acides aminés supplémentaires doit avoir des propriétés similaires. D'après les résultats obtenus lors de la mesure de l'activité de transport du glucose en solution, ce nanotube afficherait une activité de transport efficace. A titre indicatif, l'étude a mis en évidence que l'octapeptide ne permet

pas d'obtenir cette activité. Cela montre l'importance du nombre d'acides aminés dans la bague pour obtenir une cavité au diamètre désiré.

Ainsi, les nanotubes de peptides hydrophobes s'insérant dans la membrane lipidique semblent posséder les propriétés requises pour former des canaux ou pores artificiels.

Il convient tout de même de préciser que l'équipe de Zhu a obtenu des résultats de modélisation moléculaire qui indiquent que les molécules d'eau ont un mouvement coopératif à l'intérieur du tube et que la diffusion se fait dans l'axe du tube, l'eau se comportant comme de la glace.⁷⁹ Mais cette diffusion n'est pas unilatérale du fait des arrangements antiparallèles entre les bagues, il est donc nécessaire d'avoir une force motrice pour permettre aux molécules d'eau de se déplacer à l'intérieur du tube.

3. Propriétés optiques et électroniques.

Des études théoriques ont étudié les propriétés électriques de semi-conducteur que pouvaient présenter les nanotubes de peptides par l'intermédiaire du réseau de liaisons hydrogène.

En 1997, le laboratoire de Takeda a été le premier à suggérer des propriétés électroniques et optiques.⁸⁰ Pour se faire, l'étude a consisté à comparer les gaps obtenus entre un octacyclopeptide de Glycine (Gly) s'auto-assemblant en nanotube et une chaîne de Gly (non cyclique).⁸¹ Les calculs théoriques ont mis en évidence une diminution du gap passant de 5,32 eV pour la chaîne linéaire à 4,75 eV pour le cyclopeptide. La cyclisation de la chaîne coupe la conjugaison π et les électrons se retrouvent concentrés sur les atomes d'oxygène et d'azote des fonctions amides du squelette. Les auteurs en concluent alors que l'organisation en nanotube entraîne la formation de liaisons hydrogène qui vont pouvoir faire migrer ces électrons le long du tube. Le nanotube serait alors comparable à un semi-conducteur.

Ces résultats ont cependant été contredits deux ans plus tard par l'équipe de Jishi qui affirme que le gap n'est pas suffisant pour considérer le nanotube comme un semi-conducteur mais présenterait les caractéristiques d'un bon isolant.⁸² Pourtant, l'équipe de Okamoto reprendra les premières conclusions suggérant la possibilité de délocalisation électronique le long du tube via les liaisons hydrogène inter-bagues.⁸³ Les conclusions iront même jusqu'à considérer le nanotube de peptides comme un semi-conducteur.⁸⁴

En dépit de ces divergences, plusieurs réflexions peuvent être faites. Il peut être intéressant de comparer les valeurs présentées à celles de composés connus, par exemple le diamant qui est un bon isolant et qui présente un gap de 5,5 eV. En revanche, le nitrure de gallium possédant un gap de 3,4 eV est considéré comme semi-conducteur. Les valeurs discutées dans les publications se trouvent entre les deux donc il est difficile de conclure. Ces calculs théoriques ne prennent pas en compte des paramètres essentiels comme l'environnement du nanotube. En effet, il a été établi que le solvant jouait un rôle crucial dans le transfert d'électron intermoléculaire par exemple dans le cas de la photosynthèse.⁸⁵ Cela relativise la pertinence de ces résultats.

Néanmoins, la fonctionnalisation des chaînes latérales a permis l'obtention de nanotubes présentant des propriétés intéressantes en électronique.

En effet, des dérivés du naphthalenediimide (NDI) ont été fixés de manière covalente sur des cyclopeptides via les chaînes latérales. (**Schéma 13**) Ces NDIs ont tendance à former des matériaux n-type, à la différence des autres molécules organiques, et sont utilisés pour fabriquer des semi-conducteurs p-type.⁸⁶

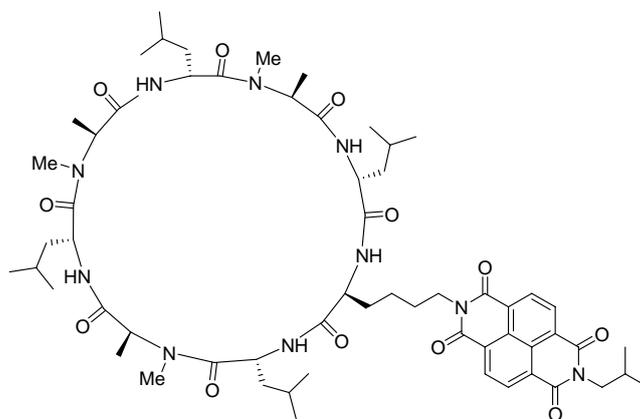


Schéma 13 : Structure développée du cyclo[-L-Leu-D-MeN-Ala-L-Leu-D-MeN-Ala-L-Leu-D-MeN-Ala-L-Leu-D-MeN-Ala-L-Leu-D-Lys_{NDI-iBu}-].

L'assemblage des cyclopeptides fonctionnalisés avec des NDI en nanotube induit un courant. Les mesures de fluorescence montrent l'efficacité du transfert de charge intermoléculaire entre les NDI.⁸⁷ Ces résultats ont été appliqués aux nanotubes de peptides à l'aide de quatre NDI par bague.⁸⁸

4. Propriété de biocapteur.

Les cyclopeptides s'auto-associant en nanotube ont fait l'objet d'études permettant de déterminer leur application potentielle comme biocapteur.

Le *cyclo*[-(D-Leu-Trp)₄-] a été choisi pour constituer un biocapteur dynamique basé sur les processus de diffusion à travers les cavités.⁸⁹ En effet, ce cyclopeptide a la capacité de s'organiser en nanotube dans une monocouche auto-organisée SAMs (ou Self-Assembled Monolayers) d'organosulfures perpendiculairement à une surface d'or. Trois complexes de tailles différentes présentant une activité redox active ont été utilisés pour leur capacité ou non à pénétrer dans la cavité des nanotubes: le [Fe(CN)₆]³⁻, le [Ru(NH₃)₆]³⁺ et le [Mo(CN)₈]⁴⁻. La reconnaissance spécifique de ces ions métalliques a été mise en évidence par étude voltamétrique. Seul les deux premiers, suffisamment petits, présentent une activité redox. Cette activité est réversible et ainsi le nanotube semble être un bon candidat comme biocapteur dynamique.

Un autre nanotube qui a été étudié pour ses capacités de biocapteurs est le *cyclo*[-(Gln-D-Leu)₄-].⁹⁰ Le nanotube de peptides a été modifié par greffage à sa surface d'anticorps reconnaissant *Escherichia coli*. L'ensemble a été fixé sur une électrode de carbone. Mise en présence d'*Escherichia coli*, des mesures de voltamétrie cyclique ont été réalisées et ont mis en évidence une activité efficace de détecteur de cette bactérie.

5. Propriétés antibactérienne et antivirale.

Le laboratoire de Ghadiri a développé une banque de cyclopeptides protéolytiquement stables pouvant s'insérer préférentiellement dans les membranes des bactéries pour former des nanotubes.⁹¹ Ainsi formés, ces derniers ont la capacité d'augmenter la perméabilité de la membrane, de réduire les potentiels ioniques transmembranaires et provoquer alors une mort rapide de la cellule. Les résultats ont été confirmés ensuite *in vitro* et *in vivo*, et la stratégie employée a montré le potentiel antibiotique des nanotubes de cyclopeptides.⁹²

En ce qui concerne l'activité antivirale, le principe consiste à inhiber sélectivement une famille de virus ayant développée une capacité à entrer dans la cellule par endocytose.⁹³ Ces virus, après avoir été reconnu par des récepteurs spécifiques, vont être internalisés dans la cellule par une poche lipidique appelée compartiment endosomal. Après acidification, ce

compartiment est dégradé et la partie active du virus va être libérée et va circuler librement dans la cellule.

Une banque d'octacyclopeptides amphiphiles a été mise au point pour s'insérer dans la bicouche lipidique de la cellule afin d'inhiber cette acidification. Le virus reste alors piégé dans le compartiment endosomal. Les résultats obtenus par fluorescence et microscopie par fluorescence de cette étude ont mis en évidence un cyclopeptide présentant les propriétés recherchées, le *cyclo*[-Ser-D-His-Lys-D-Arg-Lys-D-Trp-Leu-D-Trp-].

Ainsi, les cyclopeptides, par leur faible toxicité et leur participation active dans les mécanismes de protection des virus constituent des composés antiviraux intéressants.

6. Propriété photosensible applicable en optique, électronique et à des appareils capteur.

Le laboratoire de Ghadiri a mis au point un composé présentant des propriétés photosensibles.⁹⁴ Ce composé est constitué des deux cyclopeptides *N*-méthylés liés par un composé azobenzène capable de s'isomériser. (**Schéma 14**)

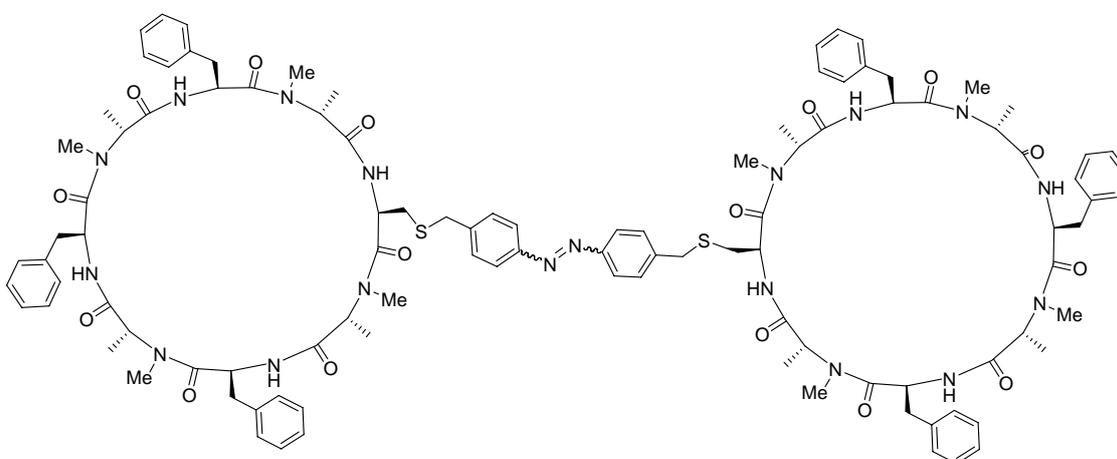


Schéma 14 : Structure développée des deux cyclopeptides *N*-méthylés liés par un composé azobenzène.

L'isomère Z qui s'auto-assemble en dimère par liaisons hydrogène intramoléculaires a la capacité de s'isomériser par voie thermique en un isomère E qui s'assemble sous forme de polymère par liaisons hydrogène intermoléculaires. (**Schéma 15**)

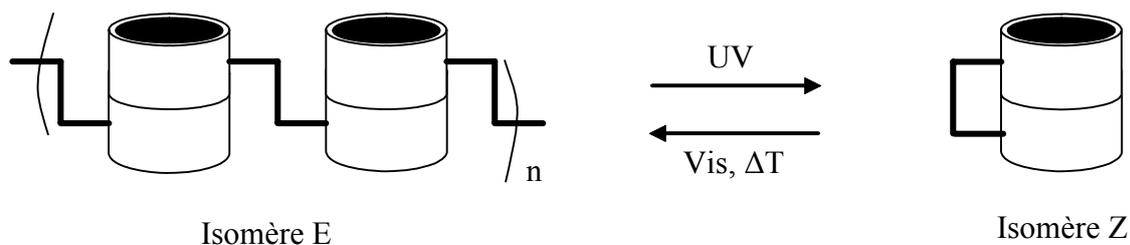


Schéma 15 : Représentation schématique des deux isomères Z et E.

L'isomère E peut à nouveau être isomérisé par voie photochimique pour donner l'isomère Z. Le système est alors réversible. La caractérisation des peptides et des différents types d'assemblages a été réalisée par UV/Vis, RMN 1D, 2D, FT-IR et ESI-MS.

Ces films ont été transférés sur support solide (surfaces de mica, de germanium ou de quartz) et les analyses montrent que les formes Z et E de l'azobenzène forment des films Langmuir-Blodgett très stables à l'interface air-eau et qui peuvent être isomérisés réversiblement.⁹⁵

Ces assemblages présentent donc les caractéristiques photosensibles requises pour des applications en optique, électronique.

7. Matériaux hybrides.

L'équipe de Biesalski a quant à elle mis au point un nouveau type de matériau hybride peptides/polymères sur la base des cyclopeptides s'assemblant en nanotube.⁹⁶ Le principe consiste à introduire une fonction polymérisable sur les chaînes latérales des acides aminés qui vont, après assemblage des peptides en nanotube, permettre l'amorce de polymérisations radicalaires. Après polymérisation en utilisant le *N*-isopropylacrylamide comme monomère, le nanotube se retrouve alors entouré tout au long de sa surface d'une coque de polymères. L'étude a montré qu'il était possible de contrôler la taille des matériaux hybrides en contrôlant le temps de polymérisation.⁹⁷

Cette approche reposant sur l'utilisation de nanotubes de peptides offre de nouvelles perspectives dans la réalisation de matériaux hybrides ayant une forme persistante, ce qui n'est pas accessible par d'autres techniques.

8. Conclusion.

Les nanotubes de peptides présentés dans cette partie ont des propriétés variées permettant des applications dans des domaines comme les nanomatériaux ou la biologie. Les perspectives très prometteuses ont été mises en évidence comme canaux ioniques ou pores membranaires, de part leur remarquable capacité à s'organiser en nanotube dans la bicouche lipidique. Leur faible toxicité permet également d'envisager leur utilisation dans la lutte contre des bactéries ou virus. Mais ces composés peuvent être aussi utilisables comme matériaux ayant des propriétés électroniques ou optiques, ou bien comme nouveaux biocapteurs simples à synthétiser et à manipuler.

Cet ensemble de propriétés laisse penser que ces composés peuvent être de bons candidats pour la conception de nouveaux matériaux hydrides.

-
- ¹ J-J Samuëli, *Par-delà les nanosciences et les nanotechnologies*, Ed. Ellipses, Paris, 2007, page 55.
- ² J-J Samuëli, *Par-delà les nanosciences et les nanotechnologies*, Ed. Ellipses, Paris, 2007, page 8.
- ³ Leurs découvertes, synthèses et applications seront plus amplement développés dans la partie 3 de ce manuscrit.
- ⁴ W. Krätschme ; L. D. Lamb; K. Fostiropoulos; D. R. Huffman, *Nature*, **1990**, 347, 354-358.
- ⁵ L. W. Tutt ; A. Kost, *Nature*, **1992**, 356, 225-226.
- ⁶ Q. Xie; E. Perez-Cordero; L. Echegoyen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 3978-3980.
- ⁷ S. Iijima, *Nature*, **1991**, 354, 56-58.
- ⁸ Les techniques de synthèse permettant de synthétiser chacune un type de nanotube de carbone soit SWNT, double-WNT, MWNT. Chaque type de nanotube ayant des propriétés différentes.
- ⁹ R. Bacon, *J. Appl. Phys.*, **1960**, 31, 283-290; C. Journet; W. K. Maser; P. Bernier; A. Loiseau; M. Lamy de la Chapelle; S. Lefrant; P. Deniard; R. Lee; J. E. Fischer, *Nature* **1997**, 388, 756-758.
- ¹⁰ A. Thess; R. Lee; P. Nikolaev; H. Dai; P. Petit; J. Robert; C. Xu; Y. Hee Lee; S. Gon Kim; A. G. Rinzler; D. T. Colbert; G. E. Scuseria; D. Tomanek; J. E. Fischer; R. E. Smalley, *Science*, **1996**, 273, 483-487.
- ¹¹ D. Laplaze; P. Bernier; W. K. Maser; G. Flamand; T. Guillard; A. Loiseau, *Carbon*, **1998**, 36, 685.
- ¹² M. J. Yacaman; M. M. Yoshida; L. Rendon; J. G. Santiesteban, *Appl. Phys. Lett.*, **1993**, 62, 685-688.
- ¹³ P. Nikolaev; M. J. Bronikowski; R. K. Bradley; F. Rohmund; D. T. Colbert; K. A. Smith; R. E. Smalley, *Chem. Phys. Lett.*, **1999**, 313, 91-97.
- ¹⁴ J.-P. Bourgoïn; A. Loiseau; J.-F. Nierengarten, *Les nanosciences, nanotechnologies et nanophysiques*, Ed. Belin, Paris, **2004**, chap 8.
- ¹⁵ J.-M. Lehn, *La chimie supramoléculaire, concepts et perspectives*, Ed. DeBoeck Université, Bruxelles, **1997**, chap 9.
- ¹⁶ A. Gerschel, *Liaisons moléculaires*, Ed. CNRS, Paris, **1995**.
- ¹⁷ Définitions tirés du gold book disponible sur Internet à l'adresse :
<http://www.goldbook.iupac.org>

-
- ¹⁸ M. W. Tate; S. M. Gruner, *Biochemistry*, **1989**, 28, 4245-4253 ; J. M. Seddon, *Biochim. Biophys. Acta*, **1990**, 1031, 1-69 ; W. Srisiri; T. M. Sisson; D. F. O'Brien; K. M. McGrath; Y. Han; S. M. Gruner, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 4866-4873.
- ¹⁹ V. Percec; J. A. Heck; D. Tomazos; G. Ungar, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1993**, 2381-2388 ; R. C. Smith ; W. M. Fischer ; D. L. Gin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 4092-4093.
- ²⁰ K. Yu; A. Eisenberg, *Macromolecules*, **1998**, 31, 3509-3518 ; B. Liu; D.-J. Qian; M. Chen; T. Wakayama; J. Miyake, *Chem. Comm.*, **2006**, 3175-3177.
- ²¹ S. Stewart; G. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 340-344.
- ²² J. Grumelard; A. Taubert; W. Meier, *Chem. Comm.*, **2004**, 1462-1463.
- ²³ S. Stewart; G. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 340-344 ; L. D.-D. Pra; S. Demoustier-Champagne, *Polymer*, **2005**, 46, 1583-1594 ; R. Xiao; S. II Cho; R. Liu; S. B. Lee, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 4483-4489.
- ²⁴ K. Yu; A. Eisenberg, *Macromolecules*, **1998**, 31, 3509-3518.
- ²⁵ M. R. Abidian; D. C. Martin, *Biomaterials*, **2008**, 29, 1273-1283.
- ²⁶ T. Beke; I. G. Csizmadia; A. Perczel, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 5158-5167.
- ²⁷ J. D. Hartgerink; E. Beniash; S. I. Stupp, *Science*, **2001**, 294, 1684-1688.
- ²⁸ M. Crima; C. Toniolo; S. Royo; A. I. Jiménez; C. Cativiela, *Org. Lett.*, **2006**, 8, 6091-6094.
- ²⁹ D. M. Marini; W. Hwang; D. A. Lauffenburger; S. Zhang; R. D. Kamm, *Nano Lett.*, **2002**, 2, 295-299 ; T. -M. Chin; K. D. Berndt; N.-C. C. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 2279-2280 ; R. C. Elgersma; T. Meijneke; G. Posthuma; D. T. S. Rijkers; R. M. J. Liskamp, *Chem. Eur. J.*, **2006**, 12, 3714-3725.
- ³⁰ M. S. Lamm; K. Rajagopal; J. P. Schneider; D. J. Pochan, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 16692-16700 ; T. Koga; M. Matsuoka; N. Higashi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 17596-17597.
- ³¹ K. Lu; L. Guo; A. K. Mehta; W. S. Childers; S. N. Dublin; S. Skanthakumar; V. P. Conticello; P. Thiyagarajan; R. P. Apkarian; D. G. Lynn, *Chem. Comm.*, **2007**, 2729-2731 ; S. Matsumura; S. Uemura; H. Mihara, *Mol. BioSyst.*, **2005**, 1, 146-148.
- ³² H. Matsui, *Recent Res. Devel. Physical Chem.*, **2002**, 6, 351-370.
- ³³ H. Matsui; G. E. Douberly Jr., *Langmuir*, **2001**, 17, 7918-7922.
- ³⁴ P. Porrata; E. Goun; H. Matsui, *Chem. Mater.*, **2002**, 14, 4378-4381.
- ³⁵ H. Matsui; S. Pan; B. Gologan; S. Jonas, *J. Phys. Chem. B*, **2000**, 104, 9576-9579.
- ³⁶ G. J. Douberly; S. Pan; D. Walters; H. Matsui, *J. Phys. Chem. B*, **2001**, 105, 7612-7618 ; H. Matsui; R. MacCuspie, *Nano Lett.*, **2001**, 1, 671-675.

-
- ³⁷ M. Reches; E. Gazit, *Science*, **2003**, 300, 625-627.
- ³⁸ Schéma de la référence 37 : M. Reches; E. Gazit, *Science*, **2003**, 300, 625-627.
- ³⁹ E. Gazit, *The FASEB journal*, **2002**, 16, 77-83.
- ⁴⁰ L. Adler-Abramovitch ; M. Reches ; V. L. Sedman ; S. Allen ; S. J. B. Tendler ; E. Gazit, *Langmuir*, **2006**, 22, 1313-1320.
- ⁴¹ N. Kol; L. Adler-Abramovich; D. Barlam; R. Z. Shneck; E. Gazit; I. Rousso, *Nano Lett.*, **2005**, 5, 1343-1346.
- ⁴² L. Adler-Abramovich; R. Perry; A. Sagi; E. Gazit; D. Shabat, *ChemBioChem.*, **2007**, 8, 859-862.
- ⁴³ M. Reches ; E. Gazit, *Nature Nanotech.*, **2006**, 1, 195-200.
- ⁴⁴ M. Reches; E. Gazit, *Nano Lett.*, **2004**, 4, 581-585 ; M. Reches; E. Gazit, *Israel J. Chem.*, **2005**, 45, 363-371.
- ⁴⁵ O. Carny; D. E. Shalev; E. Gazit, *Nano Lett.*, **2006**, 6, 1594-1597.
- ⁴⁶ N. B. Sopher; Z. R. Abrams; M. Reches; E. Gazit; Y. Hanein, *J. Micromech. Microeng.*, **2007**, 17, 2360-2365.
- ⁴⁷ M. Yemini; M. Reches; J. Rishpon; E. Gazit, *Nano Lett.*, **2005**, 5, 183-186 ; M. Yemini; M. Reches; E. Gazit; J. Rishpon, *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 5155-5159.
- ⁴⁸ S. Höger, *Chem. Eur. J.*, **2004**, 10, 1320-1329.
- ⁴⁹ D. Ranganathan; V. Haridas; R. Gilardi; I. L. Karle, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 10793-10800.
- ⁵⁰ J. Zhang; J. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 2655-2656.
- ⁵¹ P. R. Ashton; C. L. Brown; S. Menzer; S. A. Nepogodiev; J. F. Stoddart; D. J. Williams, *Chem. Eur. J.*, **1996**, 2, 580-591.
- ⁵² S. Leclair; P. Baillargeon; R. Skouta; D. Gautier; Y. Zhao; Y. L. Dory, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 349-353 ; D. Ranganathan; C. Lakshmi; V. Haridas; M. Gopikumar, *Pure Appl. Chem.*, **2000**, 72, 365-372.
- ⁵³ C. Valéry; M. Paternostre; B. Robert; T. Gulik-Krzywicki; T. Narayanan; J.-C. Dedieu; G. Keller; M.-L. Torres; R. Cherf-Cheick; P. Calvo; F. Artzner, *P. N. A. S.*, **2003**, 100, 10258-10262.
- ⁵⁴ Une description plus précise est proposée au chapitre suivant.
- ⁵⁵ C. H. Hassall, in *Proceeding of the Third American Peptide Symposium* (Ed.: J. Meinhoffer), Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI 1972, p. 153-157.
- ⁵⁶ P. DeSantis; S. Morosetti; R. Rizzo, *Macromolecules*, **1974**, 7, 52-58.

-
- ⁵⁷ V. Patove; E. Benedetti; B. D. Blasio; A. Lombardi; C. Pedone; G.P. Lorenzi, *Biopolymers*, **1989**, 28, 215-223.
- ⁵⁸ F. Heitz; F. Kaddari; N. Van Mau; J. Verducci; H. Raniri Sehen; R. Lazaro, *Biochimie*, **1989**, 71, 71-76.
- ⁵⁹ M. R. Ghadiri; J. R. Granja; R. A. Milligan; D.E. McRee; N. Khazanovich, *Nature*, **1993**, 366, 324-327.
- ⁶⁰ H. Okamoto; M. Kasahara; K. Takeda; K. Shiraishi, *Proc. 25th Int. Conf. Phys. Semicond.*, **2000**, 1637-1638.
- ⁶¹ J. D. Hartgerink; J. R. Granja; R. A. Milligan; M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 43-50.
- ⁶² K. Fukasaku; K. Takeda; K. Shiraishi, *J. Phys. Soc. Jpn*, **1997**, 66, 3387-3390.
- ⁶³ H. Okamoto; K. Takeda, *J. Drug Del. Sci. Tech.*, **2005**, 15, 97-107.
- ⁶⁴ J. P. Lewis; N. H. Pawley; O. F. Sankey, *J. Phys. Chem. B*, **1997**, 101, 10576-10583.
- ⁶⁵ Résultats obtenus par modélisation moléculaire de dérivés du cyclo[-(D-Phe-Ala)_{n=3,4,5,6}-] de : J. Zhu; J. Cheng; Z. Liao; Z. Lai; B. Liu, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **2008**, asap.
- ⁶⁶ K. Kobayashi; J. R. Granja; M. R. Ghadiri, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1995**, 34, 95-98
- ⁶⁷ M. R. Ghadiri; K. Kobayashi; J. R. Granga; R. K. Chadha; D. E. McRee, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1995**, 34, 93-95.
- ⁶⁸ T. D. Clark; J. M. Buriak; K. Kobayashi; M. P. Isler; D. E. McRee; M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 8949-8962.
- ⁶⁹ D. Seebach; J. L. Matthews; A. Meden; T. Wessels; C. Baerlocher; L.B. McCusker, *Helv. Chem. Acta*, **1997**, 80, 173-182.
- ⁷⁰ T. D. Clark; L. K. Buehler; M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 651-656 ; B. Jagannadh; M. S. Reddy; C. L. Rao; A. Prabhakar; B. Jagadeesh; S. Chandraseckhar, *Chem. Comm.*, **2006**, 4847-4849.
- ⁷¹ R. J. Brea; M. Amorín; L. Castedo; J. R. Granja, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 5710-5713.
- ⁷² P. Carboni; W. Andreoni, *Phys. Rev. Lett.*, **1997**, 79, 761-764.
- ⁷³ M. R. Ghadiri ; J. R. Granja ; L. K. Buehler, *Nature*, **1994**, 369, 301-304.
- ⁷⁴ T. W. Allen; O. S. Andersen; B. Roux, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2004**, 101, 117-122.
- ⁷⁵ H. S. Kim; J. D. Hartgering; M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 4417-4424.
- ⁷⁶ H. Hwang; G. C. Shatz; M. A. Ratner, *J. Phys. Chem. B*, **2006**, 110, 26448-26460.

-
- ⁷⁷ J. Sánchez-Quesada; M. P. Isler; M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 10004-10005.
- ⁷⁸ J. R. Granda; M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 10785-10786.
- ⁷⁹ J. Zhu; J. Cheng; Z. Liao; Z. Lai; B. Liu, *J. Comput Aided Mol. Des.*, **2008**, asap.
- ⁸⁰ K. Fukasaku; K. Takeda; K. Shiraishi, *J. Phys. Soc. Jpn*, **1997**, 66, 3387-3390.
- ⁸¹ K. Takada ; K. Shiraishi, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **1996**, 65, 421-438.
- ⁸² R. A. Jishi; N. C. Braier; C. T. White; J. W. Mintmine, *Phys. Rev. B*, **1998**, 58, 16009 (3).
- ⁸³ H. Okamoto; K. Takeda, *J. Drug Del. Sci. Tech.*, **2005**, 15, 97-107.
- ⁸⁴ H. Okamoto; K. Takeda; K. Shiraishi, *Phys. Rev. B*, **2001**, 64, 115425 (17).
- ⁸⁵ M. R. Wasielewski, *Chem. Rev.*, **1992**, 92, 435-461.
- ⁸⁶ H. E. Katz; J. Johnson; A. J. Lovinger; W. Li, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 7787-7792.
- ⁸⁷ W. S. Horne; N. Ashkenasy; M. R. Ghadiri, *Chem. Eur. J.*, **2005**, 11, 1137-1144.
- ⁸⁸ N. Ashkenazy; W. S. Horne; M. R. Ghadiri, *Small*, **2006**, 2, 99-102.
- ⁸⁹ K. Motesharei; M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 11306-11312.
- ⁹⁰ E. Chan Cho; J-W Choi; M. Lee, K-K Koo, *Colloids and surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **2008**, 313-314, 95-99.
- ⁹¹ S. Fernandez-Lopez; H-S Kim; E. C. Choi; M. Delgado; J. R. Granja; A. Kasanov; K. Kraehenbuehl; G. Long; D. A. Weinberger; K. M. Willcoxon; M. R. Ghadiri, *Nature*, **2001**, 412, 452-455.
- ⁹² V. Dartois; J. Sanchez-Quesada; E. Cabezas; E. Chi; C. Dubbelde; C. Dunn; J. R. Granja; C. Gritzen; D. Weinberger; M. R. Ghadiri; T. R. Parr, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2005**, 49, 3302-3310.
- ⁹³ W. S. Horne; C. M. Wiethoff; C. Cui; K. M. Wilcoxon; M. Amorin; M. R. Ghadiri; G. R. Nemerow, *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, 13, 5145-5153.
- ⁹⁴ M. S. Vollmer; T. D. Clark; C. Steinem; M. R. Ghadiri, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1999**, 38, 1598-1601.
- ⁹⁵ C. Steinem; A. Janshoff; M. S. Vollmer; M. R. Ghadiri, *Langmuir*, **1999**, 15, 3956-3964.
- ⁹⁶ J. Couet; J. D. Jeyaprakash; S. Samuel; A. Kopyshv; S. Santer; M. Biesalski, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 3297-3301.
- ⁹⁷ J. Couet; M. Biesalski, *Macromolecules*, **2006**, 39, 7258-7268.



Partie I

Synthèse de matériaux hybrides en solution.

A. Introduction générale.

Le but de ce travail est de concevoir et synthétiser de nouveaux matériaux hybrides associant des nanotubes de peptides de type « Ghadiri » à des nanostructures carbonées tels que les fullerènes ou les nanotubes de carbone. (**Schéma I-1**) Les applications pourraient être alors très différentes de celles mises en évidence pour les nanostructures séparées. Des applications sont attendues en optoélectronique par exemple.

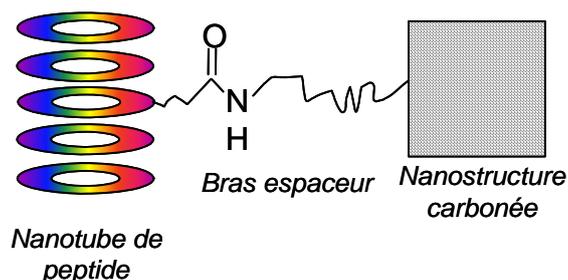


Schéma I-1 : Représentation schématique du projet matériaux hybrides.

L'approche consiste à fixer de manière covalente un cyclopeptide à une nanostructure carbonée préalablement fonctionnalisée par un bras espaceur. Le cyclopeptide modifié constituera par la suite l'amorce du nanotube de peptide. L'étape clé de cette approche est le couplage entre le cyclopeptide et la nanostructure carbonée. (**Schéma I-2**)

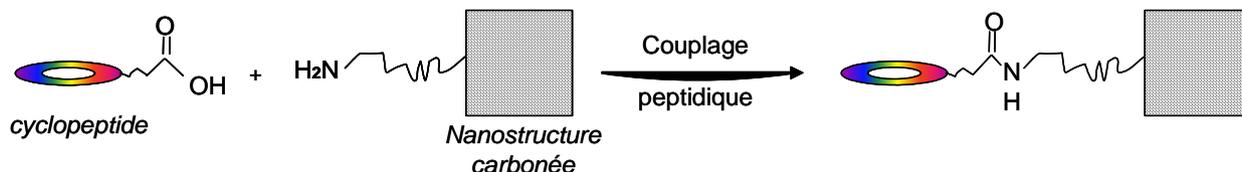


Schéma I-2 : Représentation schématique de la voie de synthèse par couplage.

Les cyclopeptides envisagés ici sont basés sur un peptide particulier, le *cyclo*[-(D-Ala-Gln-D-Ala-Glu)₂-] déjà décrit dans la littérature.¹

La possibilité de contrôler l'assemblage par l'intermédiaire du pH permet d'envisager un matériau hybride dont on pourra contrôler les applications. En effet, Ghadiri a montré l'importance de la chaîne latérale de l'acide glutamique pour l'auto-assemblage en nanotube dans les solutions aqueuses. Ainsi, en milieu alcalin, des répulsions électrostatiques importantes entre les chaînes latérales carboxylates négativement chargées, défavorisent l'agencement en nanotube et favorisent la dissolution des bagues. Par protonation des groupes carboxylates, non seulement les répulsions intermoléculaires entre les chaînes latérales

disparaissent mais en plus des interactions par liaisons hydrogène, entre ces mêmes chaînes, se créent. Ainsi, la protonation des groupes carboxylates influence fortement l'auto-assemblage en nanotubes.

Cette partie s'articulera autour de la synthèse de ces cyclopeptides et l'étude de leur auto-assemblage dans un premier temps, la synthèse des bras espaceurs et leur fonctionnalisation sur les nanostructures carbonées dans un deuxième temps. Enfin, les différents essais de couplage de ces deux entités seront présentés, avec les difficultés rencontrées et les stratégies mises en place pour les contourner.

B. Synthèse de peptides sur support solide.

I. La synthèse peptidique.

1. Couplage peptidique.

La synthèse de tels composés consiste à réaliser la séquence par ajout successif d'acides aminés et cela grâce à une réaction de couplage peptidique.

Deux stratégies de synthèses radicalement différentes sont employées, la synthèse en solution ou la synthèse sur support solide.

2. La synthèse sur support solide

La synthèse sur support solide a été proposée pour la première fois par Merrifield en 1963 et s'appliquait au cas de la synthèse peptidique.² Elle a depuis été étendue à la synthèse organique en général dans les années 1990. Le support solide est constitué de petites billes de polymères insolubles qui sont inertes aux conditions de réaction. Ces billes de résines ont la particularité de gonfler en solution, ce qui permet d'obtenir une bonne accessibilité des composés fixés sur la résine. Les billes contiennent des sites de greffage dont le nombre sur chaque bille est appelé couramment « Loading », (ou taux de chargement) qui correspond au nombre de moles de fonctions disponibles par gramme de résine (mol.g^{-1}).

3. Comparaison avec la synthèse en solution.

La synthèse en solution est longue et fastidieuse mais il est possible de travailler sur des quantités très importantes. Afin d'éliminer les produits de réaction, il est indispensable de faire des purifications sur chromatographie à chaque étape.

La synthèse sur support solide est beaucoup plus rapide puisque l'élimination des sous-produits de réaction est réalisée par simple filtration. Cette technique est entièrement automatisable, mais reste limitée en quantité à quelques grammes de peptide par synthèse. Elle est plus exigeante au point de vue des rendements de couplage et des déprotections intermédiaires, car on conserve sur la résine tous les produits résultant de couplages

incomplets. Il faut donc des rendements excellents. Il faut aussi être capable de cliver le peptide de la résine en fin de synthèse.

Pour la synthèse d'octapeptides, une approche sur support solide semble la plus adaptée.

4. Choix de la stratégie.

L'absence de racémisation, ou plutôt d'épimérisation, lors de la synthèse peptidique est fondamentale pour l'obtention de produits purs. L'utilisation d'acides aminés protégés sous forme de carbamate permet de résoudre ce problème

Deux stratégies différentes de synthèse utilisent les carbamates Boc, clivable en milieu acide, ou Fmoc, clivable en milieu basique, comme groupements protecteurs du *N*-terminal.

Le choix de l'utilisation du Fmoc peut être justifié par le fait que les déprotections répétitives par le TFA dans le cas du Boc fragilisent la liaison peptidique. De plus, l'utilisation du HF, produit dangereux, pour cliver le peptide de la résine est déconseillée.

5. Choix de l'agent de couplage pour les couplages peptidiques.

Il existe plusieurs familles d'agents de couplage pour réaliser cette réaction et leur utilisation dépend essentiellement des types de substrats à coupler.³ La famille des carbodiimides est utilisée pour les couplages courants, les familles des sels de phosphonium et des sels d'uronium sont plutôt utilisées pour les réactions de cyclisations ou pour les substrats difficiles à coupler (on préfère le PyBroP au DIC pour coupler des acides aminés *N*-méthylés⁴). (**Schéma I-5**) Il est à noter que les sels de phosphonium sont préférés aux sels d'uronium car ces derniers induisent des réactions de guanination sur le groupe amino lorsque les cinétiques sont trop lentes.

D'autres familles moins courantes comme les familles de sels de thiouronium, d'immonium, d'imidazolium ou bien les organophosphorés, agents halogénants, chloroformate ou pyridinium existent, mais leur utilisation ne sera pas développée ici.

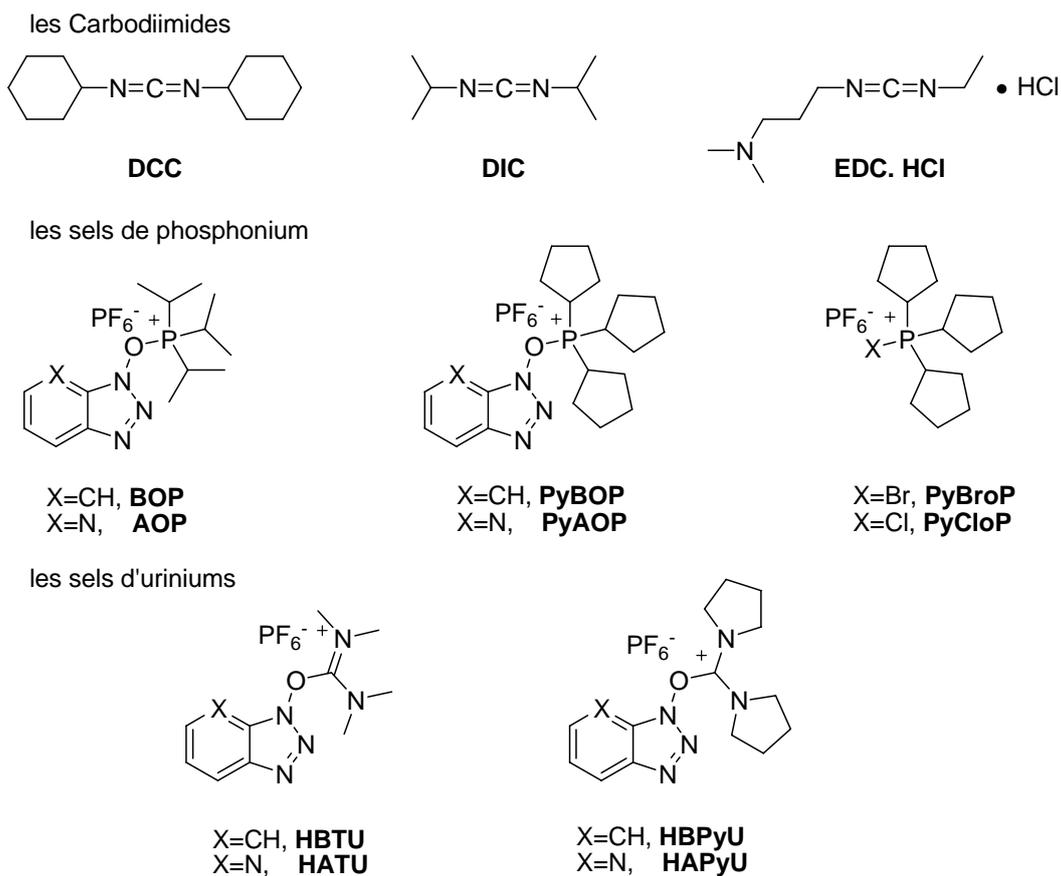


Schéma I-5 : Représentation non exhaustive des différentes familles d'agents de couplage les plus couramment utilisées.

Les agents de couplages se condensent sur l'acide carboxylique pour former un ester actif mais leur réactivité est relativement faible, même pour l'ester de OPtf, le plus réactif. On observe généralement des racémisations des acides aminés. Mais, après la découverte de l'HOBt ces racémisations ont été largement réduites et les agents de couplages sont généralement associés à l'HOBt ou à un analogue.⁵ (**Schéma I-6**)



Schéma I-6 : Représentations développées des HOBt et HOAt.

Le mécanisme de couplage faisant intervenir l'HOBt sera développé par la suite.

II. Synthèse sur support solide, description générale des étapes.

1. Présentation du projet.

Les cyclopeptides présentés dans ce chapitre ont pour but d'être engagés dans une réaction de couplage entre le peptide et la nanostructure carbonée en solution. Pour cela, il a été choisi de réaliser une réaction de couplage entre une fonction acide carboxylique présente sur la chaîne latérale du cyclopeptide et une fonction amine sur le bras espaceur préalablement fixé sur la nanostructure carbonée. (**Schéma I-7**)

Un cyclopeptide sera couplé de manière covalente sur la nanostructure carbonée (nanotube de carbone ou fullerène). Il servira d'amorce pour la croissance du nanotube de peptide.

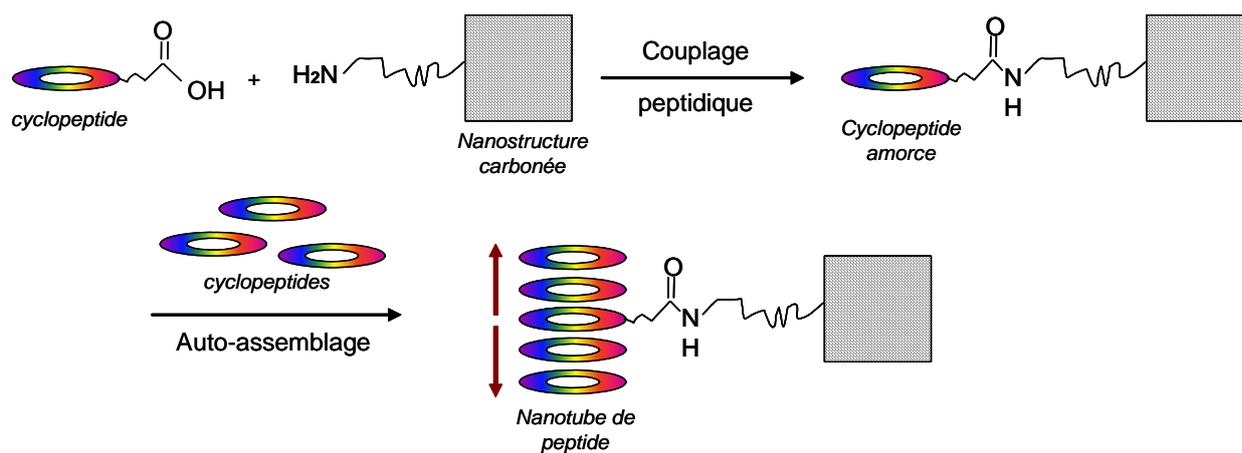


Schéma I-7 : Représentation schématique du projet matériaux hybrides nanotube de peptide et nanostructure carbonée.

2. Schéma de synthèse.

La stratégie de synthèse choisie repose sur un schéma général de fonctionnalisation de la résine de chlorure de 2-chlorotriptyl, de couplages successifs alternant des D-Alanine (Ala) et des acides aminés L différents selon le cyclopeptide choisi. Après déprotection de la chaîne principale, la cyclisation est effectuée et le peptide est alors clivé de la résine. Ces différentes étapes sont présentées détaillées dans le **Schéma I-8**.

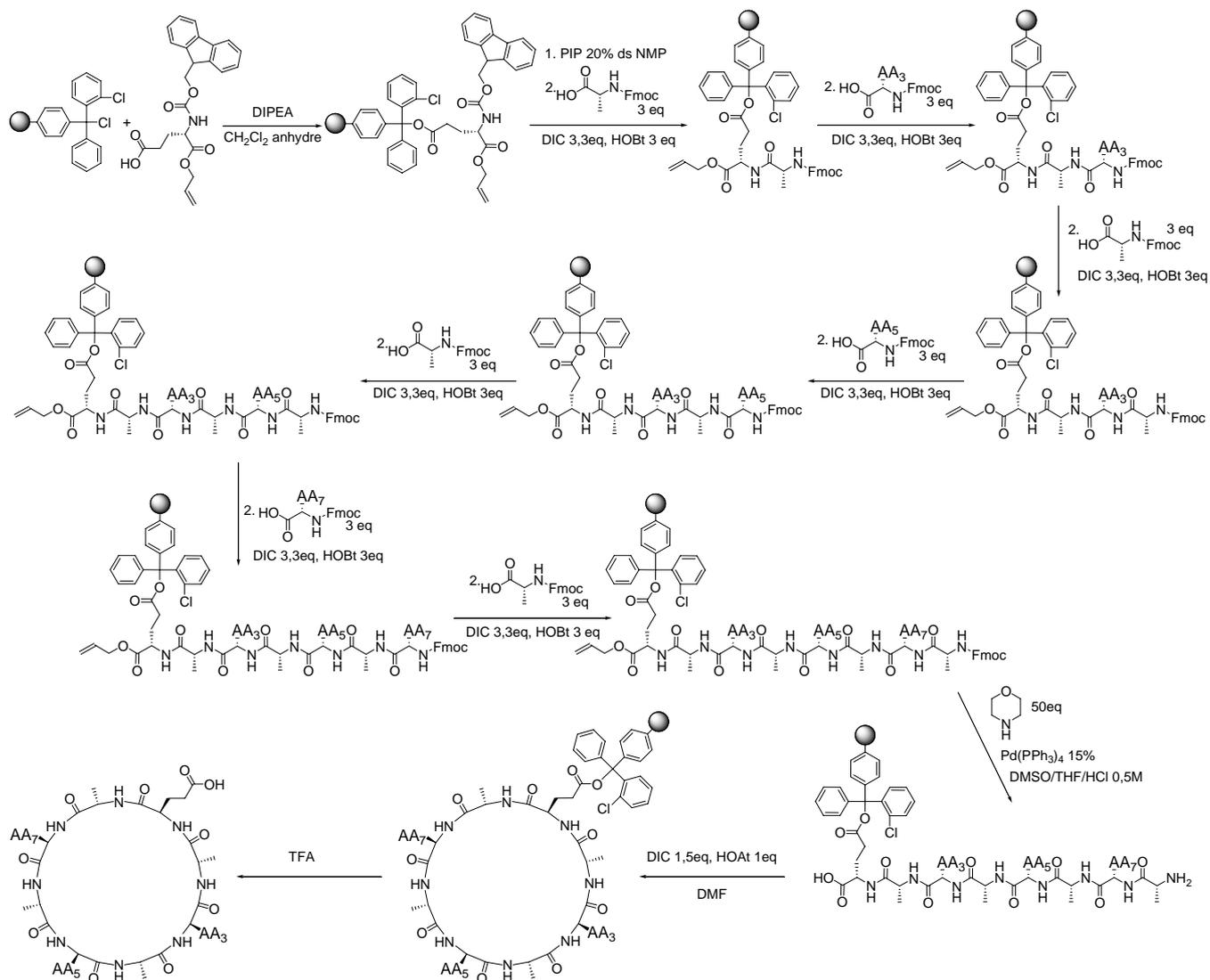


Schéma I-8 : Synthèse totale des cyclo[-D-Ala-Glu-D-Ala-AA₃-D-Ala-AA₅-D-Ala-AA₇-]

La référence donnée par Ghadiri renvoie à la description de la synthèse peptidique utilisant la stratégie Boc sur support solide pour un tout autre peptide que celui souhaité.⁶ Il a donc fallu envisager une nouvelle voie de synthèse en série Fmoc du cyclo[-(D-Ala-Gln-D-Ala-Glu)₂-] et de ses analogues.

Les différents cyclopeptides décrits ensuite utiliseront la même voie de synthèse. La description des étapes communes est présentée ici.

3. Fonctionnalisation de la résine.

La première étape consiste à fixer le premier acide aminé sur la résine. Le choix de la résine est dépendant du type de fonction à immobiliser et de la stratégie Boc ou Fmoc choisie.

Pour les synthèses qui nous intéressent en série Fmoc, la résine de chlorure de 2-chlorotrityle a été sélectionnée pour la fixation de la fonction carboxylique. (**Schéma I-9**)

La résine choisie permet la fixation d'acides aminés comportant une fonction acide. Fixer le premier acide aminé par sa chaîne latérale permet d'envisager la cyclisation sur support solide. En effet, la cyclisation semble moins problématique sur support solide qu'en solution car les réactions intermoléculaires sont bien plus réduites.

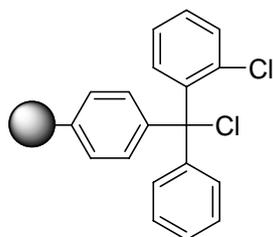


Schéma I-9 : Représentation schématique de la résine de chlorure de 2-chlorotrityle.

Cette résine a un taux de chargement plus élevé que la moyenne des résines mais cette valeur est modulable lors de cette première étape par l'introduction de méthanol qui va piéger les motifs chlorure de trityle restant.

Cette réaction est une étape de substitution nucléophile d'un acide carboxylique sur un chlorure. (**Schéma I-10**) L'acide glutamique choisi est le Fmoc-Glu(OH)-OAll.

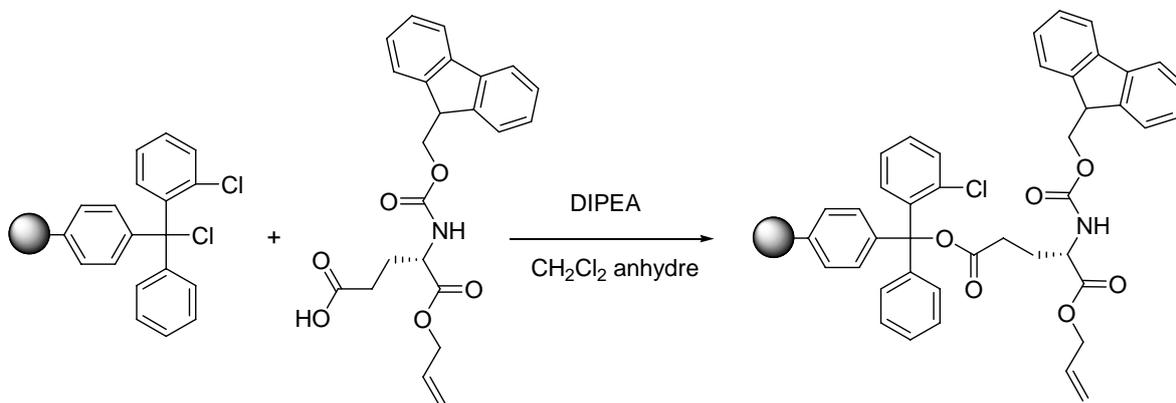


Schéma I-10 : Greffage du premier acide aminé sur la résine de chlorure de 2-chlorotrityle.

L'utilisation d'un fort taux de chargement permet de greffer sur une faible quantité de résine un grand nombre de peptide. Par contre, cela pose deux problèmes majeurs. La cyclisation est difficile du fait des encombrements stériques entre les chaînes sur la même bille ce qui augmente les réactions intermoléculaires. Le second est que le clivage est d'autant

plus difficile que l'accès au cœur est obstrué. Le rendement de clivage est alors trop faible. Il faut alors choisir de travailler avec un plus faible « Loading ».

4. Couplage peptidique.

L'utilisation de la NMP est ici préférée au DMF (qui est le solvant le plus couramment utilisé pour ce type de réaction) car c'est un solvant plus stable, qui contient moins d'impuretés.

Comme conditions de couplage, on utilise un carbodiimide, le DIC accompagné d'HOBt pour réaliser ces réactions. Le DCC est l'agent de couplage le plus populaire pour des couplages peptidiques classiques. Cependant, son utilisation est déconseillée dans la synthèse sur support solide utilisant la NMP car il se forme en cours de réaction de la dicyclohexylurée qui est insoluble.

L'HOBt est un excellent nucléophile et un excellent groupe partant. Le mécanisme met très probablement en jeu un intermédiaire d'ester de benzotriazole qui se substitue à l'ester précédent et permet l'attaque nucléophile de l'amine pour donner lieu au couplage.

(Schéma I-11)

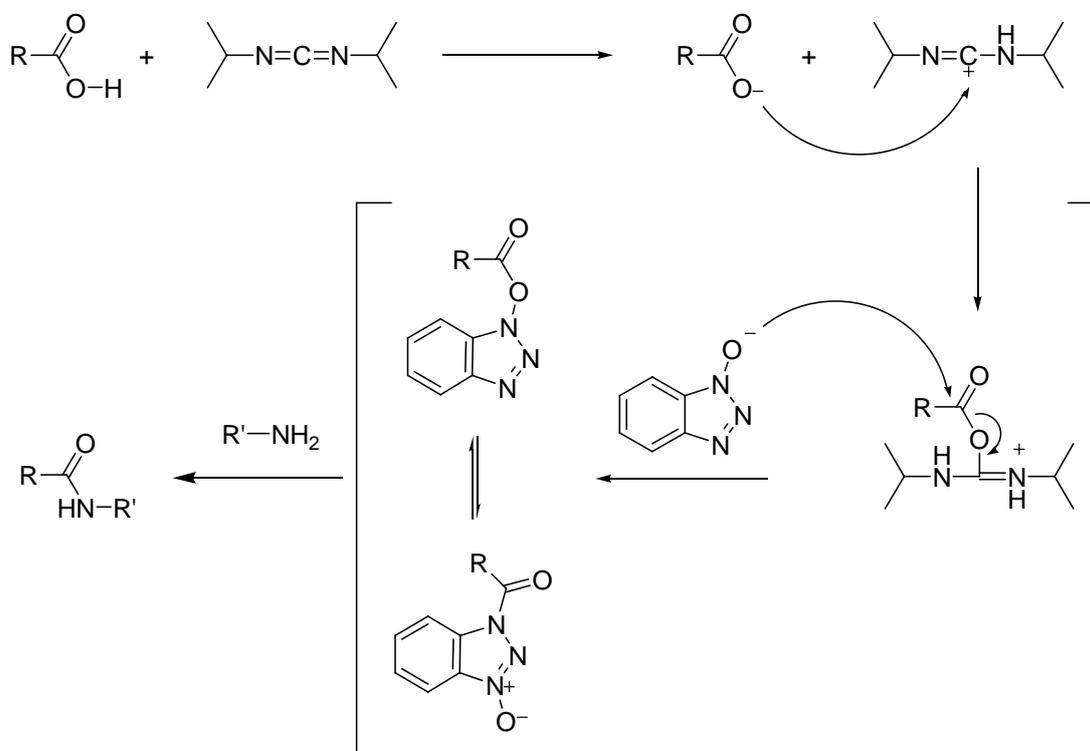


Schéma I-11 : Mécanisme proposé de réaction peptidique en présence de DIC et d'HOBt.

5. Tests de suivi de réaction.

Les techniques d'analyses classiques tels que la RMN¹H du liquide ou la LC/MS pour suivre l'avancée des réactions seraient dans le cas de la synthèse sur support solide trop longues dans la mesure où il faut cliver le peptide de sa résine pour réaliser ces analyses. Ainsi, pour gagner du temps, des tests sont utilisés pour suivre l'avancée des déprotections et des couplages.

a. Test UV permettant de suivre la déprotection de la fonction amine.

La déprotection de l'amine à l'aide d'une solution de pipéridine à 20 % dans la NMP donne un produit qui absorbe en UV à une longueur d'onde de 290 nm. (**Schéma I-12**)

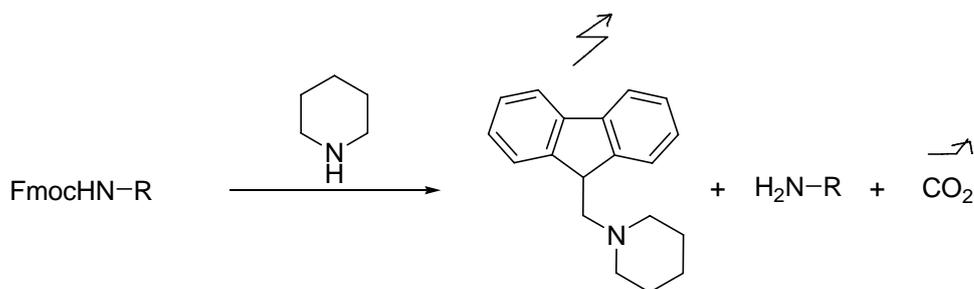


Schéma I-12 : Déprotection de la fonction amine.

La déprotection du Fmoc est suivi par UV à 290 nm.

Le mécanisme consiste en la formation d'un carbanion par l'intermédiaire de la base qui va se réarranger spontanément en alcène et libérer la chaîne peptidique qui par décarboxylation va donner l'amine primaire attendue. L'alcène non stable va être réattaqué par la base pour donner le produit que l'on observe en UV. (**Schéma I-13**)

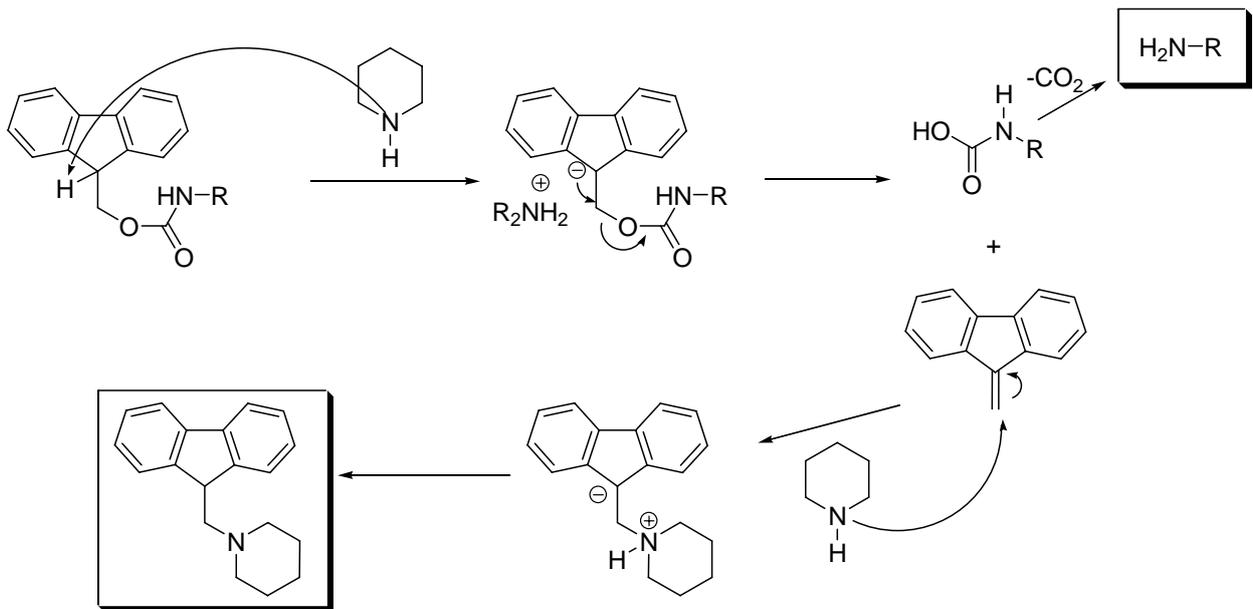


Schéma I-13 : Mécanisme de déprotection de la fonction amine.

b. Suivi de réaction de couplage par test de Kaiser.

Des tests permettant de suivre en temps réel la réaction de couplage ont été utilisés afin de permettre une synthèse rapide du peptide sur support solide. Le test que l'on utilise ici, appelé test de Kaiser⁷, permet de détecter la présence d'amine libre sur les billes de résine et ainsi l'avancement de la réaction. Le principe consiste à faire réagir les amines primaires présentes dans le milieu avec de la ninhydrine pour donner la formation d'un produit, le Rhemann's blue qui a la particularité d'avoir une couleur caractéristique dans le bleu. (**Schéma I-14**) Ainsi, si les billes restent incolores, on peut considérer que la réaction est terminée.

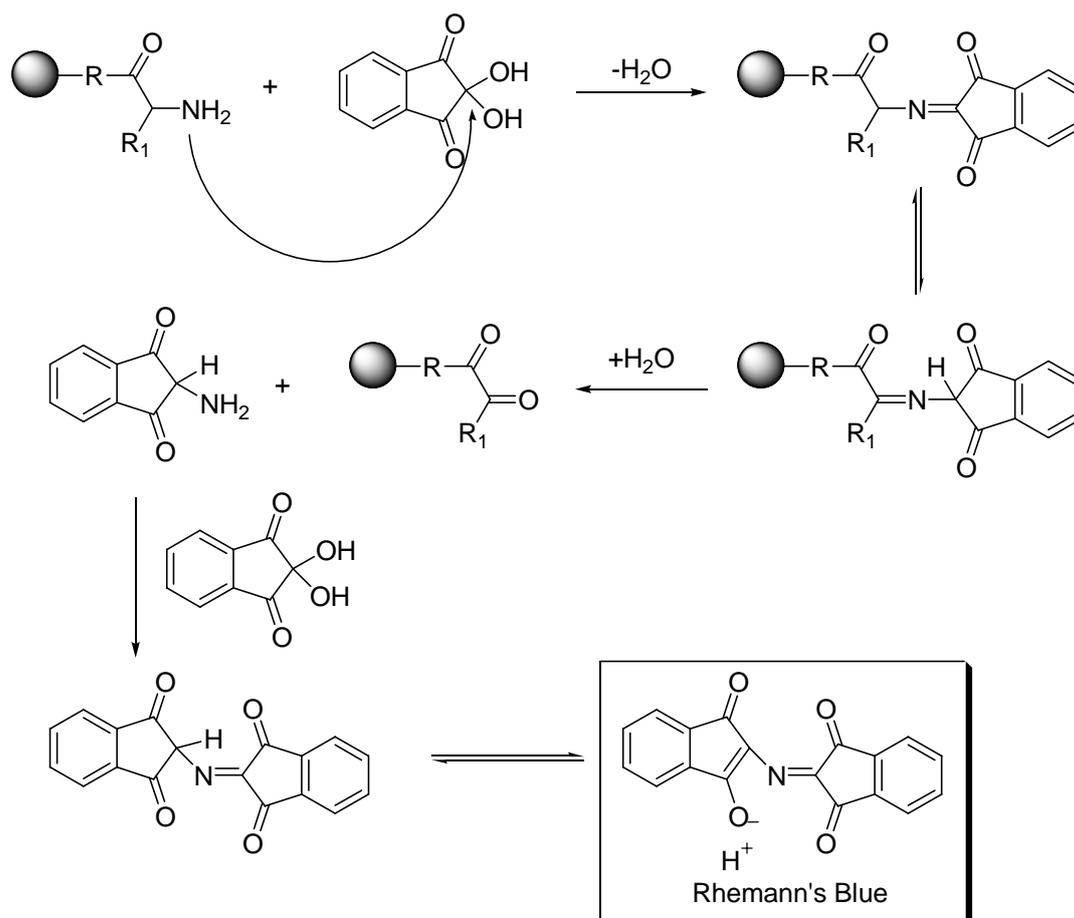


Schéma I-14 : Mécanisme du test de Kaiser sur la résine contenant une fonction amine primaire.

6. Les groupements protecteurs.

Le choix du bon groupement protecteur est régi par la stratégie employée. Pour la série Fmoc choisie ici, les groupements protecteurs employés pour les chaînes latérales doivent être conservés lors de la déprotection du *N*-terminal. En revanche, ils sont sélectionnés pour être clivés en même temps que le cyclopeptide de la résine, évitant un trop grand nombre d'étapes dans la synthèse. Puisque le clivage de la résine de chlorure de 2-chlorotrityle est effectué en milieu acide, les groupements choisis sont du type trityle et tert-butyle.

En ce qui concerne le premier acide aminé, l'ester allylique, groupement protecteur de la fonction acide carboxylique de la chaîne principale, est choisi pour être stable dans les conditions de synthèse, de plus, sa déprotection n'altère pas le reste du peptide.

Ce groupement est hydrolysé en présence d'un nucléophile, la morpholine, et à l'aide d'un catalyseur au palladium (0), le palladium tétrakis triphényle phosphine ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$).⁸ (**Schéma I-15**)

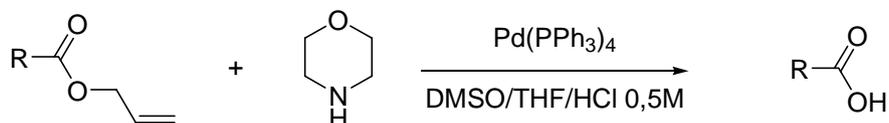


Schéma I-15 : Déprotection de l'ester allylique.

La réaction consiste à former un intermédiaire π -allyl par l'action du palladium (0) sur l'ester allylique, permettant la condensation d'une amine secondaire, la morpholine pour conduire à l'acide carboxylique recherché. (**Schéma I-16**)

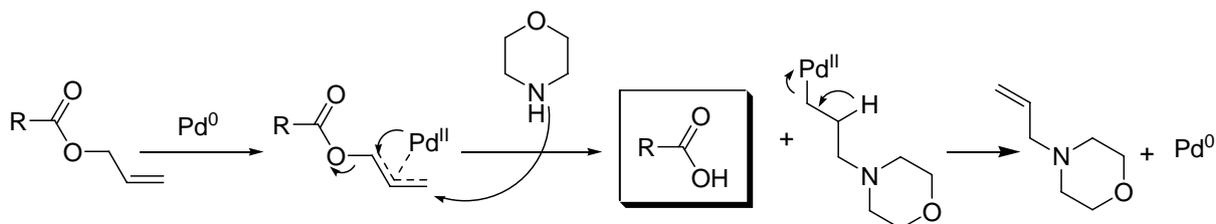


Schéma I-16 : Mécanisme de la déprotection de l'ester allylique.

Enfin, le peptide linéaire est obtenu déprotégé en position O terminale et en N terminale par une étape commune. En effet, la morpholine, du fait de sa structure voisine de la pipéridine, déprotège le NH-Fmoc. On s'affranchit alors d'une étape supplémentaire.

7. Cyclisation.

Le choix de la réaction de cyclisation n'est pas généralisable et dépend étroitement du type de peptide à cycliser. Il est possible de réaliser cette étape en solution, mais il faut alors que la solution soit très diluée afin d'éviter les réactions intermoléculaires, ce qui demande des quantités de solvants très importantes. En revanche, la cyclisation sur support solide permet de réaliser des cyclisations en milieu très concentré sans craindre de réactions intermoléculaires. L'utilisation des sels de phosphonium ou d'uronium est la plus courante pour cette étape.

8. Clivage de la résine.

Le clivage de la résine et les déprotections des chaînes latérales sont réalisés en milieu acide, généralement le TFA. Les conditions de clivage sont optimales lorsque l'on ajoute au TFA 3% de TIS (Triisopropylsilane) et 3% d'eau. Le TIS sert à piéger les carbocations qui se forment lors du clivage des groupements trityles et tertio-butyles qui réagissent facilement avec les aromatiques, les amines et alcools.

9. Conclusion.

La synthèse sur support solide en série Fmoc a été choisie pour la réalisation des cyclopeptides. Même si les étapes sont en général identiques à la synthèse que l'on vient de détailler, des difficultés ont été rencontrées. Le chapitre suivant détaille les différents cyclopeptides synthétisés au cours de la thèse.

III. Description des synthèses de cyclopeptides.

1. Le cyclo[(-D-Ala-Glu-D-Ala-Gln)₂-] [1].

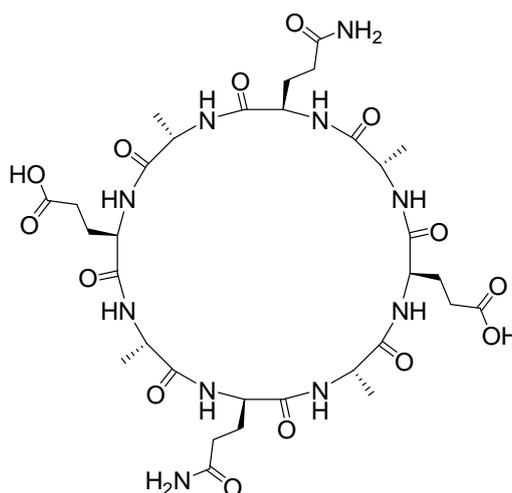


Schéma I-17 : Structure semi-développée du cyclo[(-D-Ala-Glu-D-Ala-Gln)₂] [1].

a. Synthèse.

Après 7 couplages successifs avec des acides aminés contenant des groupements protecteurs sur les chaînes latérales adéquats aux conditions de réactions, fonctions trityles pour les amides des Gln et fonction ter-butyle pour la seconde fonction acide des Glu et l'utilisation d'Ala sous la forme D, on obtient le peptide linéaire recherché avec un rendement de 90% (déterminé par LC/MS et RMN¹H).

Cependant, il a été observé que les couplages avec les Gln posent parfois des problèmes en cours de réaction. En effet, soit l'encombrement stérique autour de l'acide diminue la cinétique de réaction, soit le problème vient du test de Kaiser. Il a été observé par clivage et analyse en LC/MS que la réaction de couplage était bien terminée alors que certaines billes devenaient bleues, laissant supposer la présence d'amines libres. On trouve ce type de problème dans la littérature mais le plus souvent avec des acides aminés contenant des fonctions amines sur leur chaîne latérale, comme la lysine mais également dans le cas de l'arginine. Le problème doit être similaire dans le cas des glutamines utilisées.

La réaction de déprotection des N et O terminaux a permis d'obtenir le peptide linéaire avec un rendement de 90%.

La cyclisation s'est révélée très délicate. En effet, plusieurs paramètres ont du être optimisés afin d'obtenir une cyclisation avec un taux de conversion convenable.

Tout d'abord, le sel d'uronium HATU a été utilisé en présence de DIEA.⁹ Sur petite échelle, et quelque soit le loading de la résine, les résultats ont montré un taux de conversion quantitatif. Sur des quantités plus importantes, le temps de réaction étant plus long, des réactions secondaires sont apparues. (**Schéma I-18**) De plus, ces expériences se sont avérées dépendantes du lot d'HATU utilisé.

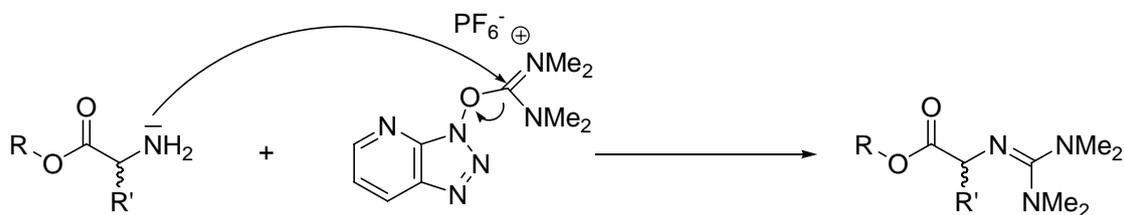


Schéma I-18 : Réaction secondaire observée lors de couplage avec l'HATU.

D'autres agents de couplage ont alors été testés comme le BOC, le PyBOP, le PyAOP et le DIC. Le DIC associé à l'HOAt en solution dans le DMF a donné les meilleurs résultats

avec un rendement de 50%. Le cyclopeptide **[1]** est alors obtenu avec un rendement global de 40%.

Il faut également noter que l'utilisation de DMF fraîchement distillé sur MgSO_4 semblerait provoquer la décomposition du DMF en diméthyle amine par chauffage sous vide. Ce qui entraîne une réaction secondaire à la cyclisation. (**Schéma I-19**) Cette réaction secondaire consiste en la condensation de la diméthyle amine sur l'acide carboxylique conduisant à la formation de l'amide correspondant, ce qui empêche alors la cyclisation d'avoir lieu. Il faut donc utiliser du DMF anhydre, dégazé sous vide afin d'éliminer la diméthyle amine qui est très volatile.

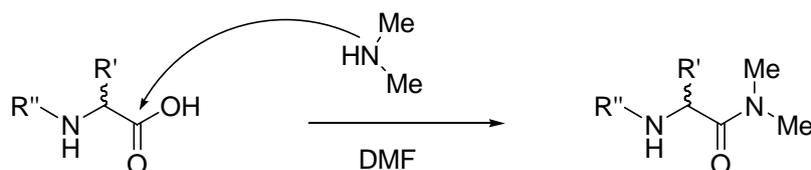


Schéma I-19 : Réaction secondaire observée avec du DMF fraîchement distillé.

b. Purification.

Si la synthèse de ce cyclopeptide n'est pas décrite dans la littérature, la purification l'est en revanche.¹ C'est un traitement acido basique qui permet d'isoler le cyclopeptide **[1]** avec une pureté supérieure à 90 % (déterminée par RMN^1H avec étalon interne). Le principe consiste à solubiliser le peptide **[1]** en milieu alcalin et les impuretés non solubles sont éliminées par centrifugation. Le passage en milieu acide permet la précipitation du cyclopeptide **[1]** et l'élimination des impuretés solubles.

c. Caractérisations.

i. RMN^1H et LC/MS.

La RMN^1H est réalisée en milieu alcalin deutéré car le peptide **[1]** est alors soluble. Le nombre de signaux observé est limité par la symétrie C2 de la molécule. La RMN^1H permet également de déterminer la teneur en peptide dans la poudre de cyclopeptide **[1]** à l'aide d'un étalon interne, le para nitrophénol. La teneur en peptide représente la proportion peptidique contenue dans la poudre par rapport aux composés non peptidiques tels que l'eau, les solvants absorbés, les contre-ions ou les sels.

Le pH de la solution ne doit pas être trop basique afin d'éviter les épimérisations possibles. Ce phénomène est observé par RMN ^1H en fonction du temps. Le massif des $\text{CH}\alpha$ tend à diminuer significativement à un pH supérieur à pH 10 par échange de proton avec les deutériums présents dans le milieu. L'intégration du massif ne correspond plus alors aux 8 protons attendus.

La LC/MS permet non seulement de vérifier que le produit attendu est présent mais également de s'assurer qu'il n'y a pas d'autres peptides.

ii. Solubilité.

Une fois le peptide [1] obtenu, des tests de solubilisation ont été réalisés et ont montré que le peptide propre (pureté et teneur en peptide > 90 %) est totalement insoluble dans la majorité des solvants organiques classiques. Le cyclopeptide n'est soluble qu'en milieu alcalin aqueux.

d. Conclusion.

La synthèse sur support solide a permis d'obtenir le cyclopeptide [1] en un nombre limité d'étape.

Toutefois, les difficultés rencontrées lors de la cyclisation ont montré que cette réaction constitue l'étape limitante.

2. Le cyclo[-D-Ala-Glu-(D-Ala-Gln)₃-].

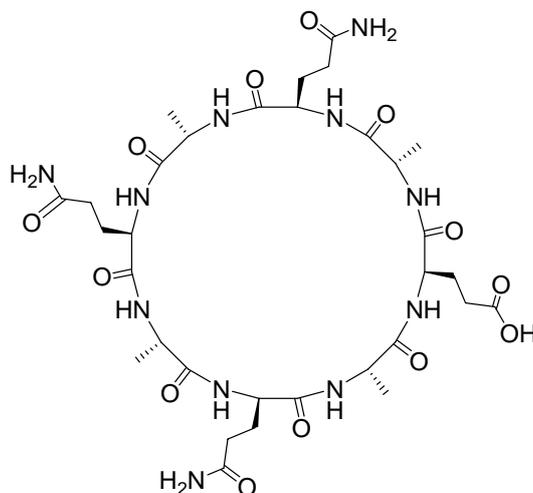


Schéma I-20 : Structure semi-développée du cyclo[-(D-Ala-Glu-(D-Ala-Gln)₃-] [2].

a. Description générale du cyclopeptide.

Le cyclopeptide [2] est conçu pour constituer l'amorce du nanotube de peptide et pour être couplé à la nanostructure carbonée. En effet, grâce au remplacement d'un Glu par un Gln, un seul point d'ancrage est possible pour la nanostructure carbonée.

Ce cyclopeptide n'est pas décrit dans la littérature mais la modification choisie ne devrait pas modifier le schéma de synthèse. (**Schéma I-20**)

De plus, cette modification ne devrait pas perturber l'auto-assemblage puisque son analogue le *cyclo[-(D-Ala-Gln)₄-]*¹⁰ est décrit comme s'auto-assemblant en nanotubes.

b. Synthèse et purification.

La synthèse de ce cyclopeptide [2] a été conçue de la même manière que le cyclopeptide [1] dans la mesure où juste l'acide aminé AA₅ a été changé. Cette fois également le Gln est protégé par une fonction trityle. Cette position ne modifie pas les conditions de cyclisation et le DIC reste alors le meilleur agent de couplage pour cette étape. Le cyclopeptide [2] est obtenu avec un rendement global de 45%.

La purification est également identique au peptide [1], ce qui montre alors que les propriétés d'assemblage, en fonction du pH, sont conservées avec une seule fonction acide carboxylique sur le squelette.

Les tests de solubilisation révèlent que ce peptide n'est pas plus soluble dans les solvants organiques classiques.

c. Conclusion.

Un second cyclopeptide a été obtenu par une synthèse identique à la stratégie précédente. Mais, les problèmes de solubilités vont probablement se poser pour le couplage peptide, nanostructure carbonée et des stratégies pour les contourner vont devoir être utilisées.

3. Le cyclo[(-D-Ala-Lys-D-Ala-Gln)₂-].

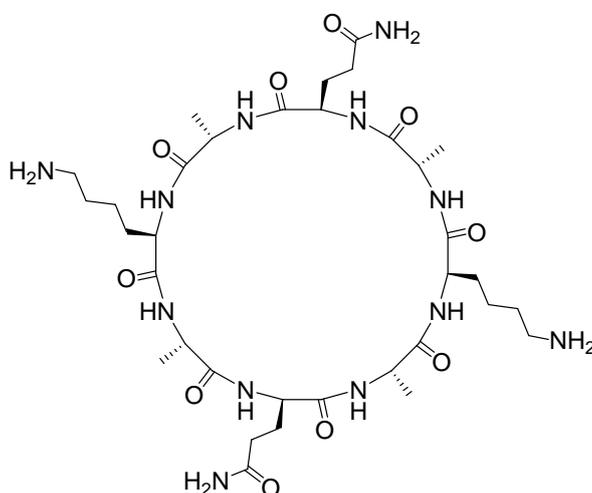


Schéma I-21: Structure semi-développée du cyclo[(-Gln-D-Ala-Lys-D-Ala)₂-] [3].

a. Description générale.

Le cyclopeptide [3] est également décrit dans la littérature.¹¹ (Schéma I-21) Il a été mis en jeu dans des réactions de couplages dans le DMF. Le couplage du cyclopeptide avec la nanostructure carbonée est donc envisageable.

b. Synthèses.

La synthèse de ce peptide est légèrement différente des synthèses précédentes car la cyclisation doit être réalisée en solution et non sur support solide. En effet, c'est la fonction

acide carboxylique à greffer sur la résine qui doit participer à la cyclisation. La description détaillée est présentée dans le **Schéma I-22**.

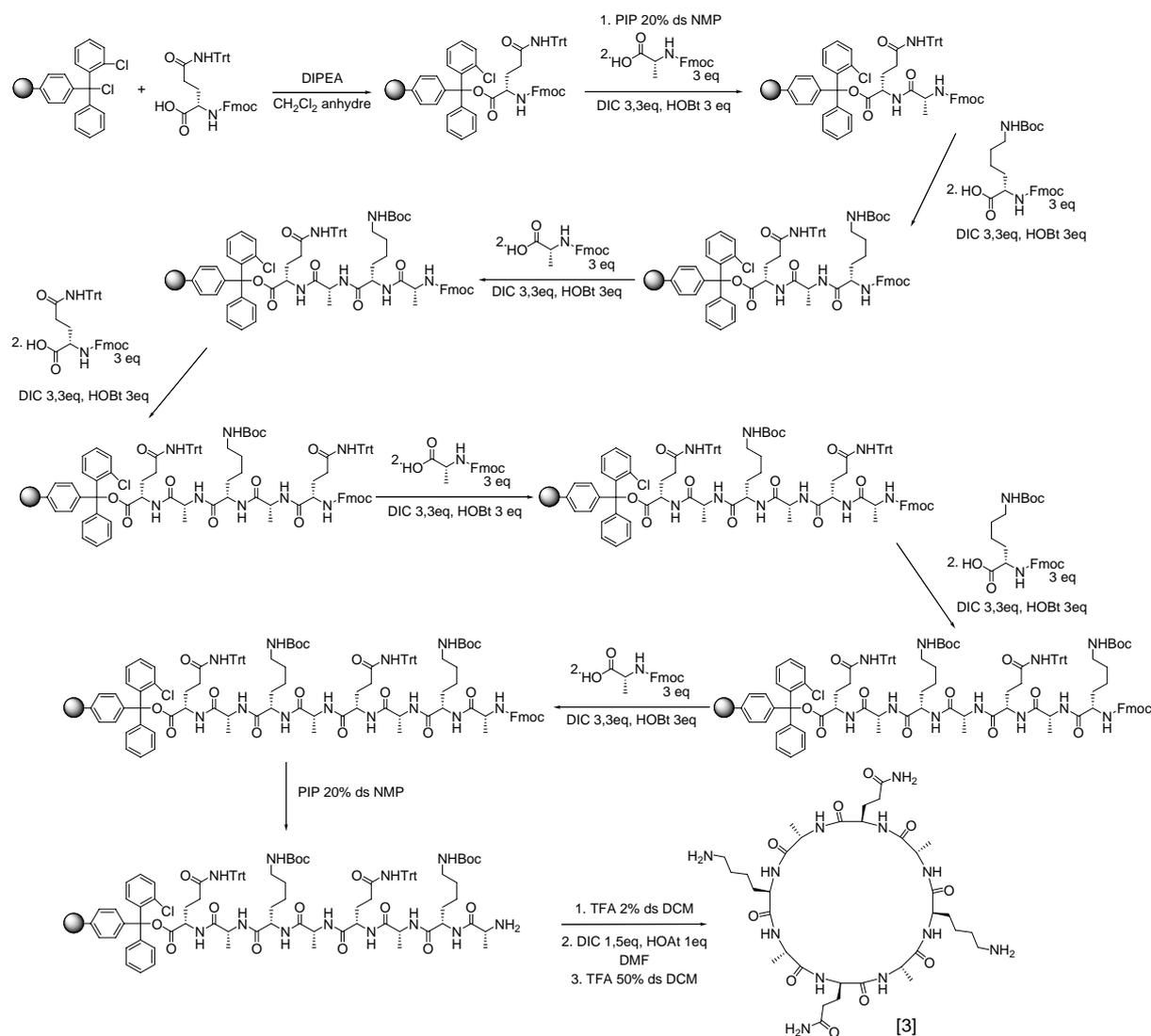


Schéma I-22 : Synthèse totale du cyclopeptide **[3]**.

La première étape de fonctionnalisation est réalisée à l'aide d'un acide aminé le Fmoc-Gln(NHTrt)-OH dont le point d'ancrage sur la résine est situé sur la chaîne principale, la chaîne latérale étant protégée. Le taux de chargement a peu d'importance car la cyclisation est réalisée en solution. Cependant, afin de permettre un clivage optimal, un faible « Loading » est utilisé.

La synthèse du peptide linéaire est ensuite identique à celle des précédents peptides. La déprotection de la fonction Fmoc du dernier acide aminé est nécessaire dans ce cas et le clivage de la résine est réalisé dans des conditions plus douces (2% de TFA dans la NMP) pour ne pas modifier les groupements protecteurs présents sur les chaînes latérales.

La cyclisation est réalisée en solution à froid en milieu très dilué et l'HATU en présence de HOAt et DIEA est préféré au DIC. La cinétique de réaction étant très rapide, les réactions secondaires ne sont pas observées. Le cyclopeptide [3] est obtenu avec un rendement global de 60%.

Une simple précipitation permet alors de purifier le peptide, jouant sur le fait que le peptide linéaire est soluble dans le méthanol alors que le cyclopeptide ne l'est pas.

En revanche, un problème important se pose alors dans la mesure où le peptide obtenu est sous forme de di-sel de trifluoro acétate dû aux deux amines des chaînes latérales des Lysines. En effet, le pKa des lysines est de 10, ce qui sous entend de neutraliser à pH très basique. Or, à ce pH, les racémisations sont probables.

Une neutralisation rapide et à froid a été réalisée. Le cyclopeptide obtenu est alors parfaitement soluble dans l'eau.

Sa caractérisation est en cours au laboratoire.

c. Conclusion.

La synthèse du cyclopeptide [3] a été réalisée. La caractérisation de ce composé n'a pas encore pu être réalisée.

4. Les cyclo[(-D-Phe-Glu-D-Phe-Gln)₂-] et cyclo[-D-Phe-Glu-(D-Phe-Gln)₃-].

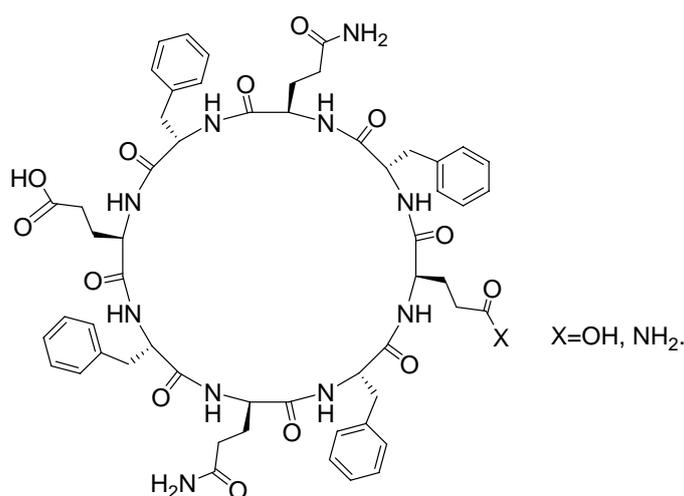


Schéma I-23: Structures semi-développées des cyclo[(-Gln-D-Phe-Glu-D-Phe)₂-] [4] (pour X=OH) et cyclo[-Glu-D-Phe-(Gln-D-Phe)₃-] [5] (pour X=NH₂).

a. Description générale des cyclopeptides.

Ces deux cyclopeptides [4] et [5] ont été conçus pour être plus soluble en milieu organique. (**Schéma I-23**) La présence des D-Phe à la place des D-Ala devrait permettre une meilleure solubilisation dans des solvants organiques.

Ils ne sont pas décrits dans la littérature mais au même titre que le cyclopeptide [2] (avec des D-Ala), leur auto-assemblage devrait être possible par analogie avec le *cyclo*[-(D-Phe-Gln)₄-].

b. Synthèse.

Les synthèses de ces deux cyclopeptides utilisent le même schéma réactionnel que celui du cyclopeptide [1]. Une fois encore, la cyclisation s'est révélée très délicate et aucune condition faisant varier l'agent de couplage n'a permis de réaliser cette étape avec une bonne conversion.

De plus, des tests réalisés sur des peptides non purifiés ont montré que ces cyclopeptides n'étaient pas solubles dans les solvants organiques.

c. Conclusion.

La synthèse de ces deux cyclopeptides a été problématique à cause de l'étape de cyclisation et ils n'ont pu être obtenus en quantité suffisante pour être purifiés. Les tests de solubilisation ont montré que ces peptides n'étaient pas plus intéressants que les précédents pour la réalisation des matériaux hybrides.

5. Les cyclo[(-D-Ala-Glu-D-Ala-Gln)₂-D-Ala-Glu-] et cyclo[-(D-Ala-Glu-D-Ala-Gln)₃-].

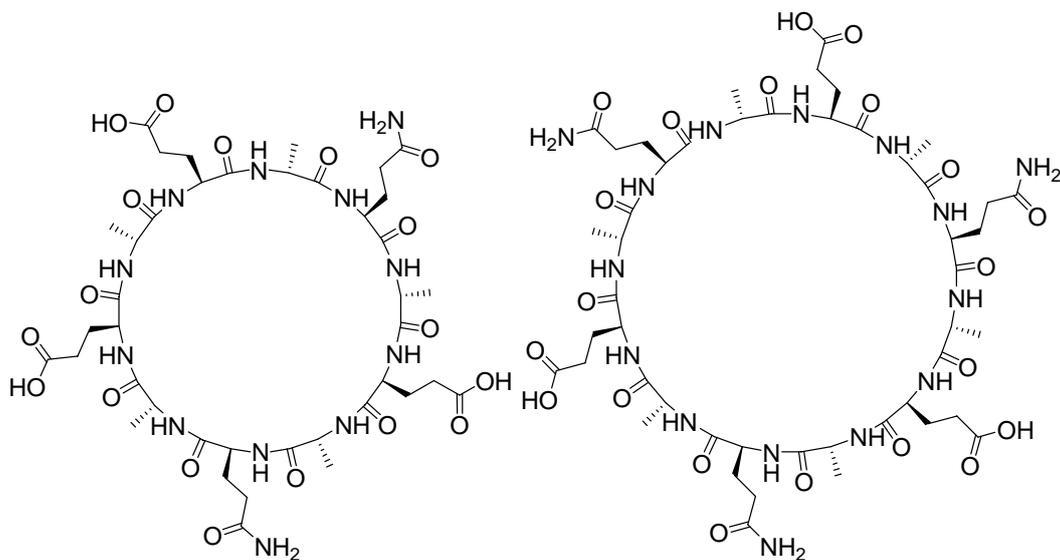


Schéma I-24: Structures semi-développées du cyclo[(-D-Ala-Glu-D-Ala-Gln)₃-] [6] et du cyclo[(-D-Ala-Glu-D-Ala-Gln)₂-D-Ala-Glu-][7].

a. Description générale des cyclopeptides.

Afin d'envisager la construction de matériaux hybrides ayant des diamètres de nanotubes de peptides différentes, ces deux cyclopeptides ont été synthétisés. (**Schéma I-24**) Leur séquence comprend encore trois Glu dont les chaînes latérales pourront être protonés ou salifiés pour contrôler l'assemblage et permettront le couplage avec la nanostructure carbonée.

Le cyclopeptide [7] constitué de 12 acides aminés est décrit dans la littérature comme s'auto-assemblant en nanotubes. En revanche, le cyclopeptide [6] constitué de 10 acides aminés ne l'est pas. Il est de taille intermédiaire entre le cyclopeptide [1] à 8 acides aminés et le [7] à 12 acides aminés, ce qui laisse penser que son auto-assemblage est possible.

b. Synthèse.

Les synthèses de [6] et [7] sont identiques à celle du cyclopeptide [1] et l'étape de cyclisation est réalisé à l'aide de DIC en présence d'HOAt avec de bons rendements. De même que les précédents, ces deux cyclopeptides sont insolubles et leur purification ne

pouvait être envisagée que par traitement acido basique. Or, l'épimérisation lors de cette étape a été dans les deux cas telle que la purification n'a pu avoir lieu.

c. Conclusion.

La synthèse de ces deux cyclopeptides [6] et [7] a été réalisée avec succès et a permis d'obtenir les produits attendus mais les échecs de purifications n'ont pas permis de les utiliser par la suite.

6. Le cyclo[-(D-N^{Me}-Ala-Glu-D-N^{Me}-Ala-Gln)₂].

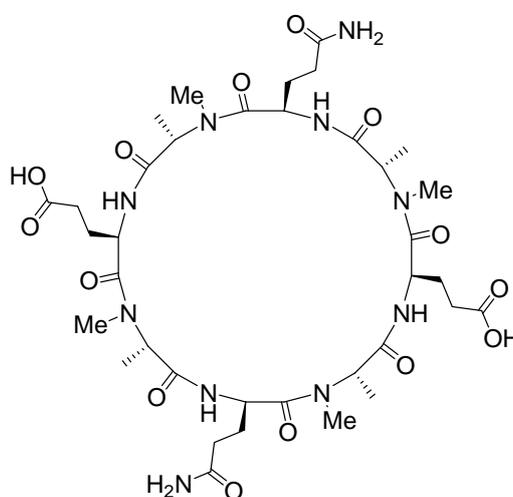


Schéma I-25 : Structure semi-développée du cyclo[-(D-N^{Me}-Ala-Glu-D-N^{Me}-Ala-Gln)₂].

a. Description générale du cyclopeptide.

Le cyclopeptide [8] décrit ici est quasi-identique au cyclopeptide [1] mais l'ensemble des D-Ala a été N-méthylé. (**Schéma I-25**) Cette modification devrait avoir une conséquence sur la solubilisation du cyclopeptide car l'assemblage sous forme de dimère de cyclopeptides analogues est décrit comme soluble (dans le DMF entre autre). Il est alors possible d'envisager d'utiliser ce peptide dans l'étape de couplage avec la nanostructure carbonée. Par la suite, l'utilisation du peptide [1] permettrait de conserver l'aspect nanotube pour un matériau hybride. (**Schéma I-26**)

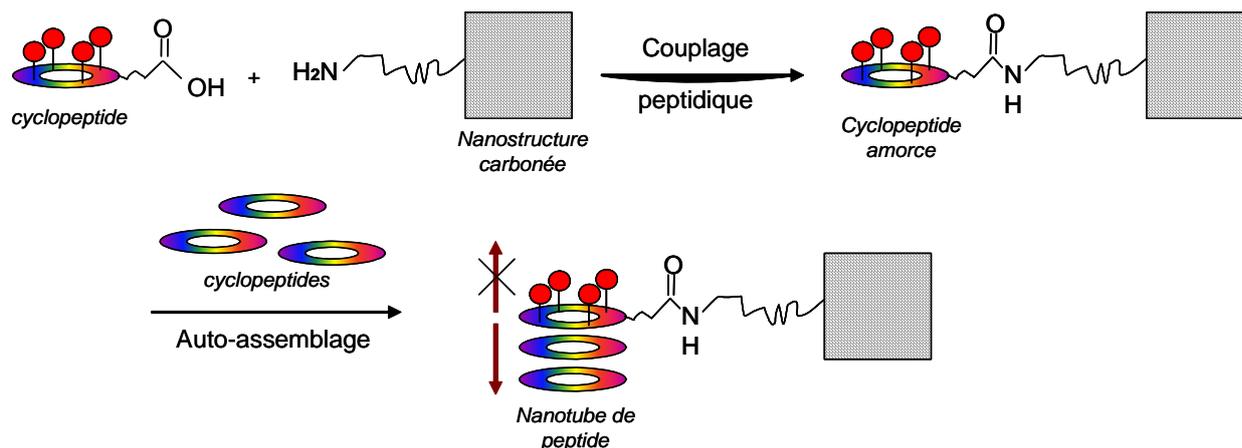


Schéma I-26 : Représentation schématique de la stratégie envisagée.

b. Synthèse.

Lors de la cyclisation, les agents de couplages tels que le DIC, l'HATU, le BOC, le PyBOP ou le PyAOP n'ont pas permis à la réaction d'avoir lieu dans de bonnes conditions. En effet, l'utilisation d'acide aminé *N*-méthylé rend la cyclisation plus difficile. Le PyBrOP est alors utilisé comme agent de couplage pour ce type de réaction, puisqu'il présente une plus grande réactivité. Malheureusement, la cyclisation du peptide **[8]** n'a pas été possible avec cet agent de couplage.

c. Conclusion.

La synthèse du cyclopeptide **[8]** a été envisagée selon la méthode générale. La cyclisation n'a pas été possible. La présence d'un D-Ala *N*-Méthylé au voisinage de la liaison peptidique à former peut en être la raison. L'encombrement stérique empêcherait la réaction de couplage avec la nanostructure carbonée d'avoir lieu.

7. Conclusions.

La synthèse de 8 cyclopeptides capables de s'auto-assembler en nanotubes a été entreprise. Une stratégie sur support solide a permis d'obtenir rapidement les cyclopeptides **[1]**, **[2]**, **[3]**, **[6]** ou **[7]**. En revanche, l'étape de cyclisation a été un échec pour les cyclopeptides **[4]**, **[5]** et **[8]**. La purification de ces premiers composés a été un obstacle pour

l'obtention des cyclopeptides [6] et [7], et seuls sont utilisables les cyclopeptides [1], [2] et [3].

Enfin, et afin de mener à bien le projet de nouveaux matériaux hybrides, les problèmes de solubilités de ces composées vont devoir être résolus pour une réaction de couplage avec la nanostructure carbonée en solution.

IV. Caractérisation de l'auto-assemblage.

1. Introduction

Avant de coupler les cyclopeptides synthétisés sur une nanostructure carbonée, il est indispensable de vérifier et analyser leurs propriétés d'auto-assemblage.

Dans ce chapitre, nous décrirons les différentes techniques utilisées pour caractériser ces auto-assemblages ainsi que les résultats obtenus.

2. Caractérisations possibles (ATR, TEM, SAXS, Diffusion de la lumière)

a. ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection-Fourier Transform InfraRed spectroscopy).

L'infrarouge permet de vérifier la présence ou non de liaisons hydrogène entre les bagues. Cette technique permet également d'identifier si ces liaisons hydrogène font parties de feuillets β antiparallèles. Pour cela, on analyse la zone caractéristique des groupements amides entre 1500 et 1800 cm^{-1} . La position des bandes d'absorption indique le type de liaisons hydrogène engagé dans l'organisation. Les feuillets β antiparallèles donnent deux bandes amides I à 1628 et 1736 cm^{-1} correspondant aux vibrations des carbonyles (C=O) et une bande amide II à 1540 cm^{-1} correspondant aux vibrations (N-H). De plus, l'observation d'une bande d'élongation NH à 3277 cm^{-1} laisse supposer la formation d'un réseau étroit de liaisons hydrogène entre les bagues. On a alors une forte indication de la formation de nanotubes grâce à cette analyse.

b. MET (Microscopie Electronique à Transmission).

Cette technique permet de « voir » les nanotubes avec une résolution allant jusqu'à l'ordre de la dizaine de nanomètres aux plus forts grossissements. L'image obtenue résulte de la déviation des électrons lors de leur passage à travers l'objet. Cela sous-entend d'observer des objets qui diffractent sinon les électrons ne sont pas déviés. Des astuces permettent tout de même de voir les composés organiques par coloration de la surface à l'aide de produits (acétate d'uranyle...) faisant dévier le faisceau d'électron.

c. Diffusion de la lumière.

Cette technique d'analyse donne des informations quant à la taille des objets présents dans une solution. Il est toutefois important de noter que les résultats dépendent d'un facteur de forme. En effet, l'analyse utilise les informations données par la déviation de la lumière provoquée par les objets présents en solution et calcule la taille correspondante. Ce calcul suppose que les objets observés sont sphériques. Or, cette supposition est fautive dans notre cas puisque l'on a des nanotubes. On peut tout de même avoir des informations sur les gammes de tailles présentes en solution.

d. SAXS (Small Angle X-ray Scattering).

L'information donnée ici concerne les cristaux de nanotubes et le comportement des nanotubes entre eux. L'analyse permet de donner une information sur l'organisation cristalline et les paramètres de mailles.

3. Cas du cyclopeptide [1].

a. Introduction.

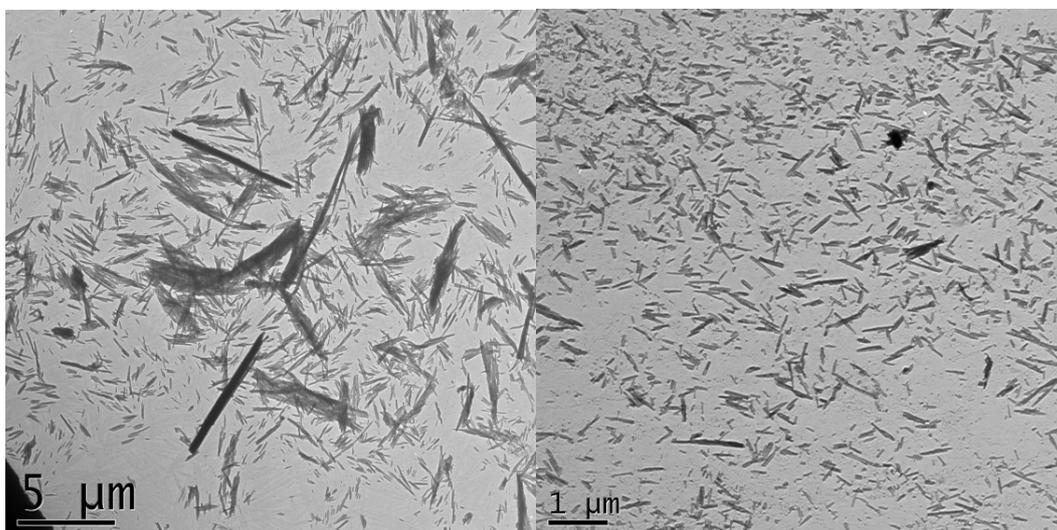
Malgré l'ensemble des données de la littérature concernant l'auto-assemblage de ce peptide [1] en nanotube, et afin de l'utiliser dans les meilleures conditions pour la suite du projet, un certain nombre de questions se posent quant à ses propriétés.

b. Formation de l'auto-assemblage.

La poudre de cyclopeptide [1] directement clivée de la résine n'est pas totalement organisée en feuillets β . En effet, les analyses ATR-FTIR montrent la présence de liaisons hydrogène aléatoires (bande Random) lorsque l'assemblage n'est pas encore totalement organisé. Le traitement acido-basique qui permet l'organisation définitive en nanotube.

c. Solubilité aqueuse des nanotubes de peptides.

L'assemblage des nanotubes entre eux par liaisons hydrogène entre les chaînes latérales conduit à des fagots de nanotubes. De ce fait, lorsque le cyclopeptide [1] est en milieu aqueux, des cristaux de nanotubes de forment. (**Images I-1**)



Images I-1 : *Images TEM du cyclopeptide [1].*

Ces objets sont de tailles variables. Certains objets sont visibles à l'œil nu et les suspensions sont généralement turbides. Les plus gros objets ont tendance à précipiter rapidement alors que les objets plus petits, de l'ordre de la centaine de nanomètres, restent en suspension (même après forte centrifugation durant plusieurs minutes) et sont comparables à des colloïdes. Lorsque ces suspensions sont observées au microscope optique à polarisateur, une forte organisation par orientation est observée et laisse penser que ces objets sont des cristaux. (**Image I-2**)

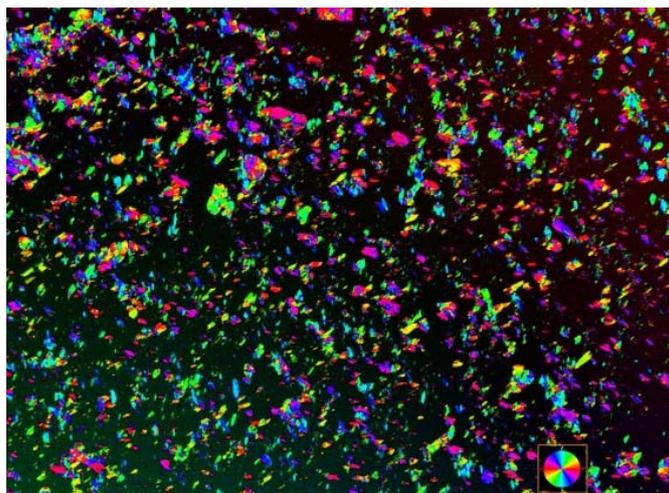
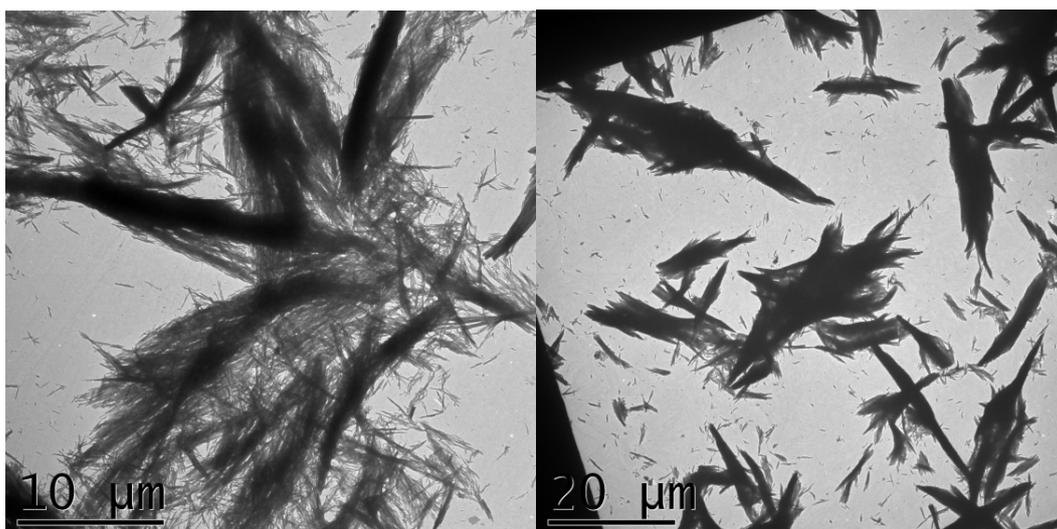


Image I-2 : Image du cyclopeptide [1] au microscope optique à polariseur multiple.

Ce cyclopeptide a été synthétisé dans l'espoir qu'il ait une bonne solubilité dans l'eau. L'insolubilité constatée pourrait s'expliquer par le fait de son arrangement supramoléculaire.

d. Caractérisation de l'assemblage.

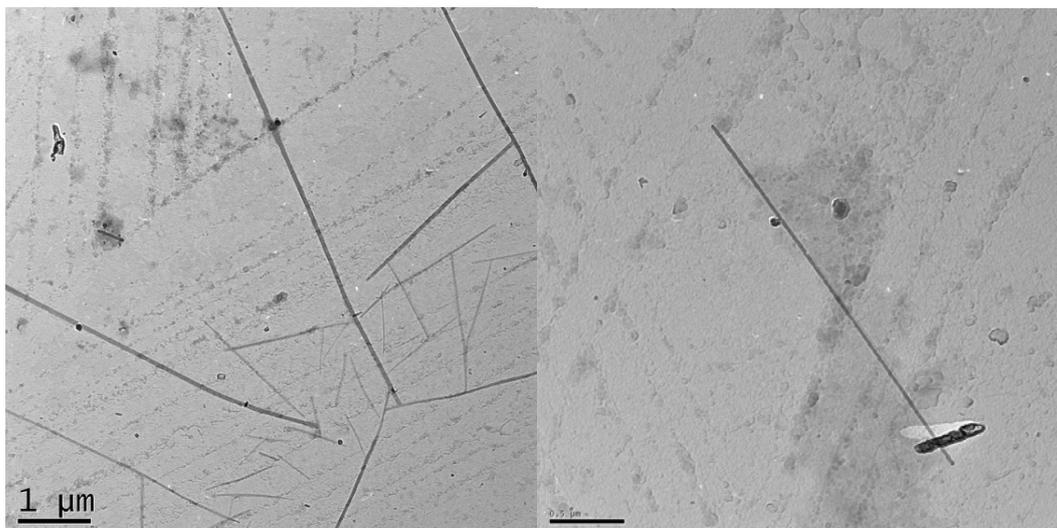
Quelque soit la concentration choisie (jusqu'à $0,075 \text{ mg.mL}^{-1}$) les feuillets β sont observables par ATR-FTIR. La taille des cristaux est très hétérogène dans tous les cas mais de très gros agrégats sont observés plutôt dans des concentrations élevées. (**Images I-3**)



Images I-3 : Images TEM d'agrégats de nanotube.

En faisant varier la concentration initiale de la suspension, il n'a pas été possible d'homogénéiser de cette manière la taille des cristaux. Lorsqu'une suspension de cyclopeptide

[1] est soumis à un chauffage, les diamètres des assemblages observés sont plus fins. (**Images I-4**) Il en est de même pour la recristallisation lente par flux de vapeur.



Images I-4 : Images TEM d'une suspension de cyclopeptide [1] chauffé durant 18h.

e. Peut-on isoler un nanotube ?

Puisque des liaisons hydrogène se créent en solution aqueuse entre les nanotubes, il n'est pas possible d'observer des nanotubes isolés. Plusieurs solutions peuvent en théorie permettre d'obtenir des nanotubes isolés. La première est d'envisager l'utilisation d'un autre solvant que l'eau, milieu défavorisant légèrement les liaisons hydrogène. En effet, les nanotubes du *cyclo*[-(D-Ala-Gln)₄-] ont été isolés en utilisant du DMSO.¹² Malheureusement, malgré le squelette quasi identique de ce dernier avec le cyclopeptide [1], aucun nanotube isolé n'a pu être observé.

La seconde solution peut résulter de la capacité à contrôler l'auto-assemblage par le pH. S'il est possible de passer de monomères à des nanotubes cristallisés, il pourrait y avoir un pH où les cyclopeptides sont assemblés en nanotubes sans avoir d'interaction entre les chaînes latérales. Pourtant, même en faisant varier très légèrement le pH, le passage de monomère aux cristaux de nanotubes est instantané. Les liaisons entre les bagues doivent se faire en même temps que les liaisons entre les chaînes latérales.

f. Conclusion.

L'étude de l'auto-assemblage du cyclopeptide [1] a permis de mettre en évidence le rôle majeur des chaînes latérales dans l'organisation. De plus, il a été mis en évidence que ce

cyclopeptide n'était pas soluble dans l'eau (à pH acide) et que l'assemblage donne des cristaux de tailles très variables.

4. Cas du cyclopeptide [2].

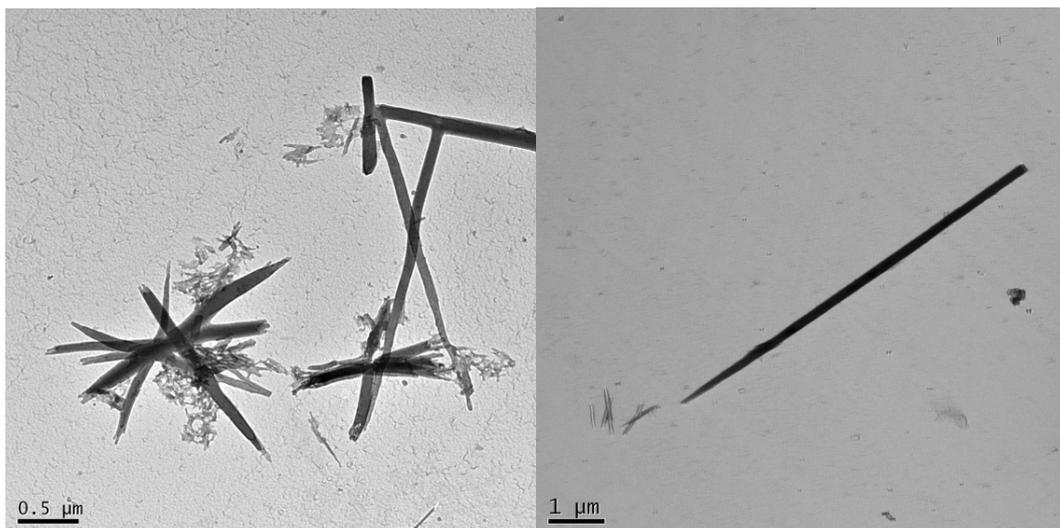
a. Introduction.

L'auto-assemblage du cyclopeptide [2] n'est pas décrit dans la littérature. Cependant, la forte ressemblance avec le cyclopeptide [1] laissait supposer que cet assemblage devrait être possible. C'est ce que nous avons effectivement constaté.

La présence de fonctions amide et acide sur les chaînes latérales conserve les interactions entre les nanotubes. Son comportement dans l'eau est donc identique au cyclopeptide [1] en tout point jusqu'à l'impossibilité d'isoler un nanotube.

b. La modification d'un acide aminé change-t-elle la taille des cristaux ?

Les observations du cyclopeptide [2] en microscopie optique à transmission (TOM) comme en TEM montrent que les cristaux sont assez différents de ceux obtenus avec le cyclopeptide [1] car ils sont en moyenne plus gros et plus organisés. (**Images I-5**) Les très gros agrégats obtenus avec [1] à des concentrations élevées ne sont pas présents dans ce cas. En revanche, de belles aiguilles de taille importante sont observables.



Images I-5 : Images TEM du cyclopeptide [2].

L'orientation cristalline à l'intérieur de ces structures est particulièrement élevée. **(Image I-6)** La structure cristalline déterminée par SAXS donne des paramètres de mailles légèrement plus grands que pour [1].

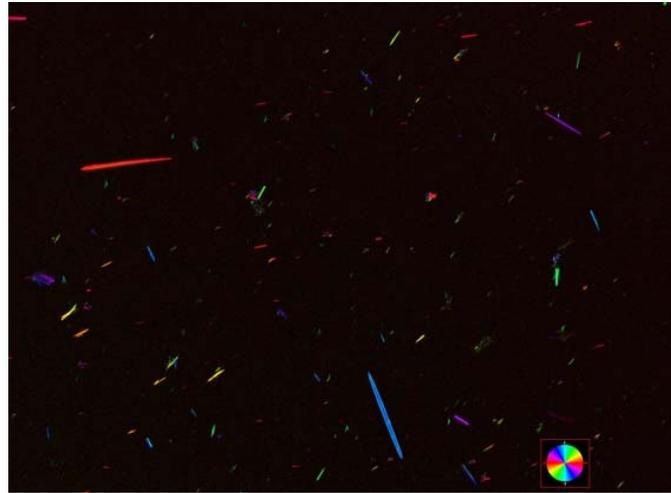
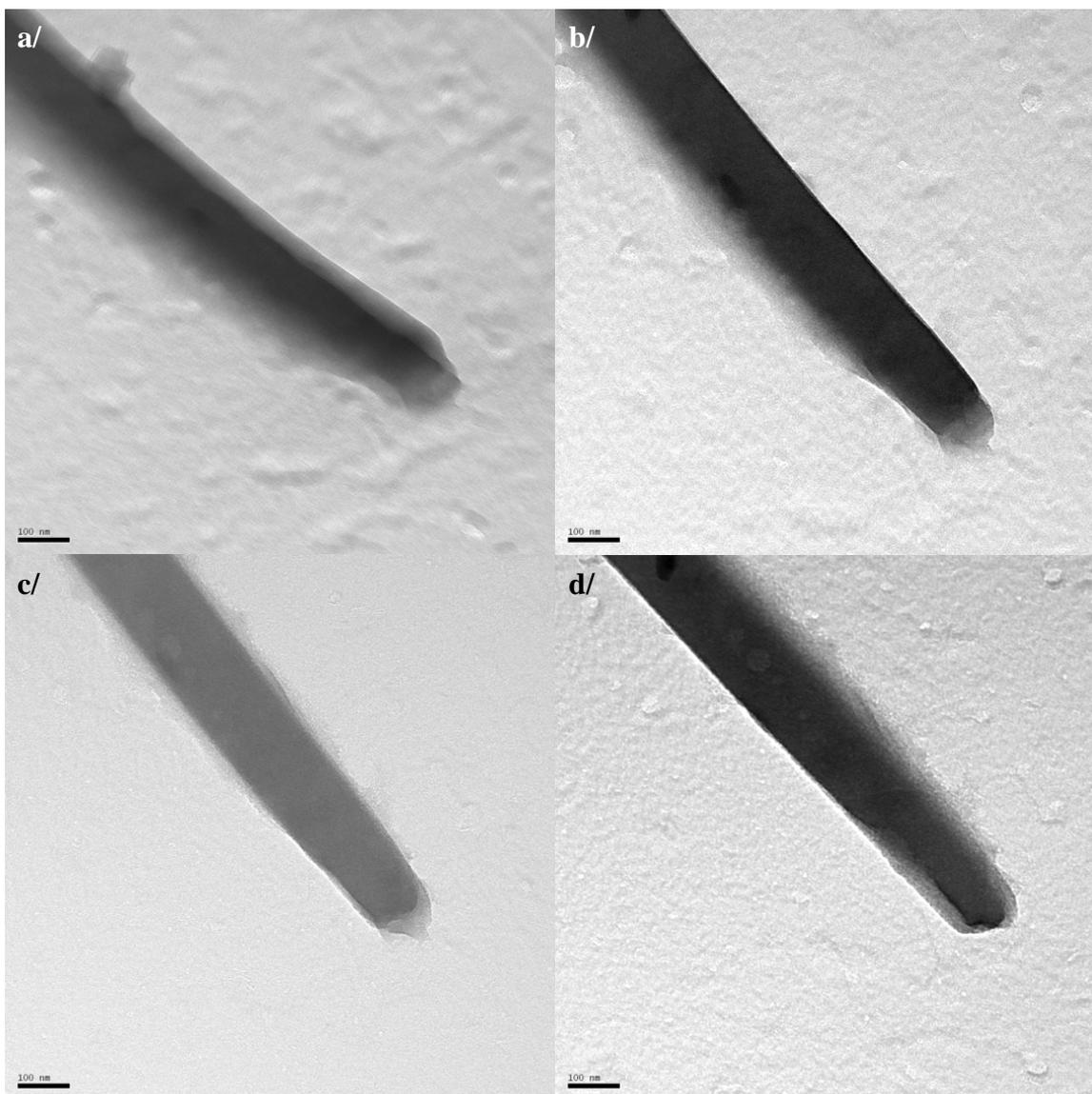


Image I-6 : *Image réalisée au microscope optique à polariseur multiple d'une suspension du cyclopeptide [2].*

De plus les aiguilles présentent des arêtes orientées à 90° environ, donnant à l'ensemble des airs de parallélépipèdes, ce qui laisse penser que l'organisation des nanotubes entre eux est particulièrement importante. **(Images I-7)**



Images I-7 : Images d'une aiguille sur la grille de TEM qui est tiltée d'un angle de : a/-60°, b/-30°, c/15°, et d/45°. Barre d'échelle à 100nm.

c. Conclusion.

Si le mode d'organisation du cyclopeptide [2] semble le même que pour le cyclopeptide [1], les nanotubes de [2] apparaissent plus ordonnés entre eux.

5. Conclusion.

Les études physicochimiques de ces deux cyclopeptides [1] et [2] ont permis de mettre en évidence leur auto-assemblage en nanotube. La légère modification dans la séquence modifie les paramètres de mailles et entraîne des modifications dans la taille des cristaux. En

dehors de cela leur comportement est quasi identique en solution et le problème de solubilité reste entier.

V. Conclusion.

La synthèse peptidique sur support solide a permis d'obtenir le cyclopeptide [1] et les analyses physico-chimiques ont non seulement confirmé l'auto-assemblage en nanotube mais également mis en évidence les problèmes de solubilité rencontrés. L'analogue [2] a été également synthétisé avec succès et présente des propriétés proches de celles du cyclopeptide [1]. En revanche, d'autres analogues ont été envisagés mais des problèmes rencontrés lors de leur synthèse n'ont pas permis de les obtenir. L'étape de cyclisation sur support solide présente un problème non résolu et la réaction en solution pourrait être une solution.

C. Les nanostructures carbonées.

I. Description des nanostructures carbonées.

Les fullerènes sont des molécules en forme de cage et constituent une nouvelle forme cristallographique du carbone, après le graphite et le diamant. (Schéma I-27)

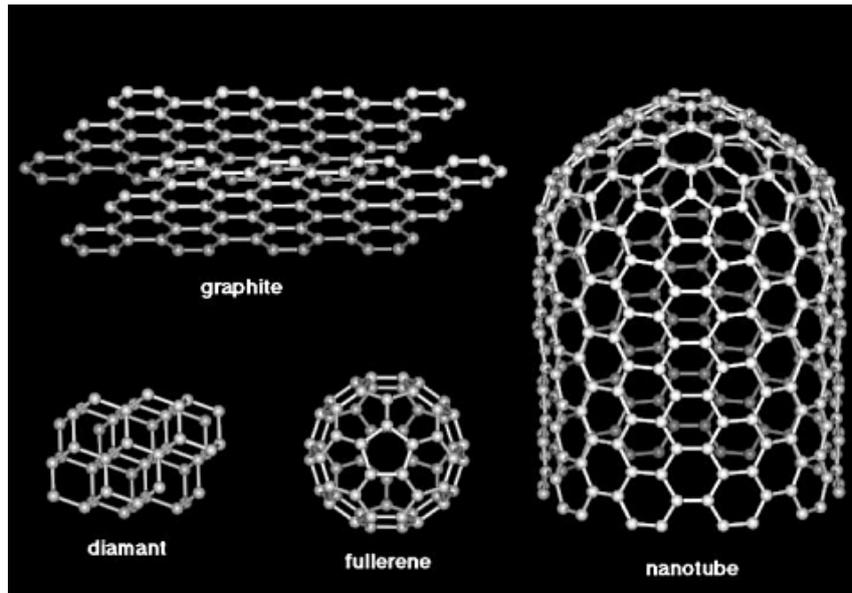


Schéma I-27 : Formes cristallographiques du carbone.

Le terme fullerène est l'abréviation de buckminsterfullerene, du nom d'un architecte R. Buckminster Fuller, à l'origine de la construction d'un dôme géodésique conçu pour l'exposition mondiale de Montréal en 1967, et correspond au fullerène C_{60} qui peut être comparé à un ballon de football. (Schéma I-28)

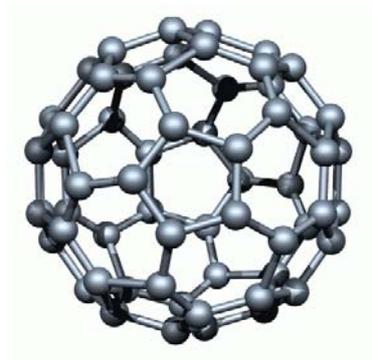


Schéma I-28 : Représentation en 3D d'un fullerène C_{60} .

Les fullerènes ont été découverts en 1985 par Curl, Krobo et Smalley¹³ (Prix Nobel de chimie en 1996) mais n'ont pu être étudiés qu'après 1990, date à laquelle une technique de synthèse efficace, par évaporation du graphite sous atmosphère d'hélium, a été mise au point par Krätschmer et Huffman. Lors de cette synthèse, le fullerène C₆₀, majoritaire à 60%, correspond au plus petit fullerène stable, qui a été depuis le plus étudié. Il est formé de 12 pentagones et 20 hexagones. Chaque pentagone est entouré de 5 hexagones, ce qui fait de ce composé une molécule très symétrique dans laquelle tous les atomes de carbones sont équivalents.

En 1991, le spécialiste de la microscopie électronique de NEC Corporation, le Japonais S. Iijima, observa des sous-produits de la synthèse de fullerènes et découvrit des structures tubulaires graphitiques qui furent baptisées nanotubes de carbone multifeuillets ou MWNT (Multi Wall carbon NanoTubes).¹⁴ Ces nanotubes sont constitués d'un arrangement concentrique de plusieurs feuillets de graphène, repliés sur eux-mêmes de manière à former des cylindres qui s'imbriquent les uns dans les autres à la manière des "poupées russes". (Schéma I-29).

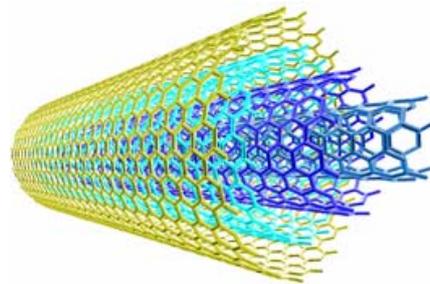


Schéma I-29 : Représentation 3D d'un nanotube multifeuillet.

Par la suite, Bethune de son côté (de la compagnie IBM) et Iijima du sien observèrent qu'en ajoutant une faible quantité de métal au cours de la synthèse, il était possible d'obtenir des nanotubes de carbone monofeuillets (SWNT : "Single Wall carbon NanoTubes").^{15,16}

Un nanotube de carbone peut être représenté comme un feuillet de graphène replié sur lui-même, de manière à former un cylindre creux. Celui-ci est constitué uniquement d'atomes de carbone hybridés sp² formant un réseau d'hexagones, comme dans le graphite. (Schéma I-30) Le nanotube idéal ainsi formé présente deux extrémités qui sont fermées par des demi-fullerènes. Dans le cas d'un nanotube réel, les extrémités comportent des défauts. En effet, les séquences de purification relativement drastiques peuvent induire une ouverture des extrémités.

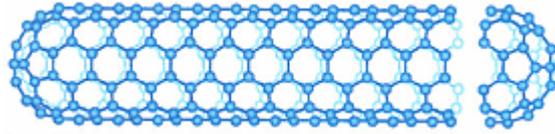


Schéma I-30 : Représentation schématique d'un nanotube monoparoi idéal.

A l'inverse du fullerène C_{60} que l'on peut détecter dans les poussières interstellaires à l'état de traces, les nanotubes n'ont à ce jour pas été décelés à l'état naturel.

La géométrie des nanotubes détermine certaines de leurs propriétés physiques. Pour mieux appréhender l'origine de cette topologie particulière, considérons une feuille de graphite. (**Schéma I-31**) L'enroulement d'un feuillet de graphène peut être réalisé selon différents angles, ce qui conduit à plusieurs types de nanotubes.

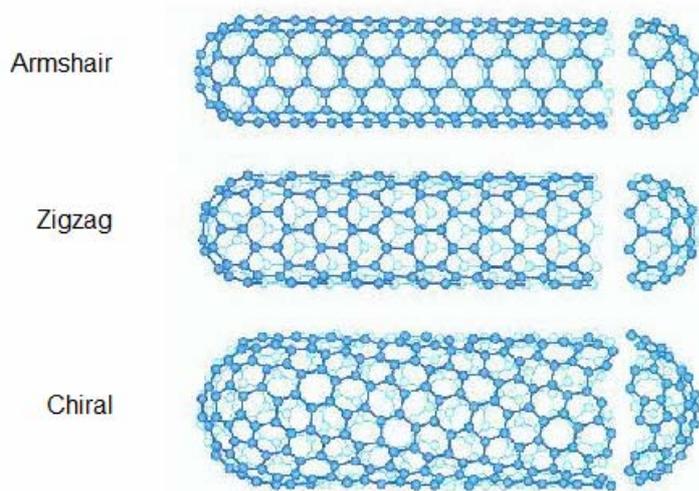


Schéma I-31 : Enroulement d'un feuillet de graphène conduisant à trois types de nanotubes.

A l'heure actuelle, les nanotubes armchair, zigzag et chiraux sont toujours obtenus en mélange, quel que soit le procédé de synthèse utilisé.

II. Les Fullerènes.

1. Introduction.

Afin de réaliser un matériau hybride peptide nanostructure carbonée, le fullerène C_{60} a été envisagé en premier lieu. La première raison repose sur le fait que ce type d'objet a été

suffisamment étudié pour fournir des possibilités de fonctionnalisation différentes qui pourront servir au projet et a démontré une bonne réactivité. La seconde raison est que ce type de nanostructure carbonée est facilement manipulable et les techniques de caractérisation sont celles classiquement utilisées en chimie organique. Ces différentes raisons en font un support d'étude intéressant.

De plus, il existe déjà des exemples de synthèse de matériaux hybrides fullerène peptides liés de manière covalente qui laissent penser que le projet est réalisable.

Le travail a donc été de s'inspirer des résultats déjà décrits dans la littérature pour concevoir les premiers objets cyclopeptide, fullerène.

Deux types de fullerènes fonctionnalisés vont être décrits dans ce chapitre. Le premier met en jeu un bras espaceur contenant une amine primaire en position terminale et le second propose un acide carboxylique. Ces choix reposent sur les deux types de cyclopeptides précédemment décrits et permettent deux alternatives pour la réaction de couplage.

2. Fullerènes fonctionnalisés par bras espaceurs contenant une amine primaire terminale.

La cycloaddition 1,3-dipolaire d'ylures d'azométhine décrite par Prato et coll. en 2002 conduit à la formation de cycles pyrrolidines à la surface des nanotubes.¹⁷ Cette fonctionnalisation a été appliquée aux fullerènes C₆₀ par la même équipe.¹⁸ (**Schéma I-32**)

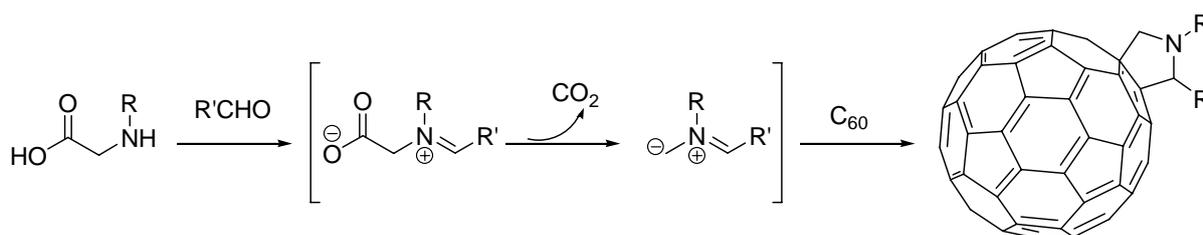


Schéma I-32 : Fonctionnalisation de C₆₀ par cycloaddition 1,3-dipolaire.

La réaction consiste à former in situ le dipôle 1,3, par condensation de l'amine sur l'aldéhyde suivie d'une décarboxylation. Le dipôle 1,3 va alors réagir avec le fullerène. La réaction est réalisée à chaud dans le toluène, un des seuls solvants permettant la solubilisation du fullerène C₆₀ natif.

L'intérêt de cette fonctionnalisation est que les groupements R et R' sont modulables. Entre autres, des chaînes carbonées contenant une amine terminale ont été utilisées comme groupement R pour la fonctionnalisation.

a. Bras espaceurs envisagés.

Le choix du bras espaceur [11] permet d'obtenir une amine primaire sur le fullerène. Sa synthèse a été décrite en trois étapes que sont la mono-protection de l'éthyle diamine en NHBOC, une substitution nucléophile du bromoacétate de benzyle par l'amine et enfin la déprotection du benzyle.¹⁹ (**Schéma I-33**)

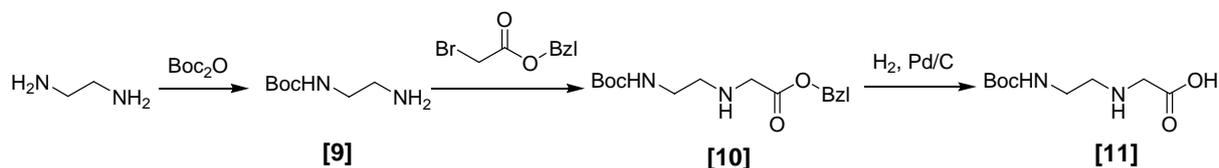


Schéma I-33 : Etapes de synthèse du bras espaceur [11].

Malheureusement, la seconde étape s'est révélée difficile car une double substitution est observée dans les conditions employées. Une voie alternative a alors été employée introduisant une étape supplémentaire de benzylation de l'amine primaire avant substitution nucléophile du bromoacétate de benzyle.²⁰ (**Schéma I-34**) Cette étape permet alors la substitution d'un seul bromoacétate de benzyle. L'étape de débenzylation déprotège en même temps l'acide carboxylique et l'amine pour donner le bras espaceur [11].

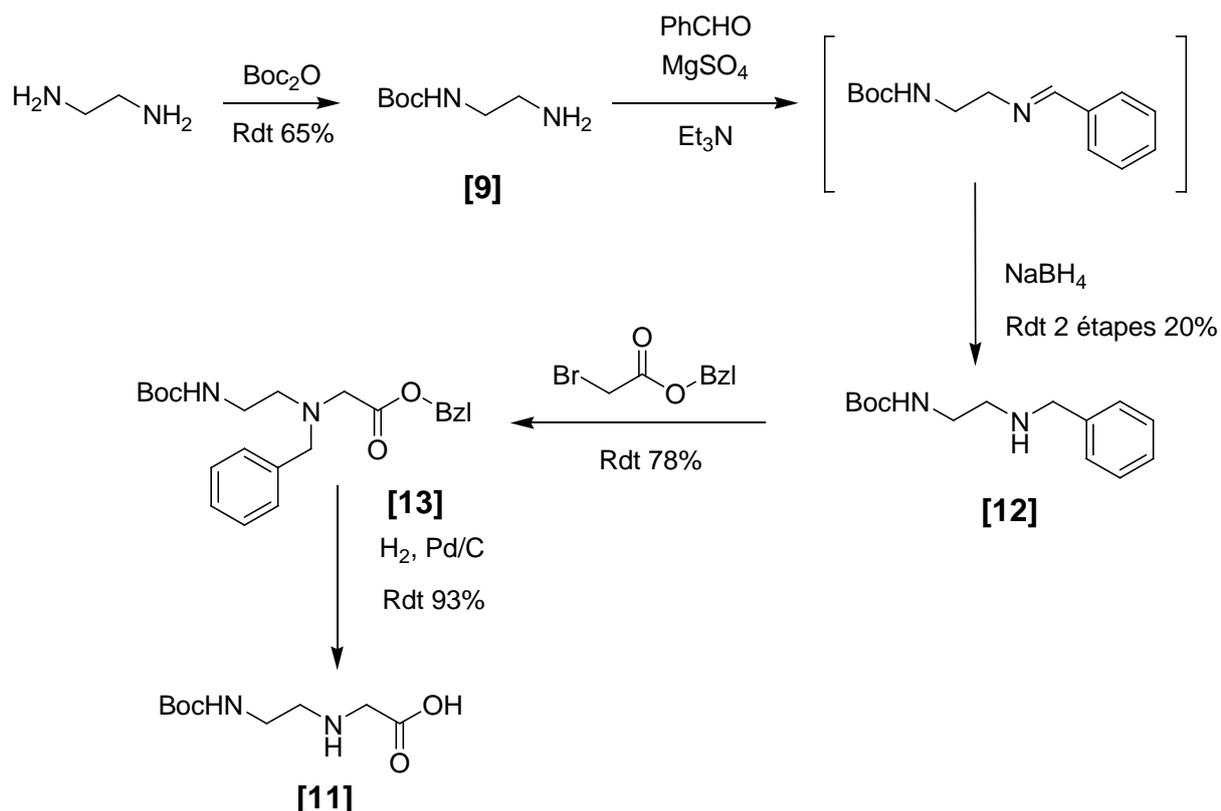


Schéma I-34 : Seconde voie de synthèse du bras espaceur **[11]**.

Basé sur ce même principe, un second bras espaceur **[17]** a été synthétisé avec un rendement global sur les cinq étapes de 40 %. (**Schéma I-35**) Ce bras espaceur a une chaîne R plus longue qui permet d'éloigner le fullerène du cyclopeptide amorce afin d'éviter des encombrements stériques pouvant perturber l'auto-assemblage des cyclopeptides en nanotube.

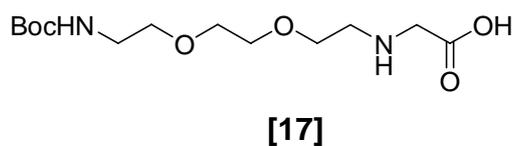


Schéma I-35 : Structure développée du bras espaceur **[17]**.

La voie de synthèse est identique à celle du bras espaceur **[11]**. En effet, c'est également la seconde voie de synthèse qui a été utilisée ici car les mêmes problèmes ont survenus en l'absence de benzylation de l'amine.

b. Fonctionnalisation du fullerène C₆₀.

Les deux bras espaceurs [11] et [17] ont été utilisés pour la fonctionnalisation du fullerène C₆₀. (**Schéma I-36**)

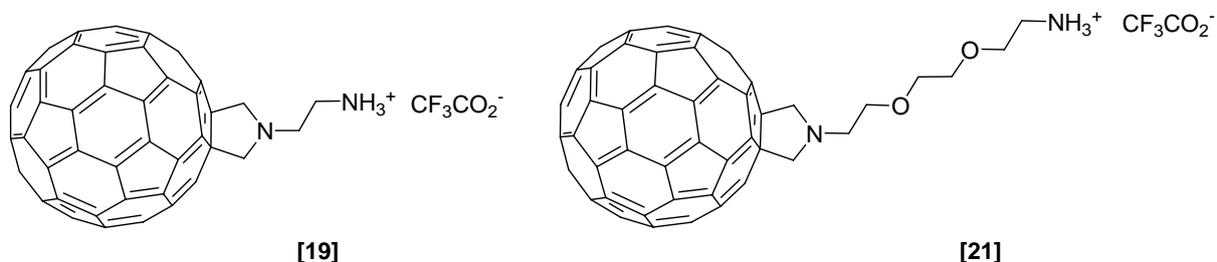


Schéma I-36 : Formules développées des composés [19] et [21].

Le couplage est réalisé au reflux du toluène et donne des rendements de l'ordre de 30% car la réaction est arrêtée avant une conversion totale afin d'obtenir une mono-fonctionnalisation.

Les composés [19] et [21] ont été obtenus après une simple déprotection en milieu acide de la fonction amine.

La solubilisation des produits en l'état est difficile dans le DMF mais l'ajout de base telle que la collidine ou la TEA neutralise le sel d'amine et permet la solubilisation des C₆₀ fonctionnalisés.

c. Conclusion.

La réaction de fonctionnalisation du fullerène C₆₀ par cycloaddition 1,3-dipolaire d'ylures d'azométhine a permis d'obtenir deux composés [19] et [21]. Ces deux composés sont obtenus par une synthèse analogue en 6 étapes.

Ces composés sont tous les deux solubles dans le DMF et ils vont pouvoir être utilisés dans la réaction de couplage cyclopeptide, fullerène.

3. Fullerènes fonctionnalisés par bras espaceurs contenant un acide carboxylique terminal.

La cyclopropanation par un malonate conduit à la formation du cyclopropane à la surface du fullerène C_{60} . (**Schéma I-37**) Cette réaction a lieu à température ambiante.

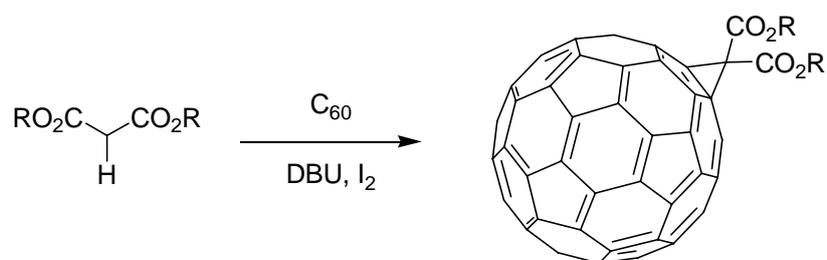


Schéma I-37 : Cyclopropanation à partir d'un malonate.

Les malonates sont pour la plupart commerciaux avec des groupements protecteurs pouvant être différents entre les deux fonctions acides.

Le malonate de tert-butyle-éthyle fournit le composé [23] après déprotection de l'ester tert butyle en milieu acide. De la même façon, le composé [25] est obtenu à partir du malonate de di-tert-butyle après déprotection des esters tertbutylés. (**Schéma I-38**)

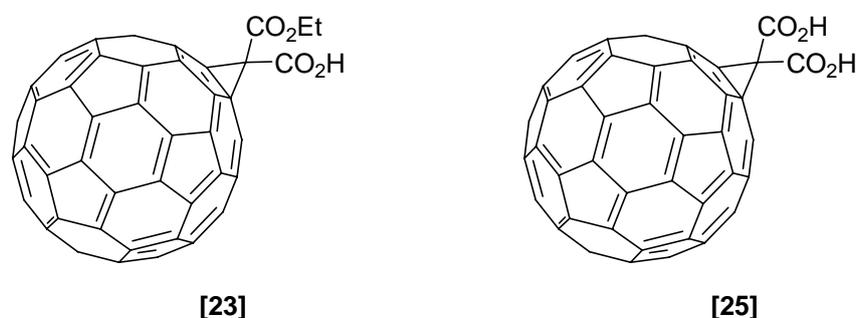


Schéma I-38 : Formules des composés [23] et [25].

Ces deux composés sont solubles dans le DMF, solvant envisagé pour l'étape de couplage avec les cyclopeptides.

4. Conclusion.

Le fullerène C_{60} a été fonctionnalisé de deux manières différentes pour obtenir soit une amine en bout de chaîne par cycloaddition 1,3-dipolaire pour les composés [19] et [21], soit

un acide carboxylique par cyclopropanation pour les composés [23] et [25]. Ces quatre composés constituent des substrats pour le couplage fullerène, cyclopeptide.

III. Les nanotubes de carbones.

1. Introduction.

Deux bras espaceurs comportant au motif diéthylène glycol différent ont été obtenus par la même voie de synthèse. Le bras espaceur le plus long permettra sans doute une meilleure flexibilité du bras sur le nanotube de peptide afin de ne pas perturber l'auto-assemblage.

Ces bras espaceur possèdent à une extrémité une fonction aniline pour la fonctionnalisation du nanotube de carbone et de l'autre extrémité une amine primaire pour la réaction de couplage avec le cyclopeptide. (**Schéma I-39**)

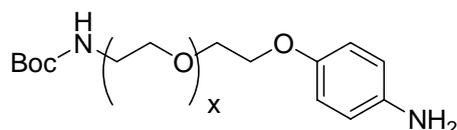


Schéma I-39 : Représentation des bras espaceurs envisagés, avec $x = 2$ ou 7 .

2. Description de la synthèse des bras espaceurs.

La synthèse de ce de bras espaceur peut être proposée en 6 étapes à partir d'un polyéthylène glycol commercial. La première étape consiste à réaliser une double tosylation des alcools à l'aide de chlorure de paratoluène sulfonyle. Elle est suivie par une première substitution nucléophile d'un azoture de sodium et d'une seconde par un phénol.

L'azoture est alors réduit en amine primaire puis protégée par un groupement Boc. La dernière étape est la déprotection de l'aniline pour fournir le bras espaceur attendu. (**Schéma I-40**)

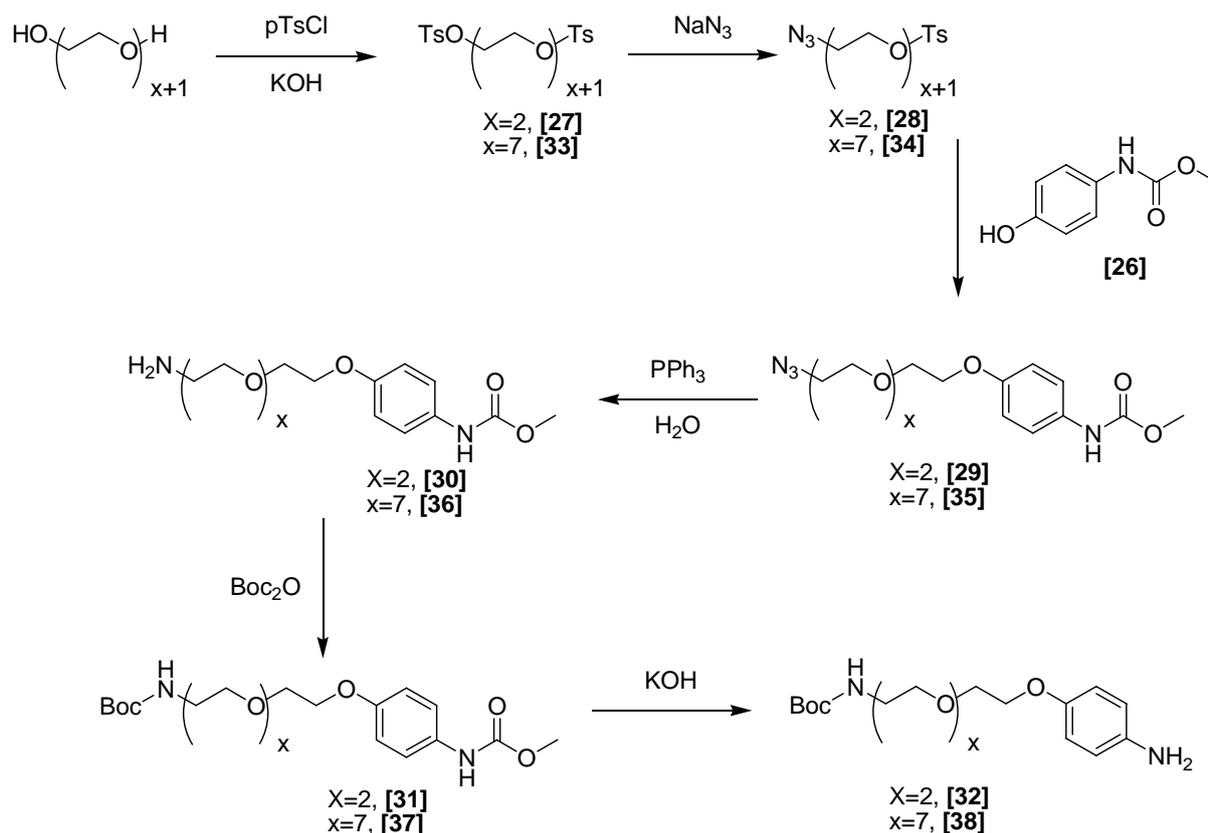


Schéma I-40 : Synthèse des bras espaceurs [32] et [38].

Le phénol est obtenu à partir du paraminophénol par protection de l'aniline sous forme du carbamate de méthyle à l'aide du chloroformate de méthyle. (**Schéma I-41**)

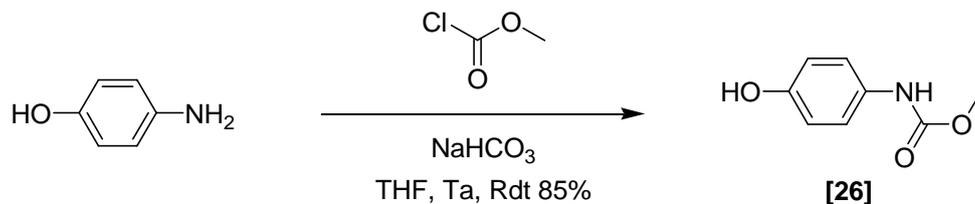


Schéma I-41 : Protection de l'aniline.

La synthèse a été réalisée par Haiyan Li, professeur invité, a permis d'obtenir le bras espaceur [32] avec un rendement global de 16%. (**Schéma I-42**)

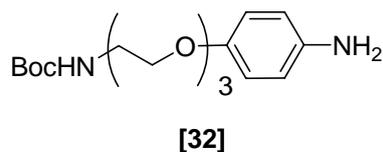


Schéma I-42 : Structure développée du bras espaceur [32].

Pour $x=7$, la première substitution fournit un mélange de produits mono et disubstitué qui n'ont pu être séparés. Aucune condition n'a permis de résoudre cette difficulté. La faible pureté des intermédiaires nous a conduit à abandonner la synthèse du composé [38].

Ainsi, la synthèse de deux bras espaceurs a été envisagée et seul le composé [32] a pu être synthétisé. Il va alors être utilisé pour l'étape de fonctionnalisation de nanotube de carbone.

3. Fonctionnalisation des nanotubes de carbone.

La réaction de fonctionnalisation consiste à condenser un sel de diazonium généré *in situ* sur la surface du nanotube par réaction du nitrite d'isoamyle avec l'aniline [32].²¹ (Schéma I-43) A 60 °C, le sel de diazonium génère une espèce très électrophile qui s'additionne sur la surface des nanotubes.

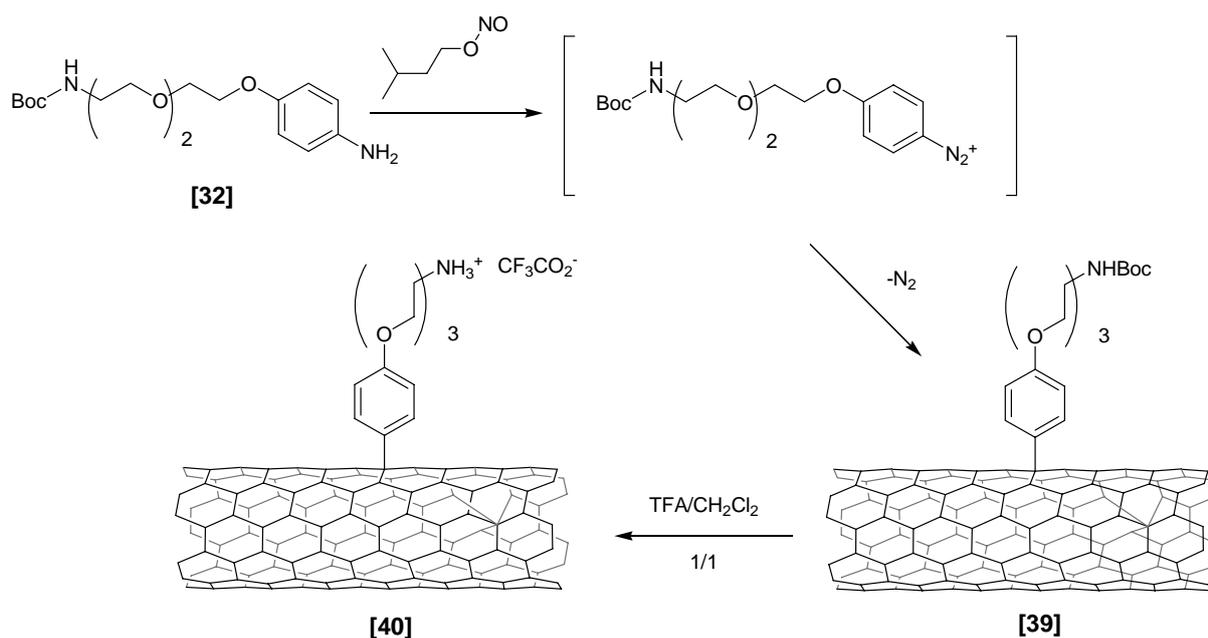


Schéma I-43 : Condensation du sel de diazonium.

La déprotection de l'amine en milieu acide permet d'obtenir le composé [40]. Le taux de fonctionnalisation, déterminé par le test de Kaiser (voir partie 1), est estimé à 0,2 millimoles par gramme de nanotube.

4. Conclusion.

La synthèse d'un nouveau bras espaceur [32] a permis de fonctionnaliser les nanotubes de carbone. Le nanotube fonctionnalisé [40] contient une amine primaire en bout de chaîne et peut être engagé dans une réaction de couplage avec un cyclopeptide contenant une fonction acide.

IV. Conclusion.

Des nanostructures carbonées (fullerènes, nanotubes de carbones) fonctionnalisés ont été obtenus. Cet ensemble de composés est disponible pour le couplage avec les cyclopeptides avec soit une fonction amine, soit une fonction acide carboxylique. Leur solubilité dans les solvants organiques tels que le DMF laisse penser que ce paramètre n'est pas un obstacle pour la réalisation de l'étape de couplage avec les cyclopeptides.

D. Couplages en solution.

I. Introduction.

La première réaction envisagée est un couplage peptidique entre la fonction acide carboxylique disponible sur le cyclopeptide et la fonction amine de la nanostructure carbonée. Pour ce faire, nous nous sommes inspirés des travaux de Prato réalisant ce type de couplage entre un nanotube de carbone et un petit peptide.²² Le fullerène a été préféré au nanotube de carbone pour sa plus grande facilité à être caractérisé.

II. Couplages entre peptides et fullerènes.

1. Couplage avec le cyclo[-(D-Ala-Gln)₃-D-Ala-Glu-] [2].

La réaction de couplage permet de fixer l'amorce du nanotube de peptide. L'utilisation du cyclopeptide [2] permet un seul couplage peptidique puisqu'une seule fonction acide carboxylique est présente. Les essais de réaction de couplage ont été réalisés à l'aide de différents agents de couplages, tels que l'HATU, le DIC, le PyBOP, le PyAOP ou encore l'EDC. (Schéma I-44)

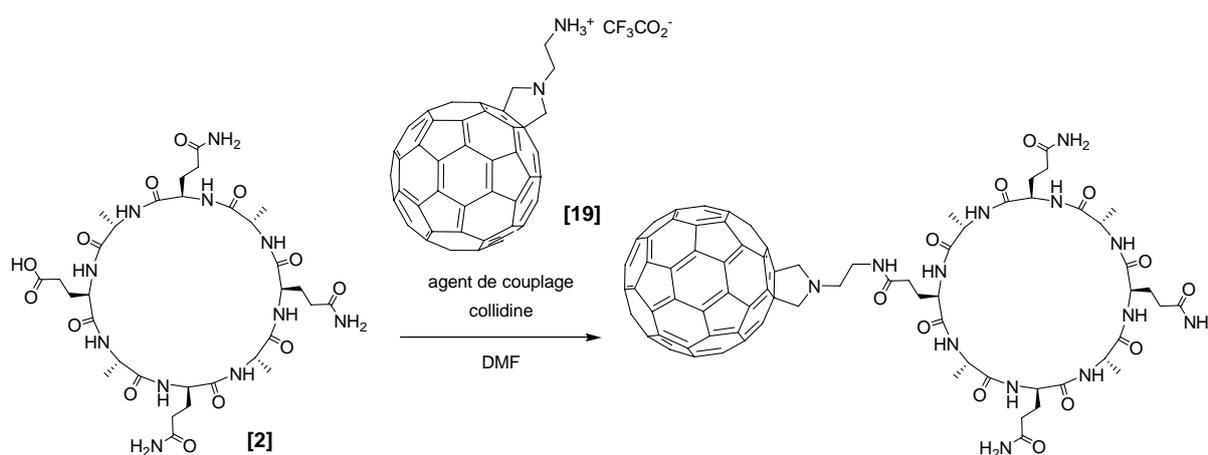


Schéma I-44 : Réaction de couplage entre fullerène [19] et cyclopeptide [2].

Des temps de réactions longs (de quelques heures à plusieurs jours) ont été utilisés pour la réaction de couplage. Le cyclopeptide [2] n'est pas soluble dans le milieu réactionnel

et un fort précipité est observé tout au long de la réaction. Après arrêt de la réaction, la phase organique ne contenant pas le produit attendu, le précipité a été analysé. Une trituration par une solution aqueuse alcaline permet d'extraire de ce précipité le cyclopeptide [2]. Par contre, cette trituration ne permet pas de recueillir le produit attendu. Des essais de solubilisation dans le (DCM, DMF, NMP, THF, EtOH, pyridine...) du précipité qui est resté après trituration n'ont pas permis de dissoudre un composé identifiable.

Devant l'impossibilité de solubiliser le produit, nous avons choisi de travailler avec le cyclopeptide [1]. Celui-ci après couplage avec le fullerène, conservant une fonction acide carboxylique disponible, pourrait permettre sa solubilisation.

2. Couplage avec le cyclo[-(D-Ala-Gln-D-Ala-Glu)₂-] [1].

Des essais de couplages ont été réalisés entre le cyclopeptide [1] et le fullerène [19] à l'aide d'agents de couplages comme l'HATU, le DIC, le PyBOP, le PyAOP ou encore l'EDC. (Schéma I-45) Les réactions sont réalisées à température ambiante dans le DMF ou dans un mélange DMF/DCM. Le DCM est utilisé comme co-solvant pour aider à la solubilisation du cyclopeptide.

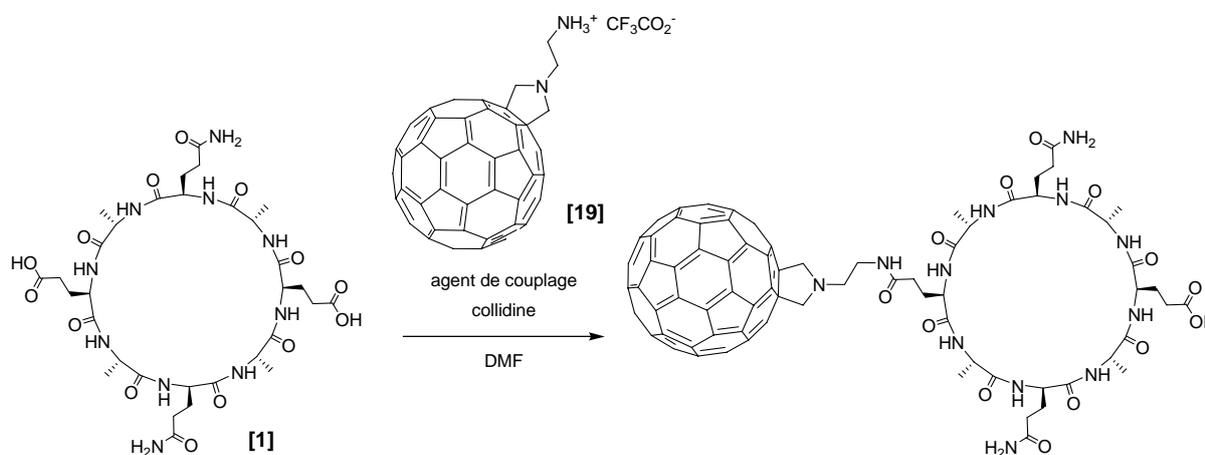


Schéma I-45 : Réaction de couplage entre fullerène et cyclopeptide.

Malheureusement, ce cyclopeptide [1] n'est pas soluble dans les conditions de réaction.

Il est supposé qu'au cours de la réaction, le peptide va se solubiliser par réaction en surface des cristaux. Pourtant, il n'y a pas de dissolution apparente. Ce précipité, ne montre pas de présence de fullerène, au même titre que le milieu réactionnel ne contient pas de cyclopeptide. Il n'y a donc pas réaction.

Les réactions ont alors été tenté dans un bain soniquant. La sonication permet de disperser les cristaux de nanotubes dans le milieu réactionnel et peut alors aider à provoquer la réaction de couplage. Pourtant, l'augmentation de la surface spécifique des cristaux de cyclopeptide **[1]** ne modifie pas le résultat, il n'y a toujours pas de réaction.

Puisque le cyclopeptide **[1]** est soluble en milieu alcalin sous la forme de monocarboxylate, des réactions de couplages sous cette forme ont été envisagées avec le fullerène **[19]**. (**Schéma I-46**)

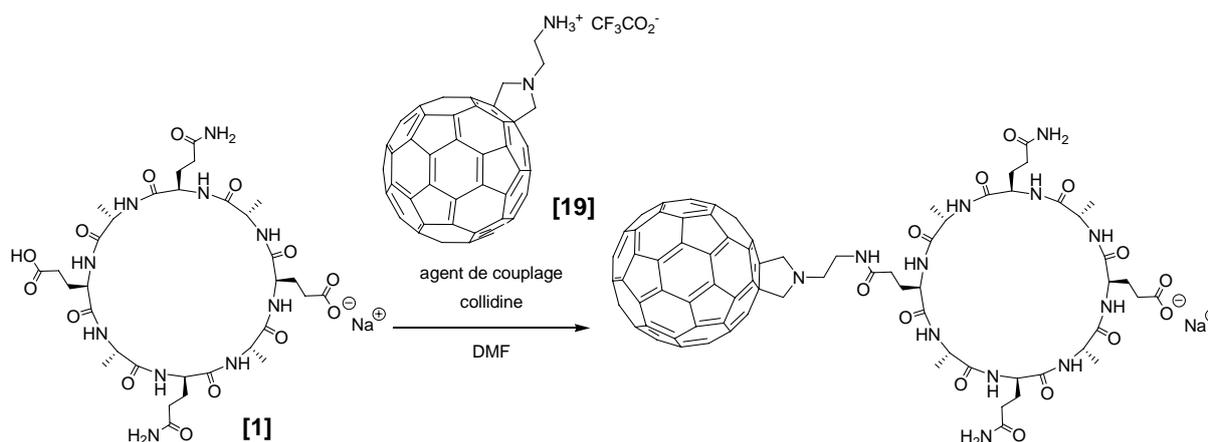


Schéma I-46 : Réaction de couplage entre le sel de carboxylate de **[1]** et le fullerène **[19]**.

Malheureusement, le cyclopeptide sous cette forme n'est pas soluble dans le DMF. La réaction de couplage n'a pas lieu non plus dans ce cas.

Des essais de couplages dans l'eau ont également été réalisés mais aucun produit de couplage n'a été identifié.

III. Conclusion.

Les premiers essais de couplages n'ont pas permis d'obtenir le composé attendu. Les problèmes de solubilité des cyclopeptides n'ont pu être contournés, les essais n'ont pas été poursuivis. Il est nécessaire de trouver une solution qui permettra de réaliser ce couplage malgré l'insolubilité des cyclopeptides. Puisque la synthèse de ces cyclopeptides est réalisée sur support solide, nous avons pensés les conserver sur la résine. Cette solution nécessite de nouvelles synthèses. En effet, il faut réaliser la synthèse de cyclopeptides possédant une fonction dont le groupement protecteur pourra être retiré sans cliver le peptide de la résine afin de pouvoir être couplé aux fullerènes. Ce travail fait l'objet de la prochaine partie de ce manuscrit.

-
- ¹ M. R. Ghadiri; J. R. Granja; R. A. Milligan; D. E. McRee; N. Khazanovich, *Nature*, **1993**, 324-327.
- ² R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149-2154.
- ³ S.-Y. Han; Y.-A. Kim, *Tetrahedron*, **2004**, 60, 2447-2467.
- ⁴ J. Coste; E. Frerot; P. Jouin, *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 1967-1970.
- ⁵ W. König; R. Geiger, *Chem. Ber.*, **1970**, 103, 788-798.
- ⁶ P. Rovero; L. Quartara; G. Fabbri, *Tetrahedron. Lett.*, **1991**, 32, 2639-2642.
- ⁷ E. Kaiser; R. L. Colescott; C. D. Bossinger; P. I. Cook, *Anal. Biochem.*, **1970**, 34, 595-598.
- ⁸ P. Lhoyd-Williams; G. Jou; F. Albericio; E. Giralt, *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 4207-4210.
- ⁹ J. Adrio; C. Cuevas; I. Manzanares; M. M. Jouillié, *Org. Lett.*, **2006**, 8, 511-514.
- ¹⁰ J. D. Hartgerink; J. R. Granja; R. A. Milligan; M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 43-50.
- ¹¹ M. G. J. ten Cate; N. Severin; H. G. Börner, *Macromolecules*, **2006**, 39, 7831-7838.
- ¹² T. Nakanishi; H. Okamoto; Y. Nagai; K. Takada; I. Obataya; H. Mihara; H. Azebara; Y. Suzuki; W. Mizutani; K. Furukawa; K. Torimitsu, *Phys. Rev. B*, **2002**, 66, 165417_1-165417_8.
- ¹³ H. W. Kroto; J. R. Heath; S. C. O'Brien; R. F. Curl; R. E. Smalley, *Nature*, **1985**, 318, 162-163.
- ¹⁴ S. Iijima, *Nature*, **1991**, 354, 56-58.
- ¹⁵ D. S. Bethune; C. H. Kiang; M. S. De Vries; G. Gorman; R. Savoy; J. Vazquez; R. Beyers, *Nature*, **1993**, 363, 605-607.
- ¹⁶ S. Iijima; T. Ichihashi, *Nature*, **1993**, 363, 603-605.
- ¹⁷ V. Georgakilas; K. Kordatos; M. Prato; D. K. Guldi; M. Holzinger; A. Hirsch, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 760-761.
- ¹⁸ F. Pellarini ; D. Pantarotto ; T. Da Ros ; A. Giangaspero ; A. Tossi ; M. Prato, *Org. Lett.*, **2002**, 3, 1845-1848.
- ¹⁹ K. Kordatos; T. Da Ros; S. Bosi; E. Vazquez; M. Bergamin; C. Cusan; F. Pellarini; V. Tomberli; B. Baiti; D. Pantarotto; V. Georgakilas; G. Spalluto; M. Prato, *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 4915-4920.
- ²⁰ R. Mosi; G. Zhang; P. Wan, *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 411-417.
- ²¹ J. L. Bahr; J. M. Tour, *Chem. Mater.* **2001**, 13, 3823-3824.

²² D. Pantarotto; C. D. Partidos; R. Graff; J. Hoebeke; J.-C. Briand; M. Prato; A. Bianco, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 6160-6164.

Partie II

Voie alternative envisagée.

A. Introduction.

Afin de contourner le problème de solubilité des cyclopeptides, une nouvelle stratégie a été envisagée pour réaliser le couplage de ces peptides aux fullerènes sur résine.

Le peptide fixé sur résine ne peut s'auto-assembler en nanotube. Or, il semblerait que l'auto-assemblage soit responsable des problèmes de solubilité.

La nouvelle voie de synthèse de matériaux hybrides est représentée sur le schéma ci-dessous. (**Schéma II-1**)

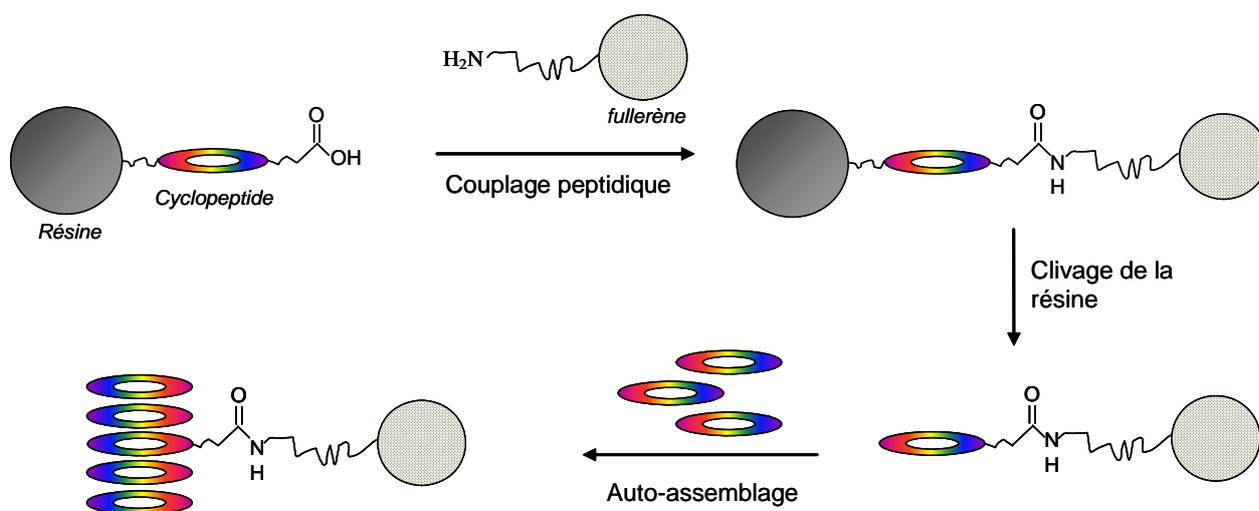


Schéma II-1: Représentation schématique d'une nouvelle voie envisagée.

Dans cette partie, nous présenterons dans un premier temps les peptides qui ont été envisagés pour cette stratégie et les difficultés rencontrées. Dans un second temps, les essais de couplage seront discutés avec les techniques d'analyses utilisées pour suivre l'avancée de la réaction.

B. Les cyclopeptides.

I. Introduction.

Deux cyclopeptides sur support solide [42] et [46] ont été envisagés pour cette nouvelle voie de synthèse de matériaux hybrides. (Schéma II-2)

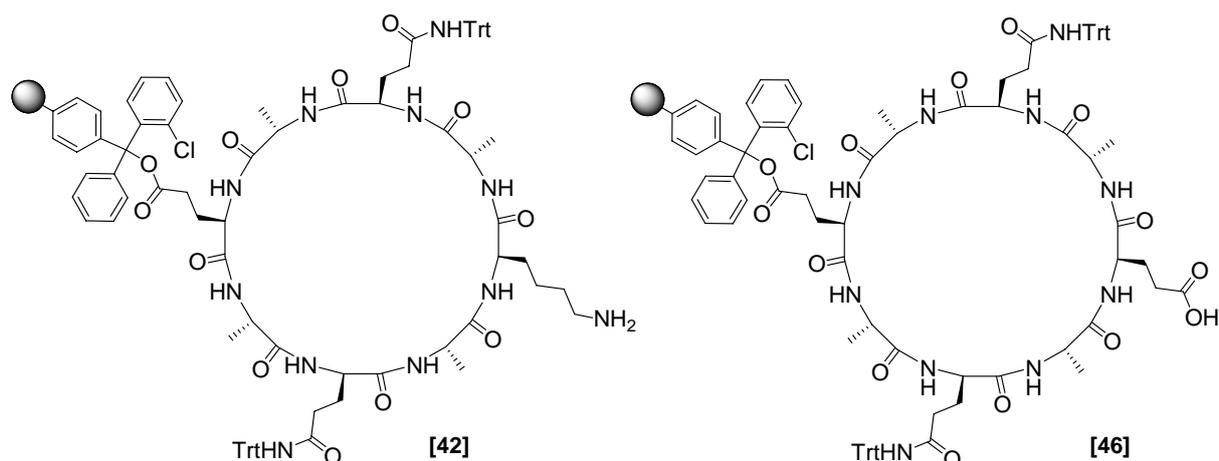


Schéma II-2 : Structure des composés [42] et [46].

Pour le cyclopeptide [42], une fonction amine est substituée à la fonction carboxylique sur la chaîne latérale du cinquième acide aminé. Cette amine peut être obtenue sur support solide par déprotection spécifique du groupement protecteur iVDde du composé [41]. (Schéma II-3)

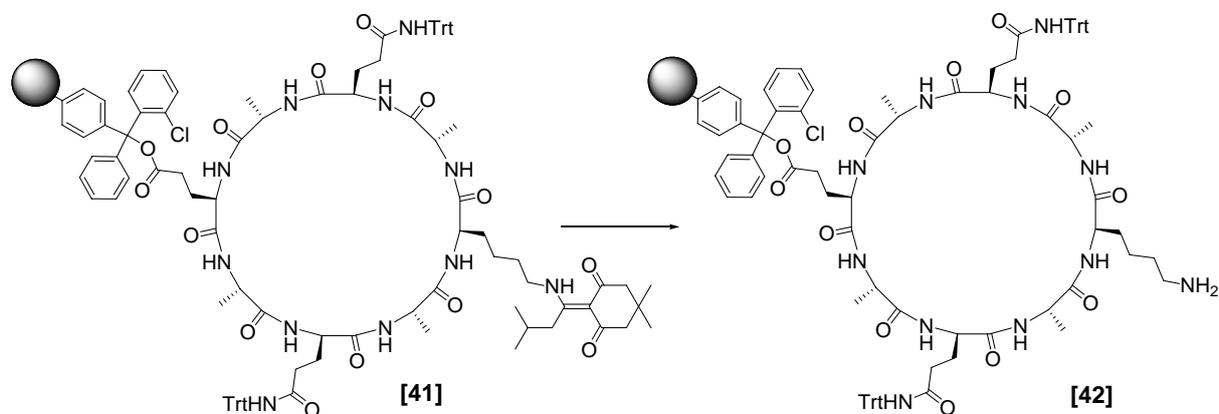


Schéma II-3 : Schéma de la déprotection de l'amine.

Le cyclopeptide **[46]** permet après clivage de la résine (et déprotection des Gln) d'obtenir le *cyclo*[-(D-Ala-Gln-D-Ala-Glu)₂-] **[1]**. (**Schéma II-4**) Pour réaliser sa synthèse, la fonction acide carboxylique sur la chaîne latérale du cinquième acide aminé est protégée par un groupement protecteur, le Dmab, pour donner le composé **[45]**. Le Dmab peut également être retiré par l'hydrazine sans toucher aux autres groupements protecteurs et permet de conserver le peptide sur résine pour conduire au composé **[46]**.

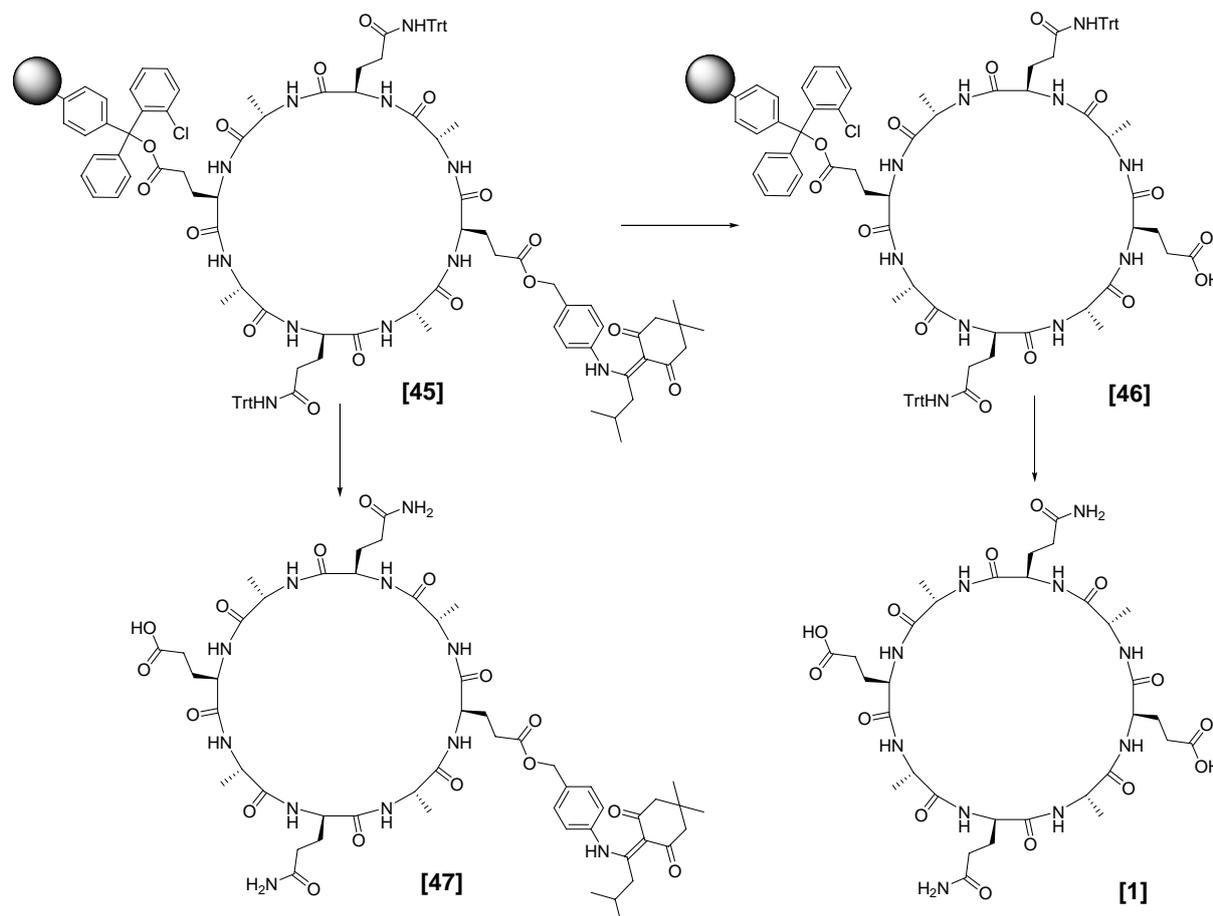


Schéma II-4 : Voie de synthèse du cyclopeptide **[46]** sur support solide.

II. Synthèse du cyclopeptide sur support solide **[42]**.

1. Synthèse.

La synthèse du cyclopeptide **[42]** est réalisée selon la stratégie décrite partie I.

L'acide aminé Fmoc-Lys(NHiVDde)-OH est utilisé lors de cette synthèse pour l'introduction du cinquième acide aminé. (**Schéma II-5**)

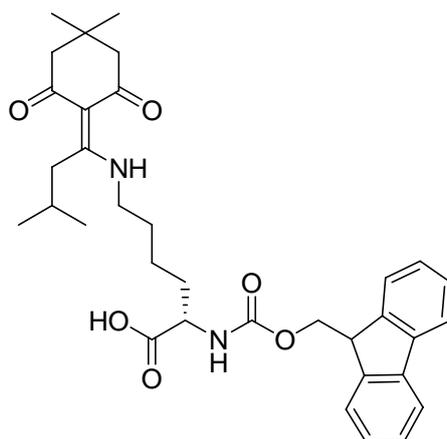


Schéma II-5 : Structure semi-développée du Fmoc-Lys(NHiVDde)-OH.

La cyclisation est réalisée à l'aide du DIC en présence d'HOAt et a permis d'obtenir le peptide [41] avec un taux de conversion de 100% selon la LC/MS sans réaction secondaire.

La déprotection est réalisée à l'aide d'hydrazine en solution dans le DMF.

2. Conclusion.

Le cyclopeptide [42] a été obtenu avec un rendement de 50%. Son amine libre devrait permettre d'introduire un fullerène.

III. Synthèse du cyclopeptide sur support solide [46].

1. Description générale.

La synthèse du cyclopeptide [46] est envisagée par une voie similaire à celle qui a permis d'obtenir le cyclopeptide [1].

Un Glu, dont la chaîne latérale est protégée par un Dmab, sera utilisé lors du couplage du cinquième acide aminé. (Schéma II-6) Le Dmab est un groupement protecteur qui est résistant aux conditions de synthèse. Sa déprotection devrait permettre de conserver les autres groupements protecteurs et le peptide sur résine. En effet, le Dmab résiste aux acides, aux amines et il faut un réducteur comme l'hydrazine pour l'éliminer.

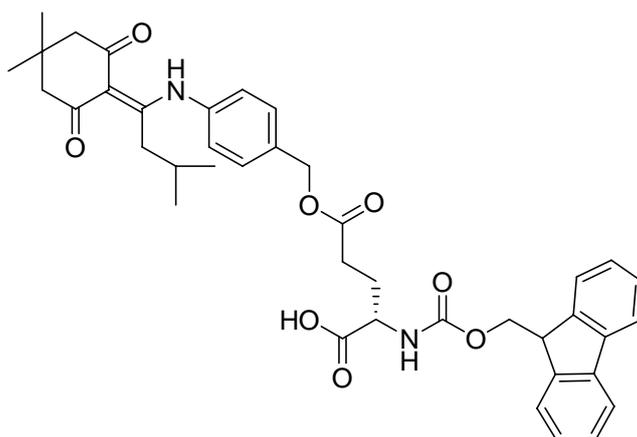


Schéma II-6 : Formule semi-développée du Fmoc-Glu(ODmab)-OH.

2. Synthèse.

a. Synthèse classique.

La cyclisation a été encore une fois l'étape limitante. Malgré la position éloignée de l'acide aminé Glu(ODmab) des deux acides aminés engagés dans l'étape de cyclisation, la taille plus importante du groupement protecteur perturbe cette étape. Le peptide cyclique est observé parmi un ensemble d'autres peptides de structure non déterminée. La cinétique de réaction étant plus lente que celle pour le cyclopeptide [1], des réactions secondaires ont sans doute lieu.

Les meilleures conditions pour la cyclisation sont encore une fois trouvées à l'aide du DIC en présence d'HOAt dans le DMF. Cependant, le peptide cyclique représente 50% des composés peptidiques présents sur la résine.

La déprotection du Glu(ODmab) est réalisée alors à l'aide d'hydrazine en solution dans le DMF. Le cyclopeptide déprotégé [46] est alors disponible sur résine. Il faut cependant noter que dans ce cas des impuretés sont conservées sur la résine. (**Schéma II-7**)

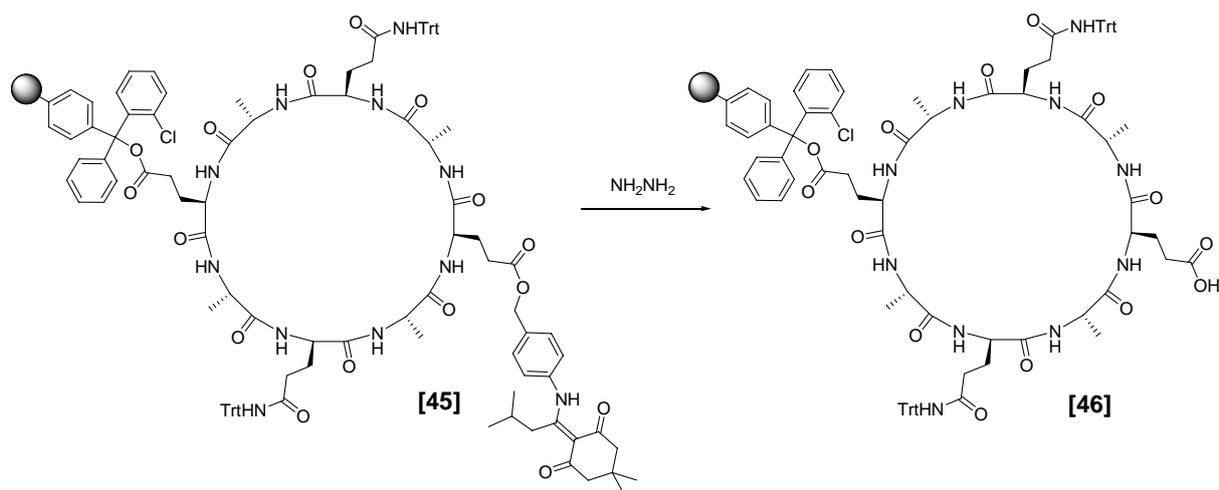


Schéma II-7 : Réaction de déprotection de la fonction acide carboxylique sur support solide.

Il est à noter que la déprotection du Dmab réalisée avant l'étape de cyclisation ne permet pas d'obtenir le produit souhaité avec un meilleur rendement.

b. Synthèse à l'aide des micro-ondes.

Afin d'améliorer cette synthèse, l'utilisation des micro-ondes a été envisagée. L'intérêt de cette technique est de modifier la cinétique de cyclisation pour avoir une sélectivité plus importante. De plus, cela peut permettre de réaliser la synthèse du peptide linéaire et la déprotection de la chaîne principale dans des temps très courts.

La fonctionnalisation de la résine par le premier acide aminé est réalisée de manière classique pour conserver un taux de chargement moyen. Les couplages peptidiques conduisant à l'octapeptide linéaire protégé sont réalisés sans contrôle en cours de synthèse (tests UV et tests de Kaiser). Les temps de réactions sont de l'ordre de la dizaine de minutes et le peptide linéaire est obtenu sans impuretés. La déprotection de la chaîne principale est obtenue en 5 minutes par micro-ondes sans modifier les conditions de réaction classique (au lieu de 24 heures par la méthode sans effet micro-ondes).

Malheureusement, la cyclisation n'a pas donné les résultats espérés que ce soit avec le PyBOP ou avec le PyAOP comme agent de couplage. En effet, la réaction n'est pas plus sélective, les mêmes impuretés sont observées dans ces cas.

3. Conclusion.

La synthèse du cyclopeptide [46] a présenté des problèmes de sélectivité lors de l'étape de cyclisation. L'apport des micro-ondes n'a pas amélioré cette réaction mais a permis d'obtenir le peptide linéaire en des temps très court et sans impuretés.

Le cyclopeptide [46] a été synthétisé sur support solide. Bien que contaminé par des impuretés, il pourra être utilisé pour la suite du projet.

IV. Conclusion.

Deux cyclopeptides ont été conçus pour réaliser l'étape de couplage avec le fullerène, l'un possédant une fonction amine, [42], et l'autre une fonction acide carboxylique, [46]. L'étape de cyclisation pour obtenir le cyclopeptide [46] a posé quelques difficultés. L'utilisation du composé [46] devrait cependant être possible pour la suite du projet en espérant pouvoir extraire les impuretés après couplage avec le fullerène. En revanche, la synthèse du cyclopeptide [42] n'a pas posé de difficultés particulières.

C. Couplages sur support solide.

I. Introduction.

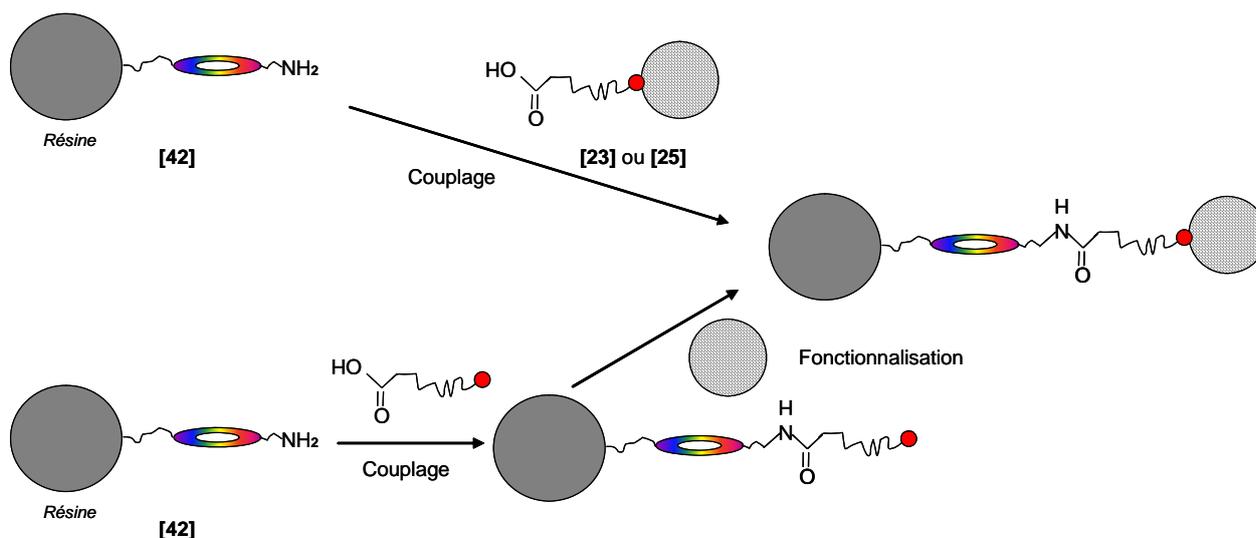
Les couplages peptidiques entre fullerène et cyclopeptides sur support solide sont envisagés à l'aide des mêmes fullerènes que précédemment. (Voir partie 1-C-II) La solubilité de ces substrats dans le DMF permet d'envisager un couplage sur support solide avec les cyclopeptides.

Les essais de couplage avec le composé [42] seront décrits dans un premier temps, puis ceux avec le composé [46] dans un second temps.

II. Couplages du cyclopeptide [42] avec un fullerène.

1. Introduction.

Deux stratégies pour lier de manière covalente le cyclopeptide [42] avec un fullerène sont envisagées. La première consiste à réaliser le couplage sur support solide entre le cyclopeptide [42] et les fullerènes [23] et [25] préalablement décrits (voir Partie 1). La seconde envisage de réaliser le couplage peptidique avec un bras espaceur avant la fonctionnalisation sur le fullerène. (Schéma II-8)



SchémaII-8 : Représentation schématique des deux stratégies envisagées : a/ fonctionnalisation puis couplage, b/ couplage puis fonctionnalisation.

2. Réactions.

a. Première stratégie.

La réaction de couplage entre le cyclopeptide [42] et le fullerène [25] a été tentée à l'aide de PyBrOP comme agent de couplage et en présence de DIEA. (Schéma II-9) Le choix de l'agent de couplage repose sur le fait que celui-ci est couramment utilisé pour les couplages difficiles.

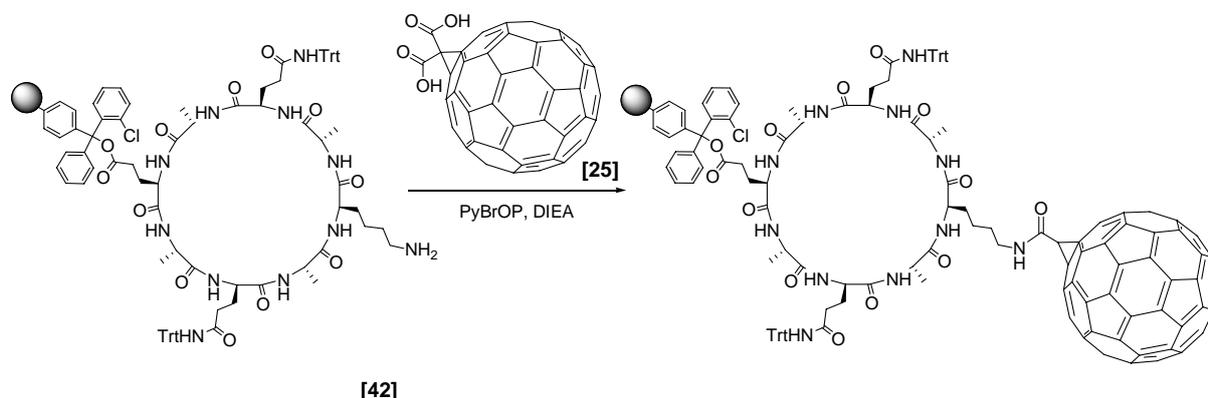


Schéma II-9 : Réaction de couplage entre [40] et [25].

Les conditions de couplages utilisant une base, la DIEA, provoquent la décarboxylation d'une des deux fonctions acide carboxylique. Le couplage ne peut avoir lieu alors qu'avec une seule fonction acide.

Le produit de clivage après réaction durant une semaine ne contient pas de fullerène d'après la RMN¹H et la LC/MS.

La réaction de couplage avec le fullerène [23] ne peut avoir lieu dans ce cas car, dans les conditions de réaction, la décarboxylation de la fonction acide libre entraîne l'absence de fonction acide disponible sur le fullerène (l'autre fonction acide étant protégée).

b. Seconde stratégie.

La première étape consiste à réaliser un couplage peptidique entre le cyclopeptide [42] et un bras espaceur, l'acide bromo-phényle acétique pour donner le composé [47]. La seconde étape consiste à fonctionnaliser le fullerène par cyclopropanation.

Ce type de réaction est courant et des polyéthylènes glycols, ou d'autres types de molécules ont été fixés sur des fullerènes par cette stratégie. Elle semble adaptée dans notre cas dans la mesure où les réactions se font à température ambiante, bien qu'elles n'aient pas été décrites sur support solide.

Le couplage a alors été réalisé entre le cyclopeptide [42] et le bras espaceur à l'aide de DIC et en présence d'HOAt. La réaction a montré un taux de conversion de 100%, selon la LC/MS. (Schéma II-10)

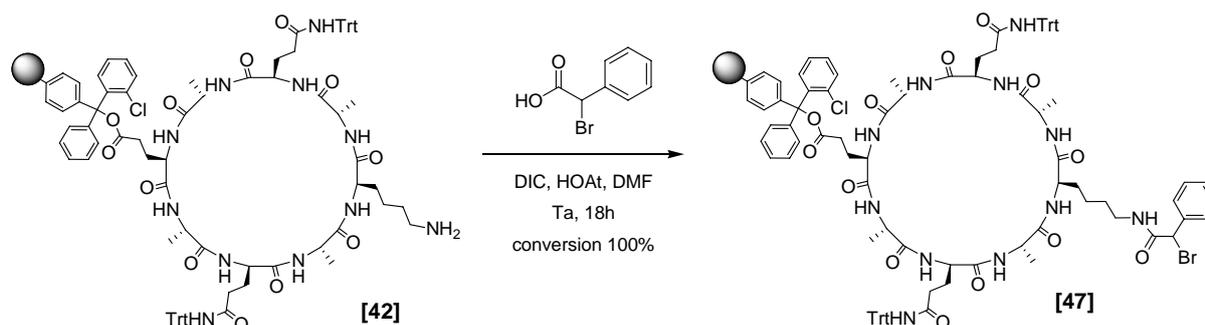


Schéma II-10 : Couplage peptidique entre [42] et l'acide bromo-phényle acétique.

Il est important ici de noter que le produit obtenu [48] par clivage de la résine n'est pas soluble dans les solvants organiques et son couplage avec le fullerène en solution semble compromis. Le peptide est alors maintenu sur support solide pour l'étape de fonctionnalisation du fullerène C₆₀.

La fonctionnalisation sur le fullerène a alors été tentée sur support solide dans le toluène en présence de DBU à température ambiante. (Schéma II-11)

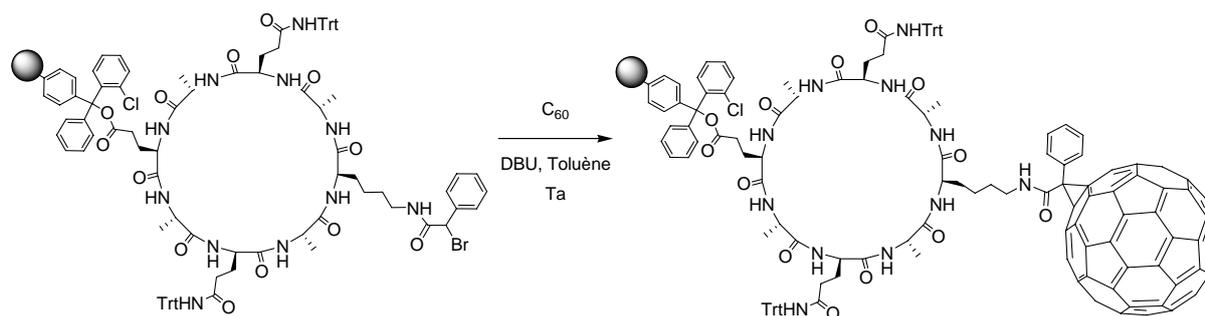


Schéma II-11 : Réaction de fonctionnalisation du fullerène C₆₀.

Le produit de couplage n'a pas été détecté et la réaction n'a pas permis d'obtenir le produit souhaité. En effet, aucun produit de couplage n'a été détecté par RMN¹H et LC/MS.

3. Conclusion.

Deux voies de synthèse de composé mixte fullerène/cyclopeptide ont fait l'objet de ce chapitre. Que ce soit l'une ou l'autre des stratégies utilisées, la voie sur support solide ne semble pas adaptée.

III. Couplage à l'aide du cyclopeptide [46].

1. Introduction.

Le cyclopeptide [46] sur support solide contient une fonction acide carboxylique déprotégée. La pureté de ce cyclopeptide sur résine n'est pas très bonne du fait de l'étape de cyclisation non sélective. Cependant, nous avons fait le choix de réaliser le couplage avec l'idée de purifier le produit après couplage.

Des réactions de couplage avec des fullerènes portant une fonction amine comme les composés [19] ou [21] préalablement décrits peuvent être tentées ici.

2. Couplages.

Les couplages réalisés mettent en jeu le cyclopeptide [46] et le composé [19] dans une réaction de couplage sur support solide. (Schéma II-12)

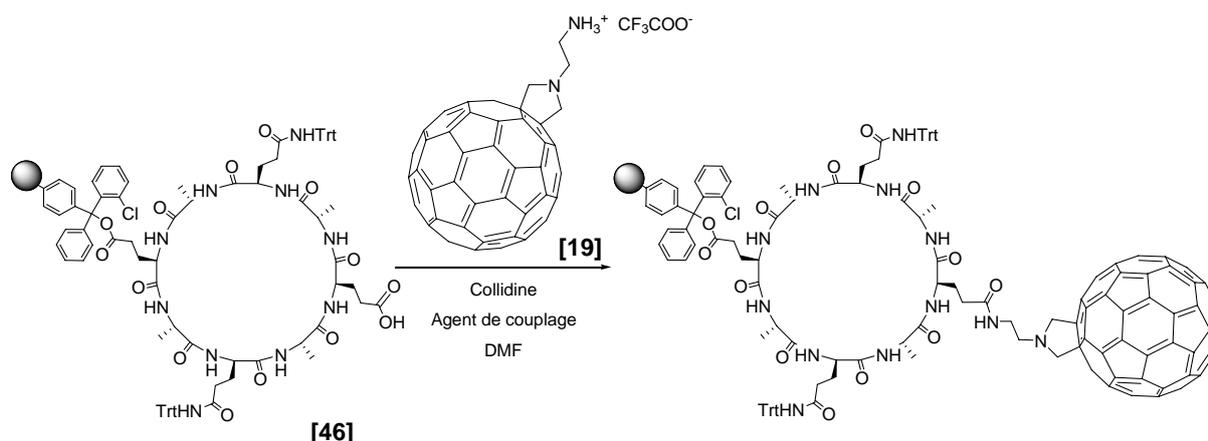


Schéma II-12 : Réactions de couplage.

Les différents essais consistent à faire varier les agents de couplage comme le DIC, le BOP, le PyBOP, le PyAOP, l'EDC, ou l'HATU. Les réactions sont arrêtées arbitrairement après une semaine.

Le suivi de la réaction est réalisé par LC/MS après clivage de la résine en contrôlant la quantité de cyclopeptide [46] consommée durant la réaction. Une réaction a retenu notre attention plus que les autres, le couplage réalisé à l'aide de PyAOP et en présence d'HOAt. En effet, selon la LC/MS plus de la moitié du cyclopeptide [46] est consommée lors de cette réaction. Différentes analyses ont alors été utilisées pour caractériser la présence du produit de couplage.

3. Caractérisations de l'essai réalisé à l'aide de PyAOP.

a. Par UV.

Des essais de mise en évidence de la présence de fullerène dans la poudre, résultante du clivage de la résine après réaction, sont réalisés en UV. Puisque le fullerène absorbe en UV, la possibilité de déterminer sa présence doit être possible.

D'après la forme des courbes d'absorbance entre 200 et 1000 nm dans un milieu alcalin comme dans d'autres solvants, une forte absorption de l'échantillon est observée sur l'ensemble du spectre. Cette absorption continue ne permet pas de conclure de la présence ou non de fullerène dans l'échantillon. La seule conclusion possible est que l'échantillon analysé est certainement organisé en solution, ce qui expliquerait l'absorption continue.

b. Par spectroscopie Raman.

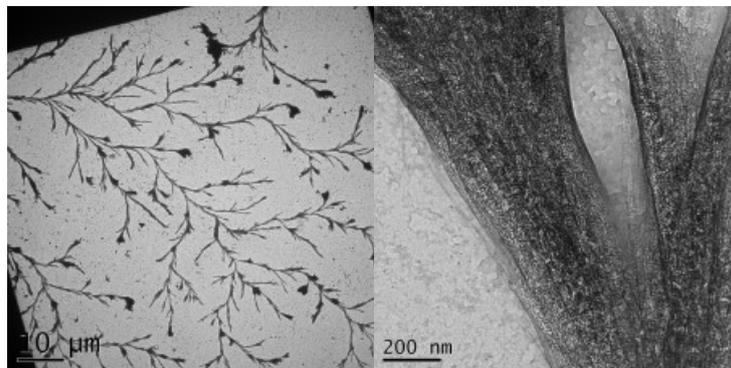
La poudre peut être analysée par Raman. En effet, cette technique peut mettre en évidence la présence de fullerène car celui-ci diffuse à des longueurs d'onde caractéristiques. Par contre, la fluorescence provoquée par l'échantillon analysé masque l'effet Raman. Ainsi, il n'est pas possible d'utiliser le spectroscope Raman pour caractériser la présence de fullerène.

c. Par Microscopie TEM.

Afin d'analyser l'organisation en solution suggérée par UV, une suspension de la poudre issue du clivage de la réaction à l'aide de PyAOP est préparé en milieu alcalin (pH 10).

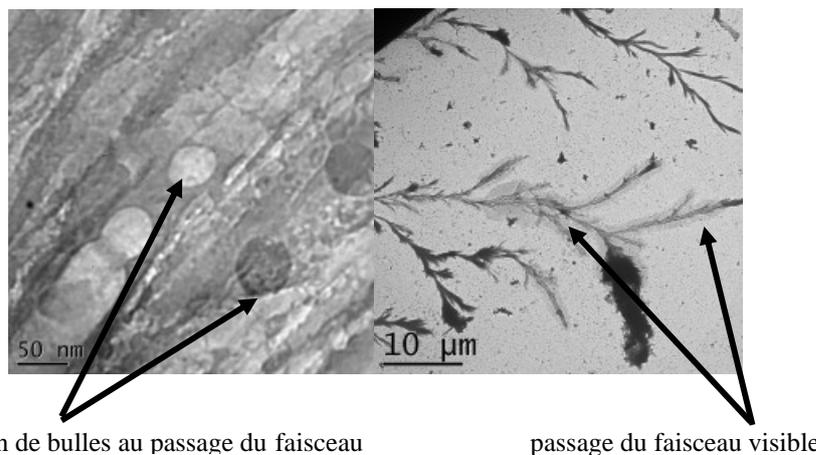
Une grille de TEM est réalisée sur la suspension et montre une auto-organisation très particulière (**Images II-1**)

On observe ici des structures contenant des branches se dédoublant plusieurs fois qui ressemblent à des structures fractales.



Images II-1 : Echantillon résultant du couplage sur support solide du cyclopeptide [10] et du fullerène [A] à l'aide de PyAOP.

Lorsque l'on utilise un grossissement plus important sur ces branches, on observe une texture granuleuse qui a tendance à s'évaporer sous le faisceau après quelque temps. (**Images II-2**) Cette évaporation peut être dû à la présence de matière organique dans la structure.



Images II-2 : Mise en évidence d'évaporation sous le faisceau.

La structure n'est donc pas rigide et contient de la matière organique.

d. Conclusion.

Les analyses réalisées n'ont pas permis de déterminer la présence de fullerène dans le produit après réaction sur support solide et clivage de la résine.

Par contre, une nouvelle organisation a été mise en évidence. Cette structure n'est pas stable, elle se décompose sous la chaleur du faisceau d'électron ou par dissolution. Les analyses semblent montrer que du cyclopeptide est présent dans la structure.

3. Conclusion

Différents essais de couplages entre le cyclopeptide [46] et le fullerène fonctionnalisé [19] ont été réalisés. Malheureusement, aucune technique n'a permis de caractériser un éventuel couplage.

En revanche, l'utilisation de la microscopie a mis en évidence une organisation supramoléculaire dont la nature reste à déterminer. Cette caractérisation va faire l'objet du prochain chapitre.

IV. Analyse de la nature des organisations supramoléculaires en branches.

1. Introduction.

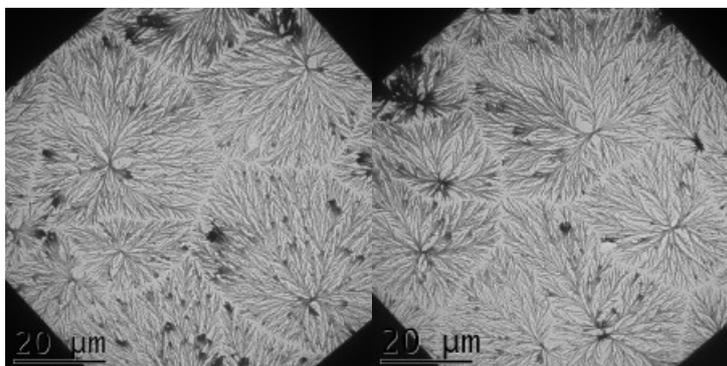
Puisqu'aucune analyse ne permet de déterminer la nature des composés formant la structure ramifiée, une nouvelle stratégie est mise au point. Chaque élément pouvant intervenir dans l'organisation va être étudié séparément. De plus, nous allons tenter de mettre en évidence la nécessité de la présence du fullerène pour obtenir les images de structure en branches.

2. Réaction de couplage sans fullerène.

Afin de prouver l'intervention du fullerène dans la structure en branches, le cyclopeptide [46] est mis en conditions de couplage (PyAOP, HOAt, collidine) sans

introduction de fullerène. Après une semaine, un clivage est réalisé et une solution alcaline est préparée pour analyse en TEM.

Les images obtenues représentent des structures fractales identiques à celles déjà observées. (**Images II-8**)



Images II-8 : Images obtenues à partir d'une solution alcaline issue de la réaction sans fullerène.

Ainsi, le fullerène n'est pas impliqué dans l'organisation en structure fractale préalablement observée. Si un couplage a eu lieu entre le cyclopeptide [46] et le fullerène [19], celui-ci n'intervient pas dans les structures en branches obtenues.

3. Etude TEM.

a. Sur support solide.

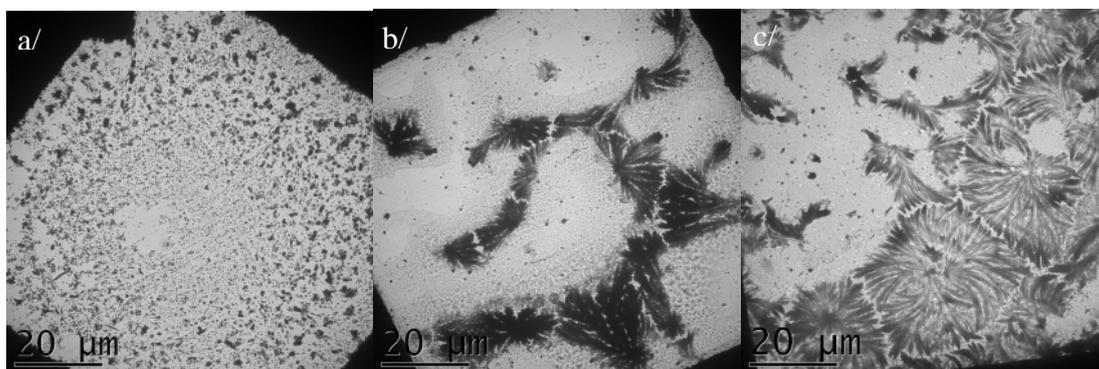
Pour comprendre la structure, des essais de réactions sans fullerènes ont été réalisés sur support solide avec différents substrats dans les conditions opératoires déjà décrites en présence de PyAOP, d'HOAt et de collidine. Les paramètres modifiés entre chaque essai sont la présence ou non de groupements protecteurs sur la fonction acide carboxylique en position 5 (ODmab, OtBu, OH), l'utilisation du cyclopeptide [46], du peptide linéaire et même d'une résine contenant un seul acide aminé.

Tous ces essais n'ont pas permis d'obtenir les structures en branches. Cela montre que ces structures ne sont pas composées de peptide linéaire, de peptide cyclique protégé. La présence de la fonction acide carboxylique en position 5 est indispensable. La résine, dont on a supposé une dégradation lors du clivage, n'est pas non plus un des éléments qui compose la structure.

b. Cyclopeptides.

Le cyclopeptide [46] est clivé de la résine et analysé en TEM pour vérifier son implication dans la structure en branche.

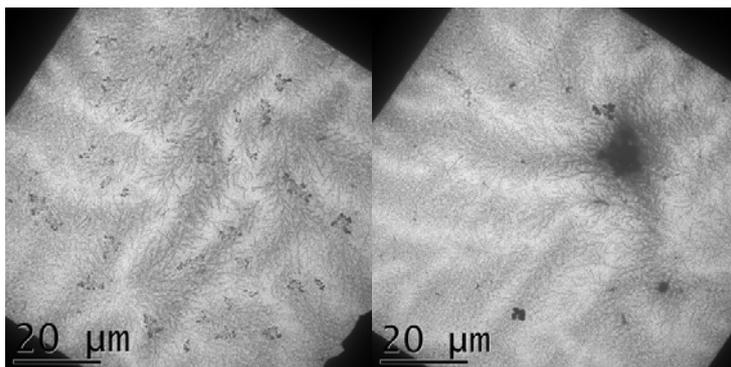
Lorsqu'une solution alcaline de NaOH de cyclopeptide [46] mise en présence d'une trace de PyAOP, d'HOAt et de collidine est analysée par TEM, aucune structure n'est observée. Sans PyAOP et HOAt en revanche, on observe une organisation. Le peptide n'est alors plus en présence que de collidine en milieu alcalin. Sans collidine, les structures sont toujours observées. Cela montre que le cyclopeptide seul, nouveau lot du cyclopeptide [1] (issu de la synthèse du cyclopeptide [46]), en milieu alcalin s'organise pour donner des structures en branches. (**Images II-9**)



Images II-9 : Images des solutions salines du cyclopeptide [1] clivé de la résine avec a/ en présence de PyAOP, HOAt et collidine, b/ en présence de collidine et c/ seul.

Puisque la poudre analysée ne contient pas exclusivement le cyclopeptide, une impureté pourrait être responsable de l'auto-assemblage. Afin de vérifier cette hypothèse, l'étude est réalisée sur un lot de cyclopeptide [1] propre.

Le cyclopeptide [1] est analysé en solution NaOH. Les images TEM obtenues montrent que, lorsque les deux acides carboxyliques sous la forme de dicarboxylates de sodium, nous observons en TEM des structures en branches. (**Images II-10**)



Images II-10 : *Images de solutions de cyclopeptide [1] sous la forme de dicarboxylates de sodium.*

Ainsi, les structures en branches seraient constituées de cyclopeptide [1] sous forme de dicarboxylates de sodium.

4. Conclusion.

L'étude en TEM a permis de mettre en évidence que le cyclopeptide [1] sous forme de dicarboxylates de sodium, s'auto-assemble pour former des structures en branches semi-fractales. Le fullerène n'a donc aucun effet sur l'organisation.

D. Conclusion.

Une stratégie sur support solide a été tentée pour réaliser le couplage entre un cyclopeptide et un fullerène. Pour ce faire, deux cyclopeptides ont été utilisés avec des fonctions acides ou amines. Les différentes réactions n'ont pas permis d'obtenir un produit de couplage. La synthèse sur support solide ne constitue pas alors une solution pour la réalisation du projet.

Lors de ces essais, une nouvelle organisation supramoléculaire a pu être mise en évidence. Le fullerène n'est pas impliqué dans cette structure.

En revanche, des études réalisées en TEM ont montré que le cyclopeptide [1] participe à cette organisation de structures ramifiées de type fractale. Bien que le cyclopeptide en solution alcaline ne soit pas organisé, il s'auto-assemble lors de la cristallisation sur la grille de TEM.

Cette nouvelle organisation va faire l'objet de la partie suivante de ce manuscrit.

Partie III

Nouvelles architectures supramoléculaires à base de cyclopeptides.

A. Introduction.

Dans les chapitres précédents, nous avons montré qu'un octacyclopeptide, le *cyclo*[-(D-Ala-Gln-D-Ala-Glu)₂-] [1] est capable de former des assemblages différents selon son degré de salification. (**Schéma III-1**) En effet, lorsque le cyclopeptide [1] est sous la forme acide, il s'auto-assemble pour donner des nanotubes de peptides. Lorsqu'il est sous forme de dicarboxylates de sodium, il s'organise pour donner les assemblages fractals observés.

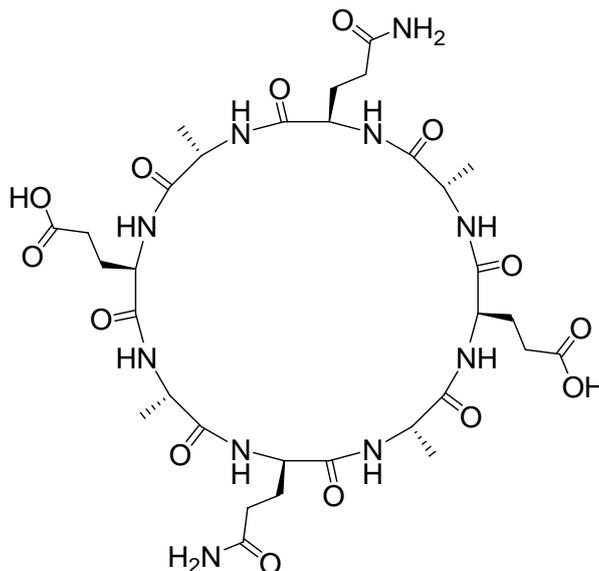


Schéma III-1 : Structure semi-développée du cyclopeptide [1].

La formation des structures supramoléculaires fractales de composés peptidiques n'est pas décrite à ce jour, à notre connaissance. Cependant, faisant appel à des peptides comme substrats, il existe quelques exemples de structures fractales qui sont issues de liaisons covalentes.¹

Nous allons aborder ici les conditions permettant d'obtenir ces structures supramoléculaires et les premiers indices concernant la nature des organisations.

B. Organisations supramoléculaires en fonction des contre-ions alcalins portés par le cyclopeptide [1].

I. Introduction.

Nous avons montré que le cyclopeptide [1], contenant deux fonctions acides carboxyliques, est capable sous forme de sel de sodium de cristalliser sous la forme de structures fractales. Nous allons dans un premier temps tâcher de mieux comprendre les conditions à mettre en œuvre pour obtenir de manière reproductible cette organisation, le mode de croissance des cristaux et proposer un début d'explication d'organisation.

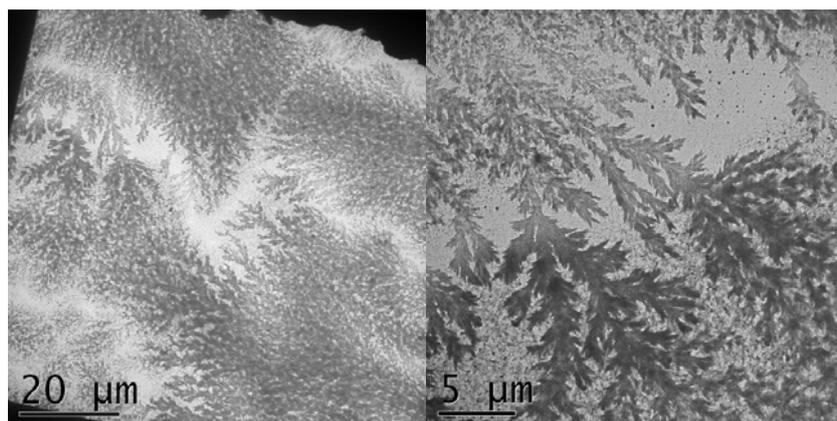
Le sodium fait partie des éléments du groupe 1 du tableau périodique, les alcalins. Les autres éléments, le lithium (Li), le potassium (K), le rubidium (Rb) et le césium (Cs) peuvent également être utilisés comme contre-ions car ce sont également des bases fortes sous leur forme hydroxyde. Il est à noter que le francium (Fr) ne sera pas étudié car c'est un élément radioactif. La principale différence entre ces éléments est basée sur leur taille. Les rayons de Van Der Waals sont respectivement pour Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ et Cs^+ de 1,55, 1,90, 2,35, 2,48 et 2,67 Å. L'organisation pourrait être différentes selon que le cyclopeptide [1] soit sous la forme de diacides, de mono-sel ou de di-sels. Il est alors important de contrôler avec précision la salification du peptide.

II. Le sodium.

1. Utilisation de solution de soude.

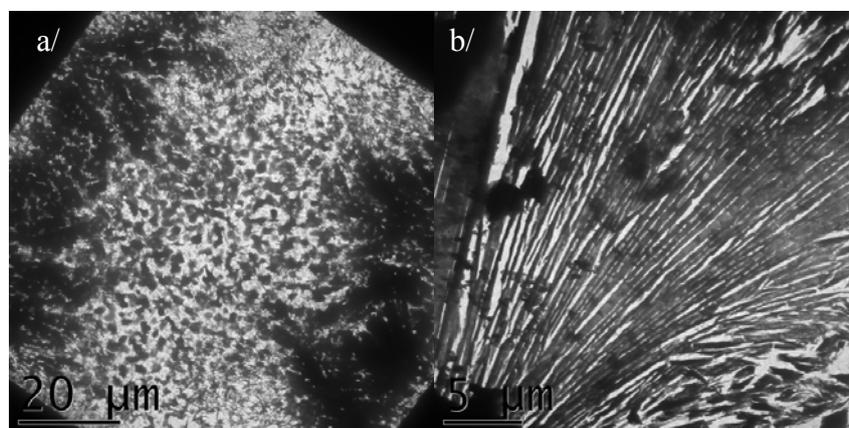
Nous avons, dans un premier temps voulu étudier l'influence de la concentration en cyclopeptide [1] et en soude sur l'organisation supramoléculaire. Pour cela, des concentrations en cyclopeptide de 1, 4 et 12 mg.mL^{-1} dans des solutions de soude à 0,01, 0,1, 0,5 et 1 M ont été réalisées.

Les échantillons préparés sont observés en TEM. Les plus belles images d'organisations supramoléculaires fractales sont obtenues à partir d'une concentration faible en cyclopeptide [1] 1 mg.mL^{-1} dans une solution 0,01 M en NaOH. (**Images III-1**)



Images III-1 : Images TEM du cyclopeptide [1] à 1 mg.mL^{-1} dans une solution de soude à $0,01 \text{ M}$.

Pour des concentrations en peptides plus élevées, des amas sont observés laissant penser que les quantités de peptide sont trop élevées pour laisser le temps à l'ensemble de se structurer avant séchage complet de la goutte. (**Images III-2 a/**) Il est possible également que la quantité de structure soit trop importante pour qu'il soit possible de les observer. De plus, de trop importantes quantités en base ne permettent plus d'organisations supramoléculaires. On observe des cristaux de soude et non plus des assemblages supramoléculaires. (**Images III-2 b/**)



Images III-2 : Images TEM des solutions 12 mg.mL^{-1} en [1] dans des solutions a/ $0,1 \text{ M}$ et b/ 1 M de soude.

Le pH de la solution en cyclopeptide [1] 1 mg.mL^{-1} pour une solution $0,01 \text{ M}$ en NaOH est de 12 et les risques de racémisations sont très élevés. Ces racémisations doivent avoir lieu et il n'est pas possible d'identifier si ce sont les cyclopeptides épimérisés qui constituent la structure ou ceux qui ne le sont pas encore.

Il est alors important de travailler avec des concentration en soude plus faibles afin d'être sûr que l'alternance D et L est nécessaire à l'organisation semi-fractale.

2. *Étude de la formation du mono-sel et du di-sel de sodium du cyclopeptide [1].*

a. Stratégies.

Afin de contrôler la salification du cyclopeptide [1], nous avons envisagé d'utiliser une titration du cyclopeptide [1] par une solution de soude avec suivi du pH. La titration réalisée est une titration d'un diacide faible par une base forte. Les pKa des deux acides glutamiques sont attendus autour de 4,5 et 7.

Pourtant, cela pose des difficultés dans la mesure où le cyclopeptide [1] est insoluble sous sa forme acide. Le problème est de connaître la cinétique de solubilisation du peptide lorsqu'une base est ajoutée.

Nous avons dans un premier temps réalisé la salification par ajout successif de solution de soude après stabilisation du pH mais les cinétiques se sont révélées très lentes. Nous avons alors choisi de ne pas attendre la stabilisation du pH pour atteindre les formes mono et di-sel de sodium.

b. Salification lente.

La première approche est réalisée en ajoutant la soude par fraction. La fraction suivante étant ajoutée lorsque le pH est totalement stabilisé. Une concentration de 2 mg.mL^{-1} de cyclopeptide [1] est titrée à l'aide d'une solution de soude à 12,5 mM. La quantité de solution de soude à ajouter est calculée pour atteindre une concentration en peptide d'environ 1 mg.mL^{-1} sous la forme de di-sel de sodium. En effet, cette concentration peptidique correspond aux précédents résultats qui donnent des assemblages supramoléculaires.

Lors de la titration, le pH ne se stabilise qu'après 24 h voire 48 h. Lorsque la quantité de soude pour être à la seconde équivalence est ajoutée, les valeurs de pH sont anormalement faibles (pH de 7,5 alors qu'il est attendu à pH 8,5).

L'analyse a montré que l'on réalisait avec des temps aussi long la titration du dioxyde de carbone qui se dissous au fur et à mesure dans la solution et dont le pKa est de 6,35. Ce qui fait que les valeurs de pH sont faussées.

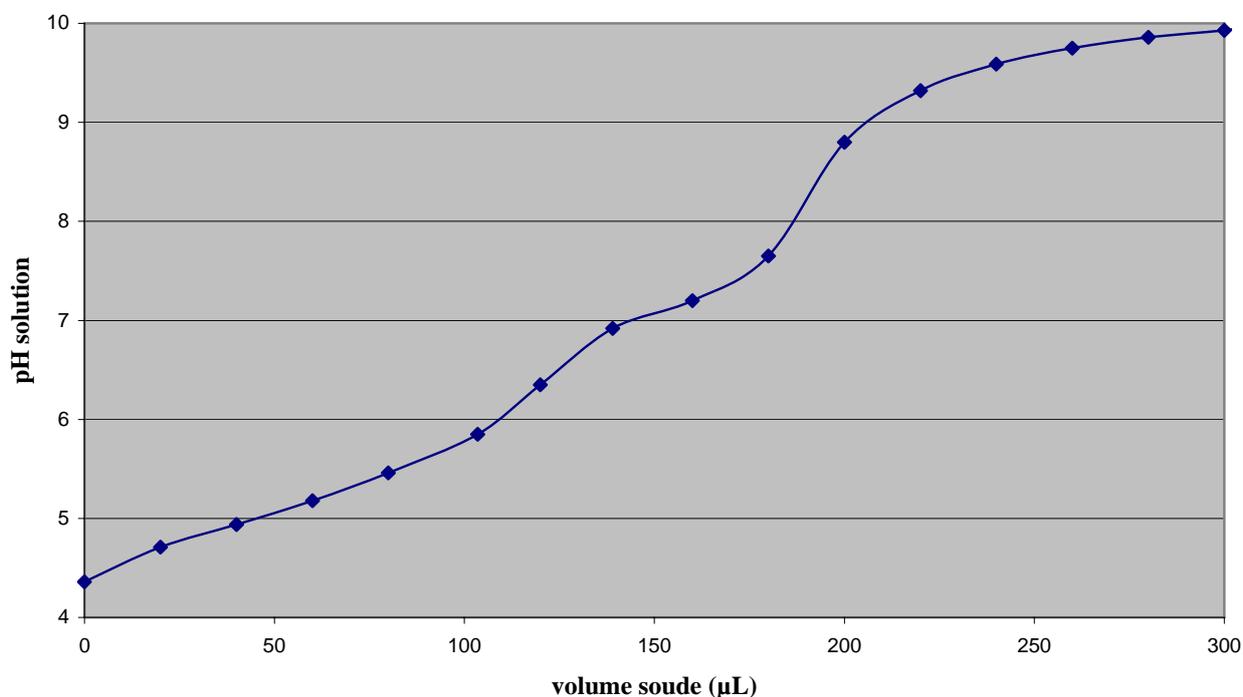
Cette stratégie longue et faussée par la titration de dioxyde de carbone n'est donc pas adaptée dans notre cas.

c. Salification rapide.

La salification est réalisée avec des temps d'ajout de soude courts, de l'ordre de 10 minutes. Les valeurs de pH sont alors fausses puisqu'il doit rester de la soude n'ayant pas réagi avec le peptide. Mais dans ce cas, le dioxyde de carbone n'influe pas sur le pH.

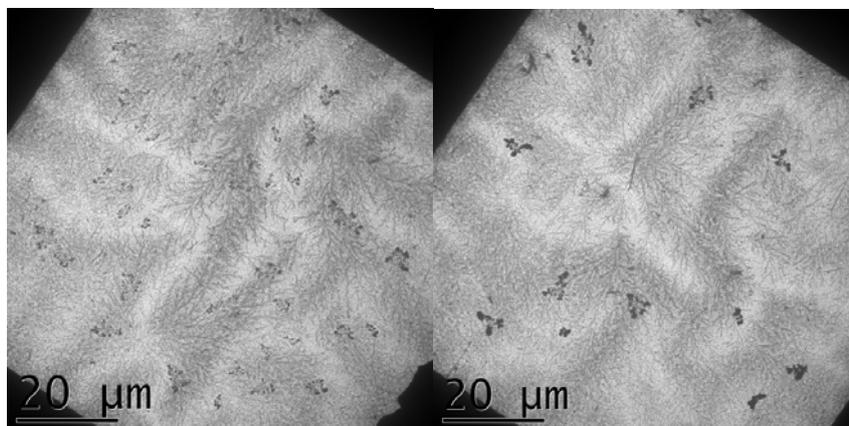
Une concentration de 2 mg.mL^{-1} de cyclopeptide [1] est titrée, cette fois encore, à l'aide d'une solution de soude 12,5 mM. Il est observé que dès la première équivalence le peptide est totalement soluble.

L'allure générale de la courbe est conforme à la titration d'un diacide faible par une base forte. Le premier saut de pH est faible alors que le second est plus prononcé. Les équivalences sont à pH_{e1} 6,3-6,5 et pH_{e2} 8,5 comme attendu. (**Graphique III-3**)



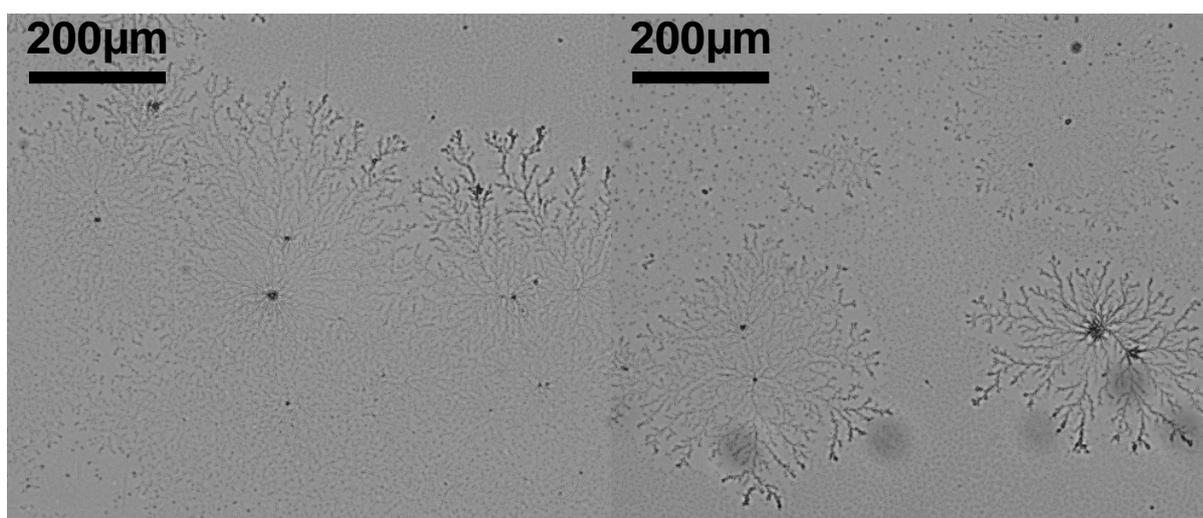
Graphique III-1 : Courbe de titration du cyclopeptide [1] 2 mg.mL^{-1} par une solution de soude à 12,5 mM.

Des prélèvements de la solution sont effectués à différents pH et observés en TEM. Les images montrent que c'est au voisinage de la seconde équivalence que les organisations supramoléculaires sont observées. (**Images III-3**)



Images III-3 : *Images TEM du di-sel de sodium du cyclopeptide [1].*

Les dimensions des objets à analyser étant plutôt de l'ordre de la centaine de micron que du nanomètre, l'utilisation du TOM (Microscope Optique à Transmission) paraît plus adapté. En effet, le dépôt sur plaque de verre et l'observation à l'aide d'un faible grossissement de 10x seulement permet d'observer les structures sans difficulté. (**Images III-4**)



Images III-4 : *Images TOM du di-sel de sodium du cyclopeptide [1].*

Lorsque le cyclopeptide est sous la forme de mono-sel de sodium, les analyses par TEM et par TOM ne montrent aucune organisation supramoléculaire.

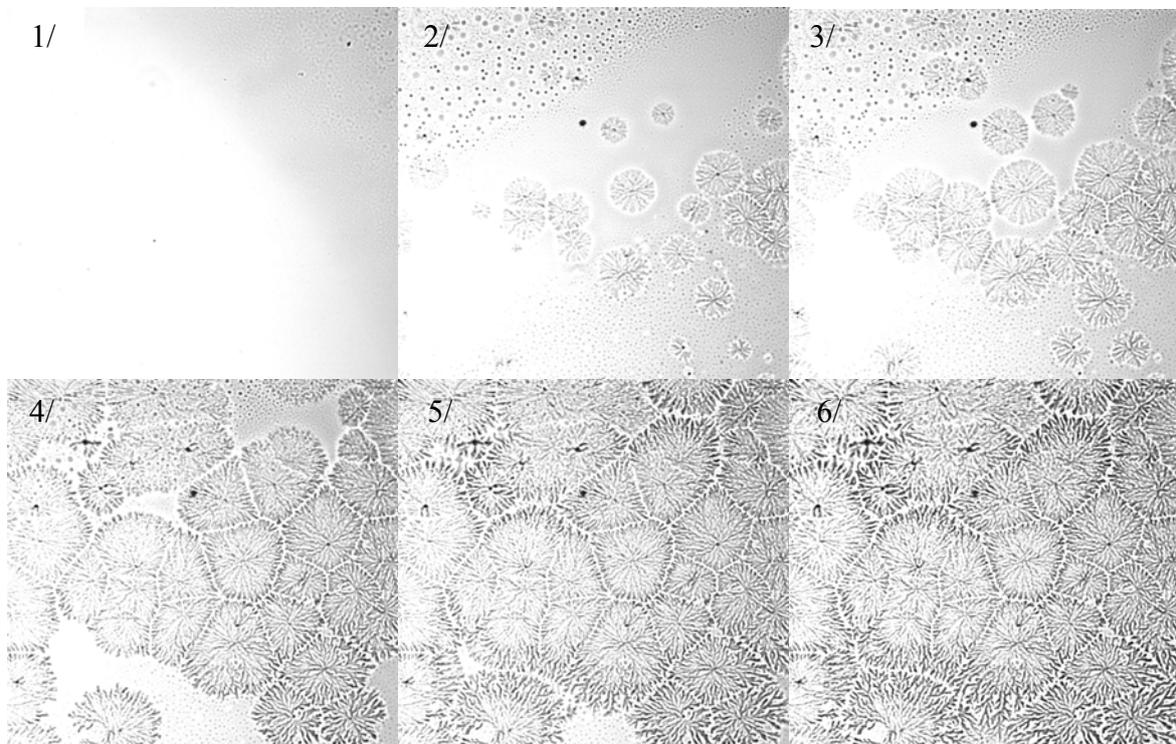
3. Étude de la dynamique de cristallisation

L'utilisation du TOM permet de suivre le séchage de la goutte puisque cette fois l'échantillon peut être observé à l'air libre (contrairement au TEM où l'échantillon est sous vide).

L'étude de la dynamique de séchage permet de mieux comprendre la croissance des cristaux. La goutte lors de son séchage va faire l'objet de forte tension à la surface et influencer la cristallisation. La cristallisation doit en théorie avoir lieu du bord de la goutte vers l'intérieur.

Or, les images obtenues montrent des cristaux isolés les uns des autres dont l'origine est plutôt au centre des structures. Ce qui ne devrait pas exister dans ce cas.

En effet, les images prises successivement lors des derniers instants de séchage de la goutte montrent bien que ces points d'origine des structures constituent des points de nucléation. La cristallisation a lieu en différents endroits simultanément juste avant le séchage total de la goutte, et non pas au bord de la goutte. Juste avant le séchage de la goutte, aucune organisation n'est observée. (**Images III-5**)



Images III-5 : Images de TOM prises successivement lors du séchage d'une solution de cyclopeptide [1] sous la forme de di-sel de sodium (de 1/ à 6/) ($t \sim 0,5$ s entre chaque photo).

4. Conclusion.

Nous avons mis en évidence que le dicarboxylate de cyclopeptide [1] est capable de former des structures supramoléculaires. L'utilisation de la technique de titration permet d'obtenir facilement le cyclopeptide sous forme mono et di-carboxylates. Une nouvelle technique de microscopie utilisée, le TOM, a permis d'étudier la dynamique de cristallisation. L'étude a montré que la formation de structures fractales se faisait juste avant séchage de la goutte et était initiée par des points de nucléation.

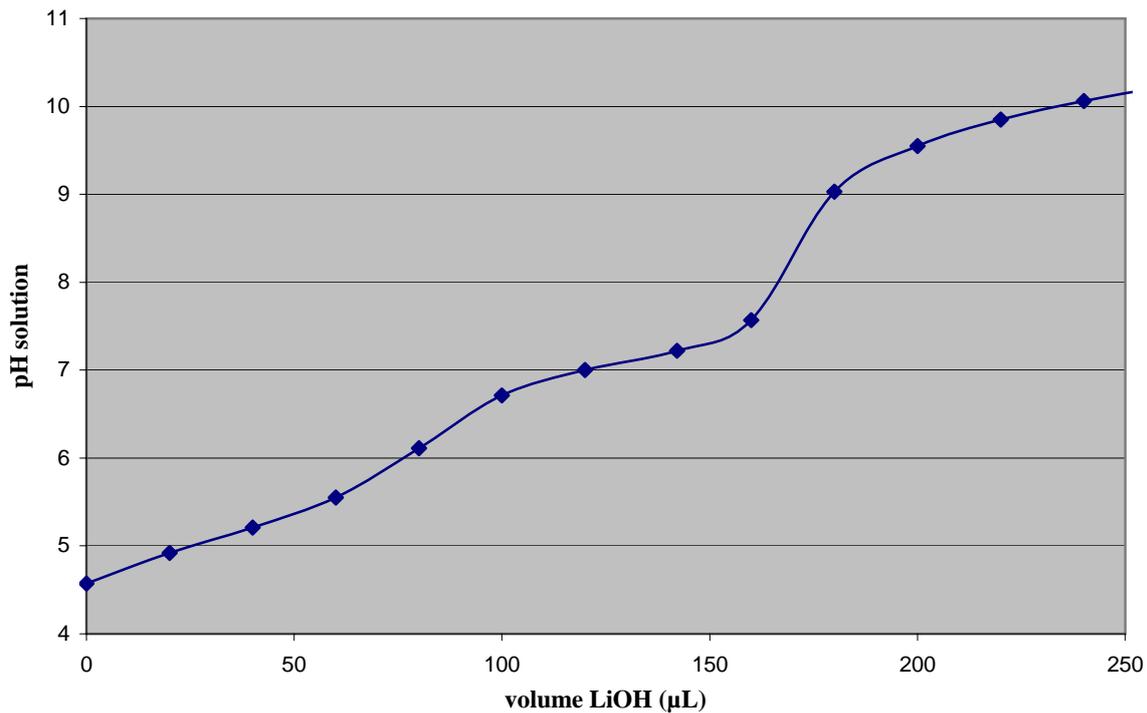
III. Les autres alcalins.

1. Le lithium.

a. La salification.

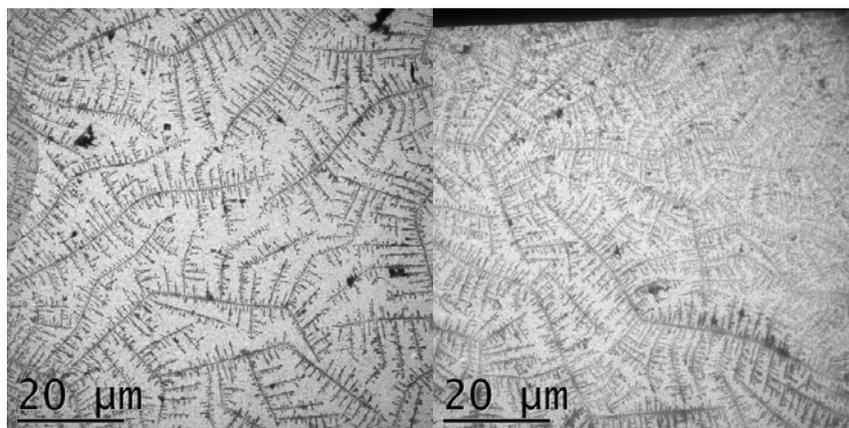
Le lithium, sous la forme du contre-ion d'acide carboxylique, a un rayon de Van der Waals plus petit que celui du sodium (1,55 au lieu de 1,90 Å). Si le contre-ion joue un rôle dans l'organisation lors du séchage de la goutte, des assemblages supramoléculaires différents pourraient être obtenus.

Afin de répondre à cette interrogation, la salification du cyclopeptide [1] par une solution de lithine est réalisée de la même manière qu'avec la soude. Comme prévue, dans la mesure où la lithine est une base forte, la forme de la courbe de titration est identique et présente les équivalences aux mêmes pH. La solubilisation du cyclopeptide est également observée après le pH_{el} . (**Graphique III-2**)



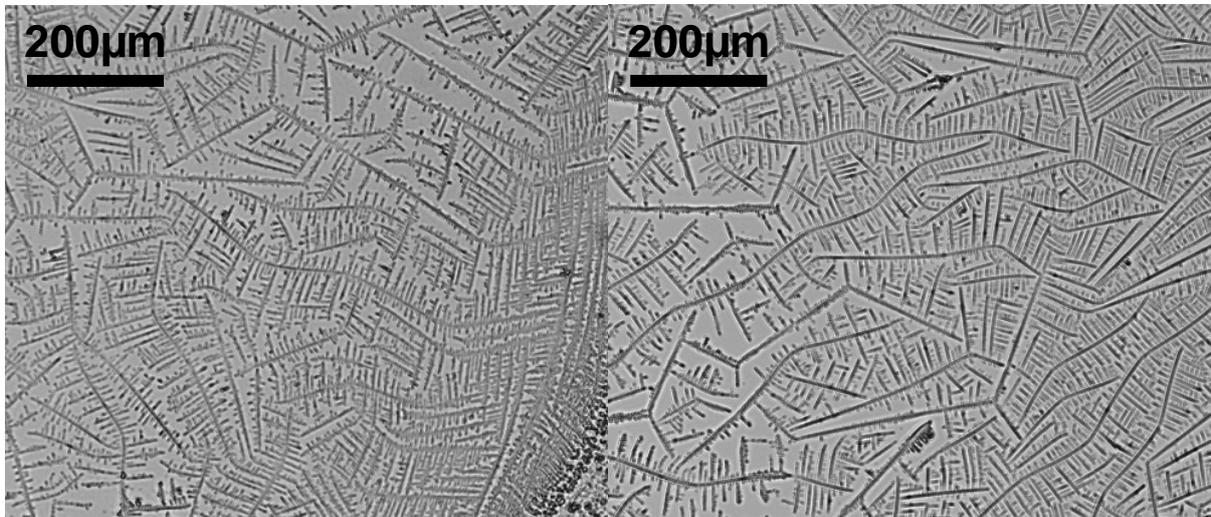
Graphique III-2 : Courbe de titration du cyclopeptide [1] à 2 mg.mL^{-1} par une solution de lithine $11,5 \text{ mM}$.

Le cyclopeptide sous forme de mono-sel et de di-sel de lithium est analysé en TEM. Pour le mono-sel de lithium, aucune structure supramoléculaire de dimension comparable aux structures semi-fractales obtenues avec la soude n'est observée. En revanche, le di-sel de lithium présente de nouvelles organisations supramoléculaires. (**Images III-6**)



Images III-6 : Images TEM obtenues à partir d'une solution de cyclopeptide [1] sous forme de di-sel de lithium.

Les dimensions des cristaux obtenus sont également très importantes et l'utilisation du TOM semble plus adaptée pour les observer avec un faible grossissement de 10 x. (**Images III-7**)

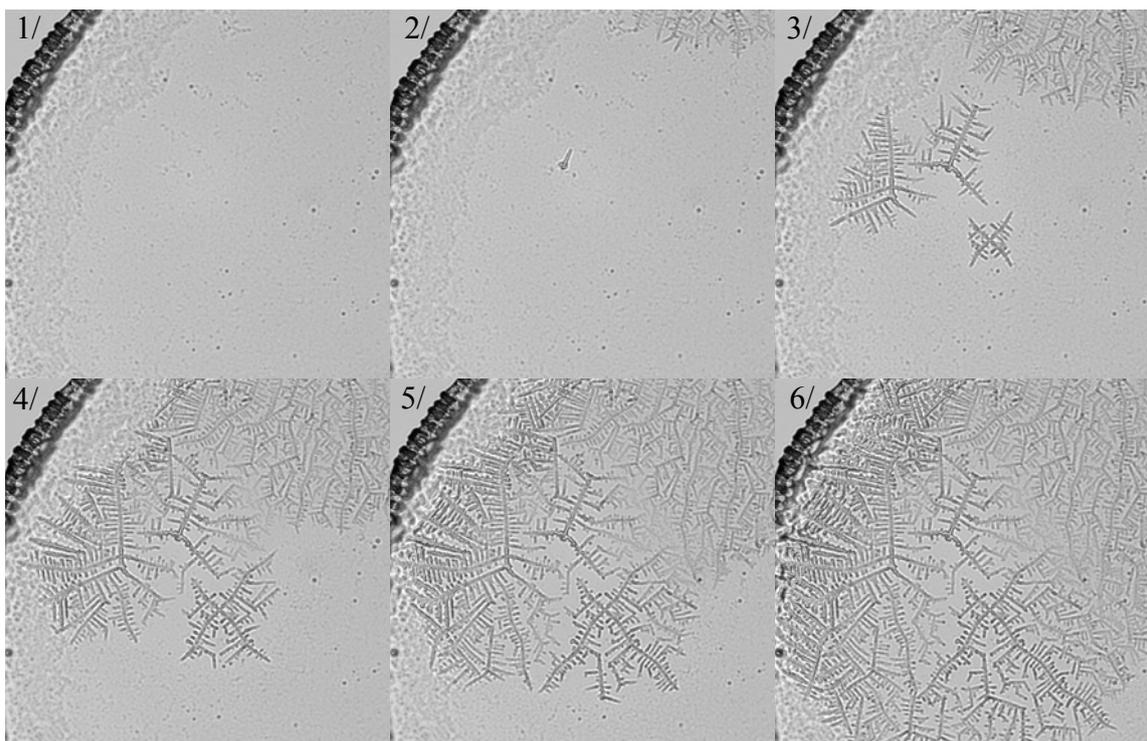


Images III-7 : Images TOM obtenues à partir d'une solution de cyclopeptide [1] titrée par de la lithine à 11,5 mM à a/ pH 7,8 et b/ pH 9.

Les cristaux comportent dans ce cas des angles approchant 90-95 ° autour d'une arête centrale qui peut être parfaitement droite ou légèrement courbée. L'orientation des cristaux les uns par rapport aux autres semble aléatoire. De plus, les cristaux ne se touchent pas entre eux, chaque croissance semble être indépendante.

b. Dynamique de cristallisation.

La dynamique de croissance est réalisée à l'aide d'une solution de cyclopeptide [1] sous la forme de di-sel de lithium et montre un mode de croissance des cristaux identique à celui obtenu à partir de la solution de di-sel de sodium. (**Images III-8**) La courbure de l'arête centrale semble due à un contournement près de cristaux déjà formés.



Images III-8 : Images de TOM prises successivement lors du séchage d'une solution de cyclopeptide [1] sous forme de di-sel de lithium (de 1/ à 6/), ($t=0,5$ s entre chaque photo).

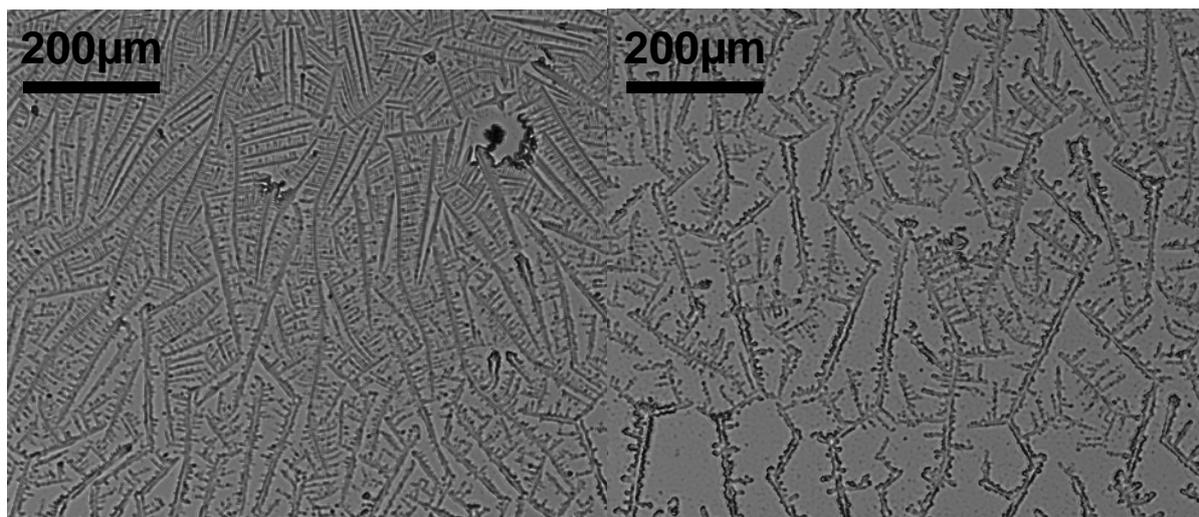
c. Conclusion.

Le lithium a été substitué au sodium comme contre-ion des fonctions acides carboxyliques du cyclopeptide [1]. Les organisations supramoléculaires obtenues n'ont plus la même forme. Le contre-ion doit donc influencer l'assemblage.

2. Le potassium, le rubidium et le césium.

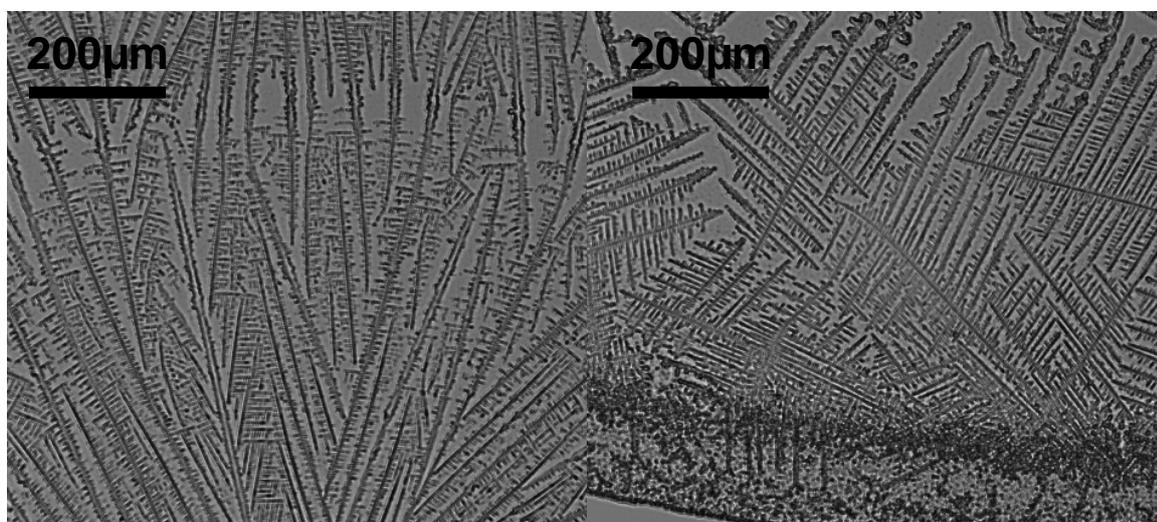
La salification du cyclopeptide [1] est réalisée dans les mêmes conditions à l'aide d'une solution de potasse, d'hydroxyde de rubidium ou d'hydroxyde de césium. Les di-sels de potassium, rubidium et césium analysés en TOM montrent également des assemblages supramoléculaires. (**Images III-9**)

Dans le cas du di-sel de potassium, les cristaux obtenus sont comparables à ceux des di-sel de lithium. Les cristaux semblent légèrement plus larges, notamment sur les arêtes centrales. L'orientation des cristaux entre eux suit des directions privilégiées et l'on peut observer une certaine homogénéité dans leur largeur.



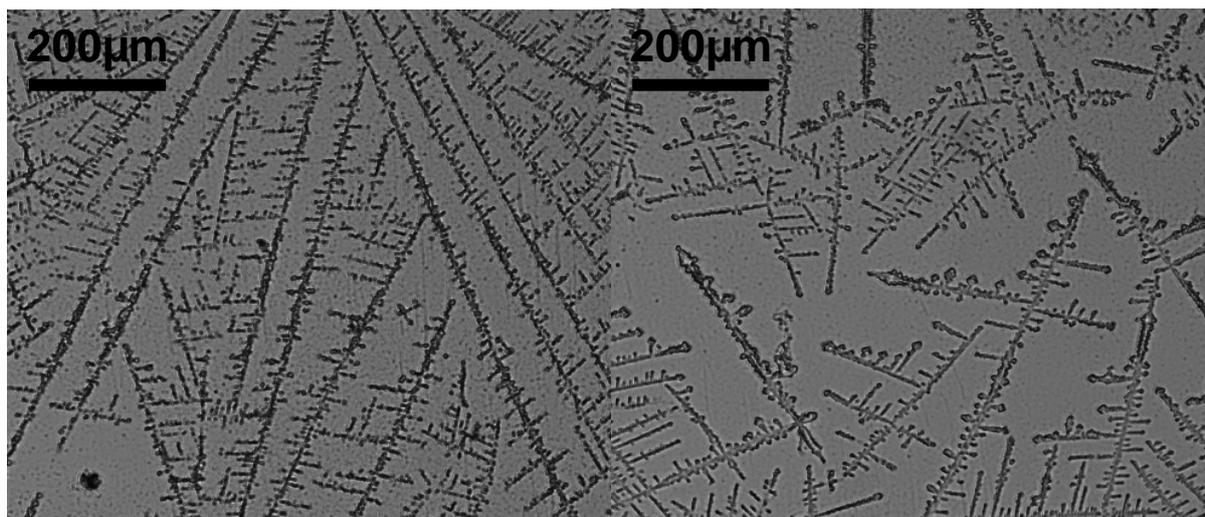
Images III-9 : Images TOM d'une solution de cyclopeptide [1] à 2 mg.mL^{-1} sous la forme de di-sel de potassium.

Dans le cas du di-sel de rubidium, les cristaux sont beaucoup plus grands et orientés de manière importante. (**Images III-10**) Les courbures des arêtes centrales sont faibles. De plus, on observe une certaine homogénéité dans la largeur des cristaux.



Images III-10 : Images TOM d'une solution de cyclopeptide [1] à 2 mg.mL^{-1} sous la forme de di-sel de rubidium.

Enfin, dans le cas du di-sel de césium, les cristaux sont encore une fois similaires à ceux que l'on observe avec le di-sel de lithium. Les espacements entre cristaux sont toutefois beaucoup plus grands. (**Images III-11**)



Images III-11 : Images TOM d'une solution de cyclopeptide [1] à 2 mg.mL^{-1} sous la forme de di-sel de césium.

Ainsi, l'utilisation du potassium, du rubidium ou du césium comme contre-ion permet également d'obtenir des organisations supramoléculaires. La forme de ces cristaux est assez différente des cristaux obtenus avec le lithium. Ces différences reposent surtout sur la taille de l'arête centrale et du nombre de ramification latérale.

3. Conclusion.

L'organisation du cyclopeptide [1] salifié par d'autres contre-ions que le sodium a été étudiée. Il est possible d'obtenir des organisations supramoléculaires variées en fonction du contre-ion (Li^+ , K^+ , Rb^+ et Cs^+).

Cependant, le sodium conduit à une organisation qui est bien différente de celles obtenues avec les autres contre-ions alcalins.

On peut remarquer qu'un effet d'ion métallique a déjà été observé dans le cas des pyroglutamates.² L'ion Na^+ s'est avéré être le seul à se lier à des fonctions amides sous forme cristalline alors que les ions Li^+ et Ca^{2+} se lient préférentiellement à la fonction acide. Dans notre cas, le sodium conduit aux structures qui ont le caractère « fractal » le plus marqué. Nous pouvons supposer un effet semblable qui favoriserait la croissance latérale par rapport à l'axe de la structure.

Le cyclopeptide [1] peut, en fonction du degré de salification, former des fagots de nanotubes ou des architectures supramoléculaires contrôlées par l'utilisation de contre-ions adaptés.

IV. Caractérisation des assemblages supramoléculaires.

1. Introduction

Pour tenter de caractériser les assemblages obtenus, nous allons utiliser trois techniques d'analyse différentes.

L'ATR-FTIR pour obtenir une information sur la présence de liaisons hydrogène. L'étude consistera à observer la zone des bandes amides afin d'identifier la nature des liaisons hydrogène présentes dans les structures.

La diffusion de la lumière pour déterminer la taille des objets en solution.

Enfin, la diffraction des électrons (TEM) pour obtenir une information sur la composition cristalline des structures et pour obtenir des paramètres de mailles.

Nous allons dans un premier temps étudier les solutions de cyclopeptide [1] sous forme de di-sel pour vérifier si un auto-assemblage est déjà présent en solution. L'ATR-FTIR et la diffusion de la lumière seront utilisés.

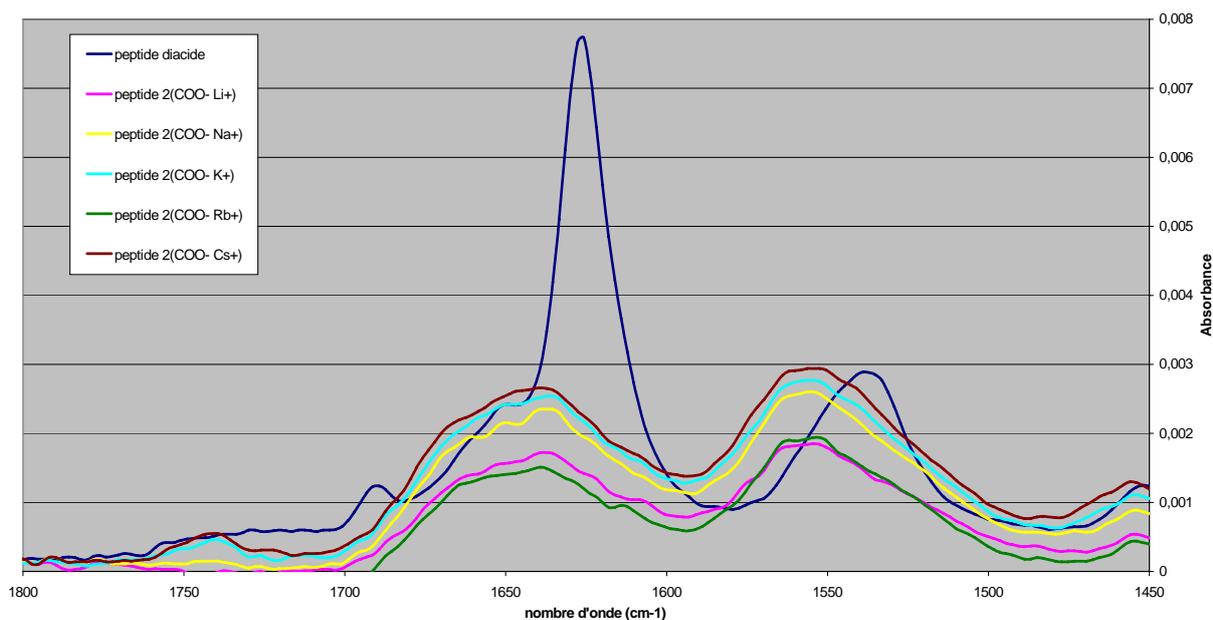
Nous allons ensuite étudier ces solutions cristallisées dans différentes conditions : par lyophilisation, séchée sur le cristal d'ATR, sur plaque de verre et sur film de carbone. Pour cela, l'ATR et la diffraction des électrons seront utilisées.

2. Analyse des solutions.

a. ATR-FTIR.

L'analyse réalisée par ATR-FTIR montre qu'aucune organisation en feuillets β n'est observable quand le cyclopeptide en solution aqueuse est sous forme de di-sel quel que soit le contre-ion utilisé.

Les positions des bandes amides I et II du cyclopeptide [1] sous forme di-acide sont comparées aux mêmes bandes du cyclopeptide doublement salifié à concentrations identiques. Le graphique montre dans chaque cas une bande à 1640 cm^{-1} qui correspond à des liaisons hydrogène aléatoires (entre les bagues isolées et l'eau) appelé bande Random. Aucune des bandes amides I (1628 et 1688 cm^{-1}) et II (1540 cm^{-1}) n'est observée. (**Graphique III-3**)

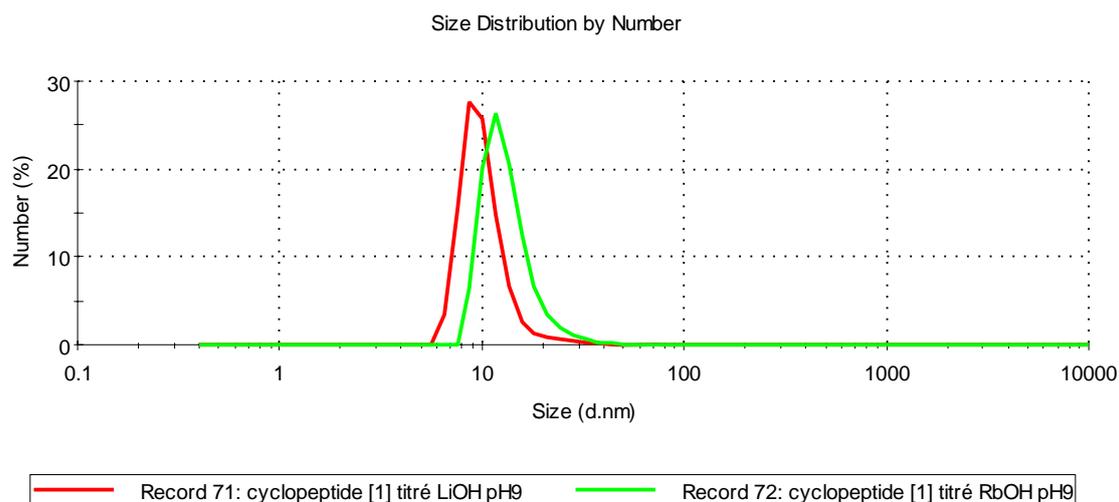


Graphique III-3 : *Courbes d'ATR-FTIR des solutions de cyclopeptide [1] sous forme de di-sel en fonction du contre-ion choisi comparé aux bandes amides I et II.*

b. Par diffusion de la lumière.

En parallèle, nous avons vérifié que des objets de tailles importants étaient formés en solution. Pour se faire nous avons choisi d'utiliser la technique par diffusion de la lumière.

La diffusion de la lumière montre des tailles d'objets en solution de l'ordre du nanomètre. Ce qui correspond aux dimensions d'un cyclopeptide isolé. (**Graphique III-4**)



Graphique III-4 : *Courbes de distribution en nombre en fonction de la taille pour les solutions de cyclopeptide [1] sous la forme de di-sel de lithium et de rubidium.*

Il n'y a donc aucune interaction permettant une organisation en solution pour le cyclopeptide [1] sous la forme de di-sel quelque soit le contre-ion utilisé.

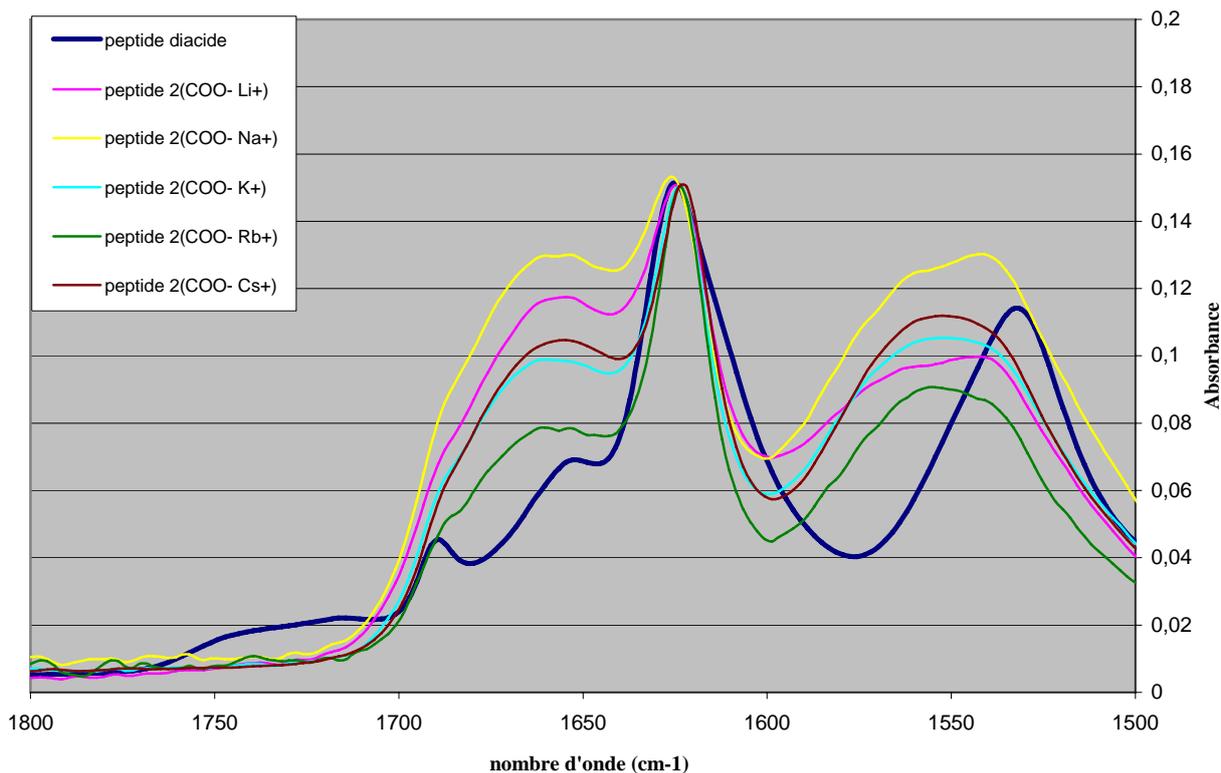
3. Etudes des solutions cristallisées.

Quatre types de poudres ont été analysés. La première a été obtenue par lyophilisation des solutions de dicarboxylates alcalins du cyclopeptide [1]. La seconde a été obtenue par séchage de ces mêmes solutions sur le cristal de l'appareil d'ATR-FTIR. La troisième a été obtenue par séchage de ces mêmes solutions sur plaques de verre. Et la quatrième a été obtenue par séchage sur film de carbone de la grille de TEM. Les trois premières ont été analysées par ATR-FTIR et la dernière par diffraction des électrons. Les assemblages supramoléculaires ont été contrôlés par microscopie lorsque cela était possible.

a. Analyse par ATR-FTIR.

i. Analyse du cyclopeptide sous forme de poudres lyophilisées.

Les résultats montrent la présence d'une bande amide I à 1628 cm^{-1} , plus ou moins prononcée selon le contre-ion analysé et la bande amide I à 1688 cm^{-1} est décelable. Une forte bande à 1640 cm^{-1} (bande Random) est également observée. (**Graphique III-5**)



Graphique III-5 : *Courbes d'ATR-FTIR des poudres lyophilisées du cyclopeptide [1] sous forme de di-sel en fonction du contre-ion choisi comparées aux bandes amides I et II.*

Ces bandes laissent penser qu'une partie du cyclopeptide [1] est assemblée par liaisons hydrogène en feuillet β antiparallèle alors que la majorité ne l'est pas. Ce qui semble montrer que cette poudre présente un faible degré d'organisation.

ii. Cristallisation sur l'appareil d'ATR-FTIR.

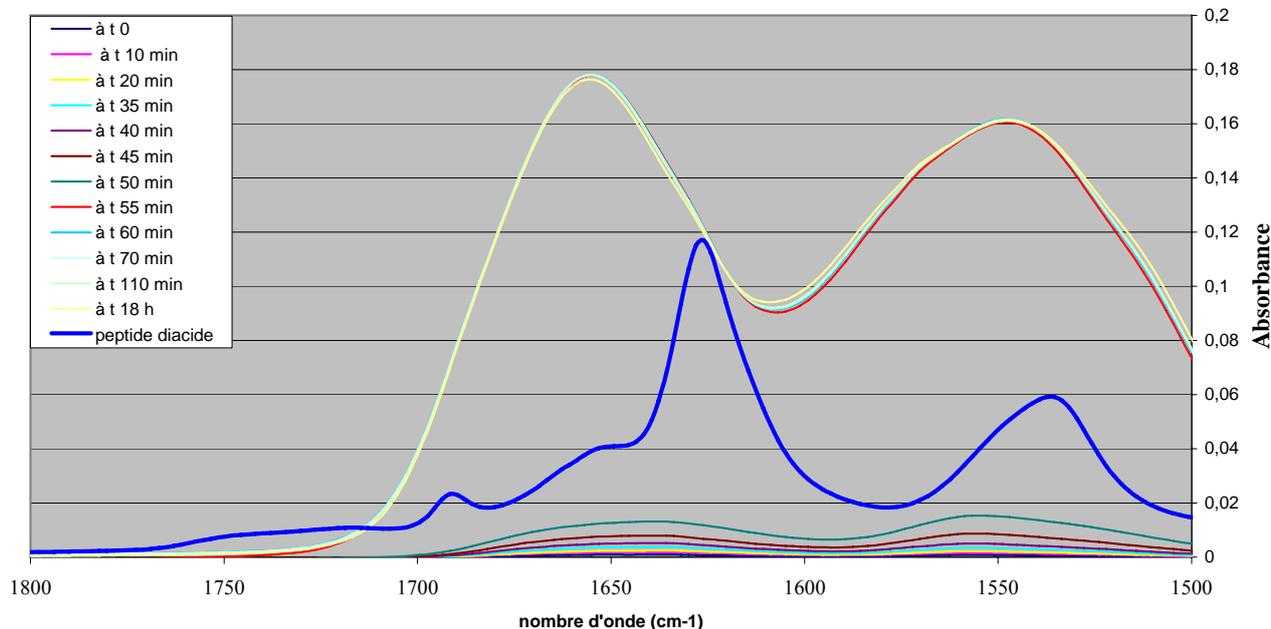
L'étude consiste ici à laisser sécher une goutte de solution du cyclopeptide [1] sous forme de dicarboxylate de lithium directement sur le cristal d'ATR. Les informations données par l'appareil permettront non seulement de déterminer la présence de feuillets β dans la structure cristallisée mais également de suivre la formation de l'organisation au cours du séchage.

Une solution de cyclopeptide [1] à 2 mg.mL^{-1} sous forme de di-sel de lithium a recouvert la totalité du cristal d'ATR. (**Graphique III-6**)

Le graphique montre que dans les premiers temps aucune liaison hydrogène n'existe (de $t = 0$ à 50 min). Lorsque la goutte est proche du séchage (à $t = 55$ min), deux bandes

importantes apparaissent à 1650 et 1545 cm^{-1} . Leur intensité ne sera plus modifiée après séchage complet, même après 18 h.

La bande à 1650 cm^{-1} correspond à la bande Random, et aucune bande Amide I ou II n'est obtenue.



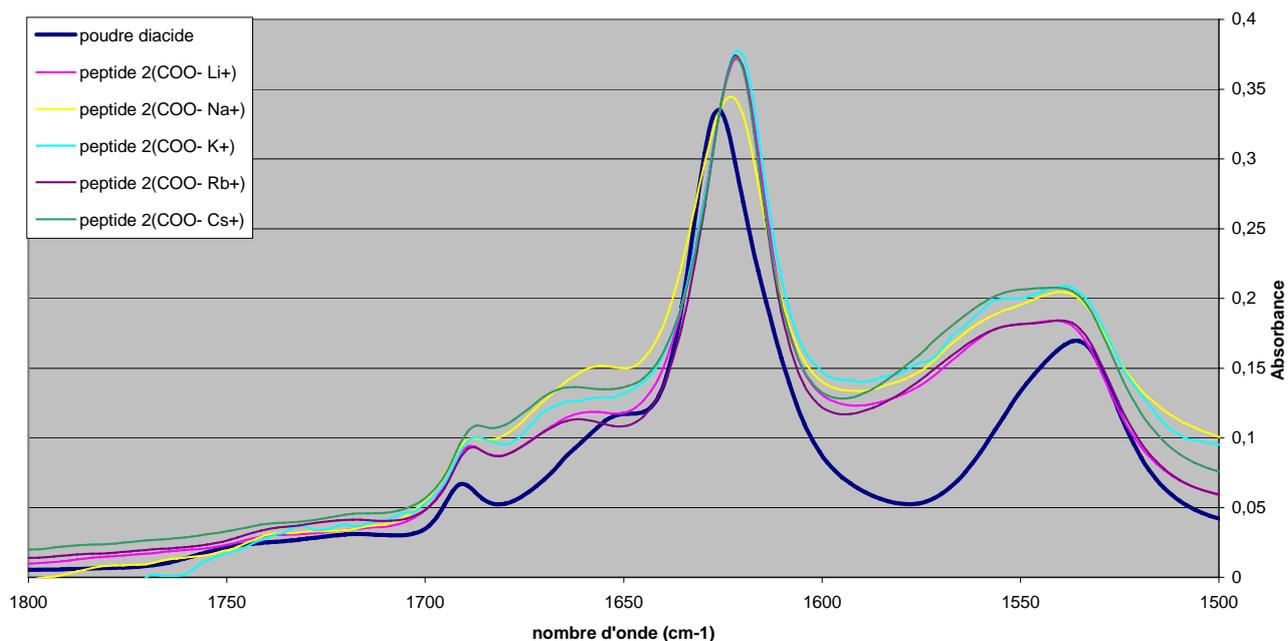
Graphique III-6 : Courbes d'ATR-FTIR de la dynamique de séchage d'une goutte de cyclopeptide [1] sous forme de di-sel de lithium comparées aux bandes amides I et II.

Les données d'ATR-FTIR indiquent qu'il n'y a pas de liaisons hydrogène en feuillets β antiparallèles. Par contre, de nombreuses liaisons hydrogène sont créées lors du séchage. Le cristal d'ATR-FTIR ne pouvant être regardé par microscopie, il est difficile de réaliser une relation entre les assemblages supramoléculaires et la formation de liaisons hydrogène lors du séchage. Pour tenter d'établir une telle relation, nous allons analyser la cristallisation sur plaques de verre. En effet, les plaques de verre pourront être analysées par les deux techniques ATR-FTIR et microscopie TOM.

iii. Analyse de la cristallisation sur plaques de verres.

Une plaque de verre sur laquelle une goutte de solution est séchée peut être analysée à la fois par microscopie TOM et par ATR-FTIR.

L'analyse est réalisée avec le cyclopeptide [1] sous forme de di-sel. (**Graphique III-7**) Les cinq contre-ions sont étudiés.



Graphique III-7 : *Courbes d'ATR-FTIR des gouttes séchées sur plaque de verre du cyclopeptide [1] sous la forme de di-sel en fonction du contre-ion choisi comparées aux bandes amides I et II.*

Des bandes pour chaque échantillon analysé sont observées aux mêmes longueurs d'onde. La bande à 1688 cm^{-1} correspond à une des deux bandes amides I. La bande à 1540 cm^{-1} correspond à la bande Amide II. La plus forte bande, à 1621 cm^{-1} pourrait correspondre à l'autre bande Amide I mais avec un décalage de quelques nombres d'onde.

Ainsi, cette nouvelle analyse montre qu'une quantité non négligeable de feuillets β antiparallèles sont *a priori* présents dans les structures supramoléculaires obtenues. En effet, très peu de Random est observé.

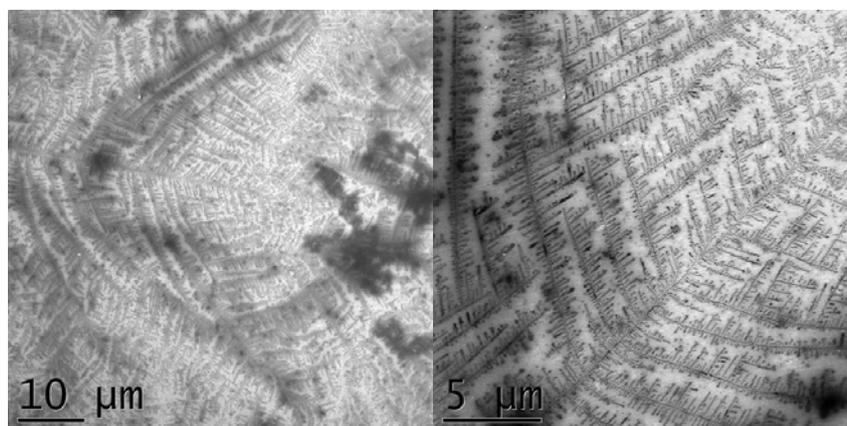
Cette étude montre ainsi que l'organisation dépend étroitement de la surface sur laquelle le cyclopeptide [1] sous forme de di-sel est cristallisé.

iv. Conclusion.

Trois conclusions importantes peuvent être tirées de ces études en ATR-FTIR. La première est que l'organisation du cyclopeptide [1] sous forme de di-sel quel que soit le contre-ion utilisé n'a lieu que sous la forme cristallisée. Ensuite, cette organisation dépend de la surface sur laquelle la solution est séchée et/ou des conditions de séchage. Enfin, l'assemblage supramoléculaire montre une quantité importante de liaisons hydrogène, notamment en feuillets β anti-parallèles.

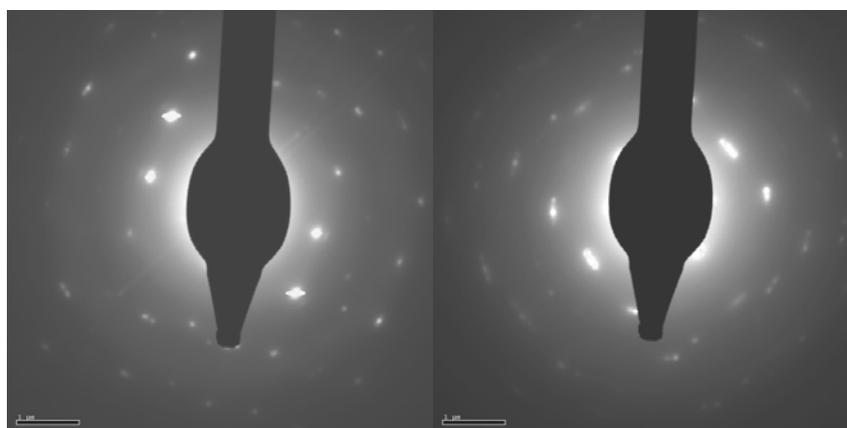
b. Analyse par diffraction des électrons.

L'échantillon analysé par diffraction correspond à une solution de cyclopeptide [1] sous forme de dicarboxylate de lithium cristallisée sur film de carbone de grille de TEM. Les images obtenues montrent des structures supramoléculaires. (**Images III-12**)



Images III-12 : Images TEM d'une solution du cyclopeptide [1] sous forme de di-sel de lithium.

Les clichés de diffractions sont réalisés à partir des images observées. (**Images III-13**)



Images III-13 : Clichés de diffraction de zones différentes pris sur l'échantillon provenant d'une solution du cyclopeptide [1] titrée par la lithine à pH 9.

La première constatation est que les objets observés diffractent, preuve que ce sont bien des objets organisés. Ensuite, on peut observer des taches de diffraction plus importantes le long d'un axe, ce qui montre que la maille est répétitive et orientée dans des directions privilégiées. La position des taches diffère d'un cliché à l'autre car les cristaux ne doivent pas être orientés dans les mêmes directions.

La grande largeur des taches doit être due au fait que l'on analyse des petits cristaux.

Les paramètres de mailles sont inversement proportionnels à la distance des taches au centre du cliché de diffraction. Malheureusement, les paramètres de mailles ne peuvent pas être mesurés. En effet, l'appareil n'est pas calibré pour réaliser ce type de mesure et rien ne permet de donner une idée des dimensions des cristaux.

Ainsi, la diffraction a permis de mettre en évidence que les structures supramoléculaires étaient très ordonnées. En revanche, il n'est pas possible de déterminer les paramètres de mailles de ces cristaux par les clichés réalisés.

4. Conclusion.

Des analyses en ATR-FTIR et en diffraction des électrons ont été réalisées afin de comprendre les organisations supramoléculaires obtenues. L'ATR-FTIR a permis de mettre en évidence que des liaisons hydrogène en feuillet β antiparallèles constituaient une des interactions permettant l'organisation supramoléculaire. De plus la diffraction des électrons réalisées en TEM sur ces échantillons montre une très importante organisation dans des directions privilégiées. Il serait intéressant de réaliser une analyse ATR-FTIR sur une solution saturée en cyclopeptide [1] sous la forme de di-sel quel que soit le contre-ion utilisé. En effet, cela permettrait de savoir s'il existe, juste avant la cristallisation des structures supramoléculaires en solution. Par contre, il sera difficile de s'assurer que cette solution sera capable de donner des structures car nous avons mis en évidence que les conditions de cristallisations sont importantes pour la formation de structures.

Nous avons alors les premiers éléments permettant de comprendre la structure mais l'assemblage n'est pas résolu.

Les problèmes qui se posent pour réaliser d'autres analyses, les rayons X par exemple, sont les dimensions des cristaux. Ils sont malheureusement trop petits pour être analysés. Des tentatives de formations de monocristaux ont échoués jusqu'à présent. Des analyses sur une ligne de SOLEIL par des Rayons X ultrasensibles pourraient être une solution et leur réalisation est en cours.

C. Les contre-ions organiques.

I. Introduction.

Après l'utilisation de bases inorganiques pour la formation de structures supramoléculaires, les bases organiques ont été envisagées. Les structures supramoléculaires pourraient alors être différentes.

Afin de choisir des bases organiques suffisamment fortes, les tables de pKa d'Evans ont été consultées.³ Il est important de choisir une base soluble dans l'eau et dont le pKa soit suffisamment élevé pour neutraliser le cyclopeptide [1] qui a un pKa₂ élevé (dans les 7-7.5). La quinuclidine a alors été choisie car son pKa est de 11 en solution aqueuse.

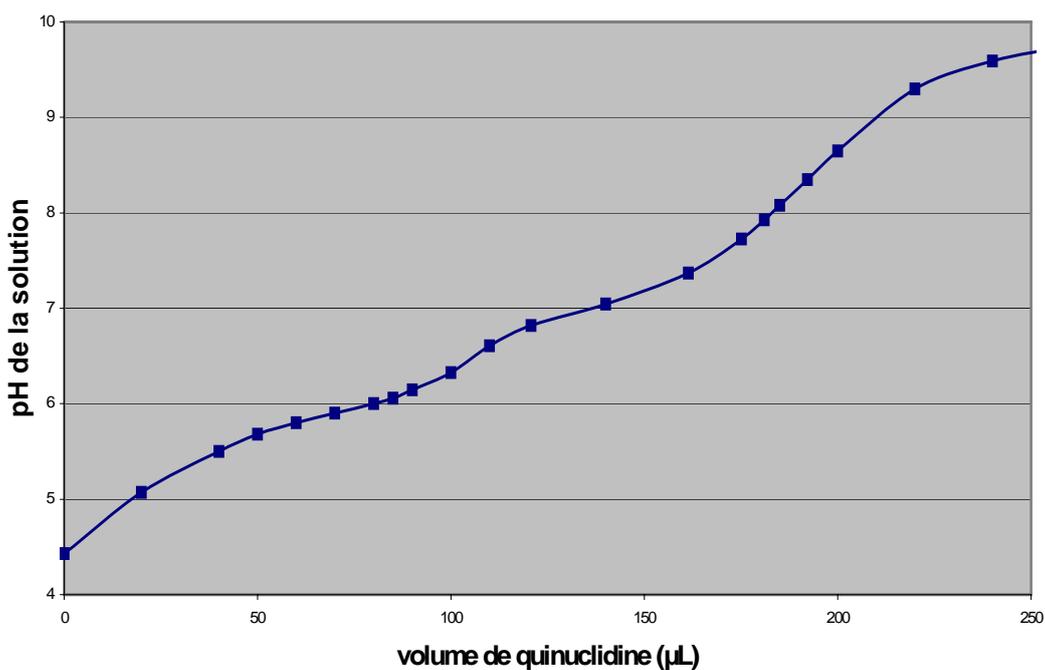
II. La quinuclidine.

La quinuclidine est une amine tertiaire pontée, ce qui lui confère sa grande basicité. (Schéma III-2)



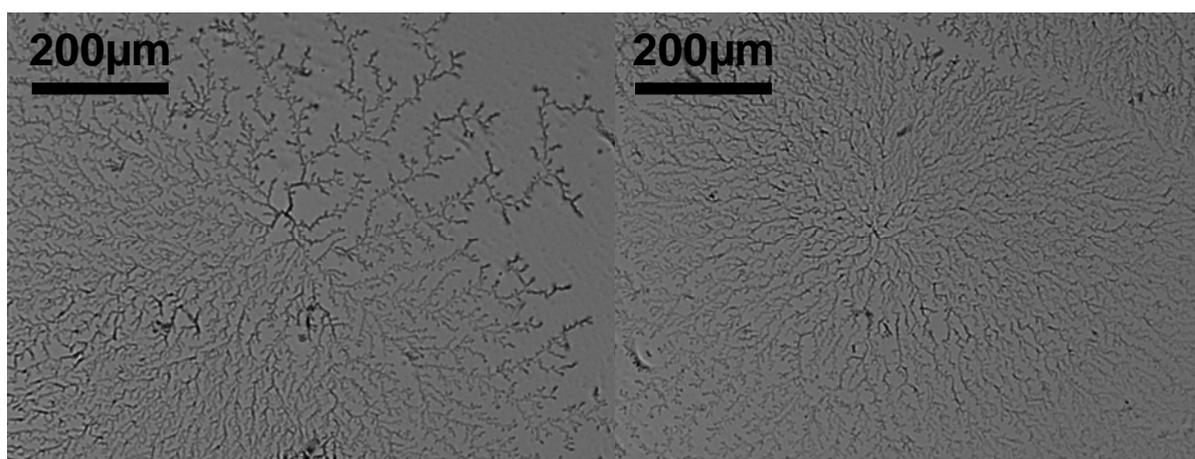
Schéma III-2 : Formule semi-développée de la quinuclidine.

Le cyclopeptide [1] à 2 mg.mL⁻¹ est titré par une solution de quinuclidine dans l'eau à 13,5 mM dans les mêmes conditions que précédemment. Le cyclopeptide [1] devient soluble à la première équivalence et la courbe de titration présente l'allure d'une titration d'un diacide faible par une base forte. (Graphique III-8)



Graphique III-8 : *Courbe de titration du cyclopeptide [1] à 2 mg.mL⁻¹ par une solution de quinuclidine à 13,5 mM.*

Le cyclopeptide [1] sous la forme mono et di-sel de quinuclidine est analysé par TOM. Sous la forme de mono-sel de quinuclidine, aucune organisation supramoléculaire n'est observée. En revanche, lorsque le cyclopeptide est sous la forme di-sel de quinuclidine, des organisations supramoléculaires sont mises en évidence. (**Images III-14**)



Images III-14 : *Images TOM d'une solution de cyclopeptide [1] sous la forme de di-sel de quinuclidine.*

Les organisations ressemblent à celles obtenues avec la soude. Les angles entre les ramifications sont toutefois plus réguliers.

Ainsi, il est possible à l'aide d'une base organique de réaliser des assemblages supramoléculaires de cyclopeptides [1]. Les analyses ATR-FTIR réalisées dans les mêmes conditions que pour les contre-ions métalliques donnent des résultats similaires. Des feuillettes β antiparallèles sont observés sur des gouttes séchées sur plaque de verre par ATR-FTIR.

III. Conclusion.

Une base organique, la quinuclidine, a été utilisée pour réaliser la neutralisation des acides carboxyliques du cyclopeptide [1]. Des structures supramoléculaires ont été obtenues à l'aide de ce contre-ion organique.

D. Le groupe II du tableau périodique.

I. Introduction.

Après l'utilisation de métaux monovalents alcalins pour la réalisation de structures supramoléculaires à base de cyclopeptide [1], nous avons envisagé de travailler avec des métaux divalents.

Les métaux divalents choisis sont le magnésium et le calcium, couramment utilisés comme contre-ions de protéines. Les oxydes et les hydroxydes de magnésium ou calcium sont commerciaux mais leur utilisation dans une titration du cyclopeptide [1] est totalement impossible. En effet, ces métaux sous ces formes sont insolubles dans l'eau et sont de plus très sensibles au dioxyde de carbone.

Dans cette partie, nous allons étudier le moyen de contourner ces problèmes pour utiliser ces éléments du groupe II dans la réalisation de structures supramoléculaires.

II. Le magnésium.

Un exemple de la littérature utilise l'hydroxyde de magnésium, $Mg(OH)_2$, pour réaliser la neutralisation d'un diacide L-Glu.⁴ Malgré l'insolubilité du $Mg(OH)_2$ dans l'eau, la présence de fonctions acides carboxyliques déplace l'équilibre. Nous avons choisi d'appliquer cette technique au cas du cyclopeptide [1] malgré le fait que le cyclopeptide lui-même n'est pas soluble dans la solution initiale.

À une suspension de cyclopeptide [1] à $2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans l'eau est ajouté un équivalent de $Mg(OH)_2$. Un insoluble est toujours observé dans le milieu. Le pH de la solution est alors contrôlé et révèle un pH basique de 8,5. Ainsi, il y a bien eu réaction acido-basique dans le milieu réactionnel. Le surnageant est alors isolé et analysé en TOM mais aucune structure supramoléculaire n'est observée.

III. Le calcium.

Le mode opératoire précédent est appliqué au cas de l'hydroxyde de calcium, Ca(OH)_2 .

À une suspension de cyclopeptide [1] à 2 mg.mL^{-1} dans l'eau est ajouté un équivalent de Ca(OH)_2 . Aucun insoluble n'est observé dans ce cas, même lorsqu'un excès de base est ajouté. Le pH du milieu dépend directement de la quantité de base ajoutée, ce qui a permis de réaliser une titration grossière du cyclopeptide. Au voisinage de l'équivalence (pH 8-9), la solution est analysée par TOM mais aucune structure supramoléculaire n'est observée.

IV. Conclusion.

La réaction acido-basique entre le cyclopeptide [1] et un hydroxyde de magnésium ou de calcium n'a pas permis d'obtenir de nouvelles structures supramoléculaires.

E. Les autres groupes du tableau périodique.

I. Introduction.

D'autres cations du tableau périodique peuvent être envisagés, des divalents, le cobalt (Co^{2+}), le nickel (Ni^{2+}), le cuivre (Cu^{2+}) et le zinc (Zn^{2+}), un trivalent, l'aluminium (Al^{3+}) et un tétravalent, le zirconium (Zr^{4+}).

Cette liste est non exhaustive et d'autres éléments du tableau périodique pouvaient faire partie de cette liste.

Leur utilisation a été envisagée pour la réalisation de nouvelles structures supramoléculaires pouvant présenter un caractère métallique intéressant en électronique moléculaire. En effet, si les cations métalliques participent aux structures supramoléculaires, des courants électriques vont pouvoir être générés et se propager le long des structures. On aura alors accès à des circuits électriques à l'échelle microscopique.

II. Les bases envisagées.

Les hydroxydes de ces métaux n'étant pas commerciaux, il a fallu les synthétiser à partir des chlorures correspondants.

La réaction consiste à réaliser un échange de contre-ion par l'action de la soude sur le chlorure métallique. L'hydroxyde métallique formé insoluble précipite et peut ainsi être isolé. (**Schéma III-3**)



Schéma III-3 : Réaction permettant la synthèse d'hydroxydes métalliques.

La neutralisation des fonctions carboxyliques du cyclopeptide **[1]** est alors réalisée par ces hydroxydes de la même manière que pour le calcium et le magnésium.

Dans les cas seulement de Ni(OH)_2 , Zn(OH)_2 et Co(OH)_2 une variation du pH des solutions est observée mais ce pH ne dépasse pas 7 malgré un excès de base ajouté. Ces solutions sont troubles. Dans les autres cas, aucune variation de pH n'est enregistrée, la neutralisation ne semblant pas effective.

Tous les milieux réactionnels sont laissés sous agitation durant 48 heures afin d'observer une évolution possible de la réaction. Les solutions restent troubles et leur pH n'évolue pas, de même après chauffage durant 18 heures.

Les caractères basiques des hydroxydes métalliques utilisés ont alors été contrôlés. Pour se faire, une réaction acido-basique entre l'hydroxyde métallique et l'acide acétique a été tentée. Dans ce cas, seul l'hydroxyde métallique est insoluble dans le milieu réactionnel. Le pKa de l'acide acétique est de 4,78 et le pH à l'équivalence doit être autour de 8,5-9. Après ajout d'un excès d'hydroxyde métallique à la solution d'acide acétique, les solutions deviennent limpides, sauf dans le cas du zirconium où le milieu réactionnel reste insoluble. Les pH contrôlés ne dépassent pas la valeur de 7.

Les hydroxydes utilisés ne constituent donc pas des bases suffisamment fortes pour réaliser ce type de titration.

Ainsi, malgré la réalisation avec succès d'hydroxydes métalliques variés, la neutralisation du cyclopeptide **[1]** n'a pu avoir lieu avec aucun d'entre eux. Un début de réaction a pu être toutefois observé à l'aide des hydroxydes de nickel, de zinc et de cobalt. Mais leur caractère basique étant trop faible, la neutralisation des deux fonctions carboxyliques du cyclopeptide **[1]** n'a pu avoir lieu. De plus les analyses réalisées en TOM ne montrent pas d'organisation supramoléculaire pour ces trois métaux.

III. Conclusion.

Des divalents et des tétravalents ont été envisagés pour la réalisation de nouvelles organisations supramoléculaires à base de cyclopeptide **[1]**. Malheureusement, leur caractère basique n'est pas suffisant pour neutraliser les deux fonctions carboxyliques du cyclopeptide **[1]**. Ainsi, ils n'ont pu donner d'organisations supramoléculaires.

F. Conclusions et perspectives.

I. Conclusion.

Le cyclopeptide [1] sous forme diacide est capable, par des interactions hydrogène en feuillets β antiparallèles de s'assembler pour donner des nanotubes de peptides.

L'utilisation du di-sel de sodium de ce cyclopeptide conduit à l'obtention d'un autre assemblage supramoléculaire de type fractal. Nous avons également mis en évidence que l'utilisation d'autres sels métalliques permettait de modifier la structure des objets obtenus. Ces résultats montrent clairement l'influence du contre-ion sur l'organisation supramoléculaire.

D'autres contre-ions métalliques (cations divalents, tétravalents) ou organiques ont également été testés. Parmi ceux-ci, seule la quinuclidine permet d'accéder à des arrangements supramoléculaires.

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence qu'à partir d'un même substrat, le cyclopeptide [1], des organisations supramoléculaires peuvent être obtenues par un contrôle des conditions de cristallisation.

II. Perspectives.

Il reste à comprendre comment les assemblages en structures supramoléculaires du cyclopeptide [1] a lieu sous l'influence de contre-ions, et par là les différences obtenues entre les contres-ions utilisés. Nous avons démontré que des liaisons hydrogène en feuillets β antiparallèles étaient présentes dans la structure. De plus, il doit être possible de connaître la maille cristalline d'après les clichés de diffractions obtenus. Les connaissances dans ce domaine ne sont pas encore suffisantes pour interpréter ces données.

Il serait intéressant de poursuivre l'étude de ces assemblages supramoléculaires pour des applications possibles. Nous pourrions commencer par utiliser des surfaces différentes comme des plaques de mica ou de silicium afin d'étudier leur influence sur la cristallisation. Cela impliquerait la nécessité d'utiliser une autre technique d'analyse comme le MEB

(Microscope Electronique à Balayage) ou l'AFM (Microscope à Force Atomique) pour la caractérisation des objets.

Il est également envisagé de soumettre la solution à un champ électrique (ou magnétique) afin de contrôler l'orientation des cristaux dans une direction privilégiée lors de la cristallisation.

Des analyses par AFM pourraient permettre de déterminer la rigidité de ces cristaux avant d'envisager leur application en électronique.

¹ K. Giri; N. P. Bhattacharyya; S. Basak, *Biophys. J.*, **2007**, 92, 293-302 ; A. Lomander; W. Hwang; S. Zhang, *Nano Lett.*, **2005**, 5, 1255-1260.

² H. Schmidbaud; P. Kiprof; O. Kumberger; J. Riede, *Chem. Ber.*, **1991**, 124, 1083-1087.

³ http://www.chem.queensu.ca/programs/ug/2005/chem422/evans_pKa_table1.pdf

⁴ H. Schmidbaud; I. Bach; D. L. Wilkinson; G. Müller, *Chem. Ber.*, **1989**, 122, 1433-1438.



Conclusions
et perspectives

A. Conclusions.

Nous avons choisi de travailler durant cette thèse sur la conception de nouvelles organisations supramoléculaires à base de cyclopeptides.

Les peptides choisis inspirés des cyclopeptides décrits par Ghadiri sont capables de s'auto-assembler en nanotubes de peptides.

Dans un premier temps, nous avons envisagé la synthèse de matériaux hybrides à base de ces cyclopeptides et de nanostructures carbonées (nanotubes de carbones ou fullerènes C₆₀). La brique élémentaire constitutive de ce matériau hybride devrait être constituée d'un cyclopeptide greffé sur le nanotube de carbone ou le fullerène C₆₀. La structuration du matériau devrait ensuite être possible via la formation de nanotubes de peptides par ajout de cyclopeptides non greffés. De plus, l'assemblage devrait pouvoir être contrôlé par le pH (structuration programmable).

Si la synthèse des cyclopeptides n'a pas posé de problèmes particuliers (synthèse classique sur support solide), l'obtention des composés mixtes (cyclopeptides / nanotubes de carbone ou cyclopeptides / fullerènes) n'a pas été possible malgré l'utilisation de diverses stratégies.

Au cours de ce travail, nous avons pu mettre en évidence l'obtention de nouvelles architectures supramoléculaires à base d'un cyclopeptide particulier (le *cyclo*[-(D-Ala-Gln-D-Ala-Glu)₂-]). Ces architectures de type fractal sont obtenues par cristallisation des sels de ce peptide. La structure des architectures est notamment liée à la nature du contre-ion utilisé et/ou au support utilisé lors de l'étape de cristallisation. Si l'organisation moléculaire conduisant à ces nanoobjets n'est pas complètement élucidée, la participation d'un réseau de liaisons hydrogène a pu être clairement établie par ATR-FTIR.

B. Perspectives.

La réalisation de matériaux hybrides nanotubes de peptides nanostructures carbonées est à poursuivre. Il serait notamment intéressant d'utiliser les cyclopeptides de Granja, analogues des cyclopeptides de Ghadiri. L'avantage serait dans ce cas la possibilité de travailler avec des nanotubes de peptides solubles en milieu organique. Des réactions à l'aide de ces substrats seraient alors possibles. Durant ma thèse, des travaux de Granja ont, en effet, démontré un couplage cyclopeptides / fullerènes.¹ Il serait intéressant de se baser sur ces travaux pour réaliser les premiers matériaux fullerènes /nanotubes de peptides mais surtout nanotubes de carbone / nanotubes de peptides.

En ce qui concerne les assemblages supramoléculaires obtenus à partir des di-sels du *cyclo[-(D-Ala-Gln-D-Ala-Glu)₂-]* [1], il reste à comprendre comment ces assemblages de forment ainsi que la nature des interactions qui interviennent.

La croissance orientée de ces structures pourrait, quant à elle, permettre l'utilisation de ces nanostructures en électronique ou en optoélectronique par exemple.

Les nanoobjets à base de cyclopeptides obtenus au cours de cette thèse peuvent également avoir des applications dans d'autres domaines.

En effet, les cyclopeptides peuvent être utilisés dans le domaine de l'imagerie médicale. Pour ce faire, le xénon hyperpolarisé s'insérant dans une cavité hydrophobe est utilisé comme détecteur dans l'organisme. Des études réalisées au cours de cette thèse ont montré que le xénon était capable d'entrer dans les cavités des nanotubes de peptides de Ghadiri par échange lent avec le milieu aqueux. Malheureusement, ces résultats n'ont pas été confirmés et l'étude n'a pu être poursuivie, faute de temps. Il serait alors intéressant de modifier les conditions opératoires pour démontrer leur utilité.

¹ R. J. Brea; L. Castedo; J. R. Granja; M. A. Herranz; L. Sánchez; N. Martín; W. Seitz; D. M. Guldi, *P. N. A. S.*, **2007**, 104, 5291-5294.



Partie
expérimentale

I. Généralités.

Produits chimiques

Les acides aminés proviennent de chez Bachem (Weil am Rhein, Allemagne), Fluka (Buchs, Suisse), Acros Organics (Geel, Belgique) et NeoMPS (Strasbourg, France). La résine est obtenue chez Novabiochem, division de Merck Bioscience (Schwalbach, Allemagne). Les autres produits chimiques proviennent de chez Aldrich (St Louis, Etats-Unis) et de Fluka.

L'eau utilisée provient soit de chez Aldrich, soit de l'eau doublement désionisée par utilisation d'un système échangeur Milli-Q Plus de la société Millipore (Billerica, Etats-Unis).

Les solvants utilisés pour les synthèses et pour les purifications proviennent de chez Aldrich ou VWR (West Chester, Etats-Unis) et sauf mention contraire, sont utilisés sans purification.

Solvants anhydres

Les expériences sensibles à l'humidité et / ou à l'air ont été réalisées dans des montages secs (étuves 1 h puis retour à température ambiante sous vide) sous atmosphère d'azote.

Les solvants anhydres sont soit achetés, soit préparés par distillation sous azote ou sous vide en présence de leur agent de dessiccation respectif.

Chromatographie sur couches minces (CCM)

Les plaques utilisées sont de type Silice Merck 60 F₂₅₄ d'épaisseur 0,25 mm sur support de verre. Les révélations sont effectuées par des rayonnements ultraviolets à 254 nm et / ou 365 nm, ainsi que par immersion dans une solution éthanolique 5 % d'acide phosphomolybdique ou de permanganate de potassium. Le facteur de rétention frontale (R_f) est indiqué, ainsi que la nature de l'éluant utilisé.

Chromatographie sur colonne ouverte

Elles sont réalisées en utilisant du gel de silice Merck (230-400 mesh).

HPLC-MS

Le système est de la société Waters (2525) avec dégazeur en ligne et système d'injection automatisé (2767). L'élution consiste en un gradient d'eau et d'acétonitrile, avec 0,1 % d'acide formique. La colonne est une XBridge C18 ($\varnothing = 100 \times 4,6$ mm, 3,5 μm taille des particules). Les conditions d'élutions sont à $t = 0$ 95 % H_2O , 5 % AcN, évolution jusqu'à 8 min à 100 % AcN et 5 min à 100 % AcN pour laver la colonne.

La détection des espèces éluées se fait par une barrette de diodes (2996), un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) et un spectromètre de masse. La colonne est de type phase inverse, greffée C_{18} , modèle X-Bridge 100 x 4,6 mm avec une taille de particules de 3,5 μm et une taille de pores de 13,5 nm. Le débit est réglé à 1 ml min^{-1} et le volume d'injection à 20 μl .

Le spectromètre de masse est un Micromass ZQ de la société Waters. L'ionisation se fait par électrospray, avec une température de la source de 120 °C et une tension de cône de 20 V. L'échantillon est introduit de façon continue à 0,3 ml.min^{-1} . L'analyseur est de type quadripôle (modèle ZQ2000). Les spectres sont enregistrés à l'aide du logiciel Mass Lynx 4.0 dans le domaine de m/z 100-1000 pour les molécules organiques et 100-2000 pour les peptides.

Les échantillons sont solubilisés dans l' $\text{H}_2\text{O} + \text{NaOH}$ ou dans le DMSO et 20 μL sont prélevés pour les analyses.

Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN^1H ont été enregistrés sur un spectromètre à ondes pulsées BRUKER AVANCED 400 dont la fréquence de résonance du proton est 400,133 MHz.

Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au solvant de référence pour le RMN^1H .

La numérotation utilisée pour l'attribution des différents signaux correspond à celle indiquée sur la surface du produit et ne suit pas nécessairement les règles de nomenclature.

Le déplacement chimique (δ) en ppm est suivi entre parenthèses de la multiplicité du signal, de l'attribution du signal, de l'intégration et de la constante de couplage (en Hertz) si elle est mesurable.

Les multiplicités des signaux sont indiquées à l'aide des lettres suivantes :

s : singulet

m : multiplet

d : doublet

M : massif

t : triplet

dd : doublet de doublet

q : quadruplet

dt : doublet de triplet

Spectrométrie de masse (SM)

En mode électrospray couplé au temps de vol, les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Mariner™ ESI TOF (PerSeptive Biosystems).

Spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier de réflexion totale atténuée ATR-FTIR (Attenuated Total Reflectance -Fourier Transform InfraRed)

Les spectres infrarouge de peptides sont enregistrés par appareil Bruker IFS 66 équipé d'un module 45°N Znse ATR, purgé en continu avec de l'azote et obtenus par le logiciel OPUS 4.2. Une goutte de 10 µL de l'échantillon dans l'eau est déposée sur le cristal d'ATR et 30 scans sont moyennés à une résolution de 4 cm⁻¹. Le signal de l'eau est ensuite soustrait du spectre brut (spectre de l'eau ayant servi à la préparation de l'échantillon). Dans le cas des poudres, environ 20 mg de poudre est déposé sur le cristal et mis en contact optimal à l'aide d'une presse.

Sonication

La dispersion est réalisée à l'aide d'une sonde à ultrasons Branson Sonifier 450 (60 W, 20 kHz) ou un bain à ultrasons Branson 5210 (19 W, 47 kHz).

Diffusion de la lumière (DLS)

L'analyseur granulométrique laser est un NANOFOX de la société Sympatec GmbH, System-Partikel-Technik (Orsay, France). Ce système est basé sur la diffusion dynamique de la lumière et la corrélation de photons.

L'analyseur par diffusion de la lumière est un Nanosizer de la société Malvern Instruments (Orsay, France).

Les spectres de diffusion de la lumière sont réalisés à l'aide du logiciel DTS (Nano) de la société Malvern Instruments.

Spectroscopie UV-Vis

Les spectres UV-Vis ont été enregistrés sur un spectromètre CARRY 50 Scan UV-Vis de chez VARIAN (Les Ulis, France), à l'aide du logiciel Cary Win UV ou un spectromètre Helios de la société ThermoSpectronic (Madison, WI).

Spectrométrie MALDI

Les analyses de peptides sont réalisées à l'aide d'un spectromètre de type Voyager-DE STR instrument (Applied Biosystems, Les Ulis, France) équipé d'un laser à azote pulsé (337 nm). La matrice « α -cyano-4-hydroxycinnamic acid » est préparée à 10 mg.mL⁻¹ dans une solution d'AcN à 50 % contenant 0,1 % de TFA. Sur une cible est déposé 0,5 μ L de la solution à analyser et 0,5 μ L de la matrice. L'instrument est utilisé en mode réflexion d'extraction retardée avec une tension d'accélération de 20 kV et un retard d'extraction de 140 ns. La puissance du laser a été soigneusement contrôlée afin d'être haute pour une bonne proportion signal / bruit de fond, mais assez basse pour éviter la saturation du détecteur et la réponse non linéaire. Les données ont été accumulées sur la fenêtre m/z de 700 Th à 5000 Th. L'appareil est calibré en externe à partir d'un mélange de peptides standard.

Microscope électronique à transmission (TEM)

Les clichés ont été réalisés sur un microscope Philips CM 12 dont la tension d'accélération des électrons est de 100 kV. Les grilles de microscopie sont en cuivre 200 mesh et recouvertes d'un film de carbone. Les échantillons sont préparés par dépôts de 5 μ L de solution à analyser et laissée sécher.

Microscopie optique à transmission (TOM)

Les clichés ont été réalisés sur un microscope Axio de la société Zeiss (Le Pecq, France) équipée d'une lampe HAL 100, d'un grossissement EC Plan NEOFLUAR 10 x 0,3 Ph 1 et à l'aide d'un logiciel AxioVision Rel. 4.5. Les échantillons de concentrations à 1

mg.mL⁻¹ sont observés en transmission sur plaques de verres polis après séchages d'une goutte de 5 ou 10 µL selon l'échantillon.

pH mètre

Le pH des solutions aqueuses (d'un volume d'environ 500 µL compris dans un eppendorf de 1,5 mL) est mesuré à l'aide d'un pH mètre Microprocessor pH 213 de la société Hanna Instruments (Tanneries, France) équipée d'une microélectrode.

Centrifugeuse

Les échantillons sont centrifugés à l'aide d'un appareil Centrifuge 5804 de chez Eppendorf (Le Pecq, France), à différentes vitesses selon le cas (jusqu'à 15557 tours / minutes).

II. Partie 1.

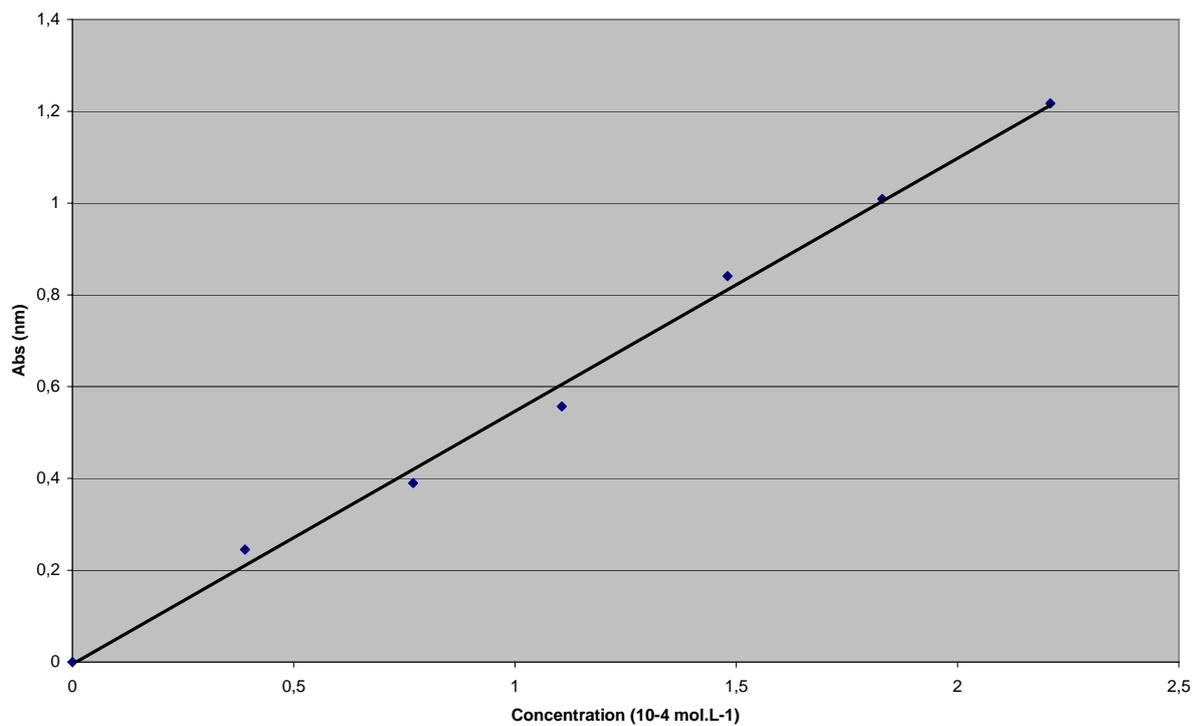
1. Détermination du loading.

Principe :

Le loading de la résine est déterminé par dosage en UV du produit de la déprotection du Fmoc.

Une courbe étalon est réalisée sur la concentration en fonction de l'absorbance en UV, sur laquelle on se rapport pour déterminer le loading de la résine.

Courbe d'étalonnage :



2. Tests de suivi de réaction.

a. Test UV permettant de suivre la déprotection de la fonction amine.

Le groupement Fmoc, présent sur le peptide fonctionnalisé sur la résine (1 g, L = 0,48 mmol.g⁻¹), est clivé à l'aide d'une solution à 20% de PIP dans la NMP. La résine est agitée 3 x 5 min avec 6 mL de PIP 20 % dans la NMP. Le dernier filtrat est récupéré et la quantité de Fmoc libéré est quantifiée par UV en prélevant 10 µL du filtrat, dilué ensuite par 2 mL de PIP 20% dans la NMP. Lorsque l'absorbance est inférieure ou égale à 0,01, on considère que la déprotection est effectuée et la résine est lavée par 3 x 4 mL de NMP.

b. Suivi de réaction de couplage par test de Kaiser.¹

Des billes de résine sont mises en présence de deux gouttes des réactifs suivants et chauffées à 120°C durant 5 min :

A : 500 mg de nihydrine dans 10 mL d'EtOH,

B : 8 % de phénol dans EtOH,

C : 2 mL d'une solution de KCN à 1% dans H₂O dans 100mL de pyridine.

Si les billes restent incolores, la réaction est terminée. En revanche, des billes bleues indiquent la présence d'amine primaire libre dans le milieu.

3. Le cyclo[(-D-Ala-Glu-D-Ala-Gln)₂-] [1].

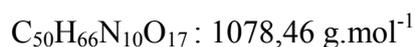
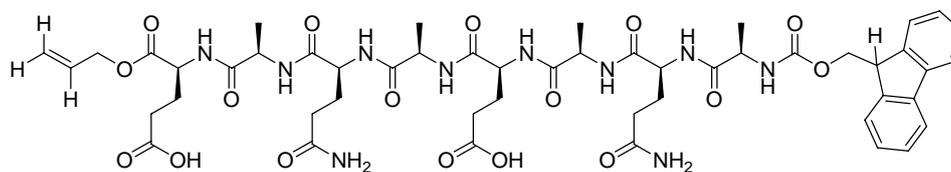
a. Fonctionnalisation de la résine.

Dans un tricol de 100 mL purgé, sous azote, est introduit le FmocGlu(OH)-OAll (12 g, 29,3 mmol, 1,72 eq.) dans 58 mL de DCM fraîchement distillé sur hydrure de calcium. Après ajout de DIEA (20,4 mL, 117 mmol, 6,9 eq.) et solubilisation totale, le milieu réactionnel est transféré dans un schlenk de 250 mL sous azote contenant la résine de chlorure de 2-chlorotriptyle (10 g, 17 mmol). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation sur plateau à température ambiante sous azote durant 18 h. La résine est filtrée, lavée par 4 x 100 mL d'un mélange DCM / MeOH / DIEA (17 : 2 : 1), 4 x 100 mL de DCM et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

b. Détermination du loading.

Une partie de la résine (261,1 mg) est prélevée et 4 étapes (5 min chaque) de déprotections Fmoc à l'aide de 13 mL de PIP 20% dans la NMP sont réalisées. Les filtrats réunis sont analysés par UV en diluant 40 µL dans 2 mL de PIP 20% dans la NMP à une longueur d'onde de 290 nm. L'absorbance est de 0,296 correspondant selon la courbe étalon à une concentration de $0,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ permettant de donner un loading de $0,99 \text{ mmol.g}^{-1}$ pour la résine.

c. Couplages peptidiques du peptide linéaire protégé.



Description générale :

L'acide aminé (3 eq.) est solubilisé dans 150 mL de NMP avec de l'HOBt (6 g, 44,4 mmol, 3 eq.). Après solubilisation totale, le DIC (7,56 mL, 48,8 mmol, 3,3 eq.) est ajouté juste avant que le mélange ne soit ajouté à la résine de chlorure de 2-chlorotriptyle, préalablement fonctionnalisée par le premier acide aminé, (14 g, L = $0,99 \text{ mmol.g}^{-1}$). L'ensemble est laissé sous agitation à la roue à température ambiante durant 1h. Un test de

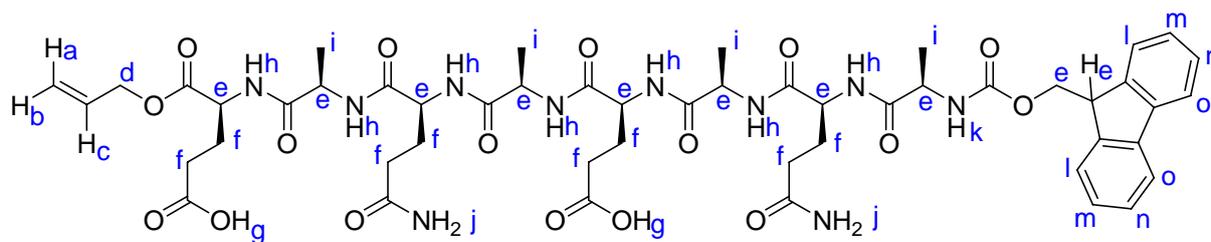
Kaiser est réalisé afin de suivre l'avancée de la réaction ; et lorsque le couplage est terminé, la résine est lavée par 200 mL de NMP (4 x 1 min).

Etapas de la synthèse :

- déprotection par 180 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP.
- couplage à l'aide du Fmoc-D-Ala-OH (13,8 g, 44,4 mmol, 3 eq.) en 1 h.
- déprotection par 180 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 180 mL de NMP et déprotection par 180 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.
- couplage à l'aide du Fmoc-L-Gln(NHTrt)-OH (27 g, 44,4 mmol, 3 eq.) en 6 h.
- déprotection par 180 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 180 mL de NMP et déprotection par 180 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.
- couplage à l'aide du Fmoc-D-Ala-OH (13,8 g, 44,4 mmol, 3 eq.) en 4 h.
- déprotection par 180 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 180 mL de NMP et déprotection par 180 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.
- couplage à l'aide du Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH (18,88 g, 44,4 mmol, 3 eq.) en 3 h.
- déprotection par 180 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 180 mL de NMP et déprotection par 180 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.
- couplage à l'aide du Fmoc-D-Ala-OH (13,8 g, 44,4 mmol, 3 eq.) en 3 h 30.
- déprotection par 180 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 180 mL de NMP et déprotection par 180 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.
- couplage à l'aide du Fmoc-L-Gln(NHTrt)-OH (27 g, 44,4 mmol, 3 eq.) en 6 h 30.
- déprotection par 180 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 180 mL de NMP et déprotection par 180 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.
- couplage à l'aide du Fmoc-D-Ala-OH (13,8 g, 44,4 mmol, 3 eq.) en 7 h.

La résine est alors lavée par 3 x 150 mL de DMF, 3 x 150 mL de MeOH et 3 x 150 mL d'hexane et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

Le clivage de 50 mg de résine est réalisé à l'aide de 1,5 mL de TFA en présence de 45 μ L de TIS et 45 μ L d' H_2O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 1 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 5 mL d' Et_2O , séché sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h. Le peptide linéaire protégé N-terminal est obtenu sous la forme d'une poudre blanche.

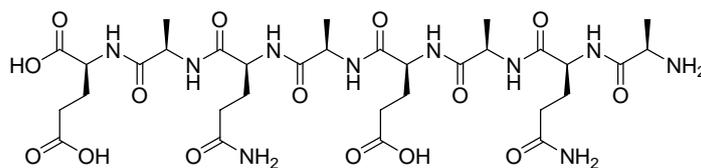


RMN ^1H (400MHz, DMSO- d_6) δ ppm : 1,12-1,28 (m, H_i , 12H), 1,65-2,33 (M, H_f , 16H), 4,00-4,33 (M, H_e , 11H), 4,50-4,60 (m, H_d , 2H), 5.19 (dd, H_b , 1H, $^2\text{J}_{\text{HbHa}} = 1,2$ Hz, $^3\text{J}_{\text{HbHc}} = 9,6$ Hz), 5.28 (dd, H_a , 1H, $^2\text{J}_{\text{HaHb}} = 1,2$ Hz, $^3\text{J}_{\text{HaHc}} = 16$ Hz), 5.87 (m, H_c , 1H), 7,25 (s, H_j , 4H), 7,32 (dd, H_m , 2H, $^3\text{J}_{\text{HmHn}} = ^3\text{J}_{\text{HmHl}} = 16$ Hz), 7,39 (dd, H_n , 2H, $^3\text{J}_{\text{HnHo}} = ^3\text{J}_{\text{HnHm}} = 16$ Hz), 7.60 (d, H_k , 1H, $^3\text{J}_{\text{HkHe}} = 6.4$ Hz), 7,70 (dd, H_l , 2H, $^3\text{J}_{\text{HlHm}} = 16$ Hz), 7,87 (d, H_o , 2H, $^3\text{J}_{\text{HoHn}} = 16$ Hz), 7,95-8.23 (M, H_h , 7H), 11,80 (s, H_g , 2H).

Masse (ES $^+$) : 1079,66 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, masse (ES $^-$) : 1077.66 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

HPLC dans DMSO : 5,95 min.

d. Déprotections de la chaîne principale donnant le peptide linéaire déprotégé.²

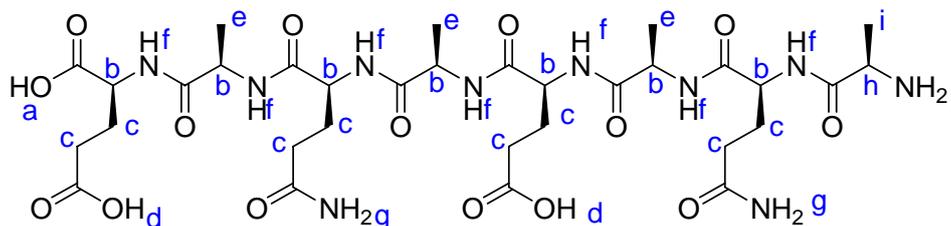


$\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{N}_{10}\text{O}_{15}$: 816,36 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Dans une seringue de 250 mL pour synthèse sur support solide contenant la résine (6 g, 2,97 mmol, $L=0,99$ $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) est introduit la morpholine (13 mL, 148 mmol, 50 eq.) et le $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (515 mg, 0,44 mmol, 0,15 eq.) dans 225 mL d'un mélange DMSO / THF / HCl 0,5 M (2 : 2 : 1). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à la roue à température ambiante durant 24 h. La résine est filtrée et lavée par 3 x 100 mL de DCM, 3 x 100 mL de DCM / HCl 0,5 M (1 : 1) et 3 x 100 mL de DCM. La résine est ensuite lavée par 3 x 100 mL de DMF, 3 x 100 mL d'isopropanol et 3 x 100 mL de n-Hexane et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

Le clivage de 70 mg de résine est réalisé à l'aide de 1 mL de TFA en présence de 30 μL de TIS et 30 μL d' H_2O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 1 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 5 mL d' Et_2O , séché sous vide au dessiccateur

sur KOH durant 18 h. Le peptide linéaire déprotégé est obtenu sous la forme d'une poudre blanche.

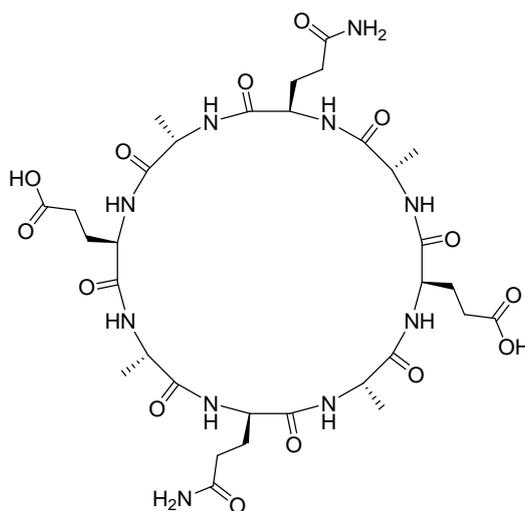


RMN ^1H (400MHz, DMSO- d_6) δ ppm : 1,12-1,28 (m, H_e , 9H), 1,33 (d, H_i , 3H, $^3J_{\text{HiHh}} = 7.2$ Hz), 1,65-2,30 (M, H_c , 16H), 3,76-3,84 (m, H_h , 1H), 4,10-4,40 (M, H_b , 7H), 7,25-7,28 (M, H_g , 4H), 7,95-8.30 (M, H_f , 7H), 8,53 (d, H_j , 2H, $^3J_{\text{HjHh}} = 6.4$ Hz).

Masse (ES+) : 817,44 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, masse (ES-) : 815,46 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

HPLC dans DMSO: 3,40 min.

e. Cyclisation et clivage de la résine pour donner le cyclopeptide [1].

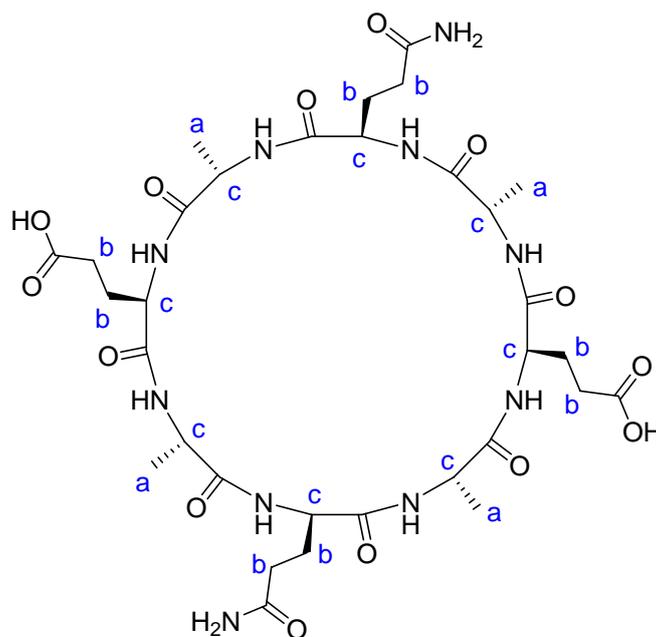


$\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{N}_{10}\text{O}_{14}$: 798,35 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Dans une seringue de 20 mL pour synthèse sur support solide est introduit la résine (2 g, 0,99 mmol, $L = 0,99 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) et 10 mL de DMF. Après agitation durant 1 h afin de faire gonfler la résine, cette dernière est filtrée et une solution de DIC (230 μL , 1,485 mmol, 1,5 eq.) et d'HOAt (134,7 mg, 0,99 mmol, 1 eq.) dans 10 mL de DMF est ajoutée. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à la roue à température ambiante durant 3 jours.

La résine est filtrée, lavée par 3 x 10 mL de DMF, 3 x 10 mL d'isopropanol, 3 x 10 mL de n-Hexane et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

La résine (2 g, 0,99 mmol, $L = 0.99 \text{ mmol.g}^{-1}$) est mise en présence de 20 mL de TFA, 0,6 mL de TIS et 0,6 mL d' H_2O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 10 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 10 mL d' Et_2O , séché sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h. Le cyclopeptide **[1]** est obtenu sous la forme d'une poudre grise (889 mg).



RMN ^1H (400MHz, $\text{D}_2\text{O-NaOD}$) δ ppm : 1,23-1,29 (M, H_a , 12H), 1,72-2,23 (M, H_b , 16H), 4,17-4,33 (M, H_c , 8H).

Masse (ES+) : 799,19 g.mol^{-1} , masse (ES-) : 797,21 g.mol^{-1} .

HPLC dans $\text{H}_2\text{O-NaOH}$ (generic70) : 5 min

f. Traitement acido basique pour la purification du cyclopeptide [1].

880 mg de poudre issue du clivage de la résine après synthèse sont introduits dans un ballon de 50 mL et 35 mL d' H_2O distillée sont ajoutés ($[\text{c}] = 25 \text{ mg.mL}^{-1}$). Deux eq. de NaOH sont ajoutés (pH contrôlé à 9) et la solution est centrifugée durant 15 min à 15000 tours/min. Le surnageant est introduit dans un ballon de 100 mL et 11 mL d'une solution de TFA à 1% dans l'ACN est ajoutée (pH contrôlé à 4). Le précipité blanc formé est centrifugé 15 min à 15000 tours / min, lavé par 3 x 5 mL d' H_2O et repris par 20 mL d' H_2O pour être lyophilisé. Le cyclopeptide **[1]** est obtenu sous la forme d'une poudre blanche avec une pureté supérieure à 90 % (238 mg, Rdt de purification 30%).

4. Le cyclo[-D-Ala-Glu-(D-Ala-Gln)₃-] [2].

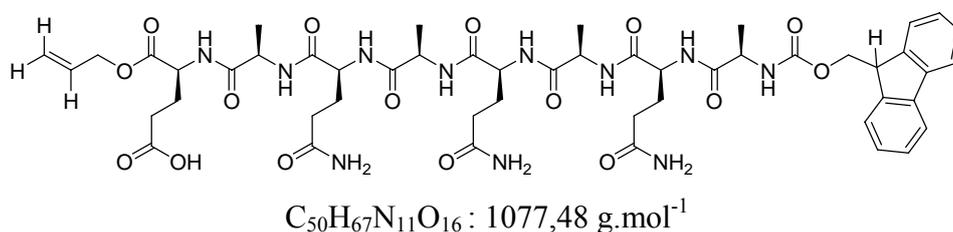
a. Fonctionnalisation de la résine.

Dans un bicol de 250 mL purgé, sous azote, est introduit le FmocGlu(OH)-OAll (1,74 g, 4,25 mmol, 0,5 eq.) dans 75 mL de DCM fraîchement distillé sur P₂O₅. Après ajout du DIEA (2,22 mL, 12,75 mmol, 1,5 eq.) et solubilisation totale, le milieu réactionnel est transféré dans une seringue de 250 mL pour synthèse sur support solide sous azote contenant la résine de chlorure de 2-chlorotrityle (5 g, 8,5 mmol). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation sur plateau à température ambiante sous azote durant 30 min. La résine est filtrée, lavée par 4 x 100mL d'un mélange DCM / MeOH / DIEA (17 : 2 : 1), 4 x 100 mL de DCM et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

b. Détermination du loading.

Une partie de la résine (21,7 mg) est prélevée et 4 étapes (5 min chaque) de déprotections Fmoc à l'aide de 1 mL de PIP 20% dans la NMP sont réalisés. Les filtrats réunis sont analysés par UV en diluant 40 µL dans 2 mL de PIP 20% dans la NMP à une longueur d'onde de 290 nm. L'absorbance est de 0,355 correspondant selon la courbe étalon à une concentration de 0,65 10⁻⁴ mol.L⁻¹ permettant de donner un loading de 0,6 mmol.g⁻¹ pour la résine.

c. Couplages peptidiques du peptide linéaire protégé.



Description générale :

L'acide aminé (3 eq.) est solubilisé dans 12 mL de NMP avec de l'HOBt (487 mg, 3,6 mmol, 3 eq.). Après solubilisation totale, le DIC (613 µL, 3,96 mmol, 3,3 eq.) est ajouté juste avant que le mélange ne soit ajouté à la résine de chlorure de 2-chlorotrityle, préalablement fonctionnalisée par le premier acide aminé, (2 g, L = 0,6 mmol.g⁻¹). L'ensemble est laissé

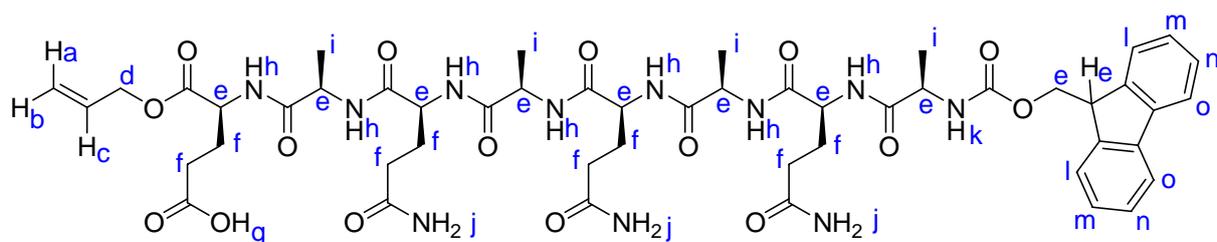
sous agitation à la roue à température ambiante durant 1h. Un test de Kaiser est réalisé afin de suivre l'avancée de la réaction ; et lorsque le couplage est terminé, la résine est lavée par 15 mL de NMP (4 x 1 min).

Etapas de la synthèse :

- déprotection par 12 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP.
- couplage à l'aide du Fmoc-D-Ala-OH (1,12 g, 3,6 mmol, 3 eq.) en 3 h 30.
- déprotection par 12 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 12 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.
- couplage à l'aide du Fmoc-L-Gln(NHTrt)-OH (2,19 g, 3,6 mmol, 3 eq.) en 7 h.
- déprotection par 12 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 12 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.
- couplage à l'aide du Fmoc-D-Ala-OH (1,12 g, 3,6 mmol, 3 eq.) en 4 h.
- déprotection par 12 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 12 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.
- couplage à l'aide du Fmoc-L-Gln(NHTrt)-OH (2,19 g, 3,6 mmol, 3 eq.) en 3 h.
- déprotection par 12 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 12 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.
- couplage à l'aide du Fmoc-D-Ala-OH (1,12 g, 3,6 mmol, 3 eq.) en 1 h 30.
- déprotection par 12 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 12 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.
- couplage à l'aide du Fmoc-L-Gln(NHTrt)-OH (2,19 g, 3,6 mmol, 3 eq.) en 3 h 30.
- déprotection par 12 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 12 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.
- couplage à l'aide du Fmoc-D-Ala-OH (1,12 g, 3,6 mmol, 3 eq.) en 1 h.

La résine est alors lavée par 3 x 15 mL de DMF, 3 x 15 mL de MeOH et 3 x 15 mL d'hexane et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

Le clivage de 100 mg de résine est réalisé à l'aide de 1,5 mL de TFA en présence de 45 µL de TIS et 45 µL d'H₂O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 1 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 5 mL d'Et₂O, séché sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h. Le peptide linéaire protégé est obtenu sous la forme d'une poudre blanche.

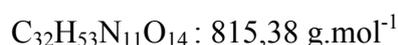
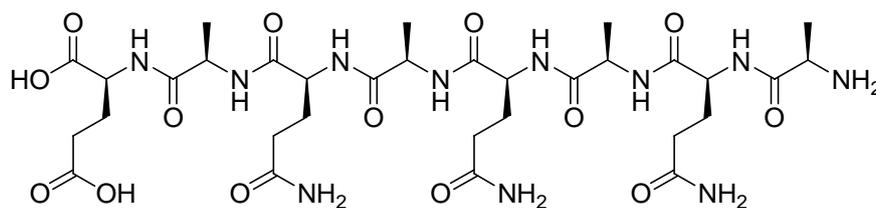


RMN ^1H (400MHz, DMSO- d_6) δ ppm : 1,12-1,28 (m, H_i , 12H), 1,65-2,33 (M, H_f , 16H), 4,00-4,33 (M, H_e , 11H), 4,50-4,60 (m, H_d , 2H), 5.19 (dd, H_b , 1H, $^2\text{J}_{\text{HbHa}} = 1,2$ Hz, $^3\text{J}_{\text{HbHc}} = 9,6$ Hz), 5.28 (dd, H_a , 1H, $^2\text{J}_{\text{HaHb}} = 1,2$ Hz, $^3\text{J}_{\text{HaHc}} = 16$ Hz), 5.87 (m, H_c , 1H), 7,25 (s, H_j , 4H), 7,32 (dd, H_m , 2H, $^3\text{J}_{\text{HmHn}} = ^3\text{J}_{\text{HmHl}} = 16$ Hz), 7,39 (dd, H_n , 2H, $^3\text{J}_{\text{HnHo}} = ^3\text{J}_{\text{HnHm}} = 16$ Hz), 7.60 (d, H_k , 1H, $^3\text{J}_{\text{HkHe}} = 6.4$ Hz), 7,70 (dd, H_l , 2H, $^3\text{J}_{\text{HlHm}} = 16$ Hz), 7,87 (d, H_o , 2H, $^3\text{J}_{\text{HoHn}} = 16$ Hz), 7,95-8.23 (M, H_h , 7H), 11,80 (s, H_g , 2H).

Masse (ES+) : 1078,69 (m/z), masse (ES-) : 1076,69 (m/z).

HPLC dans DMSO : 11,2 min.

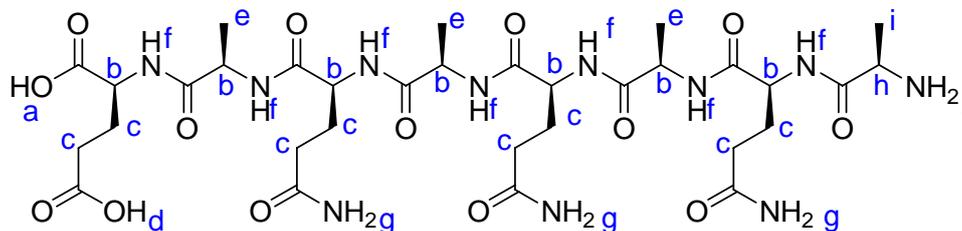
d. Déprotections de la chaîne principale donnant le peptide linéaire déprotégé.



Dans une seringue de 250 mL pour synthèse sur support solide contenant la résine (2 g, 1,2 mmol, $L=0,6 \text{ mmol.g}^{-1}$) est introduit la morpholine (5,25 mL, 60 mmol, 50 eq.) et le $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (208 mg, 0,18 mmol, 0,15 eq.) dans 75 mL d'un mélange DMSO / THF / HCl 0,5 M (2 : 2 : 1). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à la roue à Température ambiante durant 24 h. La résine est filtrée et lavée par 3 x 50 mL de DCM, 3 x 50 mL de DCM / HCl 0,5 M (1 : 1) et 3 x 50 mL de DCM. La résine est ensuite lavée par 3 x 50 mL de DMF, 3 x 50 mL d'isopropanol et 3 x 50 mL de n-Hexane et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

Le clivage de 70 mg de résine est réalisé à l'aide de 1 mL de TFA en présence de 30 μL de TIS et 30 μL d' H_2O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 1 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 5 mL d' Et_2O , séché sous vide au dessiccateur

sur KOH durant 18 h. Le peptide linéaire déprotégé est obtenu sous la forme d'une poudre blanche.

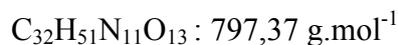
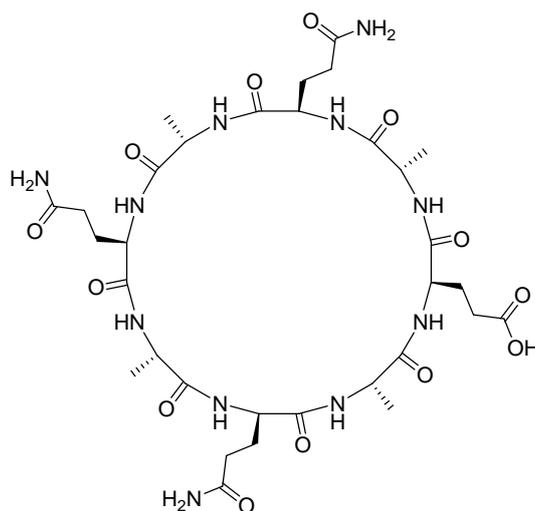


RMN ^1H (400MHz, DMSO- d_6) δ ppm : 1,12-1,28 (m, H_e , 9H), 1,33 (d, H_i , 3H, $^3\text{J}_{\text{HiHh}} = 7.2$ Hz), 1,65-2,30 (M, H_c , 16H), 3,76-3,84 (m, H_h , 1H), 4,10-4,40 (M, H_b , 7H), 7,25-7,28 (M, H_g , 6H), 7,95-8.30 (M, H_f , 7H), 8,53 (d, H_j , 2H, $^3\text{J}_{\text{HjHh}} = 6.4$ Hz), 11,80 (s, H_d , 1H).

Masse (ES $^+$) : 814,44 (m/z), masse (ES $^-$) : 816,46 (m/z).

HPLC dans DMSO: 4 min.

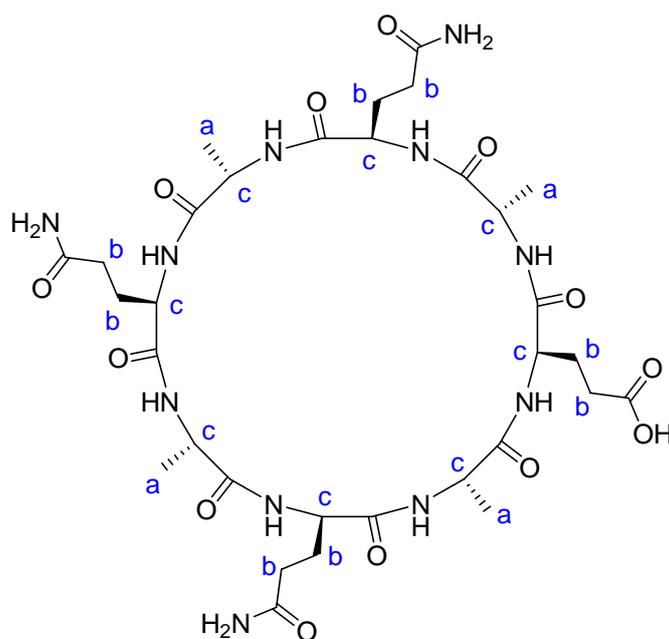
e. Cyclisation et clivage de la résine pour donner le cyclopeptide [2].



Dans une seringue de 20 mL pour synthèse sur support solide est introduit la résine (2,3 g, 0,6 mmol, $L = 0,6 \text{ mmol.g}^{-1}$) et 15 mL de DMF. Après agitation durant 1 h afin de faire gonfler la résine, cette dernière est filtrée et une solution de DIC (160 μL , 1,035 mmol, 1,5 eq.) et d'HOAt (94 mg, 0,6 mmol, 1 eq.) dans 11,5 mL de DMF est ajoutée. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à la roue à température ambiante durant 3 jours.

La résine est filtrée, lavée par 3 x 15 mL de DMF, 3 x 15 mL d'isopropanol, 3 x 15 mL de n-Hexane et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

La résine est mise en présence de 20 mL de TFA, 0,6 mL de TIS et 0,6 mL d'H₂O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 10 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 10 mL d'Et₂O, séché sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h. Le cyclopeptide [2] est obtenu sous la forme d'une poudre grise (656 mg).



RMN ¹H (400MHz, D₂O-NaOD) δ ppm : 1,23-1,29 (M, H_a, 12H), 1,72-2,23 (M, H_b, 16H), 4,17-4,33 (M, H_c, 8H).

Masse (ES⁺) : 798,19 (m/z), masse (ES⁻) : 796,21 (m/z).

HPLC dans H₂O-NaOH (generic70) : 3,5 min.

f. Traitement acido basique pour la purification du cyclopeptide [2].

151 mg de poudre issue du clivage de la résine après synthèse sont introduits dans un ballon de 25 mL et 6 mL d'H₂O distillée sont ajoutés ([c] = 25 mg.mL⁻¹). Deux eq. de NaOH sont ajoutés (pH contrôlé à 9) et la solution est centrifugée durant 15 min à 15000 tours/min. Le surnageant est introduit dans un ballon de 50 mL et 0,5 mL d'une solution de TFA à 1% dans l'ACN est ajoutée (pH contrôlé à 6). Le précipité blanc formé est centrifugé 15 min à 15000 tours / min, lavé par 3 x 1 mL d'H₂O et repris par 10 mL d'H₂O pour être lyophilisé. Le cyclopeptide [2] est obtenu sous la forme d'une poudre blanche avec une pureté supérieur à 90 % (33,7 mg, Rdt de purification 20%).

5. Le cyclo[(-D-Ala-Lys-D-Ala-Gln)₂-] [3].³

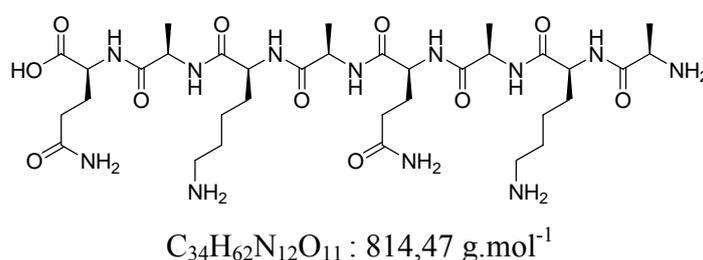
a. Fonctionnalisation de la résine.

Dans un bicol de 25 mL purgé, sous azote, est introduit le FmocGln(NHTrt)-OH (2,07 g, 3,4 mmol, 2 eq.) dans 11 mL de DCM fraîchement distillé sur P₂O₅. Après ajout du DIEA (1,5 mL, 8,5 mmol, 5 eq.) et solubilisation totale, le milieu réactionnel est transféré dans une seringue de 20 mL pour synthèse sur support solide sous azote contenant la résine de chlorure de 2-chlorotrityle (1 g, 1,7 mmol). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à la roue à température ambiante sous azote durant 30 min. La résine est filtrée, lavée par 4 x 15 mL d'un mélange DCM / MeOH / DIEA (17 : 2 : 1), 4 x 15 mL de DCM et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

b. Détermination du loading.

Une partie de la résine (20,5 mg) est prélevée et 4 étapes (5 min chaque) de déprotections Fmoc à l'aide de 2 mL de PIP 20% dans la NMP sont réalisées. Les filtrats réunis sont analysés par UV en diluant 40 µL dans 2 mL de PIP 20% dans la NMP à une longueur d'onde de 290 nm. L'absorbance est de 0,086 correspondant selon la courbe étalon à une concentration de 0,2 10⁻⁴ mol.L⁻¹ permettant de donner un loading de 0.78 mmol.g⁻¹ pour la résine.

c. Couplages peptidiques du peptide linéaire protégé.



Description générale :

L'acide aminé (3 eq.) est solubilisé dans 14 mL de NMP avec de l'HOBt (538 mg, 3,978 mmol, 3 eq.). Après solubilisation totale, le DIC (677 µL, 4,378 mmol, 3.3 eq.) est ajouté juste avant que le mélange ne soit ajouté à la résine de chlorure de 2-chlorotrityle, préalablement fonctionnalisée par le premier acide aminé, (1,7 g, L = 0,78 mmol.g⁻¹).

L'ensemble est laissé sous agitation à la roue à température ambiante durant 1h. Un test de Kaiser est réalisé afin de suivre l'avancée de la réaction ; et lorsque le couplage est terminé, la résine est lavée par 15 mL de NMP (4 x 1 min).

Etapas de la synthèse :

-déprotection par 12 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 12 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.

-couplage à l'aide du Fmoc-D-Ala-OH (1,24 g, 3,978 mmol, 3 eq.) en 3 h.

-déprotection par 12 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 12 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.

-couplage à l'aide du Fmoc-L-Lys(NHBoc)-OH (1,86 g, 3,978mmol, 3 eq.) en 2 h 15 puis lavages par 3 x 15 mL et nouveau couplage avec la même quantité de réactif durant 3 h.

-déprotection par 12 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 12 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.

-couplage à l'aide du Fmoc-D-Ala-OH (1,24 g, 3,978 mmol, 3 eq.) en 5 h 30.

-déprotection par 12 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 12 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.

-couplage à l'aide du Fmoc-L-Gln(NHTrt)-OH (2,43 g, 3,978 mmol, 3 eq.) en 5 h 30 puis lavages par 3 x 15 mL et nouveau couplage avec la même quantité de réactif durant 4 h 30.

-déprotection par 12 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 12 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.

-couplage à l'aide du Fmoc-D-Ala-OH (1,24 g, 3,978 mmol, 3 eq.) en 2 h 30 puis lavages par 3 x 15 mL et nouveau couplage avec la même quantité de réactif durant 1 h.

-déprotection par 12 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 12 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.

-couplage à l'aide du Fmoc-L-Lys(NHBoc)-OH (1,86 g, 3,978 mmol, 3 eq.) en 3 h 30 puis lavages par 3 x 15 mL et nouveau couplage avec la même quantité de réactif durant 1 h 30.

-déprotection par 12 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 12 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.

-couplage à l'aide du Fmoc-D-Ala-OH (1,24 g, 3,978 mmol, 3 eq.) en 1 h 30 puis lavages par 3 x 15 mL et nouveau couplage avec la même quantité de réactif durant 1 h 30.

-déprotection par 12 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 12 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.

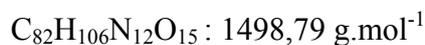
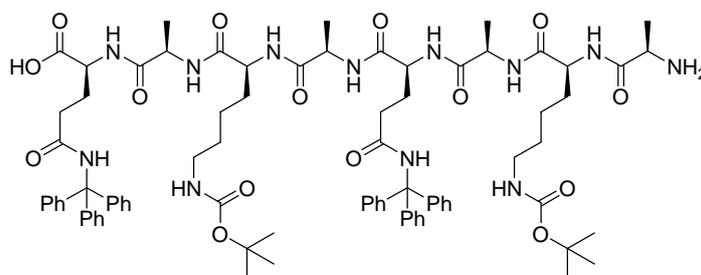
La résine est alors lavée par 3 x 15 mL de DMF, 3 x 15 mL de MeOH et 3 x 15 mL d'hexane et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

Le clivage de 20 mg de résine est réalisé à l'aide de 1 mL de TFA en présence de 30 μ L de TIS et 30 μ L d' H_2O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 1 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 5 mL d' Et_2O , séché sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h. Le peptide linéaire protégé est obtenu sous la forme d'une poudre blanche.

Masse (ES+) : 815,27 (m/z), masse (ES-) : 813,18 (m/z).

HPLC dans DMSO : 2,82 min.

d. Clivage de la résine.

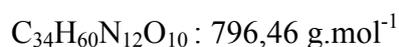
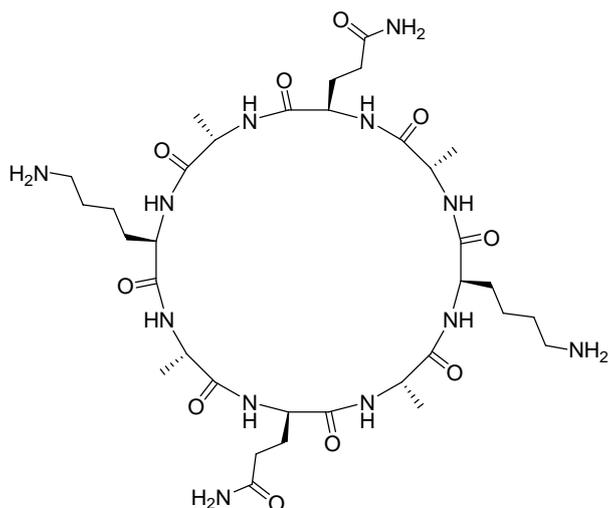


Le clivage de 2,3 g de résine est réalisé à l'aide de 2 x 1 min avec 10 mL de TFA 2 % dans le DCM. La résine est filtrée, lavée par 3 x 10 mL de DCM, 5 mL de dioxane est ajouté au filtrat et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 15 mL d' Et_2O , le précipité centrifugé 2 min à 800 tours / min, puis lavé par 3 x 5 mL de Et_2O et 3 x 5 mL d'AcN. Le résidu est lyophilisé durant 48 h dans 20 mL d' H_2O . Le peptide linéaire protégé est obtenu sous la forme d'une poudre blanche.

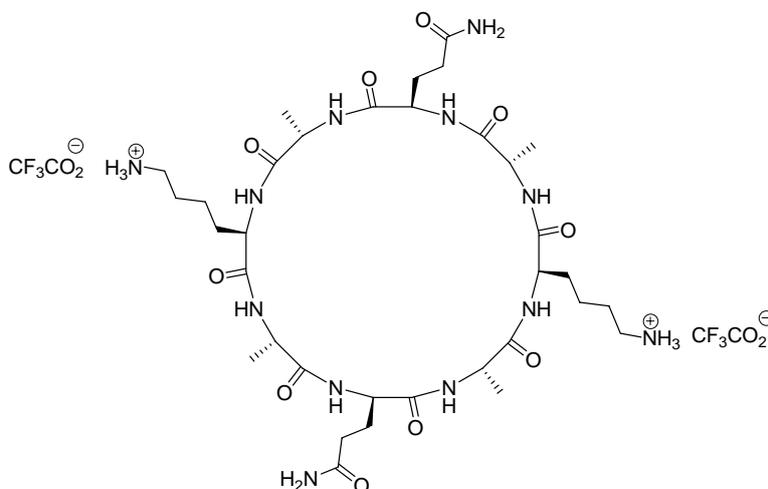
Masse (ES+) : 1500,06 (m/z), masse (ES-) : 1497,91 (m/z).

HPLC dans DMSO : 7,50 min.

e. Cyclisation pour donner le cyclopeptide [3].



Dans un ballon de 150mL contenant une solution du peptide linéaire protégé (138 mg, 0,092 mmol) dans 90 mL de DMF refroidi à 0°C est introduit l'HATU (140 mg, 0,368 mmol, 4 eq.), l'HOAt (735 mg, 0,368 mmol, 4 eq.) et enfin la DIEA (64 µL, 0,368 mmol, 4 eq.). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation durant 3 h à 0°C. L'ensemble est ensuite concentré à sec, le résidu précipité au MeOH, centrifugé 5 min à 15000 tours / min, lavé par 3 x 5 mL de MeOH. Le précipité blanc obtenu est séché sous vide au dessiccateur sur KOH durant 4 h. La poudre blanche obtenue est reprise par 3 mL d'un mélange TFA/DCM/TIS (48 : 50 : 2) durant 1 h 30 à température ambiante sous agitation. Après concentration à sec, le résidu est précipité à l'Et₂O et lavé par 3 x 10 mL d'Et₂O. Le cyclopeptide [3] est obtenu sous la forme d'une poudre blanche.



Masse (ES⁺) : 797,33 (m/z), masse (ES⁻) : 795,32 (m/z).

HPLC dans DMSO : 1,95 min

6. Les cyclo[(-D-Phe-Glu-D-Phe-Gln)₂-] [4] et cyclo[-D-Phe-Glu-(D-Phe-Gln)₃-] [5].

Synthèse commune.

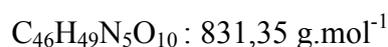
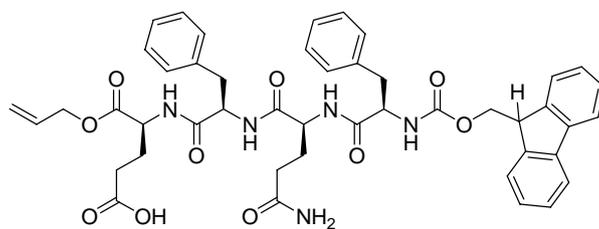
a. Fonctionnalisation de la résine.

Dans un bicol de 250 mL purgé, sous azote, est introduit le FmocGlu(OH)-OAll (1,74 g, 4,25 mmol, 0,5 eq.) dans 75 mL de DCM fraîchement distillé sur P₂O₅. Après ajout du DIEA (2,22 mL, 12,75 mmol, 1,5 eq.) et solubilisation totale, le milieu réactionnel est transféré dans une seringue de 250 mL pour synthèse sur support solide sous azote contenant la résine de chlorure de 2-chlorotriyle (5 g, 8,5 mmol). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation sur plateau à température ambiante sous azote durant 30 min. La résine est filtrée, lavée par 4 x 100mL d'un mélange DCM / MeOH / DIEA (17 : 2 : 1), 4 x 100 mL de DCM et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

b. Détermination du loading.

Une partie de la résine (20 mg) est prélevée et 4 étapes (5 min chaque) de déprotections Fmoc à l'aide de 1 mL de PIP 20% dans la NMP sont réalisées. Les filtrats réunis sont analysés par UV en diluant 40 µL dans 2 mL de PIP 20% dans la NMP à une longueur d'onde de 290 nm. L'absorbance est de 0,265 correspondant selon la courbe étalon à une concentration de 0,48 10⁻⁴ mol.L⁻¹ permettant de donner un loading de 0.48 mmol.g⁻¹ pour la résine.

c. Couplages peptidiques du peptide linéaire protégé.



Description générale :

L'acide aminé (3 eq.) est solubilisé dans 12 mL de NMP avec de l'HOBt (389 mg, 2,88 mmol, 3 eq.). Après solubilisation totale, le DIC (490 µL, 3,168 mmol, 3,3 eq.) est ajouté

juste avant que le mélange ne soit ajouté à la résine de chlorure de 2-chlorotriptyle, préalablement fonctionnalisée par le premier acide aminé, (2 g, L = 0,48 mmol.g⁻¹). L'ensemble est laissé sous agitation à la roue à température ambiante durant 1h. Un test de Kaiser est réalisé afin de suivre l'avancée de la réaction ; et lorsque le couplage est terminé, la résine est lavée par 15 mL de NMP (4 x 1 min).

Etapas de la synthèse :

-déprotection par 3 x 5 min avec 12 mL de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 1 x 5 min avec 12 mL de PIP 20 % dans la NMP.

-couplage à l'aide du Fmoc-D-Phe-OH (1,11 g, 2,88 mmol, 3 eq.) en 2 h 30.

-déprotection par 3 x 5 min avec 12 mL de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 1 x 5 min avec 12 mL de PIP 20 % dans la NMP.

-couplage à l'aide du Fmoc-L-Gln(NHTrt)-OH (1,76 g, 2,88 mmol, 3 eq.) en 4 h.

-déprotection par 3 x 5 min avec 12 mL de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 1 x 5 min avec 12 mL de PIP 20 % dans la NMP.

-couplage à l'aide du Fmoc-D-Phe-OH (1,11 g, 2,88 mmol, 3 eq.) en 2 h 30.

La résine est alors lavée par 3 x 15 mL de DMF, 3 x 15 mL de MeOH et 3 x 15 mL d'hexane et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

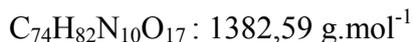
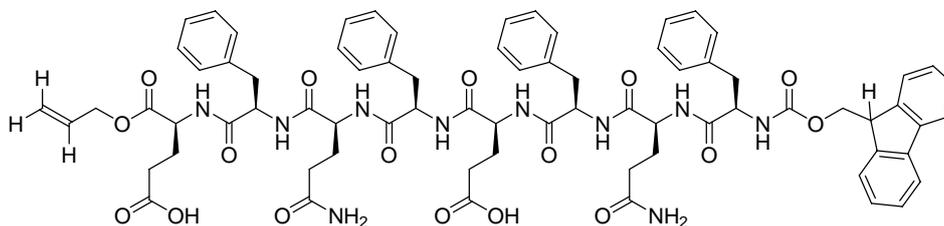
Le clivage de 20 mg de résine est réalisé à l'aide de 1 mL de TFA en présence de 30 µL de TIS et 30 µL d'H₂O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 1 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 5 mL d'Et₂O, séché sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h. Le peptide linéaire protégé est obtenu sous la forme d'une poudre blanche.

Masse (ES⁺) : 832,38 (m/z), masse (ES⁻) : 830,43 (m/z).

HPLC dans DMSO: 8,05 min

Synthèse du cyclopeptide [4].

a. Couplages peptidiques.



Description générale :

L'acide aminé (3 eq.) est solubilisé dans 5 mL de NMP avec de l'HOBt (194 mg, 1,44 mmol, 3 eq.). Après solubilisation totale, le DIC (245 μ L, 1,58 mmol, 3.3 eq.) est ajouté juste avant que le mélange ne soit ajouté à la résine de chlorure de 2-chlorotriptyle, préalablement fonctionnalisée par le premier acide aminé, (1 g, L = 0.48 mmol.g⁻¹). L'ensemble est laissé sous agitation à la roue à température ambiante durant 1h. Un test de Kaiser est réalisé afin de suivre l'avancée de la réaction ; et lorsque le couplage est terminé, la résine est lavée par 10 mL de NMP (4 x 1 min).

Etapas de la synthèse :

-déprotection par 6 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 6 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.

-couplage à l'aide du Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH (610,7 mg, 1,44 mmol, 3 eq.) en 4 h 30.

-déprotection par 6 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 6 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.

-couplage à l'aide du Fmoc-D-Phe-OH (558 mg, 1,44 mmol, 3 eq.) en 6 h.

-déprotection par 6 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 6 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.

-couplage à l'aide du Fmoc-L-Gln(NHTrt)-OH (879 mg, 1,44 mmol, 3 eq.) en 6 h.

-déprotection par 6 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 6 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.

-couplage à l'aide du Fmoc-D-Phe-OH (558 mg, 1,44 mmol, 3 eq.) en 4 h.

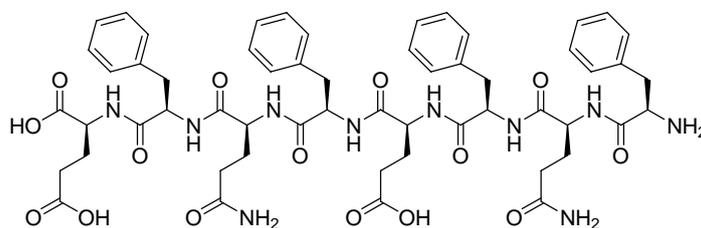
La résine est alors lavée par 3 x 15 mL de DMF, 3 x 15 mL de MeOH et 3 x 15 mL d'hexane et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

Le clivage de 80 mg de résine est réalisé à l'aide de 5 mL de TFA en présence de 30 μ L de TIS et 30 μ L d' H_2O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 1 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 5 mL d' Et_2O , séché sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h. Le peptide linéaire protégé est obtenu sous la forme d'une poudre blanche.

Masse (ES+) : 1383,82 (m/z), masse (ES-) : 1381,81 (m/z).

HPLC dans DMSO: 7,75 min.

b. Déprotections de la chaîne principale donnant le peptide linéaire déprotégé.



$\text{C}_{56}\text{H}_{68}\text{N}_{10}\text{O}_{15}$: 1120,49 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

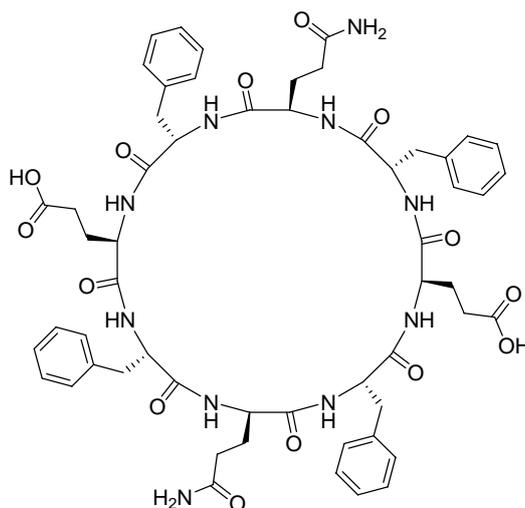
Dans une seringue de 60 mL pour synthèse sur support solide contenant la résine (2 g, 1,2 mmol, $L=0,48 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) est introduit la morpholine (2,1 mL, 24 mmol, 50 eq.) et le $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (83 mg, 0,072 mmol, 0,15 eq.) dans 35 mL d'un mélange DMSO / THF / HCl 0,5 M (2 : 2 : 1). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à la roue à température ambiante durant 24 h. La résine est filtrée et lavée par 3 x 30 mL de DCM, 3 x 30 mL de DCM / HCl 0,5 M (1 : 1) et 3 x 30 mL de DCM. La résine est ensuite lavée par 3 x 50 mL de DMF, 3 x 50 mL d'isopropanol et 3 x 50 mL de n-Hexane et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

Le clivage de 20 mg de résine est réalisé à l'aide de 1 mL de TFA en présence de 30 μ L de TIS et 30 μ L d' H_2O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 1 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 5 mL d' Et_2O , séché sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h. Le peptide linéaire déprotégé est obtenu sous la forme d'une poudre blanche.

Masse (ES+) : 1121,67 (m/z), masse (ES-) : 1119,71 (m/z).

HPLC dans DMSO: 5,65 min.

c. Essais de cyclisation.



Cyclisation au DIC :

Dans une seringue de 20 mL pour synthèse sur support solide est introduit la résine (100 mg, 0,024 mmol, $L = 0,48 \text{ mmol.g}^{-1}$) et 1 mL de DMF. Après agitation durant 1 h afin de faire gonfler la résine, cette dernière est filtrée et une solution de DIC (5,5 μL , 0,042 mmol, 1,5 eq.) et d'HOAt (à 0,5 N dans le DMF) (48 mg, 0,048 mmol, 1 eq.) dans 1 mL de DMF est ajoutée. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à la roue à température ambiante durant 3 jours. La résine est filtrée, lavée par 3 x 15 mL de DMF, 3 x 15 mL d'isopropanol, 3 x 15 mL de n-Hexane et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

Le clivage de 20 mg de résine est réalisé à l'aide de 1 mL de TFA et en présence de 30 μL de TIS et 30 μL d' H_2O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 1 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 5 mL d' Et_2O , séché sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h. L'analyse LC/MS, réalisée en solubilisant le produit dans le DMSO, ne montre aucun produit de cyclisation, il reste majoritairement du peptide linéaire.

La réaction est alors relancée dans les mêmes conditions durant encore trois jours mais aucune avancée n'est observée en LC/MS.

Cyclisation au PyBrOP :

Dans une seringue de 20 mL pour synthèse sur support solide est introduit la résine (100 mg, 0,024 mmol, $L = 0,48 \text{ mmol.g}^{-1}$) et 2 mL de DMF. Après agitation durant 1 h afin de faire gonfler la résine, cette dernière est filtrée et une solution de PyBrOP (67,1 mg, 0,144

mmol, 3 eq.) et de DIEA (50 μ L, 0,288 mmol, 6 eq.) dans 2 mL de DMF est ajoutée. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à la roue à température ambiante durant 3 jours. La résine est filtrée, lavée par 3 x 15 mL de DMF, 3 x 15 mL d'isopropanol, 3 x 15 mL de n-Hexane et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

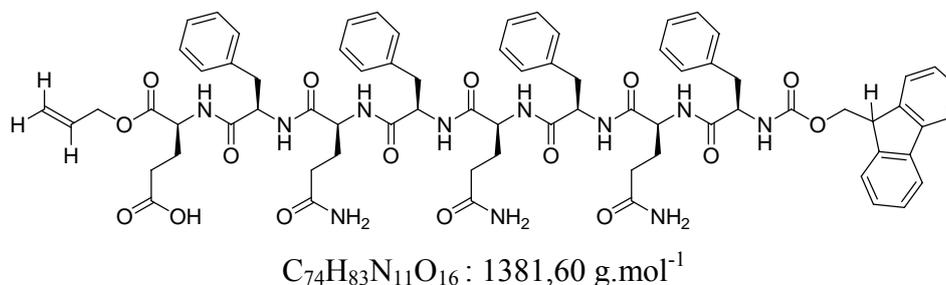
Le clivage à partir de 20 mg de résine est réalisé à l'aide de 1 mL de TFA et en présence de 30 μ L de TIS et 30 μ L d' H_2O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 1 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 5 mL d' Et_2O , séché sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h. L'analyse LC/MS, réalisée en solubilisant le produit dans le DMSO, montre des traces de produit de cyclisation mais il reste majoritairement du peptide linéaire.

La réaction est alors relancée dans les mêmes conditions durant encore trois jours mais aucune avancée n'est observée en LC/MS.

Synthèse du cyclopeptide [5].

a. Couplages peptidiques.

Synthèse identique au cyclopeptide [4].

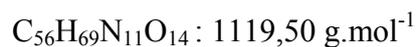
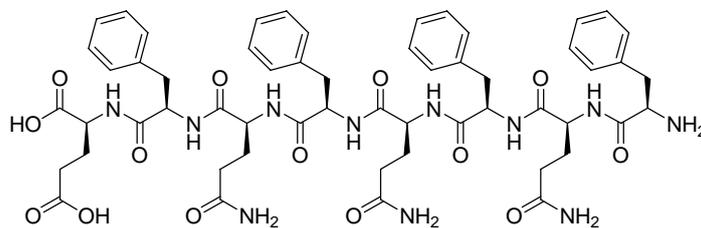


Masse (ES+) : 1382,82 (m/z), masse (ES-) : 1380,85 (m/z).

HPLC dans DMSO: 7,60 min.

b. Déprotections de la chaîne principale donnant le peptide linéaire déprotégé.

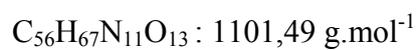
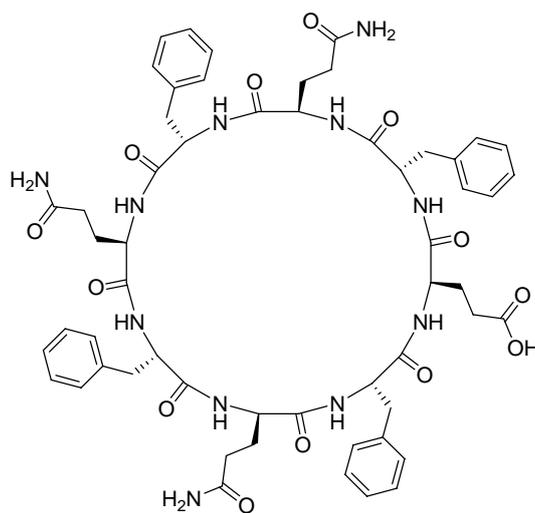
Synthèse identique au cyclopeptide [4].



Masse (ES+) : 1120,66 (m/z), masse (ES-) : 1118,77 (m/z).

HPLC dans DMSO: 5,62 min.

c. Essais de cyclisation.

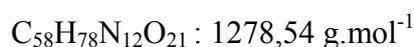
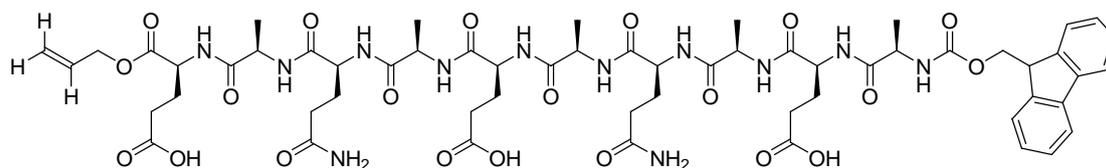


Essais identiques au cyclopeptide [4] et les mêmes résultats sont obtenus.

7. Les cyclo[(-D-Ala-Glu-D-Ala-Gln)₂-D-Ala-Glu-] [6] et cyclo[-(D-Ala-Glu-D-Ala-Gln)₃-] [7].

Synthèse du cyclopeptide [6].

a. Couplages peptidiques du peptide linéaire protégé.



Description générale :

L'acide aminé (3 eq.) est solubilisé dans 15 mL de NMP avec de l'HOBt (602 mg, 4,45 mmol, 3 eq.). Après solubilisation totale, le DIC (760 µL, 4,9 mmol, 3,3 eq.) est ajouté juste avant que le mélange ne soit ajouté à la résine du cyclopeptide linéaire (issu des étapes de couplages peptidiques lors de la synthèse du cyclopeptide [1]) (1,5 g, L = 0,99 mmol.g⁻¹). L'ensemble est laissé sous agitation à la roue à température ambiante durant 1h. Un test de Kaiser est réalisé afin de suivre l'avancée de la réaction ; et lorsque le couplage est terminé, la résine est lavée par 20 mL de NMP (4 x 1 min).

Etapes de la synthèse :

-déprotection par 18 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 18 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.

-couplage à l'aide du Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH (610,7 mg, 1,44 mmol, 3 eq.) en 4 h 30.

-déprotection par 18 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 18 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.

-couplage à l'aide du Fmoc-D-Ala-OH (558 mg, 1,44 mmol, 3 eq.) en 6 h.

La résine est alors lavée par 3 x 20 mL de DMF, 3 x 20 mL de MeOH et 3 x 20 mL d'hexane et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

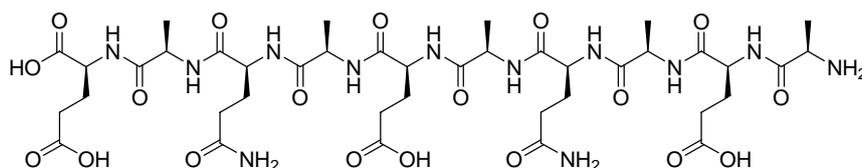
Le clivage de 20 mg de résine est réalisé à l'aide de 1 mL de TFA en présence de 30 µL de TIS et 30 µL d'H₂O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 1 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 5 mL d'Et₂O, séché sous vide au dessiccateur

sur KOH durant 18 h. Le peptide linéaire déprotégé est obtenu sous la forme d'une poudre blanche.

Masse (ES+) : 1279,56 (m/z), masse (ES-) : 1277,40 (m/z).

HPLC dans DMSO: 5,95 min.

b. Déprotections de la chaîne principale donnant le peptide linéaire déprotégé.



$C_{40}H_{64}N_{12}O_{19}$: 1016,44 g.mol⁻¹

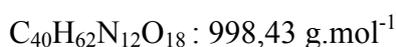
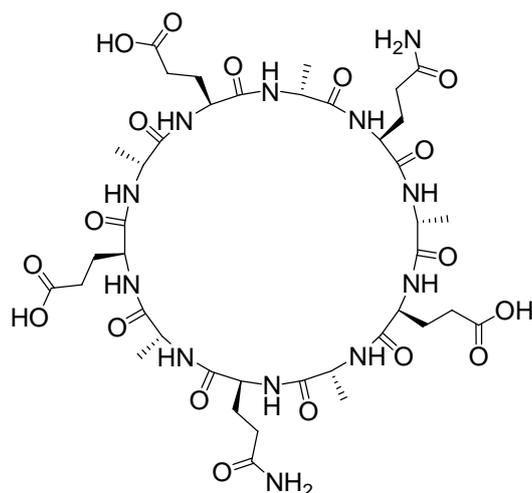
Dans une seringue de 60 mL pour synthèse sur support solide contenant la résine (1,5 g, 1,48 mmol, L=0,99 mmol.g⁻¹) est introduit la morpholine (6,5 mL, 74 mmol, 50 eq.) et le Pd(PPh₃)₄ (257 mg, 0,22 mmol, 0,15 eq.) dans 35 mL d'un mélange DMSO / THF / HCl 0,5 M (2 : 2 : 1). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à la roue à température ambiante durant 24 h. La résine est filtrée et lavée par 3 x 30 mL de DCM, 3 x 30 mL de DCM / HCl 0,5 M (1 : 1) et 3 x 30 mL de DCM. La résine est ensuite lavée par 3 x 50 mL de DMF, 3 x 50 mL d'isopropanol et 3 x 50 mL de n-Hexane et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

Le clivage de 20 mg de résine est réalisé à l'aide de 1 mL de TFA en présence de 30 µL de TIS et 30 µL d'H₂O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 1 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 5 mL d'Et₂O, séché sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h. Le peptide linéaire déprotégé est obtenu sous la forme d'une poudre blanche.

Masse (ES+) : 1017,47 (m/z), masse (ES-) : 1015,36 (m/z).

HPLC dans DMSO: 3,78 min.

c. Cyclisation.



Dans une seringue de 20 mL pour synthèse sur support solide est introduit la résine (679 mg, 0,67 mmol, $L = 0,99 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) et 15 mL de DMF. Après agitation durant 1 h afin de faire gonfler la résine, cette dernière est filtrée et une solution de DIC (364,5 μL , 2,35 mmol, 3,5 eq.) et d'HOAt (à 0,5 N dans le DMF) (225 μL , 2,35 mmol, 3,5 eq.) dans 15 mL de DMF est ajoutée. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à la roue à température ambiante durant 4 jours.

La résine est filtrée, lavée par 3 x 15 mL de DMF, 3 x 15 mL d'isopropanol, 3 x 15 mL de n-Hexane et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

La résine est mise en présence de 20 mL de TFA, 0,6 mL de TIS et 0,6 mL d' H_2O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 10 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 10 mL d' Et_2O , séché sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h. Le cyclopeptide **[6]** est obtenu sous la forme d'une poudre grise (650 mg).

Masse (ES+) : 999,37 (m/z), masse (ES-) : 997,39 (m/z).

HPLC dans DMSO: 4,78 min.

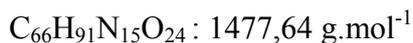
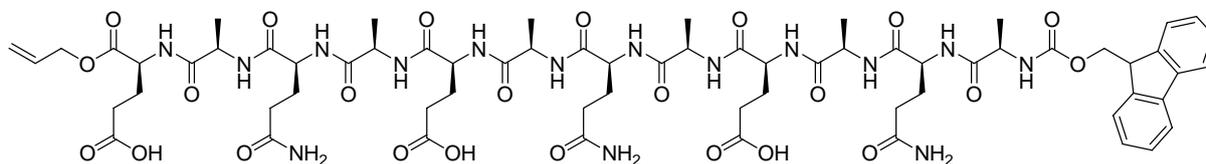
d. Traitement acido basique pour la purification du cyclopeptide [6].

650 mg de poudre issue du clivage de la résine après synthèse sont introduits dans un ballon de 50 mL et 26 mL d' H_2O distillée sont ajoutés ($[c] = 25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Deux eq. de NaOH

sont ajoutés (pH contrôlé à 9) et la solution est centrifugée durant 15 min à 15000 tours/min. Le surnageant est introduit dans un ballon de 100 mL et 9 mL d'une solution de TFA à 1% dans l'ACN est ajoutée (pH contrôlé à 4). Le précipité blanc formé est centrifugé 15 min à 15000 tours / min, lavé par 3 x 5 mL d'H₂O et repris par 20 mL d'H₂O pour être lyophilisé. Le cyclopeptide [6] est obtenu sous la forme d'une poudre blanche mais la LC/MS montre deux pics distincts correspondant à la même masse signifiant une racémisation lors de la purification.

Synthèse du cyclopeptide [7].

a. Couplages peptidiques du peptide linéaire protégé.



Description générale :

L'acide aminé (3 eq.) est solubilisé dans 18 mL de NMP avec de l'HOBt (800 mg, 5,94 mmol, 3 eq.). Après solubilisation totale, le DIC (1 mL, 6,53 mmol, 3,3 eq.) est ajouté juste avant que le mélange ne soit ajouté à la résine du cyclopeptide linéaire (issu des étapes de couplages peptidiques lors de la synthèse du cyclopeptide [1]) (2 g, L = 0,99 mmol.g⁻¹). L'ensemble est laissé sous agitation à la roue à température ambiante durant 1h. Un test de Kaiser est réalisé afin de suivre l'avancée de la réaction ; et lorsque le couplage est terminé, la résine est lavée par 30 mL de NMP (4 x 1 min).

Etapes de la synthèse :

- déprotection par 25 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 25 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.
- couplage à l'aide du Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH (2,5 g, 5,94 mmol, 3 eq.) en 3 h.
- déprotection par 25 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 25 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.
- couplage à l'aide du Fmoc-D-Ala-OH (1,85 g, 5,94 mmol, 3 eq.) en 4 h.
- déprotection par 25 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 25 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.

-couplage à l'aide du Fmoc-L-Gln(NHTrt)-OH (3,62 g, 5,94 mmol, 3 eq.) en 3 h 30 puis lavages par 3 x 30 mL et nouveau couplage avec la même quantité de réactifs durant 8 h 30.

-déprotection par 25 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 25 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.

- couplage à l'aide du Fmoc-D-Ala-OH (1,85 g, 5,94 mmol, 3 eq.) en 3 h.

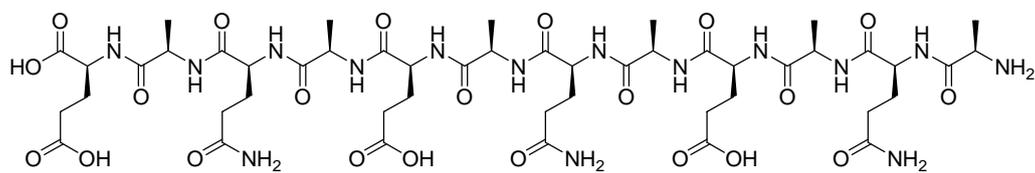
La résine est alors lavée par 3 x 30 mL de DMF, 3 x 30 mL de MeOH et 3 x 30 mL d'hexane et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

Le clivage de 20 mg de résine est réalisé à l'aide de 1 mL de TFA en présence de 30 μ L de TIS et 30 μ L d' H_2O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 1 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 5 mL d' Et_2O , séché sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h. Le peptide linéaire déprotégé est obtenu sous la forme d'une poudre blanche.

Masse (ES⁺) : 1478,73 (m/z), masse (ES⁻) : 1477,34 (m/z).

HPLC dans DMSO: 5,75 min.

b. Déprotections de la chaîne principale donnant le peptide linéaire déprotégé.



$C_{48}H_{77}N_{15}O_{22}$: 1215,54 g.mol⁻¹

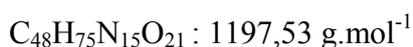
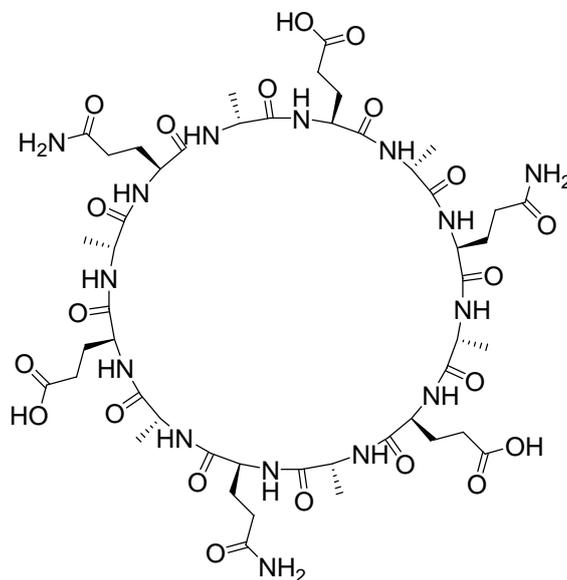
Dans une seringue de 60 mL pour synthèse sur support solide contenant la résine (2 g, 1,98 mmol, $L=0,99$ mmol.g⁻¹) est introduit la morpholine (8,7 mL, 99 mmol, 50 eq.) et le Pd(PPh₃)₄ (343 mg, 0,297 mmol, 0,15 eq.) dans 45 mL d'un mélange DMSO / THF / HCl 0,5 M (2 : 2 : 1). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à la roue à température ambiante durant 24 h. La résine est filtrée et lavée par 3 x 50 mL de DCM, 3 x 50 mL de DCM / HCl 0,5 M (1 : 1) et 3 x 50 mL de DCM. La résine est ensuite lavée par 3 x 50 mL de DMF, 3 x 50 mL d'isopropanol et 3 x 50 mL de n-Hexane et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

Le clivage de 20 mg de résine est réalisé à l'aide de 1 mL de TFA en présence de 30 μL de TIS et 30 μL d' H_2O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 1 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 5 mL d' Et_2O , séché sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h. Le peptide linéaire déprotégé est obtenu sous la forme d'une poudre blanche.

Masse (ES+) : 1216,60 (m/z), masse (ES-) : 1214,47 (m/z).

HPLC dans DMSO: 3,83 min.

c. Cyclisation.



Dans une seringue de 60 mL pour synthèse sur support solide est introduit la résine (1,5 g, 1,48 mmol, $L = 0,99 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) et 20 mL de DMF. Après agitation durant 1 h afin de faire gonfler la résine, cette dernière est filtrée et une solution de DIC (805 μL , 5,19 mmol, 3,5 eq.) et d' HOAt (à 0,5 N dans le DMF) (1 mL, 5,19 mmol, 3,5 eq.) dans 20 mL de DMF est ajoutée. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à la roue à température ambiante durant 4 jours.

La résine est filtrée, lavée par 3 x 30 mL de DMF, 3 x 30 mL d'isopropanol, 3 x 30 mL de n-Hexane et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

La résine est mise en présence de 20 mL de TFA, 0,6 mL de TIS et 0,6 mL d' H_2O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La

résine est filtrée, lavée par 3 x 10 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 10 mL d'Et₂O, séché sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h. Le cyclopeptide [6] est obtenu sous la forme d'une poudre grise (1 g).

Masse (ES+) : 1198,63 (m/z), masse (ES-) : 1196,65 (m/z).

HPLC dans DMSO: 4,05 min.

d. Traitement acido basique pour la purification du cyclopeptide [7].

1 g de poudre issue du clivage de la résine après synthèse est introduit dans un ballon de 50 mL et 40 mL d'H₂O distillée est ajouté ($[c] = 25 \text{ mg.mL}^{-1}$). Deux eq. de NaOH sont ajoutés (pH contrôlé à 9) et la solution est centrifugée durant 15 min à 15000 tours/min. Le surnageant est introduit dans un ballon de 100 mL et 14 mL d'une solution de TFA à 1% dans l'ACN est ajoutée (pH contrôlé à 4). Le précipité blanc formé est centrifugé 15 min à 15000 tours / min, lavé par 3 x 5 mL d'H₂O et repris par 20 mL d'H₂O pour être lyophilisé. Le cyclopeptide [7] est obtenu sous la forme d'une poudre blanche mais la LC/MS montre deux pics distincts correspondant à la même masse signifiant une racémisation lors de la purification.

8. Le cyclo[-(D-N^{Me}-Ala-Glu-D-N^{Me}-Ala-Gln)₂] [8].

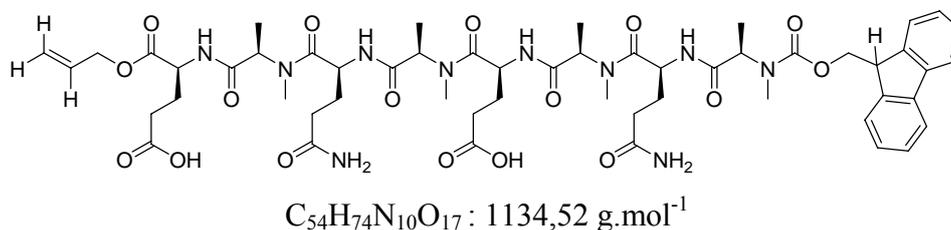
a. Fonctionnalisation de la résine.

Dans un bicol de 250 mL purgé, sous azote, est introduit le FmocGlu(OH)-OAll (1,74 g, 4,25 mmol, 0,5 eq.) dans 75 mL de DCM fraîchement distillé sur P₂O₅. Après ajout du DIEA (2,22 mL, 12,75 mmol, 1,5 eq.) et solubilisation totale, le milieu réactionnel est transféré dans une seringue de 250 mL pour synthèse sur support solide sous azote contenant la résine de chlorure de 2-chlorotriptyle (5 g, 8,5 mmol). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation sur plateau à température ambiante sous azote durant 30 min. La résine est filtrée, lavée par 4 x 100 mL d'un mélange DCM / MeOH / DIEA (17 : 2 : 1), 4 x 100 mL de DCM et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

b. Détermination du loading.

Une partie de la résine (20 mg) est prélevée et 4 étapes (5 min chaque) de déprotections Fmoc à l'aide de 1 mL de PIP 20% dans la NMP sont réalisées. Les filtrats réunis sont analysés par UV en diluant 40 µL dans 2 mL de PIP 20% dans la NMP à une longueur d'onde de 290 nm. L'absorbance est de 0,265 correspondant selon la courbe étalon à une concentration de 0,48 10⁻⁴ mol.L⁻¹ permettant de donner un loading de 0.48 mmol.g⁻¹ pour la résine.

c. Couplages peptidiques du peptide linéaire protégé.



Description générale :

L'acide aminé (3 eq.) est solubilisé dans 6 mL de NMP avec de l'HOBt (208 mg, 1,54 mmol, 3 eq.). Après solubilisation totale, le DIC (261,5 µL, 1,69 mmol, 3,3 eq.) est ajouté juste avant que le mélange ne soit ajouté à la résine de chlorure de 2-chlorotriptyle, préalablement fonctionnalisée par le premier acide aminé, (1 g, L = 0,48 mmol.g⁻¹).

L'ensemble est laissé sous agitation à la roue à température ambiante durant 1h. Un test de Kaiser est réalisé afin de suivre l'avancée de la réaction ; et lorsque le couplage est terminé, la résine est lavée par 10 mL de NMP (4 x 1 min).

Etapas de la synthèse :

-déprotection par 6 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 6 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.

-couplage à l'aide du Fmoc-D-*N*^{Me}-Ala-OH (500 mg, 1,53 mmol, 3 eq.) en 3 h 30.

-déprotection par 6 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 6 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.

-couplage à l'aide du Fmoc-L-Gln(NHTrt)-OH (938 mg, 1,53 mmol, 3 eq.) en 5 h.

-déprotection par 6 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 6 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.

-couplage à l'aide du Fmoc-D-*N*^{Me}-Ala-OH (500 mg, 1,53 mmol, 3 eq.) en 3 h.

-déprotection par 6 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 6 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.

-couplage à l'aide du Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH (654 mg, 1,53 mmol, 3 eq.) en 2 h 15.

-déprotection par 6 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 6 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.

-couplage à l'aide du Fmoc-D-*N*^{Me}-Ala-OH (500 mg, 1,53 mmol, 3 eq.) en 4 h 30.

-déprotection par 6 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 6 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.

-couplage à l'aide du Fmoc-L-Gln(NHTrt)-OH (938 mg, 1,53 mmol, 3 eq.) en 4 h 30.

-déprotection par 6 mL (3 x 5 min) de PIP 20 % dans la NMP, lavages par 3 x 15 mL de NMP et déprotection par 6 mL (5 min) de PIP 20 % dans la NMP.

-couplage à l'aide du Fmoc-D-*N*^{Me}-Ala-OH (500 mg, 1,53 mmol, 3 eq.) en 3 h 30.

La résine est alors lavée par 3 x 150 mL de DMF, 3 x 150 mL de MeOH et 3 x 150 mL d'hexane et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

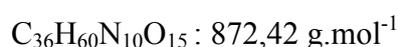
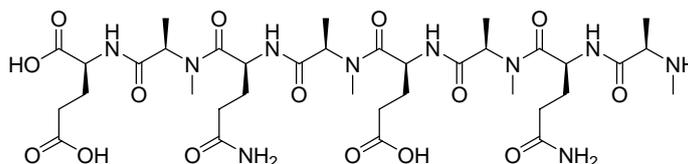
Le clivage de 20 mg de résine est réalisé à l'aide de 1 mL de TFA en présence de 30 μ L de TIS et 30 μ L d' H_2O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 1 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 5 mL d' Et_2O , séché sous vide au dessiccateur

sur KOH durant 18 h. Le peptide linéaire protégé est obtenu sous la forme d'une poudre blanche.

Masse (ES+) : 1135,74 (m/z), masse (ES-) : 1133,51 (m/z).

HPLC dans DMSO: 6,25 min.

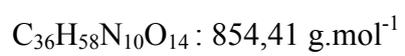
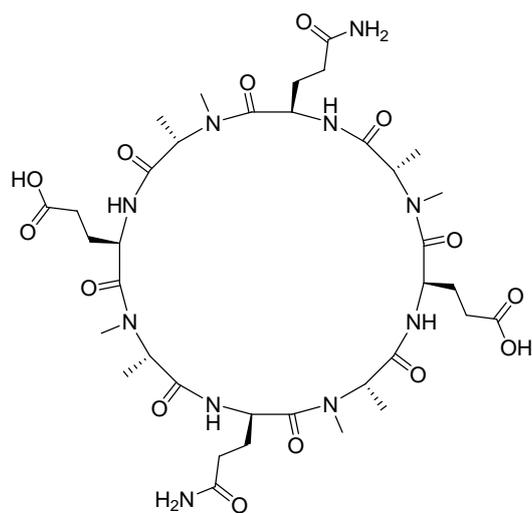
d. Déprotections de la chaîne principale donnant le peptide linéaire déprotégé.



Dans une seringue de 60 mL pour synthèse sur support solide contenant la résine (2 g, 0,48 mmol, $L=0,48 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) est introduit la morpholine (2,1 mL, 87,12 mmol, 50 eq.) et le $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (83 mg, 0,072 mmol, 0,15 eq.) dans 45 mL d'un mélange DMSO / THF / HCl 0,5 M (2 : 2 : 1). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à la roue à température ambiante durant 24 h. La résine est filtrée et lavée par 3 x 45 mL de DCM, 3 x 45 mL de DCM / HCl 0,5 M (1 : 1) et 3 x 45 mL de DCM. La résine est ensuite lavée par 3 x 45 mL de DMF, 3 x 45 mL d'isopropanol et 3 x 45 mL de n-Hexane et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

Le clivage de 20 mg de résine est réalisé à l'aide de 1 mL de TFA et en présence de 30 μL de TIS et 30 μL d' H_2O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 1 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 5 mL d' Et_2O , séché sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h. Le peptide linéaire déprotégé est obtenu sous la forme d'une poudre blanche.

e. Essais de cyclisations.

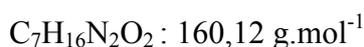
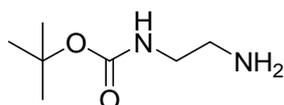


Essais identiques au cyclopeptide [4] et les mêmes résultats sont obtenus.

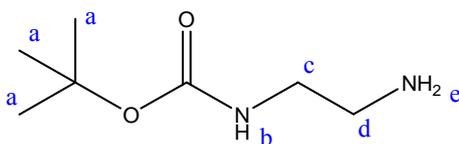
9. Fullerènes fonctionnalisés par des bras espaceurs contenant une amine primaire terminale.

Synthèse du bras espaceur [11].

a. Première étape : composé [9].⁴

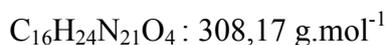
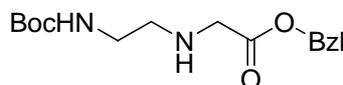


Dans un tricol de 250 mL est introduit le Boc₂O (5,45 g, 25 mmol, 0,1 eq.) aux gouttes à gouttes (durant 6 h) à une solution refroidi à 0°C d'éthylène diamine (15 g, 0,25 mol) dans 250 mL de CHCl₃. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est laissé sous agitation durant 18 h. Le précipité blanc formé est filtré, le filtrat est lavé par 8 x 100 mL d'H₂O et la phase organique est séchée sur Na₂SO₄ avant d'être concentré à sec. Le produit attendu [9] est obtenu sous forme d'une huile incolore (2,620 g, Rdt 65%).



RMN ¹H (400MHz, CDCl₃) δ ppm : 1,44 (s, H_a, 9H), 1,86 (s, H_e, 2H), 2,81 (t, H_d, 2H, ³J_{HdHc} = 5,6 Hz), 3,19 (q, H_c, 2H, ³J_{HcHd} = 5,6 Hz), 4,95 (s, H_b, 1H).

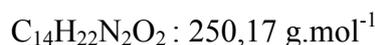
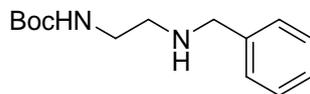
b. Seconde étape : composé [10].⁵



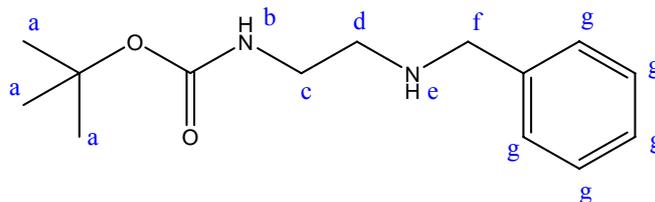
Une solution de bromoacétate de benzyl (572 mg, 2,79 mmol, 0,4 eq.) dans 6,5 mL de dioxane est ajouté aux gouttes à gouttes à 12°C à une solution du composé [9] (1 g, 6,24 mmol) dans 4,2 mL de dioxane sous azote. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est laissé sous agitation durant 18 h. L'ensemble est concentré à sec et repris par 10mL d'H₂O, extrait par 3 x 25 mL d'AcOEt. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et

concentré à sec. Une huile jaune est obtenue contenant un mélange de mono substitution et de di substitution non séparables.

c. Seconde et troisième étapes : **[12]**.⁶

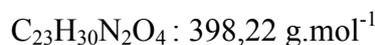
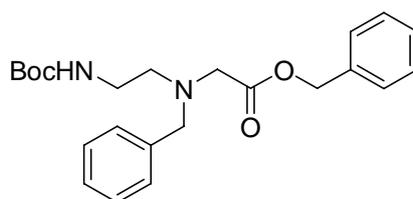


Dans un ballon de 25mL purgé, sous azote, est ajouté du MgSO_4 (1,12 g, 9,37 mmol, 1,5 eq.) et l' Et_3N (348 μL , 2,49 mmol, 0,4 eq.) à une solution du composé **[10]** (1 g, 6,24 mmol) dans 8 mL de MeOH anhydre. Le benzaldéhyde (697 μL , 6,87 mmol, 1,1 eq.), préalablement distillé sur CaSO_4 (sous vide de la pompe à palette, avec un bain à 110°C , $T_e=47,5^\circ\text{C}$), est ajouté et le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante durant 1h30. Le milieu réactionnel est alors placé à -5°C et le NaBH_4 (1,4 g, 37,4 mmol, 6 eq.) est ajouté très lentement (réaction très exothermique !) en 45 min. Le milieu est laissé à -5°C durant 1h puis à 0°C durant 1 h avant d'être quenché par 25 mL d' H_2O distillée et 25 mL d' AcOEt sont ajoutés. Le milieu est extrait par 3 x 25 mL d' AcOEt et la phase organique est lavée par 3 x 25 mL d' H_2O . Le milieu est extrait par 4 x 25 mL d' HCl 0,5 M. La phase aqueuse est refroidi à 0°C et neutralisé à l'aide de NH_4OH 28%. Le produit est alors extrait par 3 x 15 mL de CHCl_3 , et la phase organique est lavée par 3 x 10 mL d' H_2O . La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 et concentrée à sec. Le produit attendu **[12]** est obtenu sous forme d'une huile jaune (574 mg, Rdt 36%).

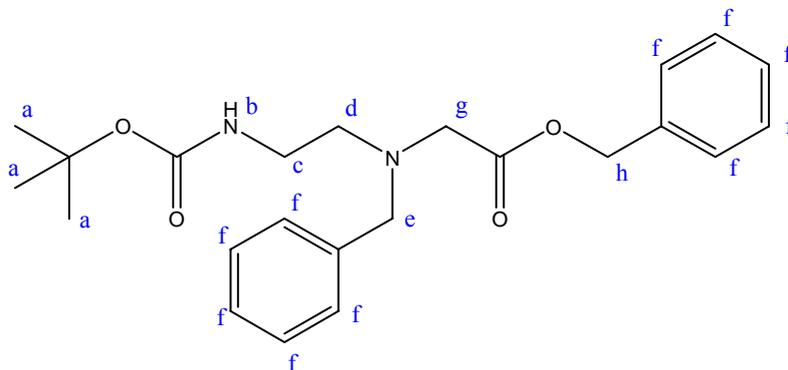


RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) δ ppm : 1,44 (s, H_a , 9H), 2,75 (t, H_d , 2H, $^3J_{\text{HdHc}}= 5,6$ Hz), 3,23 (q, H_c , 2H, $^3J_{\text{HcHd}}= 5,6$ Hz), 3,78 (s, H_f , 2H), 4,68 (s, H_b , 1H), 7,23-7,35 (m, H_g , 5H).

d. Quatrième étape : composé [13].

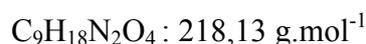
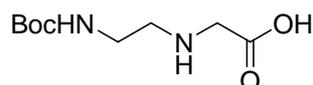


Dans un ballon de 25 mL est introduit aux gouttes à gouttes le Bromoacétate de benzyle (697 μL , 4,4 mmol, 1 eq.) et la DIEA (766 μL , 4,4 mmol, 1 eq.) à une solution du composé [12] dans 1,5 mL de DMF anhydre refroidi à 0°C. Après 2 h à 0°C, le milieu réactionnel est laissé à température ambiante sous agitation durant 18h. 30 mL d'Et₂O est ajouté au milieu et le précipité formé est filtré, lavé par un minimum d'Et₂O. Le filtrat est lavé par 3 x 15 mL d'H₂O et extrait par 4 x 15 mL d'HCl 0,5 M. La phase acide est neutralisée à 0°C à l'aide de NH₄OH 28% et le produit est extrait par 4 x 15 mL de CHCl₃. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et concentrée à sec. Le produit attendu [13] est obtenu sous la forme d'une huile jaune (1,36 g, Rdt 78%).



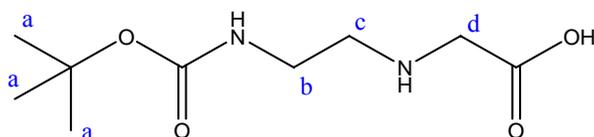
RMN ¹H (400MHz, CDCl₃) δ ppm : 1,44 (s, H_a, 9H), 2,75-2,85 (m, H_d, 2H), 3,17-3,25 (m, H_c, 2H), 3,38 (s, H_h, 2H), 3,79 (s, H_e, 2H), 5,14 (s, H_g, 2H), 7,26-7,39 (m, H_f, 10H).

e. Cinquième étape : [11].



Dans un ballon de 500 mL est introduit un excès de Pd/C (1 g, 0,94 mmol, 0,2 eq.), à une solution du composé [13] (1,36 mg, 3,42 mmol) dans 125 mL de MeOH. Le milieu est

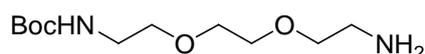
purgé 3 x vide/Azote et mis sous atmosphère de H₂. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante durant 2 h puis filtré sur Célite, préalablement lavée par 4 x MeOH (sur fritté n°4, ø = 10 cm, h = 5 cm), et lavé par du MeOH propre. Le filtrat est concentré à sec et le résidu blanc est précipité à l'Et₂O. Le produit attendu [11] est obtenu sous la forme d'une poudre blanche (694 mg, Rdt 93%).



RMN ¹H (400MHz, D₂O) δ ppm : 1,32 (s, H_a, 9H), 3,08 (t, H_c, 2H, ³J_{HcHb} = 5,6 Hz), 3,15 (q, H_b, 2H, ³J_{HbHc} = 5,6 Hz), 3,63 (s, H_d, 2H).

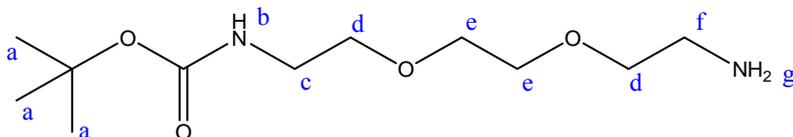
Synthèse du bras espaceur [17].

a. Première étape : composé [14].



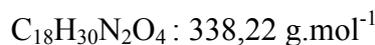
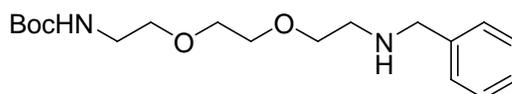
C₁₁H₂₄N₂O₄ : 248,17 g.mol⁻¹

Dans un tricol de 1 L est introduit le Boc₂O (2,94 g, 13,5 mmol, 0,1 eq.) aux gouttes à gouttes (durant 6 h) à une solution refroidi à 0°C de diéthylène glycol diamine (19,76 mL, 134,9 mol) dans 250 mL de CHCl₃. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est laissé sous agitation durant 18 h. Le précipité blanc formé est filtré, le filtrat est lavé par 8 x 150 mL d'H₂O et la phase organique est séchée sur Na₂SO₄ avant d'être concentré à sec. Le produit attendu [14] est obtenu sous forme d'une huile incolore (2,44 g, Rdt 73%).

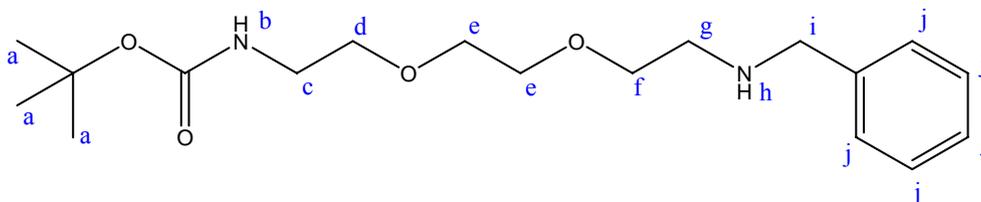


RMN ¹H (400MHz, CDCl₃) δ ppm : 1,43 (s, H_a, 9H), 2,04 (s, H_g, 2H), 2,89 (t, H_f, 2H, ³J_{HfHd} = 5,2 Hz), 3,25-3,35 (m, H_c, 2H), 3,50-3,58 (m, H_d, 4H), 3,60-3,65 (m, H_e, 4H), 5,17 (s, H_b, 1H).

b. Seconde et troisième étapes : composé [15].

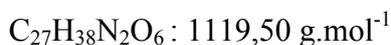
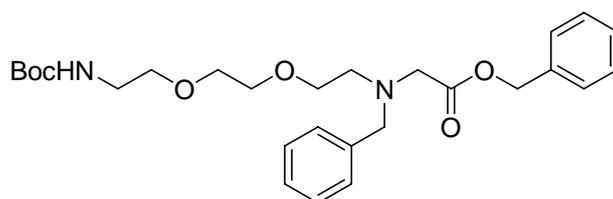


Dans un ballon de 25mL purgé, sous azote, est ajouté du $MgSO_4$ (727 mg, 6,04 mmol, 1,5 eq.) et l' Et_3N (225 μL , 1,61 mmol, 0,4 eq.) à une solution du composé [14] (1 g, 4,03 mmol) dans 8 mL de MeOH anhydre. Le benzaldéhyde (450 μL , 4,43 mmol, 1,1 eq.), préalablement distillé sur $CaSO_4$ (sous vide de la pompe à palette, avec un bain à $110^\circ C$, $T_e=47,5^\circ C$), est ajouté et le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante durant 1h30. Le milieu réactionnel est alors placé à $-5^\circ C$ et le $NaBH_4$ (914,5 mg, 24 mmol, 6 eq.) est ajouté très lentement (réaction très exothermique !) en 45 min. Le milieu est laissé à $-5^\circ C$ durant 1h puis à $0^\circ C$ durant 1 h avant d'être quenché par 25 mL d' H_2O distillée et 25 mL d' $AcOEt$ sont ajoutés. Le milieu est extrait par 3 x 25 mL d' $AcOEt$ et la phase organique est lavée par 3 x 25 mL d' H_2O . Le milieu est extrait par 4 x 25 mL d' HCl 0,5 M. La phase aqueuse est refroidi à $0^\circ C$ et neutralisé à l'aide de NH_4OH 28%. Le produit est alors extrait par 3 x 15 mL de $CHCl_3$, et la phase organique est lavée par 3 x 10 mL d' H_2O . La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 et concentrée à sec. Le produit attendu [15] est obtenu sous forme d'une huile jaune (1,1 g, Rdt 80%).

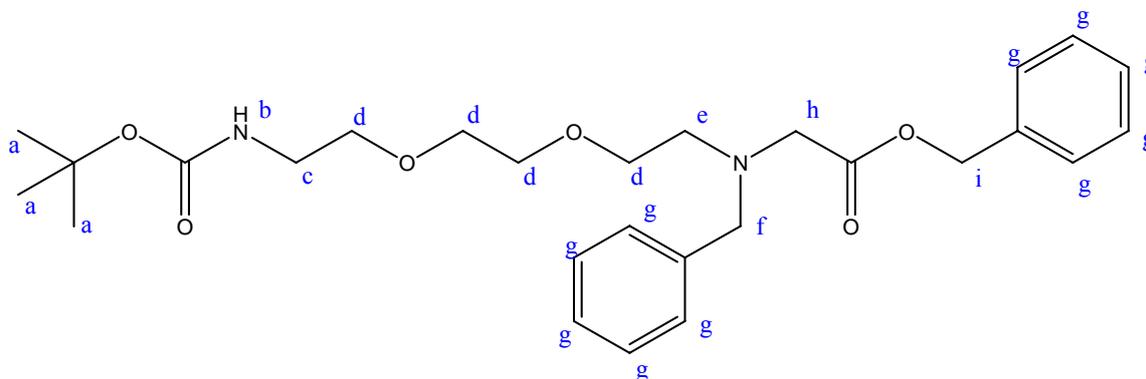


RMN 1H (400MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1,43 (s, H_a , 9H), 2,85-2,95 (m, H_g , 2H), 3,20-3,35 (m, H_c , 2H), 3,53 (t, H_f , 2H, $^3J_{HfHg} = 5,2$ Hz), 3,62 (s, H_e , 4H), 3,65-3,74 (m, H_d , 2H), 3,93 (s, H_i , 2H), 5,19 (s, H_b , 1H), 7,26-7,42 (m, H_j , 5H).

c. Quatrième étape : composé **[16]**.

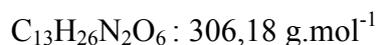
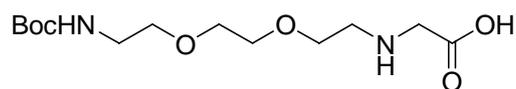


Dans un ballon de 25 mL est introduit aux gouttes à gouttes le Bromoacétate de benzyle (460 μ L, 2,9 mmol, 1 eq.) et la DIEA (505 μ L, 2,9 mmol, 1 eq.) à une solution du composé **[15]** dans 1,5 mL de DMF anhydre refroidi à 0°C. Après 2 h à 0°C, le milieu réactionnel est laissé à température ambiante sous agitation durant 18h. 30 mL d'Et₂O est ajouté au milieu et le précipité formé est filtré, lavé par un minimum d'Et₂O. Le filtrat est lavé par 3 x 15 mL d'H₂O et extrait par 4 x 15 mL d'HCl 0,5 M. La phase acide est neutralisée à 0°C à l'aide de NH₄OH 28% et le produit est extrait par 4 x 15 mL de CHCl₃. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et concentrée à sec. Le produit attendu **[16]** est obtenu sous la forme d'une huile jaune (1,06 g, Rdt 74%).

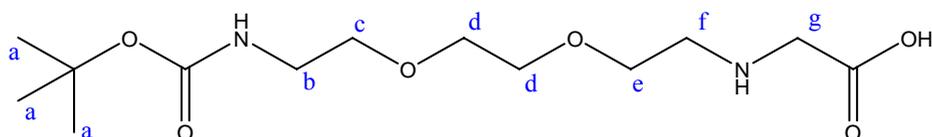


RMN ¹H (400MHz, CDCl₃) δ ppm : 1,43 (s, H_a, 9H), 2,80-3,05 (m, H_c, 2H), 3,27 (m, H_c, 2H), 3,46-3,60 (m, H_{d-h}, 10H), 3,87 (s, H_f, 2H), 5,13 (s, H_b, 1H), 5,14 (s, H_i, 2H), 7,26-7,39 (m, H_g, 10H).

d. Cinquième étape : composé [17].



Dans un ballon de 500 mL est introduit un excès de Pd/C (425 mg, 0,4 mmol, 0,2 eq.), à une solution du composé [16] (1 g, 2,06 mmol) dans 125 mL de MeOH. Le milieu est purgé 3 x vide/Azote et mis sous atmosphère de H₂. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante durant 2 h puis filtré sur Célite, préalablement lavée par 4 x MeOH (sur fritté n°4, Ø = 10 cm, h = 5 cm), et lavé par du MeOH propre. Le filtrat est concentré à sec et le résidu blanc est précipité à l'Et₂O. Le produit attendu [17] est obtenu sous la forme d'une poudre blanche (556 mg, Rdt 88%).

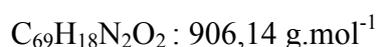
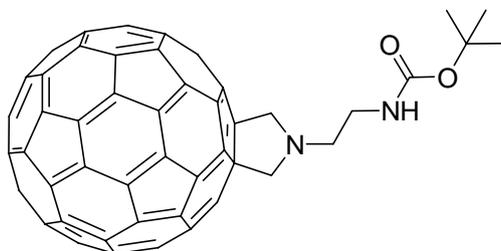


RMN ¹H (400MHz, D₂O) δ ppm : 1,43 (s, H_a, 9H), 3,14 (t, H_f, 2H, ³J_{HfHe} = 5,6 Hz), 3,19 (t, H_e, 2H, ³J_{HeHf} = 5,6 Hz), 3,47 (t, H_b, 2H, ³J_{HbHc} = 5,6 Hz), 3,58 (s, H_d, 4H), 3,65 (s, H_g, 2H), 3,69 (t, H_c, 2H, ³J_{HcHb} = 5,6 Hz).

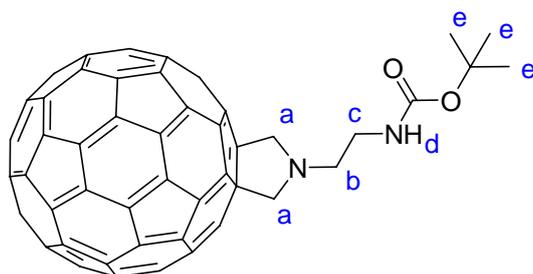
10. Fonctionnalisation du fullerène C₆₀.

Synthèse du fullerène fonctionnalisé [19].

a. Première étape : composé [18].⁷

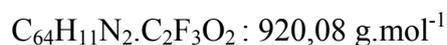
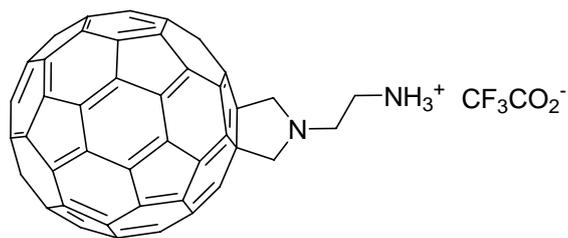


Dans un bicol de 250 mL surmonté d'un réfrigérant est introduit le composé [11] (108 mg, 0,486 mmol) et le para-formaldéhyde (104,2 mg, 3,47 mmol, 7 eq.) à une solution du fullerène C₆₀ (500 mg, 0,69 mmol, 1,4 eq.) dans 150 mL de toluène. Le milieu réactionnel est porté au reflux du toluène et la réaction est suivie par CCM dans les conditions toluène / AcOEt (8 : 2) (R_f = 0,6). La réaction est arrêtée au bout de 3 h et après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est passé directement sur colonne (Φ = 3,5 cm, L = 16 cm) dans le toluène pur. Après passage du C₆₀ (coloration violette caractéristique), changement d'éluants à toluène / AcOEt (99 : 1). Le produit attendu est alors isolé, les fractions concentrées à sec. Le composé [18] est obtenu sous la forme d'une poudre marron foncé (132 mg, Rdt = 30 %)

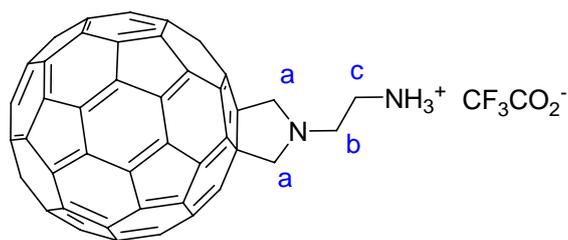


RMN ¹H (400MHz, Tol-d8) δ ppm : 1,53 (s, H_e, 9H), 2,69 (t, H_b, 2H, ³J_{HbHc} = 6,4 Hz), 3,44 (dt, H_c, 2H, ³J_{HcHb} = 6,4 Hz, ³J_{HcHd} = 6 Hz), 3,88 (s, H_a, 4H), 4,83 (m, H_d, 1H).

b. Seconde étape : composé [19].



Dans un ballon de 25 mL est introduit 9 mL de TFA à une solution du composé [18] (183,3 mg, 0,2 mmol) dans 9 mL de DCM fraîchement distillé. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante et la réaction est suivie par CCM dans les conditions toluène / AcOEt (8 : 2) ($R_f = 0,2$). La réaction est terminée au bout de 3 h. L'ensemble est alors concentré à sec et le résidu marron obtenu est lavé par 3 x 5 mL de toluène avant d'être séché sous vide. Le composé [19] est obtenu sous la forme d'une poudre marron (160 mg, Rdt quantitatif).

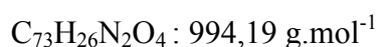
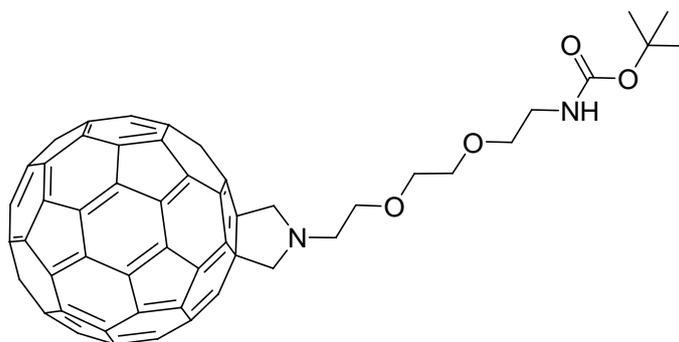


RMN 1H (400MHz, MeOD / THF-d8 1 : 1) δ ppm : 3,30 (m, H_b , 2H), 3,67 (m, H_c , 2H), 4,53 (s, H_a , 4H).

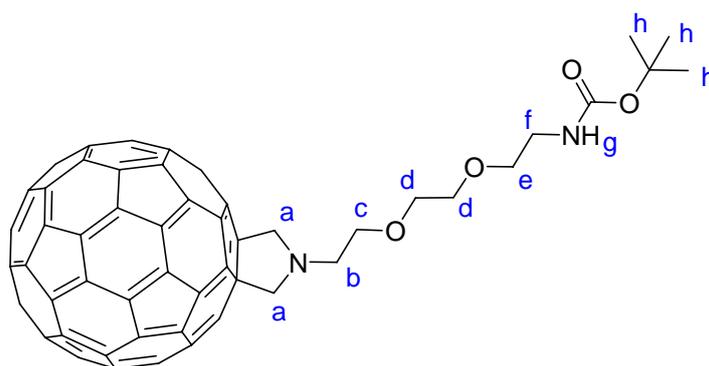
Masse (ESI) dans MeOH / THF (1 : 1) : 807 (m/z).

Synthèse du fullerène fonctionnalisé [21].

a. Première étape : composé [20].

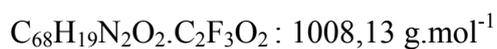
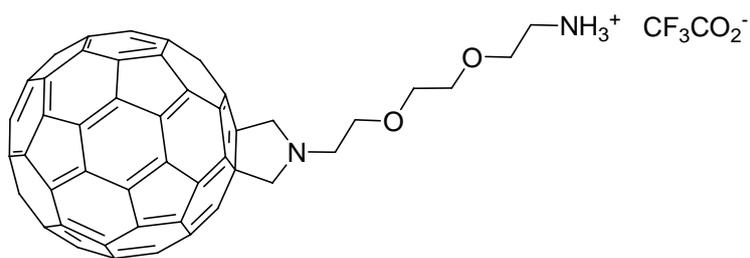


Dans un bicol de 250 mL surmonté d'un réfrigérant est introduit le composé [17] (100 mg, 0,326 mmol) et le para-formaldéhyde (68,7 mg, 2,28 mmol, 7 eq.) à une solution du fullerène C₆₀ (500 mg, 0,69 mmol, 1,4 eq.) dans 110 mL de toluène. Le milieu réactionnel est porté au reflux du toluène et la réaction est suivie par CCM dans les conditions toluène / AcOEt (7 : 3) (R_f = 0,44). La réaction est arrêtée au bout de 3 h et après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est passé directement sur colonne ($\Phi = 3,5 \text{ cm}$, $L = 25 \text{ cm}$) dans le toluène pur. Après passage du C₆₀ (coloration violette caractéristique), passage à un mélange toluène / AcOEt (99 : 1). Le produit attendu est alors isolé, les fractions concentrées à sec. Le composé [20] est obtenu sous la forme d'une poudre marron foncé (35 mg, Rdt = 11 %)



RMN ¹H (400MHz, Tol-d8) δ ppm : 1,47 (s, H_h, 9H), 3,02 (t, H_b, 2H, ³J_{HbHc} = 5,2 Hz), 3,26 (s, H_d, 4H), 3,40 (t, H_c, 2H, ³J_{HcHb} = 5,2 Hz), 3,50 (t, H_e, 2H, ³J_{HeHf} = 5,2 Hz), 3,77 (t, H_f, 2H, ³J_{HfHe} = 6,4 Hz), 4,16 (s, H_a, 4H), 4,79 (s, H_g, 1H).

b. Seconde étape : composé [21].



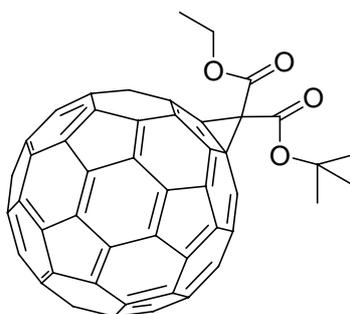
Dans un ballon de 25 mL est introduit 5 mL de TFA à une solution du composé [20] (25 mg, 0,025 mmol) dans 5 mL de DCM fraîchement distillé. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante et la réaction est suivie par CCM dans les conditions toluène / AcOEt (7 : 3) ($R_f = 0,1$). La réaction est terminée au bout de 3 h. L'ensemble est alors concentré à sec et le résidu marron obtenu est lavé par 3 x 5 mL de toluène avant d'être séché sous vide. Le composé [21] est obtenu sous la forme d'une poudre marron (25 mg, Rdt quantitatif).

Masse (ESI) dans MeOH / THF (1 : 1) : 895 (m/z).

11. Fullerènes fonctionnalisés par bras espaceurs contenant un acide carboxylique terminal.

Synthèse du composé [23].

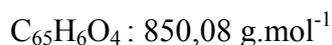
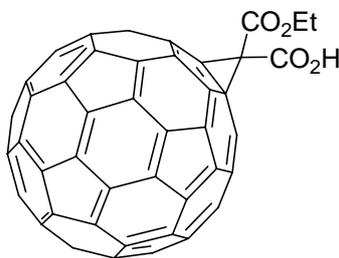
a. Première étape : composé [22].



Dans un ballon de 50 mL est introduit le malonate de tert-butyle-éthyle (52,6 μL , 0,27 mmol, 2 eq.), le DBU (104 μL , 0,694 mmol, 5 eq.) et l' I_2 (105,75 mg, 0,416 mmol, 3 eq.) à une solution du fullerène C_{60} (100 mg, 0,27 mmol) dans 30 mL de toluène. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante durant 24 h. Après concentration, le résidu est purifié sur colonne chromatographique ($\Phi = 3,5 \text{ cm}$, $L = 20 \text{ cm}$) dans les conditions toluène / Cyclohexane (1 : 1) ($R_f = 0,5$). Le produit attendu [22] est obtenu sous la forme d'une poudre marron (25 mg, Rdt 20 %).

Masse (ESI) dans MeOH / DCM (1 : 1) : 906 (m/z).

b. Seconde étape : composé [23].



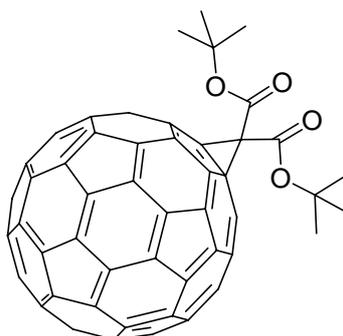
Dans un ballon de 25 mL est ajouté 2 mL de TFA à une solution du composé [22] (25 mg, 0,0275 mmol) dans 2 mL de DCM. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à

température ambiante durant 3 h. L'avancé de la réaction est suivi par CCM dans les conditions toluène / cyclohexane (1 : 1) ($R_f = 0$). Le milieu est concentré à sec et le produit attendu [23] est obtenu sous la forme d'une poudre marron (23 mg, Rdt = 98 %).

Masse (ESI) dans MeOH : 850 (m/z).

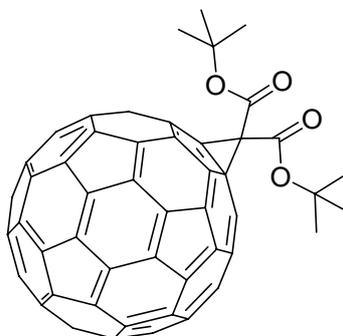
Synthèse du composé [25].

a. Première étape : composé [24].



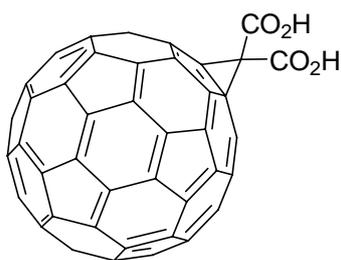
$C_{71}H_{18}O_4$: 934,12 $g \cdot mol^{-1}$

Dans un ballon de 50 mL est introduit le malonate de di-tert-butyle (58,4 mg, 0,27 mmol, 2 eq.), le DBU (104 μL , 0,694 mmol, 5 eq.) et l' I_2 (105,75 mg, 0,416 mmol, 3 eq.) à une solution du fullerène C_{60} (100 mg, 0,27 mmol) dans 30 mL de toluène. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante durant 24 h. Après concentration, le résidu est purifié sur colonne chromatographique ($\Phi = 3,5$ cm, $L = 20$ cm) dans les conditions toluène / Cyclohexane (1 : 1) ($R_f = 0,54$). Le produit attendu [24] est obtenu sous la forme d'une poudre marron (13 mg, Rdt 18 %).

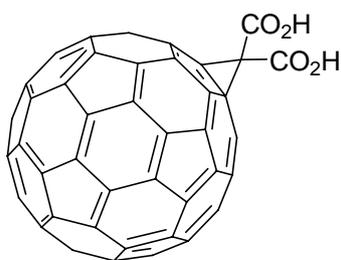


Masse (ESI) dans MeOH / DCM (1: 1) : 934 (m/z).

b. Seconde étape : composé [25].



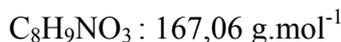
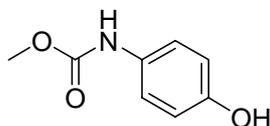
Dans un ballon de 25 mL est ajouté 1 mL de TFA à une solution du composé [24] (13 mg, 0,0139 mmol) dans 1 mL de DCM. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante durant 3 h. L'avancé de la réaction est suivi par CCM dans les conditions toluène / cyclohexane (1 : 1) (Rf = 0). Le milieu est concentré à sec et le produit attendu [25] est obtenu sous la forme d'une poudre marron (11 mg, Rdt = 96 %).



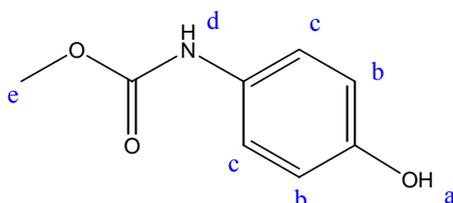
Masse (ESI) dans MeOH : 822 (m/z).

12. Synthèse des bras espaceurs pour les nanotubes de carbone.

Synthèse du 4-hydroxyphényle carbamate de méthyle [26].⁸



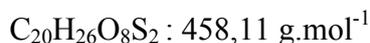
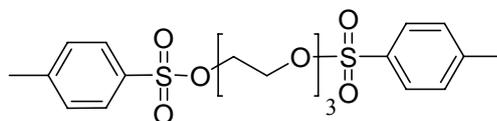
Dans un tricol de 500 mL purgé, sous azote, est introduit le produit commercial p-aminophénol (5 g, 45,8 mmol) dans 200 mL de THF anhydre. Le milieu réactionnel est refroidi à 0°C et le bicarbonate de sodium (4 mL, 51,9 mmol, 1,15 eq.) est ajouté par fraction. Toujours à 0°C, le chloroformate de méthyle (10 g, 119 mmol, 2,65 eq.) est ajouté aux gouttes à gouttes en 30 minutes. Après 1 h à 0°C, et retour à température ambiante, le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 3 h. 500 mg de charbon activé est ajouté et le milieu réactionnel est filtré. Le filtrat est concentré, repris par 200 mL de CHCl_3 et un précipité blanc apparaît. Le précipité est filtré, lavé par un minimum de CHCl_3 et séché au dessiccateur sous vide sur KOH durant 18 h. Le produit attendu [20] est obtenu sous la forme d'une poudre blanche (6,45 g, Rdt = 85%).



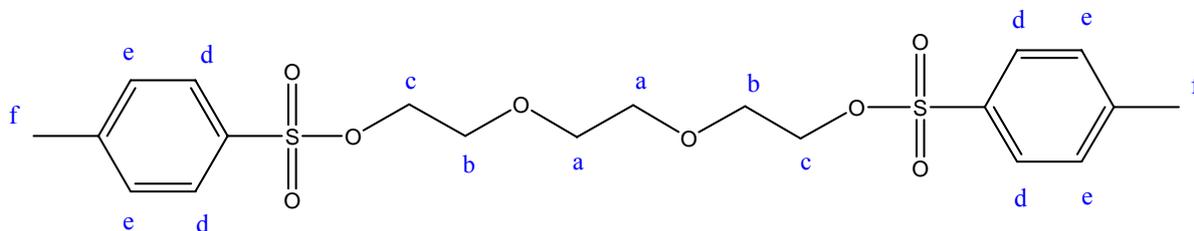
RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) δ ppm : 3,59 (s, H_e , 3H), 6,64 (d, H_b , 2H, $^3\text{J}_{\text{HbHc}} = 8 \text{ Hz}$), 7,17 (d, H_c , 2H, $^3\text{J}_{\text{HcHb}} = 8 \text{ Hz}$), 9,07 (s, H_a , 1H), 9,26 (s, H_d , 1H).

Description du bras espaceur à x=2 [32] réalisé par Haiyan Li.

a. Première étape : composé [27].⁹

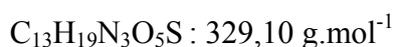
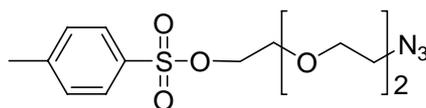


Dans un tricol de 250 mL est introduit le composé commercial de l'octaéthylène glycol (0,8 g, 5,32 mmol) dans 8 mL de THF. Après ajout du chlorure de p-toluène sulfonyle (3,04 g, 15,96 mmol, 3 eq.), la solution est refroidi à 0°C et la potasse (1,97 g, 35,6 mmol, 7eq.) en solution dans 2,2 mL d'eau distillée est ajoutée au goutte à goutte en 2 h 30. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 7 heures. Il est ajouté à 20 mL d'un mélange DCM / eau-glace (1 :1). Après décantation, la phase aqueuse est extraite par 3 x 10 mL de DCM. Les phases organiques réunies sont lavées par 10 mL de NaCl saturé, séchées sur Na₂SO₄ durant une nuit. Après concentration, le solide est recristallisé par du MeOH pour donner le produit attendu [27] sous la forme d'une poudre blanche (1,87 g, Rdt = 82 %).



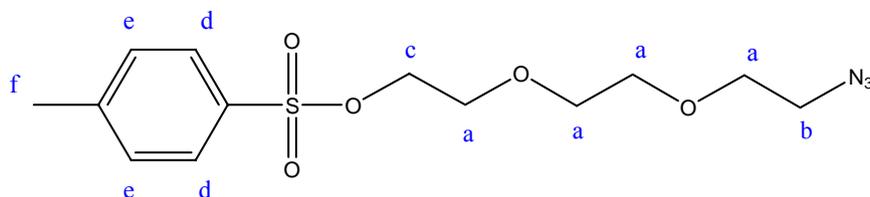
RMN ¹H (400MHz, CDCl₃) δ ppm : 2,45 (s, H_f, 6H), 3,49-3,53 (m, H_a, 4H), 3,65 (t, H_b, 4H, ³J_{HbHc}= 4 Hz), 4,15 (t, H_c, 4H, ³J_{HcHb}= 4 Hz), 7,33 (d, H_d, 4H, ³J_{HdHe}= 8 Hz), 7,80 (d, H_e, 4H, ³J_{HeHd}= 8 Hz).

b. Seconde étape : composé [28].¹⁰



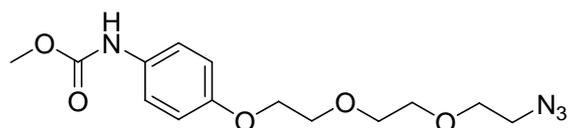
Dans un tricol de 50 mL est introduit le composé [28] (1,07 g, 2,33 mmol) dans 25 mL d'EtOH absolu. Après ajout de l'azoture de sodium (151,5 mg, 2,33 mmol, 1 eq.), le milieu

réactionnel est porté à reflux pendant 18 heures. Après concentration, le résidu est repris par 15 mL d'Et₂O, lavé par 10 mL de NaCl saturé. Après séchage sur Na₂SO₄ et concentration, le résidu est purifié par colonne chromatographique dans les conditions cyclohexane / AcOEt (7 : 3) pour donner le produit attendu **[28]** sous la forme d'une huile jaune (353 mg, Rdt = 46 %).



RMN ¹H (400MHz, CDCl₃) δ ppm : 2,45 (s, H_f, 3H), 3,37 (t, H_b, 2H, ³J_{HbHa} = 4 Hz), 3,60-3,72 (m, H_a, 8H), 4,17 (t, H_c, 2H, ³J_{HcHa} = 4 Hz), 7,35 (d, H_e, 2H, ³J_{HcHd} = 8 Hz), 7,80 (d, H_d, 2H, ³J_{HdHe} = 8 Hz).

c. Troisième étape : composé **[29]**.¹¹

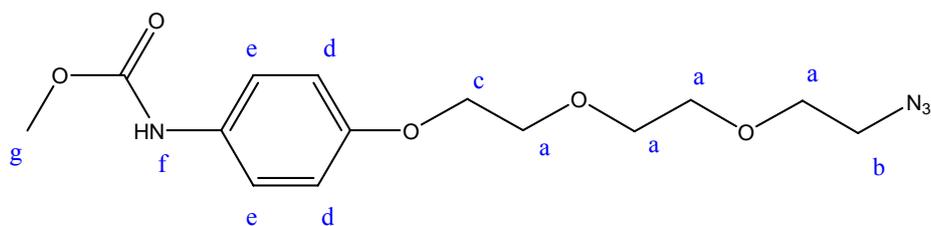


C₁₄H₂₀N₄O₅ : 324,14 g.mol⁻¹

Dans un tricol de 50 mL, purgé et sous azote, est introduit l'hydrure de sodium (60% dans l'huile) (32 mg, 0,67 mmol, 1,4 eq.) et est lavé par 3 x 5mL de THF anhydre. Du DMF anhydre (13 mL) est ajouté et le milieu réactionnel est refroidi à 0°C avant que le composé **[28]** (200 mg, 0,61 mmol) en solution dans 3 mL de DMF anhydre ne soit ajouté aux gouttes à gouttes. Lorsque le dégagement gazeux est terminé, le composé **[26]** (101,5 mg, 0,61 mmol, 1 eq.) en solution dans 1,5 mL de DMF anhydre est lui aussi ajouté aux gouttes à gouttes.

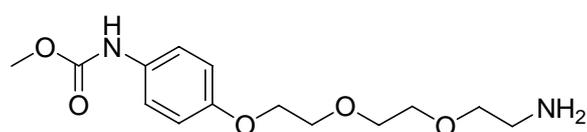
Le milieu réactionnel est laissé sous agitation, après retour à température ambiante, durant 18 heures. Après concentration, le résidu est repris par 30 mL d'AcOEt, lavé par 3 x 10mL d'H₂O distillée, séché sur Na₂SO₄ et concentré.

Après une colonne chromatographique dans les conditions DCM / AcOEt, (4.5 : 0.5) (R_f = 0,15) le produit attendu **[29]** est obtenu sous la forme d'une huile jaune (125 mg, Rdt 68%).



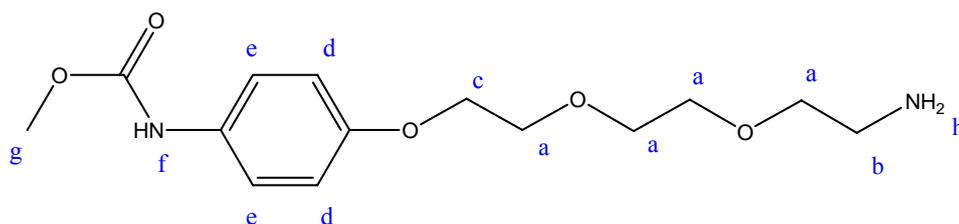
RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) δ ppm : 3,37 (t, H_b , 2H, $^3\text{J}_{\text{HbHa}} = 4$ Hz), 3,65-3,95 (m, H_a , 8H), 3,94 (s, H_g , 3H), 4,12 (t, H_c , 2H, $^3\text{J}_{\text{HcHa}} = 4$ Hz), 6,44 (s, H_f , 1H), 6,85 (d, H_d , 2H, $^3\text{J}_{\text{HeHd}} = 8$ Hz), 7,30 (d, H_e , 2H, $^3\text{J}_{\text{HdHe}} = 8$ Hz).

d. Quatrième étape : composé [30].¹²



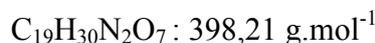
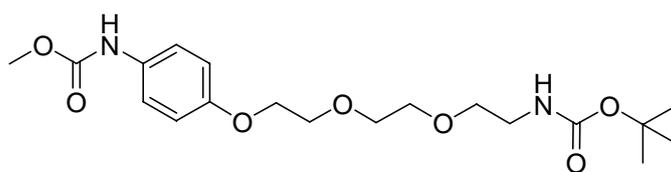
$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$: 298,15 g.mol $^{-1}$

Dans un ballon de 25 mL est introduit le composé [29] (160 mg, 0,43 mmol) dans 5 mL de THF. Après ajout du PPh_3 (125 mg, 0,477 mmol, 1,1 eq.) et 12 mL d' H_2O , le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante durant 24 h. Le milieu est concentré à sec et le résidu est purifié sur colonne chromatographique dans les conditions AcOEt / MeOH/ Et_3N , 4 : 0,5 : 1 ($R_f = 0,11$) pour donner le produit attendu [30] sous la forme d'une huile jaune (144 mg, Rdt 97%).

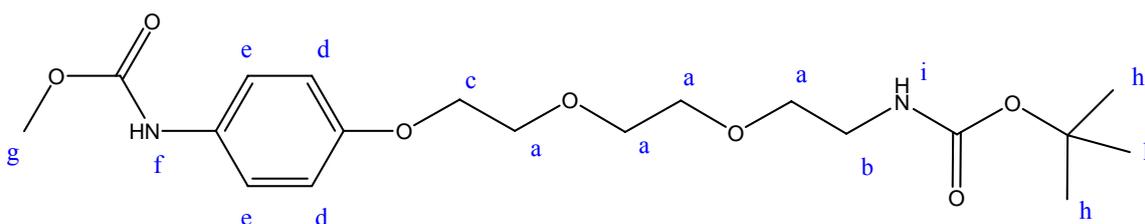


RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) δ ppm : 2,9 (t, H_b , 2H, $^3\text{J}_{\text{HbHa}} = 4$ Hz), 3,55-3,95 (m, H_a , 8H), 3,94 (s, H_g , 3H), 4,12 (t, H_c , 2H, $^3\text{J}_{\text{HcHa}} = 4$ Hz), 6,44 (s, H_f , 1H), 6,85 (d, H_d , 2H, $^3\text{J}_{\text{HeHd}} = 8$ Hz), 7,30 (d, H_e , 2H, $^3\text{J}_{\text{HdHe}} = 8$ Hz).

e. Cinquième étape : composé [31].

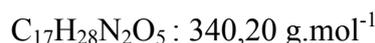
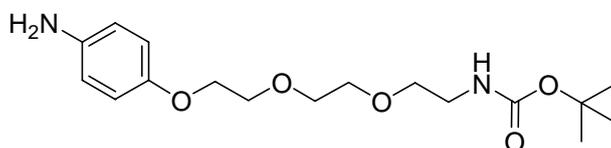


Dans un ballon de 25 mL est mis en présence le composé [30] (207 mg, 0,6 mmol) et KOH (37,5 mg, 0,65 mmol, 1,1 eq.) dans 0,4 mL d'H₂O. La solution est refroidi à 0°C avant qu'une solution de Boc₂O (142 mg, 0,65 mmol, 1,1 eq.) dans 1 mL de dioxane soit ajouté aux gouttes à gouttes. Après 1 h à 0°C et 4 h à température ambiante, le produit est extrait par 3 x 5 mL de DCM. La phase organique est isolée, séchée sur Na₂SO₄ et concentrée à sec. Le résidu est purifié par colonne chromatographique dans les conditions Cyclohexane / AcOEt, 3 : 7 (R_f = 0.33) et le produit attendu [31] est obtenu sous la forme d'une huile jaune (140 mg, Rdt 52%).



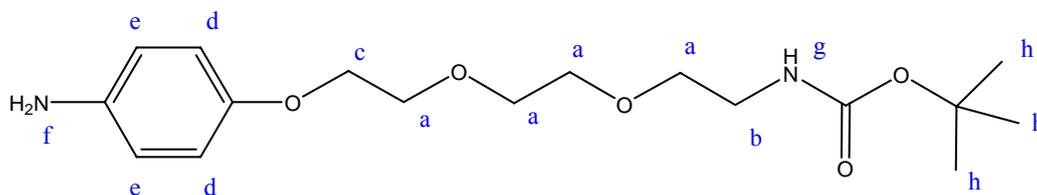
RMN ¹H (400MHz, CDCl₃) δ ppm : 1.44 (s, H_h, 9H), 3.30 (t, H_b, 2H, ³J_{HbHa} = 4 Hz), 3,55-3,95 (m, H_a, 8H), 3.84 (s, H_g, 3H), 4.13 (t, H_c, 2H, ³J_{HcHa} = 4 Hz), 5.03 (s, H_i, 1H), 6.44 (s, H_f, 1H), 6.85 (d, H_d, 2H, ³J_{HeHd} = 8 Hz), 7.30 (d, H_e, 2H, ³J_{HdHe} = 8 Hz).

f. Sixième étape : composé [32].



Dans un bicol de 25 mL, surmonté d'un réfrigérant, est introduit 6,5 mL d'une solution de KOH 2 M à une solution du composé [31] (100 mg, 0,23 mmol) dans 3 mL d'EtOH. Le milieu réactionnel est porté à reflux de l'EtOH durant 22 h puis est concentré. La mixture restante est extraite par 3 x 10 mL d'EtOAc et la phase organique est séchée sur

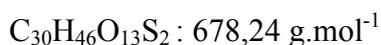
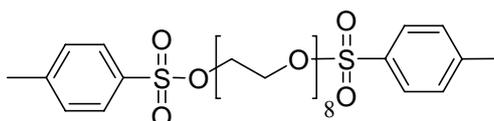
Na₂SO₄ et concentrée à sec. Le produit attendu [32] est obtenu sous la forme d'une poudre blanche sans autre purification (56 mg, Rdt 65%).



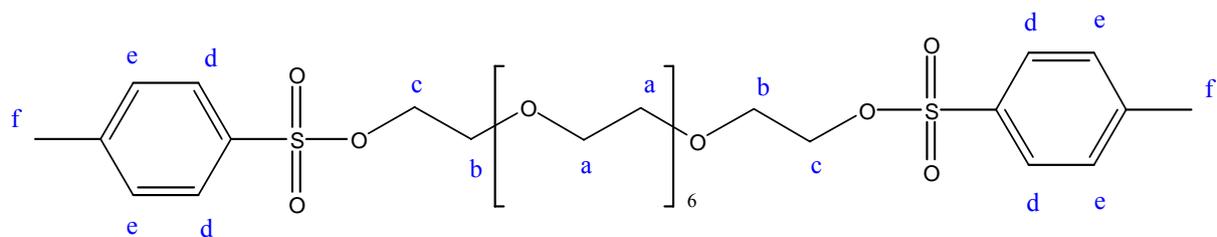
RMN ¹H (400MHz, CDCl₃) δ ppm : 1.44 (s, H_h, 9H), 3.30 (t, H_b, 2H, ³J_{HbHa}= 4 Hz), 3,55-3,85 (m, H_a, 8H), 4.05 (t, H_c, 2H, ³J_{HcHa}= 4 Hz), 5.04 (s, H_g, 1H), 6.85 (d, H_d, 2H, ³J_{HeHd}= 8 Hz), 7.30 (d, H_e, 2H, ³J_{HdHe}= 8 Hz).

Description du bras espaceur à x=7 [36].

a. Première étape : composé [33].

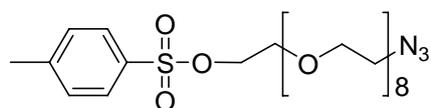


Dans un tricol de 250 mL est introduit le composé commercial de l'octaéthylène glycol (1 g, 2,7 mmol) dans 50 mL de THF. Après ajout du chlorure de p-toluène sulfonyle (1,54 g, 8,1 mmol, 3 eq.), la solution est refroidi à 0°C et la potasse (1,06 g, 18,9 mmol, 7eq.) en solution dans 10 mL d'eau distillée est ajoutée au goutte à goutte en 2 h 30. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 22 h. Il est ajouté à 100 mL d'un mélange DCM / eau-glace (1 : 1). Après décantation, la phase aqueuse est extraite par 3 x 20 mL de DCM. Les phases organiques réunies sont lavées par 20 mL de NaCl saturé, séchées sur Na₂SO₄ durant une nuit. Après concentration, le produit attendu [33] est obtenu sous la forme d'une huile transparente (1,57 g, Rdt = 85%).

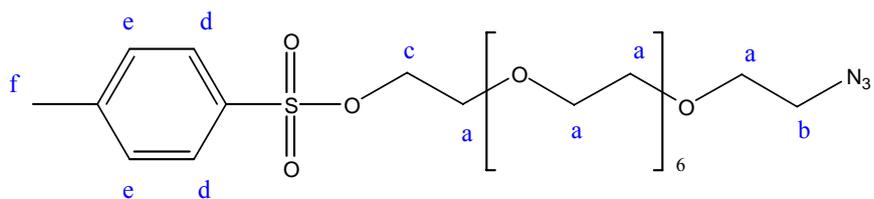


RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) δ ppm : 2,44 (s, H_f , 6H), 3,57-3,63 (m, H_a , 24H), 3,67 (t, H_b , 4H, $^3\text{J}_{\text{HbHc}} = 4$ Hz), 4,49 (t, H_c , 4H, $^3\text{J}_{\text{HcHb}} = 4$ Hz), 7,33 (d, H_d , 4H, $^3\text{J}_{\text{HdHe}} = 8$ Hz), 7,79 (d, H_e , 4H, $^3\text{J}_{\text{HeHd}} = 8$ Hz).

b. Seconde étape : composé [34].

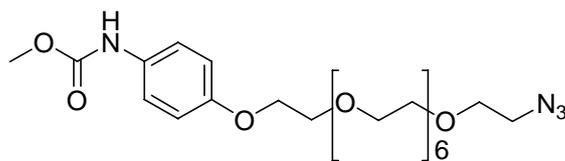


Dans un tricol de 25 mL est introduit le composé [33] (500 mg, 0,73 mmol) dans 8 mL d'EtOH absolu. Après ajout de l'azoture de sodium (48 mg, 0,732 mmol, 1 eq.), le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 18 heures. Après concentration, le résidu est repris par 25 mL d'Et₂O, lavé par 3 x 10mL de NaCl saturé. Après séchage sur Na₂SO₄ et concentration, le produit attendu [34] est obtenu sous la forme d'huile transparente (136 mg, Rdt = 33%) en proportion égale avec le produit de double substitution.



RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) δ ppm : 2,44 (s, H_f , 3H), 3,39 (t, H_b , 2H, $^3\text{J}_{\text{HbHa}} = 4$ Hz), 3,58-3,69 (m, H_a , 28H), 3,67 (t, H_c , 2H, $^3\text{J}_{\text{HcHa}} = 4$ Hz), 7,34 (d, H_e , 2H, $^3\text{J}_{\text{HeHd}} = 8$ Hz), 7,79 (d, H_d , 2H, $^3\text{J}_{\text{HdHe}} = 8$ Hz).

c. Troisième étape : composé [35].



Dans un tricol de 50mL, purgé et sous azote, est introduit l'hydruure de sodium (60% dans l'huile) (21 mg, 0,53 mmol, 1,5 eq.) et est lavé par 3 x 5mL de THF anhydre. 2,5 mL de DMF anhydre est ajouté et le milieu réactionnel est refroidi à 0°C avant que le composé [34] en solution dans 2,5 mL de DMF anhydre ne soit ajouté aux gouttes à gouttes. Lorsque le dégagement gazeux est terminé, le composé [26] (59 mg, 0,354 mmol, 1 eq.) en solution dans 1,5 mL de DMF anhydre est lui aussi ajouté au goutte à goutte.

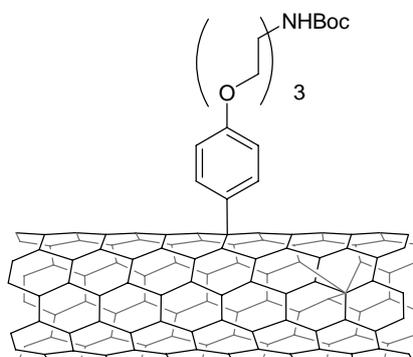
Le milieu réactionnel est laissé sous agitation, après retour à température ambiante, durant 18 heures. Après concentration, le résidu est repris par 20 mL d'AcOEt, lavé par 3 x 8mL d'H₂O distillée, séché sur Na₂SO₄ et concentré.

Après une CCM préparative dans les conditions DCM /MeOH (98 : 2), le produit attendu [35] est obtenu avec une forte proportion de diazide non séparables.

13. Fonctionnalisation des nanotubes de carbone.

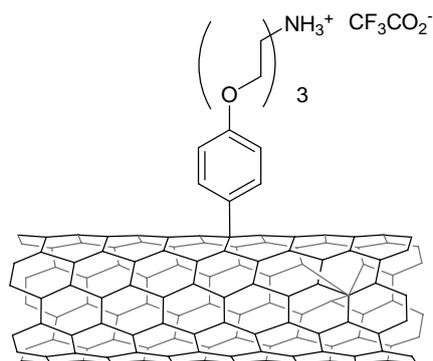
Synthèse du composé [40].

a. Première étape : composé [39].



Dans un ballon de 5 mL est soniquée à la sonde durant 10 min une suspension de SWNT (1 mg, 0,083 mmol) dans 2 mL de 1,2-dichlorobenzène anhydre. Une solution du composé [32] (4,8 mg, 0,0125 mmol, 0,15 eq.) dans 1 mL de CH_3CN anhydre est ajouté et l'ensemble est soniqué à la sonde durant 10 min. De l'azote est alors barboté dans le milieu réactionnel durant 10 min et le nitrite d'isoamyle (2 μ L, 0,015 mmol, 0,18 eq.) est ajouté au milieu. Le milieu réactionnel est alors porté à 60°C et laissé sous agitation durant 18 h. Après retour à température ambiante, le milieu est centrifugé 15 min à 15000 tours / min. Le culot est lavé par 2 x 1, 5 mL de CH_3CN puis par 2 x 1,5 mL de THF et enfin par 2 mL de Et_2O . Après concentration à sec, le produit attendu [39] est obtenu sous la forme d'une poudre noire (16 mg).

b. Seconde étape : composé [40].¹³



Dans un ballon de 5 mL est ajouté une solution de HCl (4M) dans le dioxane au composé [39] (3,3 mg) et l'ensemble est laissé sous agitation à température ambiante durant 24 h. Le milieu est concentré à sec et le résidu est précipité plusieurs fois par un mélange MeOH / Et₂O.

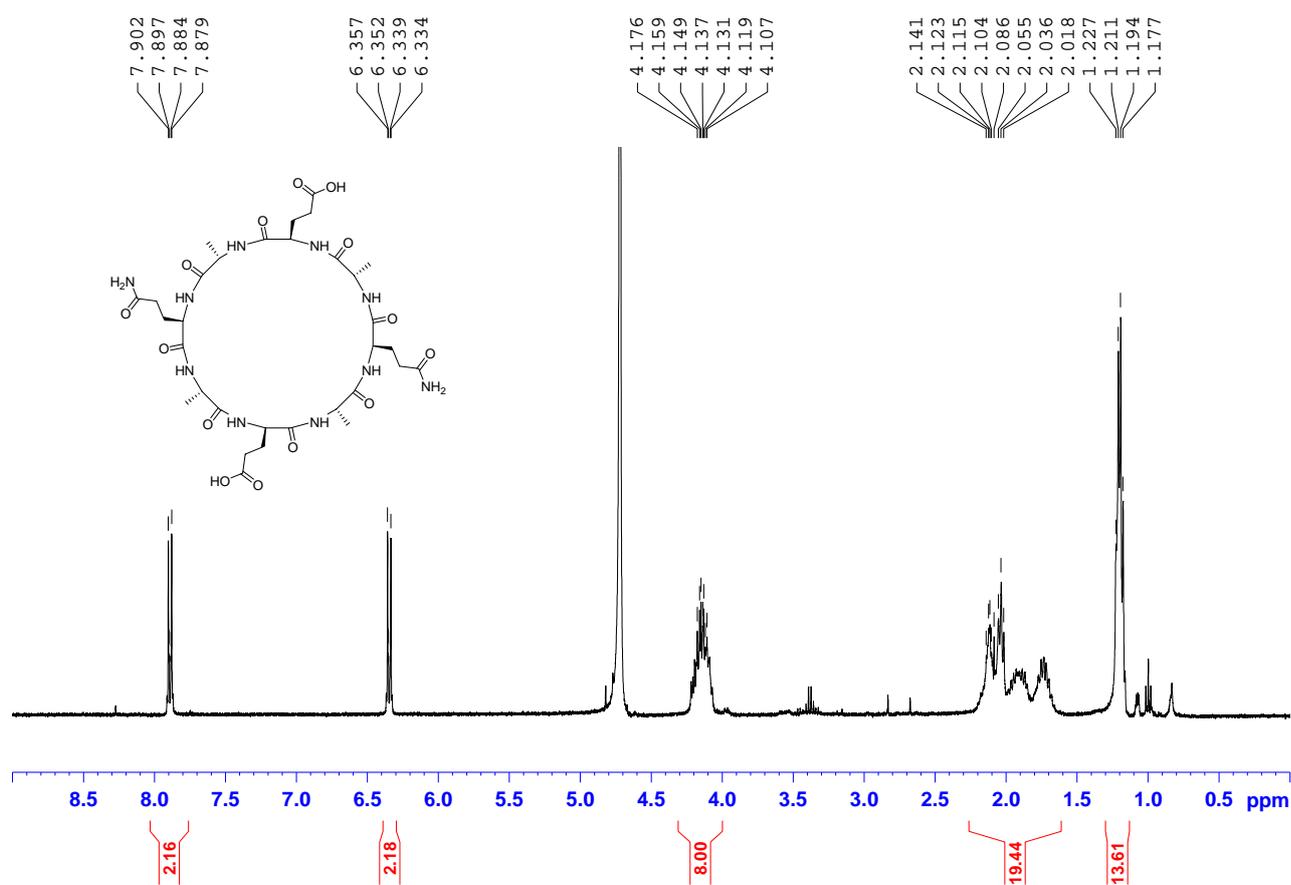
c. Détermination du taux de chargement.¹

A 0,5 mg de composé [40] est ajouté 140 μ L de solution A, 56 μ L de solution B et 49 μ L de solution C. Est ajouté en plus 0,5 mL d'une solution de 0,5 mL de DCM + 1 mL EtOH 60 % dans H₂O. L'ensemble est porté à 120°C et laissé ainsi 10 min. Après retour à température ambiante, le milieu est filtré à l'aide de filtre PTFE (0,22 μ m) Le culot est lavé par 2 x 0,2 mL d'une solution de Et₄NCl 0,5 M dans DCM. La solution est ajusté à 2 mL à l'aide d'EtOH à 60 % dans H₂O. L'absorbance est mesurée par UV à 570 nm (Abs = 0,802). D'après l'équation : $\mu = (\text{Abs}_{570} \times V) / \epsilon_{570} \times m) \times 10^6$, le taux de chargement est alors de 0,213 mmol.g⁻¹.

14. Analyses.

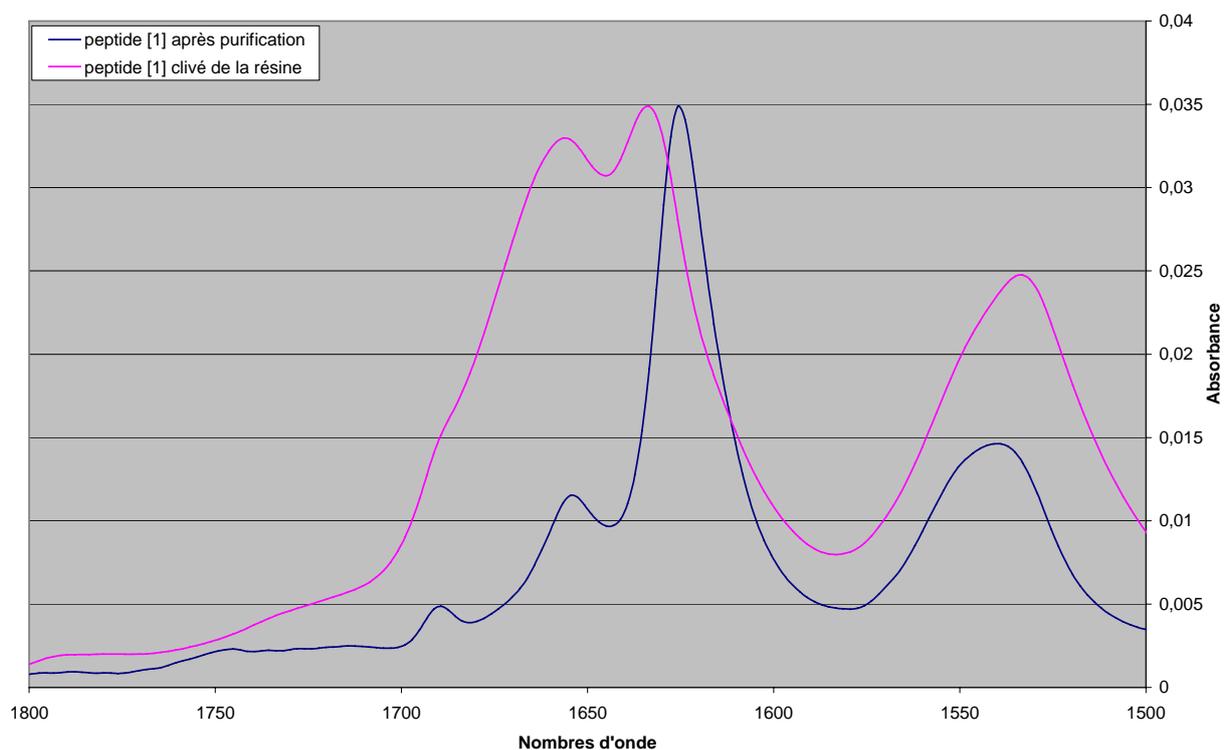
a. Analyse RMN¹H du cyclopeptide [1].

L'analyse est réalisée sur une solution de cyclopeptide [1] à 13 mg.mL⁻¹ dans D₂O + NaOD (pH9) avec 1 équivalent de para-nitrophénol comme étalon interne.



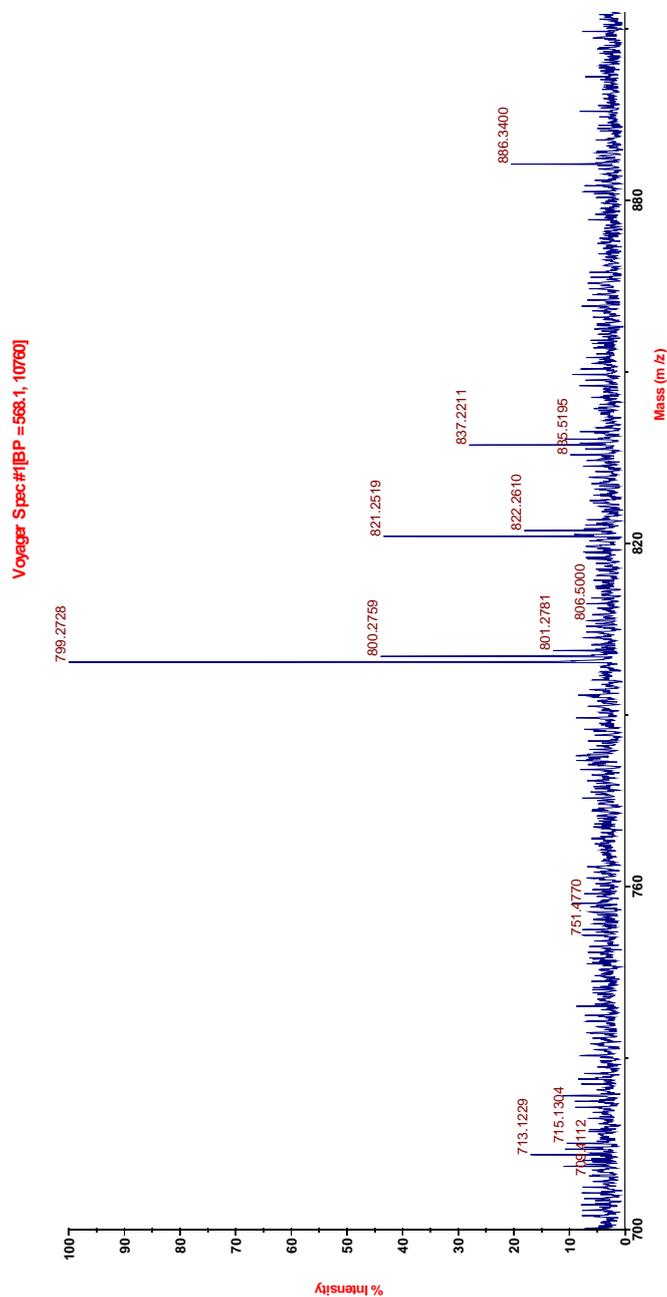
b. Analyse ATR-FTIR de l'assemblage du cyclopeptide [1] en nanotubes de peptides par interactions de liaisons hydrogène en feuillets β antiparallèles.

Poudres de cyclopeptide [1] analysées par ATR-FTIR. La courbe rose représente l'assemblage après clivage de la résine et précipitation à l' Et_2O . La courbe bleue représente l'assemblage après traitement acido basique.



c. Analyse de spectrométrie de masse MALDI-TOF du cyclopeptide [1].

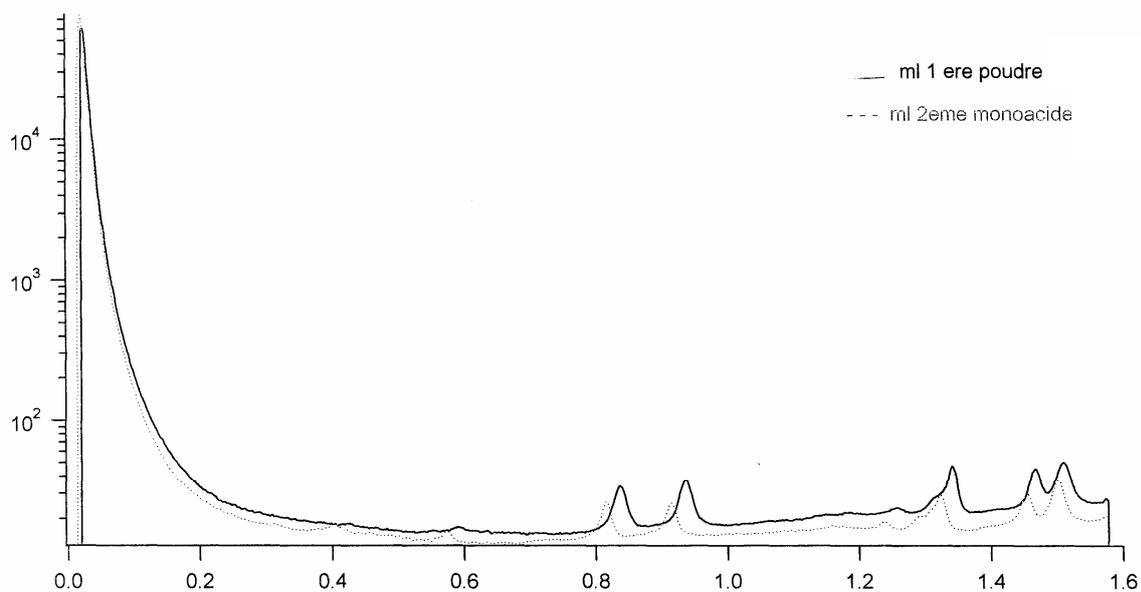
Une solution de cyclopeptide [1] à 1 mg.mL^{-1} dans le TFA pur est passé en MALDI-TOF. Cette analyse a été réalisée par François Fennaille.¹⁴



d. Analyses SAXS des cyclopeptides [1] et [2].

La poudre des cyclopeptides [1] et [2] est analysée par SAXS. La courbe en trait plein représente le cyclopeptide [1] et la courbe en pointillé le cyclopeptide [2]. Le réseau cristallin des cyclopeptides est un réseau carré à fond plat dans les deux cas mais les paramètres de mails dans le cas du cyclopeptide [2] sont plus grand que dans le cas du cyclopeptide [1].

Ces analyses ont été réalisées par l'équipe de Franck Artzner.¹⁵



III. Partie 2.

1. Synthèse du cyclopeptide [42].

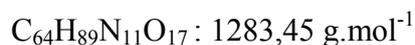
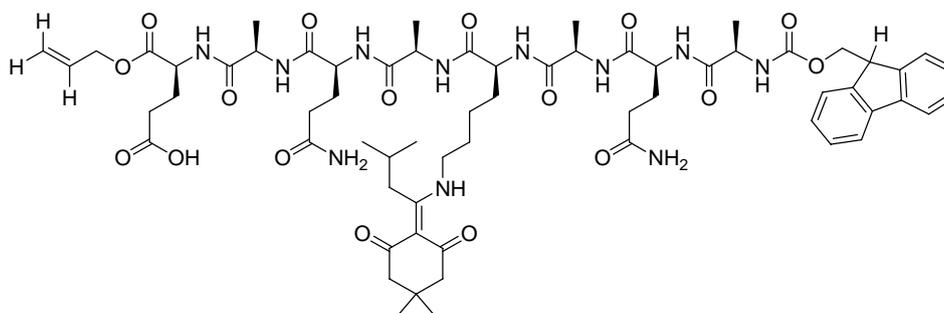
a. Fonctionnalisation de la résine.

Synthèse identique au cyclopeptide [2].

b. Détermination du loading.

La résine a un loading de $0,6 \text{ mmol.g}^{-1}$ pour la résine.

c. Couplages peptidiques du peptide linéaire protégé.



Description générale :

Synthèse identique au cyclopeptide [2].

Etapes de la synthèse :

- couplage à l'aide du Fmoc-D-Ala-OH en 1 h.
- couplage à l'aide du Fmoc-L-Gln(NHTrt)-OH en 6 h.
- couplage à l'aide du Fmoc-D-Ala-OH en 4 h.
- couplage à l'aide du Fmoc-L-Lys(NHivDde)-OH en 6 h.
- couplage à l'aide du Fmoc-D-Ala-OH en 6 h.
- couplage à l'aide du Fmoc-L-Gln(NHTrt)-OH en 4 h 40.
- couplage à l'aide du Fmoc-D-Ala-OH en 4 h.

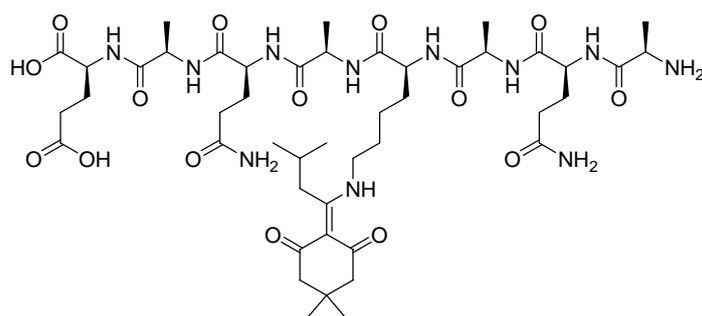
Le clivage de 20 mg de résine est réalisé à l'aide de 1 mL de TFA en présence de 30 μL de TIS et 30 μL d' H_2O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 1 mL de TFA et le filtrat

est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 5 mL d'Et₂O, séché sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h. Le peptide linéaire protégé est obtenu sous la forme d'une poudre blanche.

Masse (ES+) : 1284,83 g.mol⁻¹, masse (ES-) : 1282,92 g.mol⁻¹.

HPLC dans DMSO : 7,37 min.

d. Déprotections de la chaîne principale donnant le peptide linéaire déprotégé.



C₄₆H₇₅N₁₁O₁₅ : 1021,54 g.mol⁻¹

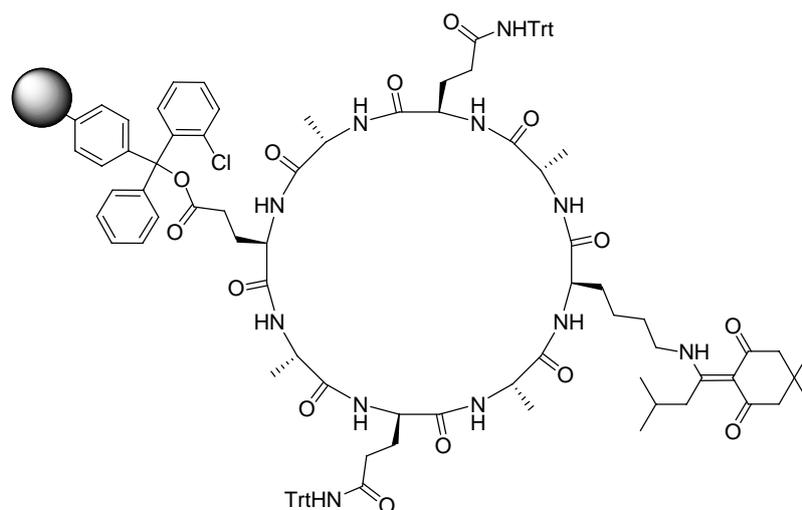
Dans une seringue de 250 mL pour synthèse sur support solide contenant la résine (2 g, 0,6 mmol, L=0,6 mmol.g⁻¹) est introduit la morpholine (2,62 mL, 30 mmol, 50 eq.) et le Pd(PPh₃)₄ (104 mg, 0,09 mmol, 0,15 eq.) dans 35 mL d'un mélange DMSO / THF / HCl 0,5 M (2 : 2 : 1). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à la roue à température ambiante durant 24 h. La résine est filtrée et lavée par 3 x 40 mL de DCM, 3 x 40 mL de DCM / HCl 0,5 M (1 : 1) et 3 x 40 mL de DCM. La résine est ensuite lavée par 3 x 40 mL de DMF, 3 x 40 mL d'isopropanol et 3 x 40 mL de n-Hexane et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

Le clivage de 20 mg de résine est réalisé à l'aide de 1 mL de TFA en présence de 30 µL de TIS et 30 µL d'H₂O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 1 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 5 mL d'Et₂O, séché sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h. Le peptide linéaire déprotégé est obtenu sous la forme d'une poudre blanche.

Masse (ES+) : 1022,85 g.mol⁻¹, masse (ES-) : 1020,57 g.mol⁻¹.

HPLC dans DMSO: 5,12 min.

e. Cyclisation pour l'obtention du cyclopeptide **[41]**.

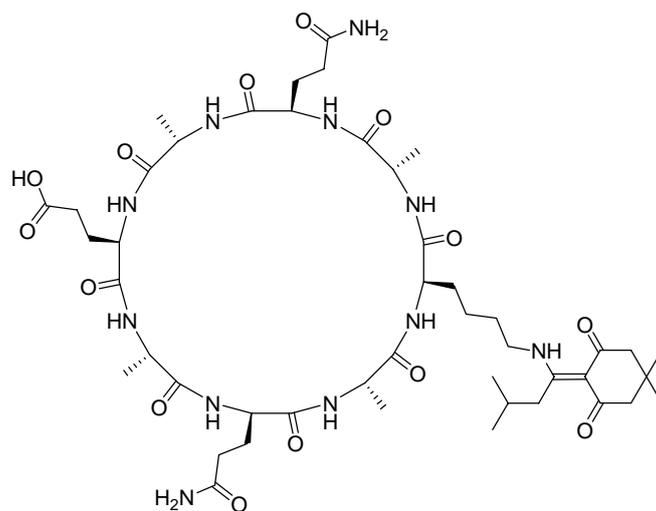


[41]

Dans une seringue de 20 mL pour synthèse sur support solide est introduit la résine (950 mg, 0,285 mmol, $L = 0,6 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) et 10 mL de DMF. Après agitation durant 1 h afin de faire gonfler la résine, cette dernière est filtrée et une solution de DIC (66 μL , 0,427 mmol, 1,5 eq.) et d'HOAt (0,5 M dans le DMF) (570 μL , 0,6 mmol, 1 eq.) dans 10 mL de DMF est ajoutée. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à la roue à température ambiante durant 3 jours.

La résine est filtrée, lavée par 3 x 10 mL de DMF, 3 x 10 mL d'isopropanol, 3 x 10 mL de n-Hexane et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

La résine (20 mg) est mise en présence de 1 mL de TFA, 30 μL de TIS et 30 μL d' H_2O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 1 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 1 mL d' Et_2O , séché sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h. Le cyclopeptide **[43]** est obtenu sous la forme d'une poudre blanche.



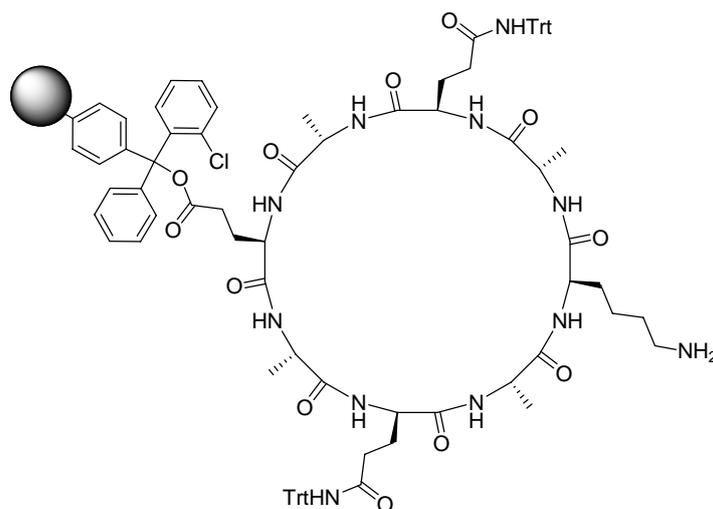
[43]

$C_{46}H_{73}N_{11}O_{14}$: 1003,53 g.mol⁻¹

Masse (ES+) : 1004,80 g.mol⁻¹, masse (ES-) : 1002,55 g.mol⁻¹.

HPLC dans DMSO : 5,47 min

f. Déprotection de la lysine.

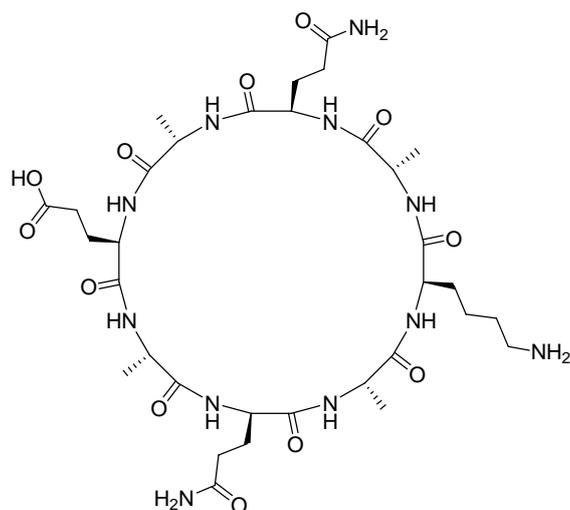


[42]

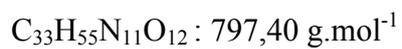
Le composé [41] (505 mg) est déprotégé par 5 x 3 min avec 10 mL d'une solution d'hydrazine à 2 % dans le DMF. La résine est alors lavé par 3 x 10 mL de DMF, 3 x 10 mL de MeOH et 3 x 10 mL d'hexane. La résine est séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

La résine (20 mg) est mise en présence de 1 mL de TFA, 30 µL de TIS et 30 µL d'H₂O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 1 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu

est lavé par 3 x 1 mL d'Et₂O, séché sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h. Le cyclopeptide [44] est obtenu sous la forme d'une poudre blanche.



[44]



Masse (ES+) : 798,3 g.mol⁻¹, masse (ES-) : 796,4 g.mol⁻¹.

HPLC dans DMSO : 3,5 min

2. Synthèse du cyclopeptide [46].

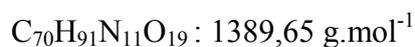
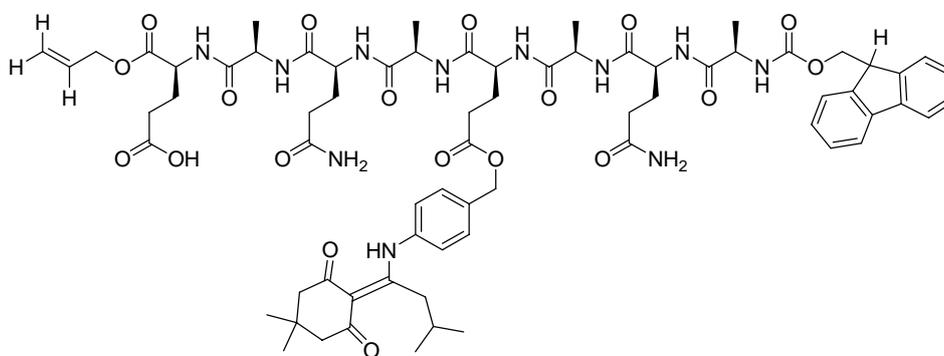
a. Fonctionnalisation de la résine.

Synthèse identique au cyclopeptide [2].

b. Détermination du loading.

La résine a un loading de 0,6 mmol.g⁻¹ pour la résine.

c. Couplages peptidiques du peptide linéaire protégé.



Description générale :

Synthèse identique au cyclopeptide [2].

Etapes de la synthèse :

- couplage à l'aide du Fmoc-D-Ala-OH en 1 h.
- couplage à l'aide du Fmoc-L-Gln(NHTrt)-OH en 6 h.
- couplage à l'aide du Fmoc-D-Ala-OH en 4 h.
- couplage à l'aide du Fmoc-L-Glu(ODmab)-OH en 6 h.
- couplage à l'aide du Fmoc-D-Ala-OH en 1 h 45.
- couplage à l'aide du Fmoc-L-Gln(NHTrt)-OH en 4 h 30.
- couplage à l'aide du Fmoc-D-Ala-OH en 3 h.

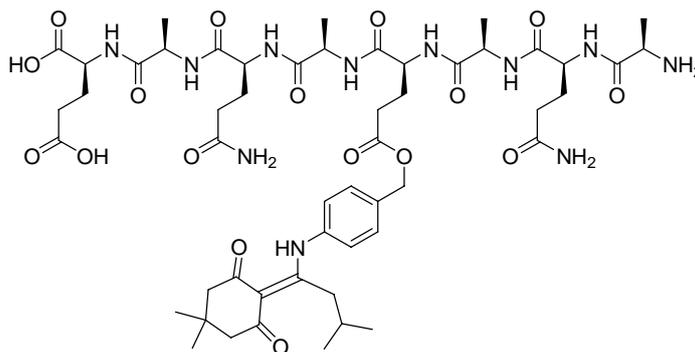
Le clivage de 20 mg de résine est réalisé à l'aide de 1 mL de TFA en présence de 30 μL de TIS et 30 μL d' H_2O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 1 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 5 mL d' Et_2O , séché sous vide au dessiccateur

sur KOH durant 18 h. Le peptide linéaire protégé est obtenu sous la forme d'une poudre blanche.

Masse (ES+) : 1390,30 g.mol⁻¹, masse (ES-) : 1388,53 g.mol⁻¹.

HPLC dans DMSO : 7,47 min.

d. Déprotections de la chaîne principale donnant le peptide linéaire déprotégé.



C₅₂H₇₇N₁₁O₁₇ : 1127,55 g.mol⁻¹

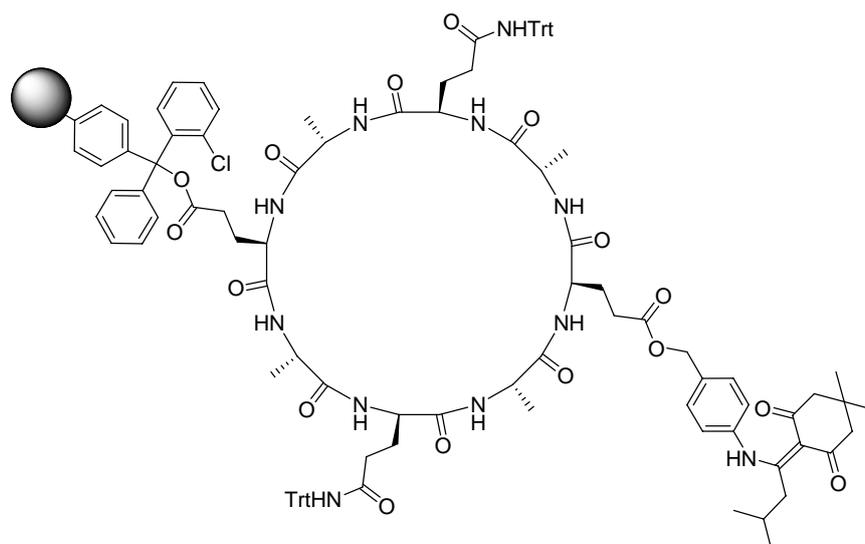
Dans une seringue de 250 mL pour synthèse sur support solide contenant la résine (2 g, 0,6 mmol, L=0,6 mmol.g⁻¹) est introduit la morpholine (2,62 mL, 30 mmol, 50 eq.) et le Pd(PPh₃)₄ (104 mg, 0,09 mmol, 0,15 eq.) dans 35 mL d'un mélange DMSO / THF / HCl 0,5 M (2 : 2 : 1). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à la roue à température ambiante durant 24 h. La résine est filtrée et lavée par 3 x 40 mL de DCM, 3 x 40 mL de DCM / HCl 0,5 M (1 : 1) et 3 x 40 mL de DCM. La résine est ensuite lavée par 3 x 40 mL de DMF, 3 x 40 mL d'isopropanol et 3 x 40 mL de n-Hexane et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

Le clivage de 20 mg de résine est réalisé à l'aide de 1 mL de TFA en présence de 30 µL de TIS et 30 µL d'H₂O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 1 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 5 mL d'Et₂O, séché sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h. Le peptide linéaire déprotégé est obtenu sous la forme d'une poudre blanche.

Masse (ES+) : 1128,52 g.mol⁻¹, masse (ES-) : 1126,18 g.mol⁻¹.

HPLC dans DMSO: 5,43 min.

e. Cyclisation pour l'obtention du cyclopeptide [45].

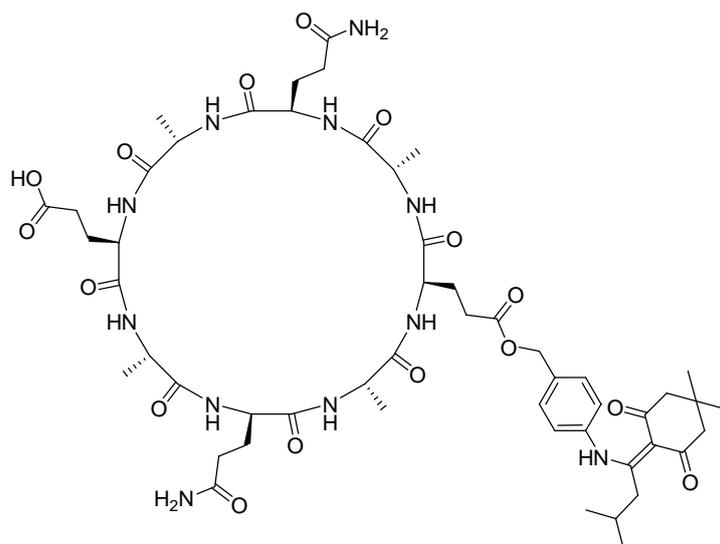


[45]

Dans une seringue de 20 mL pour synthèse sur support solide est introduit la résine (2 g, 0,6 mmol, $L = 0,6 \text{ mmol.g}^{-1}$) et 10 mL de DMF. Après agitation durant 1 h afin de faire gonfler la résine, cette dernière est filtrée et une solution de DIC (139 μL , 0,9 mmol, 1,5 eq.) et d'HOAt (0,5 M dans le DMF) (1,2 mL, 0,6 mmol, 1 eq.) dans 10 mL de DMF est ajoutée. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à la roue à température ambiante durant 3 jours.

La résine est filtrée, lavée par 3 x 10 mL de DMF, 3 x 10 mL d'isopropanol, 3 x 10 mL de n-Hexane et séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

La résine (20 mg) est mise en présence de 1 mL de TFA, 30 μL de TIS et 30 μL d' H_2O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 1 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 1 mL d' Et_2O , séché sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h. Le cyclopeptide [47] est obtenu sous la forme d'une poudre blanche.



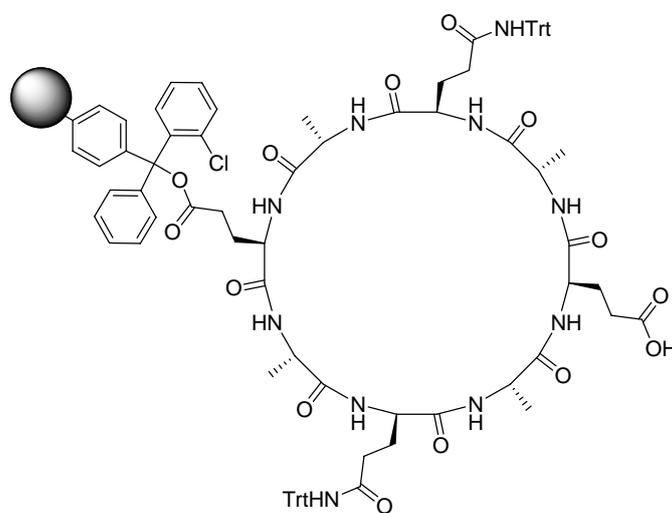
[47]

$C_{52}H_{75}N_{11}O_{164}$: 1009,54 g.mol⁻¹

Masse (ES+) : 1110,97 g.mol⁻¹, masse (ES-) : 1108,69 g.mol⁻¹.

HPLC dans DMSO : 6,00 min

f. Déprotection de la lysine.

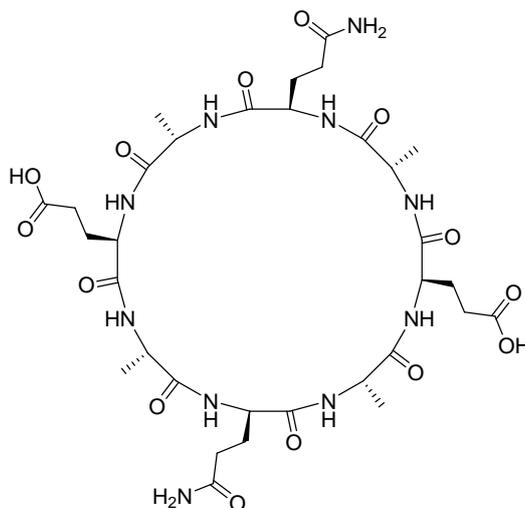


[46]

Le composé [45] (1 g) est déprotégé par 5 x 3 min avec 20 mL d'une solution d'hydrazine à 2 % dans le DMF. La résine est alors lavé par 3 x 20 mL de DMF, 3 x 20 mL de MeOH et 3 x 20 mL d'hexane. La résine est séchée sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h.

La résine (20 mg) est mise en présence de 1 mL de TFA, 30 µL de TIS et 30 µL d'H₂O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 1 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu

est lavé par 3 x 1 mL d'Et₂O, séché sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h. Le cyclopeptide [1] est obtenu sous la forme d'une poudre blanche.



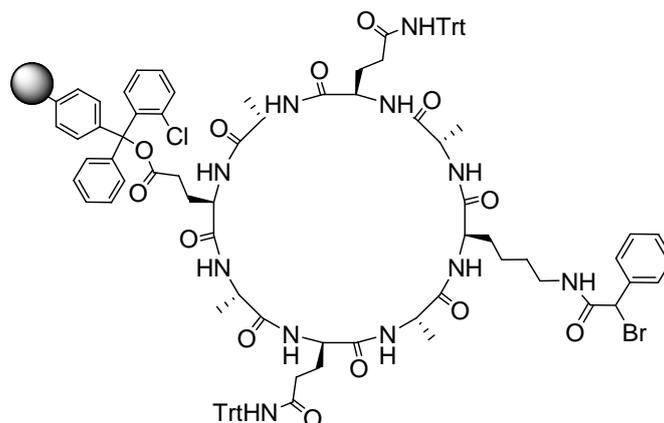
[1]

$C_{32}H_{50}N_{10}O_{14}$: 798,35 g.mol⁻¹

Masse (ES+) : 799,55 g.mol⁻¹, masse (ES-) : 797,37 g.mol⁻¹.

HPLC dans H₂O + NaOH (generic70) : 4,82 min

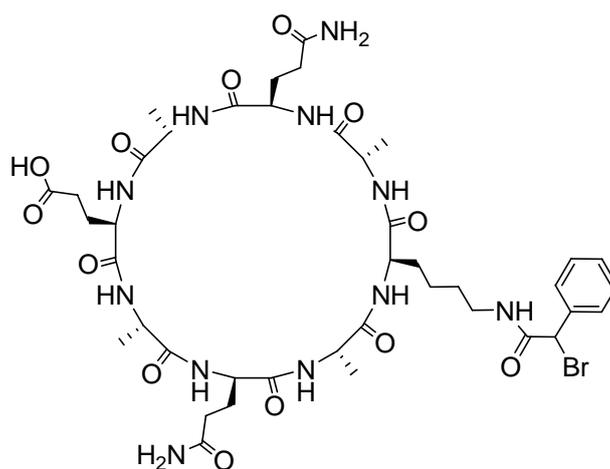
3. Synthèse du composé [47].



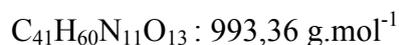
[47]

Dans une seringue de 6 mL pour synthèse sur support solide est ajouté une solution de l'acide (19,5 mg, 0,09 mmol, 3 eq.), du DIC (16,2 μ L, 0,105 mmol, 3,5 eq.) et d'HOAt (0,5 M dans le DMF) (211 μ L, 0,105 mmol, 3,5 eq.) à la résine [42] (50 mg, 0,03 mmol, L = 0,6 mmol.g⁻¹). L'ensemble est laissé sous agitation à la roue à température ambiante durant 3 jours.

La résine (20 mg) est mise en présence de 1 mL de TFA, 30 μ L de TIS et 30 μ L d'H₂O distillée. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant 3 h. La résine est filtrée, lavée par 3 x 1 mL de TFA et le filtrat est concentré à sec. Le résidu est lavé par 3 x 1 mL d'Et₂O, séché sous vide au dessiccateur sur KOH durant 18 h. Le cyclopeptide [1] est obtenu sous la forme d'une poudre blanche.



[48]



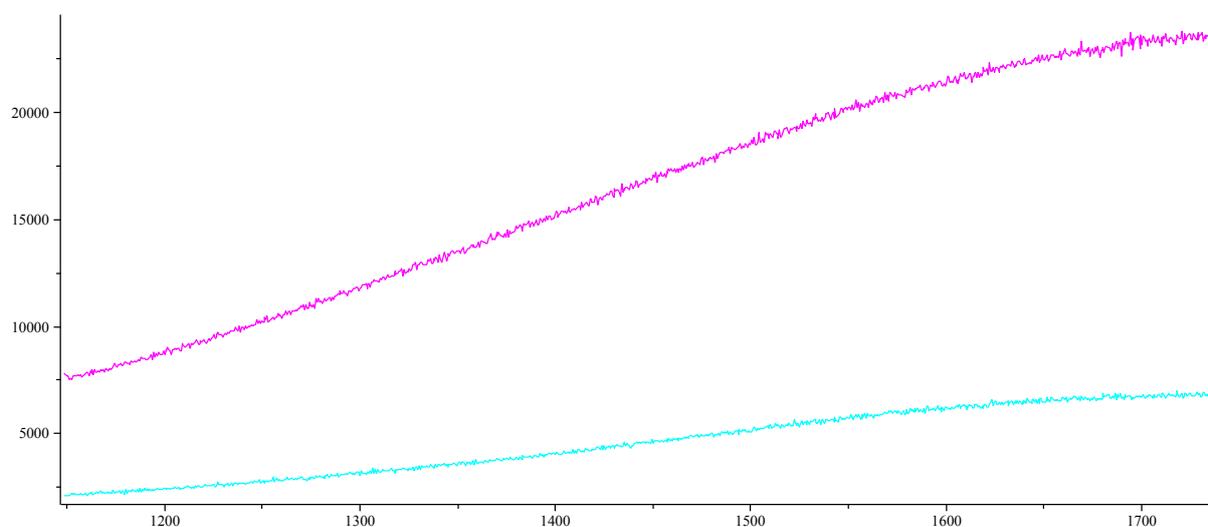
Masse (ES+) : 994,46 g.mol⁻¹, masse (ES-) : 992,35 g.mol⁻¹.

HPLC dans H₂O + NaOH (generic70) : 5,23 min

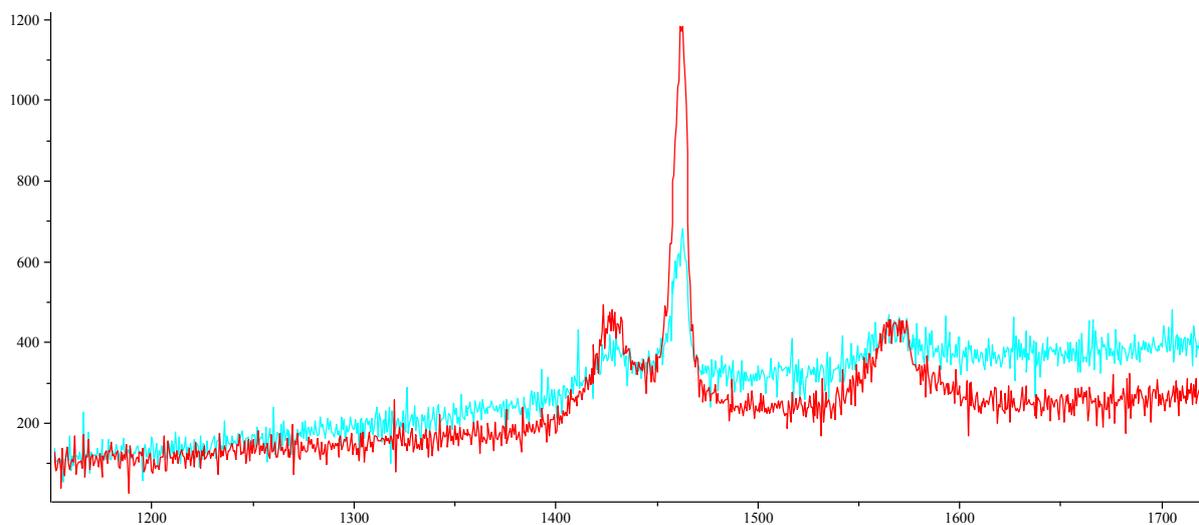
4. Caractérisation du couplage fullerène [19] avec le cyclopeptide [46].

L'analyse RAMAN est réalisée sur l'essai de couplage à l'aide du PyAOP comme agent de couplage. Après clivage de la résine, la poudre solubilisée en milieu alcalin est lyophilisée et analysé par RAMAN. Les analyses ont été réalisés par Denis Rouchon¹⁶

L'analyse a été réalisée par spectroscopie Raman visible avec deux longueurs d'onde 514,532 et 647,1 nm. Pour éviter tout problème de transformation du fullerène sous laser, l'analyse a été réalisée avec une puissance laser sous microscope de l'ordre de 1 μ W.



Pour référence, le fullerène [19] est analysé également. On observe sur la zone analysée 3 pics provenant des modes de vibrations du fullerène (C60). Il excite de nombreux modes actifs mais ceux là sont les plus intenses.¹⁷



IV. Partie 3.

1. Cristallisation sur grille de TEM des assemblages supramoléculaires de sels alcalins du cyclopeptide [1].

La cristallisation sur grille de TEM est optimale pour des solutions de sels alcalins du cyclopeptide [1] de concentrations 1 mg.mL^{-1} . Un prélèvement de $5 \text{ }\mu\text{L}$ des solutions à analyser est déposé sur grille de cuivre 200 mesh recouvert d'un film de carbone à une température ambiante de $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Environ la moitié de la goutte est retiré au bout de 5 min et le restant est laissé séché sur la grille et observé en TEM.

2. Cristallisation sur plaque de verre des assemblages supramoléculaires de sels alcalins du cyclopeptide [1].

La cristallisation sur plaque de verre est ici également optimale pour des solutions de sels alcalins du cyclopeptide [1] de concentrations 1 mg.mL^{-1} . Un prélèvement de $10 \text{ }\mu\text{L}$ des solutions à analyser est déposé sur plaque de verre à une température ambiante de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. La goutte est laissée sécher entièrement sans perturbation durant 10 min et la goutte séchée est observée par TOM.

-
- ¹ V.K. Sarin; S. B. H. Kent; J.-P. Tam; R. B. Merrifield, *Anal. Biochem.*, **1981**, 117, 147-157.
- ² P. Lhoyd-Williams; G. Jou; F. Albericio; E. Giralt, *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 4207-4210.
- ³ M. G. J. Ten Cate; N. Severin; H. G. Börner, *Macromolecules*, **2006**, 39, 7831-7838.
- ⁴ D. Muller; I. Zeltser; G. Bitan; C. Gilon, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 411-416.
- ⁵ K. Kordatos; T. Da Ros; S. Bosi; E. Vázquez; M. Bergamin; C. Cusan; F. Pellarini; V. Tomberli; B. Baiti; D. Pantarotto; V. Georgakilas; G. Spalluto; M. Prato, *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 4915-4920.
- ⁶ D. Muller; I. Zeltser; G. Bitan; C. Gilon, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 411-416.
- ⁷ F. Pellarini; D. Pantarotto; T. Da Ros; A. Giangaspero; A. Tossi; M. Prato, *Org. Lett.*, **2001**, 3, 1845-1848.
- ⁸ M. Shiga; K. Yakata; M. Aoyama; K. Sasamoto; M. Takagi; K. Ueno, *Anal. Sci.*, **1995**, 11, 195-201.
- ⁹ Y. Chen; G. Baker, *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 6870-6873.
- ¹⁰ S. W. Jeong; D. F. O'Brien, *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 4799-4802.
- ¹¹ M. Apparü; Y. B. Tiba; P.-M. Léo; D. Fagret, *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, 6, 1007-1012.
- ¹² L. Lebeau; P. Oudet; C. Mioskowski, *Helv. Chem. Acta*, **1991**, 74, 1697-1706.
- ¹³ G. Pastorin; W. Wu; S. Wieckowski; J.-P. Briand; K. Kostarelos; M. Prato; A. Bianco, *Chem. Commun.*, **2006**, 11, 1182-1184.
- ¹⁴ François Fennaille du CEA/Saclay/IBiTec'S/SPI.
- ¹⁵ Franck Artzner de l'UMR 6626 de l'université Rennes 1.
- ¹⁶ Denis Rouchon du CEA/LETI/LEPMI.
- ¹⁷ J.-L. Sauvajol; E. Anglaret; A. Girard; A. Moreac; J.-C. Ameline; Y. Delugeard; L. Forró, *Phys. Rev. B*, **1997**, 56,13642-13645 ; J.-L. Sauvajol; F. Brocard; Z. Hricha; A. Zahab, *Phys. Rev. B*, **1995**, 52,14839-14849.



Abstract

The purpose of my thesis was to realize new hybrid compounds based on carbon nanotubes (or fullerenes) and peptide nanotubes. The chosen approach consisted first in grafting on carbon nanotubes, or at first on fullerene, via linkers, « Ghadiri type » cyclopeptides leading to the peptide nanotubes.

On the one hand, the grafting was planned to be done via the introduction of linkers on carbon nanotubes or C₆₀. On the other hand, cyclopeptides are obtained by SPPS using an even number of alternated D and L amino acids auto-assembling in antiparallel β sheets affording nanotubes after cleavage.

Although, we were successful of the first part of this approach, unsolubility of the cyclopeptides in common organic solvents did not allow us to get the target compound. Introduction of C₆₀ during the solid phase synthesis was not more satisfactory.

In a second part, I focused on the characterization of two cyclopeptides, by TEM, ATR-FTIR, optical microscopy and light scattering. During there studies, I also evidenced self-assembly. The self-organization can be drive by the counter-ion on (one or two) Glu.

In fact, whereas the free acid yields to nanotubes, salification strongly affects the self-assembly leading after crystallization to fractal aggregates. The shapes of these aggregates are also dependent of the counter-ions used.

In addition, I also briefly evaluate the potential of some of these cyclopeptides to encapsulate Xe for MRI.

Résumé

Le but de ma thèse a été de réaliser de nouveaux composés hybrides constitués de nanotubes de carbone (ou fullerènes) et de nanotubes de peptides.

L'approche choisie a consisté à greffer sur des nanotubes de carbone, ou dans un premier temps sur des fullerènes, via des bras espaceurs, des cyclopeptides « de type Ghadiri » conduisant aux nanotubes de peptides. Pour se faire, la synthèse de bras espaceurs a été nécessaire ainsi que leur fixation sur les nanotubes de carbones ou fullerènes. Les cyclopeptides sont constitués d'un nombre pair d'acides aminés (8) alternés D et L s'auto-assemblant en feuillets β antiparallèles pour conduire à des nanotubes. Des essais de solubilisation du cyclopeptide diacide révèlent l'impossibilité d'utiliser ces composés en synthèse organique, dans la mesure où ils ne sont pas solubles dans les solvants organiques classiques. Il a fallu ainsi revoir la synthèse en incluant soit le fullerène en cours de synthèse peptidique soit en modifiant les conditions pour permettre une solubilisation du peptide.

Les composés synthétisés ont été caractérisés par différentes méthodes notamment en TEM, FT-IR, ATR, microscopie optique, diffusion de la lumière.

De nouvelles applications aux peptides de Ghadiri ont été cherchées en imagerie (par encapsulation du Xénon hyperpolarisé dans les cavités).

Il a été mis en évidence de nouvelles organisations cristallines des peptides possibles dans des conditions contrôlées à l'aide de contre ions tels que les éléments de la première colonne du tableau périodique (Li, Na, K, Rb, ou Cs). Ces organisations, différentes en fonction du contre ion choisi, ont un caractère fractal remarquable, une organisation cristalline régulière et on observe un réseau de liaisons hydrogène inattendu dans les conditions utilisés.