

NOTE TO USERS

This reproduction is the best copy available.

UMI[®]

PIERRE-LUC BOUDREAUULT

**SYNTHÈSE DE NANOSTRUCTURES PEPTIDIQUES
À ACTIVITÉ CYTOLYTIQUE**

Mémoire présenté

à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en chimie
pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

MARS 2005



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*

ISBN: 0-494-01159-9

Our file *Notre référence*

ISBN: 0-494-01159-9

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

RÉSUMÉ

Les peptides et les protéines naturels sont d'une importance capitale pour tous les êtres vivants de notre planète. Plus particulièrement, les peptides lytiques membranaires constituent un système de défense efficace contre l'invasion des microorganismes d'où leur intérêt en chimie pharmaceutique. Ces nanostructures peptidiques agissent toutes selon un mécanisme semblable, soit en perturbant et en perméabilisant la membrane biologique de l'organisme ou de la cellule à être éliminée.

Les peptides lytiques membranaires peuvent aussi être utilisés pour le traitement contre le cancer. La chimiothérapie anticancéreuse actuelle n'est plus aussi efficace étant donné la forte résistance face aux médicaments sur le marché. Ceci requiert donc d'urgence le développement de nouveaux agents anticancéreux possédant un mécanisme d'action inédit, sans possibilité de résistance, pouvant cibler sélectivement les cellules malades. Les nanostructures peptidiques sont des candidats idéals, car ils répondent à plusieurs critères essentiels.

Dans un vaste programme de recherche sur le développement de nanostructures peptidiques fonctionnels, le groupe Voyer a mis au point une famille de peptides possédant des propriétés cytolytiques. Ces derniers sont constitués de 14 acides aminés naturels et synthétiques. Ils sont amphiphiles, non chargés et possèdent une conformation d'hélice α . Des études préliminaires ont démontré que la modification au *N*- ou au *C*-terminal des peptides provoquait aussi un changement dans l'activité biologique. Ces composés s'avèrent intéressants pour le design et la synthèse de pro-drogues.

Dans ce mémoire de maîtrise, plusieurs analogues des nanostructures peptidiques ont été synthétisés sous forme de pro-peptides. Ceux-ci sont constitués du noyau cytolytique de 14 acides aminés et d'une chaîne formée de 2 à 4 acides aspartique et/ou glutamique. Des tests d'activité biologique ainsi que des études conformationnelles par dichroïsme circulaire ont permis de déterminer la relation entre la structure et l'activité des composés. Ces études ont été réalisées à l'aide de vésicules phospholipidiques et de cellules

humaines. Les résultats obtenus démontrent qu'il est possible de moduler et même d'inhiber les propriétés lytiques de certaines nanostructures grâce aux chaînes de type Asp/Glu.

Les travaux futurs permettront de déterminer si ses chaînes peuvent être hydrolysées par la PSMA, une enzyme sur-exprimée uniquement à la surface des cellules cancéreuses de la prostate et d'autres types de cancer. Ceci permettrait de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses au détriment des cellules saines.

REMERCIEMENTS

Premièrement, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Professeur Normand Voyer, de m'avoir accueilli dans son équipe et m'avoir transmis sa passion pour les sciences. Ses qualités professionnelles en font un scientifique remarquable. De plus, ses qualités personnelles en font un directeur de recherche et un ami hors pair. Merci Normand, ton dynamisme, ton enthousiasme et ta persévérance sont agréablement transmis à tes étudiants et sont une source d'inspiration pour tous.

De même, je remercie le professeur Bradley Smith et Kristy M. DiVittorio de l'Université de Notre-Dame pour la merveilleuse collaboration qui a été des plus enrichissantes.

Par ailleurs, je voudrais remercier mes collègues de laboratoire pour leur soutien et pour leur aide. Ceux-ci contribuent à une atmosphère de travail des plus conviviales. Merci à : Mélanie Beaumont, Dominique Hivon, Joelle Martin, Julie Richer, Michel Dumont, Marise Ouellet, Simon Ouellet, Régis Barattin, Jérôme Joutel, Jean-Philippe Blanchette, Mathieu Arseneault et Dave Lee.

Je remercie spécialement les assistants de recherche pour leur assistance technique ainsi que pour leur soutien moral. Merci à Mélanie Tremblay et à François Otis, qui sont d'une aide précieuse à tous les points de vue.

Enfin, je ne peux passer sous silence mes amis et ma famille, en particulier mes parents France et Jean, ma copine Sonia, mon fils Charle-Antoine, mon frère Jean-Sébastien et ma sœur Mélanie, sans quoi rien de tout cela n'aurait été possible. Vos encouragements continuels et votre soutien moral ont été, et seront toujours d'une importance capitale.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTES DES ABRÉVIATIONS	vii
LISTES DES TABLEAUX	x
LISTES DES FIGURES	xi
LISTES DES GRAPHIQUES	xiv
LISTES DES ANNEXES	xv
CHAPITRE 1: INTRODUCTION.....	1
1.1 Les peptides naturels lytiques perturbateurs membranaires	2
1.2 Les peptides hélicoïdaux amphiphiles linéaires.....	3
1.2.1 La mélittine	3
1.2.2 Les cécropines.....	4
1.2.3 Les magainines	5
1.2.4 L'alaméthicine	6
1.2.5 La pardaxine	7
1.3 Les origines de la nanochimiothérapeutique	8
1.3.1 Les peptides lytiques synthétiques perturbateurs membranaires	9
1.4 Les peptides lytiques perturbateurs membranaires pour le traitement du cancer .	16
1.4.1 Cibler les cellules cancéreuses à l'aide de pro-drogues.....	17
1.5 L'antigène membranaire spécifique à la prostate, la PSMA	18
1.5.1 Activité catalytique et expression de la PSMA	19
1.6 Conclusion	20
CHAPITRE 2 : RÉSULTATS ANTÉRIEURS	21
2.1 Préambule	21
2.2 Activité lytique des peptides modifiés avec des éthers couronnes	21
2.2.1 Effet de la longueur des peptides sur l'activité lytique.....	22
2.2.2 Effet de la polarité des extrémités.....	24
2.2.3 Effet de la taille de l'éther couronne.....	24
2.3 Activité envers les érythrocytes.....	25
2.4 Conclusion	26
CHAPITRE 3 : DESIGN ET SYNTHÈSE DES COMPOSÉS CIBLES	27
3.1 Préambule	27
3.2 Objectifs spécifiques du projet	27
3.3 Molécules cibles	28
3.4 Stratégie générale de synthèse	29
3.4.1 Synthèse de l'acide aminé modifié avec un éther 21-couronne-7	30
3.4.2 Synthèse peptidique sur support solide.....	31
3.4.2.1 Préparation de la résine de Kaiser (résine oxime) 16	32
3.4.2.2 Synthèse sur support solide du segment heptapeptidique.....	34
3.4.2.3 Clivage du segment et préparation de l'heptamère acide 22	36
3.4.2.4 Condensation de segments sur support solide	38

3.4.2.5	Clivage et préparation du 14-mère acide 4	39
3.4.3	Synthèse des chaînes de types Glu/Asp	39
3.4.4	Couplage final des chaînes au 14-mère, clivage et déprotection	45
3.5	Conclusion	49
CHAPITRE 4 : ACTIVITÉ LYTIQUE ET ÉTUDES CONFORMATIONNELLES.....		50
4.1	Préambule	50
4.2	Activité lytique des nanostructures peptidiques synthétisées	51
4.2.1	Expériences de perméabilité des vésicules	52
4.2.2	Préparation des liposomes	53
4.2.3	Choix des phospholipides pour la préparation des liposomes	54
4.2.4	Activité lytique envers les vésicules DOPC :Chol	56
4.2.5	Activité lytique envers les vésicules DMPC :DMPG	58
4.3	Activité lytique des nanostructures peptidiques envers les érythrocytes.....	59
4.4	Études conformationnelles par spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire.....	61
4.4.1	Préambule	61
4.4.2	Résultats des études de spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire.....	63
4.5	Relation entre la structure et l'activité lytique.....	65
4.6	Conclusion	66
CHAPITRE 5 : CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET TRAVAUX FUTURS.....		68
5.1	Conclusions générales.....	68
5.2	Travaux futurs.....	69
PARTIE EXPÉRIMENTALE		70
ANNEXE		138
RÉFÉRENCES		193

LISTES DES ABRÉVIATIONS

<u>Abréviation</u>	<u>Nom</u>
A	L-alanine
Ac	acétyle
Aib	2-méthylalanine
Ala	L-alanine
Arg	L-arginine
Asn	L-asparagine
Asp	acide L-aspartique
Bt	benzotriazole
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbone
C	L-cystéine
CA	cécropine A
CB	cécropine B
Chol	cholestérol
CL	concentration létale
CSSS	condensation de segments sur support solide
Cys	L-cystéine
D	acide L-aspartique
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DC	dichroïsme circulaire
DCC	dicyclohexylcarbodiimide
DCM	dichlorométhane
DIC	diisopropylcarbodiimide
DIEA	diisopropyléthylamine
DMF	N',N'-diméthylformamide
DMPC	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycérol-3-phosphatidylcholine
DMPG	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycérol-3-[phospho(1-glycérol)]
DMSO	diméthylsulfoxyde
Dns	dansyl
DOPA	L-3-(3,4-dihydroxyphényl)-alanine
DOPC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycérol-3-phosphocholine
E	acide L-glutamique
EC	éther couronne
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide
ES	electrospray
Et	éthyl

F	L-phénylalanine
FT-IR	spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
G	glycine
Gln	L-Glutamine
Glu	acide L-glutamique
Gly	glycine
H	L-histidine
HCl	acide chlorhydrique
His	L-histidine
HOBt	hydrate d'hydroxybenzotriazole
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
Hz	hertz
I	L-isoleucine
IC	ionisation chimique
Ile	L-isoleucine
J	constante de couplage
K	L-lysine
kDa	kilo Dalton
L	L-leucine
Leu	L-leucine
LNCaP	Nodule Lymphatique du Cancer de la prostate
Lys	L-lysine
M	L-méthionine
MALDI	Matrix-Assisted-Laser Desorption-Ionisation
M2	Magainine 2
mdeg	millidegré
MDR	résistance multi-drogue
Me	méthyl
ME	mélittine
MeCN	acétonitrile
MeOH	méthanol
Met	L-méthionine
MIC	concentration minimale inhibitoire
m/z	masse/charge
N	L-asparagine
NMP	N-méthylpyrrolidinone
Net ₃	triéthylamine
OBzl	benzyle

P	L-proline
pA	picoampère
Ph	phényl
Phe	L-phénylalanine
PC	palmitoyl-oleoylphosphatidylcholine
ppm	partie par million
Pr	propyl
Pro	L-proline
PS	palmitoyl-oleoylphosphatidylsérine
PSMA	Antigène Membranaire Spécifique à la prostate
Q	L-glutamine
R	L-arginine
RMN	résonance magnétique nucléaire
S	L-sérine
Ser	L-sérine
SM	sphingomyéline
SPSS	synthèse peptidique sur support solide
T	L-thréonine
TFA	acide 2,2,2-trifluoroacétique
TFE	2,2,2-trifluoroéthanol
THF	tétrahydrofurane
Thr	L-thréonine
Trp	L-tryptophane
Tyr	L-tyrosine
U	2-méthylalanine
V	L-valine
Val	L-valine
W	L-tryptophane
Y	L-tyrosine

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1. Activité antibactérienne des analogues de la cécropine.....	9
Tableau 2. Activité anticancéreuse des analogues de la cécropine	10
Tableau 3. Activité antibactérienne des analogues de la magainine-2.....	10
Tableau 4. Concentration létale pour divers hybrides de la cécropine A (CA) et la mélittine (ME).....	11
Tableau 5. Concentration létale pour divers analogues hybrides de la cécropine A (CA) et de la magainine (MA).....	12
Tableau 6. Concentration létale sur les érythrocytes et efficacité intrinsèque envers les liposomes des peptides modèles Dns(L _i K _j) avec $i = 2j$	14
Tableau 7. Activité antibactérienne et hémolytique des peptides α cycliques D,L.....	15
Tableau 8. Conditions de réactions pour le couplage des acides glutamiques et aspartiques au N-terminal du 14-mère sur support solide.....	41
Tableau 9. Rendement de synthèse et masses moléculaires des chaînes de type Asp/Glu.....	45
Tableau 10. Nanostructures peptidiques synthétisés, masse moléculaire et rendements de synthèse.....	48
Tableau 11. Nanostructures peptidiques utilisées pour les tests d'activité lytique.....	50
Tableau 12. Perméabilité induite des peptides sur des vésicules DOPC :Chol(70 :30).....	57
Tableau 13. Perméabilité induite des peptides sur des vésicules DMPC :DMPG(1 :1).....	59
Tableau 14. Activité hémolytique des nanostructures peptidiques.....	60

LISTES DES FIGURES

Figure 1. a) Caractère partiel de double liaison C-N b) Plans de la liaison peptidique et rotation permise.....	1
Figure 2. Rotation entre les plans : angles φ et ψ possibles.....	2
Figure 3. Structure de la mélittine déterminée par cristallographie.....	4
Figure 4. 10 structures de la magainine-2 déterminées par RMN dans une micelle	5
Figure 5. Structure de l'alaméthicine déterminée par cristallographie.....	6
Figure 6. Structure et orientation de la pardaxine déterminée par RMN dans une membrane.....	7
Figure 7. Peptides de Degrado : A- Première série, B- seconde série	13
Figure 8. Peptides β de Gellman	13
Figure 9. L'auto-assemblage et les modes de perméabilisation membranaire des nanotubes peptidiques de Ghadiri : a) monopore intamoléculaire, b) mode "barrel stave", c) mode "carpet-like".....	15
Figure 10. Concept de "pro-drogue"	18
Figure 11. Nature globulaire de la PSMA. A- Domaine intracellulaire, B- Domaine transmembranaire, C, D, E, F- sous-domaines extracellulaires.....	18
Figure 12. Fonctions catalytiques de l'Antigène Membranaire Spécifique à la Prostate (PSMA).....	19
Figure 13. Nanostructures peptidiques : a) Structure et séquence b) Amphiphilicité du 14-mère.....	22
Figure 14. a) Structure des peptides 7-mère <u>1</u> , 14-mère <u>2</u> , 21-mère <u>3</u> b) Activité lytique des nanostructures peptidiques 5 à 7.....	23
Figure 15. Acides aminés constituant les chaînes de types Asp/Glu.....	28
Figure 16. Molécules cibles ; a) noyau cytolytique, b) Synthons pro-cytolytiques.....	29
Figure 17. Schéma de synthèse du Boc-EC ₂₁₋₇ -OH <u>11</u>	31

Figure 18. Schéma de synthèse de la résine de Kaiser (résine oxime) 16	33
Figure 19. Test de colorimétrie de Kaiser	33
Figure 20. Schéma général de synthèse peptidique sur support solide avec la résine de Kaiser.....	35
Figure 21. a) Clivage de la résine oxime pour l'obtention de l'heptapeptide acide b) Mécanisme de clivage à l'aide de DBU.....	37
Figure 22. Schéma général de condensation de segments sur support solide	38
Figure 23. Stratégie de synthèse convergente des synthons de types Asp/Glu pour le couplage au C- ou au N-terminal du noyau cytolitique.....	40
Figure 24. Tentative infructueuse de couplage a) des acides α - et β - aspartique et b) α - et γ -glutamique sur la résine oxime c) des acides aminés suivants	41
Figure 25. Réaction secondaire impliquant l'acide aspartique	42
Figure 26. Acides aminés de départ pour la synthèse des chaînes de type Asp/Glu.....	43
Figure 27. Schéma de synthèse des chaînes de type Asp/Glu, exemple du Boc- $[\gamma$ -Glu(α -OMe)] ₄ -OBzl	44
Figure 28. Schéma de couplage final des chaînes au 14-mère, clivage et déprotection.....	46
Figure 29. Schéma de couplage final des chaînes au C-terminal du 14-mère et déprotection.....	47
Figure 30. Représentation schématique du test de perméabilité : A- Concentration élevée \rightarrow auto-extinction B- Dilution \rightarrow Augmentation de la fluorescence.....	52
Figure 31. Intensité de la fluorescence en fonction du temps : A- Fluorescence sans agent lytique (F_0), B- Ajout de l'agent lytique, C- Fluorescence induite par l'agent lytique (F), D- Ajout du Triton-X, E- Lyse complète des vésicules (F_{100}).....	53
Figure 32. Structure des lipides formant les liposomes mimant les cellules eucaryotes normales.....	55
Figure 33. Structure des lipides formant les liposomes mimant les cellules cancéreuses...56	

Figure 34. 1- A) Ondes polarisés à 90° déphasées de $\pi/2$ B) Résultante C) Résultante vue de face 2- A) Polarisation vers la gauche et la droite B) Résultat de l'absorption inégale de la lumière polarisée gauche et droite : une ellipse.....62

Figure 35. Courbes de DC associées aux structures secondaires suivante : 1- Aléatoire 2- Feuillet β et 3- Hélice α63

Figure 36. Courbes de DC associées aux nanostructures peptidiques synthétisées dans le TFE à 0,28 mM64

LISTES DES GRAPHIQUES

Graphique 1. Lyse induite par $1\mu\text{M}$ de peptide ayant différents états de protection sur des vésicules 100% PC d'oeuf.....24

Graphique 2. Hémolyse induite par différentes concentrations de peptides (EC=21-7)....25

LISTES DES ANNEXES

ANNEXE 1 : Spectres RMN ^1H.....	139
ANNEXE 2 : Spectres de masse.....	167
ANNEXE 3 : Activité lytique.....	189

CHAPITRE 1 :

INTRODUCTION

Découvertes en 1838 par Jöns Jacob Berzelius, les protéines sont maintenant connues comme étant des constituants prépondérants de la cellule comptant pour plus de 50 % de sa masse sèche¹. Un corps d'adulte ordinaire est constitué de 12 à 18 % de protéines¹. Réalisant un certain nombre de tâches indispensables à la survie de l'organisme, la cellule fonctionne grâce à plusieurs types de polymères biologiques dont font partie les protéines et les polypeptides. Les propriétés moléculaires de ces nanostructures peptidiques sont essentielles au rôle que ces derniers assument dans la cellule, ainsi qu'à leurs interactions.

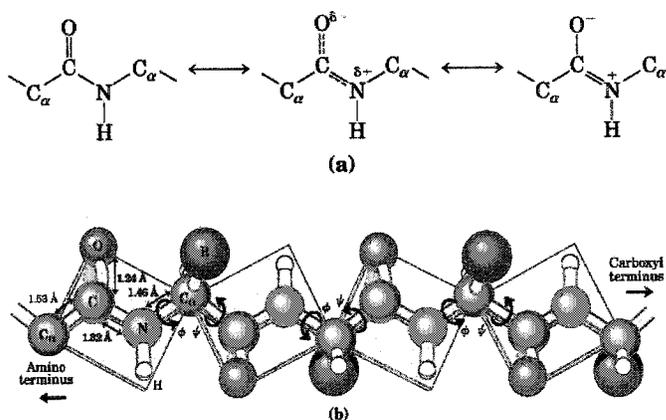


Figure 1 : a) Caractère partiel de double liaison C-N
b) Plans de la liaison peptidique et rotation permise

Le code génétique standard contient 20 acides aminés essentiels qui donnent lieu à une très grande diversité de combinaisons biologiques lors de leur polymérisation. Les peptides et les protéines sont, en fait, des oligomères et des polymères d'acides aminés. Chaque acide aminé est uni à son voisin par un lien amide également appelé liaison peptidique.

Ce lien peptidique est parfaitement rigide et plan en raison de la délocalisation de la paire d'électrons libres de l'azote de l'amine avec le groupe carbonyle. Étant donné le caractère partiel de double liaison du lien C-N, la rotation autour de ce lien est empêchée. De plus, dans la plupart des cas, l'hydrogène du N-H se situe en trans de la fonction carbonyle. Cependant, les liaisons adjacentes à la fonction amine peuvent tourner librement dans

l'espace. Malgré leur relative rigidité, les polypeptides possèdent donc une mobilité suffisante pour l'adoption d'une variété de conformation. Ainsi, dépendamment de

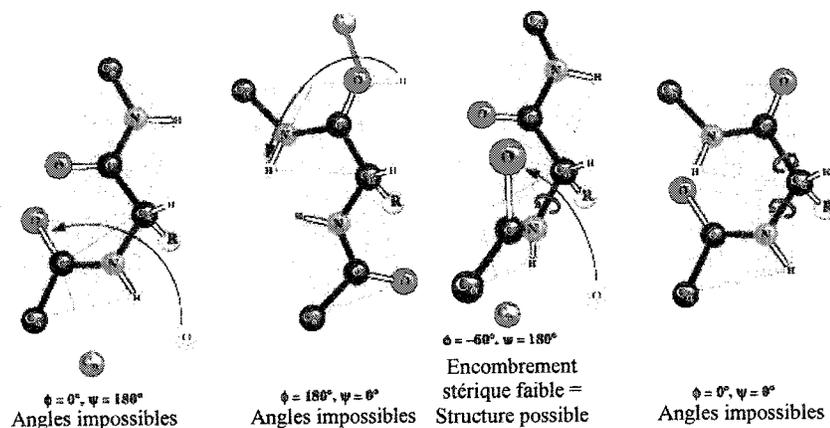


Figure 2 : Rotation entre les plans : angles ϕ et ψ possibles

leur structure primaire, les polypeptides peuvent se replier de différentes manières. Les activités biologiques qui en découlent sont dues à de telles dispositions spatiales. À ce point, il s'avère primordial de faire la corrélation entre la structure et l'activité biologique des peptides cytolytiques naturels pour éventuellement créer des nanostructures peptidiques synthétiques possédant des propriétés inédites.

1.1 Les peptides naturels lytiques perturbateurs membranaires

Les peptides lytiques membranaires ont été isolés à partir d'amphibiens et d'insectes aussi tôt qu'en 1962 par Kiss et Michl². Ce n'est cependant que 20 ans plus tard que l'investigation de ces nanostructures peptidiques s'est intensifiée, après la publication de la description détaillée de leurs propriétés lytiques et antimicrobiennes. En 2001, plus de 800 peptides antimicrobiens avaient été identifiés³. Ces nanostructures cytolytiques sont omniprésents dans la nature. Ils constituent un système de défense efficace contre l'invasion des microorganismes chez plusieurs organismes vivants. Ils ont été isolés à partir de bactéries (hémolysine), d'insectes (cécropine, mélattine), de plantes (thionines), d'amphibiens (magainines, dermaceptine) et de mammifères (défensines)⁴. Les peptides lytiques peuvent être classés en trois groupes majeurs : ceux actifs sélectivement contre les cellules eucaryotes, ceux actifs sélectivement contre les cellules procaryotes et ceux actifs contre les cellules eucaryotes et procaryotes à la fois. Cependant, ils agissent tous selon un mécanisme semblable, soit en perturbant et en perméabilisant la membrane biologique,⁵

causé par l'interaction avec la matrice lipidique. Les peptides hélicoïdaux amphiphiles sont ceux étant le plus largement répandus et possèdent un spectre d'activité très étendu.

1.2 Les peptides hélicoïdaux amphiphiles linéaires

On reconnaît aujourd'hui de nombreuses fonctions biologiques aux peptides amphiphiles hélicoïdaux linéaires telles la fusion membranaire, la génération de canaux transmembranaires et les phénomènes d'import/export de protéines. Ceux-ci sont diversifiés et comptent pour plus de quelques centaines. Chez la plupart des organismes vivants, ils constituent la première ligne de défense contre les agents pathogènes. La plupart du temps, ils sont composés de 25 à 50 résidus et sont riches en lysine et en arginine. Étant donné leur poids moléculaire relativement faible, beaucoup de ces peptides sont intéressants en synthèse organique. Il est possible de déterminer leur relation structure/activité car ils peuvent être caractérisés par dichroïsme circulaire (DC) et par résonance magnétique nucléaire (RMN). L'hélice α amphiphile est un motif structural commun dans plusieurs protéines et peptides biologiquement actifs⁶. L'activité lytique et antimicrobienne des peptides hélicoïdaux dépendent de plusieurs facteurs dont : la faculté de former des structures amphiphiles, la charge nette, l'hydrophobicité moyenne, la taille et la séquence ainsi que le degré de structuration⁷.

1.2.1 La mélittine

La mélittine, par exemple, est le composant principal du venin de l'abeille domestique, *Apis mellifera*. Elle est constituée de 26 acides aminés formant une hélice α ⁸. Étant donné la simplicité de sa structure ainsi que la bonne connaissance de ses propriétés physiques, la mélittine est l'un des peptides lytiques qui est le plus utilisé pour l'étude des interactions protéines-membranes⁹. Même si son activité antibactérienne est connue depuis la fin des années 1960¹⁰, les caractéristiques structurales nécessaires à son activité biologique ne le sont que depuis une vingtaine d'années¹¹. La manifestation de l'activité biologique de la mélittine n'est aucunement reliée à la chiralité de la molécule. Celle-ci

démontre une activité hémolytique et antibactérienne comparable pour chaque énantiomère¹². Le segment *N*-terminal constitué de 20 résidus est fortement hydrophobe tandis que le segment *C*-terminal est hautement cationique avec 6 résidus chargés positivement. Le rôle de la portion hélicoïdale amphiphile des résidus 1 à 20 semble n'être que structural. Le remplacement de cette séquence par une séquence formant une hélice α amphiphile n'affecte en rien l'activité biologique. Par contre, le segment 1 à 20 seul ne possède aucune activité lytique¹³. Une étude utilisant plusieurs analogues de la mélittine démontre que la structure amphiphile est d'une importance capitale pour l'hémolyse mais s'avère moins essentielle pour l'activité antimicrobienne¹⁴.

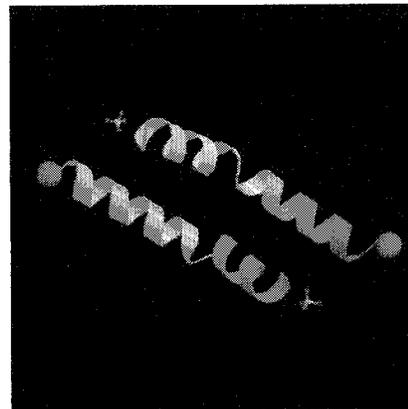


Figure 3 : Structure de la mélittine déterminée par cristallographie⁸.

1.2.2 Les cécropines

Le premier peptide hélicoïdal isolé à partir d'insectes (hémolymphe de la larve de verre à soie *Hyalophora cecropia*), a été la cécropine, par Hans Boman et collaborateur en 1981¹¹. Depuis, plus de 60 analogues de la cécropine ont été isolés d'insectes, et de mammifères¹⁵. Cette famille comprend les cécropines A, B, C, D, E, F et P1. Ces peptides possèdent une séquence de 35 à 39 acides aminés hautement conservée¹⁶. Ils ont une activité antibactérienne contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives, mais aucune activité lytique n'a été démontrée envers les cellules eucaryotes¹⁷. Cependant, plusieurs analogues de la cécropine peuvent lyser les cellules cancéreuses et ainsi provoquer leurs morts. En général, les cécropines sont des nanostructures polaires et leur structure primaire consiste en une séquence fortement basique au *N*-terminal suivi par un *C*-terminal hydrophobe¹⁸. Le remplacement du résidu tryptophane qui est toujours présent en position 2, ainsi que la délétion des deux résidus au *N*-terminal, causent une décroissance drastique de l'activité antibactérienne¹⁹. Plus spécifiquement, une étude de la cécropine A semble démontrer que la charge nette positive du peptide est un facteur plus important que

l'hélicité et l'hydrophobicité²⁰. Par contre, aucune corrélation ne peut être faite par rapport à la sélectivité envers les érythrocytes.

1.2.3 Les magainines

Plusieurs peptides hélicoïdaux ont été isolés à partir d'amphibiens. C'est le cas des magainines. Les magainines sont une famille de peptides lytiques secrétés par la peau et l'estomac de la grenouille africaine *Xenopus laevis*²¹. Ils ont été isolés pour la première fois en 1987. Ceux-ci sont constitués de 21 à 26 acides aminés et possèdent un caractère fortement basique. Ils démontrent une activité antibactérienne, antifongique et antivirale²².

De plus, plusieurs études ont révélé une sélectivité envers les cellules tumorales, sans toutefois être toxique pour les cellules saines²³. La magainine-2 a été étudiée de près par plusieurs groupes de recherche²⁴. Comme dans la plupart des peptides synthétiques analogues, l'augmentation de l'hélicité corrèle aussi bien avec l'activité antimicrobienne que la cytotoxicité envers les érythrocytes. Par exemple, le remplacement de la sérine et des glycines par l'alanine, promoteur d'hélice α , augmente l'activité hémolytique ainsi que l'activité antimicrobienne²⁵. Aussi, lorsque quelques acides aminés situés du côté hydrophile sont substitués par des lysines, ceci résulte en une augmentation de l'activité antimicrobienne. Cette approche a pour effet d'augmenter l'amphiphilicité, l'hélicité ainsi que la charge positive nette du peptide. Ensuite, le remplacement des acides aminés L par des D élimine complètement l'activité antibactérienne²⁴. Ce résultat suggère que l'hélicité soit un paramètre important pour les interactions hydrophobes et que la balance entre les interactions hydrophobes et les interactions électrostatiques joue un rôle crucial sur la sélectivité et sur l'activité. Le même résultat est observé lorsque seulement un acide aminé D est incorporé au milieu de la séquence²⁴. Enfin, l'augmentation de la charge par le

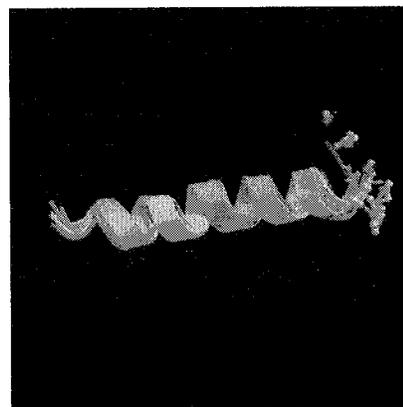


Figure 4 : 10 Structures de la magainine-2 déterminées par RMN dans une micelle²⁴

remplacement d'acides aminés sur la face polaire de la magainine-2 augmente l'activité antimicrobienne mais réduit considérablement l'activité hémolytique²⁶.

1.2.4 L'alaméthicine

Contrairement aux mélittines et aux magainines, l'alaméthicine est spécialement riche en acides aminés hydrophobes. De plus, il fait partie de la famille des peptaiboles, c'est-à-dire qu'il contient un acide aminé non protéogénique, l'acide 2-aminoisobutyrique (Aib). L'Aib est d'ailleurs reconnu pour avoir une forte propension à induire une structure en hélice α . L'alaméthicine est un peptide de 20 acides aminés isolé du champignon *Trichoderma viride*²⁷. Il forme un canal ionique voltage-dépendant dans les bicouches lipidiques²⁸. Depuis la publication de Muller et Rudin en 1968 « Artificial Membrane Excitability Induced by Alamethicin », celui-ci a été intensivement investigué²⁹. Seulement quelques études sont consacrées à l'activité antibactérienne de l'alaméthicine même si sa découverte est due à son activité antibactérienne plutôt qu'à ses propriétés biophysiques de canal ionique. Dans une des premières études, le peptide est actif contre les champignons et les bactéries Gram-positives mais semble n'avoir aucun effet sur les bactéries Gram-négatives³⁰. Pour clarifier la relation entre la structure et l'activité biologique, plusieurs dérivés de l'alaméthicine ont été synthétisés. Ces expériences ont démontré une très bonne corrélation entre l'activité antibiotique et la dimension du pore formé par le canal³¹. La conclusion est la suivante : plus le pore est large, plus l'activité antibiotique est élevée. De plus, une autre étude démontre que la longueur du peptide a une influence sur l'activité antibactérienne des peptaiboles. L'activité de la trichorzin PA, qui possède deux acides aminés en moins, est diminuée de 2 à 4 fois pour la même bactérie³².

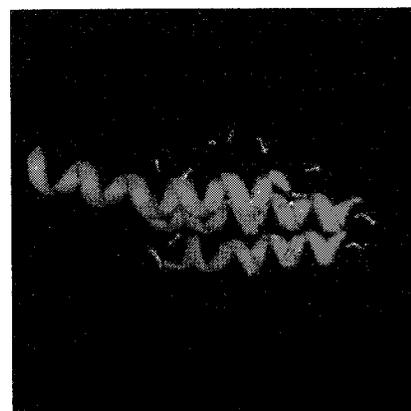


Figure 5 : Structure de l'alaméthicine déterminée par cristallographie²⁸

1.2.5 La pardaxine

Un bon nombre de peptides hélicoïdaux lytiques ont été isolés à partir de différentes espèces de poissons comme, par exemple, la pardaxine³³. La pardaxine est une toxine présente dans les sécrétions de la sole Moses rouge des mers *Pardachirus marmoratus*³⁴. Ce peptide est composé de 33 acides aminés. Il possède deux segments hélicoïdaux, l'un hydrophobe et l'autre amphiphile, séparés par une proline en position 13. Il possède une activité efficace envers les bactéries Gram-négatives et Gram-positives et une activité hémolytique restreinte⁴. Pour déterminer les éléments structuraux nécessaires à l'activité antibactérienne et hémolytique, Shai et collaborateurs ont synthétisés plusieurs analogues³⁵. Premièrement, un analogue possédant 10 acides aminés en moins au C-terminal possède une activité hémolytique extrêmement réduite. Cette étude a aussi démontré que la queue au C-terminal est responsable de la non-sélectivité envers les érythrocytes et les bactéries. De plus, l'addition d'une charge positive au N-terminal a comme effet d'augmenter significativement l'activité antibactérienne et d'abolir l'activité hémolytique. L'introduction d'un acide aminé diastéréomérique, comme dans le cas de la mélittine, génère des analogues de la pardaxine sélectifs aux bactéries³⁶. En somme, l'activité hémolytique peut être réduite en diminuant la propension du peptide à former une structure en hélice α et en augmentant la charge à des endroits stratégiques. Finalement, l'élimination de la proline induit une activité hémolytique importante³⁷. Ce résultat suggère que le motif structural hélice-proline-hélice joue un rôle clef en ce qui concerne l'activité biologique.

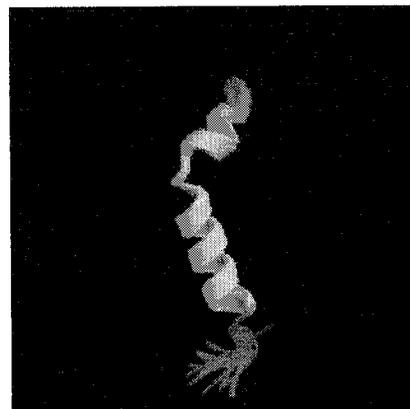


Figure 6 : Structure et orientation de la pardaxine déterminée par RMN dans une membrane³³

Il existe une très grande quantité de peptides naturels possédant différentes structures chimiques et différentes conformations ayant des propriétés lytiques envers les membranes. Toutefois, ces nanostructures ont plusieurs propriétés en commun. Il y a aujourd'hui un bon nombre d'études systématiques sur l'effet des propriétés structurales et physiques envers l'activité biologique. Ces études, basées sur des peptides naturels, sont

primordiales car elles permettent le design rationnel de nouvelles nanostructures peptidiques possédant un caractère inédit. De plus, les scientifiques ont recours à la peptidomimétique, c'est-à-dire qu'il est maintenant possible d'incorporer, dans la séquence peptidique, des composés possédant des éléments stéréochimiques des protéines mais qui ne miment que leurs structures. Ainsi, l'exploitation de ces motifs vient souvent contrecarrer les propriétés pharmacocinétiques et métaboliques décevantes des peptides. Plusieurs chimistes ont tenté de créer de nouvelles molécules, inspirées de la nature, réunissant les caractéristiques nécessaires à l'élimination des cellules ou organismes non désirés comme, par exemple, les cellules cancéreuses ou les bactéries.

1.3 Les origines de la nanochimiothérapie

La nanotechnologie et les nanosciences concernent l'étude, la synthèse, la manipulation, la caractérisation et l'utilisation de composés de dimension nanométrique, c'est-à-dire d'un milliardième de mètre, plus précisément entre 1 et 100 nanomètres³⁸. L'intérêt pour ce type de composés origine du fait que les propriétés physiques qui découlent de ces structures sont radicalement différentes à l'échelle nanométrique. Il existe plusieurs domaines et de plus en plus d'exemples d'applications des nanotechnologies. Dans l'industrie pharmaceutique, des biotechnologies et des soins de santé, de plus en plus d'efforts sont investis dans la nanochimiothérapie c'est-à-dire le développement de nouveaux médicaments basés sur des nanostructures, peptidiques par exemple, et des systèmes de diffusion des médicaments qui ciblent des emplacements prédéterminés dans le corps. Plusieurs groupes de recherches à travers le monde tentent de mettre au point des nanomolécules pouvant intervenir dans diverses maladies. Les nanostructures peptidiques sont des candidats idéaux car ils possèdent des propriétés fondamentales très intéressantes. Aujourd'hui, plusieurs peptides lytiques synthétiques sont décrits dans la littérature.

1.3.1 Les peptides lytiques synthétiques perturbateurs membranaires

Une des stratégies les plus communes pour l'obtention de peptides lytiques est la synthèse d'analogues de peptides naturels. Pour outrepasser la stabilité médiocre et augmenter la sélectivité, plusieurs méthodes sont utilisées comme : l'utilisation de séquences plus courtes ou plus longues, l'incorporation ou le remplacement d'acides aminés D dans la séquence, la modification du squelette, la cyclisation et l'ajout d'acides aminés non naturels. Par la suite, il s'avère possible de faire la corrélation entre la structure et l'activité des composés synthétisés et ainsi déterminer les facteurs influençant l'activité. Une des séries de composés les plus étudiées est sans doute celle de la cécropine A (CA), de la cécropine B (CB) et ses analogues. Par exemple, Chen et *coll.* ont synthétisé deux analogues de celle-ci : CB-1 et CB-2³⁹. CB-1 a été construit en remplaçant le segment C-terminal (résidus 26 à 35) par le segment N-terminal de la cécropine (résidus 1 à 10). Le second analogue, CB-2, est semblable mise à part l'insertion des résidus Gly-Pro entre la Pro-24 et l'Ala-25. La puissance de ces analogues envers certaines bactéries est diminuée de 2 à 4 fois par rapport à la cécropine en se basant sur les mesures de concentration létale (CL). Par contre, la puissance de CB-1 et de CB-2 est de 2 à 3 fois inférieures à celle de la cécropine naturelle en se basant sur les IC₅₀.

Tableau 1 : Activité antibactérienne (IC₅₀) des analogues de la cécropine

Peptide	Séquence	Concentration létale à 50% (μM)		
		<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. Coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
CA	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGP--AVAVVGOATQIAK	0,33 ± 0,021	0,45 ± 0,022	1,43 ± 0,004
CB	KWKLFKKIEKMGRNIRNGIVKAGP--AIAVLGEAKAL	0,26 ± 0,012	0,36 ± 0,003	0,46 ± 0,022
CB-1	KWKLFKKIEKMGRNIRNGIVKAGP--KWKLFKKIEK	0,39 ± 0,015	0,49 ± 0,002	1,48 ± 0,0021
CB-2	KWKLFKKIEKMGRNIRNGIVKAGPGPKWKLFKKIEK	0,36 ± 0,003	0,49 ± 0,002	1,51 ± 0,008

Tableau 2 : Activité anticancéreuse des analogues de la cécropine *

Peptide	Séquence	IC ₅₀ (µM)		
		HL-60	K-562	E6-1
CB	<u>KWKL</u> FKKIEKMGRNIRNGIVKAGP--AIAVLGEAKAL	14,1 ± 1,3	17,6 ± 1,7	8,0 ± 0,4
CB-1	KWKL <u>F</u> KKIEKMGRNIRNGIVKAGP-- <u>KWKL</u> FKKIEK	7,5 ± 0,5	10,2 ± 0,7	2,4 ± 0,3
CB-2	KWKL <u>F</u> KKIEKMGRNIRNGIVKAGP <u>G</u> PKWKL <u>F</u> KKIEK	9,2 ± 0,8	11,1 ± 1,5	3,1 ± 0,3

* Les changements dans chaque séquence sont soulignés. HL-60, K-562-, E6-1 = Lignées cellulaires leucémiques

Ensuite, des études plus approfondies ont été effectuées par la compagnie Magainin Pharmaceutical Inc. sur la relation structure-activité de la magainine-2 (M2) et de ses analogues⁴⁰. Dans ce cas, plusieurs acides aminés ont été remplacés dans le but de déterminer les caractéristiques nécessaires à l'obtention d'une activité antimicrobienne maximale. Trois conclusions peuvent ressortir de cette étude : stabiliser l'hélice α , augmenter l'amphiphilicité et augmenter la charge nette positive sont les règles à suivre afin de décrocher de faibles valeurs de MIC (concentration minimale inhibitrice).

Tableau 3 : Activité antibactérienne des analogues de la magainine-2

Peptide	Séquence ^{1,2}	Activité : MIC (µg/mL)		
		<i>E. Coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. Aureus</i>
M2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	6,3	N/A	25
MSI-235	GIGKFLHSAKKFGKAFV <u>K</u> -IMNS-NH ₂	8	32	64
MSI-93	GIGKFLKSAKKFGKAFV <u>K</u> -IMNS-NH ₂	4	8	16
MSI-94	GIGKFL <u>KK</u> AKKFGKAFV <u>K</u> -IMNS-NH ₂	8	8	8
MSI-99	GIGKFL <u>KK</u> AKKFGKAFV <u>K</u> - <u>IL</u> NS-NH ₂	4	8	8
MSI-78	GIGKFL <u>KK</u> AKKFGKAFVG- <u>IL</u> <u>KK</u> -NH ₂	4	4	4

1) Les acides aminés cationiques sont en **gras**. 2) Les acides aminés ajoutés sont soulignés

Ensuite, la synthèse de nanostructures peptidiques hybrides permet de tirer profit des deux composés en conservant les caractéristiques intéressantes de chacun d'eux. Merrifield et *coll.* fut l'un des premiers groupes de recherche à utiliser cette stratégie. Basés sur la structure des peptides hémolytiques, cinq peptides composés de 15 à 25 acides aminés ont été synthétisés, lesquels sont des hybrides entre la mélittine et la cécropine⁴¹.

Tableau 4 : Concentration létale pour divers hybrides de la cécropine A(CA) et la mélittine(ME)

Peptide	Séquence ^{1,2}	Concentration létale (µM)		
		<i>E. Coli</i>	<i>S. Auréus</i>	Érythrocytes
CA	<u>KWKLFFKKIEKVG</u> --NIRDGIIKAGP-- <u>AVAVVGQATQIAK</u>	0,2	> 200	> 200
ME	GIGAVLKVLTTGL--PA--LISWIKRKRQO	0,8	0,2	4 – 8
CA(1-24)-ME(1-13)	<u>KWKLFFKKIEKV</u> --NIRDGIIKAGP-- GIGAVLKVLTTGL	0,3	6	> 200
CA(1-13)-ME(1-13)	<u>KWKLFFKKIEKVG</u> --GIGAVLKVLTTGL	0,5	2	> 200
CA(25-37)-ME(1-13)	<u>AVAVVGQATQIAK</u> -- GIGAVLKVLTTGL	> 200	> 300	> 200
ME(1-13)-CA(1-13)	GIGAVLKVLTTGL-- <u>KWKLFFKKIEKVG</u>	1	5	> 200
ME(16-26)-CA(1-13)	LISWIKRKRQO-- <u>KWKLFFKKIEKVG</u>	0,7	10	> 200

1) Séquence provenant de la cécropine A : soulignée, 2) Séquence provenant de la mélittine : *Italique*

Les résultats obtenus sont, de plus, remarquables. Le meilleur composé soit cécropine A (1 à 13) mélittine (1 à 13) est 100 fois plus actif envers *Staphylococcus aureus* que la cécropine A seule. Enfin, à faibles concentrations, les érythrocytes sont lysés par la mélittine, mais non par les composés hybrides.

Plus récemment, Kim et collaborateurs ont poussé leur recherche encore plus loin⁴². Après avoir synthétisé des hybrides de la cécropine A – magainine-2, ils ont construit et investigué une série d'analogues du meilleur candidat, le P18(A-10). Les résultats obtenus envers les cellules tumorales pour quelques composés démontrent l'efficacité de la méthode. Les analogues N-3L et N-4L sont des antitumoraux potentiels envers les cellules cancéreuses humaines et ce, avec peu ou sans toxicité envers les cellules normales.

Tableau 5 : Concentration létale pour divers analogues hybrides de la cécropine A (CA) et de la magainine (MA)

Peptide	Séquence*	Concentration létale : IC ₅₀ (µM)		
		MDA-MB-361	Jurkat	Cellules normales
P18	KWKFKKIPKFLHLAKKF	8,0	9,0	75,0
N-4	-W-FKKIPKFLHLAKKF	32,0	23,0	24,0
N-3L	KWKFKKIPKFLHL-KKF	5,0	4,0	50,0
N-4L	-WKFKKIPKFLHL-KKF	5,0	6,0	50,0
C-1	KWKFKKIP-FLHLAKKF	26,0	32,0	100
C-9	KWKFKKIP-----KKF	> 100	> 100	> 100

* Les acides aminés manquants sont représentés par : -

Récemment, plusieurs publications rapportent l'activité lytique d'oligomères d'acides aminés β ⁴³. Il existe deux avantages dans l'utilisation de peptides β en nanochimiothérapie. Premièrement, le squelette particulier conçu à partir d'acides aminés non-naturels confère une résistance face aux enzymes protéolytiques. Deuxièmement, les peptides β construits à l'aide de résidus soigneusement sélectionnés démontrent une stabilité conformationnelle accrue grâce aux liens amides pouvant former des liaisons hydrogènes intramoléculaires⁴⁰. En premier lieu, De Grado et collaborateurs ont synthétisé une première série de peptides β formés par trois acides aminés se répétant de 2 à 6 fois (voir Figure 7) : la β -leucine, la β -valine et la β -lysine. Ces nanostructures ont démontré une très forte activité antibactérienne et hémolytique. La seconde série a été préparée en remplaçant le résidu β -leucine ou β -valine, par une β -alanine qui est moins hydrophobe. Les peptides résultants démontrent une activité et une sélectivité comparables aux peptides antimicrobiens naturels comme la magainine.

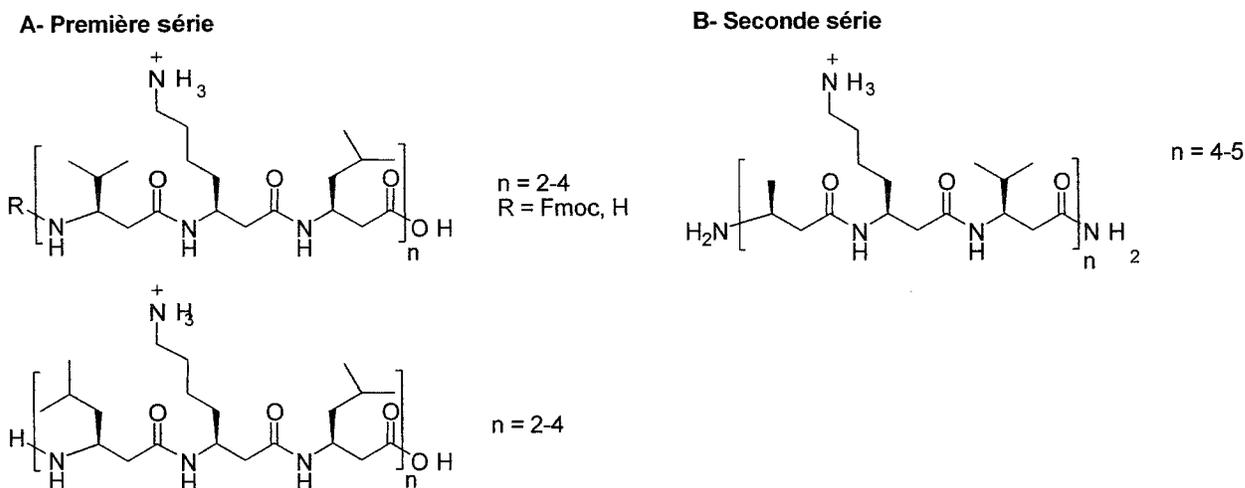


Figure 7 : Peptides de DeGrado : **A-** Première série, **B-** seconde série⁴²

En 2000, Gellman et collaborateurs, ont développé une série de peptides β à partir d'acides aminés cycliques⁴⁴. Ceux-ci contiennent des résidus chargés positivement et hydrophobes, conçus pour se faire face lors de l'adoption de la structure tertiaire. La structure ainsi obtenue est donc amphiphile comme celle de la plupart des peptides naturels. Ces peptides β s'avèrent donc très sélectifs envers les bactéries et démontrent une activité lytique minimale envers les érythrocytes.

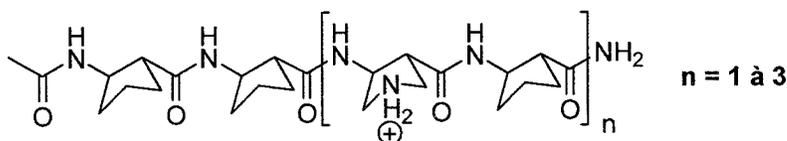


Figure 8 : Peptides β de Gellman⁴⁰

Basé sur les connaissances acquises lors des études de relation entre la structure et l'activité biologique, quelques groupes de recherche ont mis au point des peptides lytiques simples. Dans plusieurs cas, leur séquence est constituée de deux ou trois acides aminés différents et n'excède pas les 30 résidus en longueur. Par exemple, Dufourcq et collaborateurs, ont synthétisé des peptides amphiphiles ayant L_iK_j (avec $i = 2j$) comme composition⁴⁵. Des études d'hémolyse et de lyse de vésicules ont été effectuées avec des

peptides de longueur variant entre 5 et 22 résidus. Leurs séquences sont conçues pour générer des hélices α amphiphiles idéales. Tous les peptides se sont avérés cytotoxiques. Les peptides les plus longs sont plus actifs envers les érythrocytes que la membrane naturelle. Selon les auteurs, la charge positive nette, le caractère amphiphile, l'hydrophobicité et la taille sont des facteurs importants pour le design de ce type de composés.

Tableau 6 : Concentration létale sur les érythrocytes et efficacité intrinsèque envers les liposomes des peptides modèles Dns(L_iK_j) avec $i = 2j$

Peptide	Séquence ²	Liposomes (EPC/Chol) C ₅₀ (μM) ¹	Érythrocytes Dose létale DL ₅₀ (μM)
DnsLK ₅ -NH ₂	Dns-KLLK-CONH ₂	39	90
DnsLK ₈	Dns-KLLKLLK	0,95	8,5
DnsLK ₁₂	Dns-KLLKLLKLLK	0,11	2,5
DnsLK ₁₅	Dns-KLLKLLKLLKLLK	0,023	0,35
DnsLK ₁₈	Dns-KLLKLLKLLKLLKLLK	0,125	0,65
DnsLK ₂₂	Dns-KLLKLLKLLKLLKLLKLLK	0,023	0,30

¹C₅₀ = Concentration de peptide qui provoque la lyse de 50% de liposomes

²Dns = Groupe dansyle

Les peptides cycliques α , composés d'acides aminés D et L, sont une classe de nanostructures très intéressante car ils sont stables envers les enzymes protéolytiques, sont facilement synthétisables et possèdent une masse moléculaire relativement faible. Ghadiri et collaborateurs rapportent en 2001 la synthèse de peptides cycliques α , composés d'acides aminés D et L, capable de s'auto-assembler dans les membranes bactériennes spécifiquement⁴⁶. Ceux-ci exercent leur activité antibactérienne en augmentant la perméabilité membranaire par la formation de nanotube (Figure 9). Leur structure est stabilisée par la formation de nombreuses liaisons hydrogène intermoléculaires. Ces peptides cycliques amphiphiles sont composés de six à huit résidus et agissent préférentiellement sur les bactéries.

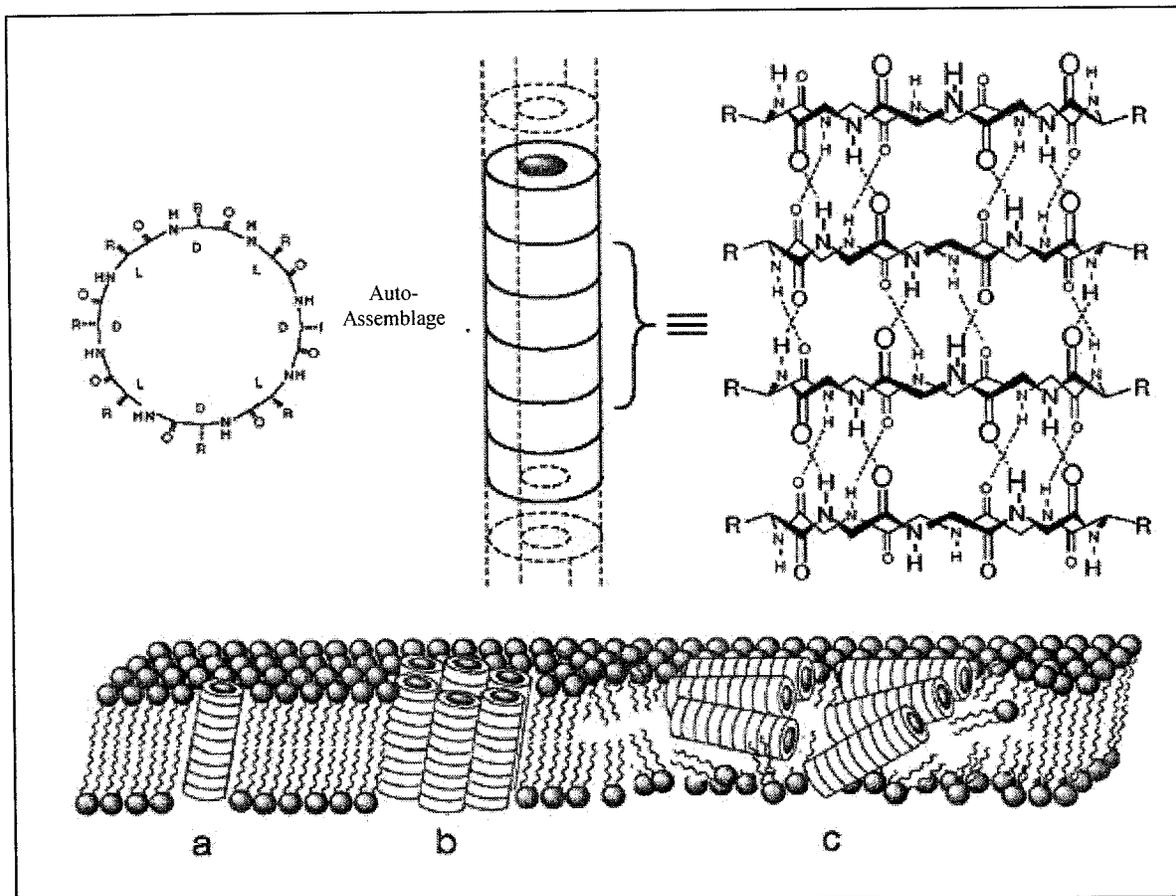


Figure 9 : L'auto-assemblage et les modes possibles de perméabilisation membranaire des nanotubes peptidiques de Ghadiri : a) monopore intramoléculaire, b) mode "barrel stave", c) mode "carpet-like"⁴⁶

Tableau 7 : Activité antibactérienne et hémolytique des peptides α cycliques D,L

Peptide	Séquence ²	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		Érythrocytes HD ₅₀ ¹ ($\mu\text{g/mL}$)
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	
A	(<u>K</u> QRWLWLW)	6	80	45
B	(K <u>S</u> RWLWLW)	5	40	100
C	(<u>K</u> KKWLWLW)	8	70	50
D	(<u>R</u> RRWLWLW)	6	15	50
E	(<u>K</u> KLWLW)	10	17	80

1 HD₅₀ = Dose provoquant la mort à 50% de la population (hémolyse)

2 Les acides aminés D sont soulignés

Les peptides lytiques perturbateurs membranaires sont abondants dans la nature et sont utiles comme moyen de défense pour les insectes, les vertébrés et invertébrés, et les humains. Initialement, ces peptides ont attiré l'attention en raison de leur activité antimicrobienne. Ce n'est que plus tard que l'on a découvert une sensibilité envers les cellules cancéreuses. Un bon nombre de peptides lytiques ont été synthétisés pour optimiser leurs propriétés antitumorales et améliorer leurs propriétés thérapeutiques.

1.4 Les peptides lytiques perturbateurs membranaires pour le traitement du cancer

Un avantage d'utiliser des nanostructures peptidiques dans le traitement contre le cancer est, sans aucun doute, la très faible possibilité de résistance. Les peptides lytiques agissent sur les membranes des cellules cancéreuses et sont capables de contourner la résistance multi-drogue⁴⁷. Le phénotype de la résistance multi-drogue (MDR) est lié à la présence dans la membrane cellulaire d'une glycoprotéine, la GP170⁴⁸. Elle fonctionne comme une pompe ATP-dépendante qui augmente l'efflux de la drogue hors de la cellule. La résistance passe donc par une diminution de la quantité intracellulaire de drogue. La chimiothérapie anticancéreuse basée sur des agents alkylants, antimétabolites et des produits naturels n'est plus aussi efficace. La plupart des agents chimiothérapeutiques affectent aussi les cellules saines, et conséquemment causent des effets secondaires indésirables. Ceci requiert donc d'urgence le développement de nouveaux agents anticancéreux possédant un mécanisme d'action inédit, sans possibilité de résistance, pouvant cibler sélectivement les mauvaises cellules. Les nanostructures peptides sont des candidats idéaux car ils possèdent plusieurs caractéristiques essentielles pour le traitement du cancer.

Comprendre la relation entre la structure et la fonction des peptides lytiques permet le design d'analogues possédant des applications thérapeutiques, une activité accrue envers les cellules tumorales ou bactériennes et une activité cytolitique faible envers les cellules normales. Plusieurs peptides naturels comme la cécropine et la magainine sont sélectifs. Ils se lient et détruisent les bactéries et les cellules tumorales sans affecter les cellules de

mammifères normales. Au contraire, la méliittine est un peptide lytique non-sélectif qui démontre une forte activité hémolytique, bactériolytique et tumorilytique.

Plusieurs aspects peuvent toutefois être exploités dans le design d'agents antitumoraux comme par exemple, la composition de la membrane cellulaire tumorale versus celle normale. Ensuite, pour augmenter la sélectivité, le peptide lytique peut être lié à une hormone ou à d'autres types de ligands. Cette approche augmente la spécificité en s'attaquant majoritairement aux cellules cancéreuses exprimant des récepteurs fonctionnels à cette hormone. Un bon nombre de cancers comme le cancer du sein, de la prostate, des ovaires et des testicules expriment des récepteurs à de telles hormones. De plus, ces récepteurs peuvent être sur-exprimés par un traitement avec d'autres hormones. L'approche que nous comptons utiliser pour le ciblage des cellules cancéreuses est l'utilisation de pro-drogues peptidiques.

1.4.1 Cibler les cellules cancéreuses à l'aide de pro-drogues

La stratégie «pro-drogue» est employée de plus en plus en chimie thérapeutique. Elle constitue une alternative efficace pour améliorer certaines propriétés pharmacologiques. Plusieurs raisons mènent à l'utilisation de cette stratégie :

- Augmentation de la solubilité
- Modification de l'absorption et de la distribution
- Obtention d'une stabilité chimique ou métabolique accrue
- Obtention d'une action prolongée du médicament
- Inhibition ou diminution de la toxicité
- Acceptabilité du médicament par la modification de l'odeur ou du goût
- Changement au niveau de l'état du médicament (gazeux à solide par exemple)

Dans notre cas, nous voulons utiliser l'approche de «pro-drogue» pour la conversion d'un agent nanochimiothérapeutique non-toxique en une molécule toxique par l'entremise d'une biotransformation enzymatique comme le démontre la Figure 10. Dans le présent

ouvrage, le système modèle que nous comptons utiliser est celui de la PSMA c'est-à-dire la « Prostate-specific Membrane Antigen ».

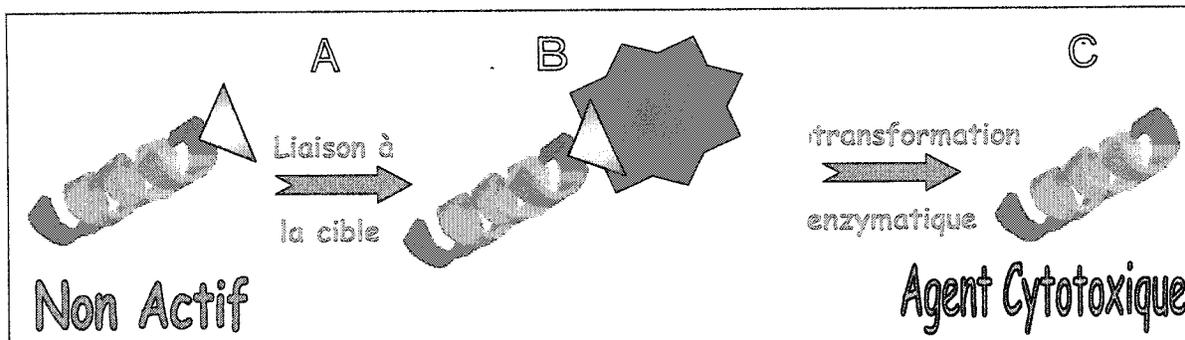


Figure 10 : Concept de «pro-drogue» : A- L'agent thérapeutique non actif se lie à sa cible biologique, B- Il subit une transformation enzymatique, C- L'agent cytotoxique est libéré dans l'environnement de la cellule à être éliminée.

1.5 L'antigène membranaire spécifique à la prostate , la PSMA

Le cancer de la prostate est la forme de cancer la plus diagnostiquée chez les Canadiens. En 2004, au Canada, on estime à 3200 le nombre d'hommes qui recevront un diagnostic de cancer de la prostate et à 900 le nombre de ceux qui en mourront⁴⁹. Par contre, depuis la découverte de la PSMA en 1987 par Horoszewicz et collaborateurs, la recherche sur le cancer de la prostate ne cesse d'avancer⁵⁰. La PSMA est une glycoprotéine transmembranaire de types II possédant une masse moléculaire d'environ 100 kDa. Elle fait partie de la famille des métallocarboxypeptidases et a comme co-facteur le zinc⁵¹. Elle a été isolée pour la première fois, à partir d'une lignée de cellules cancéreuses de la prostate : les LNCaP (Lymphatic Node Cancer Prostate). La PSMA possède trois domaines principaux, un domaine intracellulaire A (acides aminés 1 à

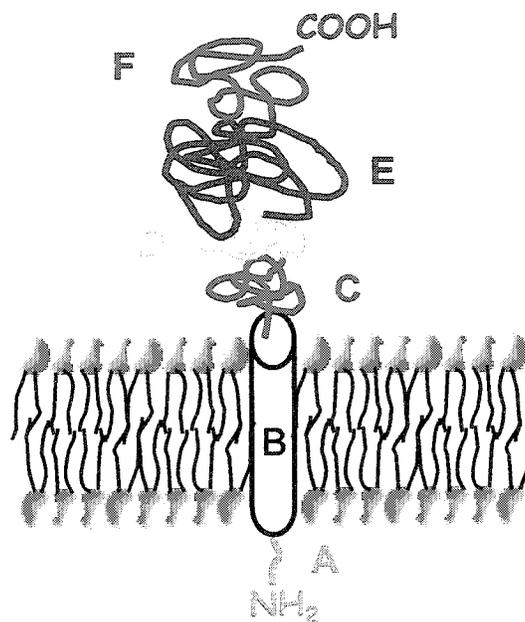


Figure 11 : Nature de la PSMA. A- Domaine intracellulaire, B- Domaine transmembranaire, C, D, E, F- sous-domaines extracellulaires

18), un domaine transmembranaire B (acides aminés 19 à 43) et un large domaine extracellulaire (acides aminés 44 à 750) (Figure 11). Ce dernier domaine est, en fait, constitué de quatre sous-domaines : C, D, E, F. Une des caractéristiques importantes de la PSMA est que son domaine catalytique est extracellulaire, il se situe au niveau du sous-domaine E⁵².

1.5.1 Activité catalytique et expression de la PSMA

La PSMA possède deux fonctions catalytiques (Figure 12). Premièrement, la PSMA est dotée d'une activité protéasique de type ptéroylpoly- γ -glutamate carboxypeptidase (folate hydrolase), découvert initialement dans les cellules LNCaP. Pinto *et* collaborateurs ont démontré que la PSMA possède l'habileté d'hydrolyser progressivement la liaison peptidique terminale gamma-glutamate à partir du ptéroylpoly- γ -glutamate et du méthotrexate poly- γ -glutamate⁵³. Deuxièmement, Carter *et* collaborateurs ont démontré que la PSMA est une enzyme possédant une activité de NAALADase (*N*-acetylated *alpha*-linked acidic dipeptidase)⁵⁴. Elle peut hydrolyser les liaisons α -aspartyle du *N*-acétylaspartyl-glutamate (Ac-Asp-Glu). Ac-Asp-Glu est un neuropeptide important impliqué dans la transmission de l'influx nerveux.

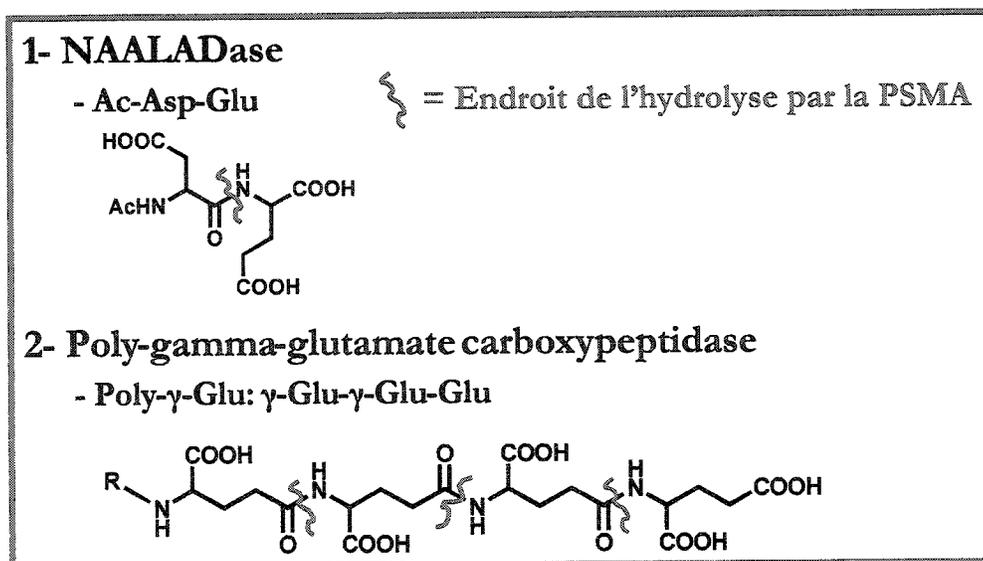


Figure 12 : Fonctions catalytiques de l'Antigène Membranaire Spécifique à la Prostate (PSMA)

Par ailleurs, des études d'immunohistochimie en utilisant l'anticorps monoclonal 7E11 ont démontré que la PSMA est sur-exprimée (plus de 100 fois dans certains cas) par les cellules cancéreuses prostatiques (LNCaP) ainsi que par d'autres tissus prostatiques cancéreux⁵⁵. De plus, en cas de résistances des cellules cancéreuses au traitement androgène-suppresseur, les concentrations deviennent très élevées⁵⁶. La PSMA a aussi été détectée dans plusieurs types d'autres tumeurs comme le colon, les reins, le pancréas, le cerveau, les testicules, les poumons⁵⁷ mais non dans les tissus normaux⁵⁸.

1.6 Conclusion

Les protéines et les peptides sont présents en très grande quantité dans les organismes vivants. Parmi ceux-ci, les peptides lytiques perturbateurs membranaires sont des constituants de plusieurs vertébrés et invertébrés et constituent une première ligne de défense efficace contre certains organismes envahisseurs. De nombreuses études ont été effectuées afin de comprendre la relation entre la structure et l'activité de ces composés. Ces recherches permettront, entre autres, de développer de nouveaux agents médicaux possédant des modes d'action inédits.

L'utilisation de nanostructures peptidiques pour le traitement du cancer combiné à la stratégie «pro-drogue» semble une voie avant-gardiste pour le traitement du cancer. Le système PSMA est un modèle idéal pour tester cette approche. La PSMA possède un excellent potentiel thérapeutique car elle est une protéine transmembranaire ayant un large domaine catalytique extracellulaire. De plus, ses fonctions catalytiques et sa sur-expression dans les cellules cancéreuses en font une cible de choix pour la stratégie pro-drogue.

CHAPITRE 2 :

RÉSULTATS ANTÉRIEURS

2.1 Préambule

À la lumière de l'abondante littérature publiée jusqu'à ce jour, plusieurs caractéristiques sont communes aux peptides lytiques membranaires linéaires : une charge nette positive, une structure amphiphile en hélice α et une longueur adéquate. L'augmentation de la perméabilité membranaire est directement liée à l'augmentation de la charge nette positive des peptides comme la mélittine et la magainine⁵⁹ et à l'augmentation de l'hélicité pour la magainine⁶⁰ et la cécropine⁶¹. De plus, dans plusieurs études récentes, l'hydrophobicité totale et le moment hydrophobe de l'hélice amphiphile ont été reconnus comme étant la base pour la modification de l'activité membranaire⁶². Finalement, les hélices amphiphiles qui exposent une face non-polaire large et une face polaire étroite sont de bons perturbateurs membranaires⁶³. Pour ce qui est de la longueur, plusieurs peptides aussi courts que 13 acides aminés démontrent des propriétés lytiques très élevées⁶⁴. Plusieurs études basées sur les analogues des peptides lytiques naturels ont été effectuées pour déterminer la relation entre la structure et l'activité biologique. Cependant, très peu d'approches systématiques en utilisant la peptidomimétisme sont décrites.

Dans un vaste projet de recherche concernant la synthèse de nanostructures peptidiques fonctionnelles, le groupe Voyer a mis au point une famille de peptides neutres possédant des propriétés lytiques⁶⁵.

2.2 Activité lytique des peptides modifiés avec des éthers couronnes

Plusieurs avantages offrent l'utilisation d'acides aminés dans la synthèse de nanostructures fonctionnelles. Suivant la nature de leur chaîne latérale, les acides aminés offrent une gamme de caractéristiques comme la charge et la polarité. De plus, il est possible de prédire la conformation des peptides formés en solution et l'orientation spatiale

des groupements fonctionnels des chaînes latérales. Pour l'étude de la relation entre la structure et l'activité lytique, le choix s'est arrêté sur des nanostructures peptidiques de 7 (heptamères), 14 (14-mères) et 21 (21-mères) acides aminés. Ceux-ci sont constitués de L-leucines, reconnus pour sa forte hydrophobicité⁶⁶ et pour sa forte propension à induire une hélice α ⁶⁷, et de L-phénylalanine modifiée chimiquement par des éthers couronne. Ce dernier se situe aux positions 2 et 6 dans le segment heptapeptidique, donc aux positions 2, 6, 9 et 13 dans le 14-mère et aux positions 2, 6, 9, 13, 16 et 20 dans le 21-mère comme le démontre la Figure 13. Les positions stratégiques de ces éthers couronne permettent l'amphiphilicité des structures peptidiques lors de l'adoption de la conformation en hélice α .

Deux types d'éthers couronne ont été choisis, soit les éthers 21-couronne-7 et 15-couronne-5. Il a été démontré que ces peptides adoptent une conformation en hélice α . Lors de l'adoption de celle-ci, ils deviennent amphiphiles c'est-à-dire qu'ils présentent une face hydrophile et une face hydrophobe. Enfin, cette famille de nanostructures peptidiques est non chargée comparativement à tous les autres peptides lytiques connus.

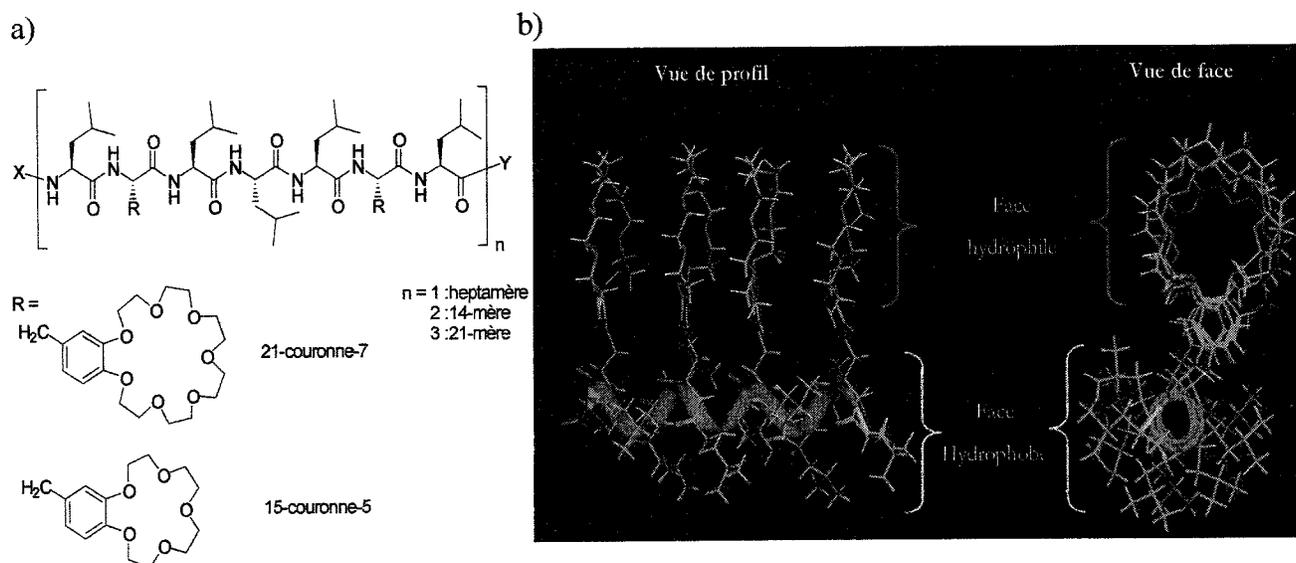


Figure 13 : Nanostructures peptidiques : a) Structure et séquence b) Amphiphilicité du 14-mère

2.2.1 Effet de la longueur des peptides sur l'activité lytique⁶³

Premièrement, la perméabilité induite sur les vésicules chargées de calcéine par trois peptides portant l'éther 27-couronne-7 a été déterminée, soit le 7-mère 1, le 14-mère 2

et le 21-mère 3, a été investiguée. Ceux-ci possèdent différentes longueurs de l'ordre du nanomètre (voir Figure 14). Indépendamment du type de vésicules utilisées, neutres ou anioniques, les peptides 7-mère 1 et 21-mère 3 perméabilisent très peu les vésicules tandis que le peptide 14-mère 2 produit une fuite importante de calcéïne (75 %) comparativement au Triton X (100%)⁶³.

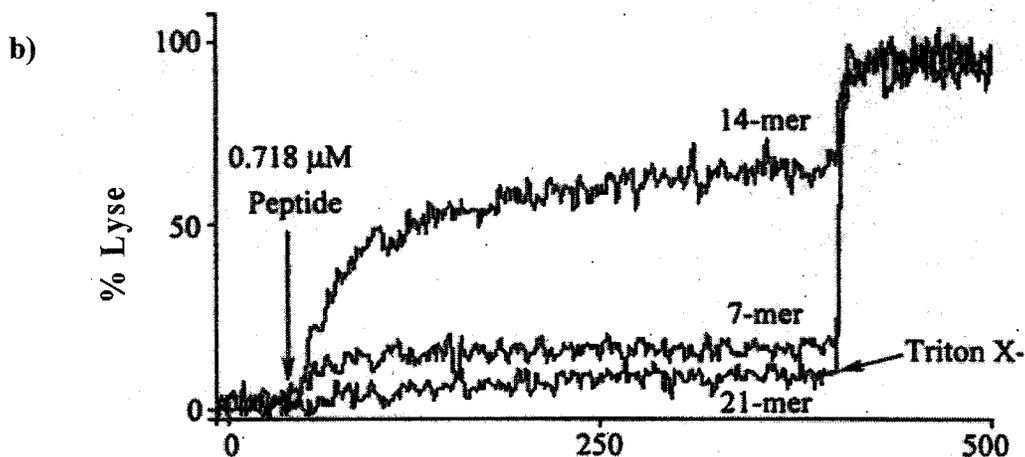
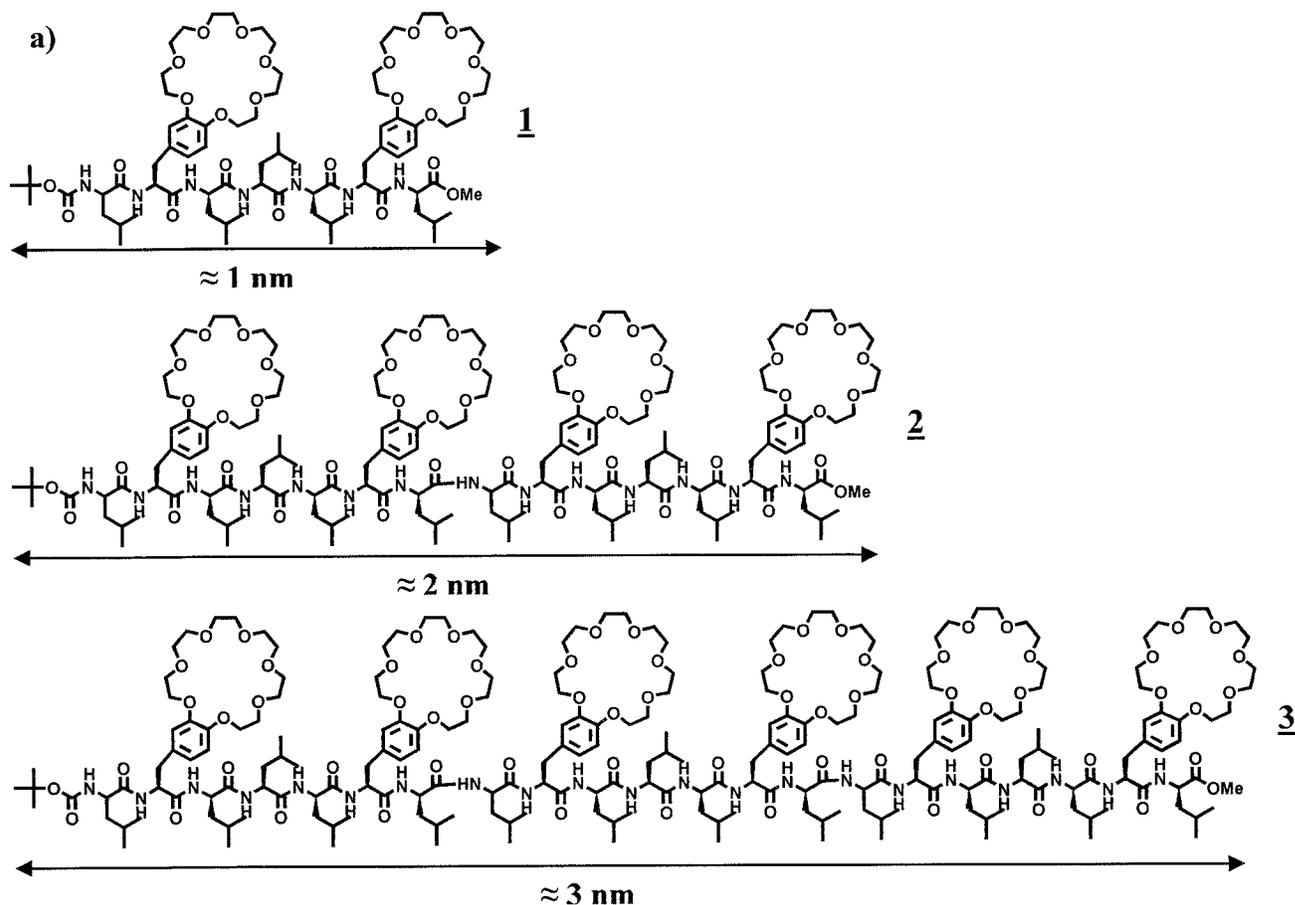
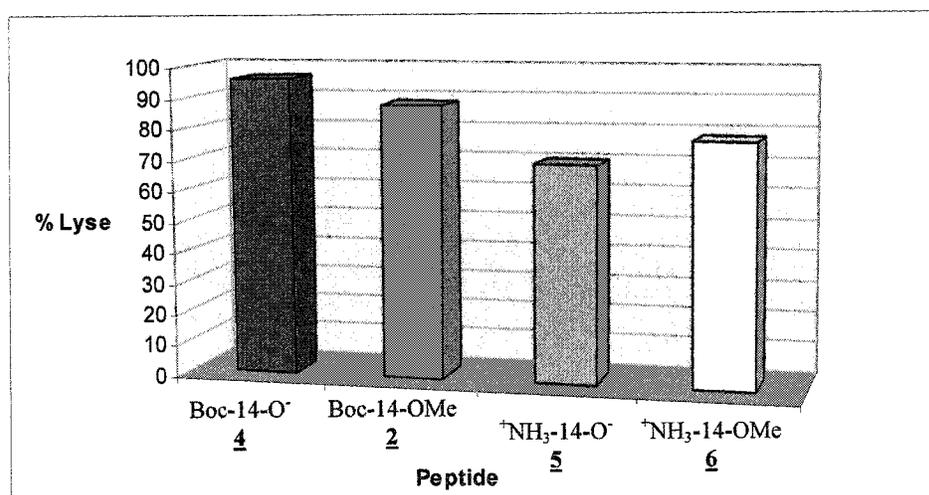


Figure 14 : a) Structure des peptides 7-mère 1, 14-mère 2, 21-mère 3
b) Activité lytique des nanostructures peptidique 1 à 3⁶³

2.2.2 Effet de la polarité des extrémités⁶³

Les résultats précédents ont été obtenus avec des peptides protégés au *N*-terminal par un groupement *tert*-butoxycarbonyl (Boc) et au *C*-terminal par un ester méthylique (OMe). Cependant, plusieurs tests de perméabilité membranaire ont été effectués afin de déterminer l'effet de la polarité des extrémités du 14-mère 2 sur l'activité lytique. Le peptide protégé au *N*-terminal 4 démontre une activité lytique la plus importante ($\approx 95\%$) suivie de près par celui protégé aux deux extrémités 2 ($\approx 90\%$). La déprotection des deux extrémités génère un peptide zwitterionique 5 qui résulte en une diminution importante de la capacité du peptide 14-mère à induire la perméabilité membranaire ($\approx 65\%$). Enfin, la déprotection au *N*-terminal 6 génère une charge positive et semble induire une légère diminution de l'activité lytique.



Graphique 1 : Lyse induite par 1 μ M de peptide ayant différents états de protection sur des vésicules 100% PC d'oeuf

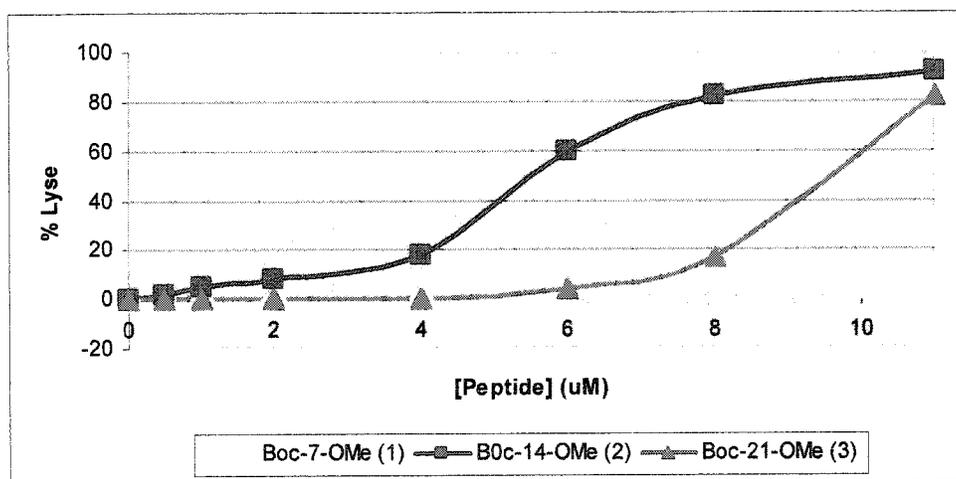
2.2.3 Effet de la taille de l'éther couronne⁶³

Pour examiner l'effet de la taille de l'éther couronne sur la perméabilité membranaire, les peptides 14-mère portant les éthers 15-couronne-5 et 21-couronne-7 ont été testés à différentes concentrations. Les résultats obtenus démontrent que la substitution des éthers 21-couronne-7 par des éthers 15-couronne-5 produit une diminution de plus de 20 fois de la lyse des vésicules de phosphatidylcholine d'oeuf (100% PC). Ceci peut être

expliqué par la diminution du caractère amphiphile des nanostructures. De plus, la perte de deux oxygènes diminue aussi l'hydrophilicité de la face polaire du peptide.

2.3 Activité envers les érythrocytes⁶³

Les résultats concluants obtenus avec les peptides amphiphiles synthétiques en ce qui concerne la lyse des membranes phospholipidiques laissent croire que ceux-ci peuvent également induire la lyse des cellules biologiques, comme par exemple les érythrocytes. Les érythrocytes sont des cellules humaines modèles. Leur lyse peut être suivie par spectroscopie visible car ils contiennent l'hémoglobine⁶⁸. L'hémolyse a donc été déterminé en fonction de la concentration des trois nanostructures peptidiques suivante : Boc-7-mère-OMe 1, Boc-14-mère-OMe 2, et Boc-21-mère-OMe 3.



Graphique 2 : Hémolyse induite par différentes concentrations de nanostructures peptidiques (EC = 21-7)

Les peptides Boc-14-mère-OMe 2, et Boc-21-mère-OMe 3 induisent une fuite importante de l'hémoglobine ($\approx 90\%$ à $11\ \mu\text{M}$) tandis que le Boc-7-mère-OMe 1 n'induit pratiquement aucune fuite aux concentrations testées. Par ailleurs, le seuil de concentration induisant la lyse est très faible, $4\ \mu\text{M}$, en ce qui concerne le Boc-14-mère-OMe 2.

2.4 Conclusion

Pour conclure, on dénote une activité lytique importante du Boc-14-mère-OMe 2 et non du Boc-21-mère-OMe 3 et du Boc-7-mère-OMe 1 envers les vésicules. Ceci démontre que la dimension nanométrique est un facteur essentiel à l'activité lytique. De plus, la taille des éthers couronne ainsi que la polarité des extrémités ont un effet important sur la perméabilité des vésicules. Il est donc possible de moduler ou même d'inhiber l'activité lytique des nanostructures peptidiques en modifiant une ou plusieurs caractéristiques. Enfin, le Boc-14-mère-OMe 6 possèdent une activité hémolytique très importante. Ces résultats démontrent la possibilité de développer de nouveaux agents médicaux ayant des modes d'action inédits à l'aide de structures moléculaires simples et définies de dimensions nanométriques.

CHAPITRE 3 :

DESIGN ET SYNTHÈSE DES COMPOSÉS CIBLES

3.1 Préambule

Il a été clairement démontré précédemment que la famille de nanostructures peptidiques composés de 14 acides aminés portant des éthers couronne de différentes tailles possèdent des propriétés lytiques envers des cellules humaines et différents types de vésicules. De plus, en variant différents facteurs, comme la polarité au *N* et/ou au *C*-terminal, il est possible de moduler l'activité de ces molécules. À la lumière des résultats obtenus, le 14-mère portant les éthers 21-couronne-7 s'avère le composé idéal pour le design et la synthèse de pro-drogues.

Par ailleurs, la PSMA demeure une cible de choix pour l'activation de pro-peptides lytiques membranaires car elles possèdent de nombreuses caractéristiques fondamentales : large domaine catalytique extracellulaire, fonctions catalytiques spécifiques et sur-expression au niveau des cellules cancéreuses prostatiques. **L'objectif global de ce projet est donc de synthétiser des analogues des nanostructures peptidiques lytiques sous forme de pro-drogues afin de cibler les cellules cancéreuses à l'aide de la PSMA.**

3.2 Objectifs spécifiques du projet

Les objectifs de ce projet de maîtrise peuvent se résumer en trois points :

- Inhiber la cytotoxicité non-spécifique des nanostructures peptidiques par l'ajout de séquence d'acides aminés glutamique et aspartique au *C* ou au *N*-terminaux.
- Étudier la relation entre la structure et l'activité des composés synthétisés à l'aide de vésicules phospholipidiques et de cellules humaines.
- Cibler et détruire spécifiquement les cellules cancéreuses prostatiques au détriment des cellules saines avec des pro-peptides en utilisant les fonctions de la PSMA : l'hydrolyse des acides glutamiques et aspartiques.

3.3 Molécules cibles

Les molécules synthétisés dans ce projet sont toutes constituées d'une portion cytolytique de 14 acides aminés auxquels sont greffées deux ou plusieurs unités de reconnaissance de types acide aspartique (Asp) et glutamique (Glu) au *N*- ou au *C*-terminal (Figure 16). Le noyau cytolytique de 14 acides aminés est obtenu par dimérisation de segments heptapeptidiques. L'heptapeptide est constitué de cinq résidus L-leucine et de deux résidus L-phénylalanine modifiés chimiquement pour porter les éthers 21-couronne-7. Ces derniers sont situés aux positions 2, 6, 9 et 13 pour permettre l'amphiphilicité de ces structures lorsqu'elles adoptent une conformation hélicoïdale reconnue comme la conformation active. Les unités de reconnaissance ou synthons sont formés de deux à quatre résidus : la L-acide aspartique (Asp), la L-acide β -aspartique (β -Asp), la L-acide Glutamique (Glu) et la L-acide γ -glutamique (γ -Glu). La lettre grecque indique quel carbone (α , β ou γ) forme la liaison peptidique avec le résidu suivant. Il est convenu que pour les résidus ne présentant pas de lettre grecque, le carboxyle α forme la liaison peptidique (voir Figure 15). L'ordre et la longueur des synthons ont été déterminés dans le but d'obtenir le plus large éventail de peptides pro-cytolytiques possible.

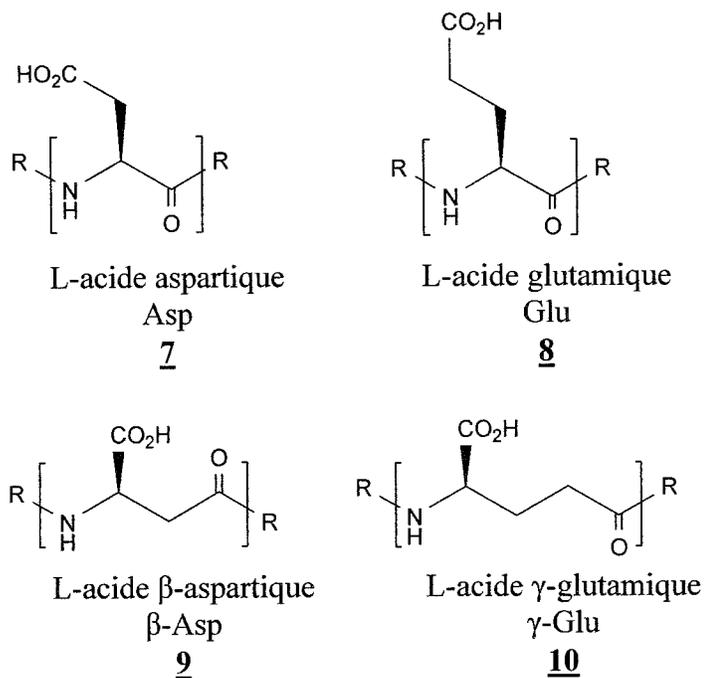
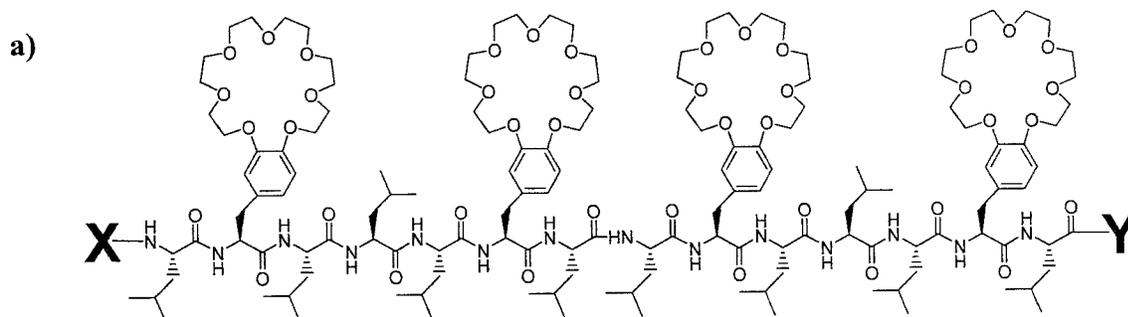


Figure 15 : Acides aminés constituant les chaînes de types Asp/Glu



b)

X (N-terminal)		Y (C-terminal)
H		OH
Boc-		-NH- <i>n</i> -Pr
γ -Glu- γ -Glu-		- γ -Glu-Glu-OH
Glu- γ -Glu-		-Glu-Glu-OH
Asp-Glu-		-Asp-Glu-OH
Asp- γ -Glu-		-Asp-Glu-OH
γ -Glu-Asp-		- γ -Glu-Asp-OH
γ -Glu- β -Asp-	Et/ou	- γ -Glu-Asp-OH
β -Asp-Glu-		- β -Asp-Glu-OH
γ -Glu-Glu-		- γ -Glu-Glu-OH
γ -Glu- β -Asp- γ -Glu-		- γ -Glu- β -Asp-Glu-OH
γ -Glu- γ -Glu-Asp-Glu-		- γ -Glu- γ -Glu-Asp-Glu-OH
Asp- γ -Glu-Asp-Glu-		-Asp- γ -Glu-Asp-Glu-OH
γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu-		- γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu-Glu-OH
γ -Glu- γ -Glu- β -Asp-Glu-		- γ -Glu- γ -Glu- β -Asp-Glu-OH
γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu-Asp-		- γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu-Asp-OH

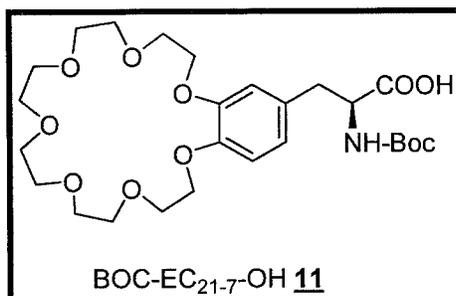
Figure 16 : Molécules cibles ; a) noyau cytolytique, b) Synthons pro-cytolytiques

3.4 Stratégie générale de synthèse

La stratégie générale de synthèse comporte quatre parties : la synthèse en solution des acides aminés portant l'éther 21-couronne-7, la synthèse sur support solide du 14-mère,

la synthèse en solution des syntons de type Asp/Glu et enfin, le couplage, le clivage et la déprotection des chaînes. Cette stratégie a été utilisée car elle comporte de nombreux avantages comme par exemple la convergence lors de la préparation des syntons. Plusieurs autres avantages seront mentionnés dans les sections suivantes.

3.4.1 Synthèse de l'acide aminé modifié avec un éther 21-couronne-7



La *N*-Boc-3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanine **11** est synthétisée à partir de la L-DOPA **12** commerciale (voir Figure 17). L'acide carboxylique de cette dernière est protégé sous forme d'ester méthylique tandis que le groupement amine est protégé sous forme de *t*-butyloxycarbamate (Boc) pour obtenir le composé **13**. Par ailleurs, le dibromure **14** est préparé par traitement de l'hexaéthylène glycol à la triphénylphosphine et au brome dans l'acétonitrile⁶⁵. Par la suite, une réaction de macrocyclisation impliquant les composés **13** et **14** permet la formation de la molécule **15** possédant l'éther 21-couronne-7. Afin de favoriser la double substitution nucléophile intramoléculaire, cette réaction s'effectue dans des conditions de haute dilution. Le milieu réactionnel doit être chauffé à 60°C pour obtenir l'énergie nécessaire à la formation du produit désiré sans toutefois provoquer la racémisation. Le carbonate de césium est utilisé comme base. De plus, l'ion césium favorise la réaction intramoléculaire par « effet template »⁶⁹. L'acide carboxylique libre **11** peut finalement être obtenu par saponification à l'aide d'hydroxyde de sodium. Une trituration avec un mélange éther de pétrole/éther permet l'obtention d'un solide blanc. Le rendement global de la synthèse s'élève à 43%.

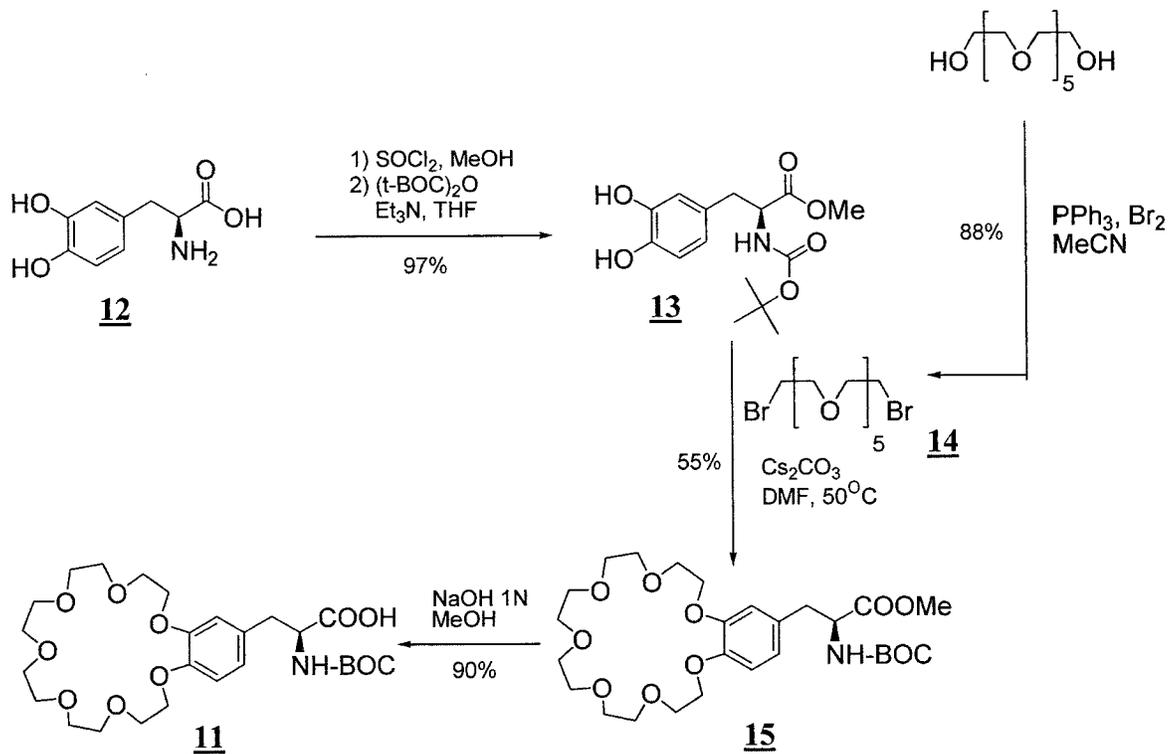
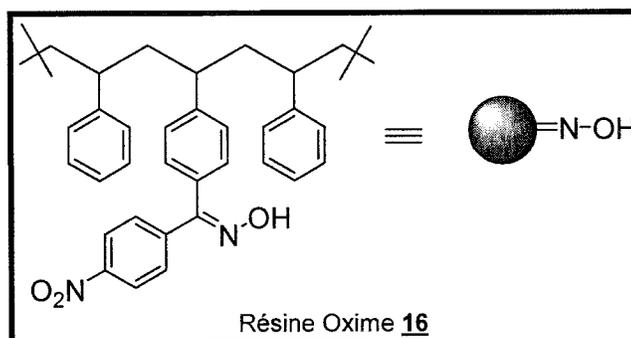


Figure 17 : Schéma de synthèse du Boc-EC₂₁₋₇-OH **11**

3.4.2 Synthèse peptidique sur support solide

La technique de synthèse sur support solide fut développée par Bruce Merrifield vers les années 1960⁷⁰. L'utilité de cette méthode pour la synthèse peptidique lui valut le prix Nobel de chimie en 1984. Depuis, la synthèse en phase solide ne cesse de se développer. Comparativement à la synthèse en solution, celle-ci se montre beaucoup plus rapide. La construction de peptide sur résine facilite considérablement les procédures habituelles car les étapes de purification et d'isolement sont simplifiées. De plus, les rendements obtenus par la technique de synthèse sur support solide s'avèrent très intéressants. Enfin, dans la plupart des cas, le support peut être régénéré après la synthèse, ce qui permet sa réutilisation. La synthèse en phase solide est désormais une méthode de choix pour le développement de nanostructures peptidiques de 5 à 40 résidus.

3.4.2.1 Préparation de la résine de Kaiser (résine oxime) **16**



Le support solide utilisé pour nos synthèses peptidiques est la résine de Kaiser **16** car elle possède plusieurs avantages⁷¹. Premièrement, elle est facilement synthétisable en laboratoire avec des rendements élevés. Deuxièmement, les coûts liés à la synthèse de la résine sont relativement faibles. Enfin, la résine oxime peut être clivée par un nucléophile dans des conditions relativement douces, ce qui permet l'introduction d'une grande diversité moléculaire au niveau du C-terminal des peptides.

La résine oxime est constituée de polystyrène réticulé par 1% de divinylbenzène. Ceci permet le gonflement de la résine en présence de solvant pour diminuer l'encombrement vers les sites réactionnels. Des groupements *p*-nitrobenzoyloxime y sont greffés de manière aléatoire. Le peptide peut donc être accroché sur la résine par le biais d'un lien ester d'oxime formé entre le support solide et le carbonyle du premier acide aminé. Ce lien est suffisamment stable pour permettre l'élongation du peptide mais peut être clivé par un nucléophile. Étant donné la stabilité de l'ester d'oxime en condition acide, ceci permet de travailler en « stratégie » Boc ; c'est-à-dire l'utilisation d'un *t*-butyloxycarbone pour la protection de l'amine. Ce groupement protecteur peut être éliminé en milieu acide fort.

En ce qui concerne la synthèse de la résine oxime, elle se prépare en deux étapes. Premièrement, une réaction de Friedel-Craft sur le polystyrène commercial permet l'acylation des cycles aromatiques par le chlorure de *p*-nitrobenzoyle, en présence d'un acide de Lewis. Par la suite, en condition basique, on génère l'oxime à l'aide d'hydroxylamine sur les cétones préalablement formées. Un taux variant de 0,5 à 0,7 mmol de fonctions oxime par gramme de résine **16** sèche est ainsi obtenu. Ce taux est déterminé à

l'aide du test colorimétrique quantitatif de Kaiser⁷². La ninhydrine réagit avec une amine libre couplée à la résine ce qui mène au Pourpre de Ruhemann. Cette molécule dont la coloration est bleue possède une absorbance maximale à 570 nm. La concentration peut alors être calculée par spectroscopie avec la loi de Beer-Lambert.

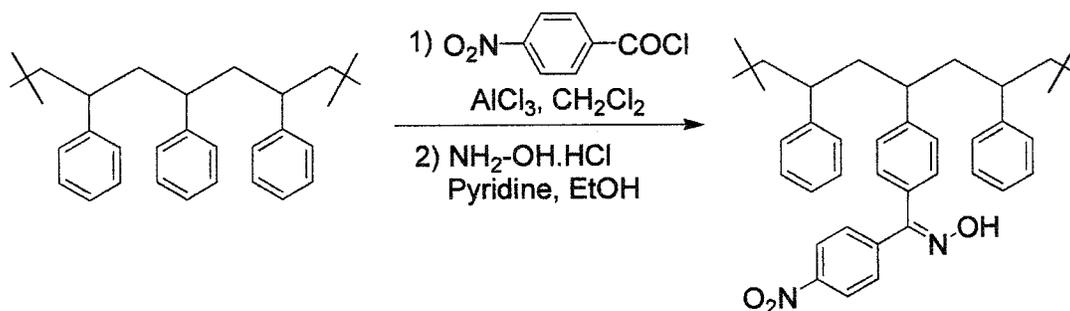


Figure 18 : Schéma de synthèse de la résine de Kaiser (résine oxime) **16**

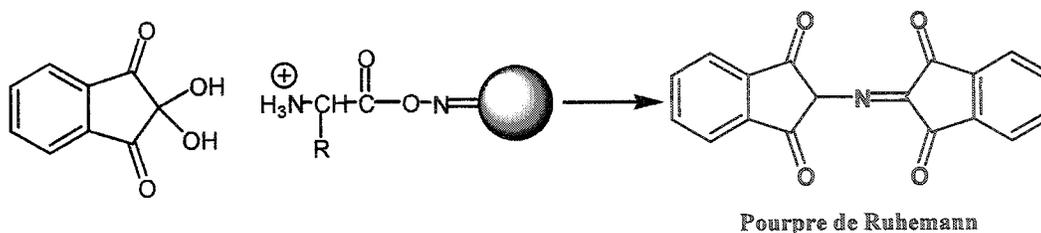
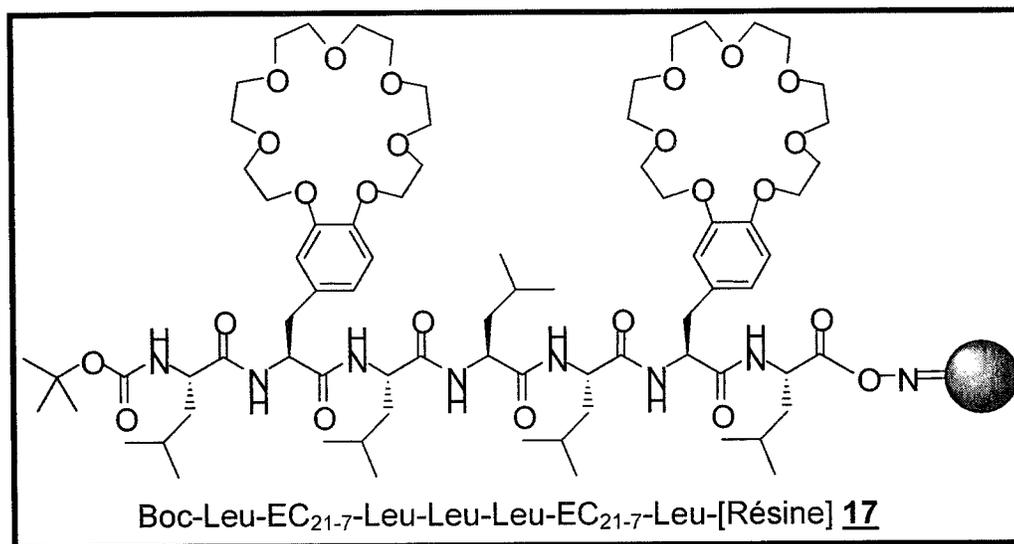


Figure 19 : Test de colorimétrie de Kaiser

3.4.2.2 Synthèse sur support solide du segment heptapeptidique



La synthèse de la chaîne peptidique (Figure 20) débute par l'activation de la fonction acide du premier acide aminé, à l'aide d'un agent de condensation, le diisopropylcarbodiimide (DIC). Le premier acide aminé est la leucine dont l'amine est protégée par un groupement Boc (Boc-Leu-OH). Après l'activation, le mélange réactionnel est introduit dans une ampoule à synthèse peptidique en présence de la résine oxime **16**. L'acide activé **20** est aussi couplé à la fonction oxime de la résine. La réaction de couplage est d'environ 24 heures en raison de la faible nucléophilicité de la fonction oxime. Les excès de réactifs et de produits secondaires indésirables sont éliminés par une succession de lavage avec les solvants appropriés. Par la suite, les sites oximes de la résine n'ayant pas réagi sont bloqués (acétylés) par l'anhydride acétique. La fonction amine de la leucine est alors déprotégé **19** par élimination du groupement Boc avec dégagement de gaz carbonique et d'isobutylène en milieu acide à l'aide d'une solution acide trifluoroacétique à 50% dans le dichlorométhane. Le taux de substitution de la résine par la leucine peut donc être déterminé via le test de Kaiser quantitatif à la ninhydrine. Si le taux obtenu n'est pas satisfaisant, le processus est répété. Ce taux servira de repère afin de déterminer les quantités de réactifs nécessaires lors des étapes de synthèse subséquentes.

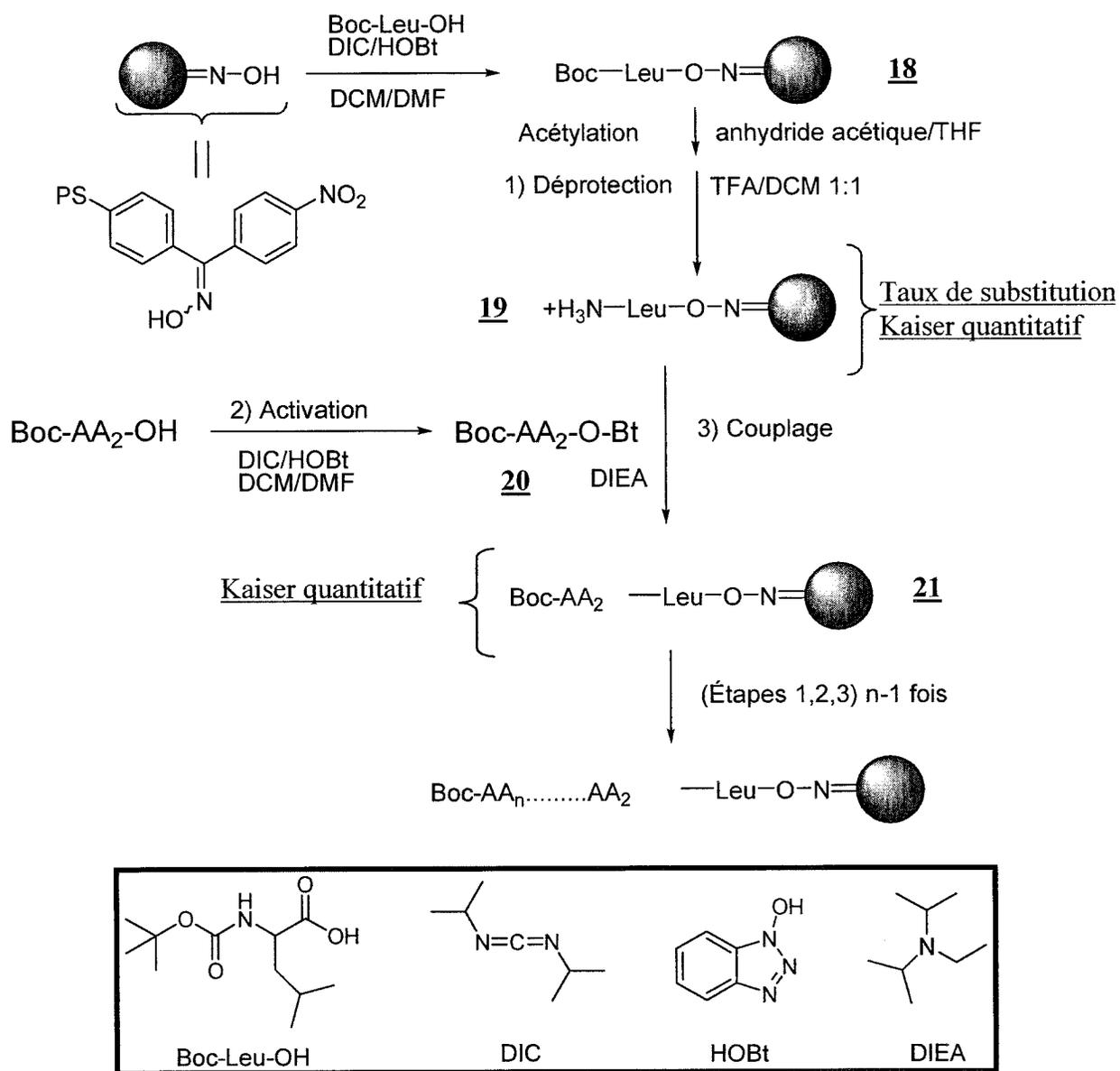


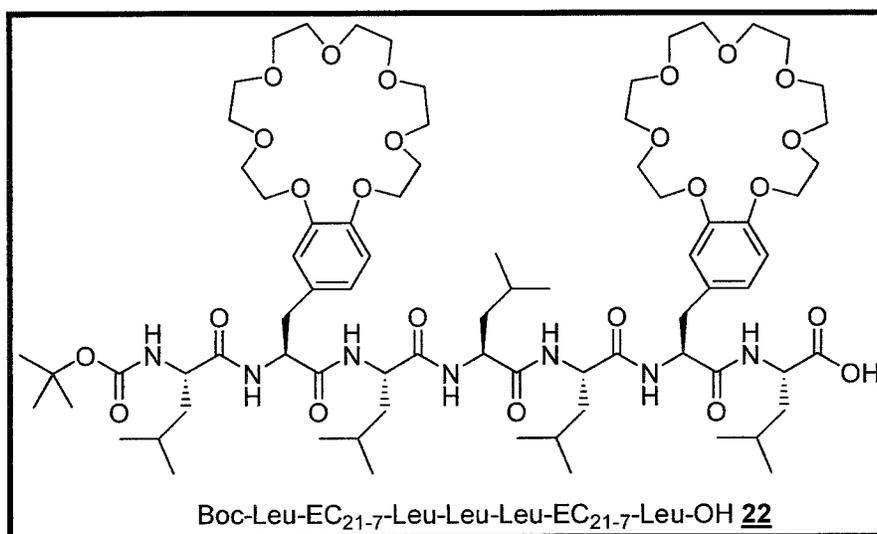
Figure 20 : Schéma général de synthèse peptidique avec la résine de Kaiser

Le deuxième acide aminé peut être couplé, soit la phénylalanine modifiée avec l'éther 21-couronne-7(Boc-EC₂₁₋₇-OH **11**). Celui-ci est préalablement activé au DIC et estérifié avec l'hydroxybenzotriazole (HOBt). L'ester de benzotriazole est formé dans le but de limiter la racémisation et les réactions secondaires. La réaction désirée est plus rapide lorsque le résidu est sous cette forme. Le couplage peptidique s'effectue en présence de diisopropyléthylamine (DIEA) une base faible non nucléophile afin de neutraliser le sel

de trifluoroacétate d'ammonium produit lors de la réaction de déprotection du groupement Boc. Dans l'intention de limiter la racémisation et le clivage prématuré de la résine, la réaction de couplage dure au maximum 2 heures. Si la réaction est incomplète, il est préférable de recommencer le processus plutôt que d'augmenter le temps de réaction, étant donné les conditions du milieu réactionnel. Le taux de succès du couplage est évalué par le test de Kaiser qualitatif à la ninhydrine. Celui-ci permet de détecter la présence d'amines libres n'ayant pas réagi. Si la quantité d'amines libres est faible, une réaction d'acétylation avec l'anhydride acétique peut être effectuée. Les couplages sont répétés jusqu'à l'obtention du segment heptamérique Boc-Leu-EC₂₁₋₇-Leu₃-EC₂₁₋₇Leu-[Résine] **17**.

Étant donné la possibilité de clivage cyclidatif, ce qui mènerait à la formation d'un dicétopipérazine, le troisième couplage se fait avec 10 équivalents de Boc-Leu-OH. Ceci permet de réduire les risques d'observer cette réaction secondaire en favorisant la réaction intermoléculaire. Il est à noter que le couplage des Boc-Leu-OH est généralement réalisé avec 5 équivalents tandis que le couplage des Boc-EC₂₁₋₇-OH **11** se fait avec 3 équivalents seulement en raison de la disponibilité et du coût de ce dernier.

3.4.2.3 Clivage du segment et préparation de l'heptamère acide **22**



La stratégie de synthèse nécessite la dimérisation d'un segment heptapeptidique. Pour cela, la production de l'heptapeptide acide est nécessaire. La résine oxime peut être clivée par un nucléophile dans des conditions relativement douces. Pour aider au clivage, du 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undé-7-cène (DBU) est utilisé comme catalyseur de transacylation (Figure 21). Une partie (70%) de la résine contenant la chaîne peptidique est mis en présence de DBU dans un mélange THF/H₂O de 9 :1 afin d'obtenir l'heptapeptide acide Boc-Leu-EC₂₁₋₇-Leu₃-EC₂₁₋₇-Leu-OH **22**. Les 30% restant serviront comme support lors de la dimérisation. Du bromure de lithium peut être ajouté à la réaction. Ce dernier peut agir comme acide de Lewis en activant le groupe carbonyle de l'ester d'oxime, en plus d'aider à la solubilisation des chaînes peptidiques formées lors de la réaction.

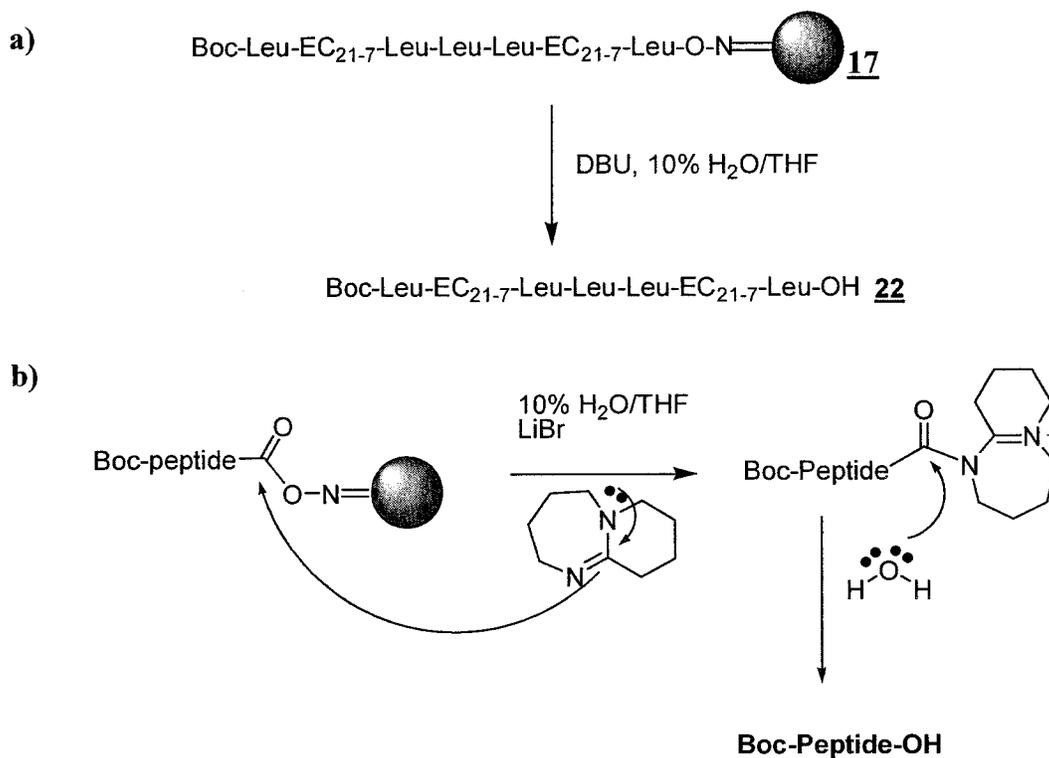
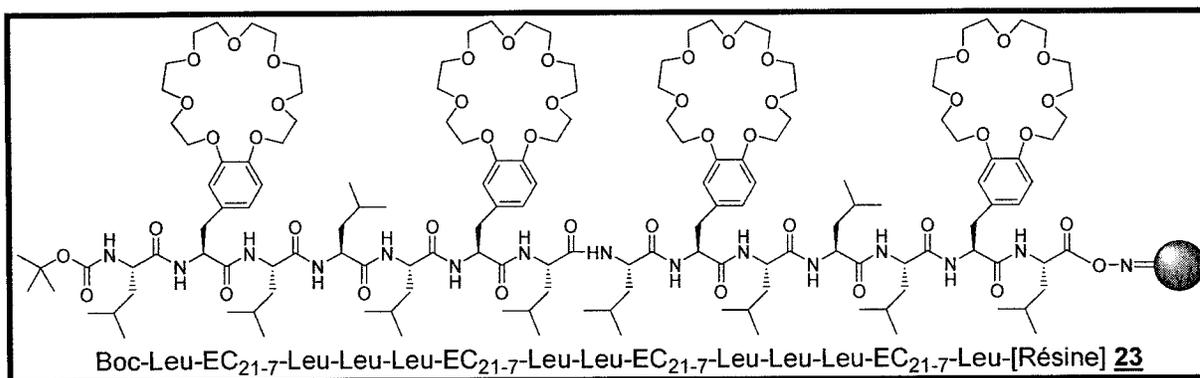


Figure 21 : a) Clivage de la résine oxime pour l'obtention de l'heptapeptide acide
b) Mécanisme de clivage à l'aide de DBU

3.4.2.4 Condensation de segments sur support solide



La condensation de segments sur support solide est une technique très utile lors de la synthèse de peptides comportant des segments répétitifs dans la chaîne peptidique. Cette méthode s'applique dans notre synthèse étant donné la répétition du motif heptapeptidique. La condensation de segment sur support solide possède des avantages incontournables comparativement à la synthèse peptidique par voie linéaire : il y a diminution au niveau du nombre d'étapes synthétiques et la purification finale en est grandement facilitée.

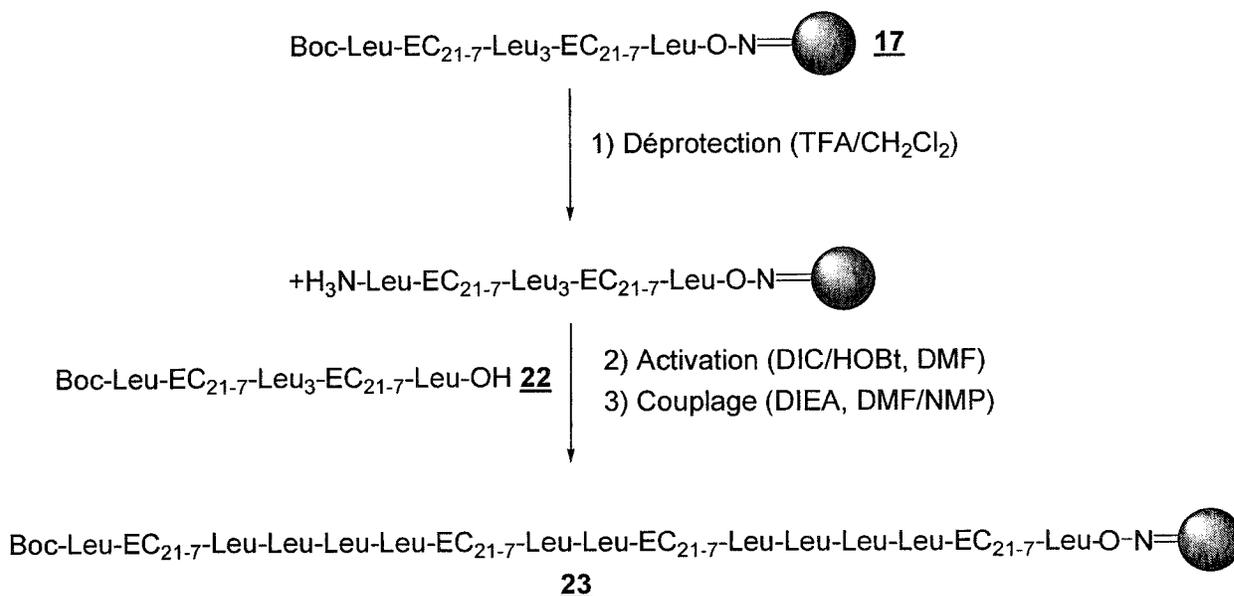
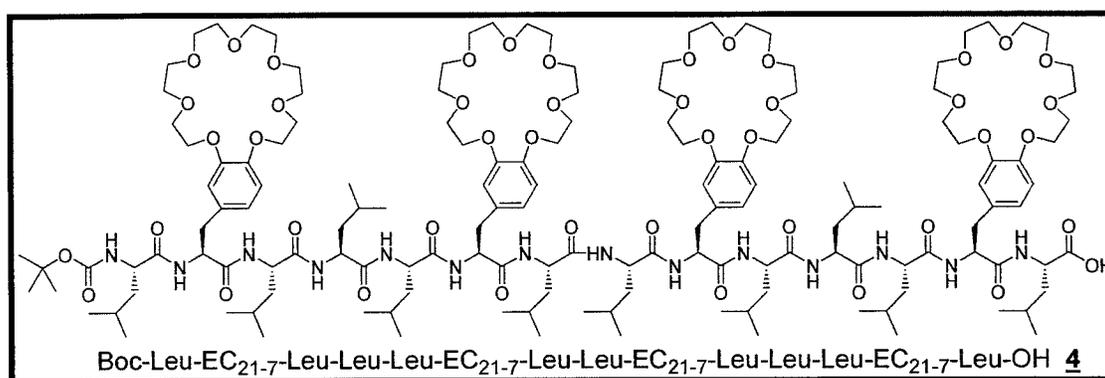


Figure 22 : Schéma général de condensation de segments sur support solide

Les 30% de résine sur support solide non clivé précédemment sont utilisés dans cette synthèse. Les étapes suivantes sont pratiquement identiques aux étapes décrites lors de la synthèse de l'heptapeptide. La déprotection de l'amine se fait en milieu acide

(TFA/CH₂Cl₂) tandis que la dimérisation est effectuée suivant la méthode d'activation au DIC/HOBt. Toutefois, le temps de couplage est de 4 heures et le CH₂Cl₂ peut être remplacé par du N-méthylpyrrolidinone (NMP), un solvant plus polaire ayant fait ses preuves lors du couplage de segments. Une fraction du peptide 14-mère **23** est conservée sur la résine pour le greffage subséquent des synthons de types Asp/Glu au *N*-terminal. Cependant, une partie de la résine doit être clivée pour l'obtention du 14-mère acide **4** et pour des réactions postérieures.

3.4.2.5 Clivage et préparation du 14-mère acide **4**



La méthode utilisée pour l'obtention du 14-mère acide est identique à celle décrite en 3.4.2.3. Le DBU est employé comme agent de transacylation en présence d'eau et de THF. Par ailleurs, l'eau peut être remplacée par un alcool pour l'obtention de l'ester correspondant⁷³.

3.4.3 Synthèse des chaînes de types Glu/Asp

Pour ce qui est de la synthèse des unités de reconnaissance des pro-peptides, la synthèse en solution s'est avérée la voie la plus pratique. Par la suite, les syntons peuvent être greffés au 14-mère acide **4** soit par couplage sur support solide au *N*-terminal, soit par couplage en solution au *C*-terminal. La stratégie utilisée est convergente car chaque

synthon préparé offre la possibilité d'être couplé à l'un ou l'autre des extrémités du noyau peptidique cytolitique et ce, en seulement une étape supplémentaire (Figure 23).

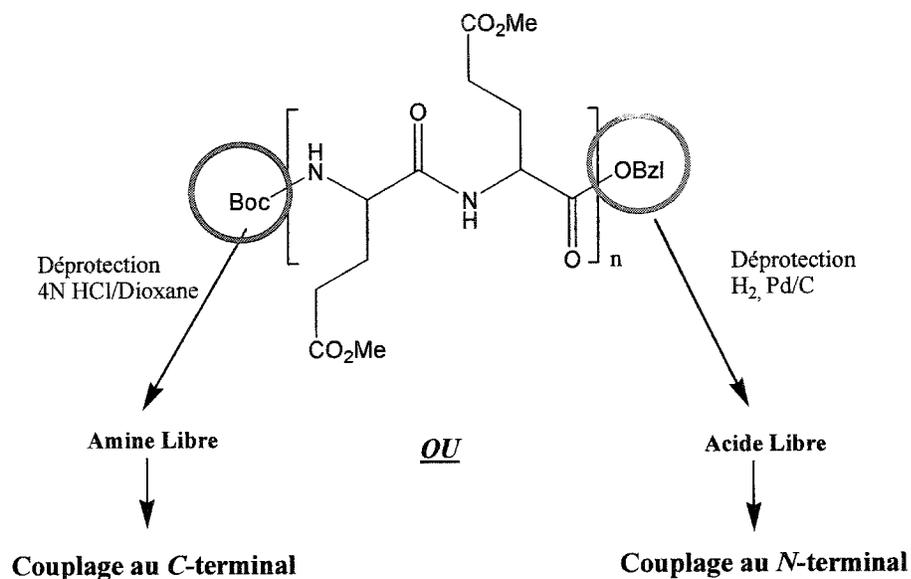


Figure 23 : Stratégie de couplage convergente des synthons de types Asp/Glu pour le couplage au C- ou au N-terminal du noyau cytolitique.

Avant d'effectuer la synthèse en solution, plusieurs possibilités ont été investiguées afin d'utiliser la synthèse sur support solide pour le couplage des acides aspartiques et glutamiques. Premièrement, le couplage de l'acide aspartique sur la résine oxime dans des conditions classiques (DIC/HOBt) s'est avéré très peu efficace. Des rendements très faibles ont été obtenus et déterminés par clivage avec de la n-propylamine. De plus, comme les tests de Kaiser donnent une coloration brune et non bleu avec cet acide aminé, il est impossible de déterminer le taux de substitution par cette méthode. Des résultats passables ont été obtenus avec l'acide glutamique avec des taux de substitution faible de l'ordre de 0,1 à 0,2 mmol par gramme de résine. Plusieurs essais ont toutefois été tentés dans le but de coupler les acides aminés suivants (Figure 24). Cependant, après le clivage à l'aide de la n-propylamine, les spectres HPLC démontrent la présence de plusieurs produits. Quelques essais ont été tentés en modifiant les conditions réactionnelles comme par exemple en laissant réagir plusieurs jours, en utilisant d'autres réactifs (DCC, EDC, HATU, HBTU) et d'autres solvants (NMP, CH₂Cl₂) sans obtenir de meilleurs résultats.

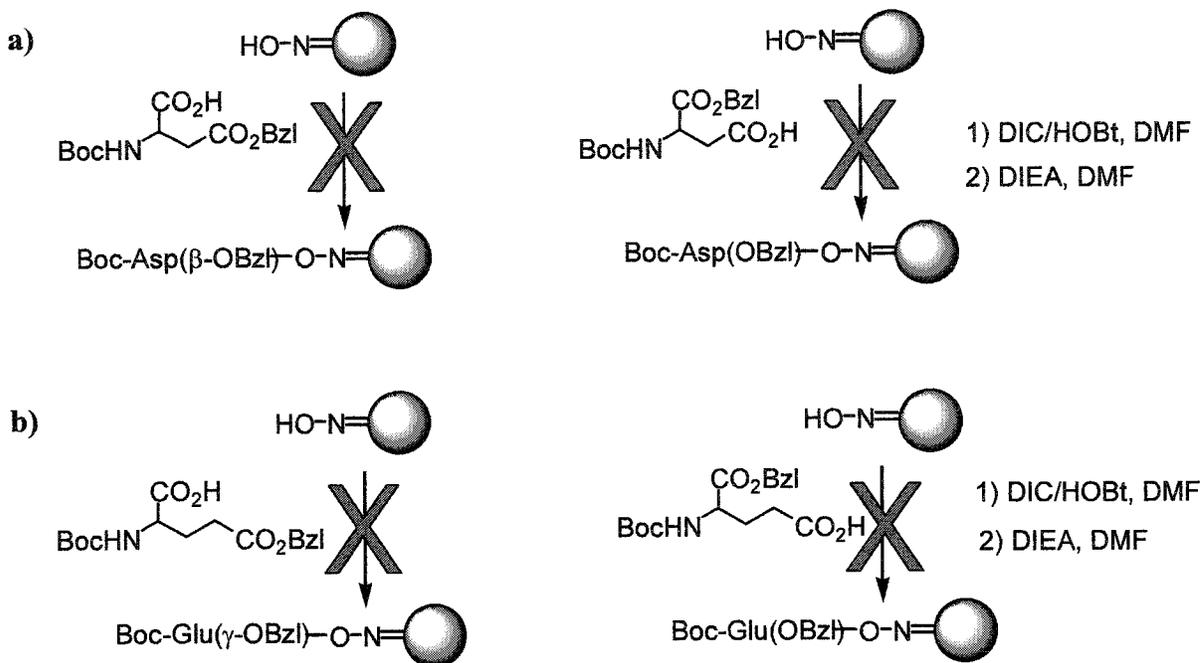


Figure 24 : Tentatives infructueuses de couplage **a)** des acides α - et β -aspartiques **b)** des acides α - et γ -glutamiques sur la résine oxime

Le couplage de l'acide aspartique et de l'acide glutamique au *N*-terminal du 14-mère s'est avéré tout aussi problématique (voir tableau 8). Des rendements médiocres ont été obtenus, et ce dans plusieurs conditions réactionnelles différentes. Cependant, en effectuant des couplages doubles, triples ou parfois quadruples avec le même peptide sur support solide, il est possible d'obtenir des rendements satisfaisants.

Tableau 8 : Conditions de réaction pour le couplage des acides glutamiques et aspartiques au *N*-terminal du 14-mère sur support solide

Réactifs	Solvant	Temps (heures)	Rendement (%)
DIC/HOBt	NMP	2 à 12	Faible
DIC/HOBt	DMF	2 à 48	Faible
EDC	DMF	2 à 12	Faible
DCC	DMF	2 à 12	Faible
HATU	DMF	2 à 12	Faible

Plusieurs hypothèses peuvent être émises concernant les faibles rendements obtenus lors du couplage des acides aspartique et glutamique. Premièrement, la réaction secondaire la plus importante est la formation d'isoaspartyle ou d'isoglutamyle via l'intermédiaire cyclique correspondant. L'atome d'azote de l'acide aminé précédent peut attaquer l'ester de la chaîne latérale des acides aspartique ou glutamique pour former un cycle à 5 ou 6 membres **24**. Subséquemment, ceux-ci peuvent subir une réaction d'ouverture de cycle par un nucléophile telles l'eau ou la piperidine⁷⁴(Figure 25). Pour prévenir cette réaction secondaire indésirable, l'ester β -cyclohexyle pourrait être employé comme groupe protecteur au lieu de l'ester benzylique. Cependant, notre stratégie de synthèse rendait impossible l'utilisation du cyclohexyle. Par ailleurs, le traitement prolongé avec des acides forts durant le clivage des groupes protecteurs peut aussi être accompagné par des réactions de cyclisation.

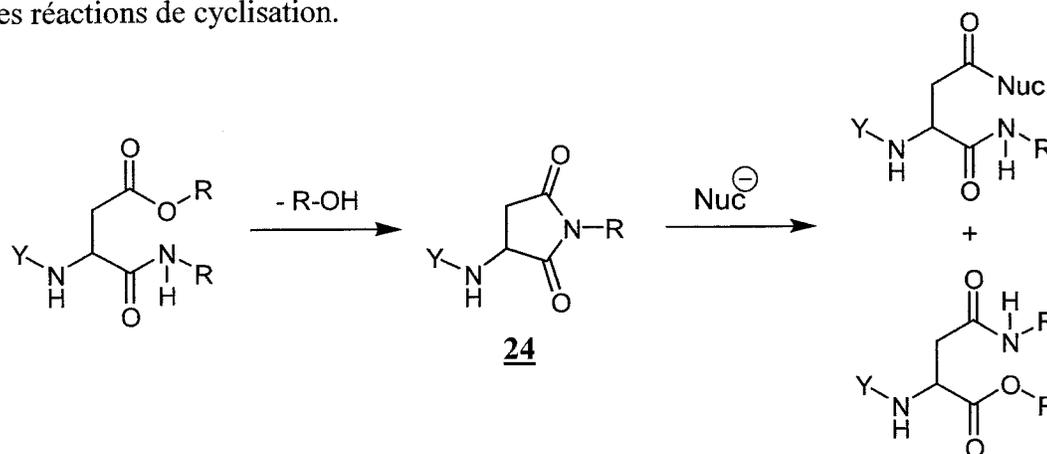


Figure 25 : Réaction secondaire impliquant l'acide aspartique

Étant donné la nature de la résine oxime, une hypothèse peut être émise en ce qui concerne les rendements médiocres obtenus lors du premier couplage. En effet, l'acide aminé peut être clivé de la résine par l'oxygène du carbonyle de la chaîne latérale de l'acide aspartique ou de l'acide glutamique. Ainsi, après plusieurs couplages avec différents résidus, un mélange de produits est obtenu lors du clivage de la résine. Étant donné les difficultés rencontrées lors du couplage des acides aspartique et glutamique sur support solide, une autre stratégie a dû être envisagée. Nous avons donc opté pour la synthèse en solution des chaînes comportant 2 à 4 résidus de type Asp/Glu, pour leur greffage subséquent au noyau cytolytique de 14 acides aminés **4**.

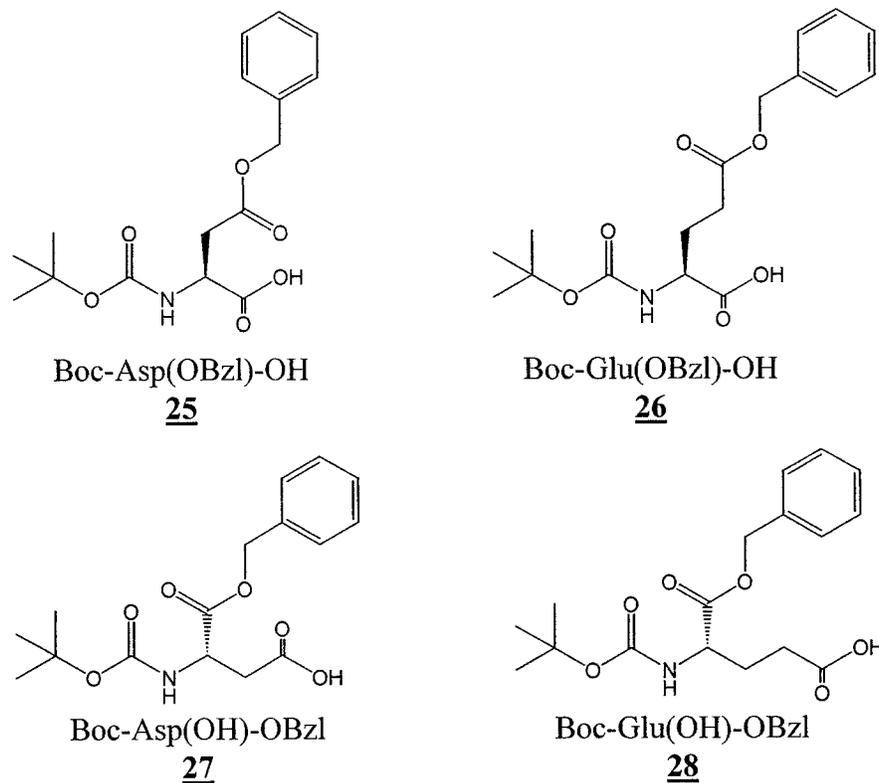


Figure 26 : Acides aminés de départ pour la synthèse des chaînes de type Asp/Glu

La schéma de synthèse des chaînes de types Asp/Glu est identique pour chaque chaînes. Cependant, la nature des acides aminés ainsi que le nombre de résidus dans la chaîne varient. Les acides aminés choisis sont protégés par un groupement Boc au niveau de l'amine et par un benzyle (OBzl) au niveau d'un des acides carboxyliques. Les possibilités de molécules de départ sont présentées à la Figure 26 soit : Boc-Asp(OBzl)-OH **25**, Boc-Glu(OBzl)-OH **26**, Boc-Asp(OH)-OBzl **27**, Boc-Glu(OH)-OBzl **28**. La synthèse débute par la méthylation de l'acide carboxylique libre à l'aide du diazométhane (CH_2N_2) pour l'obtention du composé du Boc-Glu(OBzl)-OMe **29**. Le diazométhane est produit *in situ* à partir du Diazald commercial en présence d'une base, l'hydroxyde de potassium (KOH)⁷⁵. La masse totale obtenue est divisée en deux parties. Une hydrogénation catalytique en utilisant un catalyseur de palladium sur charbon activé est effectuée, ce qui libère l'acide carboxylique de la chaîne latérale **30**. La seconde fraction de **29** est mise en présence d'acide chlorhydrique pour la déprotection de l'amine **31**. Ensuite, un couplage peptidique en utilisant le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide

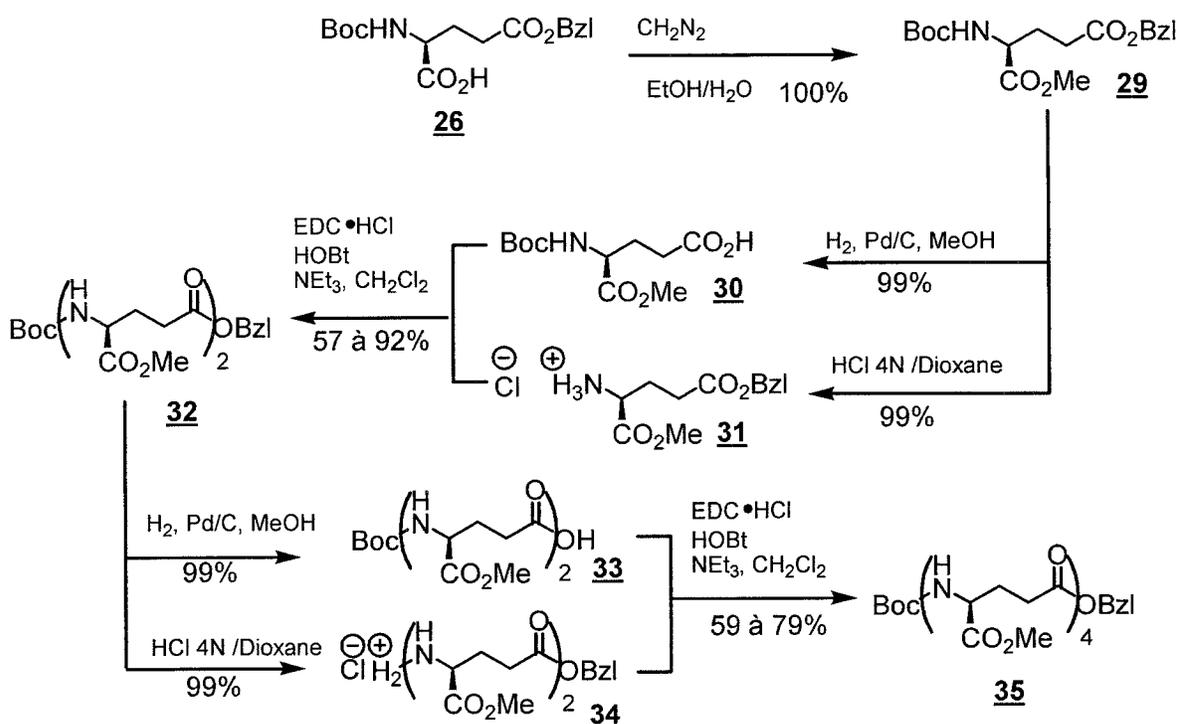


Figure 27 : Schéma de synthèse des chaînes de type Asp/Glu, exemple du Boc-[γ -Glu(α -OMe)]₄-OBzl

(EDC) est effectué entre **30** et **31**. EDC est employé ici en synthèse peptidique en solution car l'urée formée durant la réaction peut être éliminée lors de lavages aqueux subséquent contrairement au DCC. Cette réaction se fait en présence d'une base, la triéthylamine (NEt₃) et de l'hydroxybenzotriazole (HOBt). Ce dernier joue le même rôle que lorsqu'il est utilisé en synthèse sur support solide. Ceci permet d'obtenir un dipeptide complètement protégé. Pour l'obtention d'un térapeptide de type Asp/Glu, les étapes de déprotection et de couplage sont répétées ce qui mène, dans ce cas-ci, au composé **35**. Les synthons ainsi que les rendements de synthèse sont présentés au tableau 9. Ces molécules ont été purifiées par cristallisation et par chromatographie sur gel de silice lorsqu'il en était nécessaire. Celles-ci ont été caractérisées par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ¹H) et par spectrométrie de masse « Electrospray » (ES) ou ionisation chimique (IC).

Tableau 9 : Rendement de synthèse et masse moléculaire des chaînes de type Asp/Glu

Peptides		Masse Calc.	Masse Obs.	Rdt (%)
Dipeptides				
<u>32</u>	Boc- γ -Glu(α -OMe)-Glu(OBzl)-OMe	494,53	494,54	88
<u>36</u>	Boc-Glu(OMe)-Glu(OMe)-OBzl	494,53	494,	86
<u>37</u>	Boc-Asp(OMe)-Glu(OMe)-OBzl	480,51	480, 0	1
<u>38</u>	Boc-Glu(OMe)-Asp(OMe)-OB	4 1	4	
<u>39</u>	Boc-Asp(OMe)-Glu(OBzl)-OMe	480,51	480, 0	66
<u>40</u>	Boc- γ -Glu(α -OMe)-Asp(OBzl)-OMe	480,51	480, 0	6
<u>41</u>	Boc- γ -Glu(α -OMe)-Asp(OMe)-OBzl	480,51	480,20	57
<u>42</u>	Boc- β -Asp(α -OMe)-Glu(OMe)-OBzl	480,51	480, 0	59
Tripeptide				
<u>43</u>	Boc- γ -Glu(α -OMe)- β -Asp(α -OMe)-Glu(OBzl)-OMe	6 3,60	6 3,39	69
Tétrapeptides				
<u>44</u>	Boc- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)-Asp(OMe)-Glu(OMe)-OBzl	66,33	66,39	59
<u>45</u>	Boc-Asp(OMe)- γ -Glu(α -OMe)-Asp(OMe)-Glu(OMe)-OBzl	5 ,31	5 ,39	8
<u>35</u>	Boc- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)-Glu(OBzl)-OMe	80,35	80,36	1
<u>46</u>	Boc- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)- β -Asp(α -OMe)-Glu(OMe)-OBzl	66,33	66,39	9
<u>47</u>	Boc- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)-Asp(OBzl)-OMe	66,33	66,39	

3.4.4 Couplage final des chaînes au 14-mère, clivage et déprotection

Le couplage des chaînes présentées au tableau précédent se fait de deux différentes manières dépendamment si l'on désire la chaîne au *N*- ou au *C*-terminal. Étant donné les résultats obtenus sur support solide en ce qui concerne le couplage au *N*-terminal, celui-ci se fera comme décrit dans les figures 28 et 29. Premièrement, le synthon subit une déprotection sélective de l'ester benzylique par hydrogénation catalysée au palladium sur charbon activé. Par la suite, l'acide ainsi formé 33 est activé et couplé au 14-mère 23 en utilisant les conditions classiques de couplage sur support solide (DIC/HOBt, DIEA) pendant 4 heures. Dans tous les cas, cette étape est répétée deux fois. Toutefois, pour

plusieurs chaînes, le couplage doit être fait en triplicata. Le groupement Boc du peptide sur support solide est alors éliminé en milieu acide. Finalement, les esters méthyliques des chaînes latérales sont hydrolysés et le peptide est clivé en une seule et même étape en présence de DBU dans un mélange contenant 10 % de H₂O dans le THF. Le peptide **53** et tous les autres peptides ainsi formés peuvent donc être purifiés par HPLC si nécessaire et caractérisés par RMN ¹H et par spectrométrie de masse MALDI.

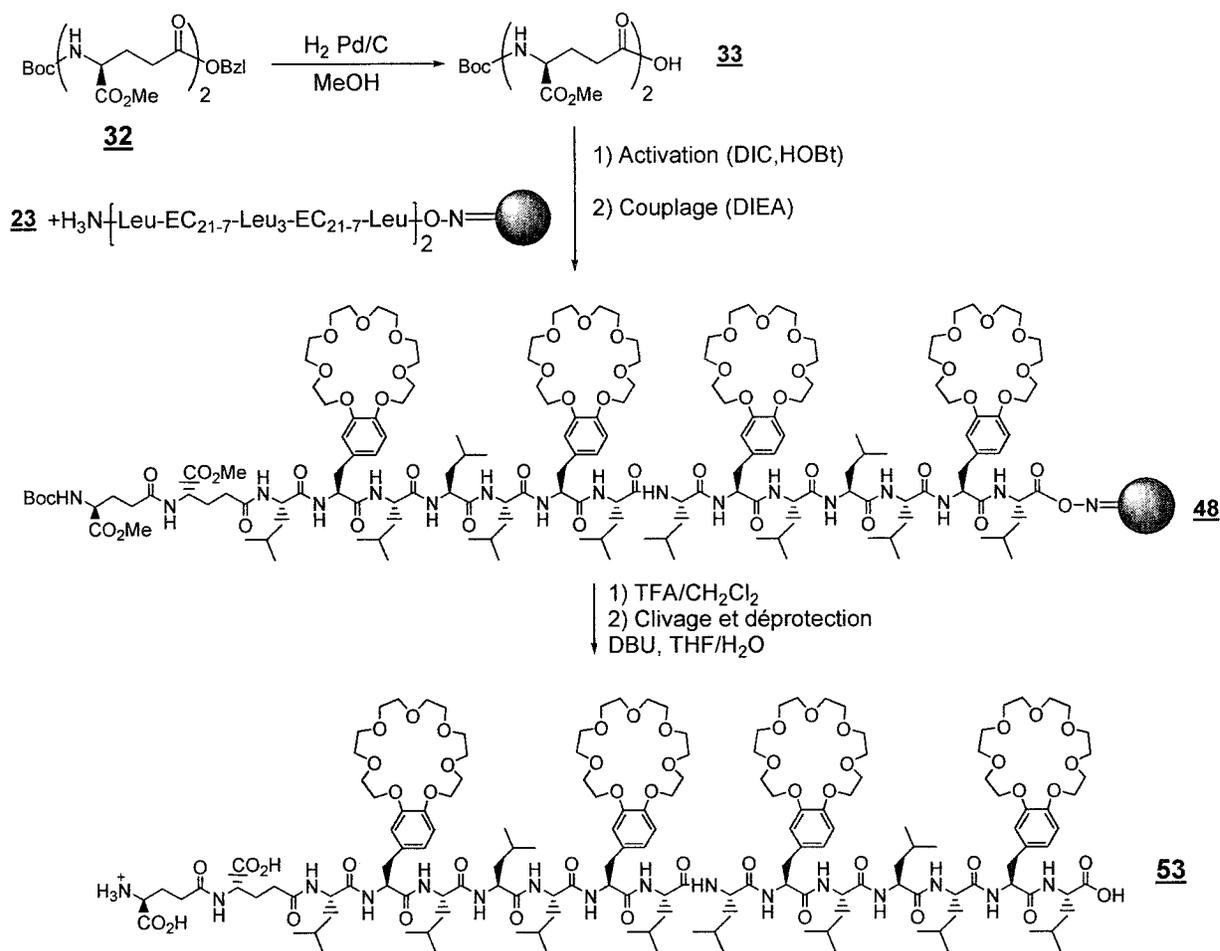


Figure 28 : Schéma de couplage final des chaînes au 14-mère, clivage et déprotection

Il a déjà été démontré que la résine oxime pouvait être clivée par un nucléophile azoté. Cela s'effectue régulièrement en utilisant la n-propylamine comme agent nucléophile comme dans le cas du composé **61** (tableau 10). Pour l'introduction de synthons au C-terminal, la première stratégie utilisée a donc été de tenter le clivage du 14-

mère à l'aide de dimère de type Asp/Glu possédant l'extrémité amine libre. Les doublets d'électrons libres de l'azote pouvant attaquer le carbonyle de l'ester d'oxime, il serait ainsi possible de cliver le peptide de la résine et ainsi obtenir les 14-mères substitués au C-terminal. Cependant, toutes les tentatives en ce sens ont échoué. Une hypothèse peut être émise quant à la raison de ces résultats. L'encombrement stérique et/ou la polarité des dimères nucléophiles peuvent vraisemblablement empêcher cette réaction de se produire. Il s'avère donc impossible pour le nucléophile de pénétrer dans l'environnement réactionnel de l'ester d'oxime.

Nous avons donc eu recours à la synthèse en solution pour le couplage au C-terminal des chaînes de types Asp/Glu (Figure 29). Après clivage et préparation du 14-mère

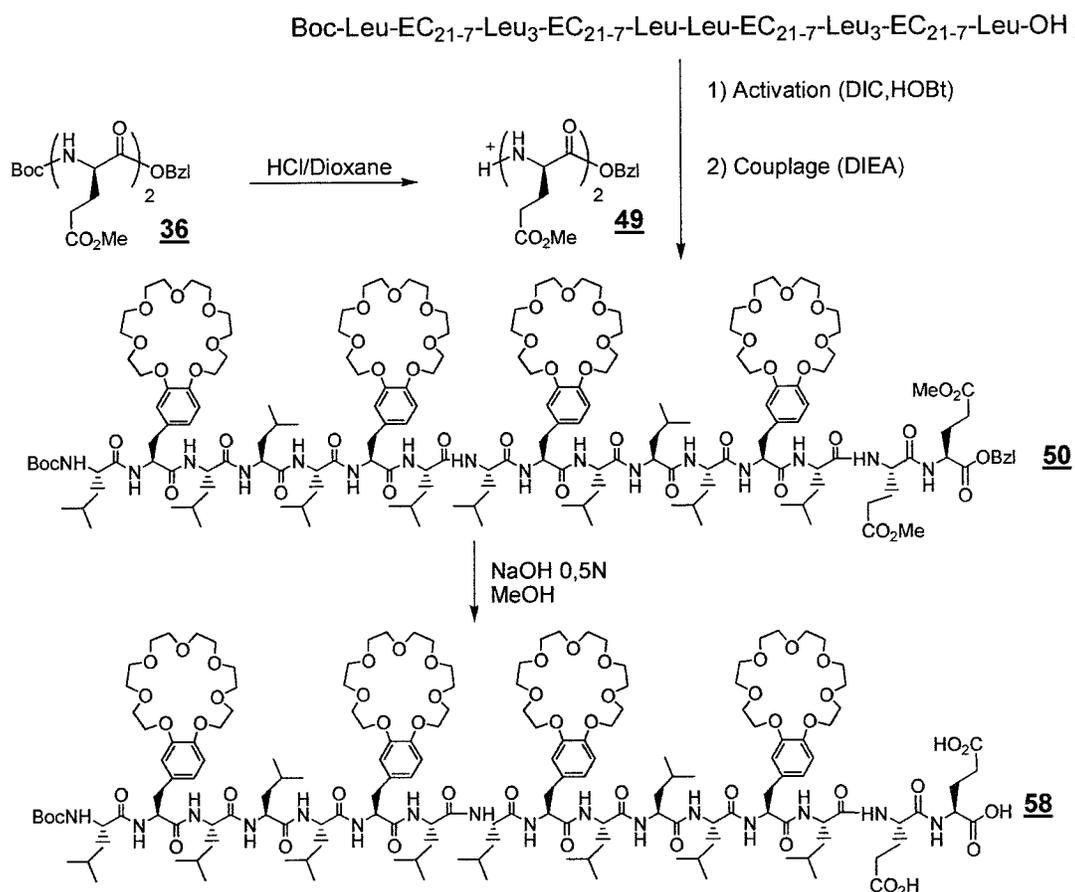


Figure 29 : Schéma de couplage final des chaînes au C-terminal du 14-mère et déprotection

acide **4** comme décrit précédemment, celui-ci est activé selon les conditions standards (DIC/HOBt) et couplé (DIEA) avec une chaîne de type Asp/Glu. Le groupement Boc de cette chaîne doit être préalablement éliminé en milieu acide dans des conditions HCl 4N dans le dioxane. Finalement, l'hydrolyse des esters benzyliques et méthyliques est effectuée à l'aide d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (NaOH) 0,5N en présence de méthanol (MeOH) et ce à une température de 60°C pendant 6 heures. Dans quelques cas, l'acidification par HCl 1 N permet la précipitation du produit désiré. Celui-ci est filtré, purifié par HPLC si nécessaire, et caractérisé par RMN ¹H et spectrométrie de masse MALDI. Le tableau 10 montre les peptides synthétisés ainsi que leur masse respective et le rendement de synthèse.

Tableau 10 : Nanostructures peptidiques synthétisés, masse moléculaire et rendement synthèse

	Peptides*	Masse Calculée	Masse Observée	Rdt (%)
5	⁺ NH ₃ -[14-mère]-OH	2850,13	2851,48	58
2	Boc-[14-mère]-OMe	2965,63	2963,64	74
4	Boc-[14-mère]-OH	2951,60	2951,53	74
N-Terminal				
51	γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu-Asp-[14-mère]-OH	3468,05	3466,79	--
52	γ -Glu- γ -Glu-Asp-Glu- 4- -	3468,05	3466,80	--
53	γ -Glu- γ -Glu-[14-mère]-OH	3109,71	3108,58	13
54	γ -Glu-Asp-[14-mère]-OH	3095,68	3095,97	--
55	Glu-Glu-[14-mère]-OH	3109,71	3108,77	32
56	Glu-Asp-[14-mère]-OH	3095,68	3094,81	41
C-Terminal				
57	Boc-[14-mère]- γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu-Asp-OH	3451,88	3451,18	--
58	Boc-[14-mère]-Glu-Glu-OH	3209,83	3208,50	--
59	Boc-[14-mère]- β -Asp-Glu-OH	3195,80	3195,65	12
60	Boc-[14-mère]- γ -Glu-Glu-OH	3208,49	3208,50	15
61	Boc-[14-mère]- <i>n</i> -P	2992,69	2990,98	81

*[14-mère] = [Leu-EC₂₁₋₇-Leu-Leu-Leu-EC₂₁₋₇-Leu]₂-

3.5 Conclusion

Plusieurs chaînes de type Asp/Glu ainsi que plusieurs nanostructures peptidiques ont été préparées avec des rendements très satisfaisants en tenant compte de leur masse moléculaire élevée. La synthèse sur support solide s'avère dans certains cas un outil extrêmement puissant de synthèse organique lorsqu'il est employé correctement.

La synthèse des nanostructures peptidiques cibles étant réalisée, il s'avère donc intéressant d'effectuer des études conformationnelles ainsi que des études d'activité lytique. Par contre, quelques produits n'ont pu être utilisés, car ces études demandent un très haut degré de pureté des composés à tester, ainsi qu'une quantité appréciable.

CHAPITRE 4 :

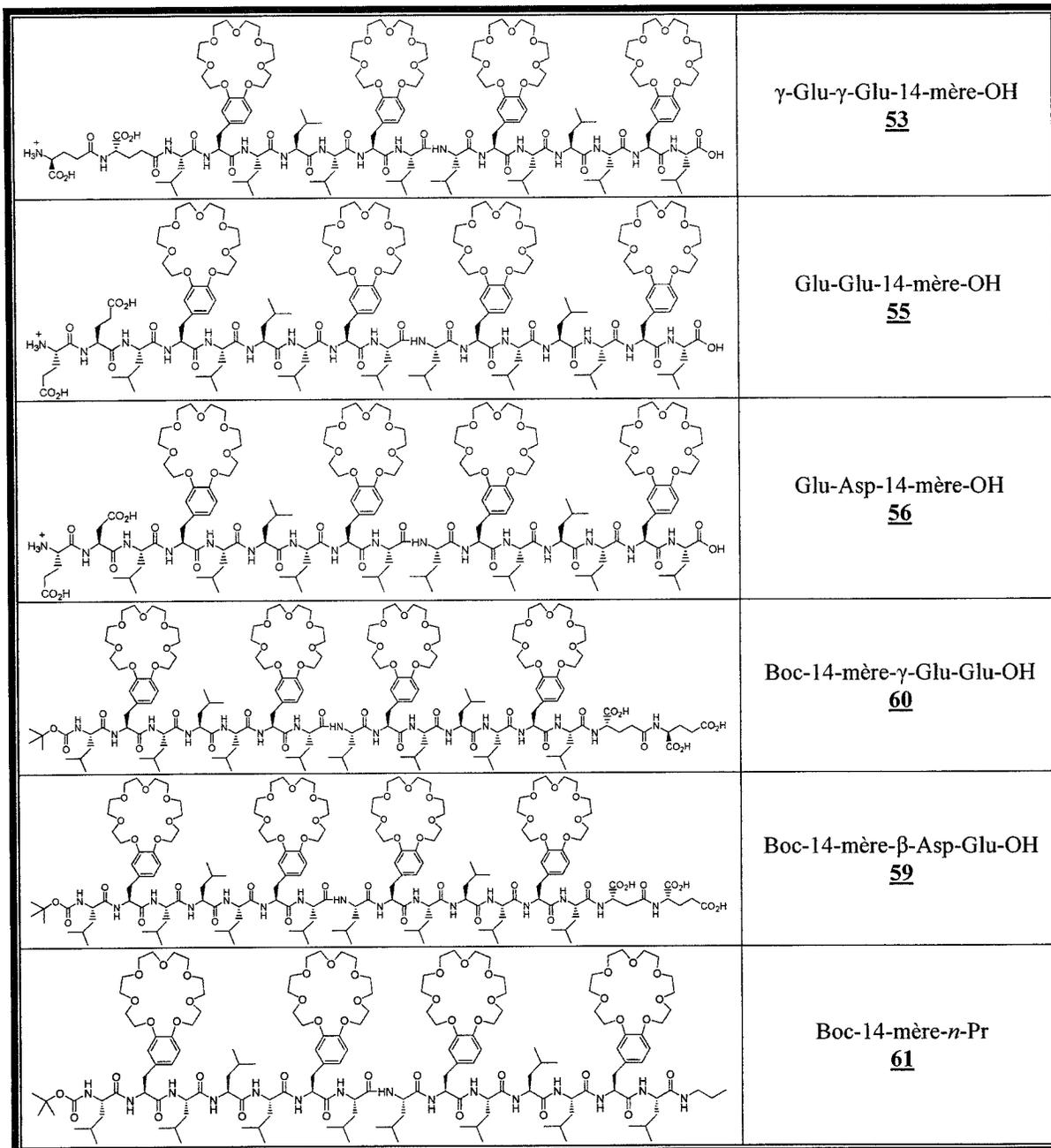
ACTIVITÉ LYTIQUE ET ÉTUDES CONFORMATIONNELLES

4.1 Préambule

Comme il a été décrit au chapitre 1, il a été démontré par plusieurs groupes de recherche que la structure secondaire des peptides lytiques perturbateurs membranaires était d'une importance capitale pour l'activité. Il est donc important de vérifier l'effet de l'ajout des chaînes de types Asp/Glu au *N*- ou au *C*-terminal du 14-mère sur la structure secondaire de nos nanostructures peptidiques. Des études d'activité lytique peuvent aussi être effectuées pour ensuite corrélérer ces résultats avec la structure secondaire des peptides. Ceci permettra de déterminer la relation structure-activité des peptides afin d'orienter les travaux futurs. Pour les raisons mentionnées précédemment, seuls les peptides présentés au tableau 11 ont été testés et caractérisés.

Tableau 11 : Nanostructures peptidiques utilisées pour les tests d'activité lytique

Structure	Peptide
	⁺ NH ₃ -14-mère-OH <u>5</u>
	Boc-14-mère-OMe <u>2</u>
	Boc-14-mère-OH <u>4</u>



4.2 Activité lytique des nanostructures peptidiques synthétisés

Afin d'étudier la relation entre la structure et l'activité des nanostructures peptidiques synthétisés, des expériences de perméabilisation de vésicules phospholipidiques ont été effectuées. Le comportement du 14-mère envers différents types de vésicules a été étudié en profondeur et est bien connu⁶⁵. Cependant, est-il possible de

moduler ou même d'inhiber ses propriétés lytiques? C'est pour vérifier cette hypothèse que des tests de perméabilité des vésicules ont été effectués.

4.2.1 Expériences de perméabilité des vésicules

Le test de perméabilité à la calcéine a été utilisé afin d'étudier la capacité des nanostructures peptidiques à augmenter la perméabilité membranaire de vésicules⁷⁶(Figure 30).

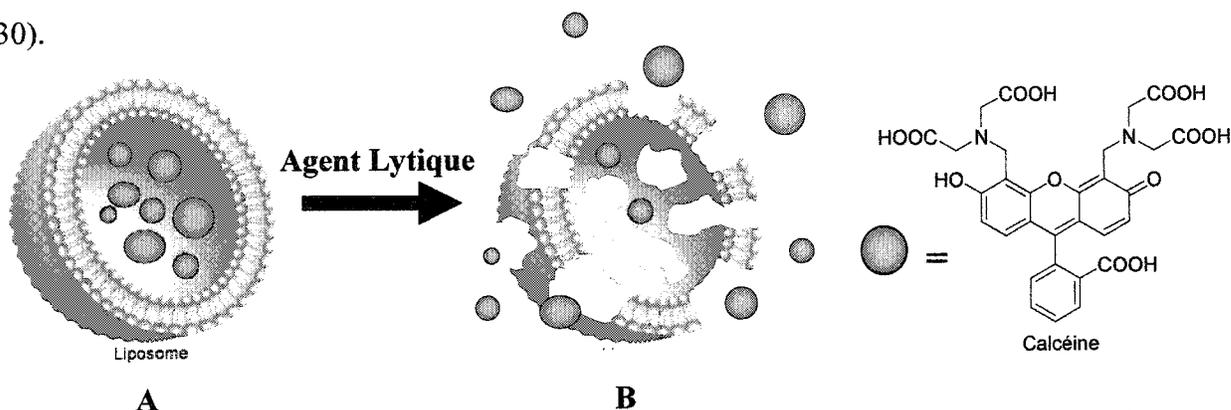


Figure 30 : Représentation schématique du test de perméabilité à la calcéine :
A- Concentration élevée → auto-extinction **B-** Dilution → augmentation de la fluorescence

La fluorescence de la carboxyfluorescéine ou de la calcéine est auto-extincte à plus de 95% à des concentrations élevées (>100mM) en solution. Cependant, à des concentrations plus faibles, il y a diminution de l'auto-extinction et augmentation de la fluorescence. Pour ces composés, la longueur d'onde d'excitation maximale est de 490 nm et celle d'émission est de 520 nm. Le concept de cette méthode consiste à observer l'augmentation de fluorescence après l'ajout de l'agent lytique comme le démontre la Figure 31. Premièrement, une solution concentrée de fluorophore est encapsulée à l'intérieur de liposomes. Les fluorophores libres sont séparés des liposomes par une simple filtration sur gel de Séphadex®. Après l'addition de l'agent lytique, la libération du fluorophore est accompagnée par une augmentation de la fluorescence. Ceci est le résultat de la dilution de la solution mère. La lyse complète des liposomes (100%) est obtenue par l'ajout d'une solution de 10% de Triton-X, un détergent extrêmement puissant. En utilisant

cette référence, le degré de lyse induite par les peptides est calculé à l'aide de cette équation :

$$\% \text{ Lyse} = [(F - F_0) / (F_{100} - F_0)] \times 100 \quad \text{Équation 1}$$

où F représente l'intensité de fluorescence induite par l'agent lytique, F_0 est l'intensité obtenue de la solution sans agent lytique, et F_{100} est l'intensité de la fluorescence obtenue après l'addition du Triton-X.

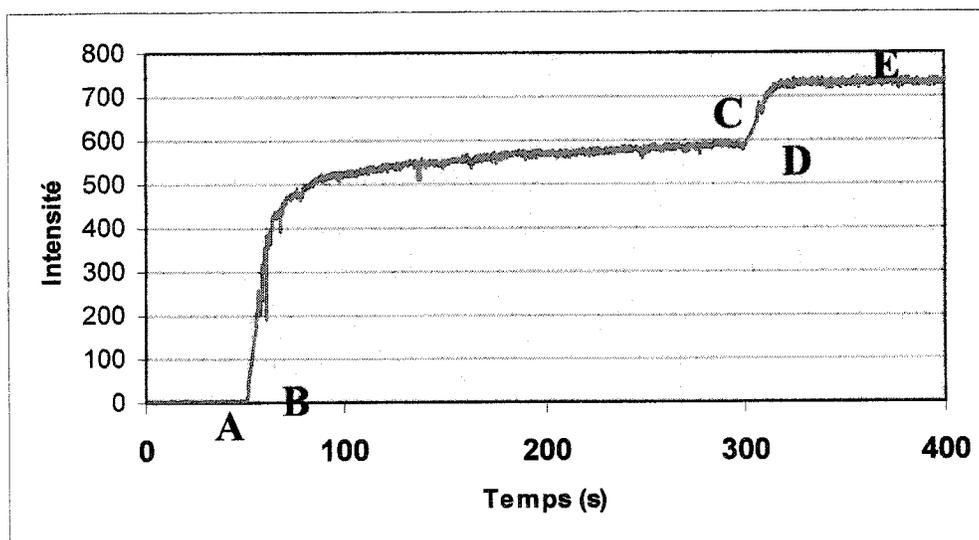


Figure 31 : Intensité de la fluorescence en fonction du temps : **A**- Fluorescence sans agent lytique (F_0), **B**- Ajout de l'agent lytique, **C**- Fluorescence induite par l'agent lytique (F), **D**- Ajout de Triton-X , **E**- Lyse complète des vésicules (F_{100})

4.2.2 Préparation des liposomes⁷⁷

Pour effectuer ces tests, la préparation des liposomes ou vésicules doit être faite avec rigueur pour obtenir des vésicules possédant des caractéristiques semblables. Ainsi, les phospholipides sont dissous dans le chloroforme. Le chloroforme est évaporé sous pression réduite et mise sous vide pendant 1 heure. Une solution de 50 mM de calcéïne ou de carboxyfluorescéine à pH 7,4, préparée à l'aide d'un tampon Hepes ou TES, est ajoutée. Le tout est porté au bain aux ultrasons à une température entre 0 et 4°C pendant 1 heure. Les vésicules sont filtrées sur une membrane de polycarbonate 0,4 micron. La solution

obtenue est passée sur une colonne chromatographique Séphadex G-50 en présence d'un tampon Hepes ou TES à pH 7,4.

Une deuxième technique a aussi été utilisée. Après évaporation de la solution de chloroforme contenant les phospholipides, ceux-ci sont réhydratés avec une solution de calcéine ou de carboxyfluorescéine, cette dernière est portée au Vortex. La solution subit 10 cycles de gel/dégel à l'aide de l'azote liquide et à l'eau chaude. Celle-ci est extrudée 29 fois avec un filtre possédant des pores de 100 nm. Enfin, la solution est passée sur une colonne chromatographique Séphadex G-50. Comme dans le premier cas, le pH de la solution est de 7,4 et les premières fractions sont conservées pour les tests de perméabilité.

4.2.3 Choix des phospholipides pour la préparation des liposomes

La composition membranaire peut être exploitée dans le design de peptides lytiques sélectifs. Les membranes bactériennes sont composées de phospholipides acides ce qui résulte en une paroi chargée négativement. Les cellules humaines normales sont composées principalement de phosphatidylcholine (PC), de sphingomyéline (SM), de cholestérol et de phospholipides zwitterioniques. Celles-ci sont neutres. Les érythrocytes sont riches en cholestérol et possèdent aussi des PC, des SM, de l'acide sialique et des glyco-phospholipides⁷⁸. Enfin, la membrane des cellules cancéreuses contient de 3 à 7 fois plus de phosphatidylsérine (PS) que les cellules normales⁷⁹, ce qui leur confère une charge négative globale. Les PS sont situés dans la couche externe des cellules cancéreuses comparativement à ceux des cellules normales qui sont dans la couche interne⁸⁰.

Les peptides cytolytiques exercent leur influence sur les cellules majoritairement par des interactions avec la bicouche lipidique constituant la membrane. L'influence de la composition lipidique des membranes cellulaires sur la spécificité des peptides envers différents types de cellules ou organisme n'est pas très bien comprise. La complexité des cellules naturelles ne permet aucunement d'établir une corrélation directe entre la structure et l'activité des peptides cytolytiques. Toutefois, les études avec des membranes modèles simples mimant différents types de cellules combinées avec des techniques

spectroscopiques comme le dichroïsme circulaire peuvent révéler des informations importantes.

Deux types de vésicules ont été employés pour nos essais. En premier lieu, pour mimer les cellules eucaryotes, un mélange de 70% de 1,2-Dioléoyl-*sn*-Glycéro-3-Phosphocholine (DOPC) et 30% de cholestérol a été employé. (Figure 32) Le DOPC est souvent utilisé car il produit des petites vésicules unilamellaires neutres. Celui-ci a été utilisé pour l'étude des interactions de la gramicidine⁸¹. Par ailleurs, afin de mimer la membrane des cellules cancéreuses, un mélange de 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycéro-3-[Phospho-*rac*-(1-glycérol)] (DMPG) et de 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycéro-3-Phosphocholine (DMPC) dans une proportion 1:1 permet la construction de vésicules chargées négativement. La charge provient du DMPG qui, dans des conditions physiologiques possède une charge nette négative comme le démontre la Figure 33. Le DMPC et le DOPC sont des phospholipides zwitterioniques tandis que le cholestérol joue un rôle de modulateur de fluidité membranaire.

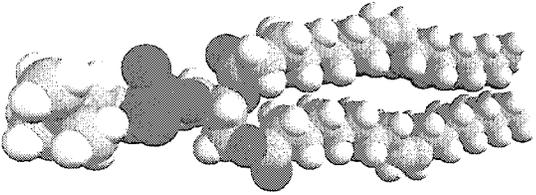
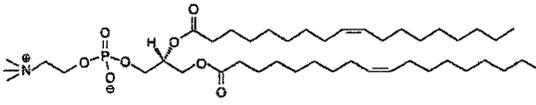
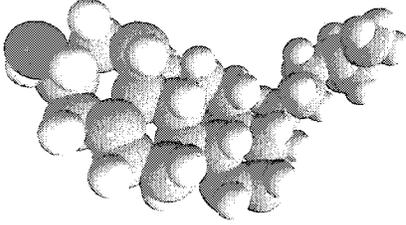
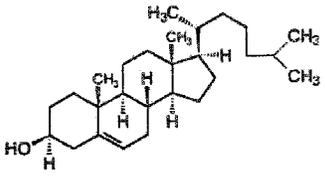
Lipide	Structure tridimensionnelle	Composition chimique
DOPC 70%		
Chol 30%		

Figure 32 : Structure des lipides formant les liposomes mimant la membrane des cellules eucaryotes normales

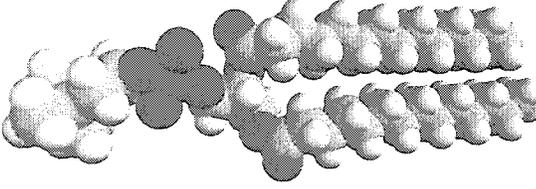
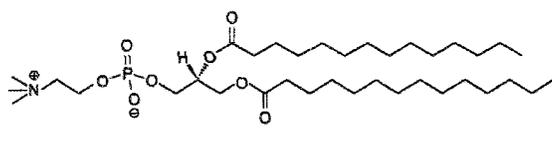
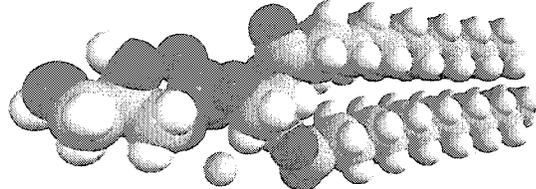
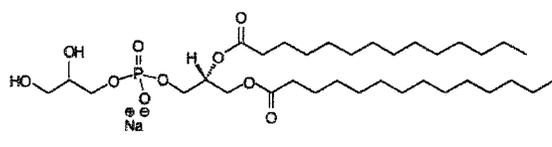
Lipide	Structure tridimensionnelle	Composition chimique
DMPC 50%		
DMPG 50%		

Figure 33 : Structure des lipides formant les liposomes mimant les cellules cancéreuses

4.2.4 Activité lytique envers les vésicules DOPC :Chol

En premier lieu, afin de mimer les membranes des cellules humaines normales, des vésicules neutres ont été construites avec du DOPC et du cholestérol (70 :30). Tous les peptides présentés au tableau 11 ont été testés à trois concentrations différentes : 0,72 μM , 1,25 μM et 12,5 μM . L'analyse des résultats sera faite principalement par rapport au composé modèle Boc-14-mère-OH **4**, celui-ci constituant le noyau cytolytique. Les neuf peptides étudiés peuvent être divisés en trois groupes principaux ; ceux dont la chaîne de types Asp/Glu se situe au *N*-terminal du 14-mère (**53**, **55**, **56**), ceux dont la chaîne se situe au *C*-terminal du 14-mère (**60**, **59**) et ceux qui ne possèdent pas de chaîne de types Asp/Glu.

Une tendance générale se dégage des résultats présentés au tableau 12. Lorsque le peptide 14-mère est substitué au *N*-terminal par des chaînes de types Asp/Glu, il y a diminution de la capacité à induire la perméabilité membranaire. Au contraire, lorsque le peptide 14-mère est substitué au *C*-terminal par des chaînes de types Asp/Glu, il y a augmentation de la capacité à induire la perméabilité membranaire. La diminution de la perméabilité sur les vésicules DOPC :Cholestérol est aussi remarquée lors de l'élimination

de la charge négative au C-terminal du Boc-14-mère-OH **4** sous forme d'ester méthylique **2** (Boc-14-mère-OMe) ou sous forme d'amide propylique **61** (Boc-14-mère-*n*-Pr). Dans ce dernier cas, la perméabilité peut diminuer de 75%. Enfin, le peptide déprotégé au N-terminal, $^+\text{NH}_3$ -14-mère-OH **5**, donc zwitterionique dans les conditions expérimentales, produit des fuites de fluorophore légèrement inférieures à ceux induites par le composé modèle **4**.

Tableau 12 : Perméabilité induite des peptides sur des vésicules DOPC :Chol (70 :30)

Peptides		Perméabilité induite (%)		
		0,72 μM	1,25 μM	12,5 μM
--	Blanc	1	2	2
5	$^+\text{NH}_3$ -14-mère-OH	77	74	80
2	Boc-14-mère-OMe	14	30	58
4	Boc-14-mère-OH	90	89	89
53	γ -Glu- γ -Glu-14-mère-OH	31	52	65
55	Glu-Glu-14-mère-OH	46	63	68
56	Glu-Asp-14-mère-OH	39	53	68
60	Boc-14-mère- γ -Glu-Glu-OH	85	86	95
59	Boc-14-mère- β -Asp-Glu-OH	75	89	95
61	Boc-14-mère- <i>n</i> -Pr	27	18	46

Sauf pour le $^+\text{NH}_3$ -14-mère-OH **5** et le Boc-14-mère-OH **4**, la concentration à laquelle les tests ont été effectués est un facteur important. Pour ces deux composés, il semble déjà y avoir une activité maximale à une concentration aussi faible que 0,72 μM . Dans presque tous les autres cas, la perméabilité induite par les peptides augmente rapidement à de faibles concentrations pour plafonner rapidement. Les graphiques de

l'intensité de fluorescence en fonction du temps pour chaque concentration testée se retrouvent en annexe.

4.2.5 Activité lytique envers les vésicules DMPC :DMPG

L'augmentation de la perméabilité des vésicules anioniques mimant les cellules cancéreuses a également été déterminée (tableau 13). Dans ce cas-ci, même à une concentration très faible (1,25 μM), les nanostructures peptidiques formées par le 14-mère modifié au *C*- ou au *N*-terminal provoquent des fuites importantes de plus de 80%. À une concentration de 12,5 μM , le Glu-Asp-14-mère-OH **56** est aussi efficace que le détergent employé, soit le Triton-X. Comme dans les essais réalisés avec des vésicules DOPC :Cholestérol, l'élimination de la charge négative du Boc-14-mère-OH **4** diminue la capacité à induire la perméabilité de plus de 40% dans les deux cas, soit Boc-14-mère-OMe **2** et Boc-14-mère-*n*-Pr **61** et ce à une concentration de 12,5 μM . Cependant, pour ces deux composés à des concentrations faibles, la lyse est inhibée (moins de 3%). La charge négative au *C*-terminal est un facteur important par rapport à l'activité lytique. Par des interactions électrostatiques défavorables, cette charge déstabilise la bicouche lipidique qui possède aussi une charge nette négative. Enfin, la déprotection du composé modèle Boc-14-mère-OH **4** en son analogue chargé positivement au *N*-terminal, $^+\text{NH}_3$ -14-mère-OH **5** n'affecte pas l'activité lytique. Les graphiques de l'intensité de fluorescence en fonction du temps pour chaque concentration testée se retrouvent en annexe.

Tableau 13 : Perméabilité induite des nanostructures peptidiques sur des vésicules DMPC :DMPG (1 :1)

Peptide	Perméabilité induite %		
	1,25 μ M	12,5 μ M	
--	Blanc	0	0
<u>5</u>	$^+$ NH ₃ -14-mère-OH	35	88
<u>2</u>	Boc-14-mère-OMe	2	48
<u>4</u>	Boc-14-mère-OH	30	89
<u>53</u>	γ -Glu- γ -Glu-14-mère-OH	81	96
<u>55</u>	Glu-Glu-14-mère-OH	83	95
<u>56</u>	Glu-Asp-14-mère-OH	81	100
<u>60</u>	Boc-14-mère- γ -Glu-Glu-OH	85	98
<u>59</u>	Boc-14-mère- β -Asp-Glu-OH	88	99
<u>61</u>	Boc-14-mère- <i>n</i> -Pr	2	34

4.3 Activité lytique des nanostructures peptidiques envers les érythrocytes

Plusieurs peptides amphiphiles possédant une activité lytique envers les liposomes sont reconnus pour provoquer l'hémolyse, c'est-à-dire la lyse des érythrocytes⁸². Les érythrocytes ont été choisis pour l'étude de l'activité envers les cellules biologiques pour plusieurs raisons. Ce sont les cellules humaines les plus simples et sont facilement isolables du plasma sanguin. De plus, ils contiennent l'hémoglobine dont la fuite est observable par spectroscopie visible⁸³. Les tests d'activité hémolytique ont été effectués dans les laboratoires du professeur Bradley Smith de l'Université Notre-Dame en Indiana.

La technique utilisée pour effectuer les expérimentations est simple. En premier lieu, les érythrocytes sont isolés par centrifugation puis lavés à l'aide d'une solution de PBS

(Phosphate Buffer Saline) froide. Par la suite, ceux-ci sont dissous dans une solution tampon de PBS au pH physiologique. Une solution contenant l'agent cytolytique est alors ajoutée. Le tout est incubé à 37°C pendant une heure. L'absorbance d'une solution centrifugée et diluée à partir de la solution mère est mesurée à 414 nm. La lyse totale est provoquée par de l'eau distillée. Le pourcentage d'hémolyse est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ hémolyse} = 100 - [(A_{100} - A)/(A_{100} - A_0) \times 100] \quad \text{Équation 2}$$

où A_{100} est l'absorbance provoquée par la lyse totale, A est l'absorbance induite par la solution contenant l'agent lytique et A_0 est l'absorbance sans agent lytique.

Les tests d'activité hémolytique ont été effectués à trois concentrations différentes de solutions peptidiques soit : 1 μM , 6 μM et 10 μM . Les résultats sont décrits au tableau suivant.

Tableau 14 : Activité hémolytique des nanostructures peptidiques

	Peptides	Hémolyse (%)		
		1 μM	6 μM	10 μM
--	Blanc (DMSO)	0 %	0 %	0 %
<u>4</u>	Boc-14-mère-OH	-2 %	<1 %	12 %
<u>53</u>	γ -Glu- γ -Glu-14-mère-OH	-1 %	<1 %	3%
<u>55</u>	Glu-Glu-14-mère-OH	1 %	<1 %	<1 %
<u>56</u>	Glu-Asp-14-mère-OH	-1 %	<1 %	<1 %
<u>60</u>	Boc-14-mère- γ -Glu-Glu-OH	0 %	15 %	45 %
<u>59</u>	Boc-14-mère- β -Asp-Glu-OH	3 %	13 %	23 %

À une concentration de 1 μM , aucun composé n'induit une fuite de l'hémoglobine. Cependant, les 14-mères modifiés au C-terminal avec des chaînes, soit Boc-14-mère- γ -Glu-Glu-OH **60** et Boc-14-mère- β -Asp-Glu-OH **59** provoquent une faible fuite de l'hémoglobine de près de 15% à 6 μM . À une concentration plus importante, 10 μM , ceux-ci provoquent une lyse un peu plus importante des érythrocytes (23 à 45%). Enfin, le composé modèle Boc-14-mère-OH **4**, produit l'hémolyse à près de 12% à 10 μM . Les peptides 14-mère possédant une chaîne de types Asp/Glu au N-terminal n'induisent pas l'hémolyse à aucune concentration testée. Il semble de plus que les nanostructures ayant un N-terminal hydrophobe (Boc) soient plus hémolytiques. Qualitativement, ces tendances sont en accord avec les résultats décrits précédemment pour la perméabilité membranaire de vésicules DOPC :Cholestérol. Cependant, les systèmes vésiculaires étant des systèmes modèles simples, plusieurs facteurs ne sont pas pris en considération.

4.4 Études conformationnelles par spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire

4.4.1 Préambule

La spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire (DC) est une technique spectroscopique d'analyse largement utilisée pour l'étude conformationnelle des molécules chirales, en particulier des peptides et des protéines. Elle permet d'étudier la conformation des acides nucléiques, des protéines et des peptides en solution dans différentes conditions. En ce qui concerne les protéines et les peptides, les spectres enregistrés au cours d'une expérience de DC contiennent des informations sur la nature des différents types de structures secondaires présentes. Il est donc possible de distinguer l'hélice α , le feuillet β , les coudes et les structures aléatoires. L'apparence générale du spectre dépend de l'organisation locale de chaque liaison peptidique; les spectres DC des molécules peptidiques mettent en évidence les transitions π - π^* et n - π^* des carbonyles.

La spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire est une technique qui s'applique aux molécules chirales en solution. Celle-ci repose sur la capacité qu'ont les structures optiquement actives d'absorber différemment la lumière polarisée circulairement à droite de la lumière polarisée circulairement à gauche⁸⁴.(Figure 34) Ceci a pour effet de déphaser

les ondes et de créer un spectre ayant un motif particulier. En dichroïsme circulaire, deux ondes polarisées, à 90° l'une de l'autre sont envoyées à travers un échantillon en solution. Étant donné que les carbonyles des structures secondaires n'absorbent pas de façon égale la lumière polarisée circulairement à droite et la lumière polarisée circulairement à gauche, ceci mène à un signal elliptique spécifique pour chaque structure secondaire. Par exemple, si le déphasage d'une seule onde est de $\pi/2$, la résultante donne un cercle (Figure 34-A). Cependant, en pratique, les deux ondes sont déphasées. Le tracé du signal entre la résultante de la lumière polarisée tournant à droite et celle tournant à gauche est donc une ellipse comme le démontre la Figure 34-B.

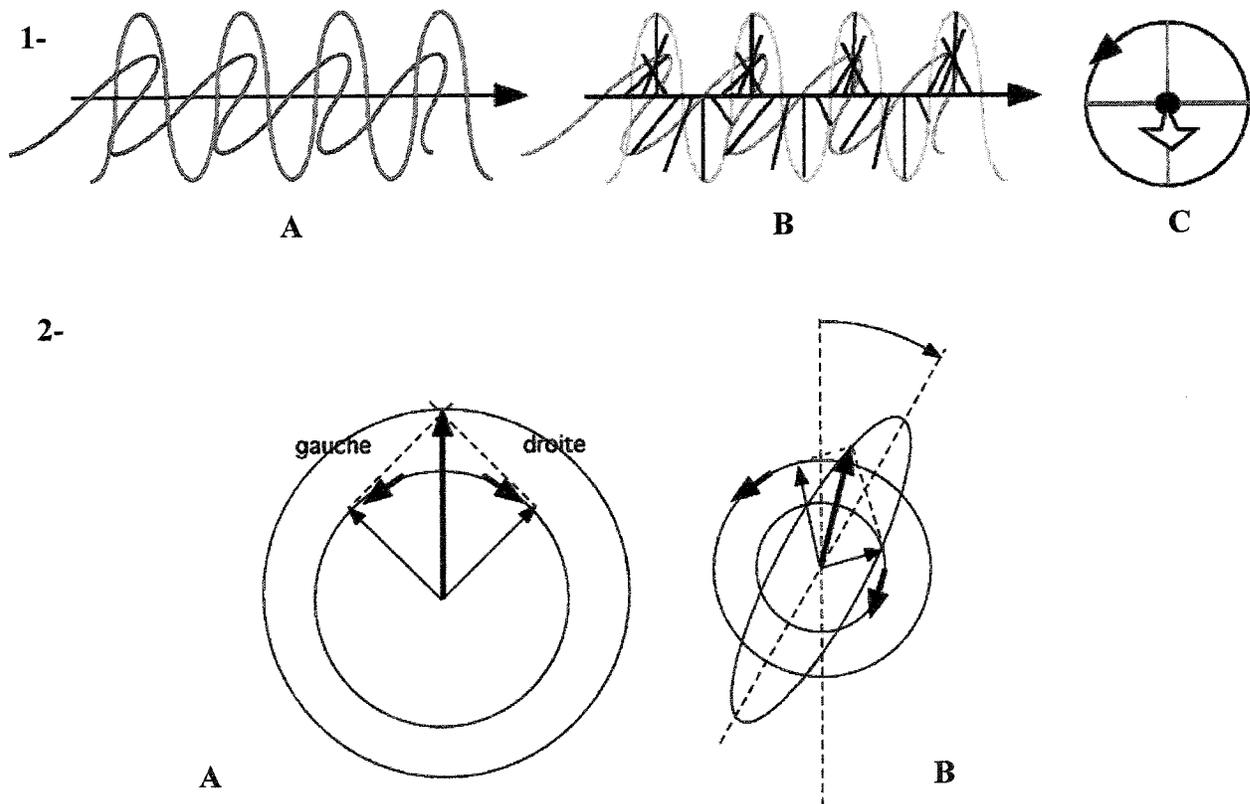


Figure 34 : 1- A) Ondes polarisés à 90° déphasés de $\pi/2$ B) Résultante C) Résultante vue de face 2- A) Polarisation vers la gauche et la droite B) Résultat de l'absorption inégale de la lumière polarisée gauche et droite : une ellipse

Dans le cas des protéines qui contiennent plusieurs types de structures secondaires, les spectres de DC représentent la somme de ces conformations. Le traitement des données par des logiciels appropriés permet une approximation de la participation des diverses structures secondaires à l'architecture tridimensionnelle. Les peptides de tailles réduites

possèdent généralement une seule structure, donc la courbe de DC donne directement leur conformation majoritaire. L'allure générale du spectre ainsi que les bandes caractéristiques permettent d'évaluer la structure secondaire majoritaire soit : l'hélice α , le feuillet β , ou une forme aléatoire (Figure 35). Le dichroïsme circulaire est généralement exprimé en ellipticité molaire $[\theta]$, c'est-à-dire en degré-centimètre carré par décimole ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}$).

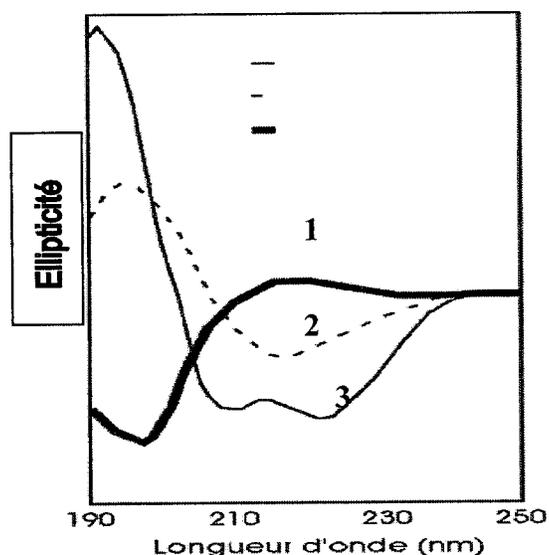


Figure 35 : Courbes de DC associées aux structures secondaires suivantes : 1- Aléatoire 2- Feuillet β et 3- Hélice α

4.4.2 Résultats des études de spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire

Tous les peptides ayant été utilisés pour les tests d'activité ont été étudiés par dichroïsme circulaire dans les mêmes conditions. La concentration des solutions utilisées est de 0,283 mM. Chaque peptide a été dissous dans le trifluoroéthanol et les mesures sont prises entre 190 et 250 nm.

Les résultats démontrent que toutes les nanostructures peptidiques synthétisées adoptent préférentiellement une structure en hélice α (Figure 36). Comme pour l'activité lytique, il est cependant possible de les diviser en trois groupes : ceux dont la chaîne de types Asp/Glu se situe au *N*-terminal du 14-mère (53, 55, 56), ceux dont la chaîne se situe au *C*-terminal du 14-mère (60, 59) et ceux qui ne possèdent pas de chaîne de types Asp/Glu

(5, 2, 4, 61). Comme nous l'avions présumé, la présence d'acide glutamique et d'acide aspartique au *N*- ou au *C*-terminal du 14-mère augmente l'hélicité. Cet effet est encore plus prononcé pour les peptides possédant leur chaîne au *N*-terminal 53, 55, 56. L'ester méthylique et l'amide propylique au *C*-terminal ont aussi pour effet d'augmenter l'hélicité (2, 61) tel qu'observé par l'augmentation de la bande à 224 nm. Par contre, la déprotection du groupement Boc du 14-mère produit un peptide chargé positivement au *N*-terminal 5 ce qui défavorise la structure en hélice en faveur du feuillet β . La figure 36 présente les études de DC effectuées sur les nanostructures peptidiques synthétisées. Ces résultats, en complément de ceux obtenus lors des expériences de perméabilité membranaire, permettront de déterminer la relation entre la structure et l'activité des peptides.

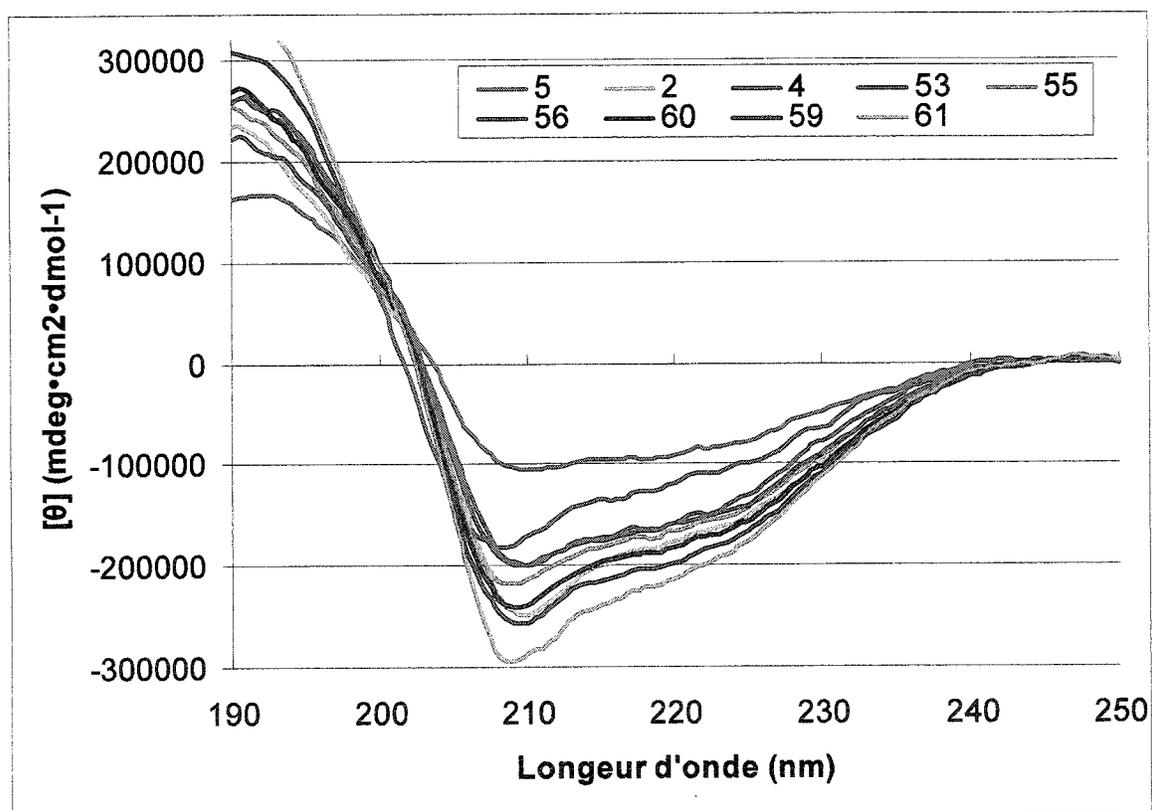


Figure 36: Courbes de DC associées aux nanostructures peptidiques synthétisées dans le TFE à 0,28 mM

4.5 Relation entre la structure et l'activité lytique

Les résultats obtenus démontrent clairement que l'augmentation de la perméabilité membranaire des peptides dépend de plusieurs facteurs. La composition de la bicouche lipidique joue un rôle important. En ce qui concerne les vésicules formées par 70% de DOPC et de 30% de cholestérol, la relation entre la structure et l'activité lytique peut être établie. Premièrement, la corrélation entre la structure hélicoïdale et l'activité lytique ne semble pas être directement reliée. Par exemple, le Boc-14-mère-*n*-Pr **61** possède la structure en hélice α la plus prononcée mais l'activité lytique la plus faible (46% à 12,5 μ M). Au contraire, le $^+$ NH₃-14-mère-OH **5** dont la structure en hélice α est la plus faible, possède une activité lytique de plus de 80%. Toutefois, pour ce qui est des peptides 14-mère modifiés au *N*- ou au *C*-terminal (**53**, **55**, **56**, **60**, et **59**) une structure en hélice α plus prononcée correspond à une plus grande activité lytique. Tous les peptides possédant leur chaîne au *N*-terminal (**53**, **55**, et **56**) ont un caractère d'hélice α moins prononcé, et par le fait même, une activité lytique moins importante. Cependant, d'autres facteurs doivent être pris en considération. La charge positive au *N*-terminal des peptides semble être d'une importance mineure dans la lyse de ces vésicules. Ceci se confirme par les profils de perméabilité membranaire du Boc-14-mère-OH **4** et du $^+$ NH₃-14-mère-OH **5**, qui sont pratiquement identiques. Toutefois, en plus de la conformation, la différence d'activité lytique peut être reliée à la polarité au *C*-terminal. L'activité lytique se trouve fortement diminuée pour les peptides ne possédant pas de charge négative négative soit Boc-14-mère-OMe **2** et Boc-14-mère-*n*-Pr **61**, tandis que leur analogue Boc-14-mère-OH **4** démontre une activité lytique élevée. De plus, si l'hydrophilicité au *C*-terminal est augmentée par l'ajout d'acides aminés anioniques, il résulte une lyse membranaire quasi totale.

Les résultats de lyse obtenus démontrent que les vésicules DMPC : DMPG (1 :1) sont plus déstabilisées par les peptides étudiés, à l'exception de ceux ne présentant aucune charge au *C*-terminal (Boc-14-mère-OMe **2** et Boc-14-mère-*n*-Pr **61**). Comme dans le cas précédent, il est très difficile de relier la structure en hélice α donnée par les spectres DC et l'activité lytique. Même si cette structure est plus importante pour les peptides 14-mère modifiés au *C*-terminal (**60**, et **59**) que pour ceux modifiés au *N*-terminal (**53**, **55**, et **56**) leur profil de perméabilité membranaire est semblable. À des concentrations aussi faibles que

1,25 μM , les deux groupes induisent fortement la lyse de ce type de vésicule. Le fort caractère hydrophile des peptides face à des vésicules anioniques peut expliquer ces résultats. Encore une fois, la charge négative au niveau du C-terminal joue un rôle primordial. Lorsque celle-ci est absente (Boc-14-mère-OMe **2** et Boc-14-mère-*n*-Pr **61**), on observe une chute drastique de l'activité lytique. La perméabilité membranaire devient même nulle à une concentration de 1,25 μM . Au contraire, la charge positive au N-terminal n'a aucune influence sur l'activité lytique.

La structure en hélice α peut jouer un rôle par rapport à l'activité hémolytique mais ne semble pas être un facteur déterminant. Néanmoins, deux des composés qui ont une activité biologique (Boc-14-mère- γ -Glu-Glu-OH **60** et Boc-14-mère- β -Asp-Glu-OH **59**) possèdent les structures en hélice α les plus prononcées. Une portion hydrophile à l'extrémité C-terminale, combinée avec l'absence de charge positive, provoque l'augmentation de l'hémolyse. Au contraire, l'inhibition de l'activité cytolitique peut se faire par l'ajout de chaîne hydrophile de type Asp/Glu à l'extrémité N-terminale du 14-mère. Par ailleurs, l'addition de chaînes de types Asp/Glu diminue l'hydrophobicité totale des peptides. Des études récentes ont cependant démontré que l'augmentation de l'hydrophobicité conduisait à l'accroissement de l'activité cytolitique des cellules eucaryotes⁸³. Ceci permet d'expliquer en partie l'activité hémolytique relativement faible des nanostructures peptidiques synthétisées. La forte diminution de l'activité hémolytique rend les nanostructures encore plus intéressantes pour le développement de nanothérapeutiques.

4.6 Conclusion

La capacité des nanostructures peptidiques synthétiques à lyser les vésicules mimant les cellules cancéreuses et normales ainsi que l'activité hémolytique a été étudiée. La spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire a permis de connaître la structure secondaire de ces peptides. Il a donc été possible de clarifier la relation entre la structure et l'activité lytique des peptides. À la lumière de ces résultats, plusieurs caractéristiques jouent un rôle important en ce qui concerne l'activité lytique et hémolytique comme : la structure

secondaire, la polarité des extrémités *N*- et *C*-terminaux, l'hydrophobicité totale et partielle des molécules et la composition de la membrane.

Il a été démontré que les activités lytique et hémolytique peuvent être modulées et même inhibées par la modification du *C*- et/ou du *N*-terminaux du peptide 14-mère. Il y a donc possibilité de développer de nouveaux agents nanochimiothérapeutiques anticancéreux ayant des modes d'action inédits. Ceci pourrait être réalisé par l'approche pro-drogue en utilisant la PSMA comme cible biologique.

CHAPITRE 5 :

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET TRAVAU FUTURS

5.1 Conclusions générales

Les peptides lytiques perturbateurs membranaires sont ubiquitaires dans la nature. Ils ont été isolés à partir d'une grande variété de vertébrés et d'invertébrés. Ceux-ci sont cependant complexes et l'étude de la relation entre leur structure et leur activité en est difficile.

Dans ces travaux, nous avons fait le design, la synthèse et la caractérisation de plusieurs peptides modèles de 14 à 18 acides aminés. Par la suite, des tests d'activité lytique et des études conformationnelles ont été effectués. Ces résultats ont permis de déterminer certaines caractéristiques nécessaires afin de moduler l'activité biologique envers différents types de vésicules phospholipidiques et de cellules humaines. Ainsi, en modifiant l'extrémité C- ou N-terminale du Boc-14-mère-OH **4** par l'ajout de chaînes composées d'acides aspartiques et/ou d'acides glutamiques par exemple, il est possible de diminuer considérablement l'activité lytique des nanostructures peptidiques.

La synthèse des composés s'est effectuée sur support solide en combinaison avec la synthèse en solution. La stratégie initiale prévoyait pratiquement exclusivement l'utilisation du support solide, cependant la fixation de l'acide aspartique et de l'acide glutamique a soulevé plusieurs problèmes. Quelques réactions secondaires peuvent être observées lors du couplage peptidique pour ces deux résidus. Les chaînes de types Asp/Glu ont donc été synthétisées en solution puis couplées au 14-mère.

5.2 Travaux futurs

Comprendre la relation entre la structure et l'activité des peptides lytiques permet le design d'analogues possédant des applications thérapeutiques inédites. De plus, les peptides lytiques membranaires peuvent être utilisés pour le traitement du cancer. En plus de permettre l'inhibition de l'activité lytique du 14-mère, l'acide aspartique et de l'acide glutamique ont été utilisés dans un but précis ; cibler les cellules cancéreuses de la prostate au détriment des cellules saines.

Les travaux futurs seront donc d'effectuer des tests d'activité anticancéreuse en utilisant un système modèle, soit la PSMA. Cette enzyme constitue une excellente cible thérapeutique car elle est transmembranaire et son domaine catalytique est extracellulaire. De plus, ses fonctions catalytiques et sa sur-expression au niveau des cellules cancéreuses de la prostate en font une cible de choix pour la stratégie pro-drogue.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

1. Remarques générales

Les solvants et réactifs ont été traités ou purifiés de la façon suivante :

- Dichlorométhane (DCM), distillé
- Diméthylformamide (DMF), dégazé à l'azote
- Eau, distillé, déionisée et filtrée sur membrane 0,45 µM
- Tétrahydrofurane (THF), distillé sur Na/benzophénone
- Hexanes, distillé
- Diisopropyléthylamine (DIEA), distillé sur KOH
- Triéthylamine (TEA), distillé sur KOH
- N-méthyl-pyrrolidone (NMP), distillé sur KOH

Les solvants suivants utilisés directement :

- Méthanol, qualité spectroscopique (Omnisolv® , EM Science)
- Acétonitrile (ACN), qualité spectroscopique (Optima, Fisher)
- Éther diéthylique, réactif ACS (BDH)
- Éther de pétrole, réactif ACS (BDH)
- Acétone, réactif ACS (BDH)
- Chloroforme, qualité spectroscopique (Aldrich)

Les spectres de résonance magnétique du proton (RMN ^1H) ont été enregistrés avec un appareil Varian Innova 400. Les déplacements chimiques sont rapportés en partie par million (ppm). Le standard interne est le pic résiduel du solvant. Les abréviations suivantes ont été utilisées dans l'interprétation des spectres :

CDCl_3 : Chloroforme deutéré

δ : déplacement chimique

s : singulet

d : doublet

t : triplet

q : quadruplet

dd : doublet de doublet

m : multiplet ou massif

j : constante de couplage

Les spectres de masse (SM) pour les peptides ont été enregistrés sur un spectromètre Perkin Elmer API-III triple Quadripole (ES et MALDI, University of Toronto) et pour les molécules de faibles masses sur un spectromètre de masse ZAB-IF VG (IE et IC, Université de Sherbrooke). Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil Gallenkamp de design enregistré #889339.

Les analyses et les purifications de peptides ont été réalisées avec un appareil de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) Hewlett Packard HP 1050 muni d'un détecteur spectroscopique à diodes en réseau et à l'aide de colonnes à phase inverse Vydac (C-4 analytique 0,46 cm x 25 cm) et Phenomenex (C-4 semi-préparative 2,5 cm x 25 cm). Tous les éluants ont été additionnés de 0,1% d'acide trifluoroacétique. Les tests HPLC analytiques ont été réalisés au débit de 1 mL/min avec les gradients suivants : colonne C-4 ; eau : 90→0, MeCN : 5→50 , *i*-PrOH : 5→50 en 45 min. Les séparations HPLC semi-

préparatives ont été réalisées au débit de 5 mL/min avec les gradients d'éluants suivants :
A) colonne C-4 ; eau : 90→0, MeCN : 5→50 , *i*-PrOH : 5→50 en 45 min.

Les mesures spectrophotométriques ont été réalisées sur un spectrophotomètre UV-visible Hewlett Parkard HP 8452-A. Les expériences de fluorescence ont été réalisées avec un spectrofluorimètre Varian Carey Eclipse muni d'un dispositif d'agitation. Les études de dichroïsme circulaire ont été réalisées à l'aide d'un spectropolarimètre Jasco J-710, en utilisant des cellules cylindriques en quartz possédant des chemins optiques variant de 0,01 à 0,05 cm.

Les chromatographies éclair sur colonne ont été réalisées en utilisant un gel de silice de maille 230-400 (Silicycle) comme adsorbant et une pression positive d'azote. Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur des plaques de gel de silice de 0,25 mm d'épaisseur (Merck 60 F₂₅₄). Les composés ont été détectés à l'aide d'une exposition à la lumière ultraviolette ou aux révélateurs suivants : ninhydrine, acide phosphomolybdique, ou nitrate d'ammonium cérique.

Les acides aminés ont été achetés chez Advanced Chemtech ou chez Matrix Innovation. Les phospholipides DOPC, DMPG, DMPC et le cholestérol ont été obtenus d'Avanti Polar Lipids. La calcéine provient de Molecular Probes. Tous les autres produits chimiques sont de source Aldrich.

Le bain à ultrasons utilisé est un appareil de modèle Branson 3510.

Les autres abréviations utilisées sont :

éq. : équivalent

g : gramme

h : heure

IC : ionisation chimique

IE : ionisation électronique

ES : electrospray

L : litre

M^+ : ion moléculaire

min : minute

mol : mole

P_f : point de fusion

Rdt : rendement

R_t : temps de rétention

sec : seconde

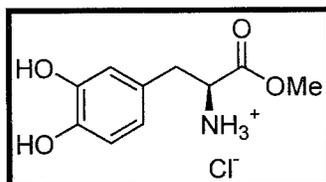
t.p. : température de la pièce

2. SYNTHÈSES

2.1 Synthèses en solution de la L-Dopa modifiée par un éther 21-couronne-7

2.1.1 Protection de la L-DOPA

L'ester méthylique de la L-3,4-dihydroxyphénylalanine·HCl⁸⁵ 12.1



HCl·L-DOPA-OCH₃ 12.1

À 0°C, on ajoute goutte à goutte le SOCl₂ (302,45 g ; 2,5 moles) dans 1,5 L de méthanol anhydre (séché sur sulfate de magnésium anhydre) sur une période de 1 h. De la L-DOPA 12 (200 g ; 1 mole) est ajoutée par petites fractions dans la solution. On laisse le milieu revenir à la température de la pièce et on agite pendant 48 h. On évapore le méthanol à sec et on triture à l'éther. On obtient 251,12 g d'un solide blanc.

Rendement : 100%

Pf : 172-175°C (litt : 172-174°C⁸⁵)

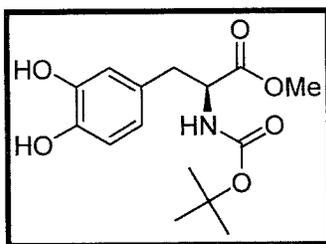
[α]_D = + 7,54 (c = 1, MeOH) (litt : 7,80⁸⁵)

Spectre de masse (IE): 211 = M⁺

RMN ¹H (CDCl₃)

δ	Intégration	Multiplicité	Assignation	Couplage
2,87-3,04	2H	M	CH ₂ (β)	---
3,67	3H	S	OCH ₃	---
4,07-4,11	1H	M	CH(α)	---
6,42-6,46	1H	M	H _{arom} (H ₆)	---
6,59	1H	S	H _{arom} (H ₂)	---
6,68	1H	M	H _{arom} (H ₅)	---
8,61	1H	D	NH	14,6 Hz
8,96	2H	S	OH	---

L'ester méthylique de la N^α-*t*-butyloxycarbonyl-3,4-dihydroxyphényl-L-alanine⁸⁵ **13**



Boc-L-DOPA-OCH₃ 13

On dissout la HCl.L-Dopa-OCH₃ **12.1** (250,12 g ; 1 mole) dans 250 mL de tétrahydrofurane et le mélange est refroidi à 0°C. On additionne alors, sur une période de 15 min, la triéthylamine (101,20g ; 1 mole) par portion de 3-5 mL. Le mélange passe d'une coloration blanche à une coloration mauve pendant l'addition. On agite 5 minutes et on ajoute goutte à goutte une solution de di-*t*-butyldicarbonate (218,42 g ; 1 mole) dissous dans 100 mL de tétrahydrofurane. On laisse agiter à la température de la pièce pendant 24 h. On filtre le précipité. On évapore le tétrahydrofurane à sec, et on dissout le mélange dans 150 mL de dichlorométhane. Le mélange réactionnel est lavé 2 fois avec de l'eau. On récupère la phase organique et on sèche sur MgSO₄ anhydre. On évapore le solvant et on triture à l'éther. On obtient 304,67 g d'un solide blanc.

Rendement : 96%

P_f : 132-135°C (litt : 133-135°C⁸⁵)

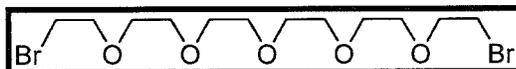
[α]_D = + 7,44 (c = 1, MeOH) (litt : 7,60⁸⁵)

Spectre de masse (IC): 312 = (M+H)⁺

RMN ¹H (CDCl₃)

δ	Intégration	Multiplicité	Assignment	Couplage
1,33	9H	s	-butyl	---
2,83-2,98	2H	m	CH _{2(β)}	---
3,68	3H	s	OCH ₃	---
4,43-4,53	1H	m	CH _(α)	---
4,96-5,05	1H	d	NH	7,7 Hz
6,46-6,50	1H	m	H _{arom} (H ₅)	---
6,58-6,74	2H	m	H _{arom} (H ₂ et H ₆)	---

Le dibromure d'hexaéthylène glycol⁸⁵ 14



Br-(CH₂CH₂O)₅-CH₂CH₂-Br 14

On dissout la triphénylphosphine (83,6 g; 318,9 mmol) dans 330 mL d'acétonitrile et on refroidit à 0°C. On maintient la réaction sous atmosphère inerte (N₂) et on additionne le brome (50,7 g; 318,9 mmol) goutte à goutte sur une période d'une heure. On forme ainsi, *in situ*, le dibromotriphénylphosphorane. On ajoute au mélange réactionnel, en maintenant la température à 0°C, l'hexaéthylène glycol (45,0 g; 159,4 mmol) dissous dans 50 mL d'acétonitrile. On laisse agiter pour 48 h à la température de la pièce. On filtre le précipité blanc (l'oxyde de triphénylphosphine) et on évapore le solvant à sec. On extrait le dibromohexaéthylène glycol avec l'hexane et on évapore l'hexane. On obtient 50,3 g d'huile incolore.

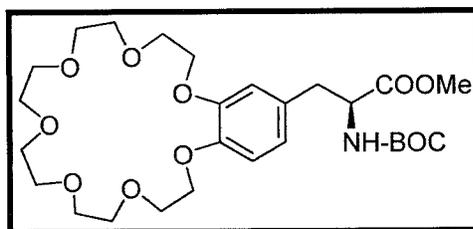
Rendement 82%

IR: 2740, 1460, 1350, 1250, 1120 cm⁻¹

RMN ¹H (CDCl₃)

δ	Intégration	Multiplicité	Assignation	Couplage
3,43-3,47	4H	t	CH ₂ en α de Br	6,5 Hz
3,63	16H	m	CH ₂ aliphatiques	---
3,75-3,81	4H	t	CH ₂ en β de Br	6,5 Hz

L'ester méthylique de la N^α-*t*-butyloxycarbonyl-3,4-(21-couronne-7)-L-phénylalanine⁸⁵ **15**



Boc-EC₂₁₋₇-OCH₃ 15

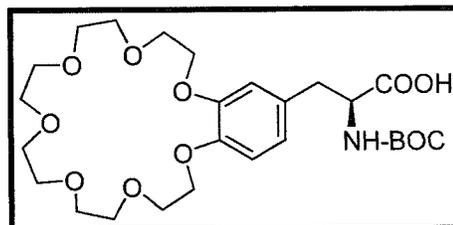
Sous atmosphère inerte (N₂), on dissout le N- -Boc-L-DOPA-OCH₃ **13** (38,1 g ; 122,5 mmol) et le carbonate de césium (39,9 g ; 122,5 mmol) dans 1,3 L de diméthylformamide dégazé à 60°C. Par la suite, on ajoute lentement sur une période d'une heure, une solution de dibromure d'hexaéthylène glycol **14** (50,0 g ; 122,5 mmol) dissous dans 300 mL de diméthylformamide dégazé et on laisse agiter 24 h en maintenant la température 60°C. On évapore le diméthylformamide sous pression réduite à 45°C et on dissout le mélange réactionnel dans 400 mL de dichlorométhane. On lave la phase organique trois fois avec une solution aqueuse de NaOH 1M et de NaCl saturé, puis trois fois avec de l'eau distillée. On récupère la phase organique et on sèche avec du MgSO₄ anhydre. On évapore le solvant et on obtient une huile brun foncé. On purifie l'huile obtenue par chromatographie sur colonne de silice en utilisant comme éluant une solution de dichlorométhane avec 10%(v/v) de méthanol. L'huile obtenue est triturée avec un mélange éther de pétrole/éther (10:1) pour obtenir 48,7 g de solide blanc.

Rendement : 70%, P_f : 64-66°C (litt : 66-67°C⁸⁵) [α]_D = + 3,91(c =1, MeOH)(litt : 4,2⁸⁵)

RMN ¹H (CDCl₃)

δ	Intégration	Multiplicité	Assignation	Couplage
1,40	9H	s	-butyl	---
2,92-2,98	2H	m	CH ₂ (β)	---
3,65	3H	s	OCH ₃	---
3,62-3,77	16H	m	CH ₂ macrocyle	---
3,82-3,86	4H	m	CH ₂ -CH ₂ -O-C ₆ H ₃	---
4,08-4,11	4H	m	CH ₂ -CH ₂ -O-C ₆ H ₃	---
4,52	1H	m	CH(α)	---
4,92	1H	d	NH	7,9 Hz
6,58-6,63	2H	m	H _{arom} (H ₅ et H ₆)	---
6,78	1H	m	H _{arom} (H ₂)	---

N^α-*t*-butyloxycarbonyl-3,4-(21-couronne-7)-L-phénylalanine⁸⁶ 11



Boc-EC₂₁₋₇-OH 11

On solubilise l'ester 15 (47,7 g ; 85,8 mmol) dans un minimum de méthanol (150 mL) et on refroidit à 0°C. Puis on ajoute lentement 200 mL de NaOH 1M, et on laisse le mélange se réchauffer à la température ambiante. On agite sur une période de 2 h à 25°C. La solution alcaline est lavée avec de l'éther, puis acidifiée à 0°C jusqu'à pH=3-4 avec de l'acide chlorhydrique 1M. On extrait l'acide avec le dichlorométhane et on lave la phase organique avec de l'eau, puis on sèche sur MgSO₄ anhydre. On évapore le solvant et on triture à l'éther 2 ou 3 fois. On obtient 42,7 g de solide blanc.

Rendement : 90%

P_f : 68-70°C (litt : 69-71°C⁸⁵)

[α]_D : +9,03 (c=1 ; CH₃OH) (litt : + 10,2⁸⁵)

Spectre de masse (IC): 561 = (M + NH₄)⁺

RMN ¹H (CDCl₃)

δ	Intégration	Multiplicité	Assignation	Couplage
1,40	9H	s	-butyl	---
2,99	2H	m	CH ₂ (β)	---
3,60-3,78	16H	m	CH ₂ macrocyle	---
3,85	4H	m	CH ₂ -CH ₂ -O-C ₆ H ₃	---
4,07	4H	m	CH ₂ -CH ₂ -O-C ₆ H ₃	---
4,48	1H	m	CH(α)	---
4,95	1H	d	NH	7,9 Hz
6,60-6,65	2H	m	H _{arom} (H ₅ et H ₆)	---
6,78	1H	m	H _{arom} (H ₂)	---

2.2 Synthèse sur support solide

La synthèse sur support solide concerne exclusivement les peptides. Nous décrivons tout d'abord l'approche générale, qui se décompose en trois parties :

- la synthèse d'un segment heptapeptidique
- le clivage pour l'obtention d'un 7-mère acide
- la condensation de ce segment sur support solide
- le clivage final pour l'obtention d'un 14-mère acide

Toute modification apportée à cette approche, pour la synthèse d'un peptide particulier, sera spécifiée.

2.2.1 Synthèse peptidique sur support solide (SPSS)

2.2.1.1 Fixation du premier acide aminé

Nous introduisons la résine oxime **16** (5g), possédant un taux de substitution approximatif de 0,4 mmol/g, dans une ampoule munie d'un verre fritté à une extrémité et d'un bouchon en téflon. La résine est gonflée au DCM (100 mL) puis, lavée avec ce même solvant (2 x 100 mL). Nous dissolvons de la BOC-Leu.H₂O (2,5 g, 10 mmol, 5éq) dans un mélange DCM-DMF 1 :1 (80 mL) et amenons la solution à 0°C. Nous additionnons du DIC (1,57 mL, 10 mmol) et agitons pendant 30 min. La suspension est versée dans l'ampoule et nous mettons sous agitation mécanique pendant 24 h. À la fin, le contenu de l'ampoule est filtré par succion.

2.2.1.2 Séquence de lavages

La résine est agitée successivement en présence des solvants suivants : DMF (3 x 100 mL) ; méthanol (3 x 100 mL) ; DMF (3 x 100 mL) ; méthanol (3 x 100 mL). Puis elle est séchée exhaustivement sous vide poussé.

2.2.1.3 Détermination du taux de substitution

Nous utilisons le test quantitatif de Kaiser à la ninhydrine⁷². Dans un tube Isolab® contenant 25 mg de la résine on ajoute une solution de TFA/DCM 1:1 et on agite pendant 30 minutes à 25°C. Après filtration, on procède au protocole 2.2.1.2. La résine est lavée 2X avec une solution DIEA/DCM 1:10, et séchée sur la pompe. On pèse avec précision 2X 5 mg de résine qui sont déposés dans des éprouvettes. À chaque éprouvette on ajoute : 40 µL d'une solution 5% ninhydrine/éthanol, 50µL d'une solution phénol/éthanol 400%(v/v) et 100 µL d'une solution KCN/pyridine. Les éprouvettes sont chauffées pendant 10 minutes à 100°C. Par la suite on ajoute 1 mL d'éthanol 60% et les éprouvettes sont portés au Vortex et le tout est filtré. La résine est lavée 2X avec une solution de chlorure de triéthylammonium et on jauge le filtrat à 25 mL avec de l'éthanol 60%. L'absorbance est observée à 570 nm en faisant le zéro avec la solution témoin. On détermine un taux de substitution variant entre 0,38 et 0,42 mmol/g de résine sèche à l'aide des équations suivantes :

$$\# \text{mmol d'amine} = \text{Abs.} \times 25 \text{ mL} / 15750 \mu^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm}$$

$$\text{Taux de substitution} = \text{mmol d'amide} / \text{g de résine}$$

2.2.1.4 Acétylation des sites non-substitués

La résine est gonflée au DMF (100 mL) puis, lavée avec ce même solvant (2 x 100 mL). On introduit dans l'ampoule un mélange anhydride acétique-DMF 1 :1 (80 mL) et de

la DIEA (1 mL, 5,75 mmol). On place sous agitation mécanique pendant 2 h. À la fin, le contenu de l'ampoule est filtré par succion.

2.2.1.5 Séquence de lavages

Cette étape est identique à l'étape 2.2.1.2

2.2.1.6 Déprotection de la fonction amine du dernier acide aminé fixé

La résine est gonflée au DCM (100 mL) puis, lavée avec ce même solvant (2 x 100 mL). Nous introduisons dans l'ampoule un mélange TFA-DMF 1 :1 (80 mL) et mettons sous agitation mécanique pendant 30 min. À la fin, le contenu de l'ampoule est filtré par succion.

2.2.1.7 Séquence de lavages

Cette étape est identique à l'étape 2.2.1.2

2.2.1.8 Couplage de l'acide aminé suivant

La résine est gonflée au DMF (100 mL) puis, lavée avec ce même solvant (2 x 200 mL). Nous dissolvons le BOC-aminoacide (10 mmol, 5 éq. ou 6 mmol, 3 éq., dans le cas du composé **11**) dans une mélange DCM-DMF 1 :1 (80 mL) et amenons la solution à 0°C. Nous additionnons du DIC (1,57 mL, 10 mmol ou 0,94 mL, 6 mmol, dans le cas du composé **11**) et agitons pendant 10 min. Puis, nous ajoutons de l'HOBt.H₂O (1,35 g, 10 mmol ou 0,81 g, 6 mmol, dans le cas du composé **11**) et agitons pendant 30 min supplémentaires. Nous introduisons la suspension dans l'ampoule, ajoutons de la DIEA (0,70 ml, 2 éq.) et mettons sous agitation mécanique pendant 2 h. À la fin, le contenu de l'ampoule est filtré par succion.

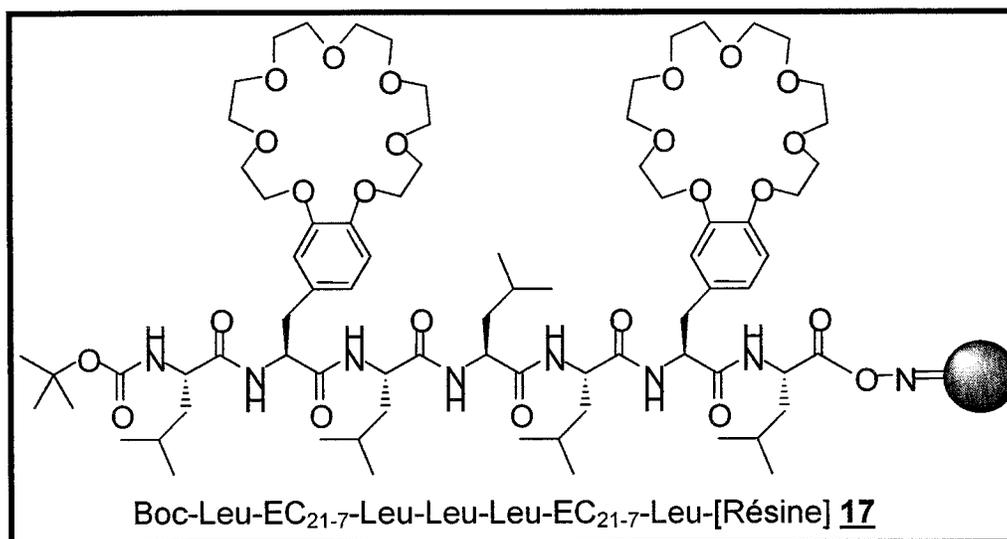
2.2.1.9 Séquence de lavages

Cette étape est identique à l'étape 2.2.1.2.

2.2.1.10 Détermination de l'efficacité du couplage

Nous utilisons le test qualitatif de Kaiser à la ninhydrine. Pour les cas où le test est négatif, nous reprenons à l'étape 9.

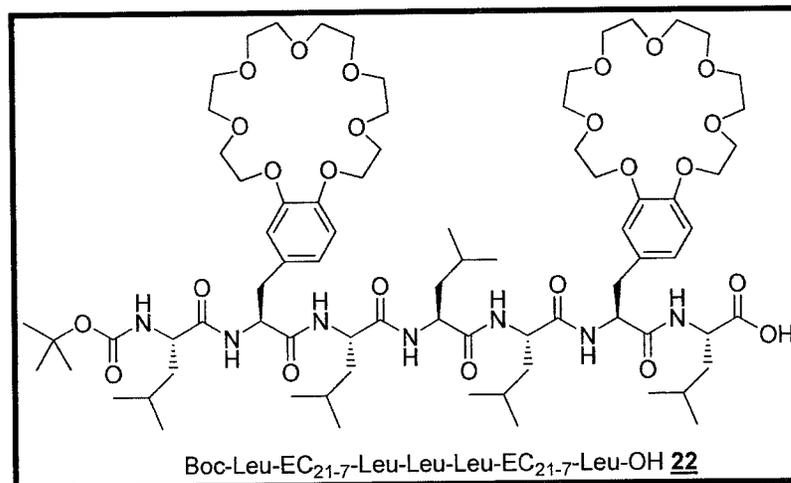
2.2.1.11 Couplage des acides aminés suivant pour l'obtention du 7-mère sur support solide



Les étapes 2.2.1.7 à 2.2.1.10 sont effectuées 6 fois pour l'obtention de l'heptapeptide.

2.2.1.12 Clivage du segment heptapeptidique pour l'obtention du 7-mère acide⁸⁷ **22**

N-*t*-Butyloxycarbonyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucine **22**



Les volumes de solvants ne sont donnés qu'à titre indicatif pour l'équivalent de 3,75 g de résine sèche et varient en fonction de la quantité de résine mise en œuvre. Les équivalents s'entendent par rapport à la quantité de peptide fixé sur la résine, estimée par mesure du taux de substitution.

Seulement $\frac{3}{4}$ de la résine contenant le 7-mère est utilisée. On gonfle la résine au THF (100 mL) puis on lave avec ce même solvant (2 x 100 mL). On introduit dans l'ampoule un mélange THF-eau 9 :1 (80 mL). Nous agitons mécaniquement pendant 15 min. Puis, nous ajoutons du DBU (2 équ.) dans l'ampoule et mettons sous agitation mécanique pendant 4 h. À la fin, le contenu de l'ampoule est filtré par succion. La résine est lavée plusieurs fois au DCM et au méthanol. Le filtrat est récupéré et les solvants sont évaporés sous vide. Le résidu est repris par du DCM (50 mL) puis lavé par du HCl 0,5 N (2 x 50 mL) et avec une solution saturée en NaCl (50 mL). On sèche la phase organique sur MgSO₄ anhydre et le solvant est évaporé sous vide. On triture à l'éther anhydre pour obtenir le peptide **22** désiré sous la forme d'une fine poudre blanche. La pureté est déterminée par HPLC et estimée supérieure à 95%. Le produit sera utilisé tel quel pour la suite des synthèses.

Spectre de masse (MALDI) : m/z 1534,87 = (M+H)⁺, 1558,04 = (M+Na)⁺,

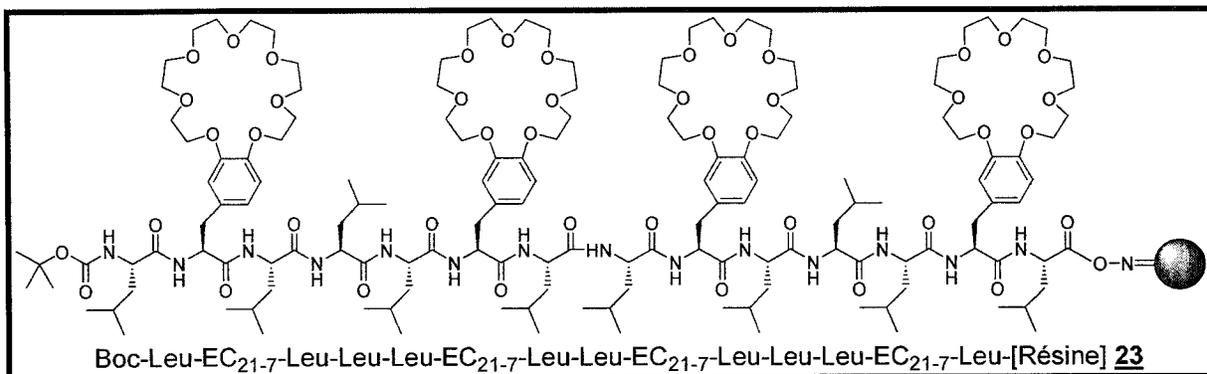
1574,02 = (M+K)⁺

HPLC analytique : R_t = 24,04 min

RMN ¹H (CDCl₃)

	Intégration	Multiplicité	Assignment	Couplage
1,22-1,63	24H	m	5 CβH ₂ Leu, 5 CγH Leu, 9 H -Bu	---
2,49-3,00	4H	m	CH _{2(β)} EC ₂₁₋₇	---
3,44-3,64	32H	m	CH ₂ -O	---
3,65-3,79	8H	m	CH ₂ -CH ₂ -O-C ₆ H ₃	---
3,84	1H	m	CH _(α) Boc-Leu	---
3,90-4,10	8H	m	CH ₂ -CH ₂ -O-C ₆ H ₃	---
4,20-4,33	4H	m	CH _(α) Leu	---
4,48-4,50	2H	m	CH _(α) EC ₂₁₋₇	---
6,63-6,77	6H	m	H Aromatique	---
7,65	1H	d	NH	7,8
7,72	1H	d	NH	7,9
7,86	1H	d	NH	8,0
7,98	1H	d	NH	7,8
8,05	1H	d	NH	8,3
8,15	1H	d	NH	8,0

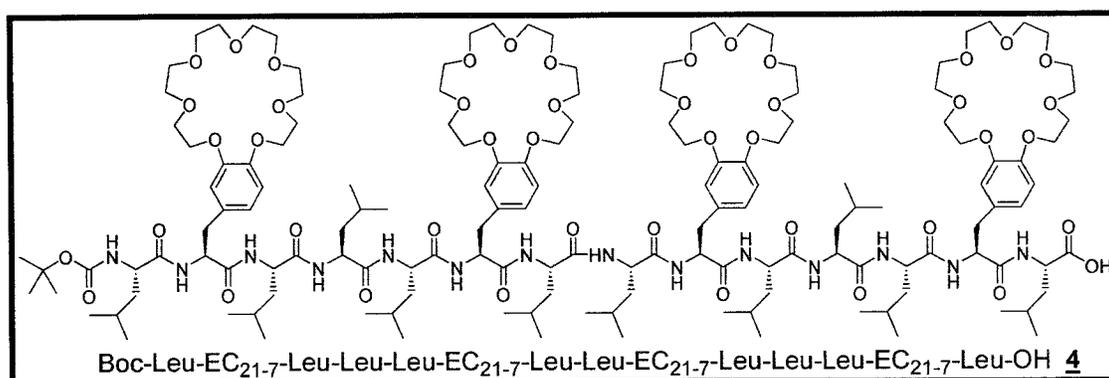
2.2.1.13 Condensation de segments sur support solide pour l'obtention du 14-mère sur résine (CSSS)⁸⁸ **23**



Le dernier $\frac{1}{4}$ de résine contenant le peptide non-clivé sert de support solide lors de la condensation de segments. Ceci est la stratégie générale utilisée pour la condensation de deux segments. Nous déposons la résine (1 g) supportant le fragment peptidique dans une ampoule. La résine est gonflée au DCM (10 mL) puis, lavée avec ce même solvant (2 x 10 mL). Nous introduisons dans l'ampoule un mélange TFA-DCM 1 : 1 (10 mL) et mettons sous agitations mécanique pendant 40 min. La résine est alors filtrée, lavée (*cf.* étape 2.2.1.2, 10 mL de chaque solvant) et séchée. Nous dissolvons le Boc-Peptide-OH **22** (0,39 mmol, 2 éq.), précédemment clivé, dans du DMF (10 mL) et amenons la solution à 0°C. Nous additionnons du DIC (61 μ L, 0,39 mmol) et agitons pendant 15 min. Puis, nous ajoutons de l'HOBt.H₂O (53 mg, 0,39mmol) et agitons pendant 30 min supplémentaires. La résine est gonflée au DMF (10 mL) et lavée avec ce même solvant (2 x 10 mL). Nous introduisons alors la solution de peptide activé dans le tube, ajoutons de la DIEA (70 μ L, 2 éq.) et mettons sous agitation mécanique pendant 4 h à température de la pièce. À la fin, le contenu de l'ampoule est filtré par succion et la résine est lavée comme ci-dessus.

2.2.1.14 Clivage du segment de 14 acides aminés pour l'obtention du 14-mère acide **4**

N*-t-Butyloxycarbonyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucine **4*



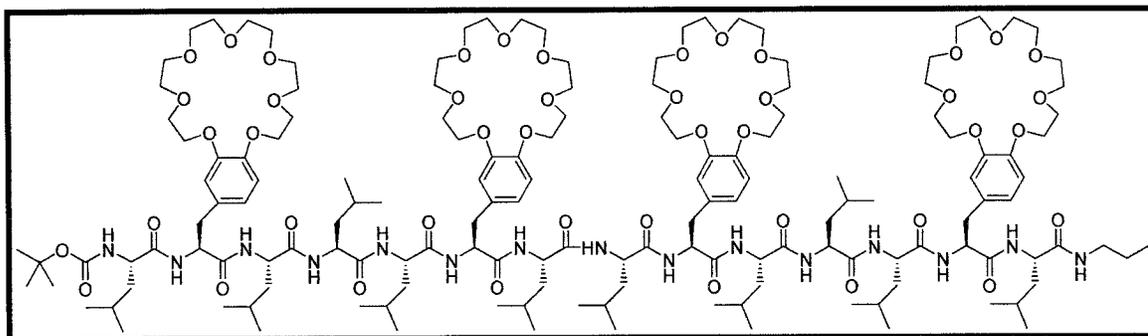
Le clivage est effectué selon dans les mêmes conditions décrites au protocole 2.2.1.12. Nous obtenons un solide jaunâtre, dont nous purifions par HPLC semi-préparative. Après évaporation des solvants, nous obtenons le peptide **4** désirés sous la forme de flocons blancs par lyophilisation dans l'acide acétique.

HPLC analytique : $R_t = 41,8$ min

Spectre de masse (MALDI) : m/z 2973,15 = $(M+Na)^+$

2.2.1.14 Clivage du 14-mère pour l'obtention du 14-mère amide propylique **61**

L'amide propylique de la *N*-*t*-Butyloxycarbonyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucine **61**



La résine est gonflée au CH_2Cl_2 (100 mL) puis, lavée avec ce même solvant (2 x 100 mL). Nous introduisons dans l'ampoule un mélange de CH_2Cl_2 : *n*-propylamine, 9 : 1 (80 mL). Nous agitions mécaniquement pendant 1 heure. À la fin, le contenu de l'ampoule est filtré par succion. La résine est lavée plusieurs fois au DCM et au méthanol. Le filtrat est récupéré et les solvants sont évaporés sous vide. Le résidu est repris par du DCM (50 mL) puis lavé par du HCl 0,5 N (2 x 50 mL) et par une solution saturée en NaCl (50 mL). La phase organique est séchée sur MgSO_4 anhydre et le solvant est évaporé sous vide. Après évaporation des solvants, nous obtenons le peptide **61** désiré sous la forme de flocons blancs par lyophilisation dans l'acide acétique,

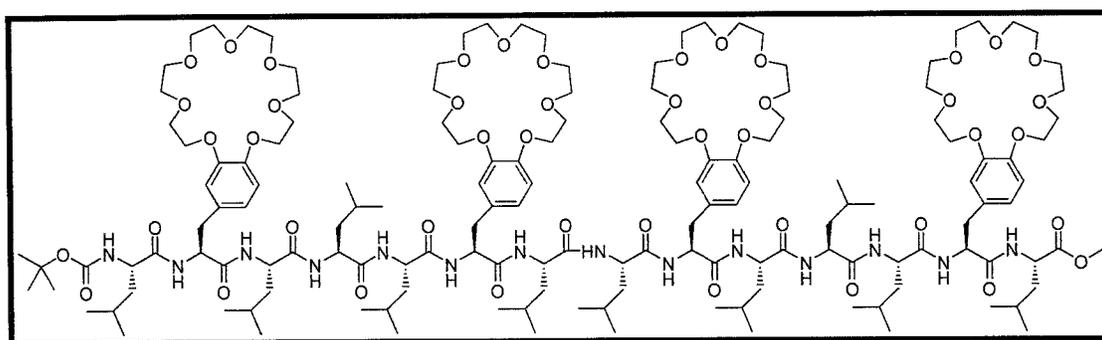
HPLC analytique. : $R_t = 46,3$ min

Spectre de masse (MALDI) : m/z 3013,96 = $(M+\text{Na})^+$

2.2.2 Synthèse des autres peptides de 14 acides aminés

2.2.2.1 Méthylation du 14-mère acide **4**

Ester méthylique de la *N*-*t*-Butyloxycarbonyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucine **2**



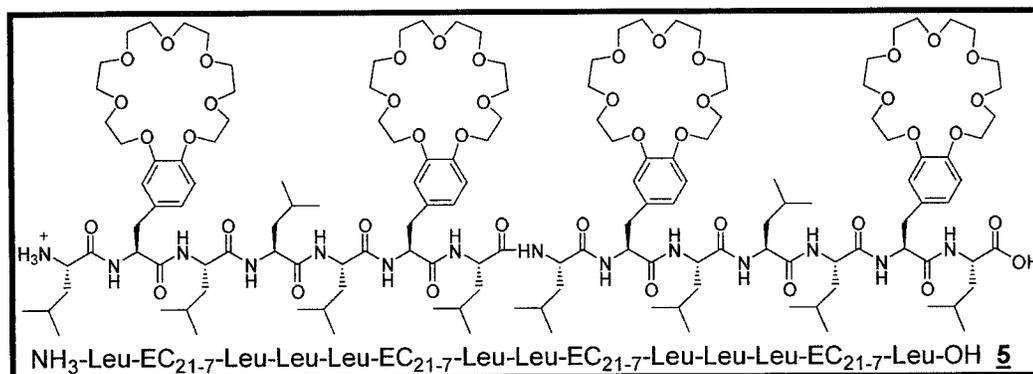
Le 14-mère acide **4** (10 mg; 0,003 mmol) est solubilisé dans l'éther contenant du diazométhane (CH_2N_2) en excès. On agite sur une période de 30 minutes à température ambiante. À la fin, on fait buller de l'azote dans la solution jusqu'à ce que la coloration jaune disparaisse. Après évaporation du solvant, nous obtenons le peptide **2** désiré sous la forme de flocons blancs par lyophilisation dans l'acide acétique.

HPLC analytique : $R_t = 35,4$ min

Spectre de masse (MALDI) : m/z 2986,63 = $(\text{M}+\text{Na})^+$, 3001,65 = $(\text{M}+\text{K})^+$

2.2.2.2 Déprotection du groupement Boc du 14-mère acide **4**

L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucine **5**



Le peptide **4** est simplement dissous dans un minimum de CH_2Cl_2 . Du HCl 4N dans le dioxane est ajouté. On agite 3 h et on évapore à sec. Après séchage l'huile est lyophilisée dans l'acide acétique et le peptide **5** est récupéré sous la forme de flocons blancs.

HPLC analytique : $R_t = 35,4$ min

Spectre de masse (MALDI) : m/z 2872,62 = $(M+\text{Na})^+$, 2851,14 = $(M+\text{K})^+$

2.3 Synthèse des chaînes de type Asp/Glu

L'exemple suivant décrit le protocole pour la synthèse d'un tétrapeptide constitué d'acide glutamique essentiellement. Le protocole s'applique pour toutes les chaînes synthétisées présentées au tableau 9 du chapitre 3. De façon générale, celui-ci se divise en 4 parties dans le cas d'un dipeptide :

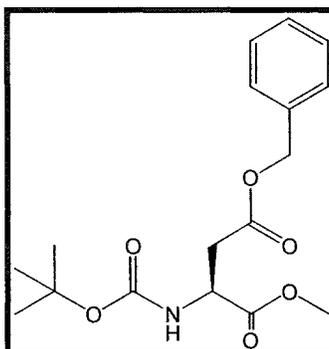
- 1- Protection de l'acide libre
- 2- Déprotection en parallèle de l'amine et de l'acide à être couplés
- 3- Couplage peptidique
- 4- Déprotection sélective au C- ou au N-terminal pour le couplage au 14-mère

Pour ce qui est des tétrapeptides, les étapes 1 à 3 sont répétées.

2.3.1 Protection de l'acide carboxylique à l'aide du diazométhane *in situ*⁷⁵

Pour la protection de l'acide carboxylique à l'aide du diazométhane, la verrerie ne doit pas posséder de joints rodés. Dans un ballon, du KOH (5,0 g ; 89 mmol) est dissous dans 8 mL de H₂O distillé. 10 mL d'éthanol 95% est ensuite ajouté dans ce même ballon. Un ballon receveur contenant l'acide à protéger est attaché au réfrigérant et placé dans un bain de glace. Dans l'ampoule à addition, le Diazald (5,9 g : 23 mmol) est dissous dans 45 mL d'éther. Le ballon est chauffé jusqu'à 65°C avec un bain d'huile. La solution de Diazald est ajoutée sur une période de 30 minutes goutte à goutte. On forme *in situ* le diazométhane. La vitesse de distillation doit égaler la vitesse d'addition. À la fin, on fait buller un gaz inerte dans le ballon receveur afin d'évaporer le diazométhane en excès. 5g de Diazald donne 700 mg de diazométhane (16,6 mmol). Lorsque la coloration jaune est disparue, on évapore le solvant sous pression réduite.

Ester méthylique de l'acide N^α-*tert*-butyloxycarbonyl-β-O-benzyl-L-aspartique 62



Boc-Asp(OBzl)-OMe 62

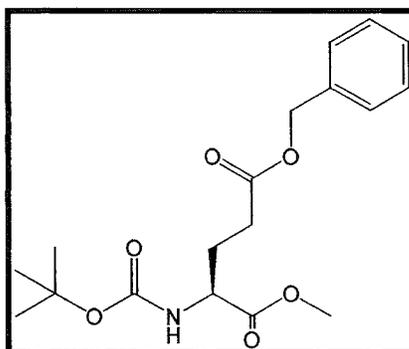
Rendement : 100%

Spectre de masse (IC): 338 = (M+H)⁺ , 355 = (M+NH₄)⁺

RMN ¹H (CDCl₃)

δ	Intégration	Multiplicité	Assignation	Couplage
1,40	9H	s	-butyl	---
2,81-3,07	2H	m	CH ₂ (β)	---
3,67	3H	s	COOCH ₃	---
4,55-4,60	1H	m	CH	---
5,09	1H	d	CH-Ph	4,0 Hz
5,11	1H	d	CH-Ph	4,0 Hz
5,42-5,48	1H	d	NH	7,9 Hz
7,27-7,37	5H	m	H Aromatique	7,9 Hz

Ester méthylique de l'acide N^α-*tert*-butyloxycarbonyl-γ-O-benzyl-L-glutamique 29



Boc-Glu(OBzl)-OMe 29

Rendement : 100%

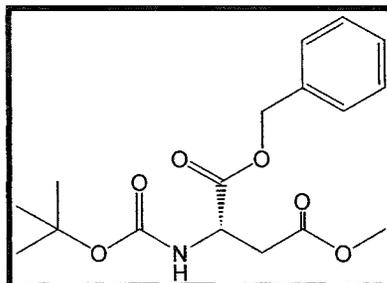
Spectre de masse (IC): 352 = (M+H)⁺ , 369 = (M+NH₄)⁺

RMN ¹H (CDCl₃)

Δ	Intégration	Multiplicité	Assignment	Couplage
1,40	9H	s	-butyl	---
1,87-2,22	2H	m	CH ₂ (β)	---
2,33-2,50	2H	m	CH ₂ (γ)	---
3,71	3H	s	COOCH ₃	---
4,29-4,37	1H	m	CH _(α)	---
5,07	1H	d	NH	7,9 Hz
5,1	2H	s	CH ₂ -Ph	---
7,25-7,37	5H	m	H Aromatique	---

Ester benzylique de l'acide N^α-*tert*-butyloxycarbonyl,β-O-méthyl-L-aspartique

63



Boc-Asp(OMe)-OBzl 63

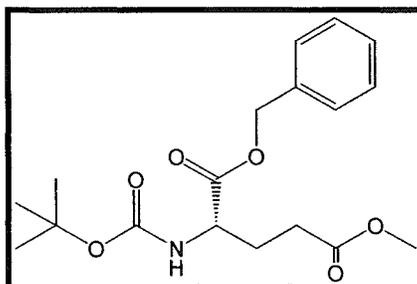
Rendement : 100%

Spectre de masse (IC): 338 = (M+H)⁺ , 355 = (M+NH₄)⁺

RMN ¹H (CDCl₃)

Δ	Intégration	Multiplicité	Assignation	Couplage
1,40	9H	s	-butyl	---
2,72-2,90	2H	m	CH ₂ (β)	---
3,60	3H	s	COOCH ₃	---
4,55-4,63	1H	m	CH _(α)	---
5,13	1H	d	CH-Ph	10,0 Hz
5,16	1H	d	CH-Ph	10,0 Hz
5,48-5,53	1H	d	NH	7,9 Hz
7,30-7,36	5H	m	H Aromatique	7,9 Hz

Ester benzylique de l'acide N^α-*tert*-butyloxycarbonyl-γ-O-méthyl-L-glutamique **64**



Boc-Glu(OMe)-OBzl 64

Rendement : 100%

Spectre de masse (IE): 352 = (M+H)⁺ , 369 = (M+NH₄)⁺

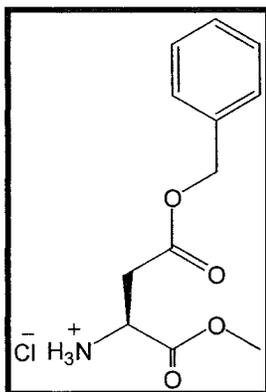
Tableau 10: RMN ¹H (CDCl₃)

Δ	Intégration	Multiplicité	Assignation	Couplage
1,40	9H	s	-butyl	---
1,87-2,22	2H	m	CH ₂ (β)	---
2,33-2,50	2H	m	CH ₂ (γ)	---
3,62	3H	s	COOCH ₃	---
4,25-4,29	1H	m	CH(α)	---
5,09-5,16	2H	d	NH	7,8 Hz
5,13	1H	s	CH ₂ -Ph	---
7,24-7,37	5H	m	H Aromatique	---

2.3.2 Déprotection de l'amine par élimination du groupement Boc

Le composé dont l'amine est protégé sous forme de *t*-butyloxycarbone est dissous dans un minimum de CH₂Cl₂. Du HCl(6N)/dioxane est ajouté. La solution est agitée pendant 3 heures à température ambiante. À la fin de la réaction, le solvant est évaporé sous pression réduite.

Ester méthylique de l'acide β-O-benzyl-L-aspartique 65



⁺NH₃-Asp(OBzl)-OMe 65

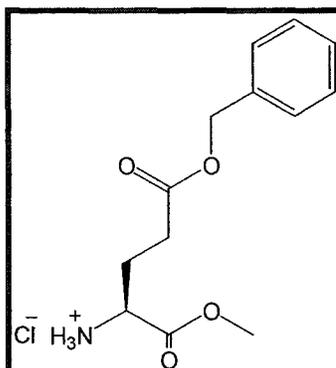
Rendement : 100%

Spectre de masse (IC): 238,2 = (M+H)⁺

RMN ¹H (CDCl₃)

Δ	Intégration	Multiplicité	Assignation	Couplage
3,20-3,39	2H	m	CH ₂ (β)	---
3,65	3H	s	COOCH ₃	---
4,54	1H	s	CH	---
5,14	2H	s	CH ₂ -Ph	---
7,30-7,37	5H	m	H Aromatique	---
8,87	3H	s	NH ₃	---

Ester méthylique de l'acide γ -O-benzyl-L-glutamique **31**



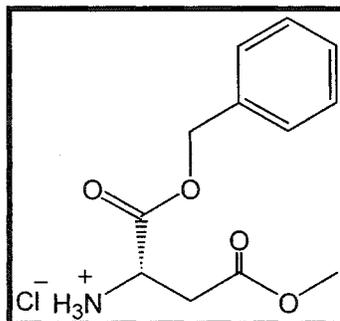
$^+$ NH₃-Glu(OBzl)-OMe **31**

Rendement : 100%

Spectre de masse (IC): 252 = (M+H)⁺

RMN ¹H (CDCl₃)

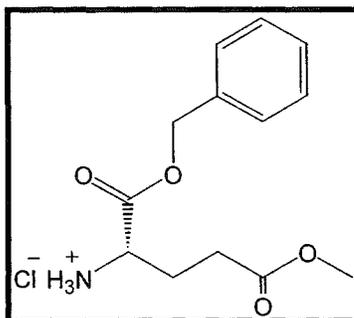
Δ	Intégration	Multiplicité	Assignment	Couplage
2,35-2,43	2H	m	CH ₂ (β)	---
2,57-2,77	2H	m	CH ₂ (γ)	---
3,68	3H	s	COOCH ₃	---
4,21-4,32	1H	m	CH(α)	---
5,05	1H	d	CH-Ph	1,9 Hz
5,07	1H	d	CH-Ph	1,9 Hz
7,23-7,29	5H	m	H Aromatique	---
8,79	3H	s	NH ₃	---

Ester benzylique de l'acide γ -O-méthyl-L-aspartique **66** $^+$ NH₃-Asp(OMe)-OBzl **66**

Rendement : 100%

Spectre de masse (IC) : 238 = (M+H)⁺RMN ¹H (CDCl₃)

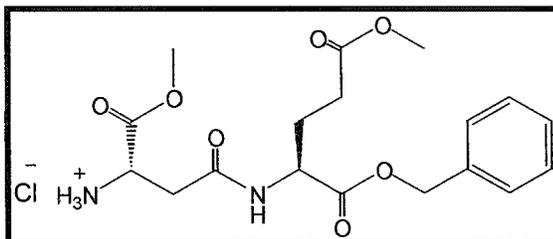
Δ	Intégration	Multiplicité	Assignation	Couplage
3,18-3,32	2H	m	CH ₂ (β)	---
3,60	3H	s	COOCH ₃	---
4,58	1H	s	CH(α)	---
5,15	1H	d	CH-Ph	12,0 Hz
5,20	1H	d	CH-Ph	12,0 Hz
7,27-7,32	5H	m	H Aromatique	---
8,85	3H	s	NH ₃	---

Ester benzylique de l'acide γ -O-benzyl-L-glutamique 67 $^+$ NH₃-Glu(OMe)-OBzl 67

Rendement : 100%

Spectre de masse (IC) : 254,2 = (M+H)⁺RMN ¹H (CDCl₃)

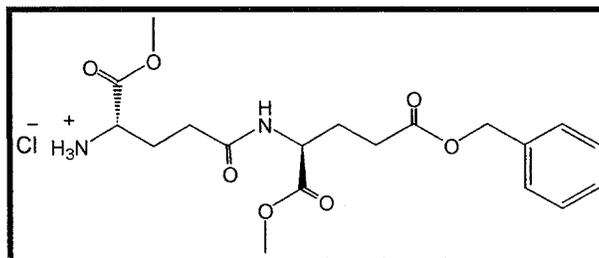
δ	Intégration	Multiplicité	Assignation	Couplage
2,33-2,41	2H	m	CH ₂ (β)	---
2,50-2,69	2H	m	CH ₂ (γ)	---
3,55	3H	s	COOCH ₃	---
4,28-4,33	1H	m	CH(α)	---
5,13-5,20	2H	m	CH ₂ -Ph	---
7,24-7,32	5H	m	H Aromatique	---
8,85	3H	s	NH ₃	---

$^+\text{NH}_3\text{-}\beta\text{-Asp}(\alpha\text{-OMe})\text{-Glu}(\text{OMe})\text{-OBzl}$ **68**

Rendement : 59%

Spectre de masse (IC) : 381,2 = (M+H)⁺RMN ¹H (CDCl₃)

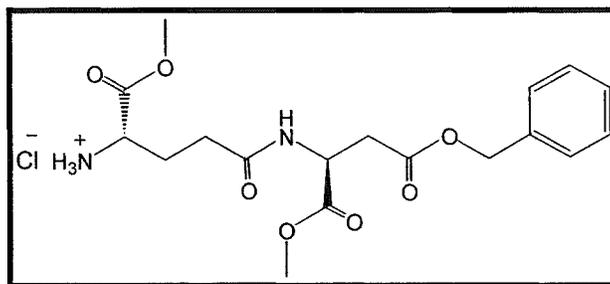
Δ	Intégration	Multiplicité	Assigination	Couplage
1,73-2,04	2H	m	$\text{CH}_2(\beta)$	---
2,27-2,35	2H	m	$\text{CH}_2(\gamma)$	---
2,71-2,84	2H	m	$\text{CH}_2(\beta)$ (Asp)	---
3,52	3H	s	COOCH_3	---
3,64	3H	s	COOCH_3	---
4,23-4,28	1H	m	$\text{CH}(\alpha)$	---
4,30-4,37	1H	m	$\text{CH}(\alpha)$	---
5,04-5,11	2H	m	$\text{CH}_2\text{-Ph}$	---
7,24-7,40	5H	m	H Aromatique	---
8,24-8,39	3H	s	NH_3	---
8,67-8,71	3H	d	NH	8,0 Hz

$^+\text{NH}_3\text{-}\gamma\text{-Glu}(\alpha\text{-OMe})\text{-Glu}(\text{OBzl})\text{-OMe}$ 34

Rendement : 88%

Spectre de masse (IC) : 395,2 = (M+H)⁺RMN ¹H (CDCl₃)

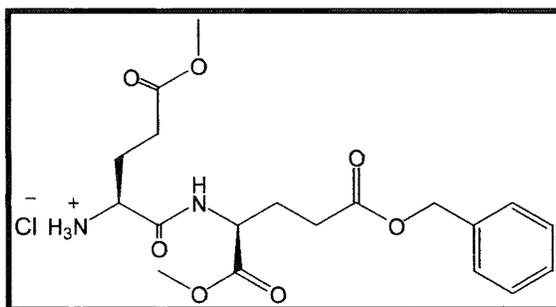
Δ	Intégration	Multiplicité	Assignment	Couplage
1,92-2,18	2H	m	CH ₂ (β)	---
2,20-2,44	2H	m	CH ₂ (β)	---
2,38-2,45	2H	m	CH ₂ (γ)	---
2,51-2,63	2H	m	CH ₂ (γ)	---
3,61	3H	s	COOCH ₃	---
3,69	3H	s	COOCH ₃	---
4,14-4,20	1H	m	CH(α)	---
4,40-4,50	1H	m	CH(α)	---
5,03	2H	s	CH ₂ -Ph	---
7,21-7,30	5H	m	H Aromatique	---
7,51-7,58	1H	d	NH	7,8 Hz
8,62	3H	s	NH ₃	---

⁺NH₃-γ-Glu(α-OMe)-Asp(OBzl)-OMe 69

Rendement : 67%

Spectre de masse (IC) : 381,2 = (M+H)⁺RMN ¹H (CDCl₃)

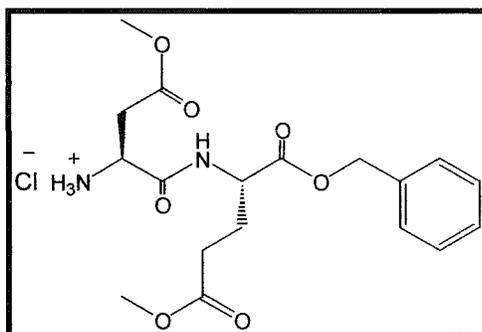
δ	Intégration	Multiplicité	Assignation	Couplage
2,22-2,26	2H	m	CH ₂ (β) (Glu)	---
2,26-2,71	2H	m	CH ₂ (γ) (Glu)	---
2,82-2,98	2H	m	CH ₂ (β) (Asp)	---
3,55	3H	s	COOCH ₃	---
3,74	3H	s	COOCH ₃	---
4,17-4,25	1H	m	CH _(α)	---
4,8-4,86	1H	m	CH _(α)	---
5,10	1H	d	CH-Ph	12,3 Hz
5,14	1H	d	CH-Ph	12,3 Hz
7,23-7,30	5H	m	H Aromatique	---
7,59-7,63	1H	d	NH	7,9 Hz
8,7	3H	s	NH ₃	---

⁺NH₃-Glu(OMe)-Glu(OBzl)-OMe 70

Rendement : 82%

Spectre de masse (IC) : 395,2 = (M+H)⁺RMN ¹H (CDCl₃)

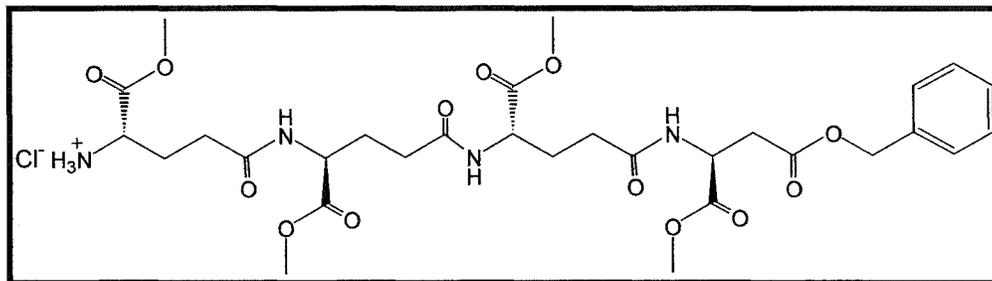
δ	Intégration	Multiplicité	Assignation	Couplage
1,94-2,22	2H	m	CH ₂ (β)	---
2,24-2,53	2H	m	CH ₂ (β)	---
2,35-2,42	2H	m	CH ₂ (γ)	---
2,53-2,73	2H	m	CH ₂ (γ)	---
3,57	3H	s	COOCH ₃	---
3,71	3H	s	COOCH ₃	---
4,19-4,28	1H	m	CH(α)	---
4,48-4,56	1H	m	CH(α)	---
5,09	2H	s	CH ₂ -Ph	---
7,26-7,34	5H	m	H Aromatique	---
7,64-7,72	1H	d	NH	7,9 Hz
8,69	3H	s	NH ₃	---

⁺NH₃-Asp(OMe)-Glu(OMe)-OBzl 71

Rendement : 71%

Spectre de masse (IC) : 381,2 = (M+H)⁺RMN ¹H (CDCl₃)

δ	Intégration	Multiplicité	Assignment	Couplage
2,00-2,28	2H	m	CH ₂ (β)	
2,45-2,52	2H	m	CH ₂ (γ)	---
2,97-3,27	2H	m	CH ₂ (β) (Asp)	---
3,56	3H	s	COOCH ₃	---
3,63	3H	s	COOCH ₃	---
4,50-4,62	1H	m	CH(α)	---
4,68-4,75	1H	m	CH(α)	---
5,08	1H	d	CH-Ph	12,4 Hz
5,12	1H	d	CH-Ph	12,4 Hz
7,22-7,33	5H	m	H Aromatique	---
8,3-8,35	1H	d	NH	7,9 Hz
8,41	3H	s	NH ₃	---

⁺NH₃-γ-Glu(α-OMe)-γ-Glu(α-OMe)-γ-Glu(α-OMe)-Asp(OBzl)-OMe 72

Rendement : 42%

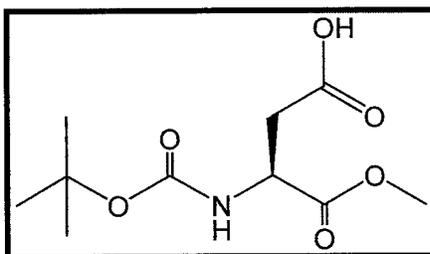
Spectre de masse (IC) : 667,4 = (M+H)⁺RMN ¹H (CDCl₃)

δ	Intégration	Multiplicité	Assignation	Couplage
1,41	9H	s	<i>t</i> -butyl	---
1,83-2,98	14H	m	CH ₂ (β) et CH ₂ (γ)	---
3,53	3H	s	COOCH ₃	---
3,63	6H	s	COOCH ₃	---
3,71	3H	s	COOCH ₃	---
4,17-4,27	1H	m	CH(α)	---
4,36-4,49	2H	m	CH(α)	---
4,75-4,86	1H	m	CH(α)	---
5,08	1H	d	CH-Ph	11,3 Hz
5,12	1H	d	CH-Ph	11,3 Hz
7,22-7,31	5H	m	H Aromatique	---
7,37-7,31	1H	d	NH	7,9 Hz
7,59-7,65	1H	d	NH	7,8 Hz
7,71-7,76	1H	d	NH	7,9 Hz
8,47-8,57	3H	s	NH ₃	---

2.3.3 Déprotection sélective de l'acide carboxylique par hydrogénolyse

L'ester benzylique est dissous dans un minimum de méthanol et versé dans un contenant à hydrogénation. 60 mg/mmol de palladium sur charbon activé (10%) sont ajoutés délicatement au milieu réactionnel. Celui-ci est déposé directement dans le solvant avec une spatule. Le système est purgé trois fois avec de l'hydrogène. On agite mécaniquement pendant 3 à 4 heures sous une pression de 40 psi de H₂. À la fin, le contenu de l'ampoule est filtré sur Célite©. Le solvant est évaporé sous pression réduite pour l'obtention d'un solide blanc.

α -Ester méthylique de l'acide N^α-*tert*-butyloxycarbonyl-L-aspartique 73



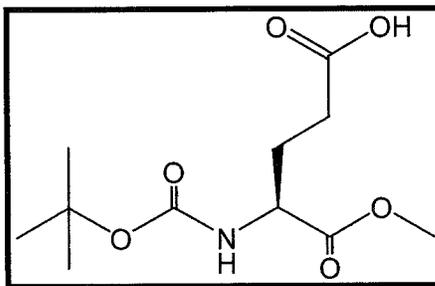
Boc-Asp(OH)-OMe 73

Rendement : 100%

Spectre de masse (IC) : 248,0 = (M+H)⁺

RMN ¹H (CDCl₃)

δ	Intégration	Multiplicité	Assignation	Couplage
1,42	9H	s	<i>t</i> -butyl	---
2,78-3,06	2H	m	CH ₂ (β)	---
3,46	3H	s	COOCH ₃	---
4,50-4,61	1H	m	CH(α)	---
5,42-5,55	1H	d	NH	8,1 Hz

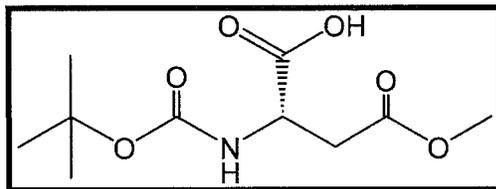
α -Ester méthylique de l'acide N ^{α} -*tert*-butyloxycarbonyl-L-glutamique 30**Boc-Glu(OH)-OMe 30**

Rendement : 100%

Spectre de masse (IC) : 262,0 = (M+H)⁺RMN ¹H (CDCl₃)

δ	Intégration	Multiplicité	Assignment	Couplage
1,40	9H	s	<i>t</i> -butyl	---
1,76-2,20	2H	m	CH ₂ (β)	---
2,34-2,46	2H	m	CH ₂ (γ)	---
3,70	3H	s	COOCH ₃	---
4,29-4,37	1H	m	CH(α)	---
5,18	1H	d	NH	7,9 Hz

L'acide N^α-*tert*-butyloxycarbonyl-β-O-Méthyl-L-aspartique **74**



Boc-Asp(OMe)-OH 74

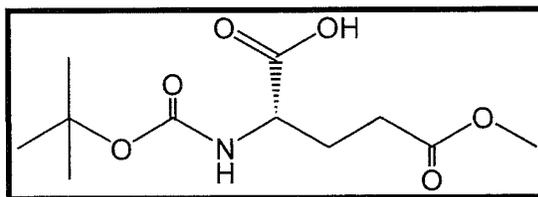
Rendement : 100%

Spectre de masse (IC) : 248,3 = (M+H)⁺

RMN ¹H (CDCl₃)

δ	Intégration	Multiplicité	Assignment	Couplage
1,41	9H	s	<i>t</i> -butyl	---
2,76-3,10	2H	m	CH ₂ (β)	---
3,68	3H	s	COOCH ₃	---
4,56-4,64	1H	m	CH(α)	---
5,54-5,58	1H	d	NH	7,9 Hz
10,91	5H	s	OH	---

L'acide N^α-*tert*-butyloxycarbonyl-γ-O-méthyl-L-glutamique 75



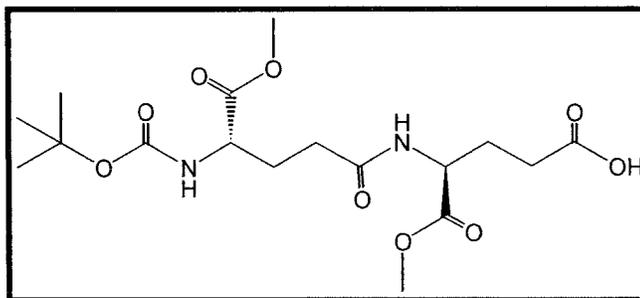
Boc-Glu(OMe)-OH 75

Rendement : 100%

Spectre de masse (IC) : 262,0 = (M+H)⁺

RMN ¹H (CDCl₃)

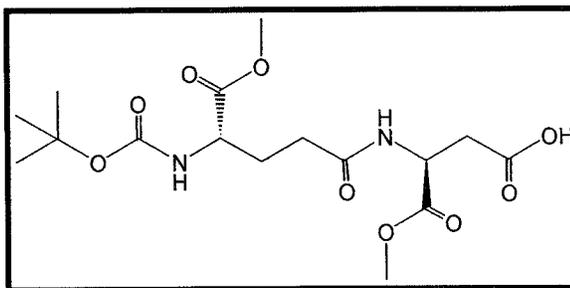
δ	Intégration	Multiplicité	Assignment	Couplage
1,40	9H	s	<i>t</i> -butyl	---
1,90-2,22	2H	m	CH ₂ (β)	---
2,33-2,50	2H	m	CH ₂ (γ)	---
3,62	3H	s	COOCH ₃	---
4,25-4,32	1H	m	CH(α)	---
5,18-5,24	2H	s	NH	7,8 Hz

Boc- γ -Glu(α -OMe)-Glu-OMe 33

Rendement : 88%

Spectre de masse (IC) : 405 = (M+H)⁺RMN ¹H (CDCl₃)

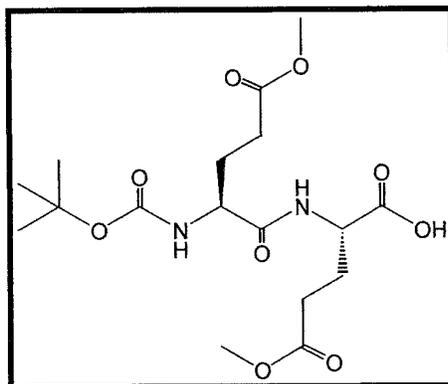
δ	Intégration	Multiplicité	Assignment	Couplage
1,40	9H	s	<i>t</i> -butyl	---
1,78-2,04	2H	m	CH ₂ (β)	---
2,10-2,22	2H	m	CH ₂ (β)	---
2,27-2,31	2H	M	CH ₂ (γ)	---
2,36-2,42	2H	m	CH ₂ (γ)	---
3,70	3H	s	COOCH ₃	---
3,70	3H	s	COOCH ₃	---
4,20,-4,27	1H	m	CH(α)	---
4,57-4,62	1H	m	CH(α)	---
5,38-5,44	1H	d	NH	8,1 Hz
6,78-6,82	1H	d	NH	7,9 Hz

Boc- γ -Glu(α -OMe)-Asp-OMe **76**

Rendement : 67%

Spectre de masse (IC) : 391 = (M+H)⁺RMN ¹H (CDCl₃)

δ	Intégration	Multiplicité	Assignment	Couplage
1,40	9H	s	<i>t</i> -butyl	---
1,83-2,18	2H	m	CH ₂ (β) (Glu)	---
2,38-2,43	2H	m	CH ₂ (γ) (Glu)	---
2,81-3,06	2H	t	CH ₂ (β) (Asp)	---
3,73	3H	s	COOCH ₃ (Asp)	---
3,75	3H	s	COOCH ₃	---
4,26-4,31	1H	m	CH(α) (Glu)	---
4,78-4,86	1H	m	CH(α)	---
5,46-5,53	1H	d	NH	7,8 Hz
5,52-5,58	1H	d	NH	7,9 Hz

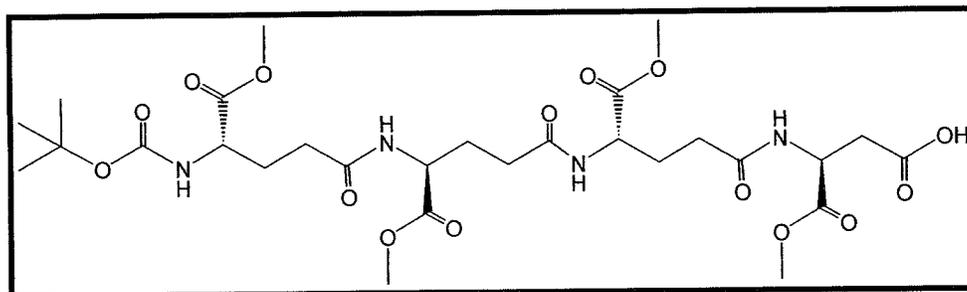
Boc-Glu(OMe)-Glu(OMe)-OH 77

Rendement : 86%

Spectre de masse (IC) : 405 = (M+H)⁺RMN ¹H (CDCl₃)

δ	Intégration	Multiplicité	Assignment	Couplage
1,39	9H	s	<i>t</i> -butyl	---
1,80-2,28	2H	m	CH ₂ (β)	---
1,95-2,08	2H	m	CH ₂ (β)	---
2,30-2,45	4H	m	CH ₂ (γ)	---
2,61	6H	s	COOCH ₃	---
4,21-4,28	1H	m	CH _(α)	---
4,53-4,60	1H	m	CH _(α)	---
5,48-5,66	1H	d	NH	7,9 Hz
7,41-7,46	1H	d	NH	8,0 Hz

Boc- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)-Asp-OMe 78



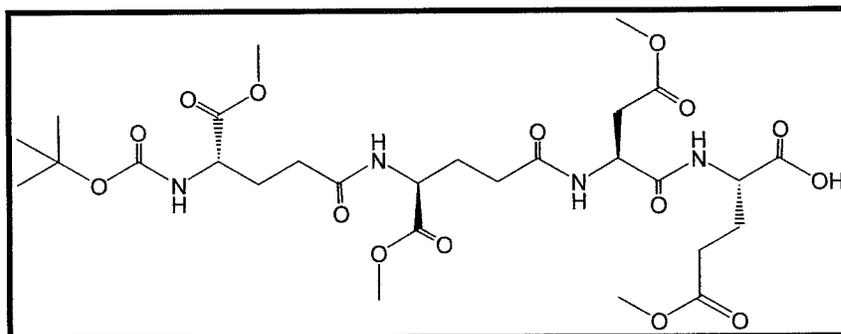
Rendement : 42%

Spectre de masse (IC) : 677,6 = (M+H)⁺ , 694,6 = (M+NH₄)⁺

RMN ¹H (CDCl₃)

δ	Intégration	Multiplicité	Assignation	Couplage
1,41	9H	s	<i>t</i> -butyl	---
1,72-2,30	4H	m	CH ₂ (β)	---
2,26-2,47	8H	m	CH ₂ (β) et CH ₂ (γ)	---
2,83-3,02	2H	m	CH ₂ (β) (Asp)	---
3,65	3H	s	COOCH ₃	---
3,70	3H	s	COOCH ₃	---
3,71	6H	s	COOCH ₃	---
4,25-4,30	1H	m	CH(α)	---
4,54-4,62	2H	m	CH(α)	---
4,74-4,82	1H	m	CH(α)	---
5,38-5,42	1H	d	NH	7,9 Hz
6,72-6,76	1H	d	NH	8,1 Hz
6,96-7,00	1H	d	NH	8,0 Hz
7,61-7,65	1H	d	NH	8,0 Hz

Boc- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)-Asp(OMe)-Glu(OMe)-OH 79



Rendement : 37%

Spectre de masse (IC) : 677,6 = (M+H)⁺ , 694,4 = (M+NH₄)⁺

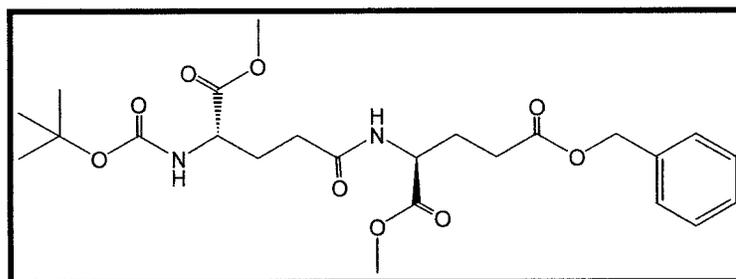
RMN ¹H (CDCl₃)

δ	Intégration	Multiplicité	Assignment	Couplage
1,40	9H	s	<i>t</i> -butyl	---
1,91-2,63	14H	m	CH ₂ (β) et CH ₂ (γ)	---
3,57-3,71	12H	m	COOCH ₃	---
4,19-4,24	1H	m	CH(α)	---
4,32-4,36	1H	m	CH(α)	---
4,51-4,57	1H	m	CH(α)	---
4,79-4,85	1H	m	CH(α)	---
5,27	2H	s	CH ₂ -Ph	---
7,07-7,15	2H	d	NH	7,8 Hz
7,18-7,23	1H	d	NH	7,9 Hz
7,56-7,61	1H	d	NH	7,9 Hz

2.3.4 Couplage en solution pour la formation des conjugués de types Asp/Glu

À une solution contenant un composé possédant un acide carboxylique libre dissous dans le dichlorométhane (1 M), du HOBt (1,0 eq.) et du EDC (1,2 eq.) sont ajoutés. La solution est agitée pendant 30 minutes. Le composé possédant l'amine libre et de la triéthylamine sont additionnés. La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince et dure de 5 à 24 heures. La phase organique est ensuite lavée successivement avec NaHCO₃, H₂O, acide citrique 10%, et H₂O. On récupère la phase organique et on sèche sur MgSO₄ anhydre. Le solvant est évaporé. On recristallise à l'aide d'un mélange éther/hexane pour obtenir une solide blanc.

Boc- γ -Glu(γ -OMe)-Glu(OBzl)-OMe 32

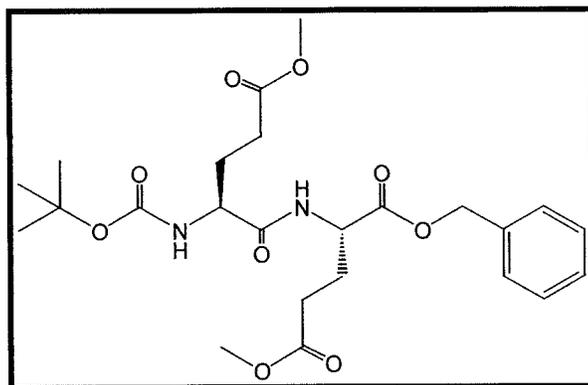


Rendement : 88%

Spectre de masse (IC) : 495 = (M+H)⁺

RMN ¹H (CDCl₃)

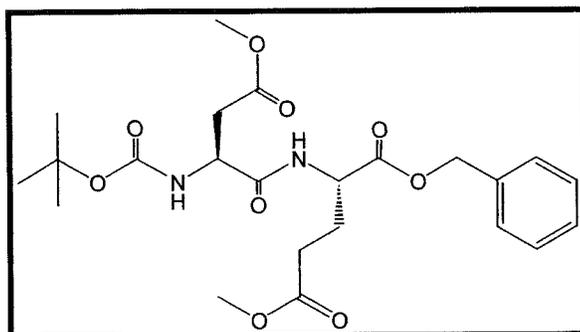
δ	Intégration	Multiplicité	Assignment	Couplage
1,40	9H	s	<i>t</i> -butyl	---
1,81-2,06	2H	m	CH ₂ (β)	---
2,10-2,23	2H	m	CH ₂ (β)	---
2,23-2,30	2H	m	CH ₂ (γ)	---
2,35-2,52	2H	m	CH ₂ (γ)	---
3,69	3H	s	COOCH ₃	---
3,70	3H	s	COOCH ₃	---
4,21,-4,30	1H	m	CH(α)	---
4,54-4,62	1H	m	CH(α)	---
5,08	2H	s	CH ₂ -Ph	---
5,20-5,26	1H	d	NH	7,9 Hz
6,48-6,55	1H	d	NH	8,0 Hz
7,27-7,36	5H	m	H Aromatique	---

Boc-Glu(OMe)-Glu(OMe)-OBzl 36

Rendement : 86%

Spectre de masse (IC) : 495 = (M+H)⁺RMN ¹H (CDCl₃)

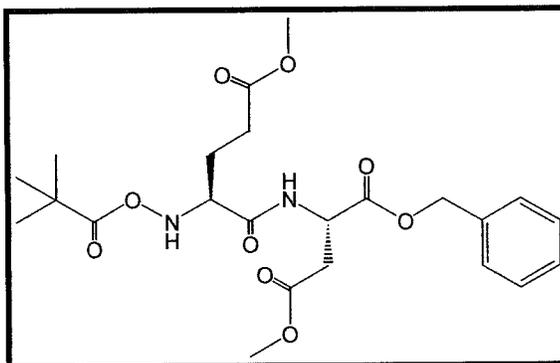
δ	Intégration	Multiplicité	Assignment	Couplage
1,39	9H	s	-butyl	---
1,80-2,09	2H	m	CH ₂ (β)	---
1,92-2,25	2H	m	CH ₂ (β)	---
2,31-2,46	4H	m	CH ₂ (γ)	---
3,62	3H	s	COOCH ₃	---
3,65	3H	s	COOCH ₃	---
4,11-4,17	1H	m	CH _(α)	---
4,76-4,84	1H	m	CH _(α)	---
5,11	2H	s	CH ₂ -Ph	---
5,20-5,25	1H	d	NH	8,1 Hz
6,95-7,00	1H	d	NH	8,1 Hz
7,24-7,37	5H	m	H Aromatique	---

Boc-Asp(OMe)-Glu(OMe)-OBzl 37

Rendement : 71%

Spectre de masse (IE) : 424 (M-C₄H₉)⁺RMN ¹H (CDCl₃)

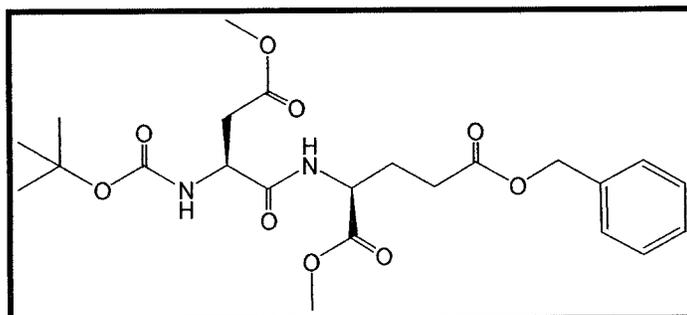
δ	Intégration	Multiplicité	Assignment	Couplage
1,42	9H	s	<i>t</i> -butyl	---
1,96-2,26	2H	m	CH ₂ (β)	---
2,27-2,39	2H	m	CH ₂ (γ)	---
2,57-3,02	2H	m	CH ₂ (β) (Asp)	---
3,62	3H	s	COOCH ₃	---
3,65	3H	s	COOCH ₃	---
4,45-4,51	1H	m	CH _(α)	---
4,56-4,63	1H	m	CH _(α)	---
5,13	2H	s	CH ₂ -Ph	---
5,60-5,66	1H	d	NH	7,8 Hz
7,10-7,15	1H	d	NH	8,0 Hz
7,28-7,36	5H	m	H Aromatique	---

Boc-Glu(OMe)-Asp(OMe)-OBzl 38

Rendement : 92%

Spectre de masse (IC): 481 = (M+H)⁺RMN ¹H (CDCl₃)

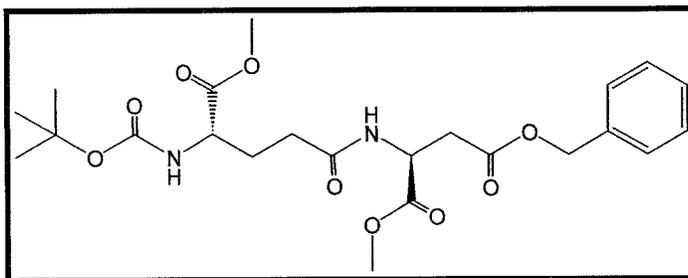
δ	Intégration	Multiplicité	Assignment	Couplage
1,39	9H	s	<i>t</i> -butyl	---
1,86-2,16	2H	m	CH ₂ (β)	---
2,41-2,52	2H	m	CH ₂ (β)	---
2,81-3,07	4H	m	CH ₂ (γ)	---
3,53	3H	s	COOCH ₃	---
3,64	3H	s	COOCH ₃	---
4,10-4,20	1H	m	CH _(α)	---
4,83-4,89	1H	m	CH _(α)	---
5,01-5,18	2H	m	CH ₂ -Ph	---
5,20-5,26	1H	d	NH	7,9 Hz
7,11-7,17	1H	d	NH	8,0 Hz
7,25-7,35	5H	m	H Aromatique	---

Boc-Asp(OMe)-Glu(OBzl)-OMe 39

Rendement : 66%

Spectre de masse (IC) : 391 = (M+H)⁺RMN ¹H (CDCl₃)

δ	Intégration	Multiplicité	Assigantion	Couplage
1,40	9H	s	<i>t</i> -butyl	---
1,81-2,22	2H	m	CH ₂ (β)	---
2,25-2,31	2H	m	CH ₂ (γ)	---
2,80-3,04	2H	m	CH ₂ (β) (Asp)	---
3,59	3H	s	COOCH ₃	---
3,70	3H	s	COOCH ₃	---
4,23-4,31	1H	m	CH _(α)	---
4,84-4,90	1H	m	CH _(α)	---
5,13	1H	d	CH-Ph	12,1 Hz
5,18	1H	d	CH-Ph	12,1 Hz
5,18-5,23	1H	d	NH	7,9 Hz
6,65-6,70	1H	d	NH	8,2 Hz
7,27-7,36	5H	m	H Aromatique	---

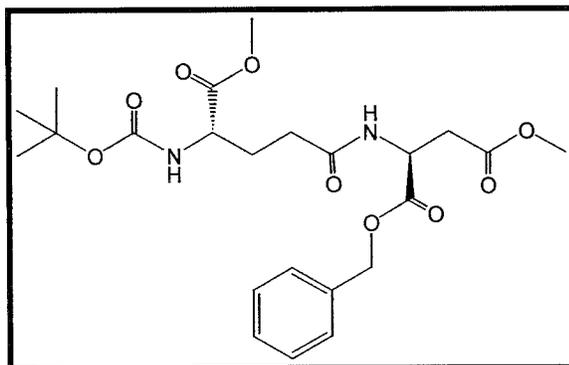
Boc- γ -Glu(α -OMe)-Asp(OBzl)-OMe 40

Rendement : 67%

Spectre de masse (IC): 481,2 = (M+H)⁺, 498,2 = (M+NH₄)⁺RMN ¹H (CDCl₃)

δ	Intégration	Multiplicité	Assignation	Couplage
1,40	9H	s	<i>t</i> -butyl	---
1,80-2,20	2H	m	CH ₂ (β) (Glu)	---
2,25-2,31	2H	m	CH ₂ (γ) (Glu)	---
2,80-3,04	2H	m	CH ₂ (β) (Asp)	---
3,58	3H	s	COOCH ₃ (Asp)	---
3,69	3H	s	COOCH ₃	---
4,23-4,30	1H	m	CH(α) (Glu)	---
4,84-4,89	1H	m	CH(α)	---
5,13	1H	d	CH-Ph	12,5 Hz
5,16	1H	d	CH-Ph	12,5 Hz
5,20-5,26	1H	d	NH	7,9 Hz
6,67-6,73	1H	d	NH	7,8 Hz
7,26-7,36	5H	m	H Aromatique	---

Boc- γ -Glu(α -OMe)-Asp(OMe)-OBzl 41



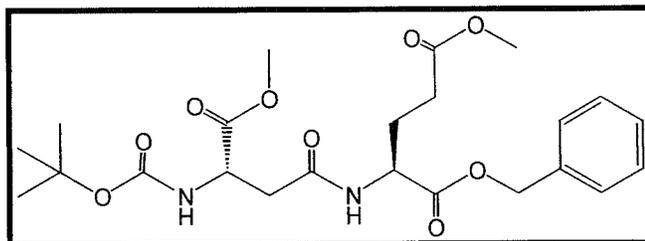
Rendement : 57%

Spectre de masse (IC): 481,2 = (M+H)⁺ , 498,2 = (M+NH₄)⁺

RMN ¹H (CDCl₃)

δ	Intégration	Multiplicité	Assignation	Couplage
1,38	9H	s	<i>t</i> -butyl	---
1,81-2,19	2H	m	CH ₂ (β) (Glu)	---
2,20-2,31	2H	m	CH ₂ (γ) (Glu)	---
2,83-3,04	2H	m	CH ₂ (β) (Asp)	---
3,64	3H	s	COOCH ₃ (Asp)	---
3,68	3H	s	COOCH ₃	---
4,22-4,29	1H	m	CH(α) (Glu)	---
4,79-4,86	1H	m	CH(α)	---
5,07	2H	s	CH ₂ -Ph	---
5,25-5,33	1H	d	NH	8,0 Hz
6,70-6,79	1H	d	NH	8,0 Hz
7,23-7,36	5H	m	H Aromatique	---

Boc-β-Asp(α-OMe)-Glu(OMe)-OBzl 42



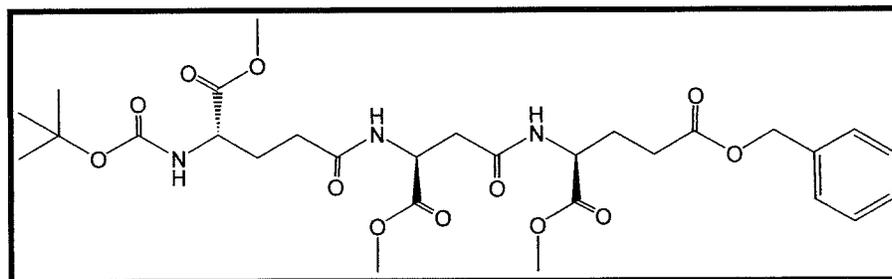
Rendement : 59%

Spectre de masse (IC) : 481,2 = (M+H)⁺ , 498,2 = (M+NH₄)⁺

RMN ¹H (CDCl₃)

δ	Intégration	Multiplicité	Assigination	Couplage
1,41	9H	s	<i>t</i> -butyl	---
1,89-2,23	2H	m	CH ₂ (β)	---
2,25-2,37	2H	m	CH ₂ (γ)	---
2,65-2,94	2H	m	CH ₂ (β) (Asp)	---
3,62	3H	s	COOCH ₃	---
3,71	3H	s	COOCH ₃	---
4,48-4,54	1H	m	CH _(α)	---
4,57-4,64	1H	m	CH _(α)	---
5,14	2H	s	CH ₂ -Ph	---
5,66-5,71	3H	d	NH	7,9 Hz
6,29-6,33	3H	d	NH	7,9 Hz
7,28-7,37	5H	m	H Aromatique	---

Boc- γ -Glu(α -OMe)- β -Asp(α -OMe)-Glu(OBzl)-OMe 43



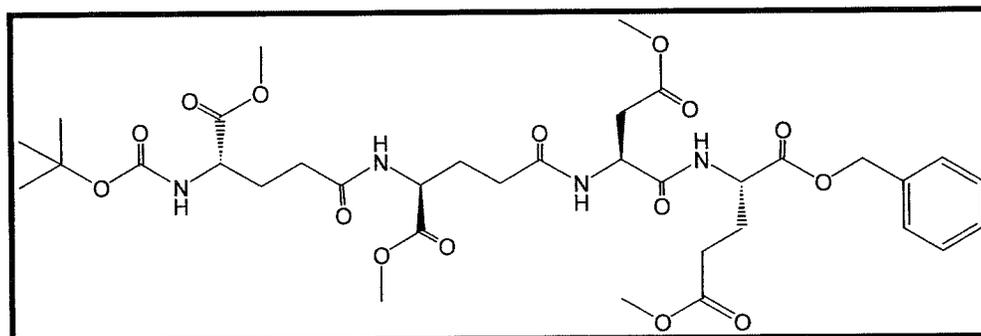
Rendement : 39%

Spectre de masse (IC) : 624,4 = (M+H)⁺, 641,4 = (M+NH₄)⁺

RMN ¹H (CDCl₃)

δ	Intégration	Multiplicité	Assignation	Couplage
1,36	9H	s	<i>t</i> -butyl	---
1,85-2,21	4H	m	CH ₂ (β) (Glu)	---
2,22-2,29	2H	m	CH ₂ (γ) (Glu)	---
2,32-2,43	2H	m	CH ₂ (γ) (Glu)	---
2,62-2,84	2H	m	CH ₂ (β) (Asp)	---
3,63-3,68	9H	m	COOCH ₃	---
4,19-4,26	1H	m	CH(α)	---
4,47-4,55	1H	m	CH(α)	---
4,71-4,78	1H	m	CH(α)	---
5,05	2H	s	CH ₂ -Ph	---
5,26-5,31	1H	d	NH	7,8 Hz
6,42-6,47	1H	d	NH	7,8 Hz
6,81-6,86	1H	d	NH	7,9 Hz
7,24-7,32	5H	m	H Aromatique	---

Boc- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)-Asp(OMe)-Glu(OMe)-OBzl 44

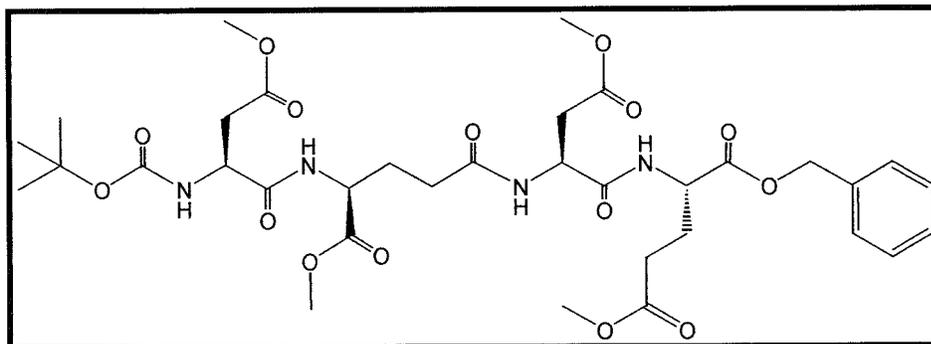


Rendement : 49%

Spectre de masse (IC) : 767,4 = (M+H)⁺ , 784,4 = (M+NH₄)⁺

RMN ¹H (CDCl₃)

δ	Intégration	Multiplicité	Assignation	Couplage
1,36	9H	s	<i>t</i> -butyl	---
1,76-2,97	14H	m	CH ₂ (β) et CH ₂ (γ)	---
3,57-3,71	12H	m	COOCH ₃	---
4,23-4,30	1H	m	CH(α)	---
4,49-4,57	2H	m	CH(α)	---
4,71-4,79	1H	m	CH(α)	---
5,08	2H	m	CH ₂ -Ph	---
5,24-5,29	1H	d	NH	7,9 Hz
6,64-6,68	2H	d	NH	8,1 Hz
7,04-7,08	1H	d	NH	8,0 Hz
7,24-7,32	5H	m	H Aromatique	---

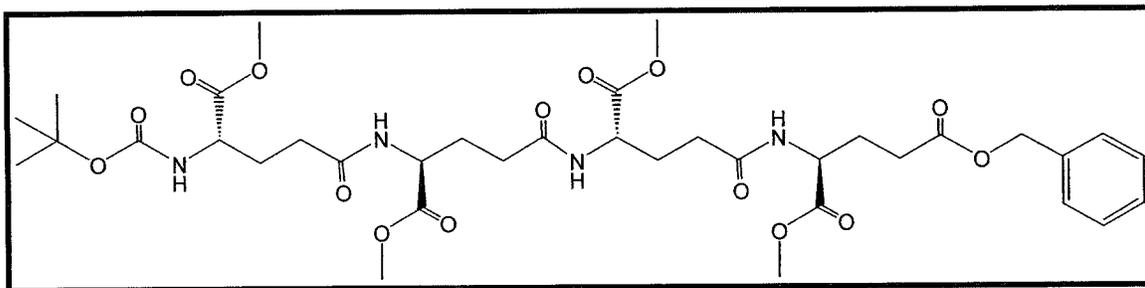
Boc-Asp(OMe)- γ -Glu(α -OMe)-Asp(OMe)-Glu(OMe)-OBzl 45

Rendement : 13%

Spectre de masse (IC): 753,4 = (M+H)⁺, 770,4 = (M+NH₄)⁺RMN ¹H (CDCl₃)

δ	Intégration	Multiplicité	Assignment	Couplage
1,36	9H	s	<i>t</i> -butyl	---
1,80-3,04	12H	m	CH ₂ (β) et CH ₂ (γ)	---
3,60-3,73	12H	m	COOCH ₃	---
4,17-4,27	1H	m	CH(α)	---
4,50-4,57	1H	m	CH(α)	---
4,66-4,85	2H	m	CH(α)	---
5,06-5,10	2H	m	CH ₂ -Ph	---
6,82-6,86	1H	d	NH	7,9 Hz
6,92-6,97	1H	d	NH	7,9 Hz
7,21-7,33	5H	m	H Aromatique	---
7,51-7,56	1H	d	NH	8,0 Hz
7,71-7,77	1H	d	NH	7,8 Hz

Boc- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)-Glu(OBzl)-OMe 35



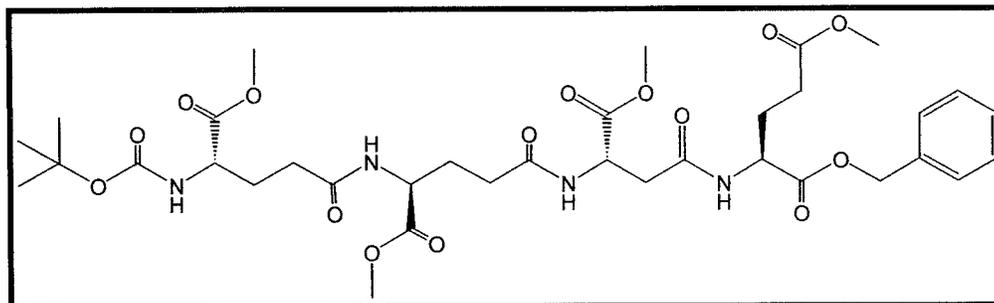
Rendement : 55%

Spectre de masse (IC): 782,4 = (M+H)⁺ , 798,4 = (M+NH₄)⁺

RMN ¹H (CDCl₃)

δ	Intégration	Multiplicité	Assignment	Couplage
1,36	9H	s	<i>t</i> -butyl	---
1,80-2,22	6H	m	CH ₂ (β)	---
2,21-2,35	6H	m	CH ₂ (β) et CH ₂ (γ)	---
2,64-2,90	4H	m	CH ₂ (β) et CH ₂ (γ)	---
3,59	3H	s	COOCH ₃	---
3,65	3H	s	COOCH ₃	---
3,67	3H	s	COOCH ₃	---
3,69	3H	s	COOCH ₃	---
4,17-4,27	1H	m	CH(α)	---
4,47-4,59	2H	m	CH(α)	---
4,75-4,82	2H	m	CH(α)	---
5,09	1H	d	CH-Ph	12,4 Hz
5,12	1H	d	CH-Ph	12,4 Hz
5,23-5,28	1H	d	NH	7,9 Hz
6,60-6,65	1H	d	NH	8,0 Hz
6,76-6,81	1H	d	NH	8,0 Hz
6,89-6,94	1H	d	NH	7,9 Hz
7,24-7,34	5H	m	H Aromatique	---

Boc- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)- β -Asp(α -OMe)-Glu(OMe)-OBzl **46**



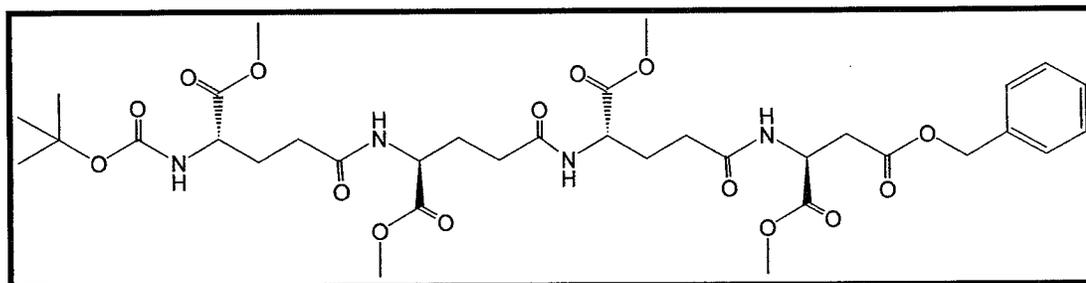
Rendement : 41%

Spectre de masse (IC) : 764,4 = (M+H)⁺ , 786,4 = (M+NH₄)⁺

RMN ¹H (CDCl₃)

δ	Intégration	Multiplicité	Assignation	Couplage
1,40	9H	s	<i>t</i> -butyl	---
1,83-2,24	6H	m	CH ₂ (β)	---
2,19-2,36	6H	m	CH ₂ (β) et CH ₂ (γ)	---
2,66-2,88	4H	m	CH ₂ (β) et CH ₂ (γ)	---
3,57	3H	s	COOCH ₃	---
3,64	3H	s	COOCH ₃	---
3,66	3H	s	COOCH ₃	---
3,69	3H	s	COOCH ₃	---
4,18-4,25	1H	m	CH(α)	---
4,47-4,60	2H	m	CH(α)	---
4,77-4,82	1H	m	CH(α)	---
5,08	1H	d	CH-Ph	12,6 Hz
5,12	1H	d	CH-Ph	12,6 Hz
5,22-5,29	1H	d	NH	7,9 Hz
6,60-6,65	1H	d	NH	7,9 Hz
6,77-6,82	1H	d	NH	7,9 Hz
6,90-6,95	1H	d	NH	7,9 Hz
7,24-7,35	5H	m	H Aromatique	---

Boc- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)-Asp(OBzl)-OMe 47



Rendement : 42%

Spectre de masse (IC): 767,4 = (M+H)⁺ , 784,4 = (M+NH₄)⁺

RMN ¹H (CDCl₃)

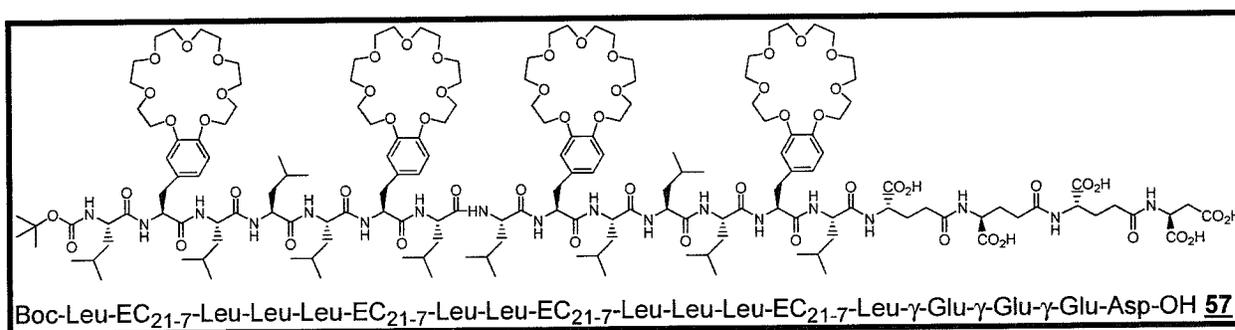
δ	Intégration	Multiplicité	Assignation	Couplage
1,41	9H	s	-butyl	---
1,71-1,96	4H	m	CH ₂ (β)	---
2,19-2,42	8H	m	CH ₂ (β) et CH ₂ (γ)	---
2,79-3,00	2H	m	CH ₂ (β) (Asp)	---
3,57	3H	s	COOCH ₃	---
3,69	6H	s	COOCH ₃	---
3,71	3H	s	COOCH ₃	---
4,25-4,33	1H	m	CH(α)	---
4,55-4,65	2H	m	CH(α)	---
4,85-4,92	1H	m	CH(α)	---
5,12	1H	d	CH-Ph	12,5 Hz
5,16	1H	d	CH-Ph	12,5 Hz
5,29-5,34	1H	d	NH	7,9 Hz
6,47-6,51	1H	d	NH	8,0 Hz
6,90-6,94	1H	d	NH	7,9 Hz
7,33-7,38	1H	d	NH	8,0 Hz
7,26-7,34	5H	m	H Aromatique	---

2.4 Synthèse finale des nanostructures peptidiques

2.4.1 Couplage au C-terminal du 14-mère des chaînes de types Asp/Glu et déprotection

Le couplage du 14-mère acide avec une des chaînes présentées précédemment se fait en solution selon le protocole 2.3.4. La déprotection des acides carboxyliques se fait par hydrolyse alcaline avec NaOH 0,5 N pendant 6 heures. Le peptide est préalablement dissous dans un minimum de méthanol et la température est maintenue à 60°C. À la fin, le pH est ajusté entre 2 et 3. On extrait au dichlorométhane (3 fois), puis on lave avec de l'eau (3 fois). La phase organique est séchée avec MgSO₄ et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le composé obtenu est alors lyophilisé pour obtenir un solide blanc. Lorsque cela est nécessaire, le produit est purifié par HPLC.

***N*-t-Butyloxycarbonyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L- γ -Glutamyl-L- γ -Glutamyl-L- γ -Glutamyl-L-Aspartate 57**

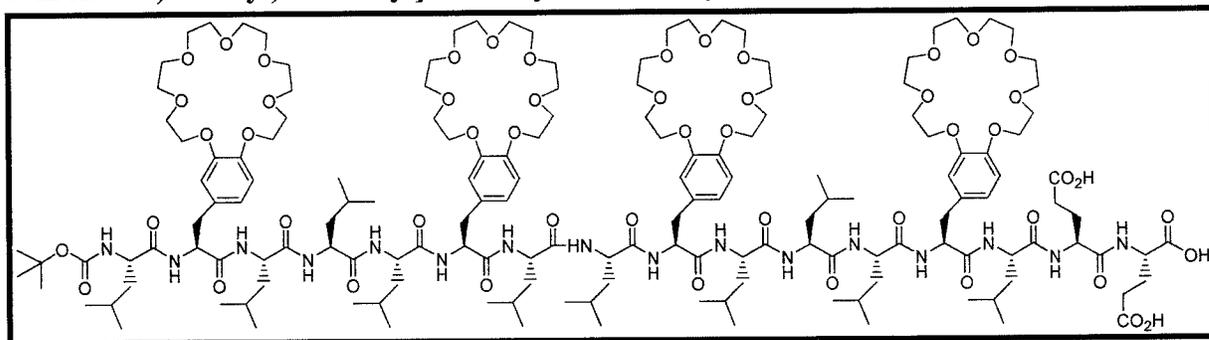


Boc-14-mère- γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu-Asp-OH 57

HPLC analytique : 34,1 min

Spectre de masse (MALDI): m/z 3474,18 = (M+Na)⁺, 3495,99 = (M+K)⁺

***N*-*t*-Butyloxycarbonyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Glutamyl-L-Glutamate 58**

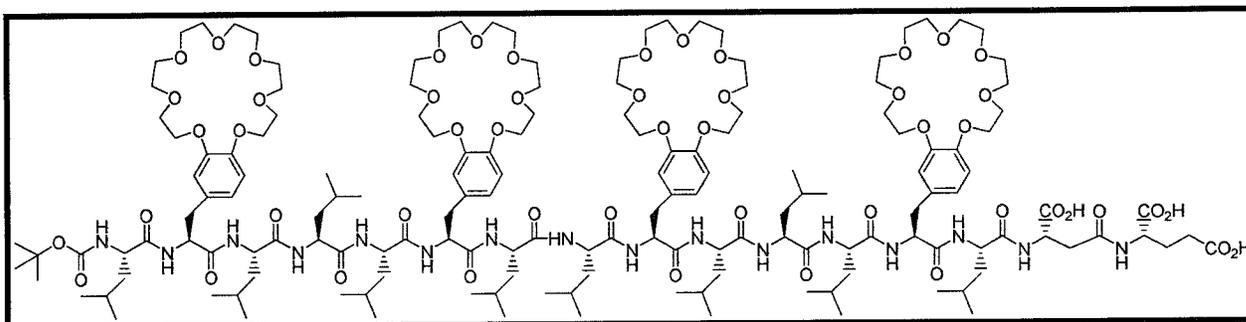


Boc-14-mère-Glu-Glu-OH 58

Spectre de masse (MALDI): m/z 3232,85 = (M+H)⁺, 3254,87 = (M+Na)⁺

HPLC analytique : 36,3 min

***N*-*t*-Butyloxycarbonyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-β-L-Aspartyl-L-Glutamate 59**

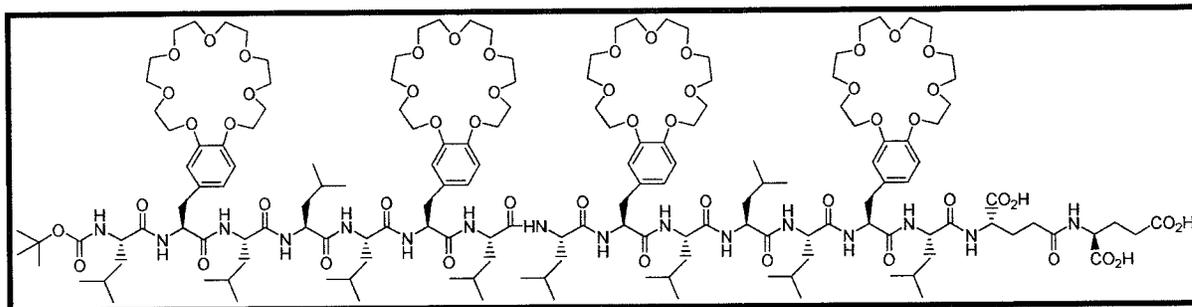


Boc-14-mère-β-Asp-Glu-OH 59

Spectre de masse (MALDI): m/z 3218,65 = (M+Na)⁺

HPLC analytique : 40,0 min

***N*-*t*-Butyloxycarbonyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L- γ -Glutamyl-L-Glutamate 60**



Boc-14-mère- γ -Glu-Glu-OH 60

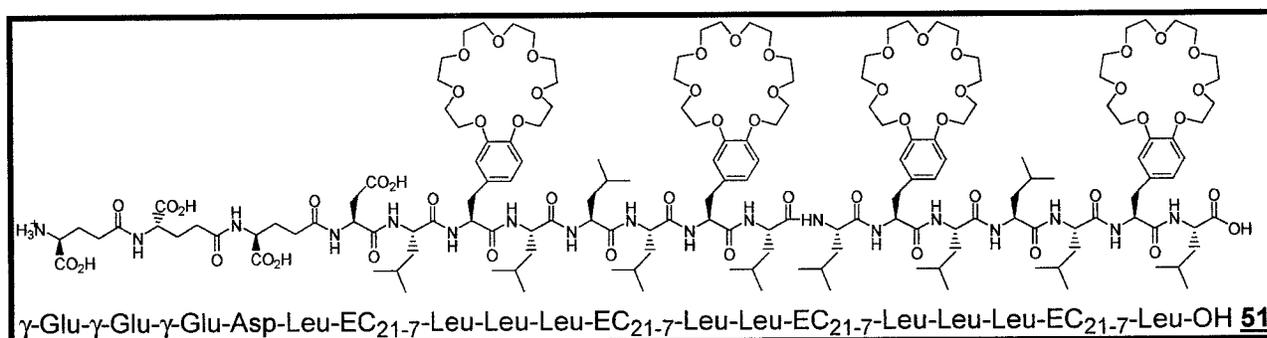
Spectre de masse (MALDI): m/z 3231,49 = (M+Na)⁺

HPLC analytique : 39,6 min

2.4.2 Couplage au *N*-terminal du 14-mère des chaînes de types Asp/Glu et déprotection

Le couplage du 14-mère avec une des chaînes présentées précédemment se fait par condensation de segments sur support solide selon le protocole général 2.2.1.13. Le clivage des pro-peptides s'effectue selon le protocole 2.2.1.12. Cette procédure permet aussi la déprotection partielle des acides carboxyliques. Par la suite, les acides carboxyliques non-déprotégés le sont par hydrolyse alcaline selon le protocole 2.4.1. Le composé obtenu est alors lyophilisé pour obtenir un solide blanc. Lorsque cela est nécessaire, le produit est purifié par HPLC.

L- γ -Glutamyl-L- γ -Glutamyl-L- γ -Glutamyl-L-Aspartyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucine 51

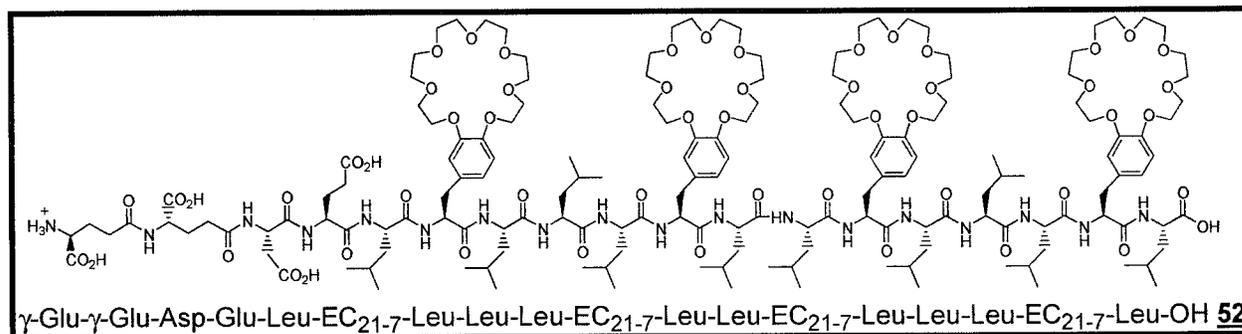


γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu-Asp-14-mère-OH 51

Spectre de masse (MALDI): m/z 3489,78 = Boc+(M+Na)⁺

HPLC analytique : 30-32 min

L- γ -Glutamyl-L- γ -Glutamyl-L-Aspartyl-L-Glutamyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucine 52

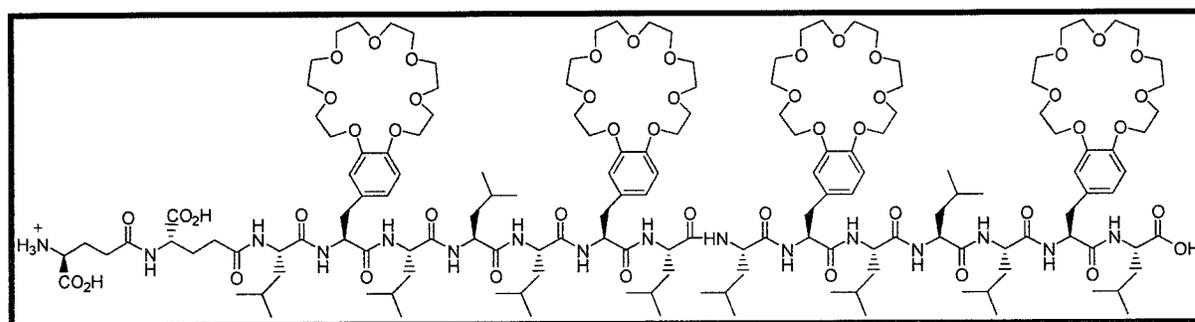


γ -Glu- γ -Glu-Asp-Glu-14-mère-OH 52

Spectre de masse (MALDI): m/z 3350,16 = (M+H)⁺

HPLC Analytique : 30-32 min

L- γ -Glutamyl-L- γ -Glutamyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucine 53

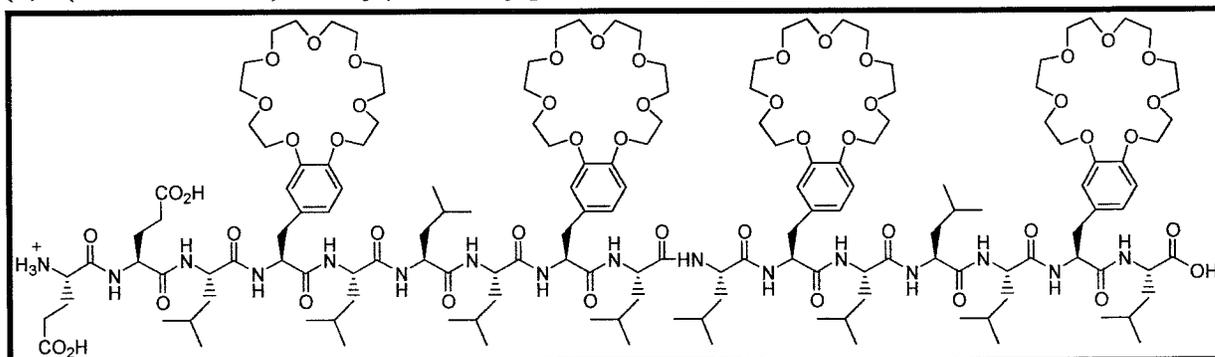


γ -Glu- γ -Glu-14-mère-OH 53

Spectre de masse (MALDI): m/z 3130,89 = (M+Na)⁺ , 3152,63 = (M+K)⁺

HPLC analytique : 32,0 min

L-Glutamyl-L-Glutamyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucine 55

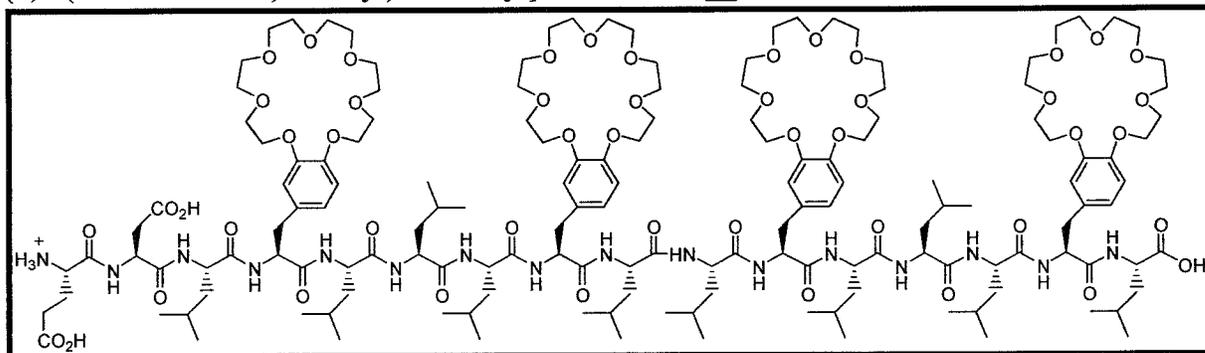


Glu-Glu-14-mère-OH 55

Spectre de masse (MALDI): m/z 3131,76 = (M+Na)⁺, 3152,93 = (M+K)⁺

HPLC analytique : 29,7 min

L-Glutamyl-L-Aspartyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-Phényl)-L-Alanyl]-L-Leucine 56



Glu-Asp-14-mère-OH 56

Spectre de masse (MALDI): m/z 3117,20 = (M+Na)⁺, 3133,07 = (M+K)⁺

HPLC analytique : 34,9 min

3. Activité lytique

3.1 Études de perméabilité des vésicules

3.1.1 Préparation des solutions tampons

3.1.1.1 Tampon interne

50 mL de tampon interne sont préparés dans l'eau en y dissolvant les composés suivants : HEPES (100 mM), NaCl (30 mM) et EDTA (5 mM). Le pH est ajusté à 7,4 à l'aide d'une solution de NaOH (1 N ou 0,1 N).

3.1.1.2 Solution de calcéine ou de carboxyfluorescéine

De la calcéine ou de la carboxyfluorescéine est dissous dans le tampon interne pour l'obtention d'une solution de concentration égale à 80 mM. Le pH est réajusté à 7,4 à l'aide d'une solution de NaOH (1 N ou 0,1 N).

3.1.1.3 Tampon externe

500 mL de tampon externe sont préparés dans l'eau en y dissolvant les composés suivants : HEPES (100 mM), NaCl (170 mM) et EDTA (5 mM). Le pH est ajusté à 7,4 à l'aide d'une solution de NaOH (1 N ou 0,1 N).

3.1.2 Préparation des vésicules

3.1.2.1 Vésicule de DMPG :DMPC

13 mg de phosphatidylglycérol (0,65 mL d'une solution de 20 mg/mL) et 5,2 mg de phosphatidylcholine (0,26 mL d'une solution de 20 mg/mL) sont dilués dans 25 mL de chloroforme. La solution est évaporée à sec sous pression réduite et placée sous vide

environ 2 heures. Le film lipidique ainsi obtenu est mis en contact avec 5 mL de la solution de calcéine ou de carboxyfluorescéine. La solution est placée, pendant 40 minutes, dans un bain ultrason contenant de l'eau et de la glace pour conserver la température entre 2 et 5 °C. Les vésicules sont filtrées sur une membrane de polycarbonates possédant des pores de 0,4 micron. Par la suite, la solution de vésicules contenant des fluorophores libres est purifiée par chromatographie d'exclusion sur une colonne de gel de Séphadex G-50. Le tampon externe est utilisé comme éluant et comme éluant. La première fraction colorée d'environ 10 mL est recueillie et est utilisée pour les expériences de fluorescence.

3.1.2.2 Vésicule de DOPC :Cholestérol

612 µL d'une solution de 10 mg/mL de DOPC et 138 µL d'une solution de 10 mg/mL de cholestérol sont dilués dans 25 mL de chloroforme. La solution est évaporée à sec sous pression réduite et placée sous vide environ 2 heures. Le film lipidique ainsi obtenu est mis en contact avec 5 mL de la solution de calcéine ou de carboxyfluorescéine. La solution est placée dans un bain ultrason, pendant 40 minutes, contenant de l'eau et de la glace pour conserver la température entre 2 et 5 °C. Les vésicules sont filtrées sur une membrane de polycarbonates possédant des pores de 0,4 microns. Par la suite, la solution de vésicules contenant des fluorophores libres est purifiée par chromatographie d'exclusion sur une colonne de gel de Séphadex G-50. Le tampon externe est utilisé comme éluant. La première fraction colorée d'environ 10 mL est recueillie et est utilisée pour les expériences de fluorescence.

3.1.3 Préparation des échantillons pour les tests de perméabilité

Les solutions suivantes sont préparées avant la prise des mesures. Dans des cellules de quartz de 1 cm², 4 mL de la solution de tampon externe est additionné à 50 µL de la solution de vésicules préparée précédemment. Un agitateur magnétique est ajouté dans la cellule.

3.1.4 Réglage des paramètres et prise des mesures

Les paramètres du spectrofluorimètre sont présentés au tableau suivant :

Paramètres	Ajustement
Programme	Kinetic
Longueur d'onde d'excitation	490 nm
Longueur d'onde d'émission	513 nm
Sensibilité du détecteur	Entre 500 et 800 V
Température	25 °C
Temps	400 ou 500 sec

La cellule est placée dans l'appareil et l'agitation est mise en marche. On démarre la prise de mesure. Après un temps de 50 secondes, la solution contenant l'agent lytique testé est additionnée selon les concentrations désirées. Après 300 ou 400 secondes, 10 mL d'une solution de Triton-X (10% dans l'eau) sont ajoutés. L'expérience est complétée à 400 ou 500 secondes. Les expériences ont été réalisées en triplicata.

3.2 Hémolysé des érythrocytes

Du sang frais est centrifugé à 7500 rotations par minute, puis le sérum est discarté. Le sang est lavé trois fois avec du tampon PBS froid. Une solution mère de peptide 1,5 mM dans le DMSO est dilué à l'aide de PBS pour obtenir différentes concentrations peptidiques finales. À chaque solution de peptides, 60 µL de solution cellulaire sont ajoutés et incubés à 37°C pendant 30 minutes. Les échantillons sont centrifugés pendant 10 minutes et l'absorbance du surnageant est mesurée à 414 nm. Les valeurs de 0% et 100% d'absorbance sont déterminés en absence de peptide et en substituant le tampon avec de l'eau pure respectivement.

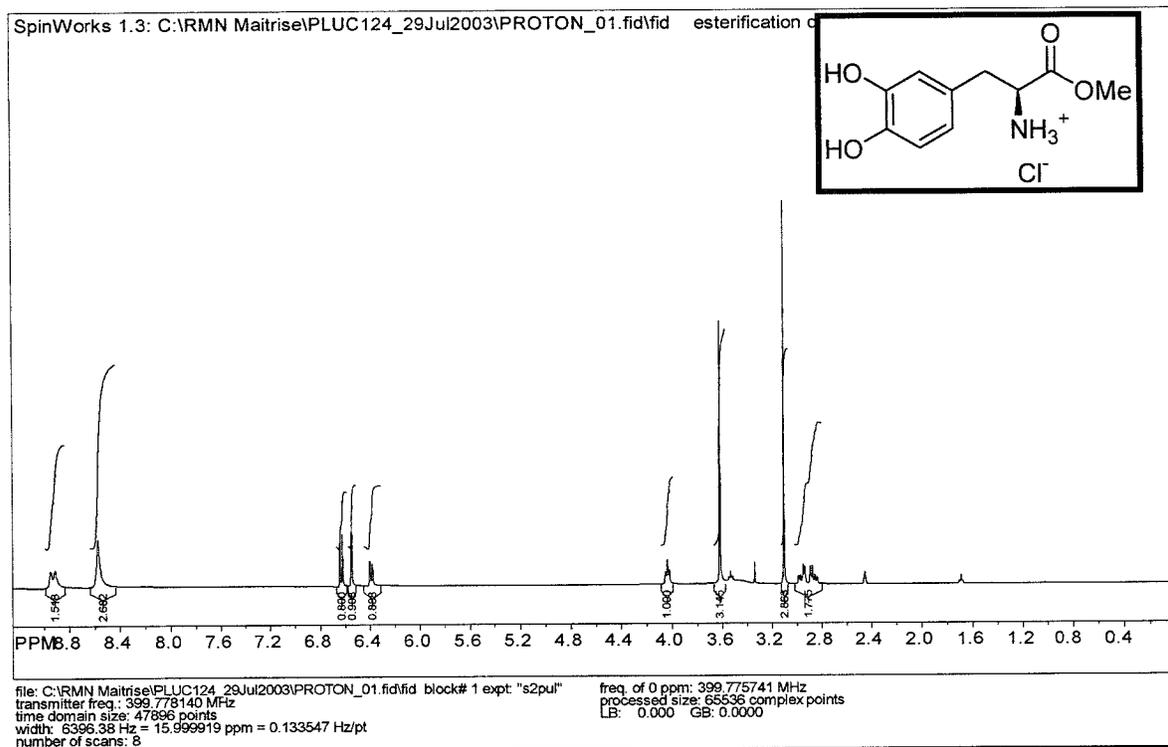
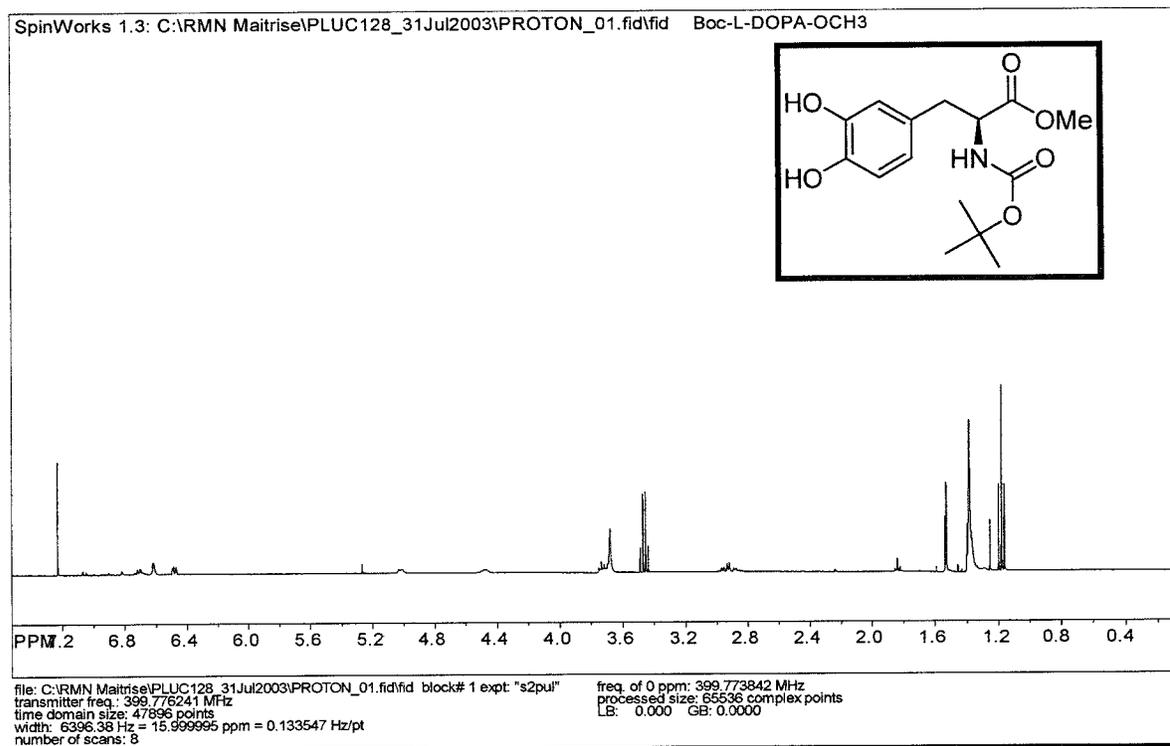
3.3 Études conformationnelles par spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire (DC)

Nous préparons une solution du peptide étudié, à une concentration de 0,5 mg/mL, dans le trifluoroéthanol (TFE). Toutes les mesures sont effectuées à l'aide d'une cellule cylindrique en quartz de 0,01 à 0,05 cm de chemin optique à 25°C et par rapport à la référence constituée par le solvant seul. Les valeurs sont exprimées en ellipticité molaire moyenne par résidu $[\theta]$ ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$), c'est-à-dire en considérant que la masse molaire du peptide est celle d'un acide aminé moyen (109 g/mol). Les courbes sont présentées après réduction du bruit par traitement informatique.

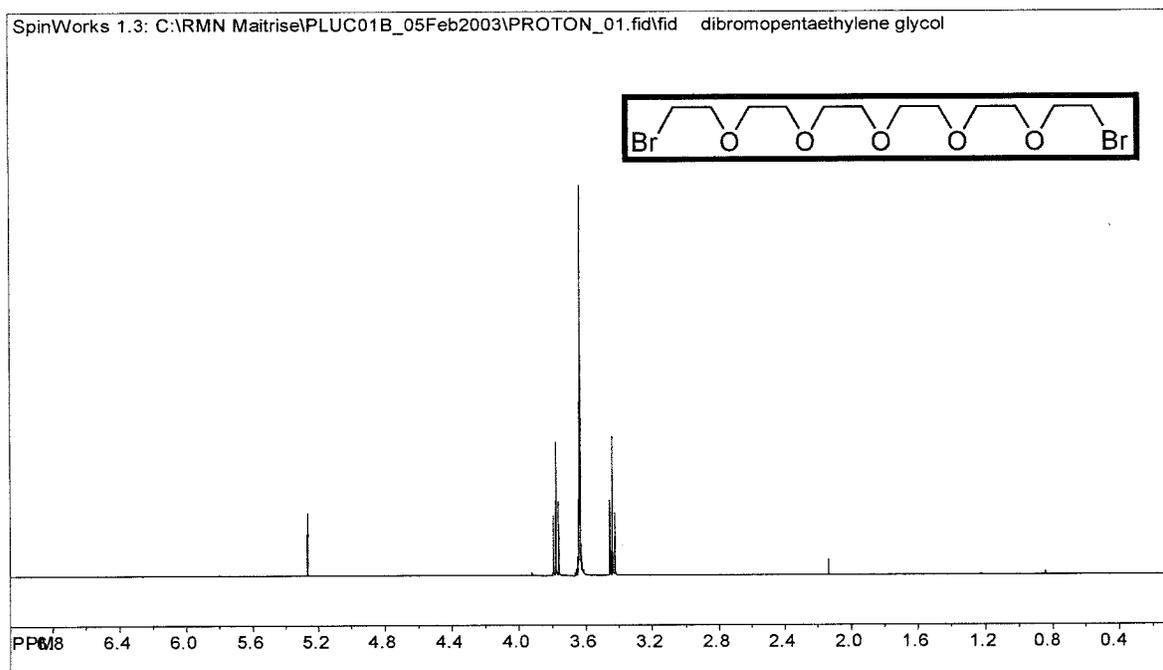
- Paramètres utilisés :
 - longueur de la bande : 1.0 nm
 - sensibilité : 5 mdeg
 - temps de réponse : 1 s
 - longueur d'onde initiale 250 nm
 - longueur d'onde finale : 190 nm
 - vitesse de balayage : 100 nm/min
 - résolution
 - nombre d'accumulations : 20

ANNEXE

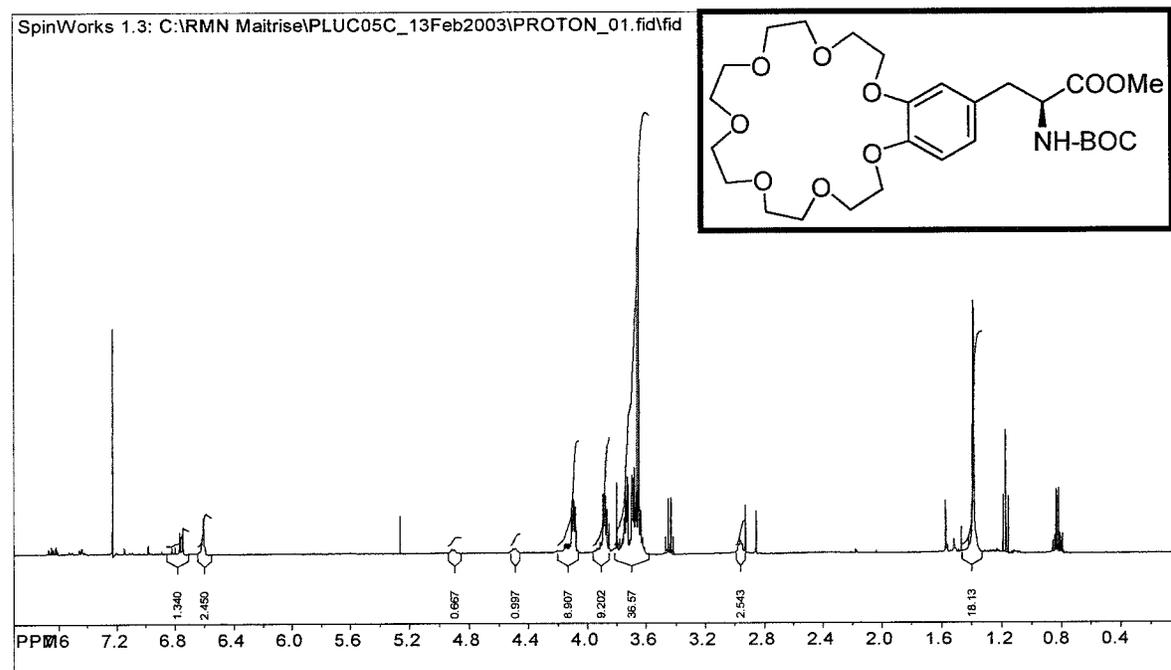
ANNEXE 1**Spectres RMN ^1H**

HCl-L-DOPA-OCH₃ 12.1**Boc-L-DOPA-OCH₃ 13**

Br-(CH₂CH₂O)₅-CH₂CH₂-Br 14

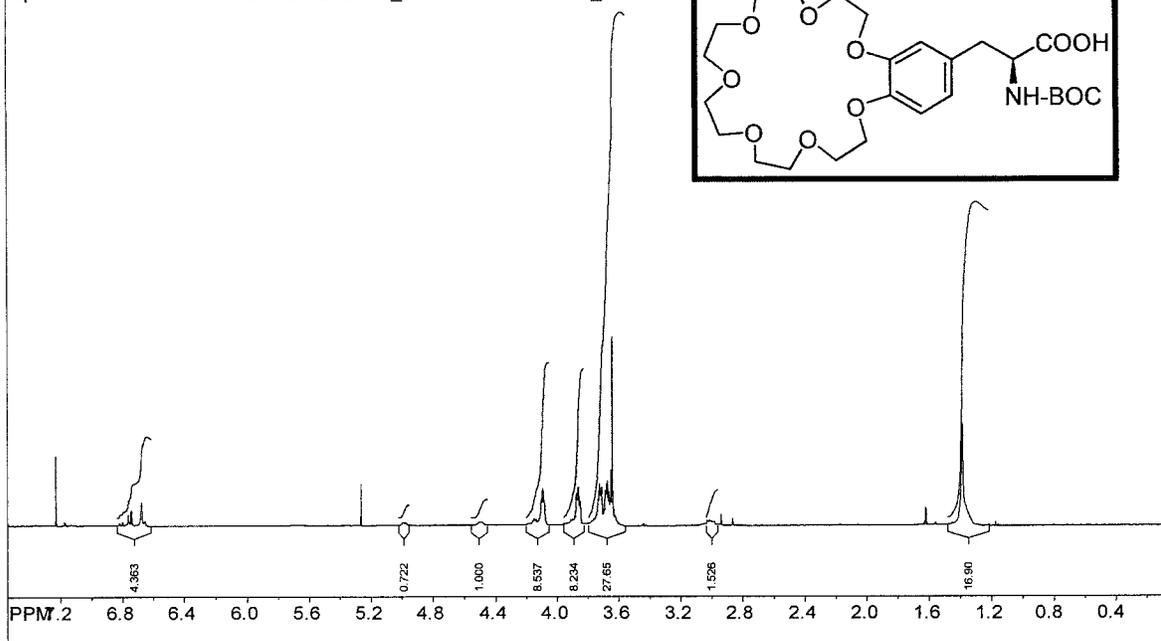


Boc-EC₂₁₋₇-OCH₃ 15



Boc-EC₂₁₋₇-OH 15

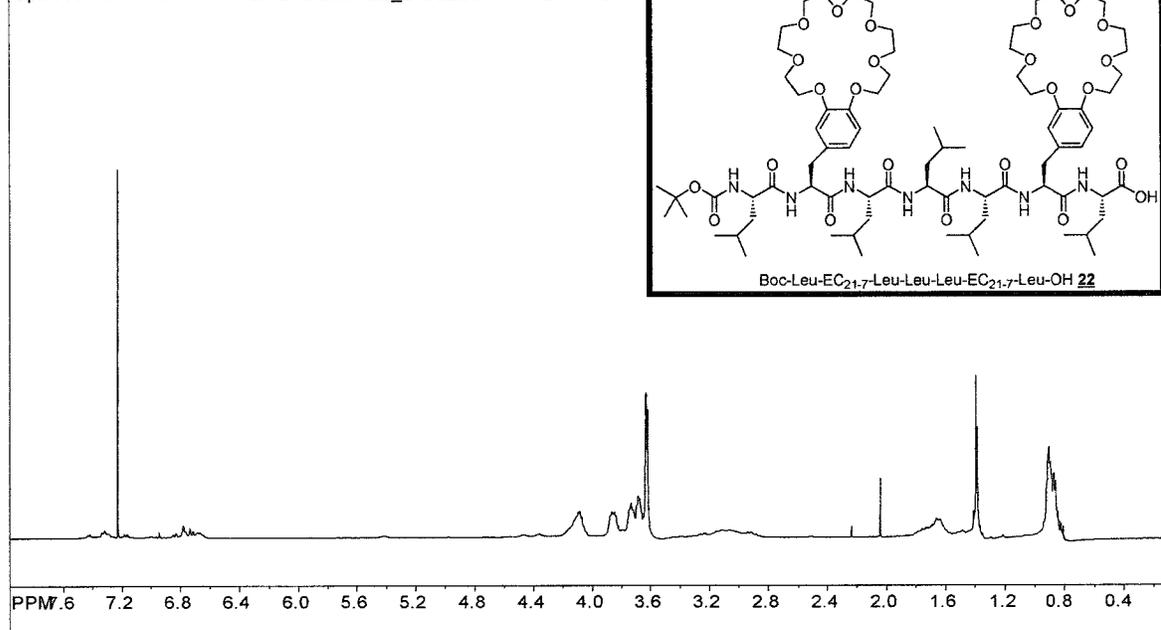
SpinWorks 1.3: C:\RMN Maitrise\PLUC06B_19Feb2003\PROTON_01.fid\fid



file: C:\RMN Maitrise\PLUC06B_19Feb2003\PROTON_01.fid\fid block# 1 expt: "s2pul" freq. of 0 ppm: 399.773842 MHz
 transmitter freq.: 399.776241 MHz processed size: 65536 complex points
 time domain size: 47896 points LB: 0.000 GB: 0.0000
 width: 6396.38 Hz = 15.99995 ppm = 0.133547 Hz/pt
 number of scans: 8

Boc-Leu-EC₂₁₋₇-Leu-Leu-Leu-EC₂₁₋₇-Leu-OH 22

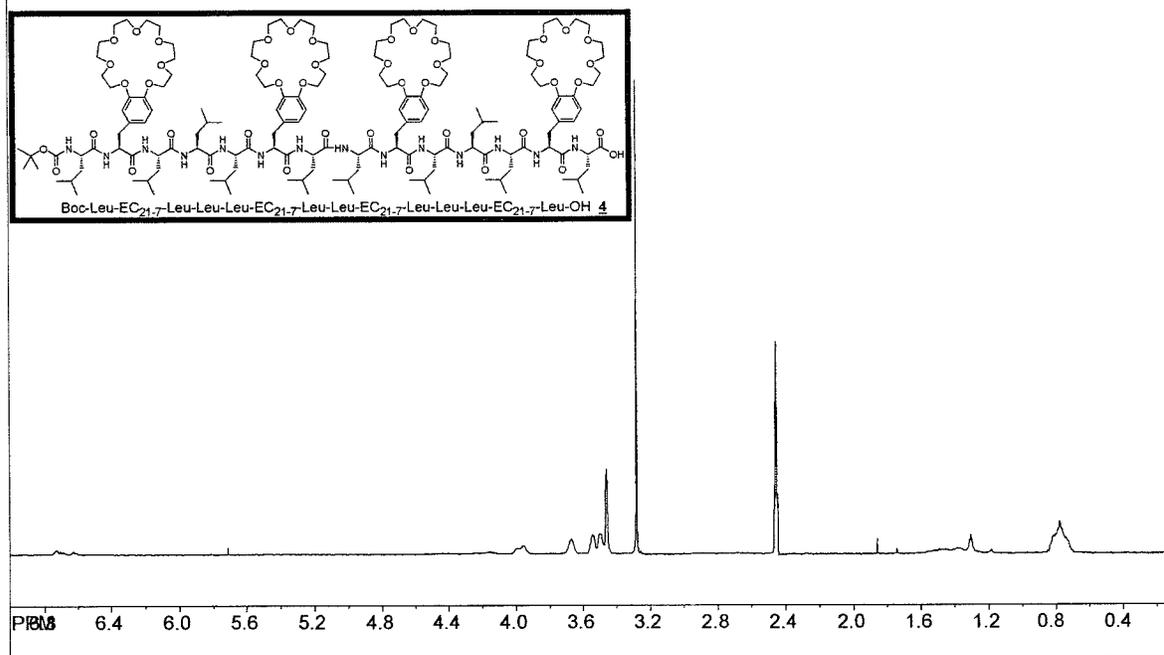
SpinWorks 1.3: C:\RMN Maitrise\PLUC120_24Jul2003-105625\PROTON_01.fid\fid



file: C:\RMN Maitrise\PLUC120_24Jul2003-105625\PROTON_01.fid\fid block# 1 expt: "s2pul" freq. of 0 ppm: 399.773842 MHz
 transmitter freq.: 399.776241 MHz processed size: 65536 complex points
 time domain size: 47896 points LB: 0.000 GB: 0.0000
 width: 6396.38 Hz = 15.99995 ppm = 0.133547 Hz/pt
 number of scans: 32

Boc-[Leu-EC_{21.7}-Leu-Leu-Leu-EC_{21.7}Leu]₂-OH 4

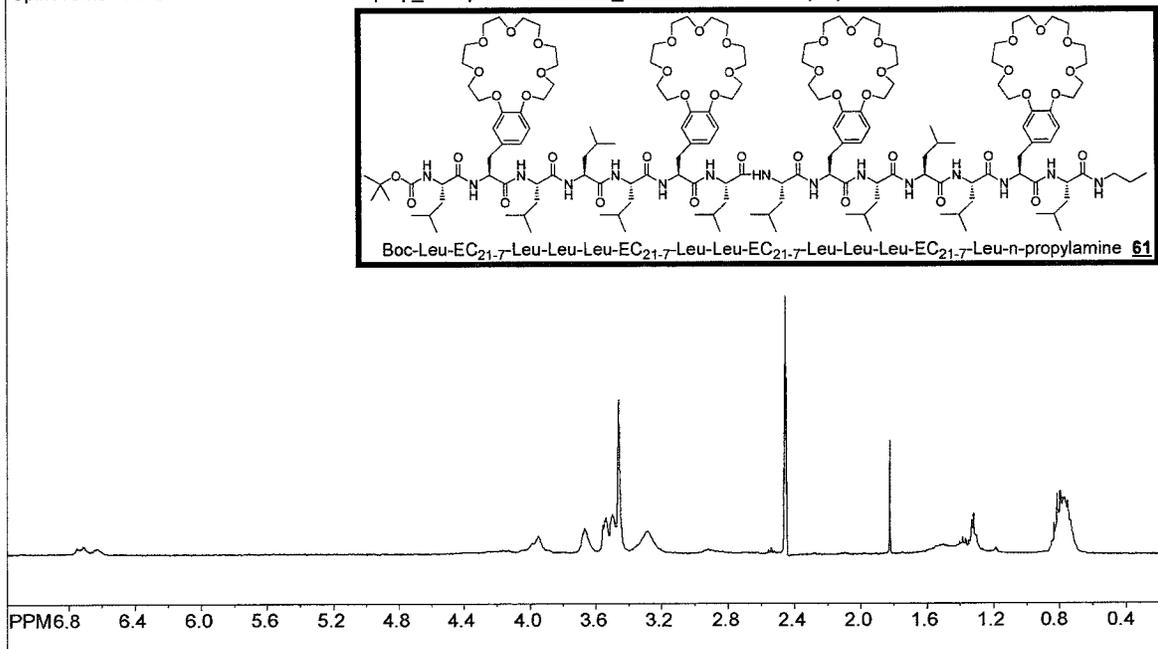
SpinWorks 1.3: C:\RMN Maitrise\PLUC259_13Sep2004\PROTON_01.fid\fid Boc-14-OH



file: C:\RMN Maitrise\PLUC259_13Sep2004\PROTON_01.fid\fid block# 1 expt: "s2pul" freq. of 0 ppm: 399.775741 MHz
 transmitter freq.: 399.778140 MHz processed size: 65536 complex points
 time domain size: 47896 points LB: 0.000 GB: 0.0000
 width: 6396.38 Hz = 15.999919 ppm = 0.133547 Hz/pt
 number of scans: 16

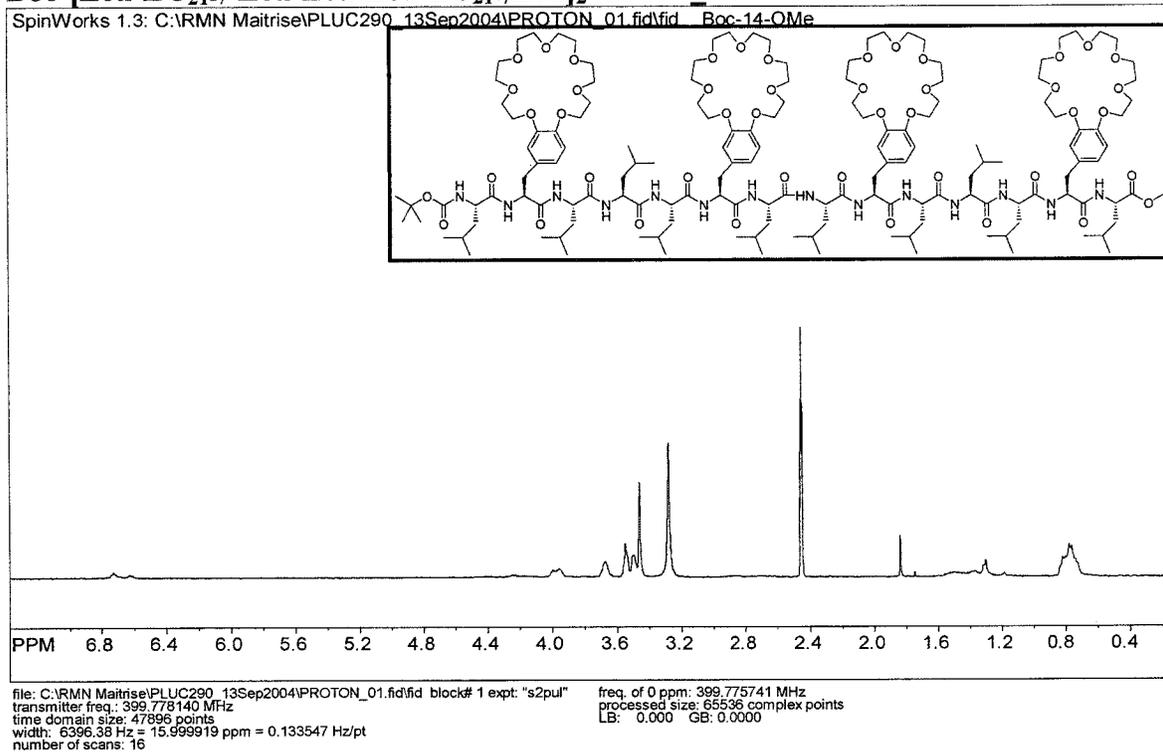
Boc-[Leu-EC_{21.7}-Leu-Leu-Leu-EC_{21.7}Leu]₂-n-Pr 61

SpinWorks 1.3: C:\RMN Maitrise\PLUCn-prop_13Sep2004\PROTON_01.fid\fid Boc-14-n-prop

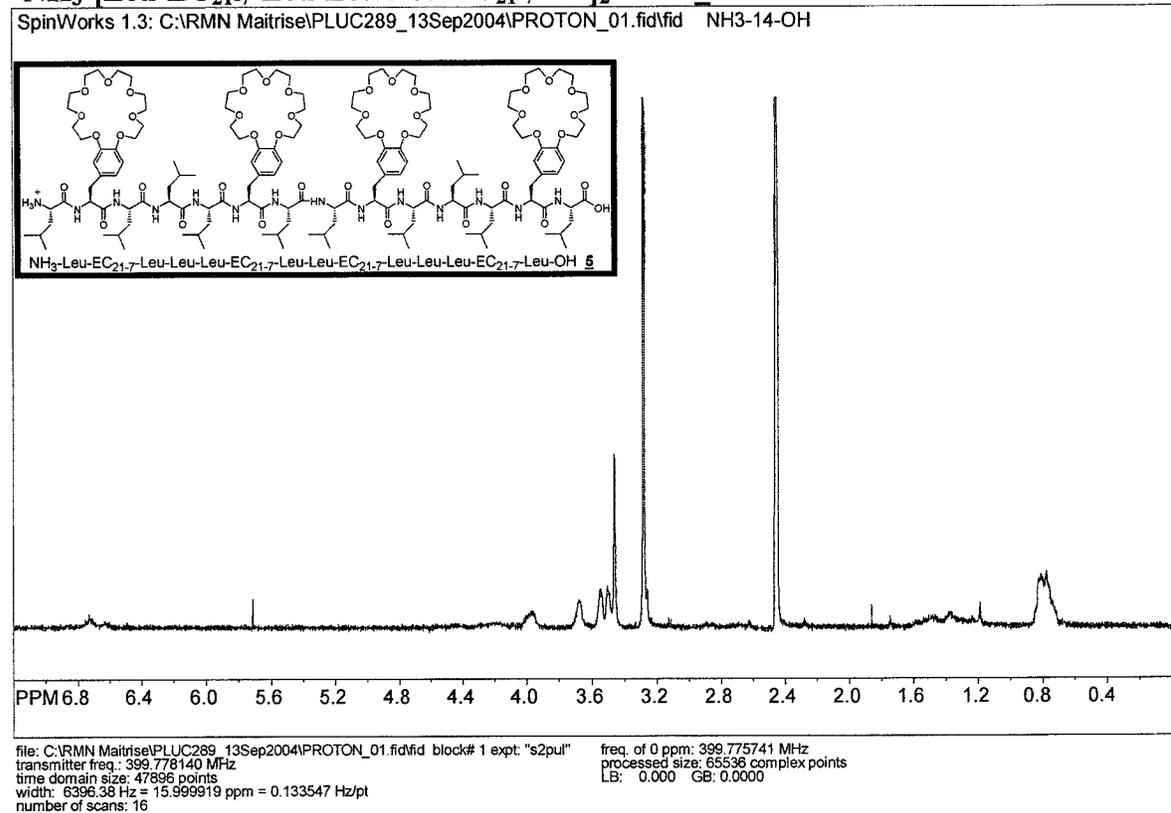


file: C:\RMN Maitrise\PLUCn-prop_13Sep2004\PROTON_01.fid\fid block# 1 expt: "s2pul" freq. of 0 ppm: 399.775741 MHz
 transmitter freq.: 399.778140 MHz processed size: 65536 complex points
 time domain size: 47896 points LB: 0.000 GB: 0.0000
 width: 6396.38 Hz = 15.999919 ppm = 0.133547 Hz/pt
 number of scans: 16

Boc-[Leu-EC₂₁₋₇-Leu-Leu-Leu-EC₂₁₋₇Leu]₂-OMe **2**

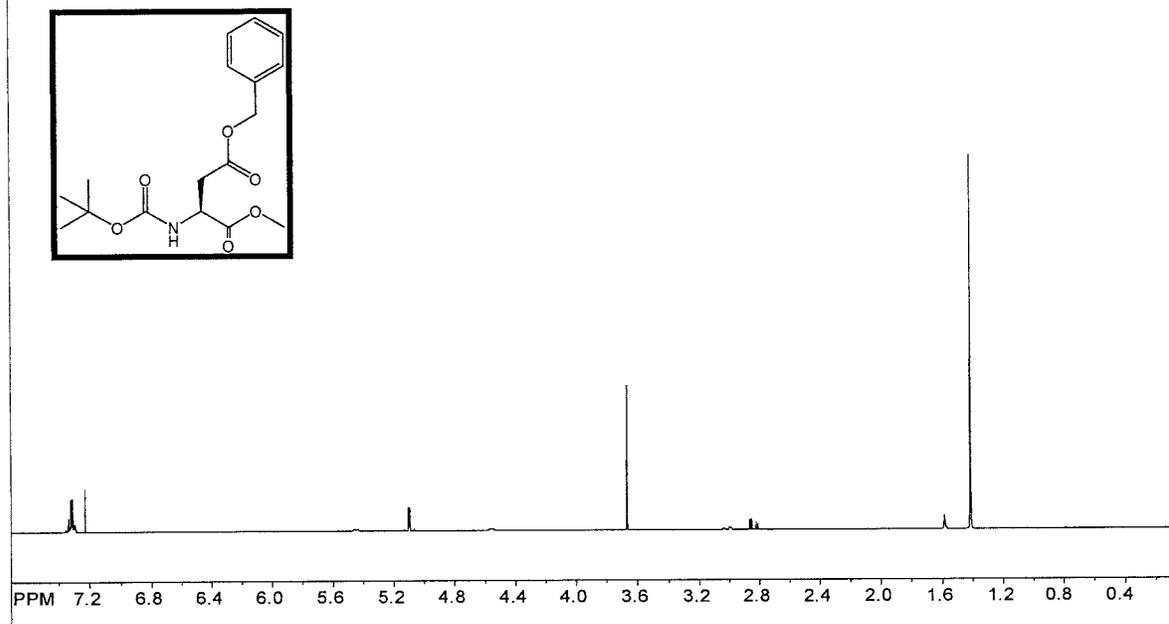


⁺NH₃-[Leu-EC₂₁₋₇-Leu-Leu-Leu-EC₂₁₋₇Leu]₂-OH **5**



Boc-Asp(OBzl)-OMe 62

SpinWorks 1.3: C:\RMN Maitrise\PLUC88_04Jun2003\PROTON_01.fid\fid Boc-Asp(Bzl)OMe

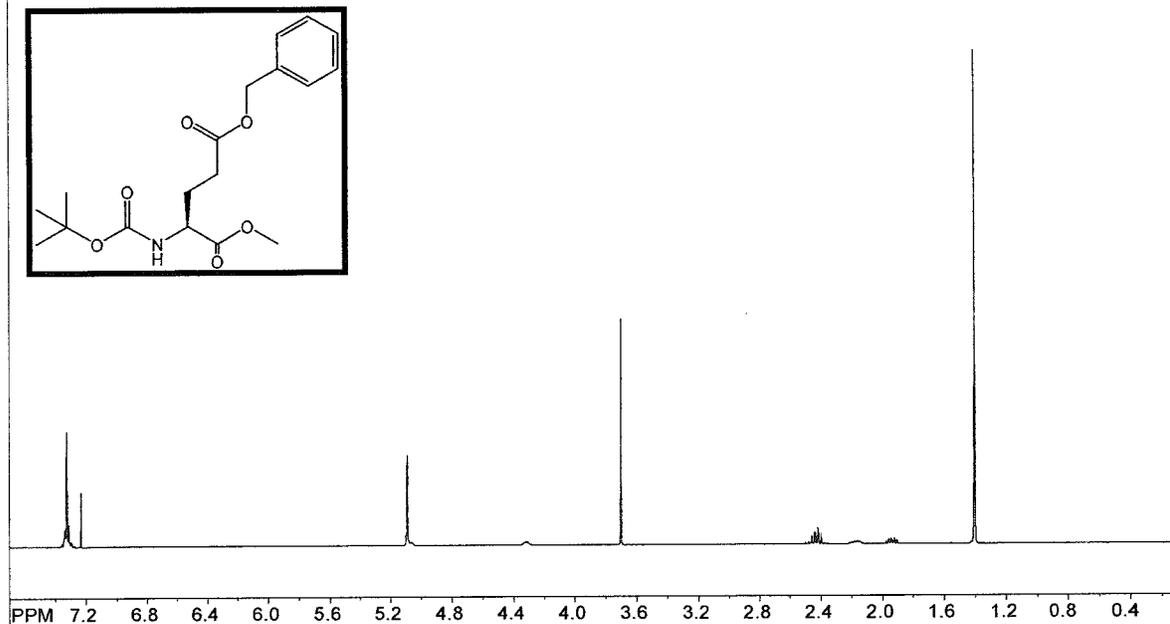


file: C:\RMN Maitrise\PLUC88_04Jun2003\PROTON_01.fid\fid block# 1 expt: "s2pul"
 transmitter freq.: 399.776241 MHz
 time domain size: 47896 points
 width: 6396.38 Hz = 15.999995 ppm = 0.133547 Hz/pt
 number of scans: 8

freq. of 0 ppm: 399.773842 MHz
 processed size: 65536 complex points
 LB: 0.000 GB: 0.0000

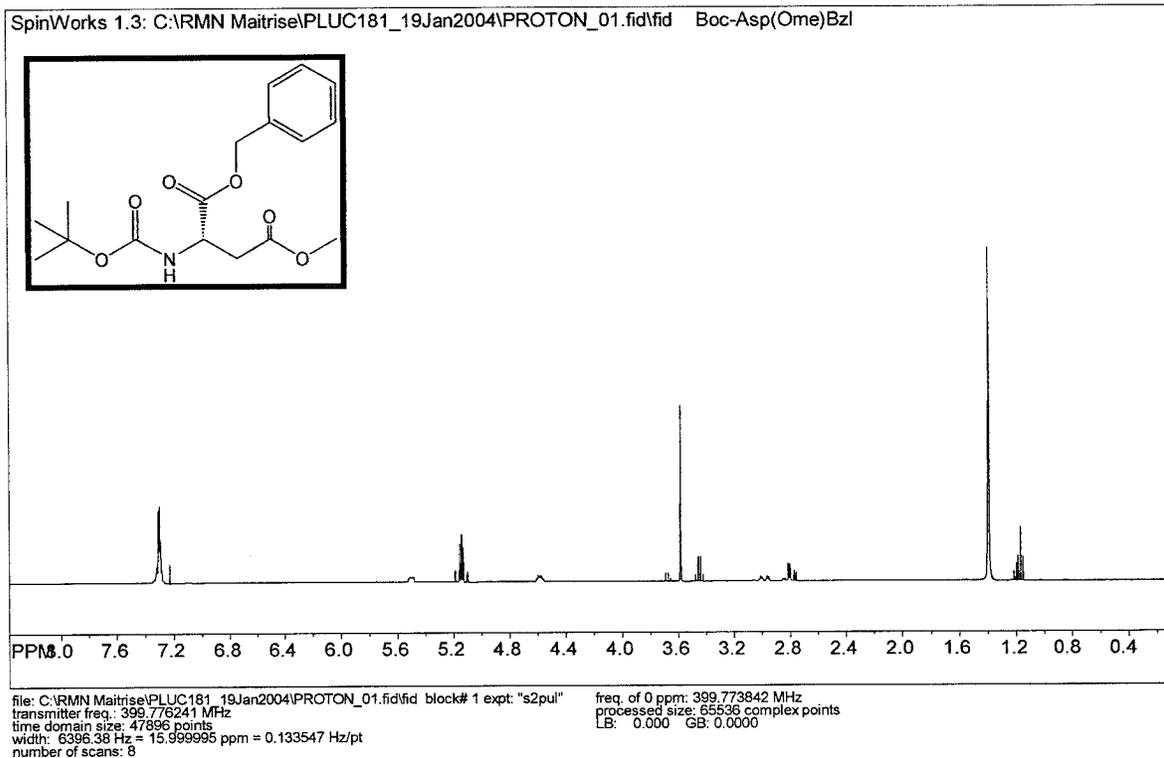
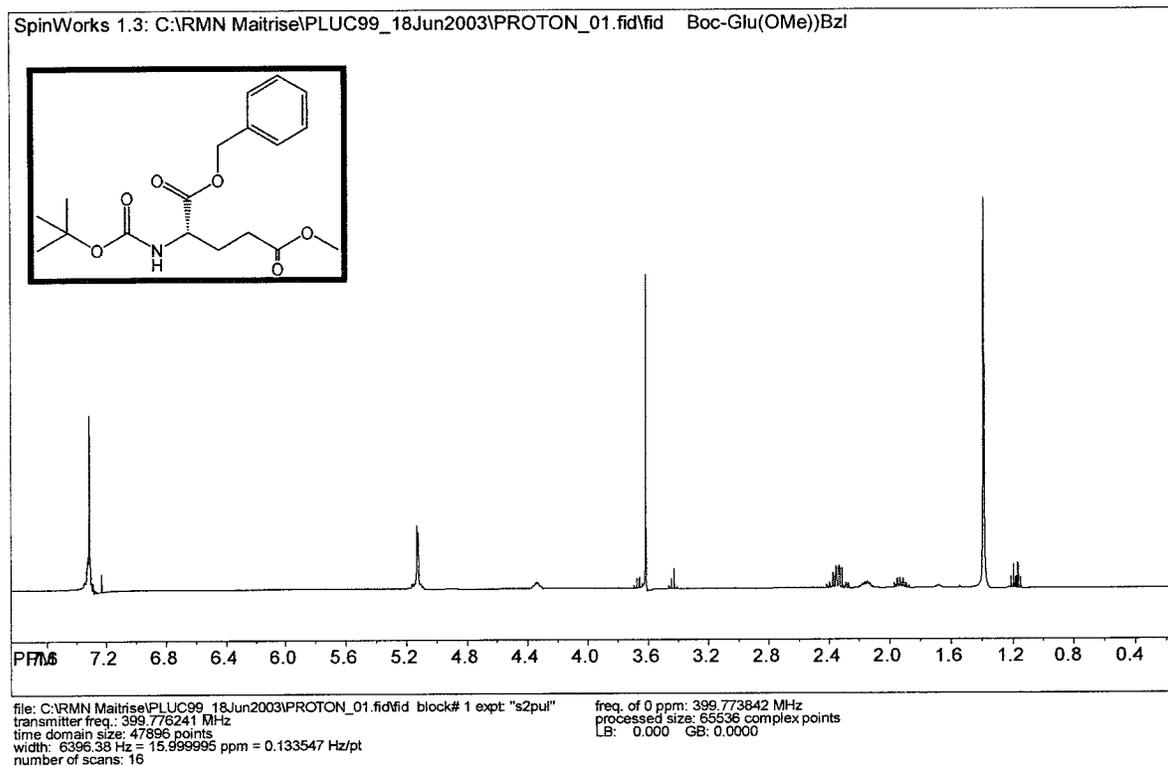
Boc-Glu(OBzl)-OMe 29

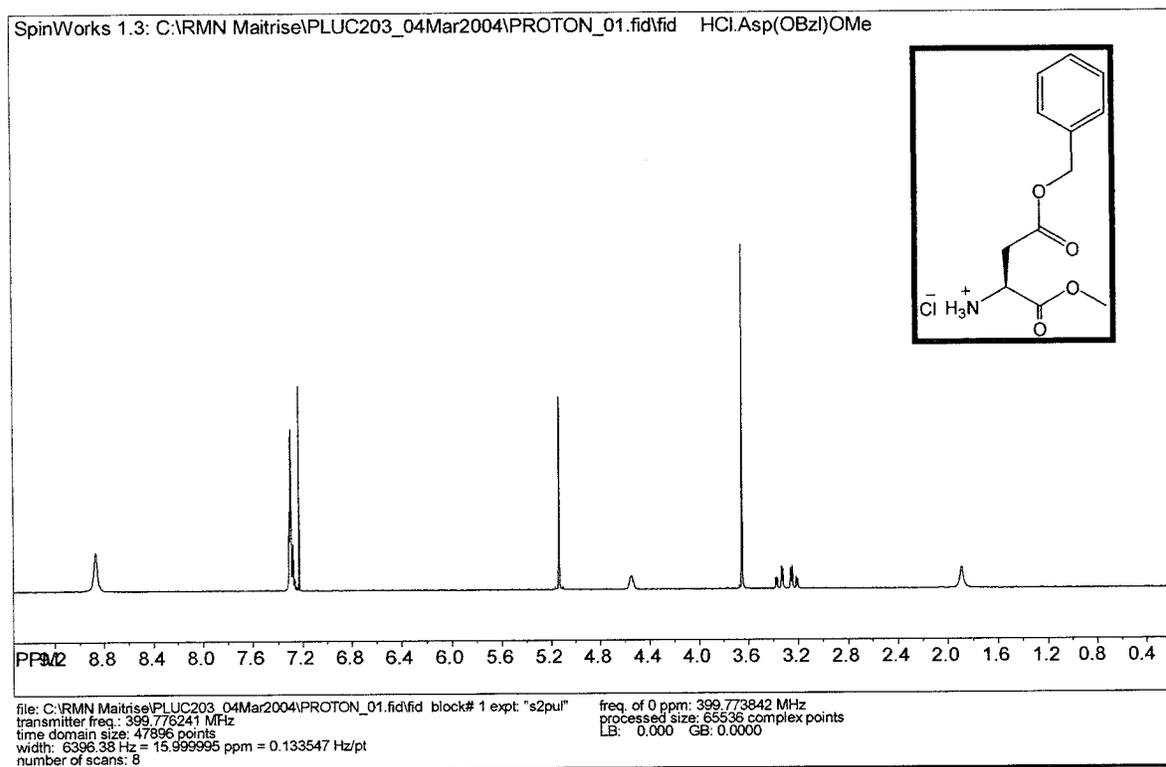
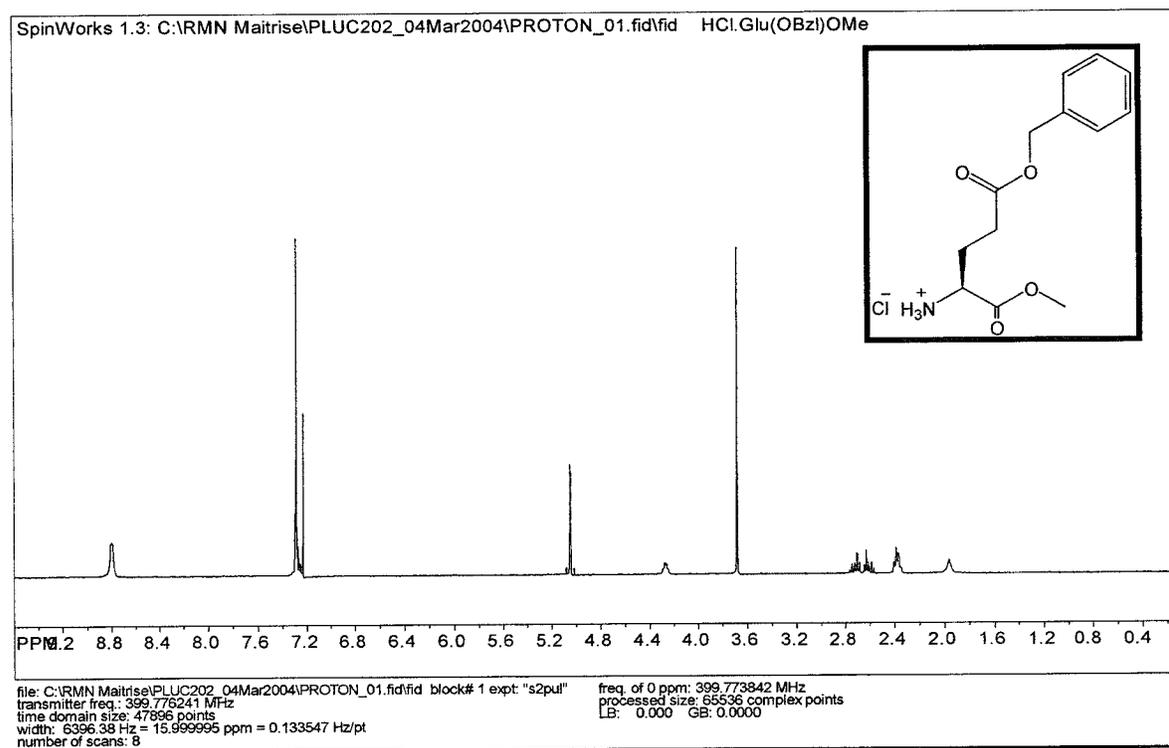
SpinWorks 1.3: C:\RMN Maitrise\PLUC187_04Feb2004\PROTON_01.fid\fid Boc-Glu(OBzl)-OMe

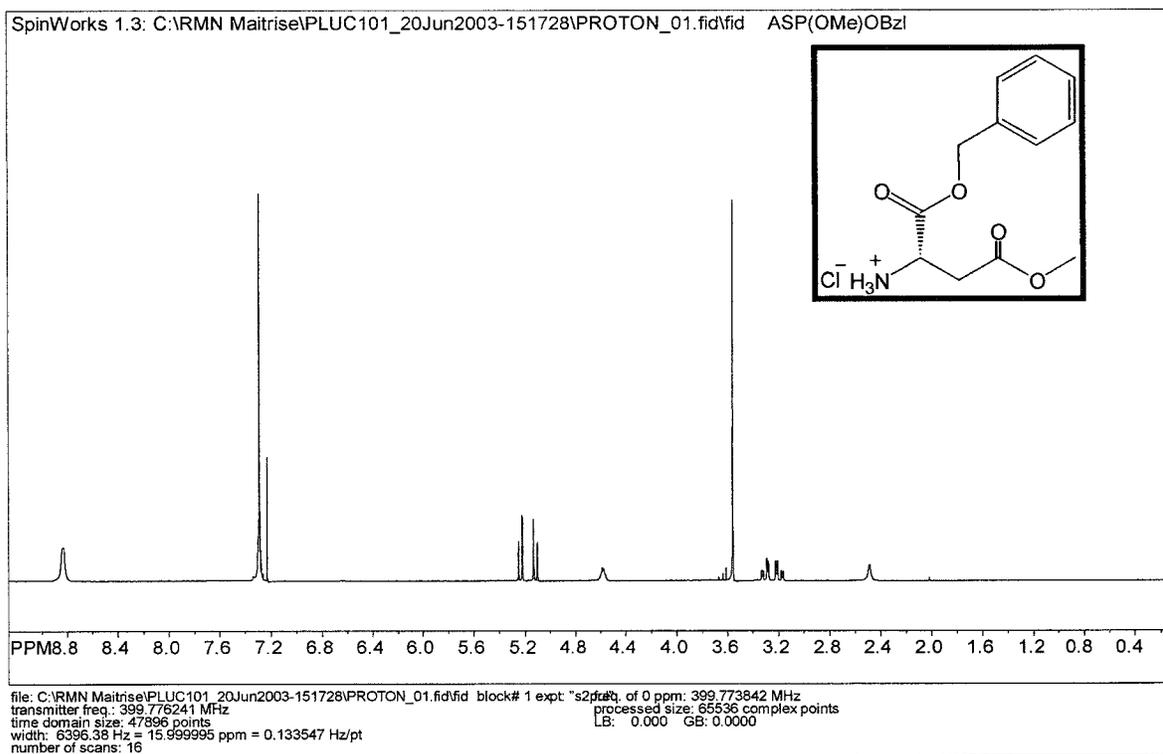
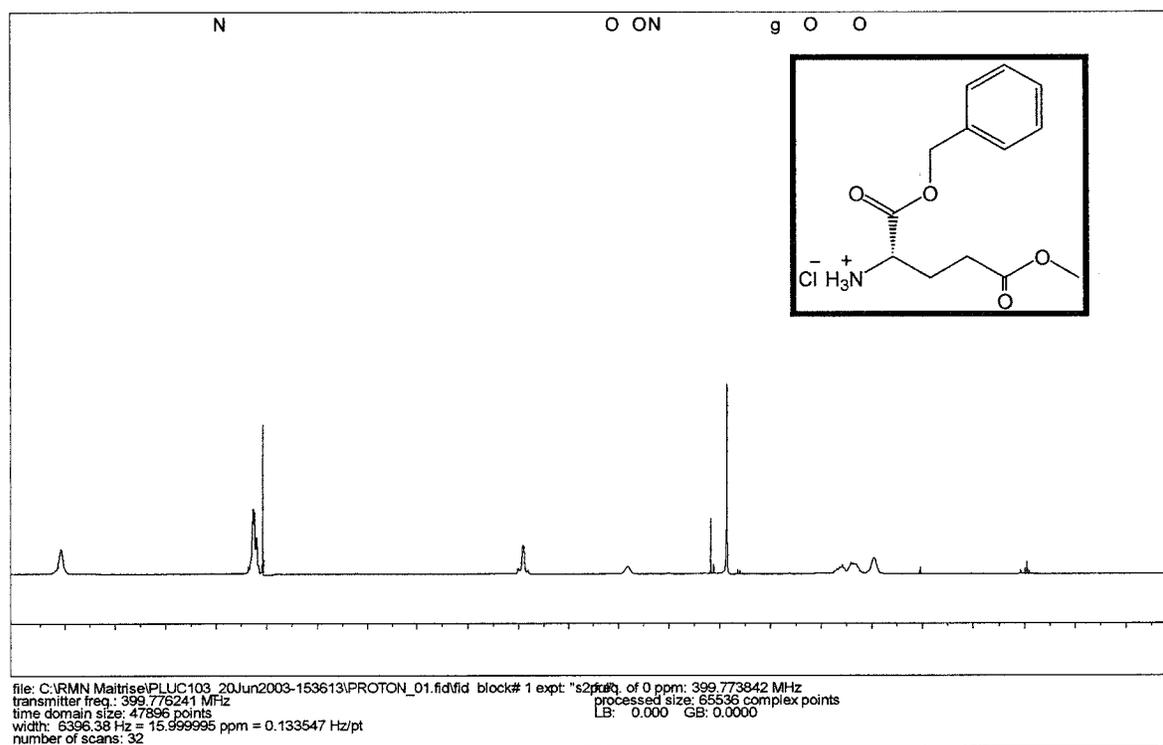


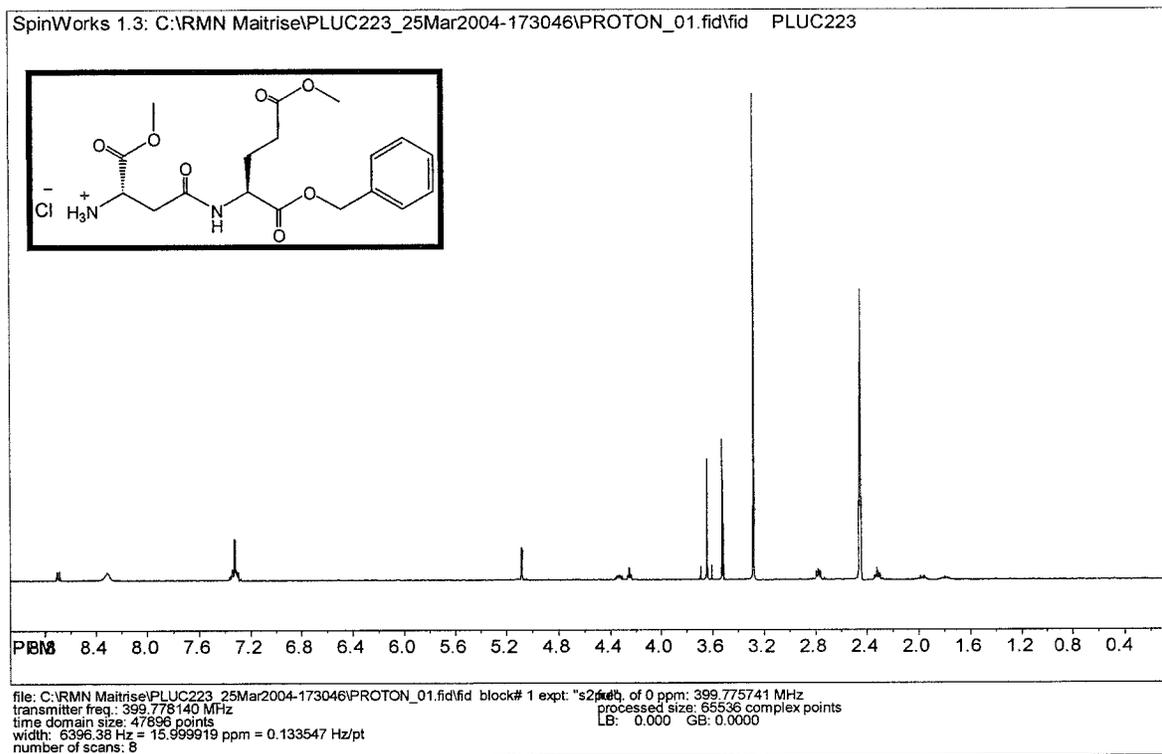
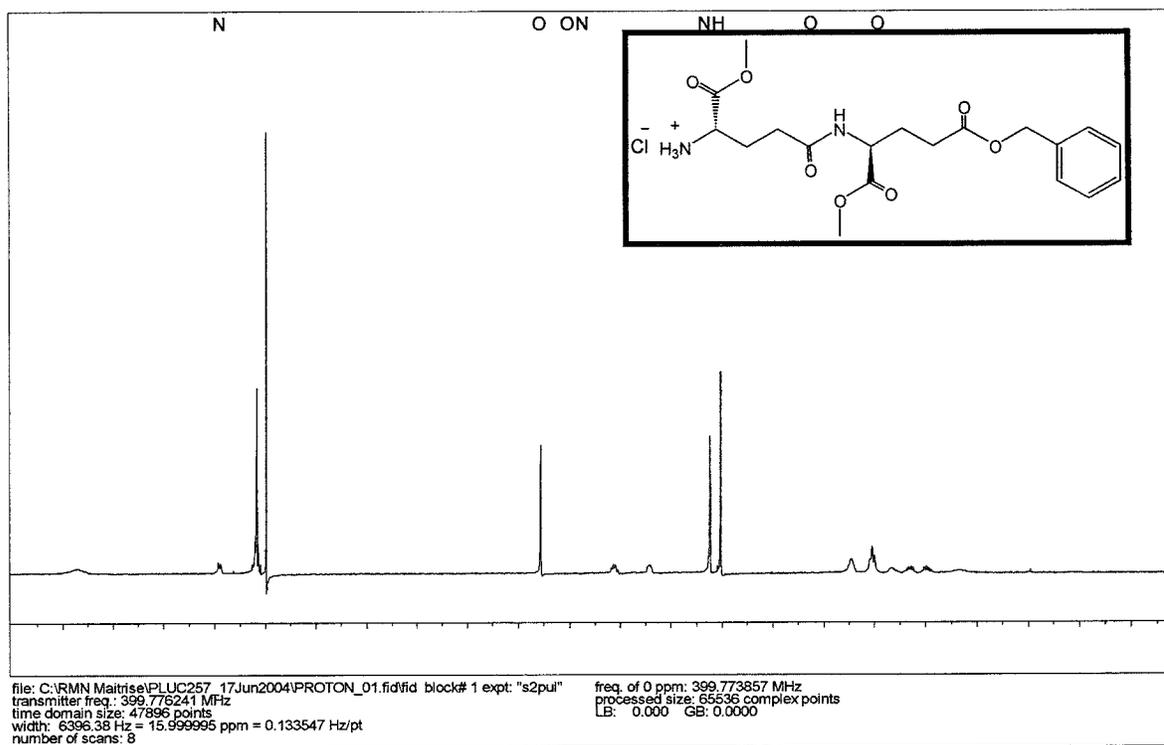
file: C:\RMN Maitrise\PLUC187_04Feb2004\PROTON_01.fid\fid block# 1 expt: "s2pul"
 transmitter freq.: 399.776241 MHz
 time domain size: 47896 points
 width: 6396.38 Hz = 15.999995 ppm = 0.133547 Hz/pt
 number of scans: 8

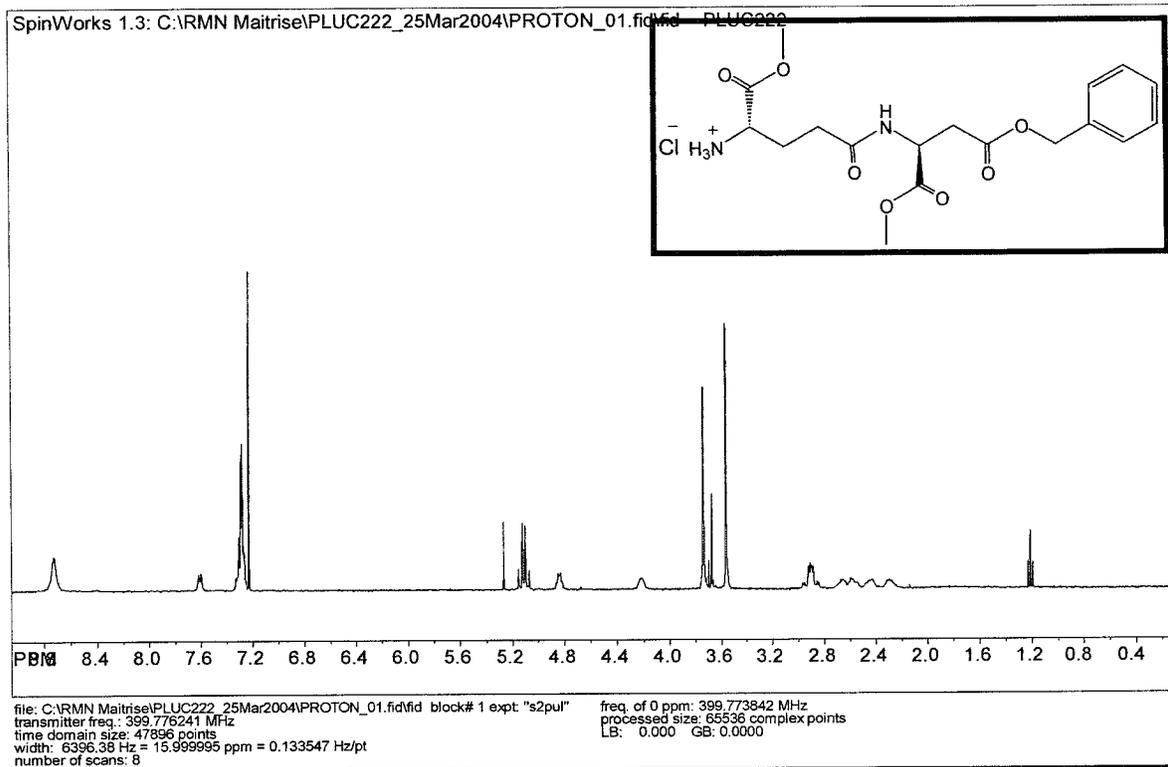
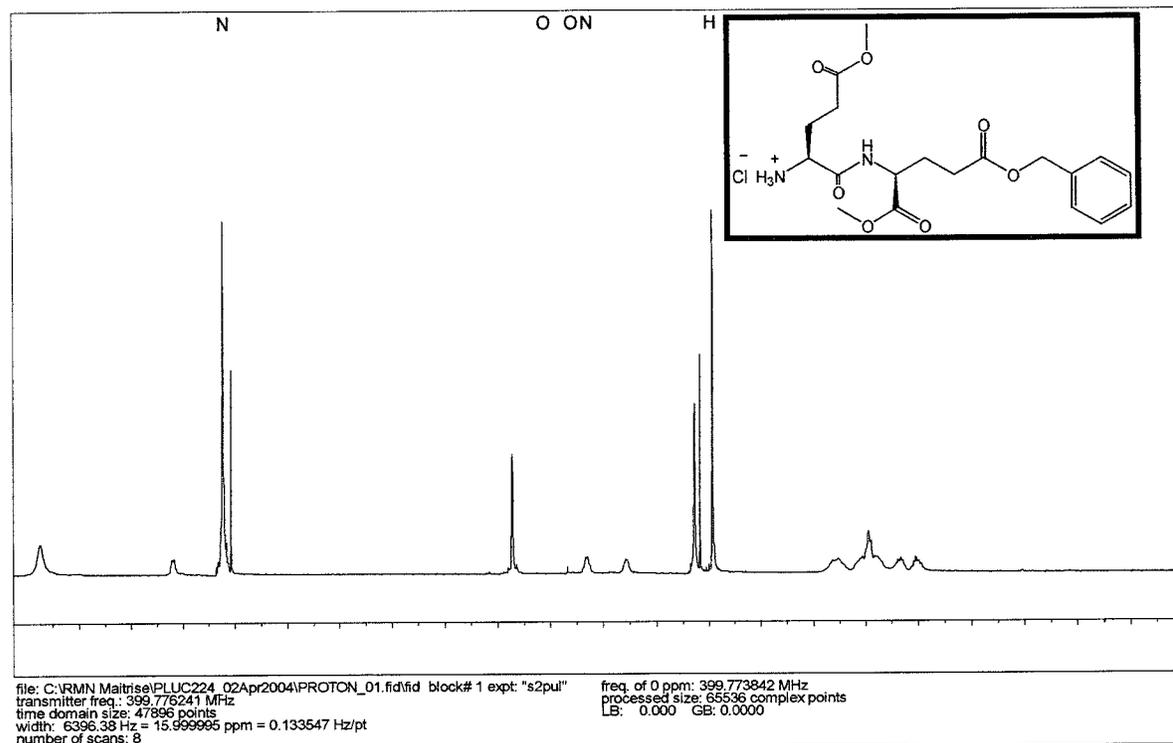
freq. of 0 ppm: 399.773842 MHz
 processed size: 65536 complex points
 LB: 0.000 GB: 0.0000

Boc-Asp(OMe)-OBzl 63**Boc-Glu(OMe)-OBzl 64**

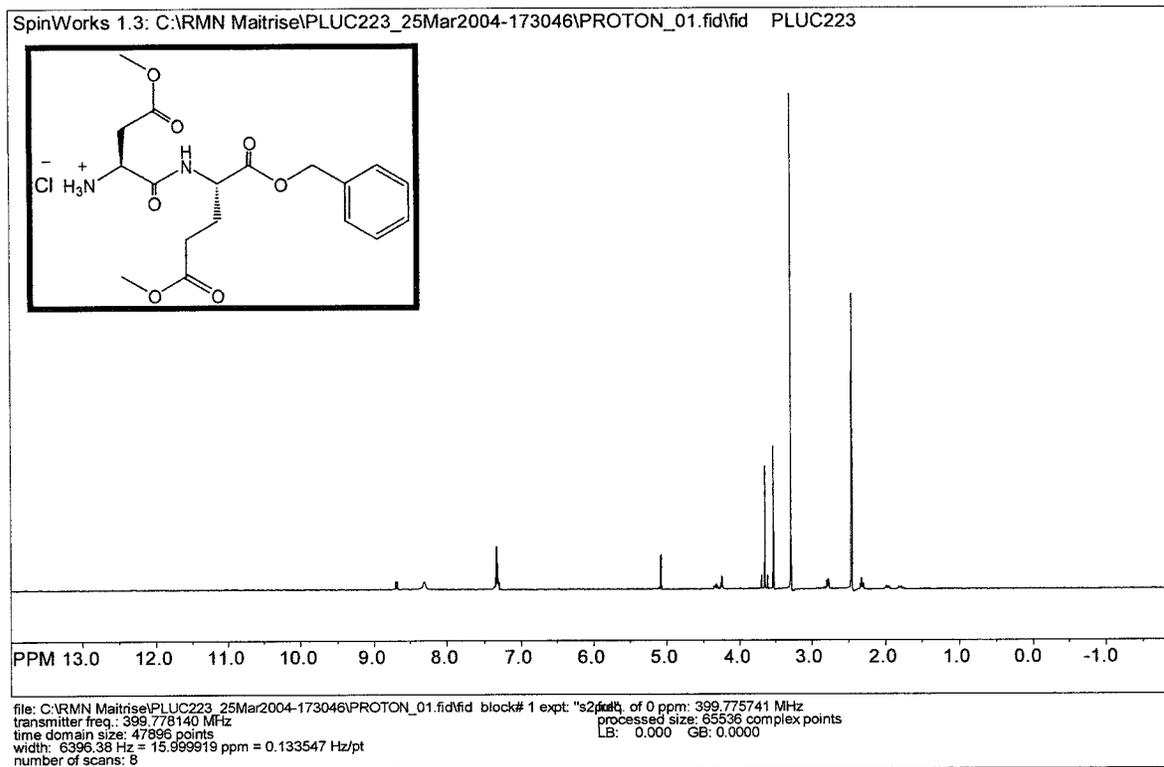
⁺NH₃-Asp(OBzl)-OMe 65**⁺NH₃-Glu(OBzl)-OMe 31**

⁺NH₃-Asp(OMe)-OBzl 66**⁺NH₃-Glu(OMe)-OBzl 67**

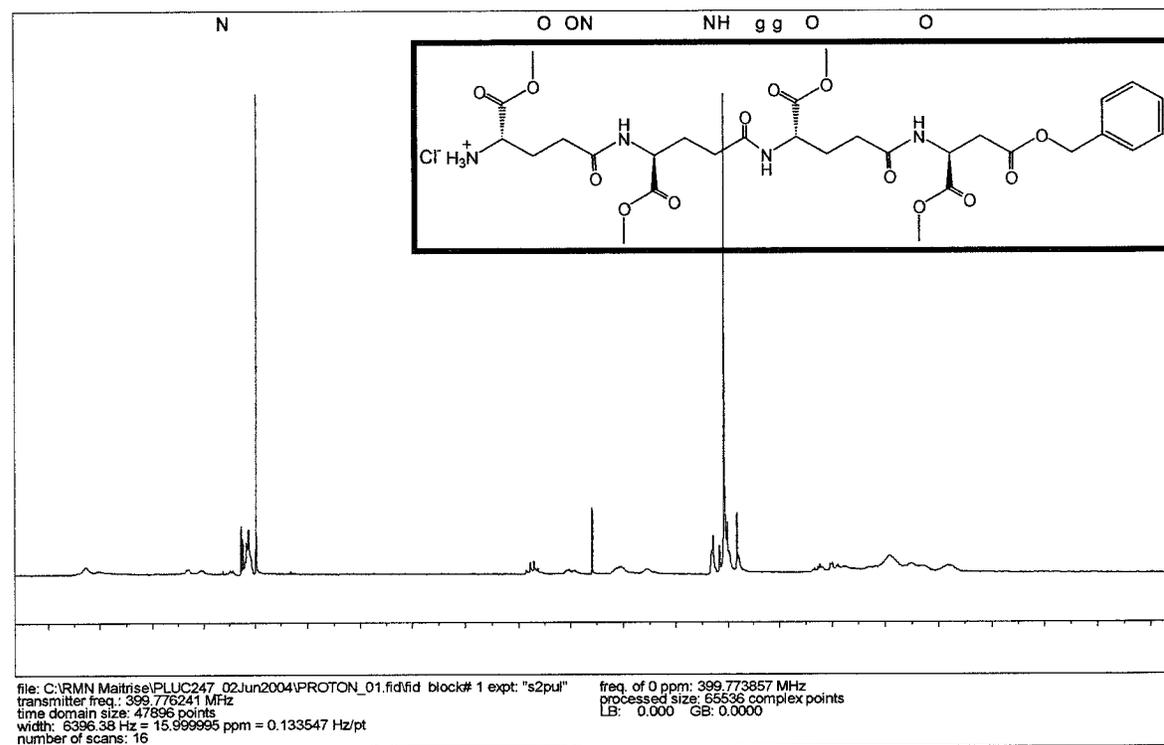
$^+$ NH₃-β-Asp(α-OMe)-Glu(OMe)-OBzl 68 **$^+$ NH₃-γ-Glu(α-OMe)-Glu(OBzl)-OMe 34**

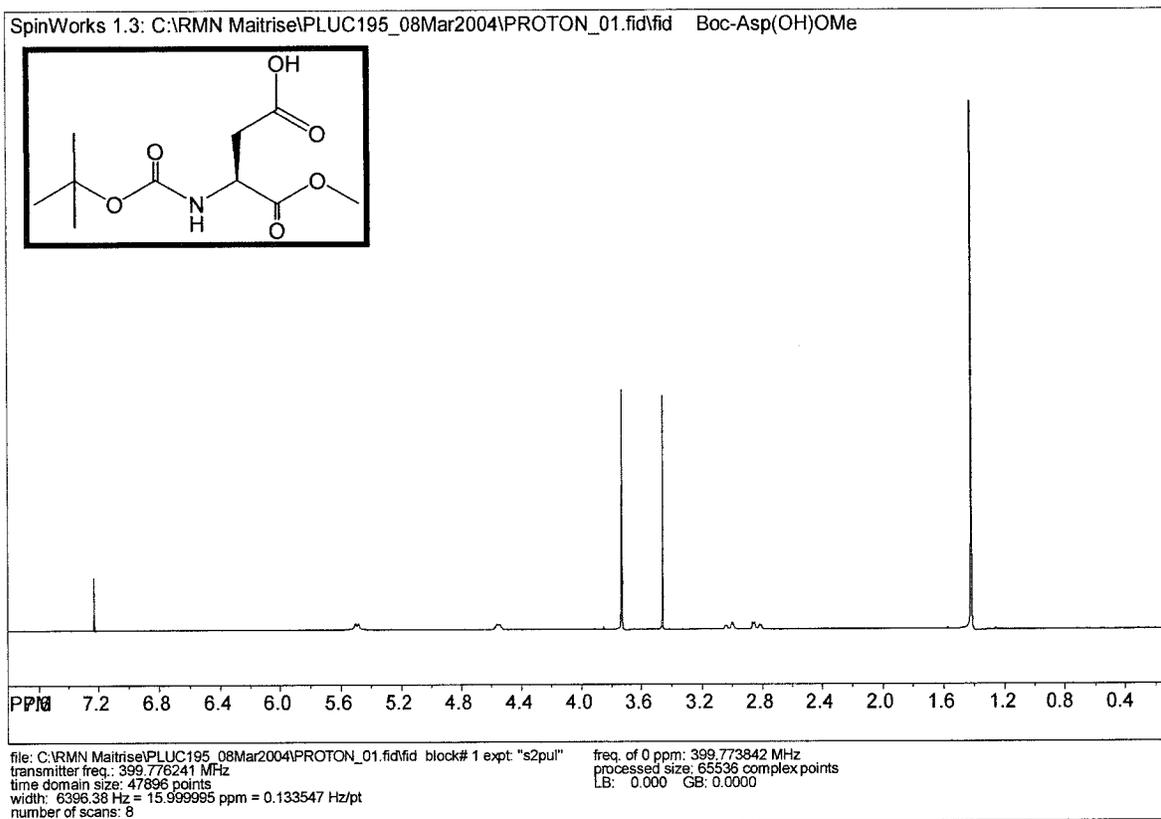
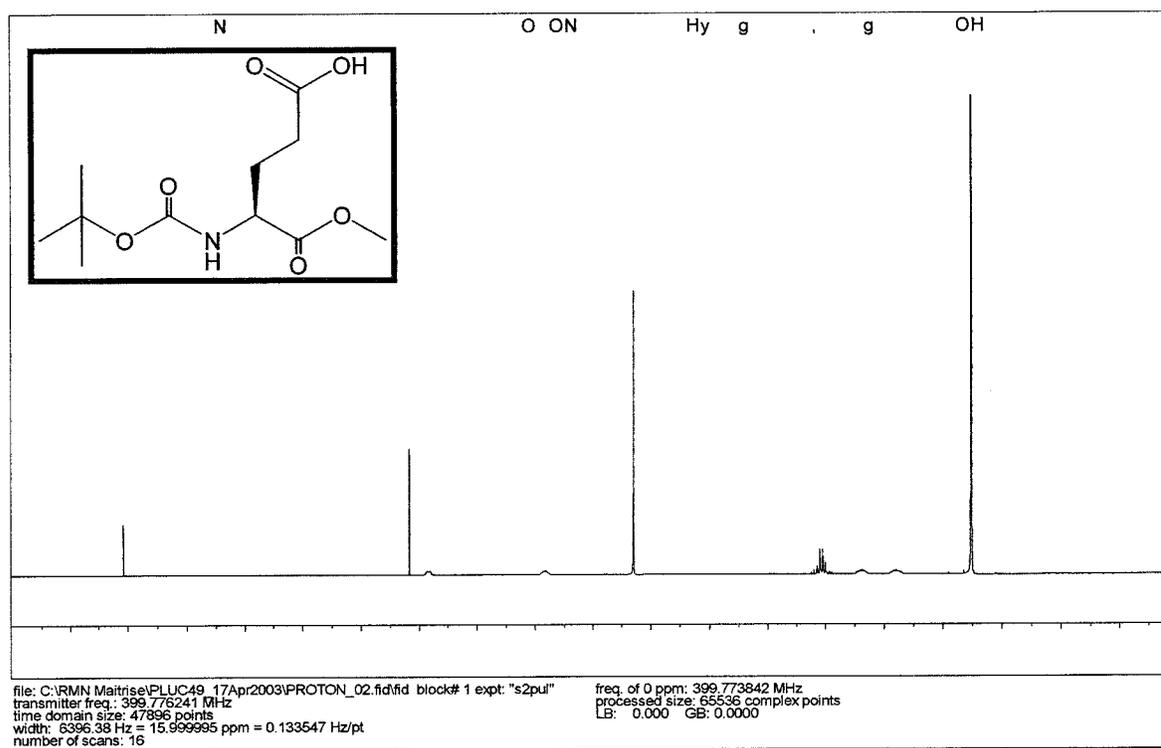
NH_3^+ - γ -Glu(α -OMe)-Asp(OBzl)-OMe 69 **NH_3^+ -Glu(OMe)-Glu(OMe)-OBzl 70**

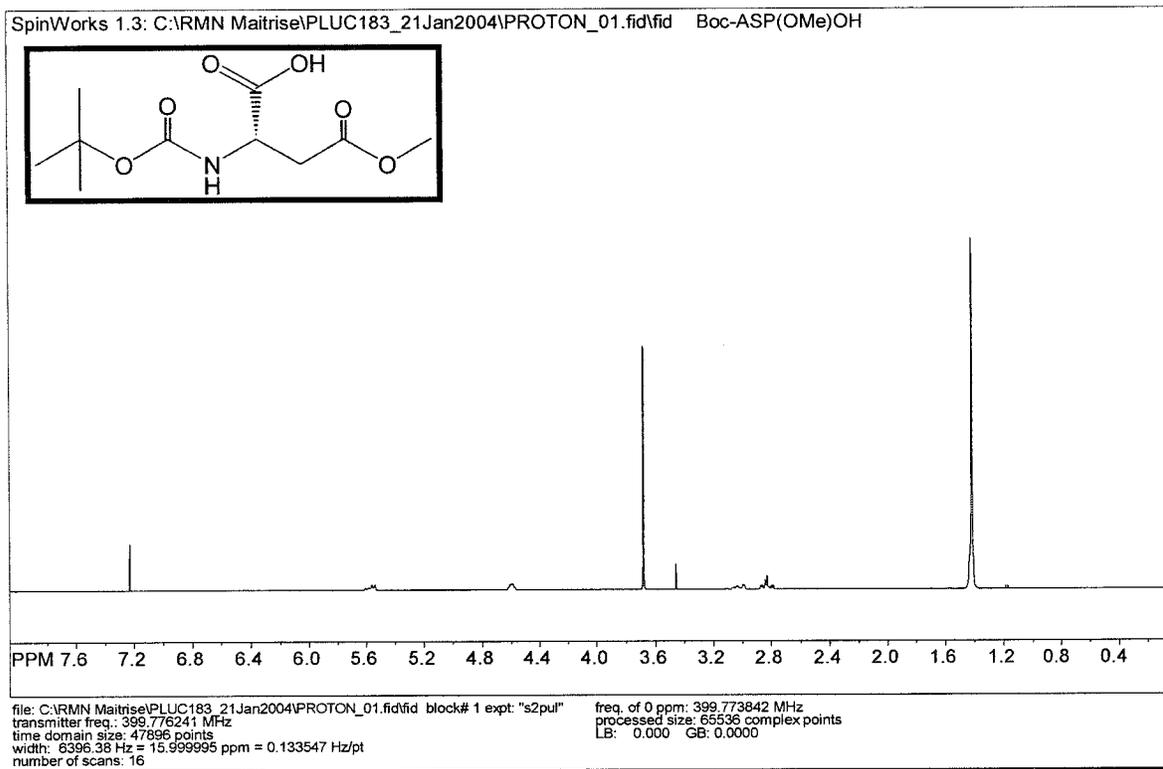
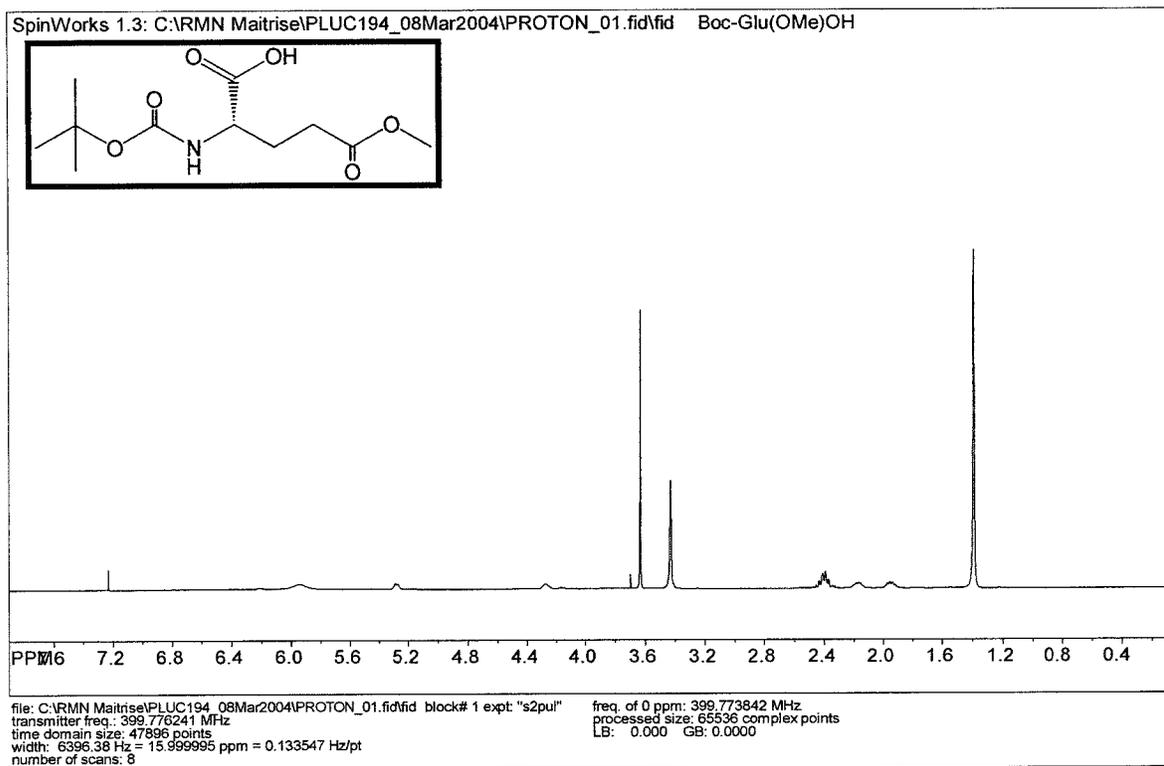
$^+$ NH₃-Asp(OMe)-Glu(OMe)-OBzl 71

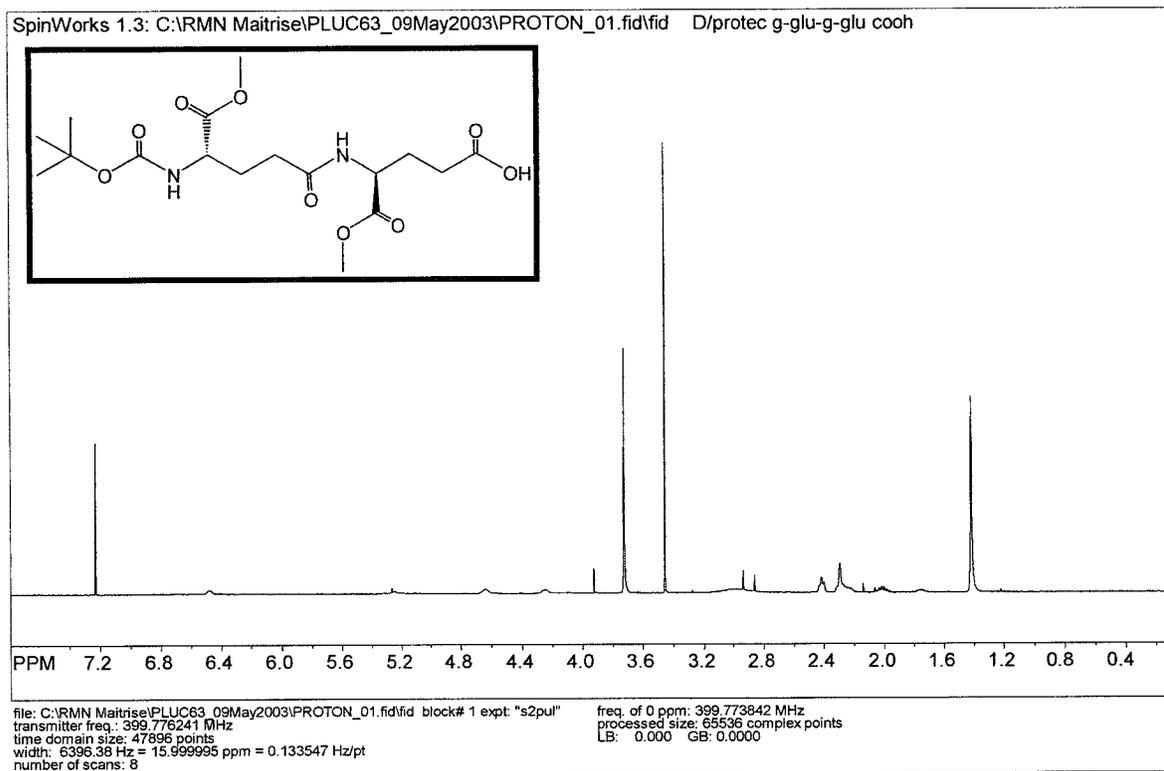
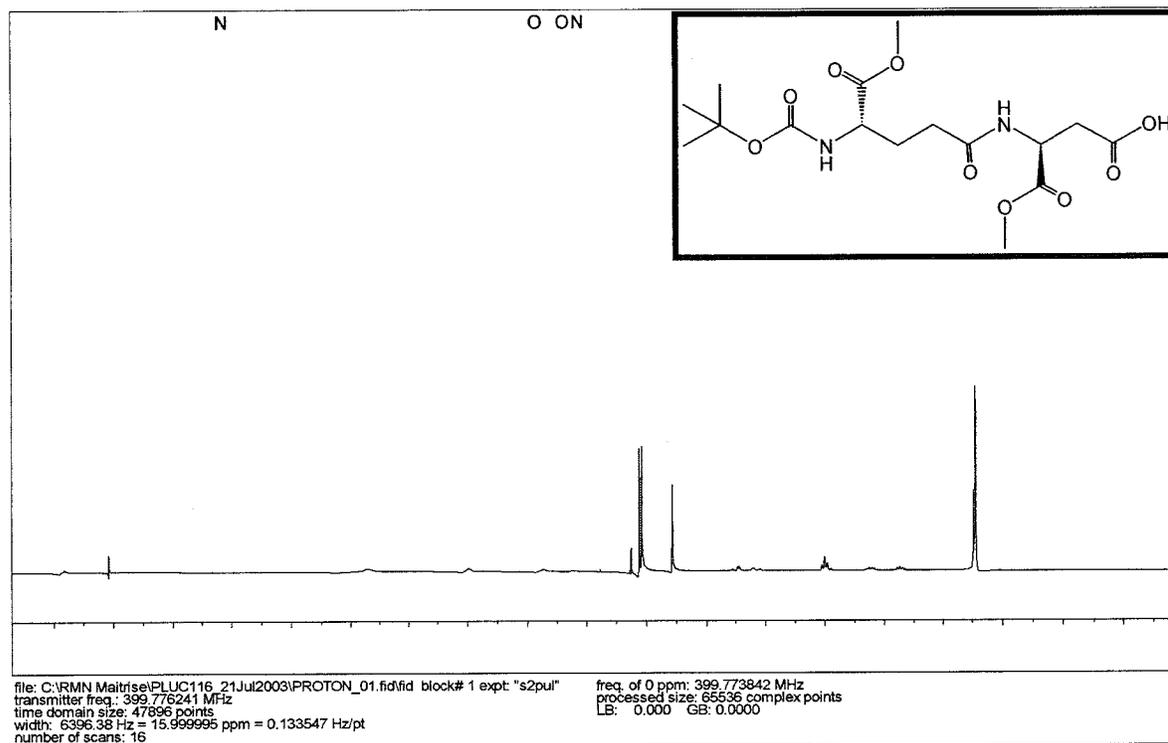


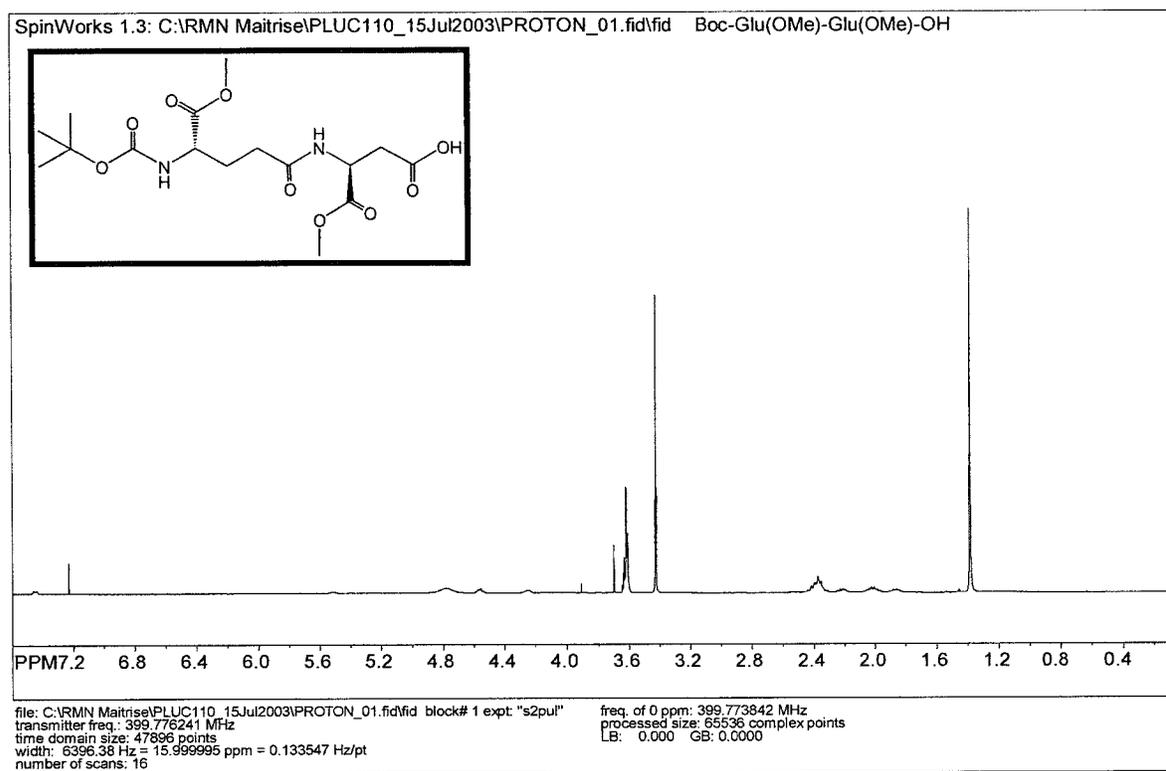
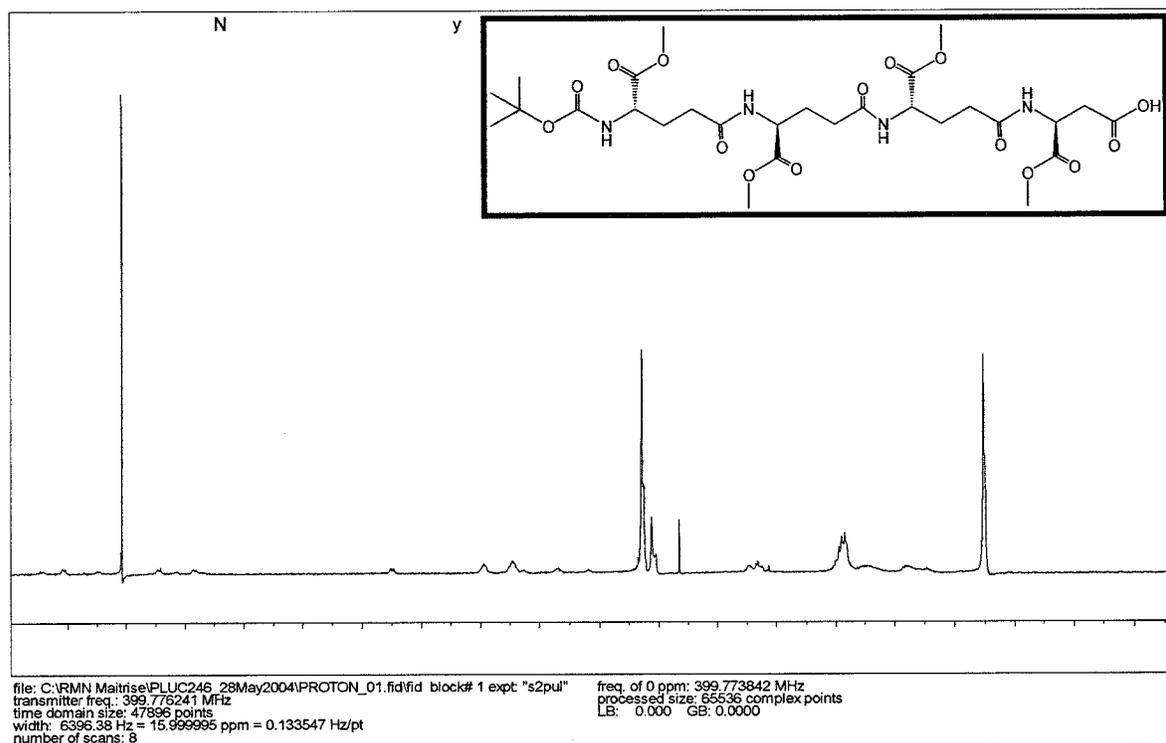
$^+$ NH₃-γ-Glu(α-OMe)-γ-Glu(α-OMe)-γ-Glu(α-OMe)-Asp(OBzl)-OMe 72



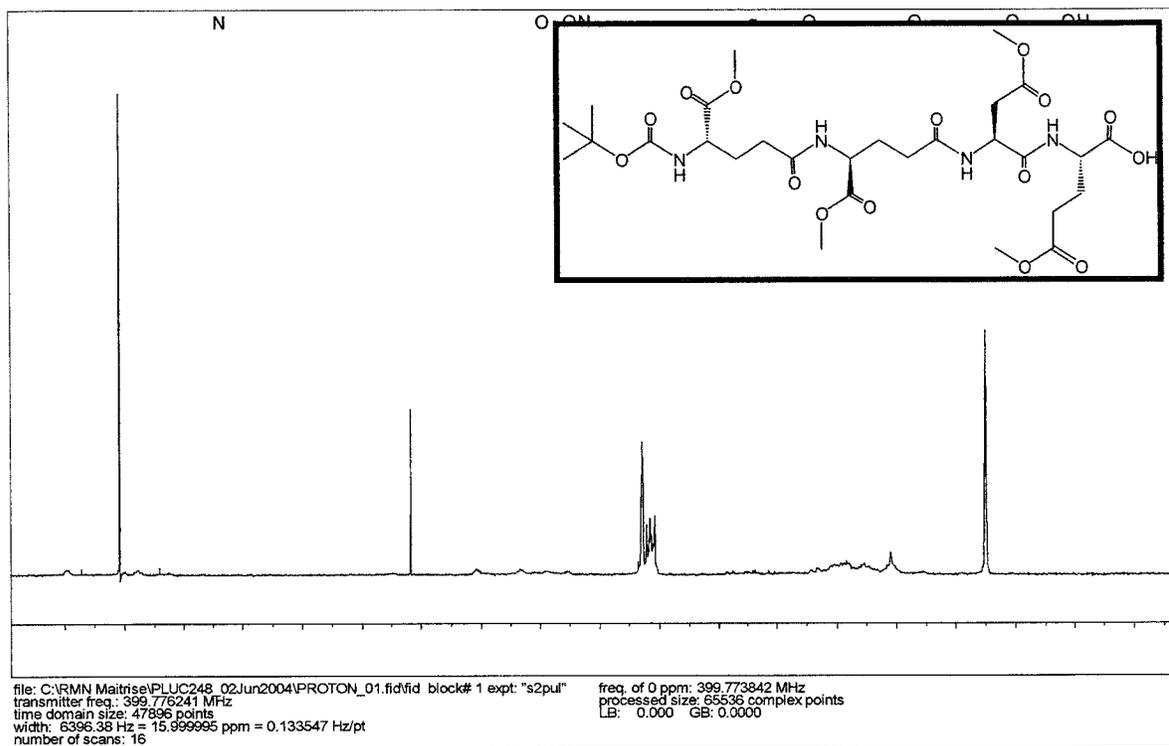
Boc-Asp(OH)-OMe 73**Boc-Glu(OH)-OMe 30**

Boc-Asp(OMe)-OH 74**Boc-Glu(OMe)-OH 75**

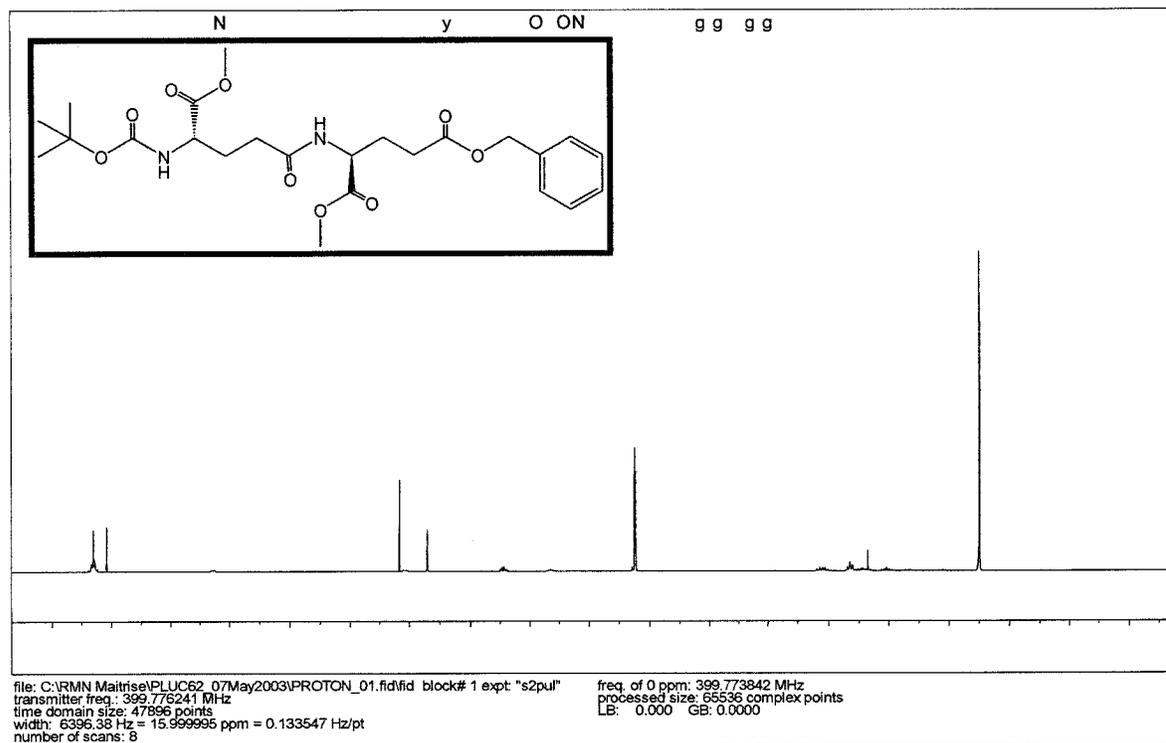
Boc- γ -Glu(α -OMe)-Glu-OMe 33**Boc- γ -Glu(α -OMe)-Asp-OMe 76**

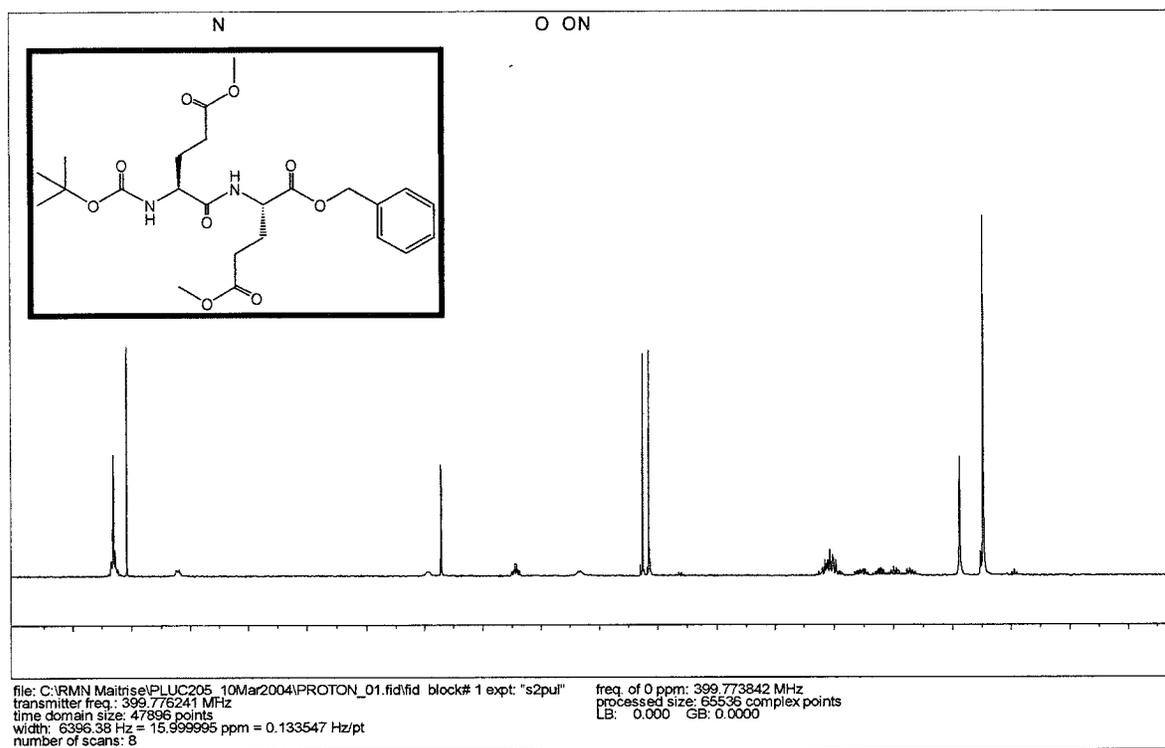
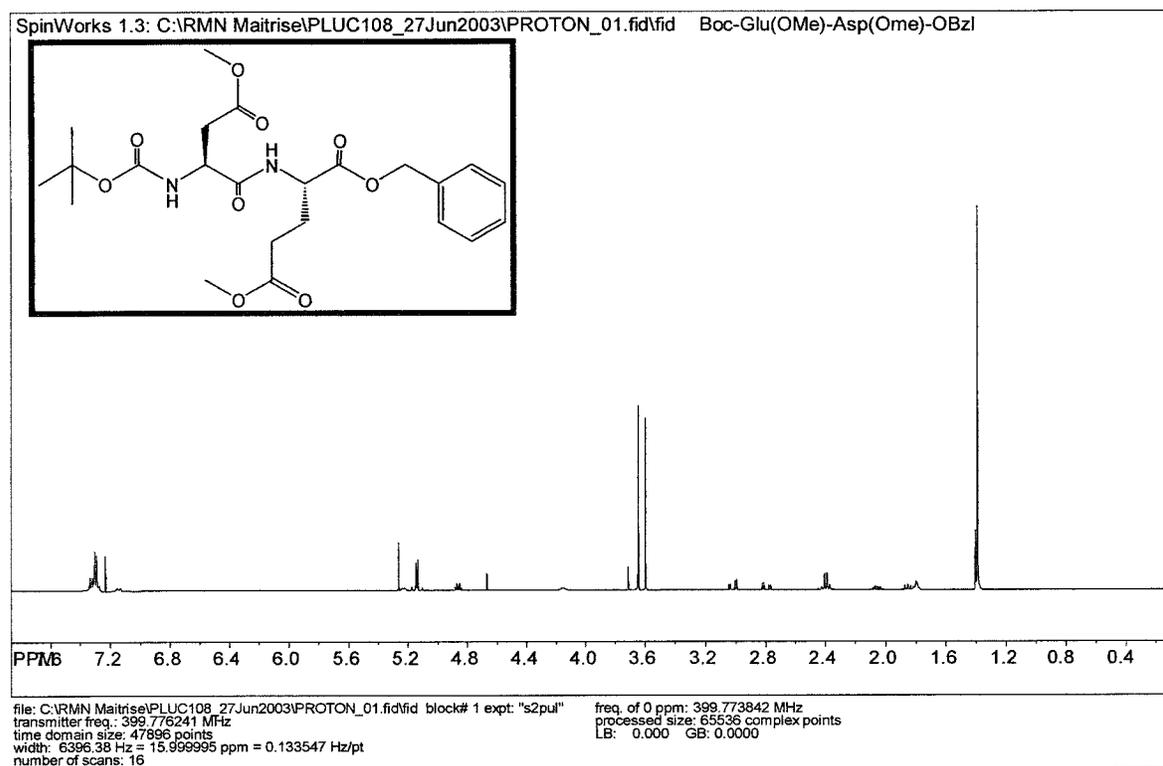
Boc-Glu(OMe)-Glu(OMe)-OH 77**Boc- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)-Asp-OMe 78**

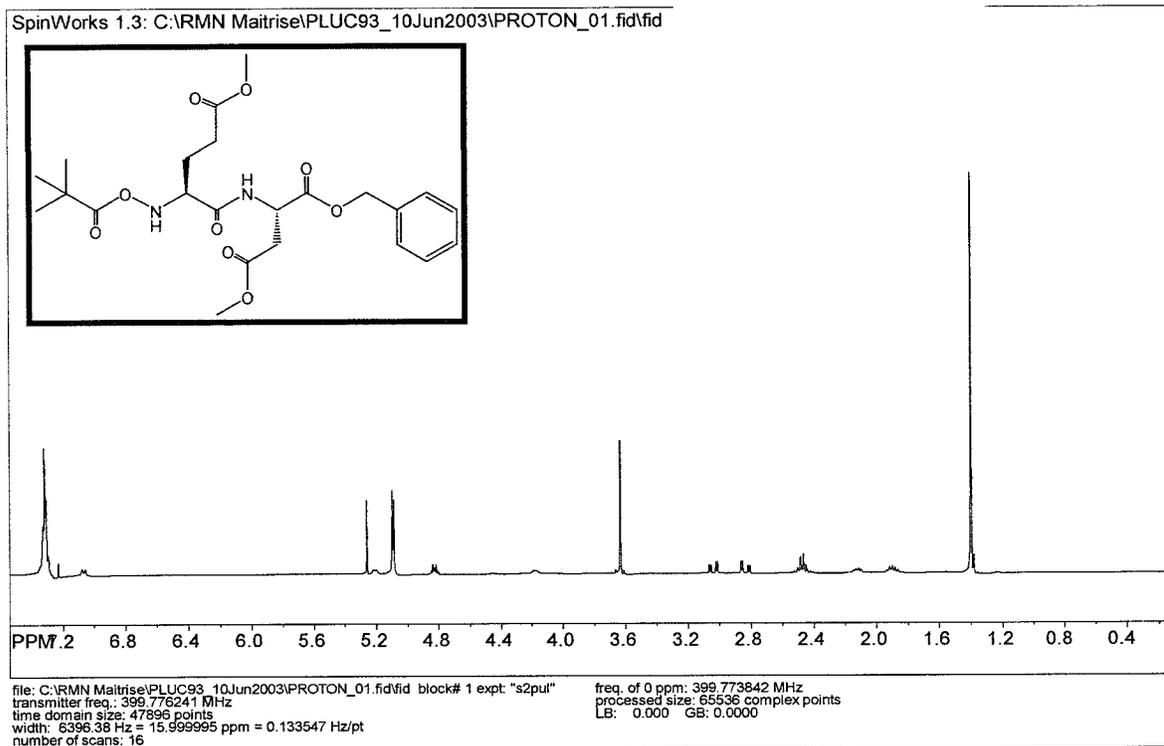
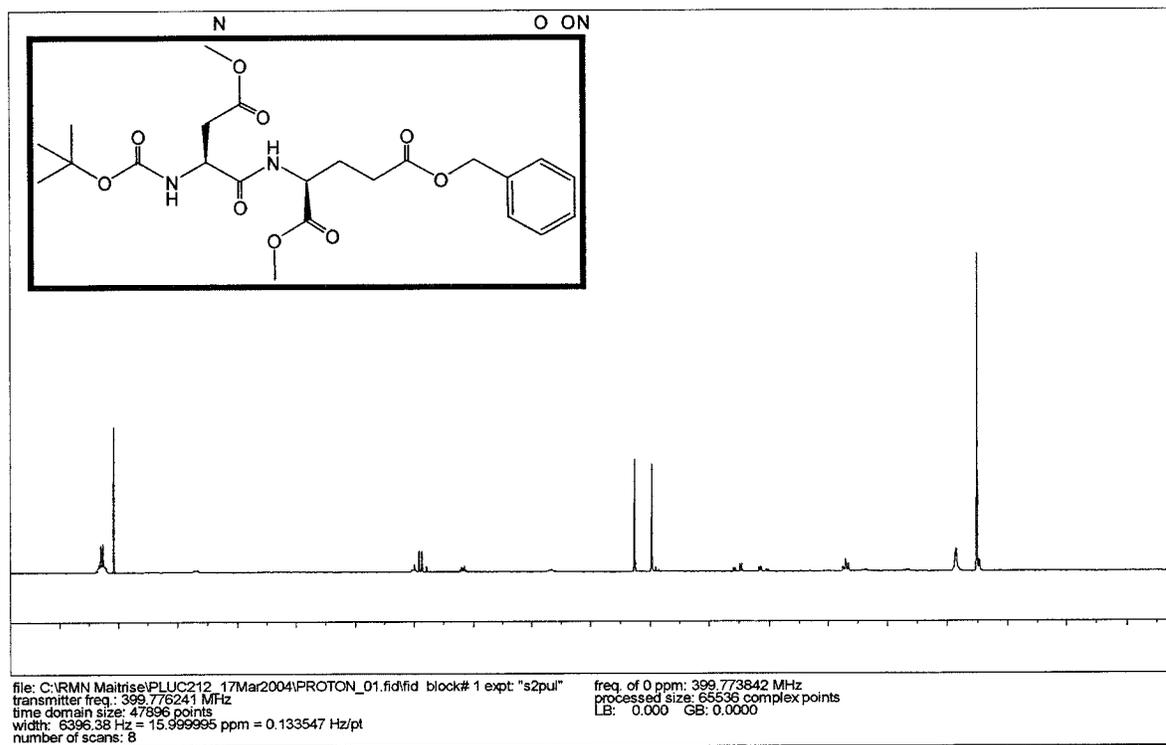
Boc- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)-Asp(OMe)-Glu(OMe)-OH 79

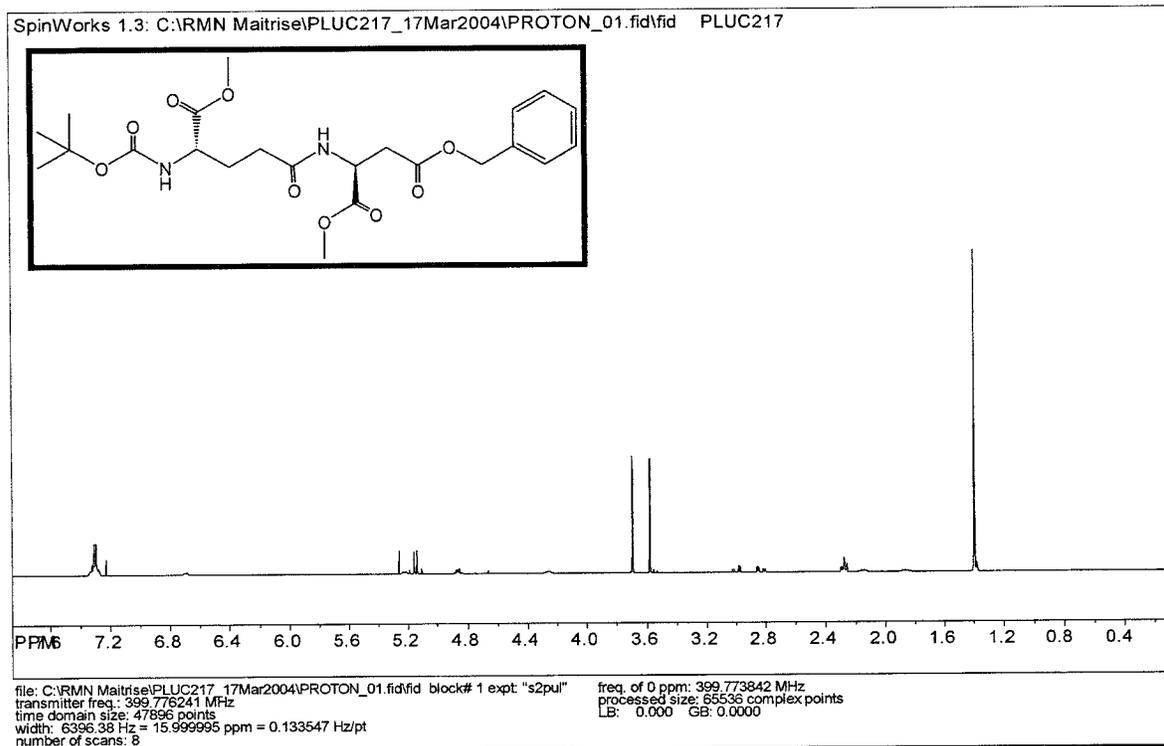
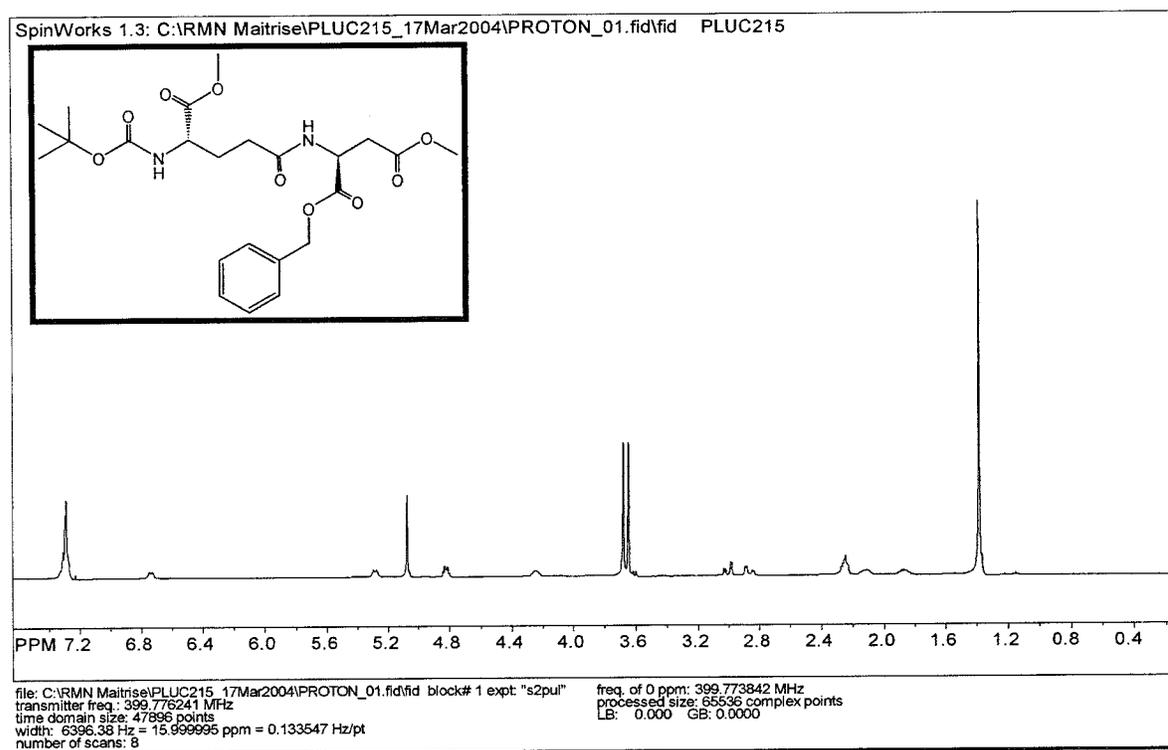


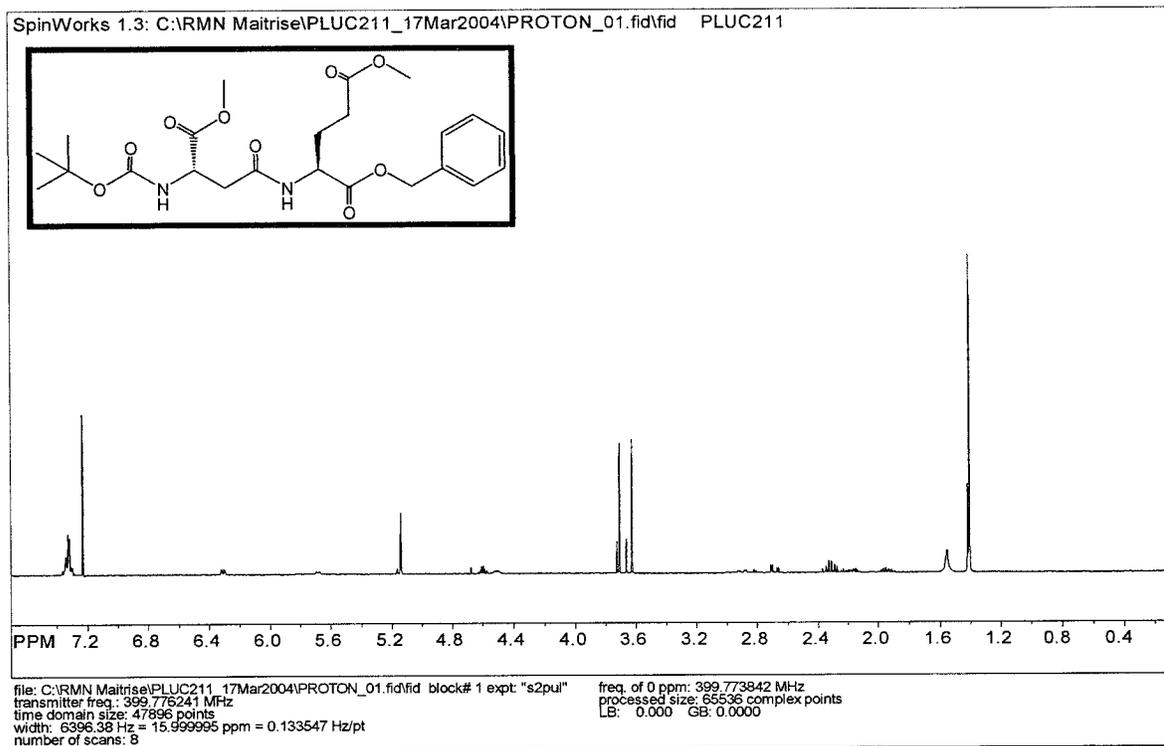
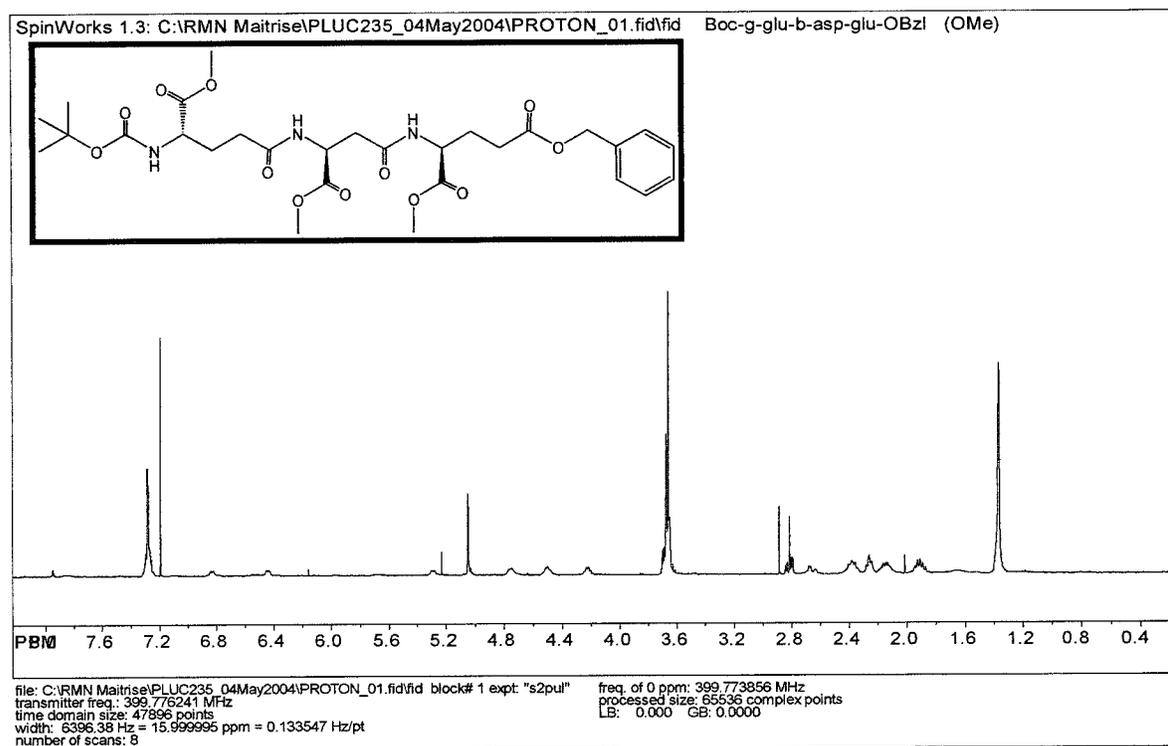
Boc- γ -Glu(γ -OMe)-Glu(OBzl)-OMe 32



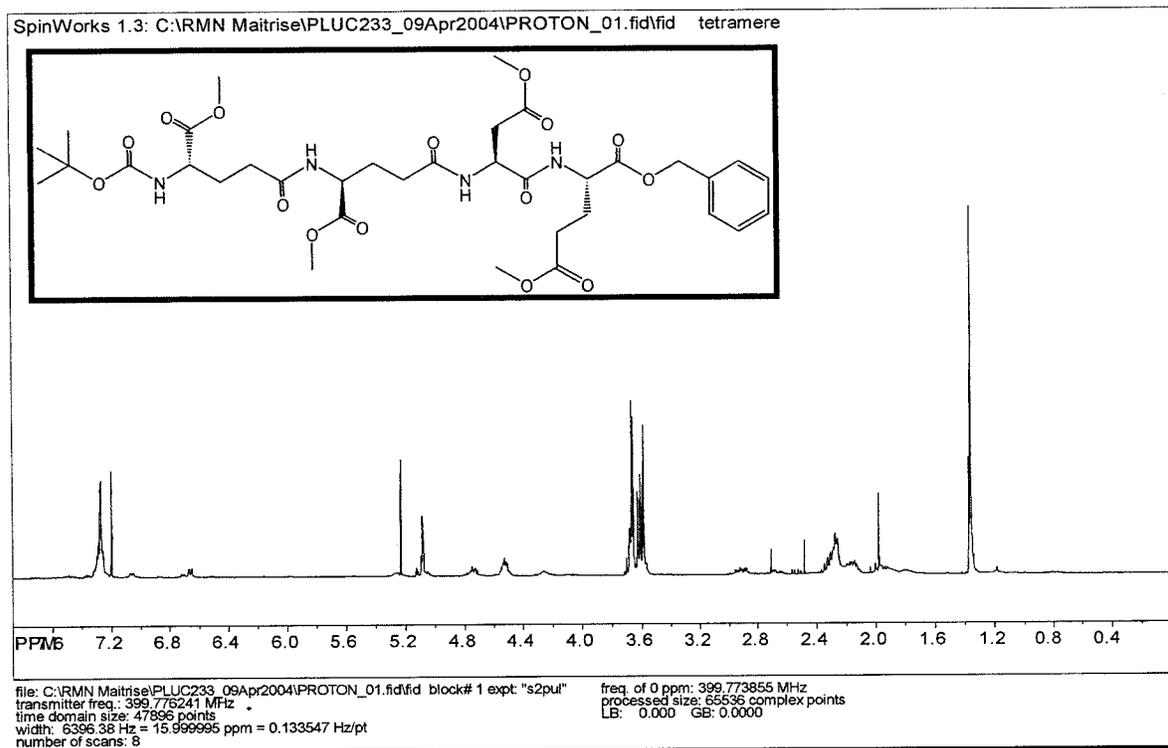
Boc-Glu(OMe)-Glu(OMe)-Bzl 36**Boc-Asp(OMe)-Glu(OMe)-OBzl 37**

Boc-Glu(OMe)-Asp(OMe)-OBzl 38**Boc-Asp(OMe)-Glu(OBzl)-OMe 39**

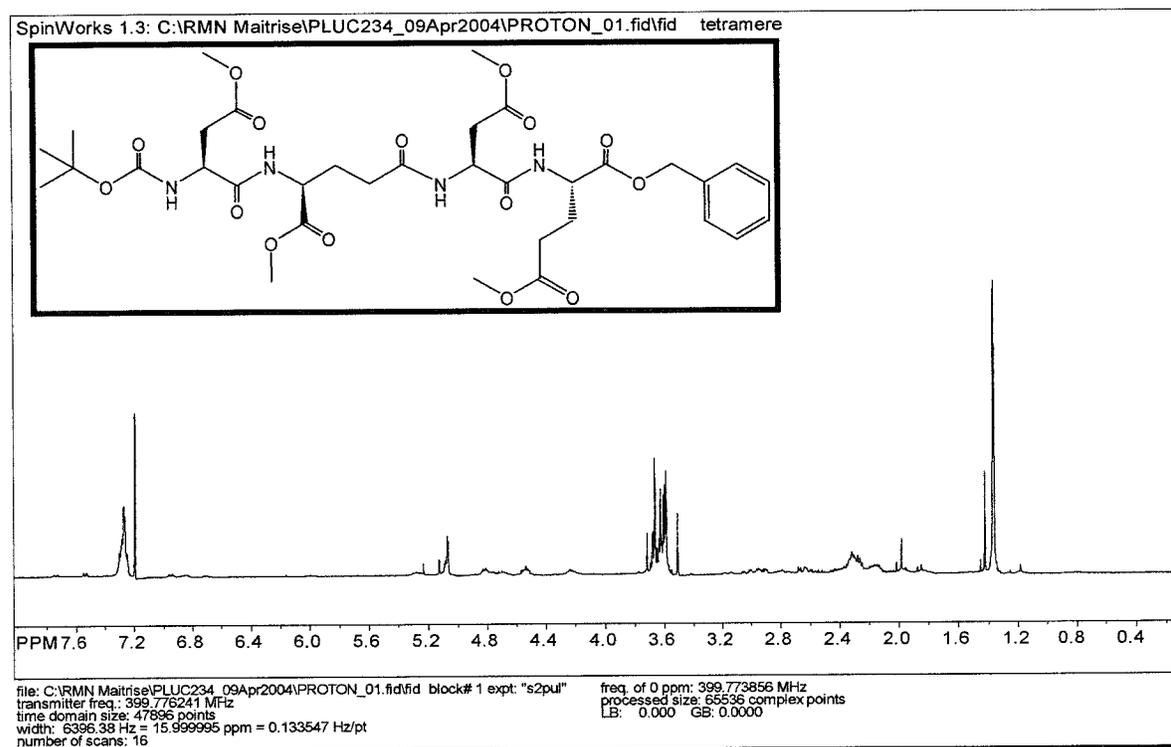
Boc- γ -Glu(α -OMe)-Asp(OBzl)-OMe 40**Boc- γ -Glu(α -OMe)-Asp(OMe)-OBzl 41**

Boc- β -Asp(α -OMe)-Glu(OMe)-OBzl 42**Boc- γ -Glu(α -OMe)- β -Asp(α -OMe)-Glu(OBzl)-OMe 43**

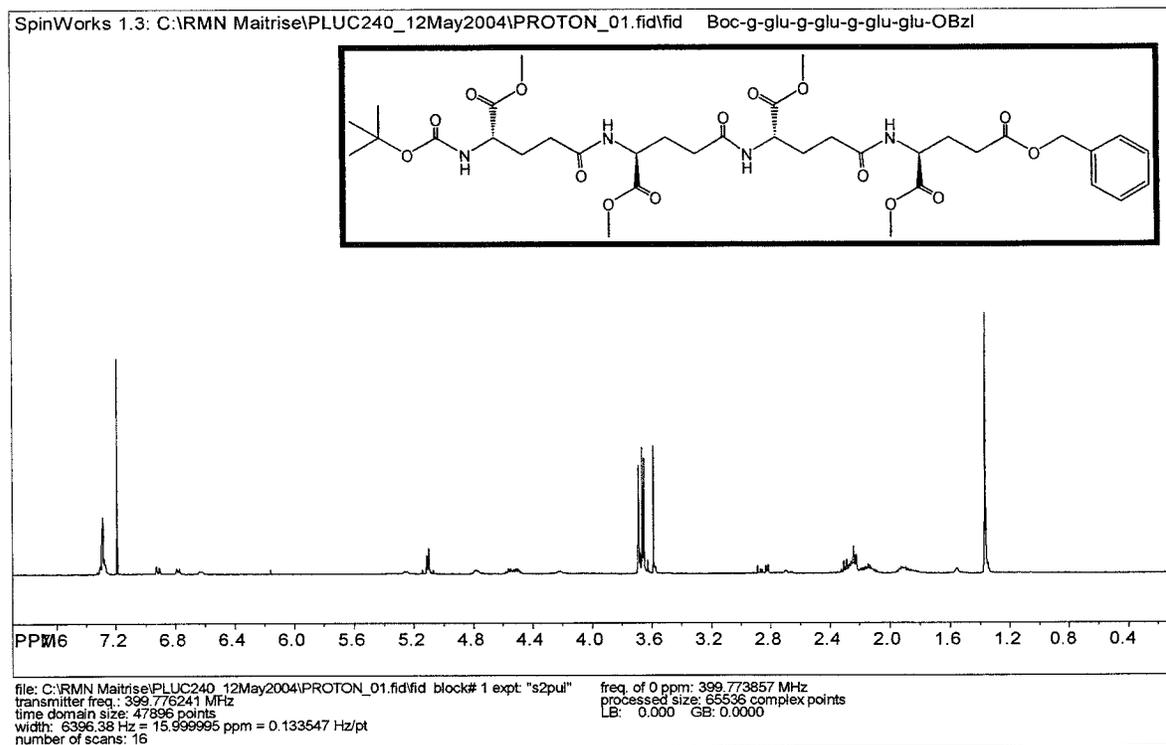
Boc- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)-Asp(OMe)-Glu(OMe)-OBzl 44



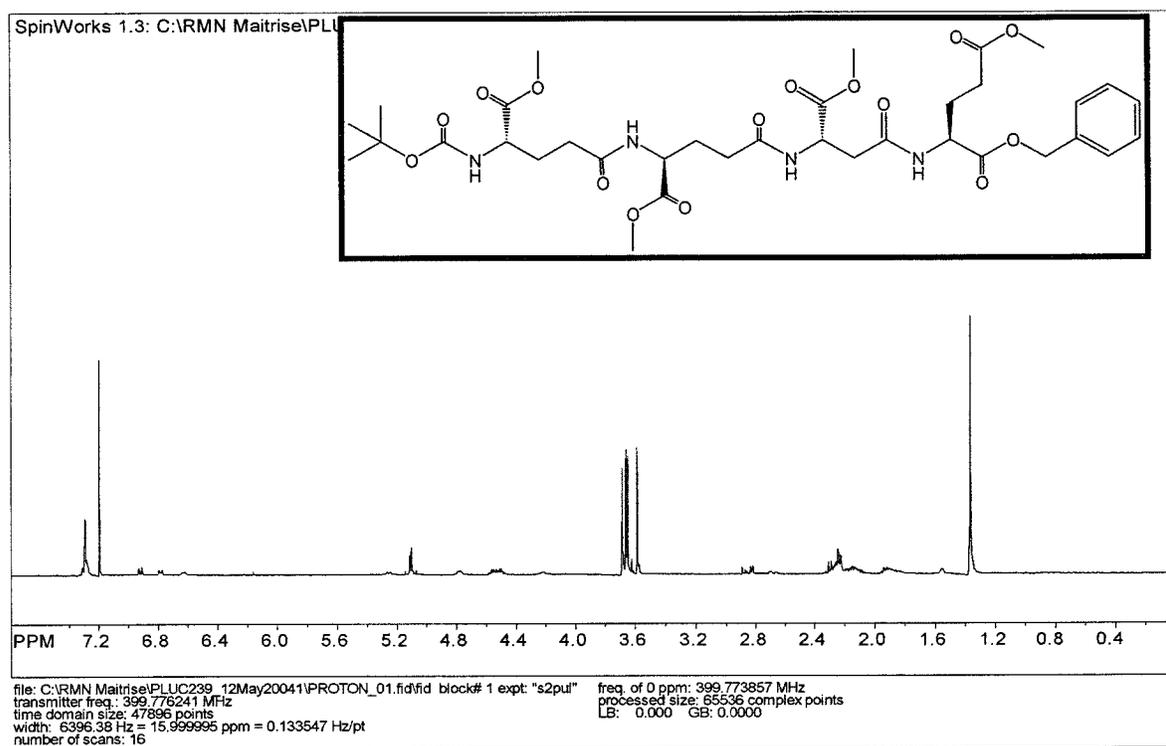
Boc-Asp(OMe)- γ -Glu(α -OMe)-Asp(OMe)-Glu(OMe)-OBzl 45



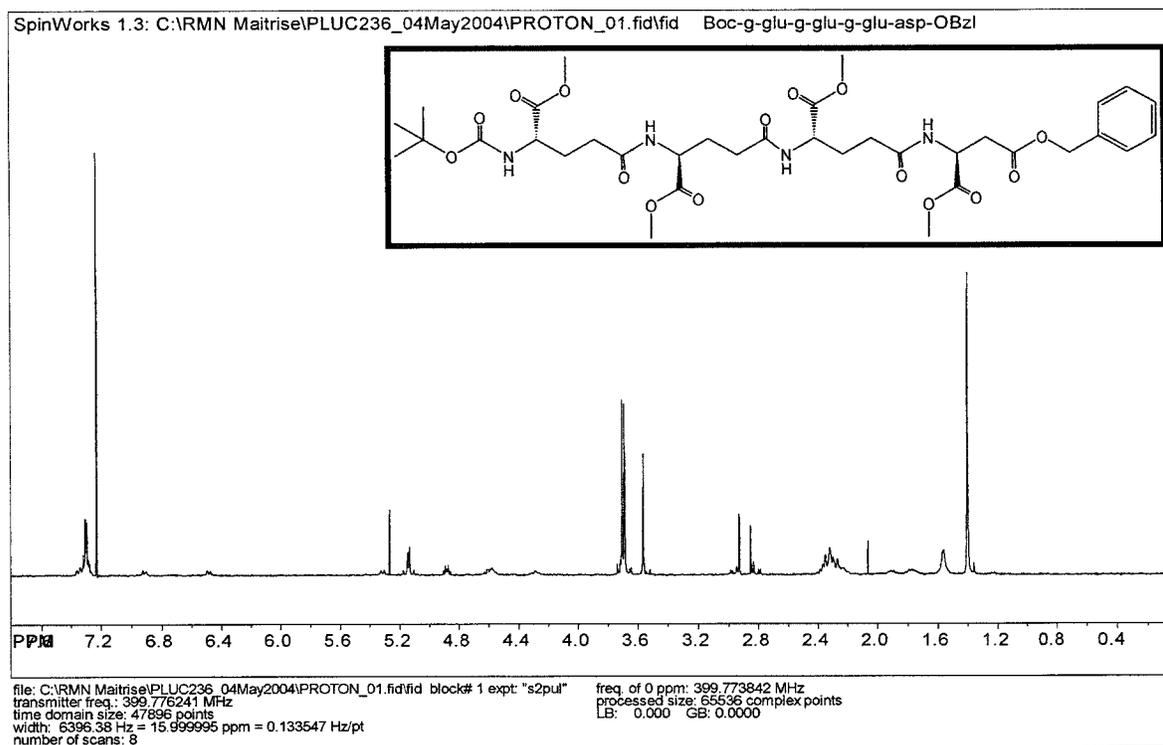
Boc- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)-Glu(OBzl)-OMe 35



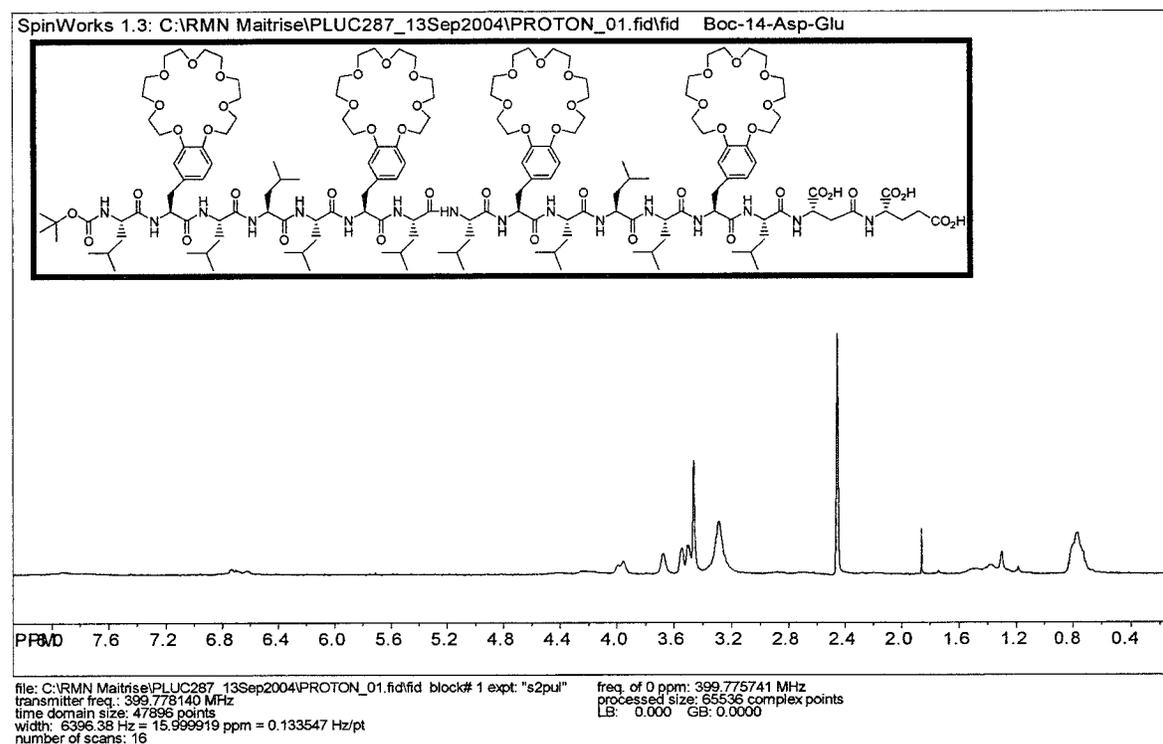
Boc- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)- β -Asp(α -OMe)-Glu(OMe)-OBzl 46

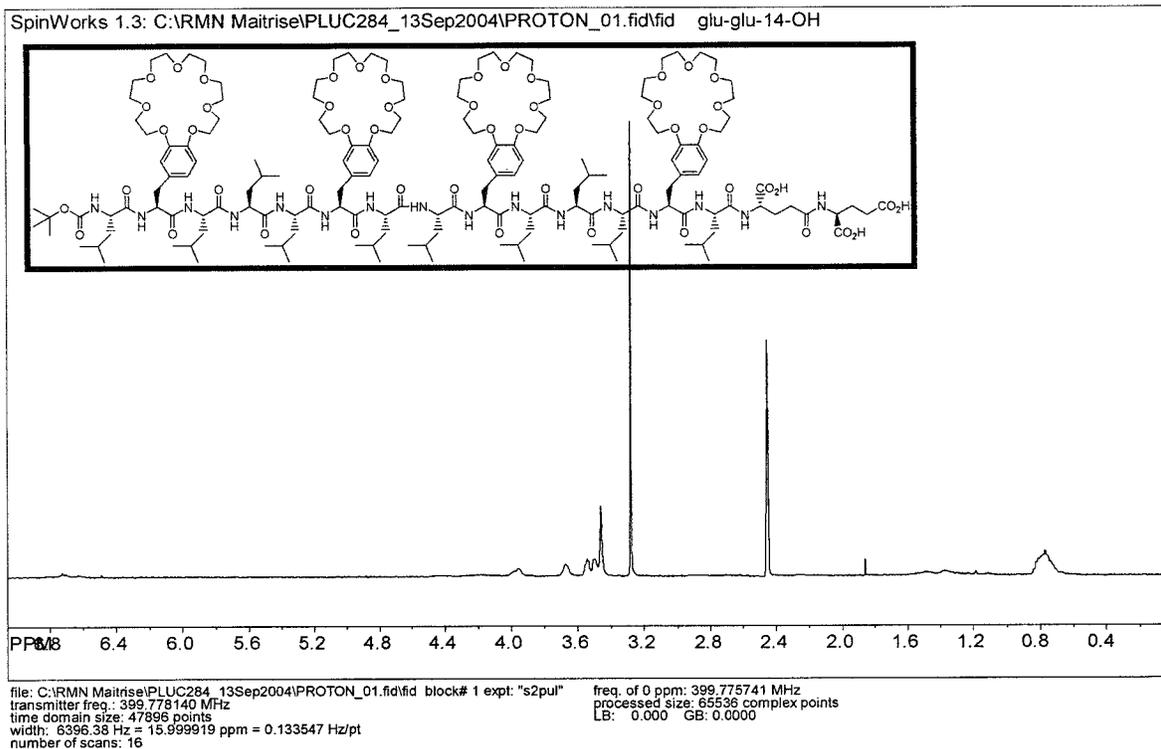
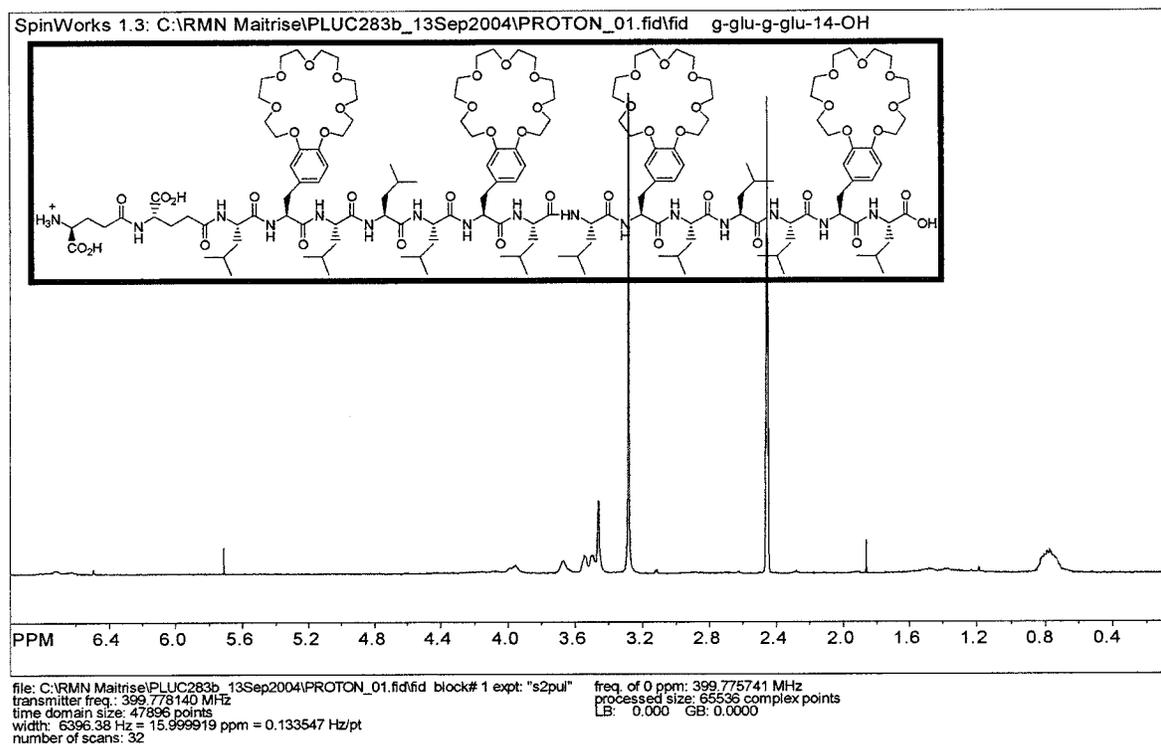


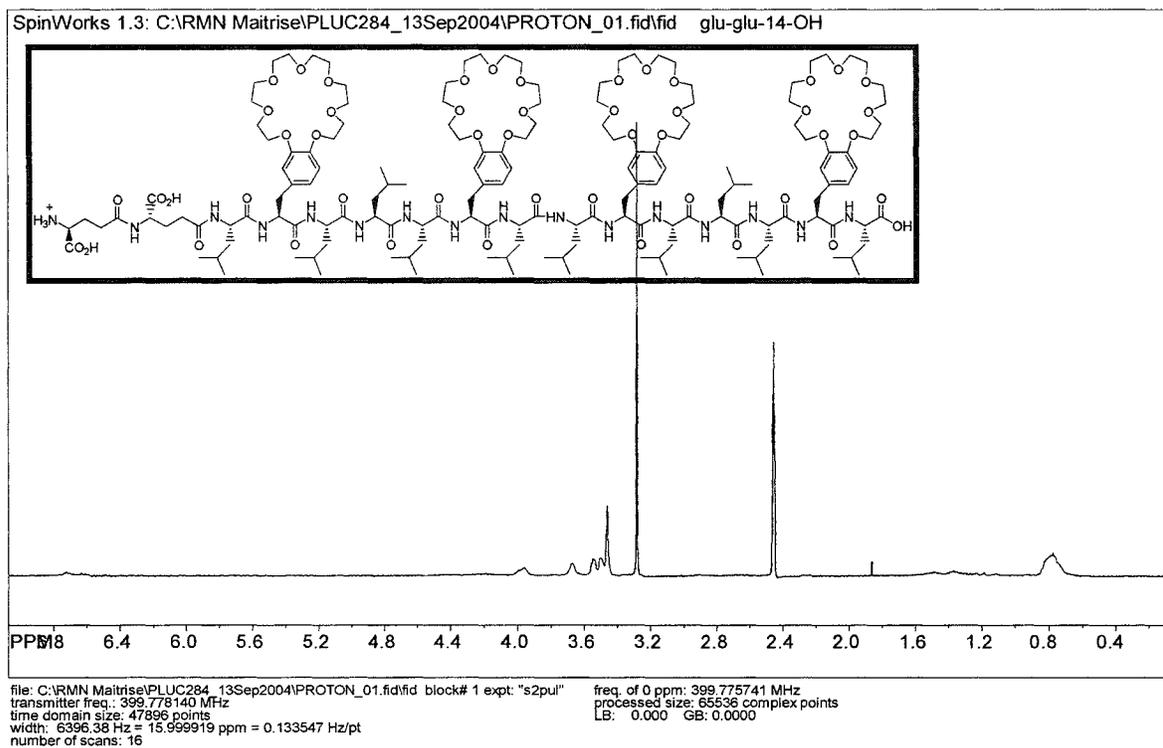
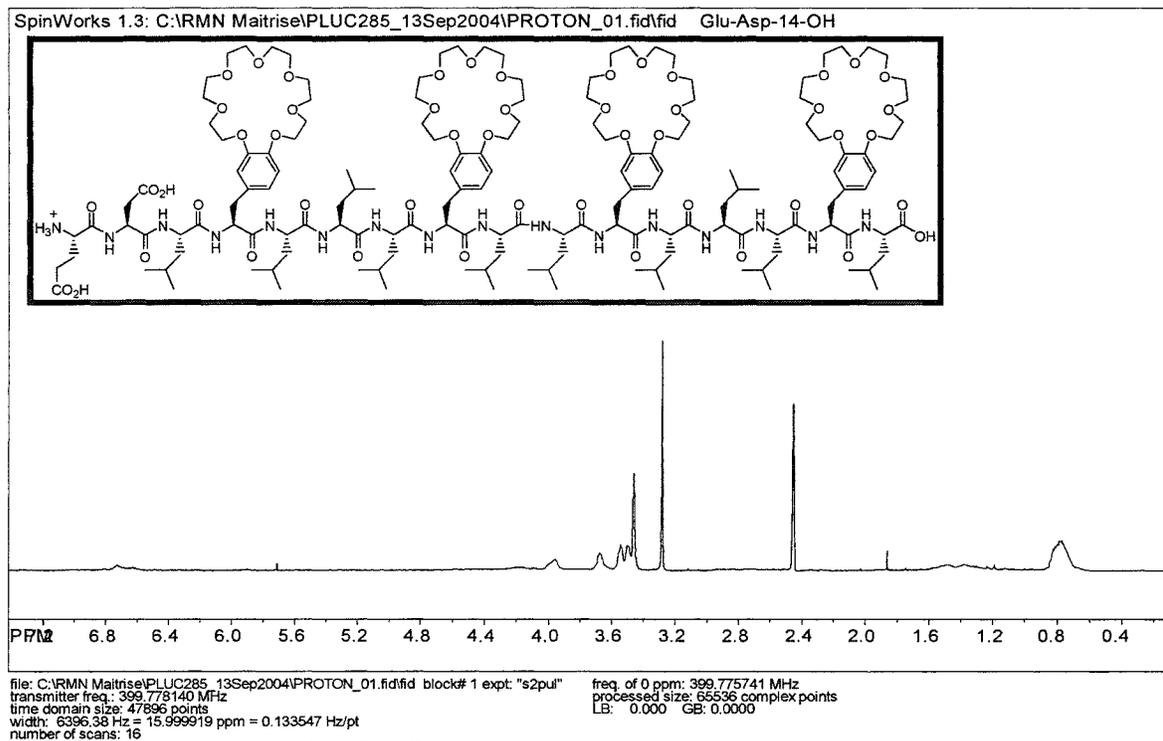
Boc- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)-Asp(OBzl)-OMe 47



Boc-14-mère- β -Asp-Glu-OH 59



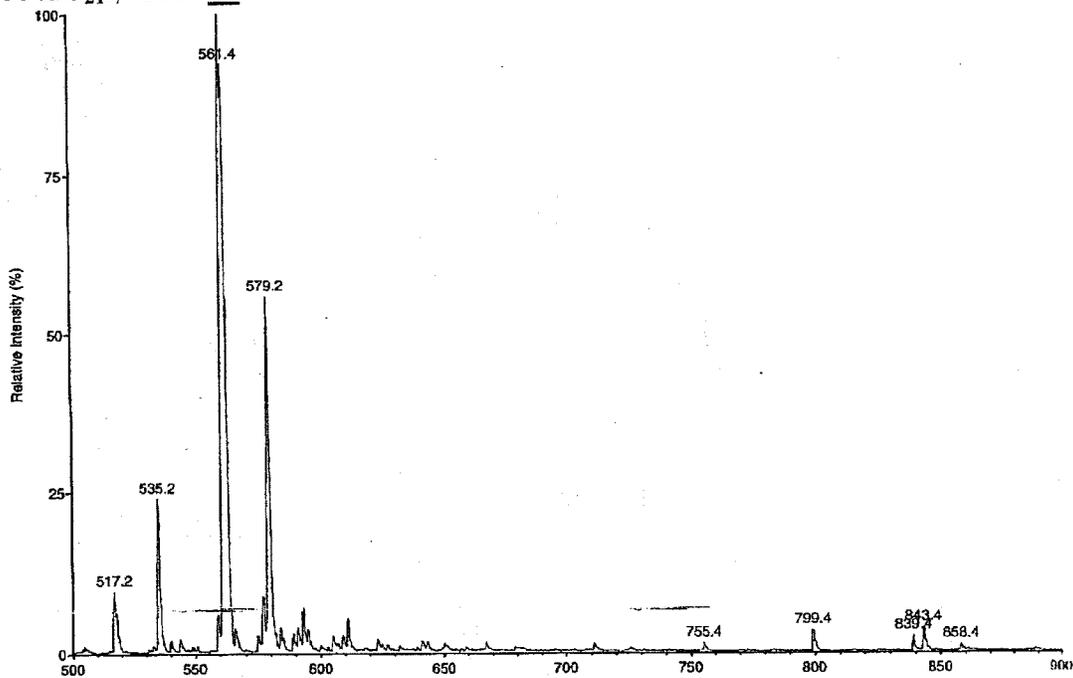
Boc-14-mère- γ -Glu- γ -Glu-OH 60 **γ -Glu- γ -Glu-14-mère-OH 53**

Glu-Glu-14-mère-OH 55**Glu-Asp-14-mère-OH 56**

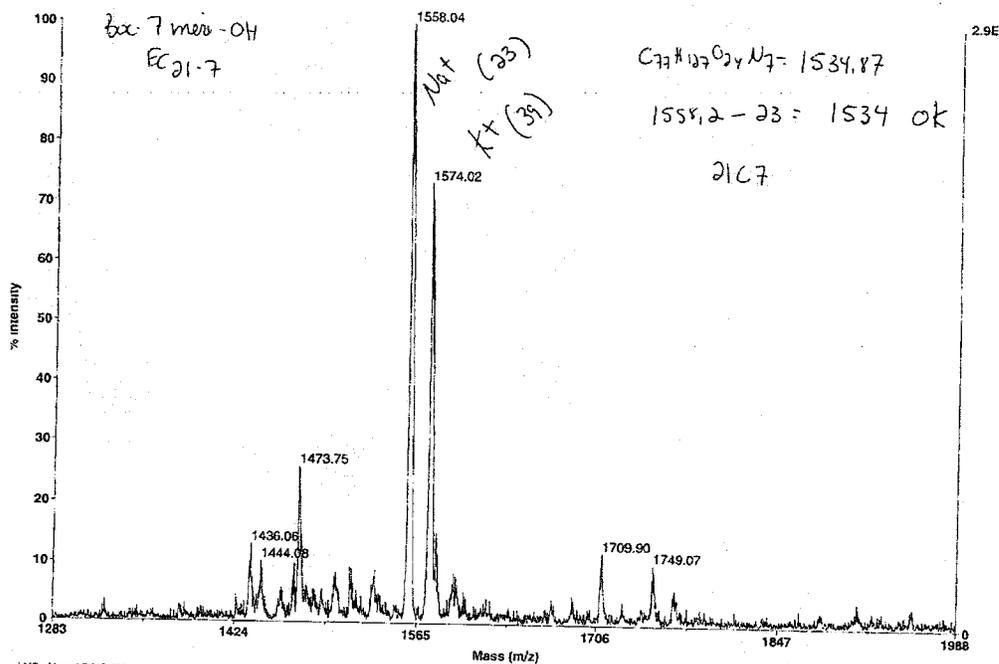
ANNEXE 2

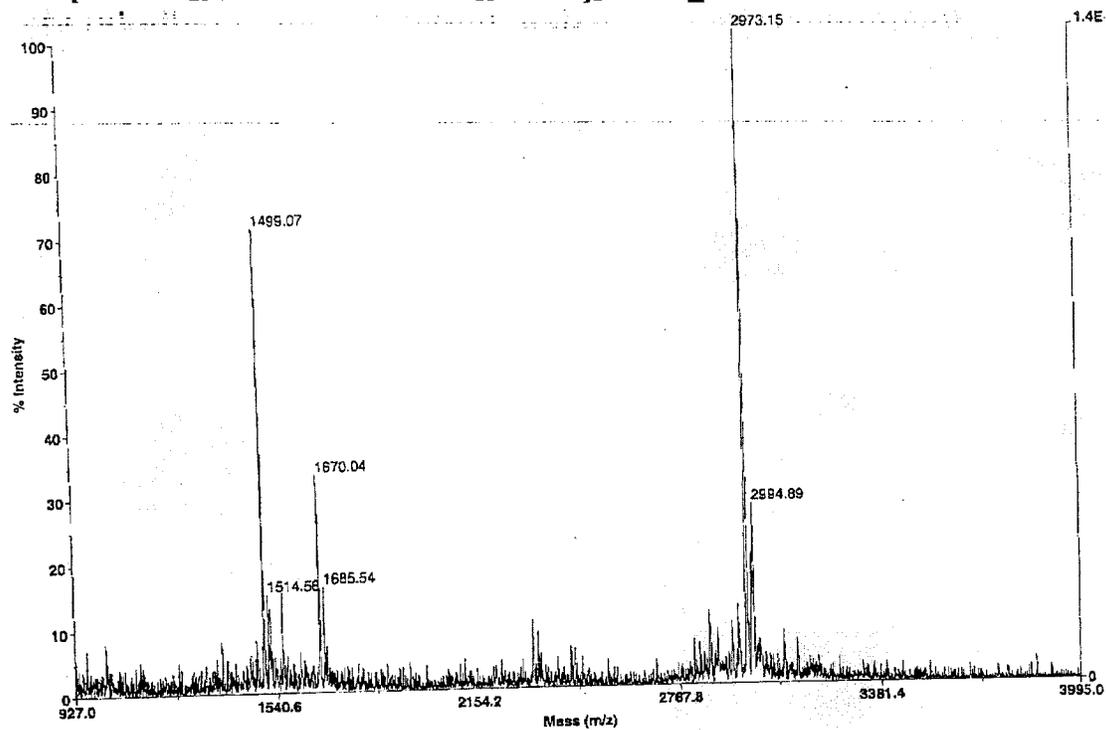
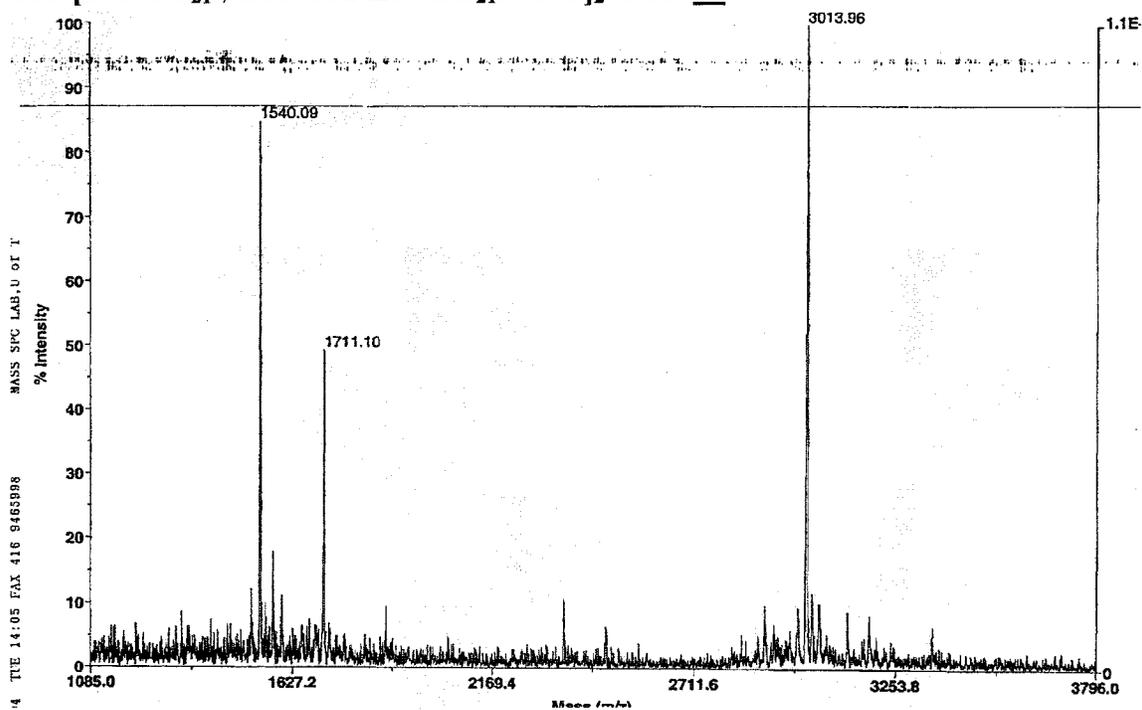
Spectres de Masse

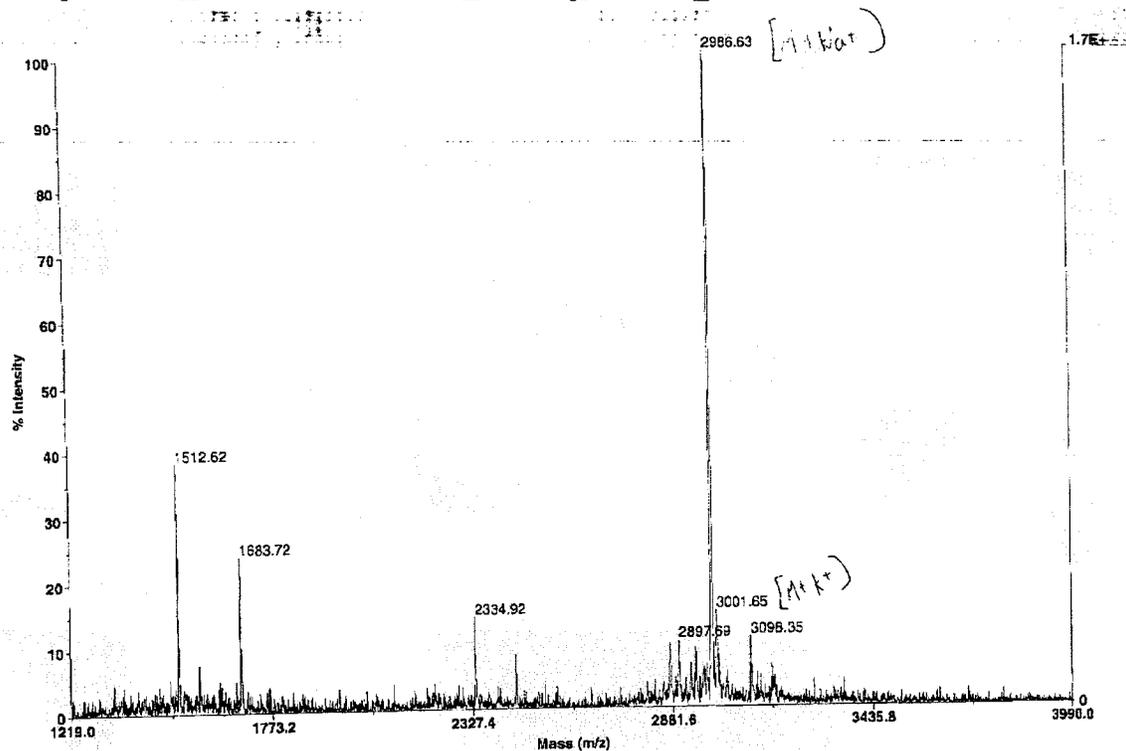
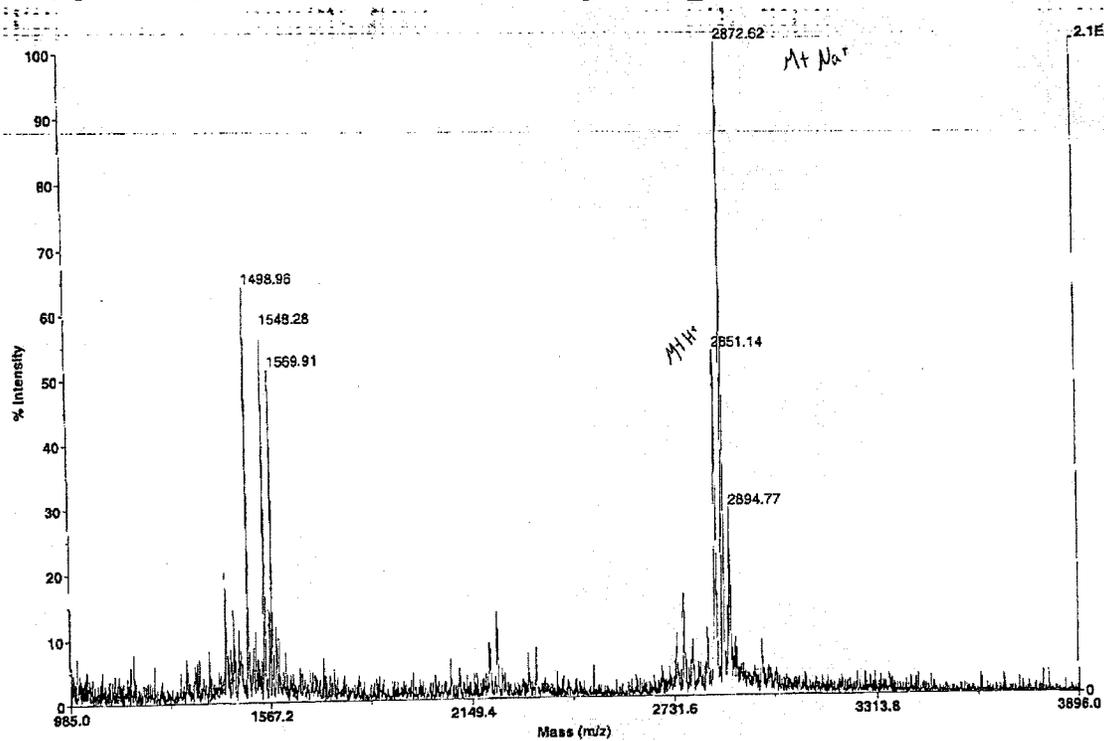
Boc-EC₂₁₋₇-OH 11

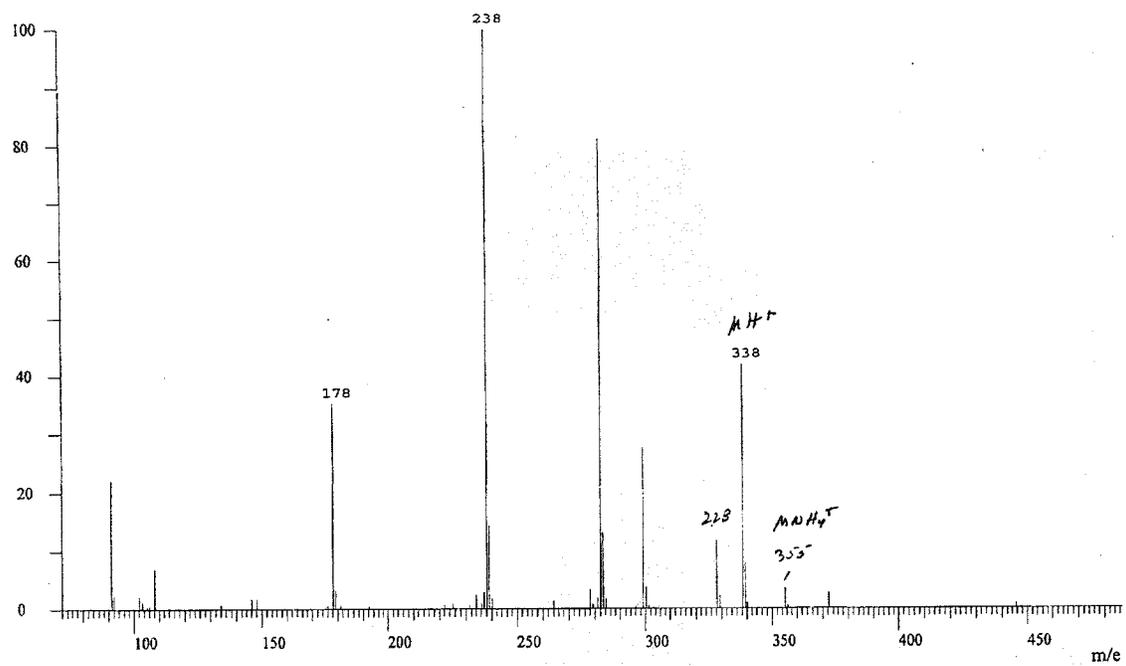
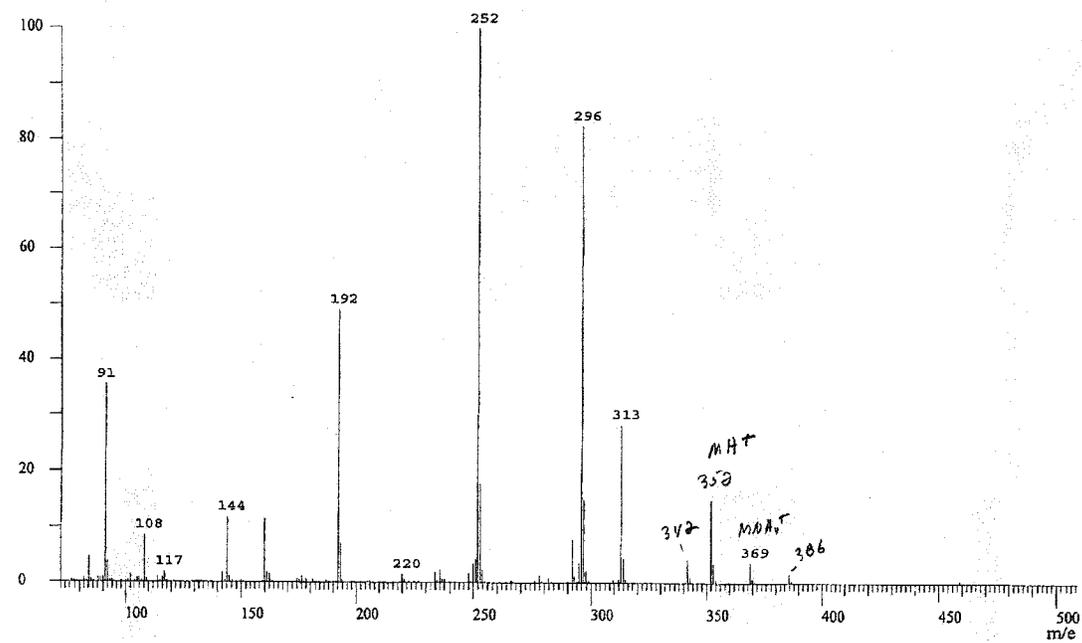


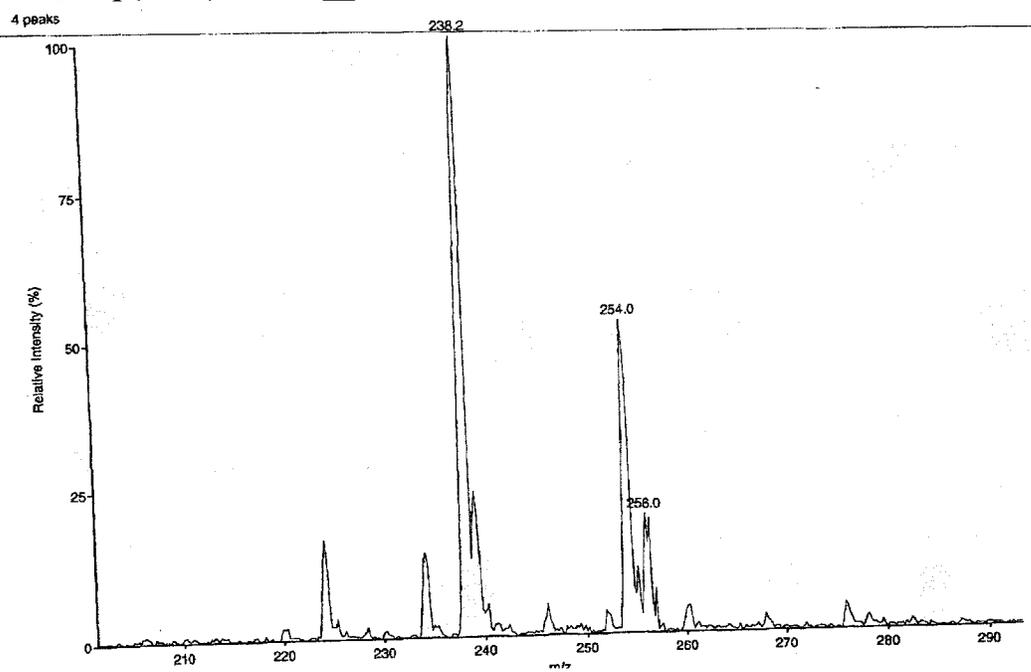
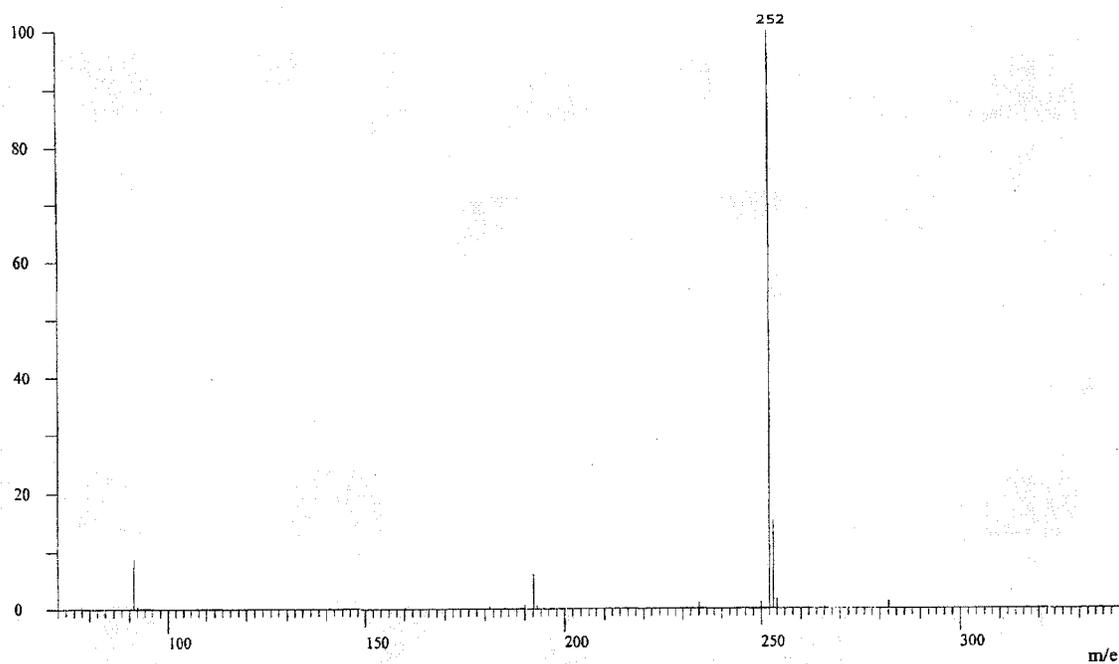
Boc-Leu-EC₂₁₋₇-Leu-Leu-Leu-EC₂₁₋₇-Leu-OH 22

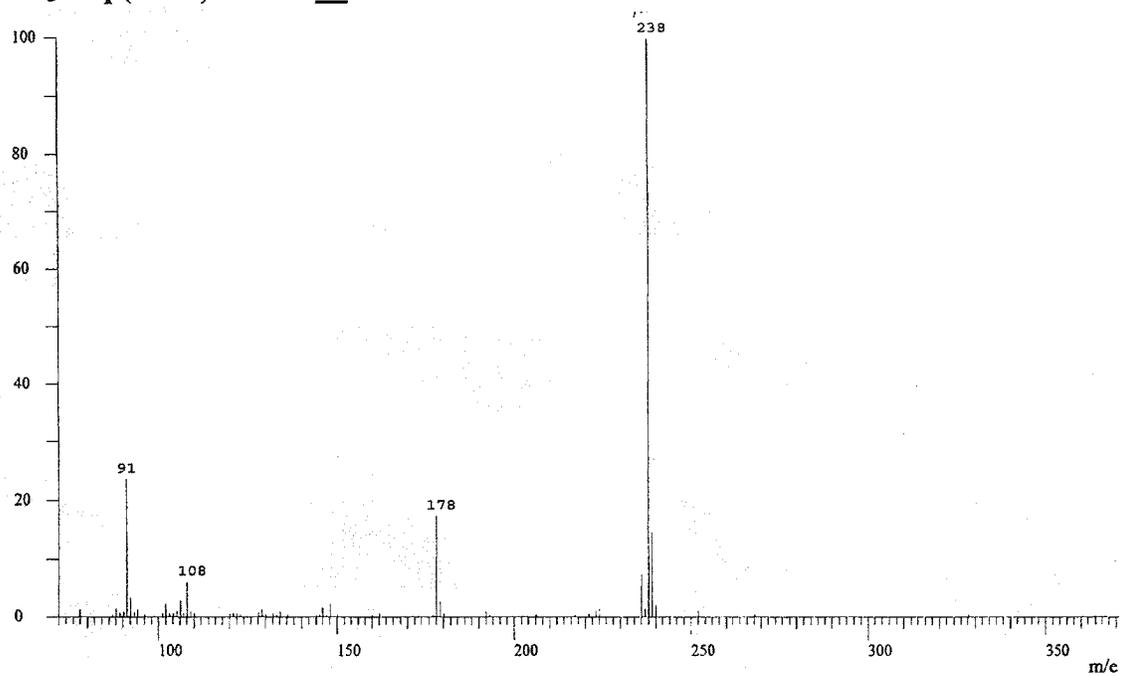
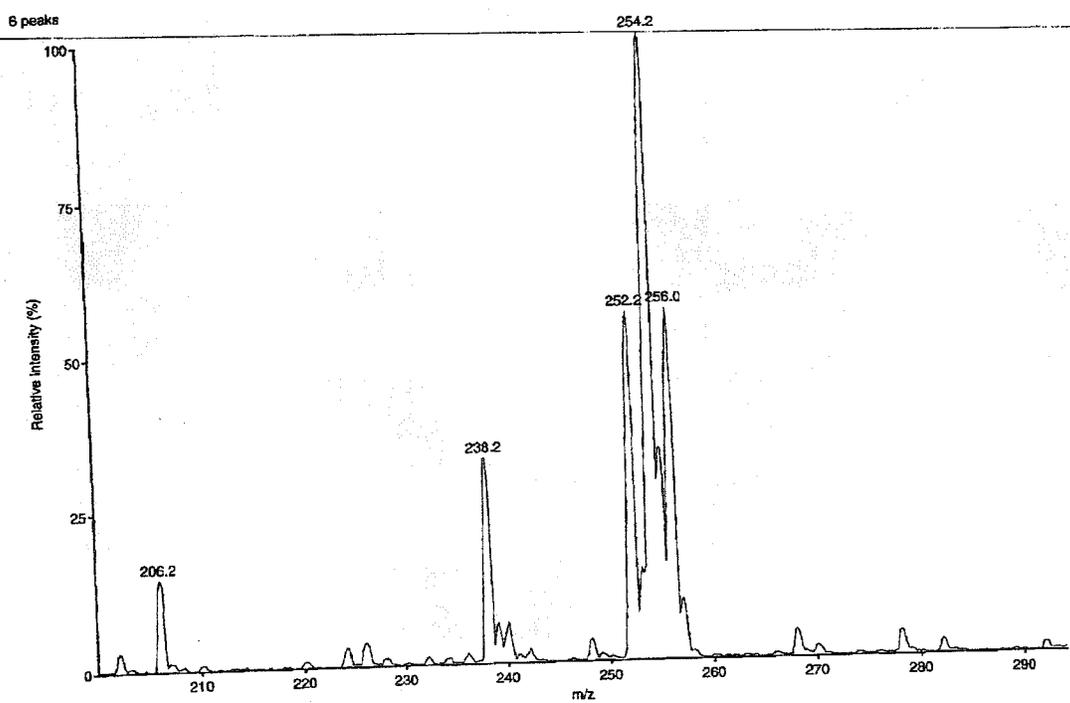


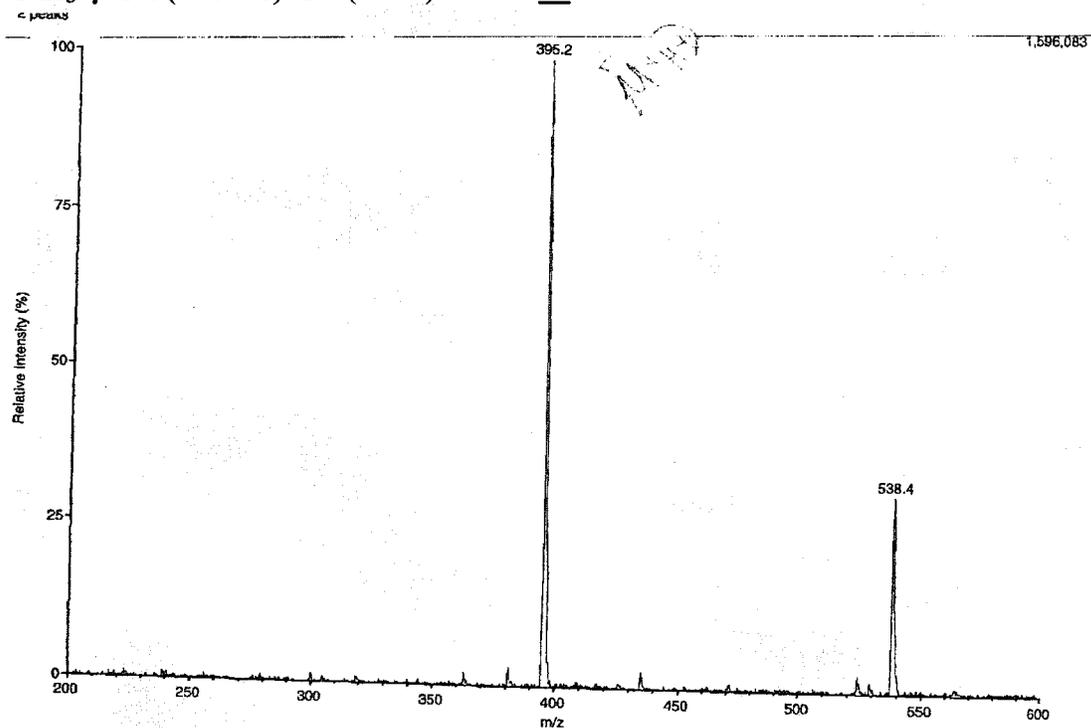
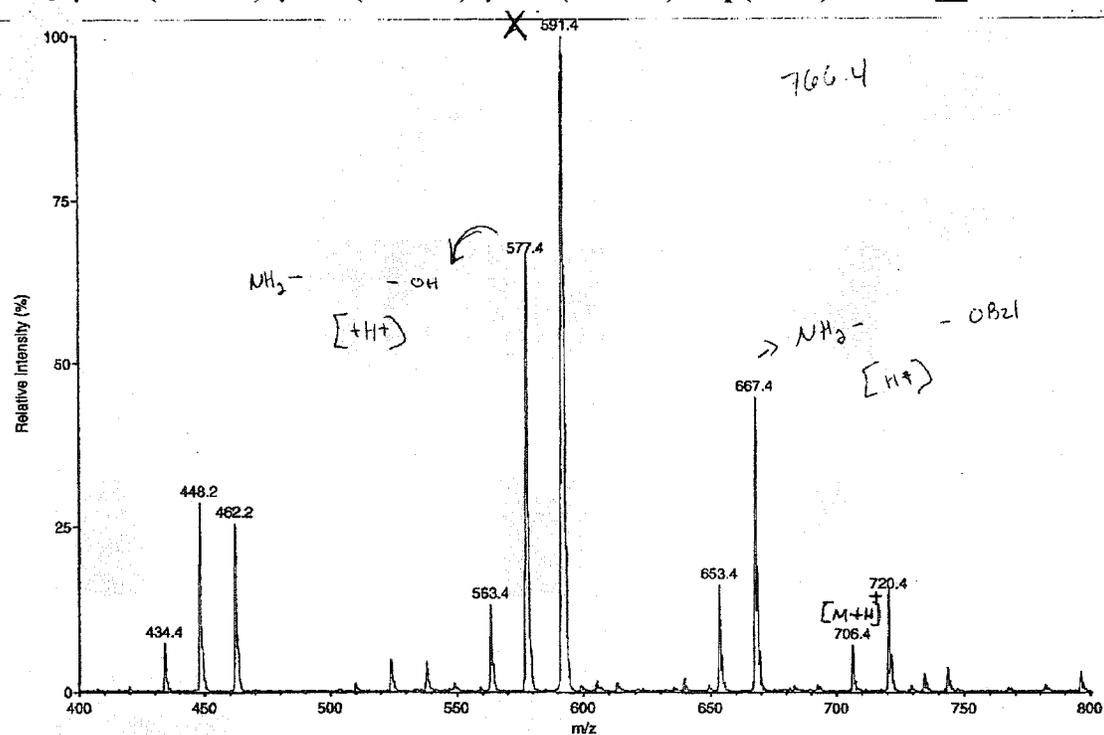
Boc-[Leu-EC₂₁₋₇-Leu-Leu-Leu-EC₂₁₋₇-Leu]₂-OH 4**Boc-[Leu-EC₂₁₋₇-Leu-Leu-Leu-EC₂₁₋₇-Leu]₂-n-Pr 61**

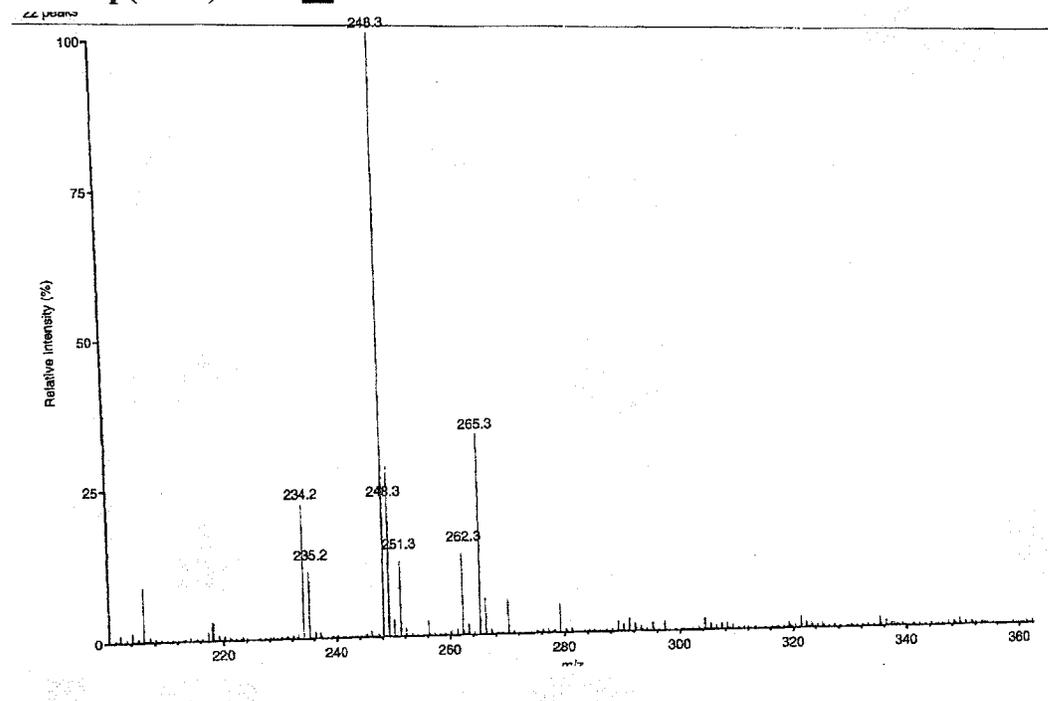
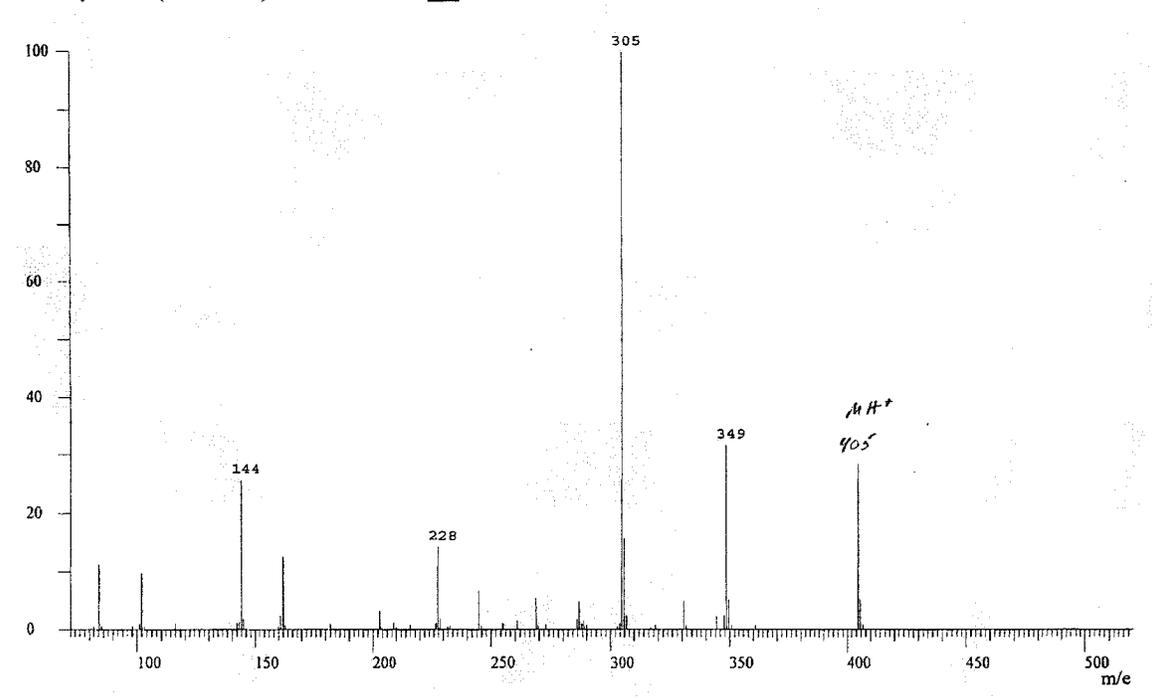
Boc-[Leu-EC_{21.7}-Leu-Leu-Leu-EC_{21.7}-Leu]₂-OMe 2**NH₃-[Leu-EC_{21.7}-Leu-Leu-Leu-EC_{21.7}-Leu]₂-OH 5**

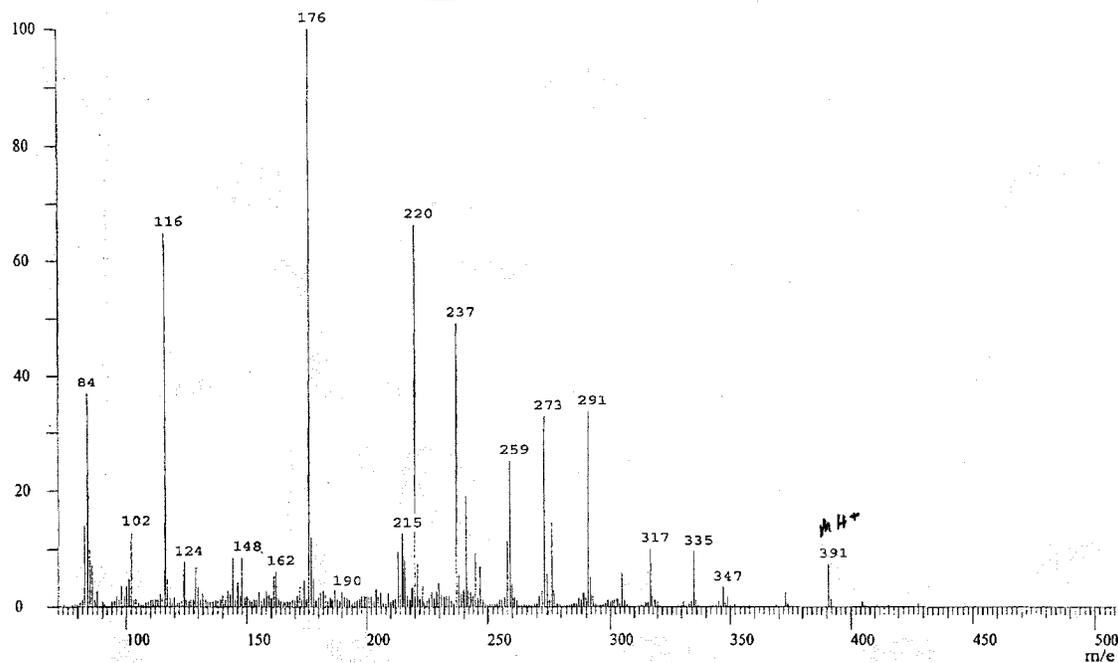
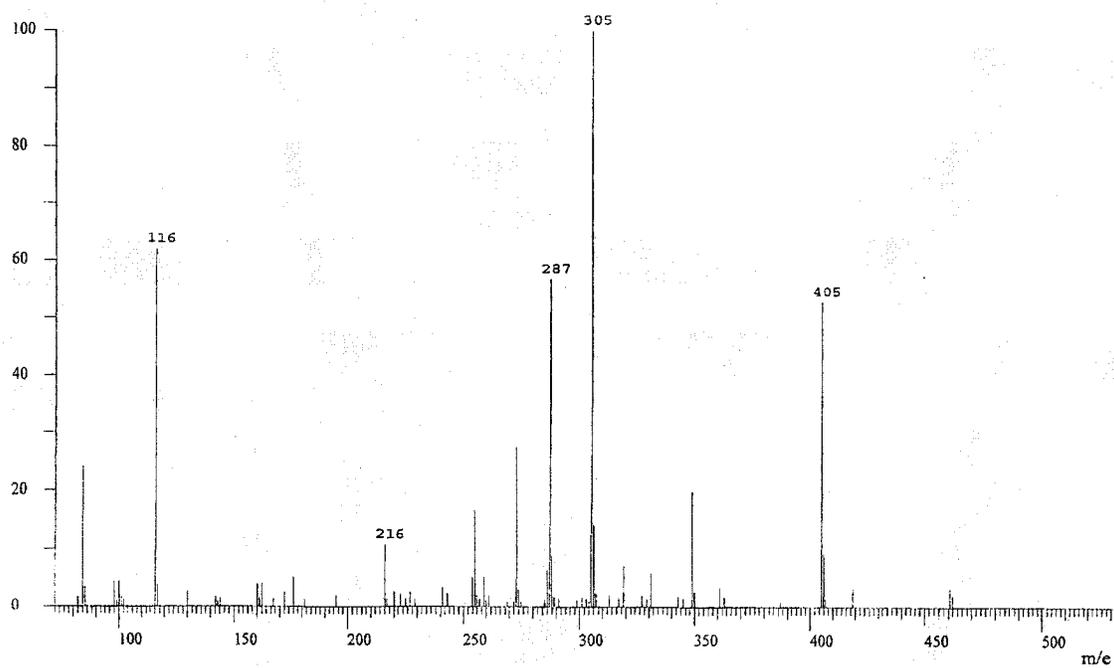
Boc-Asp(OBzl)-OMe 62**Boc-Glu(OBzl)-OMe 29**

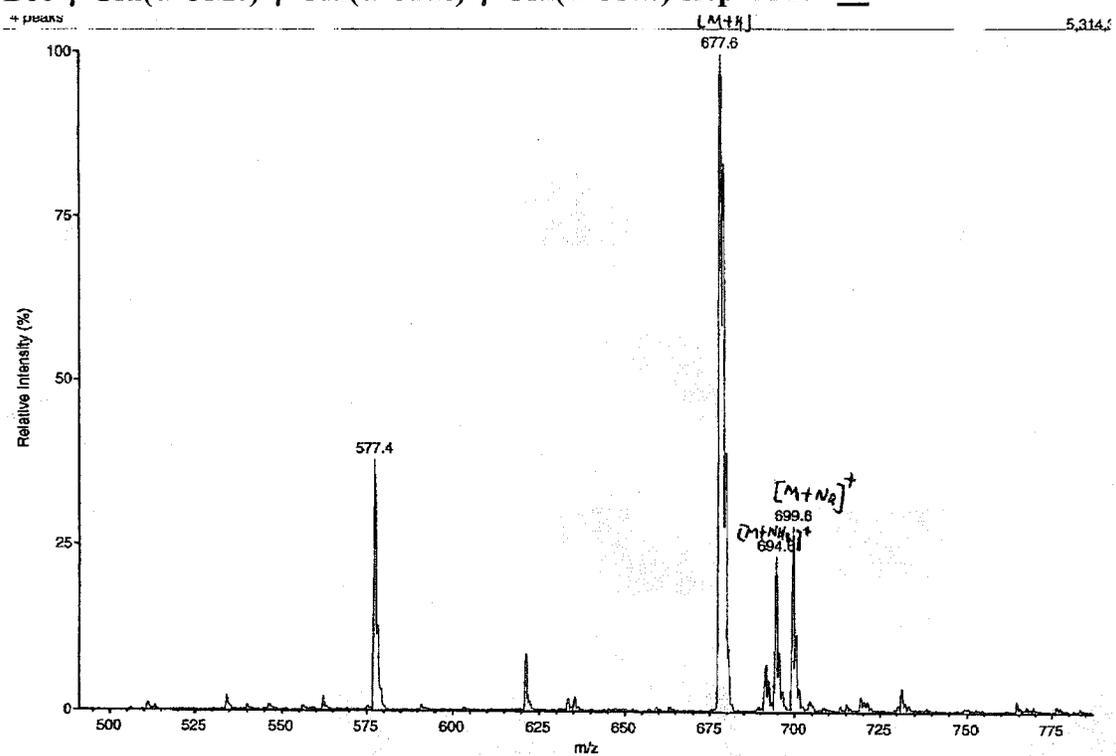
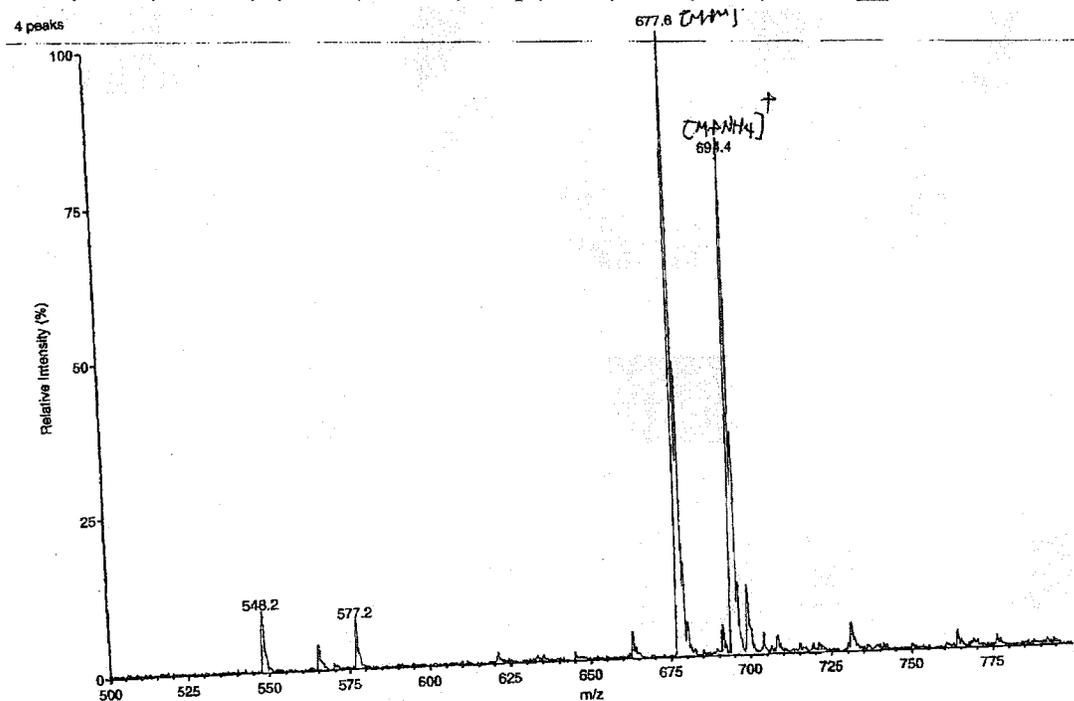
$^+\text{NH}_3\text{-Asp(OBzl)-OMe}$ 65 $^+\text{NH}_3\text{-Glu(OBzl)-OMe}$ 31

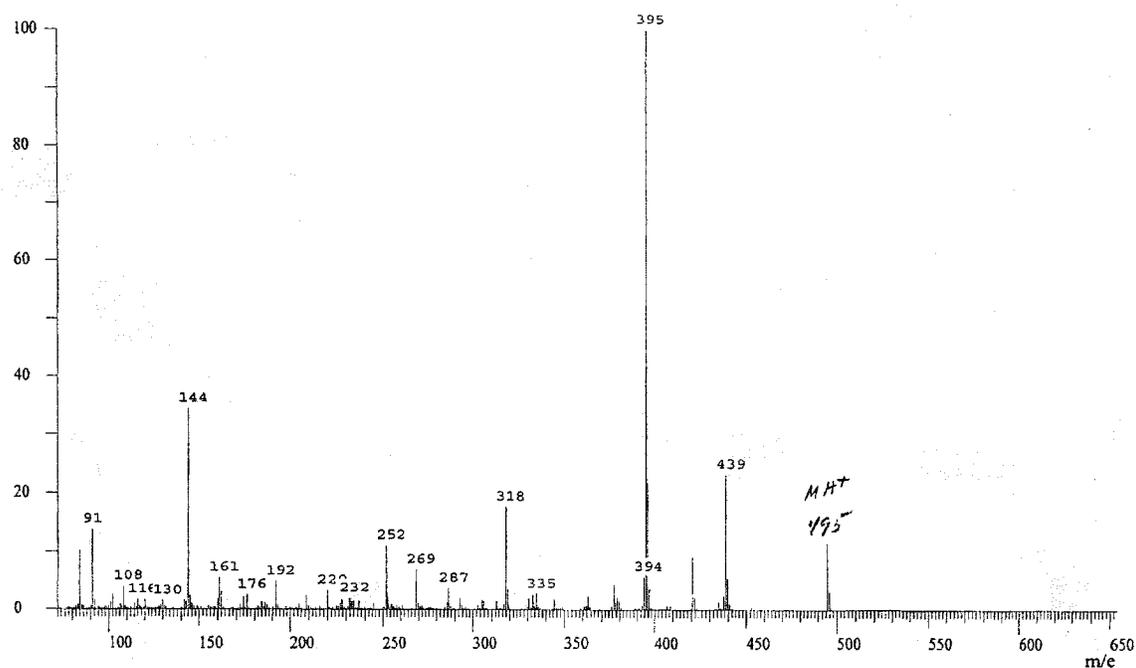
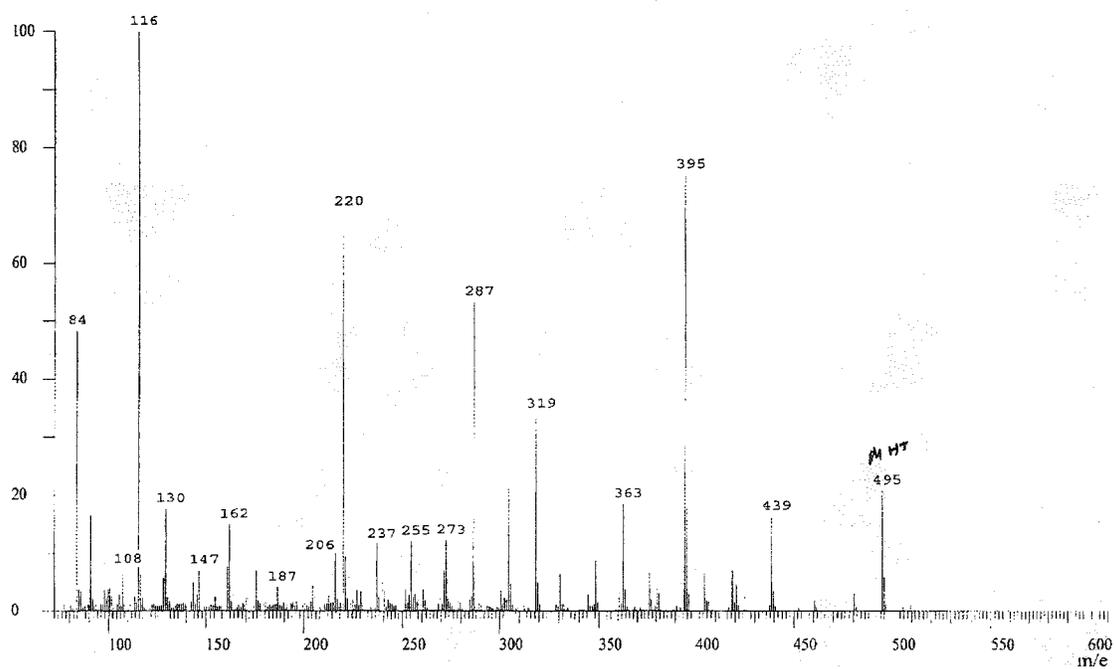
$^+$ NH₃-Asp(OMe)-OBzl 66 **$^+$ NH₃-Glu(OMe)-OBzl 67**

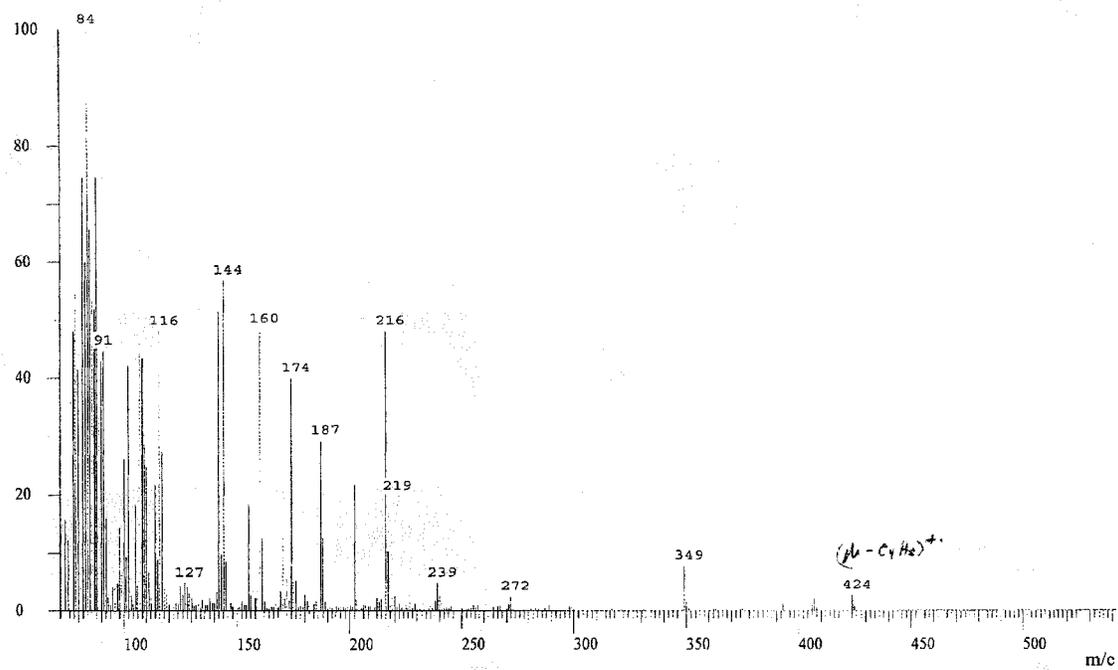
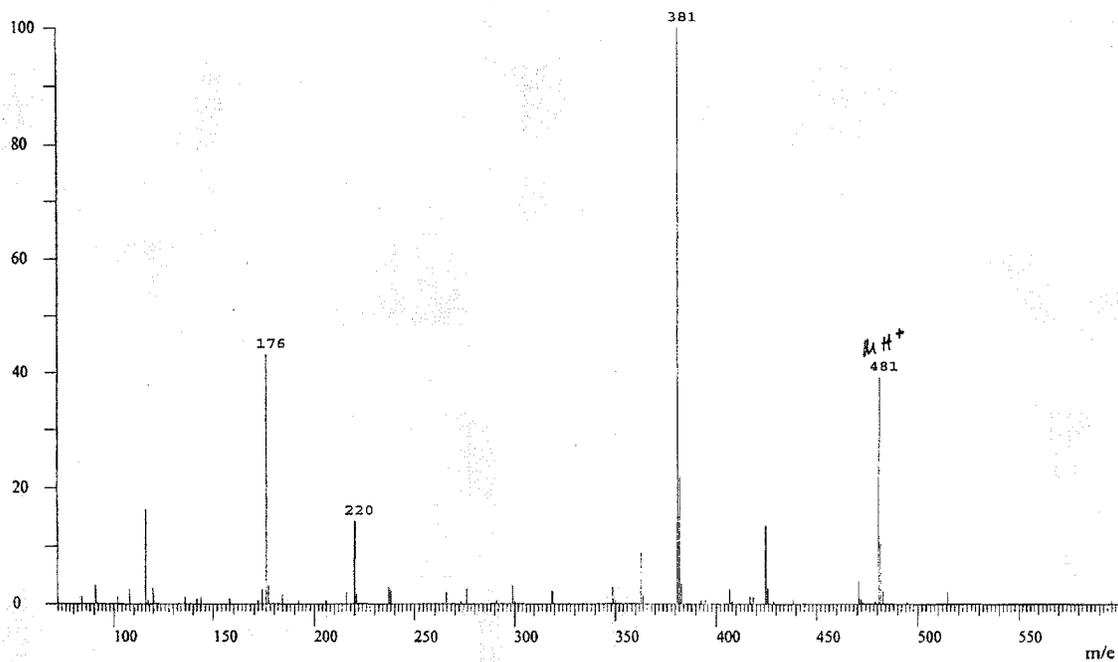
$^+ \text{NH}_3\text{-}\gamma\text{-Glu}(\alpha\text{-OMe})\text{-Glu}(\text{OBzl})\text{-OMe}$ 34

 $^+ \text{NH}_3\text{-}\gamma\text{-Glu}(\alpha\text{-OMe})\text{-}\gamma\text{-Glu}(\alpha\text{-OMe})\text{-}\gamma\text{-Glu}(\alpha\text{-OMe})\text{-Asp}(\text{OBzl})\text{-OMe}$ 72


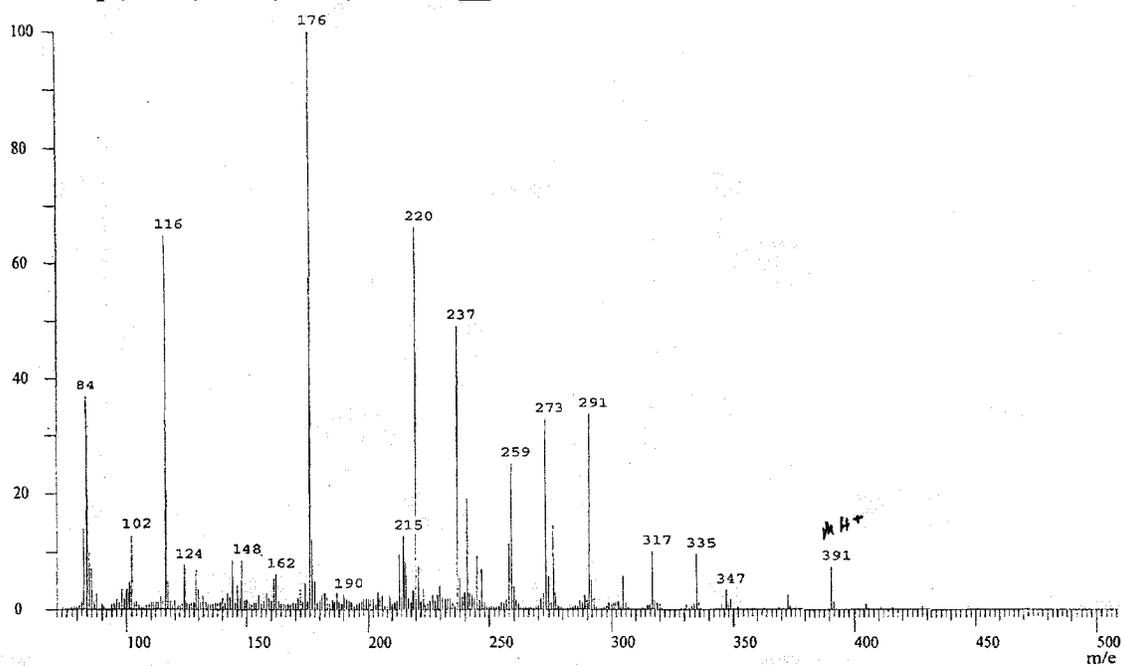
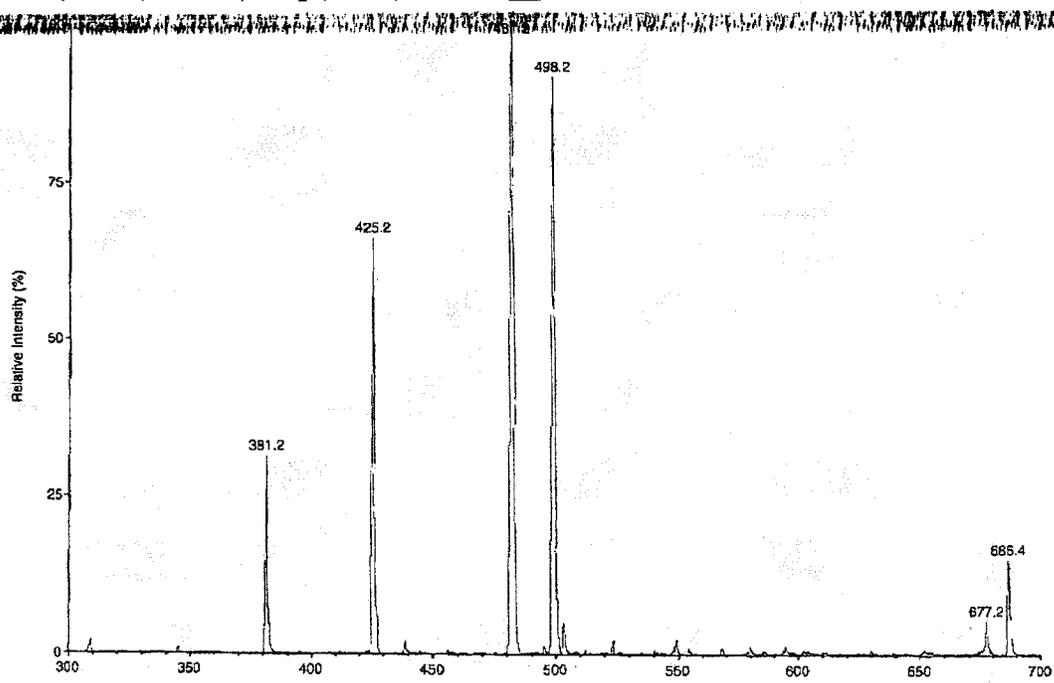
Boc-Asp(OMe)-OH 74**Boc- γ -Glu(α -OMe)-Glu-OMe 33**

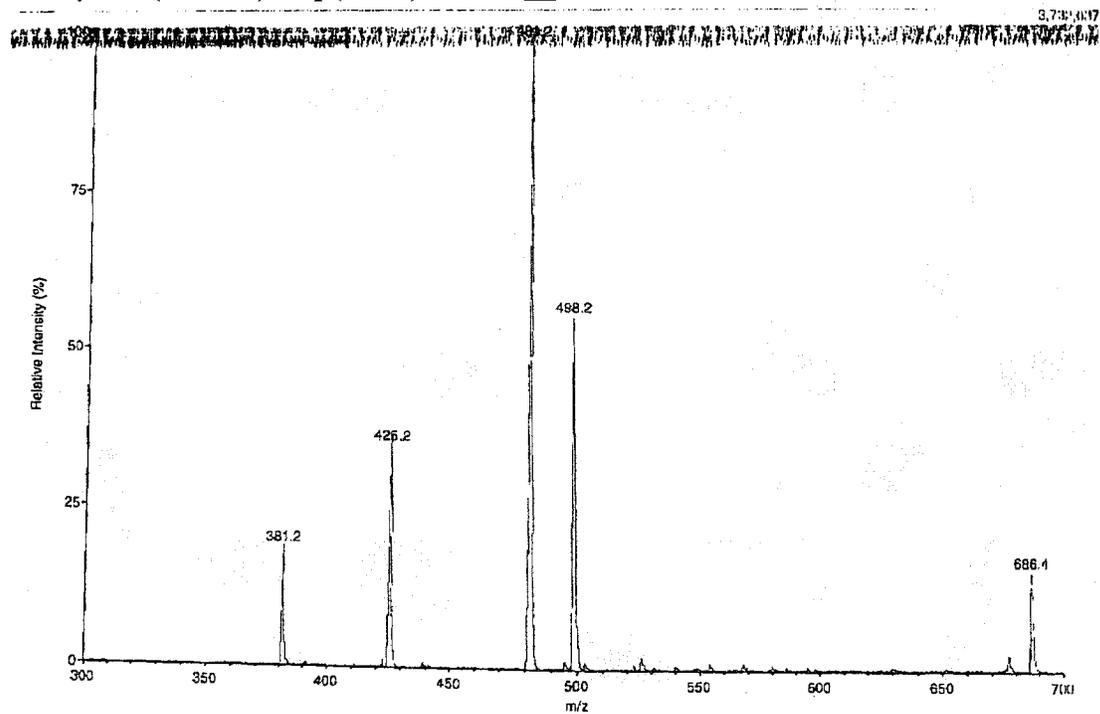
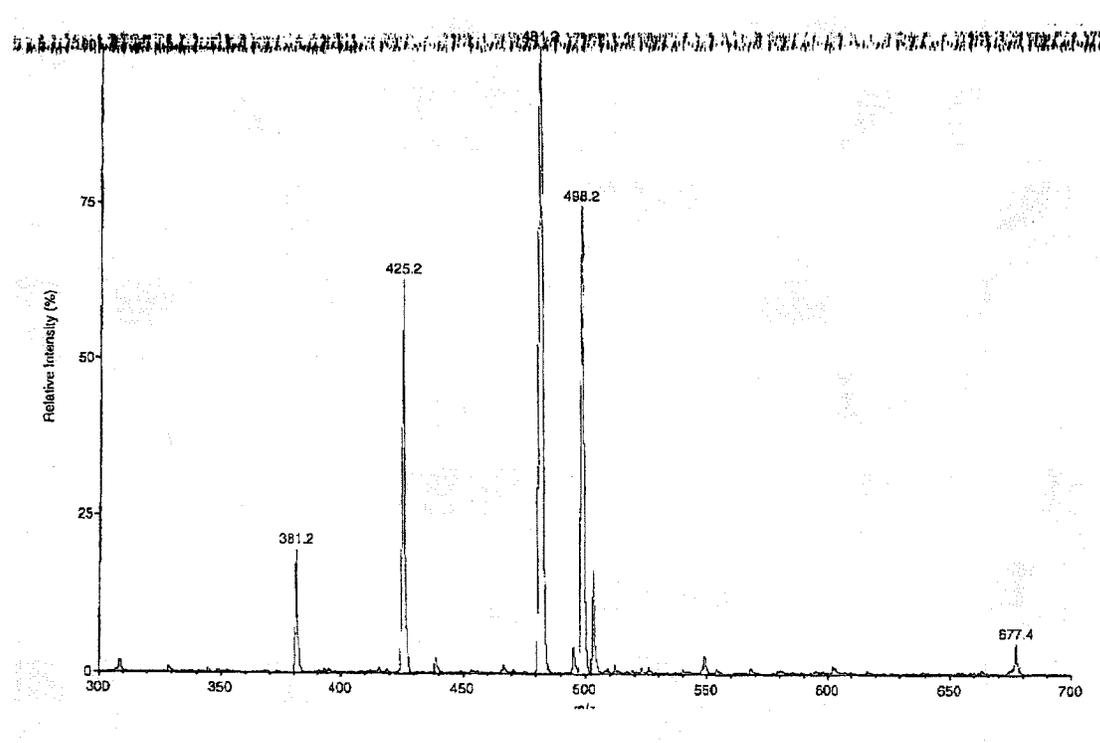
Boc- γ -Glu(α -OMe)-Asp-OMe 76**Boc-Glu(OMe)-Glu(OMe)-OH 77**

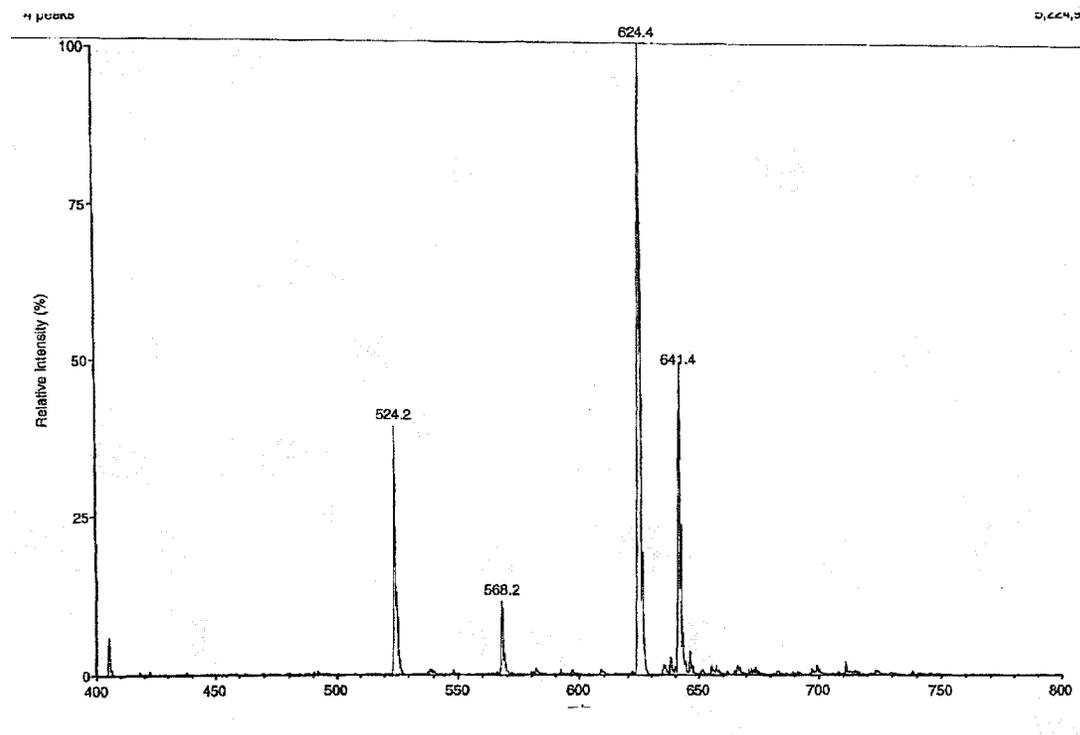
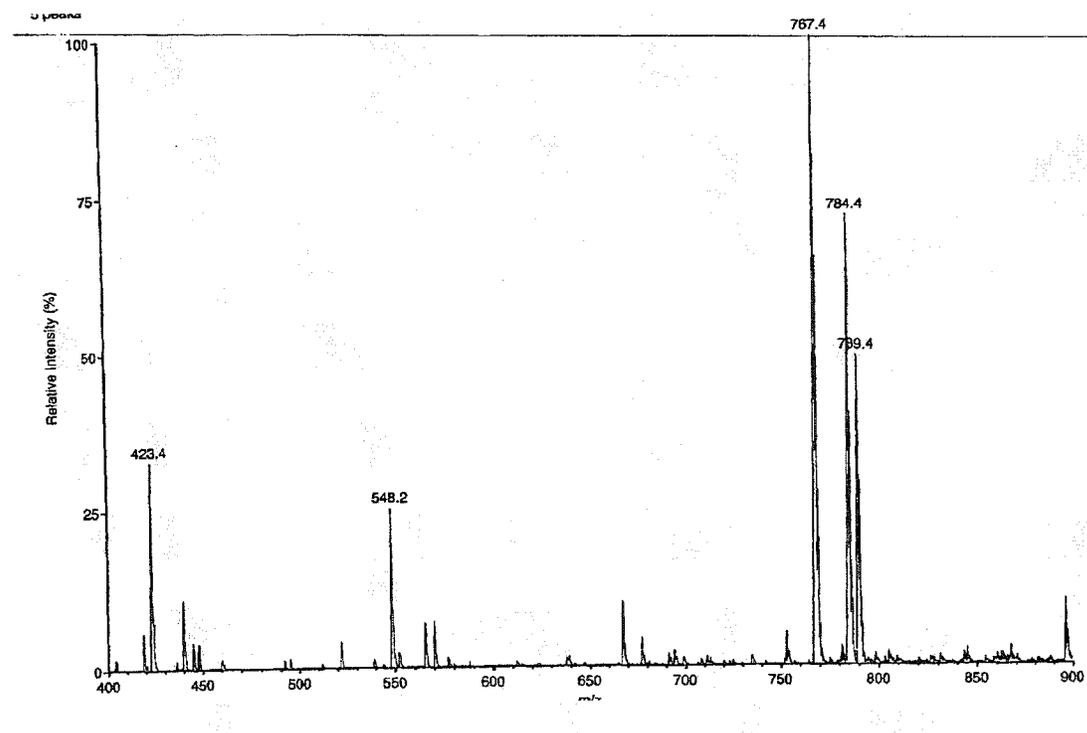
Boc- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)-Asp-OMe 78**Boc- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)-Asp(OMe)-Glu(OMe)-OH 79**

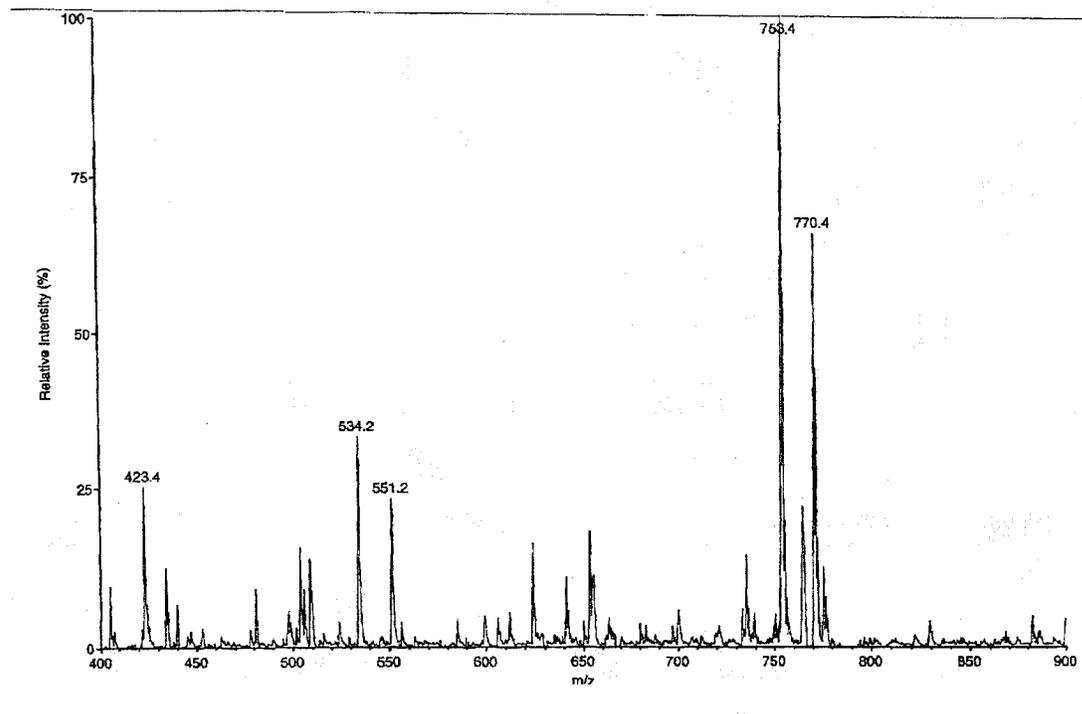
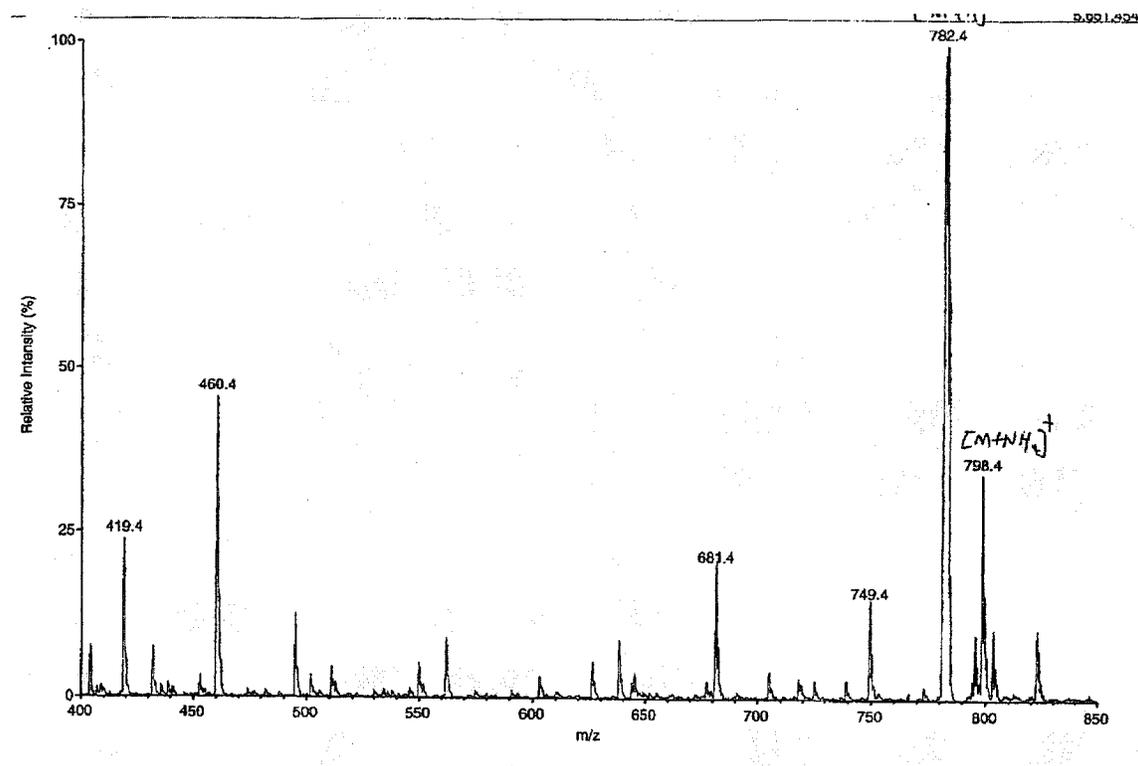
Boc- γ -Glu(γ -OMe)-Glu(OBzl)-OMe 32**Boc-Glu(OMe)-Glu(OMe)-OBzl 36**

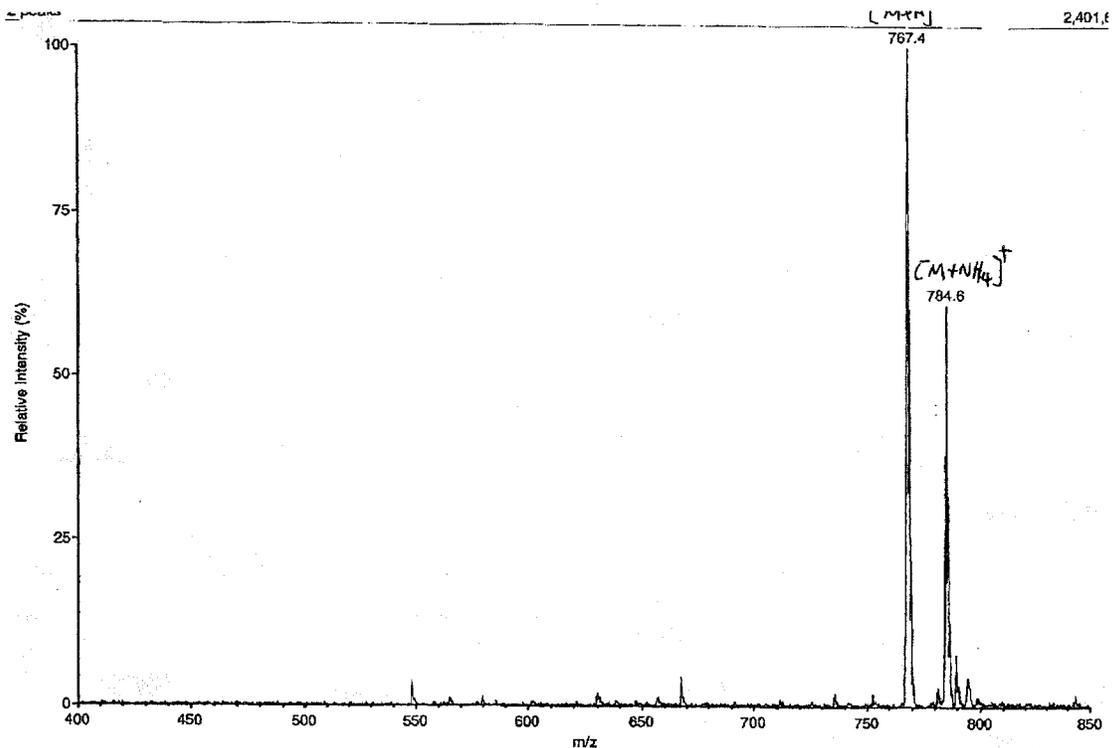
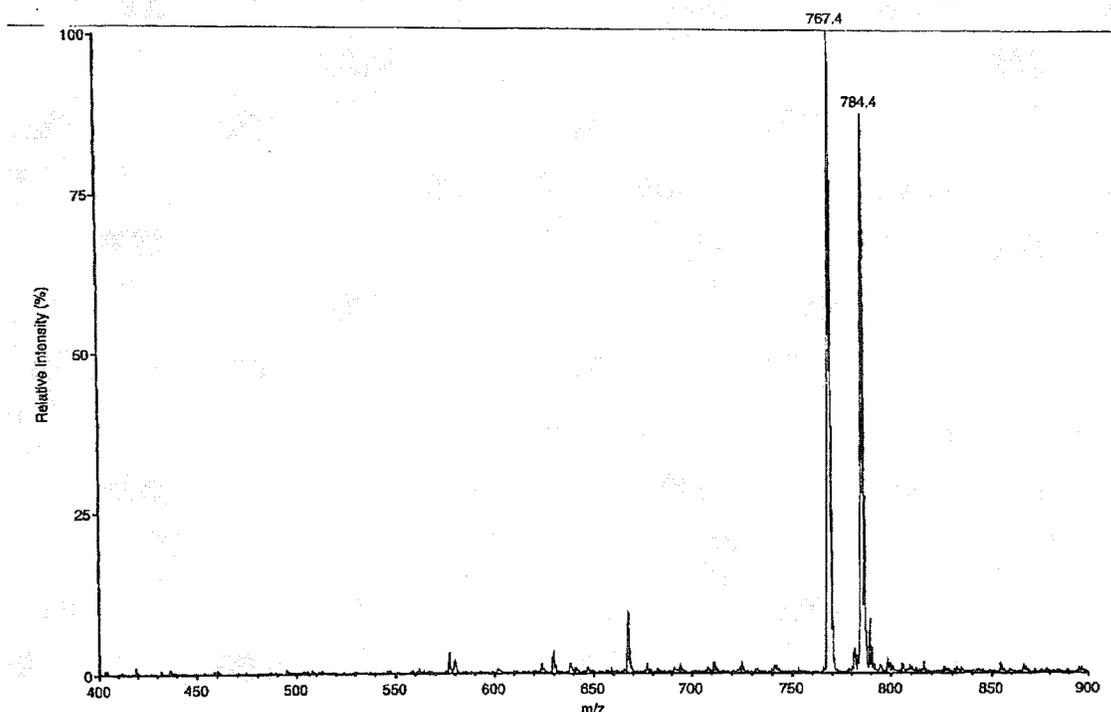
Boc-Asp(OMe)-Glu(OMe)-OBzl 37**Boc-Glu(OMe)-Asp(OMe)-Bzl 38**

Boc-Asp(OMe)-Glu(OBzl)-OMe 39**Boc- γ -Glu(α -OMe)-Asp(OBzl)-OMe 40**

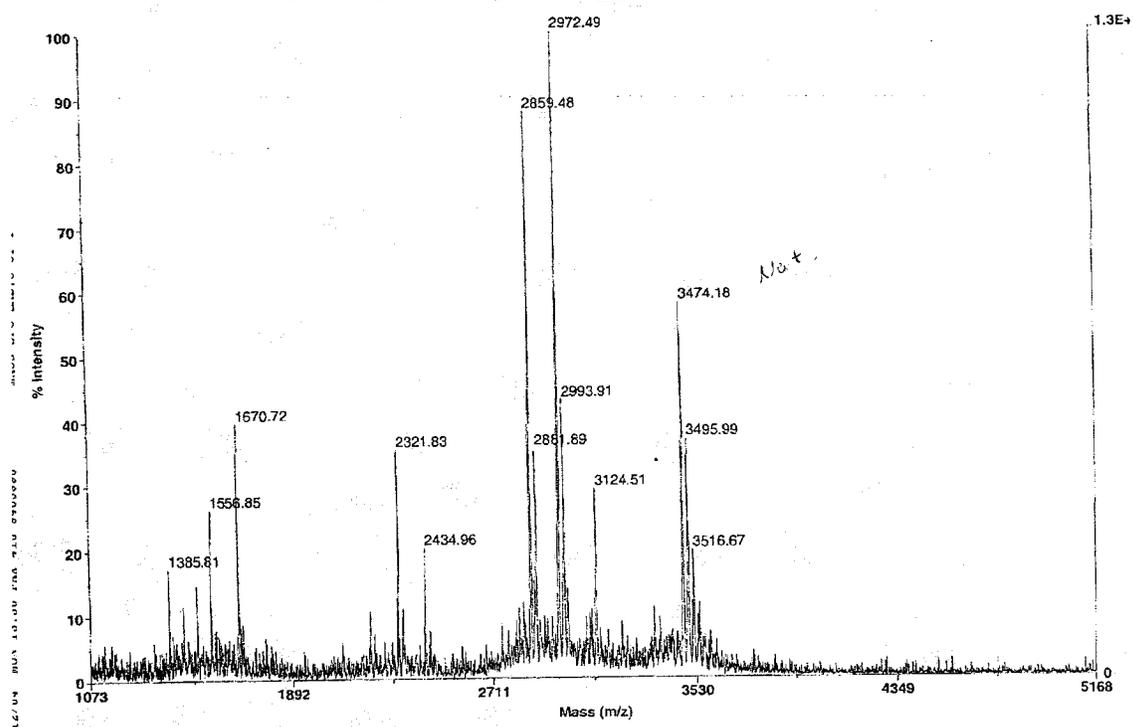
Boc- γ -Glu(α -OMe)-Asp(OMe)-OBzl 41**Boc- β -Asp(α -OMe)-Glu(OMe)-OBzl 42**

Boc- γ -Glu(α -OMe)- β -Asp(α -OMe)-Glu(OBzl)-OMe 43**Boc- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)-Asp(OMe)-Glu(OMe)-OBzl 44**

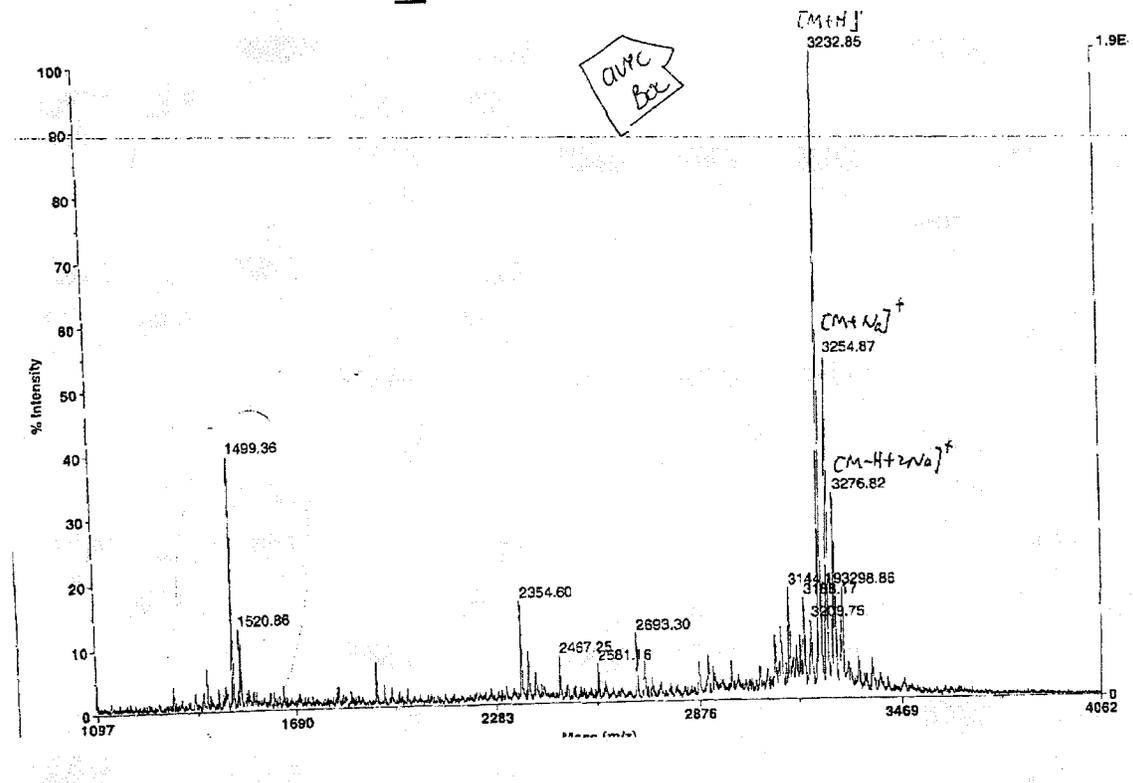
Boc-Asp(OMe)- γ -Glu(α -OMe)-Asp(OMe)-Glu(OMe)-OBzl 45**Boc- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)-Glu(OBzl)-OMe 35**

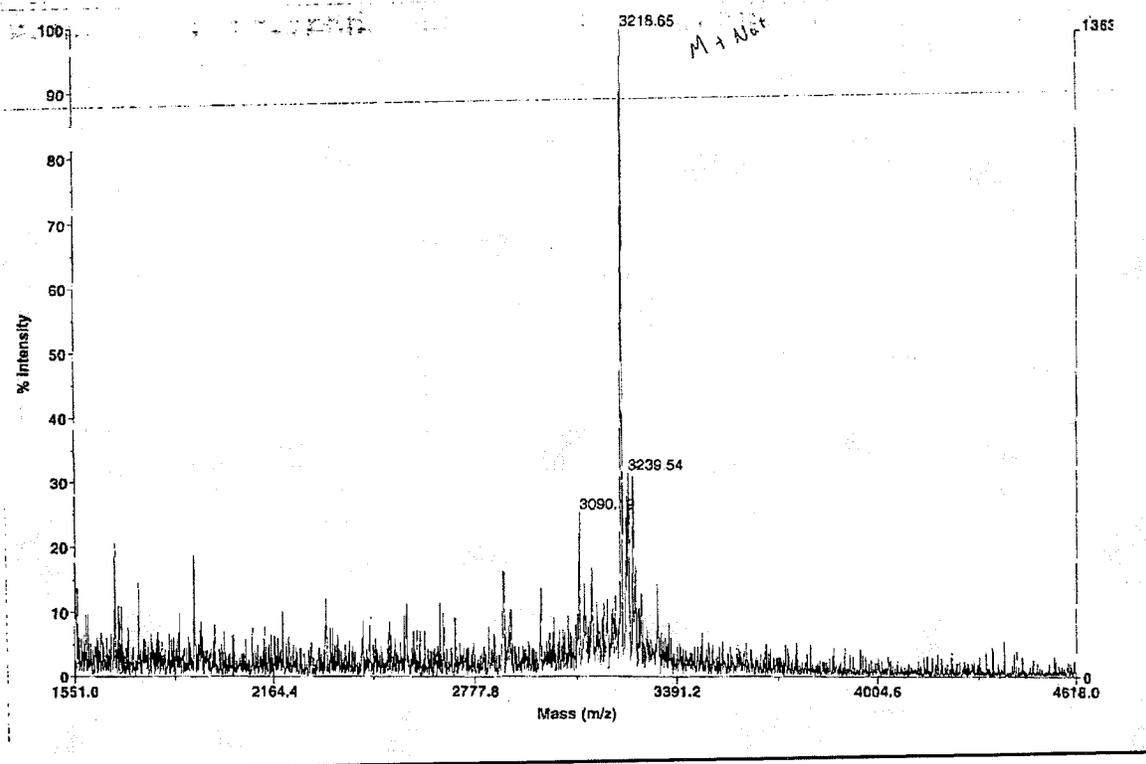
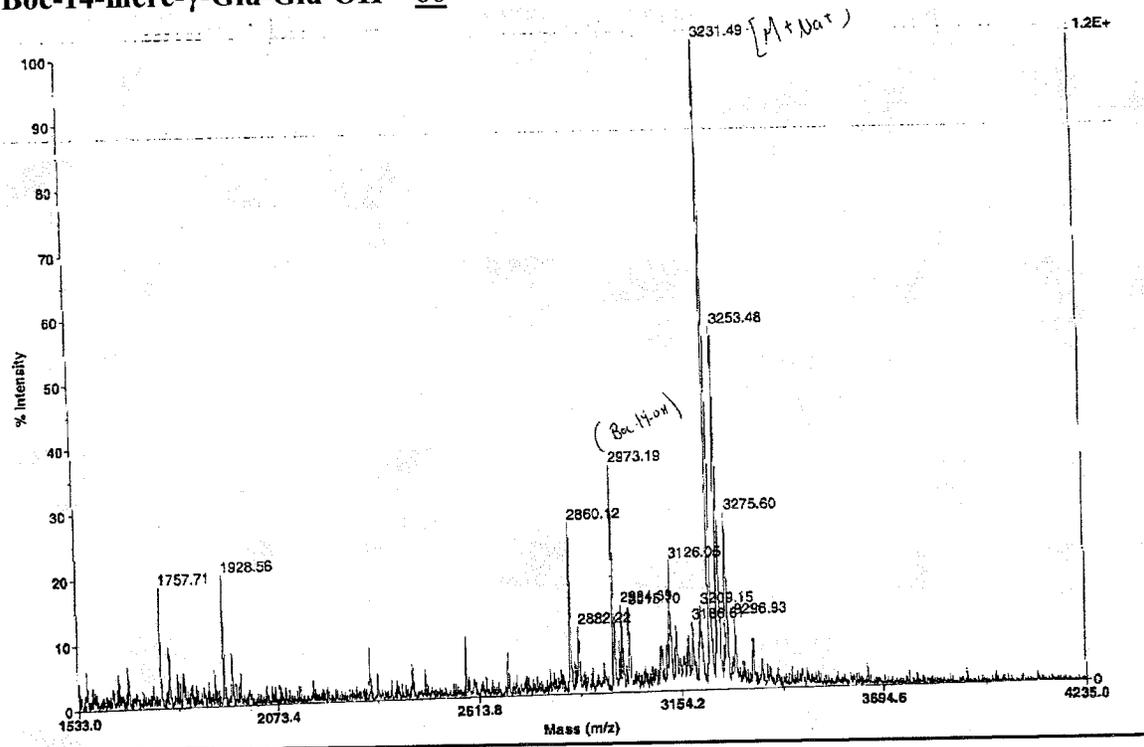
Boc- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)- β -Asp(α -OMe)-Glu(OMe)-OBzl 46**Boc- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)- γ -Glu(α -OMe)-Asp(OBzl)-OMe 47**

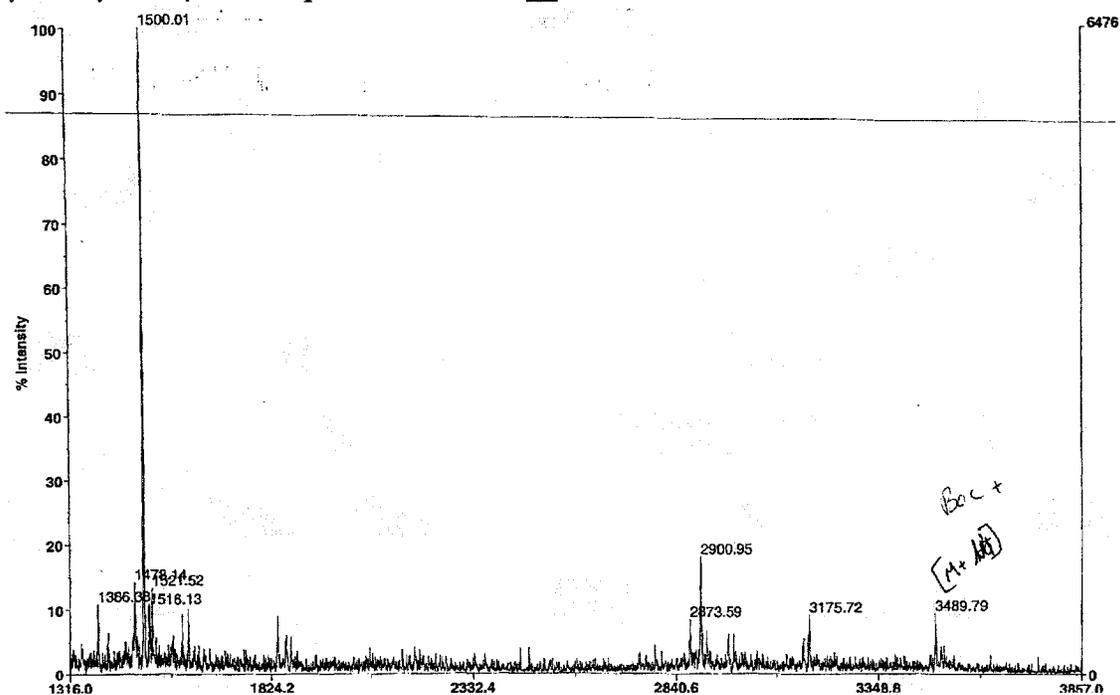
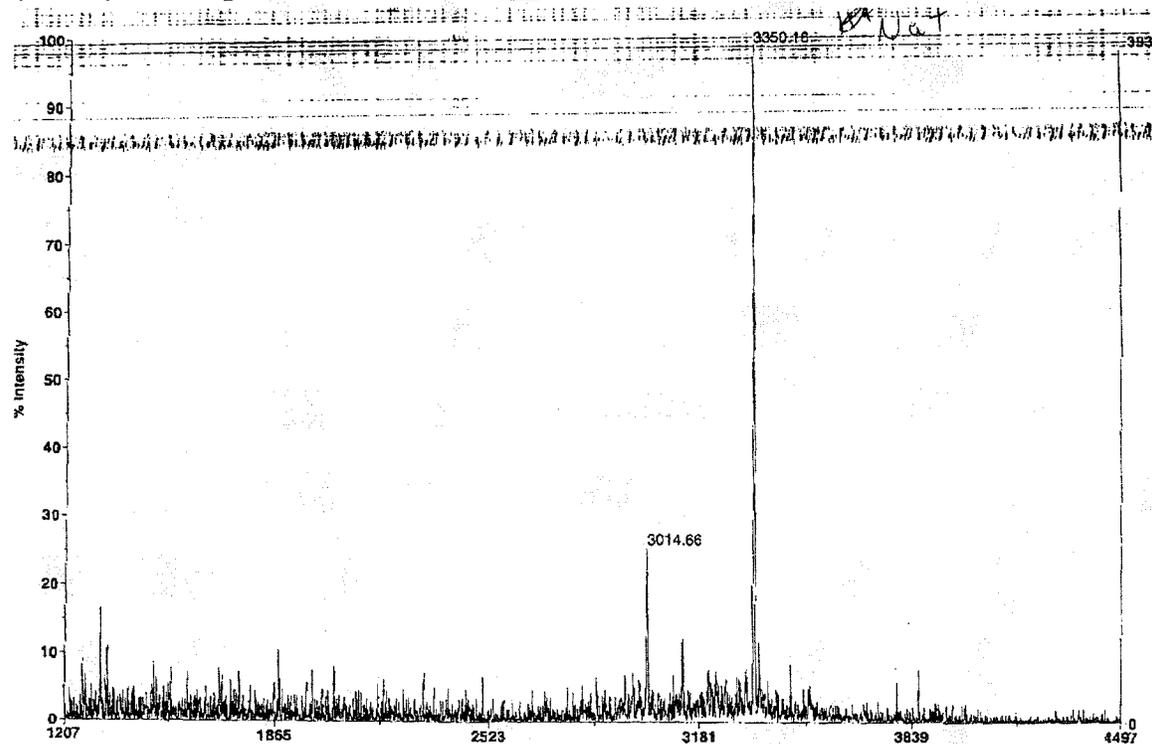
Boc-14-mère- γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu-Asp-OH 57

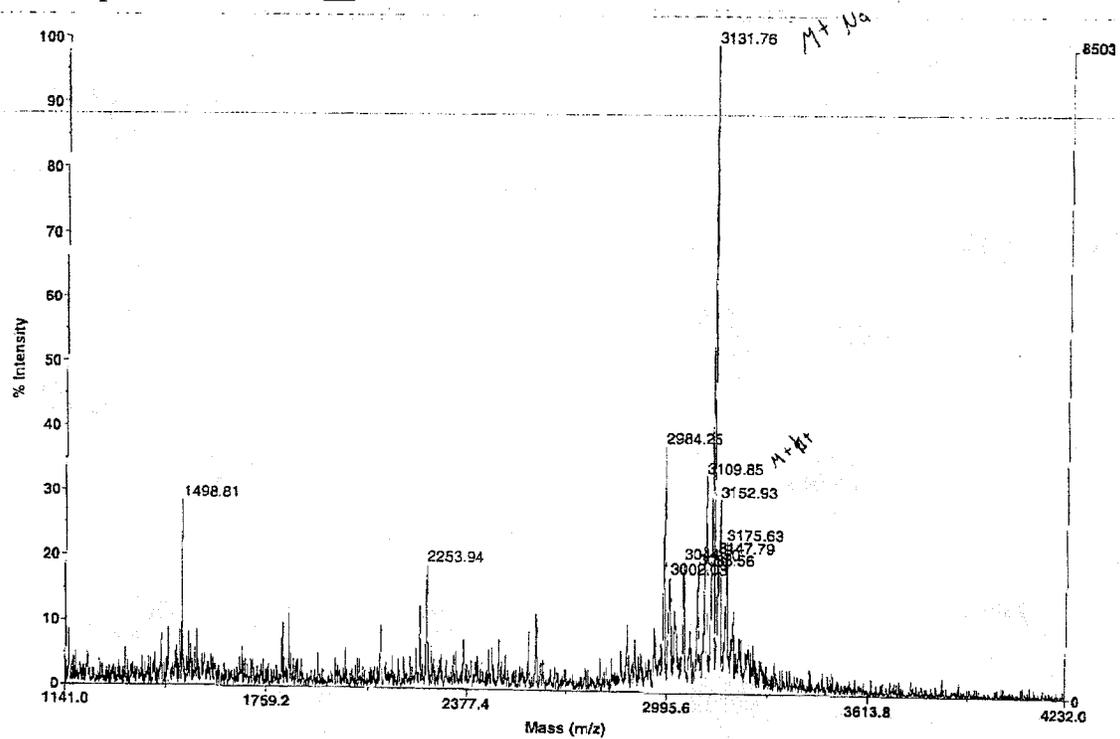


Boc-14-mère-Glu-Glu-OH 58



Boc-14-mère- β -Asp-Glu-OH 59**Boc-14-mère- γ -Glu-Glu-OH 60**

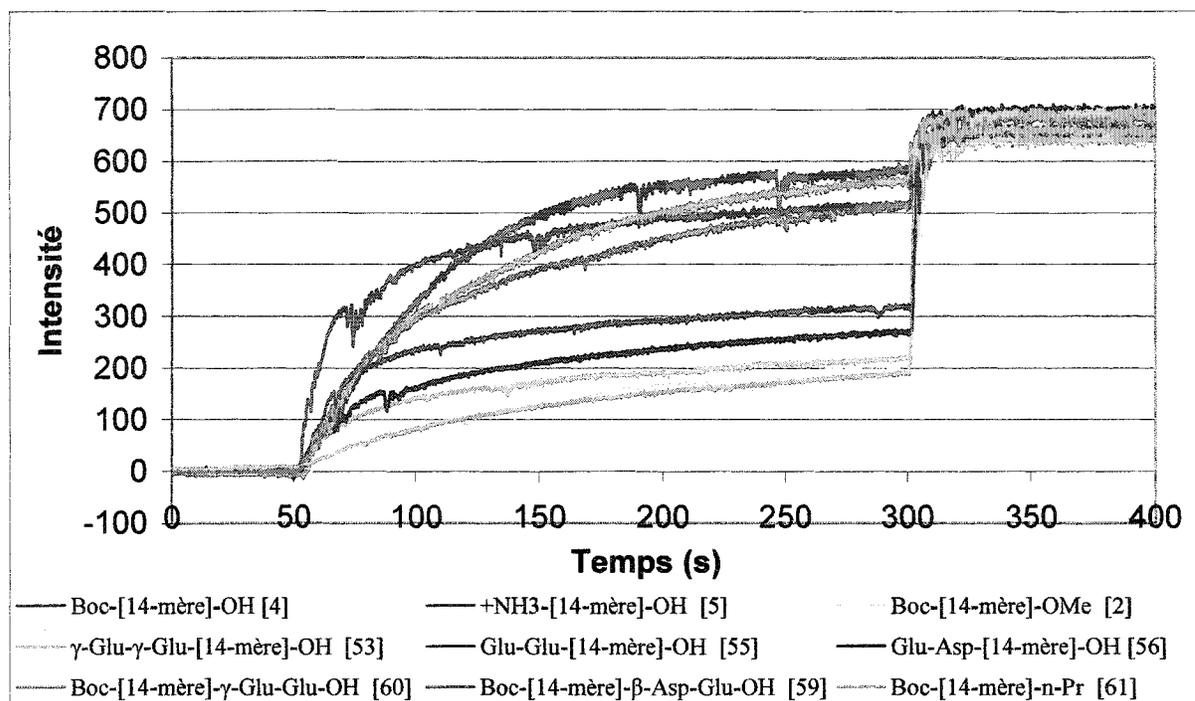
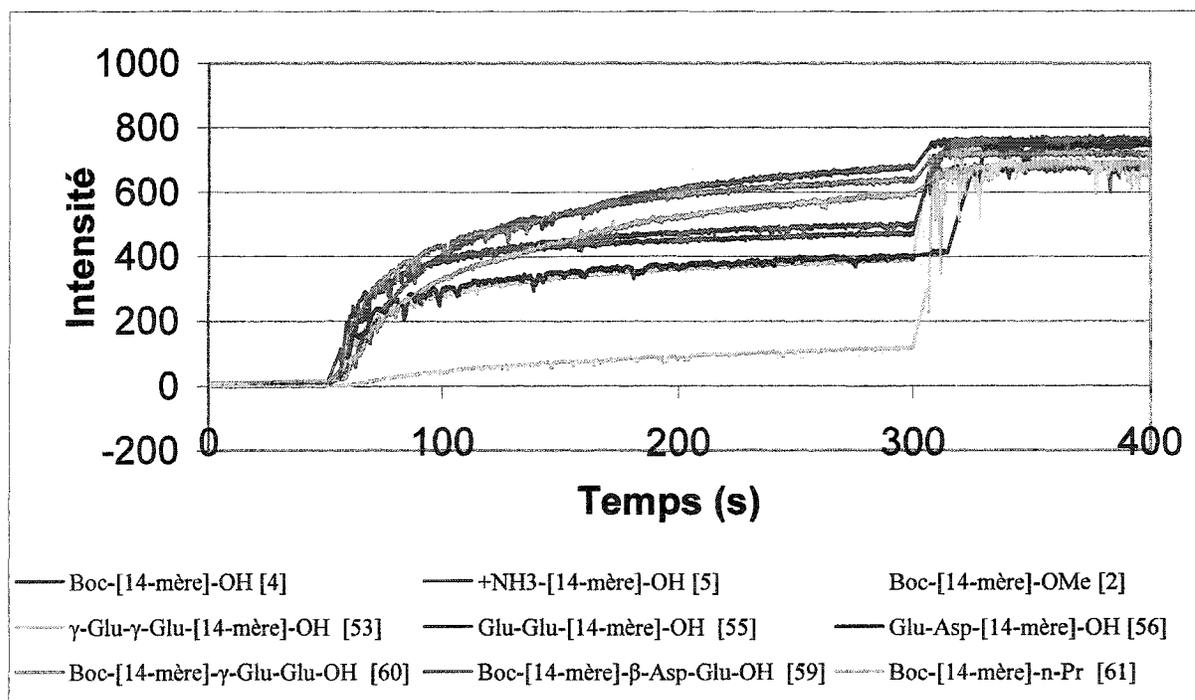
γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu-Asp-14-mère-OH 51 γ -Glu- γ -Glu-Asp-Glu-14-mère-OH 52

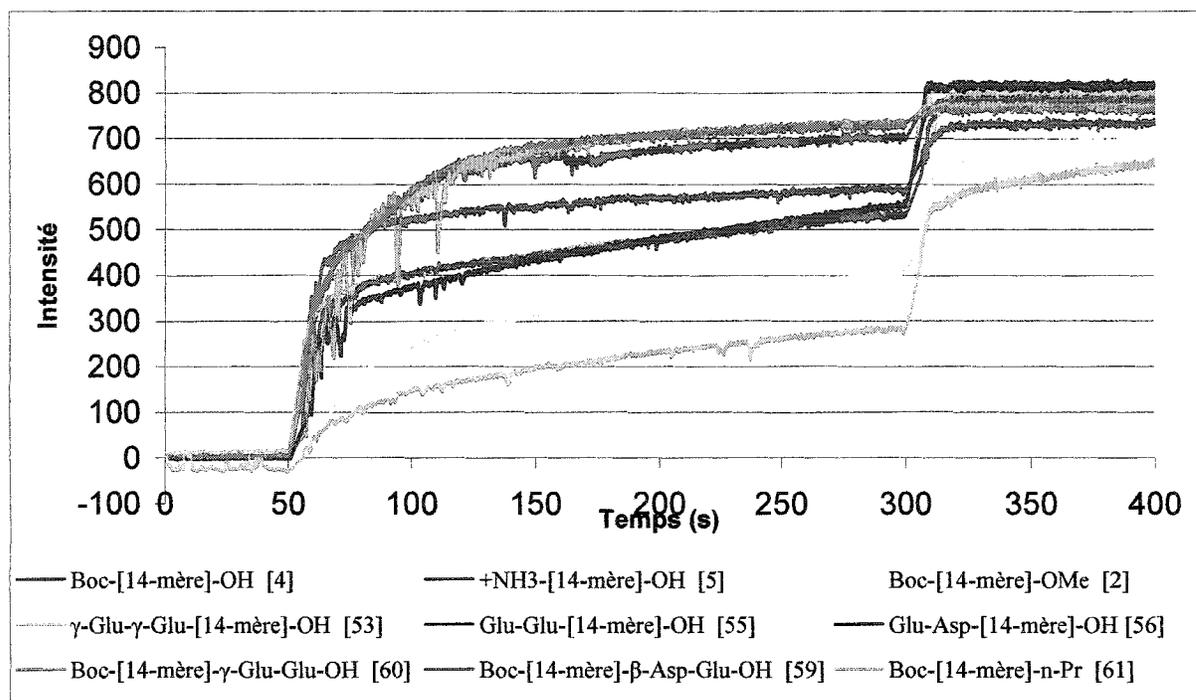
Glu-Asp-14-mère-OH 56

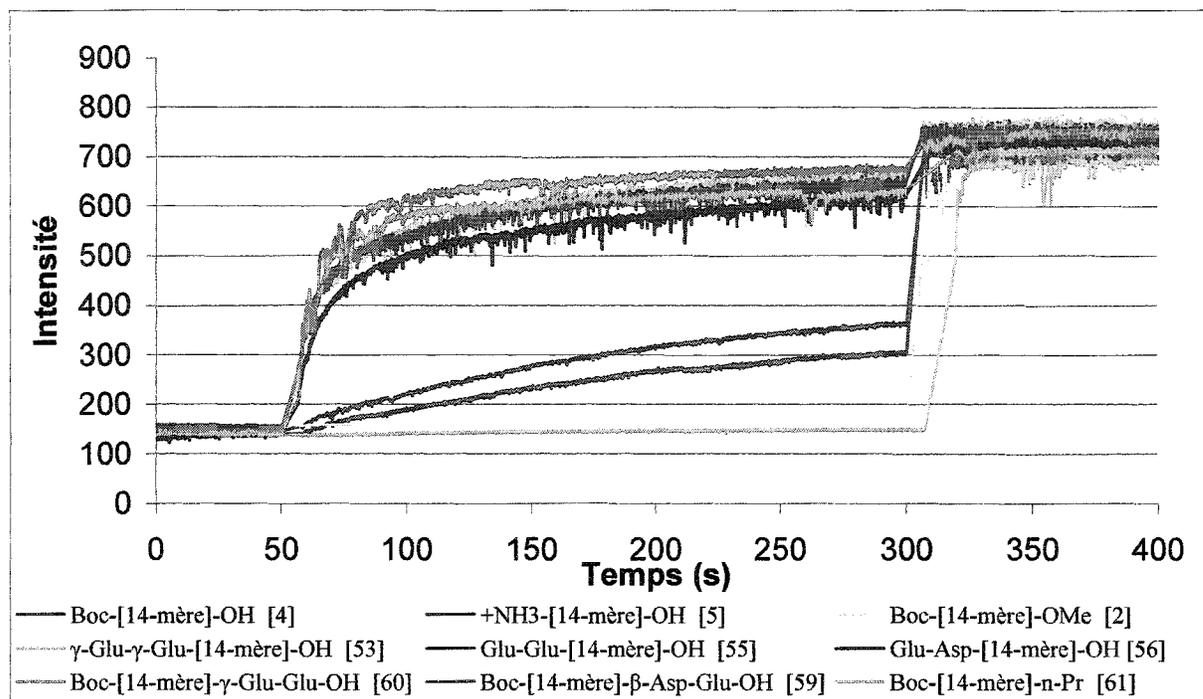
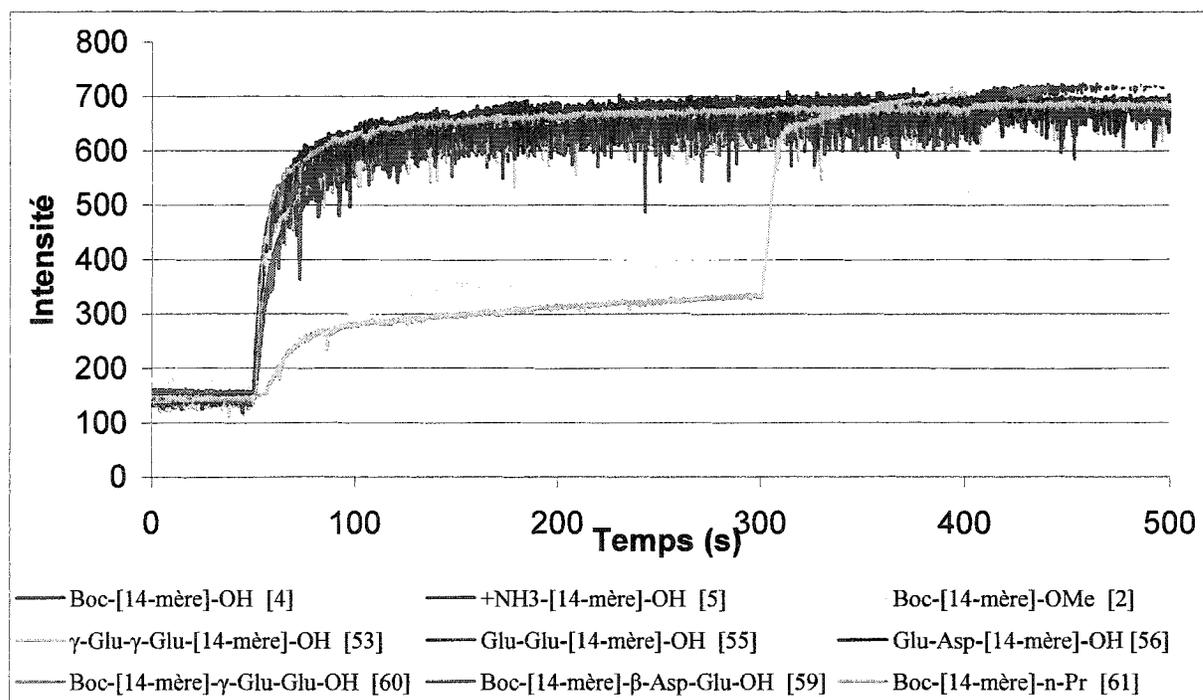
Data File: MS04.P110.D

ANNEXE 3

Activité lytique

DOPC :Chol (70 :30)**Intensité de la fluorescence en fonction du temps à 0,72 μ M de peptide****Intensité de la fluorescence en fonction du temps à 1,25 μ M de peptide**

Intensité de la fluorescence en fonction du temps à 12,5 μ M de peptide

DMPC : DMPG (50 :50)**Intensité de la fluorescence en fonction du temps à 1,25 μ M de peptide****Intensité de la fluorescence en fonction du temps à 12,5 μ M de peptide**

RÉFÉRENCES

-
- 1 D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, seconde édition, Jonh Wiley and Sons inc., **1995**, 1360 pages
 - 2 G. Kiss, H. Michl, *Über das Giftsekret der Gelbbauchunke Bombina variegata L. Toxicom*, (Oxford) **1962**, 1, 33-39
 - 3 <http://www.bbcm.iniv.trieste.it>
 - 4 P. Bulet, R. Stocklin, L. Menin, *Immunological Reviews*, **2004**, 198, 169-184
 - 5 Y. Shai, *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1462, 55-70 ; b) R.M. Epand, H.J. Vogel. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1462, 11-28.
 - 6 I. Cornut., E. Thiaudière, & J Dufourcq, *The Amphipatic Helix*, **1994**, Epand R.M., ed., CRC Press, Boca Raton, pp. 173-219
 - 7 a) M. Dathe, H. Nikolenko, J. Meyer, M. Beyermann, M. Bienert, *FEBS Letters*, **2001**, 501, 146-150 b) M. Dathe, M. Schümann, T. Wieprech, A. Winkler, M. Beyermann, E. Krause, K. Matsuzaki, O. Murase, M. Bienert, *Biochemistry*, **1996**, 35, 12612-12622 c) M. Sharon, Z. Oren, Y. Shai, J. Anglister, *Biochemistry*, **1999**, 38, 15305-15316 d) T. Tachi, R.F. Epand, R.M. Epand, K. Matsuzaki, *Biochemistry*, **2002**, 41, 10723-10731
 - 8 T. C. Terwilleger, D. Eisenberg, *J. Biol. Chem.*, **1982**, 257, 6010-6015
 - 9 C. E. Dempsey, *Biochim. Biophys. Acta*, **1990**, 1031, 143-161
 - 10 J.F. Fennel, W.H. Shipman, L. Cole, *J. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1968**, 127, 707-710
 - 11 H. Steiner, D. Hultmark, A. Engstrom, H. Bennich, H. Boman, *Nature*, **1981**, 292, 246-248
 - 12 D. Wade, A. Boman, W. Wahlin, C.M. Drain, D. Andreu, H.G. Boman, R.B. Merrifield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, 87, 4761-4765
 - 13 a) E. Schroder, K. Lubke, M. Lehmann, I. Beetz, *Experientia*, **1971**, 27, 764-765
b) C.R. Dawson, A.F. Drake, J. Helliwell, R.C. Hider, *Biochim. Biophys. Acta*, **1978**, 510, 75-86
 - 14 S.E. Blondelle, R.A. Houghten, *Biochemistry*, **1991**, 30, 4671-4678

-
- 15 a) H.G. Boman, D. Hultmark, *Ann. Rev. Microbiol.*, **1987**, 41, 103-126 b) J.-Y. Lee, I.A. Boman, C. Sun, M. Anderson, H. Jornwall, V. Mutt, H.G. Boman, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1989**, 86, 9159-9162
- 16 D. Hultmark, A. Engstrom, H. Bennich, R. Kapur, H.G. Boman, *Eur. J. Biochem.*, **1982**, 127, 207-217
- 17 H.G. Boman, D. Wade, I.A. Boman, B. Wahlin, R.B. Merrifield, *FEBS Lett.*, **1989**, 259, 103-106
- 18 H. Steiner, *FEBS Lett.*, **1982**, 137, 283-287
- 19 H. Steiner, D. Andreu, R.B. Merrifield, *Biochim. Biophys. Acta*, **1988**, 939, 260-266
- 20 S.Y. Shin, K.W. Lee, Y. Kim, J.I. Kim, K.S. Hahm, S.W. Kang, *Proteins and Peptides Letters*, **2002**, 9, 487-493
- 21 M. Zaloff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**, 84, 5449-5453
- 22 a) Y. Aboudy, E. Mendelson, I Shalit, R. Besalle, M. Fridkin, *Int.J. Peptide Protein Res.*, **1994**, 43, 57 b) C.L. Bevins, M. Zasloff, *Annu. Rev. Biochem.*, **1990**, 59, 395 c) H.G. Boman, *Cell*, 65, 205
- 23 R.A. Cruciani, J.L. Baker, M. Zasloff, H. Chen, O. Colomonici, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, 88, 3792
- 24 B. Bechinger, M. Zasloff, S. J. Opella, *Protein Science*, **1993**, 2, 2077-2084
- 25 H.C. Chen, J.H. Brown, J.L. Morell, C.M. Huang, *FEBS Lett.*, **1988**, 236, 462
- 26 M. Dathe, H. Nikolenko, J. Meyer, M. Beyermann, M. Bienert, *FEBS Lett.*, **2001**, 501, 146
- 27 a) D.S. Cafiso, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1994**, 23, 141 b) M.S. Sansom, *Eur. Biophys. J.*, **1993**, 22, 105
- 28 R.O. Jr. Fox, F.M. Richards, *Nature*, **1982**, 300, 325-330
- 29 P. Mueller., D. O. Rudin, *Nature*, **1968**, 217, 713-719
- 30 W.-C. Jen, G.A. Jones, D. Brewer, V.O. Parkinson, A. Taylor, *J. Appl. Bacteriol.*, **1987**, 63, 293-298
- 31 L. Beven, O. Helluin, G. Molle, H. Duclohier, H. Wroblewski, *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1420, 53-63

-
- 32 L. Beven, D. Duval, S. Rebuffat, F.G. Riddell, B. Bodo, H. Wroblewski, *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, 1372, 78-90
- 33 M.G. Zagorski, D.G. Norman, C.J. Barrow, T. Iwashita, K. Tachibana, D.J. Patel, *Biochemistry*, **1991**, 30, 8009-8017
- 34 Z. Oren, Y. Shai, *Eur. J. Biochem.*, **1996**, 237, 303-310
- 35 Y. Shai, *Toxicology*, **1994**, 87, 109-129
- 36 Z. Oren, Y. Shai, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 7305-7308
- 37 a) S. Thennarasu, R. Nagaraj, *Biopolymer*, **1999**, 41, 635-646 b) Y. Shai, D. Bach, A. Yanovski, *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265, 20202
- 38 N. Voyer, *Biotendance*, **2003**, 1, 1-8
- 39 H.M. Chen, W. Wang, D. Smith, S.C. Chan, *Bioch. et Biophysica Acta*, **1997**, 1336, 171-179
- 40 A. Okada, K. Wakamatsu, T. Miyazawa, T. Higashijima. *Biochemistry* **1994**, 33, 9438-9448.
- 41 a) H.G. Boman, D. Wade, I.A. Boman, B. Wihlin, R.B. Merrifield, *FEBS Lett.*, **1989**, 259, 103-106 b) D. Andreu, J. Ubach, A. Boman, B. Wihlin, D. Wade, R.B. Merrifield, H.G. Boman, *FEBS Lett*, **1992**, 296, 190-194 c) D. Wade, D. Andreu, S.A. Mitchell, A.M.V. Silveira, A. Boman, H.G. Boman, R.B. Merrifield, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1992**, 40, 429-436
- 42 S.Y. Shin, S.-H. Lee, S.-T. Yang, E.J. Park, D.G. Lee, M.K. Lee, S.H. Eom, W.K. Song, Y. Kim, K.-S. Hahm, J.I. Kim, *J. Peptides Res.*, **2001**, 58, 504-514
- 43 R.P. Cheng, S.H. Gellman, W.F. Degrado, *Chem. Rev.*, **2001**, 101, 3219-3232
- 44 a) E.A. Porter, X. Wang, H.-S. Lee, B. Weisblum, S.H. Gellman, *Nature*, **2000**, 404, 656 b) E.A. Porter, B. Weisblum, S.H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 7324-7330 c) X. Wang, J.F. Espinosa, S.H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 4821-4822
- 45 J. Dufourcq, S. Castano, I. Cornut, K. Büttner, J.L. Dasseux, *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1416, 1161-1175
- 46 S.F. Lopez, H.-S. Kim, E.C. Choi, M. Delgado, J.R. Granja, A. Khasanov, K. Kraehenbuehl, G. Long, D.A. Weinburger, K.M. Wilcoxon, R. Ghadiri, *Nature*, **2001**, 412, 452-455

-
- 47 a) P.W. Soballe, W.L. Maloy, M.L. Myrnga, L.S. Jacob, M. Herly, *Int. J. Cancer*, **1995**, 60, 280-284 b) S.A. Jonhstone, K. Gelmon, L.D. Mayer, M.B. Bally, *Anti-Cancer Drug Des.*, **2000**, 15, 151-160 c) A.J. Moore, D.A. Devine, M.C. Bibby, *Peptide Research*, **1994**, 7, 265
- 48 M.J. Borgina, G.D. Eytan, Y.G. Assaraf, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 3163-3171
- 49 www.statcan.ca, Statistique Canada 2004
- 50 J.S. Horoszewick, E. Kawinski, G.P. Murphy, *Anticancer Res.*, **1987**, 7, 927-936
- 51 A. Ghosh, W.D.W.Heston, *J. Cell. Biochem.*, **2004**, 91, 528-539
- 52 N.D. Rawling, A.J. Barret, *Biochim. Biophys. Acta*, **1997**, 1339, 247-252
- 53 J.T. Pinto, B.P. Suffoletto, T.M. Berzin, *Clin. Cancer Res.*, **1996**, 2, 1445-1451
- 54 R.E. Carter, A.R. Feldman, J.T. Coyle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, 93, 749-753
- 55 J.T. Pinto, D.W.D. Heston, *Prostate*, **1999**, 1, 15-26
- 56 R.S. Israeli, C.T. Powell, J.G. Corr, W.R. Fair, W.D.W. Heston, *Cancer Res.*, **1994**, 54, 1807
- 57 D.A. Silver, I. Pellicer, M. Blute, *Clin. Cancer Res.*, **1997**, 3, 81-85
- 58 H. Liu, P. Moy, S. Kim, *Cancer Res.*, **1997**, 57, 3629-3634
- 59 R. Besalle, H. Haas, A. Gorla, I. Shalit, M. Fridhin, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1992**, 36, 313-317
- 60 H.-C. Chen, H.G. Brown, J.L. Morell, C.M. Huang, *FEBS Lett.*, **1988**, 236, 462-466
- 61 E. Grazit, A. Boman, H.G. Boman, Y. Shai, *Biochemistry*, **1995**, 34, 11479-11488
- 62 W.L. Maloy, U.P. Kari, *Biopolymers*, **1995**, 37, 105-122
- 63 R.M. Epand, Y. Shai, J.P. Segrest, G.M. Anantharamaiah, *Biopolymers*, **1995**, 37, 317-338
- 64 N. Sitaram, C. Subbalakshmi, R. Nagaraj, *Int. J. Pept. Proteins*, **1995**, 46, 166-173
- 65 a) E. Biron, *Thèse de Doctorat*, **2002** b) Y.R. Vandenburg, B.D. Smith, E. Biron, N. Voyer, *Chem. Comm.*, **2002**, 16, 1694-1695 c) N. Voyer, M. Robitaille. *J. Am.*

-
- Chem. Soc.* **1995**, 117, 6599-6600 d) J.-C. Meillon, N. Voyer. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 967-969 e) N. Voyer, L. Potvin, E. Rousseau. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1997**, 1469-1471
- 66 D.M. Engleman, T.A. Steitz, A. Goldman, *Annu. Rev. Biophys. Chem.*, **1986**, 15, 321-336.
- 67 P.Y. Chou, G.D. Fasman, *Annu. Rev. Biochem.*, **1978**, 47, 251-276
- 68 a) S. Castano, I. Cornut, K. Büttner, J.L. Dasseux, J. Dufourcq. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1416, 161-175 b) T.A. Harroun, W.T. Heller, T.M. Weiss, L. Yang, H.W. Huang. *Biophys. J.*, **1999**, 76, 937-945
- 69 a) N.F. Curtis, *J. Chem. Soc.* **1960**, 4409-4415 b) E. Weber, F. Vögtel. *Top. Curr. Chem.* **1981**, 98, 1-7.
- 70 R.B. Merrifield. *Peptides : Synthesis, Structure and Applications*, Academic Press, New York, **1995**, chap. 3
- 71 W.F. DeGrado, E.T. Kaiser, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 1295-1300 ; *ibid.* **1982**, 47, 3258-3260
- 72 J.M. Stewart, J.D. Young. *Solid Phase Synthesis*, Pierce Chemical Compagny, **1984**, 305 pages
- 73 H. Benz, *Synthesis* **1994**, 4, 337-358
- 74 N. Sewald, H.-D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, **2002**, Wiley-Vch, 562 pages
- 75 T.H. Black, *Aldrichimica*, **1983**, 16, 3
- 76 W.H. Scouten. *Solid Phase Biochemistry : Analytical and Synthetic Aspects*. John Wiley and Sons, New York, **1983**
- 77 Y.R. Vanderburg, B.D. Smith, E. Biron, N. Voyer, *J. Chem. Soc. Chem. Com.*, **2002**, 16, 1694-1695
- 78 C. Leuschner, W. Hansel, *Current Pharmaceutical Design*, **2004**, 10, 2299-2310
- 79 T. Utsugi, A.J. Schroit, J. Connor, C.D. Bucana, I.J. Fidler, *Cancer Res.*, **1991**, 51, 3062-3066
- 80 a) J.E. Rothman, J. Leonard, *Science*, **1995**, 195, 743-753 b) J.A.F. OP Dem Kamp, *Ann. Rev. Biochem.*, **1979**, 48, 47-71

-
- 81 C. Whitehouse, G. Gidalevidz, M. Cahuzac, R.E. Koeppe, A. Nelson, *Langmuir*, **2004**, 20, 9291-9298
- 82 J.Y. Legendre, F.C. Szoka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 893-897
- 83 a) S.Castano, I. Cornut, K. Büttner, J.L. Dasseux, J. Dufourcq. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1416, 161-175 b) T.A. Harroun, W.T. Heller, T.M. Weiss, L. Yang, H.W. Huang. *Biophys. J.* **1999**, 76, 937-945
- 84 A.G. Walton, *Polypeptides and Proteins Structure*, Elsevier, New York, **1981**
- 85 N. Voyer., *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 1818-1821
- 86 R. Bessalle, A. Kapitkovsky, A. Gorea, I. Shalit, M. Fridkin. *FEBS Lett.* **1990**, 274, 151-155
- 87 A. Pichette, N. Voyer, R. Larouche, J.-C. Meillon, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 1279-1282
- 88 a) H. Benz, *Synthesis*, **1994**, 4, 337-358 b) G. Ösapray, J.W. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 6046-6051 c) H. Mihara, J. . hmielewski, . . aiser, *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 2209-2215

-
- Chem. Soc.* **1995**, 117, 6599-6600 d) J.-C. Meillon, N. Voyer. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 967-969 e) N. Voyer, L. Potvin, E. Rousseau. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1997**, 1469-1471
- 66 D.M. Engleman, T.A. Steitz, A. Goldman, *Annu. Rev. Biophys. Chem.*, **1986**, 15, 321-336.
- 67 P.Y. Chou, G.D. Fasman, *Annu. Rev. Biochem.*, **1978**, 47, 251-276
- 68 a) S. Castano, I. Cornut, K. Büttner, J.L. Dasseux, J. Dufourcq. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1416, 161-175 b) T.A. Harroun, W.T. Heller, T.M. Weiss, L. Yang, H.W. Huang. *Biophys. J.*, **1999**, 76, 937-945
- 69 a) N.F. Curtis, *J. Chem. Soc.* **1960**, 4409-4415 b) E. Weber, F. Vögtel. *Top. Curr. Chem.* **1981**, 98, 1-7.
- 70 R.B. Merrifield. *Peptides : Synthesis, Structure and Applications*, Academic Press, New York, **1995**, chap. 3
- 71 W.F. DeGrado, E.T. Kaiser, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 1295-1300 ; *ibid.* **1982**, 47, 3258-3260
- 72 J.M. Stewart, J.D. Young. *Solid Phase Synthesis*, Pierce Chemical Compagny, **1984**, 305 pages
- 73 H. Benz, *Synthesis* **1994**, 4, 337-358
- 74 N. Sewald, H.-D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, **2002**, Wiley-Vch, 562 pages
- 75 T.H. Black, *Aldrichimica*, **1983**, 16, 3
- 76 W.H. Scouten. *Solid Phase Biochemistry : Analytical and Synthetic Aspects*. John Wiley and Sons, New York, **1983**
- 77 Y.R. Vanderburg, B.D. Smith, E. Biron, N. Voyer, *J. Chem. Soc. Chem. Com.*, **2002**, 16, 1694-1695
- 78 C. Leuschner, W. Hansel, *Current Pharmaceutical Design*, **2004**, 10, 2299-2310
- 79 T. Utsugi, A.J. Schroit, J. Connor, C.D. Bucana, I.J. Fidler, *Cancer Res.*, **1991**, 51, 3062-3066
- 80 a) J.E. Rothman, J. Leonard, *Science*, **1995**, 195, 743-753 b) J.A.F. OP Dem Kamp, *Ann. Rev. Biochem.*, **1979**, 48, 47-71

-
- 81 C. Whitehouse, G. Gidalevidz, M. Cahuzac, R.E. Koeppe, A. Nelson, *Langmuir*, **2004**, 20, 9291-9298
- 82 J.Y. Legendre, F.C. Szoka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 893-897
- 83 a) S.Castano, I. Cornut, K. Büttner, J.L. Dasseux, J. Dufourcq. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1416, 161-175 b) T.A. Harroun, W.T. Heller, T.M. Weiss, L. Yang, H.W. Huang. *Biophys. J.* **1999**, 76, 937-945
- 84 A.G. Walton, *Polypeptides and Proteins Structure*, Elsevier, New York, **1981**
- 85 N. Voyer., *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 1818-1821
- 86 R. Bessalle, A. Kapitkovsky, A. Gorea, I. Shalit, M. Fridkin. *FEBS Lett.* **1990**, 274, 151-155
- 87 A. Pichette, N. Voyer, R. Larouche, J.-C. Meillon, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 1279-1282
- 88 a) H. Benz, *Synthesis*, **1994**, 4, 337-358 b) G. Ösapray, J.W. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 6046-6051 c) H. Mihara, J. . hmielewski, . . aiser, *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 2209-2215