

Université de Montréal

Synthèse et analyse conformationnelle d'analogues de la Gramicidine S
comportant des acides aminés indolizidinone.

par

Simon Roy

Département de chimie

Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.)
en chimie

Décembre 2000

© Simon Roy, 2000



QD

3

U54

2001

N.024

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

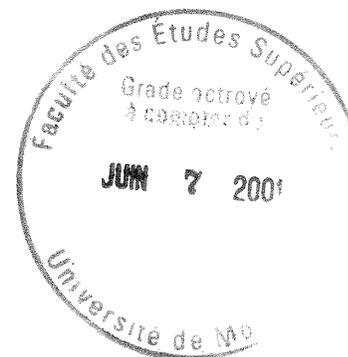
Synthèse et analyse conformationnelle d'analogues de la Gramicidine S
comportant des acides aminés indolizidinone.

présenté par:

Simon Roy

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

André Charette	président-rapporteur
William Lubell	directeur de recherche
Joelle Pelletier	membre du jury



Mémoire accepté le: _____

Sommaire.

Les peptides antibiotiques possèdent des structures variées et certains d'entre eux sont des composants clés dans le système immunitaire inné. La plupart agissent par un mécanisme de perturbation des membranes cellulaires, provoquant une augmentation de leur perméabilité et leur effondrement. La gramicidine S (GS) est un décapeptide cyclique agissant de la sorte. Beaucoup d'études portant sur sa structure et son action ainsi que la synthèse de nombreux analogues ont apporté une plus grande compréhension de son mécanisme d'action sans toutefois l'élucider complètement. Le point majeur ressortant de ces études est que sa charge positive et sa structure de feuillet β délimité par deux tours β de type II' doivent être conservées si l'on veut avoir un analogue actif. C'est ce dernier élément qui a fait de la gramicidine S un système permettant d'évaluer le potentiel d'un peptidomimétique à stabiliser un tour β de type II'. Nous avons synthétisé des analogues de la gramicidine S incorporant des acides aminés indolizidinone, afin de déterminer leur potentiel à stabiliser un tour β de type II' et leur effet sur l'activité biologique et hémolytique de la GS. Ces résultats peuvent aussi mener à une meilleure compréhension de la relation structure-activité de la GS.

Deux méthodes de synthèse sur support solide ont été essayées pour obtenir des analogues de la GS. La première faisait appel à l'ancrage de la chaîne latérale de la lysine sur la résine de Wang. Le peptide linéaire était ensuite préparé et cyclisé sur le support solide pour être finalement clivé et purifié. Cette méthode s'est avérée inefficace dans l'obtention du peptide cyclique. La deuxième méthode, qui nous a permis d'obtenir les analogues voulus, impliquait la synthèse du peptide linéaire sur la résine d'oxime de Kaiser et sa cyclisation avec clivage simultané par aminolyse intramoléculaire.

Les résultats de l'analyse conformationnelle faisant appel aux techniques de dichroïsme circulaire et de RMN 2D ainsi que de l'activité biologique de nos analogues nous ont amené à conclure que le diastéréoisomère 6*S* des acides aminés indolizidinone stabilise plus efficacement un tour β de type II' que le diastéréoisomère 6*R*. L'activité hémolytique de nos analogues a été diminuée en raison de l'absence des chaînes latérales

hydrophobes de la D-phénylalanine de la GS et non en raison de leur structure tridimensionnelle.

Table des matières.

Sommaire.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des sigles et des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xv
Chapitre I: Introduction.....	1
1.1 Peptides Antibiotiques.....	2
1.1.1 Classes.....	2
1.1.2 Mécanismes d'action.....	9
1.2 Gramicidine S.....	10
1.2.1 Découverte et utilisation.....	10
1.2.2 Structure.....	10
1.2.3 Activité et analogues clés.....	12
1.2.4 Mécanisme d'action.....	16
1.3 Analogues de la gramicidine S restreints conformationnellement.....	19
1.3.1 Tours β	19
1.3.2 Mimétismes de tour β	20
1.3.3 Mimétismes de tour β incorporés dans la gramicidine S.....	21
1.4 Gramicidine S incorporant des acides aminés indolizidinone.....	25
1.5 Références du chapitre 1.....	30

Chapitre II: Préambule à la synthèse de peptides.	37
2.1 Synthèse de peptides sur phase solide (SPPS).	38
2.2 Synthèse en solution d'acides aminés protégés pour la SPPS.	41
2.2.1 Synthèse des acides aminés indolizidinone (IAA).	41
2.2.2 Synthèse du chlorhydrate de l'ester allylique de la <i>N</i> - α -Fmoc-L-Lys.	44
2.3 Références du chapitre II.	45
Chapitre III: Synthèse d'analogues de la gramicidine S sur la résine de Wang.	47
3.1 Synthèse de peptides par cyclisation sur la résine de Wang.	48
3.2 Synthèse sur support solide.	50
3.2.1 Ancrage de la lysine sur la résine de Wang.	50
3.2.2 Synthèse de peptides sur la résine de Wang.	52
3.2.3 Investigation de la stratégie de synthèse de peptides sur la résine de Wang.	54
3.3 Références du chapitre III.	58
Chapitre IV: Synthèse d'analogues de la gramicidine S sur la résine d'oxime.	60
4.1 Synthèse de peptides par cyclisation sur la résine d'oxime.	61
4.2 Synthèse d'analogues de la GS incorporant des IAA.	63
4.2.1 Ancrage de la leucine sur la résine d'oxime.	63
4.2.2 Synthèse de peptides sur la résine d'oxime.	64
4.3 Références du chapitre IV.	68

Chapitre V: Analyse conformationnelle.	69
5.1 Dichroïsme circulaire.	70
5.2 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire.	72
5.2.1 Assignation des résonances RMN.	72
5.2.2 Assignation séquentielle.	74
5.2.3 Assignation non-séquentielle.	78
5.2.4 Coefficients de température.	83
5.2.5 Couplages spin-spin $^3J_{\text{NH-C}\alpha\text{H}}$	85
5.3 Comparaison des analogues.	86
5.4 Références du chapitre V.	87
Chapitre VI: Conclusion.	88
Chapitre VII: Partie expérimentale.	92
7.1 Section générale.	93
7.2 Protocoles de synthèse.	94
Acide (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-2-oxo-3-[<i>N</i> -(Boc)amino]-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylique (65):	94
Chlorhydrate de l'acide (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-2-oxo-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9- carboxylique (66):	95
Acide (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-2-oxo-3-[<i>N</i> -(Fmoc)amino]-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylique (67):	95
Ester allylique de la <i>N</i> - α -Fmoc- <i>N</i> - ϵ -Boc-L-Lys (69):	96
Chlorhydrate de l'ester allylique de la <i>N</i> - α -Fmoc-L-Lys (70):	97
Résine de Wang <i>p</i> -nitrophényle carbonate (73):	97
Ester allylique de la <i>N</i> - α -Fmoc-L-Lys ω -Wang carbamate (74):	97
Protocole général pour l'obtention du peptide linéaire sur résine de Wang Fmoc-Leu-IAA(6 <i>S</i>)-Val-Lys(Boc)-Leu-IAA(6 <i>S</i>)-Val-Lys(OAl)-Wang (75):	98

Fmoc-IAA(6 <i>S</i>)-Val-Lys(OAl):	99
Fmoc-Leu-IAA(6 <i>S</i>)-Val-Lys-Leu-IAA(6 <i>S</i>)-Val-Lys-OAl (76):	99
Fmoc-Leu-IAA(6 <i>S</i>)-Val-Lys-Leu-IAA(6 <i>S</i>)-Val-Lys (78):	99
Leu-IAA(6 <i>S</i>)-Val-Lys-Leu-IAA(6 <i>S</i>)-Val-Lys (80):	100
Essai d'obtention de Cyclo(Val-Lys-Leu-IAA(6 <i>S</i>)) ₂ (55) en utilisant Pd ₂ Cl ₂ (PPh ₃) ₂ et Bu ₃ SnH.	100
Fmoc-Leu-IAA(6 <i>S</i>)-Val-Lys-Leu-IAA(6 <i>S</i>)-Val-Lys (78):	101
Essai d'obtention de Cyclo(Val-Lys-Leu-IAA(6 <i>S</i>)) ₂ (55) en utilisant Pd(PPh ₃) ₄ et la morpholine:	101
Résine Boc-Leu-oxime (83):	102
Préparation de Boc-Leu-NH-Pr (84):	
Détermination de la substitution de la résine Boc-Leu-oxime (83)	102
Acétylation de la résine Boc-Leu-oxime (83):	102
Protocole général pour l'obtention des peptides linéaires sur résine d'oxime (85 et 86):	103
Cyclo(Val-Lys(Z)-Leu-IAA(6 <i>S</i>)) ₂ (87):	103
Cyclo(Val-Orn(Z)-Leu-IAA(6 <i>R</i>)) ₂ (88):	104
Cyclo(Val-Lys-Leu-IAA(6 <i>S</i>)) ₂ (55):	105
Cyclo(Val-Orn-Leu-IAA(6 <i>R</i>)) ₂ (56):	105
Spectre de cyclo(Val-Orn-Leu-IAA(6 <i>S</i>)) ₂ (51):	106
 7.3 Références de la partie expérimentale.	 107
 Glossaire.	 108
 Annexe 1: Activité biologique et hémolytique.	 xv
 Annexe 2: Spectres et chromatogrammes.	 xviii

Liste des tableaux.

Tableau I: Séquences de peptides antibiotiques riches en certains acides aminés.	6
Tableau II: Analogues de la gramicidine S et leurs activités biologiques.	13
Tableau III: Analogues de la GS comportant 12 et 14 résidus.	15
Tableau IV: Activités hémolytiques des analogues de la GS comportant 12 et 14 résidus.....	15
Tableau V: Activités biologiques de la GS et [BTD ^{4-5,4'-5'}]GS (47).....	21
Tableau VI: Activités biologiques de la GS et [BZD ⁴⁻⁵]GS (49).	23
Tableau VII: Activités biologiques de la GS, [IBTM(11bR) ⁴⁻⁵]GS, [Lys ^{2,2'} , IBTM(11bS) ⁴⁻⁵]GS et [Lys ^{2,2'} , IBTM (11bR) ⁴⁻⁵]GS.....	24
Tableau VIII: Activités biologiques de la GS et [IAA(6S) ^{4-5,4'-5'}]GS (51).	26
Tableau IX: Activités hémolytiques de la GS et [IAA(6S) ^{4-5,4'-5'}]GS (51).....	26
Tableau X: Peptides synthétisés par la stratégie d'ancrage de la lysine ou de l'ornithine par sa chaîne latérale et rendements obtenus.	49
Tableau XI: Protocole utilisé pour le couplage des acides <i>N</i> -(Fmoc)aminés.	52
Tableau XII: Masses et temps de rétention (<i>t_R</i>) obtenus des séquences de réactions.	55
Tableau XIII: Peptides cycliques synthétisés sur résine d'oxime et rendements obtenus.....	62
Tableau XIV: Protocole utilisé pour le couplage des acides <i>N</i> -(Boc)aminés.....	64
Tableau XV: Intensité des connectivités nOe séquentielles de chaque acide aminé des analogues de la Gramicidine S.....	75
Tableau XVI: Connectivités nOe non-séquentielles pour [IAA(6S) ^{4-5,4'-5'}]GS (51).....	78
Tableau XVII: Connectivités nOe non-séquentielles pour [Lys ^{2,2'} , IAA(6S) ^{4-5,4'-5'}]GS (55)...	80
Tableau XVIII: Connectivités nOe non-séquentielles pour [IAA(6R) ^{4-5,4'-5'}]GS (56).	82
Tableau XIX: Coefficients de température des protons amide ($\Delta\delta/\Delta T$, ppm 10 ³ /K) de GS, [Lys ^{2,2'} , IAA(6S) ^{4-5,4'-5'}]GS (55), [IAA(6R) ^{4-5,4'-5'}]GS (56) et [IBTM(11bR) ⁴⁻⁵]GS.....	84
Tableau XX: Constantes de couplage des protons amide des analogues de la gramicidine S (³ <i>J</i> _{NH-CαH} , Hz).....	85
Tableau XXI: Activité biologique de la GS, des analogues [IAA(6S) ^{4-5,4'-5'}]GS (51), [Lys ^{2,2'} , IAA(6S) ^{4-5,4'-5'}]GS (55) et [IAA(6R) ^{4-5,4'-5'}]GS (56).....	xvi
Tableau XXII: Activité hémolytique de la GS, des analogues [IAA(6S) ^{4-5,4'-5'}]GS (51), [Lys ^{2,2'} , IAA(6S) ^{4-5,4'-5'}]GS (55) et [IAA(6R) ^{4-5,4'-5'}]GS (56).....	xvii

Liste des figures.

Figure 1: Magainine 2 (1).....	3
Figure 2: Défensine d'insecte (<i>Phormia</i>) (2).....	4
Figure 3: Thanatine (3) et protégrine 1 (4).....	5
Figure 4: Tritrpticine (6).....	6
Figure 5: Séquence primaire de la nisine.....	7
Figure 6: Gramicidine A (14) et S (15).....	8
Figure 7: Structure tridimensionnelle de la gramicidine S (15).....	11
Figure 8: Modèle de l'interaction entre la GS et les membranes de phospholipides.....	16
Figure 9: Résidus et angles dièdres de tours γ et β	19
Figure 10: Exemples de mimétismes de tour β	20
Figure 11: Analogue de LH-RH incorporant le lactame de Freidinger.....	20
Figure 12: Analogue de la gramicidine S [BTD ^{4-5,4'-5'}]GS (47).....	21
Figure 13: Analogues de la gramicidine S [Lys ^{2,2'} , BTD ⁴⁻⁵]GS (48) et [BZD ⁴⁻⁵]GS (49).....	22
Figure 14: Analogue de la gramicidine S [IBTM ⁴⁻⁵]GS (50).....	24
Figure 15: Analogue de la GS [IAA(6S) ^{4-5,4'-5'}]GS (51).....	25
Figure 16: Valeurs des angles dièdres ψ_2 et ϕ_3 des acides aminés indolizidinone obtenues par rayons X et modélisation moléculaire.....	27
Figure 17: Analogues de la GS [IAA(6S) ^{4-5,4'-5'}]GS (51), [Lys ^{2,2'} , IAA(6S) ^{4-5,4'-5'}]GS (55) et [IAA(6R) ^{4-5,4'-5'}]GS (56).....	28
Figure 18: Synthèse d'un dipeptide sur résine de Wang.....	38
Figure 19: Formes activées des acides aminés représentatives.....	39
Figure 20: Agents de couplage représentatifs.....	39
Figure 21: Synthèse du 4-carbométhoxy-5-oxo-2,8-bis[<i>N</i> -(PhF)amino]azélate de diméthyle (60).....	41
Figure 22: Synthèse du 5-oxo-2,8-bis[<i>N</i> -(PhF)amino]azélate de diméthyle (62).....	42
Figure 23: Synthèse des (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- et (3 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>S</i>)-2-oxo-3-[<i>N</i> -(Boc)amino]-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate de méthyle (64).....	42
Figure 24: Synthèse de l'acide (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-2-oxo-3-[<i>N</i> -(Fmoc)-amino]-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylique (67).....	43

Figure 25: Synthèse du chlorhydrate de l'ester allylique de la <i>N</i> - α -Fmoc-L-Lys (70).....	44
Figure 26: Peptidomimétique IBTM (71) a) et analogue [IBTM ^{4,5}]GS (50) b).	49
Figure 27: Synthèse et spectres photoacoustiques des résines 72-74	50
Figure 28: Protocole de la synthèse sur support solide de cyclo(Val-Lys-Leu-IAA(6 <i>S</i>)) ₂ (55).	53
Figure 29: Exploration des conditions de clivage, déprotection et cyclisation de (75).	55
Figure 30: Synthèse et cyclisation d'un peptide sur la résine d'oxime.	61
Figure 31: Ancrage de la leucine et détermination de la substitution de la résine.	63
Figure 32: Synthèse d'analogues de la GS par cyclisation sur la résine d'oxime.	65
Figure 33: Chromatogrammes de [Lys ^{2,2'} , IAA(6 <i>S</i>) ^{4-5,4'-5'}]GS (55) et [IAA(6 <i>R</i>) ^{4-5,4'-5'}]GS (56) obtenus après purification.	66
Figure 34: Spectres de dichroïsme circulaire dans l'eau et le méthanol de la GS et ses analogues.	70
Figure 35: Assignement des signaux de valine dans le spectre TOCSY de [IAA(6 <i>R</i>) ^{4-5,4'-5'}]GS (56).....	72
Figure 36: Assignement des signaux de leucine dans le spectre COSY de [IAA(6 <i>R</i>) ^{4-5,4'-5'}]GS (56).....	73
Figure 37: Connectivités nOe séquentielles d'un segment polypeptidique.	74
Figure 38: Connectivités nOe séquentielles des analogues 51 , 55 et 56	75
Figure 39: Connectivités nOe séquentielles ($d_{\alpha N}$ et d_{NN}) de [IAA(6 <i>S</i>) ^{4-5,4'-5'}]GS (51).	76
Figure 40: Connectivités nOe séquentielles ($d_{\alpha N}$ et d_{NN}) de [Lys ^{2,2'} , IAA(6 <i>S</i>) ^{4-5,4'-5'}]GS (55). 76	
Figure 41: Connectivités nOe séquentielles ($d_{\alpha N}$ et d_{NN}) de [IAA(6 <i>R</i>) ^{4-5,4'-5'}]GS (56).....	76
Figure 42: Connectivités nOe non-séquentielles pour [IAA(6 <i>S</i>) ^{4-5,4'-5'}]GS (51).	78
Figure 43: Spectre NOESY de [IAA(6 <i>S</i>) ^{4-5,4'-5'}]GS (51) et assignation des pics croisés.	79
Figure 44: Connectivités nOe non-séquentielles pour [Lys ^{2,2'} , IAA(6 <i>S</i>) ^{4-5,4'-5'}]GS (55).....	80
Figure 45: Spectre NOESY de [Lys ^{2,2'} , IAA(6 <i>S</i>) ^{4-5,4'-5'}]GS (55) et assignation des pics croisés.	81
Figure 46: Connectivités nOe non-séquentielles pour [IAA(6 <i>R</i>) ^{4-5,4'-5'}]GS (56).....	81
Figure 47: Spectre NOESY de [IAA(6 <i>R</i>) ^{4-5,4'-5'}]GS (56) et assignation des pics croisés.	82
Figure 48: Analogues de GS-14 (89) et GS-14K4 (90) incorporant des acides aminés indolizidinone.	91

Liste des sigles et des abréviations.

aa	Acide aminé.
Ac	Acétyle.
Aib	Acide aminoisobutyrique.
Al	Allyle.
AOP	(7-Azabenzotriazol-1-yloxy)tris(diméthylamino)- phosphonium hexafluorophosphate.
Boc	<i>Tert</i> -butyloxycarbonyle.
BOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tris(diméthylamino)- phosphonium hexafluorophosphate.
Bpa	5-Bipyridylalanine.
br	« Broad » (large).
Bzl	Benzyle.
ccm	Chromatographie sur couche mince.
CD	« Circular dichroism » (dichroïsme circulaire).
COSY	Spectroscopie de corrélation.
d	Doublet.
d_{AB}	Distance entre les atomes d'hydrogène A et B des acides aminés de la séquence peptidique dans la direction <i>N</i> vers <i>C</i> .
D	Configuration D (d'un acide aminé).
DCC	1,3-Dicyclohexylcarbodiimide.
DIC	1,3-Diisopropylcarbodiimide.
DIEA	Diisopropyléthylamine.
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholine.
DMSO	Diméthylsulfoxyde.
DSC	« Differential scanning calorimetry » (calorimétrie différentielle à balayage).
EACNO _x	Éthyl-2-(hydroxyimino)-2-cyanoacétate.
EDC	Chlorhydrate de 1-(3-Diméthylaminopropyl)-3- éthylcarbodiimide.

Et	Éthyle.
Fmoc	Fluorényloxycarbonyle.
For	Formyle.
FTIR	Infrarouge à transformée de Fourier.
GS	Gramicidine S.
HATU	<i>N</i> -[(Diméthylamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-Triazolo[4,5- <i>b</i>]-pyridino-1-ylméthylène]- <i>N</i> -méthylméthanaminium hexafluorophosphate <i>N</i> -oxide.
HBTU	<i>N</i> -[(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)(diméthylamino)-méthylène]- <i>N</i> -méthylméthanaminium hexafluorophosphate <i>N</i> -oxide.
Hfv	Hexafluorovaline.
Hnv	δ-Hydroxynorvaline.
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazole.
HOBt	Hydroxybenzotriazole.
HMPA	Hexaméthylphosphoramide.
HMQC	« Heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy ».
HPLC	Chromatographie liquide haute performance.
IAA	Acide aminé indolizidinone.
IBTM	Acide 2(<i>S</i>)-amino-3-oxohexahydroindolizino[8,7- <i>b</i>]-indole-5(<i>S</i>) carboxylique.
m	Multiplet.
MALDI	«Matrix Assisted Laser Desorption Ionization».
MBHA	Résine <i>p</i> -méthylbenzhydrylamine.
MS	Spectre de masse.
NaHMDS	Sodium bis(triméthylsilyle)amide.
nOe	Effet nucléaire Overhauser.
NOESY	Spectroscopie d'effet nucléaire Overhauser.
ORD	« Optical rotatory dispersion » (dispersion optique rotatoire).
Orn	Ornithine.
PA	Photoacoustique.

PhF	9-phénylfluorényle.
Pr	Propyle.
Pya	Pyrénylalanine.
PyAOP	(7-azabenzotriazol-1-yloxy)tris(pyrrolidino) phosphonium hexafluorophosphate.
q	Quadruplet.
RMN 2D	Résonance magnétique nucléaire deux dimensions.
s	Singulet.
SPPS	Synthèse de peptides sur phase solide.
t	Triplet.
t _R	Temps de rétention (HPLC).
TATU	<i>N</i> -[(Diméthylamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-Triazolo[4,5- <i>b</i>]-pyridino-1-ylméthylène]- <i>N</i> -méthylméthanaminium tétrafluoroborate <i>N</i> -oxide.
TBTU	<i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)(diméthylamino)méthylène]- <i>N</i> -méthylméthanaminium tétrafluoroborate <i>N</i> -oxide.
TFA	Acide trifluoroacétique.
TOCSY	Spectroscopie de corrélation totale.
TOF	« Time Of Flight ».
Z	Benzyloxycarbonyle.

Remerciements.

Je me dois en premier lieu d'exprimer ma gratitude envers William Lubell qui m'a permis de faire des études de maîtrise dans son laboratoire. Par son enthousiasme débordant pour la chimie, ses encouragements, son aide et son humour, il a été un très bon guide dans cette aventure.

Je veux ensuite saluer tout le groupe de recherche pour les nombreuses contributions et le support moral. Merci Laurent Bélec pour tes précieux enseignements, merci Éryk Thouin pour les suggestions judicieuses et les composés et merci à Liliane Halab pour tous les renseignements, services et disques. Merci à Éric Beausoleil, Kenza Dairi, Francis Gosselin, Félix Polyak, Jo Van Betsbrügge, Mostafa Hatam, Martin Swarbrick, Dany Rondeau, Jérôme Cluzeau, Lan Wei et Zhe Feng. Votre compagnie a été extraordinaire, je ne vous oublierai pas.

Je tiens aussi à remercier le professeur Jo-Anne Turnbull pour m'avoir permis d'utiliser son spectromètre de dichroïsme circulaire. Je remercie sincèrement Mme Sylvie Bilodeau, le Dr. Tan Phan Viet et M. Robert Mayer pour toute l'aide apportée dans l'acquisition des spectres RMN ainsi que M. Mike Evans et M. Mostafa Harraj du Centre Régional de Spectrométrie de Masse de L'Université de Montréal pour leur bon service. Je suis très reconnaissant envers Mme Susan W. Farmer et le professeur Robert E.W. Hancock pour les analyses antimicrobiennes et hémolytiques de la gramicidine S et de nos analogues. Je remercie chaleureusement Raluca Voicu, Craig Hyett et le professeur Tom Ellis pour les spectres photoacoustiques. Un merci tout particulier au professeur Serge St-Pierre pour m'avoir permis d'utiliser ses HPLC et à Alain Larocque et Karen pour l'aide apportée dans leur utilisation.

Merci à Simon Nadeau et Daniel Perron pour leur coup de main dans la réalisation des figures des chapitres I et V.

Finalement je tiens à remercier les Fonds FCAR pour avoir financé ce projet de maîtrise.

À Mark Lar

Chapitre I: Introduction.

1.1 Peptides Antibiotiques.

Les peptides antibiotiques possèdent des longueurs variées, allant de 2 à plus de 50 acides aminés et se retrouvent dans les bactéries, les champignons, les plantes, les invertébrés, les amphibiens et les mammifères.^{1,2,3} Ils sont des composants clés dans le système immunitaire inné de la plupart des organismes multicellulaires.^{4,5,6,7} Par exemple, chez les mammifères, des peptides antibiotiques se retrouvent dans les phagocytes.⁷ Ceux-ci sont des cellules ayant la propriété d'avaler et de digérer des particules ou cellules étrangères, nuisibles pour le corps.

Avant 1990, seulement une cinquantaine de peptides antibiotiques était connue. Aujourd'hui, on en dénombre plus de cinq cents.⁸ C'est dire à quel point la recherche dans ce domaine s'est accrue dans les dix dernières années.

En plus de leur action antibactérienne, certains peptides antibiotiques présentent aussi des activités antitumorale,^{9,10} antivirale,^{3,9,10} antifongique^{3,10} ou d'inhibition de protéine.¹¹

Ils sont ainsi devenus d'intéressantes cibles pour générer de nouveaux antibiotiques parce qu'ils ont un large spectre d'action et que leurs modes d'action sont différents de ceux des antibiotiques utilisés cliniquement de nos jours. Ces derniers deviennent de moins en moins efficaces en raison d'un nombre accru de souches de bactéries résistantes.¹⁰ Toutefois, ces peptides antibiotiques ont fréquemment une cytotoxicité qui empêche leur usage direct comme médicament. Ce problème a pu être contourné dans certains cas par la synthèse d'analogues.¹²

1.1.1 Classes.

Quand les premiers peptides antibiotiques ont été découverts, une classification par origine avait été adoptée. Toutefois, avec leur nombre grandissant, cette façon de faire s'est avérée inadéquate en grande partie à cause de similitudes entre certains peptides antibiotiques provenant d'espèces très différentes. De nos jours, ils sont classés par

séquence et/ou structure tridimensionnelle. Cette méthode pourrait faciliter le design de meilleurs analogues synthétiques. Voici les classes qui sont les plus souvent rencontrées dans les différentes classifications.^{7,9,13}

1.1.1.1 Peptides antibiotiques en hélice α .

Ce sont les premiers peptides antibiotiques à avoir été identifiés et caractérisés. De ce fait, davantage d'information les concernant se retrouve dans la littérature.^{5,6,14,15} Ces peptides ont des longueurs et des séquences primaires variées, mais ont les caractéristiques communes suivantes: ils sont linéaires et fortement chargés avec une tendance à adopter une conformation d'hélice α et sont amphiphiles.¹⁶ Cette dernière caractéristique vient du fait que les chaînes latérales hydrophobes sont situées d'un côté de l'hélice et les chaînes latérales hydrophiles ou chargées de l'autre côté. Des exemples connus comprennent les dermaseptines,¹⁷ les cécropines¹⁸ et les magainines.¹⁹ La magainine 2 est illustrée dans la Figure 1.

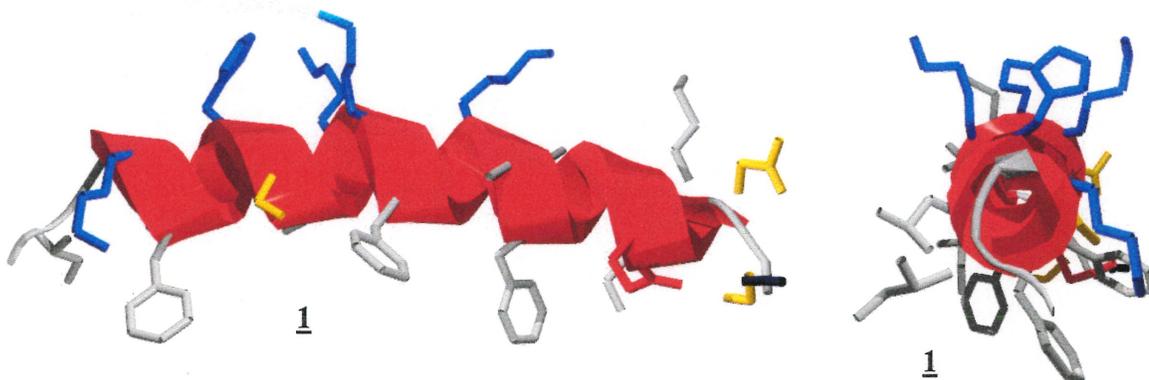


Figure 1: Magainine 2 (1).

Les chaînes latérales hydrophobes sont en gris et les chaînes latérales hydrophiles sont en couleurs.

La magainine 2 a une activité antifongique en plus de son activité antibactérienne (gram-positif et gram-négatif) et antiprotozoaire.¹⁹

1.1.1.2 Peptides antibiotiques riches en cystéine.

Cette classe est à ce jour la plus nombreuse et comporte une grande diversité de structures.²⁰ Les peptides qui en font partie ont toutefois les particularités communes d'avoir environ 40 résidus et d'être chargés positivement. Les cystéines sont impliquées dans des ponts disulfure et maintiennent ainsi la structure tridimensionnelle du peptide. Cette structure peut être formée d'une hélice α et d'un feuillet β antiparallèle qui sont côte à côte reliés par des ponts disulfure, comme dans le cas des défensines d'insectes^{21,22} ou de plantes.^{23,24}

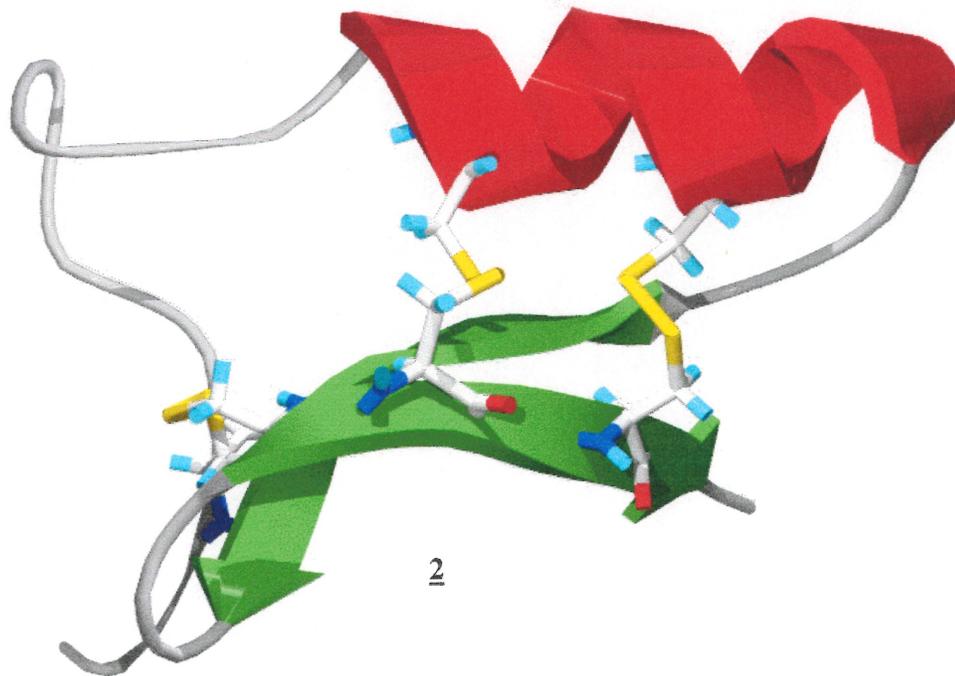


Figure 2: Défensine d'insecte (*Phormia*) (2).

Cette défensine 2 est efficace contre les bactéries gram-positif seulement.²⁰

1.1.1.3 Peptides antibiotiques en feuillet β .

Les peptides de cette classe comportent pour la plupart une vingtaine d'acides aminés et sont tous chargés positivement. Chez ces peptides, la structure commune est celle d'une épingle: un feuillet β antiparallèle formé de deux brins reliés ensemble par des ponts disulfure. On retrouve une telle architecture, par exemple, dans la tachyplésine,²⁵ les protégrines²⁶ et la thanatine.²⁷

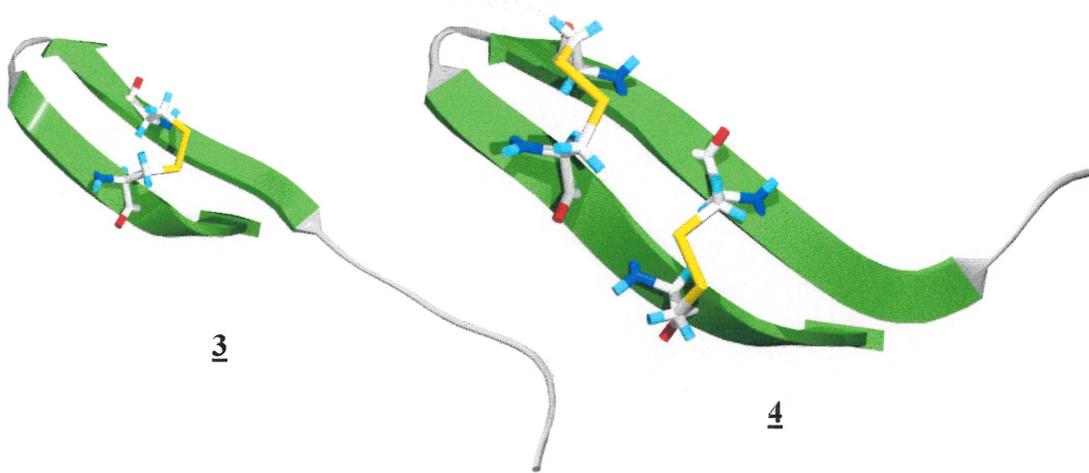


Figure 3: Thanatine (3) et protégrine 1 (4).

La thanatine démontre une activité antifongique en plus de son activité antibactérienne à large spectre.²⁰ La protégrine 1 agit aussi contre certaines bactéries gram-positif, gram-négatif et des champignons.²⁸

1.1.1.4 Peptides antibiotiques avec des compositions inhabituelles en acides aminés naturels.

Les peptides de cette classe ont la particularité d'avoir une forte proportion de certains acides aminés dans leur structure primaire (Tableau I). Ils n'ont pas de structure générale commune, mais sont chargés positivement. Souvent, le nom qui a été attribué à ces peptides reflète leur séquence. L'indolicidine²⁹ et la tritrpticine³⁰ (Figure 4) sont riches en résidus tryptophane. Une structure d'hélice poly-L-proline II a été suggérée pour

l'indolicidine.³¹ L'histatine est riche en histidine.^{32,33,34} Les bacténécines³⁵ (e.g. Bac 5) et certaines cathélicidines sont riches en proline et ont des structures irrégulières. D'autres cathélicidines présentent des hélices α comme CAP-18 qui est riche en lysine³⁶ ou PR-39 qui est riche en proline et en arginine.³⁷

Tableau I: Séquences de peptides antibiotiques riches en certains acides aminés.

PEPTIDE	SÉQUENCE
Indolicidine	ILPWKWPWWP WRR-NH ₂ <u>5</u>
Tritrpticine	VRRFPWWWPF LRR <u>6</u>
Histatine-5	DSHAKRHHGY KRKFHEKHHS HRGY <u>7</u>
Bac 5	RFRPPIRRPP IRPPFYPPFR PPIRPPIFPP IRPPFRPPLG PFP-NH ₂ <u>8</u>
PR-39	RRRPRPPYLP RPRPPFFFP RLPPRIPPGF PPRFPPRFPP-NH ₂ <u>9</u>
CAP-18	GLRKRLRKFR NKIKEKLLKI GQKIQGLLPK LA <u>10</u>

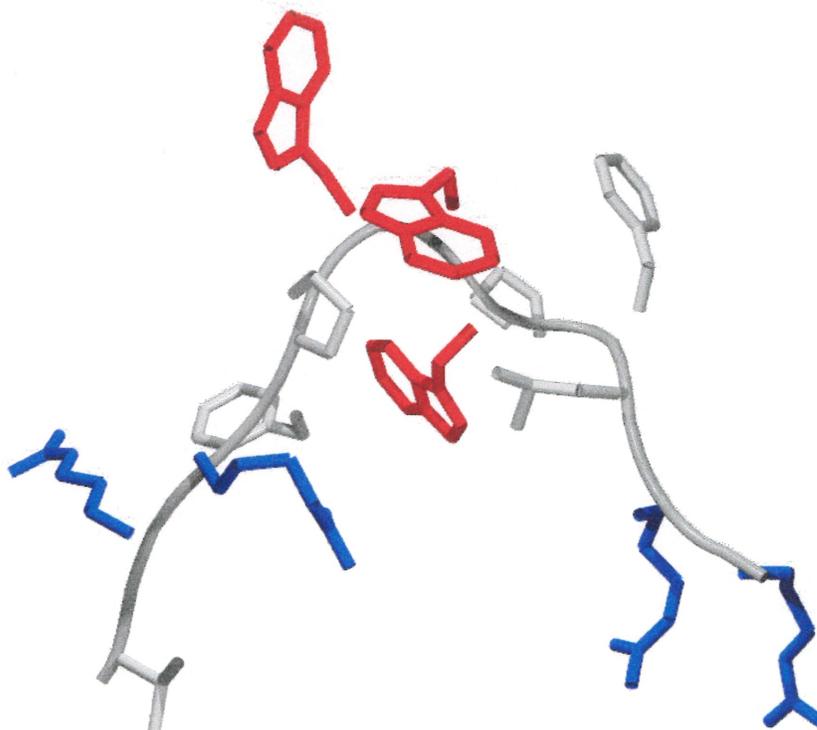


Figure 4: Titrpticine (6).

Bleu indique les résidus basiques, rouge les résidus tryptophanes et gris les résidus hydrophobes.

La tritrpticine est active contre des bactéries gram-positif, gram-négatif et certains champignons.³⁰

1.1.1.5 Peptides antibiotiques avec des acides aminés rares et modifiés.

Les bactéries sont la principale source de ces peptides, qui sont plus apparentés aux antibiotiques conventionnels.³⁸ Ils contiennent des acides aminés de configuration D ou des acides aminés non-conventionnels, ce qui leur permet d'avoir des structures qui ne sont pas accessibles aux autres peptides antibiotiques. Certains de ces peptides ont une structure amphiphile.

La nisine^{38,39} est un lantibiotique^{40,41} qui est employé dans l'industrie de la conserve et des produits laitiers en raison de son efficacité contre les bactéries gram-positif. Elle contient des acides aminés D, de la lanthionine, de la déhydroalanine, de la déhydrobutyrine et de la méthyllanthionine. (Figure 5)

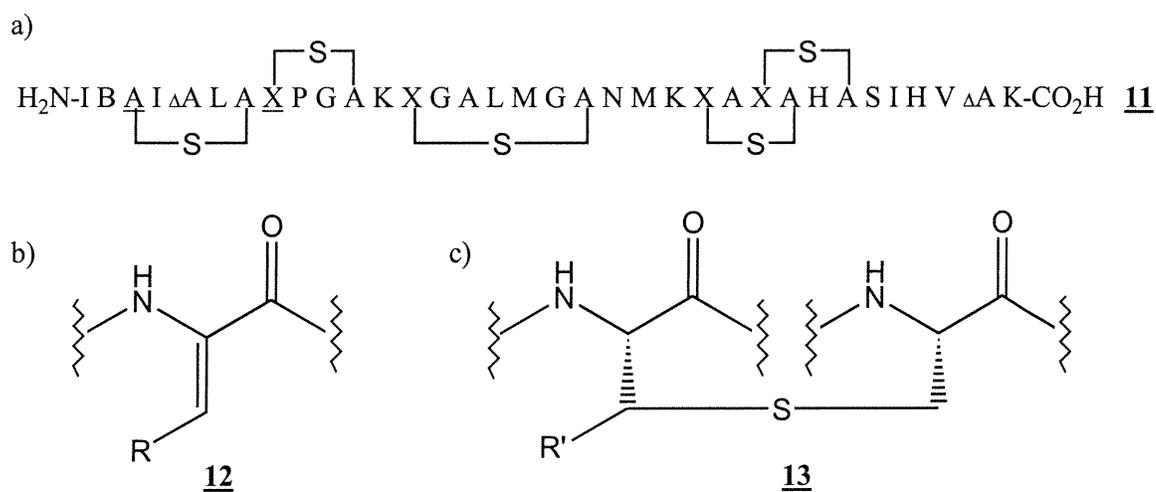


Figure 5: Séquence primaire de la nisine.

a) Séquence de la nisine b) ΔA: déhydroalanine 12 R=H, B: déhydrobutyrine 12 R=CH₃ c) ASA: lanthionine 13 R'=H, XSA 3-méthyllanthionine 13 R'=CH₃. Les acides aminés D sont soulignés.

Les gramicidines, comme la gramicidine A et la gramicidine S (GS), comportent des acides aminés D qui leur permettent d'adopter des conformations particulières. La gramicidine A, formée par quinze acides aminés L et D en alternance, a une structure d'hélice β.⁴² C'est un dimère de deux hélices entrelacées avec suffisamment d'espace au centre pour servir de canal cationique lorsqu'inséré dans une membrane (Figure 6).

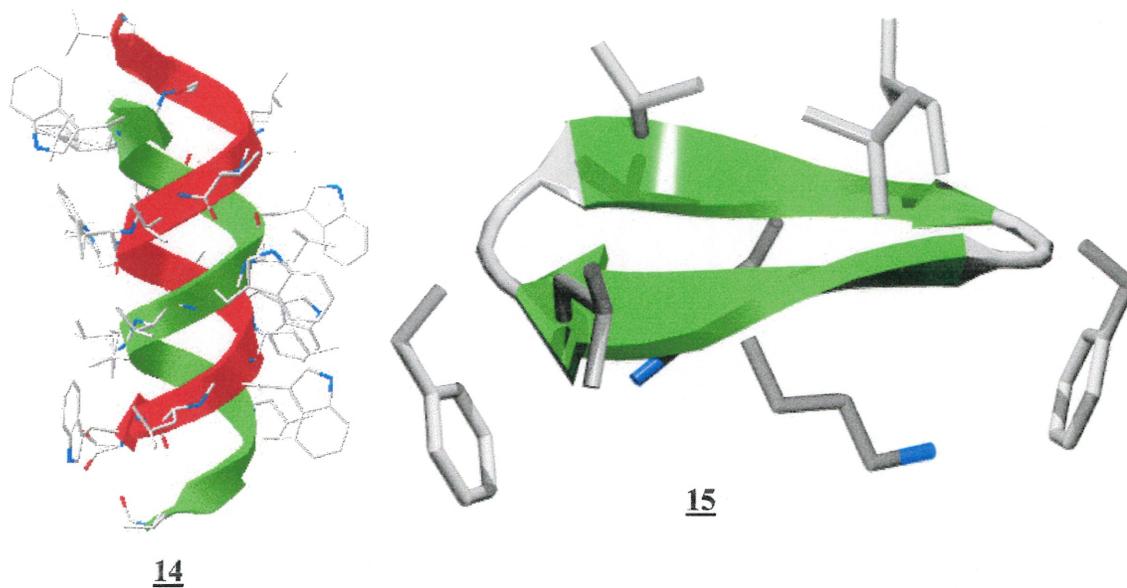


Figure 6: Gramicidine A (14) et S (15).

La gramicidine S a une structure inhabituelle d'épingle β cyclique sans faire intervenir de pont disulfure.⁴³ Elle comporte deux acides aminés D-Phe et deux résidus chargés positivement (Figure 6).

1.1.2 Mécanismes d'action.

1.1.2.1 Perméabilisation des membranes.

Malgré la très grande diversité en taille et en structure des peptides antibiotiques, ils ont en commun une structure amphiphile où des charges positives (hydrophiles) sont séparées de groupements non-polaires (hydrophobes). La plupart n'interagissent pas avec des enzymes ou des récepteurs spécifiques. Par exemple, des analogues de la cécropine A, de la magainine 2 ou de la mellitine comportant seulement des acides aminés D ont démontré la même activité antibactérienne que les analogues comportant seulement des acides aminés L.⁴⁴ Ils provoquent une perméabilisation des membranes cellulaires mais le mécanisme complet n'est pas connu en détail. Deux éléments du mécanisme ont toutefois été proposés. D'abord, il y aurait une interaction entre les chaînes latérales chargées positivement des peptides et les composants chargés négativement des membranes (phospholipides, protéines acides, etc). Dans un deuxième temps, il y aurait positionnement du peptide sur la membrane pour accroître la perméabilisation. Pour cette seconde étape, il a été proposé la formation de pores transmembranaires multimériques ou une perturbation de la membrane par positionnement du peptide parallèlement à la surface de la membrane.^{9,14}

Ces propositions découlent d'études réalisées sur des organismes vivants, des membranes modèles et d'expériences de RMN de l'état solide sur les interactions entre des peptides antibiotiques et des lipides.¹³

1.1.2.2 Autres mécanismes.

Certains peptides antibiotiques ont un mécanisme d'action différent de la perméabilisation de la membrane cellulaire. Il a été proposé que des peptides comme l'attacine ou la gloverine, inhibent la synthèse de protéines membranaires spécifiques.^{45,46} Le PR-39 **9** inhibe la synthèse de l'ADN.⁴⁷ L'histatine **7** est capable d'inhiber chez la bactérie orale *Bacteroides gingivalis* une enzyme qui ressemble à la trypsine.⁴⁸

1.2 Gramicidine S.

1.2.1 Découverte et utilisation.

C'est au début de 1942 que Gause et Brazhnikova ont fait la découverte fortuite de la gramicidine S.⁴⁹ En effet, ils désiraient obtenir de la thyrothricine selon la méthode de Dubos⁵⁰ et ont essayé d'extraire de sols russes les souches de *Bacillus brevis* dont ils avaient besoin. En faisant une extraction alcoolique du précipité acide de la culture de *B. brevis*, ils s'attendaient à obtenir un corps amorphe, la thyrothricine. Ils obtinrent plutôt une substance cristalline toute autre, avec des propriétés antibiotiques. La bactérie produisant cette substance fut désignée comme étant la souche Gause-Brazhnikova et la substance antibiotique fut nommée gramicidine S pour Soviet gramicidine.

La gramicidine S fut ensuite utilisée pour traiter les plaies infectées puisque son action sur les différentes bactéries pyogènes (qui font suppurer) est plus généralisée que celle de la thyrothricine.

1.2.2 Structure.

Dans les années qui suivirent, plusieurs chercheurs travaillèrent à déterminer la structure de la gramicidine S. Syngé⁵¹ hydrolysa la GS et découvrit cinq acides aminés: leucine, ornithine, D-phénylalanine, proline et valine. Par titration électrométrique, il a déterminé qu'il n'y avait pas d'acide carboxylique. Il suggéra une structure cyclique. C'est Conden et ses collaborateurs⁵² qui ont, par une hydrolyse partielle, déterminé la séquence des cinq acides aminés: valine-ornithine-leucine-D-phénylalanine-proline. Le nombre de répétitions de cette séquence fut établi par la détermination de la masse molaire du peptide. Plusieurs expériences différentes donnèrent des masses de l'ordre de 1000 g/mol et la conclusion fut que la GS est un cyclodécapeptide, la séquence Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro se répétant deux fois.^{53,54,55} Les résultats de cristallographie de rayons X⁵⁶ et la synthèse de la GS⁵⁷ ont confirmé la structure proposée.

Beaucoup de méthodes ont été employées afin de déterminer la structure tridimensionnelle exacte de la GS. On retrouve parmi ces méthodes les rayons X,⁵⁸ les spectroscopies ORD,^{59,60} CD^{59,60} et de RMN.^{61,62,63,64} La conclusion principale à tirer de ces différentes études tend à confirmer le premier modèle qui avait été suggéré par Hodgkin sur la base d'études par rayons X⁵⁸ et par Schwyzer qui a fait la synthèse de la GS.⁶⁵ Cette structure comporte un feuillet β plissé impliquant les résidus valine, ornithine et leucine, une symétrie C_2 et comme il a été démontré plus tard, deux tours β de type II' centrés sur les résidus D-Phe et Pro (Figure 7).^{64,66,67} Des liens hydrogène intramoléculaires impliquent les groupes carbonyles et les protons amides des résidus valine et leucine. Dans cette structure, les chaînes latérales hydrophobes aliphatiques sont situées d'un côté du plan de la chaîne peptidique et les chaînes latérales hydrophiles et aromatiques sont de l'autre côté.⁶⁵ Cette conformation est maintenue dans l'eau, dans d'autres solvants de différentes polarités et même dans des micelles de détergents ou des bicouches de phospholipides.^{68,69}

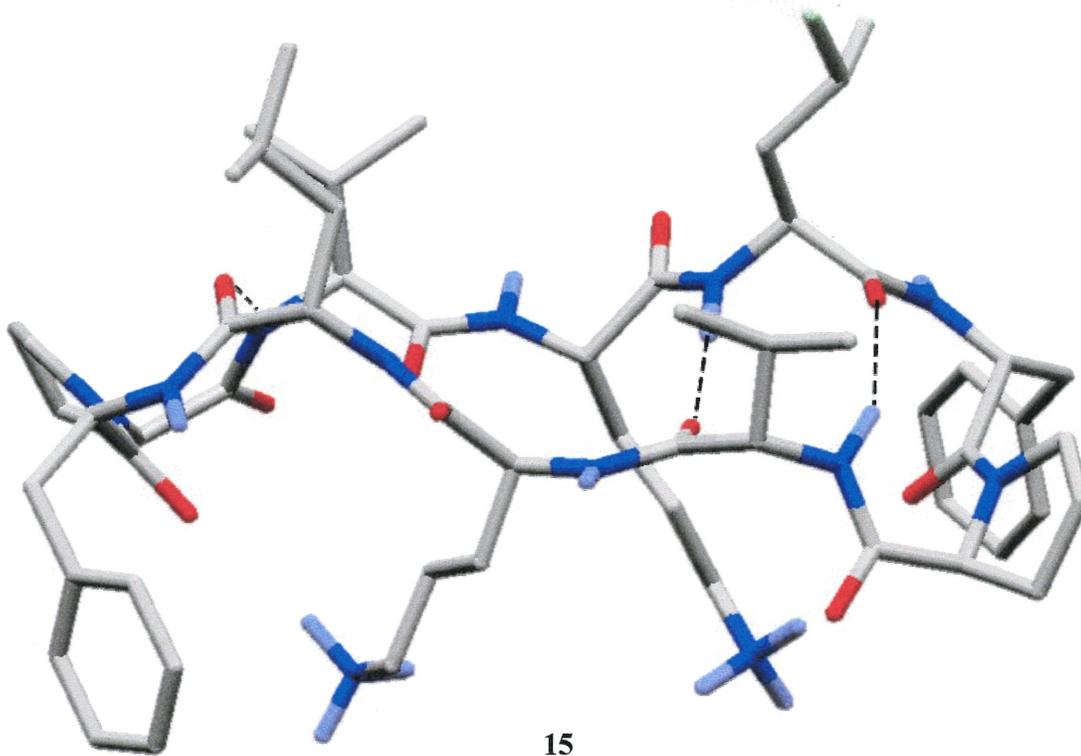


Figure 7: Structure tridimensionnelle de la gramicidine S (15).

1.2.3 Activité et analogues clés.

L'activité antibiotique de la GS s'étend aux bactéries gram-positif et gram-négatif ainsi qu'à plusieurs champignons pathogènes.⁷⁰ Parallèlement à son activité antibiotique, la GS a toutefois une grande activité hémolytique: elle provoque la lyse des globules rouges.⁶⁸ C'est pour cette raison qu'elle n'a été employée que topiquement en tant qu'antibiotique.⁷¹ Une quantité importante d'analogues de la GS a donc été synthétisée depuis sa découverte (>200 analogues), à la fois pour mieux comprendre la relation structure-activité et pour produire de meilleurs analogues.^{68,69}

La GS et ses analogues ont été préparés par diverses méthodes. La première, celle de Schwyzer,⁵⁷ a consisté à l'assemblage du décapeptide linéaire en solution grâce à la méthode des esters *p*-nitrophényliques. Plusieurs autres stratégies utilisant différents agents de couplage comme par exemple la cyclisation par dimérisation de pentapeptides^{72,73} ou la synthèse sur support solide avec cyclisation en solution⁷⁴ ou sur le support solide,⁷⁵ ont été utilisées. On peut voir dans le Tableau II des exemples représentatifs d'analogues obtenus par ces diverses méthodes ainsi que leurs activités biologiques.

Tableau II: Analogues de la gramicidine S et leurs activités biologiques.

	Séquence du décapeptide cyclique ^{68,69}					Concentration minimale	
						d'inhibition (µg/mL)	
			<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>			
15	Val ^{1,1'}	Orn ^{2,2'}	Leu ^{3,3'}	D-Phe ^{4,4'}	Pro ^{5,5'}	5	5
16	Gly ^{1,1'}					100	100
17	Phe ^{1,1'}					50	-
18	Lys ^{1,1'}					-	>100
19	Ala ^{1,1'}		Ala ^{3,3'}			>100	>100
20	Ser ^{1,1'}		Ser ^{3,3'}			Pas d'activité	
21			Gly ^{3,3'}			>100	>100
22			Phe ^{3,3'}			10-25	-
23		His ^{2,2'}				40	80
24		Lys ^{2,2'}				10	10
25		Orn(For) ^{2,2'}				92	97
26		Hnv ^{2,2'}				>85	>85
27				Gly ^{4,4'}		50	>100
28				Phe ^{4,4'}		45-180	300-700
29				D-Ala ^{4,4'}		40	40
30				D-Leu ^{4,4'}		5	10
31				D-Ser(Bzl) ^{4,4'}		5	2,5
32					Gly ^{5,5'}	10	10
33					Leu ^{5,5'}	5	10
34					Phe ^{5,5'}	10	10
35					Aib ^{5,5'}	>100	>100
36					β-Ala ^{5,5'}	100	80

Seuls les acides aminés qui ont été modifiés par rapport à la GS (**15**) sont inscrits dans ce tableau.

-:non-disponible.

En analysant ces analogues et tous ceux qui ont été synthétisés, on peut tirer les conclusions suivantes. La présence d'acides aminés aliphatiques, hydrophobes est nécessaire en position 1,1' et 3,3' pour que l'activité antibiotique soit maintenue. La substitution de l'acide aminé en position 1 par glycine ou lysine diminue grandement l'activité. Il en va de même avec la position 3, si l'on observe l'activité de [Gly^{3,3'}]GS **21**. Le remplacement simultané des acides aminés en position 1 et 3 est encore plus désastreux sur l'activité biologique puisque l'analogue **20** contenant quatre sérines est inactif. En position 2,2', il doit y avoir un groupement avec une certaine basicité (charge). Quand on place un résidu faiblement basique comme histidine ou non chargé comme l'ornithine protégée par le groupe fomyle ou la δ -hydroxynorvaline (Hnv), on obtient des composés beaucoup moins actifs. La position 4,4' demande un acide aminé D pour que l'activité biologique soit maintenue parce que sans un tour β de type II', le feuillet β de la GS est déstabilisé. Les tours β de type II' nécessitent en effet un acide aminé D à cette position. La position 5,5' peut accepter différents acides aminés naturels en autant que la conformation originale du tour β ne soit pas grandement altérée. Sinon, il y a perte d'activité antimicrobienne. En général, on peut dire que les analogues qui ont aussi le caractère amphiphile de la GS peuvent conduire à des analogues actifs. On peut aussi voir que toute déstabilisation ou perte du caractère amphiphile conduit à une diminution de l'activité.⁶⁸

Les analogues de la GS les plus sélectifs à ce jour en tant qu'antibiotiques sont ceux comportant des cycles de 12 et 14 membres, synthétisés par les groupes de Ando et Hodges (Tableau III et IV).^{76,77,78} La relation entre la structure et l'activité biologique et hémolytique de ces analogues est discutée en page 17.

Tableau III: Analogues de la GS comportant 12 et 14 résidus.

PEPTIDE	SÉQUENCE	RÉF.
DLL-12	cyclo(Leu-Orn-Leu-Orn-D-Phe-Pro-Leu-Orn-Leu-Orn-D-Phe-Pro) <u>37</u>	76
DLL-14	cyclo(Leu-Orn-Leu-Orn-Leu-D-Phe-Pro) ₂ <u>38</u>	76
GS-12F	cyclo(Val-Lys-Leu-Lys-D-Phe-Pro-Lys-Val-Lys-Leu-D-Phe-Pro) <u>39</u>	77
GS-14	cyclo(Val-Lys-Leu-Lys-Val-D-Tyr-Pro-Leu-Lys-Val-Lys-Leu-D-Tyr-Pro) <u>40</u>	78
GS-14K4	cyclo(Val-Lys-Leu-D-Lys-Val-D-Tyr-Pro-Leu-Lys-Val-Lys-Leu-D-Tyr-Pro) <u>41</u>	78
GS-14K3L4	cyclo(Val-Lys-Lys-Leu-Val-D-Tyr-Pro-Leu-Lys-Val-Lys-Leu-D-Tyr-Pro) <u>42</u>	92

Tableau IV: Activités hémolytiques des analogues de la GS comportant 12 et 14 résidus.

PEPTIDE	MINIMALE (µg/mL)	10 µg/mL (%)	RÉFÉRENCE
GS	12,5	-	78
DLL-12	-	5	76
DLL-14	-	1	76
GS-12F	400	-	77
GS-14	1,5	100	78
GS-14K4	200	1	78
GS-14K3L4	-	3	92

Minimale: quantité minimale du peptide pour que 100% des globules rouges soient détruits.

10 µg/mL (%): pourcentage de globules rouges détruits lorsqu'ils sont mis en présence du peptide à une concentration de 10 µg/mL.

-: non-disponible.

1.2.4 Mécanisme d'action.

Le mécanisme d'action de la GS n'est pas connu en détail mais il est généralement accepté qu'elle agit au niveau de la membrane cellulaire.⁷⁹ Plusieurs expériences ont été menées afin de l'élucider: des études spectroscopiques par RMN des interactions entre la GS et des liposomes⁸⁰ ou des membranes modèles de phospholipides,⁸¹ des études de distribution de la GS sur les cellules bactériennes et leurs membranes,⁸² et plusieurs autres.⁸³ Les résultats de ces expériences suggèrent deux choses. Premièrement, il y a une interaction électrostatique entre la GS et les têtes polaires des phospholipides. Ensuite, le côté hydrophobe de la GS entre dans la partie hydrophobe de la membrane de phospholipides et les chaînes latérales chargées positivement des ornithines sont exposées à la phase aqueuse.⁸⁴

Une étude sur l'habileté de la GS et de certains de ses analogues à accroître la perméabilité de cellules a été réalisée par Katsu et ses collaborateurs.^{85,86} Les résultats de cette étude ont montré que l'aptitude de la GS et de ses analogues à augmenter la perméabilité des cellules est parallèle avec leur activité biologique. Les auteurs proposent aussi le modèle illustré dans la Figure 8 pour l'interaction entre la GS et les membranes de phospholipides.⁸⁶

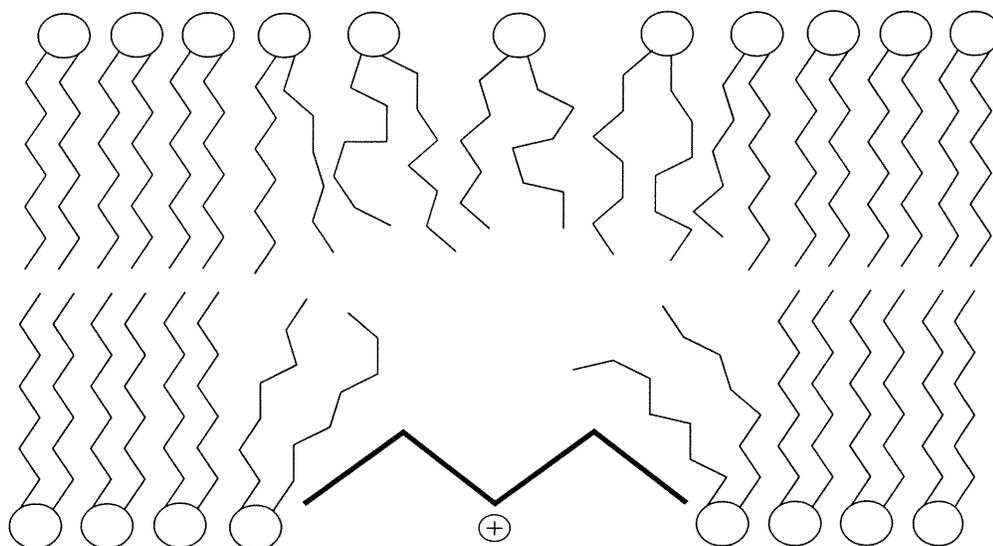


Figure 8: Modèle de l'interaction entre la GS et les membranes de phospholipides.

Cercles: têtes polaires, chargées des phospholipides, Zigzag: chaînes d'hydrocarbures, Lignes grasses: molécule de GS chargée.

Ce modèle illustre l'interaction et la position de la GS et des phospholipides de la membrane cellulaire. La perturbation qui provoque l'augmentation de la perméabilisation est bien visible.

Plusieurs études biophysiques ont été réalisées au cours des quinze dernières années afin d'obtenir plus d'informations sur le mécanisme d'action de la gramicidine S.⁸³

Des études par DSC⁸⁷ sur des mélanges de phospholipides et de GS suggèrent que la GS est située à l'interface polaire/non-polaire des bicouches lipidiques. On retrouve le squelette de glycérol des phospholipides dans cette région. Zidovetski et ses collaborateurs⁸⁸ ont aussi suggéré, à partir d'expériences de spectroscopie RMN ²H et ³¹P, que la GS provoque le désordre dans des bicouches de DMPC (dimyristoylphosphatidylcholine) en se plaçant à leur interface polaire/non-polaire. Les charges positives des ornithines interagissent avec les phosphates chargés négativement des phospholipides et les résidus leucine et valine pénètrent dans le centre hydrophobe de la bicouche.

Des études calorimétriques,⁸⁷ de spectroscopie RMN du ³¹P⁸⁹ et de rayons X⁸⁹ ont également permis de découvrir que la GS interagit plus fortement avec les phospholipides anioniques qu'avec ceux qui sont zwitterioniques. Elle les perturbe davantage. Ceci est probablement dû à l'interaction électrostatique mentionnée plus haut. Cette spécificité est encourageante du point de vue de l'utilisation thérapeutique, puisque les membranes des globules rouges sont composées majoritairement de phospholipides zwitterioniques.⁹⁰ Les membranes des bactéries sont plus riches en phospholipides ou en polysaccharides acides, ce qui leur confère une surface chargée négativement.⁹¹

Hodges et ses collaborateurs ont synthétisé une gamme d'analogues de la gramicidine S comportant 14 résidus (Tableau III). À partir de GS-14, qui est parfaitement amphiphile, ils ont remplacé systématiquement chaque acide aminé ainsi que deux ou quatre lysines par leurs énantiomères. Les analogues ainsi obtenus varient en amphiphilie. Ils ont démontré que pour ces analogues de 14 membres, l'activité hémolytique augmente en même temps que leur caractère amphiphile. Par contre leur action contre les bactéries varie inversement avec le caractère amphiphile jusqu'à une certaine limite inférieure d'amphiphilie en bas de

laquelle l'activité antibactérienne diminue.⁷⁸ Les analogues avec deux ou quatre lysines du côté hydrophobe sont en effet moins actifs. Un des meilleurs analogues, GS-14K4, est aussi actif que la GS mais son activité hémolytique est 16 fois moindre. Ce groupe suggère donc que pour perturber les membranes des bactéries et éviter l'association avec les cellules eucaryotes, un domaine hydrophobe doit être présent dans le peptide antibiotique mais ce domaine doit inclure un résidu hydrophile en son sein.⁹² Cette méthode avait aussi été employée pour des peptides linéaires, avec des résultats similaires.^{93,94}

1.3 Analogues de la gramicidine S restreints conformationnellement.

1.3.1 Tours β .

L'élément structural d'une chaîne peptidique qui lui permet un changement de direction de 180° se nomme un tour. C'est ce qui permet à une protéine de se replier⁹⁵ et de maintenir sa structure tridimensionnelle compacte.⁹⁶ Deux types de tour sont principalement rencontrés. Le tour γ implique trois acides aminés liés par un pont d'hydrogène entre le carbonyle du résidu i et le proton amide du résidu $i + 2$.⁹⁷ Le tour β implique quatre acides aminés et le lien hydrogène relie le carbonyle du résidu i et le proton amide du résidu $i + 3$ (Figure 9). Les tours β se subdivisent en plusieurs types selon leurs valeurs pour les angles dièdres ϕ_2 , ψ_2 , ϕ_3 , et ψ_3 .^{98,99}

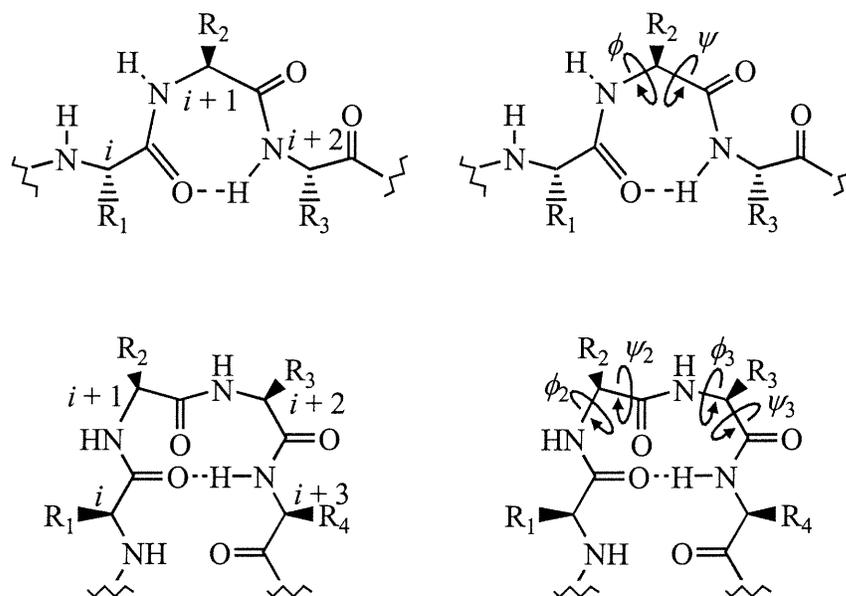


Figure 9: Résidus et angles dièdres de tours γ et β .

1.3.2 Mimétismes de tour β .

Les mimétismes de tour β sont des molécules peptidiques¹⁰⁰ ou organiques¹⁰¹ qui ont été créées dans le but de remplacer les résidus centraux des tours β en conservant la même conformation et/ou activité du peptide ou de la protéine (Figure 10). Ils peuvent présenter de grands avantages d'un point de vue médicinal puisqu'ils ont une plus grande stabilité métabolique et qu'ils «figent» la conformation du tour β qui peut être nécessaire pour l'activité biologique. En raison de leur structure particulière, les angles dièdres ψ_2 et ϕ_3 des tours β qu'ils imitent sont restreints.

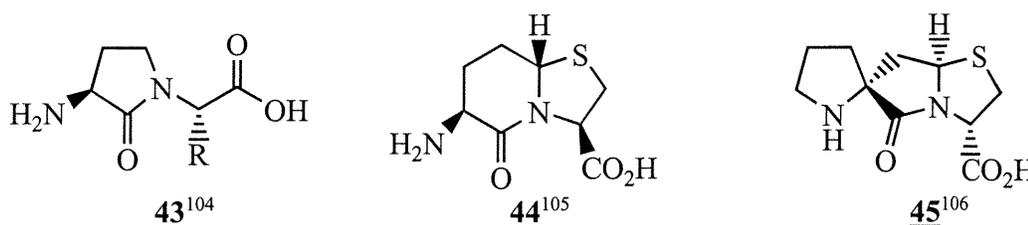


Figure 10: Exemples de mimétismes de tour β .

Un des premiers peptidomimétiques est celui de Freidinger **43**, qui une fois incorporé dans LH-RH (*Luteinizing Hormone-Releasing Hormone*) donne un analogue dont la puissance a été augmentée d'environ neuf fois (Figure 11).¹⁰²

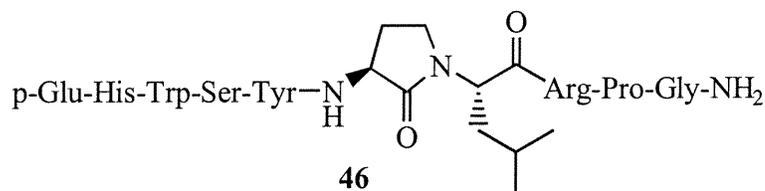


Figure 11: Analogue de LH-RH incorporant le lactame de Freidinger.

p-Glu: pyroglutamate.

Toutefois, ce peptidomimétique ne contraint que l'angle ψ dans un tour β de type II' ($\psi_2 = -120^\circ$).¹⁰² Nagai et Sato ont remédié à cette situation en créant le BTD (*bicyclic β -turn dipeptide*) **44**. Celui-ci fixe les angles ψ_2 et ϕ_3 à des valeurs proches de celles d'un tour β de type II'.¹⁰³

1.3.3 Mimétismes de tour β incorporés dans la gramicidine S.

Nagai et Sato ont créé le BTD pour pouvoir déterminer si la conformation bioactive d'un peptide inclut un tour β . C'est ce qu'ils ont fait avec la gramicidine S en remplaçant les deux segments D-Phe-Pro par leur BTD, contraignant ainsi les deux tours β (Figure 12).¹⁰⁵

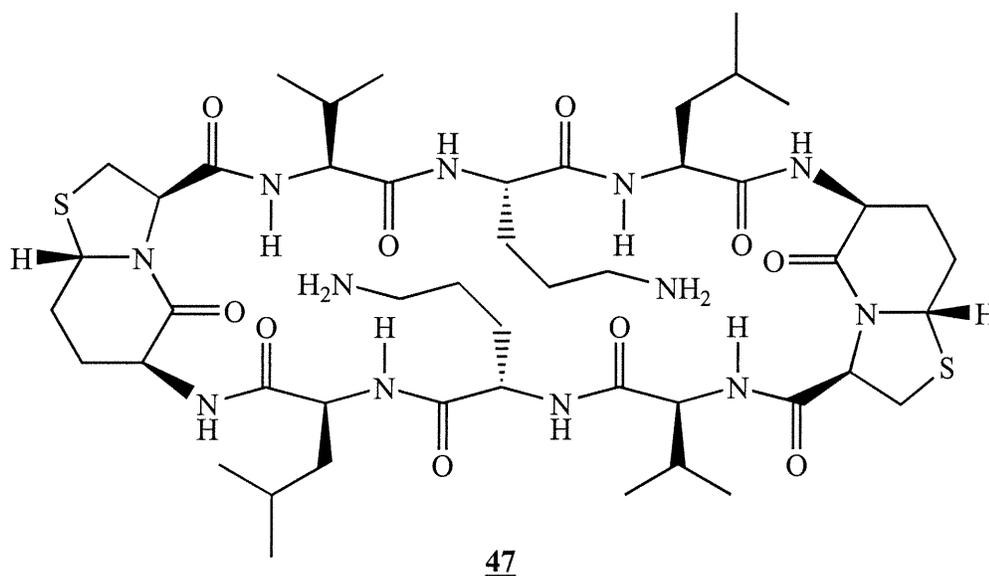


Figure 12: Analogue de la gramicidine S [BTD^{4-5,4'-5'}]GS (47).

Les courbes de dichroïsme circulaire de la GS et [BTD^{4-5,4'-5'}]GS 47 sont très similaires, indiquant ainsi des conformations semblables. L'activité antibactérienne de [BTD^{4-5,4'-5'}]GS 47 est la même que celle de la GS pour les espèces évaluées (Tableau V), ce qui montre que la GS a la même conformation comportant des tours β en solution et dans l'environnement dans lequel elle agit comme antibiotique.¹⁰⁵

Tableau V: Activités biologiques de la GS et [BTD^{4-5,4'-5'}]GS (47).¹⁰⁵

SOUCHE	GS ^a	[BTD ^{4-5,4'-5'}]GS ^a
<i>Staphylococcus aureus</i> MCI-1380	3,13	3,13
<i>Bacillus subtilis marfurg</i> 168	3,13	3,13
<i>Escherichia coli</i> C-600	>100	>100

a: concentration minimale d'inhibition $\mu\text{g/mL}$.

L'activité de cet analogue n'a toutefois pas été évaluée pour les bactéries gram-négatif ou pour les champignons puisque ces travaux ont été réalisés dix ans avant qu'il soit établi que la GS est efficace contre ces deux classes de microorganismes. L'activité de la GS contre les bactéries gram-négatif n'est manifeste que si on la détermine avec un test en solution plutôt qu'avec un test sur agar comme auparavant.⁷⁰

À partir de ces résultats, d'autres chercheurs se sont intéressés à utiliser la GS pour évaluer l'aptitude de peptidomimétiques à stabiliser des tours β (de type II'). Ripka et ses collaborateurs ont synthétisé les analogues **48** et **49** (Figure 13) ne comportant qu'un seul peptidomimétique dans la séquence pour faire leur analyse conformationnelle par RMN.^{106,107}

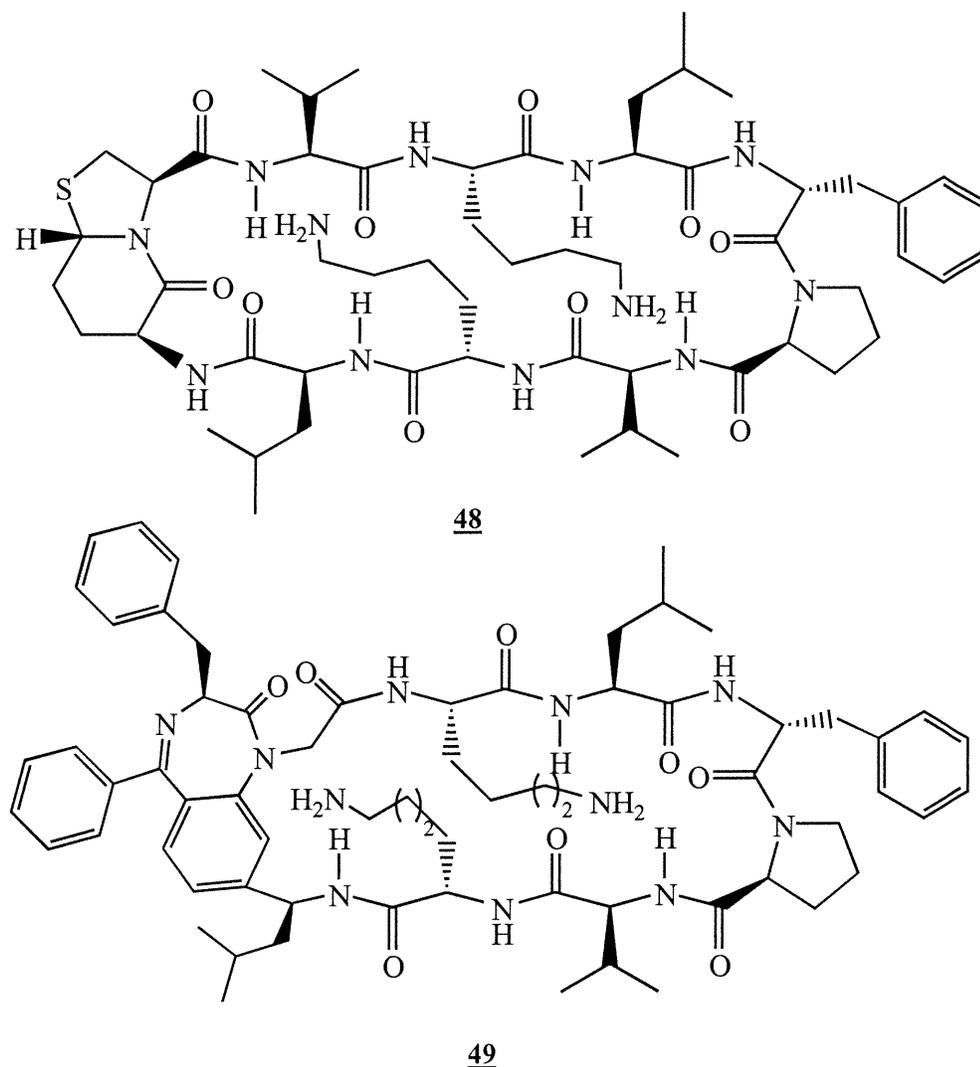


Figure 13: Analogues de la gramicidine S [Lys^{2,2'}, BTD⁴⁻⁵]GS (**48**) et [BZD⁴⁻⁵]GS (**49**).

Ce remplacement unique brise la symétrie de la GS dont on ne voit dans les spectres RMN que les signaux du pentapeptide Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro. Ainsi, plus de signaux caractéristiques peuvent être observés. En se basant sur les données des coefficients de température des protons amides, des constantes de couplage $^3J_{\text{NH-C}\alpha\text{H}}$, des nOe entre les deux brins du feuillet β et de l'activité biologique (Tableau VI), les auteurs ont conclu que le BTM et leur benzodiazépine¹⁰⁷ sont de bonnes mimiques d'un tour β de type II'.

Tableau VI: Activités biologiques de la GS et [BZD⁴⁻⁵]GS (49).¹⁰⁹

SOUCHE	GS ^a	[BZD ⁴⁻⁵]GS 49 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	8
<i>Bacillus subtilis</i>	2	4
<i>Escherichia coli</i>	16	128

a: concentration minimale d'inhibition $\mu\text{g/mL}$.

Une étude similaire a été réalisée par Andreu et al¹⁰⁸ avec leur peptidomimétique IBTM (acide 2(S)-amino-3-oxohexahydroindolizino[8,7-b]-indole-5(S) carboxylique, Figure 14). Dans cet exemple de remplacement des acides aminés D-Phe-Pro aux positions $i + 1$ et $i + 2$ par les peptidomimétiques IBTM, il a été démontré que la stéréochimie au niveau de la fusion des cycles a un effet très important sur l'activité biologique de cet analogue de la Gramicidine S (Tableau VII). Alors que [Lys^{2,2'}, IBTM(11bR)^{4,5}]GS adopte une conformation semblable à celle de la GS, [Lys^{2,2'}, IBTM(11bS)^{4,5}]GS a une conformation dans laquelle un tour β de type I est centré sur les résidus Val¹ et Lys² tel que déterminé par des expériences de RMN. Ils ont conclu que seul le IBTM(11bR) peut stabiliser un tour β de type II'. Ce peptidomimétique étant celui dont la position de la fusion des cycles (11b) est de configuration R.

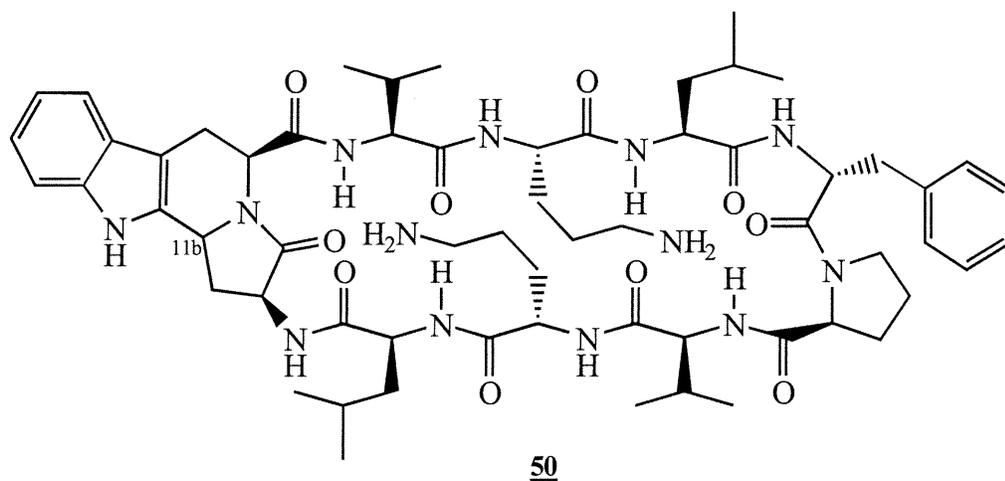


Figure 14: Analogue de la gramicidine S [IBTM⁴⁻⁵]GS (50).¹¹⁰

Tableau VII: Activités biologiques de la GS, [IBTM(11bR)⁴⁻⁵]GS, [Lys^{2,2'}, IBTM(11bS)⁴⁻⁵]GS et [Lys^{2,2'}, IBTM(11bR)⁴⁻⁵]GS.¹⁰⁸

SOUCHE	GS ^a	[IBTM(11bR) ⁴⁻⁵]GS ^a	[Lys ^{2,2'} , IBTM(11bS) ⁴⁻⁵]GS ^a	[Lys ^{2,2'} , IBTM(11bR) ⁴⁻⁵]GS ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	8	128	16
<i>Bacillus subtilis</i>	4	2	128	4
<i>Escherichia coli</i>	128	>128	128	>64
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	256	>128	>512	>64

a: concentration minimale d'inhibition µg/mL.

1.4 Gramicidine S incorporant des acides aminés indolizidinone.

Un analogue de la gramicidine S, [IAA(6S)^{4-5,4'-5'}]GS **51**, a été synthétisé en utilisant une méthode de synthèse des peptides en solution.^{109,110} Cet analogue contient deux acides aminés indolizidinone¹¹¹ (IAA) remplaçant les deux segments D-Phe-Pro aux positions $i + 1$ et $i + 2$ des tours β de type II' (Figure 15). Cette molécule conserve l'effet antibiotique mais possède une activité hémolytique quatre fois moindre que la gramicidine S (Tableaux VIII et IX). Une étude par dichroïsme circulaire^{109,112,113} de **51** suggère que sa conformation est semblable à celle de la gramicidine S en solution aqueuse et dans le méthanol.

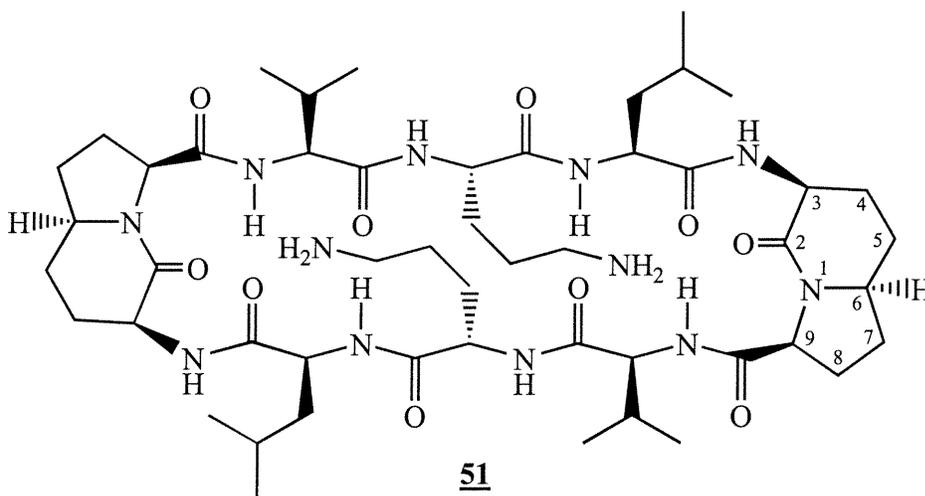


Figure 15: Analogue de la GS [IAA(6S)^{4-5,4'-5'}]GS (**51**).¹⁰⁹

Tableau VIII: Activités biologiques de la GS et [IAA(6S)^{4-5,4'-5'}]GS (51).¹¹⁴

SOUCHE	GS^a	[IAA(6S)^{4-5,4'-5'}]GS <u>51</u>^a
Bactéries gram-positif		
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,5	6,2
<i>Bacillus subtilis</i>	3,1	12,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	3,1	3,1
<i>Corynebacterium xerosis</i>	0,8	1,5
Bactéries gram-négatif		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,2	12,5
<i>Escherichia coli</i>	6,2	12,5
<i>Salmonella typhimurium</i>	12,5	25
Champignon		
<i>Candida albicans</i>	6,2	6,2

a: concentration minimale d'inhibition µg/mL.

Tableau IX: Activités hémolytiques de la GS et [IAA(6S)^{4-5,4'-5'}]GS (51).¹¹⁴

PEPTIDE	2h^a	24h^a
Gramicidine S	100	25
[IAA(6S) ^{4-5,4'-5'}]GS <u>51</u>	400	100

a. Concentration minimale pour effectuer la lyse à 100% en µg/mL.

Nous désirons explorer la relation entre la configuration de la position de fusion des cycles (6) des acides aminés indolizidinone et l'activité biologique d'analogues de la gramicidine S. Une analyse par modélisation moléculaire et les données de rayons X montrent que les angles dièdres ψ_2 et ϕ_3 des IAA varient en fonction de la stéréochimie de l'hydrogène en position 6.¹⁰⁹ Donc, chaque isomère des IAA n'aurait pas le même potentiel de stabilisation d'un tour β de type II', nécessaire à l'activité biologique (Figure 16).

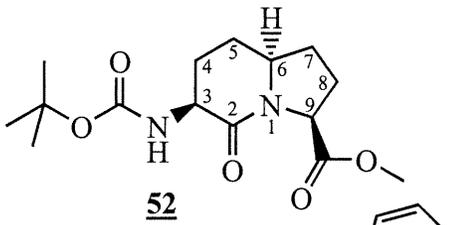
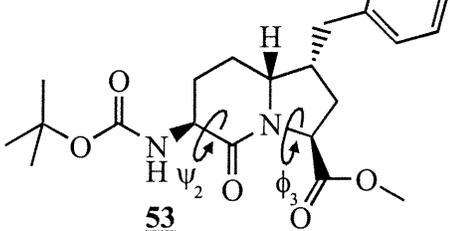
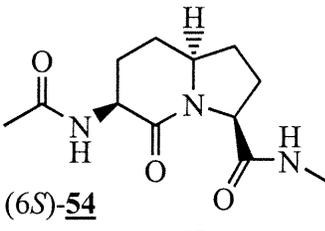
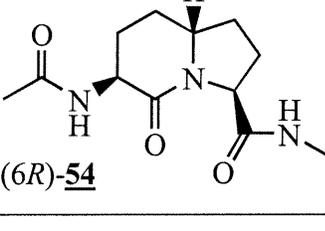
	Méthode	$\psi_2(^{\circ})$	$\phi_3(^{\circ})$	Réf.
Résidus $i + 1$ et $i + 2$ d'un tour β de type II' idéal		-120	-80	115
Résidu $i + 1$ d'un tour γ de type inverse			-80	
	Rayons X	-176	-78	111
	Rayons X	-147	-56	116
	Modélisation			
	Min. Global	-112,7	-60,1	117
	Min. Local	-125,5	-65,6	
	Modélisation			
	Min. Global	-135,6	-76,1	117
	Min. Local	-121,1	-71,0	

Figure 16: Valeurs des angles dièdres ψ_2 et ϕ_3 des acides aminés indolizidinone obtenues par rayons X et modélisation moléculaire.

L'étude par modélisation moléculaire¹¹⁷ révèle que (6*S*)-**54** et (6*R*)-**54** peuvent stabiliser des repliements γ et β et que les conformations ayant des repliements γ sont plus basses en énergie. Les valeurs de ψ_2 et ϕ_3 obtenues par modélisation moléculaire pour (6*S*)-**54** et (6*R*)-**54** indiquent qu'ils pourraient tous deux stabiliser des repliements γ ou β de type II'.

Nous voulons également savoir si la longueur de la chaîne latérale de l'acide aminé en position 2 influence l'activité biologique des analogues [IAA^{4-5,4'-5'}]GS. Dans le cas de GS, le remplacement des résidus ornithine par lysine a conduit à des analogues ayant une activité biologique deux fois moindre.¹¹⁸ Ce projet consiste d'abord à la synthèse sur support solide d'analogues de la gramicidine S comportant deux IAA (Figure 17). L'analyse conformationnelle des analogues de la gramicidine S **51**, **55** et **56** est effectuée par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire en deux dimensions (RMN 2D) et par dichroïsme circulaire. La mesure de l'activité antibiotique des analogues contre plusieurs souches de bactéries et de champignons est déterminée par nos collaborateurs (voir annexe 1, page xviii).

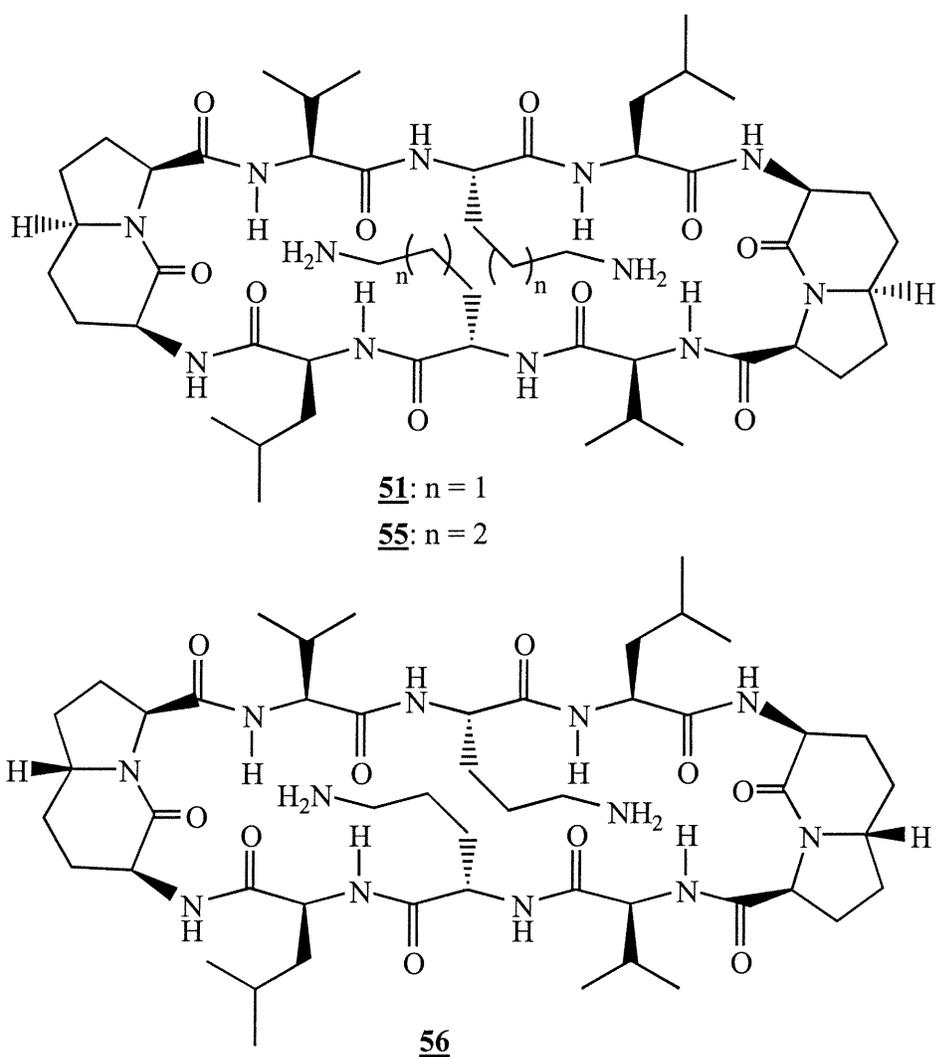


Figure 17: Analogues de la GS [IAA(6S)^{4-5,4'-5'}]GS (**51**), [Lys^{2,2'}, IAA(6S)^{4-5,4'-5'}]GS (**55**) et [IAA(6R)^{4-5,4'-5'}]GS (**56**).

La préparation des analogues **51**, **55** et **56**, leur analyse conformationnelle ainsi que la détermination de leurs activités antibactérienne, antifongique et hémolytique nous permettra d'étudier la relation structure-activité de la GS. Une approche aussi complète n'a jamais été réalisée pour des analogues de la gramicidine S comportant des peptidomimétiques aux positions 4-5 et 4'-5'.

1.5 Références du chapitre 1.

1. Gabay, J.E. *Science* **1994**, 264, 373.
2. Nissen-Meyer, J.; Nes, I.F. *Arch. Microbiol.* **1997**, 167, 67.
3. Hancock, R.E.W. dans *Drugs and the pharmaceutical sciences, Biotechnology of antibiotics, Second Edition, revised and expanded*; Strohl, W.R., Ed.; Marcel Dekker Inc: New York, 1997; 82, 471.
4. Boman, H.G. *Scand. J. Immunol.* **1998**, 48, 15.
5. Boman, H.G. *Scand. J. Immunol.* **1996**, 43, 475.
6. Nicolas, P.; Mor, A. *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, 49, 277.
7. Boman, H.G. *Annu. Rev. Immunol.* **1995**, 13, 61.
8. Andreu, D. *Biopolymers (Peptide Science)* **1998**, 47, 413.
9. Andreu, D.; Rivas, L. *Biopolymers (Peptide Science)* **1998**, 47, 415.
10. Hancock, R.E.W. *Drugs* **1999**, 57, 469.
11. Hancock, R.E.W.; Chapple, D.S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, 43, 1317.
12. Juvvadi, P.; Vunnam, S.; Merrifield, R.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 8989.
13. Hwang, P.M.; Vogel, H.J. *Biochem. Cell. Biol.* **1998**, 76, 235.
14. Oren, Z.; Shai, Y. *Biopolymers (Peptide Science)* **1998**, 47, 451.
15. Blondelle, S.E.; Houghten, R.A. *Ann. Rep. Med. Chem.* **1996**, 118, 8989.
16. Segrest, J.P.; De Loof, H.; Dohlman, J.G.; Brouillette, C.G.; Anantharamaiah, G.M. *Proteins: Structure, Function and Genetics* **1990**, 8, 103.
17. Mor, A.; Nicolas, P. *Eur. J. Biochem.* **1994**, 219, 145.
18. Steiner, H.; Hultmark, D.; Engström, A.; Bennich, H.; Boman, H.G. *Nature* **1981**, 292, 246.
19. Zasloff, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, 84, 5449.
20. Dimarcq, J.-L.; Bulet, P.; Hetru, C.; Hoffmann, J. *Biopolymers* **1998**, 47, 465.
21. Bonmatin, J.M.; Bonnat, J.L.; Gallet, X.; Vovelle, F.; Ptak, M.; Reichart, J.M.; Hoffmann, J.A.; Keppi, E.; Legrain, M.; Achstetter, T. *J. Biomol. NMR* **1992**, 2, 235.
22. Hanzawa, H.; Shimada, I.; Kuzuhara, T.; Komano, H.; Kohda, D.; Inagaki, F.; Natori, S.; Arata, Y. *FEBS Lett.* **1990**, 269, 413.
23. Broekaert, W.F.; Cammue, B.P.A.; De Bolle, M.F.C.; Thevissen, K.; De Samblanx,

- G.W.; Osborn, R.W. *Crit. Rev. Plant. Sci.* **1997**, *16*, 297.
24. Shewry, P.A.; Lucas, J.A. *Adv. Bot. Res.* **1997**, *26*, 135.
25. Kawano, K.; Yoneya, T.; Miyata, T.; Yoshikawa, K.; Tokunaga, F.; Terada, Y.; Iwanaga, S. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 15365.
26. Lehrer, R.I.; Ganz, T. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1996**, *797*, 228.
27. Mandard, N.; Sodano, P.; Labbe, H.; Bonmatin, J.M.; Bulet, P.; Hetru, C.; Ptak, M.; Vovelle, F. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *256*, 404.
28. Kokryakov, V.N.; Harwig, S.S.L.; Panyutich, E.A.; Shevchenko, A.A.; Aleshina, G.M.; Shamova, O.V.; Korneva, H.A.; Lehrer, R.I. *FEBS Lett.* **1993**, *327*, 231.
29. Selsted, M.E.; Novotny, M.J.; Morris, W.L.; Tang, Y.Q.; Smith, W.; Cullor, J.S. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 4292.
30. Lawyer, C.; Pai, S.; Watabe, M.; Borgia, P.; Mashimo, T.; Eagleton, L.; Watabe, K. *FEBS Lett.* **1996**, *390*, 95.
31. Falla, T.J.; Karunaratne, D.N.; Hancock, R.E.W. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 19298.
32. Xu, T.; Levitz, S.M.; Diamond, R.D.; Oppenheim, F.G. *Infect. Immun.* **1991**, *59*, 2549.
33. Brewer, D.; Hunter, H.; Lajoie, G. *Biochem. Cell. Biol.* **1998**, *76*, 247.
34. Raj, P.A.; Marcus, E.; Sukumaran, D.K. *Biopolymers* **1998**, *45*, 51.
35. Gennaro, R.; Skerlavaj, B.; Romeo, D. *Infect. Immun.* **1989**, *57*, 3142.
36. Chen, C.; Brock, R.; Luh, F.; Chou, P.-J.; Larrick, J.W.; Huang, R.-F.; Huang, T. *FEBS Lett.* **1995**, *370*, 46.
37. Gennaro, R.; Zanetti, M. *Biopolymers (Peptide Science)* **2000**, *55*, 31.
38. Gross, E.; Morell, J.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4634.
39. Klaenhammer, T.R. *FEMS Microbiol. Rev.* **1993**, *261*, 1457.
40. Kellner, R.; Jung, G. *Biosyst. Eur. News* **1989**, *7*, 2.
41. Guder, A.; Wiedemann, I.; Sahl, H.-G. *Biopolymers (Peptide Science)* **2000**, *55*, 62.
42. Ketchum, R.R.; Hu, W.; Cross, T.A. *Science* **1993**, *261*, 1457.
43. Gibbs, A.C.; Kondejewski, L.H.; Gronwald, W.; Nip, A.M.; Hodges, R.S.; Sykes, B.D.; Wishart, D.S. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 284.
44. Wade, D.; Boman, A.; Wählén, B.; Drain, C.M.; Andreu, D.; Boman, H.G.;

- Merrifield, R.B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 4761.
45. Engström, P.; Carlsson, A.; Engström, Å.; Tao, Z.-J.; Bennich, H. *EMBO J.* **1984**, *3*, 3347.
46. Axén, A.; Carlsson, A.; Engström, Å.; Bennich, H. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *247*, 614.
47. Boman, H.G.; Agerberth, B.; Boman, A. *Infect. Immun.* **1993**, *61*, 2978.
48. Nishikata, M.; Kanchira, T.; Oh, H.; Tani, H.; Tazaki, M.; Kuboki, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *174*, 625.
49. Gause, G.F.; Brazhnikova, M.G. *Nature* **1944**, *154*, 703.
50. Dubos, R.J. *J. Exp. Med.* **1939**, *70*, 1.
51. Syngé, R.L.M. *Biochem. J.* **1945**, *39*, 363.
52. Consdén, R.; Gordon, A.H.; Martin, A.J.P.; Syngé, R.L.M. *Biochem. J.* **1947**, *41*, 596.
53. Pederson, K.O.; Syngé, R.L.M. *Acta. Chem. Scand.* **1948**, *2*, 408.
54. Belozerskii, A.N.; Paskhina, T.S. *Biokhimiya* **1945**, *10*, 344.
55. Battersby, A.R.; Craig, L.C. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 1887.
56. Schmidt, G.M.J.; Hodgkin, D.C.; Oughton, B.M. *Biochem. J.* **1957**, *65*, 744.
57. Schwyzer, R.; Sieber, P. *Helv. Chim. Acta.* **1957**, *40*, 624.
58. Hodgkin, D.C.; Oughton, B.M. *Biochem. J.* **1957**, *65*, 752.
59. Ruttenberg, M.A.; King, T.P.; Craig, L.C. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 4196.
60. Quadrifoglio, F.; Urry, D.W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *29*, 785.
61. Stern, A.; Gibbons, W.A.; Craig, L.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1968**, *61*, 734.
62. Ohnishi, M.; Urry, D.W. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 1399.
63. Rae, I.D.; Stimson, E.R.; Scheraga, H.A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, *77*, 225.
64. Gibbons, W.A.; Crepaux, D.; Delayre, J.; Dunand, J.-J.; Hajdukovic, G.; Wyssbrod, H.R. dans *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*; Walter, R., Meienhofer, J., Eds.; Ann Arbor Science Pub. Inc.: Ann Arbor, 1975; p.127.
65. Schwyzer, R. dans *Amino Acids and Peptides with Antimetabolic Activity* (CIBA Found. Symp.); Wolstenholme, G.E.W., O'Connor, C.M., Eds.; J. & A. Churchill Ltd: London, 1958; p.171.

66. Ovchinnikov, Y.A.; Ivanov, V.T.; Bystrov, V.F.; Miroshnikov, A.I.; Shepel, E.N.; Abdullaev, N.D.; Efremov, E.S.; Senyavina, L.B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1970**, *39*, 217.
67. De Santis, P.; Liquori, A.M. *Biopolymers*, **1971**, *10*, 699.
68. Izumiya, N.; Kato, T.; Aoyagi, H.; Waki, M.; Kondo, M. dans *Synthetic Aspects Of Biologically Active Cyclic Peptides-Gramicidine S and Tyrocidines*; Halsted Press: New York, 1979.
69. Waki, M.; Izumiya, N. dans: *Recent Advances in the Biotechnology of β -Lactams and Microbial Bioactives Peptides*; Kleinkaug, H., van Doren, H, Eds.; Walter de Gruyter: Berlin, 1990; p. 205.
70. Kondejewski, L.H.; Farmer, S.W.; Wishart, D.S.; Kay, C.M.; Hancock, R.E.W.; Hodges, R.S. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1996**, *47*, 460.
71. Lambert, H.P.; O'Grady, F.W. *Antibiotic and Chemotherapy*, 6th Ed.; Churchill Livingstone: Edinburgh, U.K., 1992; pp. 232.
72. Aoyagi, H.; Izumiya, N. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1966**, *14*, 988.
73. Tamaki, M.; Komiya, S.; Akabori, S.; Muramatsu, J. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1997**, *70*, 899.
74. Ohno, M.; Kuromizu, K.; Ogawa, H.; Izumiya, N. *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, *93*, 5251.
75. Sklarov, L.Y.; Shashkova, I.V. *Zh. Obshch. Khim.* **1969**, *39*, 2778.
76. Ando, S.; Nishikawa, H.; Takiguchi, H.; Lee, S.; Sugihara, G. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1147*, 42.
77. Kondejewski, L.H.; Farmer, S.W.; Wishart, D.S.; Kay, C.M.; Hancock, R.E.W.; Hodges, R.S. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 25261.
78. Kondejewski, L.H.; Jelokhani-Niaraki, M.; Farmer, S.W.; Lix, B.; Kay, C.M.; Sykes, B.D.; Hancock, R.E.W.; Hodges, R.S. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 13181.
79. Ovchinnikov, Y.A.; Ivanov, V.T. *Tetrahedron* **1975**, *31*, 2177.
80. Datema, D.P.; Pauls, K.P.; Bloom, M. *Biochemistry* **1986**, *25*, 3796.
81. Pache, W.; Chapman, D.; Hillaby, R. *Biochem. Biophys. Acta* **1972**, *255*, 358.
82. Yonezawa, H.; Okamoto, K.; Tomokiyo, K.; Izumiya, N. *J. Biochem.* **1986**, *100*,

- 1253.
83. Prenner, E.J.; Lewis, R.N.A.H.; McElhaney, R.N. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1462*, 201 et les références citées dans cet article.
84. Higashijima, T.; Miyazawa, T.; Kawai, U.; Nagai, U. *Biopolymers* **1986**, *25*, 2295.
85. Katsu, T.; Kobayashi, H.; Hirota, T.; Fujita, Y. *Biochem. Biophys. Acta* **1986**, *860*, 608.
86. Katsu, T.; Kobayashi, H.; Hirota, T.; Fujita, Y.; Sato, K.; Nagai, U. *Biochem. Biophys. Acta* **1987**, *899*, 159.
87. Prenner, E.J.; Lewis, R.N.A.H.; Kondejewski, L.H.; Hodges, R.S. McElhaney, R.N. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1417*, 211.
88. Zidovetski, R.; Banerjee, U.; Harrington, D.W.; Chan, S.I. *Biochemistry* **1988**, *27*, 5686.
89. Prenner, E.J.; Lewis, R.N.A.H.; Newman, K.C.; Gruner, S.M.; Kondejewski, L.H.; Hodges, R.S. McElhaney, R.N. *Biochemistry* **1997**, *36*, 7906.
90. Verkleij, A.J.; Zwaal, R.F.; Roelofsen, B.; Comfurius, P.; Kastelijn, D, Deenen, L.V. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *323*, 178.
91. Brock, T.D.; Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. *Biology of microorganisms, 7th Ed.*; Brake, D.K., Ed.; Prentice Hall: Englewood Cliffs, N.J., 1994; p. 58.
92. McInnes, C.; Kondejewski, L.H.; Hodges, R.S.; Sykes, B.D. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 14287.
93. Dathe, M.; Wieprecht, T.; Nikolenko, H.; Handel, L.; Maloy, W.L.; MacDonald, K.; Beyermann, M.; Bienert, M. *FEBS Lett.* **1997**, *403*, 208.
94. Oren, Z.; Hong, J.; Shai, Y. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 14643.
95. Lewis, P.N.; Momamy, F.A.; Scheraga, H.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1971**, *68*, 2293.
96. Crawford, J.-L.; Lipscomb, W.N.; Schellman, C.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1977**, *74*, 4126.
97. Rose, G.D.; Gierasch, L.M.; Smith, J.A. dans *Adv. Prot. Chem.*; Anfinsen, C.B. Edsall, J.T. Richards, F.M., Eds.; Academic Press: Orlando, 1985; p.1.
98. Venkatachalam, C.M. *Biopolymers* **1968**, *6*, 1425.

99. Lewis, P.N.; Momamy, F.A.; Scheraga, H.A. *Biochem. Biophys. Acta* **1973**, *303*, 211.
100. Hanessian, S.; McHaughton-Smith, G.; Lombart, H.-G.; Lubell, W.D. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 12789.
101. Ball, J.B.; Alewood, P.F. *J. Mol. Recogn.* **1990**, *3*, 55.
102. Freidinger, R.M.; Veber, D.F.; Perlow, D.S.; Brooks, J.R.; Saperstein, R. *Science*, **1980**, *210*, 656.
103. Nagai, U.; Sato, K. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 647.
104. Genin, M.J.; Johnson, R.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8778.
105. Sato, K.; Nagai, U. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1986**, 1231.
106. Bach, A.C.; Markwalder, J.A.; Ripka, W.C. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *38*, 314.
107. Ripka, W.C.; De Lucca, G.V.; Bach, A.C.; Pottorf, R.S.; Blaney, J.M. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3609.
108. Andreu, D.; Ruiz, S.; Carreño, C.; Alsina, J.; Albericio, F.; Jiménez, M.Á.; de la Figuera, N.; Herranz, R.; García-López, M.T.; González-Muñiz, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10579.
109. Lombart, H.-G.; Lubell, W.D. dans *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*; Pravin T.P. Kaumaya et Robert S. Hodges, Eds.; ESCOM Sci. Pub. B. V.: Leiden, 1996; 291, p. 695.
110. Bodanszky, M. dans *Principles of Peptide Synthesis 2nd Edition*; Springer-Verlag: Berlin, 1993; p. 14.
111. Lombart, H.-G.; Lubell, W.D. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9437.
112. Woody, R.W. *Methods in Enzymology* **1995**, *246*, 34.
113. Kawai, M.; Nagai, U. *Biopolymers* **1978**, *17*, 1549.
114. Lombart, H.-G.; Lubell, W.D. résultats non publiés.
115. Venkatachalam, C.M. *Biopolymers* **1968**, *6*, 1425.
116. Polyak, F.; Lubell, W.D. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5937.
117. Lombart, H.-G.; Lubell, W.D. *Développement d'un nouvel acide aminé indolizidinone et applications en mimétique peptidique*; Thèse de doctorat, Université de Montréal,

1997; p.269.

118. Izumiya, N.; Kato, T.; Aoyagi, H.; Waki, M.; Kondo, M. dans *Synthetic Aspects Of Biologically Active Cyclic Peptides-Gramicidine S and Tyrocidines*; Halsted Press: New York, 1979; p. 62.

Chapitre II: Préambule à la synthèse de peptides.

2.1 Synthèse de peptides sur phase solide (SPPS).

Pour synthétiser nos analogues de la gramicidine S, nous avons employé la synthèse de peptides sur phase solide (SPPS) née en 1963 du travail de Merrifield.¹ Elle consiste à fixer sur un support polymérique insoluble, un acide aminé par sa fonction acide. La fonction amine de ce premier acide aminé est ensuite déprotégée pour réagir avec la fonction acide d'un deuxième acide aminé utilisé en excès. On se débarrasse des réactifs qui n'ont pas réagi par une simple filtration du polymère, qu'on lave avec un solvant. La séquence déprotection et acylation est répétée jusqu'à l'assemblage complet du peptide. Ce dernier est ensuite clivé de la résine et purifié. Un exemple représentatif est ici illustré pour la synthèse d'un peptide sur support polymérique insoluble qui emploie la résine de Wang² (Figure 18).

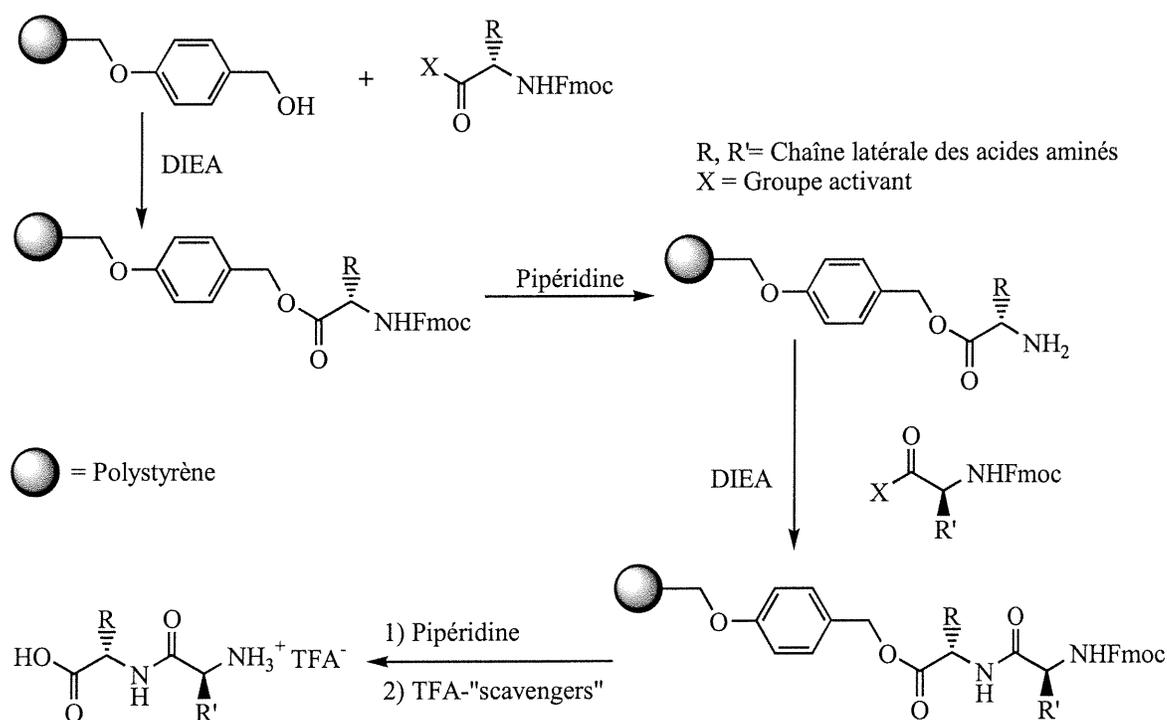


Figure 18: Synthèse d'un dipeptide sur résine de Wang.

Le lien amide est formé en faisant réagir l'amine comme nucléophile sur une forme activée de l'acide (électrophile). Plusieurs méthodes d'activation de l'acide ont été développées depuis le début du vingtième siècle. Mentionnons les chlorures d'acide³, les azidures d'acyle^{4,5}, les anhydrides mixtes^{6,7} ou symétriques^{8,9,10} et les nombreux esters activés¹¹ (Figure 19).

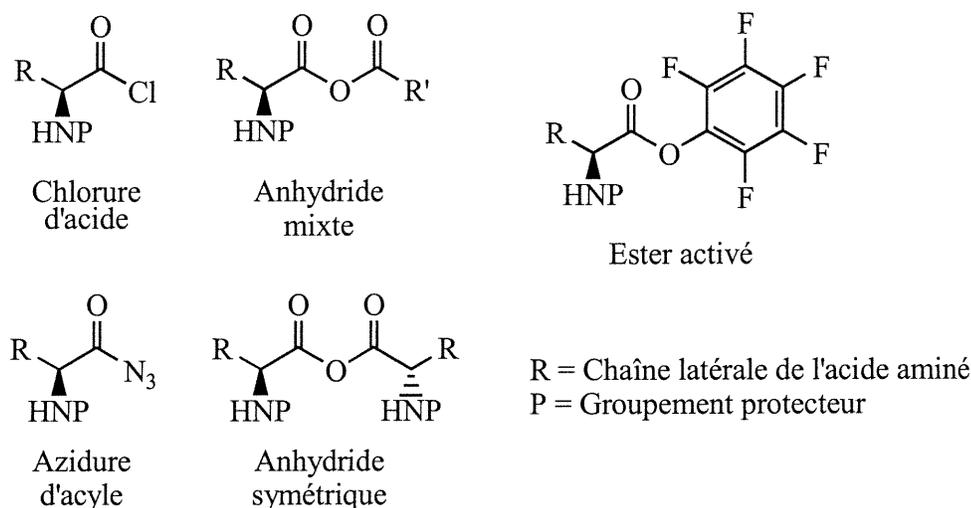


Figure 19: Formes activées des acides aminés représentatives.

Plusieurs agents de couplage ont été conçus pour faire la synthèse des peptides. Les plus fréquemment utilisés sont les carbodiimides^{12,13}, les sels de phosphonium^{14,15} et d'aminium^{16,17} (Figure 20).

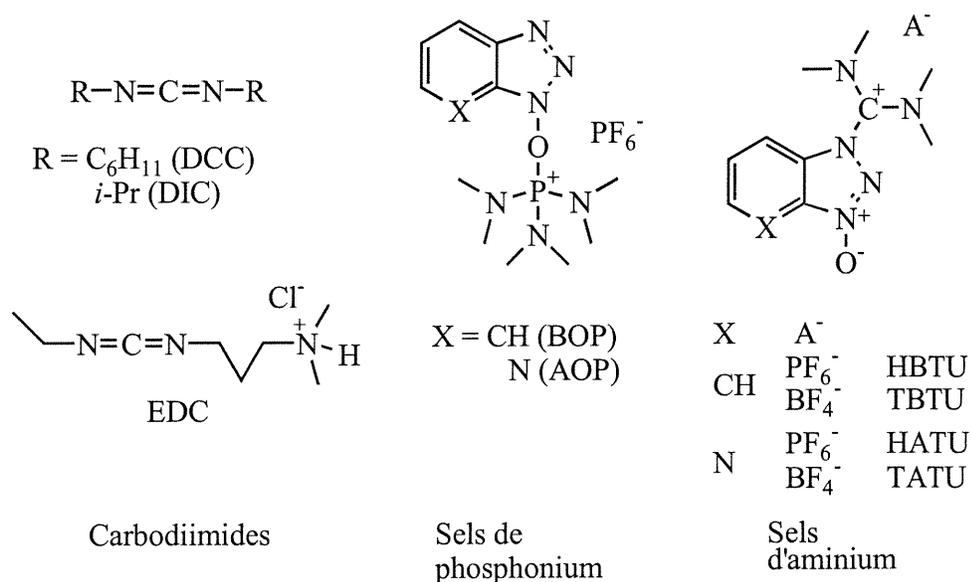


Figure 20: Agents de couplage représentatifs.

Les carbodiimides sont en général employés en conjonction avec la 1-hydroxybenzotriazole pour minimiser la racémisation de l'espèce activée. Les agents de couplage sont simplement mis en présence de l'amine et de l'acide à coupler avec une amine tertiaire (e.g. diisopropyléthylamine). De plus, cette technique n'engendre que très peu de racémisation de l'espèce activée.^{18,19,20} Dans ce projet, la méthode employée pour construire les liens amides sur support solide a été l'utilisation de l'agent de couplage TBTU (*N*-[(1*H*-benzotriazol-1-yl)(diméthylamino)méthylène]-*N*-méthylmethanaminium tétrafluoroborate *N*-oxide). Il génère des produits de réaction moins toxiques que les sels de phosphonium (tétraméthylurée versus HMPA, hexaméthylphosphoramide) et est beaucoup plus soluble dans le DMF, que nous employons pour faire les couplages peptidiques.

2.2 Synthèse en solution d'acides aminés protégés pour la SPPS.

2.2.1 Synthèse des acides aminés indolizidinone (IAA).

Les diastéréoisomères (3*S*, 6*S*, 9*S*)-**64** et (3*S*, 6*R*, 9*S*)-**64** des acides aminés indolizidinone ont été synthétisés par une procédure connue dans la littérature²¹ qui débute avec le glutamate de diméthyle (**57**, Figure 21). La protection de la fonction amine a d'abord été accomplie par réaction du glutamate de diméthyle **57** avec le 9-bromo-9-phénylfluorène²² **58** en présence de carbonate de potassium. Le *N*-(PhF)glutamate de diméthyle **59** obtenu a ensuite été soumis aux conditions de la condensation de Claisen pour donner le 4-carbométhoxy-5-oxo-2,8-bis[*N*-(PhF)amino]azélate de diméthyle **60**.

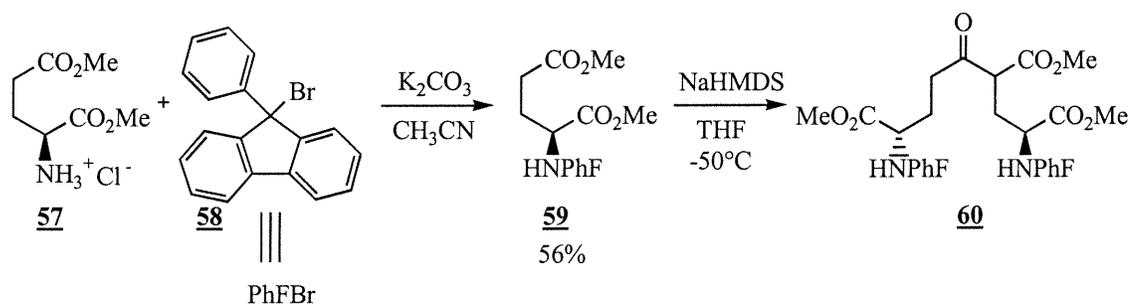


Figure 21: Synthèse du 4-carbométhoxy-5-oxo-2,8-bis[*N*-(PhF)amino]azélate de diméthyle (60**).**

L'hydrolyse et la décarboxylation en position 4 du β -céto ester **60** avec l'hydroxyde de sodium nous ont permis d'obtenir le diacide **61**, qui a été réestérifié en utilisant l'iodure de méthyle et le carbonate de potassium pour donner la cétone symétrique **62** (Figure 22). Celle-ci a été produite dans un rendement de 48% à partir du glutamate de diméthyle **59**.

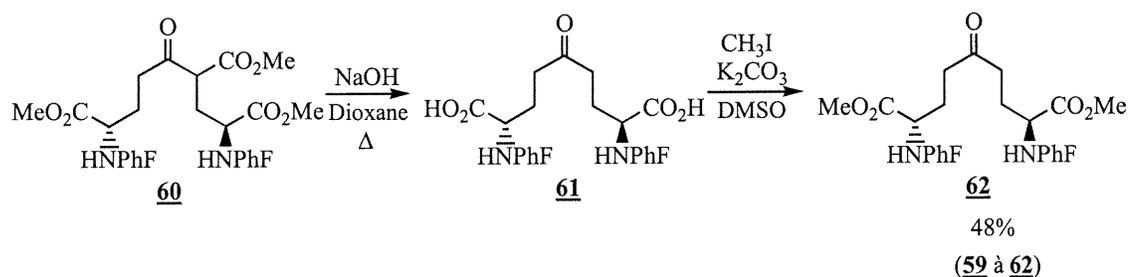


Figure 22: Synthèse du 5-oxo-2,8-bis[*N*-(PhF)amino]azélate de diméthyle (62**).**

Les conditions d'amination réductrice/cyclisation au lactame appliquées à **62** ont conduit à la formation d'un mélange diastéréomérique d'esters méthyliques des acides aminés indolizidinone **63** (Figure 23). Le palladium sur charbon a été utilisé comme catalyseur avec de l'hydrogène (11 atm), de l'acide acétique et de l'éthanol. Les acides aminés indolizidinone **63** ont été séparés par chromatographie sur gel de silice une fois la fonction amine protégée avec le groupe protecteur Boc en utilisant le di-*tert*-butyldicarbonate et la triéthylamine. Le ratio diastéréomérique obtenu pour (6*S*)-**64** et (6*R*)-**64** est de 82:18 et les rendements de 36% et 8% respectivement à partir de **62**.

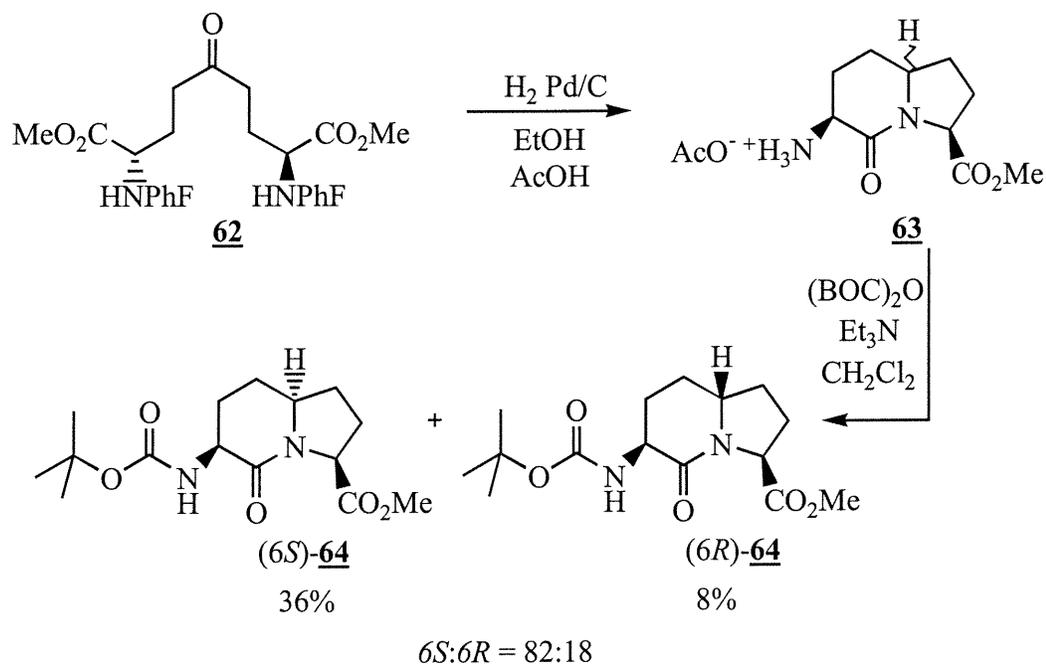


Figure 23: Synthèse des (3*S*, 6*S*, 9*S*)- et (3*S*, 6*R*, 9*S*)-2-oxo-3-[*N*-(Boc)amino]-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate de méthyle (64**).**

Les dérivés Fmoc, qui sont aussi utilisés pour la synthèse sur support solide, ont été obtenus après l'hydrolyse des esters (6*S*)- et (6*R*)-**64** séparément avec l'hydroxyde de sodium (96% et 73% de rendement respectivement) et l'enlèvement subséquent du groupe protecteur Boc avec l'acide chlorhydrique barboté dans le dichlorométhane (95% et 85% de rendement respectivement). Le groupe protecteur Fmoc a ensuite été introduit avec des rendements de 90% et 92% en utilisant le 9-fluorénylméthyle chloroformate et le carbonate de sodium dans un mélange d'eau et de dioxane (Figure 24)²³.

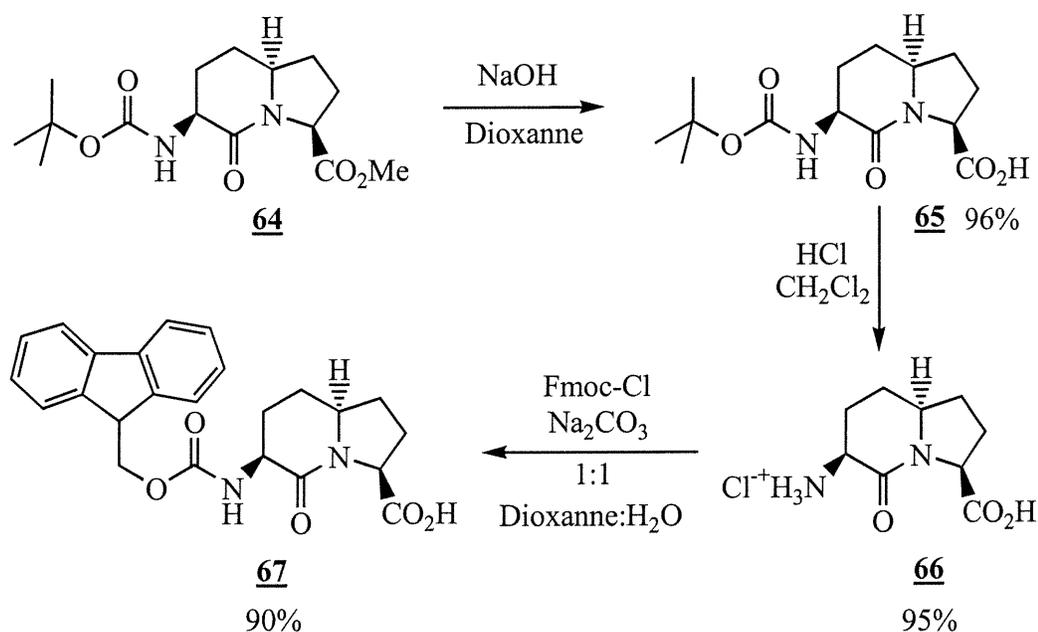


Figure 24: Synthèse de l'acide (3*S*, 6*S*, 9*S*)-2-oxo-3-[*N*-(Fmoc)-amino]-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylique (**67**).

Les acides *N*-(Fmoc)aminé **67** et *N*-(Boc)aminé **65**, ainsi que leurs diastéréoisomères 6*R*, ont été préparés afin d'explorer les deux techniques principales pour la synthèse de peptides sur support solide.

2.2.2 Synthèse du chlorhydrate de l'ester allylique de la *N*- α -Fmoc-L-Lys.

Le chlorhydrate de l'ester allylique de la *N*- α -Fmoc-L-Lys²⁴ **70**, dont nous avons besoin pour faire la synthèse du peptide **55**, a été synthétisé à partir de la *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Boc-L-Lys **68** placée à reflux dans le bromure d'allyle en présence de DIEA (diisopropyléthylamine, Figure 25). L'ester allylique **69** obtenu a ensuite été traité avec l'acide chlorhydrique dans le dichlorométhane pour enlever sélectivement le groupe protecteur Boc. Le protocole original utilise de l'acide trifluoroacétique et conduit à la formation d'une huile. L'utilisation d'acide chlorhydrique rend la purification du produit final plus aisée en donnant un solide blanc qui peut être purifié efficacement par trituration avec de l'hexane.

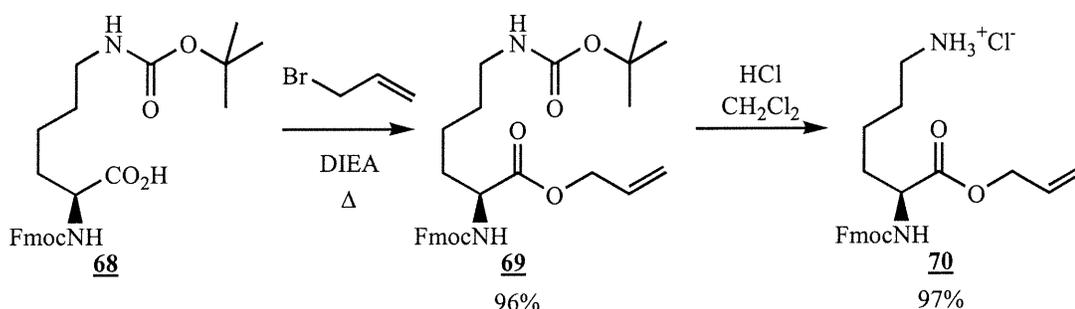


Figure 25: Synthèse du chlorhydrate de l'ester allylique de la *N*- α -Fmoc-L-Lys (**70**).

En conclusion, les acides aminés indolizidinone nécessaires à la synthèse de nos analogues de la GS ont été aisément obtenus en utilisant la méthode de synthèse en solution publiée dans la littérature.²¹ Des déprotections et protections simples nous ont permis d'obtenir tous les dérivés désirés. La lysine protégée adéquatement pour l'incorporer sur le support solide a également été obtenue facilement en utilisant une version modifiée d'une procédure déjà publiée.²⁴ Avec ces molécules en main, nous avons ensuite entrepris la synthèse de nos analogues.

2.3 Références du chapitre II.

1. Merrifield, R.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
2. Wang, S.-S. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328.
3. Fischer, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1903**, *36*, 2094.
4. Curtius, T. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1902**, *35*, 3226.
5. Sieber, P.; Riniker, B.; Brugger, M.; Kamber, B.; Rittel, W. *Helv. Chim. Acta.* **1970**, *53*, 2135.
6. Albertson, N.F. *Org. React.* **1962**, *12*, 157.
7. Tarbell, D.S. *Acc. Chem. Res.* **1969**, *2*, 296.
8. Weygand, F.; Huber, P.; Weiss, K. *Z. Naturf.* **1967**, *22b*, 1084.
9. Weygand, F.; di Bello, C. *Z. Naturf.* **1969**, *24b*, 314.
10. Khorana, H.G. *Chem. Ind.* **1955**, *35*, 1087.
11. Bodanszky, M. dans *Principles of Peptide Synthesis 2nd Edition*; Springer-Verlag: Berlin, 1993; p. 29.
12. Sheehan, J.C.; Hess, G.P. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067.
13. Rich, D.H.; Singh, J. dans *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*; Gross, E., Meienhofer, J., Ed.; Academic Press: New York, 1979; *1*, 241.
14. Castro, B.; Dormoy, J.R.; Evin, G.; Selve, C. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *14*, 1219.
15. Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205.
16. Dourtoglou, V.; Ziegler, J.-C.; Gross, B. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *15*, 1269.
17. Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillessen, D. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927.
18. Bodanszky, M. dans *Principles of Peptide Synthesis 2nd Edition*; Springer-Verlag: Berlin, 1993; p. 170.
19. Romonoff, T.T.; Goodman, M. *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 281.
20. Carpino, L.A.; Elfaham, A.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2279.
21. Lombart, H.-G.; Lubell, W.D. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9437.
22. Jamison, T.F.; Lubell, W.D.; Dener, J.M.; Krisché, J.M.; Rapoport, H. *Org. Synth.* **1993**, *71*, 220.
23. Carpino, L.A.; Han, G.Y. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404.

24. Alsina, J.; Rabanal, F.; Giralt, E.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 9633.

**Chapitre III: Synthèse d'analogues de la
gramicidine S sur la résine de Wang.**

3.1 Synthèse de peptides par cyclisation sur la résine de Wang.

Les peptides cycliques, tels que la gramicidine S, après avoir été assemblés entièrement sur un support solide, clivés et purifiés, nécessitent en plus d'être cyclisés en solution et purifiés de nouveau. Un des moyens qui a été utilisé pour contourner cette situation est de se servir d'une fonctionnalité (amine, acide, alcool, thiol, etc.) présente dans une chaîne latérale du peptide pour le lier sur le support solide.¹ Le peptide est assemblé et cyclisé sur support solide pour être par la suite relâché en solution et purifié. Une résine avec un bas niveau de substitution en acide aminé (< 0,8 mmol de peptide par gramme de résine) est utilisée afin de profiter du phénomène de pseudo-dilution.^{2,3} Ceci évite la formation d'oligomères rencontrée fréquemment dans les cyclisations en solution.^{4,5,6}

C'est cette méthode d'ancrage par la chaîne latérale que nous nous sommes initialement proposés d'utiliser pour obtenir nos analogues de la gramicidine S. L'ancrage de la lysine sur le support solide par une fonction carbamate est une méthode établie dans la littérature.⁷ Elle est compatible avec la synthèse de peptides utilisant le groupement Fmoc, enlevé en utilisant la pipéridine, pour protéger l'amine α . Afin que la fonction acide de la lysine demeure cachée tout au long de l'assemblage de nos peptides, elle est protégée d'une manière orthogonale⁸ sous forme d'ester allylique. La fonction acide est déprotégée à la fin avec un catalyseur au palladium en présence d'un nucléophile.

Pendant le déroulement de ce projet, un article d'Andreu et al⁹ décrivant la synthèse d'analogues de la gramicidine S comportant un peptidomimétique IBTM est paru dans la littérature (Figure 26). Les résidus IBTM ont été conçus afin de stabiliser des tours β .

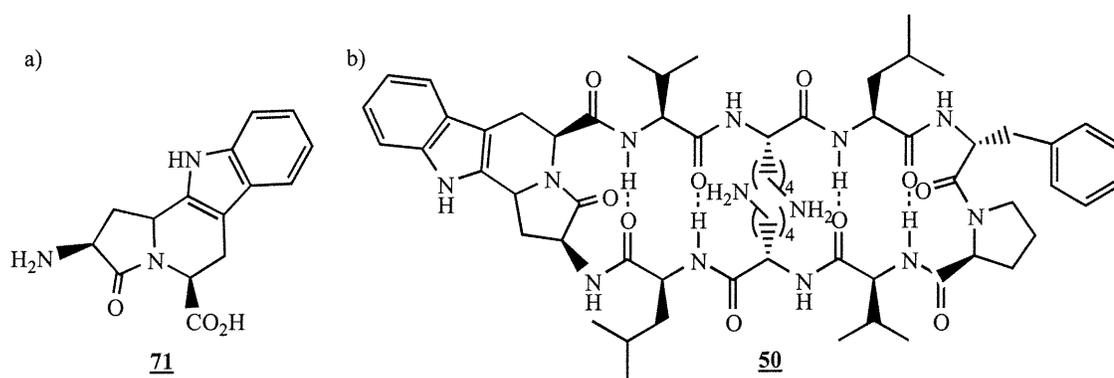


Figure 26: Peptidomimétique IBTM (71) a) et analogue [IBTM^{4,5}]GS (50) b).

La méthode de synthèse de peptide qu'ils ont employée fait appel à l'ancrage de la lysine par sa chaîne latérale sur une résine carbonate. Cette résine est générée en faisant réagir le disuccinimidylcarbonate sur la résine 3-[4-(hydroxyméthyle)phénoxy]propionyl-Ala-MBHA. Ils ont ensuite appliqué un protocole de synthèse de peptide avec des acides *N*-(Fmoc)aminés. Le peptide a été ensuite déprotégé et cyclisé sur la résine avec PyAOP, HOAt, DIEA dans le DMF. Le clivage a été réalisé avec un mélange (90:5:3:2) de TFA:thioanisole:éthanedithiol:anisole. Cette méthode leur a permis de synthétiser la gramicidine S et quelques analogues avec des rendements finals faibles (Tableau X).

Tableau X: Peptides synthétisés par la stratégie d'ancrage de la lysine ou de l'ornithine par sa chaîne latérale et rendements obtenus.

NOM	SÉQUENCE	RENDEMENT
Gramicidine S	cyclo(Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro) ₂	2%
[Lys ^{2,2'}]GS	cyclo(Val-Lys-Leu-D-Phe-Pro) ₂	2%
[IBTM(11bR) ^{4,5}]GS	cyclo(Val-Lys-Leu-D-Phe-Pro-Val-Lys-Leu-IBTM(11bR))	11%
[IBTM(11bS) ^{4,5}]GS	cyclo(Val-Lys-Leu-D-Phe-Pro-Val-Lys-Leu-IBTM(11bS))	9%

3.2 Synthèse sur support solide.

3.2.1 Ancrage de la lysine sur la résine de Wang.

La synthèse peptidique sur support solide de **55** a été essayée en utilisant la résine de Wang **72** (Figure 27). La résine a été placée en présence de 4-nitrophénylchloroformate et de 4-méthylmorpholine pour donner la résine carbonate **73**.¹⁰ Cette réaction a été confirmée en comparant le spectre infrarouge photoacoustique^{11,12} de la résine de Wang (alcool) avec le spectre de **73**. L'élongation OH centrée à 3400 cm^{-1} est disparue de ce dernier alors que l'élongation C=O caractéristique du carbonate est apparue à 1766 cm^{-1} .¹³

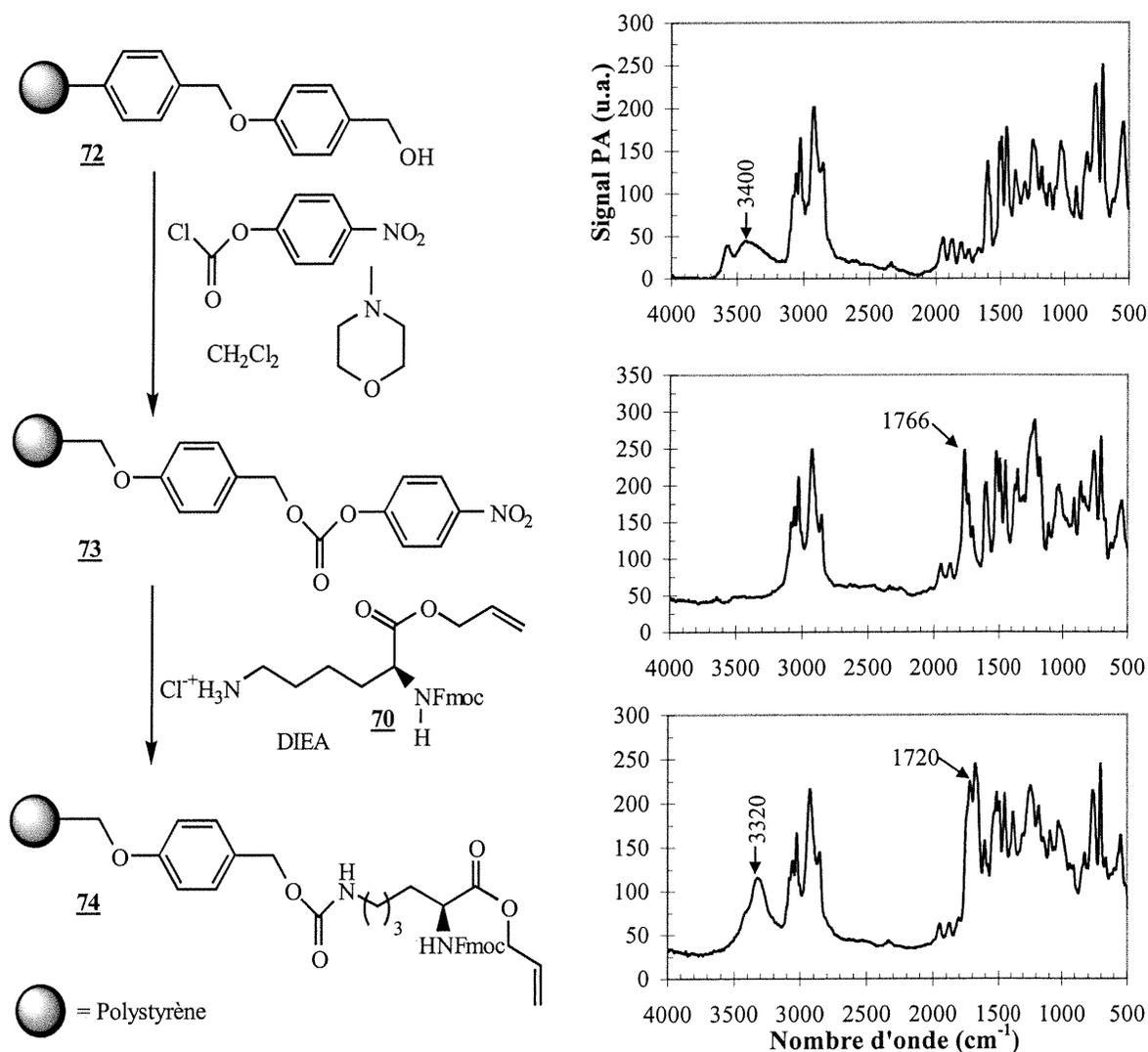


Figure 27: Synthèse et spectres photoacoustiques des résines **72-74**.

Le chlorhydrate de l'ester allylique de la *N*- α -Fmoc-L-Lys a été introduit sur le support solide en le faisant réagir avec la résine **73** en présence de DIEA. Dans ce cas aussi, les spectres infrarouges photoacoustiques ont confirmé la réaction par l'apparition de l'élongation NH centrée à 3320 cm^{-1} , l'apparition de l'élongation C=O du carbamate à 1720 cm^{-1} et la disparition de l'élongation C=O du carbonate à 1766 cm^{-1} .¹³

3.2.2 Synthèse de peptides sur la résine de Wang.

La lysine, liée sur le support solide, a ensuite été soumise à une séquence de couplages avec les acides *N*-(Fmoc)aminés. Ce protocole est décrit dans le Tableau XI.

Tableau XI: Protocole utilisé pour le couplage des acides *N*-(Fmoc)aminés.

ÉTAPE	RÉACTIFS	TEMPS
Déprotection de l'amine	1:4 Pipéridine:DMF (2x)	10 min
Lavage	DMF	-
Déprotection de l'amine	1:4 Pipéridine:DMF (2x)	10 min
Lavage	DMF (6x)	-
Couplage d'un acide aminé	Fmoc-aa-OH (200 mol%), TBTU (200 mol%), HOBt (200 mol%), DIEA (450 mol%), DMF	2 h
Lavage	DMF (3x), CH ₂ Cl ₂ (3x), Et ₂ O	-
Acétylation	Ac ₂ O, DMF, DIEA	2 h
Lavage	DMF (3x), CH ₂ Cl ₂ (3x)	-

Les couplages et les lavages ont été faits avec 10 mL de solvant par gramme de résine. L'efficacité des couplages est déterminée par le test quantitatif à la ninhydrine de Kaiser.¹⁴ Dans le cas d'un couplage complet (>99%), la séquence de couplages a été poursuivie. L'acétylation des amines libres a été réalisée lorsque les rendements de couplages ont été inférieurs à 99% (minimum de 97%), en utilisant une solution 1:1 Ac₂O:DMF en présence de DIEA. Dans le cas des acides aminés indolizidinone, les modifications suivantes aux conditions de couplage ont été apportées: Fmoc-IAA(6*S*)-OH (110 mol%), TBTU (150 mol%), HOBt (110 mol%) et DIEA (300 mol%).

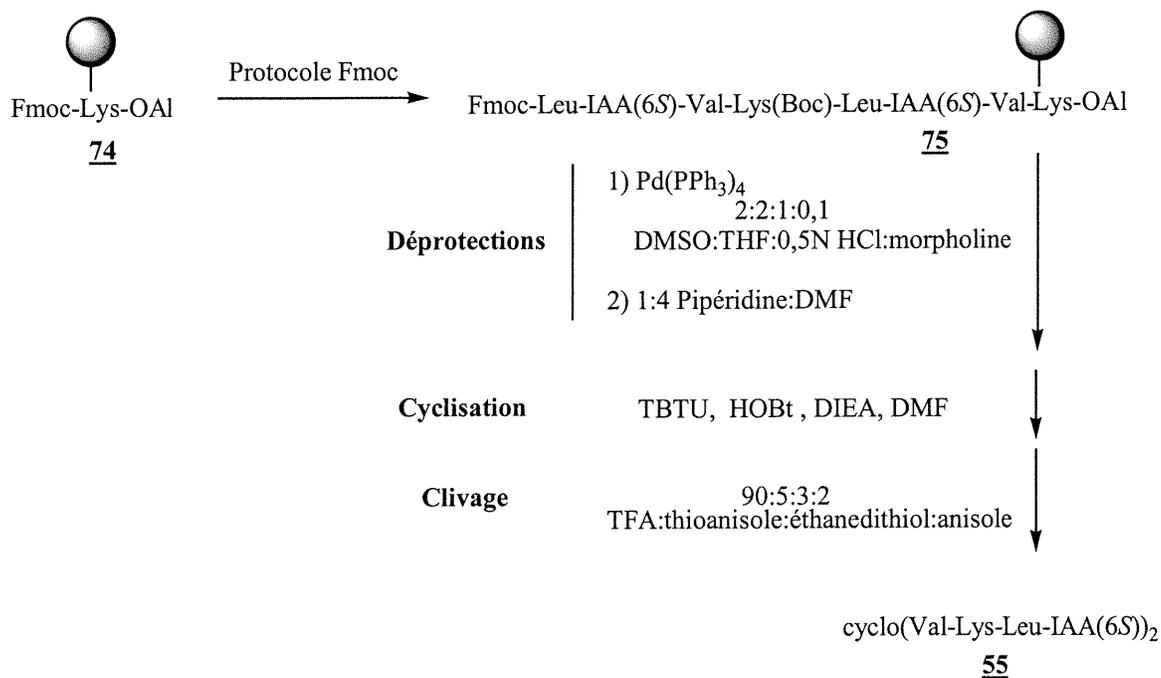


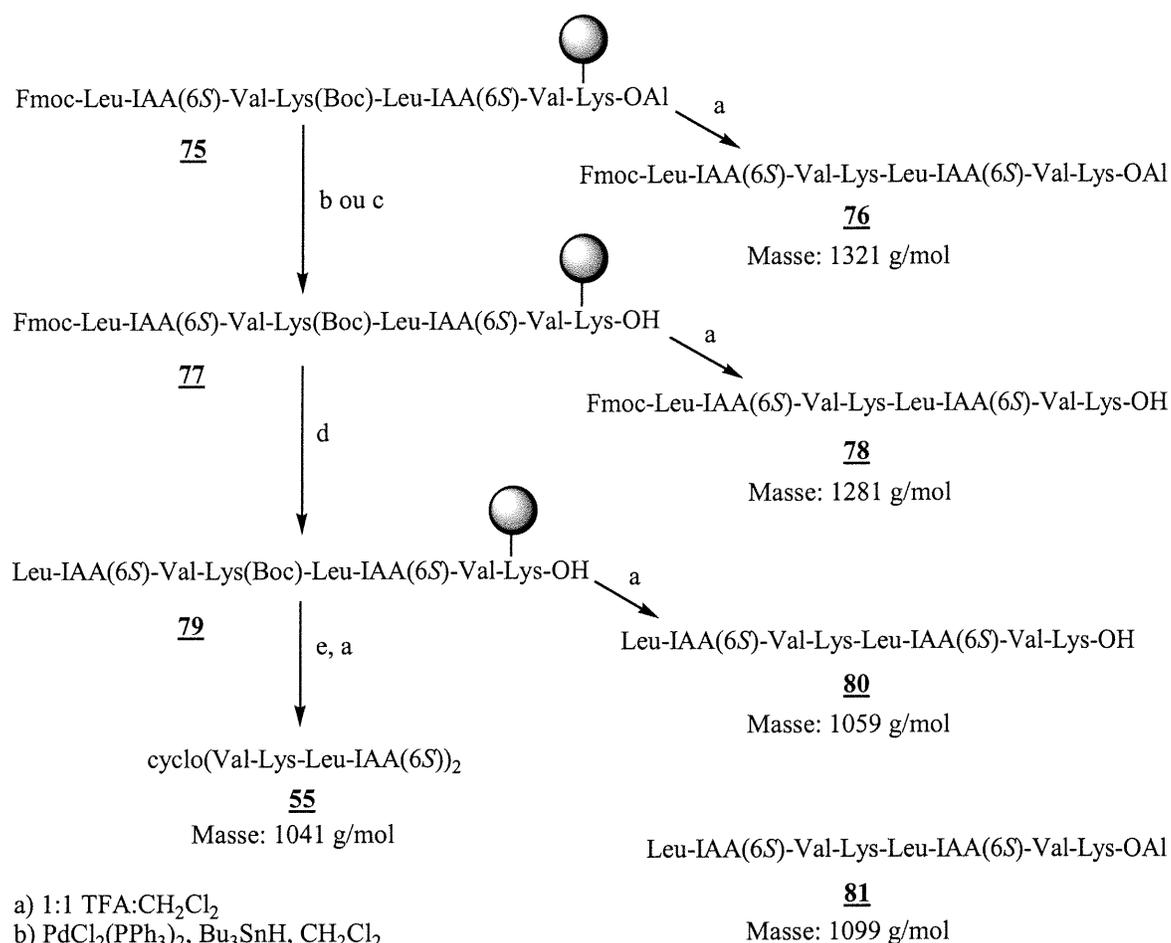
Figure 28: Protocole de la synthèse sur support solide de cyclo(Val-Lys-Leu-IAA(6S))₂ (55).

La déprotection de l'ester allylique a été effectuée en utilisant le $\text{Pd(PPh}_3)_4$ dans un mélange 2:2:1 de DMSO:THF:0,5N HCl¹⁵ avec de la morpholine pendant 13 heures (Figure 28). Le groupement protecteur Fmoc a ensuite été enlevé selon la méthode décrite précédemment (Tableau XI). La cyclisation a été effectuée avec TBTU, HOBt et DIEA dans le DMF pendant deux heures. Après avoir lavé et séché la résine, le test de Kaiser (utilisé pour déterminer la quantité d'amines libres) a donné un résultat de 10% d'amines libres. La résine a été soumise de nouveau aux conditions de cyclisation et un résultat de 6% a été obtenu pour le test de Kaiser. Le clivage du peptide de la résine a été effectué avec de l'acide trifluoroacétique dans un cocktail de « scavengers »: 90:5:3:2 TFA:thioanisole:éthanedithiol:anisole¹⁶ pendant deux heures. Malgré le fait que le spectre de masse du produit brut après clivage a démontré la bonne masse (masse calculée: 1041,3, masse obtenue FAB MS: 1042 [MH]⁺), aucun des pics majeurs isolés par HPLC ne s'est avéré être le bon produit.

3.2.3 Investigation de la stratégie de synthèse de peptides sur la résine de Wang.

Cette stratégie n'ayant pas donné le produit escompté, nous avons entrepris de déterminer les facteurs qui étaient en cause. L'insertion de la lysine sur le support solide, qui avait été confirmée par spectrométrie infrarouge photoacoustique, n'apparaissait pas comme une étape problématique. La présence du peptide en croissance sur la résine avait été vérifiée par le clivage du tripeptide Lys-Val-IAA, qui a été isolé et caractérisé par RMN ^1H et spectrométrie de masse. Toutefois le rendement de clivage en utilisant le cocktail 90:5:3:2 TFA:thioanisole:éthanedithiol:anisole n'était que de 31%. Afin de déterminer de meilleures conditions de clivage pour notre peptide, un système modèle (résine **74**, Figure 27) a été soumis à trois conditions de clivage différentes: 75:25 TFA:CH₂Cl₂¹⁷, 50:50 TFA:CH₂Cl₂ et 95:5 TFA:H₂O¹⁸ pendant deux heures. Les rendements obtenus sont de 68%, 69% et 57% respectivement, tels que déterminés par la masse d'acide aminé clivé. Le mélange 50:50 TFA:CH₂Cl₂ a été employé pour tous les clivages subséquents puisqu'il a offert le meilleur rendement. Pour examiner les dernières étapes de la stratégie, nous avons utilisé le peptide linéaire sur la résine, auquel nous avons fait subir plusieurs réactions (Figure 29) et analysé les produits issus du clivage de la résine par spectrométrie de masse et HPLC (Tableau XII).

Vu la similarité des stratégies et des molécules à synthétiser, nous avons initialement utilisé la même méthode qu'Andreu et al⁹ pour déprotéger les esters allyliques. Toutefois, cette méthode n'est pas nécessairement la meilleure pour effectuer cette transformation.^{19,20} C'est pourquoi nous avons étudié l'efficacité de deux autres méthodes (voir Figure 29) pour déprotéger les esters allyliques dans le cas de notre système.



- a) 1:1 TFA:CH₂Cl₂
 b) PdCl₂(PPh₃)₂, Bu₃SnH, CH₂Cl₂
 c) Pd(PPh₃)₄, morpholine, THF
 d) 1:4 pipéridine:DMF
 e) TBTU, HOBt, DIEA, DMF

Figure 29: Exploration des conditions de clivage, déprotection et cyclisation de (**75**).

Tableau XII: Masses et temps de rétention (t_R) obtenus des séquences de réactions.

Séquence	Peptide attendu	Masse obtenue (MS)	HPLC t _R (min)	Peptide(s) obtenu(s)
a	76	1321	18,20	76
b, a	78	1281, 1321	16,76; 18,29	78, 76
c, a	78	1060, 1282	8,09; 16,76	80, 78
b, d, a	80	1059, 1099	5,72; 8,09	80, 81
b, d, e, a	55	1041, 1075, 1100	9,03; 7,81	55, 81
c, d, e, a	55	1041, 1059	Pics multiples	55, 80

En traitant la résine **75** avec TFA:CH₂Cl₂, nous avons obtenu un produit très propre par HPLC possédant la masse attendue pour le peptide linéaire. La façon dont nous avons procédé pour les expériences subséquentes est la suivante. Un échantillon de la résine **75** a été soumis aux conditions de déprotection des esters allyliques (Bu₃SnH, PdCl₂(PPh₃)₂, CH₂Cl₂).¹⁹ Ensuite, une partie de **77** a été traitée avec la pipéridine pour enlever le groupement protecteur Fmoc. Puis, une partie de **79** a été soumise aux conditions de cyclisation (HOBt, TBTU, DIEA, DMF). Finalement, une portion des résines **77** et **79** (avant et après cyclisation) ont été traitées séparément avec TFA:CH₂Cl₂ et les produits obtenus ont été analysés par HPLC et spectrométrie de masse. Pour fin de comparaison, la séquence c, d, e, a (Figure 29) a été faite avec une technique de déprotection d'ester allylique qui utilise la morpholine et le Pd(PPh₃)₄ dans le THF.

Comme on peut le constater dans le Tableau XII, l'utilisation de Bu₃SnH et de PdCl₂(PPh₃)₂¹⁹ n'amène pas la libération complète de la fonction acide de l'acide aminé C-terminal (séquence b, a). On observe par HPLC la formation d'un mélange du peptide attendu et du peptide protégé. Évidemment, on obtient encore un mélange si on enlève le groupe protecteur Fmoc et qu'on cyclise. Par contre, l'utilisation de morpholine et de Pd(PPh₃)₄²¹ déprotège complètement la fonction ester de la lysine liée au support solide (séquence c, a). On note aussi la perte partielle du groupe protecteur Fmoc, déprotégé par la morpholine. Ce produit secondaire ne nous a pas inquiété puisque l'étape suivante avant la cyclisation a consisté effectivement à enlever le groupe Fmoc du peptide.

Ayant en main cette méthode fiable pour déprotéger l'ester allylique de la lysine, nous avons donc procédé à la libération de l'amine terminale et soumis le peptide aux conditions de cyclisation. La spectrométrie de masse a confirmé la présence du produit cyclique dans le mélange de clivage. Toutefois, le chromatogramme (HPLC) de ce mélange a révélé une multitude de produits. Après isolation de chaque pic et analyse par spectrométrie de masse, aucun ne s'est avéré être le bon produit.

Compte tenu du fait que nous n'avons pas pu isoler le produit désiré et que la méthode employée par Andreu et al⁹ ne leur ont permis d'obtenir que des rendements finals de 9% et 11% de leurs analogues incorporant IBTM(11bS) et IBTM(11bR) (basé sur la

substitution initiale de la résine), nous avons décidé de nous tourner vers une autre méthode de synthèse qui a été estimée plus efficace.

3.3 Références du chapitre III.

1. Kates, S.A.; Solé, N.A.; Albericio, F.; Barany, G. *Solid-Phase Synthesis Of Cyclic Peptides* dans *Peptides: Design, Synthesis and Biological Activity*; Chap. 4; Basava C., Anantharamaiah, G.M., Eds.; Birkhäuser: Boston, 1994; p. 39.
2. Albericio, F.; Barany, G.; Fields, G.B.; Hudson, D.; Kates, S.A.; Lyttle, M.H.; Solé, N.A dans *Peptides 1992, Proceedings of the 22nd European Peptide Symposium*; Schneider, C.H., Eberle, A.N., Eds; Escom: Leiden, 1993; p. 191.
3. Mazur, S.; Jayalekshmy, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 677.
4. Hamada, Y.; Kato, S.; Shiori, T. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *27*, 3223.
5. König, W.; Geiger, R. dans *Perspectives in Peptide Chemistry*; Eberle, A, Geiger, R, Wieland, T., Eds.; Basel: Karger, 1981; p. 31.
6. Schwyzer, R.; Gorup, B. *Helv. Chim. Acta.* **1958**, *41*, 2199.
7. Pande, C.S.; Gupta, N.; Bhardwaj, A. *J. Appl. Polymer Sci.* **1995**, *56*, 1127.
8. Barany, G.; Merrifield, R.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 7363.
9. Andreu, D.; Ruiz, S.; Carreño, C.; Alsina, J.; Albericio, F.; Jiménez, M.Á.; de la Figuera, N.; Herranz, R.; García-López, M.T.; González-Muñiz, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10579.
10. Dressman, B.A.; Spangle, L.A.; Kaldor, S.W. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 937.
11. Rosencwaig, A. dans *Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy*; Wiley: New York, 1980; p. 192.
12. Gosselin, F.; Di Renzo, M.; Ellis, T.H.; Lubell, W.D. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7980.
13. Pande, C.S.; Gupta, N.; Bhardwaj, A. *J. Appl. Polymer Sci.* **1995**, *56*, 1127.
14. Kaiser, E.; Colescott, R.L.; Cook, P.I. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595.
15. Lloyd-Williams, P.; Jou, G.; Albericio, F.; Giralt, E. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4207.
16. Alsina, J.; Rabanal, F.; Giralt, E.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9633.
17. Ho, C.Y.; Kukla, M.J. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2799.
18. Andreu, D.; Ruiz, S.; Carreño, C.; Alsina, J.; Albericio, F.; Jiménez, M.Á.; de la Figuera, N.; Herranz, R.; García-López, M.T.; González-Muñiz, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10579. Voir le glossaire pour la définition d'orthogonal.

19. Lloyd-Williams, P.; Merzouk, A.; Guibé, F.; Albericio, F.; Giralt, E. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4437.
20. Kuyl-Yeheskiely, E.; Tromp, C.M.; Lefeber, A.W.M.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 6515.
21. Kunz, H.; Waldmann, H.; Unverzagt, C. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1985**, *26*, 493-497.

**Chapitre IV: Synthèse d'analogues de la gramicidine S sur la résine
d'oxime.**

4.1 Synthèse de peptides par cyclisation sur la résine d'oxime.

N'ayant pas été capables d'isoler le peptide désiré en utilisant la stratégie avec la résine de Wang, nous nous sommes tournés vers une autre méthode qui emploie la résine d'oxime. La synthèse de la GS et de certains de ses analogues sur résine *p*-nitrobenzophénone oxime (résine d'oxime)^{1,2} a déjà été documentée dans la littérature.^{3,4,5,6,7,8} La stratégie développée par Ösapay et ses collègues^{3,4} consiste en l'assemblage du peptide linéaire sur la résine d'oxime, la déprotection de l'amine terminale et cyclisation par aminolyse intramoléculaire avec dégagement de la résine concomitant (Figure 30).

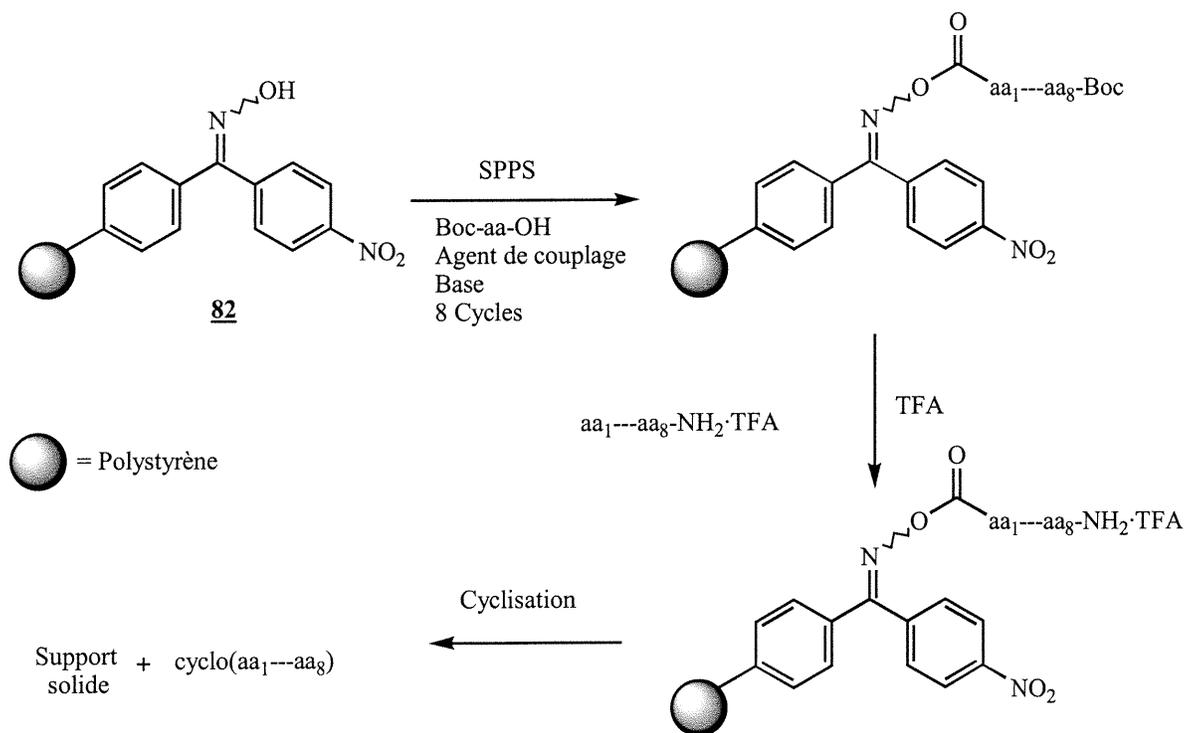


Figure 30: Synthèse et cyclisation d'un peptide sur la résine d'oxime.^{3,4}

Ce protocole a été utilisé pour synthétiser plusieurs peptides cycliques dont certains exemples sont donnés dans le Tableau XIII.

Tableau XIII: Peptides cycliques synthétisés sur résine d'oxime et rendements obtenus.

NOM	SÉQUENCE ^a	RENDEMENT	RÉFÉRENCE
Tyrocidine A	Cyclo(Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro-Phe-D-Phe-Asn-Glu-Tyr)	22%	3
	Cyclo(Val-Orn-Leu-D-Pya-Pro) ₂	45%	6
	Cyclo(Hfv-Orn-Leu-D-Phe-Pro) ₂	11%	7
	Cyclo(Val-Bpa-Leu-D-Phe-Pro) ₂	46%	8

a: Pya est pyrénylalanine, Hfv est hexafluorovaline et Bpa est 5-bipyridylalanine.

4.2 Synthèse d'analogues de la GS incorporant des IAA.

4.2.1 Ancrage de la leucine sur la résine d'oxime.

Le choix du premier acide aminé à ancrer sur le support solide a été fait en considérant les protocoles de la littérature précédente qui imitent la voie biosynthétique pour la gramicidine S.⁹ Dans celle-ci, l'amine de la phénylalanine attaque la leucine activée comme un thioester.¹⁰ La Boc-Leu-OH a été couplée sur la résine d'oxime avec le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) comme agent de couplage en présence d'EACNOx (éthyl-2-(hydroxyimino)-2-cyanoacétate) comme additif pour minimiser la racémisation (Figure 31).¹¹ La quantité de leucine ancrée sur le support solide a été déterminée en clivant la Boc-Leu d'une portion du support solide avec la propylamine (valeur obtenue: 0,7 mmol/g, voir section expérimentale).¹² Le traitement de la résine avec l'anhydride acétique et la DIEA a été effectué par la suite pour acétyler toute fonction oxime restante.

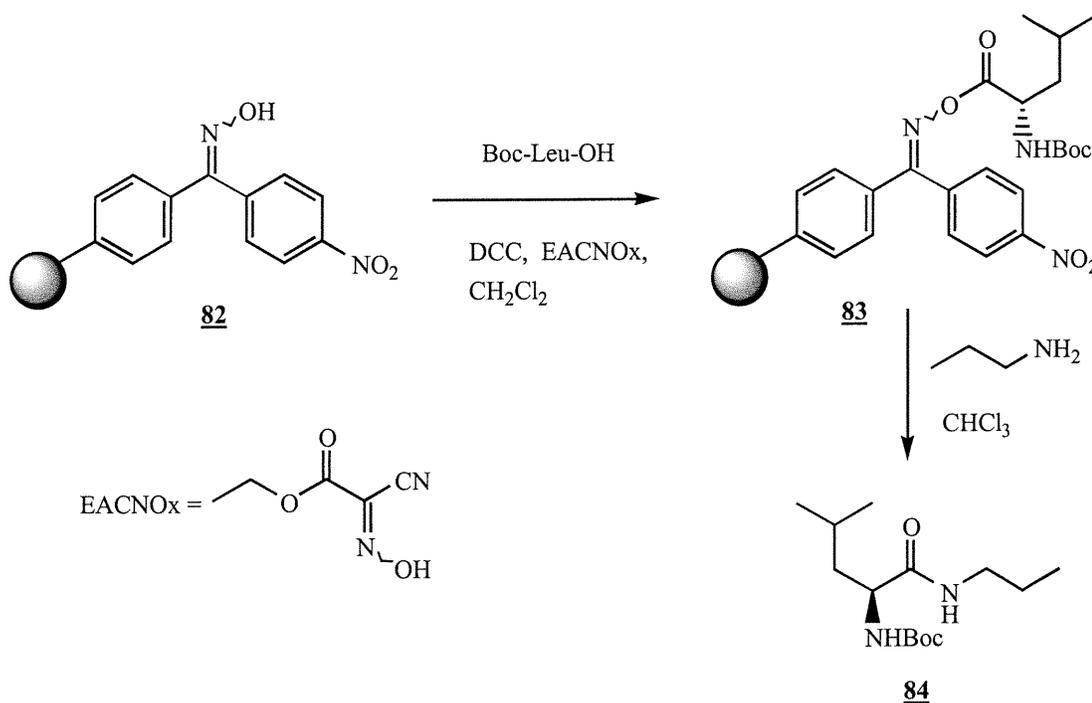


Figure 31: Ancrage de la leucine et détermination de la substitution de la résine.

4.2.2 Synthèse de peptides sur la résine d'oxime.

L'élongation des peptides sur support solide a été effectuée en appliquant à la résine **83** une séquence de couplages avec les acides *N*-(Boc)aminés (Tableau XIV).

Tableau XIV: Protocole utilisé pour le couplage des acides *N*-(Boc)aminés.

ÉTAPE	RÉACTIFS	TEMPS
Déprotection de l'amine	1:3 TFA:CH ₂ Cl ₂ (3x)	1 min, 2 x 15 mins
Lavage	CH ₂ Cl ₂	-
Neutralisation	1:9 DIEA:CH ₂ Cl ₂ (2x)	2 mins
Lavage	CH ₂ Cl ₂ (1x), DMF (1x)	-
Couplage d'un acide aminé	Boc-aa-OH (200 mol%, 0,1 M), TBTU (200 mol%), DIEA (400 mol%), DMF	2 h (1 ou 2x)
Lavage	DMF (4x), CH ₂ Cl ₂ (4x)	-
Acétylation	Ac ₂ O, DIEA, CH ₂ Cl ₂	1 h
Lavage	CH ₂ Cl ₂ (5x)	-

Un test qualitatif à la ninhydrine de Kaiser nous a permis de déterminer l'efficacité de chaque couplage.¹³ Pour les couplages ayant donné un test positif, la résine a été soumise une deuxième fois aux conditions de couplage du Tableau XIV. Pour les acides aminés indolizidinone, les modifications suivantes aux conditions de couplage ont été apportées: Boc-IAA-OH (110 mol%), TBTU (200 mol%) et DIEA (400 mol%).

Une fois que le peptide linéaire a été synthétisé sur la résine d'oxime, son amine terminale a été déprotégée avec TFA, neutralisée avec la DIEA et placée dans des conditions de cyclisation (Figure 32).¹⁴ Deux conditions de cyclisation différentes ont été expérimentées.^{4,15} D'abord, cyclo(Val-Lys(Z)-Leu-IAA(6S))₂ **87** a été cyclisé dans le DMF en présence de DIEA et d'AcOH. En second lieu, cyclo(Val-Orn(Z)-Leu-IAA(6R))₂ **88** a été cyclisé dans le CH₂Cl₂ comme solvant en présence de DIEA et d'AcOH. Ce sont les conditions utilisant la DIEA, l'AcOH et le DMF comme solvant pour cyclo(Val-Lys(Z)-Leu-IAA(6S))₂ **87** qui nous ont donné le meilleur rendement final en peptide (10% basé sur la substitution initiale de la résine). Les conditions utilisant la DIEA et le CH₂Cl₂ comme solvant pour cyclo(Val-Orn(Z)-Leu-IAA(6R))₂ **88** n'ont donné que 2% de rendement. Les chromatogrammes des produits bruts après cyclisation pour cyclo(Val-Lys(Z)-Leu-IAA(6S))₂ **87** et cyclo(Val-Orn(Z)-Leu-IAA(6R))₂ **88** montrent un produit prédominant et moins d'impuretés que le produit brut issu de la stratégie avec la résine de Wang (voir annexe 2 pages xxxvii, lvii et lx). Les peptides cycliques protégés sont ensuite déprotégés en utilisant le palladium noir en présence d'hydrogène et d'acide chlorhydrique dans un mélange méthanol:eau (9:1) et sont finalement purifiés par HPLC.

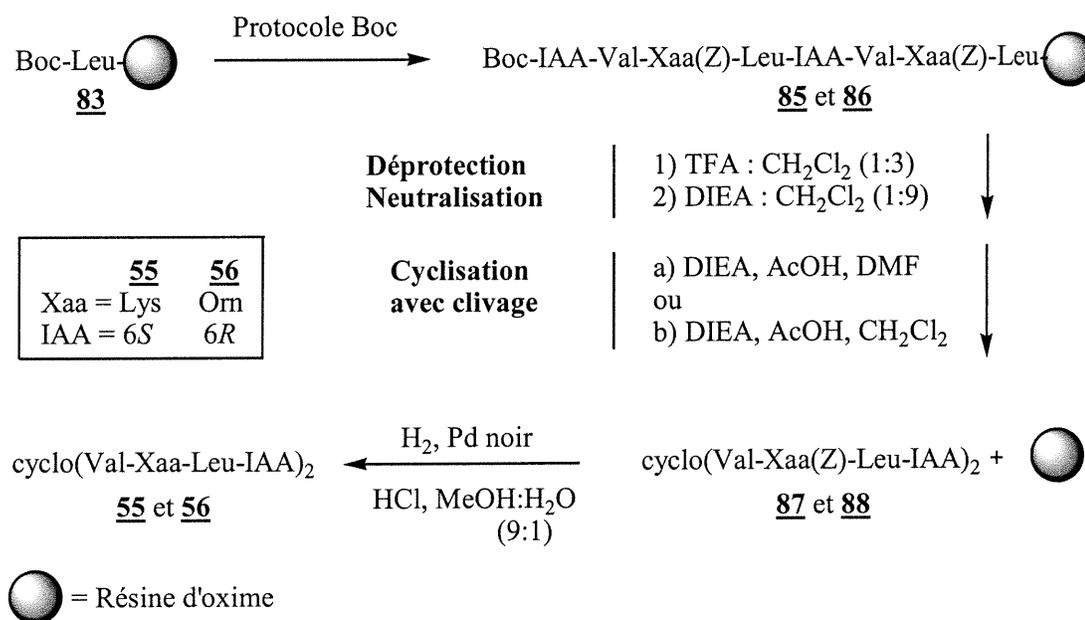


Figure 32: Synthèse d'analogues de la GS par cyclisation sur la résine d'oxime.

Dans le cas de cyclo(Val-Lys-Leu-IAA(6*S*))₂ **55**, nous avons obtenu 15,5 mg du peptide après purification, soit un rendement global de 10% basé sur la substitution initiale de la résine. Pour cyclo(Val-Orn-Leu-IAA(6*R*))₂ **56**, le rendement global est de 2% (8,8 mg). Les chromatogrammes des produits purs sont présentés dans la Figure 33. Dans les deux cas, la pureté du produit final dépasse 95% par HPLC analytique (Figure 33). Dans le cas du chromatogramme pour cyclo(Val-Orn-Leu-IAA(6*R*))₂, les pics avant sept minutes sont dus à l'injection et la mauvaise soustraction du blanc.

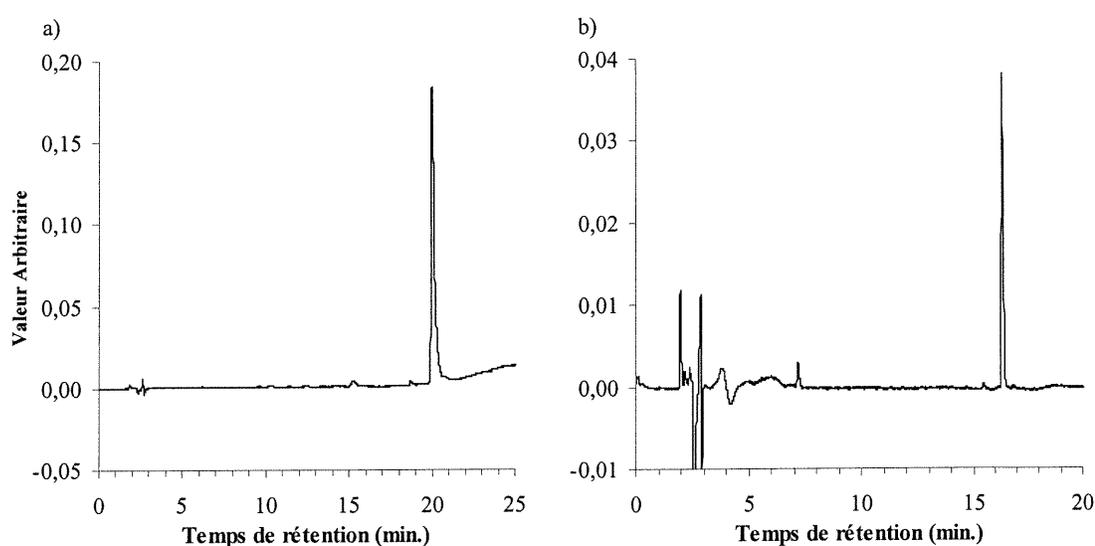


Figure 33: Chromatogrammes de [Lys^{2,2'}, IAA(6*S*)^{4-5,4'-5'}]GS (55**) et [IAA(6*R*)^{4-5,4'-5'}]GS (**56**) obtenus après purification.**

a) [Lys^{2,2'}, IAA(6*S*)^{4-5,4'-5'}]GS **55** b) [IAA(6*R*)^{4-5,4'-5'}]GS **56**

Les valeurs correctes pour la masse des deux peptides sont obtenues par spectrométrie de masse, soit 1041 et 1013 pour [Lys^{2,2'}, IAA(6*S*)^{4-5,-5'}]GS **55** et [IAA(6*R*)^{4-5,4'-5'}]GS **56** respectivement.

Cette méthode nous a permis d'obtenir les peptides voulus dans des rendements faibles mais avec une bonne pureté. Le succès de cette stratégie de synthèse peut être dû au support solide et à l'endroit dans sa séquence primaire où le peptide est cyclisé. En effet, le rapprochement des extrémités du peptide lors de la cyclisation grâce au réseau de ponts

d'hydrogène du feuillet β du peptide est nettement favorisé en cyclisant au *C* terminal de la leucine. Dans la stratégie avec la résine de Wang, où l'on cyclise au *C* terminal de la lysine, les extrémités du peptide à cycliser ont une plus grande liberté de mouvement puisque la lysine se trouve entre les deux acides aminés impliqués dans les liaisons hydrogène (voir Figure 6, p.11).

4.3 Références du chapitre IV.

1. DeGrado, W.F.; Kaiser, E.T. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1295.
2. DeGrado, W.F.; Kaiser, E.T. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 13258.
3. Ösapay, G.; Profit, A.; Taylor, J.W. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6121.
4. Ösapay, G.; Bouvier, M.; Taylor, J.W. dans *Techniques in Protein Chemistry II*; Villafranca, J.J., Ed.; Academic Press: New York, 1991; p. 221.
5. Mihara, H.; Hayashida, J.; Hasegawa, H.; Ogawa, H.I.; Fujimoto, T.; Nishino, N. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2.* **1997**, 517.
6. Xu, M.; Nishino, N.; Mihara, H.; Fujimoto, T.; Izumiya, N. *Chem. Lett.* **1992**, 191.
7. Arai, T.; Imachi, T.; Kato, T.; Ogawa, H.I.; Fujimoto, T.; Nishino, N. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1996**, *69*, 1383.
8. Nishino, N.; Arai, T.; Hayashida, J.; Ogawa, H.; Yamamoto, H.; Yoshikawa, S. *Chem. Lett.* **1994**, 2435.
9. Izumiya, N.; Kato, T.; Aoyagi, H.; Waki, M.; Kondo, M. dans *Synthetic Aspects Of Biologically Active Cyclic Peptides-Gramicidine S and Tyrocidines*; Halsted Press: New York, 1979; p.49.
10. Laland, S.G.; Frøyshov, Ø.; Gilhuus-Moc, C.; Zimmer, T.L. *Nature (London) New Biol.* **1972**, *239*, 43.
11. Kaiser, E.T.; Mihara, H.; Laforet, G.A.; Kelly, J.W.; Walters, L.; Findeis, M.A.; Sasaki, T. *Science* **1989**, *243*, 188.
12. Voyer, N.; Lavoie, A.; Pinette, M.; Bernier, J. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 355.
13. Kaiser, E.; Colescott, R.L.; Cook, P.I. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595.
14. Gisin, B.F.; Merrifield, R.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 3102.
15. Nishino, N.; Hayashida, J.; Arai, T.; Mihara, H.; Ueno, Y.; Kumagai, H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1996**, 939.

Chapitre V: Analyse conformationnelle.

5.1 Dichroïsme circulaire.

Le dichroïsme circulaire est une technique spectroscopique permettant d'obtenir de l'information qualitative sur les structures secondaires d'un peptide. La présence dans un peptide d'une hélice α , d'un feuillet β , d'un tour β^1 , d'une pelote statistique, etc., donne lieu à un spectre caractéristique.²

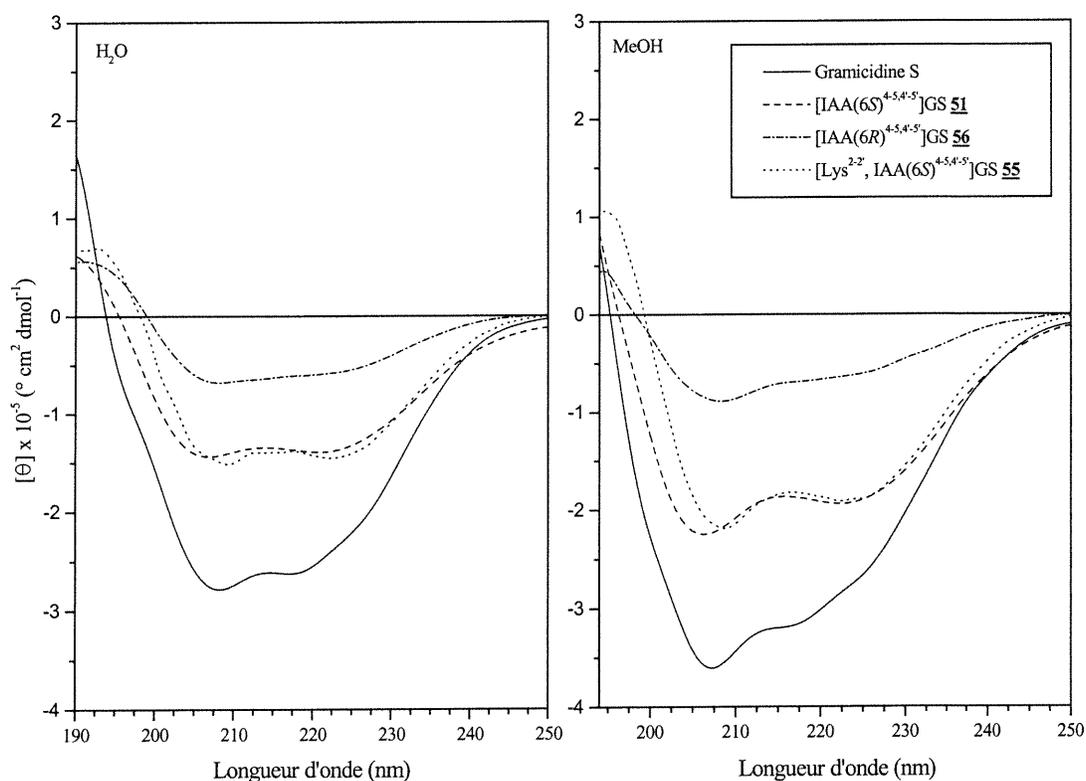


Figure 34: Spectres de dichroïsme circulaire dans l'eau et le méthanol de la GS et ses analogues.

Les spectres de dichroïsme circulaire pour la Gramicidine S et les analogues **51**, **55** et **56** sont présentés dans la Figure 34.³ Dans le méthanol, les caractéristiques spectrales des analogues sont similaires à celles de la Gramicidine S. Les quatre spectres présentent un maximum négatif aux alentours de 207 nm et un épaulement négatif à environ 222 nm. Dans l'eau on voit aussi les mêmes maxima mais dans les spectres des analogues, ils ont

des intensités presque égales. La ressemblance entre le spectre de la GS et ceux des analogues **51** et **55** suggère que ces peptides adoptent des conformations similaires dans ces deux solvants. Toutefois, l'analogue [IAA(6R)^{4-5,4'-5'}]GS **56** semble avoir une conformation moins proche de celle de la GS que **51** et **55**. Son spectre de dichroïsme circulaire a des maxima moins prononcés et moins intenses dans l'eau et le méthanol. Les intensités plus faibles des courbes de dichroïsme circulaire des analogues peuvent être le résultat de l'absence des chromophores aromatiques dans ces molécules.

5.2 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire.

5.2.1 Assignation des résonances RMN.

Les analogues de la gramicidine S synthétisés ont une symétrie C_2 . Ceci a comme résultat qu'il y a deux fois moins de signaux RMN que de protons. Pour assigner chaque proton à son déplacement chimique dans les spectres RMN 1H des analogues **51**, **55** et **56**, la méthodologie RMN standard de Wüthrich⁴ a été employée. Les systèmes de spin des acides aminés ont d'abord été identifiés à partir des spectres TOCSY et COSY comme démontré pour valine dans la Figure 35 et pour leucine dans la Figure 36. Ceci nous a permis d'identifier les protons NH, α et ceux des chaînes latérales, incluant les protons aux positions 3, 4 et 5 des IAA. Les signaux des protons aux positions 6, 7, 8 et 9 des IAA, ont été assignés en se servant en plus des spectres HMQC et NOESY (voir annexe 2).

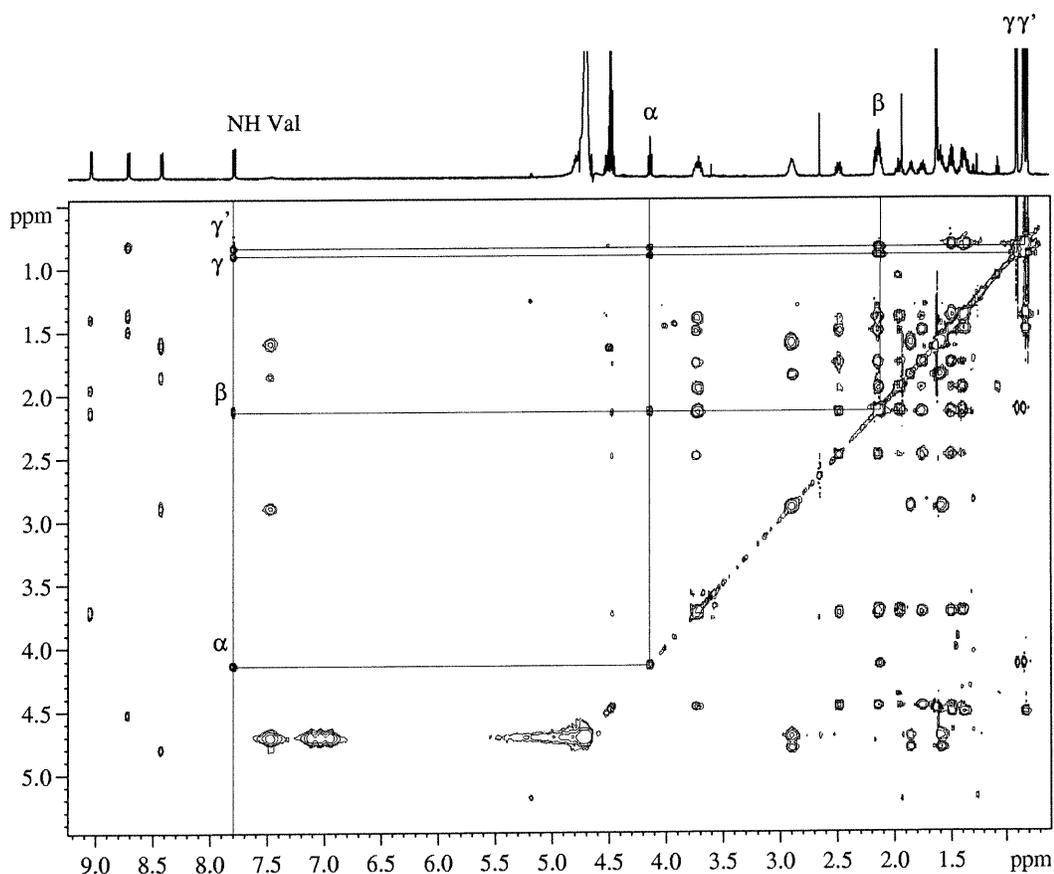


Figure 35: Assignement des signaux de valine dans le spectre TOCSY de $[IAA(6R)^{4-5,4'-5'}]GS$ (**56**).

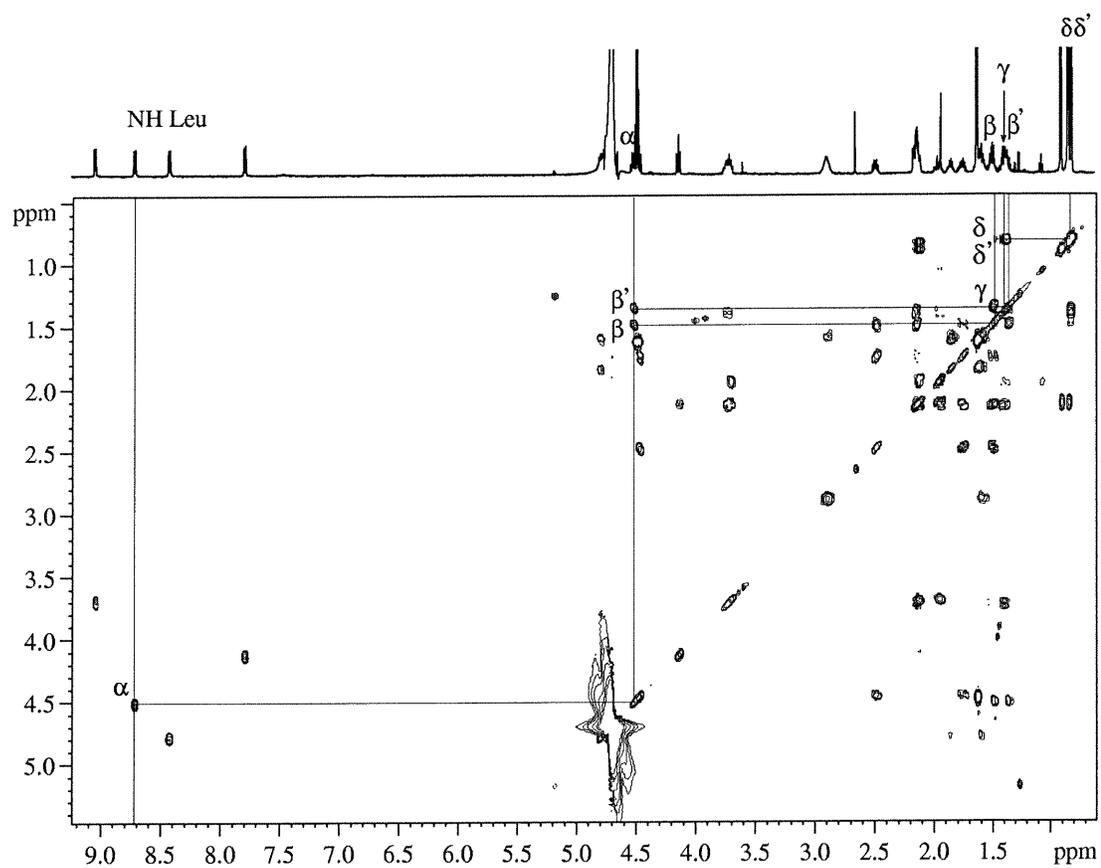


Figure 36: Assignement des signaux de leucine dans le spectre COSY de $[IAA(6R)^{4-5,4'-5'}]GS$ (56).

5.2.2 Assignation séquentielle.

Ensuite, l'assignation séquentielle a pu être réalisée en se servant des données des spectres NOESY. Cela consiste à relever les effets nOe qui sont caractéristiques pour des paires de protons dans un polypeptide (Figure 37). Les effets nOe sont possibles si deux atomes d'hydrogène sont situés à moins de 5 Å. Il est établi que d_{AB} est la distance entre les atomes d'hydrogène A et B des acides aminés de la séquence peptidique dans la direction *N* vers *C*.⁵ Plus cette distance est faible, plus l'effet nOe est grand. Il est possible d'établir la séquence d'un peptide en se servant de ces effets nOe.⁴ L'azote en position 1 des acides aminés indolizidinone (voir Figure 38) est sous forme d'amine tertiaire et donc, n'a pas de proton NH. Nous avons utilisé le proton à la fusion des cycles (6) pour relever les effets nOe qui sont caractéristiques dans le cas des acides aminés indolizidinone. L'intensité des effets nOe a été établie en intégrant les pic croisés (voir section expérimentale).

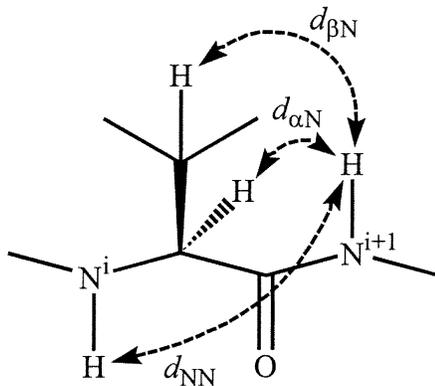


Figure 37: Connectivités nOe séquentielles d'un segment polypeptidique.

Les données des effets nucléaires d'Overhauser pour les analogues **51**, **55** et **56** (Figure 38) sont ici rassemblées sous forme de tableau et graphiquement (Tableau XV et Figure 39 à 41). Des nOe forts pour $d_{\alpha N}$ et plus faibles pour d_{NN} sur plusieurs acides aminés consécutifs sont indicatifs de la présence d'un feuillet β .⁶ Les données pour les résidus valine, lysine ou ornithine et leucine de [IAA(6S)^{4-5,4'-5'}]GS **51**, [Lys^{2,2'}, IAA(6S)^{4-5,4'-5'}]GS **55** et [IAA(6R)^{4-5,4'-5'}]GS **56** concordent bien avec ce fait.

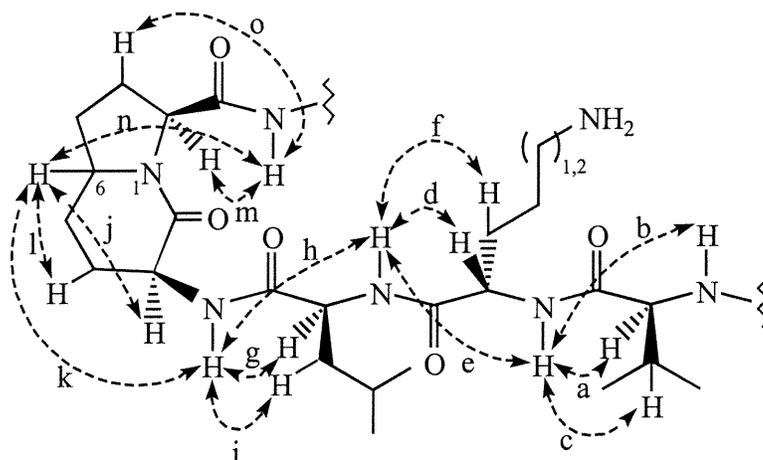


Figure 38: Connectivités nOe séquentielles des analogues 51, 55 et 56.

Tableau XV: Intensité des connectivités nOe séquentielles de chaque acide aminé des analogues de la Gramicidine S.

ACIDE AMINÉ	CONNECTIVITÉ nOe	INTENSITÉ DE L'EFFET NUCLÉAIRE OVERHAUSER (nOe)		
		[IAA(6S) ^{4-5,4'-5'}]GS (<u>51</u>)	[Lys ^{2,2'} , IAA(6S) ^{4-5,4'-5'}]GS (<u>55</u>)	[IAA(6R) ^{4-5,4'-5'}]GS (<u>56</u>)
Valine	a $d_{\alpha N}$	Forte	Forte	Forte
	b d_{NN}	Faible	Faible	Faible
	c $d_{\beta N}$	Moyenne	Moyenne	Moyenne
Orn ou Lys	d $d_{\alpha N}$	Forte	Forte	Forte
	e d_{NN}	Faible	Moyenne	Faible
	f $d_{\beta N}$	Moyenne	Forte	-
Leu	g $d_{\alpha N}$	Forte	Forte	Forte
	h d_{NN}	Faible	Moyenne	Faible
	i $d_{\beta N}$	Moyenne	Moyenne	-
IAA-lactame	j $d_{\alpha 6}$	Moyenne	Faible	*
	k d_{N6}	Faible	Faible	-
	l $d_{\beta 6}$	*	*	*
IAA-proline	m $d_{\alpha N}$	Faible	*	Faible
	n d_{6N}	Faible	Faible	Faible
	o $d_{\beta N}$	Moyenne	Moyenne	-

*: chevauchement avec un autre pic croisé -: absence de pic croisé

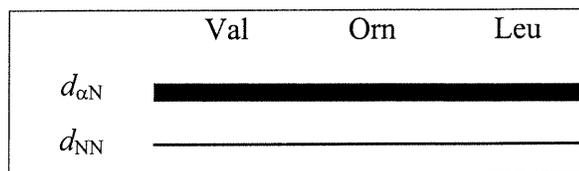


Figure 39: Connectivités nOe séquentielles ($d_{\alpha N}$ et d_{NN}) de [IAA(6S)^{4-5,4'-5'}]GS (51).

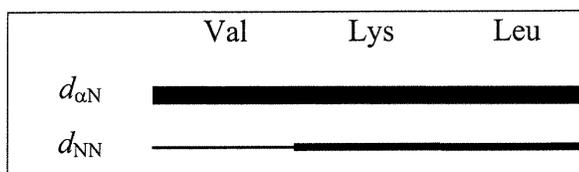


Figure 40: Connectivités nOe séquentielles ($d_{\alpha N}$ et d_{NN}) de [Lys^{2,2'}, IAA(6S)^{4-5,4'-5'}]GS (55).

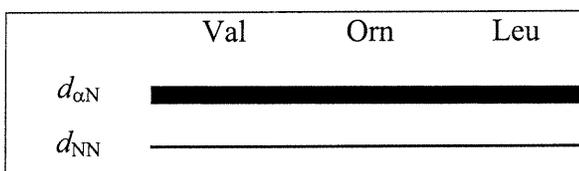
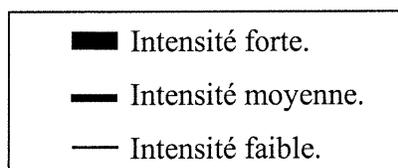


Figure 41: Connectivités nOe séquentielles ($d_{\alpha N}$ et d_{NN}) de [IAA(6R)^{4-5,4'-5'}]GS (56).



Pour [IAA(6*S*)^{4-5,4'-5'}]GS **51** il est clair à partir de la Figure 39 que les nOe $d_{\alpha N}$ sont forts pour les acides aminés valine, ornithine et leucine et les nOe d_{NN} sont faibles pour ces trois mêmes acides aminés. Dans le cas de [Lys^{2,2'}, IAA(6*S*)^{4-5,4'-5'}]GS **55** on retrouve un patron semblable à la différence que les d_{NN} pour ornithine et leucine sont d'intensité moyenne. Finalement, [IAA(6*R*)^{4-5,4'-5'}]GS **56** démontre aussi le même comportement que [IAA(6*S*)^{4-5,4'-5'}]GS **51**. Des trois peptides, [IAA(6*S*)^{4-5,4'-5'}]GS **51** et [IAA(6*R*)^{4-5,4'-5'}]GS **56** se conforment le mieux au patron attendu pour un feuillet β .

5.2.3 Assignation non-séquentielle.

Les feuilletts β ont aussi pour caractéristique des distances entre les deux brins suffisamment faibles pour que des pics croisés en nOe soient observables.⁷ Plusieurs de ces connectivités non-séquentielles ont effectivement été relevées (Figures 42 à 47 et Tableaux XVI à XVIII).

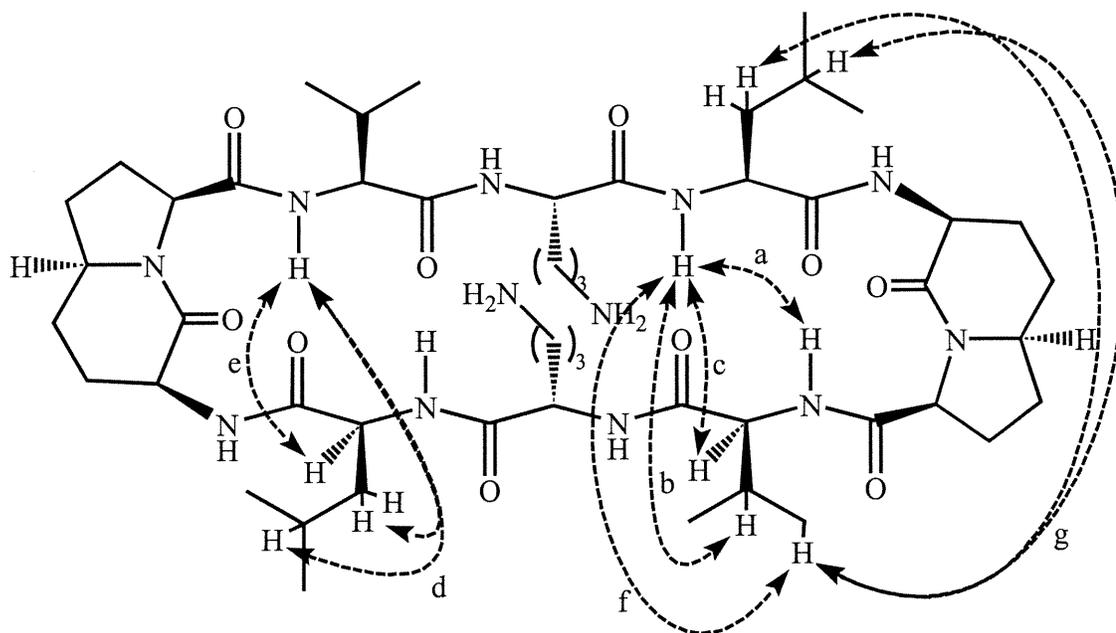


Figure 42: Connectivités nOe non-séquentielles pour [IAA(6S)^{4-5,4'-5'}]GS (51).

Tableau XVI: Connectivités nOe non-séquentielles pour [IAA(6S)^{4-5,4'-5'}]GS (51).

CONNECTIVITÉS nOe NON-SÉQUENTIELLES.			
CONNECTIVITÉ	RÉSIDU i	RÉSIDU j	INTENSITÉ
a	NH Leucine	NH Valine	Faible
b	NH Leucine	C β H Valine	Moyenne
c	NH Leucine	C α H Valine	Faible
d	NH Valine	C β γ H Leucine	Faible
e	NH Valine	C α H Leucine	Faible
f	NH Leucine	C γ H Valine	Faible
g	C β γ H Leucine	C γ H Valine	Moyenne

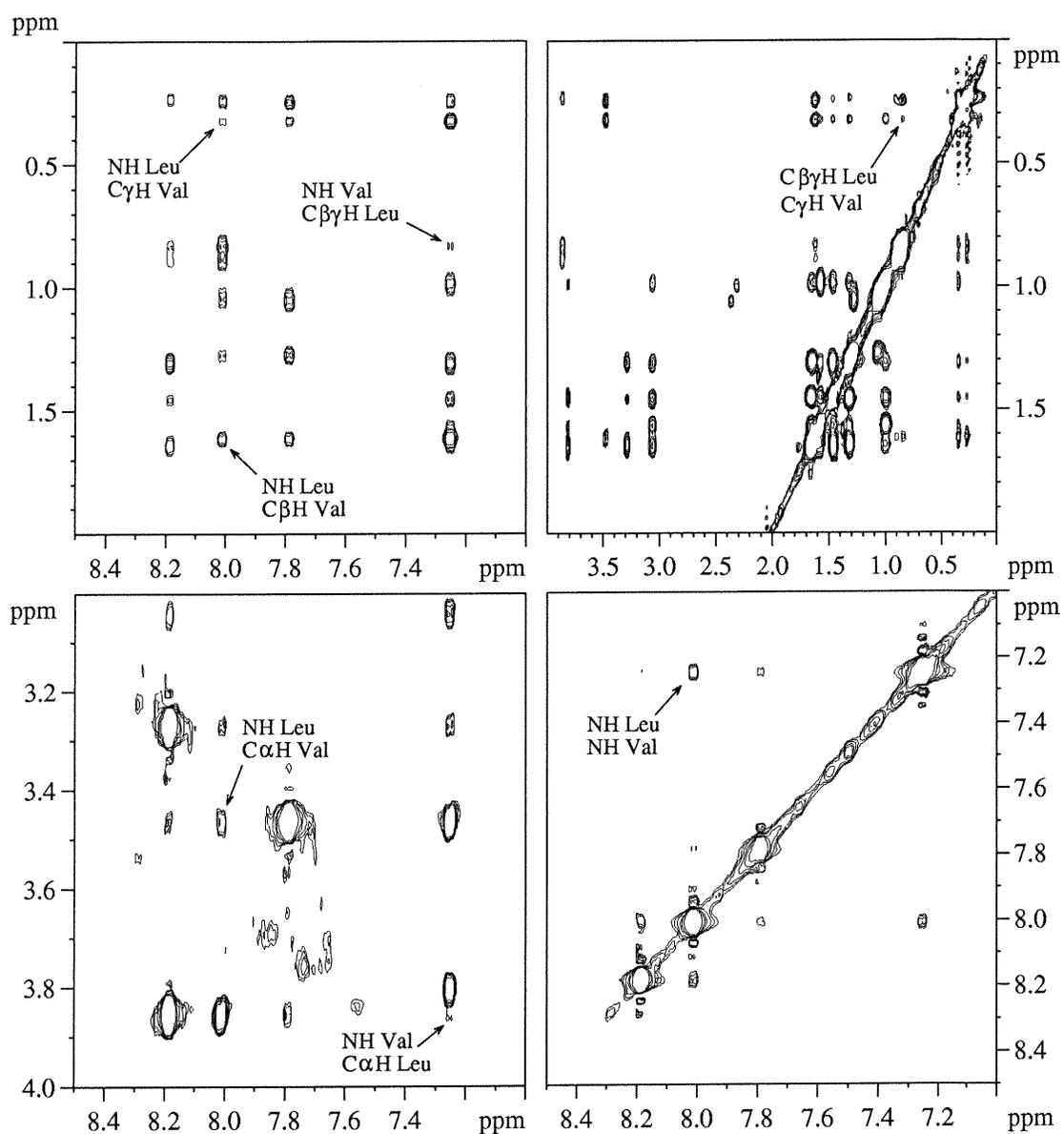


Figure 43: Spectre NOESY de [IAA(6S)^{4-5,4'-5'}]GS (**51**) et assignation des pics croisés.

Dans les spectres de **51**, il y a chevauchement des signaux pour les protons β et γ de la leucine. C $\beta\gamma$ H Leucine indique donc que les nOe d et g impliquent les protons β , γ ou les deux.

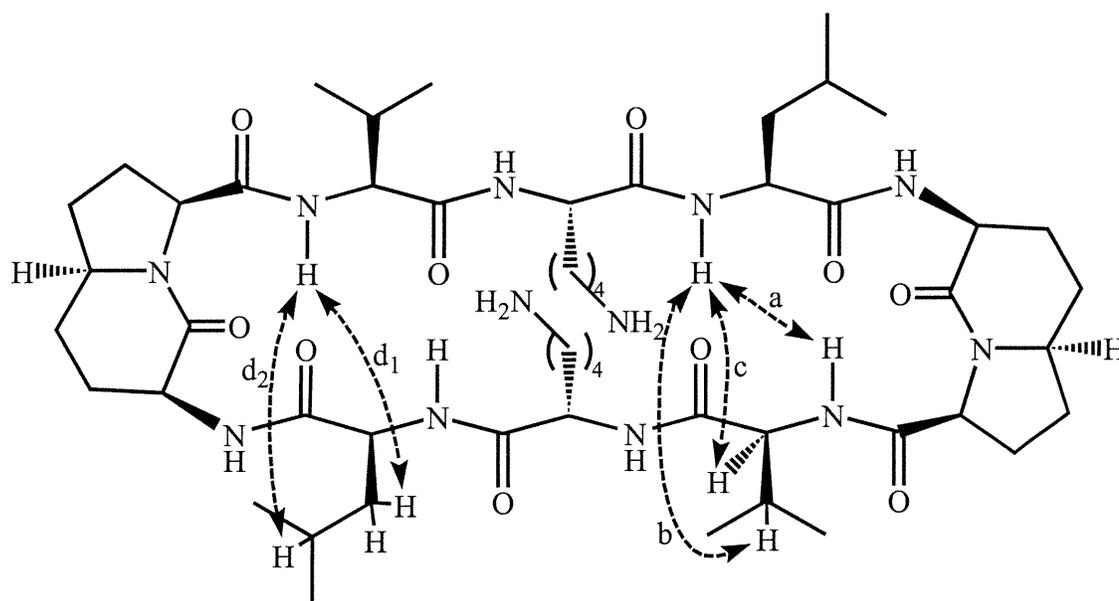


Figure 44: Connectivités nOe non-séquentielles pour [Lys^{2,2'}, IAA(6S)^{4-5,4'-5'}]GS (55).

Tableau XVII: Connectivités nOe non-séquentielles pour
[Lys^{2,2'}, IAA(6S)^{4-5,4'-5'}]GS (55).

CONNECTIVITÉS nOe NON-SÉQUENTIELLES.			
CONNECTIVITÉ	RÉSIDU i	RÉSIDU j	INTENSITÉ
a	NH Leucine	NH Valine	Faible
b	NH Leucine	CβH Valine	Moyenne
c	NH Leucine	CαH Valine	Moyenne
d ₁	NH Valine	CβH Leucine	Moyenne
d ₂	NH Valine	CγH Leucine	Faible

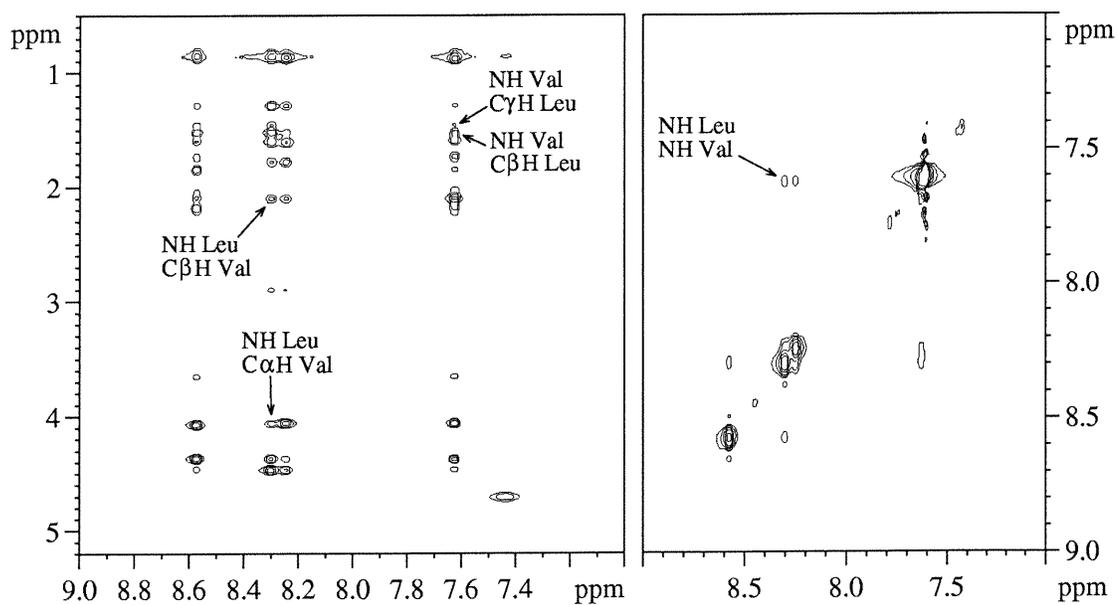


Figure 45: Spectre NOESY de [Lys^{2,2'}, IAA(6S)^{4-5,4'-5'}]GS (55) et assignation des pics croisés.

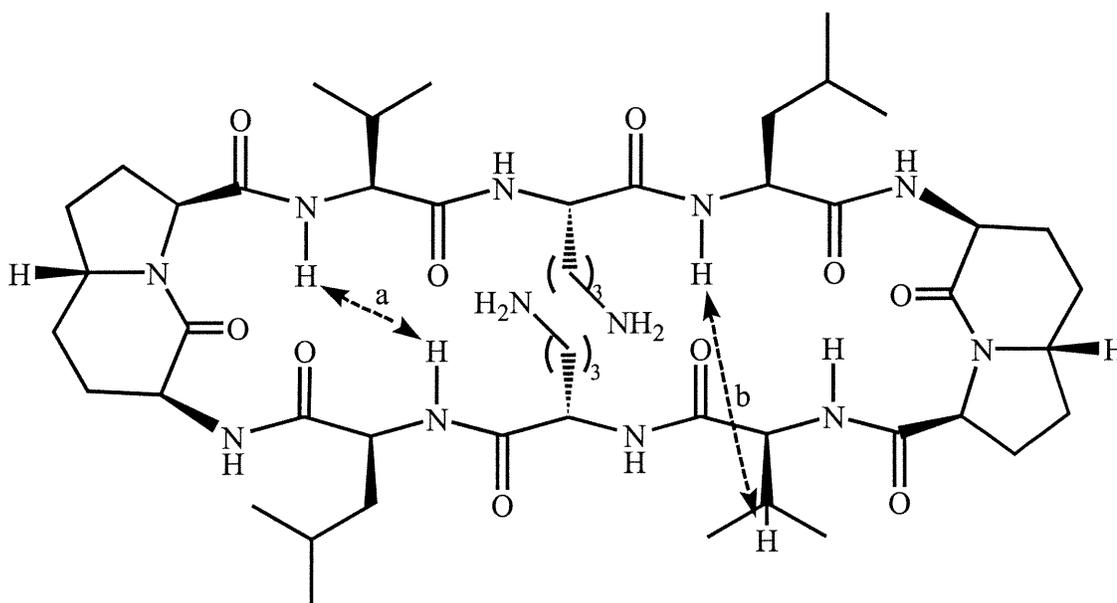


Figure 46: Connectivités nOe non-séquentielles pour [IAA(6R)^{4-5,4'-5'}]GS (56).

Tableau XVIII: Connectivités nOe non-séquentielles pour [IAA(6*R*)^{4-5,4'-5'}]GS (56).

CONNECTIVITÉS nOe NON-SÉQUENTIELLES.			
CONNECTIVITÉ	RÉSIDU i	RÉSIDU j	INTENSITÉ
a	NH Valine	NH Leucine	Faible
b	NH Leucine	CβH Valine	Faible

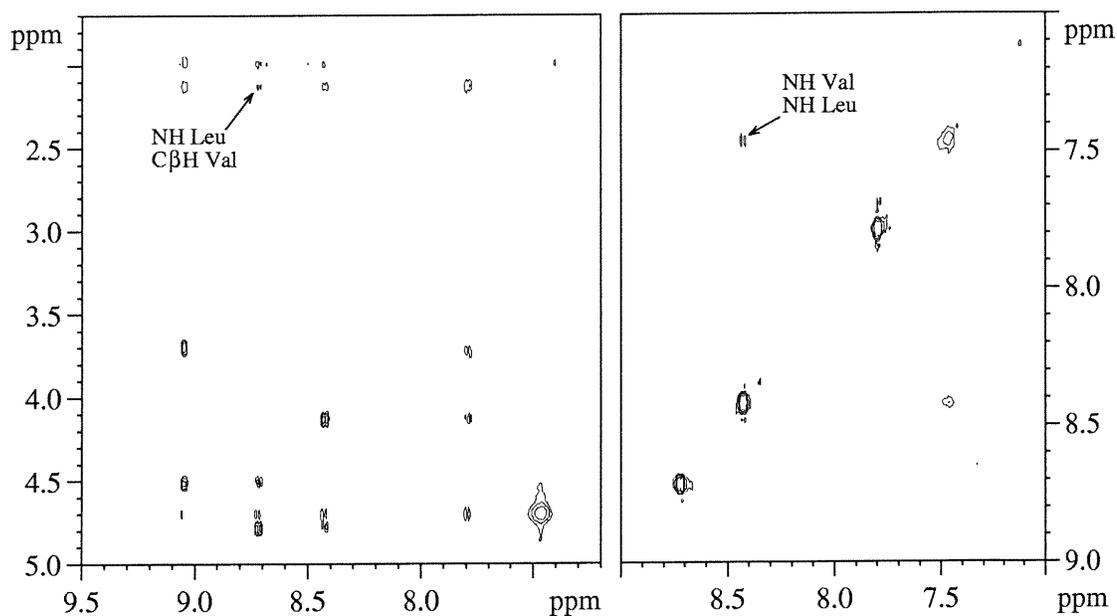


Figure 47: Spectre NOESY de [IAA(6*R*)^{4-5,4'-5'}]GS (56) et assignation des pics croisés.

Plusieurs connectivités nOe non-séquentielles sont observées pour [IAA(6*S*)^{4-5,4'-5'}]GS 51 et [Lys^{2,2'}, IAA(6*S*)^{4-5,4'-5'}]GS 55. Dans le cas de [IAA(6*R*)^{4-5,4'-5'}]GS 56, on en observe que deux qui sont faibles. Cet analogue manifeste encore une différence marquée avec [IAA(6*S*)^{4-5,4'-5'}]GS 51 et [Lys^{2,2'}, IAA(6*S*)^{4-5,4'-5'}]GS 55.

Les résultats pour les connectivités nOe séquentielles (Figures 39 à 41), les coefficients de température et les couplages spin-spin $^3J_{\text{NH-C}\alpha\text{H}}$ (voir plus bas) montrent que les analogues **51**, **55** et **56** adoptent une conformation de feuillet β plissé. Dans une telle structure, la distance entre les résidus reliés par des ponts d'hydrogène (ici leucine avec valine) est plus petite qu'entre deux acides aminés situés à des positions i et $i + 2$ (ici leucine et valine sur le même brin du feuillet β plissé). Alors que les résidus reliés par des ponts d'hydrogène peuvent donner lieu à des nOe non-séquentiels, les résidus à des positions i et $i + 2$ sont trop distants pour que ce soit possible.⁷ C'est pourquoi la connectivité non-séquentielle g dans l'analogue **51** est entre les résidus leucine et valine reliés par un pont d'hydrogène et non ceux sur le même brin.

5.2.4 Coefficients de température.

Une expérience qui permet de déterminer l'accessibilité d'un proton au solvant consiste à déterminer la variation de son déplacement chimique (δ) en fonction de la température (K). Les protons impliqués dans des liaisons hydrogène ont des faibles coefficients $\Delta\delta/\Delta T$ et ceux qui sont exposés au solvant ont des coefficients plus grands.⁸ Cette expérience a été réalisée avec [Lys^{2,2'}, IAA(6S)^{4-5,4'-5'}]GS **55** et [IAA(6R)^{4-5,4'-5'}]GS **56** (Tableau XIX). La Gramicidine S comportant des ponts d'hydrogène au niveau des protons amide de Val et Leu, on obtient donc pour ceux-ci des petites valeurs pour $\Delta\delta/\Delta T$. Par contre, pour les protons de Orn et D-Phe, qui sont exposés au solvant, les valeurs de $\Delta\delta/\Delta T$ sont plus grandes.

Tableau XIX: Coefficients de température des protons amide ($\Delta\delta/\Delta T$, ppm $10^3/K$) de GS, [Lys^{2,2'}, IAA(6S)^{4-5,4'-5'}]GS (55**), [IAA(6R)^{4-5,4'-5'}]GS (**56**) et [IBTM(11bR)⁴⁻⁵]GS.**

Résidu	GS	[Lys ^{2,2'} , IAA	[IAA(6R) ^{4-5,4'-5'}]GS	[IBTM(11bR) ⁴⁻⁵]GS	
	DMSO	(6S) ^{4-4,4'-5'}]GS / H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	DMSO
Valine 1	-1,6	-3,7	0,05	-3	-1,6
Xaa 2	-5	-5,9	-8,3	-9	-5,3
Leu 3	-2,8	-2,7	-4,2	-2,5	-1,6
Yaa 4	-7,4	-11,2	-9,4	-8,5	-4,7
Valine 1'	-1,6	-3,7	0,05	0,5	-0,4
Xaa 2'	-5	-5,9	-8,3	-8,5	-5,1
Leu 3'	-2,8	-2,7	-4,2	-3	-2,4
Zaa 4'	-7,4	-11,2	-9,4	-12	-7,6

Xaa est Om pour GS et **56**, Lys pour **55** et [IBTM(11bR)⁴⁻⁵]GS.

Yaa et Zaa sont D-Phe pour GS, IAA(6S) pour **55** et IAA(6R) pour **56**.

Yaa est IBTM(11bR) et Zaa est D-Phe pour [IBTM(11bR)⁴⁻⁵]GS.

Quand on compare les données obtenues pour [Lys^{2,2'}, IAA(6S)^{4-5,4'-5'}]GS **55** et [IAA(6R)^{4-5,4'-5'}]GS **56** avec celles de GS, on constate le même patron de protons exposés ou impliqués dans un pont d'hydrogène. Toutefois, la valeur des coefficients de température de la leucine pour [IAA(6R)^{4-5,4'-5'}]GS **56** est la plus faible, dénotant des ponts d'hydrogène plus faibles aussi.

Les données pour $\Delta\delta/\Delta T$ de GS ont été mesurées dans le DMSO,⁹ mais on peut voir que pour un analogue de GS comportant un peptidomimétique stabilisant un tour β de type II', [IBTM(11bR)⁴⁻⁵]GS¹⁰ (voir Figure 25), le patron des coefficients $\Delta\delta/\Delta T$ reste le même lorsque l'eau est utilisée comme solvant. Nous avons initialement utilisé l'eau comme solvant pour faire l'étude de la GS, mais en raison de la superposition des signaux NH, il n'a pas été possible de faire les expériences de coefficients de température et de couplages spin-spin $^3J_{NH-C\alpha H}$.

5.2.5 Couplages spin-spin ${}^3J_{\text{NH-C}\alpha\text{H}}$.

Les valeurs de couplage spin-spin entre les protons amide et leur proton α correspondant peuvent aussi donner des informations quant à la conformation du peptide.

Tableau XX: Constantes de couplage des protons amide des analogues de la gramicidine S (${}^3J_{\text{NH-C}\alpha\text{H}}$, Hz).

Résidu	GS	[IAA(6S) ^{4-5,4'-5'}]GS	[Lys ^{2,2'} , IAA (6S) ^{4-5,4'-5'}]GS	[IAA(6R) ^{4-5,4'-5'}]GS	[IBTM(11bR) ⁴⁻⁵]GS	
	DMSO	<u>51</u> H ₂ O	<u>55</u> / H ₂ O	<u>56</u> H ₂ O	H ₂ O	DMSO
Valine 1	9,7	8,5	8,3	9,3	8,9	12
Xaa 2	8,9	8,6	5,3	9,3	8,9	10,3
Leu 3	9,2	8,6	6,9	9,3	8	9,1
Yaa 4	2,6	7,3	7,2	6,9	6,4	4,3
Valine 1'	9,7	8,5	8,3	9,3	9,3	12,3
Xaa 2'	8,9	8,6	5,3	9,3	8,4	9,7
Leu 3'	9,2	8,6	6,9	9,3	8	10,3
Yaa 4'	2,6	7,3	7,2	6,9	3,8	2,6

Xaa est Orn pour GS, 51 et 56, Lys pour 55 et [IBTM(11bR)⁴⁻⁵]GS.

Yaa et Zaa sont D-Phe pour GS, IAA(6S) pour 51 et 55 et IAA(6R) pour 56.

Yaa est IBTM(11bR) et Zaa est D-Phe pour [IBTM(11bR)⁴⁻⁵]GS.

En effet, une étude statistique a démontré que des valeurs élevées pour ${}^3J_{\text{NH-C}\alpha\text{H}}$ ($> 7,0$ Hz) sont associées à la présence d'un feuillet β .⁴ En regardant les données du Tableau XX, on constate que les valeurs de ${}^3J_{\text{NH-C}\alpha\text{H}}$ pour les résidus Val, Orn et Leu du feuillet β de la GS sont effectivement supérieures à 7,0 Hz. Il en va de même pour les analogues 51 et 56, qui comportent un IAA(6S) et un IAA(6R) respectivement. Dans le cas de 55, qui a une lysine en position 2, ce résidu a une valeur de ${}^3J_{\text{NH-C}\alpha\text{H}}$ inférieure à 7,0 Hz et le résidu leucine a une valeur légèrement inférieure à 7,0 Hz. Cette différence peut provenir du fait que la lysine est impliquée dans une liaison hydrogène avec un groupement carbonyle de la chaîne peptidique, ce qui modifierait sa conformation et sa valeur de ${}^3J_{\text{NH-C}\alpha\text{H}}$.

5.3 Comparaison des analogues.

Les analogues **51** et **55** présentent des spectres de dichroïsme circulaire très semblables à ceux de la Gramicidine S en solution aqueuse et dans le méthanol, nous indiquant ainsi des conformations similaires à celle de la Gramicidine S. Les analogues **51** et **55** ne diffèrent que par l'acide aminé aux positions 2 et 2' (Orn ou Lys) et on constate que leurs spectres de dichroïsme circulaire sont presque identiques. Ceci nous indique que cette substitution à cette position n'a pas une grande influence sur la structure générale des deux peptides. Ils démontrent le même patron général d'intensités pour les connectivités nOe-séquentielles qui est indicatif de la présence d'un feuillet β . On constate aussi que ces deux analogues sont ceux qui comptent le plus grand nombre de nOe non-séquentiels. Ces effets nOe sont une excellente preuve de la présence d'un feuillet β . Les valeurs des couplages spin-spin $^3J_{\text{NH-C}\alpha\text{H}}$ pour les résidus valine, ornithine et leucine de **51** sont supérieures à 7,0 Hz, comme dans le cas de la gramicidine S. Rappelons que de telles valeurs sont associées à la présence d'un feuillet β . Dans le cas de **55**, les résidus lysine et leucine ont des valeurs de $^3J_{\text{NH-C}\alpha\text{H}}$ qui sont inférieures à 7,0 Hz. Cela suggère qu'il y a une différence de conformation pour ces résidus par rapport à **51** mais qu'elle n'est pas suffisamment importante pour engendrer une structure générale grandement modifiée.

Si l'on compare **51** et **56**, qui diffèrent par la stéréochimie de la fusion des cycles, on constate les choses suivantes. D'abord, le spectre de dichroïsme circulaire de **56** ressemble beaucoup moins à celui de la gramicidine S que le spectre de **51**, dans l'eau et dans le méthanol. Son intensité est plus faible que celle des autres analogues et ses maxima sont moins prononcés. Ceci nous révèle que la structure générale de **56** est moins proche de celle de la gramicidine S que celle de **51**. Cet analogue **56** est celui pour lequel on a relevé le plus petit nombre de nOe non-séquentiels. Toutefois, le patron général d'intensités pour les connectivités nOe séquentielles est le même que pour **51** et les valeurs de couplage spin-spin $^3J_{\text{NH-C}\alpha\text{H}}$ pour leucine, ornithine et valine sont toutes supérieures à 7,0 Hz. Ces deux derniers points appuient l'hypothèse de la présence d'un feuillet β dans la structure secondaire de **56**. Les résultats obtenus pour les coefficients de température ($\Delta\delta/\Delta T$) de **51** et **56** montrent clairement que les protons amide des résidus Val et Leu sont impliqués dans des liens hydrogène, comme dans la structure de la GS.

5.4 Références du chapitre V.

1. Smith, J.A.; Pease, L.G. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **1980**, 315.
2. Woody, R.W. *Methods in Enzymology* **1995**, 246, 34.
3. Kawai, K.; Nagai, U. *Biopolymers* **1978**, 17, 1549.
4. Wüthrich, K. dans *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; Wiley: New York, 1986, p. 130.
5. Wüthrich, K. dans *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; Wiley: New York, 1986, p. 117.
6. Wüthrich, K. dans *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; Wiley: New York, 1986, p. 166.
7. Wüthrich, K. dans *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; Wiley: New York, 1986, p. 126.
8. Kessler, H. *Ang. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, 21, 512.
9. Bach, A.C.; Markwalder, J.A.; Ripka, W.C. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, 38, 314.
10. Andreu, D.; Ruiz, S.; Carreño, C.; Alsina, J.; Albericio, F.; Jiménez, M.Á.; de la Figuera, N.; Herranz, R.; García-López, M.T.; González-Muñiz, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 10579.

Chapitre VI: Conclusion.

La gramicidine S (GS) est un peptide antibiotique cyclique qui a été découvert en 1942 par Gause et Brazhnikova. Son large spectre d'action antibiotique s'étend aux bactéries gram-positif, gram-négatif et à certains champignons. Il a été démontré que sa structure de feuillet β plissé antiparallèle stabilisée par deux tours β de type II' est nécessaire à son activité biologique. Toute modification de sa séquence qui perturbe la conformation des tours β entraîne une perte d'activité. C'est ce point qui a fait de la gramicidine S un système permettant d'évaluer le potentiel d'un peptidomimétique à stabiliser un tour β de type II'. Nous avons synthétisé des analogues de la gramicidine S (**51**, **55** et **56**) pour étudier les acides aminés indolizidinone qu'ils renferment.

Nous avons préparé les IAA en utilisant la stratégie d'autocondensation de Claisen/amination réductrice/cyclisation au lactame bicyclique. Les IAA portant des groupements protecteurs Boc et Fmoc ont été synthétisés avec succès pour être utilisés sur support solide. Nous avons également préparé avec succès l'ester allylique de la *N*- α -Fmoc-L-Lys en solution.

Nous avons d'abord essayé la résine de Wang pour la production de nos analogues. La résine de Wang a été convertie en une résine carbonate pour l'introduction de l'ester allylique de la *N*- α -Fmoc-L-Lys. L'emploi de la spectrométrie infrarouge photoacoustique nous a permis de suivre ces deux réactions sur support solide. Les peptides linéaires ont été obtenus sur support solide par l'utilisation d'un protocole standard de synthèse pour les acides *N*-(Fmoc)aminés. Il n'a toutefois pas été possible d'isoler les peptides cycliques désirés même après investigation des étapes potentiellement problématiques de cette stratégie.

Nous avons ensuite utilisé une autre stratégie ayant porté fruit pour plusieurs analogues de la GS. En utilisant une résine d'oxime et un protocole de synthèse avec les acides *N*-(Boc)aminés, nous avons obtenu les peptides linéaires sur support solide. Leur cyclisation par aminolyse intramoléculaire a été couronnée de succès et les peptides cycliques désirés ont été obtenus avec des rendements globaux de 10% et de 2% pour **55** et **56**, respectivement. La pureté de ces produits, telle que déterminée par HPLC (>95%), était adéquate pour leur analyse conformationnelle et l'évaluation de leur activité biologique.

Nous avons finalement procédé à l'analyse conformationnelle de nos analogues **51**, **55** et **56**. Pour ce faire, nous nous sommes servi du dichroïsme circulaire, de la RMN 2D, de l'observation de connectivités nOe séquentielles et non-séquentielles, des coefficients de température des protons amide et des valeurs de couplage spin-spin $^3J_{\text{NH-C}\alpha\text{H}}$. Les résultats de l'analyse conformationnelle nous indiquent que le diastéréoisomère 6*S* des acides aminés indolizidinone donne un analogue (**51**) de la GS qui maintient son feuillet β et dont la structure générale est très semblable. Le remplacement de l'ornithine de **51** par lysine engendre des changements locaux dans la conformation de l'analogue (**55**), mais sa structure générale n'est pas grandement modifiée. Par contre, le diastéréoisomère 6*R* des acides aminés indolizidinone produit un analogue (**56**) dont la structure globale est moins semblable à celle de la GS mais qui comporte quand même une structure de feuillet β .

Les analogues **51**, **55** et **56** ont des activités biologiques égales ou plus faibles que la GS. L'activité biologique de l'analogue **51** est en général deux fois plus faible que celle de la GS. Contre une seule souche, elle est aussi efficace et contre trois autres elle est quatre fois moins efficace. L'analogue **55** a la même activité biologique que **51** contre les bactéries gram-négatif et les champignons. Par contre **55** est un peu moins efficace que **51** contre les bactéries gram-positif. Les activités hémolytiques de **51** et **55** sont quatre fois moindre que celle de la GS. L'analogue **56** est le moins puissant de tous, ayant des activités biologiques de 4 à 32 fois plus faibles que celle de la GS. L'activité hémolytique de **56** est toutefois 2 ou 4 fois plus faible que celle de la GS.

Avec tous ces résultats, nous en sommes arrivés à la conclusion que le diastéréoisomère 6*S* des IAA est une meilleure mimique de tour β de type II' que le diastéréoisomère 6*R*. Les caractéristiques structurales nécessaires à l'activité biologique de la GS sont conservées dans les analogues **51** et **55**. Ceci se reflète dans les résultats spectroscopiques et de l'activité biologique. Par contre, le diastéréoisomère 6*R* des IAA incorporé dans la GS **56** semble stabiliser une structure dans laquelle il y a des ponts d'hydrogène, un feuillet β mais qui n'est pas suffisamment proche de celle de la GS pour maintenir son activité biologique.

La gramicidine S nécessite bel et bien un tour β pour conserver son activité antibiotique. Toutefois, les analogues synthétisés ont démontré une activité hémolytique quatre fois moindre que la GS, qu'ils conservent l'activité antibiotique ou non. Ce résultat est relié au fait que dans tous nos analogues, la chaîne latérale hydrophobe de la D-phénylalanine a été enlevée. Cette ablation diminue l'hydrophobicité des analogues relativement à la GS et donc amène moins d'affinité pour les membranes composées de phospholipides zwitterioniques.

Les analogues obtenus ne sont pas utilisables commercialement comme antibiotiques mais il serait très intéressant d'incorporer l'IAA(6S) dans les analogues **41** et **42** de Hodges (voir page 15) pour tenter de diminuer davantage leurs activités hémolytiques (Figure 48).

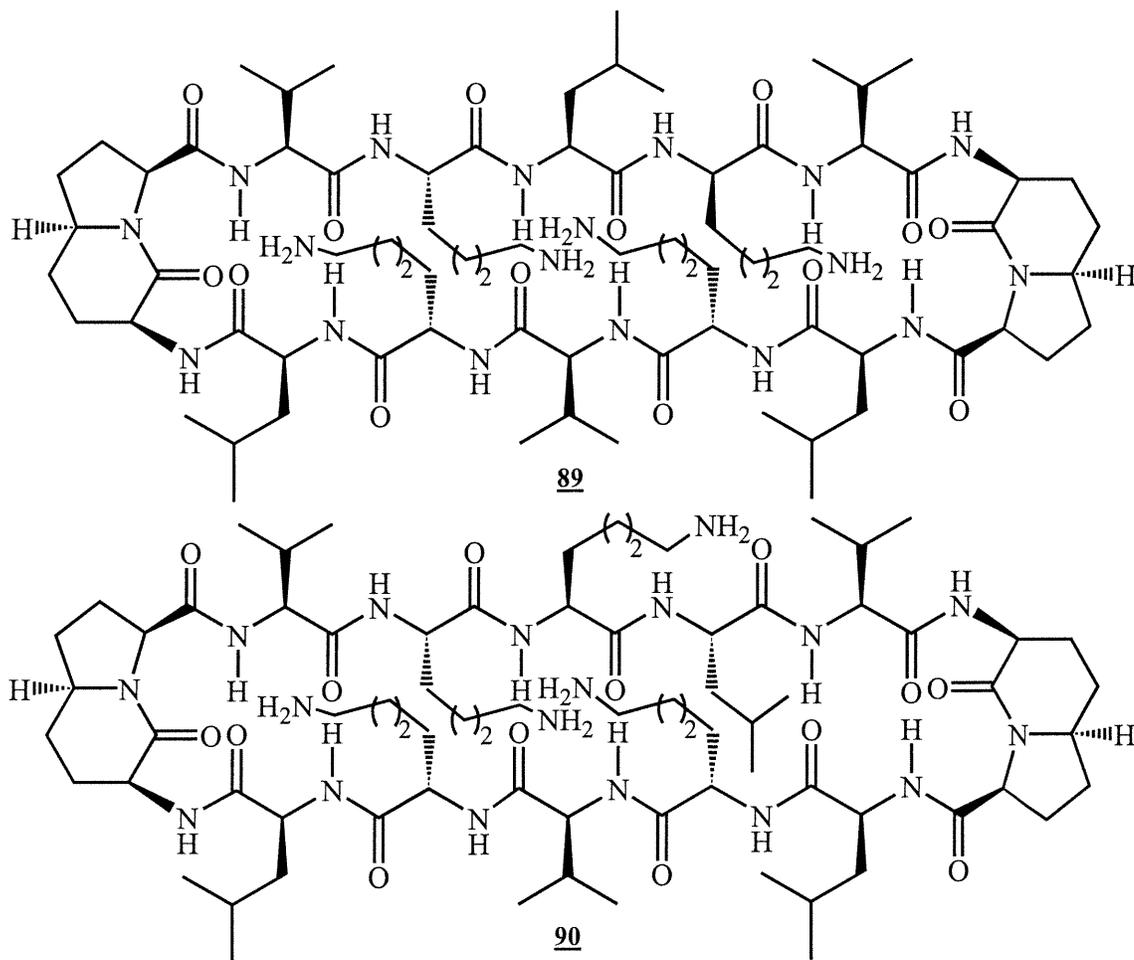


Figure 48: Analogues de GS-14 (**89**) et GS-14K4 (**90**) incorporant des acides aminés indolizidinone.

Chapitre VII: Partie expérimentale.

7.1 Section générale.

Le tétrahydrofurane a été distillé sur sodium/benzophénone immédiatement avant usage. Le dichlorométhane a été distillé sur P₂O₅, la pipéridine sur KOH et la diisopropyléthylamine sur ninhydrine et sur CaH₂. Toutes les réactions ont été réalisées à température ambiante à moins d'avis contraire. Les réactions en solution ont été agitées à l'aide d'un barreau magnétique et les supports solides par agitation mécanique. Les données de spectrométrie de masse, MS (FAB et MALDI) ont été obtenues du Centre Régional de Spectrométrie de Masse de L'Université de Montréal. Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton (¹H) et du carbone (¹³C) ont été enregistrés sur des appareils Bruker de 300, 400 et 600 MHz au Centre Régional de Résonance Magnétique Nucléaire de L'Université de Montréal. Les déplacements chimiques sont rapportés en ppm (unités δ) par rapport au tetraméthylsilane ((CH₃)₄Si), au CHCl₃ résiduel (δ7,27 et 77) ou au dioxanne dans le cas des spectres 2D et les constantes de couplage sont données en hertz (Hz). Les échantillons pour les expériences de RMN 2D ont été préparés en dissolvant nos analogues **51**, **55** et **56** dans 1 mL d'un mélange 9:1 H₂O:D₂O pour obtenir des concentrations d'environ 5 mM. Toutes les expériences de RMN 2D ont été acquises dans le mode sensible à la phase en utilisant la technique States TPPI (time proportional phase incrementation) avec une présaturation de signal de l'eau. Les expériences NOESY ont été acquises en utilisant des temps de mélange de 500 ms. Les spectres TOCSY ont été acquis en se servant de la séquence MLEV17 et de temps de mélange de 105 ms, 73 ms et 77 ms pour **51**, **55** et **56** respectivement. La taille de la matrice d'acquisition de données était de 2048 x 512 pour f₂ et f₁, respectivement. Après « zero-filling » et transformation de Fourier, la taille des matrices était de 2048 x 1024. L'intensité des pics croisés des spectres NOESY a été déterminée en utilisant le logiciel XWin-NMR 2.6 et en donnant une valeur arbitraire de 100 au pic le plus intense de chaque spectre. Les pics ayant une intensité de 65 à 100 ont été qualifiés de forts, de 20 à 64 de moyens et moins de 19 de faibles.¹ Les échantillons pour les expériences de dichroïsme circulaire ont été préparés en dissolvant nos analogues **51**, **55**, **56** et la gramicidine S dans 10 mL d'eau millipore ou de méthanol spectrograde pour obtenir des concentrations de 0,1 mM. Les chromatographies sur couche mince (analytiques) ont été réalisées en utilisant des plaques d'aluminium de 2x5 cm recouvertes avec 0,2 mm de gel de silice 60 F₂₅₄

(Merck). Les chromatographies ont été réalisées en utilisant du gel de silice Kieselgel 60 (230-400 mesh). Les purifications par HPLC préparative en phase inverse ont été faites en utilisant comme solvants: A: H₂O avec 0,06% de TFA et B: acétonitrile avec 0,06% de TFA. La colonne utilisée mesurait 25 cm de long par 2,5 cm de diamètre, contenait du gel de silice Higgins C₁₈ (phase inverse, 5 μm) et le débit utilisé était de 20 mL/min. Le détecteur UV enregistrait l'absorbance à 220 nm. L'homogénéité du pic majoritaire a été vérifiée par HPLC analytique avec une colonne Higgins C₁₈ (phase inverse, 5 μm), avec un débit de 1,5 mL/min. Les temps de rétention de HPLC analytique ont été rapportés en minutes. Les mêmes solvants que dans les conditions préparatives ont été utilisés. Les conditions d'éluion utilisées pour les chromatogrammes HPLC analytiques sont les suivantes: a: 5%-90% de B en 25 minutes et 90% de B pendant 10 minutes, b: 40%-90% de B en 25 minutes et 90% de B pendant 10 minutes, c: 10%-90% de B en 25 minutes et 90% de B pendant 10 minutes, d: 20%-60% de B en 20 minutes. La résine échangeuse de cations utilisée était la Dowex 50W-X8 sous forme H⁺, ayant 1,9 meq/mL (« wet volume »).

7.2 Protocoles de synthèse.

Acide (3*S*, 6*S*, 9*S*)-2-oxo-3-[*N*-(Boc)amino]-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylique (**65**):

Une solution de (3*S*, 6*S*, 9*S*)-2-oxo-3-[*N*-(Boc)amino]-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate de méthyle **64** (0,931g, 2,98 mmol, préparé selon le protocole décrit dans la référence 21 du chapitre 2) dans le dioxane (6 mL) a été traitée avec NaOH 1M (6 mL) pendant 75 minutes. Elle a ensuite été traitée avec de l'eau acidifiée (20 mL, pH 4) avec de l'acide citrique solide et de l'AcOEt a été ajouté (60 mL). La phase aqueuse a été extraite avec de l'AcOEt (2 × 30 mL) et les phases organiques combinées ont été lavées avec de la saumure, séchées avec Na₂SO₄ et évaporées pour donner un solide. La chromatographie sur gel de silice en utilisant AcOEt/AcOH (99,5:0,5) comme éluant a donné 0,92g de **65** (96%). Point de fusion: 60-62°C, [α]_D²⁰ -52° (c = 0,8, CHCl₃), littérature [α]_D²⁰ -44,7° (c = 0,8, CHCl₃). RMN ¹H (CDCl₃): δ 1,45 (s, 9H), 1,56-1,72 (m, 3H), 2,05-2,35 (m, 4H), 2,45 (m, 1H), 3,70 (m, 1H), 4,22 (m, 1H), 4,57 (d, J = 8 Hz, 1H),

5,47 (s, 1H). Littérature: RMN ^1H δ 1,44 (s, 9H), 1,65-1,75 (m, 3H), 2,1-2,3 (m, 4H), 2,42 (m, 1H), 3,71 (dddd, $J = 10$ Hz, 10 Hz, 5 Hz, 5 Hz, 1H), 4,22 (m, 1H), 4,54 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 5,66 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H). L'acide (3*S*, 6*R*, 9*S*)-2-Oxo-3-[*N*-(Boc)amino]-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylique a été obtenu par la même procédure (1,34g, 73%). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -50^\circ$ ($c = 0,29$, CHCl_3), littérature: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -20,3^\circ$ ($c = 0,8$, CHCl_3). RMN ^1H (CDCl_3): δ 1,44 (s, 9H), 1,60-2,40 (m, 8H), 3,65 (m, 1H), 3,93 (m, 1H), 4,51 (d, $J = 7$ Hz, 1H), 5,32 (s, 1H). Littérature: RMN ^1H δ 1,41 (s, 9H), 1,55-1,8 (m, 2H), 1,85-2,05 (m, 2H), 2,05-2,15 (m, 3H), 2,28 (br m, 1H), 3,63 (br m, 1H), 3,9 (m, 1H), 4,44 (t, $J = 5,3$ Hz, 1H), 5,61 (br s, 1H), 8,2 (br s, 1H).

Chlorhydrate de l'acide (3*S*, 6*S*, 9*S*)-2-oxo-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylique (**66**):

De l'acide chlorhydrique gazeux a été barboté dans du CH_2Cl_2 (20 mL) refroidi à -10°C et cette solution a été ajoutée à **65** (0,3 g, 1 mmol) dissous dans le CH_2Cl_2 (3 mL). Cette solution a été agitée pendant une heure et évaporée pour donner une poudre blanche: 0,213 g de **66** (90%). L'expérience a été répétée avec le reste de **65** (0,412 g, 95% de rendement de **66**). RMN ^1H (CD_3OD): δ 1,67-1,75 (m, 2H), 1,88 (m, 1H), 2,10-2,25 (m, 4H), 2,35 (m, 1H), 3,78 (m, 1H), 3,95 (t, $J = 8,5$ Hz, 1H), 4,44 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H). Le chlorhydrate de l'acide (3*S*, 6*R*, 9*S*)-2-oxo-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylique a été obtenu par la même procédure mais a été isolé sous forme d'une huile jaune. RMN ^1H (CD_3OD): δ 1,60-1,90 (m, 3H), 2,05 (m, 2H), 2,20-2,40 (m, 3H), 3,64 (m, 1H), 3,85 (q, $J = 6$ Hz, 1H), 4,38 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H).

Acide (3*S*, 6*S*, 9*S*)-2-oxo-3-[*N*-(Fmoc)amino]-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylique (**67**):

Le chlorhydrate de l'amine **66** (0,18 g, 0,77 mmol) a été agité dans une solution de Na_2CO_3 10% (8 mL) et du dioxane (4 mL). Le mélange a été refroidi dans un bain de glace et le Fmoc-Cl (0,258 g, 1 mmol) dans du dioxane (4 mL) a été ajouté. L'agitation a été poursuivie toute la nuit à température de la pièce. De l'eau (150 mL) a été ajoutée au mélange et la phase aqueuse a été extraite avec de l'éther (2×50 mL). La phase aqueuse a

ensuite été refroidie (bain de glace), acidifiée avec HCl 2N (8 mL) et extraite avec de l'AcOEt (3 × 100 mL). Les phases organiques combinées ont été séchées avec Na₂SO₄ et évaporées pour donner un solide beige (0,283 g, 90%). L'expérience a été répétée avec le reste de **66** (0,562 g, 78% de rendement de **67**). $[\alpha]_D^{20}$ -34° (c = 0,4, CHCl₃). RMN ¹H (CDCl₃): δ 1,65 (m, 3H), 2,10-2,30 (m, 4H), 2,40-2,60 (m, 3H), 3,70 (m, 1H), 4,20-4,40 (m, 3H), 4,60 (m, 1H), 5,82 (m, 1H), 7,30 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 7,40 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 7,60 (d, J = 5,5 Hz, 2H), 7,75 (d, J = 7,4 Hz, 2H). RMN ¹³C (CDCl₃): 13,96, 20,83, 26,35, 26,71, 28,62, 31,78, 46,84, 50,05, 56,75, 58,40, 66,77, 66,94, 119,71, 124,98, 126,85, 127,45, 141,01, 143,74, 156,12, 169,72, 173,93, 176. Masse de C₂₄H₂₄N₂O₅ calculée: 420,17. FAB MS: 421,1 [MH]⁺, 601,2 (dipeptide). L'acide (3*S*, 6*R*, 9*S*)-2-oxo-3[*N*-(Fmoc)amino]-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylique a été obtenu par la même procédure (1,210 g, 92%). RMN ¹H (CDCl₃): δ 1,70 (m, 2H), 1,9-2,3 (m, 5H), 2,40 (m, 1H), 3,60 (m, 1H), 4,05 (m, 1H), 4,20 (t, J = 7 Hz, 1H), 4,35 (s, 2H), 4,52 (s, 1H), 5,75 (s, 1H), 7,30 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 7,40 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 7,60 (d, J = 7,3 Hz, 2H), 7,75 (d, J = 7,5 Hz, 2H). RMN ¹³C (CDCl₃): 13,89, 20,75, 27,45, 27,72, 27,99, 31,10, 38,40, 46,79, 51,64, 58,38, 66,68, 119,57, 124,98, 126,80, 127,35, 140,89, 143,63, 143,74, 156,23, 169,32, 174,14, 175,43. Masse de C₂₄H₂₄N₂O₅ calculée: 420,17. FAB MS: 421,1 [MH]⁺.

Ester allylique de la *N*-α-Fmoc-*N*-ε-Boc-L-Lys (**69**):

La *N*-α-Fmoc-*N*-ε-Boc-L-Lys **68** (2,7 g, 5,76 mmol) a été dissoute dans le bromure d'allyle (13,5 mL, 156 mmol) et la DIEA (2,0 mL, 11,5 mmol). Le mélange a été chauffé à reflux pour une heure et le bromure d'allyle a été évaporé sous pression réduite pour être récupéré dans deux trappes de glace sèche/acétone. Le résidu a été dissous dans l'AcOEt (100 mL), lavé avec du HCl 0,1N (refroidi dans un bain de glace, 2 × 50 mL), un tampon carbonate pH 9,5 (3 × 35 mL) et de la saumure (100 mL). Le lavage n'ayant pas été complet (vérifié par ccm), il a été refait avec le tampon carbonate pH 9,5 (2 × 100 mL) et la saumure (100 mL). La phase organique a été séchée avec Na₂SO₄, filtrée et évaporée pour donner une huile brune translucide qui a été triturée avec du pentane. Le solide a ensuite été dissous et réévaporé dans l'AcOEt et le pentane pour donner un solide blanc (2,536 g, 87%). RMN ¹H (CDCl₃): δ 1,45 (m, 12H), 1,6 (s, 1H), 1,75 (m, 1H), 1,9 (m, 1H), 3,1 (m, 2H), 4,2 (t, J =

7 Hz, 1H), 4,4 (m, 3H), 4,6 (m, 3H), 5,3 (m, 3H), 5,9 (m, 1H), 7,3 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 7,4 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 7,6 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H), 7,75 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H).

Chlorhydrate de l'ester allylique de la *N*- α -Fmoc-L-Lys (**70**):

A une solution de l'ester allylique de la *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Boc-L-Lys **69** (2,534 g, 4,98 mmol) dans le CH₂Cl₂ (25 mL) a été ajoutée une solution de HCl(g) dans le CH₂Cl₂ (25 mL, ~0,01 M). Après 7 heures d'agitation, du HCl(g) a été barboté dans la solution et le mélange agité pendant 18 heures. L'évaporation du solvant a donné un solide beige qui a été trituré à l'hexane et réévaporé dans le CH₂Cl₂ pour donner un solide blanc (2,149 g, 97%). Point de fusion: 121-122°C, $[\alpha]_D^{20} -18^\circ$ ($c = 0,1$, MeOH). RMN ¹H (CDCl₃): δ 1,46 (m, 1H), 1,70-1,80 (m, 5H), 3,00 (d, 2H), 4,17 (t, $J = 8$ Hz, 1H), 4,33 (m, 3H), 4,59 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 5,20 (d, $J = 10$ Hz, 2H), 5,28 (d, $J = 17$ Hz, 1H), 5,83 (m, 1H), 7,3-7,4 (m, 4H), 7,60 (m, 2H), 7,72 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz).

Résine de Wang *p*-nitrophényle carbonate (**73**):

La résine de Wang (4,006 g, 0,92 mmol/g, 3,68 mmol) a été gonflée dans du CH₂Cl₂ (40 mL) et agitée mécaniquement pendant 30 minutes. La résine gonflée a ensuite été refroidie dans un bain de glace et traitée avec la 4-méthylmorpholine (1,2 mL, 11,04 mmol) et le 4-nitrophénylchloroformate (2,227 g, 11,04 mmol). L'agitation a été continuée pendant 22 heures à température de la pièce. La résine a ensuite été filtrée et lavée avec du DMF (6 \times 100 mL), du MeOH (1 \times 100 mL), du CH₂Cl₂ (6 \times 100 mL) et de l'Et₂O (1 \times 100 mL). La résine jaune a été séchée sous vide (4,54 g). PA FT-IR : O-(C=O)-O 1766 cm⁻¹.

Ester allylique de la *N*- α -Fmoc-L-Lys ω -Wang carbamate (**74**):

Dans un godet à réaction de 25 mL, la résine de Wang carbonate (0,482 g, 0,289 mmol) a été gonflée dans le DMF (4 mL) et traitée avec une solution du chlorhydrate de l'ester allylique de la *N*- α -Fmoc-L-Lys **70** (~1,9 mmol) dans le DMF (7 mL) ainsi qu'avec la DIEA (0,85 mL, 4,8 mmol). La résine en suspension a été agitée mécaniquement toute la nuit, filtrée, lavée avec DMF (6 \times 10 mL), CH₂Cl₂ (6 \times 10 mL) et séchée sous pression.

réduite. Une substitution de 0,15 mmol/g a été déterminée en utilisant la procédure de Meienhofer et al², (détermination spectrophotométrique de la concentration de l'adduit Fmoc-Pipéridine). De plus, un test à l'acide picrique a donné une substitution de 0,6 mmol/g.³ Après un deuxième traitement avec le chlorhydrate de l'ester allylique de la *N*- α -Fmoc-L-Lys **70** (~0,7 mmol) et la DIEA (0,36 mL, 2 mmol), l'examen de la substitution de la résine avec les deux tests a donné les mêmes résultats que précédemment. La résine (0,462 g) a été gonflée dans le DMF (4 mL), agitée mécaniquement avec 10 mL d'Ac₂O/DMF 50% pendant deux heures, lavée avec DMF (3 \times 10 mL) et CH₂Cl₂ (3 \times 10 mL) pour être ensuite séchée sous pression réduite: PA FT-IR: élongation N-H: 3320 cm⁻¹, O-(C=O)-N: 1720 cm⁻¹.

Protocole général pour l'obtention du peptide linéaire sur résine de Wang Fmoc-Leu-IAA(6*S*)-Val-Lys(Boc)-Leu-IAA(6*S*)-Val-Lys(OAl)-Wang (**75**):

Tous les couplages ont été réalisés de la même manière, sur un synthétiseur de peptides Advanced Chemtech Modèle 90. La résine **74** (0,341 g, 0,192 mmol) a d'abord été gonflée dans le DMF (4 mL), agitée mécaniquement avec 10 mL d'une solution 1:5 pipéridine:DMF pendant 10 minutes, lavée avec le DMF (10 mL) et traitée pour un autre 10 minutes avec 10 mL de la solution 1:5 pipéridine:DMF. La résine a été lavée (6 \times DMF, 1 \times Et₂O, 3 \times CH₂Cl₂, 1 \times Et₂O, 1 \times DMF, 10 mL de chaque) et traitée avec une solution de DMF (10 mL) contenant 2 équivalents d'acide aminé Fmoc (sauf Fmoc-IAA **67**: 1,1 équivalents) relativement à la substitution de la résine, 2 équivalents de TBTU et 4,5 équivalents de DIEA. Après agitation pendant deux heures, la résine a été lavée (3 \times DMF, 3 \times CH₂Cl₂, 2 \times Et₂O, 10 mL de chaque) et séchée sous pression réduite pendant au moins deux heures. Le test de Kaiser a été effectué sur une aliquote (1-2 mg) de la résine pour déterminer l'efficacité de couplage. L'acétylation a été réalisée lorsque les rendements de couplage ont été inférieurs à 99%, en utilisant 10 mL d'une solution 1:1 Ac₂O:DMF en présence de DIEA (1 mL) pendant deux heures. La résine a été lavée (3 \times DMF, 3 \times CH₂Cl₂, 10 mL de chaque) et séchée sous vide. Selon le test de Kaiser, les rendements de couplage ont été de (de Val jusqu'à Leu): 97%, 98%, 98%, 98%, 98%, 99% et 98%.

Fmoc-IAA(6*S*)-Val-Lys(OAl):

Après que le premier IAA **67** a été couplé, une portion de la résine (83 mg, 0,05mmol) a été gonflée dans le CH₂Cl₂ et agitée avec 4 mL de 3:1 TFA:CH₂Cl₂ pendant 30 minutes. La résine a ensuite été lavée avec CH₂Cl₂ (15 mL) et les lavages ont été combinés avec le liquide de clivage. L'évaporation de cette solution a donné une gomme brune (12,3 mg, 31%). La résine a été resoumise aux mêmes conditions de clivage pour fournir 4 mg (10%) de matériel brut. La chromatographie sur gel de silice de ce matériel brut en utilisant un système 65:33:2 CHCl₃:isopropanol:Et₃N comme éluant a donné 2,3 mg du tripeptide (6,7%). RMN ¹H (CDCl₃): δ0,93 (m, 5H), 1,47 (m, 3H), 1,60-1,90 (m, 10H), 2,03 (m, 2H), 2,10-2,30 (m, 6H), 2,99 (m, 2H), 3,15 (m, 3H), 3,65 (m, 1H), 4,05 (m, 1H), 4,45 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 4,60 (m, 3H), 5,30 (m, 2H), 5,90 (m, 1H), 7,30-7,40 (m, 4H), 7,60-7,75 (m, 3H). Masse de C₃₈H₄₉N₅O₇ calculée: 687,36. FAB MS: 688,4 [MH]⁺.

Fmoc-Leu-IAA(6*S*)-Val-Lys-Leu-IAA(6*S*)-Val-Lys-OAl (**76**):

La résine **75** (25 mg) a été traitée avec 1:1 TFA:CH₂Cl₂ (2 mL) pendant 2 heures sous agitation mécanique. Le mélange a été filtré et la résine a été lavée avec CH₂Cl₂ (3 × 2 mL). Les filtrats combinés ont été évaporés et l'huile jaunâtre obtenue dissoute dans l'eau et lyophilisée. Masse de C₇₀H₁₀₄N₁₂O₁₃ calculée: 1320,78. FAB MS: 1321,2 [MH]⁺. HPLC analytique, conditions d'éluion d: t_R = 18,20 (voir annexe 2 p. xl).

Fmoc-Leu-IAA(6*S*)-Val-Lys-Leu-IAA(6*S*)-Val-Lys (**78**):

La résine **75** (76 mg) a été placée dans du CH₂Cl₂ (6 mL) et ce dernier a été dégazé en barbotant du N_{2(g)} (15 minutes). Une quantité catalytique de PdCl₂(PPh₃)₂ (~1 mg) et 0,1 mL de Bu₃SnH ont ensuite été ajoutés à la résine, qui a été agitée pendant 30 minutes. La résine a été lavée avec une solution 1:20 AcOH:CH₂Cl₂ (2 × 5 mL) et avec du CH₂Cl₂ (3 × 5 mL) pour être ensuite séchée afin de prendre un spectre FTIR-PA. Une partie de la résine (19 mg) a été traitée avec une solution 1:1 TFA:CH₂Cl₂ (2 mL) pendant 2 heures sous agitation mécanique. Le mélange a été filtré et la résine lavée avec CH₂Cl₂ (3 × 2 mL). Les filtrats combinés ont été évaporés et l'huile jaunâtre obtenue a été dissoute dans

l'eau et lyophilisée. Masse de $C_{67}H_{100}N_{12}O_{13}$ calculée: 1280,75. FAB MS: 1281,3, $[MH]^+$, 1321,2 $[M+40]^+$ (**76**). HPLC analytique, conditions d'élution d: $t_R = 16,76, 18,29$ (voir annexe 2 p. xlii)

Leu-IAA(6*S*)-Val-Lys-Leu-IAA(6*S*)-Val-Lys (**80**):

La résine **77** (57 mg) a été agitée mécaniquement avec une solution 1:5 pipéridine:DMF (2 mL) pendant 10 minutes, lavée avec DMF (2 mL), traitée une deuxième fois avec la solution de pipéridine et lavée avec du DMF (6×1 mL). Ensuite, une partie de la résine (26 mg) a été agitée mécaniquement avec une solution 1:1 TFA:CH₂Cl₂ (2 mL) pendant 2 heures. Le mélange a été filtré et la résine lavée avec CH₂Cl₂ (3×2 mL). Les filtrats combinés ont été évaporés et l'huile jaunâtre obtenue a été dissoute dans l'eau et lyophilisée. Masse de $C_{52}H_{90}N_{12}O_{11}$ calculée: 1058,69. FAB MS: 1059,5 $[MH]^+$, 1099,5 $[M+40]^+$ (**81**). HPLC analytique, conditions d'élution d: $t_R = 5,72, 8,09$ (voir annexe 2 p. xliv).

Essai d'obtention de Cyclo(Val-Lys-Leu-IAA(6*S*))₂ (**55**) en utilisant Pd₂Cl₂(PPh₃)₂ et Bu₃SnH.

La résine **79** (25 mg) a été gonflée avec DMF (1 mL), traitée avec une solution de DMF (1 mL) contenant TBTU (19 mg, 0,06 mmol), HOBt (9 mg, 0,06 mmol) et DIEA (0,02 mL, 0,12 mmol), agitée mécaniquement pendant 2 heures, filtrée et lavée avec DMF (6×1 mL). Le test de Kaiser étant positif, la résine a été soumise une deuxième fois aux conditions décrites. La résine a été agitée mécaniquement pendant 2 heures avec une solution 1:1 TFA:CH₂Cl₂ (2 mL). Le mélange a été filtré et la résine lavée avec CH₂Cl₂ (3×2 mL). Les filtrats combinés ont été évaporés et l'huile jaunâtre obtenue a été dissoute dans l'eau et lyophilisée. Masse de $C_{52}H_{88}N_{12}O_{10}$ calculée: 1040,67. FAB MS:HRMS: 1041,5 $[MH]^+$, 1075,5 $[M+34]^+$, 1100,4 $[M+59]^+$ (**81**). HPLC analytique, conditions d'élution d: $t_R = 7,81, 9,03$ (voir annexe 2 p. xlvi).

Fmoc-Leu-IAA(6*S*)-Val-Lys-Leu-IAA(6*S*)-Val-Lys (**78**):

La résine **75** (20 mg) a été placée dans du THF (1 mL) et ce dernier a été dégazé en barbotant du N_{2(g)} (15 minutes). Une quantité catalytique de Pd(PPh₃)₄ et de la morpholine (0,01 mL, 0,16 mmol) ont été ajoutés à la résine, qui a été agitée pendant 15 minutes. Elle a été lavée par la suite avec du THF (2 x 1 mL), traitée à nouveau dans les mêmes conditions pendant une heure et lavée avec du THF (1 x 1 mL) et du CH₂Cl₂ (4 x 1 mL). La résine a ensuite été placée dans un tube à rodage et agitée mécaniquement avec une solution 1:1 TFA:CH₂Cl₂ (2 mL) pendant 2 heures. Le mélange a été filtré et la résine lavée avec CH₂Cl₂ (3 x 2 mL). Les filtrats combinés ont été évaporés et l'huile obtenue a été dissoute dans l'eau et lyophilisée. Masse de C₆₇H₁₀₀N₁₂O₁₃ calculée: 1280,75. FAB MS: 1060, [M-222]⁺ (**80**), 1282, [MH]⁺. HPLC analytique, conditions d'éluion d: t_R = 6,63, 15,69 (voir annexe 2 p. xlviii).

Essai d'obtention de Cyclo(Val-Lys-Leu-IAA(6*S*))₂ (**55**) en utilisant Pd(PPh₃)₄ et la morpholine:

La résine de Wang portant le peptide protégé **75** (56 mg) a été placée dans du THF (1 mL) et ce dernier a été dégazé en barbotant du N_{2(g)} (15 minutes). Une quantité catalytique de Pd(PPh₃)₄ et de la morpholine (0,01 mL, 0,16 mmol) ont été ajoutés à la résine, qui a été agitée pendant 15 minutes. Elle a été lavée par la suite avec du THF (2 x 1 mL), traitée à nouveau dans les mêmes conditions pendant une heure et lavée avec du THF (1 x 1 mL) et du CH₂Cl₂ (4 x 1 mL). La résine a ensuite été agitée mécaniquement avec une solution 1:5 pipéridine:DMF (1 mL) pendant 10 minutes, lavée avec DMF (1 mL), traitée une deuxième fois avec la solution de pipéridine et lavée avec du DMF (6 x 1 mL). La résine a été gonflée avec DMF (1 mL), traitée avec une solution de DMF (1 mL) contenant TBTU (6,7 mg, 0,042 mmol), HOBt (1,9 mg, 0,014 mmol) et DIEA (0,01 mL, 0,57 mmol), agitée mécaniquement pendant 2 heures, filtrée et lavée avec DMF (6 x 1 mL). Le test de Kaiser étant positif, la résine a été soumise une deuxième fois aux conditions de cyclisation décrites. La résine a été agitée mécaniquement pendant 2 heures avec une solution 1:1 TFA:CH₂Cl₂ (2 mL). Le mélange a été filtré et la résine lavée avec CH₂Cl₂ (3 x 2 mL). Les filtrats combinés ont été évaporés et l'huile obtenue a été dissoute dans l'eau et

lyophilisée. Masse de $C_{52}H_{88}N_{12}O_{10}$ calculée: 1040,67. FAB MS: 1041 [MH]⁺, 1059 [M+18]⁺ (**80**). HPLC analytique, conditions d'élution d: pics multiples (voir annexe 2 p. 1).

Résine Boc-Leu-oxime (**83**):

La résine d'oxime **82** (6 g, 0,75 mmol/g, 4,5 mmol) a été gonflée dans du CH_2Cl_2 (75 mL), traitée avec la *N*- α -Boc-Leu (5,28 mmol), le EACNOx (10,56 mmol), le DCC (5,28 mmol) et agitée mécaniquement pendant 17 heures. La résine a ensuite été filtrée et lavée avec du CH_2Cl_2 (3 x 75 mL), une solution 1:1 CH_2Cl_2 :EtOH (3 x 75 mL) et du CH_2Cl_2 (3 x 75 mL). Spectre PA-FTIR: élongation NH: 3417 cm^{-1} , C=O ester: 1775 cm^{-1} , O-(C=O)-N: 1718 cm^{-1} (voir annexe 2 p. lii).

Préparation de Boc-Leu-NH-Pr (**84**):

Détermination de la substitution de la résine Boc-Leu-oxime (**83**)

Deux aliquotes de la résine **83** ont été séchées sur la pompe à vide dans des tubes à rodage (104 et 106 mg). Le $CHCl_3$ (2 mL) et la propylamine (15 μ L, 0,18 mmol) ont été ajoutés dans les tubes et ceux-ci ont été agités mécaniquement pendant 43 heures. Les résines ont ensuite été filtrées séparément et lavées avec du $CHCl_3$, une solution 1:1 $CHCl_3$:MeOH et du $CHCl_3$ (2 mL chaque). Les filtrats combinés ont été évaporés et pesés (20 et 21 mg). Substitution calculée: 0,7 mmol/g. RMN ¹H ($CDCl_3$): δ 0,86 (m, 9H), 1,37 (s, 9H), 1,44 (m, 3H), 1,58 (m, 2H), 3,13 (q, J = 7 Hz, 2H), 4,00 (s large, 1H), 4,92 (s large, 1H), 6,24 (s large, 1H).

Acétylation de la résine Boc-Leu-oxime (**83**):

La résine **83** (0,687g, 0,48 mmol) a été gonflée dans du CH_2Cl_2 (5 mL) traitée avec une solution de Ac_2O (0,23 mL, 2,4 mmol) et de DIEA (0,17 mL, 0,96 mmol) dans le CH_2Cl_2 (5 mL) et agitée mécaniquement pendant une heure. La résine a été filtrée et lavée avec du CH_2Cl_2 (5 x 10 mL).

Protocole général pour l'obtention des peptides linéaires sur résine d'oxime (**85** et **86**):

Tous les couplages ont été réalisés de la même manière en utilisant des tubes de Schlenk modifiés par l'ajout d'un filtre. La résine **83** est d'abord gonflée dans le CH_2Cl_2 (1 mL), agitée mécaniquement avec 10 mL d'une solution 1:3 TFA: CH_2Cl_2 pendant deux minutes, filtrée et traitée deux autres fois 15 minutes avec 10 mL de la solution 1:3 de TFA: CH_2Cl_2 . La résine a été lavée avec du CH_2Cl_2 (5 x 10 mL) et traitée avec une solution de 1:9 DIEA: CH_2Cl_2 (10 mL) et agitée mécaniquement pendant deux minutes. La résine est ensuite lavée avec CH_2Cl_2 (3 x 10 mL), gonflée dans le DMF (5 mL) et traitée avec une solution de DMF contenant 2 équivalents d'acide aminé Boc (sauf Boc-IAA: 1,1 équivalents) relativement à la substitution de la résine, 2 équivalents de TBTU et 4 équivalents de DIEA. Après avoir été agitée pendant deux heures, la résine a été filtrée et lavée avec DMF (5 x 10 mL) et CH_2Cl_2 (5 x 10 mL). Le test de Kaiser qualitatif a été effectué sur une aliquote de la résine pour déterminer l'efficacité de couplage. Dans le cas d'un test négatif, la séquence de couplage a été poursuivie. Dans le cas d'un test positif, un deuxième couplage a été effectué en utilisant les mêmes conditions mentionnées ci-haut. L'acétylation a été réalisée suite à chaque couplage final en utilisant l' Ac_2O (0,23 mL, 2,4 mmol) et la DIEA (0,17 mL, 0,96 mmol) dans le CH_2Cl_2 pendant une heure. La résine a été ensuite lavée avec CH_2Cl_2 (5 x 10 mL).

Cyclo(Val-Lys(Z)-Leu-IAA(6S))₂ (**87**):

La résine d'oxime **85**, Boc-IAA(6S)-Val-Lys(Z)-Leu-IAA(6S)-Val-Lys(Z)-Leu-oxime, a d'abord été gonflée dans le CH_2Cl_2 (1 mL), agitée mécaniquement avec 10 mL d'une solution 1:3 de TFA: CH_2Cl_2 pendant deux minutes, filtrée et traitée deux autres fois 15 minutes avec 10 mL de la solution 1:3 de TFA: CH_2Cl_2 . La résine a été lavée avec du CH_2Cl_2 (5 x 10 mL) et traitée avec une solution de 1:9 DIEA: CH_2Cl_2 (10 mL) pendant deux minutes avec agitation mécanique. La résine est ensuite lavée avec CH_2Cl_2 (3 x 10 mL), gonflée dans le DMF (5 mL) et traitée avec une solution de DIEA (0,09 mL, 0,5 mmol) et d'AcOH (0,03 mL, 0,5 mmol) dans le DMF (5 mL). Après avoir été agitée mécaniquement pendant 23 heures, la résine a été filtrée et lavée avec DMF (2 x 10 mL), isopropanol (1 x 10 mL) et DMF (2 x 10 mL). Les filtrats combinés sont ensuite évaporés

et triturés avec de l'eau une fois. Le résidu obtenu a été purifié par chromatographie sur gel de silice en utilisant un système 18:1:1 CH₂Cl₂:MeOH:AcOH comme éluant et a donné 29 mg de **87** (10% basé sur la substitution initiale de la résine). RMN ¹H (CDCl₃): δ0,9 (m, 12H), 1,2-2,4 (m, 22H), 2,9 (m, 1H), 3,3 (m, 2H), 3,9 (m, 1H), 4,4 (m, 2H), 5,1 (m, 2H), 7,0 (m, 1H), 7,3 (m, 5H), 7,5 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 8,5 (d, J = 9,5 Hz, 1H). Masse de C₆₈H₁₀₀N₁₂O₁₄ calculée: 1308,75. MALDI TOF MS: 1310,2 [MH]⁺, 1332,3 [M+23]⁺, 1348,3 [M+39]⁺. HPLC analytique, conditions d'éluion c: t_R = 22,96, 26,79 (**87**).

Cyclo(Val-Orn(Z)-Leu-IAA(6R))₂ (**88**):

La résine d'oxime **86**, Boc-IAA(6R)-Val-Orn(Z)-Leu-IAA(6R)-Val-Orn(Z)-Leu-oxime, a d'abord été gonflée dans le CH₂Cl₂ (1 mL), agitée mécaniquement avec 10 mL d'une solution 1:3 de TFA:CH₂Cl₂ pendant deux minutes, filtrée et traitée deux autres fois 15 minutes avec 10 mL de la solution 1:3 de TFA:CH₂Cl₂. La résine a été lavée avec du CH₂Cl₂ (5 x 10 mL) et traitée avec une solution de 1:9 DIEA:CH₂Cl₂ (10 mL) pendant deux minutes avec agitation mécanique. La résine est ensuite lavée avec CH₂Cl₂ (4 x 10 mL), gonflée dans le CH₂Cl₂ (5 mL) et traitée avec une solution de DIEA (0,09 mL, 0,5 mmol) et d'AcOH (0,03 mL, 0,5 mmol) dans le CH₂Cl₂ (5 mL). Après avoir été agitée mécaniquement pendant 66 heures, la résine a été filtrée et lavée avec CH₂Cl₂ (2 x 10 mL), méthanol (1 x 10 mL), CH₂Cl₂ (2 x 10 mL) et méthanol (1 x 10 mL). Les filtrats combinés sont ensuite évaporés, dissous dans une solution 3:2 de MeOH:H₂O (2 mL) et passés sur une colonne échangeuse de cations pour se débarrasser de la DIEA en utilisant 3:2 de MeOH:H₂O comme éluant. Les fractions combinées ont donné un solide blanc qui a été purifié par HPLC en utilisant un gradient de 0-83% de B dans A en 45 minutes, 83% de B pendant 10 minutes et un autre gradient de 83-93% de B en 15 minutes. L'évaporation des fractions contenant le bon produit a donné 11,4 mg d'un solide blanc (2% basé sur la substitution initiale de la résine). RMN ¹H (CDCl₃): δ0,9 (m, 12H), 1,25 (m, 8H), 1,55 (m, 6H), 1,8-2,5 (m, 14H), 3,1 (m, 1H), 3,7 (m, 1H), 4,6 (m, 1H), 5,0 (m, 2H), 7,35 (m, 1H), 7,65 (m, 1H), 8,6 (m, 1H). Masse de C₆₆H₉₆N₁₂O₁₄ calculée: 1280,72. FAB MS: 1147,6 [M-134]⁺, 1173,6 [M-108]⁺, 1281,8 [MH]⁺. HPLC analytique, conditions d'éluion a: t_R = 16,36.

Cyclo(Val-Lys-Leu-IAA(6S))₂ (**55**):

Le peptide cyclique protégé **87** (20 mg, 0,015 mmol) a été dissous dans une solution 19:1 méthanol:eau (10 mL) et traité avec HCl (2N, 45 μ L, 0,09 mmol) et palladium noir (2 mg, 0,002 mmol). Le mélange a été dégazé sous pression réduite, placé sous atmosphère d'hydrogène (1 atm) et agité pendant 23,5 heures. Le mélange a ensuite été filtré sur CeliteTM, rincé avec du MeOH (15 mL) et évaporé. Le résidu obtenu a été purifié par HPLC en utilisant un gradient de 0-80% de B dans A en 70 minutes et en évaporant les fractions pures pour donner un solide blanc (15,5 mg, 98%, 10% basé sur la substitution initiale de la résine). RMN ¹H (H₂O:D₂O 9:1): δ 0,9 (m, 12H), 1,3 (m, 2H), 1,4-1,65 (m, 7H), 1,7-1,9 (m, 3H), 2,0-2,25 (m, 6H), 2,9 (m, 2H), 3,65 (m, 1H), 4,05 (m, 2H), 4,35 (m, 2H), 4,45 (m, 1H), 7,65 (m, 1H), 8,2 (m, 1H), 8,3 (m, 1H), 8,65 (m, 1H). Masse de C₅₂H₈₈N₁₂O₁₀ calculée: 1040,67. MALDI TOF MS: 1041,4 [MH]⁺, 1063,3 [M+22]⁺. HPLC analytique, conditions d'élution c: t_R = 20,00.

Cyclo(Val-Orn-Leu-IAA(6R))₂ (**56**):

Le peptide cyclique protégé **88** (11,4 mg, 0,0089 mmol) a été dissous dans une solution 19:1 méthanol:eau (5 mL) et traité avec HCl (2N, 25 μ L, 0,05 mmol) et palladium noir (1,2 mg, 0,0011 mmol). Le mélange a été dégazé sous pression réduite, placé sous atmosphère d'hydrogène (1 atm) et agité pendant 18 heures. Le mélange a ensuite été filtré sur CeliteTM, rincé avec du MeOH (10 mL) et évaporé. Le résidu obtenu a été purifié par HPLC en utilisant un gradient de 0-50% de B dans A en 90 minutes et 50% de B dans A pendant 30 minutes pour donner un solide blanc (8,8 mg, 98%, 2% basé sur la substitution initiale de la résine). RMN ¹H (H₂O:D₂O 9:1): δ 0,8 (m, 9H), 0,9 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,3-1,6 (m, 8H), 1,75 (m, 1H), 1,85 (m, 1H), 1,95 (m, 1H), 2,15 (m, 4H), 2,5 (m, 1H), 2,9 (m, 2H), 3,7 (m, 2H), 4,1 (t, J = 9Hz, 1H), 4,5 (m, 2H), 4,8 (m, 1H), 7,8 (d, J = 9,3 Hz, 1H), 8,4 (d, J = 9,1 Hz, 1H), 8,7 (d, J = 9,4 Hz, 1H), 9,0 (d, J = 6,8 Hz, 1H). Masse de C₅₀H₈₄N₁₂O₁₀ calculée: 1012,64. FAB MS: 1013,7 [MH]⁺, 1036,7 [M+23]⁺, 1051,7 [M+38]⁺, 1165,7 [M+152]⁺. HPLC analytique, conditions d'élution a: t_R = 16,32.

Spectre de cyclo(Val-Orn-Leu- IAA(6*S*))₂ (**51**):

Cet analogue de la GS a été synthétisé par Lombart et Lubell et nous l'avons utilisé pour faire l'analyse conformationnelle.⁴

RMN ¹H (H₂O:D₂O 9:1): δ 0,95 (m, 9H), 1,04 (m, 3H), 1,58 (m, 3H), 1,76 (m, 4H), 2,0 (m, 3H), 2,16 (m, 2H), 2,3-2,4 (m, 4H), 3,05 (m, 2H), 3,78 (m, 1H), 3,99 (t, 1H), 4,21 (t, 1H), 4,5 (m, 1H), 4,6 (m, 1H), 7,95 (d, 1H), 8,5 (d, 1H), 8,7 (d, 1H), 8,9 (d, 1H).

7.3 Références de la partie expérimentale.

1. Basé sur la méthode employée dans Williamson, M.P.; Havel, T.F.; Wüthrich, K. *J. Mol. Biol.* **1985**, *182*, 295-315.
2. Meienhofer, J.; Waki, M.; Heimer, E.P.; Lambros, T.J.; Makofske, R.C.; Chang, C-D. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1979**, *13*, 35.
3. Gisin, B.F. *Anal. Chim. Acta.* **1972**, *58*, 248.
4. Lombart, H.-G.; Lubell, W.D. dans *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*; Pravin T.P. Kaumaya et Robert S. Hodges, Eds.; Mayflower Scientific Ltd., 1996; *291*, 695.

Glossaire.

Amphiphile: une molécule ayant une tête polaire soluble dans l'eau (hydrophile) et une queue organique insoluble dans l'eau (hydrophobe).

Hémolytique: qui provoque la destruction des globules rouges.

Liposome: une vésicule (sac) artificielle de phospholipides utilisée comme système modèle pour l'étude des membranes cellulaires.

Orthogonal: un système orthogonal est défini comme un ensemble de groupes protecteurs de classes complètement indépendantes. Dans un tel système, chaque classe de groupe protecteur peut être enlevée dans n'importe quel ordre en présence de toutes les autres classes. (Voir référence 8 du chapitre trois)

«**Scavenger**»: molécule ajoutée à un agent de clivage pour piéger des espèces réactives non-désirées (e.g. des carbocations).

Annexe 1: Activité biologique et hémolytique.

SOUCHÉ	GS ^a	[IAA(6S) ^{4-5,4'-5'}]GS	[Lys ^{2,2'} , IAA(6S) ^{4-5,4'-5'}]GS	[IAA(6R) ^{4-5,4'-5'}]GS
		51 ^a	55 ^a	56 ^a
Bactéries gram-positif				
<i>Staphylococcus aureus</i> SAP0017	3,1	12,5	25	100
<i>Staphylococcus aureus</i> K147	3,1	12,5	12,5	100
<i>Staphylococcus. epidermidis</i> C621	3,1	12,5	12,5	50
<i>Bacillus subtilis</i> C626	3,1	25	25	100
<i>Enterococcus faecalis</i> C625	6,2	25	25	>100
<i>C. xerosis</i> C875	0,8	3,1	3,1	12,5
Bactéries gram-négatif				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> H187	50	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> H188	6,2	12,5	12,5	25
<i>Escherichia coli</i> UB1005	25	50	50	>100
<i>Escherichia coli</i> DC2	6,2	25	25	50
<i>Salmonella typhimurium</i> C587	25	50	50	>100
<i>S. typhimurium</i> C610	12,5	50	50	100
Champignon				
<i>Candida albicans</i> CAND105	6,2	12,5	12,5	100

a: concentration minimale d'inhibition µg/mL.

Tableau XXI: Activité biologique de la GS, des analogues [IAA(6S)^{4-5,4'-5'}]GS (51), [Lys^{2,2'}, IAA(6S)^{4-5,4'-5'}]GS (55) et [IAA(6R)^{4-5,4'-5'}]GS (56).

Les tests d'activité biologique et hémolytique ont été réalisés par Mme Susan W. Farmer et le professeur Robert E.W. Hancock dans le département de Microbiologie et d'immunologie à l'Université de la Colombie-Britannique selon le protocole décrit dans les références 72 et 79 du chapitre 1.

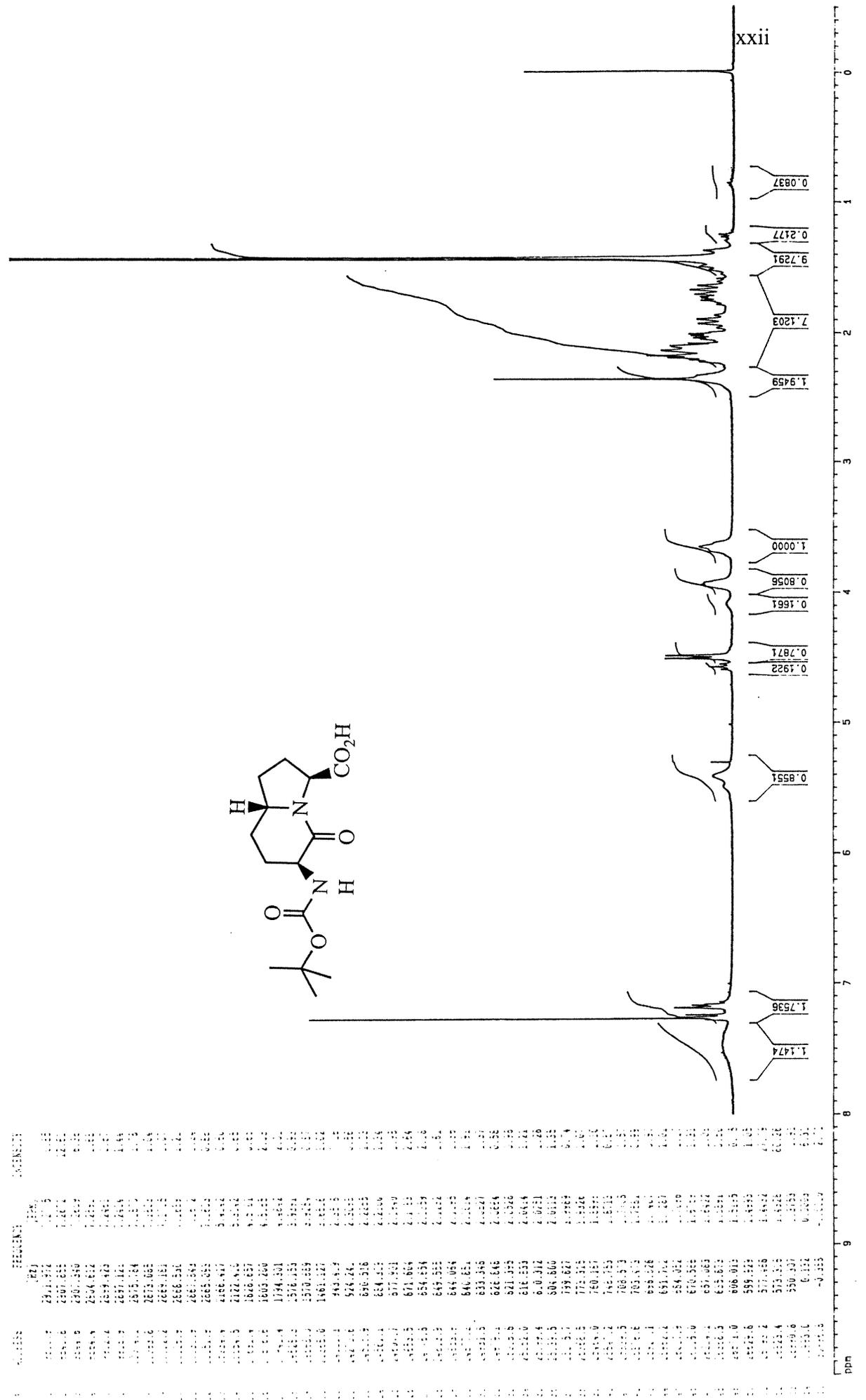
PEPTIDE	2h ^a	24h ^a
Gramicidine S	100	25
[IAA(6S) ^{4-5,4'-5'}]GS <u>51</u>	400	100
[Lys ^{2,2'} , IAA(6S) ^{4-5,4'-5'}]GS <u>55</u>	400	100
[IAA(6R) ^{4-5,4'-5'}]GS <u>56</u>	200	100

a. Concentration minimale pour effectuer la lyse à 100% en µg/mL.

Tableau XXII: Activité hémolytique de la GS, des analogues [IAA(6S)^{4-5,4'-5'}]GS (51), [Lys^{2,2'}, IAA(6S)^{4-5,4'-5'}]GS (55) et [IAA(6R)^{4-5,4'-5'}]GS (56).

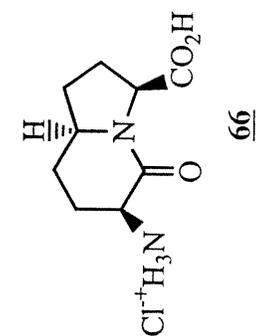
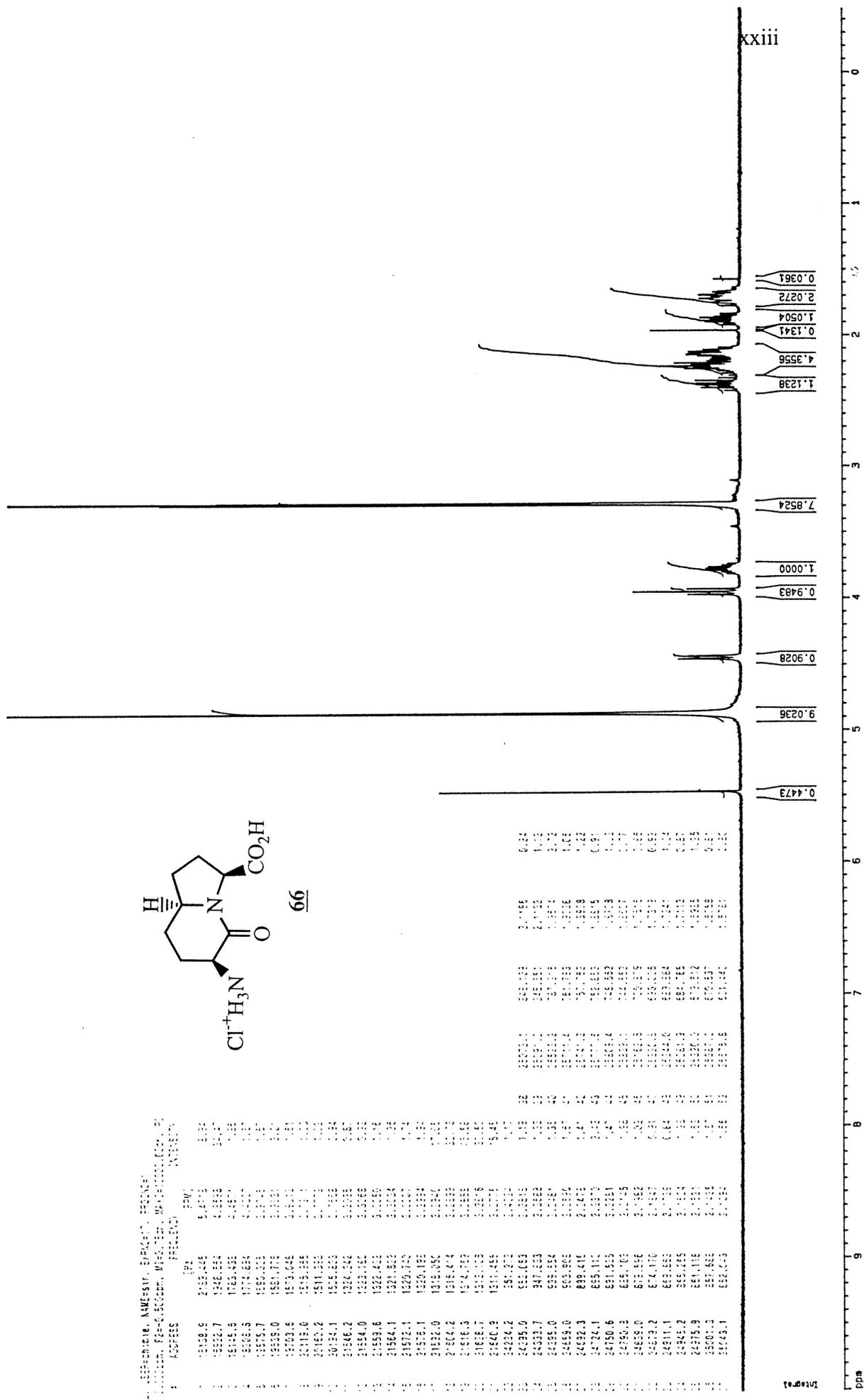
Annexe 2: Spectres et chromatogrammes.

iiXX



Chemical Shift (ppm): 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0

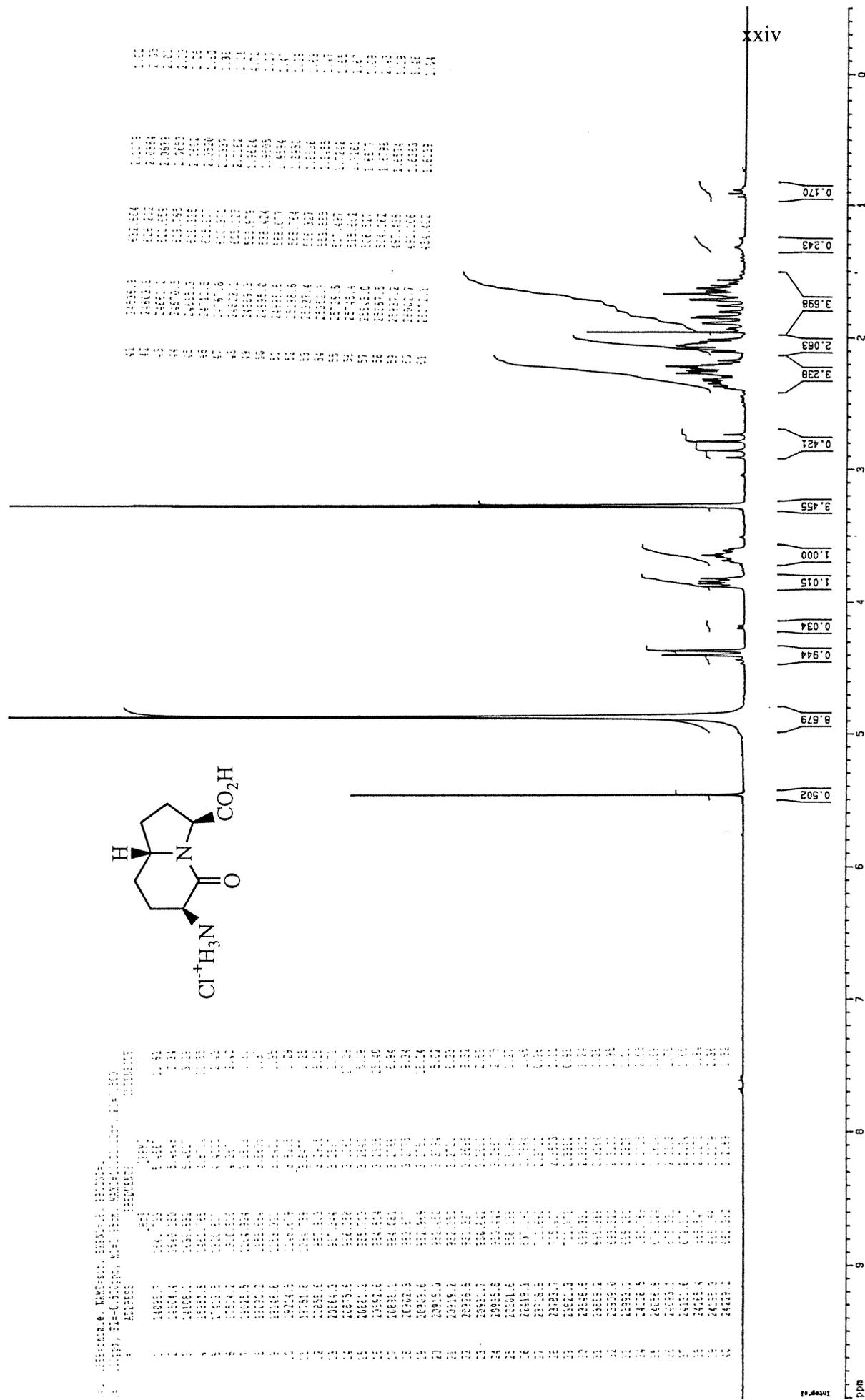
Integration: 1.1474, 1.7536, 1.9459, 7.1203, 9.7291, 0.2177, 0.0837, 0.1922, 0.7871, 0.1661, 0.8056, 1.0000, 0.8551



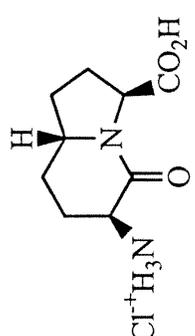
DIFFERENTIAL NMR SPECTRUM OF 99

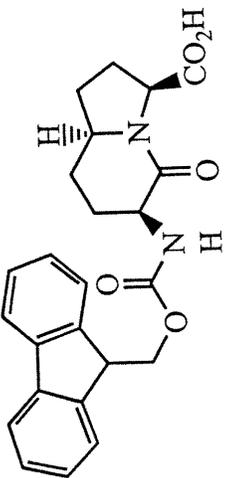
Chemical Shift (ppm) vs. Integral

Chemical Shift (ppm)	Integral
9.8236	0.0361
9.236	0.0361
8.928	0.0361
8.473	0.0361
7.8524	0.0361
7.1238	0.0361
6.3556	0.0361
5.1341	0.0361
4.3556	0.0361
3.0504	0.0361
2.0272	0.0361
1.1238	0.0361
0.9483	0.0361
0.928	0.0361
0.473	0.0361



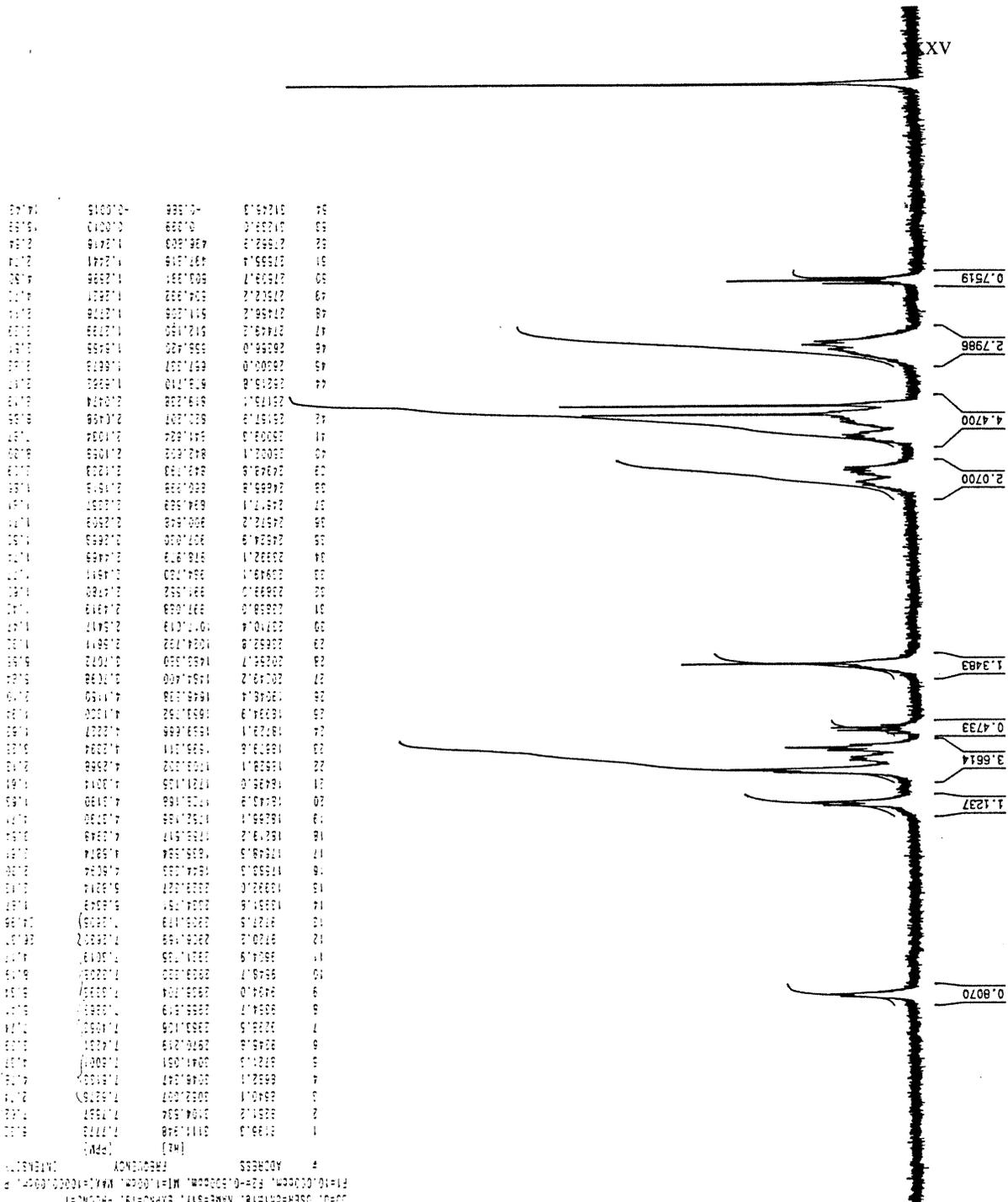
1. 0.000000
 2. 0.000000
 3. 0.000000
 4. 0.000000
 5. 0.000000
 6. 0.000000
 7. 0.000000
 8. 0.000000
 9. 0.000000
 10. 0.000000
 11. 0.000000
 12. 0.000000
 13. 0.000000
 14. 0.000000
 15. 0.000000
 16. 0.000000
 17. 0.000000
 18. 0.000000
 19. 0.000000
 20. 0.000000
 21. 0.000000
 22. 0.000000
 23. 0.000000
 24. 0.000000
 25. 0.000000
 26. 0.000000
 27. 0.000000
 28. 0.000000
 29. 0.000000
 30. 0.000000
 31. 0.000000
 32. 0.000000
 33. 0.000000
 34. 0.000000
 35. 0.000000
 36. 0.000000
 37. 0.000000
 38. 0.000000
 39. 0.000000
 40. 0.000000
 41. 0.000000
 42. 0.000000
 43. 0.000000
 44. 0.000000
 45. 0.000000
 46. 0.000000
 47. 0.000000
 48. 0.000000
 49. 0.000000
 50. 0.000000
 51. 0.000000
 52. 0.000000
 53. 0.000000
 54. 0.000000
 55. 0.000000
 56. 0.000000
 57. 0.000000
 58. 0.000000
 59. 0.000000
 60. 0.000000
 61. 0.000000
 62. 0.000000
 63. 0.000000
 64. 0.000000
 65. 0.000000
 66. 0.000000
 67. 0.000000
 68. 0.000000
 69. 0.000000
 70. 0.000000
 71. 0.000000
 72. 0.000000
 73. 0.000000
 74. 0.000000
 75. 0.000000
 76. 0.000000
 77. 0.000000
 78. 0.000000
 79. 0.000000
 80. 0.000000
 81. 0.000000
 82. 0.000000
 83. 0.000000
 84. 0.000000
 85. 0.000000
 86. 0.000000
 87. 0.000000
 88. 0.000000
 89. 0.000000
 90. 0.000000
 91. 0.000000
 92. 0.000000
 93. 0.000000
 94. 0.000000
 95. 0.000000
 96. 0.000000
 97. 0.000000
 98. 0.000000
 99. 0.000000
 100. 0.000000



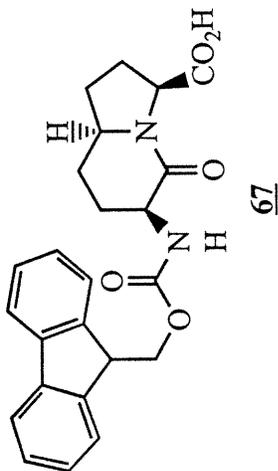
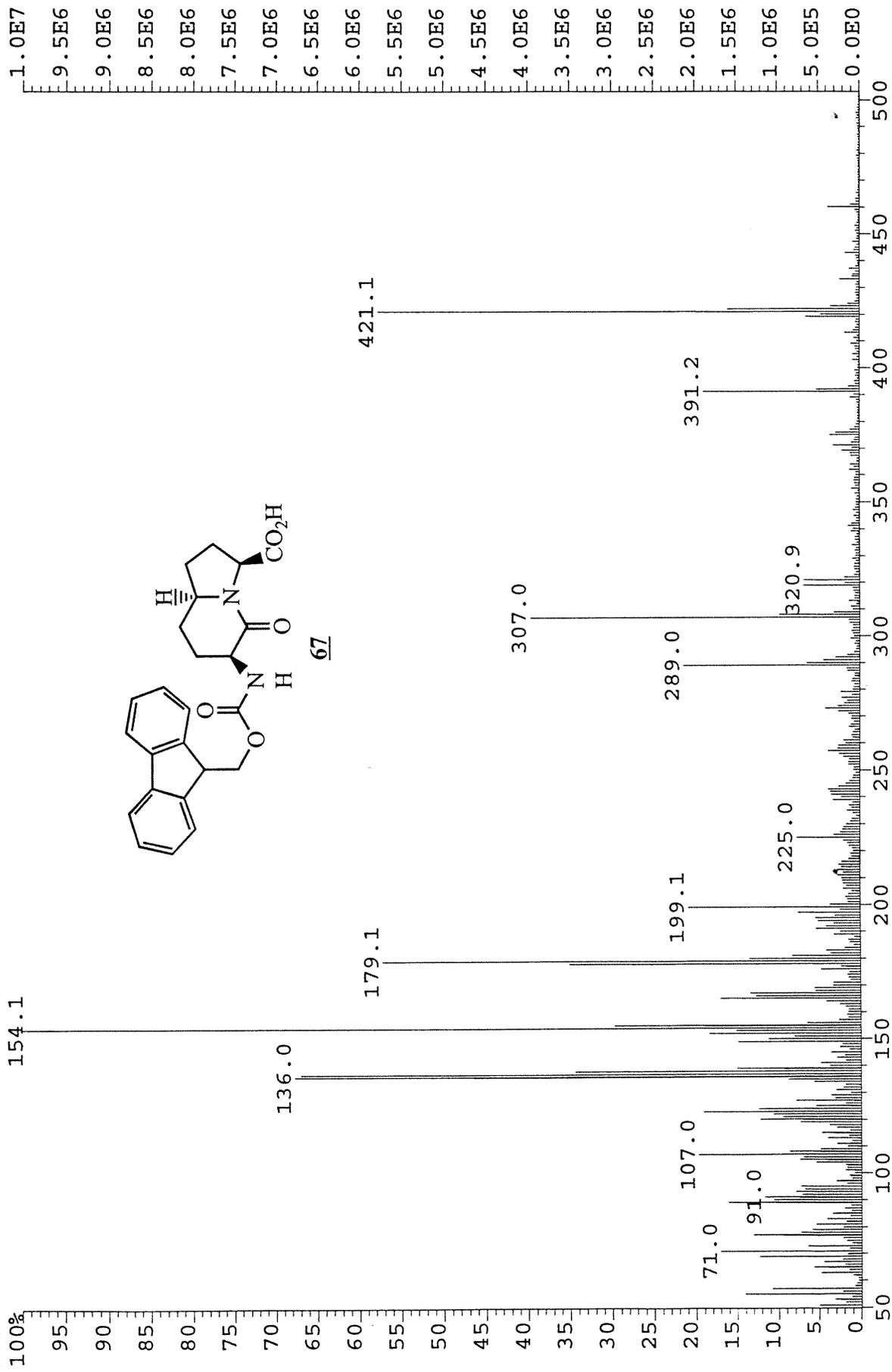


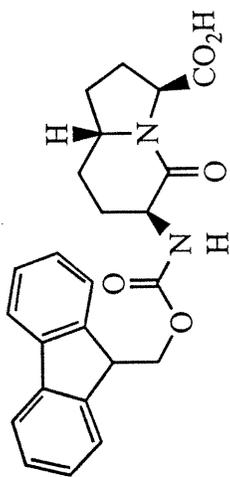
CPDUI USER=CONVINTL NAME=SYN1 EMPH=H191 PRONCH=1
 F1=10.000000M F2=0.150000M M1=1.0000M KMA1=1000.0000M P
 # ADDRESS # FREQUENCY # INTEGRAL

#	ADDRESS	#	FREQUENCY	#	INTEGRAL
1	2111.348	1	7.7778	1	61.02
2	2081.2	2	7.8537	2	7.62
3	2041.031	3	7.9297	3	7.62
4	2006.247	4	7.9957	4	41.74
5	1971.051	5	7.9957	5	41.07
6	1936.219	6	7.9957	6	41.07
7	1901.109	7	7.9957	7	41.07
8	1866.519	8	7.9957	8	41.07
9	1831.104	9	7.9957	9	41.07
10	1795.7	10	7.9957	10	41.07
11	1760.49	11	7.9957	11	41.07
12	1725.179	12	7.9957	12	41.07
13	1689.791	13	7.9957	13	41.07
14	1654.404	14	7.9957	14	41.07
15	1619.017	15	7.9957	15	41.07
16	1583.63	16	7.9957	16	41.07
17	1548.243	17	7.9957	17	41.07
18	1512.856	18	7.9957	18	41.07
19	1477.469	19	7.9957	19	41.07
20	1442.082	20	7.9957	20	41.07
21	1406.695	21	7.9957	21	41.07
22	1371.308	22	7.9957	22	41.07
23	1335.921	23	7.9957	23	41.07
24	1300.534	24	7.9957	24	41.07
25	1265.147	25	7.9957	25	41.07
26	1229.76	26	7.9957	26	41.07
27	1194.373	27	7.9957	27	41.07
28	1158.986	28	7.9957	28	41.07
29	1123.599	29	7.9957	29	41.07
30	1088.212	30	7.9957	30	41.07
31	1052.825	31	7.9957	31	41.07
32	1017.438	32	7.9957	32	41.07
33	982.051	33	7.9957	33	41.07
34	946.664	34	7.9957	34	41.07
35	911.277	35	7.9957	35	41.07
36	875.89	36	7.9957	36	41.07
37	840.503	37	7.9957	37	41.07
38	805.116	38	7.9957	38	41.07
39	769.729	39	7.9957	39	41.07
40	734.342	40	7.9957	40	41.07
41	698.955	41	7.9957	41	41.07
42	663.568	42	7.9957	42	41.07
43	628.181	43	7.9957	43	41.07
44	592.794	44	7.9957	44	41.07
45	557.407	45	7.9957	45	41.07
46	522.02	46	7.9957	46	41.07
47	486.633	47	7.9957	47	41.07
48	451.246	48	7.9957	48	41.07
49	415.859	49	7.9957	49	41.07
50	380.472	50	7.9957	50	41.07
51	345.085	51	7.9957	51	41.07
52	309.698	52	7.9957	52	41.07
53	274.311	53	7.9957	53	41.07
54	238.924	54	7.9957	54	41.07
55	203.537	55	7.9957	55	41.07
56	168.15	56	7.9957	56	41.07
57	132.763	57	7.9957	57	41.07
58	97.376	58	7.9957	58	41.07
59	61.989	59	7.9957	59	41.07
60	26.602	60	7.9957	60	41.07
61	9.215	61	7.9957	61	41.07
62	-26.172	62	7.9957	62	41.07
63	-61.559	63	7.9957	63	41.07
64	-96.946	64	7.9957	64	41.07
65	-132.333	65	7.9957	65	41.07
66	-167.72	66	7.9957	66	41.07
67	-203.107	67	7.9957	67	41.07
68	-238.494	68	7.9957	68	41.07
69	-273.881	69	7.9957	69	41.07
70	-309.268	70	7.9957	70	41.07
71	-344.655	71	7.9957	71	41.07
72	-380.042	72	7.9957	72	41.07
73	-415.429	73	7.9957	73	41.07
74	-450.816	74	7.9957	74	41.07
75	-486.203	75	7.9957	75	41.07
76	-521.59	76	7.9957	76	41.07
77	-556.977	77	7.9957	77	41.07
78	-592.364	78	7.9957	78	41.07
79	-627.751	79	7.9957	79	41.07
80	-663.138	80	7.9957	80	41.07
81	-698.525	81	7.9957	81	41.07
82	-733.912	82	7.9957	82	41.07
83	-769.299	83	7.9957	83	41.07
84	-804.686	84	7.9957	84	41.07
85	-840.073	85	7.9957	85	41.07
86	-875.46	86	7.9957	86	41.07
87	-910.847	87	7.9957	87	41.07
88	-946.234	88	7.9957	88	41.07
89	-981.621	89	7.9957	89	41.07
90	-1017.008	90	7.9957	90	41.07
91	-1052.395	91	7.9957	91	41.07
92	-1087.782	92	7.9957	92	41.07
93	-1123.169	93	7.9957	93	41.07
94	-1158.556	94	7.9957	94	41.07
95	-1193.943	95	7.9957	95	41.07
96	-1229.33	96	7.9957	96	41.07
97	-1264.717	97	7.9957	97	41.07
98	-1300.104	98	7.9957	98	41.07
99	-1335.491	99	7.9957	99	41.07
100	-1370.878	100	7.9957	100	41.07



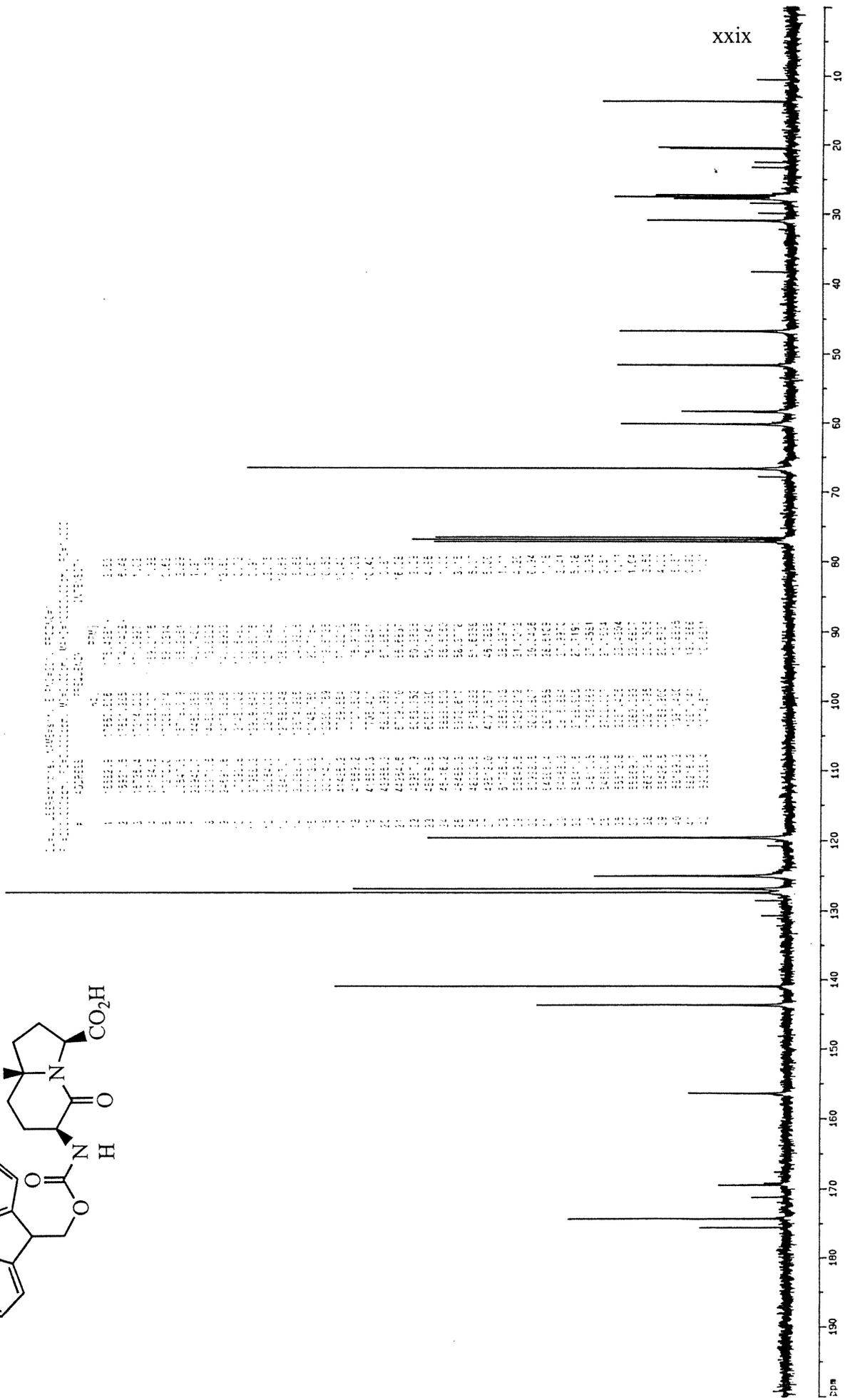
File: V97I2319FAZ13 Ident: 2 Acq: 23-SEP-1997 15:26:26 +0:18 Cal: GO_1
AutoSpecQ FAB+ Magnet BpI: 9966220 TIC: 217732512 Flags: HALL
File Text: SIR-19-NBA



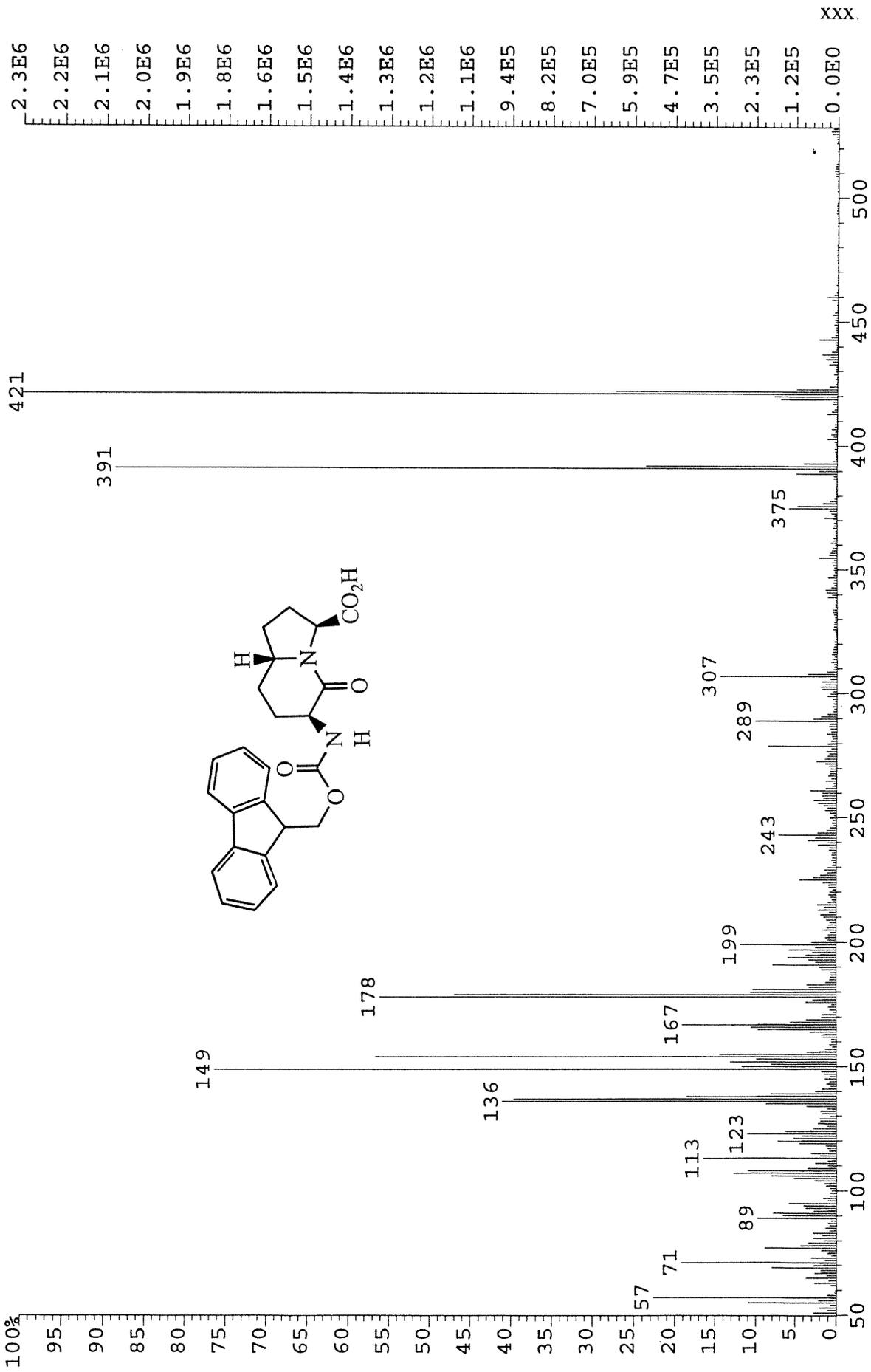


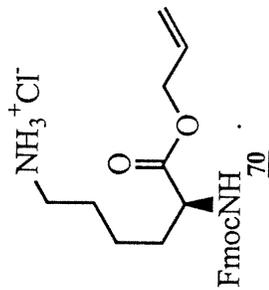
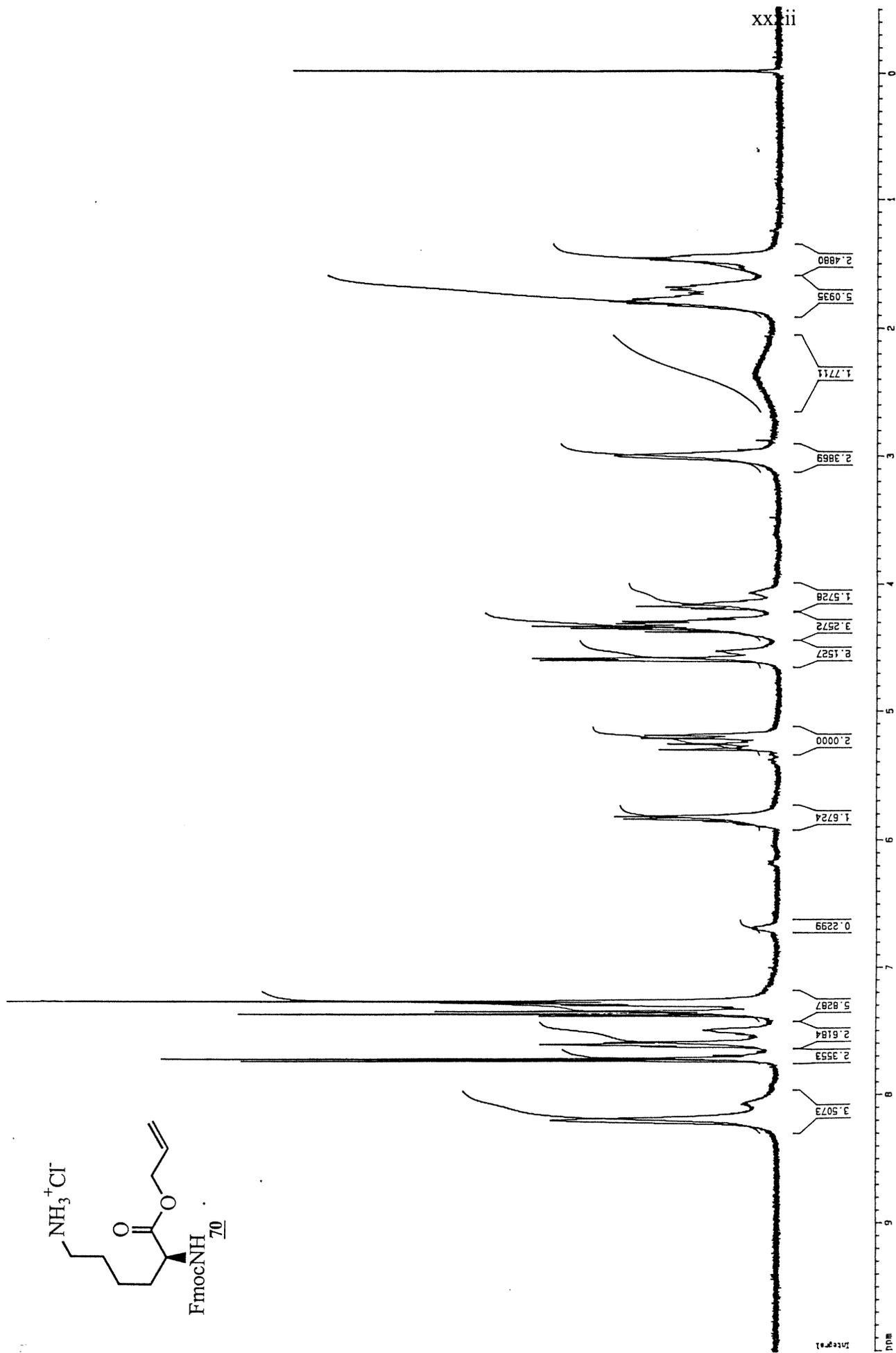
Chemical structure: C1=CC=C2C(=C1)C(=O)N2C1CCN(C1)C(=O)O
 Name: 2-(2-(2-oxo-2,3-dihydro-1H-piperidin-3-yl)ethyl)fluorene-9-carboxylic acid
 MW: 314.36
 C₂₂H₂₀N₂O₃

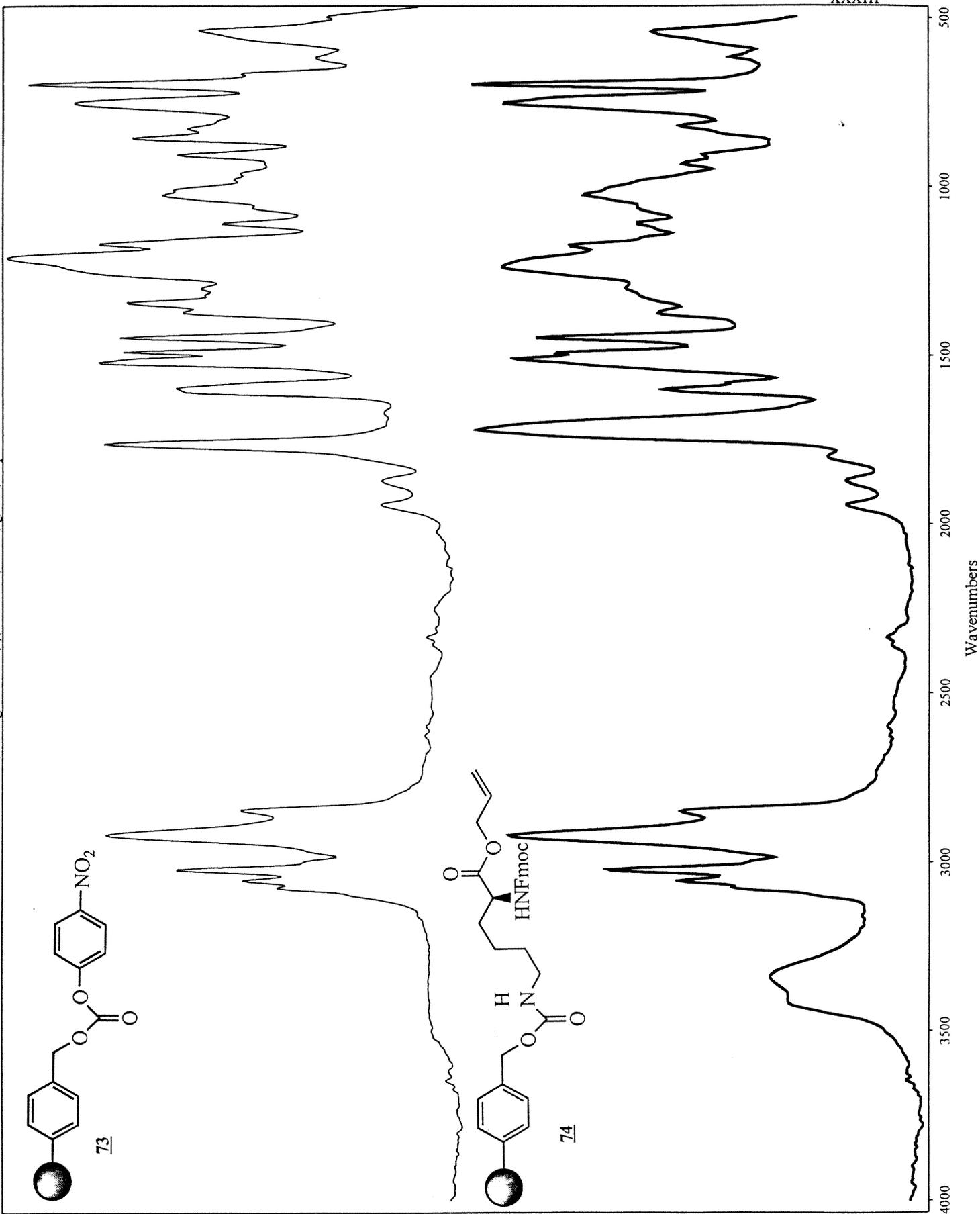
Chemical Shift (ppm)	Integration	Assignment
172.1	1.00	Carbonyl C=O
168.5	1.00	Carbonyl C=O
155.2	1.00	Aromatic C-O
151.8	1.00	Aromatic C-O
148.3	1.00	Aromatic C-O
144.9	1.00	Aromatic C-O
141.5	1.00	Aromatic C-O
138.1	1.00	Aromatic C-O
134.7	1.00	Aromatic C-O
131.3	1.00	Aromatic C-O
127.9	1.00	Aromatic C-O
124.5	1.00	Aromatic C-O
121.1	1.00	Aromatic C-O
117.7	1.00	Aromatic C-O
114.3	1.00	Aromatic C-O
110.9	1.00	Aromatic C-O
107.5	1.00	Aromatic C-O
104.1	1.00	Aromatic C-O
100.7	1.00	Aromatic C-O
97.3	1.00	Aromatic C-O
93.9	1.00	Aromatic C-O
90.5	1.00	Aromatic C-O
87.1	1.00	Aromatic C-O
83.7	1.00	Aromatic C-O
80.3	1.00	Aromatic C-O
76.9	1.00	Aromatic C-O
73.5	1.00	Aromatic C-O
70.1	1.00	Aromatic C-O
66.7	1.00	Aromatic C-O
63.3	1.00	Aromatic C-O
59.9	1.00	Aromatic C-O
56.5	1.00	Aromatic C-O
53.1	1.00	Aromatic C-O
49.7	1.00	Aromatic C-O
46.3	1.00	Aromatic C-O
42.9	1.00	Aromatic C-O
39.5	1.00	Aromatic C-O
36.1	1.00	Aromatic C-O
32.7	1.00	Aromatic C-O
29.3	1.00	Aromatic C-O
25.9	1.00	Aromatic C-O
22.5	1.00	Aromatic C-O
19.1	1.00	Aromatic C-O
15.7	1.00	Aromatic C-O
12.3	1.00	Aromatic C-O
8.9	1.00	Aromatic C-O
5.5	1.00	Aromatic C-O
2.1	1.00	Aromatic C-O
0.0	1.00	Reference



File: V97I2326FAZ13 Ident: 2 Acq: 23-SEP-1997 16:36:13 +0:19 Cal: GO_1
AutoSpecQ FAB+ Magnet BpI: 2344978 TIC: 43122816 Flags: HALL
File Text: SIR-20-NBA



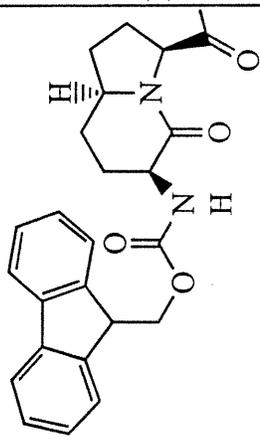
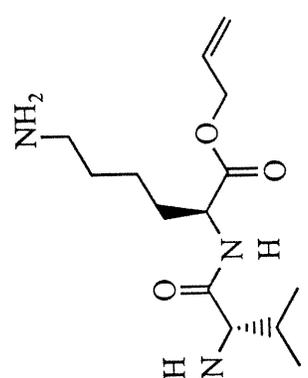
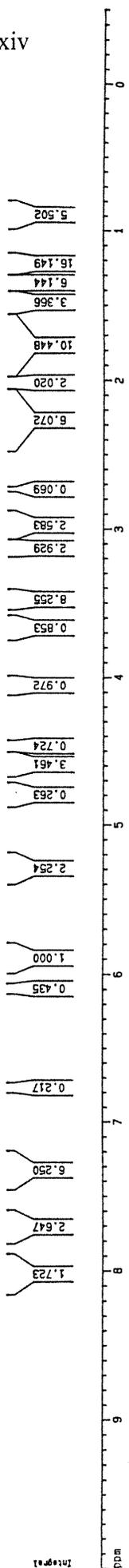




A b s o r b a n c e

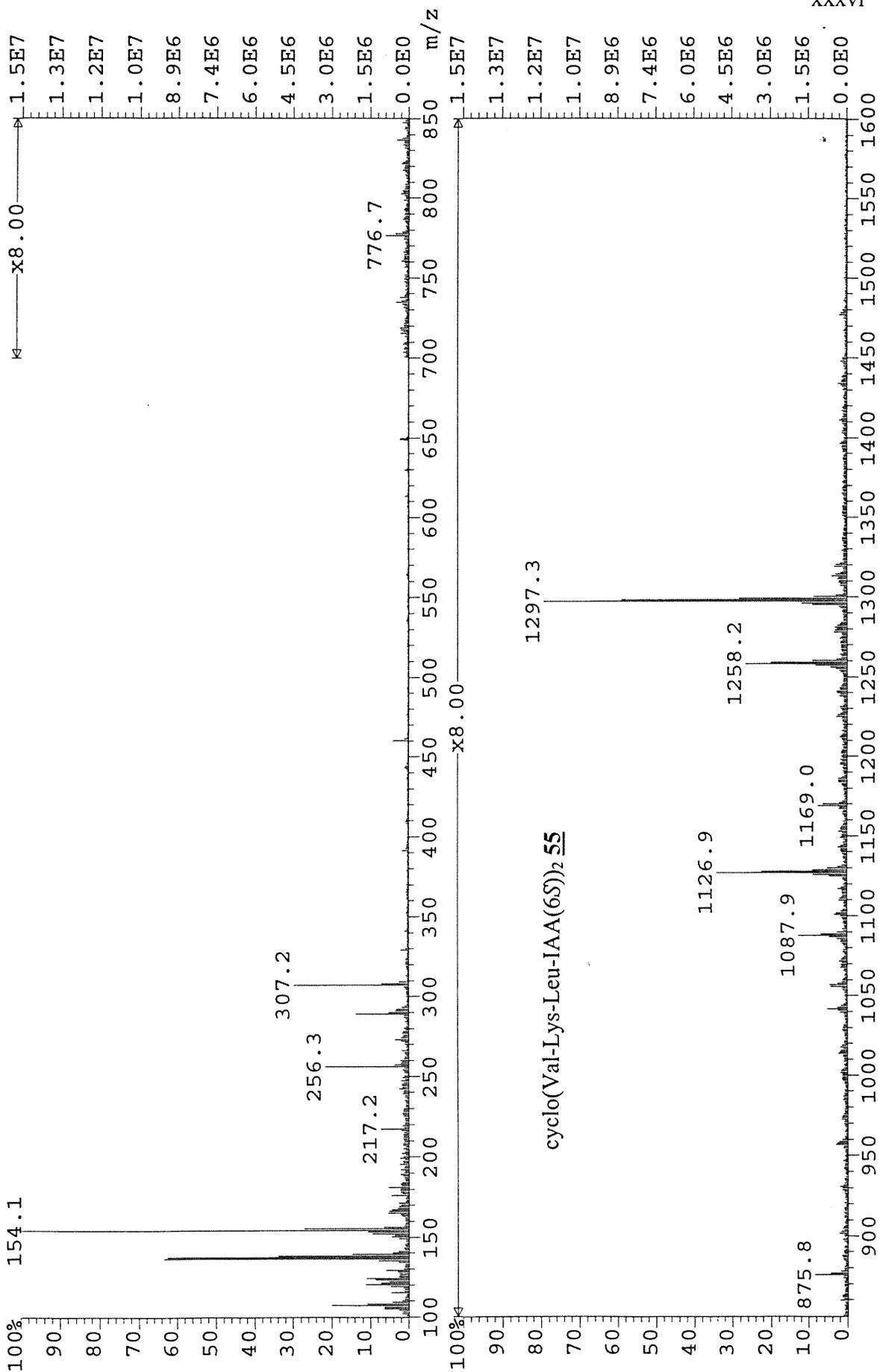
Wavenumbers

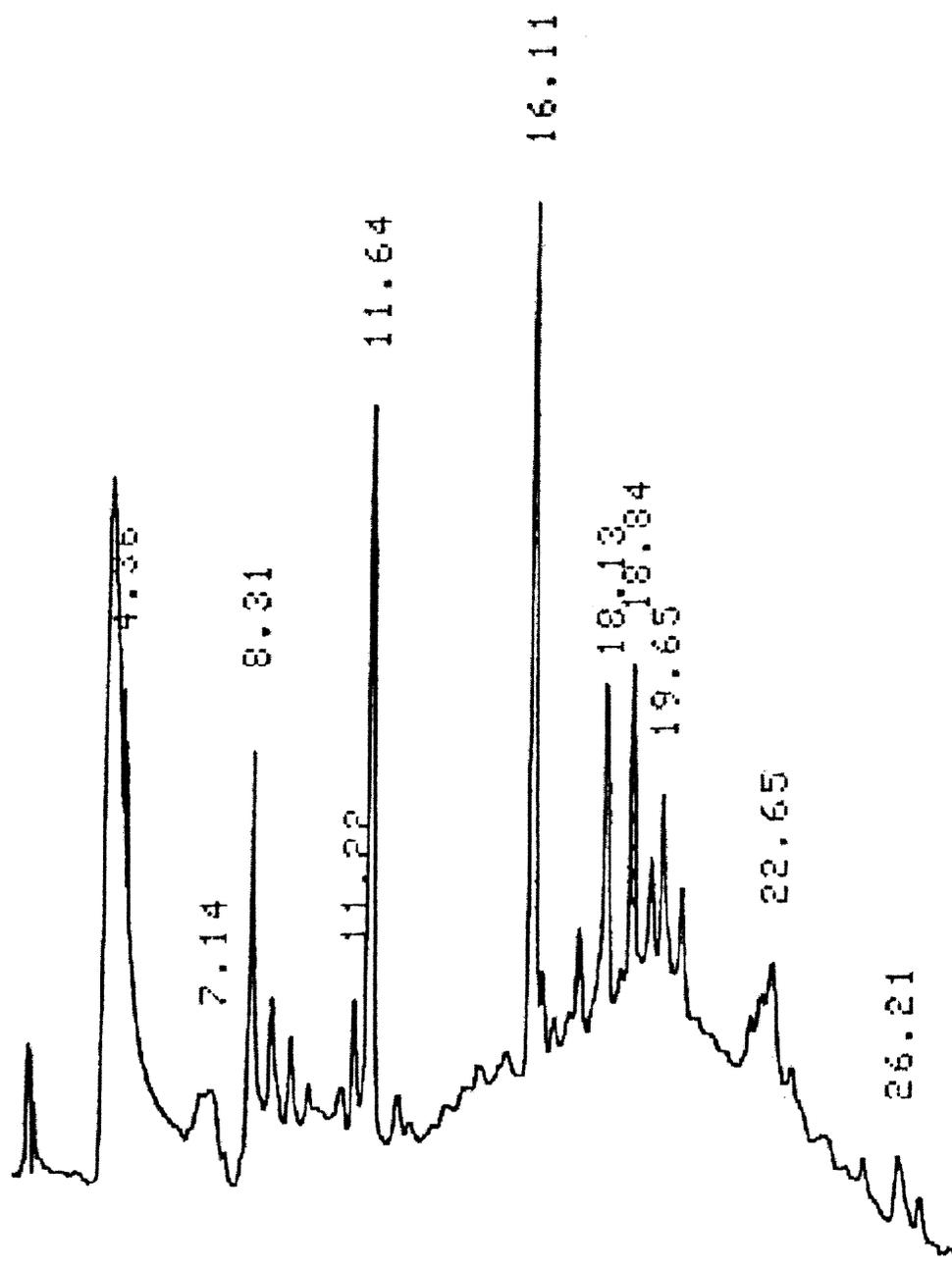
xxxiv



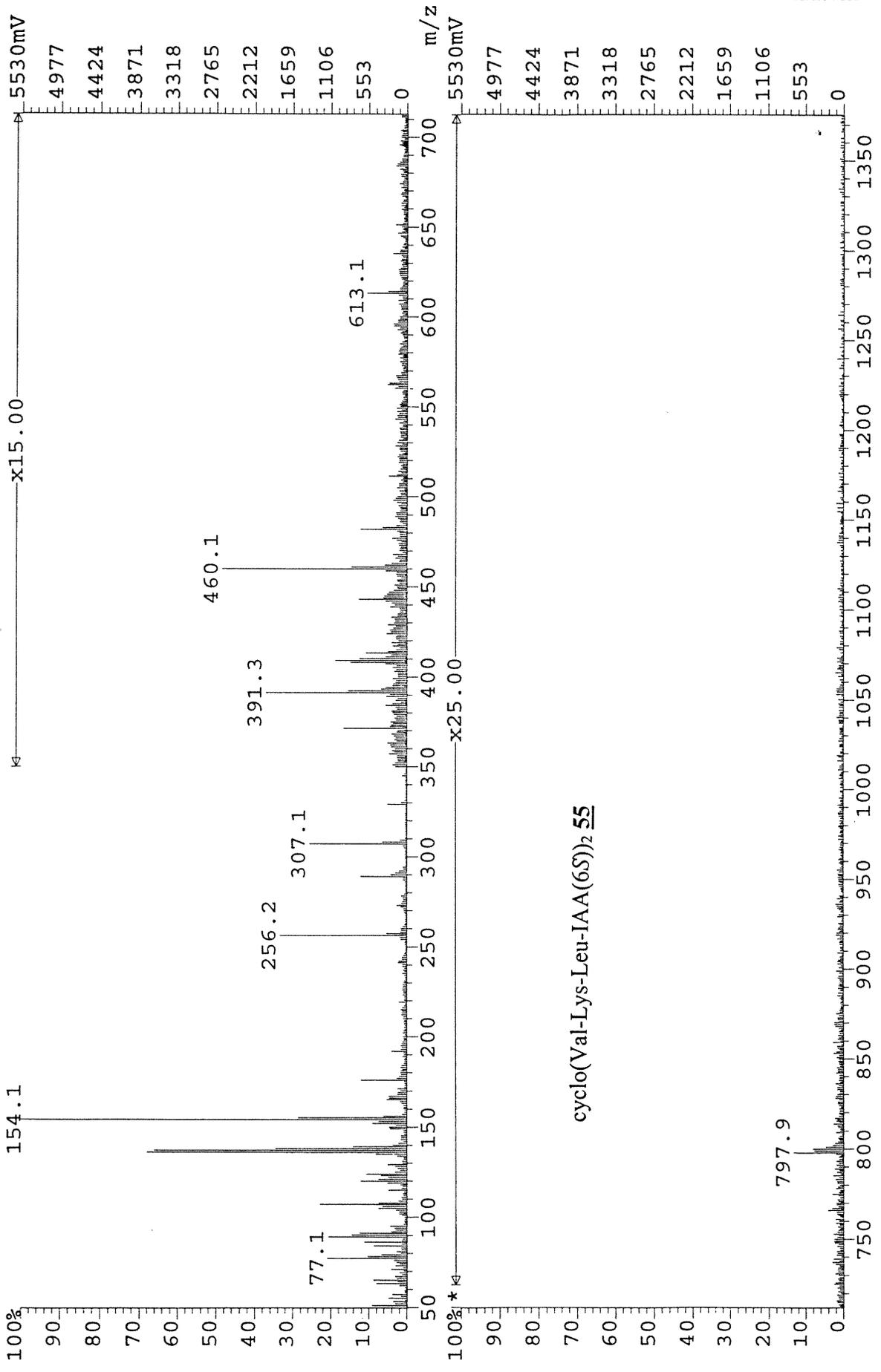
Chemical Shift (ppm)	Integration	Assignment
1.723	1.723	CH ₃ (N-alkyl)
2.647	2.647	CH ₂ (N-alkyl)
6.290	6.290	CH ₂ (N-alkyl)
0.217	0.217	CH ₂ (N-alkyl)
0.435	0.435	CH ₂ (N-alkyl)
1.000	1.000	CH ₂ (N-alkyl)
2.254	2.254	CH ₂ (N-alkyl)
0.263	0.263	CH ₂ (N-alkyl)
3.461	3.461	CH ₂ (N-alkyl)
0.724	0.724	CH ₂ (N-alkyl)
0.972	0.972	CH ₂ (N-alkyl)
0.853	0.853	CH ₂ (N-alkyl)
8.255	8.255	CH ₂ (N-alkyl)
2.929	2.929	CH ₂ (N-alkyl)
2.583	2.583	CH ₂ (N-alkyl)
0.069	0.069	CH ₂ (N-alkyl)
6.072	6.072	CH ₂ (N-alkyl)
2.020	2.020	CH ₂ (N-alkyl)
10.448	10.448	CH ₂ (N-alkyl)
3.366	3.366	CH ₂ (N-alkyl)
6.144	6.144	CH ₂ (N-alkyl)
16.149	16.149	CH ₂ (N-alkyl)
5.502	5.502	CH ₂ (N-alkyl)

File: V97K2609FAZ15 Ident: 2 Acq: 26-NOV-1997 14:44:49 +0:22 Cal: GO_1
AutoSpecQ FAB+ Magnet BpI: 14896426 TIC: 165019424 Flags: HALL
File Text: SIR-40-NBA



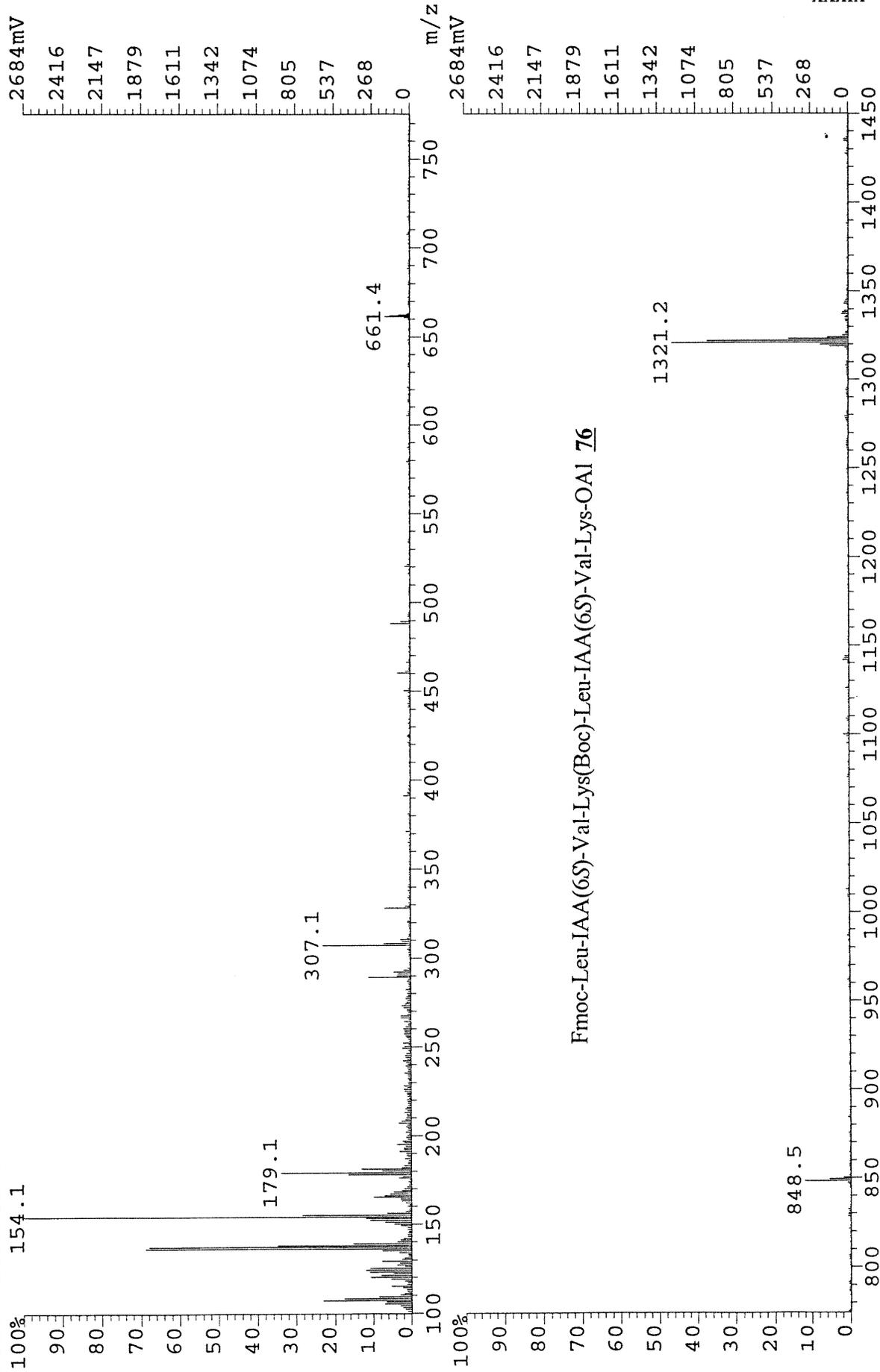
cyclo(Val-Lys-Leu-IAA(6S))₂ 55 brut

File: V98D1404FAZ13 Ident: 2 Acq: 14-APR-1998 09:23:37 +0:22 Cal: GO_1
AutoSpecQ FAB+ Magnet BpI: 12267147 TIC: 137455008 Flags: HALL
File Text: Sir-40-NBA



cyclo(Val-Lys-Leu-IAA(6S))₂ 55

File: V98E2009FAZ13 Ident: 2 Acq: 20-MAY-1998 10:03:14 +0:20 Cal: GO_1
AutoSpecQ FAB+ Magnet BpI: 4465891 TIC: 62137568 Flags: HALL
File Text: SIR-61-NBA



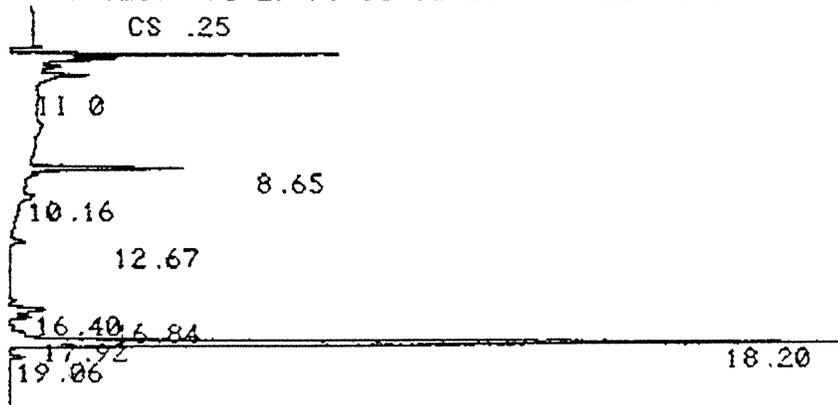
Fmoc-Leu-IAA(6S)-Val-Lys(Boc)-Leu-IAA(6S)-Val-Lys-OAl 76

FILE 1. METHOD 0. RUN 69 INDEX 69 AREA 14

PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	12.153	8.41	201522 01
2	87.847	18.32	1456670 01
TOTAL	100.		1658192

WARNING - MEMORY AT 10. K - UNPROTECTED CHROMATOGRAMS WILL BE REPLACED

CHANNEL A INJECT 05/29/98 15:15:55 STORED TO BIN # 14



SIR

DATA SAVED TO BIN # 14

Fmoc-Leu-IAA(6S)-Val-Lys(Boc)-Leu-IAA(6S)-Val-Lys-OAl 76

INPUT OVERRANGE AT RT= 22.

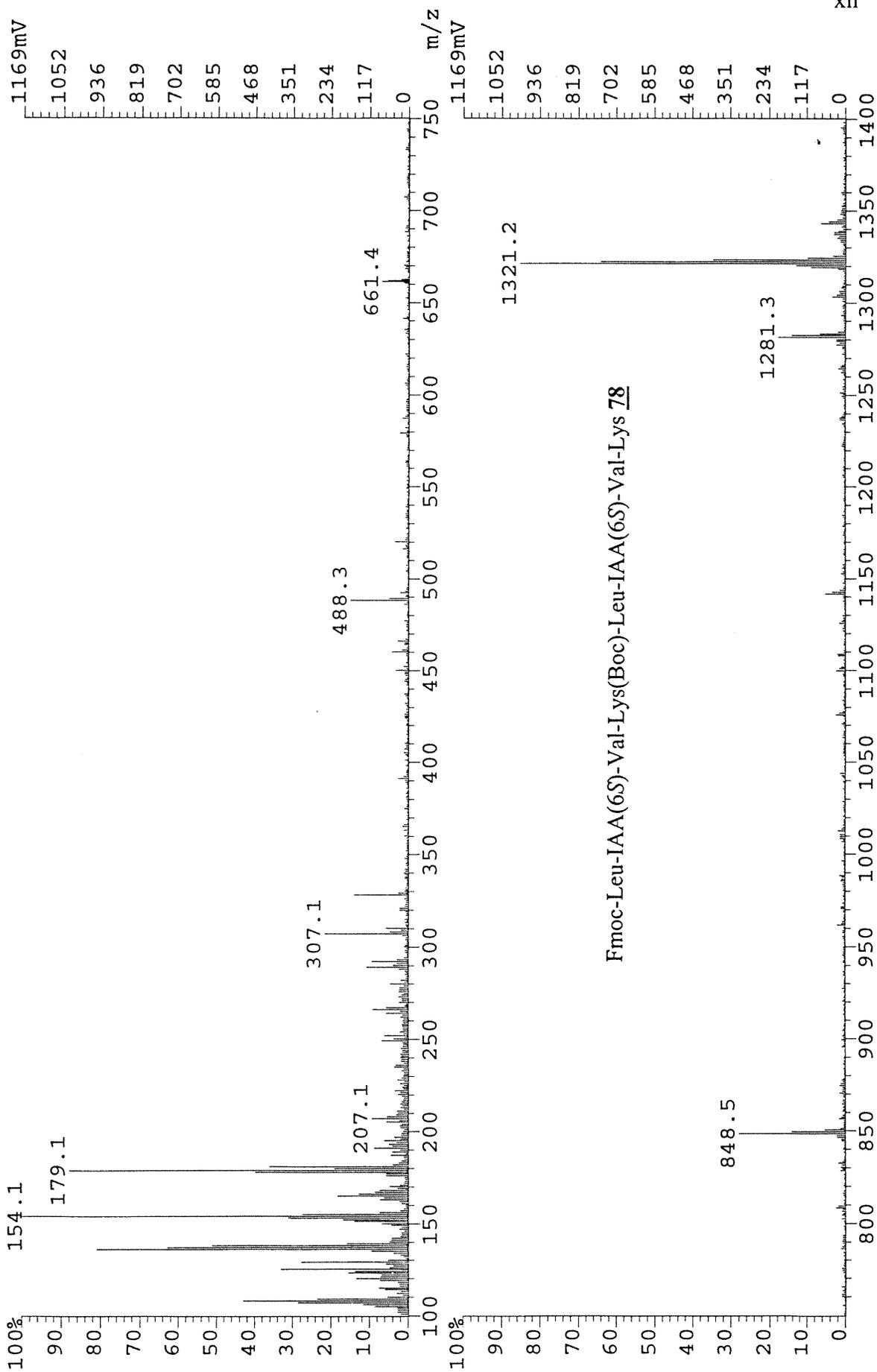
SIR 05/29/98 15:15:55 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 69 INDEX 69 BIN 14

PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	10.717	8.65	658449 01
2	1.551	10.16	95292 01
3	1.015	12.67	62340 01
4	3.742	16.4	229904 02
5	1.659	16.84	101956 03
6	2.276	17.92	139862 02
7	78.161	18.2	4802049 03
8	0.878	19.06	53971 01
TOTAL	100.		6143823

WARNING - MEMORY AT 5. K - UNPROTECTED CHROMATOGRAMS WILL BE REPLACED

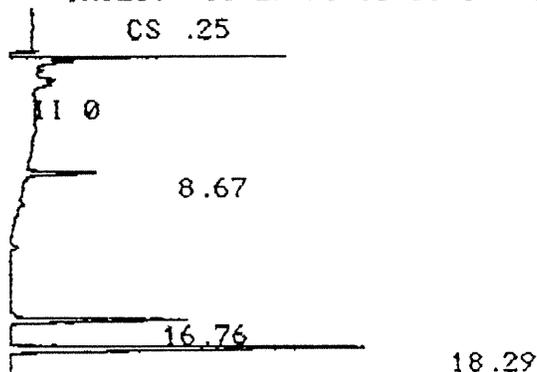
File: V98E2010FAZ13 Ident: 2 Acq: 20-MAY-1998 10:07:18 +0:15 Cal: GO_1 (mod)
AutoSpecQ FAB+ Magnet BpI: 1945278 TIC: 47772272 Flags: HALL
File Text: SIR-62-NBA



8 0.878 19.06 53971 01
TOTAL 100. 6143823

WARNING - MEMORY AT 5. K - UNPROTECTED CHROMATOGRAMS WILL BE REPLACED

CHANNEL A INJECT 05/29/98 15:51:17 STORED TO BIN # 15
CS .25



SIR

ER 0 Fmoc-Leu-IAA(6S)-Val-Lys(Boc)-Leu-IAA(6S)-Val-Lys 78
DATA SAVED TO BIN # 15

INPUT OVERRANGE AT RT= 22.

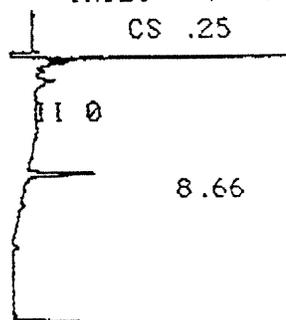
SIR 05/29/98 15:51:17 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 70 INDEX 70 BIN 15

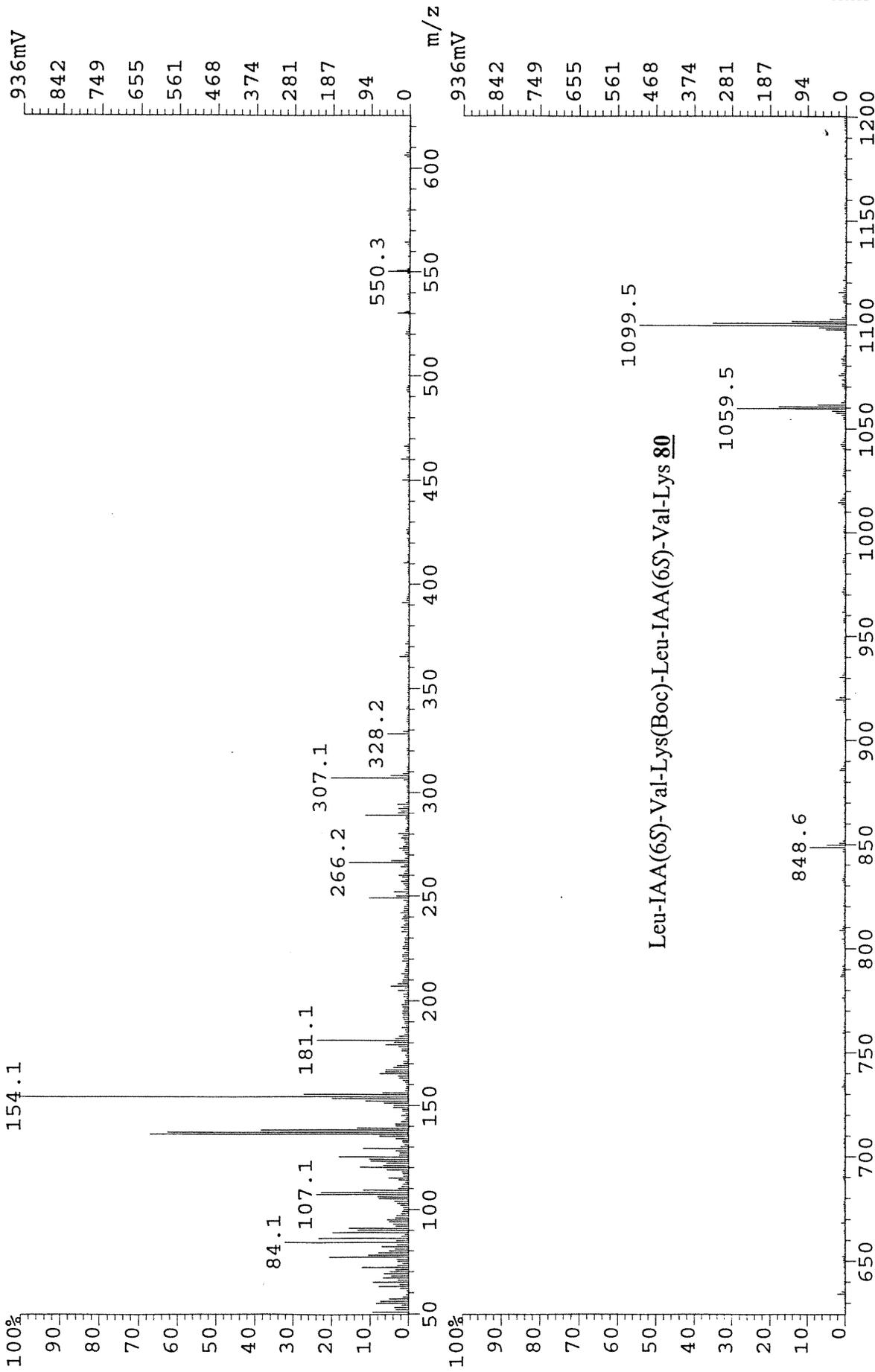
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	9.791	8.67	257464 01
2	28.44	16.76	747821 01
3	61.769	18.29	1624205 01
TOTAL	100.		2629490

WARNING - MEMORY AT 6. K - UNPROTECTED CHROMATOGRAMS WILL BE REPLACED

CHANNEL A INJECT 05/29/98 16:26:41 STORED TO BIN # 16
CS .25



File: V98E1918FAZ13 Ident: 1 Acq: 19-MAY-1998 14:21:10 +0:13 Cal: GO_1
AutoSpecQ FAB+ Magnet BpI: 1671953 TIC: 30189690 Flags: HALL
File Text: SIR-59-NBA



Leu-IAA(6S)-Val-Lys(Boc)-Leu-IAA(6S)-Val-Lys 80



CHROMATOGRAM 2 MEMORIZED

CHROMATOPAC C-R3A FILE 0
SAMPLE NO 0 METHOD 41
REPORT NO 676

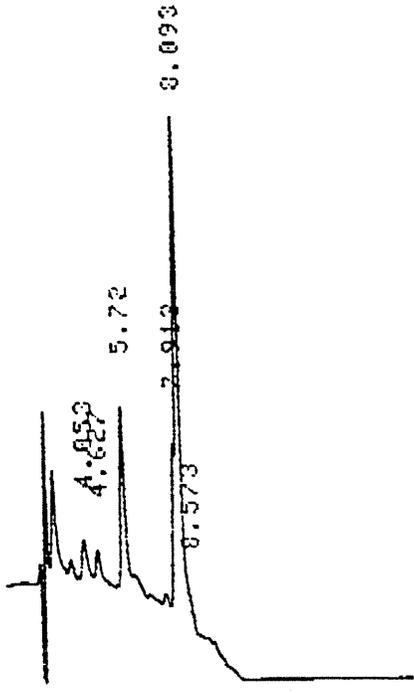
PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4.05	16366			4.9165	
2	5.72	65212			19.5906	
3	7.913	37438			11.2469	
4	8.092	213859	SV		64.246	

TOTAL 332874 100

STOP.TM(0)=18

FINAL 2

98/05/13 11:04:43

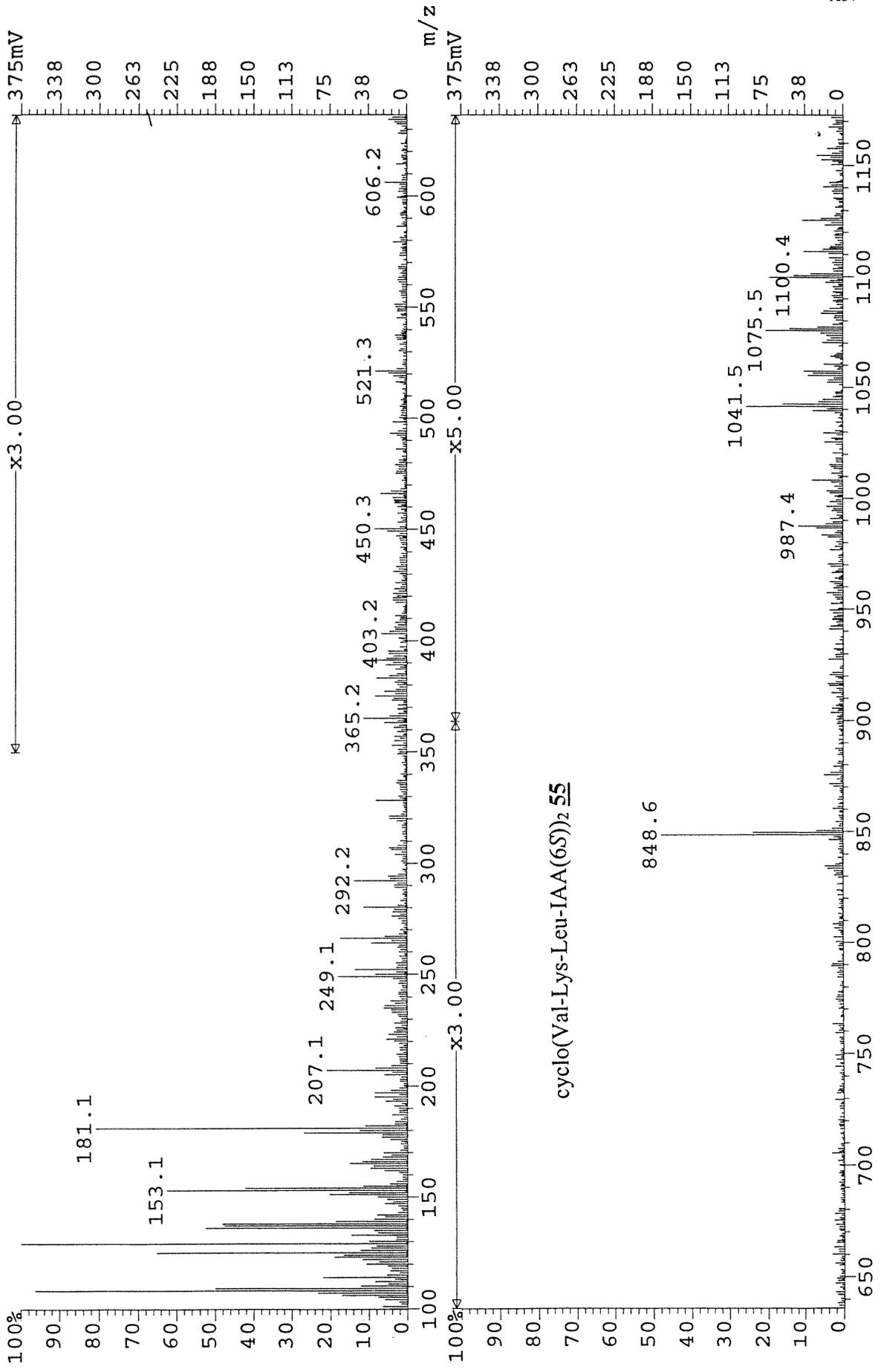


CHROMATOPAC C-R3A FILE 0
SAMPLE NO 0 METHOD 41
REPORT NO 677

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4.053	16366			4.9165	
2	5.72	65212			19.5906	
3	7.913	37438			11.2469	
4	8.093	213859	SV		64.246	

TOTAL 332874 100

File:V98E1921FAZ13 Ident:1 Acq:19-MAY-1998 15:17:10 +0:14 Cal:GO_1
AutoSpecQ FAB+ Magnet BpI:1181686 TIC:22134856 Flags:HALI
File Text:SIR-60-NBA



cyclo(Val-Lys-Leu-IAA(6S))₂ 55

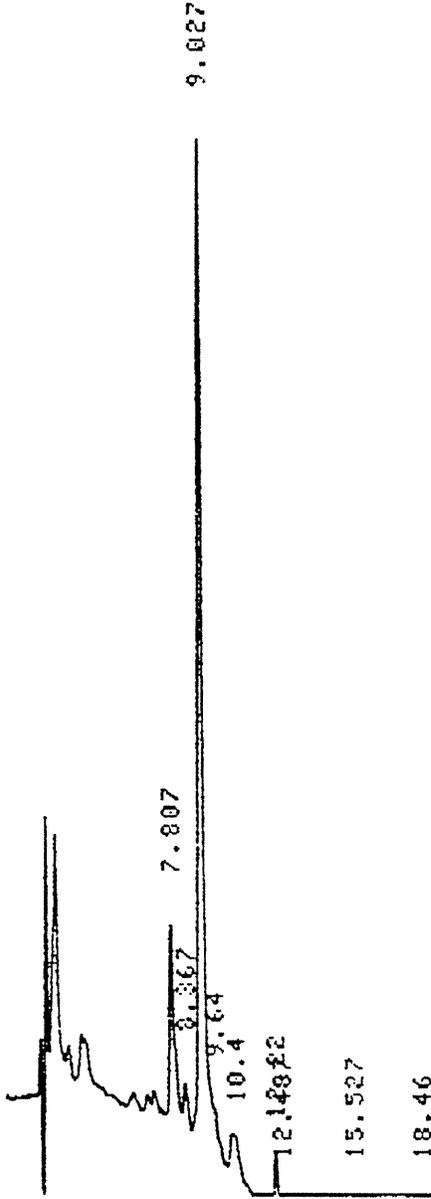
12 4

1	8.365	17607	Y	2.858
2	9.023	445685	S	72.3449
3	10.397	28962		4.7013
4	12.222	26558		4.3109
5	15.525	12839		2.084

TOTAL 616056

STOP.TM(0)=19
ANAL 3

98-05-19 11:47:24



PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	7.807	84405			13.7009	
2	8.367	17607	Y		2.858	
3	9.027	445685	S		72.3449	
4	10.4	28962			4.7013	
5	12.22	26558			4.3109	
6	15.527	12839			2.084	

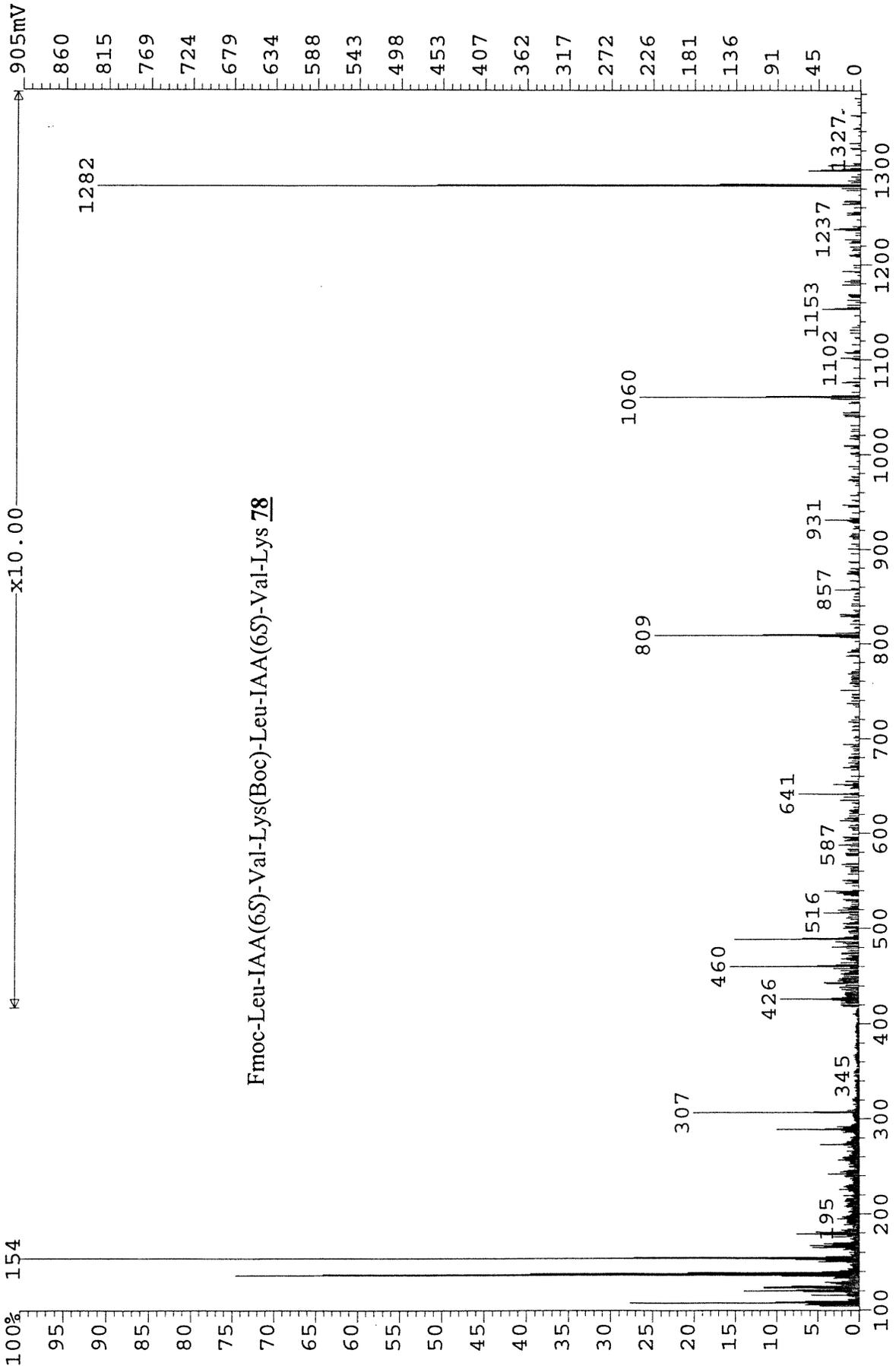
CHROMATOPAC C-R3A
SAMPLE NO 0
REPORT NO 679

FILE 0
METHOD 41

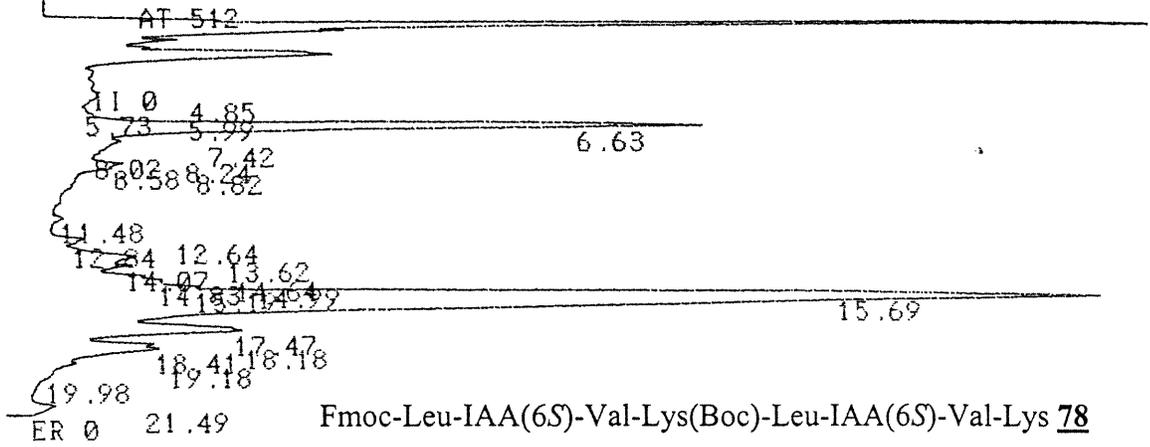
TOTAL 616056

LIST WIDTH(0)

File: V98F2204FAZ13 Ident: 3 Acq: 22-JUN-1998 10:23:06 +0:52 Cal: GO_1
AutoSpecQ FAB+ Magnet BpI: 5410630 TIC: 56761884 Flags: HALL
File Text: SIR-63-NBA



Fmoc-Leu-IAA(6S)-Val-Lys(Boc)-Leu-IAA(6S)-Val-Lys **78**



07/02/98 18:48:49 CH= "A" PS= 1.

FILE 2. METHOD 0. RUN 8 INDEX 8 BIN 118

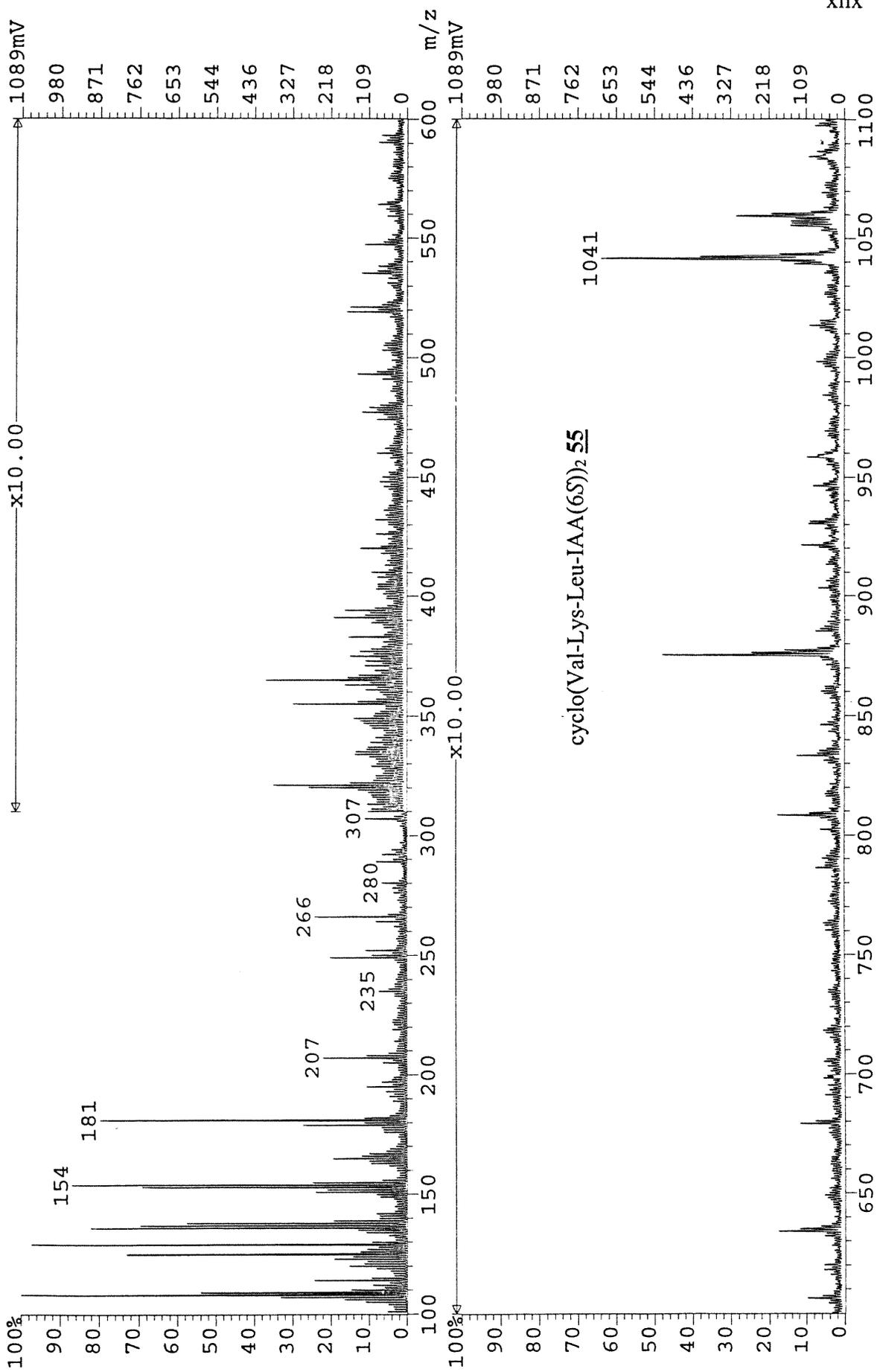
PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.283	4.85	207019	01
2	0.036	5.73	26347	02
3	0.111	5.99	81474	02
4	16.329	6.63	11946736	02
5	1.356	7.42	991841	02
6	0.249	8.02	182502	02
7	0.107	8.24	78522	02
8	0.916	8.58	669848	02
9	0.47	8.82	343705	03
10	0.176	11.48	128857	01
11	0.466	12.64	340708	02
12	0.291	12.84	213166	02
13	3.154	13.62	2307218	02
14	1.648	14.07	1205979	02
15	1.63	14.64	1192535	02
16	1.257	14.83	919416	02
17	0.901	14.99	659112	02
18	1.883	15.19	1377955	02
19	53.863	15.69	39406838	02
20	7.712	17.47	5642329	02
21	1.882	18.18	1376955	02
22	3.461	18.41	2532220	02
23	0.987	19.18	722311	02
24	0.319	19.98	233166	03
25	0.512	21.49	374509	01
TOTAL	100.		73161268	

SAMPLE SIR 68

SOLVENT A= 0.06% TEA
B= ACN

GRADIENT 20-60% B in 20 min

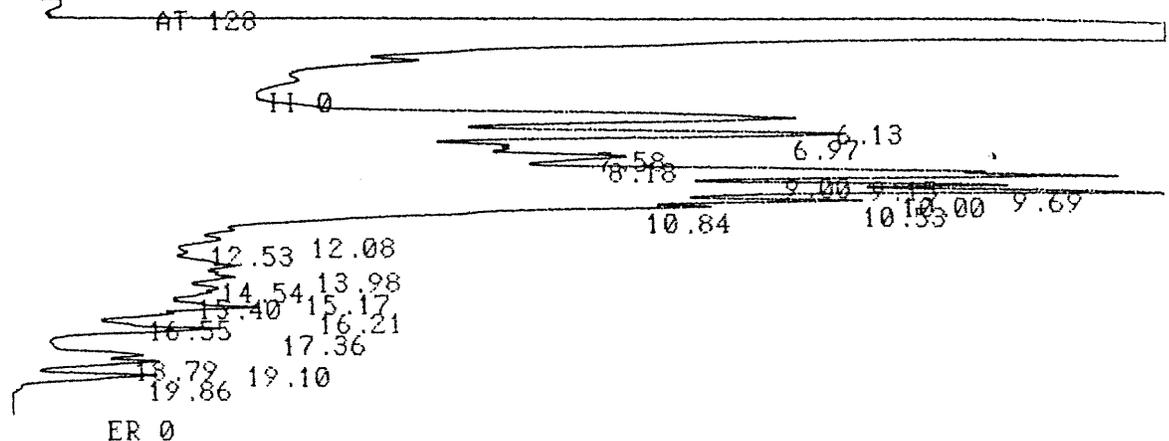
File: V98G1409FAZ13 Ident: 2 Acq: 14-JUL-1998 10:26:03 +0:50 Cal: GO_1
AutoSpecQ FAB+ Magnet BpI: 452130 TIC: 145629552
File Text: Sir-66-NBA



CHANNEL A

INJECT 07/02/98 17:35:15 REPLAYED FROM BIN # 116

1



ER 0

cyclo(Val-Lys-Leu-IAA(6S))₂ 55

INPUT OVERRANGE AT RT= 22.

07/02/98 17:35:15 CH= "A" PS= 1.

FILE 4. METHOD 0. RUN 72 INDEX 72 BIN 116

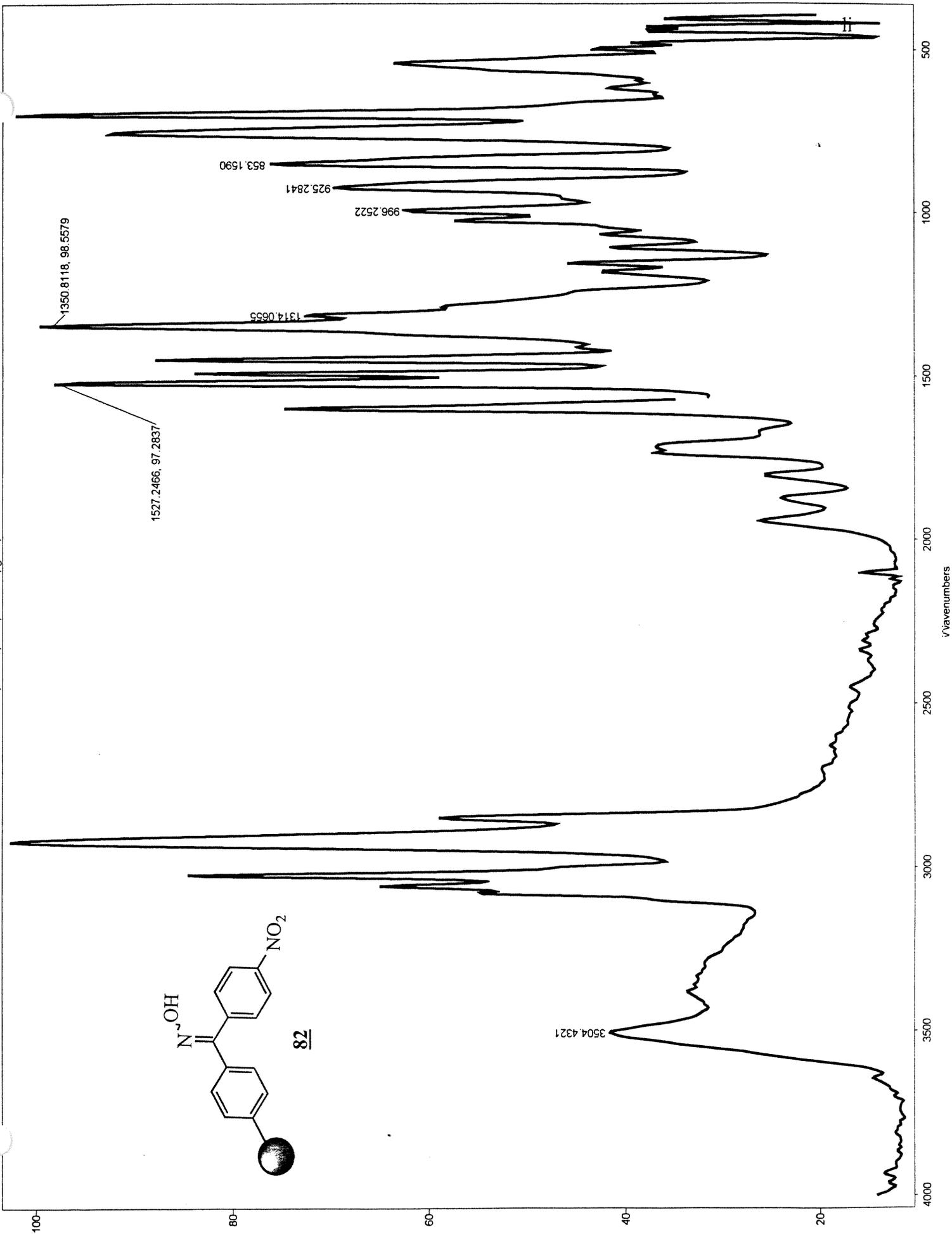
PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	12.026	6.13	4267309	02
2	10.066	6.97	3572004	02
3	4.134	7.58	1466992	02
4	7.292	8.18	2587510	02
5	8.115	9.	2879482	02
6	9.953	9.15	3531822	02
7	7.343	9.69	2605724	02
8	11.873	10.	4213219	02
9	6.549	10.53	2323923	02
10	8.796	10.84	3121155	02
11	0.443	12.08	157357	02
12	0.444	12.53	157525	03
13	1.048	13.98	371851	02
14	1.536	14.54	545082	02
15	0.969	15.17	343785	02
16	1.025	15.4	363614	02
17	2.284	16.21	810399	02
18	0.754	16.55	267627	02
19	1.954	17.36	693393	03
20	0.902	18.79	320074	02
21	1.179	19.1	418519	03
22	1.316	19.86	467121	01

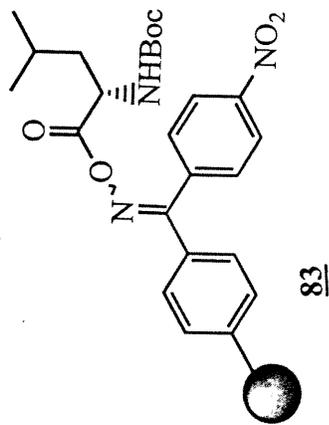
TOTAL 100. 35485487

SAMPLE SIR 66

SOLVENT A = 0.06% TFA
B = ACN

GRADIENT 20-60% B in 20 min





A P S O L D A R C O

100

80

60

40

20

4000

3500

3000

2500

2000

1500

1000

500

Wavenumbers

3416.8792

OH

1718.2747

1774.9720

1524.6554

1165.1869

1111.9609

932.2267

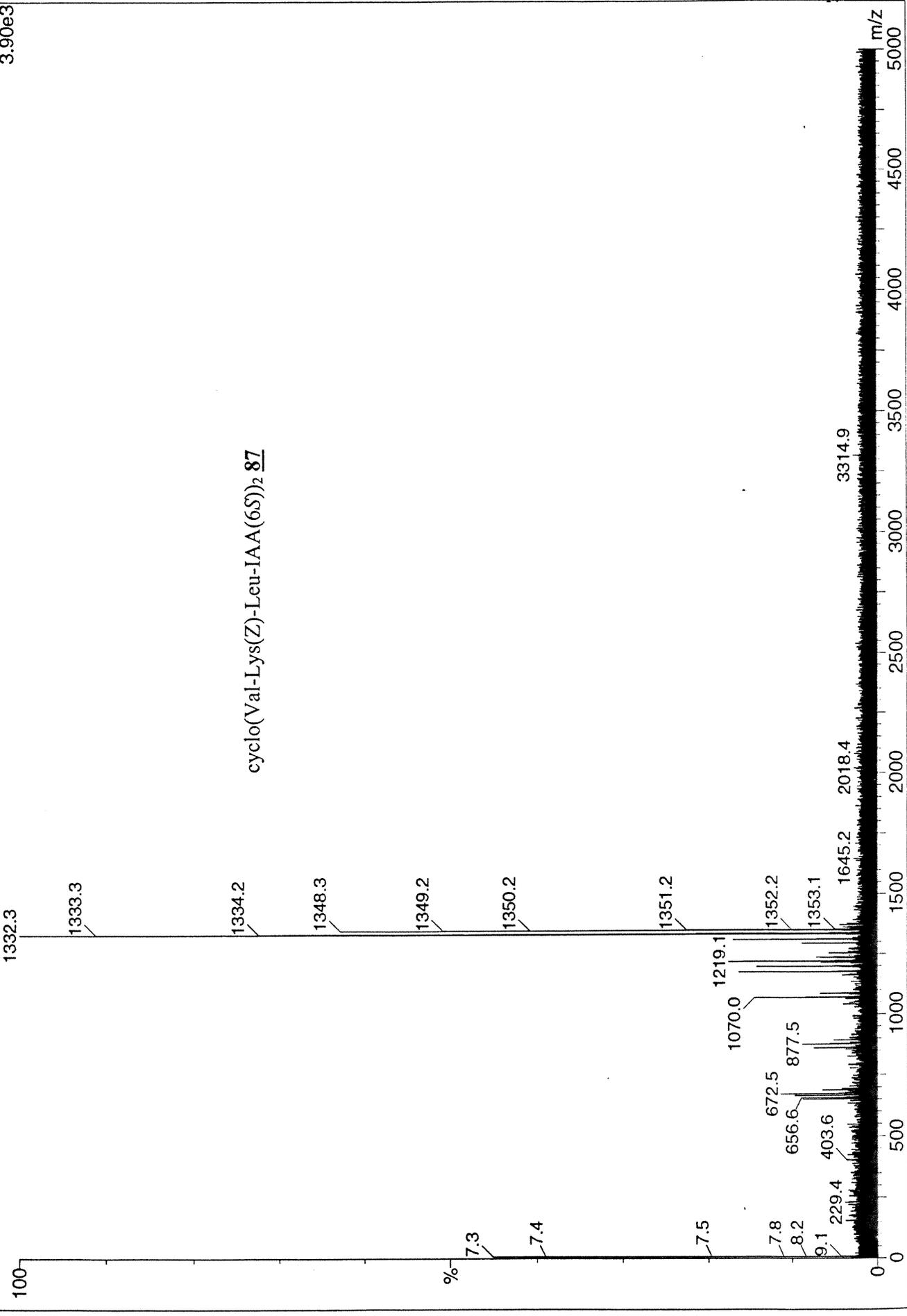
850.4591

III

SIR.96

81080213 2 (0.629) Cn (Cen,2, 10.00, Ht); Sm (SG, 1x1.00); Sb (20,10.00)

TOF LD+
3.90e3



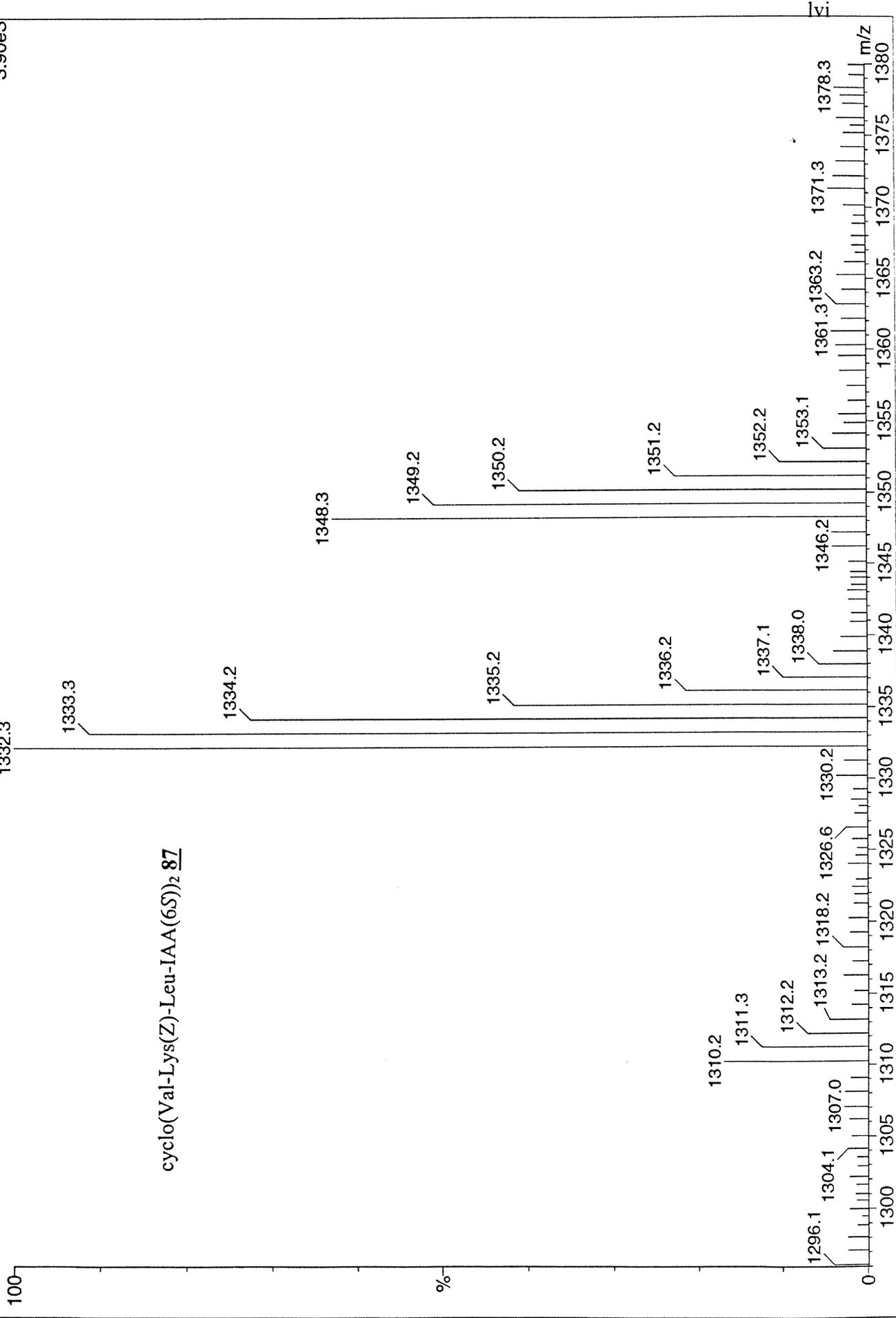
cyclo(Val-Lys(Z)-Leu-IAA(6S))₂ 87

SIR.96

81080213 2 (0.629) Cn (Cen,2, 10.00, Ht); Sm (SG, 1x1.00); Sb (20,10.00)
1332.3

TOF LD+
3.90e3

cyclo(Val-Lys(Z)-Leu-IAA(6S))₂ 87

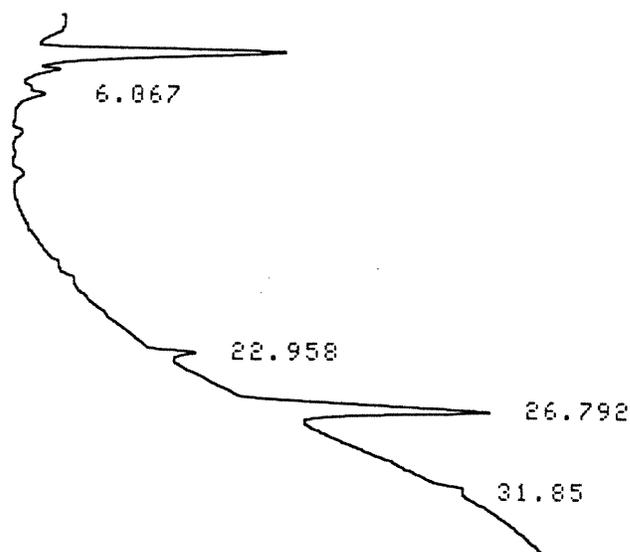


cyclo(Val-Lys(Z)-Leu-IAA(6S))₂ 87

```

LINE   PROGRAM
0.1    PRINT DATE#,TIME#
0.2    L. ON
4.5    L. OFF
END
ANAL 2.1
      00/00/00   06:46:00

```



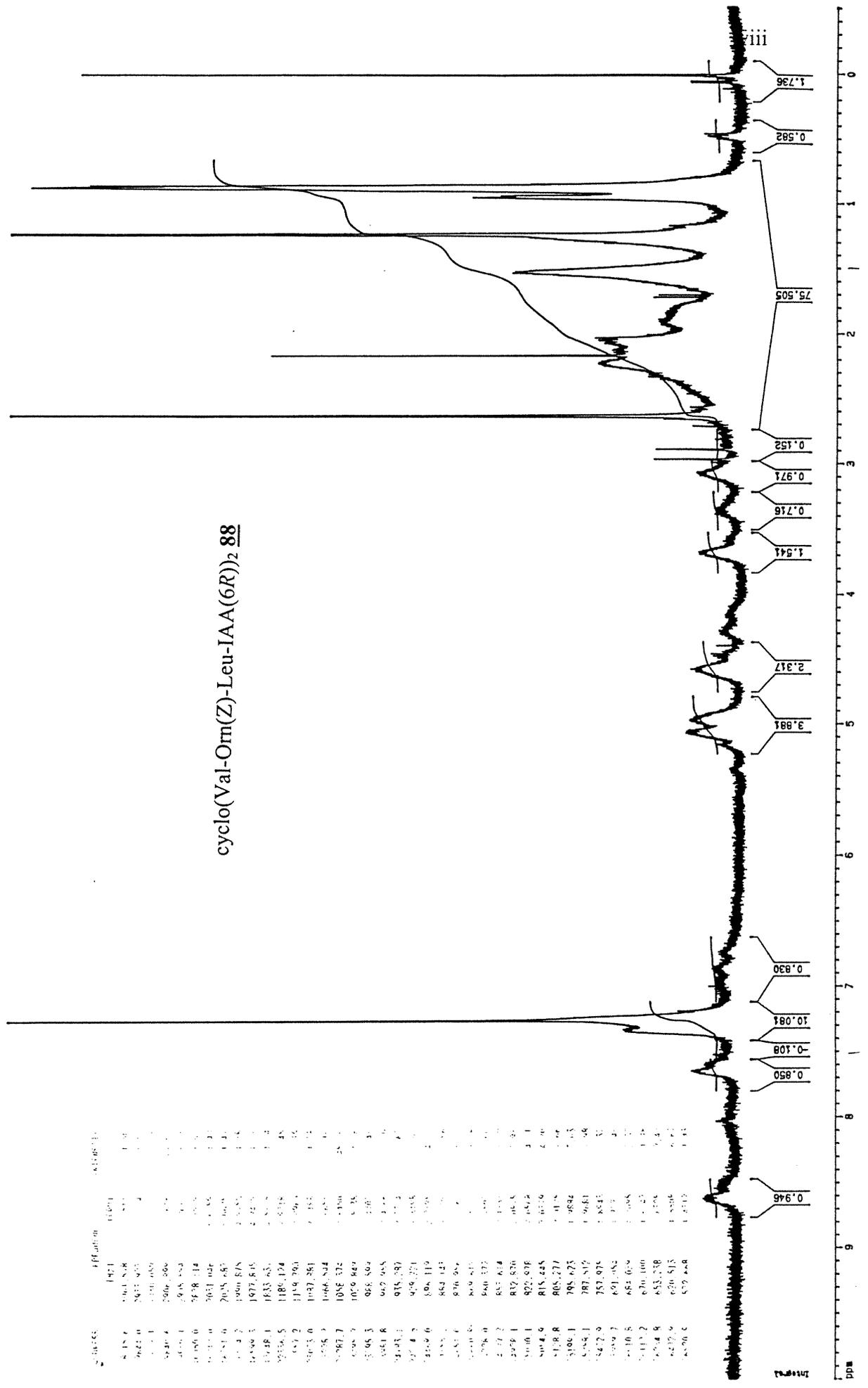
```

CHROMATOPAC  C-R3A          FILE          0
SAMPLE NO    0              METHOD         41
REPORT NO    10

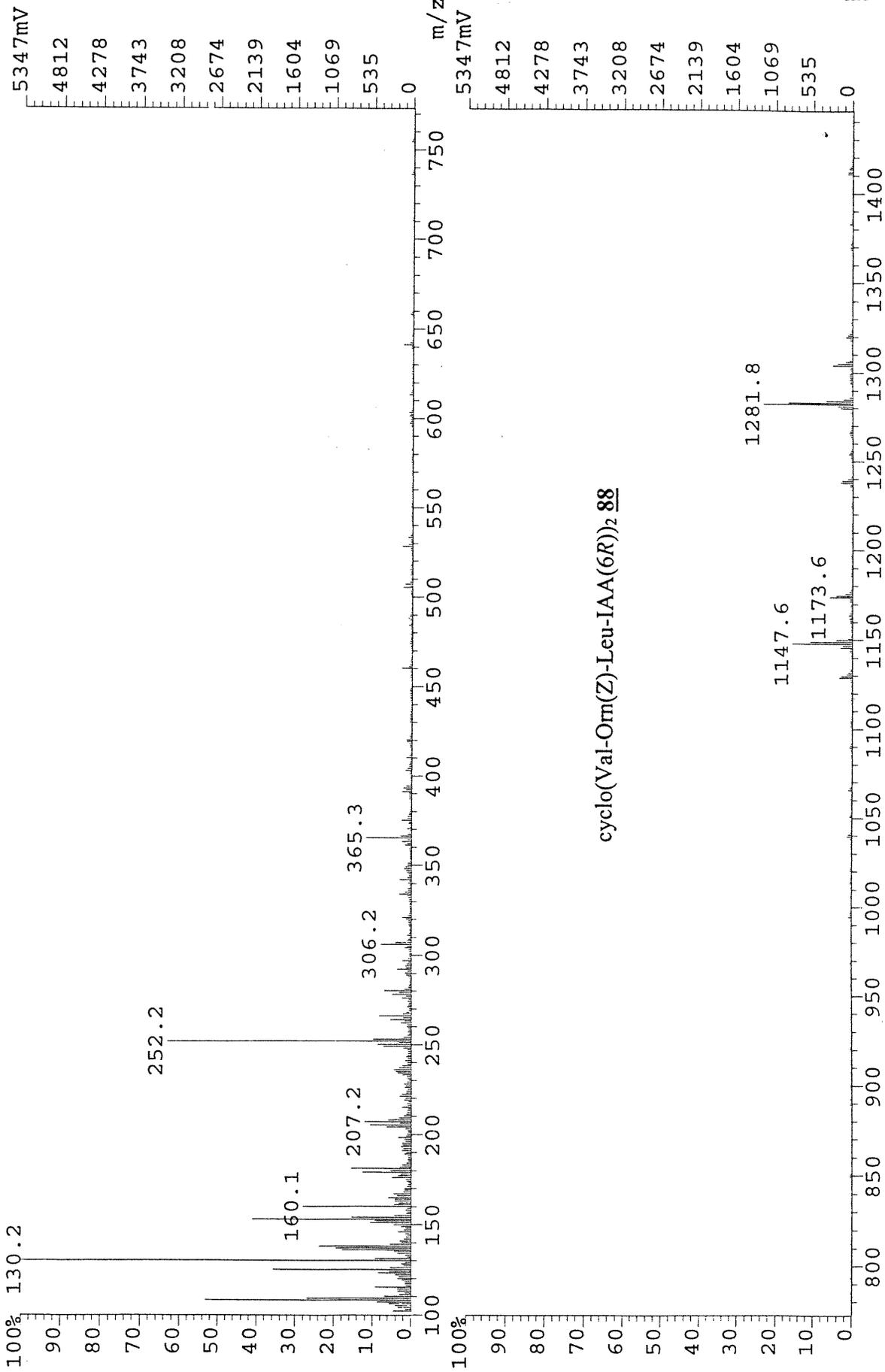
```

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	6.067	3977			5.1968	
2	22.958	5835			7.6247	
3	26.792	66713			87.1785	
TOTAL		76525			100	

cyclo(Val-Om(Z)-Leu-IAA(6R))₂ **88**



File: V00F0704FAZ13 Ident: 7 Acq: 7-JUN-2000 11:11:29 +0:57 Cal:GO_1
AutoSpecQ FAB+ Magnet BpI:14167462 TIC:204253616 Flags:HALL
File Text:SIR-151-NBA



D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 15/05/00 16:11

Reported: 16/05/00 10:26

Processed: 16/05/00 10:26

Data Path: E:\Modifications\DATA\0301\

Processing Method: methode40%

System(acquisition): Sys 1

Series:0301

Application: Modifications

Vial Number: 1

Sample Name: sir151

Vial Type: UNK

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 100,0 ul

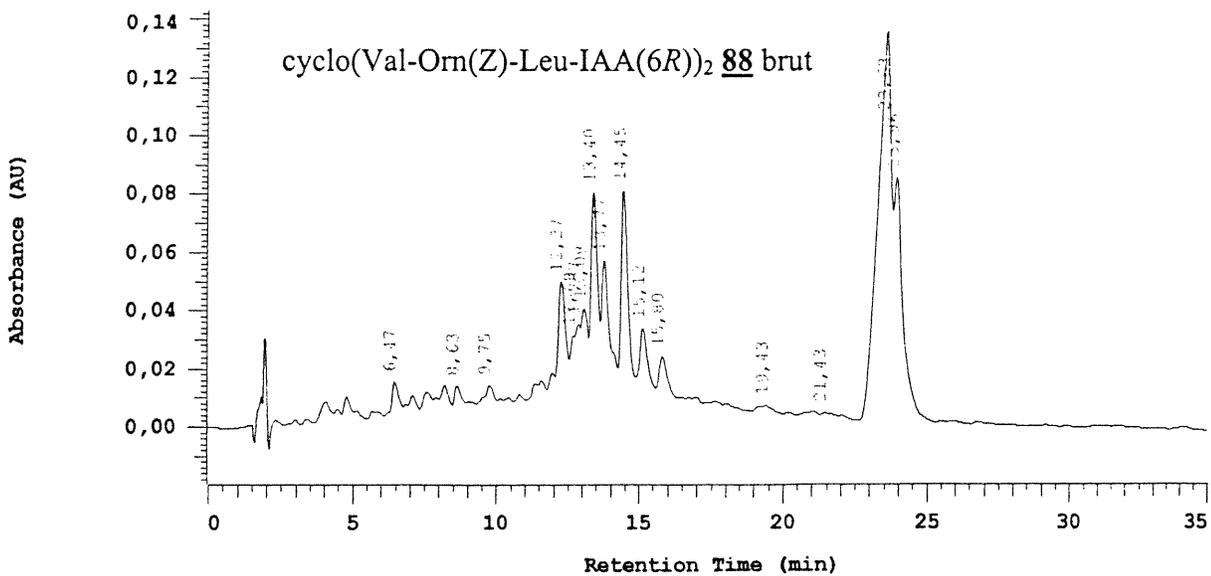
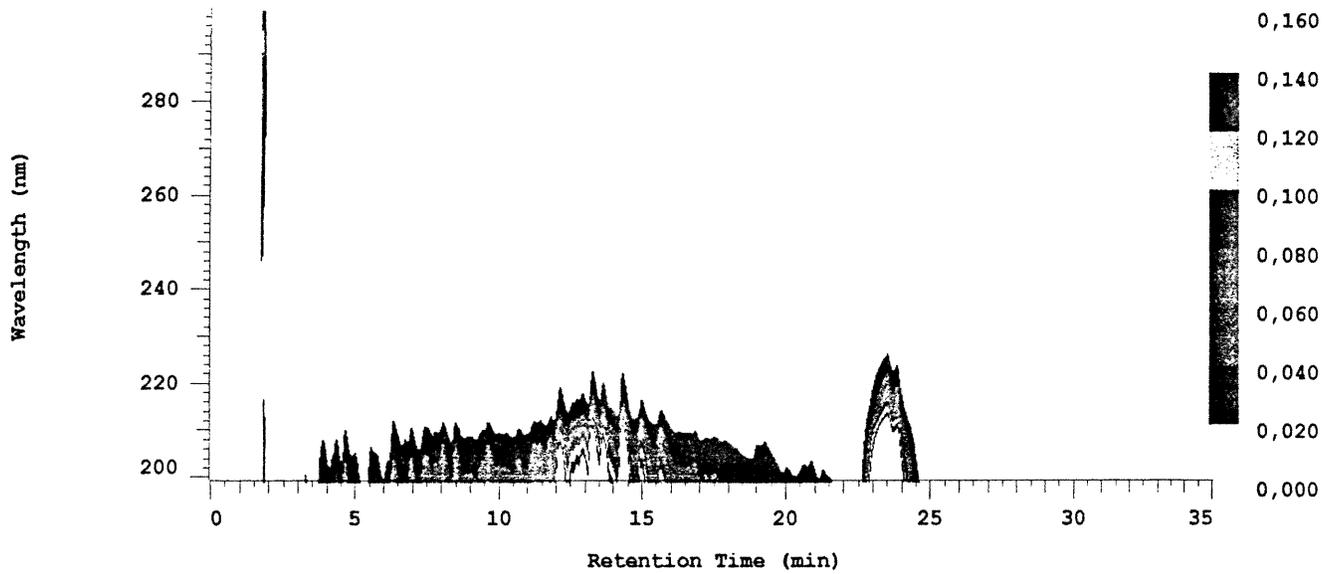
Sample Description:

Absorbance Mode: NORMAL(2.0 AU)

Absorbance Scale: 0.160

Spectral Bandwidth: 4 nm

Spectral Interval: 800 msec



Acquisition Method: methode40%

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 20/06/00 20:48

Reported: 21/06/00 09:54

Processed: 21/06/00 09:53

Data Path: E:\principal\DATA\0457\

Processing Method: methode25

System(acquisition): Sys 1

Series:0457

Application: principal

Vial Number: 72

Sample Name: Ballon 1

Vial Type: UNK

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 400,0 ul

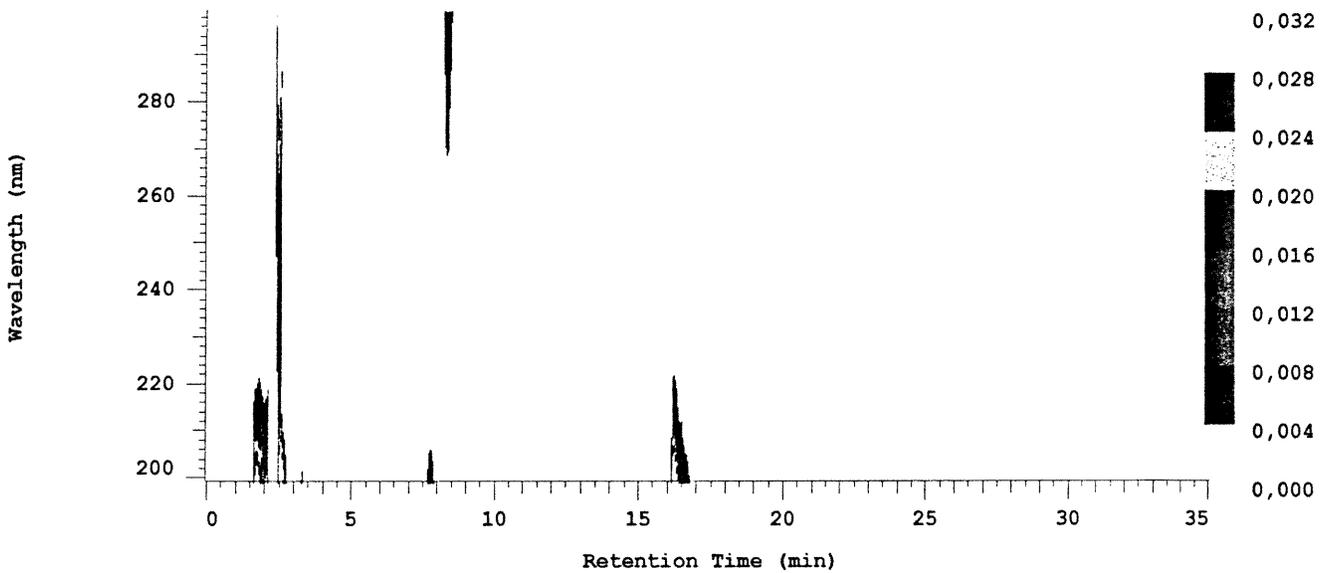
Sample Description:

Absorbance Mode: NORMAL(2.0 AU)

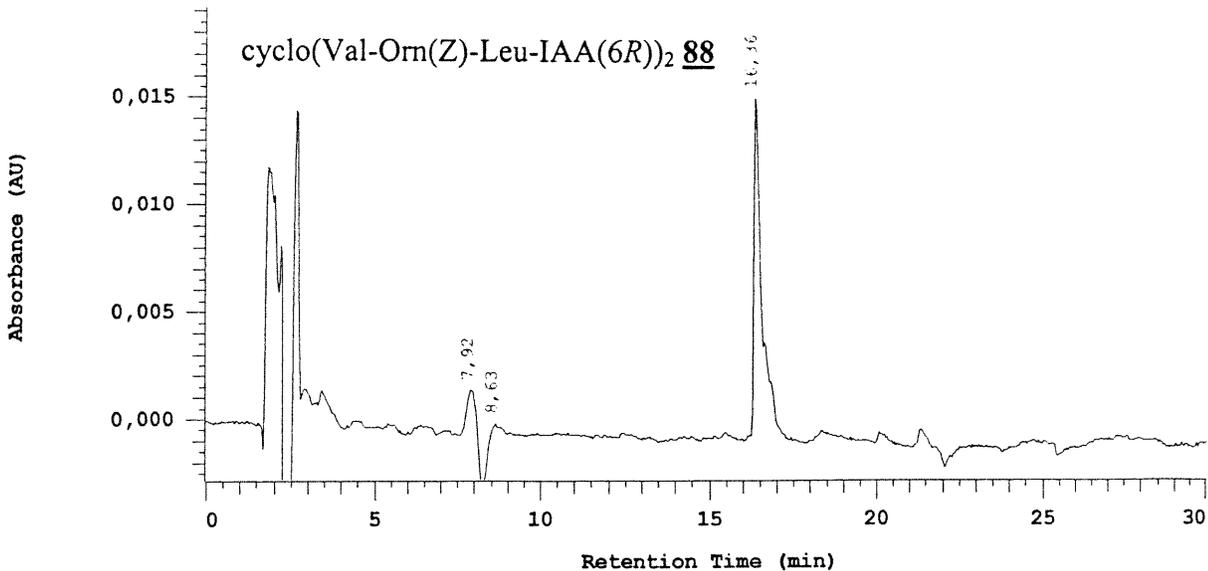
Absorbance Scale: 0.032

Spectral Bandwidth: 4 nm

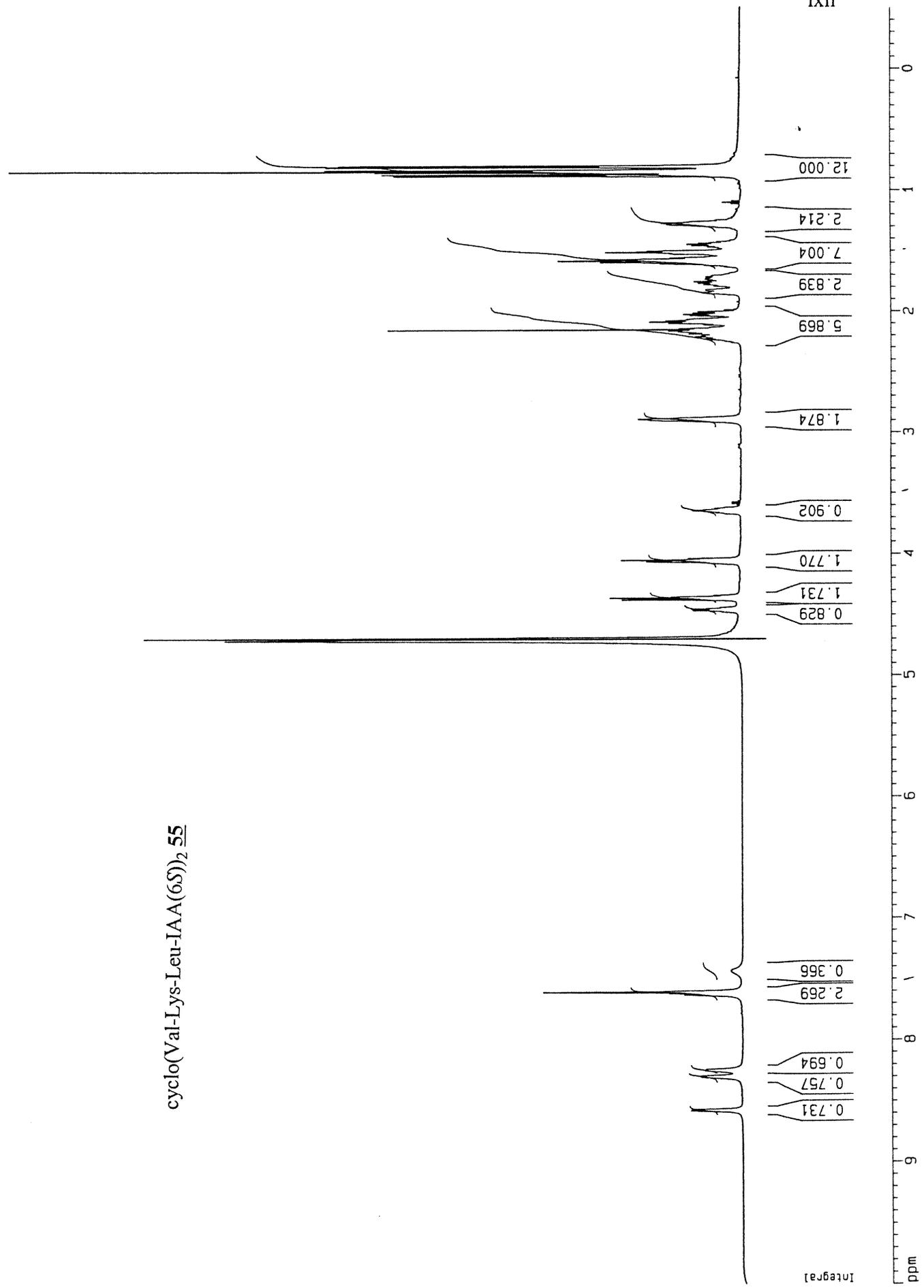
Spectral Interval: 800 msec



Chrom Type: Fixed WL Chromatogram, 214 nm



Acquisition Method: methode25

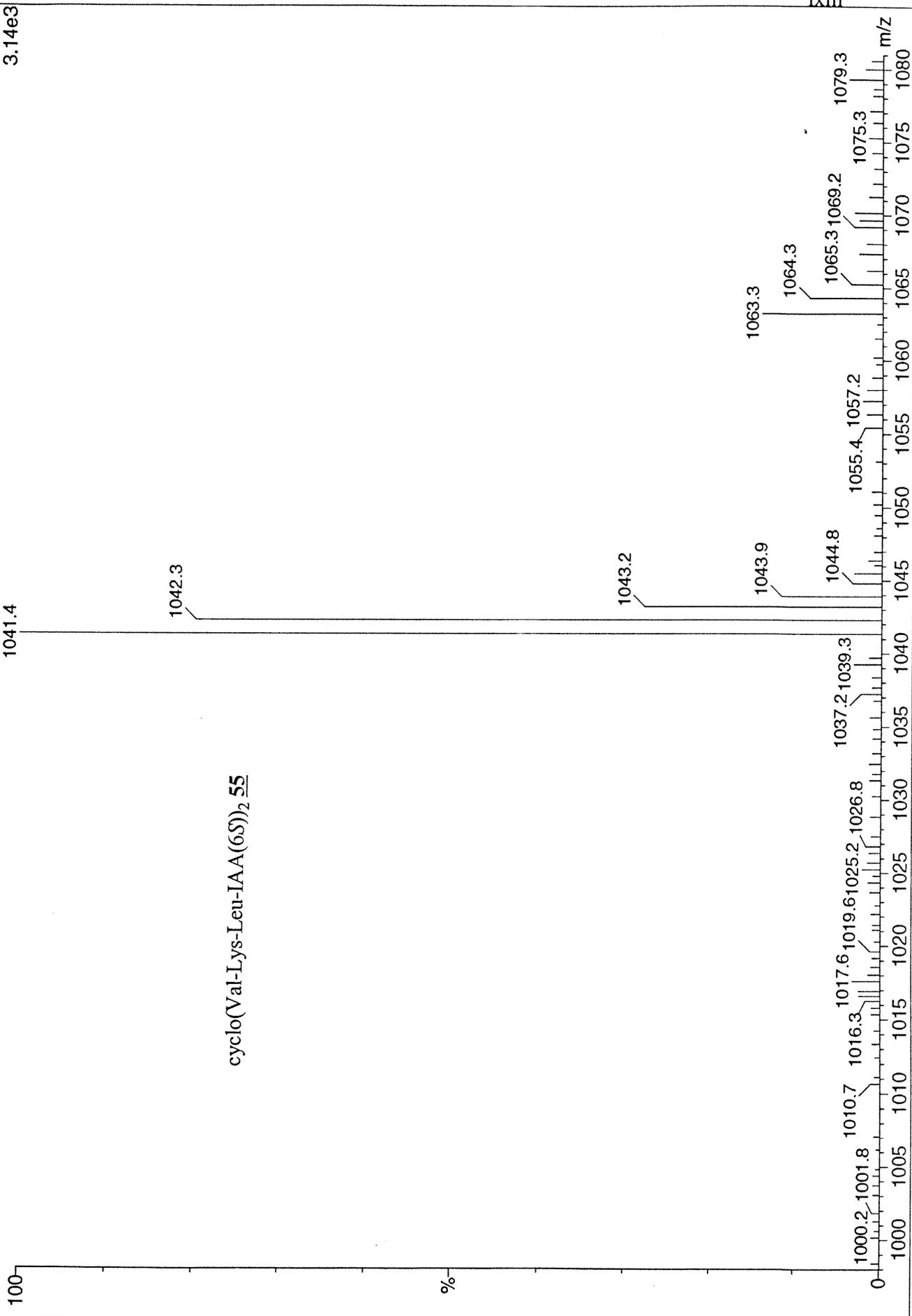


cyclo(Val-Lys-Leu-IAA(6S))₂ 55

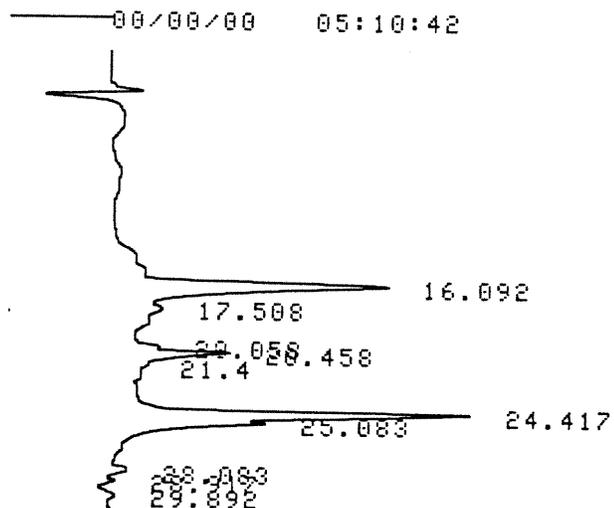
SIR-97

9b140113 1 (0.071) Cn (Cen,2, 10.00, Ht); Sm (SG, 1x0.00); Sb (5,10.00)

TOF LD+
3.14e3



cyclo(Val-Lys-Leu-IAA(6S))₂ 55 brut



CHROMATOPAC C-R3A
 SAMPLE NO 0
 REPORT NO 8

FILE
 METHOD

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC
1	16.092	307292			34.1031
2	17.508	16137	V		1.7909
3	20.058	12546			1.3924
4	20.458	76099	V		8.4455
5	21.4	3341	V		0.3707
6	24.417	331776			36.8202
7	25.083	116339	V		12.9112
8	28.083	18396			2.0416
9	28.917	6375			0.7075
10	29.892	12769			1.4171
TOTAL		901070			100

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 15/11/99 13:57

Reported: 19/11/99 16:36

Processed: 19/11/99 16:34

Data Path: C:\WIN32APP\HSM\LUBELL\Bélec\DATA\0261\

Processing Method: Run_Simon

System(acquisition): PDA HITAI

Series:0261

Application:

Vial Number: 31

Sample Name:

Vial Type: UNK

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 100,0 ul

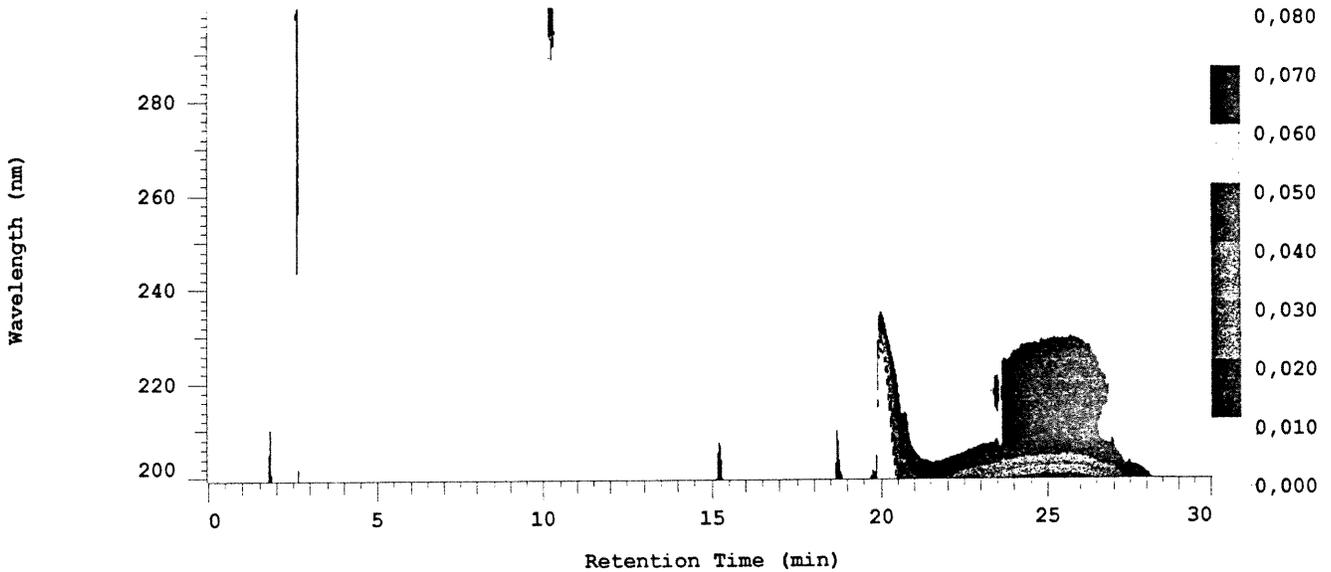
Sample Description:

Absorbance Mode: NORMAL(2.0 AU)

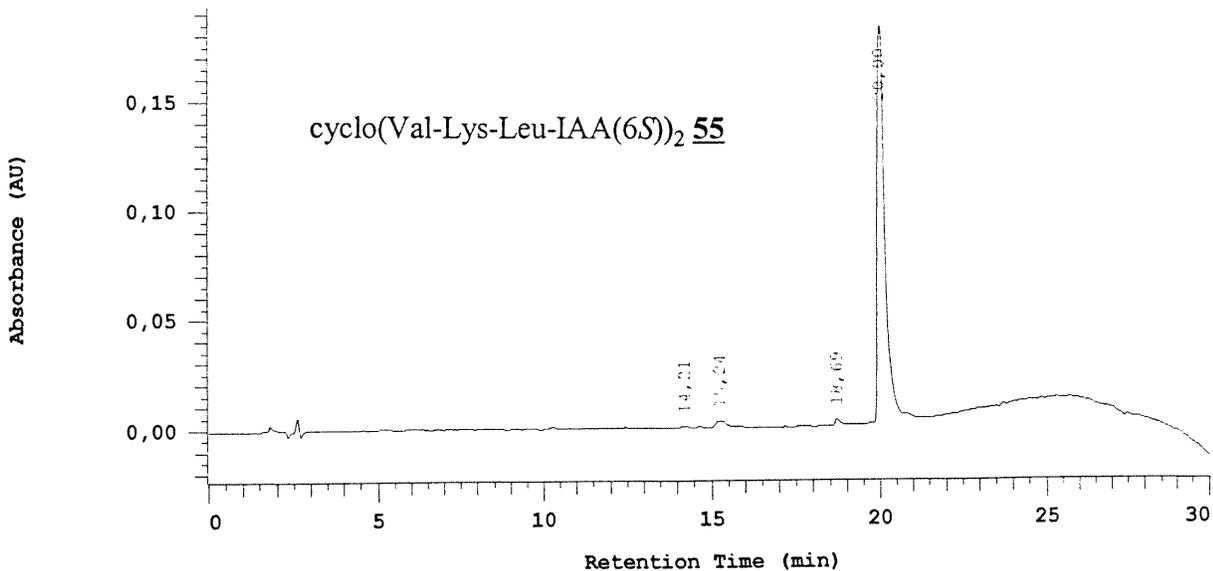
Absorbance Scale: 0.080

Spectral Bandwidth: 4 nm

Spectral Interval: 800 msec

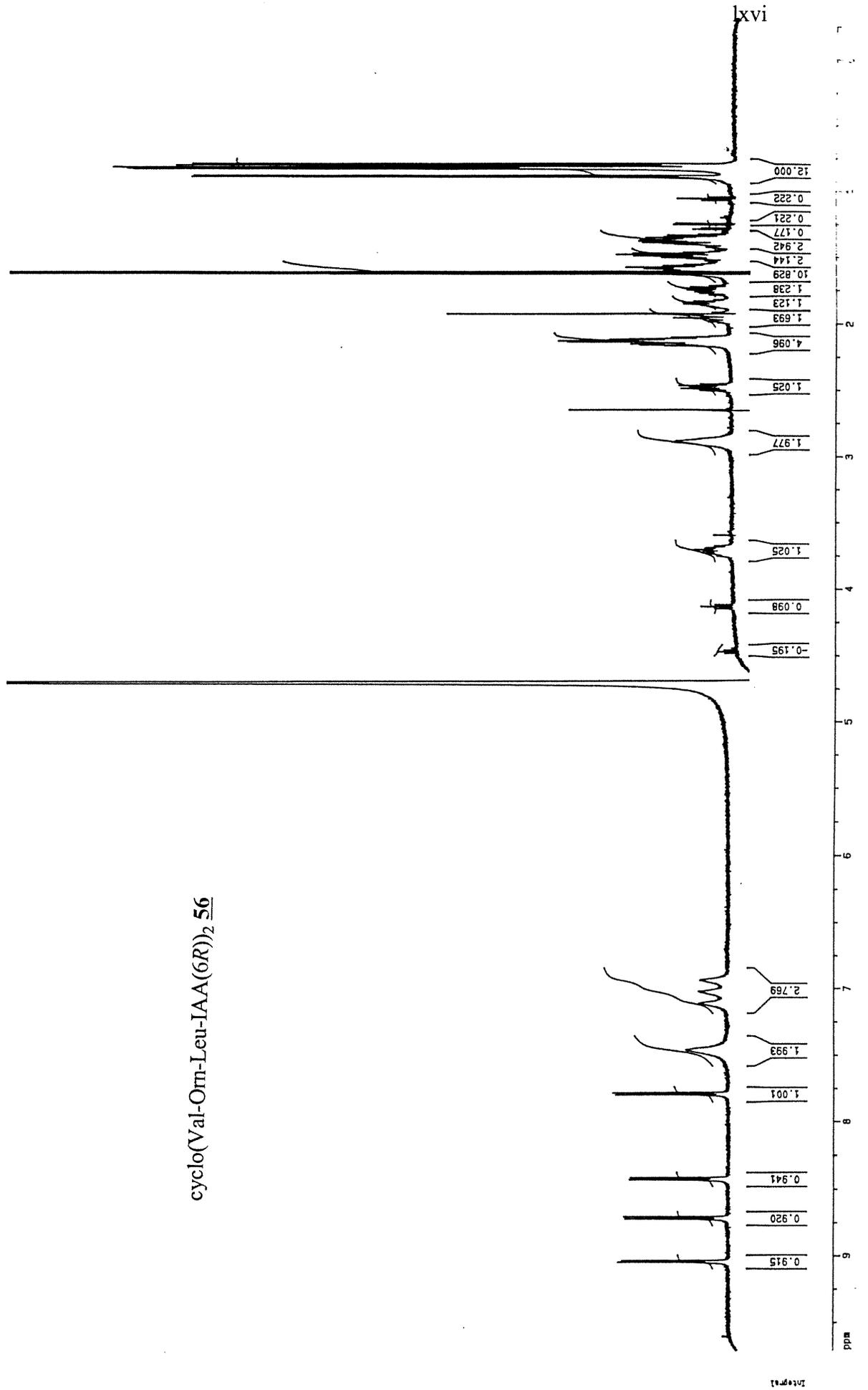


Chrom Type: Fixed WL Chromatogram, 220 nm

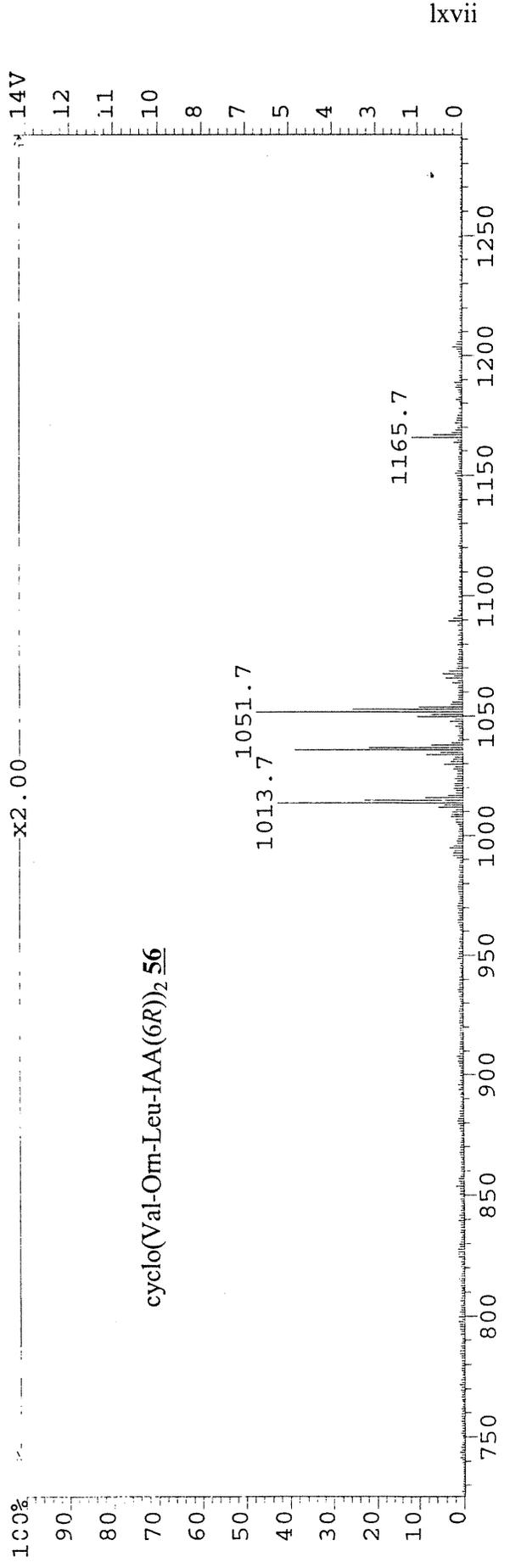
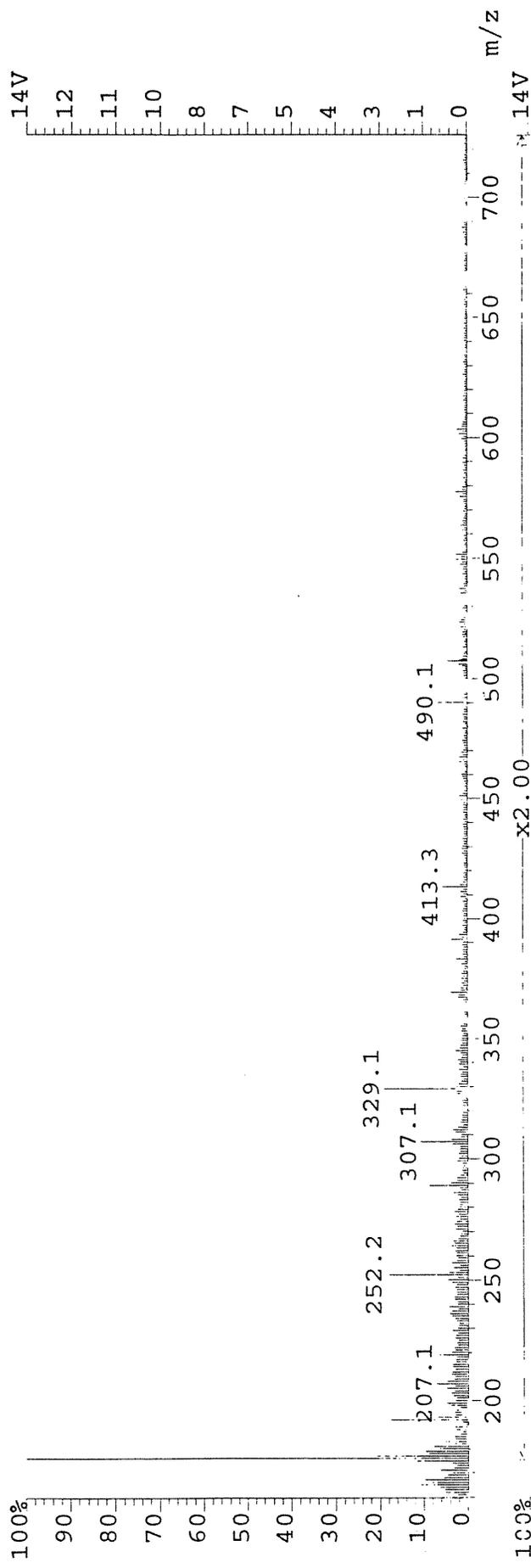


Acquisition Method: Run_Simon

cyclo(Val-Orn-Leu-IAA(6R))₂ **56**



File: V00H0802FAZ13 Ident: 1 Acq: 8-AUG-2000 09:31:28 +0:08 Cal:GO_1
AutoSpecQ FAB+ Magnet BpI:21097516 TIC:538913408 Flags:HALL
File Text:Sir-152-NBA



cyclo(Val-Orn-Leu-IAA(6R))₂ 56

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 28/06/00 14:33

Reported: 05/07/00 09:04

Processed: 28/06/00 17:42

Data Path: E:\principal\DATA\0530\

Processing Method: methode25

System(acquisition): Sys 1

Series:0530

Application: principal

Vial Number: 73

Sample Name: Sir152 Final 1-18

Vial Type: UNK

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 400,0 ul

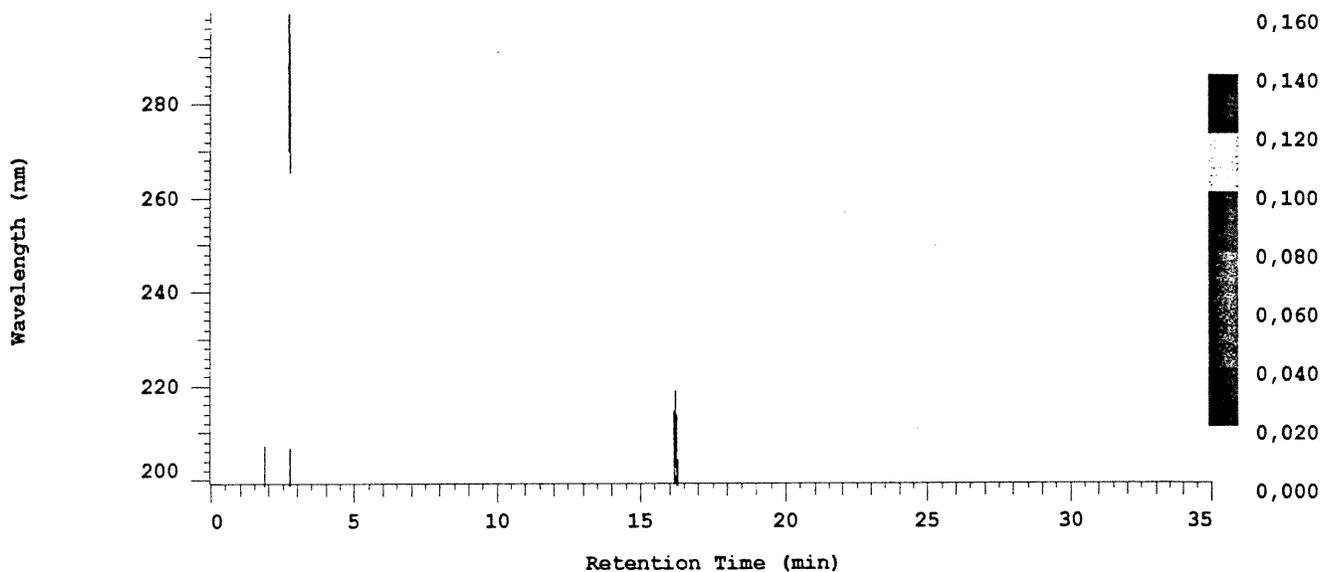
Sample Description:

Absorbance Mode: NORMAL(2.0 AU)

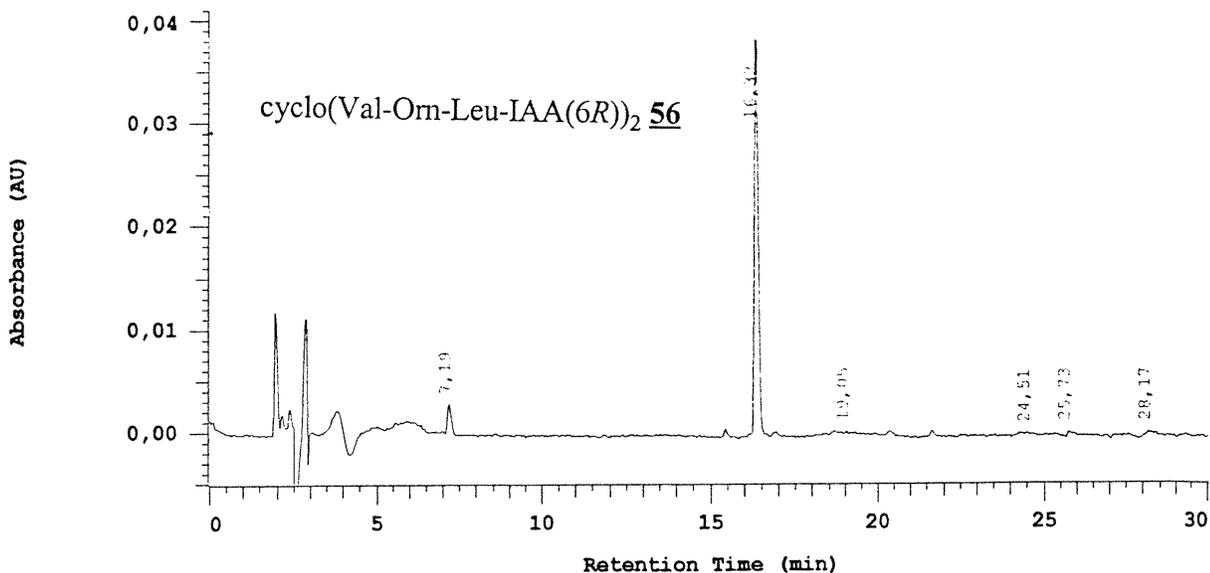
Absorbance Scale: Auto

Spectral Bandwidth: 4 nm

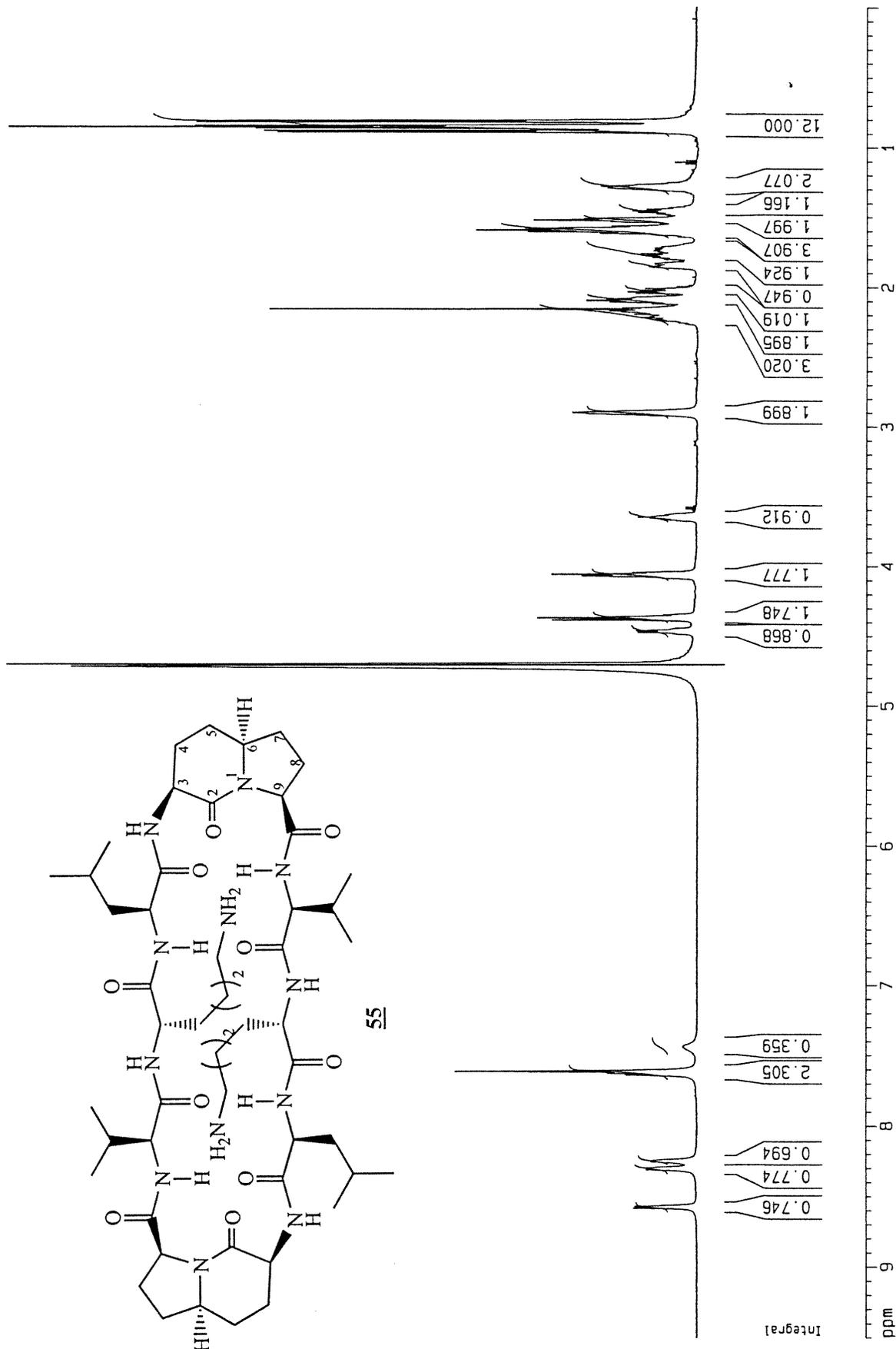
Spectral Interval: 800 msec

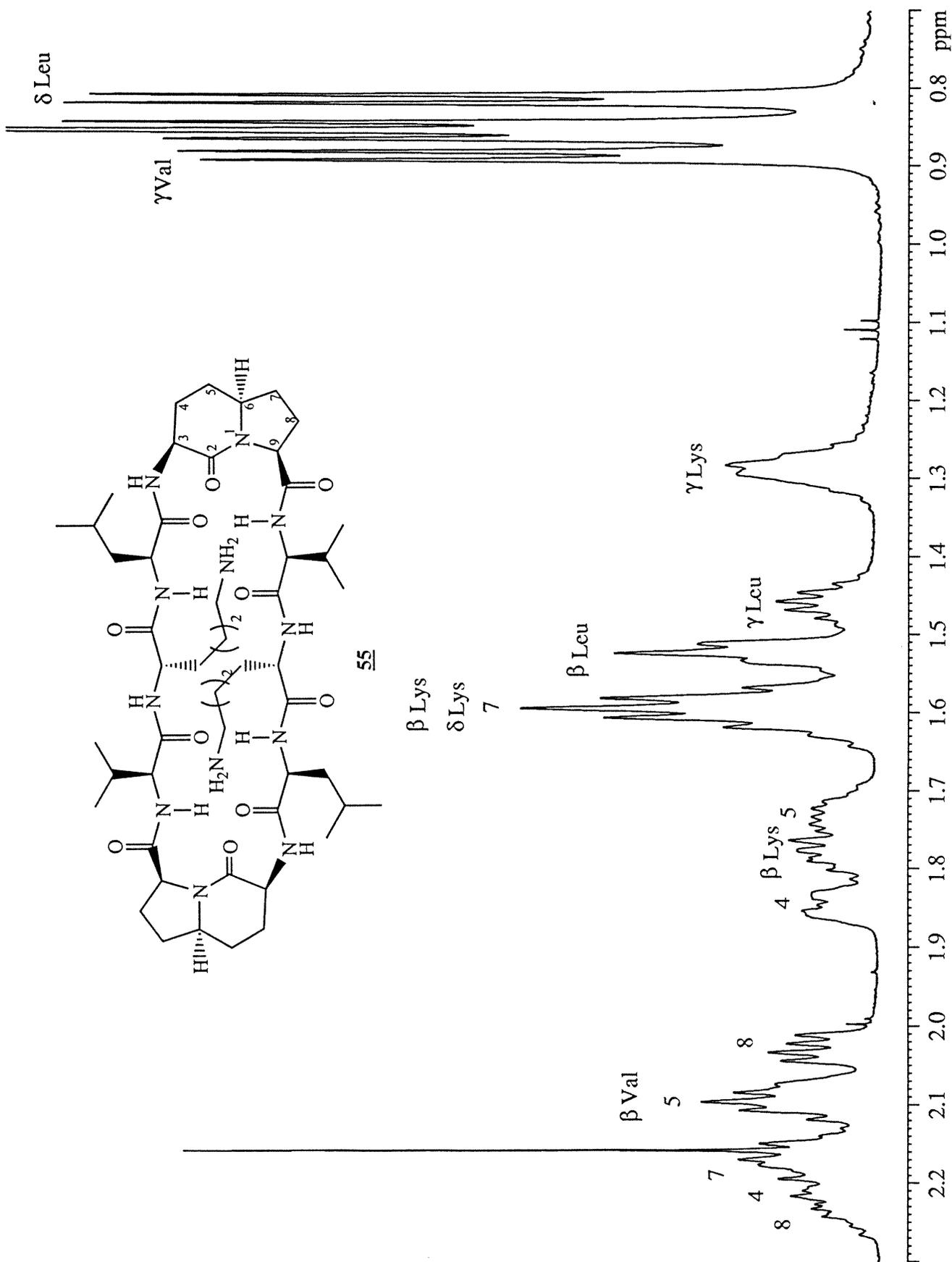


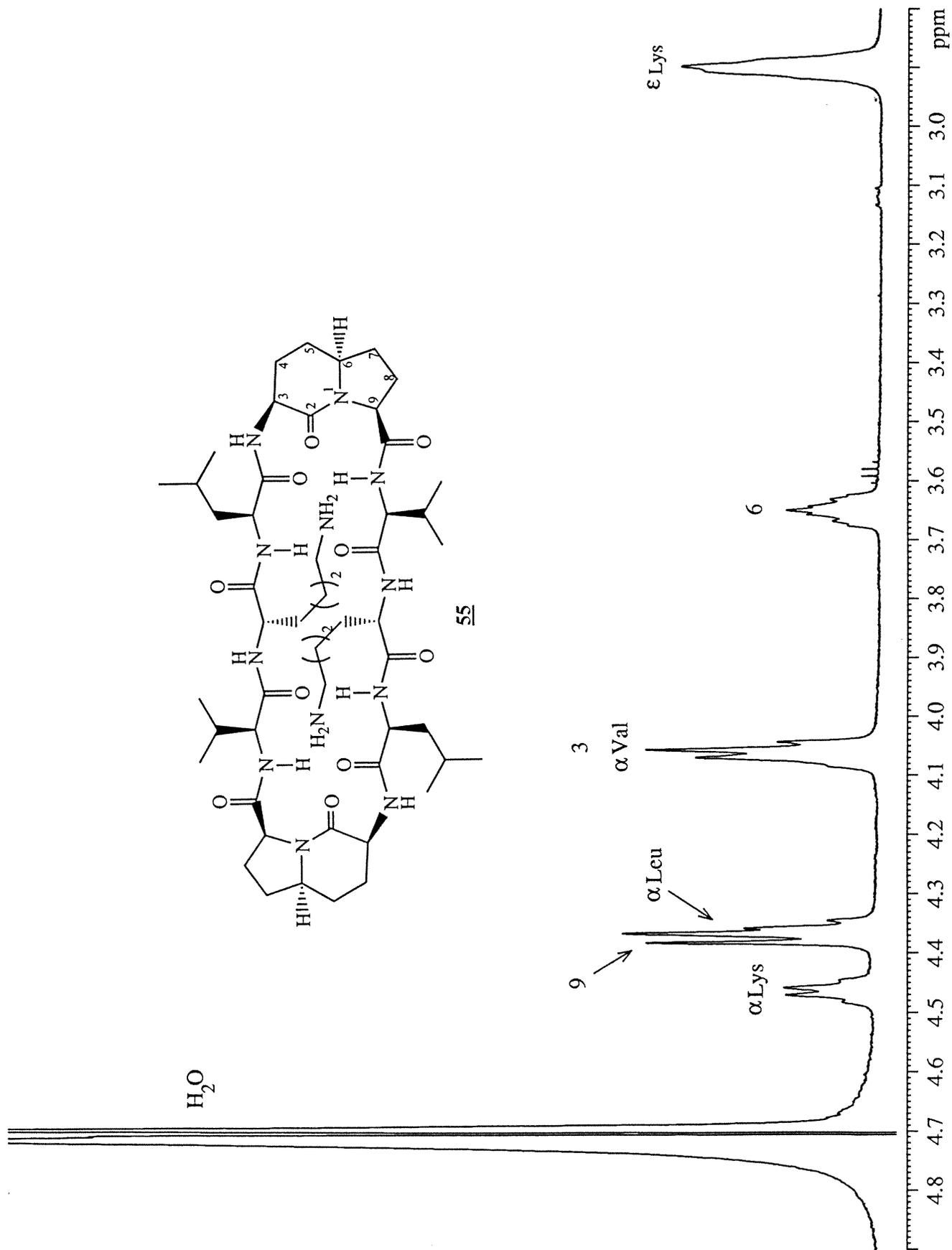
Chrom Type: Fixed WL Chromatogram, 214 nm

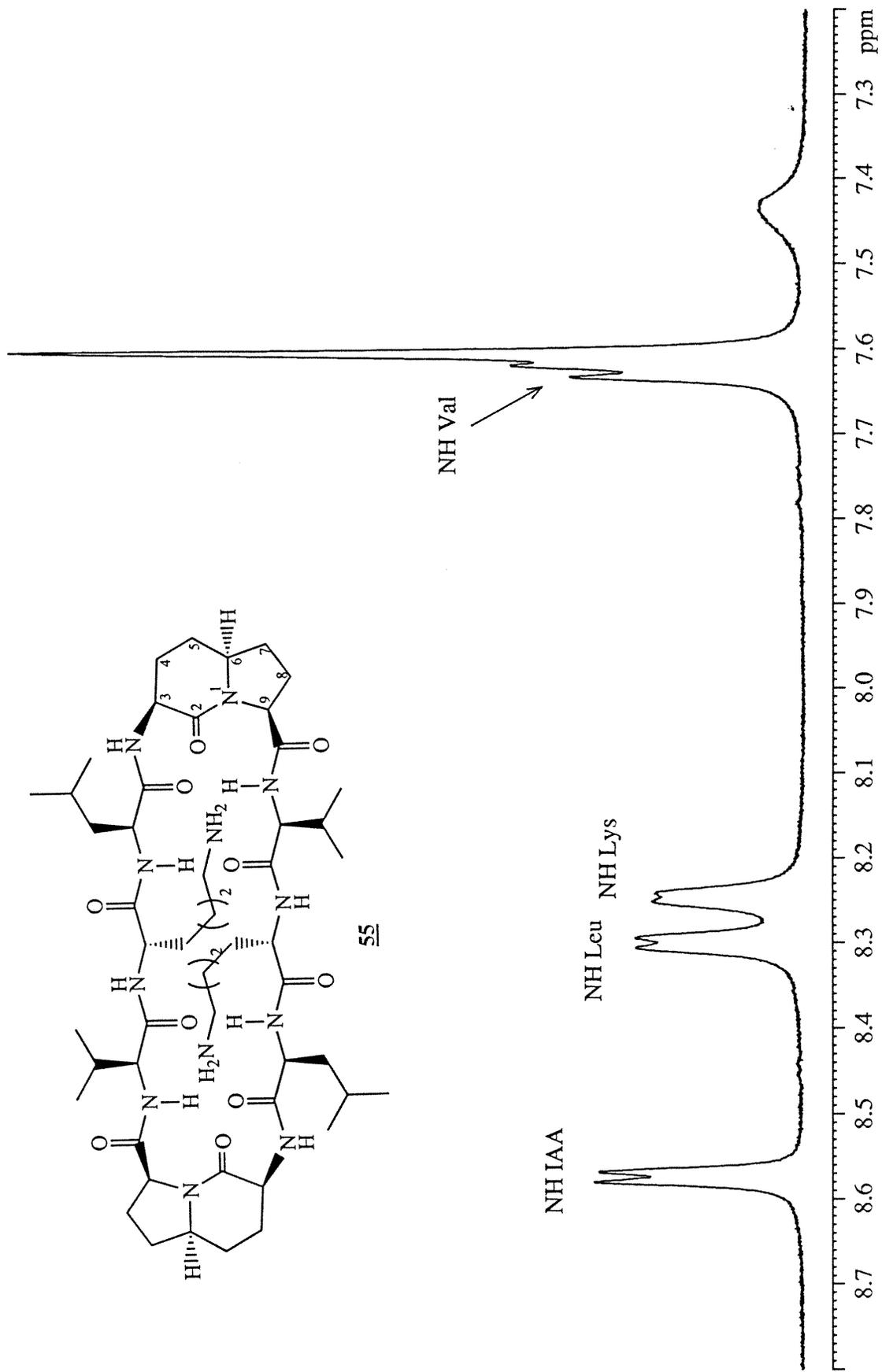


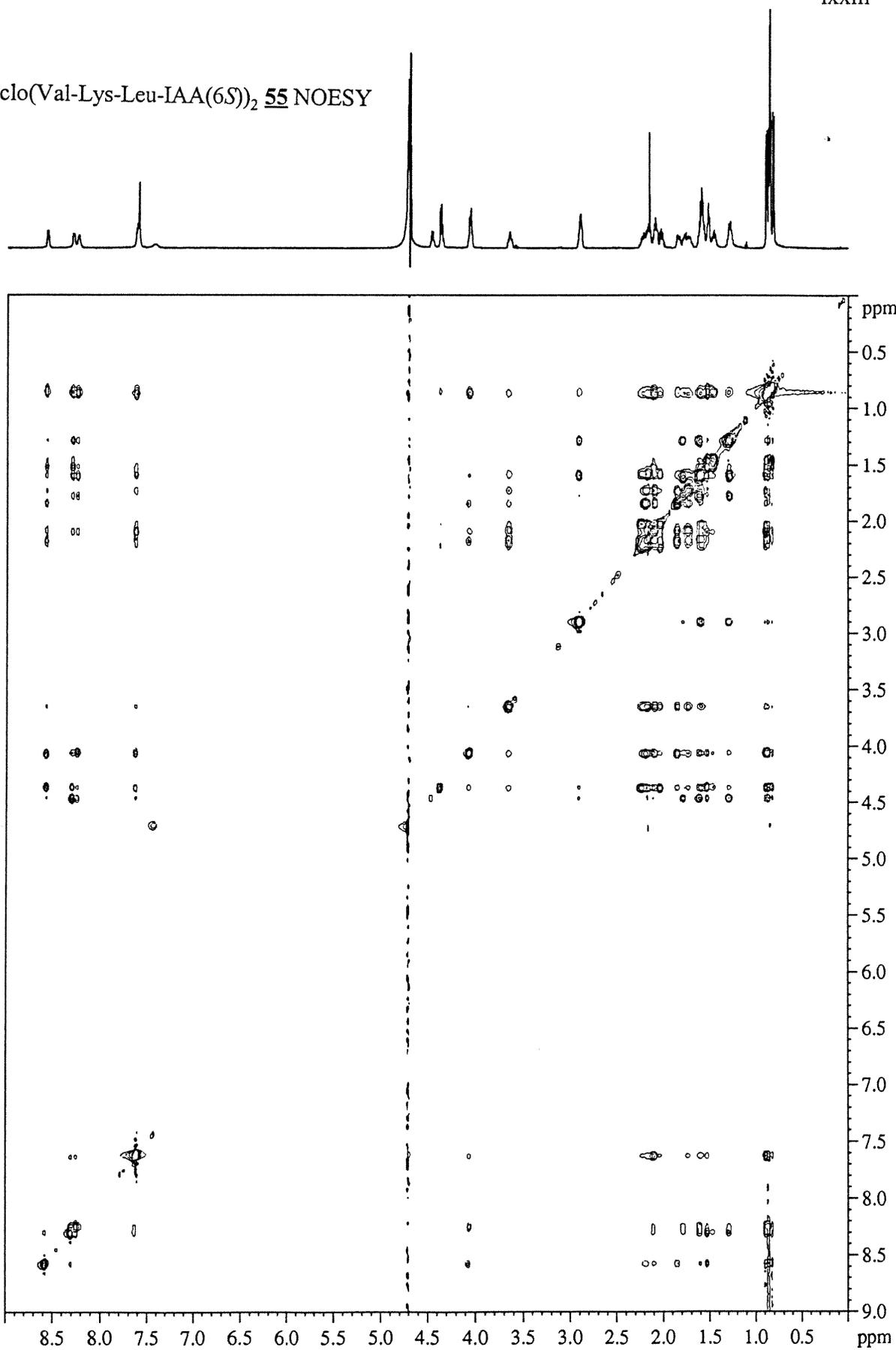
Acquisition Method: methode25

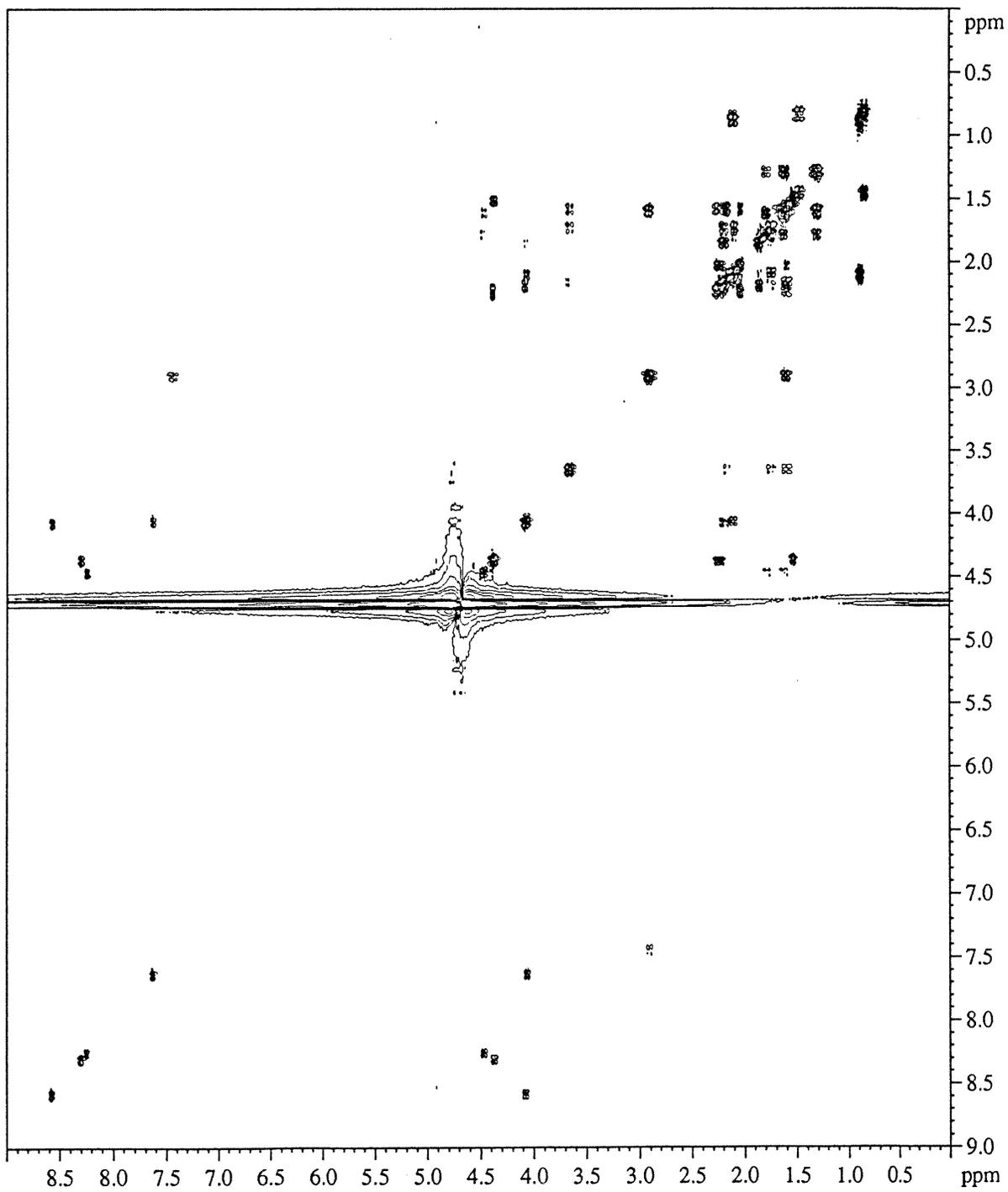
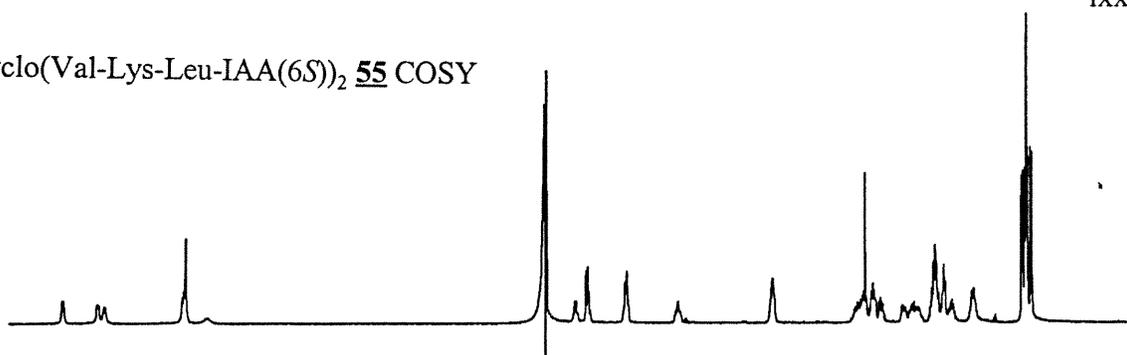


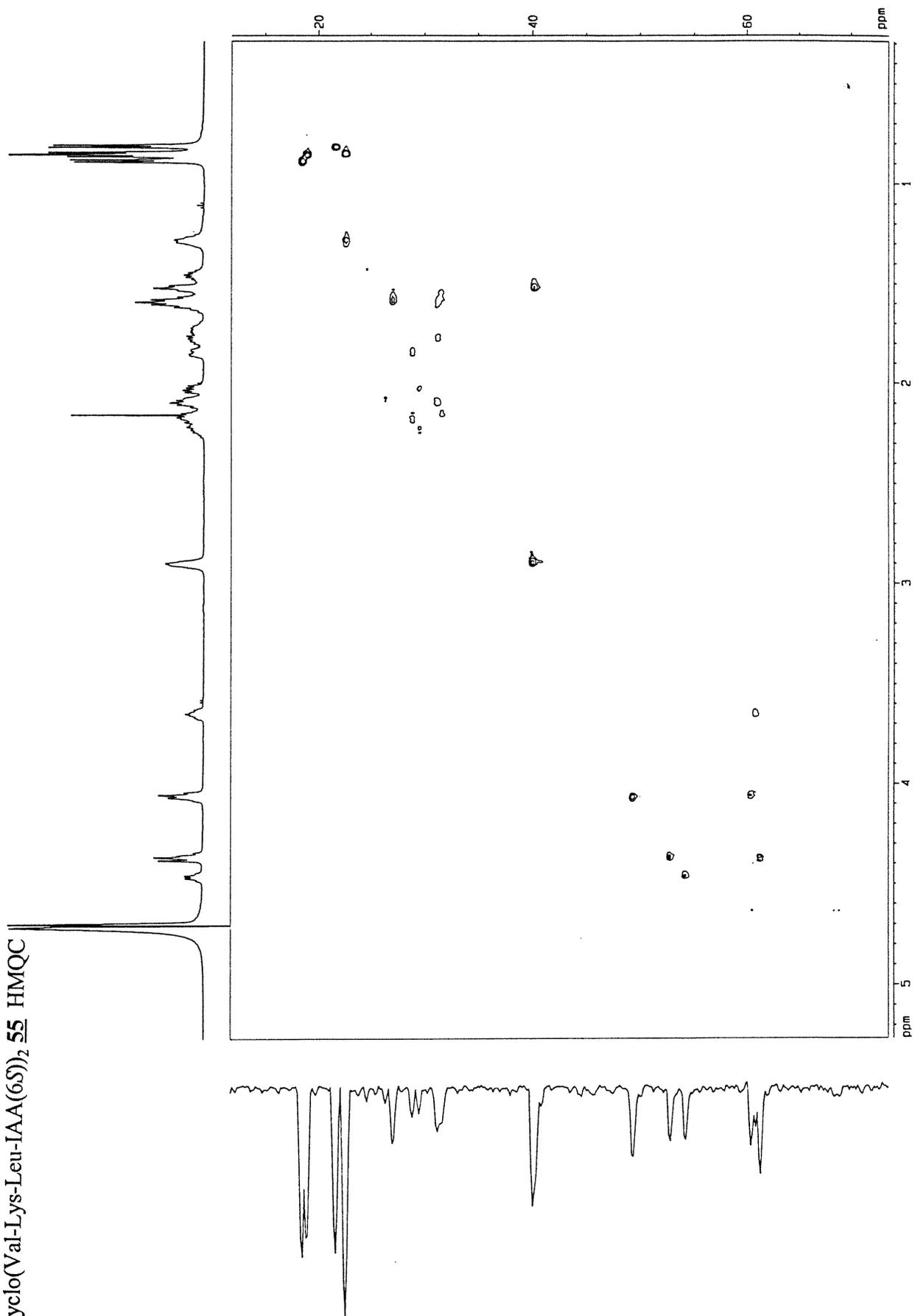


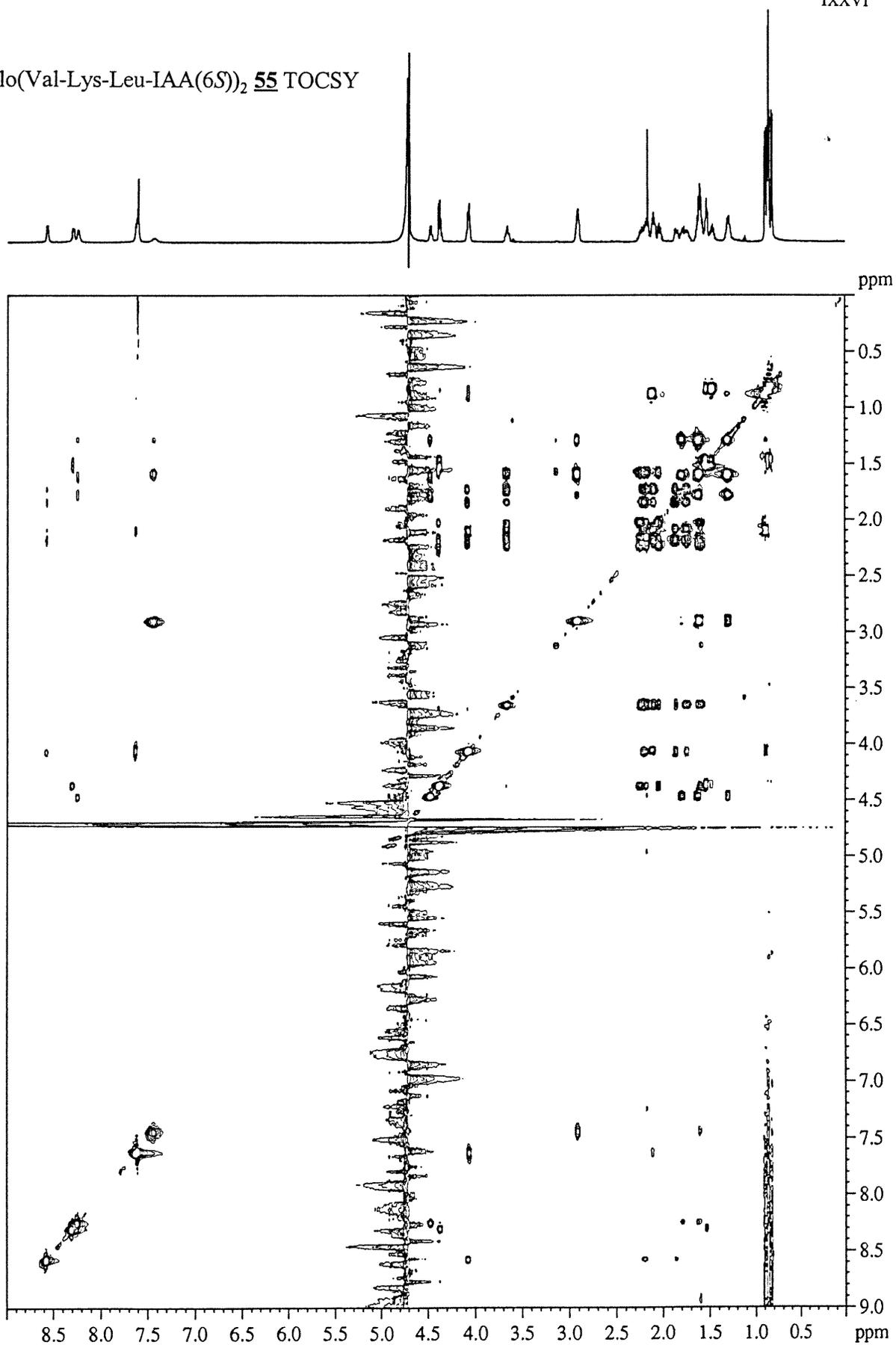


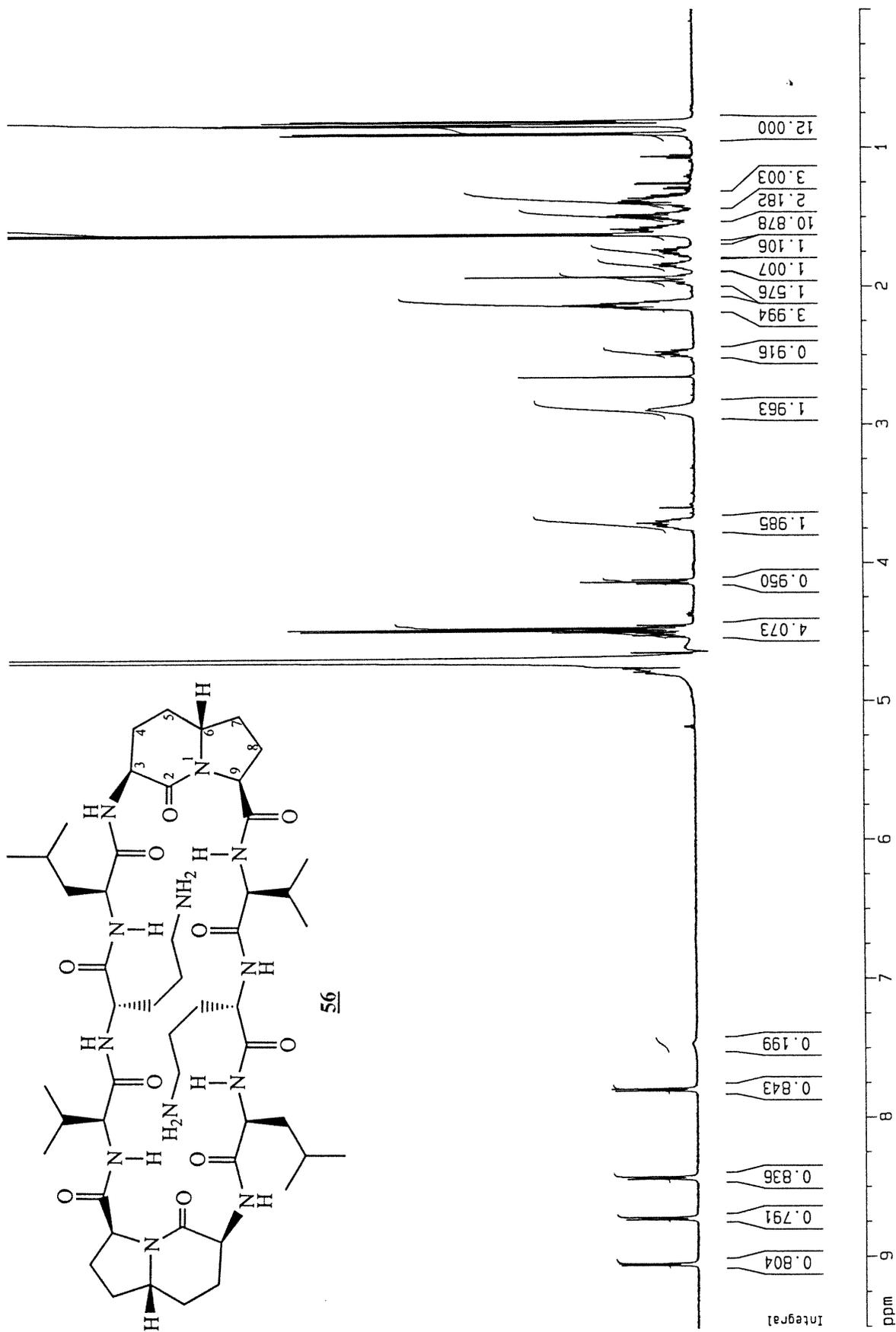


cyclo(Val-Lys-Leu-IAA(6S))₂ 55 NOESY

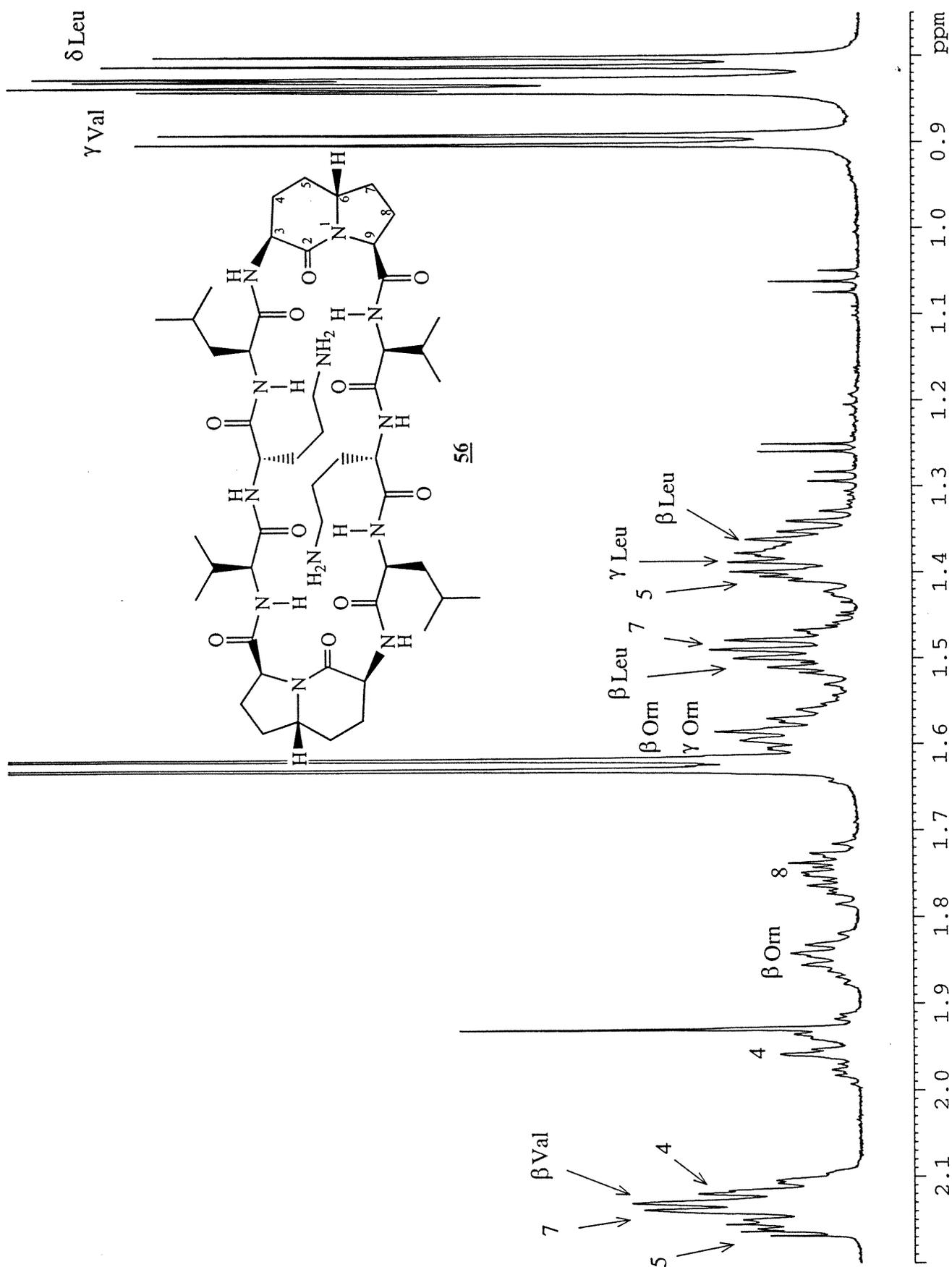
cyclo(Val-Lys-Leu-IAA(6S))₂ 55 COSY

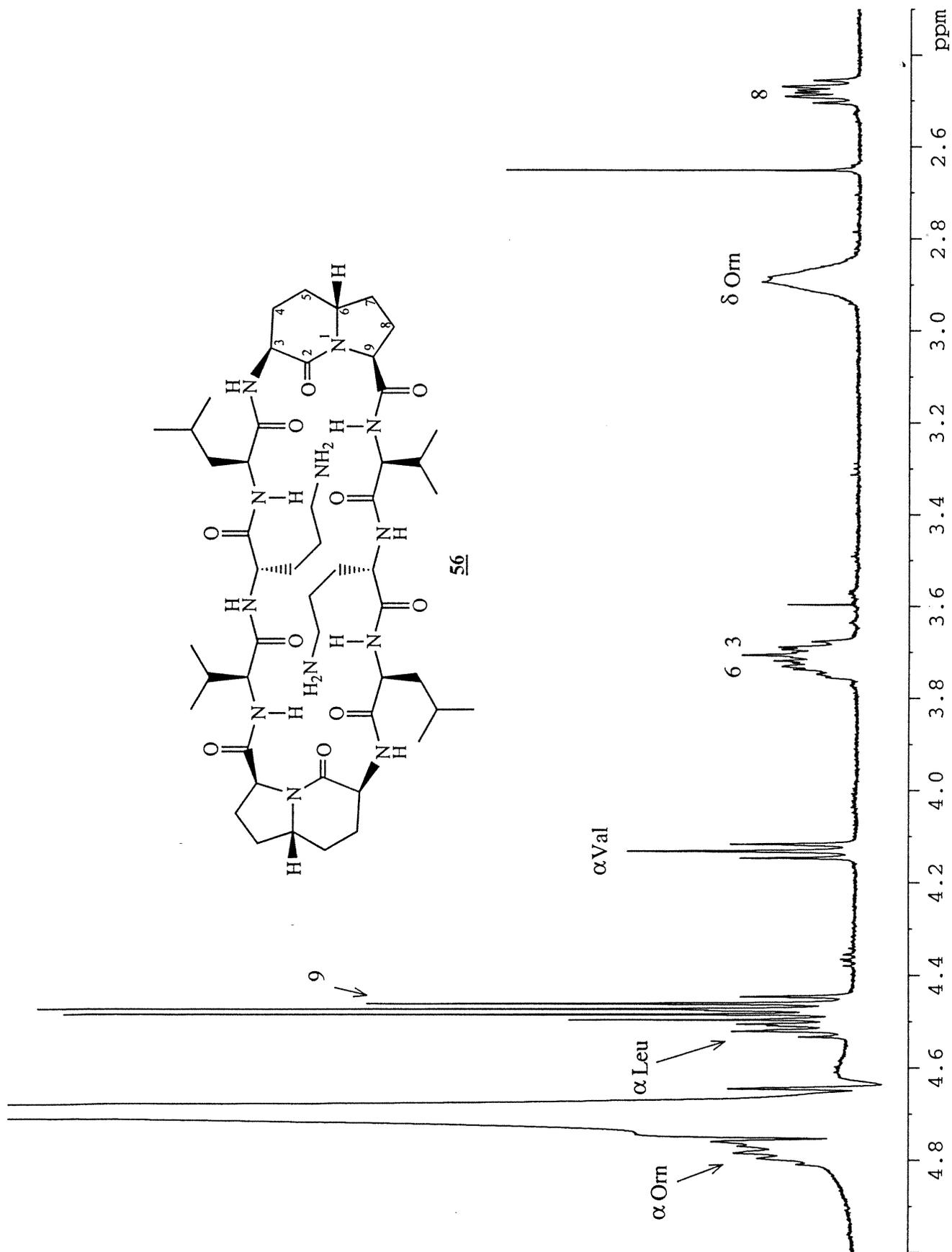
cyclo(Val-Lys-Leu-IAA(6S))₂ **55** HMQC

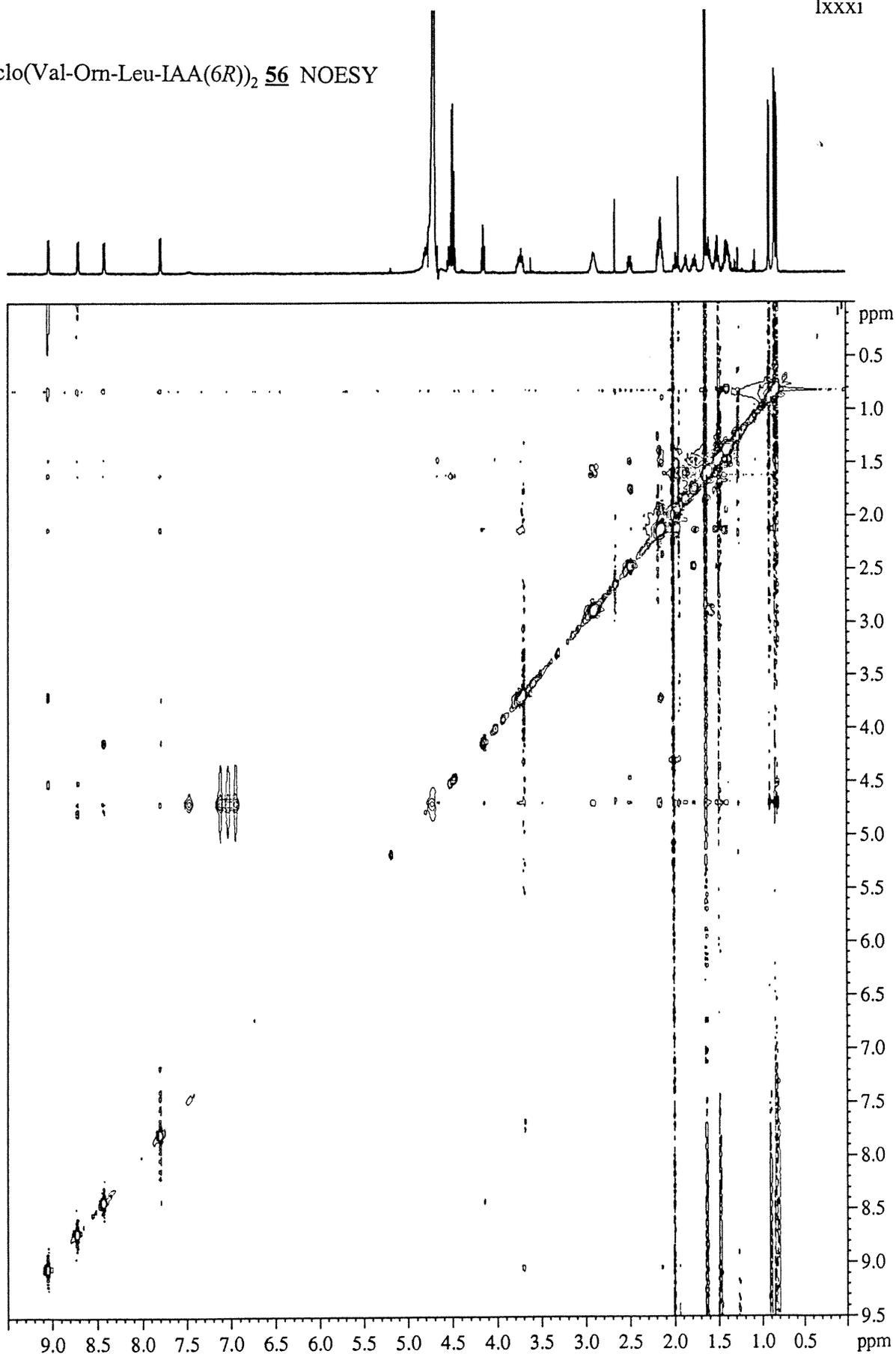
cyclo(Val-Lys-Leu-IAA(6S))₂ **55** TOCSY



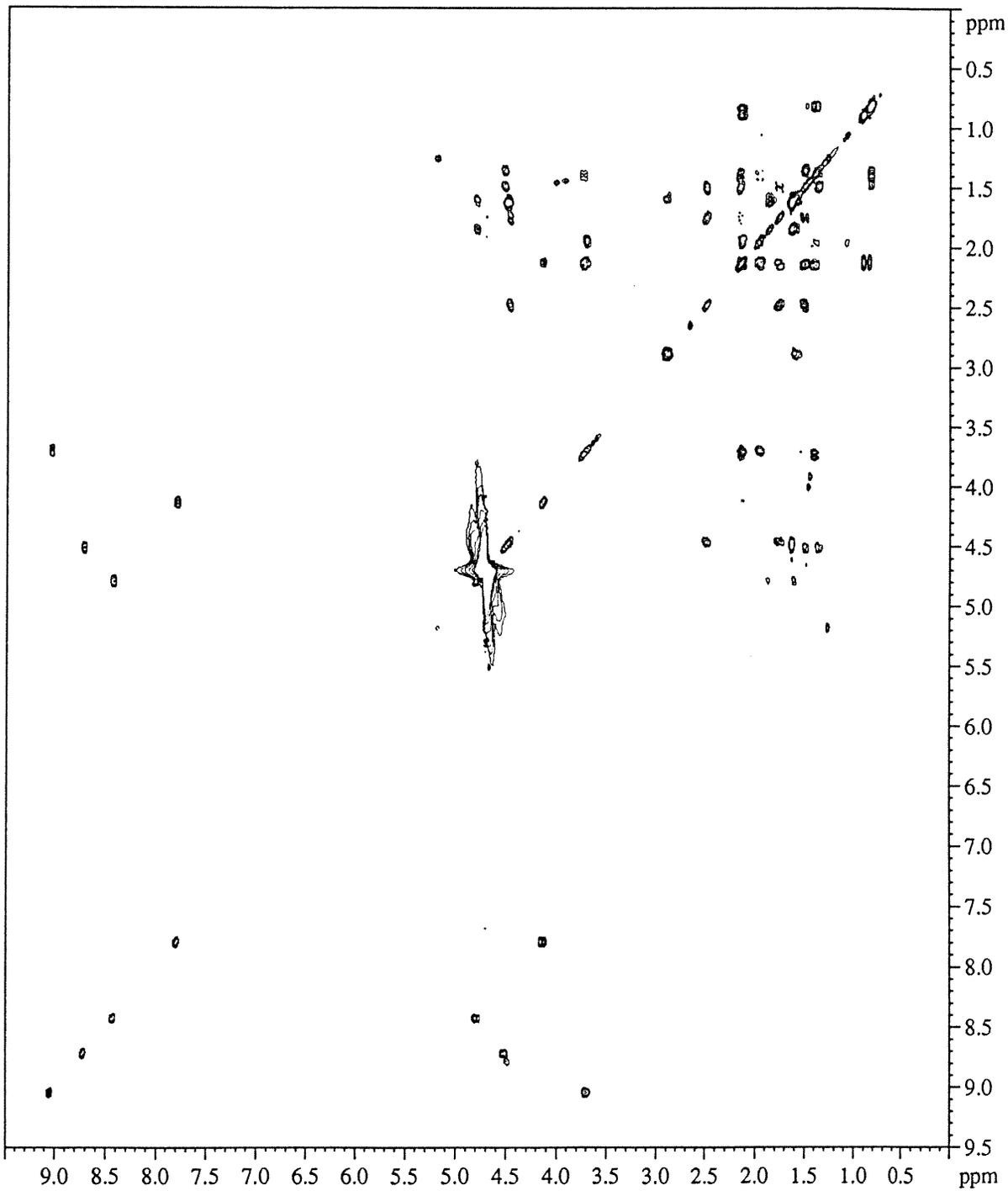
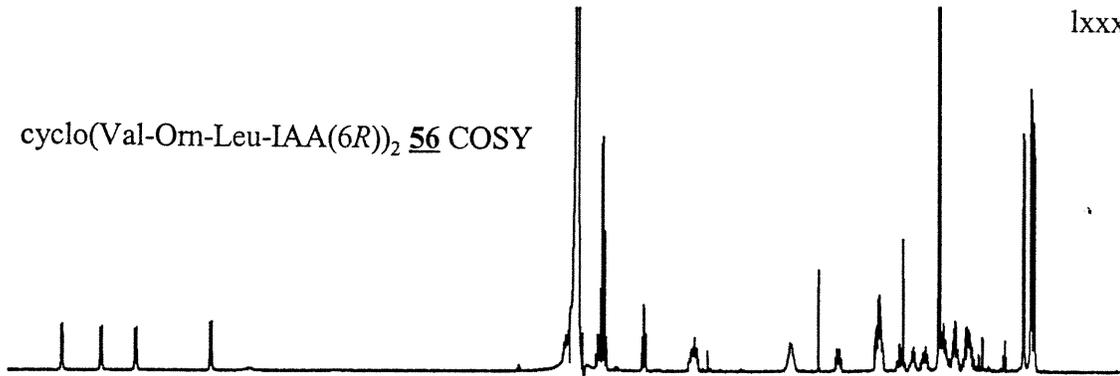
56



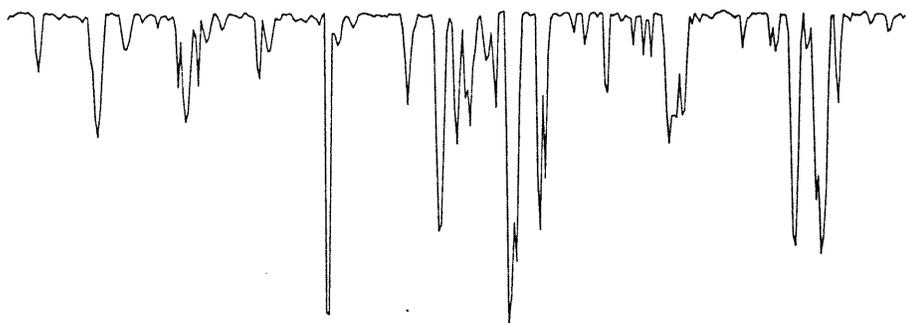
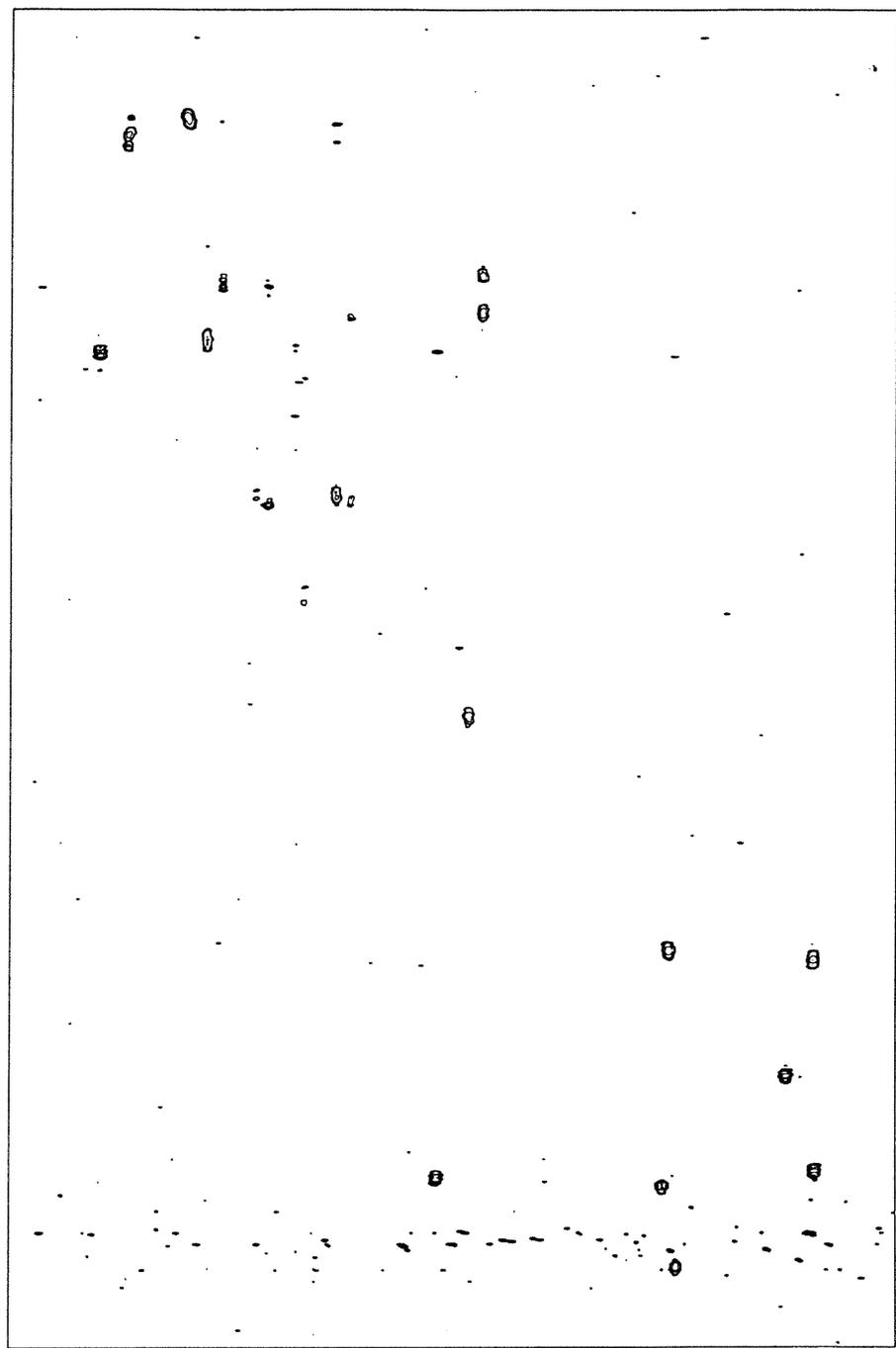
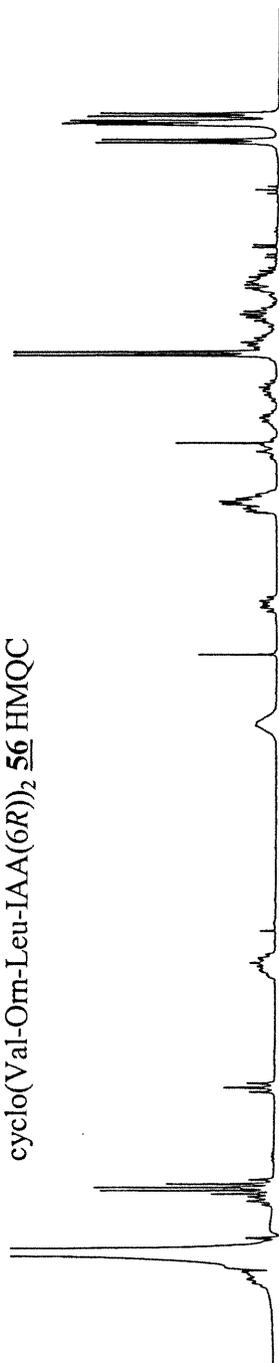


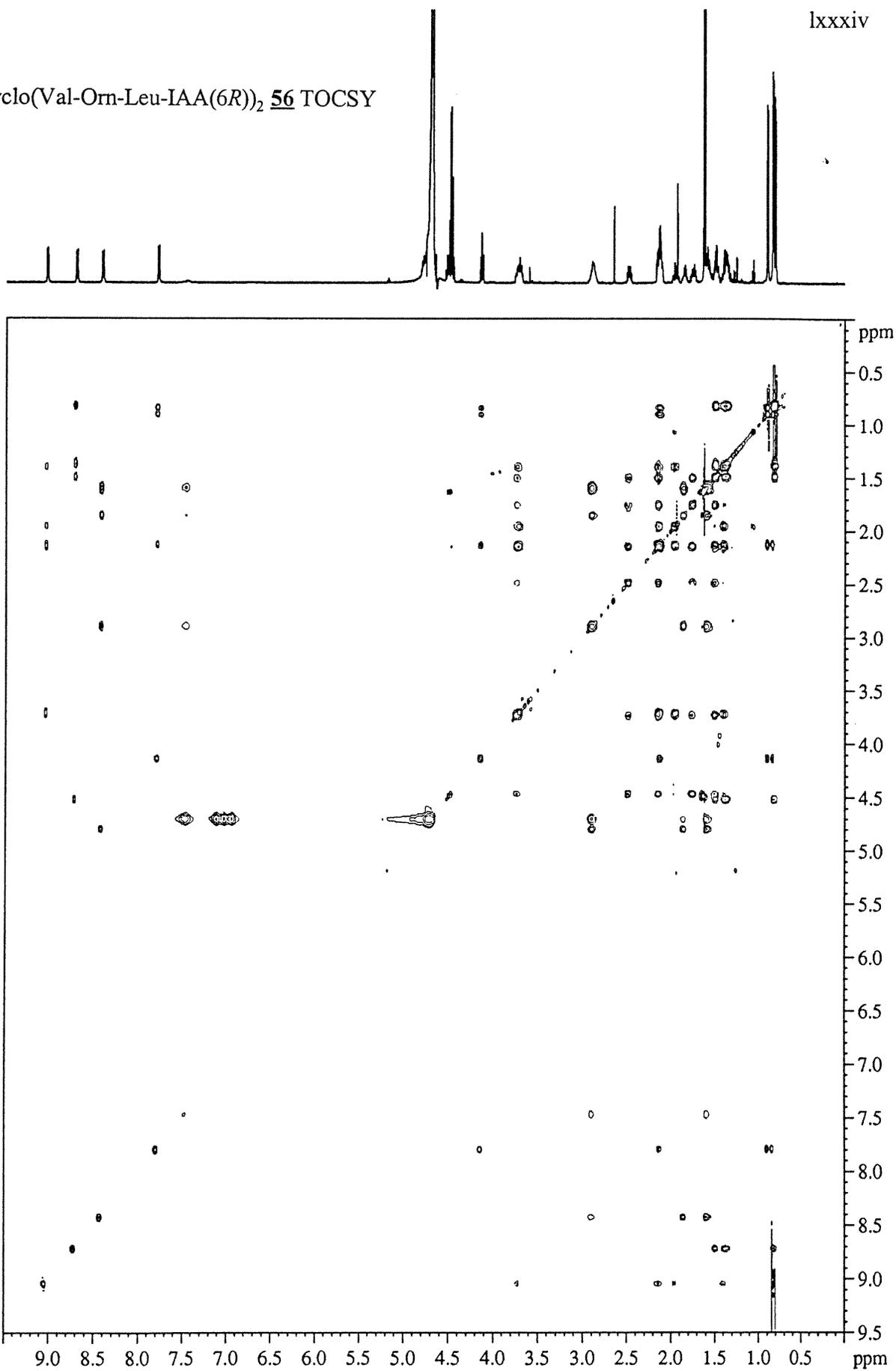
cyclo(Val-Om-Leu-IAA(6R))₂ **56** NOESY

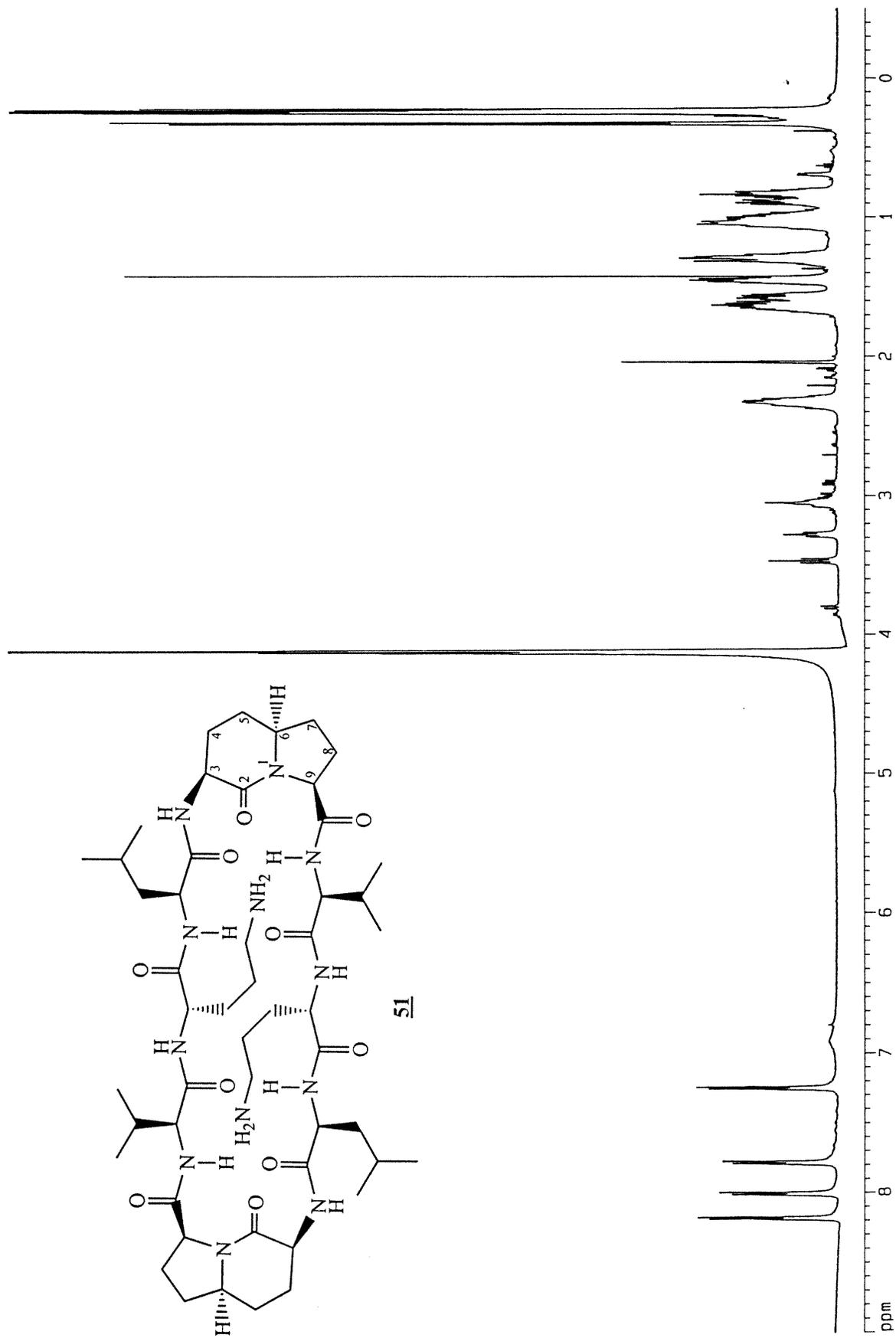
cyclo(Val-Orn-Leu-IAA(6R))₂ 56 COSY

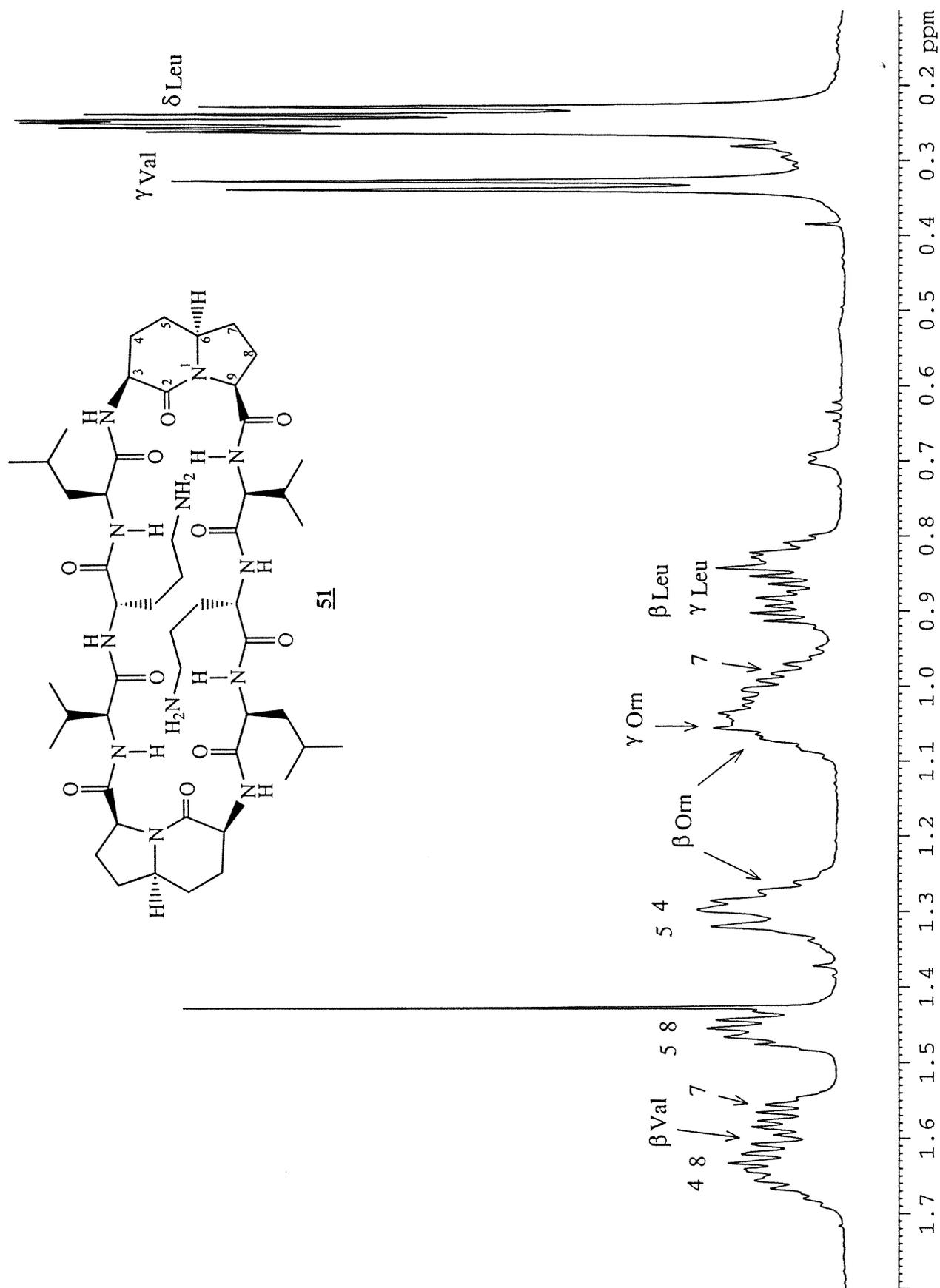


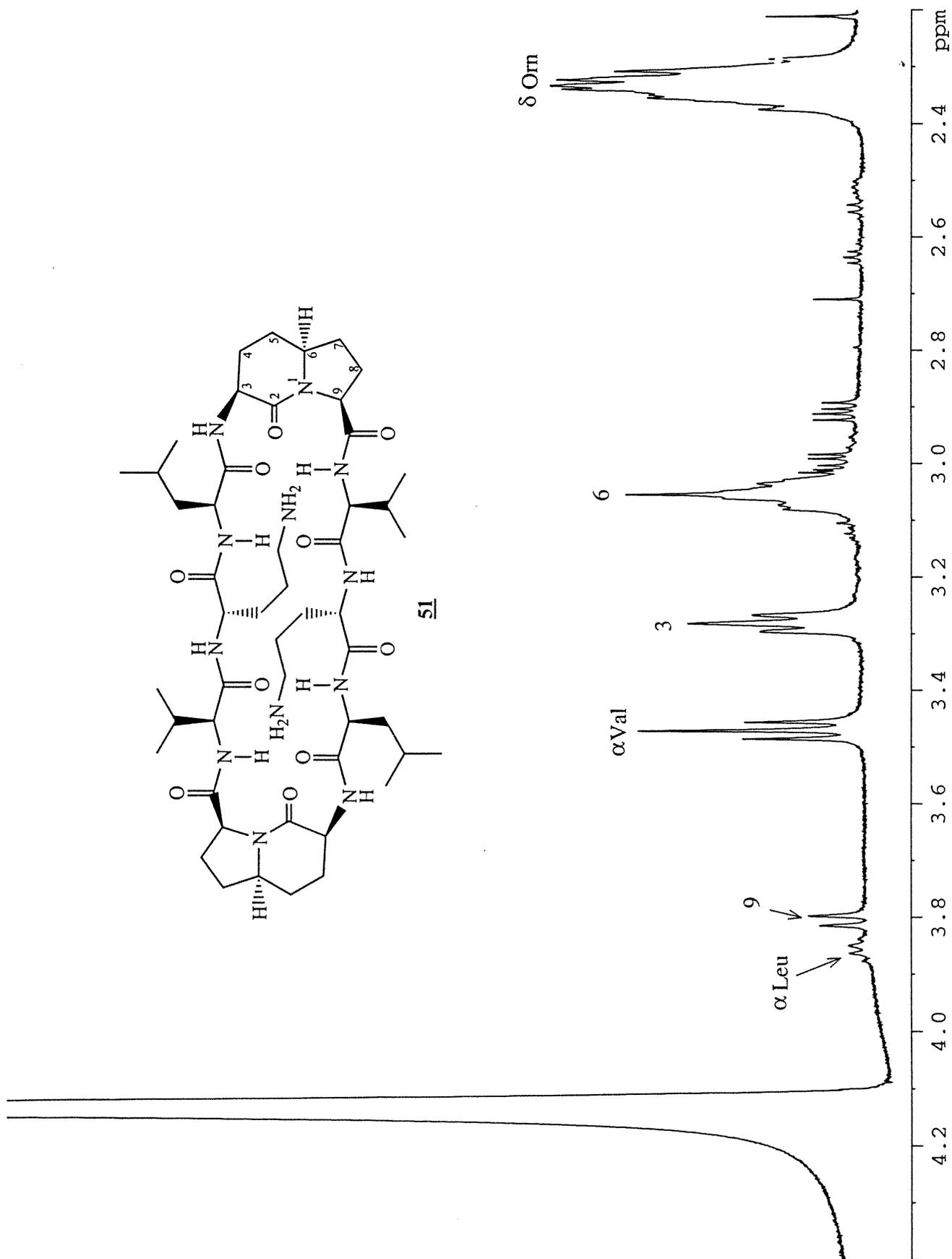
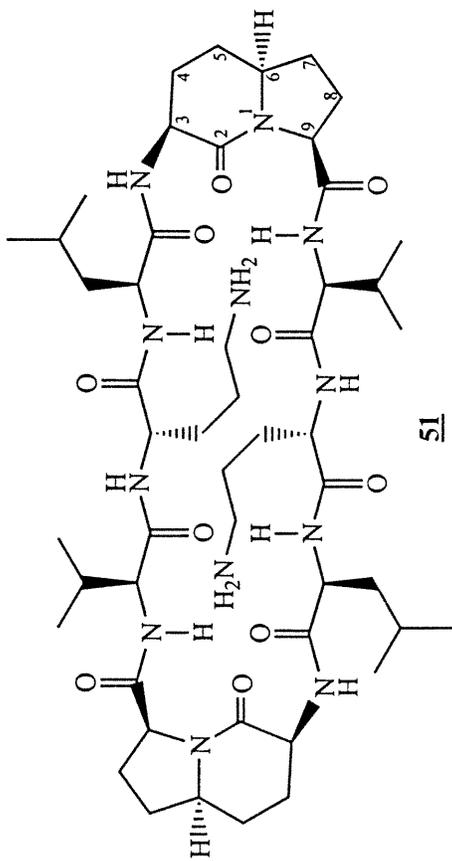
cyclo(Val-Om-Leu-IAA(6R))₂ 56 HMQC

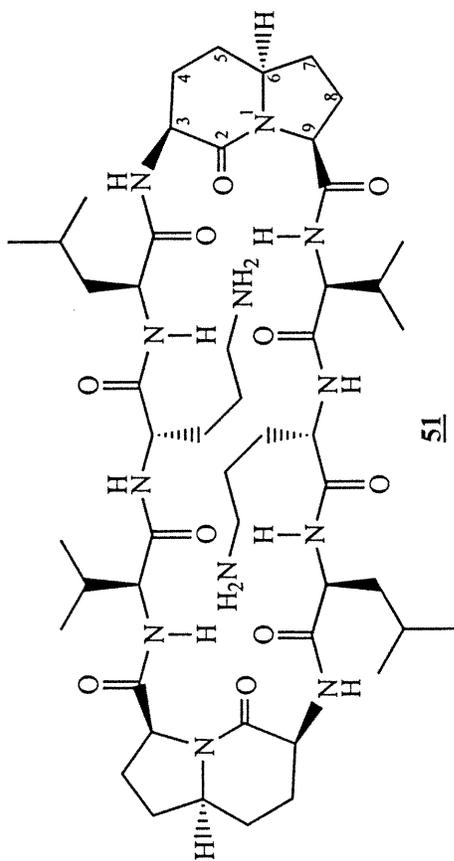


cyclo(Val-Orn-Leu-IAA(6R))₂ **56** TOCSY

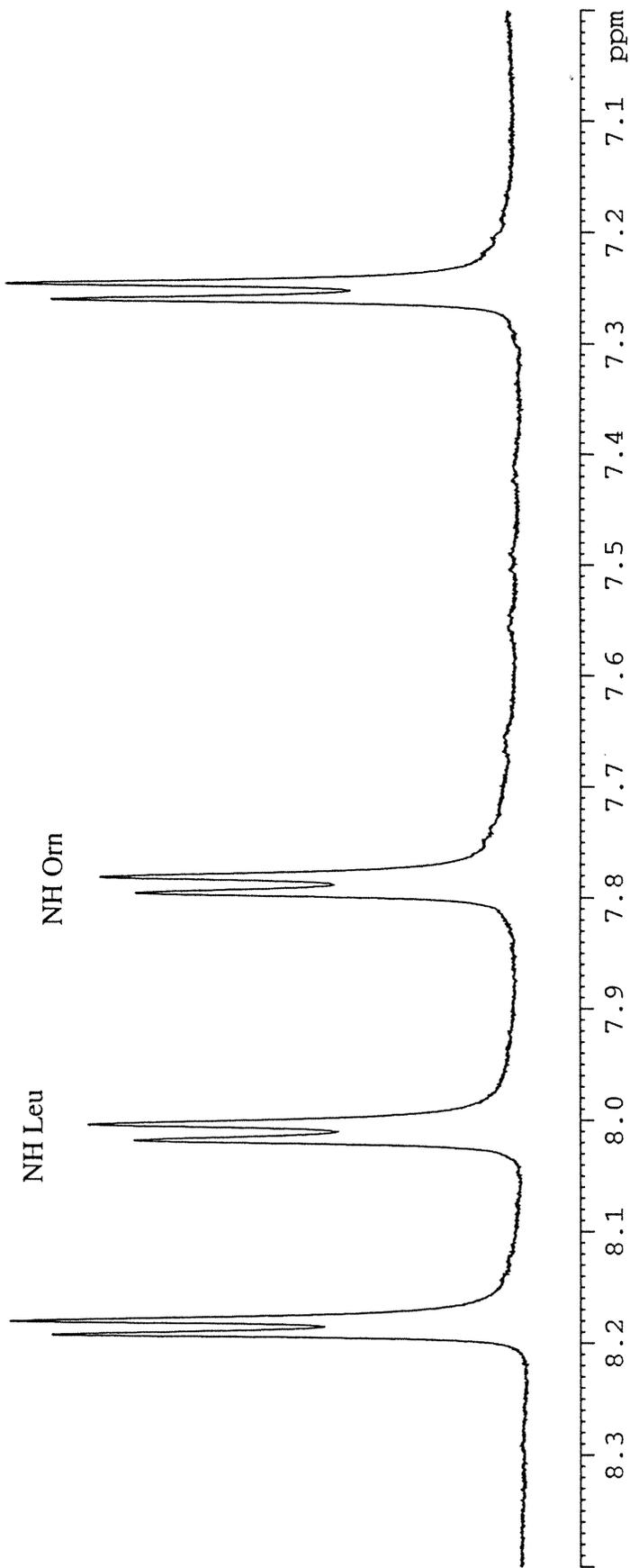




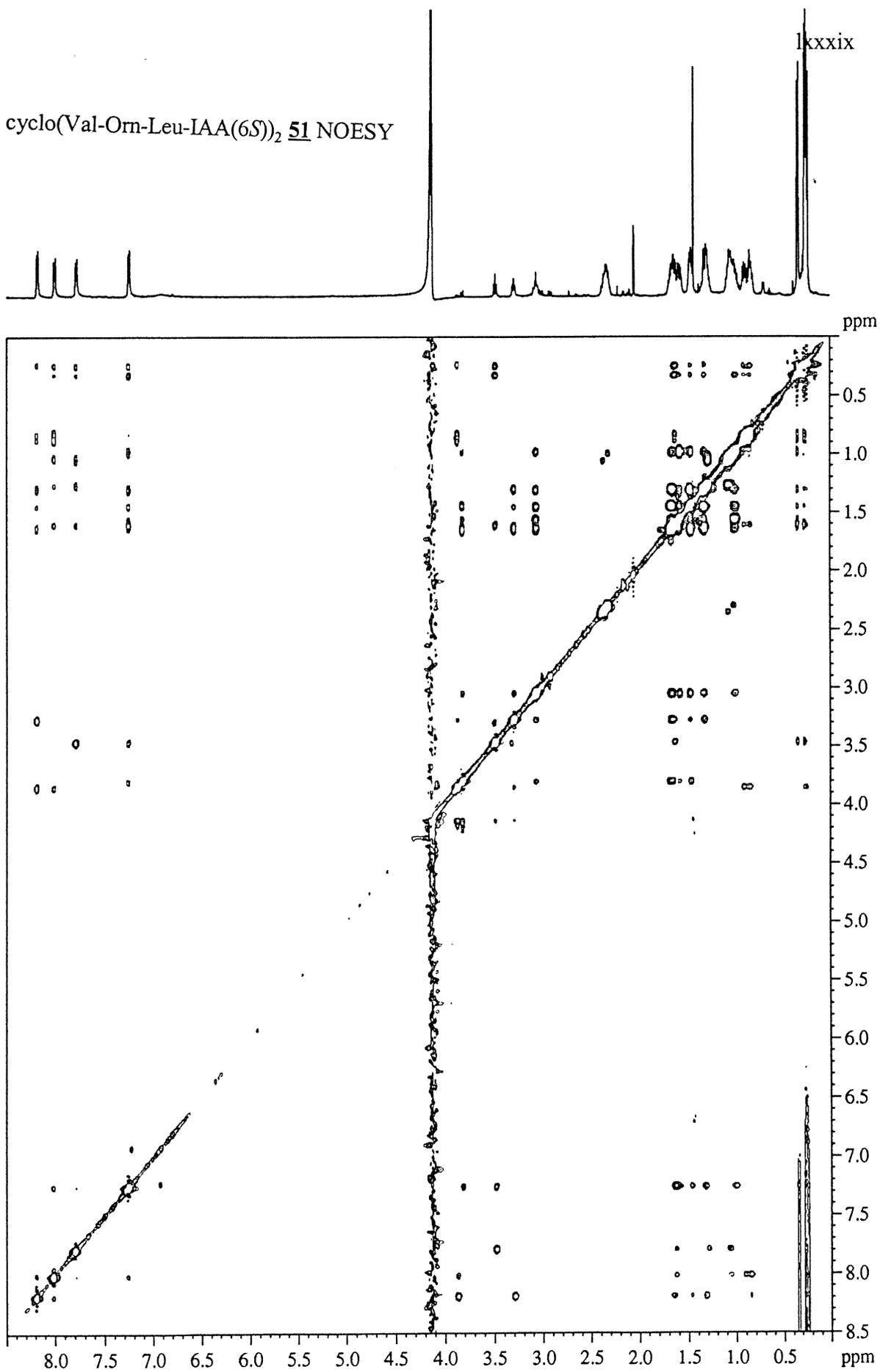




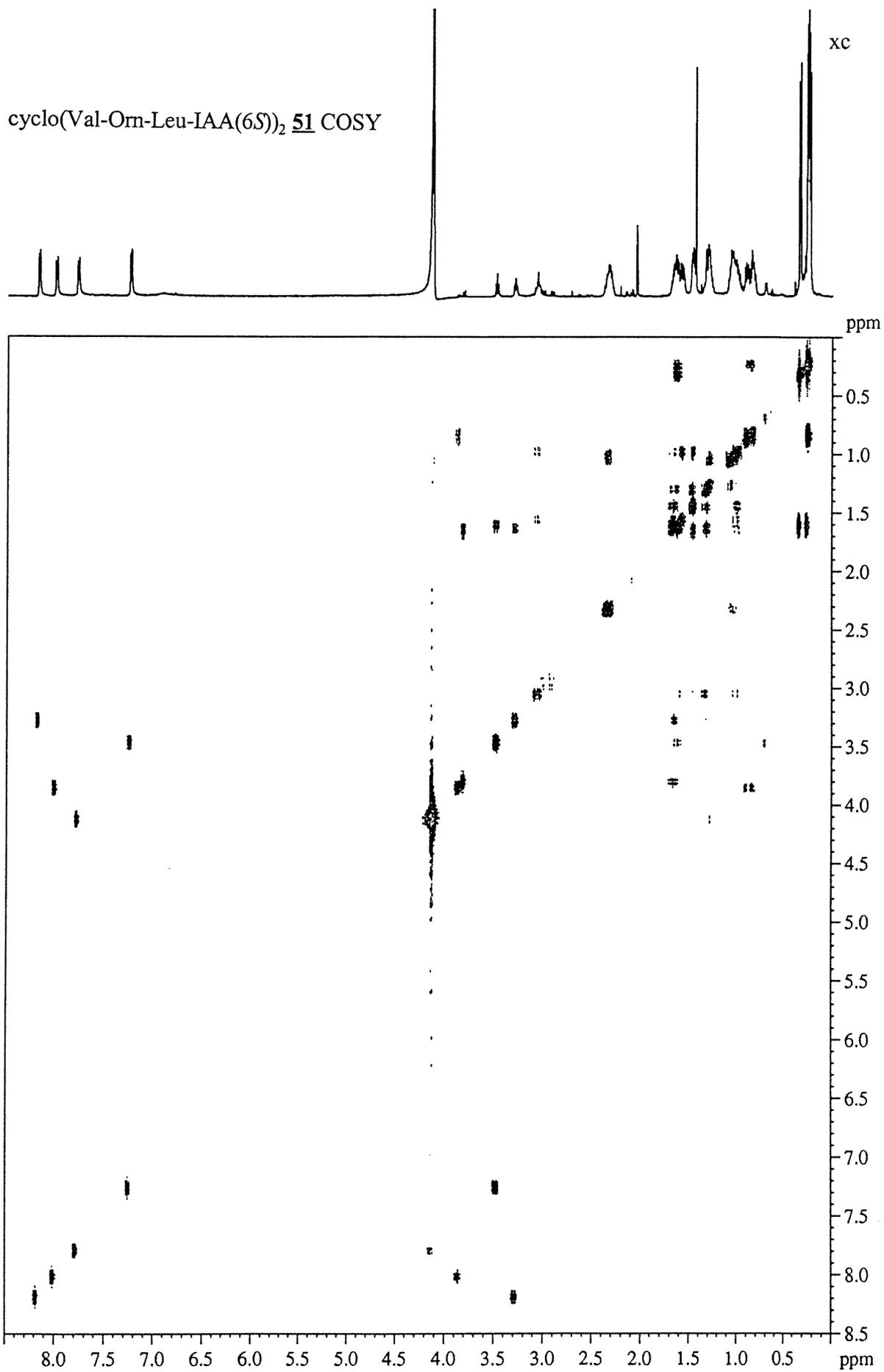
NH Val



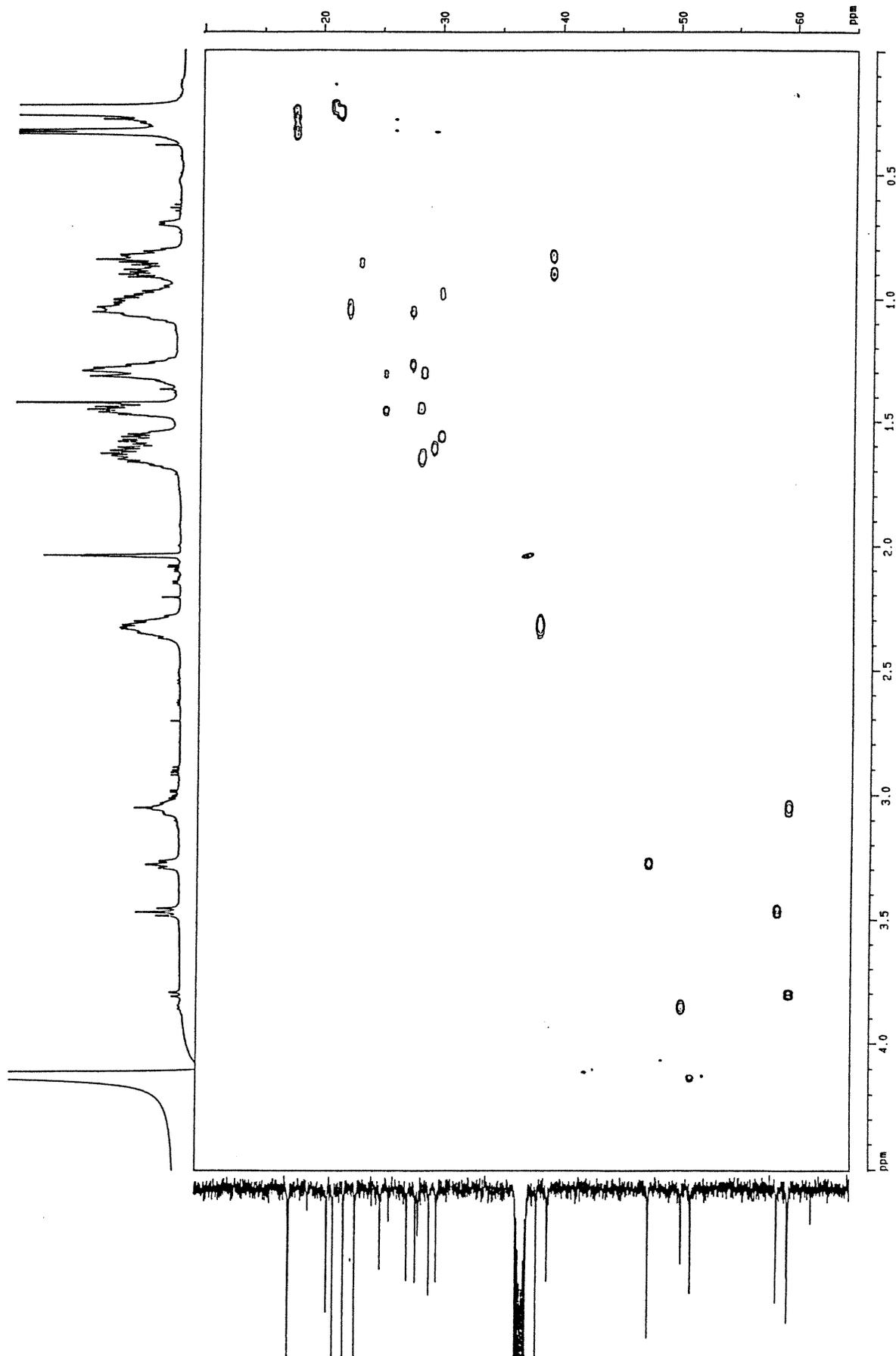
cyclo(Val-Orn-Leu-IAA(6S))₂ **51** NOESY



cyclo(Val-Orn-Leu-IAA(6S))₂ **51** COSY



cyclo(Val-Orn-Leu-IAA(6S))₂ **51** HMQC



cyclo(Val-Orn-Leu-IAA(6S))₂ 51 TOCSY

