

Université de Montréal

Vers le mimétisme de l'activité des protéases aspartiques par des modèles  
peptidiques

par

Kenza Daïri

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 es sciences (M. Sc.)  
en chimie

Avril, 2001

©Kenza Daïri, 2001



Q1  
3  
154  
2002  
N.005

## IDENTIFICATION DU JURY

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:  
Vers le mimétisme de l'activité des protéases aspartiques par des modèles  
peptidiques

présenté par:  
Kenza Daïri

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

André Charette	président-rapporteur
William Lubell	directeur de recherche
Hermann Dugas	membre du jury

Mémoire accepté le:

## SOMMAIRE

La conception et la synthèse de mimétiques d'enzymes permettent d'atteindre un meilleur degré de compréhension du mécanisme d'action de l'enzyme native afin de reproduire son activité. Les protéases aspartiques sont une classe d'enzymes protéolytiques qui possèdent deux résidus d'acide aspartique au sein de leur site actif. Ces deux résidus sont responsables de la catalyse de l'hydrolyse des liens amides des peptides et des protéines. Dans les conditions physiologiques d'activité de ces protéases, la fonction acide de la chaîne latérale de l'un des acides aspartiques est sous forme déprotonée, alors que celle du deuxième résidu aspartique est protonée. À date, les études concernant le mécanisme d'action des protéases aspartiques n'ont pas pu distinguer entre un mécanisme d'acide général-base générale impliquant une molécule d'eau ou un mécanisme procédant via une attaque nucléophile par l'un des carboxylates.

Un modèle du site actif des protéases aspartiques est exploré dans ce projet, qui consiste en un peptide cyclique incorporant une unité dipeptidique rigide qui pourrait rapprocher des fonctions carboxyliques des chaînes latérales. L'unité rigide choisie est l'acide aminé (3*S*, 6*S*, 9*S*)-indolizidin-2-one ( $I^2AA$ ) qui a la capacité d'induire des repliements  $\beta$  de type II' lorsqu'il est incorporé dans des peptides. Cet acide aminé a été incorporé dans des peptides cycliques contenant des résidus d'acides aspartique et glutamique. Par une méthodologie de synthèse peptidique sur support solide, les *c*-[Asp- $I^2AA$ -Asp- $I^2AA$ ] (**5**), *c*-[Asp- $I^2AA$ -Glu- $I^2AA$ ] (**6**) et *c*-[Glu- $I^2AA$ -Glu- $I^2AA$ ] (**7**) ont été construits et leurs conformations respectives ont été étudiées dans l'eau et le DMSO par spectroscopie RMN  $^1H$ . Pour cela, des études de couplages scalaires (spectres COSY) et dipolaires (spectres NOESY) ont été effectuées, ainsi que la détermination des coefficients de température des protons amide.

Ces études effectuées par spectrométrie RMN  $^1\text{H}$  ont permis de déterminer que le peptide **5** adoptait une conformation où les résidus I<sup>2</sup>AA occupaient les positions  $i$  et  $i+1$  d'un repliement  $\beta$  décalé dans l'eau et le DMSO. Cette conformation a été retrouvée chez les peptides **6** et **7** lorsque les analyses étaient réalisées dans le DMSO.

Finalement, l'évaluation des constantes de dissociation des fonctions carboxyliques des peptides **5** et **7** a été effectuée par titrage potentiométrique. Dans le cas des deux peptides, une grande différence entre les pKa des fonctions carboxyliques a été observée, suggérant la présence d'une interaction entre celles-ci.

En développant une méthodologie de synthèse de ce type de peptides sur support solide, il serait envisageable de concevoir une série de mimétiques de sites actifs d'enzymes. La coopération entre les fonctions réactives serait assurée par la présence d'acides aminés rigidifiés qui positionneraient adéquatement les chaînes latérales.

## Table des matières

	Page
Sommaire	i
Table des matières	iii
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	xii
Liste des équations	xiii
Liste des abréviations et des sigles	xiv
<b>CHAPITRE 1: INTRODUCTION</b>	
1.1 LES ENZYMES.	1
1.1.1 Les protéases.	1
1.2 LES PROTÉASES ASPARTIQUES.	3
1.2.1 Mécanisme d'action des protéases aspartiques.	3
1.2.2 Mimétisme des protéases aspartiques.	4
1.2.3 Mimétique proposé.	10
Références.	15
<b>CHAPITRE 2: SYNTHÈSE SUR SUPPORT SOLIDE</b>	
2.1 SYNTHÈSE PEPTIDIQUE SUR SUPPORT SOLIDE.	17
2.2 STRATÉGIE ENVISAGÉE.	18
2.3 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 (Fmoc-I <sup>2</sup> AA-OH, (6 <i>S</i> )-14).	21

	Page
2.4 SYNTHÈSE DU (2 <i>S</i> ) <i>N</i> -(FMOC)-ASPARTATE DE $\alpha$ -ALLYLE (FMOC-Asp-OAllyl, 18a) ET DU (2 <i>S</i> ) <i>N</i> -(FMOC)-GLUTAMATE DE $\alpha$ -ALLYLE (FMOC-Glu-OAllyl, 18b).	24
2.5 SYNTHÈSE SUR SUPPORT SOLIDE DES <i>c</i> -[Asp-I <sup>2</sup> AA-Asp-I <sup>2</sup> AA], <i>c</i> -[Asp-I <sup>2</sup> AA-Glu-I <sup>2</sup> AA] ET <i>c</i> -[Glu-I <sup>2</sup> AA-Glu-I <sup>2</sup> AA].	26
2.5.1 Préparation du support solide.	26
2.5.2 Ancrage des acides aspartique et glutamique au support solide.	28
2.5.3 Synthèse des peptides linéaires: Fmoc-I <sup>2</sup> AA-Asp(O- <i>t</i> -Bu)-I <sup>2</sup> AA-Asp(O-Wang)O-Allyle, Fmoc-I <sup>2</sup> AA-Glu(O- <i>t</i> -Bu)-I <sup>2</sup> AA-Asp(O-Wang)O-Allyle et Fmoc-I <sup>2</sup> AA-Glu(O- <i>t</i> -Bu)-I <sup>2</sup> AA-Glu(O-Wang)O-Allyle.	29
2.5.4 Clivage des esters allyliques.	30
2.5.5 Cyclisation des tétrapeptides.	32
Références.	35
<b>CHAPITRE 3: ANALYSE CONFORMATIONNELLE DES <i>c</i>-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Asp-I<sup>2</sup>AA] (5), <i>c</i>-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Glu-I<sup>2</sup>AA] (6) ET <i>c</i>-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Glu-I<sup>2</sup>AA] (7)</b>	
3.1 CARACTÉRISATION DES PEPTIDES CYCLIQUES.	37
3.2 DÉTERMINATION DES ANGLES DIÈDRES.	46
3.3 DISTANCES INTERATOMIQUES.	49
3.4 INTERACTIONS AVEC L'ENVIRONNEMENT.	56
Références.	63

	Page
<b>CHAPITRE 4: CONSTANTES DE DISSOCIATION DES <i>c</i>-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Asp-I<sup>2</sup>AA] (5) et <i>c</i>-[Glu-I<sup>2</sup>AA-Glu-I<sup>2</sup>AA] (7).</b>	64
Références.	68
<b>CHAPITRE 5: CONCLUSION</b>	69
<b>CHAPITRE 6: PARTIE EXPÉRIMENTALE</b>	
6.1 GÉNÉRALITÉS.	71
6.2 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 (Fmoc-I <sup>2</sup> AA-OH).	
6.2.1 (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-carboxylate de méthyle ((6 <i>S</i> )-15).	72
6.2.2 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 ((6 <i>S</i> )-14).	73
6.3 SYNTHÈSE DU (2 <i>S</i> )- <i>N</i> -(Fmoc)-ASPARTATE DE $\alpha$ -ALLYLE (18a) ET DU (2 <i>S</i> )- <i>N</i> -(Fmoc)-GLUTAMATE DE $\alpha$ -ALLYLE (18b).	
6.3.1 (2 <i>S</i> )- <i>N</i> -(Fmoc)-Aspartate de $\alpha$ -allyle $\beta$ - <i>tert</i> -butyle (17a) et du (2 <i>S</i> )- <i>N</i> -(Fmoc)-glutamate de $\alpha$ -allyle $\gamma$ - <i>tert</i> -butyle (17b).	74
6.3.2 (2 <i>S</i> )- <i>N</i> -(Fmoc)-aspartate de $\alpha$ -allyle (18a) et (2 <i>S</i> )- <i>N</i> -(Fmoc)-glutamate de $\alpha$ -allyle (18b).	76



6.4	SYNTHÈSE SUR SUPPORT SOLIDES DES <i>c</i> -[Asp-I <sup>2</sup> AA-Asp-I <sup>2</sup> AA] (5), <i>c</i> -[Glu-I <sup>2</sup> AA-Asp-I <sup>2</sup> AA] (6) et <i>c</i> -[Glu-I <sup>2</sup> AA-Glu-I <sup>2</sup> AA] (7).	
6.4.1	Synthèse du 4-(bromométhyl)phénoxyéthylpolystyrène réticulé (21).	78
6.4.2	Ancrage du (2 <i>S</i> )- <i>N</i> -(Fmoc)-aspartate de α-allyle (18a) et du (2 <i>S</i> )- <i>N</i> -(Fmoc)-glutamate de α-allyle (18b) sur la résine (21).	78
6.4.3	Détermination du degré de substitution des résines 22a-b.	79
6.4.4	Synthèse des peptides linéaires Fmoc-I <sup>2</sup> AA-Asp(O- <i>t</i> -Bu)-I <sup>2</sup> AA-Asp(O-Wang)O-Allyle (25a), Fmoc-I <sup>2</sup> AA-Glu(O- <i>t</i> -Bu)-I <sup>2</sup> AA-Asp(O-Wang)O-Allyle (25b) et Fmoc-I <sup>2</sup> AA-Glu(O- <i>t</i> -Bu)-I <sup>2</sup> AA-Glu(O-Wang)O-Allyle (25c).	80
6.4.5	Préparation du tétrakistriphénylphosphine palladium.	81
6.4.6	<i>Cyclo</i> -[I <sup>2</sup> AA-Asp(OH)-I <sup>2</sup> AA-Asp(OH)] (5), <i>cyclo</i> -[I <sup>2</sup> AA-Glu(OH)-I <sup>2</sup> AA-Asp(OH)] (6) et <i>cyclo</i> -[I <sup>2</sup> AA-Glu(OH)-I <sup>2</sup> AA-Glu(OH)] (7).	81
6.5	TEST À LA NINHYDRINE (TEST DE KAISER) POUR LA DÉTERMINATION DE LA PRÉSENCE D'AMINES LIBRES SUR LE SUPPORT SOLIDE.	84
6.6	CONSTANTES DE DISSOCIATION DES <i>c</i> -[I <sup>2</sup> AA-Asp(OH)-I <sup>2</sup> AA-Asp(OH)] (5) et <i>c</i> -[I <sup>2</sup> AA-Glu(OH)-I <sup>2</sup> AA-Glu(OH)] (7).	85
	Références	86
	ANNEXES	xvi

## Liste des Figures

	Page
<b>Figure 1-2: Mécanisme d'action probable de l'hydrolyse des liens peptidiques catalysée par la pepsine.</b>	4
<b>Figure 2: Structure de la 2,3,4,5-tétrahydro-2-oxo-1,5-éthanobenzazépine 1.</b>	5
<b>Figure 3: Processus menant à la formation du produit selon l'état de protonation de acides dicarboxyliques.</b>	5
<b>Figure 4: Mécanisme menant à l'hydrolyse de l'amide 1 par des acides dicarboxyliques.</b>	7
<b>Figure 5: Étapes de l'hydrolyse du diacide amide 3.</b>	8
<b>Figure 6: Structure du <i>cyclo</i>-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Asp-I<sup>2</sup>AA] (5).</b>	10
<b>Figure 7: Peptides cycliques conçus pour le mimétisme du site actif des protéases aspartiques.</b>	13
<b>Figure 8: Schéma de protection orthogonale des acides aspartique et glutamique.</b>	20
<b>Figure 9: Structure de la résine de Wang.</b>	20

	Page
<b>Figure 10: Synthèse des (6<i>R</i>)- et (6<i>S</i>)-Boc-I<sup>2</sup>AA-OMe.</b>	21
<b>Figure 11: Préparation du (6<i>S</i>)-Fmoc-I<sup>2</sup>AA-OH ((6<i>S</i>)-14).</b>	22
<b>Figure 12: Synthèse alternative du Fmoc-I<sup>2</sup>AA-OH.</b>	23
<b>Figure 13: Préparation des Fmoc-Asp(OCs)-OAllyl (19a) et Fmoc-Glu(OCs)-OAllyl (19b).</b>	25
<b>Figure 14: Conversion de la résine de Wang en résine halogénée.</b>	26
<b>Figure 15: Spectres FTIR photoacoustique des résines.</b>	27
<b>Figure 16: Ancrage des acides aminés sur la résine.</b>	28
<b>Figure 17: Élongation aux térapeptides.</b>	29
<b>Figure 18: Clivage des esters allyliques.</b>	30
<b>Figure 19: Cyclisation des térapeptides.</b>	32
<b>Figure 20: Structures des agents de couplage utilisés pour la cyclisation.</b>	33
<b>Figure 21: Spectre COSY du peptide 5 dans 9:1 H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (6 mM, 600 MHz, 15 °C).</b>	39

	Page
<b>Figure 22:</b> Spectre COSY du peptide 5 dans le DMSO-d <sub>6</sub> ((6 mM, 600 MHz, 25 °C).	40
<b>Figure 23:</b> Spectre COSY du peptide 6 dans 9:1 H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O (6 mM, 600 MHz, 15 °C).	41
<b>Figure 24:</b> Spectre COSY du peptide 5 dans le DMSO-d <sub>6</sub> ((6 mM, 600 MHz, 25 °C).	42
<b>Figure 25:</b> Spectre COSY du peptide 7 dans 9:1 H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O (6 mM, 600 MHz, 15 °C).	43
<b>Figure 26:</b> Spectre COSY du peptide 7 dans le DMSO-d <sub>6</sub> ((6 mM, 600 MHz, 25 °C).	44
<b>Figure 27-1:</b> Conformations possibles du peptide 5.	45
<b>Figure 28:</b> Définition des angles dièdre d'une chaîne peptidique.	46
<b>Figure 29:</b> Couplages dipolaires significatifs observés dans les spectres NOESY du peptide 5 dans 9:1 H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O (6mM) à 15 °C et dans le DMSO-d <sub>6</sub> (6mM).	50
<b>Figure 30:</b> Spectre NOESY du peptide 5 dans 9:1 H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O (6mM, 600 MHz, 15 °C).	51

	Page
<b>Figure 31:</b> Spectre NOESY du peptide 5 dans le DMSO-d <sub>6</sub> (6mM, 600 MHz, 25 °C).	51
<b>Figure 32:</b> Couplages dipolaires significatifs observés dans les spectres NOESY du peptide 6 dans 9:1 H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O (6mM) à 15 °C et dans le DMSO-d <sub>6</sub> (6mM).	52
<b>Figure 33:</b> Spectre NOESY du peptide 6 dans 9:1 H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O (6mM, 600 MHz, 15 °C).	53
<b>Figure 34:</b> Spectre NOESY du peptide 6 dans le DMSO-d <sub>6</sub> (6mM, 600 MHz, 25 °C).	53
<b>Figure 35:</b> Couplages dipolaires significatifs observés dans les spectres NOESY du peptide 7 dans 9:1 H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O (6mM) à 15 °C et dans le DMSO-d <sub>6</sub> (6mM).	54
<b>Figure 36:</b> Spectre NOESY du peptide 7 dans 9:1 H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O (6mM, 600 MHz, 15 °C).	55
<b>Figure 37:</b> Spectre NOESY du peptide 7 dans le DMSO-d <sub>6</sub> (6mM, 600 MHz, 25 °C).	55
<b>Figure 38-1:</b> Coefficients de température $\Delta\delta/\Delta T$ des fonctions NH dans le DMSO.	56

- Figure 38-2:** Variation du déplacement chimique des protons amide des peptides 5-7 en fonction de la température dans 9:1 H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O. 57
- Figure 38-3:** Variation du déplacement chimique des protons amide des peptides 5-7 en fonction de la température dans le DMSO. 58
- Figure 39:** Ponts d'hydrogène observés chez les peptides cycliques 5-7 par l'étude des coefficients de température des protons amides dans l'eau et le DMSO. 60
- Figure 40:** Conformations et angles dièdres minimisés du peptide 5. 61
- Figure 41:** Structure et constantes de dissociation de l'acide maléique. 64

## Liste des Tableaux

	Page
<b>Tableau I:</b> Constantes de dissociation des acides dicarboxyliques utilisés comme modèles de la protéase aspartique.	6
<b>Tableau II:</b> Détermination des conditions de cyclisation de la résine 24b.	33
<b>Tableau III:</b> Caractérisation par spectrométrie de masse des peptides cycliques.	37
<b>Tableau IV:</b> Constantes de couplage vicinales $^3J_{\text{HN}\alpha}$ des peptides 5-7.	47
<b>Tableau V:</b> Valeurs des angles dièdres calculées à partir des constantes de couplage $^3J_{\text{HN}\alpha}$ (voir Tableau IV).	48
<b>Tableau VI:</b> Coefficients de température $\Delta\delta/\Delta T$ ( $10^{-3}$ ppm/K) des protons amides des peptides 5-7 dans 9:1 H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O.	59
<b>Tableau VII:</b> Coefficients de température $\Delta\delta/\Delta T$ ( $10^{-3}$ ppm/K) des protons amides des peptides 5-7 dans le DMSO.	59
<b>Tableau VIII:</b> Temps de rétention et masses obtenues par FABMS des peptides 5-7.	83
<b>Tableau IX:</b> Valeurs de pKa obtenus par le titrage potentiométrique des peptides 5 et 7.	83

## Liste des équations

	Page
<b>Équation 1: Équation de Karplus modifiée par Wütrich.</b>	46
<b>Équation 2: Détermination du nombre de protons installés pour chaque volume de base ajouté.</b>	66
<b>Équation 3: Détermination du degré de substitution de la résine.</b>	79



## Liste des abréviations et des sigles

<b>Ac</b>	acetyle
<b>Bn</b>	benzyle
<b>Boc</b>	<i>tert</i> -butyloxycarbonyle
<b>c</b>	cyclo
<b>COSY</b>	«correlation spectroscopy»
<b><math>\delta</math></b>	déplacement chimique
<b>d</b>	doublet
<b>DCM</b>	dichlorométhane
<b>dd</b>	doublet dédoublé
<b>2,4-DNPA</b>	acétate de 2,4-dinitrophényle
<b>DIEA</b>	diisopropyléthylamine
<b>DMF</b>	diméthylformamide
<b>DMSO</b>	diméthylsulfoxyde
<b>Et</b>	éthyle
<b>FABMS</b>	«fast atom bombardment mass spectrometry»
<b>Fmoc</b>	9-fluorénylméthoxycarbonyle
<b>Glu</b>	acide glutamique
<b>HPLC</b>	«high performance liquid chromatography»
<b>I<sup>2</sup>AA</b>	acide 2-oxo-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylique ou acide aminé indolizidin-9-one
<b>iPr</b>	isopropyle
<b><i>J</i></b>	constante de couplage scalaire
<b>k</b>	constante de vitesse
<b>m</b>	multiplet
<b>ms</b>	milliseconde

<b>M</b>	molaire
<b>Me</b>	méthyle
<b>N</b>	normal
<b>NaHMDS</b>	hexaméthylidisilazamidure de sodium
<b>NMM</b>	<i>N</i> -méthylmorpholine
<b>NMP</b>	<i>N</i> -méthylpyrrolidinone
<b>NOE</b>	«nuclear Overhauser effect»
<b>NOESY</b>	«nuclear Overhauser effect spectroscopy»
<b>PAB-BHA</b>	$\alpha$ -( <i>p</i> -chlorométhylphénylacétamido)benzyle copoly(styrène-1%-divinylbenzène)
<b>PhF</b>	9-(9-phénylfluorényle)
<i>p</i>	para
<b>ppb</b>	partie par milliards
<b>ppm</b>	partie par millions
<b>PyBOP</b>	(benzotriazol-1-yloxy)tris (pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate
<b>RMN</b>	résonance magnétique nucléaire
<b>s</b>	singulet
<b>SMHR</b>	spectrométrie de masse à haute résolution
<i>t</i>	« <i>tertiary</i> »
<b>t</b>	triplet
<b>TBTU</b>	2(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium tetrafluoroborate
<b>TFA</b>	acide trifluoroacétique
<b>THF</b>	tétrahydrofurane

# CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

## 1.1 LES ENZYMES.

Les enzymes sont des protéines qui catalysent des réactions avec une grande efficacité et une grande spécificité, et agissent en abaissant l'énergie d'activation requise pour obtenir la transformation. Les réactions catalysées par des enzymes sont en général  $10^3$  à  $10^7$  fois plus rapides que les réactions non-catalysées correspondantes<sup>1</sup>. Les enzymes ont une spécificité remarquable pour leurs substrats, mais surtout pour la nature de la réaction catalysée.

### 1.1.1 Les protéases.

Les protéases sont une classe d'enzymes dont la fonction est d'hydrolyser les liens peptidiques<sup>2a</sup>. Les différentes protéases sont divisées en quatre catégories: les protéases à sérine, à cystéine, à zinc et les protéases aspartiques. Celles-ci diffèrent par la nature des acides aminés présents dans leur site actif et par leur mécanisme d'action. Les exopeptidases catalysent l'hydrolyse du lien amide d'un acide aminé en position terminale d'une chaîne peptidique alors que les endopeptidases catalysent l'hydrolyse d'un lien amide interne<sup>2b</sup>.

Les protéases à sérine sont des endopeptidases dont le site actif est constitué d'une triade catalytique contenant une histidine, une sérine et un acide aspartique<sup>3</sup>. Ces enzymes sont actives à pH neutre, et leur mécanisme d'action est bien défini. La trypsine et la chymotrypsine sont des exemples de protéases à sérine issues du pancréas. L'hydrolyse des liens amides catalysée par ces protéases implique un

intermédiaire de l'enzyme acylée où la fonction hydroxyle de la sérine est acylée par le substrat; l'acide aspartique et l'histidine agissent en tant qu'acide et base généraux respectivement<sup>4</sup>.

Les protéases à cystéine<sup>2a</sup> sont également des endopeptidases dont l'activité optimale est atteinte à pH 6. Ces enzymes sont issues de certains fruits tels la papaye (papaïne) et le kiwi (actinidine), de bactéries et de mammifères (cathepsines B1 et B2). Les liens amides sont hydrolysés par ces protéases selon un mécanisme similaire à celui des protéases à sérine, mais c'est le thiol d'une cystéine, assistée par une histidine, qui est cette fois acylée<sup>5</sup> par le substrat.

Les protéases à zinc<sup>2a</sup> sont des métalloprotéases, dont la plus étudiée est l'enzyme de digestion pancréatique bovine carboxypeptidase A. C'est une exopeptidase dont le site actif est composé d'un acide glutamique et deux histidines. Un ion de zinc(II) lié aux chaînes latérales des trois acides aminés coordonne la fonction carbonyle du lien amide à hydrolyser, qui est attaqué par une molécule d'eau<sup>6</sup>.

Finalement, les protéases aspartiques ou protéases acides sont des endopeptidases dont l'activité optimale est atteinte à bas pH (<4)<sup>2</sup>. Elles sont largement utilisées dans la préparation de produits fermentés issus du riz ou du lait<sup>7</sup>. Chez les mammifères ces protéases agissent en tant qu'enzymes de digestion (pepsine) ainsi qu'au niveau de la régulation de la pression artérielle (rénine). Leur mécanisme d'action sera présenté en détail à la prochaine section.

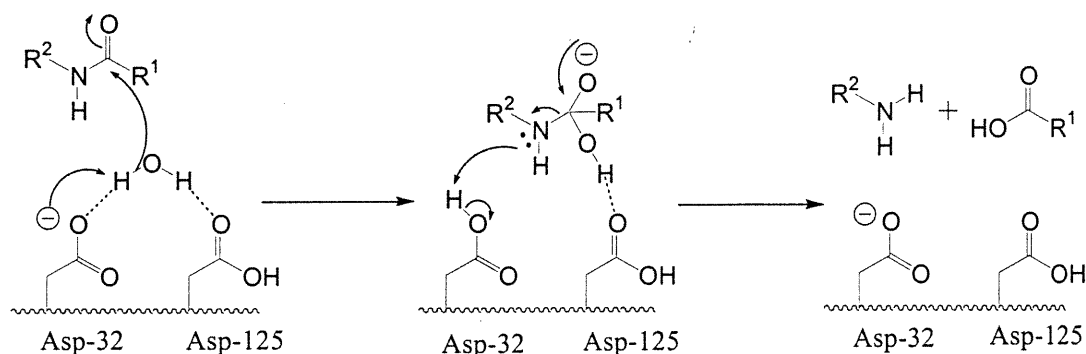
## 1.2 LES PROTÉASES ASPARTIQUES.

La protéase aspartique la mieux connue est la pepsine qui est une enzyme issue des cellules de la muqueuse digestive. D'autres exemples de cette enzyme chez les mammifères sont la cathepsine D isolée des lysosomes de plusieurs cellules et la rénine qui est la première enzyme dans la cascade de conversion de l'angiotensine. Cette enzyme est également présente chez les virus, notamment la protéase du VIH. Toutes ces protéases possèdent une homologie structurale (~30% de la protéine) et une diade catalytique de deux acides aspartiques, dont l'un est sous la forme acide et l'autre sous la forme basique.

### 1.2.1 Mécanisme d'action des protéases aspartiques.

Des études de l'influence du pH sur les paramètres cinétiques d'hydrolyse par la pepsine<sup>8</sup> ont démontré que Asp-32 possède un pKa de 1.1, alors que celui de Asp-215 est de 4.5. Les structures cristallines de cette protéase ont aussi montré que les deux fonctions carboxyliques de la chaîne latérale forment un pont d'hydrogène à l'état solide.

L'implication des deux fonctions carboxyliques au site actif de ces protéases a d'abord suggéré qu'une attaque nucléophile de l'un des deux acides aspartiques avait lieu, avec la formation d'un intermédiaire acyl-enzyme entre l'aspartate et le carbonyle du lien amide à briser. Pourtant un intermédiaire de la sorte n'a jamais été observé<sup>9</sup>, la croyance générale à ce jour est que l'hydrolyse procède selon une catalyse d'acide/base générale décrite à la Figure 1:



**Figure 1: Mécanisme d'action probable de l'hydrolyse des liens peptidiques catalysée par la pepsine<sup>10</sup>.**

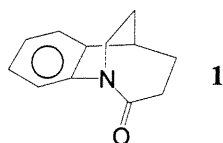
Une molécule d'eau est retenue dans le site actif par des ponts hydrogène avec l'acide aspartique-32 et l'aspartate-125. Asp-32 agit en tant que base générale en déprotonant la molécule d'eau, conduisant à un intermédiaire tétraédrique qui se décompose rapidement en deux chaînes peptidiques, l'une aminée et l'autre carboxylée.

### 1.2.2. Mimétisme des protéases aspartiques

L'étude détaillée des propriétés et du mécanisme d'action des enzymes permet de développer de nouveaux catalyseurs afin de reproduire leur activité<sup>11</sup>. Ces catalyseurs pourraient être plus stables que des protéines aux conditions réactionnelles et distinguer des substrats non-naturels. Un mimétique de la protéase aspartique serait entre autre utile pour catalyser des réactions d'hydrolyse des liens amide, qui nécessite des conditions très rigoureuses.

Deux exemples de modèles de protéases aspartiques sont rapportés dans la littérature. Le premier modèle, proposé par Somayaji et Brown<sup>12</sup>, est basé sur des

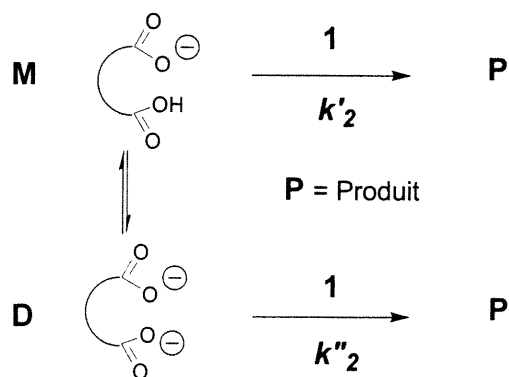
études réalisées sur l'amide tendu **1**, qui possède une réactivité élevée envers les attaques nucléophiles par rapport aux amides normaux.



**Figure 2: Structure de la 2,3,4,5-tétrahydro-2-oxo-1,5-éthanobenzazépine **1**<sup>13</sup>.**

Cette réactivité élevée de l'amide tendue **1** est essentiellement due à la distorsion du lien amide d'environ  $30^\circ$ , qui pyramidalise l'azote et empêche la délocalisation du doublet d'électrons libre dans le système  $\pi$  du carbonyle. Les modèles de la protéase aspartique proposés sont des acides dicarboxyliques possédant deux valeurs distinctes de pKa pour leurs fonctions carboxyliques tels les acides malonique, succinique, glutarique et cyclopropane-1,2-dicarboxylique (Tableau I).

Les études ont été effectuées en fonction du pH pour obtenir les constantes de vitesse de l'hydrolyse de **1** par les formes monoprotonnées (**M**) et déprotonées (**D**) des acides dicarboxyliques (Figure 3).



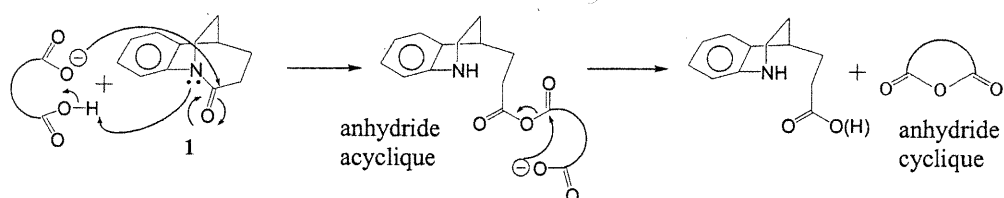
**Figure 3: Processus menant à la formation du produit selon l'état de protonation de acides dicarboxyliques.**

Acid dicarboxylique	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>	$k_2'$ (x 10 <sup>-3</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_2''$ (x 10 <sup>-3</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
malonique	2.55	5.10	non-observée	non-observée
succinique	4.05	5.25	272	0.418
glutarique	3.98	4.97	258	14.2
<i>cis</i> -cyclopropane-1,2- dicarboxylique	3.10	5.84	122	9.75
<i>trans</i> -cyclopropane-1,2- dicarboxylique	3.39	4.58	non-observée	non-observée

**Tableau I: Constantes de dissociation des acides dicarboxyliques utilisés comme modèles de la protéase aspartique<sup>13</sup>.**

Les vitesses de disparition de l'amide **1** catalysée par les acides dicarboxyliques cités suggèrent que les acides succinique, glutarique et *cis*-cyclopropane-1,2-dicarboxylique qui permettent la formation d'anhydride cyclique sont capables à promouvoir l'hydrolyse du lien amide (Figure 4). Les constantes de vitesses  $k_2'$  et  $k_2''$  de ces acides dicarboxyliques (Tableau I) suggèrent que l'hydrolyse de **I** est beaucoup plus rapide lorsqu'ils sont sous la forme monoprotinée que déprotonée, d'où l'importance de la différence des pKa des fonctions carboxyliques.





**Figure 4: Mécanisme menant à l'hydrolyse de l'amide **1** par des acides dicarboxyliques.**

Selon le mécanisme proposé, le lien amide de **1** subit une attaque nucléophile par un carboxylate pour générer un anhydride acyclique qui, en présence d'une deuxième fonction carboxylique mène à la formation du produit d'hydrolyse et à l'anhydride cyclique correspondant à l'acide dicarboxylique de départ. Le mécanisme a été confirmé par des études de FTIR d'une solution de 0.1 M de l'amide **1** contenant 1 équivalent des sels de triéthylammonium des acides dicarboxyliques (sous la forme **M**) dans l'acétonitrile. Pour chaque diacide, une augmentation de l'intensité de la bande de vibration du lien C=O de l'anhydride cyclique est observée jumelée à une diminution de celle du lien C=O de l'amide.

Un deuxième modèle, proposé par Menger et Ladika,<sup>14</sup> est basé sur le triacide de Kemp<sup>15</sup> (**2**) dont les trois fonctions carboxyliques occupent la position axiale du cycle<sup>16</sup> (Figure 5). Les résultats de modélisation moléculaire ont montré que le conformère de plus basse énergie du diacide amide **4** possède un atome d'oxygène de la fonction hydroxyle de l'acide à 2.8 Å du carbonyle de l'amide et à un angle d'attaque de 105°, angle d'attaque idéal de Dunitz<sup>17</sup>. Ce positionnement spatial des centres réactifs a mené à l'hypothèse que l'hydrolyse devrait procéder à des vitesses accrues. Effectivement, une hydrolyse rapide de l'amide est observée entre pH 2 et 6 selon les étapes suivantes:

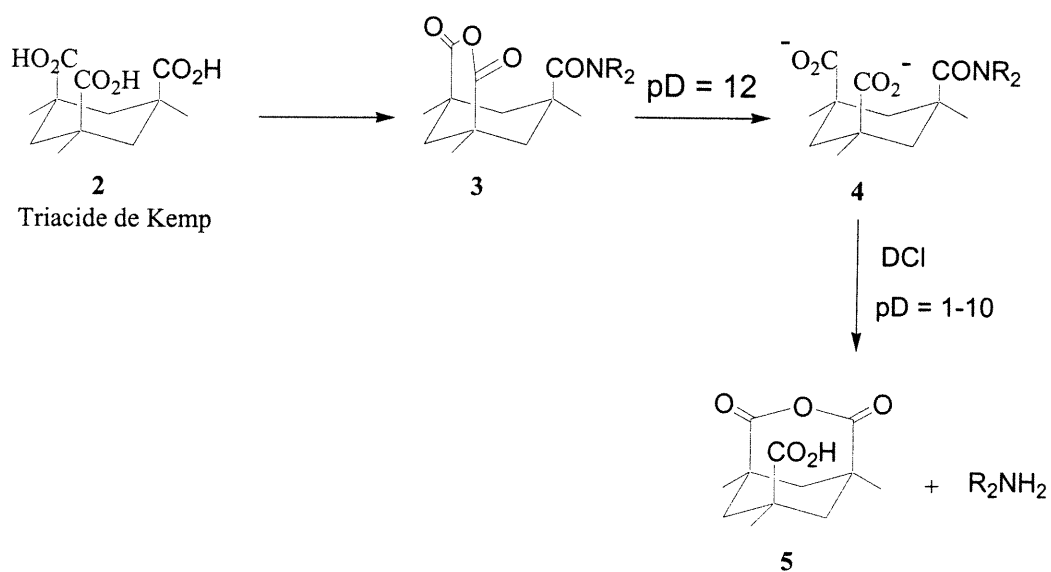


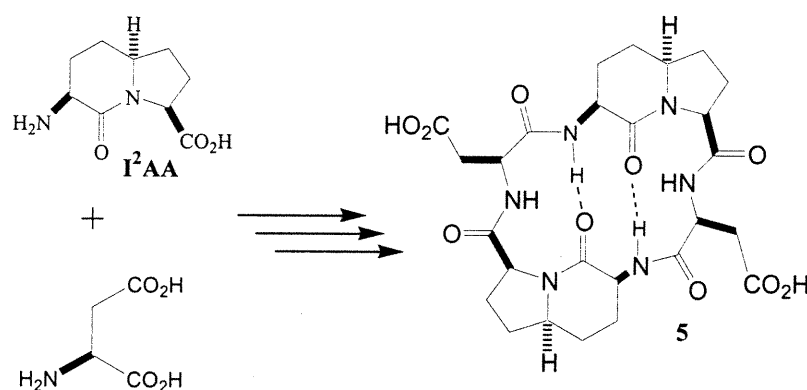
Figure 5: Étapes de l'hydrolyse du diacide amide **4**.

D'après ces deux exemples, il est possible d'envisager un modèle du site actif des protéases aspartiques contenant deux fonctions carboxyliques qui seraient liées à un squelette rigide afin d'assurer leur proximité. Cette proximité des deux fonctions acides permettra d'obtenir un environnement semblable à celui d'un acide dicarboxylique pour lequel les deux carboxylates auraient des valeurs de pKa distinctes. Cette hypothèse est basée sur les effets électrostatiques impliqués dans l'ionisation d'un acide dicarboxylique symétrique<sup>18</sup>. Lors de l'ionisation de la première fonction acide, la perte du proton se produit contre la force électrostatique engendrée par la charge négative créée sur le carboxylate. L'ionisation du deuxième proton acide s'effectue non seulement contre une force électrostatique similaire sur le deuxième carboxylate mais aussi contre celle générée par la charge négative sur le premier carboxylate. La constante d'ionisation de la deuxième fonction acide est alors plus faible, donc le pKa est plus élevé.

De nombreuses enzymes possèdent des acides aminés dont les pKa sont modifiés. La mandélate racémase est une enzyme qui catalyse la conversion des acides *R*- ou *S*-mandéliques à un mélange racémique<sup>19</sup>. Les acides aminés du site actif impliqués directement dans le mécanisme sont une lysine 166 et une histidine. L'enzyme est active à pH 7 et requiert que la fonction amine en position  $\epsilon$  de la lysine soit libre. Pourtant, à ce pH, la fonction amine de la chaîne latérale de la lysine devrait être protonée (pKa = 10.5). La détermination du pKa de cette lysine au sein du site actif de la mandélate racémase a montré que la valeur est abaissée à 6<sup>19</sup>. L'observation de la structure cristalline de cette enzyme montre une deuxième lysine 164 située à proximité de la lysine 166 qui possède un groupe ammonium en position  $\epsilon$ <sup>20</sup>. Ce groupe ammonium produit un effet électrostatique élevé qui est responsable de l'abaissement du pKa de la lysine 166.

### 1.2.3 Mimétisme proposé.

Au cours de travaux réalisés sur le mimétisme des protéases aspartiques effectués par Thouin et Lubell<sup>21</sup>, le *cyclo*-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Asp-I<sup>2</sup>AA] (**5**) a été synthétisé en solution et sur support solide. Ce peptide incorpore deux acides aspartiques qui possèdent deux fonctions carboxyliques sur leur chaîne latérale ainsi que deux acides 2-aminoindolizidin-9-one (I<sup>2</sup>AA)<sup>22</sup> qui pourraient stabiliser des repliements  $\beta$  de type II' lorsqu'ils sont incorporés dans des peptides<sup>23</sup>.



**Figure 6: Structure du *cyclo*-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Asp-I<sup>2</sup>AA] (**5**).**

La première synthèse du peptide **5** a été effectuée en solution selon une voie convergente, où le dipeptide I<sup>2</sup>AA-Asp est dimérisé puis cyclisé. Les fonctions amines étaient protégées via des carbamates Boc, et les fonctions acides de l'acide aspartique étaient converties en ester allylique pour la position  $\alpha$  et en ester benzylique en position  $\beta$ . Cette méthodologie a permis d'obtenir le peptide cyclique avec rendement global de 10% à partir du TFA·H<sub>2</sub>N-Asp(OBn)-OAllyl et du Boc-I<sup>2</sup>AA-OH. Bien que le peptide cyclique ait été obtenu avec succès, cette voie de synthèse a été coûteuse en terme de temps. De plus, chaque étape nécessitait une purification par chromatographie sur colonne.

Une deuxième synthèse, sur support solide, a par la suite été réalisée afin d'accéder une librairie de dérivés du peptide **5**, par modification de la nature de l'acide aminoindolizidinone et de l'acide aminé portant le carboxylate sur la chaîne latérale. Lorsque la synthèse était accomplie sur la résine PAB-BHA [ $\alpha$ -(*p*-chlorométhylphénylacétamido)benzyle copoly(styrène-1%-divinylbenzène)], le rendement global a été amélioré à 25% basé sur le degré de substitution initial.

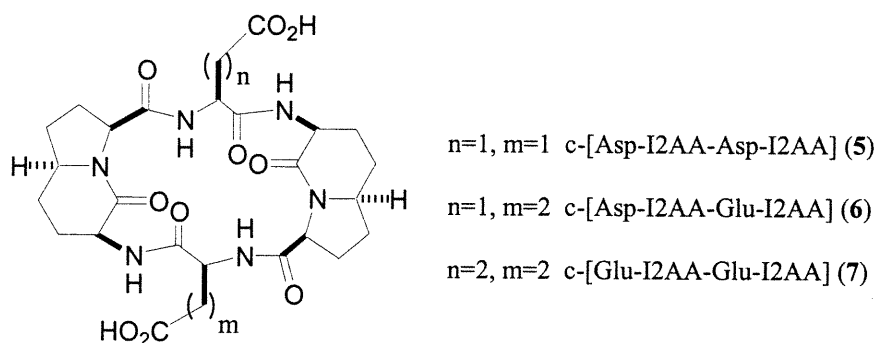
L'analyse par RMN  $^1\text{H}$  du peptide cyclique **5** a été effectuée dans un mélange 9:1  $\text{H}_2\text{O}$ :acétone- $\text{d}_6$  (pH=3.5). Seuls deux protons amides sont observés sur le spectre à cause de la symétrie  $\text{C}_2$  de la molécule. Grâce aux spectres d'effets nucléaires de Overhauser à deux dimensions (NOESY), un couplage dipolaire important a été observé entre les deux protons amides. Les expériences de coefficient de température, soit l'influence de la température sur le déplacement chimique des protons amides, ont démontré que les protons amides des  $\text{I}^2\text{AA}$  participent dans des ponts hydrogène intramoléculaires. Les résultats obtenus par NOE et les coefficients de température ont permis d'assigner la conformation adoptée par le peptide, dans laquelle les  $\text{I}^2\text{AA}$  occupent les positions  $i$  et  $i+1$  du tour  $\beta$ , avec deux ponts hydrogène intramoléculaires de dix membres impliquant les protons amides des  $\text{I}^2\text{AA}$ .

Les constantes de dissociation du *cyclo*-[Asp- $\text{I}^2\text{AA}$ -Asp- $\text{I}^2\text{AA}$ ] (**5**) ont été déterminées par titrage potentiométrique avec une solution de NaOH. Les valeurs trouvées étaient de 3.2 ( $\text{pK}_{\text{a}1}$ ) et 6.9 ( $\text{pK}_{\text{a}2}$ ). Le carboxylate de la chaîne latérale de l'acide aspartique possède un  $\text{pK}_{\text{a}}$  de 4.0. Ceci démontre la proximité et l'interaction des deux fonctions carboxyliques, assurée par la présence des  $\text{I}^2\text{AA}$  qui contraignent la rigidité du cycle. Le *cyclo*-[Asp- $\text{I}^2\text{AA}$ -Asp- $\text{I}^2\text{AA}$ ] (**5**) existe dans les conditions de l'analyse conformationnelle dans un état monoprotiné, où un proton est retenu entre les deux fonctions carboxyliques par un pont hydrogène<sup>21</sup>.

L'activité catalytique du *cyclo*-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Asp-I<sup>2</sup>AA] (**5**) a été évaluée sur l'hydrolyse du *p*-nitrophenylacétate (2,4-DNPA). L'expérience consistait à tester le peptide cyclique **5** en tant que catalyseur de l'hydrolyse du 2,4-DNPA, à pH 3, 4, 5 et 7. L'absorbance à la longueur d'onde de 410 nm résultant de la formation du *p*-nitrophénol était observée quand une solution contenant le peptide **5** a été traitée avec le 2,4-DNPA. Une légère augmentation de l'absorbance a été observée à chaque pH, mais celle-ci était comparable à l'augmentation enregistrée pour les solutions de contrôle sans peptide aux pH correspondants. Ceci démontrait l'inaptitude du *cyclo*-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Asp-I<sup>2</sup>AA] à agir en tant que catalyseur de l'hydrolyse du 2,4-DNPA.

Malgré l'inefficacité de ce peptide à catalyser l'hydrolyse du 2,4-DNPA, il serait possible d'observer de la catalyse sur d'autres modèles, notamment sur l'amide tendu **1**. De plus en modifiant les acides aminés du peptide cyclique, de nouveaux candidats catalytiques peuvent être synthétisés et testés. Pour cela, une nouvelle stratégie de synthèse est envisagée pour permettre l'obtention de divers analogues du *cyclo*-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Asp-I<sup>2</sup>AA]. La synthèse sur support solide demeure la voie choisie puisqu'elle permettra la construction d'une bibliothèque de peptides cycliques pouvant agir comme mimétiques du site actif des protéases aspartiques.

Les buts de ce projet sont la synthèse, l'analyse conformationnelle et la détermination des pKa des *cyclo*-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Asp-I<sup>2</sup>AA] (5, p 11), *cyclo*-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Glu-I<sup>2</sup>AA] (6) et *cyclo*-[Glu-I<sup>2</sup>AA-Glu-I<sup>2</sup>AA] (7). La construction de ces cibles sera effectuée par la synthèse sur support solide.



**Figure 7: Peptides cycliques conçus pour le mimétisme du site actif des protéases aspartiques.**

Selon le titrage de pKa des fonctions carboxyliques du *c*-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Asp-I<sup>2</sup>AA] (5) par Thouin<sup>21</sup>, ce peptide serait sous la forme monoprotinée dans les expériences d'activité hydrolytique, où un proton serait retenu entre les deux fonctions carboxyliques par un pont salin. L'inactivité du *c*-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Asp-I<sup>2</sup>AA] (5) face à la catalyse de l'hydrolyse d'esters actifs pourrait ainsi être associée à la présence de ce pont salin. L'introduction de l'acide glutamique dans le peptide permet de varier la longueur de la ou des deux chaîne(s) latérale(s), ce qui modifiera la distance entre les carboxylates, et pourrait donc briser le pont salin. Cette modification affectera aussi les interactions électrostatiques entre les fonctions carboxylique, ce qui devrait modifier les valeurs de pKa des fonctions.

Les conformations adoptées par chaque peptide seront déterminées par des expériences de RMN <sup>1</sup>H et de NOE et les constantes de dissociation seront évaluées

par titrage potentiométrique. Un changement de conformation des peptides serait envisageable lorsqu'un puis deux des acides aspartiques sont remplacés par des acides glutamiques. En effet, l'acide aspartique (ainsi que l'asparagine) est connu pour son aptitude à participer dans des ponts hydrogène impliquant le carboxylate de la chaîne latérale et l'amide du squelette peptidique.<sup>25</sup>

En supposant que c'est ce type d'interactions qui force l'acide aminé indolizidinone à occuper les positions  $i$  et  $i+1$  du tour  $\beta$  dans le peptide **5**, l'introduction de l'acide glutamique pourrait déstabiliser cette conformation et en favoriser une nouvelle.



1. Moran, L. A.; Scrimgeour, K. G.; Horton, R. H.; Ochs, R. S.; Rawn, J. D. *Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> Edition, Neil Patterson Publishers: New Jersey, **1994**, p 6.1.
2. a) Ref 1, p 4.18. b) Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W. *Fundamentals of Biochemistry*, John Wiley & Sons: New York, **1999**, p108-112.
3. Fersht, A. *Enzyme Structure and Mechanism*, 2<sup>nd</sup> Edition, W. H. Freeman: New York, **1985**.
4. Hahn, K. W.; Klis, W. A.; Stewart, J. M. *Science* **1990**, *248*, 1544.
5. Brown R. S.; Keillor, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7983.
6. Lee, K. J.; Kim, D. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *6*, 1613.
7. Hsu, I-N.; Delbaere, L. T. J.; James, M. N. J.; Hofmann, T. *Nature* **1977**, 140.
8. Ref 1, p 13.13.
9. (a) Hofmann, T.; Fink, A. L. *Biochemistry* **1984**, *23*, 5247. (b) Dunn, B. M.; Fink, A. L. *Biochemistry* **1984**, *23*, 5231.
10. Ref 3.
11. Kirby, A. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 707.
12. Somayaji, V.; Keillor, J. W.; Brown, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2625.
13. Somayaji, V.; Brown, R. S. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2676.
14. Menger, F. M.; Ladika, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6794.
15. Kemp, D.S.; Petrakis, K. S. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 5140.

16. Rebek, J., Jr.; Marshall, L.; Wolak, R.; Parris, K.; Killoran, M.; Askew, B.; Nemeth, D.; Islam, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7476.
17. Dunitz, J. D. *X-ray Analysis and the Structure of Organic Molecules*, Cornell University Press: Ithaca, NY, **1979**.
18. (a) Kirkwood, J. G.; Westheimer, F. H. *J. Chem. Phys.* **1938**, *6*, 506. (b) Westheimer, F. H.; Kirkwood, J. G. *J. Chem. Phys.* **1938**, *6*, 513.
19. Powers, V. M.; Koo, C. W.; Kenyon, G. L.; Gerlt, J. A.; Kozarch, J. W. *Biochemistry* **1991**, *30*, 9255.
20. Westheimer, F. W. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 3.
21. Thouin, E.; Lubell, W. D. Mémoire de Maîtrise: Nouveau Mimétisme du Site Actif des Protéases Aspartiques: Conception, Synthèse et Caractérisation du *cyclo*-[IAA-Asp-IAA-Asp], Université de Montréal, **1996**.
22. Lombart, H.-G.; Lubell, W.D. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9437.
23. Roy, S.; Lubell, W. D. Mémoire de Maîtrise: Synthèse et analyse conformationnelle d'analogues de la Gramicidine S comportant des acides aminés indolizidinone, Université de Montréal, **2001**.
24. Albert, A.; Serjeant, E.P. *Ionization Constants of Acids and Bases*, Wiley: New York, **1962**, p 52.
25. a) Abbadi, A.; Mcharfi, M.; Aubry, A.; Premilat, S.; Boussard, G.; Marraud, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2729. b) Marraud, M.; Aubry, A. *Biopolymers* **1996**, *40*, 45.

## CHAPITRE 2: SYNTHÈSE SUR SUPPORT SOLIDE

### 2.1 SYNTHÈSE PEPTIDIQUE SUR SUPPORT SOLIDE.

La synthèse de peptides sur support solide consiste en l'utilisation d'une résine insoluble (polymère) sur lequel le premier acide aminé est lié de manière covalente, suivi de l'élongation du peptide. En général, le premier acide aminé est lié à partir de sa fonction carboxylique, et la fonction amine terminale doit être protégée puis déprotégée à chaque cycle de couplage. La fonction carboxylique de l'acide aminé à coupler doit au préalable être activée afin de former le lien peptidique. Lorsque le peptide désiré est assemblé, celui-ci peut être clivé de la matrice polymérique et libéré en solution.

Les avantages de cette méthodologie par rapport à la synthèse de peptides en solution sont le haut rendement total et la rapidité avec laquelle

le peptide est construit<sup>1</sup>. Suite à l'ancrage du premier acide aminé sur une résine, la synthèse est effectuée par des séquences de déprotection et de couplage entre lesquelles la résine est simplement lavée avec des solvants appropriés pour éliminer l'excès de réactifs utilisés et les sous-produits solubles. Après chaque couplage, un test à la ninhydrine (test de Kaiser<sup>2</sup>) est réalisé afin de vérifier l'intégralité de la réaction. Si cette dernière n'est pas complète, il suffit de retraiter la résine avec un excès d'acide aminé à coupler ou alors acétyler les amines libres n'ayant pas réagi. Le peptide ne doit pas être purifié après chaque étape de couplage et les risques de pertes de produit sont éliminés puisqu'aucun transfert n'est requis et le peptide demeure attaché à la résine tout au long de la séquence.

Il existe un grand nombre de résines applicables à la synthèse peptidique. La majorité d'entre elles résultent en la fonctionalisation de la résine de Merrifield.

Cette dernière est obtenue par alkylation du polystyrène réticulé avec du chlorométhyle méthyle ether, en présence d'un acide de Lewis<sup>1</sup>. Le choix de la résine dépend du type de chimie envisagé et de la protection des acides aminés<sup>3</sup>. Une stratégie basée sur la protection des amines par le groupement Boc (*t*-butoxycarbonyl), qui est clivé par traitement avec de l'acide trifluoroacétique, nécessite une résine qui soit stable en conditions acides. Par contre, lorsque la protection désirée est avec le groupe Fmoc (9-fluorénylméthoxycarbonyl), la résine devra être stable en conditions basiques.

## 2.2 STRATÉGIE ENVISAGÉE.

La cyclisation de *N*- à *C*- terminal d'un peptide lié à un support solide par sa chaîne latérale offre des avantages par rapport à une cyclisation en solution à haute dilution. Par exemple, la formation du macrocycle devrait être plus efficace puisque le risque d'oligomérisation est minime. Cette méthode induit des conditions de pseudo-dilution qui favorisent les réactions intramoléculaires par rapport aux sous-réactions intermoléculaires<sup>4</sup>.

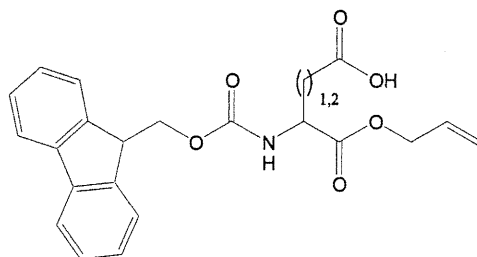
Il existe plusieurs exemples de stratégies orthogonales pour la synthèse de peptides cycliques via l'ancrage d'acides aspartique ou glutamique par leur chaîne latérale à des résines hydroxyméthyle ou aminométhyle<sup>5</sup>. Un système est dit orthogonal lorsqu'il comporte des familles de groupes protecteurs indépendantes, où chaque famille peut être enlevée sélectivement en présence des autres<sup>6</sup>. Les conditions de déprotection dans un système orthogonal sont en général plus douces que dans un système basé sur une labilité graduelle envers un type de réactif. La sélectivité est ainsi basée sur des différences chimiques et non sur des différences de vitesses de réaction.

La stratégie utilisée par Thouin pour la synthèse du  $c$ -[Asp-I<sup>2</sup>AA-Asp-I<sup>2</sup>AA] (**5**) impliquait la synthèse de l'acide (2*S*)-*N*-(Boc)aspartique- $\alpha$ -allyl ester via la protection de la fonction amine de l'acide aspartique par un groupe Boc, la formation d'oxazolidinone entre l'amine et l'acide en position  $\alpha$  puis son ouverture nucléophile avec l'allyloate de sodium. Cette dernière étape avait lieu avec un faible rendement (36%) et la détermination de la pureté énantiomérique de l'ester final démontrait la présence de 8% de racémisation. Afin d'augmenter le rendement global de la protection des acides aspartique et glutamique et empêcher la racémisation du centre  $\alpha$ , les (2*S*)-*N*-(Fmoc)-aspartate de  $\beta$ -*tert*-butyle et (2*S*)-*N*-(Fmoc)-glutamate de  $\gamma$ -*tert*-butyle seront utilisés comme produits de départ pour éviter la formation d'oxazolidinone. Leur fonction carboxylique en position  $\alpha$  sera estérifiée en présence d'iodure allylique et de DIEA qui, en tant que base tertiaire encombrée, ne pourra pas déprotomer le proton  $\alpha$ .

La résine utilisée pour la synthèse du peptide **5** par Thouin était la résine de Merrifield. Lorsque le peptide était construit, celui-ci était libéré en solution par traitement avec du HF liquide. Ce clivage nécessitait une installation spéciale à cause de la réactivité et la toxicité élevée de ce réactif. Il n'était donc pas envisageable de réutiliser une méthodologie qui ne pourrait être employée en synthèse combinatoire.

Pour ces raisons, une nouvelle stratégie a été utilisée qui consiste en l'utilisation d'acides aminés protégés avec des groupements Fmoc au lieu de Boc et une résine labile au TFA, soit la résine de Wang.

Le groupement Fmoc est choisi pour la protection des fonctions amine pour sa stabilité exceptionnelle envers les acides, sa déprotection rapide non-hydrolytique par des amines simples et la génération d'amines déprotégées sous forme de base libre<sup>7</sup>. La protection de la fonction acide est réalisée avec un groupement allylique qui peut être clivé sous conditions neutres avec du Pd<sup>0</sup>(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub><sup>8</sup> sans enlèvement du groupe Fmoc (Figure 8), d'où l'appellation protection orthogonale.



**Figure 8: Schéma de protection orthogonale des acides aspartique et glutamique.**

La stratégie de synthèse implique l'utilisation de la résine de Wang, soit le 4-(hydroxyméthyl)phénoxy-méthyle polystyrène (Figure 9):

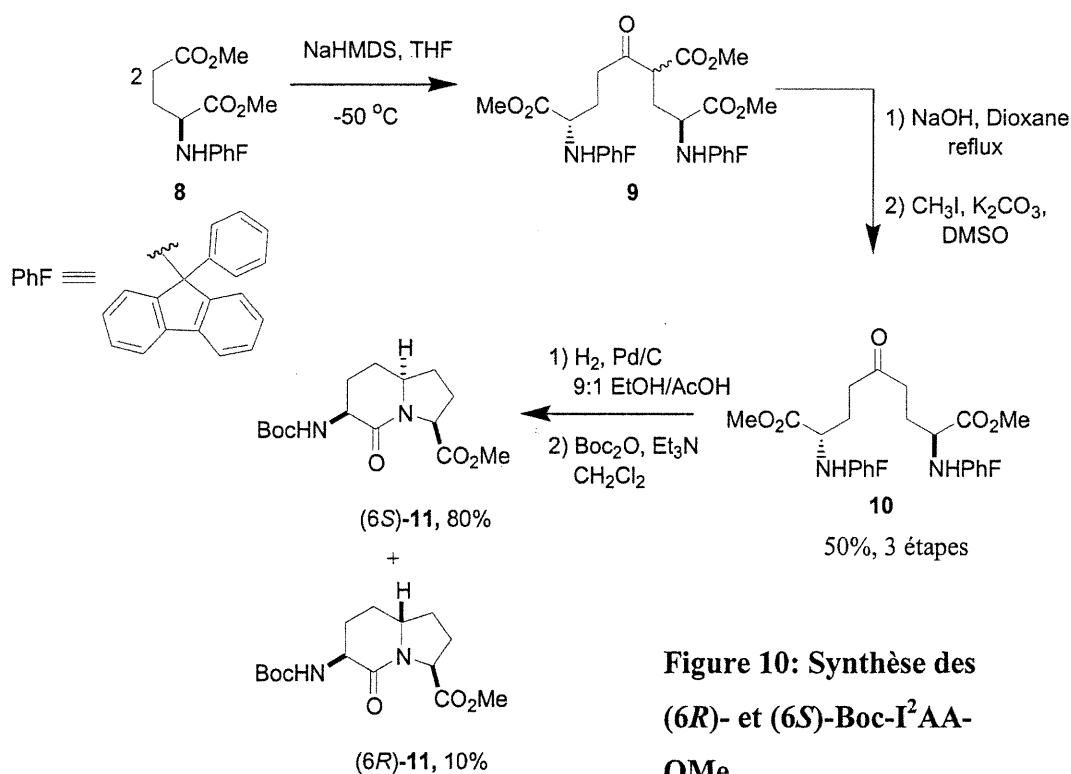


**Figure 9: Structure de la résine de Wang.**

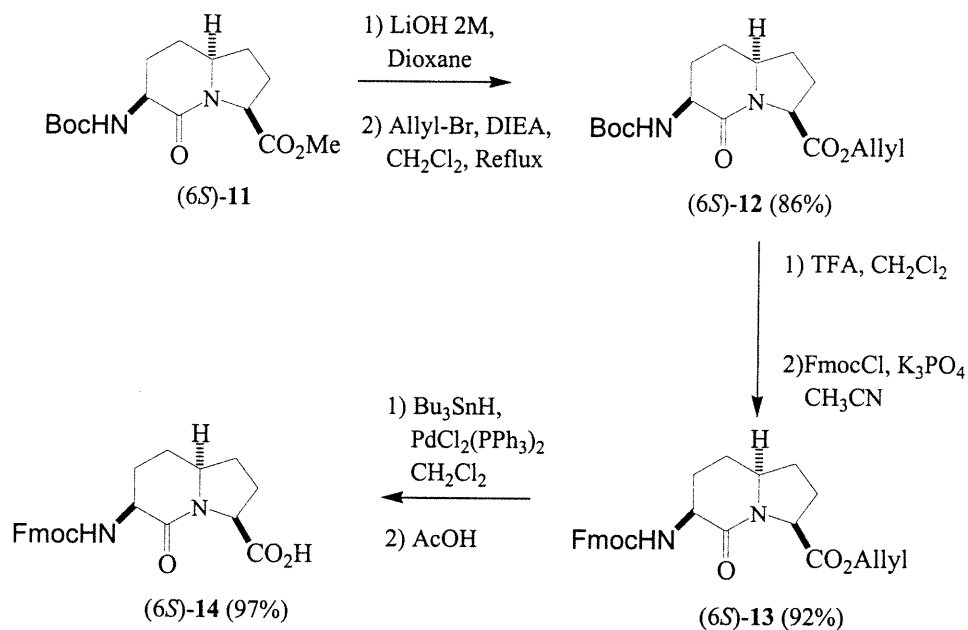
La fonction alcool de la résine permet l'attachement de l'aspartate ou glutamate par formation d'un lien ester avec leur groupement acide en oméga. Pour cela, la fonction hydroxyle de la résine de Wang sera convertie en bromure par traitement avec de la triphénylphosphine et du tétrabromure de carbone<sup>9</sup>. Les fonctions carboxylates en oméga seront converties en sel de césium en réagissant les aspartates et glutamates avec du bicarbonate de césium. Les sels de césium générés seront finalement utilisés pour déplacer les bromures de la résine afin d'obtenir les  $\omega$ -esters correspondants. La spectroscopie FTIR photoacoustique (PA-FTIR) a été utilisée pour vérifier la conversion de la fonction alcool de la résine de Wang en bromure, ainsi que la formation du lien ester avec les acides aspartiques et glutamiques. Les acides aminés ou peptides peuvent ensuite être clivés de la résine par traitement avec 50% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

### 2.3 SYNTHÈSE DE L'ACIDE (3*S*, 6*S*, 9*S*)-2-OXO-3-*N*-(FMOC)AMINO-1-AZABICYCLO[4.3.0]NONANE-9-CARBOXYLIQUE (FMOC-I<sup>2</sup>AA-OH, (6*S*)-14).

Le (3*S*, 6*S*, 9*S*)-2-oxo-3-*N*-(Boc)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate de méthyle ((6*S*)-11) est préparé en solution à partir du (2*S*)-*N*-9-(9-PhF)glutamate de  $\alpha,\gamma$ -méthyle (**8**) (Figure 10) selon une modification de la méthode décrite dans la littérature<sup>10</sup>. Pour cela le dérivé de l'acide glutamique **8** est traité dans des conditions de condensation de Claisen avec de la NaHMDS à  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  pour former le  $\beta$ -cétoster **9** qui est par la suite soumis à une séquence d'hydrolyse/décarboxylation, de réesterification puis hydrogénation/cyclisation lactamique/*N*-protection pour obtenir les (6*R*)- et (6*S*)-Boc-I<sup>2</sup>AA-OMe ((6*R*)-11 et (6*S*)-11). Les deux diastéréoisomères sont séparés par chromatographie et le (6*S*)-11 est obtenu avec un rendement global de 40% à partir du glutamate **8**.



**Figure 10: Synthèse des (6*R*)- et (6*S*)-Boc-I<sup>2</sup>AA-OMe**



**Figure 11: Préparation du (6S)-Fmoc-I<sup>2</sup>AA-OH ((6S)-14).**

Afin d'obtenir le Fmoc-I<sup>2</sup>AA-OH ((6S)-14) une manipulation des groupes protecteurs a été nécessaire. Le méthylester (6S)-11 est d'abord hydrolysé par traitement avec une solution d'hydroxyde de lithium dans du dioxane<sup>10</sup> et l'acide carboxylique résultant est protégé sous forme d'ester allylique ((6S)-12) avec du bromure d'allyle et de la diisopropyléthylamine à reflux<sup>5</sup>. La fonction Boc est clivée en présence de 50% d'acide trifluoroacétique/dichlorométhane et l'amine libre est générée par traitement avec du phosphate de potassium tribasique puis le groupe Fmoc y est installé avec du FmocCl dans du dichlorométhane ((6S)-13). Finalement, la fonction acide est déprotégée par traitement de (6S)-13 avec de l'hydrure de tributylétain et du chlorure de bistriphénylphosphine palladium<sup>11</sup> pour obtenir le Fmoc-I<sup>2</sup>AA-OH ((6S)-14) avec un rendement global de 69% à partir de (6S)-11.



Une voie alternative a par la suite été utilisée pour préparer le Fmoc-I<sup>2</sup>AA-OH, suite à la publication d'une méthode permettant l'hydrolyse sélective d'un ester méthylique en présence d'un groupement Fmoc (Figure 12)<sup>12</sup>.

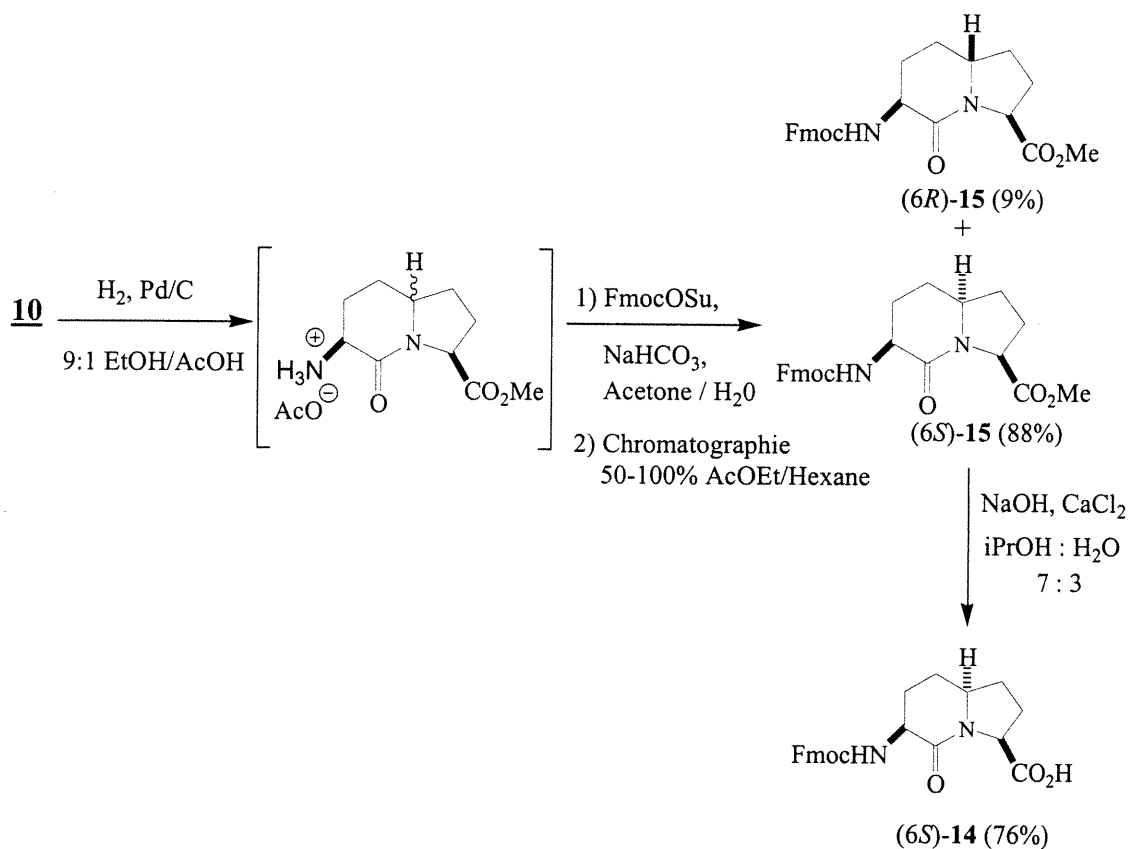


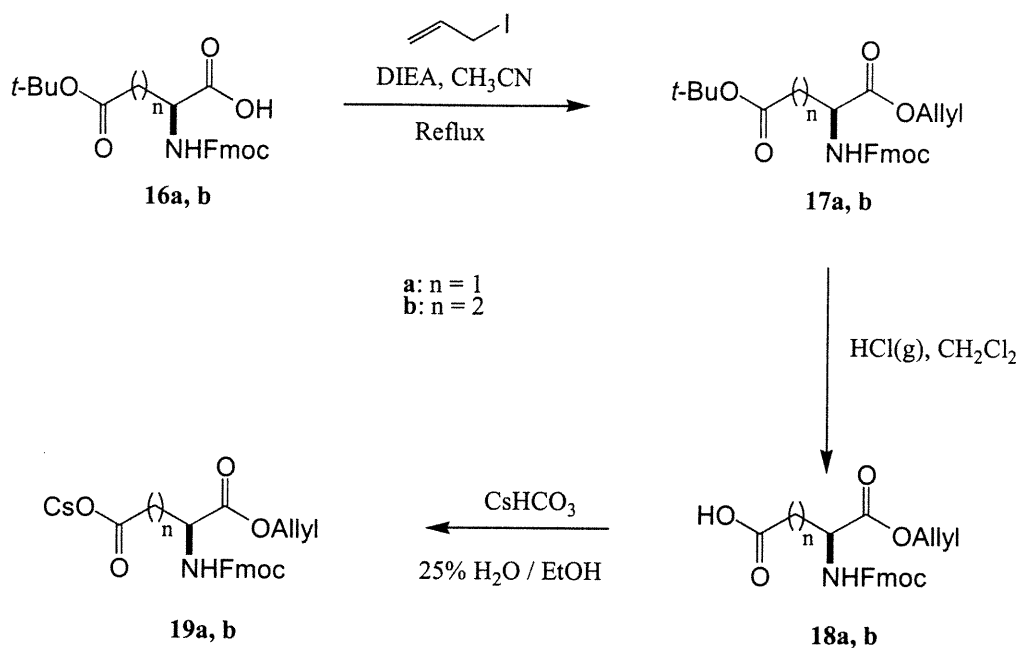
Figure 12: Synthèse alternative du Fmoc-I<sup>2</sup>AA-OH.

Un groupe Fmoc est installé sur la fonction amine en traitant une solution du produit résultant de l'amination réductive avec du bicarbonate de sodium et du FmocOSu. Après chromatographie et séparation des deux diastéréoisomères, l'ester méthylique (6S)-15 est hydrolysé en réagissant une solution de ce dernier dans l'isopropanol avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium et de chlorure de

calcium. La réaction entre l'hydroxyde de sodium et le chlorure de calcium entraînerai la formation d'hydroxyde de calcium qui est suffisamment nucléophile pour déplacer l'ester méthylique mais pas assez basique pour déprotéger le groupe Fmoc ou pour épimériser la position 9 du bicyclic (6*S*)-14. Cette voie de synthèse diminue le nombre d'étapes menant à la formation du produit (6*S*)-14.

#### **2.4 SYNTHÈSE DU (2*S*) *N*-(FMOC)-ASPARTATE DE $\alpha$ -ALLYLE (FMOC-Asp-OAllyl, 18a) ET DU (2*S*) *N*-(FMOC)-GLUTAMATE DE $\alpha$ -ALLYLE (FMOC-Glu-OAllyl, 18b).**

Les Fmoc-Asp-OAllyl (**18a**) et Fmoc-Glu-OAllyl (**18b**) sont préparés en deux étapes à partir des (2*S*)-*N*-(Fmoc)-aspartate de  $\beta$ -*tert*-butyle (**16a**) et (2*S*)-*N*-(Fmoc)-glutamate de  $\gamma$ -*tert*-butyle (**16b**) respectivement, qui sont disponibles commercialement (Figure 13). Ces derniers sont traités avec l'iodure d'allyle et la DIEA pour protéger les fonctions acide en position  $\alpha$  pour obtenir les (2*S*)-*N*-(Fmoc)-aspartate de  $\alpha$ -allyle  $\beta$ -*tert*-butyle (**17a**) et (2*S*)-*N*-(Fmoc)-glutamate de  $\alpha$ -allyle  $\gamma$ -*tert*-butyle (**17b**)<sup>13</sup>. Après chromatographie, la fonction *tert*-butylique est déprotégée quantitativement avec une solution de chlorure d'hydrogène dans le dichlorométhane (Figure 13).



**Figure 13: Préparation des Fmoc-Asp(OCs)-OAllyl (19a) et Fmoc-Glu(OCs)-OAllyl (19b).**

Les fonctions carboxyliques de Fmoc-Asp-OAllyl (**18a**) et Fmoc-Glu-OAllyl (**18b**) sont ensuite converties sous forme de sel de césium en les réagissant avec une solution de bicarbonate de césium préalablement séché pendant 24 heures dans une étuve à 110 °C. Les sels de césium **19a** et **19b** sont isolés après évaporation des produits volatiles.

## 2.5 SYNTHÈSE SUR SUPPORT SOLIDE DES *c*-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Asp-I<sup>2</sup>AA], *c*-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Glu-I<sup>2</sup>AA] ET *c*-[Glu-I<sup>2</sup>AA-Glu-I<sup>2</sup>AA].

### 2.5.1 Préparation du support solide.

Afin de permettre l'ancrage des acides aspartique et glutamique sous forme de leur sel de césium sur le support solide, la fonction alcool terminale de la résine de Wang a du être convertie en bon groupe partant. Pour cela, la résine de Wang commerciale (degré de substitution 1 mmol/g) est traitée avec de la triphénylphosphine et du tetrabromure de carbone pour échanger l'hydroxyle en bromure<sup>9</sup> (Figure 14).

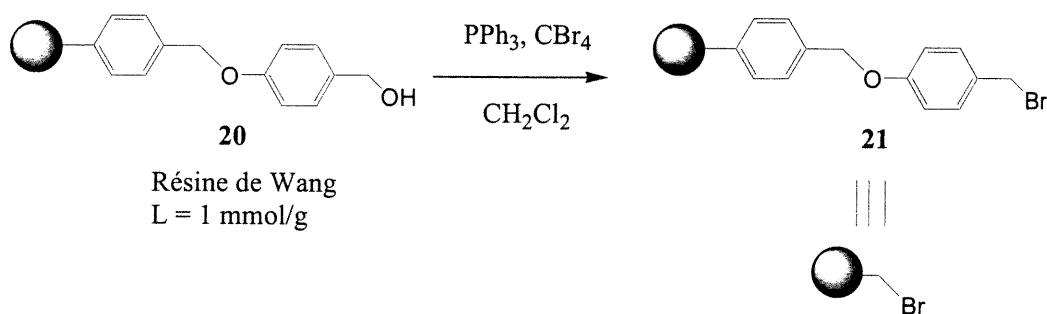


Figure 14: Conversion de la résine de Wang en résine halogénée.

Après réaction et lavage de la résine, un spectre FTIR photoacoustique d'un échantillon de la résine **21** est enregistré pour observer la disparition de la bande d'absorption de la fonction alcool à 3400 cm<sup>-1</sup> et l'apparition d'une nouvelle bande à 610 cm<sup>-1</sup>, confirmant ainsi la présence d'un lien C-Br sur la résine **21**. Si la conversion des fonctions hydroxyles n'est pas complète, il est nécessaire de les acétyler avec de l'anhydride acétique et de la DIEA après l'ancrage du premier acide aminé, afin d'éviter la formation de produits secondaires.

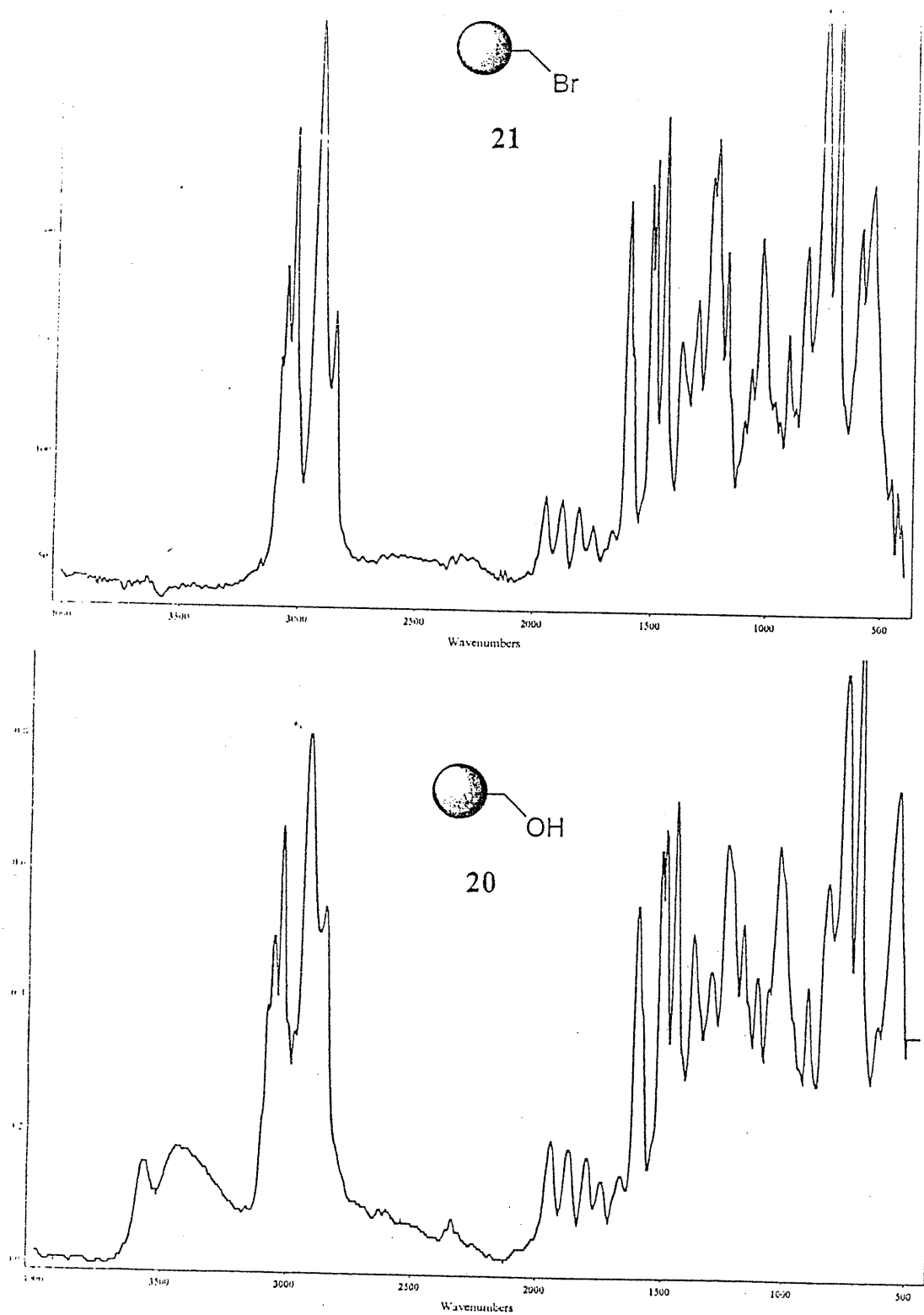
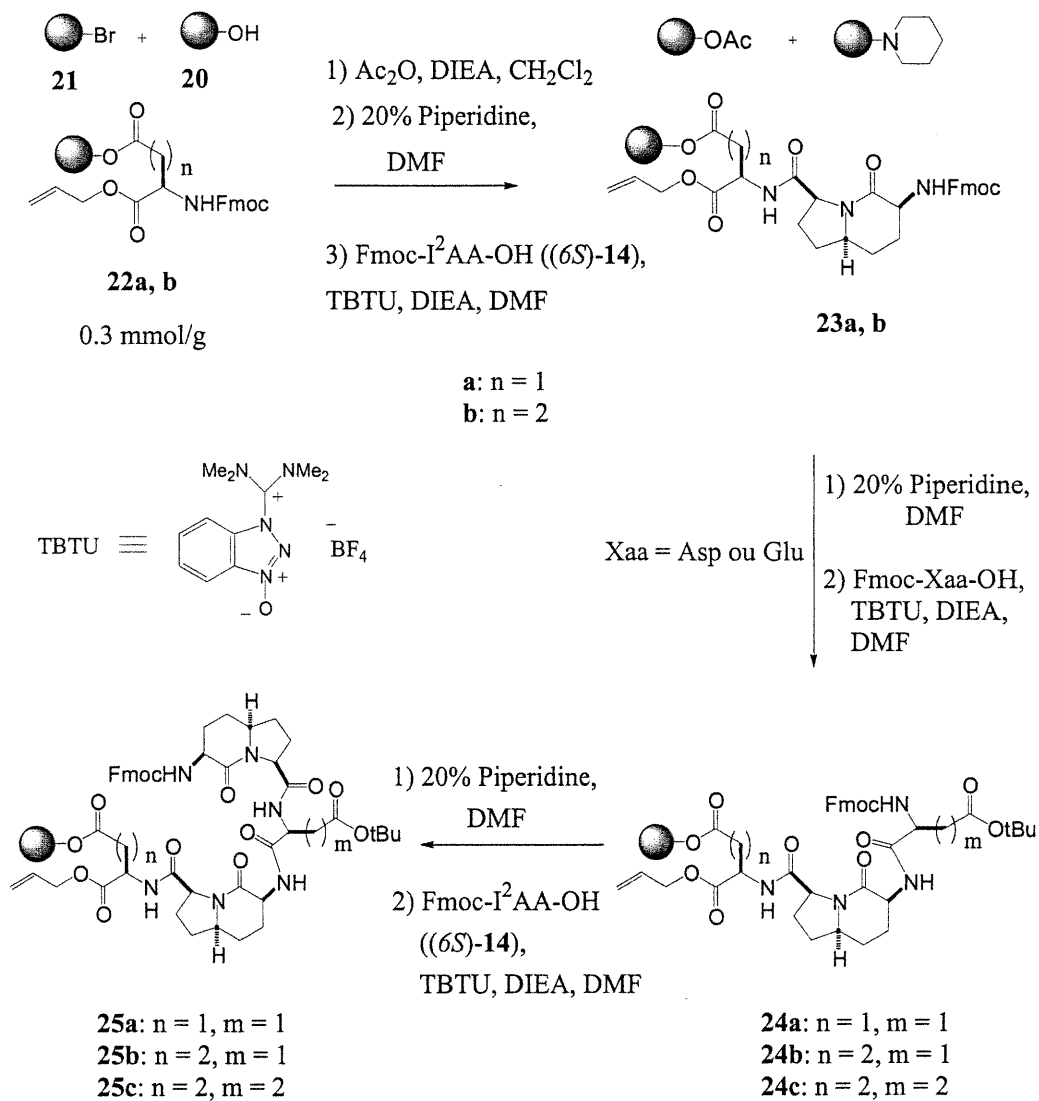


Figure 15: Spectres FTIR photoacoustique des résines.



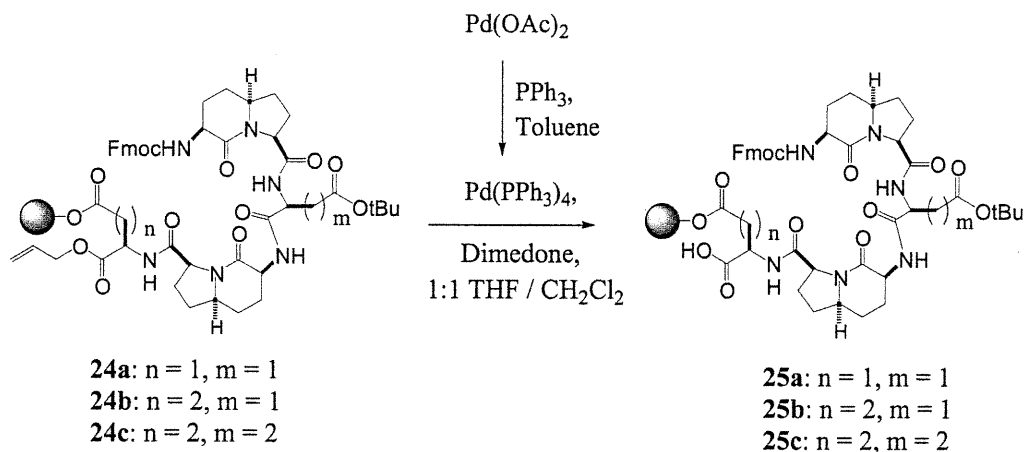
**2.5.3 Synthèse des peptides linéaires: Fmoc-I<sup>2</sup>AA-Asp(O-*t*-Bu)-I<sup>2</sup>AA-Asp(O-Wang)O-Allyle, Fmoc-I<sup>2</sup>AA-Glu(O-*t*-Bu)-I<sup>2</sup>AA-Asp(O-Wang)O-Allyle et Fmoc-I<sup>2</sup>AA-Glu(O-*t*-Bu)-I<sup>2</sup>AA-Glu(O-Wang)O-Allyle.**



**Figure 17: Élongation aux térapeptides.**

Les fonctions amine de **21a** et **21b** sont déprotégées avec une solution de 20% piperidine/DMF, ce qui entraîne en même temps un déplacement des bromures résiduels de la résine par la piperidine. Après lavage, les résines sont mises en suspension dans du DMF puis traitées avec des solutions prémélangées de Fmoc-I<sup>2</sup>AA-OH (1.1 éq), de TBTU (1.1 éq) et de la DIEA (3 éq) dans du DMF. Un couplage complet est confirmé par un test à la ninhydrine négatif<sup>2</sup>, indiquant l'absence d'amines libres. Les étapes de déprotection et couplage avec les acides aminés appropriés sont répétées jusqu'à l'obtention des trois térapeptides linéaires **24a**, **24b**, et **24c** (Figure 17).

#### 2.5.4 Clivage des esters allyliques.



**Figure 18: Clivage des esters allyliques.**

Les premières tentatives de déprotection ont été réalisées avec du Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> obtenu commercialement sur des échantillons des résines **24a-c**, puis en solution sur des échantillons des acides aminés **18a-b**. N'ayant obtenu aucune ou très peu de

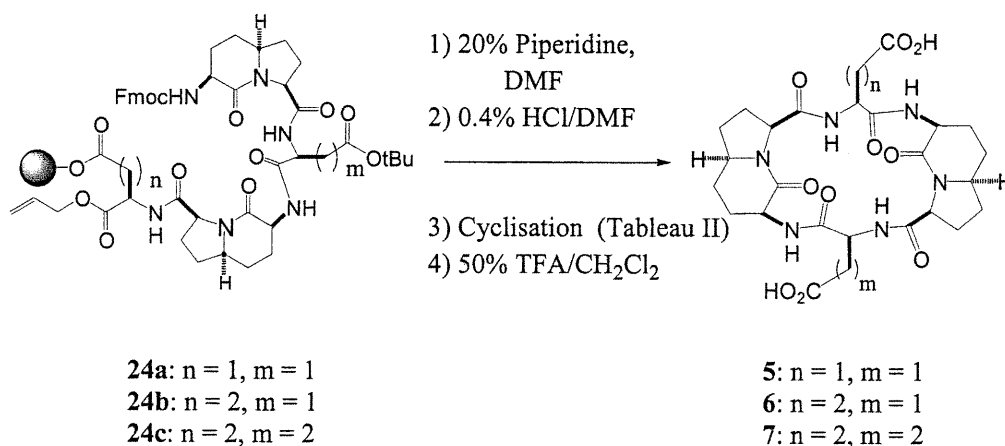


réaction de clivage, il a été décidé de préparer du  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  frais à partir d'acétate de palladium afin d'obtenir un catalyseur réactif.

Pour cela, le catalyseur au palladium est préparé 18h avant la réaction, à partir d'acétate de palladium et de triphénylphosphine, dans du toluène<sup>14</sup>. Après une dizaine de minutes, la solution est évaporée à sec pour obtenir une poudre jaune de tétrakistriphénylphosphine palladium, qui est séché sous vide à l'abri de la lumière pendant une nuit. Une solution de 1:1 THF/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a été dégazée avec de l'azote ou de l'argon pour éliminer l'oxygène qui peut oxyder le catalyseur, les résines **22a-c** sont ainsi mises en suspension dans la solution et agitées avec un courant d'azote, puis traitées avec le catalyseur au palladium (0.1 éq) et la dimédone (50 éq)<sup>15</sup> pendant douze heures. Les résines **23a-c** obtenues sont lavées notamment avec une solution de diéthylthiocarbamate de sodium dans du DMF pour complexer et dissoudre le palladium, permettant ainsi son élimination. Après lavages, un échantillon de chaque résine est soumis aux conditions de clivage des peptides par traitement avec 1:1 TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Les térapeptides libérés sont caractérisés par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  pour confirmer l'absence des groupements allyliques.

### 2.5.5 Cyclisation des tétrapeptides.

Suite à la déprotection des amines terminales de **24a-c** avec de la piperidine, les résines obtenues ont été lavées avec une solution de 0.4% HCl/DMF pour éliminer la piperidine. Les peptides linéaires déprotégés ont ainsi été obtenus sous la forme dans laquelle les fonctions carboxyliques et amines étaient protonnées, puis ont été soumis aux conditions de cyclisation (Figure 19).



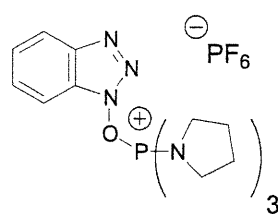
**Figure 19: Cyclisation des tétrapeptides.**

Lorsque l'absence d'amine libre a été confirmée par un test à la ninhydrine, les peptides ont été libérés en solution par traitement avec 50% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ce qui déprotège également les esters *tert*-butyliques. Après évaporation des volatiles, les peptides **25a-c** ont été précipités dans l'éther, et le rendement et la pureté de l'étape de cyclisation ont été évalués en injectant un échantillon de chaque peptide sur un système HPLC analytique en phase inverse muni d'une colonne C<sub>18</sub>.

Conditions de cyclisation	Pureté par RP-HPLC (%)
TBTU, DIEA, DCM	11
PyBOP, DIEA, DCM	11
PyBOP, NMM, NMP	5
PyBOP, 2,6-Lutidine, NMP puis DIEA	40-46

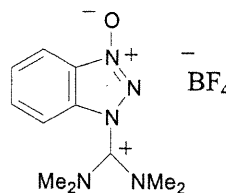
**Tableau II: Détermination des conditions de cyclisation de la résine 24b.**

Afin de déterminer les meilleures conditions de cyclisation, plusieurs méthodes ont été testées sur des échantillons de la résine **24b** (Tableau II). La première condition essayée consistait en l'utilisation du TBTU (1.1 éq) comme réactif de couplage, avec de la DIEA (3.3 éq) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Selon le chromatogramme obtenu, le peptide cyclique désiré avait une pureté de 11%. Le réactif de couplage a ensuite été remplacé par le PyBOP<sup>16</sup> (Figure 20).



**PyBOP**

(Benzotriazol-1-yloxy)tris  
(pyrrolidino)phosphonium  
hexafluorophosphate



**TBTU**

2(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-  
tetramethyluronium  
tetrafluoroborate

**Figure 20: Structures des agents de couplage utilisés pour la cyclisation.**

Dans les cas où l'activation de la fonction acide terminale avec du TBTU ou du PyBOP a été réalisée en présence de DIEA ou de *N*-méthylmorpholine, le peptide

cyclique a été obtenu avec une pureté de 11% et 5% respectivement. Ces méthodes de cyclisation ont générées des peptides cycliques de très faible pureté. Ceci peut être associé à la présence d'amines terminales libres qui entrent en compétition avec les carboxylates terminaux au niveau de l'étape d'activation. Les amines terminales peuvent être alkylées par les agents de couplage pour former du *N*-tetraméthylguanidinium<sup>16</sup>.

C'est alors qu'il a été décidé d'utiliser la 2,6-lutidine, une base plus faible que la DIEA ou la NMM, dans l'étape d'activation. Suite à la déprotection du groupe Fmoc terminal, le peptide linéaire était sous forme acide. Ainsi l'activation des carboxylates a été réalisée en présence de 2,6-lutidine, les fonctions amine demeurant temporairement protégées par protonation. L'étape de cyclisation a été alors déclenchée par l'ajout de DIEA. Ainsi, le peptide linéaire déprotégé est traité avec du PyBOP (1.1 éq) et de la 2,6-lutidine (3.3 éq), qui assure la présence de la forme zwitterionique du peptide, dans la NMP comme solvant. La résine est agitée avec un courant d'azote sous ces conditions pendant une heure puis de la DIEA (3.3éq) est introduite. La résine est agitée avec un courant d'azote une heure supplémentaire et la disparition d'amine libre est confirmée par un test à la ninhydrine négatif<sup>2</sup>. Suite à la libération du peptide cyclique **6** en solution par traitement de la résine avec 50% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, un échantillon du peptide est injecté sur un HPLC analytique. Le degré de pureté du peptide est alors évaluée à 40-46%.

Cette dernière condition de cyclisation a été utilisée pour accéder aux trois peptides **5-7**. Les peptides ont été purifiés par HPLC semi-préparatif sur une colonne C<sub>18</sub>. Les rendements globaux de synthèse déterminés après purification étaient respectivement de 8%, 22% et 12% pour les *c*-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Asp-I<sup>2</sup>AA] (**5**), *c*-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Glu-I<sup>2</sup>AA] (**6**) et *c*-[Glu-I<sup>2</sup>AA-Glu-I<sup>2</sup>AA] (**7**). Dans le cas des trois peptides, un deuxième produit a été isolé lors de leur purification, correspondant à leur dérivé protégé sous forme d'ester *t*-butylique respectifs.

1. Fields, G.B. *Methods in ENZYMOLOGY, Volume 289: Solid-Phase Peptide Synthesis*, Academic Press: New York, 1997.
2. Kaiser, E. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595.
3. a) Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.  
b) Barany, G.; Merrifield, R. B. In "The Peptides"; Gross, E., Meienhofer, J., Eds.; Academic Press: New York, 1979; Vol 2, p 1-284.
4. Mazur, S.; Jayalekshmy, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *101*, 677.
5. Alsina, J.; Rabanal, F.; Giralt, E.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9633.
6. Barany, G.; Albericio, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4936.
7. Trzeciak, A; Bannwarth, W. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *32*, 4557.
8. Carpino, L. A. *Acc. Chem. Res.* **1987**, *20*, 401.
9. Ngu, K.; Patel, D. V. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 973.
10. Lombart, H.-G.; Lubell, W.D. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9437.
11. Dangles, O.; Guibé, F.; Balavoine, G. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4984.
12. Pascal, R.; Sola, R. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5031.
13. Gosselin, F.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2163.

14. Uenishi, J., Kawahama, R., Yonemitsu, O. and Tsuji, J. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8965.
15. Marsh, I. R.; Teague, S. J.; Bradley, M. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6199.
16. Ehrlich, A.; Heyne, H-U.; Winter, R.; Beyermann, M.; Haber, H.; Carpino, L. A.; Bienert, M. *J. Org. Chem* **1996**, *61*, 8831.
17. Delforge, D.; Dieu, M.; Delaive, E.; Art, M.; Gillon, B.; Devreese, B.; Raes, M.; Beeumen, J. V.; Remacle, J. *Lett. Peptide Sci.* **1996**, *3*, 89.
18. Thouin, E.; Lubell, W. D. Mémoire de Maîtrise: Nouveau Mimétisme du Site Actif des Protéases Aspartiques: Conception, Synthèse et Caractérisation du *cyclo*-[IAA-Asp-IAA-Asp], Université de Montréal, **1996**.

**CHAPITRE 3: ANALYSE CONFORMATIONNELLE  
DES *c*-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Asp-I<sup>2</sup>AA] (5), *c*-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Glu-I<sup>2</sup>AA]  
(6) ET *c*-[Glu-I<sup>2</sup>AA-Glu-I<sup>2</sup>AA] (7)**

**3.1. CARACTÉRISATION DES PEPTIDES CYCLIQUES.**

Suite à la purification par HPLC, les peptides cycliques 5-7 ont d'abord été caractérisé par spectrométrie de masse à basse (FABMS) résolution (Tableau III).

Peptide	FABMS <i>m/e</i> [MH <sup>+</sup> ]
<i>c</i> -[Asp-I <sup>2</sup> AA-Asp-I <sup>2</sup> AA] (5)	591
<i>c</i> -[Asp-I <sup>2</sup> AA-Glu-I <sup>2</sup> AA] (6)	605
<i>c</i> -[Glu-I <sup>2</sup> AA-Glu-I <sup>2</sup> AA] (7)	619

**Tableau III: Caractérisation par spectrométrie de masse des peptides cycliques.**

Ayant ainsi confirmé l'obtention des peptides cycliques, ceux-ci ont été caractérisés par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H. L'assignation des signaux obtenus a été réalisée grâce aux couplages scalaires des spectres de corrélation bidimensionnelle homonucléaire COSY. Pour cela, des solutions des peptides 5-7 (6 mM) dans 9:1 H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O à pH 3.3 sont préparées et les spectres COSY sont enregistrés à 15 °C pour déblinder le signal de l'eau et ainsi libérer la région correspondant aux signaux des

protons  $\alpha$ . Les spectres sont également enregistrés dans le DMSO afin de déterminer l'influence du solvant sur la conformation des peptides.

Dans le cas des peptides symétriques **5** (Figures 21 et 22) et **7** (Figures 25 et 26), seuls deux signaux correspondants aux quatre protons amide sont observés, résultant de la présence d'une symétrie  $C_2$ , ce qui facilite l'assignation des signaux. Le peptide **6** quant à lui possède quatre signaux distincts pour ses quatre protons amides (Figures 23 et 24). Par contre la différenciation entre les signaux provenant des deux résidus I<sup>2</sup>AA n'est pas possible.



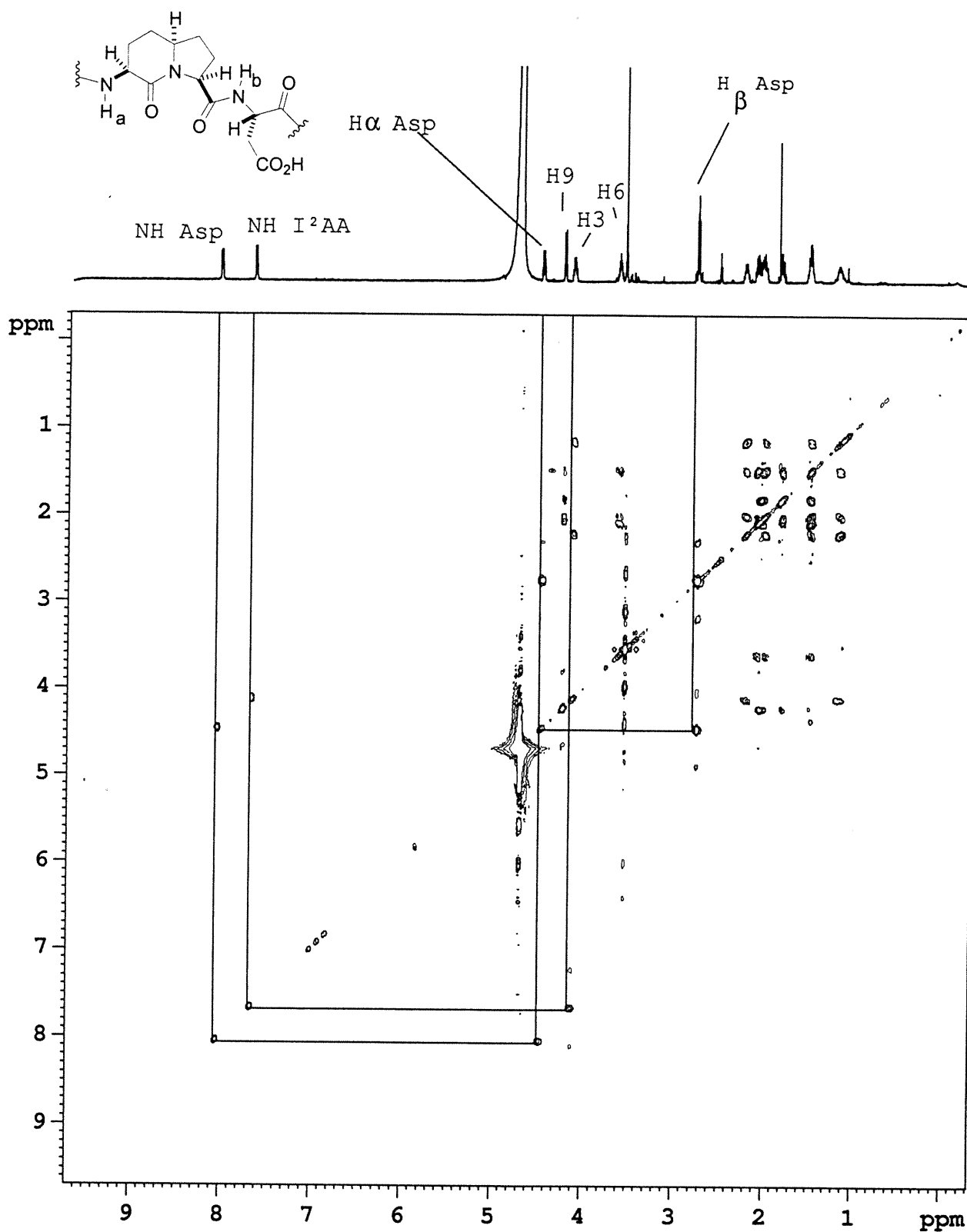


Figure 21: Spectre COSY du peptide 5 dans 9:1 H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O

(6 mM, 600 MHz, 15 °C)

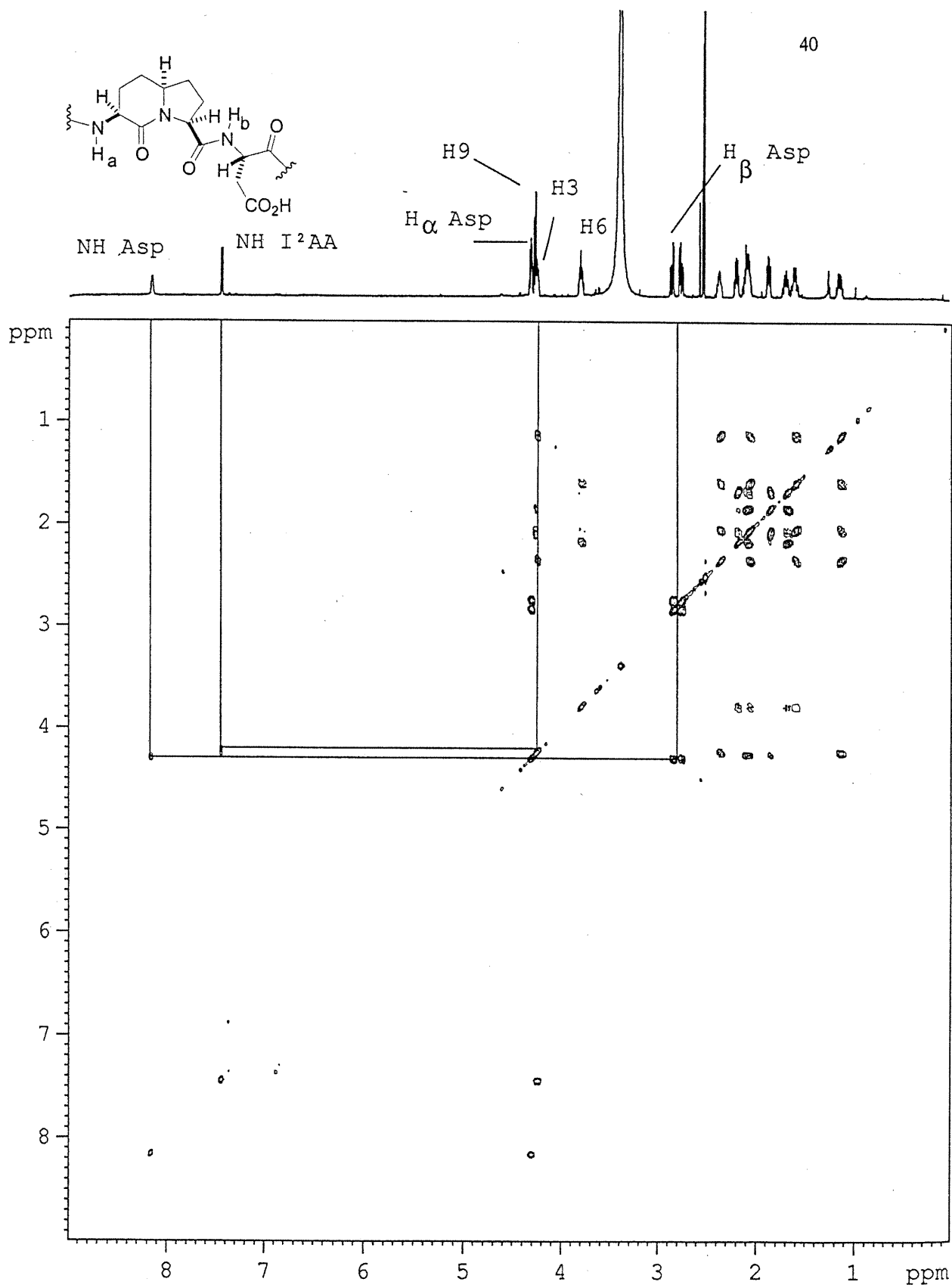


Figure 22: Spectre COSY du peptide 5 dans le DMSO-d<sub>6</sub>

(6 mM, 600 MHz, 25 °C)

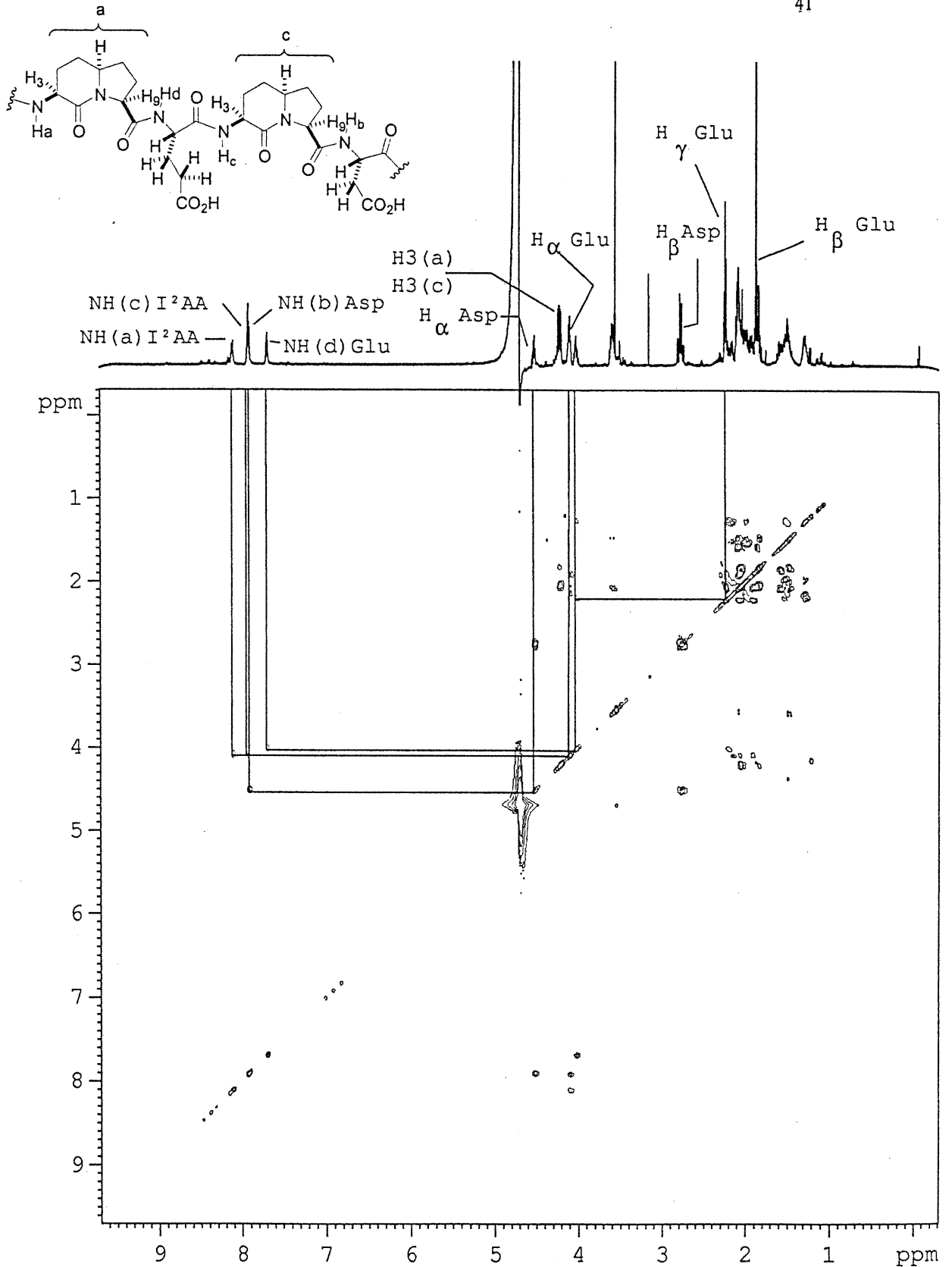


Figure 23: Spectre COSY du peptide 6 dans 9:1 H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O

(6 mM, 600 MHz, 15 °C)

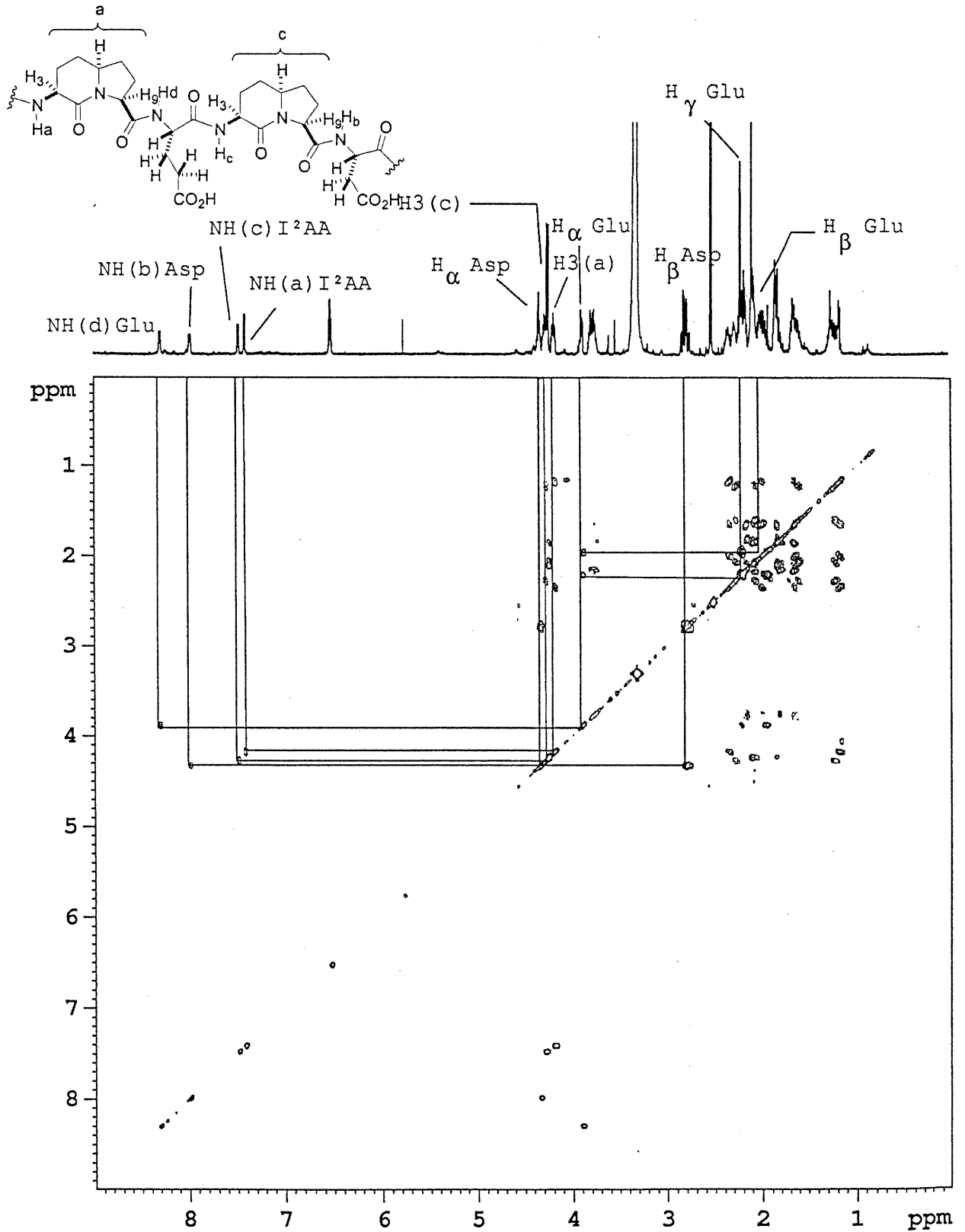


Figure 24: Spectre COSY du peptide 6 dans le DMSO-d<sub>6</sub>

(6 mM, 600 MHz, 25 °C)

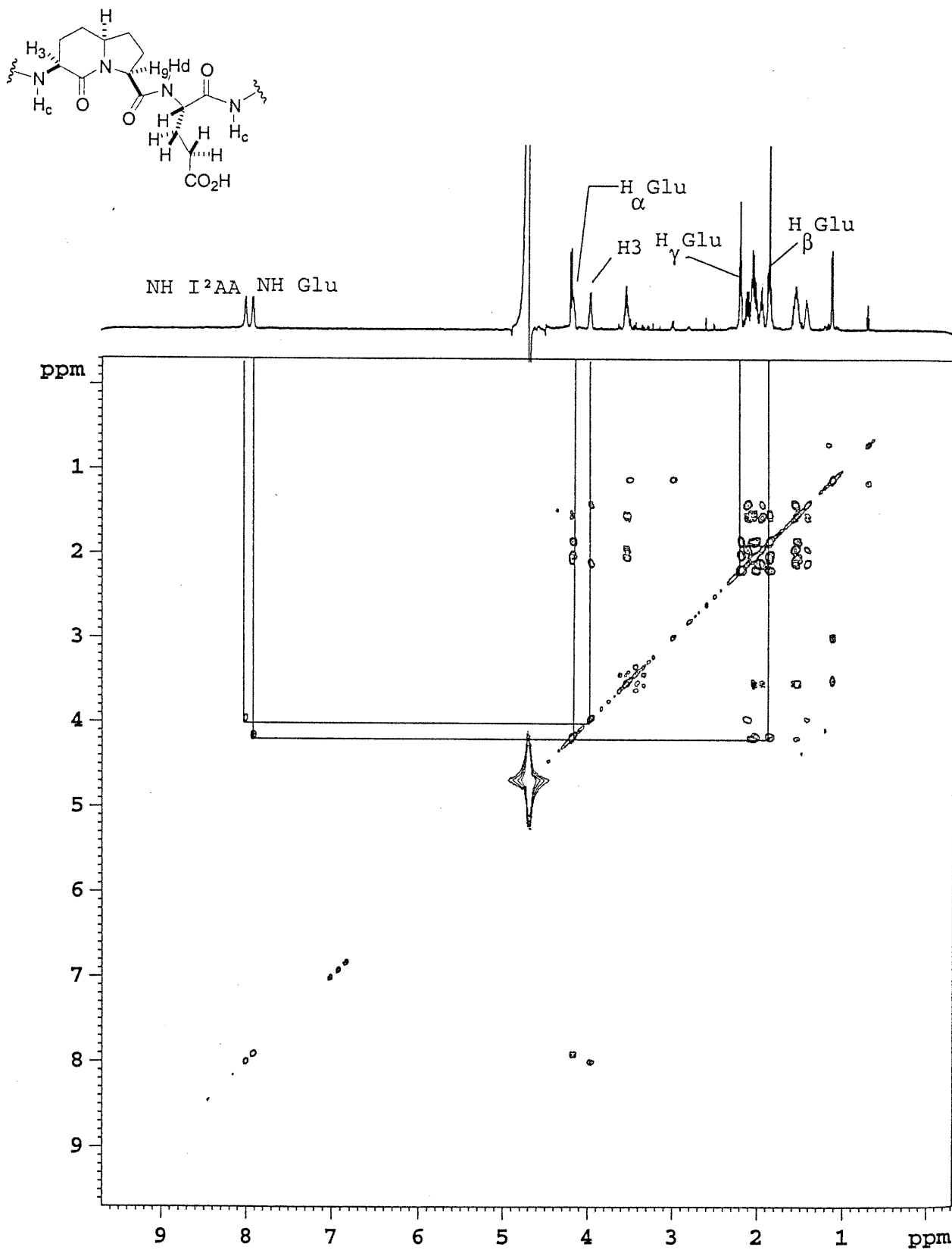


Figure 25: Spectre COSY du peptide 7 dans 9:1 H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O

(6 mM, 600 MHz, 15 °C)

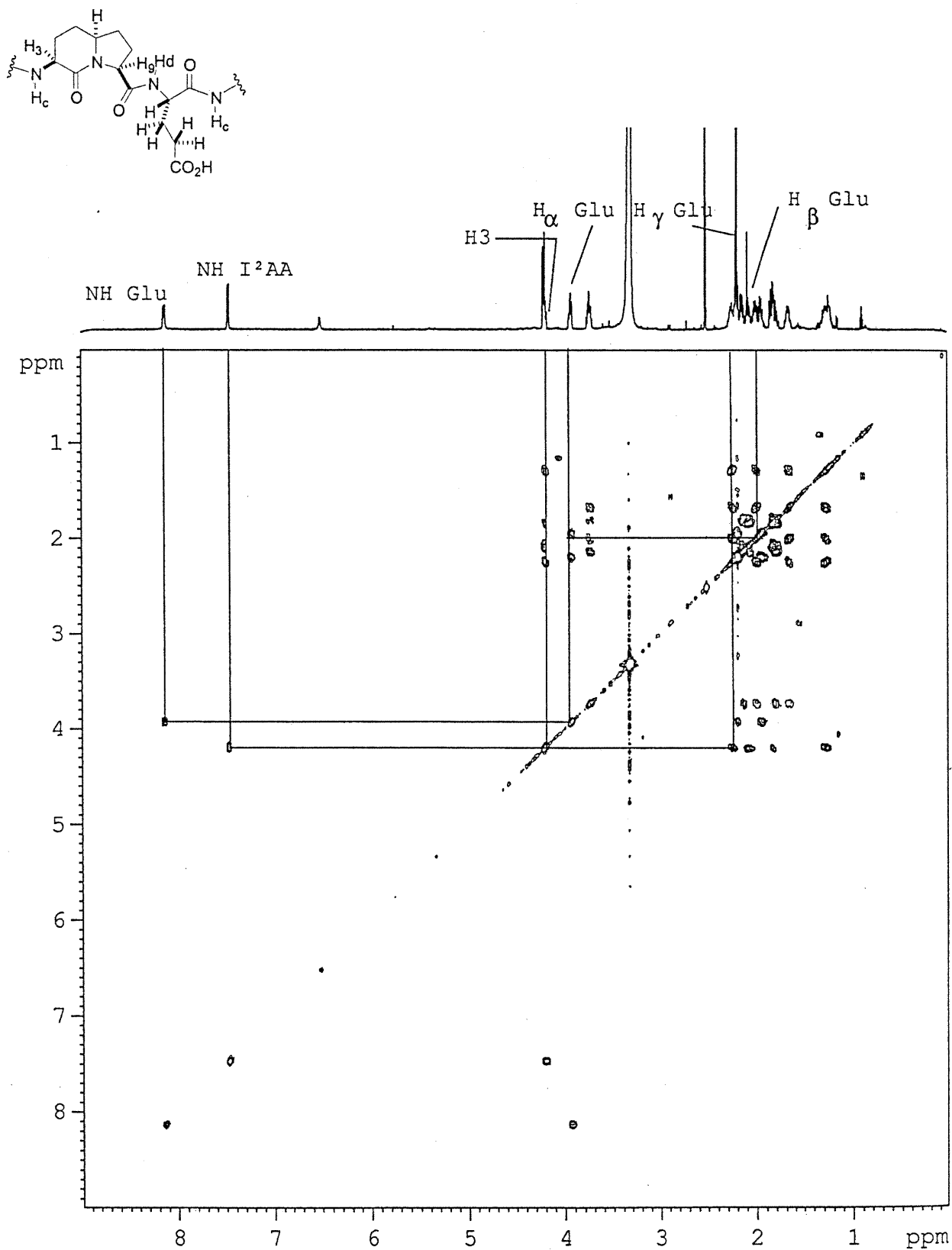
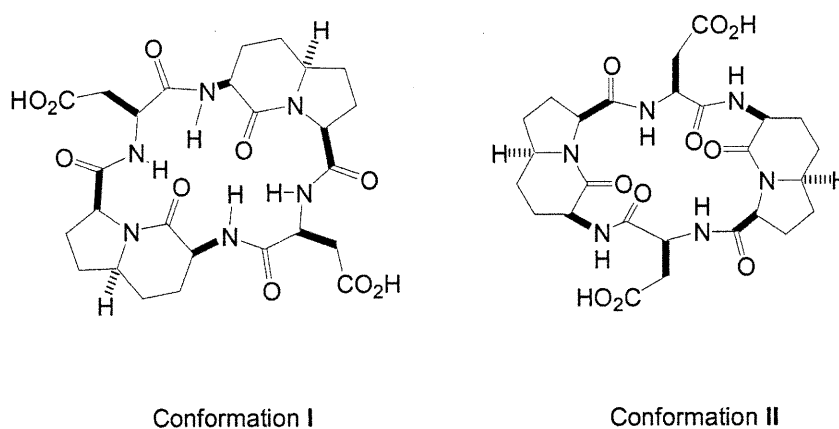


Figure 26: Spectre COSY du peptide 7 dans le DMSO-d<sub>6</sub>  
(6 mM, 600 MHz, 25 °C)

Afin d'obtenir de l'information sur la géométrie adoptée par les trois peptides cycliques, il est nécessaire de supposer qu'il puisse exister un équilibre rapide entre les différentes conformations en solution. Les données RMN donnent accès à différentes informations<sup>1,2</sup> dont:

- Les angles dièdres calculés à partir des constantes de couplage vicinales  $^3J_{\text{HN}\alpha}$  ;
- les distances interatomiques déterminées par effets nucléaires de Overhauser (NOE);
- les interactions avec l'environnement d'après l'étude des coefficients de température des protons amide  $\Delta\delta/\Delta T$ .

Au cours des travaux réalisés par Thouin et Lubell<sup>3</sup> sur le *c*-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Asp-I<sup>2</sup>AA] (5), des calculs de modélisation moléculaire ont été effectués pour déterminer les conformations probables adoptées par le peptide (Figure 27).



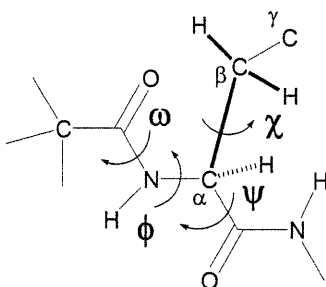
**Figure 27: Conformations possibles du peptide 5.**

Après avoir effectué les expériences par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H citées, un couplage dipolaire entre les protons amide des résidus I<sup>2</sup>AA et des acides aspartiques

a été observé, ainsi qu'un pont hydrogène intramoléculaire impliquant les protons amide des I<sup>2</sup>AA. Grâce à ces observations, il a été possible de conclure que le peptide **5** adoptait la conformation I dans l'eau et dans le DMSO.

### 3.2. DÉTERMINATION DES ANGLES DIÈDRES.

La conformation adoptée par un squelette peptidique peut s'exprimer en termes des angles dièdres  $\phi$ ,  $\psi$ ,  $\omega$  et  $\chi$  (Figure 28)<sup>1</sup>.



**Figure 28: Définition des angles dièdre d'une chaîne peptidique.**

La constante de couplage vicinale  $^3J_{\text{HN}\alpha}$  est directement liée à la valeur de l'angle dièdre  $\phi$  selon l'équation de Karplus modifiée par Wütrich<sup>4</sup>:

$$^3J_{\text{HN}\alpha} = 6.4 \cos^2\theta - 1.4 \cos\theta + 1.9 \quad \text{où } \theta = |\phi - 60^\circ|$$

#### Équation 1: Équation de Karplus modifiée par Wütrich.

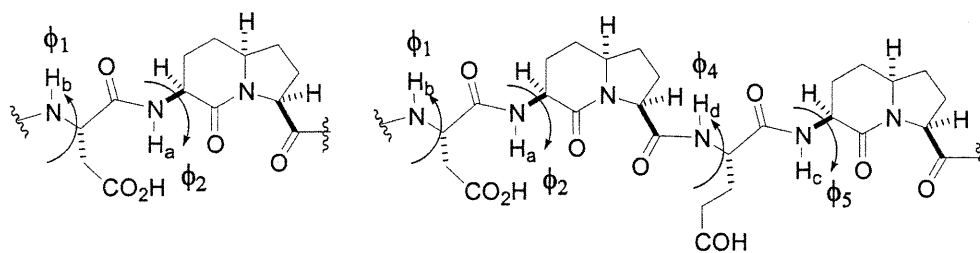
Les constantes de couplage  $^3J_{\text{HN}\alpha}$  ont été déterminées à partir des spectres de RMN <sup>1</sup>H des trois peptides cycliques (Tableau IV).



Peptide	$^3J_{\text{HN}\alpha}$ (Hz)	
	Eau	DMSO
5	NH <sub>b</sub> (Asp) / H <sub>α</sub> 8.4	NH <sub>b</sub> (Asp) / H <sub>α</sub> 8.0
	NH <sub>a</sub> (I <sup>2</sup> AA) / H <sub>α</sub> 6.1	NH <sub>a</sub> (I <sup>2</sup> AA) / H <sub>α</sub> 5.9
7	NH <sub>d</sub> (Glu) / H <sub>α</sub> 7.6	NH <sub>d</sub> (Glu) / H <sub>α</sub> 6.5
	NH <sub>c</sub> (I <sup>2</sup> AA) / H <sub>α</sub> 4.7	NH <sub>c</sub> (I <sup>2</sup> AA) / H <sub>α</sub> 6.7
6	NH <sub>d</sub> (Glu) / H <sub>α</sub> 5.6	NH <sub>d</sub> (Glu) / H <sub>α</sub> 7.9
	NH <sub>a</sub> (I <sup>2</sup> AA) / H <sub>α</sub> 7.5	NH <sub>a</sub> (I <sup>2</sup> AA) / H <sub>α</sub> 5.7
	NH <sub>b</sub> (Asp) / H <sub>α</sub> 9.3	NH <sub>b</sub> (Asp) / H <sub>α</sub> 8.7
	NH <sub>c</sub> (I <sup>2</sup> AA) / H <sub>α</sub> 7.9	NH <sub>c</sub> (I <sup>2</sup> AA) / H <sub>α</sub> 5.8

**Tableau IV: Constantes de couplage vicinales  $^3J_{\text{HN}\alpha}$  des peptides 5-7.**

Les valeurs des constantes de couplage obtenues par spectroscopie RMN ont été introduites dans l'équation 1 pour calculer les valeurs des angles  $\phi_1$  et  $\phi_2$  des peptides 5-7, de même que les angles  $\phi_4$  et  $\phi_5$  du peptide 6 (Tableau V). Pour chaque valeur de  $^3J_{\text{HN}\alpha}$ , il peut exister jusqu'à quatre valeurs d'angle dièdre  $\phi$ .



Peptide	$\phi_1$		$\phi_2$		$\phi_4$		$\phi_5$	
	Eau	DMSO	Eau	DMSO	Eau	DMSO	Eau	DMSO
5	-95	-91	82	85	---	---	---	---
	-145	-149	38	35				
			-75	-73				
			-165	-166				
6	88	-89	-90	-98	-106	88	-86	86
	32	-150	-150	-142	-134	32	-134	33
	-71					-71		-72
	-169					-168		-167
7	-87	46	21	49	---	---	---	---
	-153	74	99	71				
		-79	-159	-80				
		-161	-176	-160				

Les angles dièdres sont exprimés en degrés.

**Tableau V: Valeurs des angles dièdres calculées à partir des constantes de couplage  $^3J_{\text{HN}\alpha}$  (voir Tableau IV).**

Les valeurs des angles dièdres  $\phi_1$  et  $\phi_2$  du peptide **5** étant similaires dans l'eau et le DMSO, il était possible de conclure que ce peptide adoptait la même conformation dans les deux solvants. Par contre, dans le cas des peptides **6** et **7**, les angles de torsion différaient selon le solvant. Ceci a indiqué que ces deux peptides changeaient de conformation entre l'eau et le DMSO.

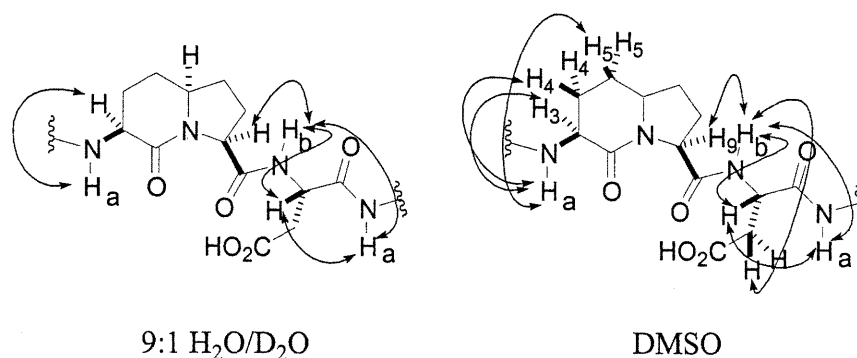
À partir de ces valeurs d'angles de torsion, il serait possible de construire des modèles possédant des contraintes au niveau des angles dièdres et de les minimiser par des simulations dynamiques. Ceci permettrait d'avoir une image de la géométrie adoptée par les peptides dans les conditions où les expériences de spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  ont été effectuées.

### 3.3. DISTANCES INTERATOMIQUES.

L'intensité des signaux obtenus à partir des spectres NOESY des peptides cycliques a permis d'évaluer les distances interatomiques. L'effet NOE intramoléculaire homonucléaire entre deux protons est attribué à un mécanisme de relaxation dipolaire. En supposant que le squelette peptidique est rigidifié par la présence des deux unités I<sup>2</sup>AA, l'intensité de cet effet est inversement proportionnelle à la distance  $r$  entre les deux protons subissant un couplage dipolaire par une relation  $1/r^6$ . Un effet NOE de forte intensité correspondrait à une distance de 1.8–2.5 Å et un effet d'intensité moyenne à une distance de 1.8–3.5 Å<sup>5</sup>.

Les premières expériences de NOE sur les peptides cycliques **5-7** ont été effectuées sur des solutions à 6 mM de peptide dans 9:1 H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O et dans le DMSO- $d_6$ . Les spectres NOESY ont été enregistrés à 15 °C suite à la saturation du signal de

l'eau, avec des temps de mixage de 500 ms dans l'eau et 180 ms dans le DMSO. L'assignation des effets NOE a été limitée à ceux impliquant les protons amide et les protons des chaînes latérales.



**Figure 29: Couplages dipolaires significatifs observés dans les spectres NOESY du peptide 5 dans 9:1 H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (6 mM) à 15 °C et dans le DMSO-d<sub>6</sub> (6 mM).**

Le spectre NOESY du *c*-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Asp-I<sup>2</sup>AA] (5) a montré un couplage dipolaire entre le proton amide du I<sup>2</sup>AA (H<sub>a</sub>) et le proton amide et le proton α (H<sub>b</sub>) de l'acide aspartique (Figures 29 et 30 et 31), dans les deux solvants. Dans le DMSO, des effets NOE supplémentaires ont été observés entre le proton amide H<sub>a</sub> et les protons H<sub>4</sub> et H<sub>5</sub> du résidu I<sup>2</sup>AA, ainsi que le proton amide H<sub>b</sub> et les protons β de l'acide aspartique. Ces NOE n'ont pas été observés dans l'eau à cause de la différence entre les temps de mixage.

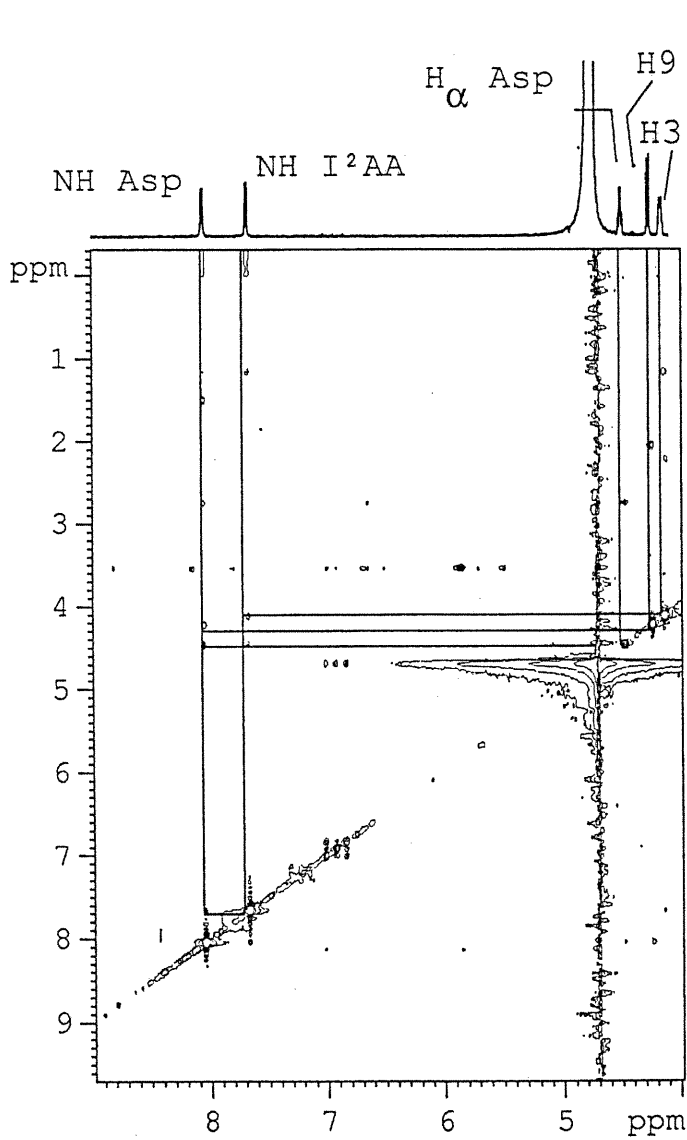
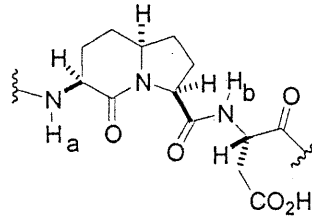


Figure 30: Spectre NOESY du peptide 5 dans 9:1  $H_2O/D_2O$  (6 mM, 600 MHz, 15 °C)

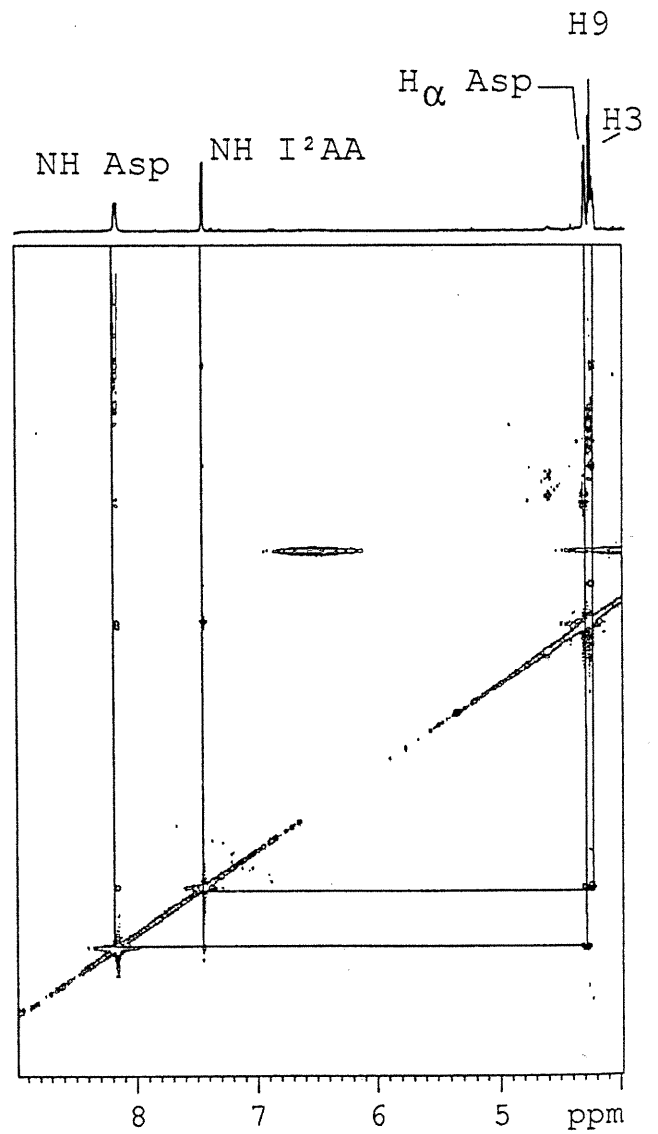
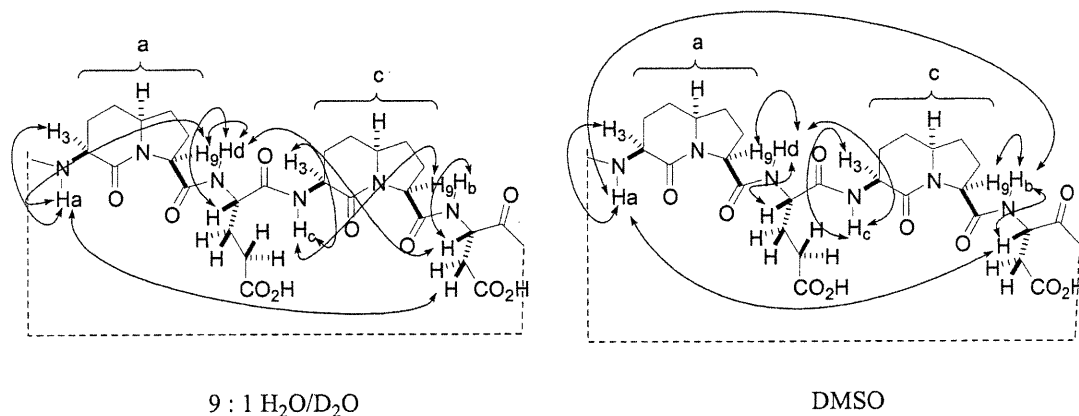


Figure 31: Spectre NOESY du peptide 5 dans le DMSO- $d_6$  (6 mM, 600 MHz, 25 °C)



**Figure 32: Couplages dipolaires significatifs observés dans les spectres NOESY du peptide 6 dans 9:1 H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (6 mM) à 15 °C et dans le DMSO-d<sub>6</sub> (6 mM).**

Le spectre NOESY du peptide 6 dans l'eau (Figure 33) a indiqué la présence de couplages dipolaires entre le proton amide du résidu I<sup>2</sup>AA a (H<sub>a</sub>) et les protons β de l'acide aspartique, ainsi qu'entre le proton amide du résidu I<sup>2</sup>AA c (H<sub>c</sub>) et les protons β et γ de l'acide glutamique (Figure 32). Ces couplages n'ont pas été observés dans le DMSO. Par contre, le spectre NOESY dans le DMSO (Figure 34) a présenté des effets NOE entre le proton amide H<sub>a</sub> et les protons amide H<sub>b</sub> et α de l'acide aspartique. Aussi des effets NOE ont-ils été observés entre le proton amide H<sub>c</sub> et les protons amide H<sub>d</sub> et α de l'acide glutamique.

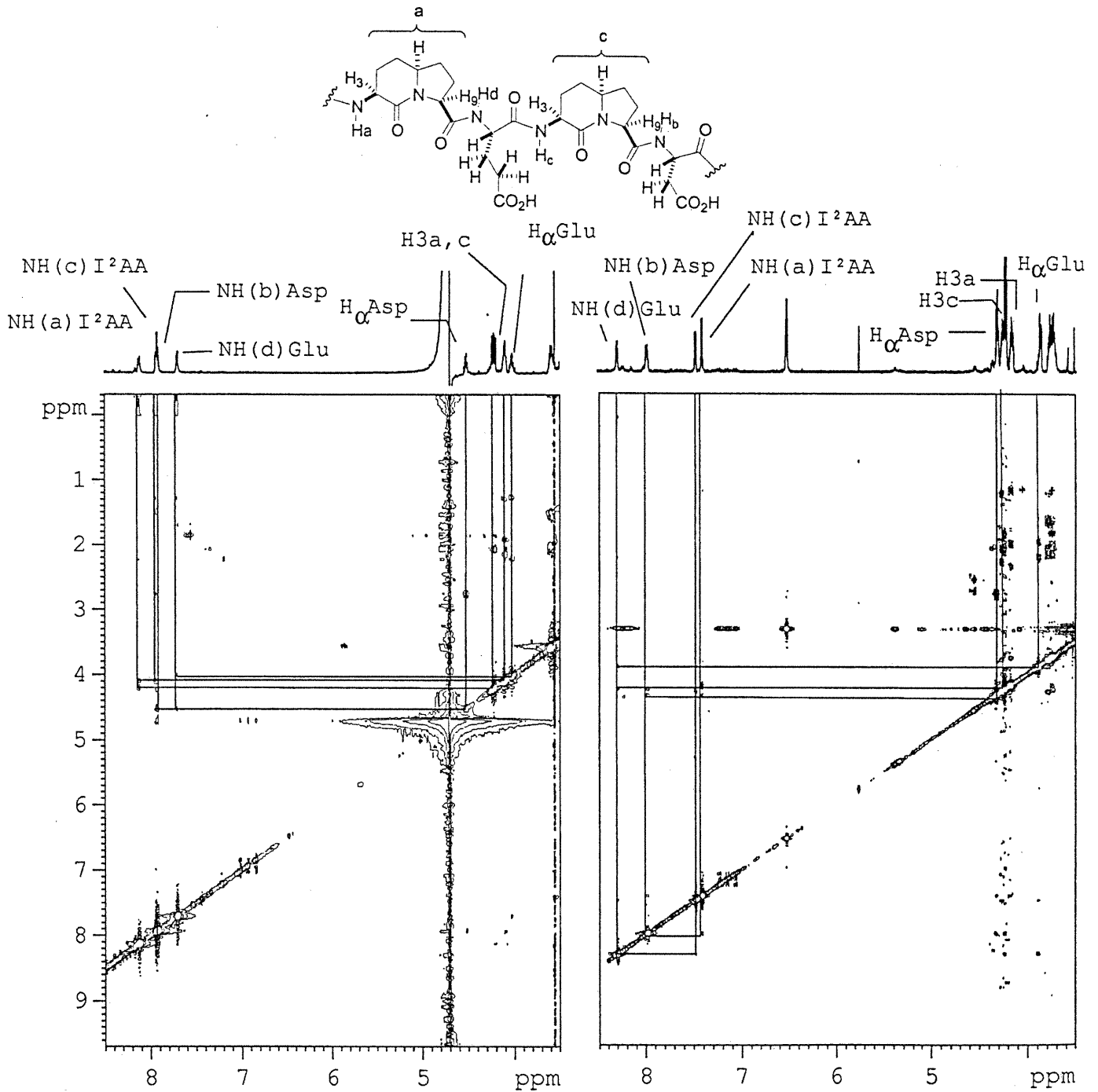
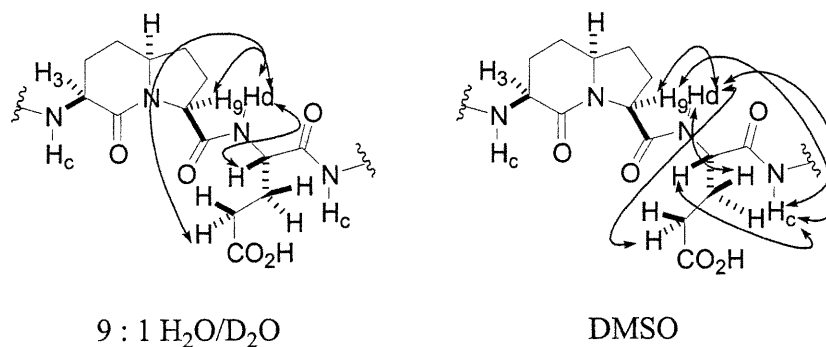


Figure 33: Spectre NOESY du peptide 6 dans 9:1 H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (6 mM, 600 MHz, 15 °C)

Figure 34: Spectre NOESY du peptide 6 dans le DMSO-d<sub>6</sub> (6 mM, 600 MHz, 25 °C)



**Figure 35: Couplages dipolaires significatifs observés dans les spectres NOESY du peptide 7 dans 9:1 H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (6 mM) à 15 °C et dans le DMSO-d<sub>6</sub> (6 mM).**

Dans l'eau, les couplages dipolaires les plus importants du peptide 7 (Figure 36) ont été ceux impliquant le proton amide H<sub>d</sub> de l'acide glutamique et le proton H<sub>g</sub> du résidu I<sup>2</sup>AA, ainsi qu'entre le proton amide H<sub>d</sub> et les protons β et γ de sa chaîne latérale. Dans le DMSO, des effets NOE supplémentaires ont été observés entre le proton amide H<sub>c</sub> du résidu I<sup>2</sup>AA et le proton H<sub>d</sub>, ainsi qu'avec le proton α de l'acide glutamique (Figure 37).



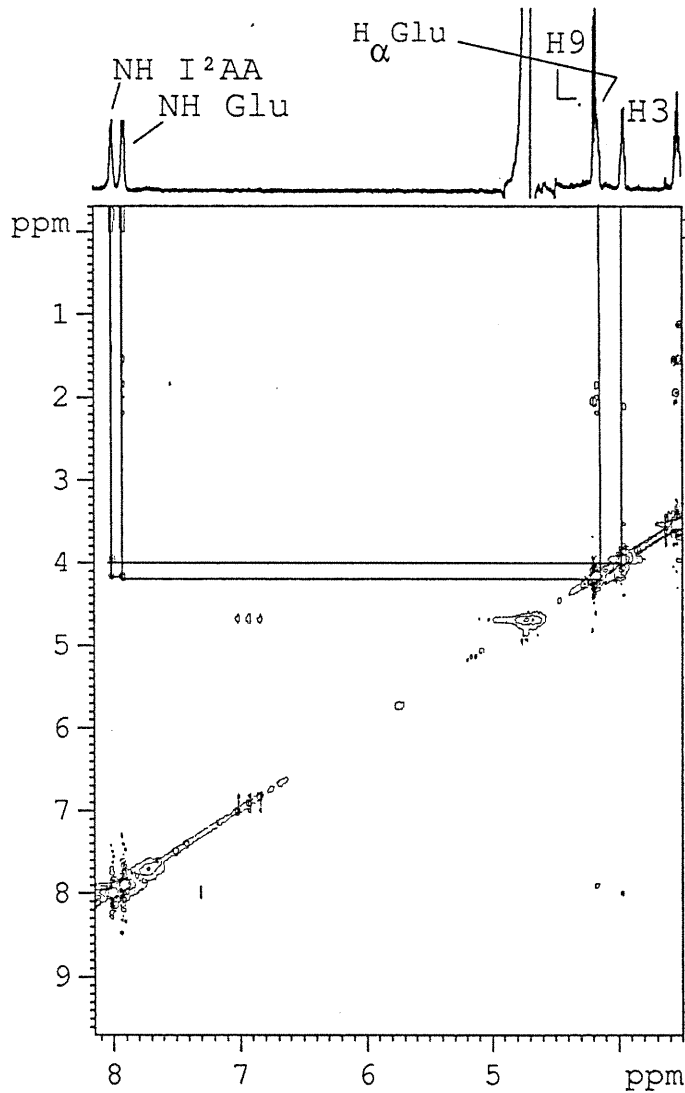
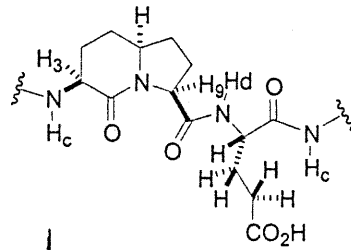


Figure 36: Spectre NOESY du peptide 7 dans 9:1 H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (6 mM, 600 MHz, 15 °C)

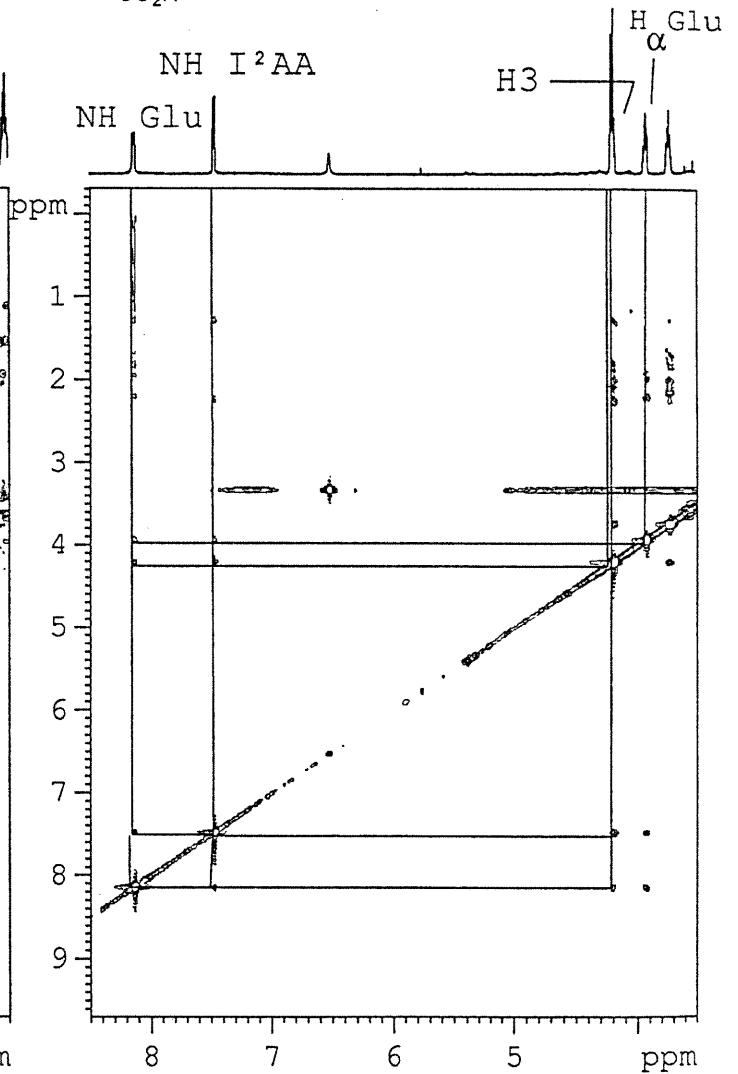
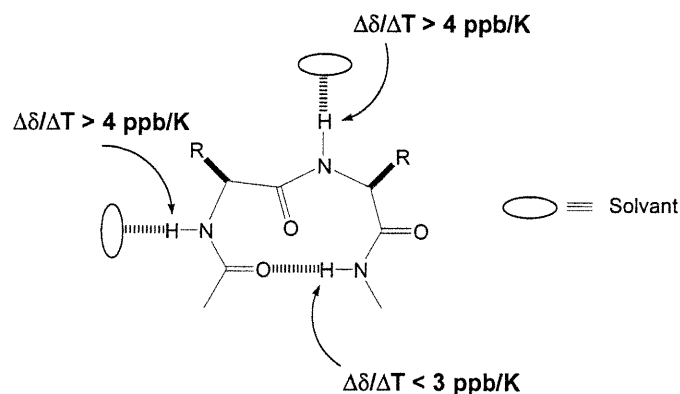


Figure 37: Spectre NOESY du peptide 7 dans le DMSO-d<sub>6</sub> (6 mM, 600 MHz, 25 °C)

### 3.4. INTERACTIONS AVEC L'ENVIRONNEMENT.

L'environnement d'un lien amide influence le déplacement chimique du proton amide. Les ponts hydrogène avec le solvant sont facilement brisés par une augmentation de température qui entraîne une baisse de l'entropie du système<sup>1</sup>. Les protons amide impliqués dans un pont hydrogène intramoléculaire seront moins affectés par une variation dans l'environnement que ceux exposés au solvant. Le coefficient de température d'un proton amide est déterminé en mesurant la variation du déplacement chimique de celui-ci en fonction de la variation de la température. La plupart des exemples de ces expériences ont été réalisées dans le DMSO<sup>6,7</sup> (Figure 38).

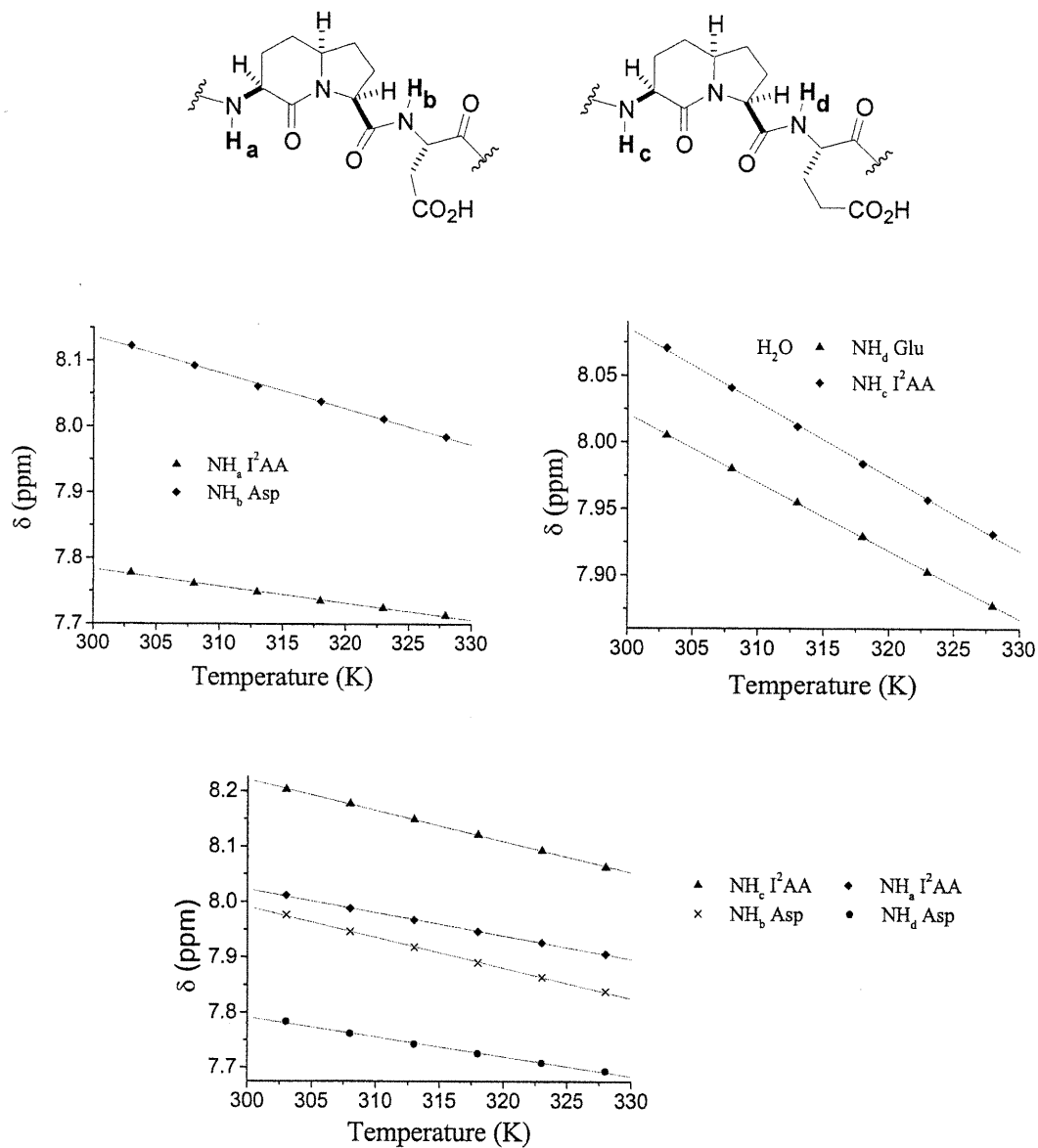


**Figure 38-1: Coefficients de température  $\Delta\delta/\Delta T$  des fonctions NH dans le DMSO<sup>1</sup>.**

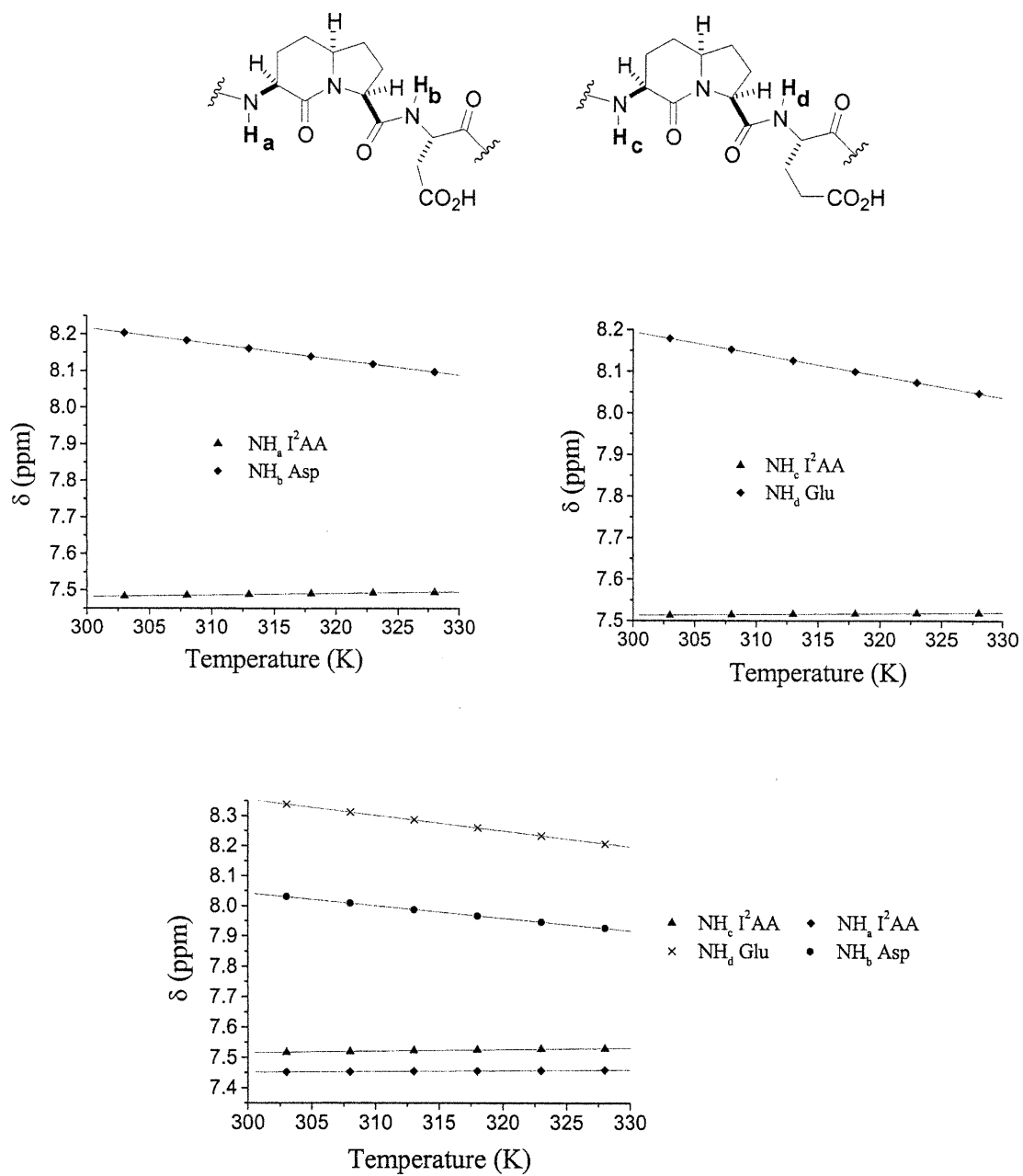
Dans le DMSO, un proton amide ayant un coefficient de température supérieur à 4 ppb/K est considéré comme étant exposé au solvant. Par contre, si son coefficient de température est inférieur à 3 ppb/K, le proton est considéré comme étant impliqué dans un pont hydrogène intramoléculaire<sup>1</sup>.

L'étude des coefficients de température des peptides 5-7 a été effectuée dans deux solvants, soit dans 9:1 H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (Tableau VI) et dans le DMSO (Tableau VII), en variant la température de 303 à 328 K par incrément de 5 K. Des graphiques

traduisant la variation des déplacements chimiques des protons amide obtenus par spectroscopie de RMN  $^1\text{H}$  en fonction de la température ont été tracés, et les pentes des droites correspondaient aux coefficients de température (Figures 38-2 et 38-3).



**Figure 38-2: Variation du déplacement chimique des protons amide des peptides 5-7 en fonction de la température dans 9:1  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ .**



**Figure 38-3: Variation du déplacement chimique des protons amide des peptides 5-7 en fonction de la température dans le DMSO.**

Peptide	NH <sub>a</sub> (I <sup>2</sup> AA)	NH <sub>c</sub> (I <sup>2</sup> AA)	NH <sub>b</sub> (Asp)	NH <sub>d</sub> (Glu)
5	<b>2.54</b>	---	5.46	---
6	4.18	5.58	5.51	<b>3.57</b>
7	---	5.58	---	5.13

Les valeurs de  $\Delta\delta/\Delta T$  indiquant un pont d'hydrogène intramoléculaire sont en gras.

**Tableau VI: Coefficients de température  $\Delta\delta/\Delta T$  ( $10^{-3}$  ppm/K) des protons des peptides 5-7 en fonction de la température dans 9:1 D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O.**

Peptide	NH <sub>a</sub> (I <sup>2</sup> AA)	NH <sub>c</sub> (I <sup>2</sup> AA)	NH <sub>b</sub> (Asp)	NH <sub>d</sub> (Glu)
5	<b>0.46</b>	---	4.27	---
6	<b>0.26</b>	<b>0.51</b>	4.14	5.23
7	---	<b>0.21</b>	---	5.27

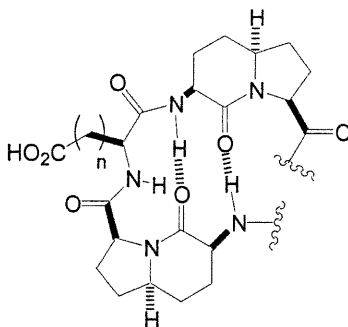
Les valeurs de  $\Delta\delta/\Delta T$  indiquant un pont d'hydrogène intramoléculaire sont en gras.

**Tableau VII: Coefficients de température  $\Delta\delta/\Delta T$  ( $10^{-3}$  ppm/K) des protons amide des peptides 5-7 dans le DMSO.**

Dans le cas du peptide **5**, le proton amide  $H_a(I^2AA)$  possède un  $\Delta\delta/\Delta T$  de 0.46 ppb/K dans le DMSO et de 2.54 ppb/K dans l'eau. Ce proton est donc impliqué dans un pont hydrogène intramoléculaire dans les deux solvants (Figure 39).

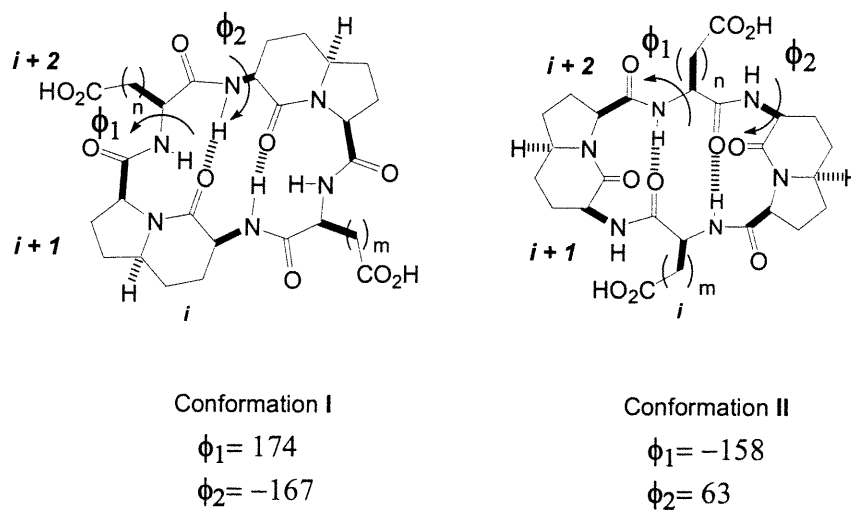
Le proton amide  $H_d(Glu)$  du peptide **6** possède un  $\Delta\delta/\Delta T$  de 3.57 ppb/K dans l'eau, indiquant sa participation dans un pont hydrogène dans ce solvant. Dans le DMSO, deux ponts hydrogène intramoléculaires sont observés impliquant les protons  $H_a(I^2AA)$  et  $H_c(I^2AA)$  avec des  $\Delta\delta/\Delta T$  de 0.51 ppb/K et 0.26 ppb/K respectivement (Figure 39).

Finalement, le proton amide  $H_c(I^2AA)$  du peptide **7** possède un  $\Delta\delta/\Delta T$  de 0.21 ppb/K dans le DMSO, ce qui démontre son implication dans un pont hydrogène intramoléculaire (Figure 39).



**Figure 39: Ponts hydrogène observés chez les peptides cycliques 5-7 par l'étude des coefficients de température des protons amide dans l'eau et le DMSO.**

Lors d'une recherche conformationnelle de MonteCarlo réalisée par Thouin et Lubell<sup>3</sup> sur le peptide **5**, deux minima d'énergie ont été observés (Figure 40).



**Figure 40: Conformations et angles dièdres minimisés du peptide 5.**

Dans la conformation **I**, les résidus I<sup>2</sup>AA occupent les positions  $i$  et  $i+1$  du tour  $\beta$  décalé, forçant les quatre fonctions NH à s'orienter vers l'intérieur du cycle. De plus, le proton amide des résidus I<sup>2</sup>AA est positionné adéquatement pour former un pont hydrogène intramoléculaire. Dans la conformation **II**, les I<sup>2</sup>AA occupent les positions  $i+1$  et  $i+2$  du tour  $\beta$ . Les fonctions NH des résidus I<sup>2</sup>AA sont ainsi orientées vers l'intérieur du cycle alors que celles des résidus aspartiques et glutamiques demeurent orientées vers l'intérieur.

Les valeurs expérimentales des angles dièdres du peptide **5** dans l'eau ( $\phi_1 = -95, -145$ ,  $\phi_2 = 82, 38, -75, -165$ ) et le DMSO ( $\phi_1 = -91, -149$ ,  $\phi_2 = 85, 35, -73, -166$ ) ont été comparées aux valeurs obtenues par analyse computationnelle (Figure 40). Mais il a été difficile de distinguer laquelle des deux conformations est adoptée par le peptide puisque la valeur  $\phi_2$  calculée par minimisation est présente dans les quatre valeurs de  $\phi_2$  obtenues expérimentalement, chez les deux conformères. Par contre, d'après les couplages dipolaires entre les protons amide observés dans les spectres NOESY (dans les deux solvants), il a été déduit que le *c*-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Asp-I<sup>2</sup>AA] (**5**)

adoptait une conformation où ses quatre protons amide étaient orientés vers l'intérieur du cycle. De plus, les protons amide  $H_a$  ( $I^2AA$ ) étaient impliqués dans des ponts hydrogène intramoléculaires, et les chaînes latérales de résidus aspartiques étaient positionnées au-dessus du cycle. Ceci a permis de conclure que le peptide **5** était présent dans la conformation **I** (Figure 40).

Dans le cas des  $c$ -[Asp- $I^2AA$ -Glu- $I^2AA$ ] (**6**) et  $c$ -[Glu- $I^2AA$ -Glu- $I^2AA$ ] (**7**), les études par spectroscopie RMN  $^1H$  ont tout d'abord montré un changement de conformation selon la nature du solvant. Dans le DMSO, les angles de torsion de ces peptides, calculés expérimentalement, étaient similaires à ceux du peptide **5**. De plus ces peptides ont présenté des couplages dipolaires de la même nature que ceux obtenus chez le peptide **5** dans les deux solvants. Aussi, les protons amide des résidus  $I^2AA$  étaient impliqués dans des ponts hydrogène intramoléculaires dans le DMSO. Les peptides **6** et **7** adoptent ainsi la même conformation que le peptide **5** dans ce solvant, c'est à dire la conformation **I**.

Par contre, il semblerait que les peptides **6** et **7** soient présents dans une conformation différente dans l'eau par rapport à celle adoptée dans le DMSO. Dans l'eau, l'absence des couplages dipolaires entre les protons amide ainsi que les valeurs de  $\Delta\delta/\Delta T$  supérieures à 4 ppb/K suggèrent que ces deux peptides ne soient pas présents dans la conformation **I**. De plus les valeurs des angles dièdres calculés expérimentalement pour le peptide **7** dans l'eau ( $\phi_1 = -153$ ,  $\phi_2 = 99$ ) suggèrent que la conformation qu'il adopte est possiblement la conformation **II** ( $\phi_1 = -158$ ,  $\phi_2 = 83$ ). Cependant, pour le peptide **6**, les angles de torsion calculés expérimentalement dans l'eau n'ont pas permis de distinguer entre les deux conformations.

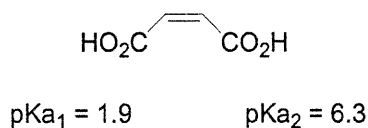


1. Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 521.
2. Wagner, G.; Braun, W.; Havel, T. F.; Schaumann, T.; Gö, N.; Wütrich, K. *J. Mol. Biol.* **1987**, *196*, 611
3. Thouin, E.; Lubell, W. D. Mémoire de Maîtrise: Nouveau Mimétisme du Site Actif des Protéases Aspartiques: Conception, Synthèse et Caractérisation du *cyclo*-[IAA-Asp-IAA-Asp], Université de Montréal, **1996**.
4. Wütrich, K.; Pardi, A.; Billeter, M. *J. Mol. Biol.* **1984**, *180*, 741.
5. Morita, H.; Yun, Y. S.; Takeya, K.; Itokawa, H.; Shiro, M. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 5987.
6. Ovchinnikov, Y. A.; Ivanov, V. T. *Tetrahedron* **1974**, *30*, 1871.
7. Ovchinnikov, Y. A.; Ivanov, V. T. *Tetrahedron* **1975**, *31*, 2177.

## CHAPITRE 4: CONSTANTES DE DISSOCIATION DES *c*-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Asp-I<sup>2</sup>AA] (5) et *c*-[Glu-I<sup>2</sup>AA-Glu-I<sup>2</sup>AA] (7).

Chez les protéases aspartiques telles la pepsine, les deux résidus aspartiques présents dans le site actif, Asp-32 et Asp-125, possèdent des valeurs différentes de pKa pour leur fonction acide de la chaîne latérale<sup>1,2</sup>. Asp-32 possède un pKa de 1.1, alors que celui de Asp-215 est de 4.5, et les études cristallographiques ont révélé la formation d'un pont d'hydrogène entre les deux fonctions acide à l'état solide. De même, l'étude des pKa des fonctions carboxyliques au sein du site actif de la ribonucléase H de *Escherichia coli*, une nucléase qui clive des chaînes d'ARN d'un hybride ADN/ARN, ont démontrés que Asp-10 possédait un pKa de 6.1 et Asp-70 un pKa de 2.6<sup>3</sup>. La structure obtenue par rayons-X de la protéine a suggéré une forte interaction entre ces deux résidus aspartiques.

Les différences de pKa observées chez ces deux enzymes ont été comparées à l'ionisation de l'acide maléique, dont les pKa sont 1.9 et 6.3 (Figure 41).



**Figure 41: Structure et constantes de dissociation de l'acide maléique.**

Cette différence notable entre les valeurs de pKa est due à l'interaction intramoléculaire entre les deux fonctions carboxyliques, et est retrouvée chez un grand nombre de composés dicarboxyliques<sup>3</sup>.

Les études conformationnelles des *c*-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Asp-I<sup>2</sup>AA] (**5**) et *c*-[Glu-I<sup>2</sup>AA-Glu-I<sup>2</sup>AA] (**7**) ont démontré que les chaînes latérales de ces peptides étaient positionnées au-dessus du squelette peptidique. Cette observation a donc permis de croire que les deux fonctions carboxyliques pourraient être suffisamment proches pour interagir ensemble.

Le titrage potentiométrique des constantes de dissociation des peptides **5** et **7** a été réalisé dans l'eau, à 25 °C. Pour cela, des solutions aqueuses de peptide (8 µM) ont été préparées puis acidifiées à pH < 2 avec une solution de HCl 0.1 N. Ces solutions ont été titrées par une solution aqueuse de NaOH. Les constantes de dissociation ont été déterminées selon le calcul du nombre de protons présents sur les carboxylates ( $n_{\text{H}^+}$ ), pour chaque volume de base ajouté, d'après l'équation de Simms<sup>4</sup>. Ce nombre résulte de la différence entre la quantité de protons en solution et celle détectée par l'électrode (Équation 2). Les pKa sont alors égaux aux pH où 1.5 et 0.5 protons sont installés sur le peptide.

Cette expérience n'a pas été réalisée sur le *c*-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Glu-I<sup>2</sup>AA] (**6**) car celui-ci contenait une impureté (détectée par la présence d'un épaulement sur le chromatogramme HPLC après purification) qui erronait l'acquisition des valeurs de pH.



Les fonctions carboxyliques en position  $\omega$  de l'acide aspartique et de l'acide glutamique possèdent des valeurs de pKa de 3.90 et 4.07 respectivement<sup>5</sup>. Les différences observées chez les peptides **5** et **7** ont suggéré qu'il existe dans l'eau une interaction entre les carboxylates des chaînes latérales. L'introduction des acides glutamiques a permis d'allonger les chaînes latérales du peptide cyclique, et la différence entre les pKa des deux fonctions acide a diminué de 3.1 à 2.8 unités en passant du peptide **5** au peptide **7**. Puisque les interactions électrostatiques entre les fonctions acides sont responsables de leur différence de pKa, il semblerait que la distance entre les carboxylates soit augmentée chez le peptide **7**.

1. Hsu, I.-N.; Delbaere, L. T. J.; James, M. N. G.; Hofmann, T. *Nature* **1977**, *266*, 140.
2. Blundell, T.; Jenkins, J.; Pearl, L.; Sewell, T.; Pedersen, V. *Aspartic Proteinases and their Inhibitors* (Kotska, V.; Ed.), Walter de Gruyter: Berlin, **1985**, pp151-161.
3. Oda, Y.; Yamazaki, T.; Nagayama, K.; Kanaya, S.; Kuroda, Y.; Nakamura, H. *Biochemistry* **1994**, *33*, 5275.
4. Simms, H. S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1926**, *48*, 1239.
5. Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W. *Fundamentals of Biochemistry*, John Wiley & Sons: New York, **1999**, p 81.

## CHAPITRE 5: CONCLUSION.

Les modèles du site actif des protéases aspartiques conçus consistaient en des peptides cycliques dont la conformation serait rigidifiée par l'introduction des résidus I<sup>2</sup>AA. Pour cela, le Fmoc-I<sup>2</sup>AA-OH (6*S*)-**14** a été synthétisé en solution à partir du (2*S*)-*N*-9-(9-PhF)glutamate de  $\alpha,\gamma$ -méthyle (**8**) en six étapes avec un rendement global de 33%. Le I<sup>2</sup>AA ainsi préparé a été incorporé dans trois peptides cycliques qui différaient par la nature des acides aminés comportant une fonction acide en position  $\omega$  de la chaîne latérale.

Une méthodologie de synthèse peptidique sur support solide a été choisie à cause de la rapidité avec laquelle les peptides peuvent être assemblés puisque aucune étape de purification n'est nécessaire pendant l'élongation. Les *c*-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Asp-I<sup>2</sup>AA] (**5**), *c*-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Glu-I<sup>2</sup>AA] (**6**) et *c*-[Glu-I<sup>2</sup>AA-Glu-I<sup>2</sup>AA] (**7**) ont été synthétisés en liant les acides aminés Asp et Glu via leur chaîne latérale sur un support solide. Pour cela, la fonction hydroxyle de la résine de Wang commerciale a été convertie en bromure (résine **21**), qui a été déplacé par les sels de césium de Asp et Glu (**18a** et **18b** respectivement). L'élongation des peptides a été effectuée en utilisant le TBTU comme réactif de couplage, alors que la cyclisation a été réalisée en présence de PyBOP. Après libération en solution et purification par HPLC, les peptides cycliques **5-7** ont été isolés avec des rendements de 8%, 22% et 12%, respectivement.

L'analyse conformationnelle des peptides **5-7** a été effectuée grâce à des expériences de spectroscopie RMN <sup>1</sup>H. Les angles dièdres ont été calculés à partir des constantes de couplage vicinales <sup>3</sup>J<sub>H<sub>N</sub> $\alpha$</sub> , les distances interatomiques ont été déterminées à partir des couplages dipolaires observés dans les spectres NOESY et les interactions avec l'environnement ont été évaluées par l'étude des coefficients de température des protons amides indiquant la présence de ponts hydrogène intramoléculaires.

Ces études ont permis de conclure que le peptide **5**, dans l'eau et le DMSO, adoptait une conformation dans laquelle les résidus I<sup>2</sup>AA occupaient les positions  $i$  et  $i+1$  d'un repliement  $\beta$  décalé (conformation I) et leur proton amides étaient impliqués dans des ponts hydrogène intramoléculaires. Cette conformation a été observée chez les peptides **6** et **7** seulement dans le DMSO.

Dans l'eau, le peptide **7** semblait adopter une conformation dans laquelle les résidus I<sup>2</sup>AA occupaient les positions  $i+1$  et  $i+2$  d'un repliement  $\beta$  (conformation II), d'après les valeurs des angles dièdres et l'absence des couplages dipolaires entre les protons amide, ainsi que l'absence de ponts hydrogène intramoléculaires des protons amide. Cependant, la conformation dans l'eau du peptide **6** n'a pas pu être défini.

La détermination des constantes de dissociation des fonctions carboxyliques des peptides **5** et **7** a indiqué pour chacun une différence d'environ trois unités des deux valeurs de pKa. Ceci a confirmé la proximité des fonctions carboxyliques, assurée par la présence des I<sup>2</sup>AA qui rigidifient le squelette peptidique, et la possibilité d'une interaction entre elles.

Afin de déterminer l'aptitude des  $c$ -[Asp-I<sup>2</sup>AA-Asp-I<sup>2</sup>AA] (**5**),  $c$ -[Asp-I<sup>2</sup>AA-Glu-I<sup>2</sup>AA] (**6**) et  $c$ -[Glu-I<sup>2</sup>AA-Glu-I<sup>2</sup>AA] (**7**) à agir en tant que modèles du site actif des protéases aspartiques, des expériences de catalyse de l'hydrolyse de liens esters ou amides activés devront être effectuées. Ces mimétiques pourront aussi être évalués en tant que modèles du site actif des protéases à zinc par l'ajout de sels de zinc pendant les expériences de catalyse d'hydrolyse.

Finalement, en modifiant la nature des acides aminés dans des peptides cycliques incorporant des I<sup>2</sup>AA, il serait possible de construire des modèles du site actif de différentes enzymes. Par exemple, le  $c$ [Cys-I<sup>2</sup>AA-His-I<sup>2</sup>AA] pourrait mimer le site actif des protéases à cystéine (référence 2a, p13).



## CHAPITRE 6: PARTIE EXPÉRIMENTALE

### 6.1 GÉNÉRALITÉS.

Toutes les réactions ont été effectuées sous atmosphère inerte d'azote. Le THF et le diéthyloxy ont été distillés sur du sodium/benzophénone; le dichlorométhane a été distillé sur du CaH<sub>2</sub>; la DIEA a été distillée sur de la ninhydrine puis du CaH<sub>2</sub>; la pyridine a été distillée sur du BaO. De l'eau déionisée a été utilisée pour effectuer les purifications par HPLC et la détermination des constantes de dissociation des peptides cycliques. Les spectres de masse à basse résolution (FABSM) et à haute résolution ont été obtenus du Centre Régional de Spectrométrie de Masse de l'Université de Montréal. Les caractérisations par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H (300/400/600 MHz) et <sup>13</sup>C (75/100 MHz) ont été effectués dans des solvants deutérés (CDCl<sub>3</sub>, 9:1 H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O, CD<sub>3</sub>OD, DMSO-d<sub>6</sub>). Les expériences de COSY et NOESY ont été réalisées à une concentration de 6 mM et obtenues avec 2048 par 512 points. Des temps de mixages des spectres NOESY étaient de 180 ou 500 ms. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en ppm et les constantes de couplage ( $J$ ) en Hertz (Hz). Les purifications par chromatographie éclairée ont été réalisées avec de la silice 230-400 mesh. Les analyses par HPLC ont été faites sur une colonne analytique C<sub>18</sub> (Higgins, 4.6 x 250 mm, 5 microns, 300 Å) et les purifications sur une colonne semi-préparative C<sub>18</sub> (Higgins, 20 x 250 mm, 5 microns, 300 Å), avec un détecteur UV à 214 nm. Les titrages potentiométriques ont été réalisés sur un titrateur Mettler Toledo DL53 muni d'une électrode en calomel Fisher 13-620-293.

## 6.2 SYNTHÈSE DE L'ACIDE (3*S*, 6*S*, 9*S*)-2-OXO-3-*N*-(Fmoc)AMINO-1-AZABICYCLO[4.3.0]NONANE-9-CARBOXYLIQUE (Fmoc-I<sup>2</sup>AA-OH).

### 6.2.1 (3*S*, 6*S*, 9*S*)-2-Oxo-3-*N*-(Fmoc)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate de méthyle ((6*S*)-15).

À une solution du sel d'acide acétique du (3*S*, 6*S*, 9*S*)-2-oxo-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate de méthyle<sup>1</sup> (**10**, 1.32 g, 5.33 mmol, préparé selon la référence 1) dans l'acétone (30 mL) est ajoutée une solution aqueuse (30 mL) de NaHCO<sub>3</sub> (1.75 g, 10.66 mmol). Après trente minutes d'agitation, du *N*-(9-fluorénylméthoxycarboxyloxy)succinimide (2 g, 5.86 mmol) est additionné au mélange réactionnel et le pH de la solution est ajusté à 9 avec du NaHCO<sub>3</sub> solide. Le mélange est agité pendant dix-huit heures à température ambiante, puis traité avec de l'acétate d'éthyle (50 mL) et la solution est acidifiée à pH 2 avec une solution de HCl 1N. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite une fois avec de l'acétate d'éthyle (30 mL). Les phases organiques sont combinées, lavées avec de la saumure (3 x 100 mL), séchées sur du sulfate de magnésium puis évaporées à sec. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne-flash de silice avec un gradient de 50-100% acétate d'éthyle-hexane pour obtenir (6*S*)-**15** comme une mousse blanche.

**Rendement:** 88% (2.04 g, 4.70 mmol).

**RMN <sup>1</sup>H:** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 1.71-1.80 (m, 3H); 2.04-2.26 (m, 4H); 2.51-2.56 (m, 1H); 3.76 (s, 3H); 4.16-4.25 (m, 2H); 4.34 (m, 2H); 4.52 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz); 5.94 (d, 1H, *J* = 5.2 Hz); 7.27-7.78 (m, 9H).

**RMN <sup>13</sup>C:** (CDCl<sub>3</sub>, 60 MHz) δ 27.2; 27.4; 29.5; 32.6; 47.5; 50.7; 52.9; 56.8; 58.7; 67.4; 120.3; 125.6; 127.5; 128.0; 141.7; 144.3; 156.5; 169.3; 172.5.

**FABMS:** *m/e* 431.5 (85, [MH]<sup>+</sup>).

**SMHR:** C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub> [MH]<sup>+</sup> calculé: 435.19199 obtenu: 435.19280.

**[α]<sub>D</sub>:** -65.1 (*c* 1.00, CH<sub>3</sub>OH)

### 6.2.2 Acide (3*S*, 6*S*, 9*S*)-2-oxo-3-*N*-(Fmoc)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylique ((6*S*)-14)<sup>2</sup>.

À une solution de NaOH (0.23g, 5.75 mmol) et de CaCl<sub>2</sub> (9.6 g, 86 mmol) l'eau (32 mL) préalablement agitée pendant 20 min est ajoutée une solution de l'ester (6*S*)-**15** (2.08 g, 4.80 mmol) dans l'isopropanol (73 mL). Le mélange est agité pendant quatre heures à température ambiante. La solution est acidifiée à pH 2 avec du HCl 1N et traitée avec l'acétate d'éthyle (100 mL). Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite une fois avec l'acétate d'éthyle (50 mL). Les phases organiques sont combinées, lavées avec de la saumure (3 x 100 mL), séchées sur du sulfate de magnésium puis évaporées à sec. Le résidu est purifié par chromatographie flash de silice avec un gradient de 50-100% acétate d'éthyle-hexane pour récupérer le produit de départ (6*S*)-**15** puis 0-10% méthanol-acétate d'éthyle contenant 1% d'acide acétique pour obtenir le produit désiré comme une mousse blanche.

**Rendement:** 82% (1.65 g, 3.92 mmol).

RMN  $^1\text{H}$ : ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  1.71-1.75 (m, 3H); 2.04-2.25 (m, 4H); 2.45-2.48 (m, 1H); 4.20-4.24 (m, 2H); 4.32 (m, 2H); 4.56 (d, 1H,  $J = 9.5$  Hz); 6.12 (d, 1H,  $J = 6.1$ ); 7.26-7.76 (m, 9H); 10.32 (s large, 1H).

RMN  $^{13}\text{C}$ : ( $\text{CDCl}_3$ , 60 MHz)  $\delta$  21.2; 29.2; 32.3; 37.2; 39.0; 50.7; 57.7; 59.1; 67.5; 120.3; 125.7; 127.5; 128.0; 141.6; 144.2; 163.7; 170.2; 174.3.

FABSM :  $m/e$  435.2 (73,  $[\text{MH}]^+$ ).

$[\alpha]_D$ : -45.0 ( $c$  0.41,  $\text{CH}_3\text{OH}$ )

### 6.3 SYNTHÈSE DU (2S)-N-(Fmoc)-ASPARTATE DE $\alpha$ -ALLYLE (18a) ET DU (2S)-N-(Fmoc)-GLUTAMATE DE $\alpha$ -ALLYLE (18b).

#### 6.3.1 (2S)-N-(Fmoc)-Aspartate de $\alpha$ -allyle $\beta$ -*tert*-butyle (17a) et du (2S)-N-(Fmoc)-glutamate de $\alpha$ -allyle $\gamma$ -*tert*-butyle (17b)<sup>3</sup>.

Une solution de (2S)-N-(Fmoc)-aspartate de  $\beta$ -*tert*-butyle (1.5 g, 3.64 mmol) dans l'acétonitrile (36 mL) est traitée avec l'iodure d'allyle (1.46 mL, 16 mmol) et la DIEA (1.45 mL, 7.29 mmol). Le mélange est porté à reflux pendant deux heures, puis le solvant est évaporé à sec. Le résidu est dissout dans l'acétate d'éthyle (40 mL) puis traité avec une solution froide de HCl 0.1N (40 mL). Les phases sont séparées et la phase organique est lavée deux fois avec une solution froide de HCl 0.1N (30 mL), trois fois avec de la saumure (100 mL), séchée sur du sulfate de magnésium puis évaporée. Le produit est purifié par chromatographie flash de silice avec un gradient de 5-30% acétate d'éthyle-hexane puis recristallisé dans un mélange d'ether-hexane pour obtenir un solide blanc floconneux.

**Rendement:** 78% (1.26 g, 2.86 mmol).

**RMN  $^1\text{H}$ :** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  1.47 (s, 9H); 2.80 (dd, 1H,  $J = 16.9$ ; 4.4); 2.99 (dd, 1H,  $J = 16.9$ , 4.7); 4.26 (t, 1H,  $J = 7.2$ ); 4.33-4.46 (m, 2H); 4.63-4.68 (m, 2H); 5.25-5.37 (m, 2H); 5.85-5.93 (m, 2H); 7.30-7.78 (m, 9H).

**RMN  $^{13}\text{C}$ :** ( $\text{CDCl}_3$ , 60 MHz)  $\delta$  28.4; 38.2; 47.5; 51.0; 66.7; 67.7; 82.3; 119.2; 120.4; 125.5; 127.5; 128.1; 131.9; 141.7; 144.2; 156.4; 170.4; 171.1.

**FABSM:**  $m/e$  452.2 (23,  $[\text{MH}]^+$ ).

**SMHR:**  $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_6\text{N}$   $[\text{MH}]^+$  calculé: 452.2073, obtenu: 452.2065

$[\alpha]_{\text{D}}$ : -19.0 ( $c$  1.02,  $\text{CH}_3\text{OH}$ )

**P.f.:** 84-85 °C

Le (2*S*)-*N*-(Fmoc)-glutamate de  $\alpha$ -allyle  $\beta$ -*tert*-butyle est préparé selon le même protocole à partir du (2*S*)-*N*-(Fmoc)-glutamate de  $\beta$ -*tert*-butyle (0.89 g, 2.00 mmol) en présence d'iodure d'allyle (0.73 mL, 8.00 mmol) et de DIEA (0.80 mL, 4.00 mmol) dans l'acétonitrile (20 mL). Le produit désiré est purifié par chromatographie sur colonne-flash de silice avec un gradient de 5-30% acétate d'éthyle-hexane puis recristallisé dans un mélange d'ether-hexane pour obtenir un solide blanc floconneux.

**Rendement:** 100% (0.93 g, 2 mmol).

**RMN  $^1\text{H}$ :** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  1.47 (s, 9H); 1.99-2.07 (m, 1H); 2.23-2.31 (m, 1H); 2.34-2.37 (m, 2H); 4.23-4.25 (t, 1H,  $J = 7.0$ ); 4.38-4.45 (m, 2H); 4.66-4.67 (d, 2H,  $J = 5.5$ ); 5.26-5.37 (m, 2H); 5.54-5.56 (d, 1 H,  $J = 8.2$ ); 5.92-5.98 (m, 1H); 7.34-7.78 (m, 9H).

**RMN  $^{13}\text{C}$ :** ( $\text{CDCl}_3$ , 60 MHz)  $\delta$  28.5; 31.9; 32.0; 47.6; 54.0; 66.5; 67.5; 81.3; 119.4; 120.4; 125.5; 127.5; 128.1; 131.9; 141.7; 144.2; 156.4; 172.1; 172.4.

**FABSM:**  $m/e$  466.2 (8,  $[\text{MH}]^+$ ).

**SMHR:**  $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_6\text{N}$   $[\text{MH}]^+$  calculé: 466.2230, obtenu: 466.2220.

**$[\alpha]_D$ :** -13.5 ( $c$  1.00,  $\text{CH}_3\text{OH}$ )

**P.f.:** 69-70 °C.

### 6.3.2 (2*S*)-*N*-(Fmoc)-aspartate de $\alpha$ -allyle (18a) et (2*S*)-*N*-(Fmoc)-glutamate de $\alpha$ -allyle (18b).

À une solution de 25% TFA-dichlorométhane (30 mL) est ajouté le (2*S*) *N*-(Fmoc)-aspartate de  $\alpha$ -allyle  $\beta$ -*tert*-butyle (17a, 1.26 g, 2.86 mmol) et le mélange est agité à température ambiante pendant dix-huit heures. Le solvant est évaporé à sec et le résidu est recristallisé dans un mélange d'ether-hexane. Le produit est ainsi obtenu sous forme de cristaux blancs.

**Rendement:** 100% (1.15 g, 2.86 mmol).

**RMN  $^1\text{H}$ :** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  2.90-2.98 (dd, 1H,  $J = 17.6, 4.4$ ); 3.08-3.15 (dd, 1H,  $J = 17.5, 4.4$ ); 4.19-4.24 (t, 1H,  $J = 6.8$ ); 4.33-4.72 (m, 4H); 5.22-5.34 (m, 2H); 5.81-5.92 (m, 2H); 7.27-7.75 (m, 9H); 10.66 (s, 1H).

**RMN  $^{13}\text{C}$ :** ( $\text{CDCl}_3$ , 60 MHz)  $\delta$  36.8; 47.4; 50.6; 67.0; 67.8; 119.5; 120.4; 125.5; 127.5; 128.2; 131.7; 141.7; 144.0; 156.6; 170.7; 176.6.

**FABSM:**  $m/e$  396.1 (24,  $[\text{MH}]^+$ ).

**SMHR:** C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>N [MH]<sup>+</sup> calculé: 396.1447, obtenu: 396.1459.

**[α]<sub>D</sub>:** -18.5 (c 1.04, CH<sub>3</sub>OH)

**P.f.:** 94-95 °C

Le (2*S*)-*N*-(Fmoc)-glutamate de α-allyle (**18b**) est préparé selon le même protocole à partir du (2*S*)-*N*-(Fmoc)-glutamate de α-allyle β-*tert*-butyle (**17a**, 0.93 g, 2 mmol) dans une solution de 25% TFA-dichlorométhane (20 mL). Le produit désiré est recristallisé dans un mélange d'ether-hexane sous forme de solide blanc floconneux.

**Rendement:** 100% (0.82 g, 2 mmol).

**RMN <sup>1</sup>H:** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 1.93-2.20 (m, 1H); 2.22-2.37 (m, 1H); 2.41-2.47 (m, 2H); 4.19 (t, 1H, *J* = 6.8); 4.38-4.48 (m, 3H); 4.58-4.64 (m, 2H); 5.23-5.35 (m, 2H); 5.54-5.56 (d, 1H, *J* = 8.2); 5.82-5.93 (m, 1H); 7.27-7.75 (m, 9H).

**RMN <sup>13</sup>C:** (CDCl<sub>3</sub>, 60 MHz) δ 27.8; 30.3; 47.5; 53.6; 66.7; 67.5; 119.7; 120.4; 125.5; 127.5; 128.2; 131.7; 141.7; 144.1; 156.5; 172.0; 178.6.

**FABSM:** m/e 410.0 (33, [MH]<sup>+</sup>).

**SMHR:** C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub>N [MH]<sup>+</sup> calculé: 410.16037, obtenu: 410.15850.

**[α]<sub>D</sub>:** -22.5 (c 1.03, CH<sub>3</sub>OH)

**P.f.:** 119 °C.

## 6.4 SYNTHÈSE SUR SUPPORT SOLIDE DES *c*-[Asp-I<sup>2</sup>AA-Asp-I<sup>2</sup>AA] (5), *c*-[Glu-I<sup>2</sup>AA-Asp-I<sup>2</sup>AA] (6) et *c*-[Glu-I<sup>2</sup>AA-Glu-I<sup>2</sup>AA] (7).

### 6.4.1 Synthèse du 4-(bromométhyl)phénoxyméthylpolystyrène réticulé (21)<sup>4</sup>.

À une suspension du 4-(hydroxyméthyl)phénoxyméthylpolystyrène réticulé (20, résine de Wang, Advanced Chemtech, 2 g, 1 mmol/g, 2 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) est introduite de la triphénylphosphine (1.06 g, 4 mmol) et le mélange est refroidit à 0 °C dans un bain de glace. Du tétrabromure de carbone (1.33 g, 4 mmol) est ensuite ajouté et le mélange est agité avec des bulles d'azote pendant deux heures à température ambiante. La résine est filtrée, lavée avec du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20 mL), de l'isopropanol (3 x 20 mL) puis du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20 mL). La résine est finalement séchée sous vide à l'aide d'une pompe mécanique et la conversion est confirmée par FTIR photoacoustique en observant la disparition de la bande OH à 3500 cm<sup>-1</sup>.

**PAFTIR:** 610 cm<sup>-1</sup> (C-Br, s)

### 6.4.2 Ancrage du (2*S*)-*N*-(Fmoc)-aspartate de α-allyle (18a) et du (2*S*)-*N*-(Fmoc)-glutamate de α-allyle (18b) sur la résine (21).

Une solution de (2*S*)-*N*-(Fmoc)-aspartate de α-allyle (18a, 0.49 g, 1.25 mmol) dans un mélange de 25% eau-éthanol (17 mL) est traitée avec du CsHCO<sub>3</sub> (0.25 g, 1.37 mmol, préalablement séché dans une étuve à 110 °C pendant 24 h et refroidit dans un dessiccateur), agitée pendant 15 minutes et les solvants sont évaporés. Le



résidu est séché par distillation azéotropique de l'eau en présence de benzène puis placé dans un dessiccateur sous vide pendant 12 heures. Le sel de césium du (2*S*)-*N*-(Fmoc)-aspartate de  $\alpha$ -allyle (0.65 g, 1.26 mmol) est ensuite mis en présence d'une suspension de la résine brominée (3.15 g, 1 mmol/g, 3.15 mmol) dans du DMF (31 mL). Le mélange est chauffé à 50 °C et agité avec des bulles d'azote pendant 18 heures. La résine est ensuite filtrée, lavée avec du DMF (3 x 30 mL), du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 30 mL), de l'isopropanol (3 x 30 mL), du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 30 mL) et séchée sous vide à l'aide d'une pompe mécanique.

Le (2*S*)-*N*-(Fmoc)-glutamate de  $\alpha$ -allyle (0.69 mg, 1.27 mmol) est ancré de manière analogue sur la résine (3.15 g, 1 mmol/g, 3.15 mmol).

#### 6.4.3 Détermination du degré de substitution des résines 22a-b.

Deux échantillons de résines **22a-b** (50 mg) sont mis en suspension dans une solution de 50% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) et agités avec des bulles d'azote pendant 20 minutes. Les résines sont filtrées, lavées avec du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 4 mL) et les filtrats sont récupérés puis évaporés à sec. Les résines sont traitées deux autres fois selon cette séquence. Les masses et puretés du (2*S*)-*N*-(Fmoc)-aspartate de  $\alpha$ -allyle et du (2*S*)-*N*-(Fmoc)-glutamate de  $\alpha$ -allyle obtenues permettent de calculer le degré de substitution de la résine, soit 0.3 mmol/g, en utilisant l'équation suivante:

$$L = n_{aa} / M_{(résine)}$$

L: Degré de substitution en mmol/g;

$n_{aa}$ : nombre de mmol d'acide aminé recueilli;

$M_{(résine)}$ : Masse de l'échantillon de résine en g.

**Équation 3: Détermination du degré de substitution de la résine.**

**6.4.4 Synthèse des peptides linéaires Fmoc-I<sup>2</sup>AA-Asp(O-*t*-Bu)-I<sup>2</sup>AA-Asp(O-Wang)O-Allyle (25a), Fmoc-I<sup>2</sup>AA-Glu(O-*t*-Bu)-I<sup>2</sup>AA-Asp(O-Wang)O-Allyle (25b) et Fmoc-I<sup>2</sup>AA-Glu(O-*t*-Bu)-I<sup>2</sup>AA-Glu(O-Wang)O-Allyle (25c).**

La résine Fmoc-Asp(O-Wang)O-Allyle (**22a**, 2.15 g, 0.64 mmol) est mise en suspension dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, traitée avec de l'anhydride acétique (1.44 mL, 15.0 mmol), de la DIEA (1.2 mL, 15.0 mmol) et agitée avec des bulles d'azote pendant trois heures. La résine est ensuite filtrée, lavée avec du DMF (3 x 20 mL), de l'isopropanol (3 x 20 mL), du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20 mL) et de l'ether (3 x 20 mL). La résine est par la suite mise en suspension dans une solution de 20% pipéridine/DMF (20 mL) et agitée avec des bulles d'azote pendant 10 minutes. La résine est filtrée puis retraitée dans les mêmes conditions. Après filtration, la résine est lavée avec du DMF (3 x 20 mL), de l'isopropanol (3 x 20 mL), une solution de 0.4% HCl/DMF (3 x 20 mL) puis du DMF (3 x 20 mL). La résine est ensuite traitée avec une solution contenant du Fmoc-I<sup>2</sup>AA-OH (295 mg, 0.71 mmol), du TBTU (232 mg, 0.71 mmol) et de la DIEA (180 µL, 2.13 mmol) dans du DMF (20 mL). Le mélange est agité avec des bulles d'azote pendant 2 heures. La résine est filtrée, lavée avec du DMF (3 x 20 mL), de l'isopropanol (3 x 20 mL) et du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20 mL). Le couplage complet est confirmé par un test à la ninhydrine négatif. Deux autres séquences similaires sont effectuées pour coupler le Fmoc-Asp(O-*t*-Bu)-OH (395 mg, 0.96 mmol) et le Fmoc-I<sup>2</sup>AA-OH (295 mg, 0.71 mmol).

Les Fmoc-I<sup>2</sup>AA-Glu(O-*t*-Bu)-I<sup>2</sup>AA-Asp(O-Wang)O-Allyle et Fmoc-I<sup>2</sup>AA-Glu(O-*t*-Bu)-I<sup>2</sup>AA-Glu(O-Wang)O-Allyle sont assemblés de la même manière sur 2.0 g, 0.60 mmol de résine **22b** et 2.25 g, 0.67 mmol de résine **22c**, respectivement.

À la fin du dernier couplage, les résines **25a-c** obtenues sont lavées avec du DMF (3 x 20 mL), de l'isopropanol (3 x 20 mL) et du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20 mL) puis séchées sous vide à l'aide d'une pompe mécanique.

#### 6.4.5 Préparation du tétrakistriphénylphosphine palladium<sup>5</sup>.

Une solution de triphénylphosphine (419 mg, 1.6 mmol) dans du toluène sec (60 mL) est traitée avec de l'acétate de palladium (90 mg, 0.4 mmol) puis agitée jusqu'à l'obtention d'une couleur jaune suite à dissolution de tout le sel de palladium. Le solvant est évaporé et la poudre jaune obtenue est séchée sous vide sur une pompe mécanique.

#### 6.4.6 *Cyclo*-[I<sup>2</sup>AA-Asp(OH)-I<sup>2</sup>AA-Asp(OH)] (5), *cyclo*-[I<sup>2</sup>AA-Glu(OH)-I<sup>2</sup>AA-Asp(OH)] (6) et *cyclo*-[I<sup>2</sup>AA-Glu(OH)-I<sup>2</sup>AA-Glu(OH)] (7).

La résine Fmoc-I<sup>2</sup>AA-Asp(O-*t*-Bu)-I<sup>2</sup>AA-Asp(O-Wang)O-Allyle (0.64 mmol) séchée est mise en suspension dans une solution de 1:1 THF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (64 mL, préalablement dégazée pendant 30 min avec de l'azote) dans un réacteur à synthèse sur support solide en verre, et agitée avec des bulles d'azote. La suspension est ensuite traitée avec du Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (fraîchement préparé, 55 mg, 0.06 mmol) et de la dimédone (713 mg, 6.4 mmol). Le réacteur est mis sous atmosphère d'azote, scellé avec un bouchon en verre et agité sur un agitateur Burrel Wrist Action® Shaker pendant dix-huit heures. La résine est ensuite filtrée, lavée avec du DMF (3 x 30 mL), 0.5% v/v DIEA et 0.5% m/v Et<sub>2</sub>NCS<sub>2</sub>Na dans du DMF (3 x 30 mL), du DMF (3 x 30 mL), de l'isopropanol (3 x 30 mL), du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 30 mL) et de l'éther (3 x 30 mL). Le clivage de l'ester allylique est confirmé après libération d'un échantillon du peptide de la résine (50 mg) par traitement avec 50% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 2 mL, 2 x

20 min) suivi d'une analyse du matériel brut par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) en observant la disparition des signaux allyliques à  $\delta$  4.7 (d, 2H), 5.3 (m, 2H) et 5.9 (m, 1H).

La résine est par la suite soumise aux conditions de déprotection du groupe Fmoc avec 20% pipéridine/DMF (2 x 20 mL, 2 x 20 min) puis lavée avec du DMF (3 x 20 mL), une solution de 0.4% v/v HCl (12 M)/DMF (3 x 20 mL), du DMF (3 x 20 mL), de l'éther (3 x 20 mL), du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 20 mL) et de la NMP (3 x 20 mL). Après suspension de la résine dans de la NMP (20 mL), celle-ci est traitée avec de la 2,6-lutidine (224  $\mu\text{L}$ , 1.92 mmol) et du PyBOP (480 mg, 0.96 mmol) puis agitée pendant une heure. De la DIEA (160  $\mu\text{L}$ , 1.92 mmol) est ensuite ajoutée et la résine est agitée pendant une heure supplémentaire. Suite à un test à la ninhydrine négatif, la résine est lavée avec de la NMP (3 x 20 mL), de l'isopropanol (3 x 20 mL) et du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 20 mL). La totalité de la résine est finalement traitée avec une solution de 50% TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 30 mL, 3 x 30 min) et les filtrats sont combinés puis évaporés à sec. Le peptide a été mis en suspension dans de l'éther puis ré évaporé trois fois pour obtenir 373 mg de peptide brut. Le peptide brut est séparé en cinq fractions qui sont purifiés par HPLC semi-préparative en phase inverse avec un gradient d'eau contenant 0.05% TFA (A) et de 75% acétonitrile/eau contenant 0.005% TFA (B). Un gradient d'éluion de 0 à 18 % B/A sur 50 min est utilisé avec un débit de 20 mL/min et la longueur d'onde est fixée à 214 nm. Après lyophilisation des échantillons contenant du produit pur suite à l'injection des fractions contenant du peptide sur une colonne analytique (0-50% B/A, 214 nm), 23 mg de *cyclo*[I<sup>2</sup>AA-Asp(OH)-I<sup>2</sup>AA-Asp(OH)] (**5**) sont obtenus, ce qui représente un rendement global de 8%.

Les *cyclo*[I<sup>2</sup>AA-Glu(OH)-I<sup>2</sup>AA-Asp(OH)] (6) et *cyclo*[I<sup>2</sup>AA-Glu(OH)-I<sup>2</sup>AA-Glu(OH)] (7) sont préparés de manière similaire pour obtenir respectivement 176 mg et 419 mg de peptide brut. Après purification, 40 et 51 mg de peptide sont obtenus respectivement, correspondant à des rendements de 22% et 12%.

Peptide	Temps de rétention (min)	FABMS <i>m/e</i>
5	11.04	591
6	11.93	605
7	12.95	619

**Tableau VIII: Temps de rétention et masses obtenues par FABMS des peptides**

**5-7.**

## **6.5 TEST À LA NINHYDRINE (TEST DE KAISER) POUR LA DÉTERMINATION DE LA PRÉSENCE D'AMINES LIBRES SUR LE SUPPORT SOLIDE<sup>6</sup>.**

### **Préparation de la solution A.**

Du phénol (80 g) est dissout dans de l'éthanol (20 mL). Une solution aqueuse de 0.001 M de cyanure de potassium (2 mL) est ajouté, ainsi que de la pyridine distillée sur KOH (98 mL).

### **Préparation de la solution B.**

De la ninhydrine (5 g) est dissoute dans de l'éthanol (100 mL).

Un de la solution **A** et deux gouttes de la solution **B**. Le tube est scellé puis chauffé à 100 °C pendant dix minutes.

L'apparition d'une couleur violette sur les billes de résine indique un test positif, soit la présence d'amines libres. Sinon le test est négatif indiquant que la réaction de couplage est complète.

6.6 CONSTANTES DE DISSOCIATION DES  $c$ -[I<sup>2</sup>AA-Asp(OH)-I<sup>2</sup>AA-Asp(OH)] (5) et  $c$ -[I<sup>2</sup>AA-Glu(OH)-I<sup>2</sup>AA-Glu(OH)] (7).

Deux échantillons de peptide **5** (4.8 mg, 8.1  $\mu$ mol et 4.7 mg, 8.0  $\mu$ L) ont été dissous dans de l'eau (0.6 mL), et le pH des solutions a été ajusté à 1.6 par addition de HCl 0.1 N (0.1 mL). La solution titrante utilisée était une solution aqueuse de NaOH (19.9 mM) dont la concentration a été déterminée suite à un titrage avec la solution de HCl 0.1 N.

Les titrages du peptide **7** ont été effectués de la même manière sur deux échantillons du peptide (5.1 mg, 8.3  $\mu$ mol et 5.0 mg, 8.1  $\mu$ mol).

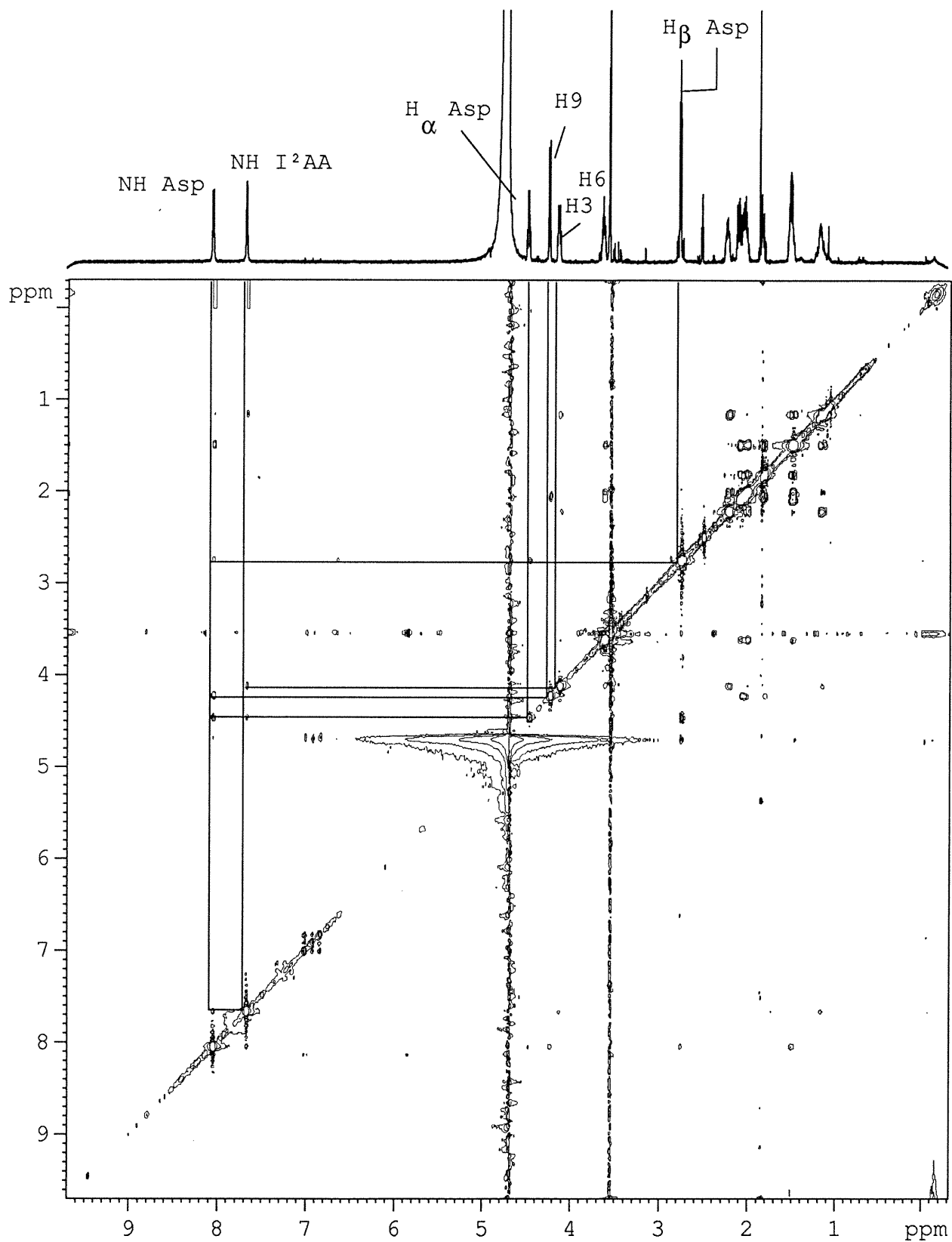
Peptide	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>	$\Delta$ pKa
5			
Echantillon 1	3.33	6.42	3.09
Echantillon 2	3.37	6.47	3.10
<b>Moyenne</b>	<b>3.35</b>	<b>6.45</b>	<b>3.10</b>
7			
Echantillon 1	3.70	6.57	2.87
Echantillon 2	3.62	6.50	2.88
<b>Moyenne</b>	<b>3.66</b>	<b>6.54</b>	<b>2.88</b>

**Tableau IX: Valeurs de pKa obtenus par le titrage potentiométrique des peptides 5 et 7.**

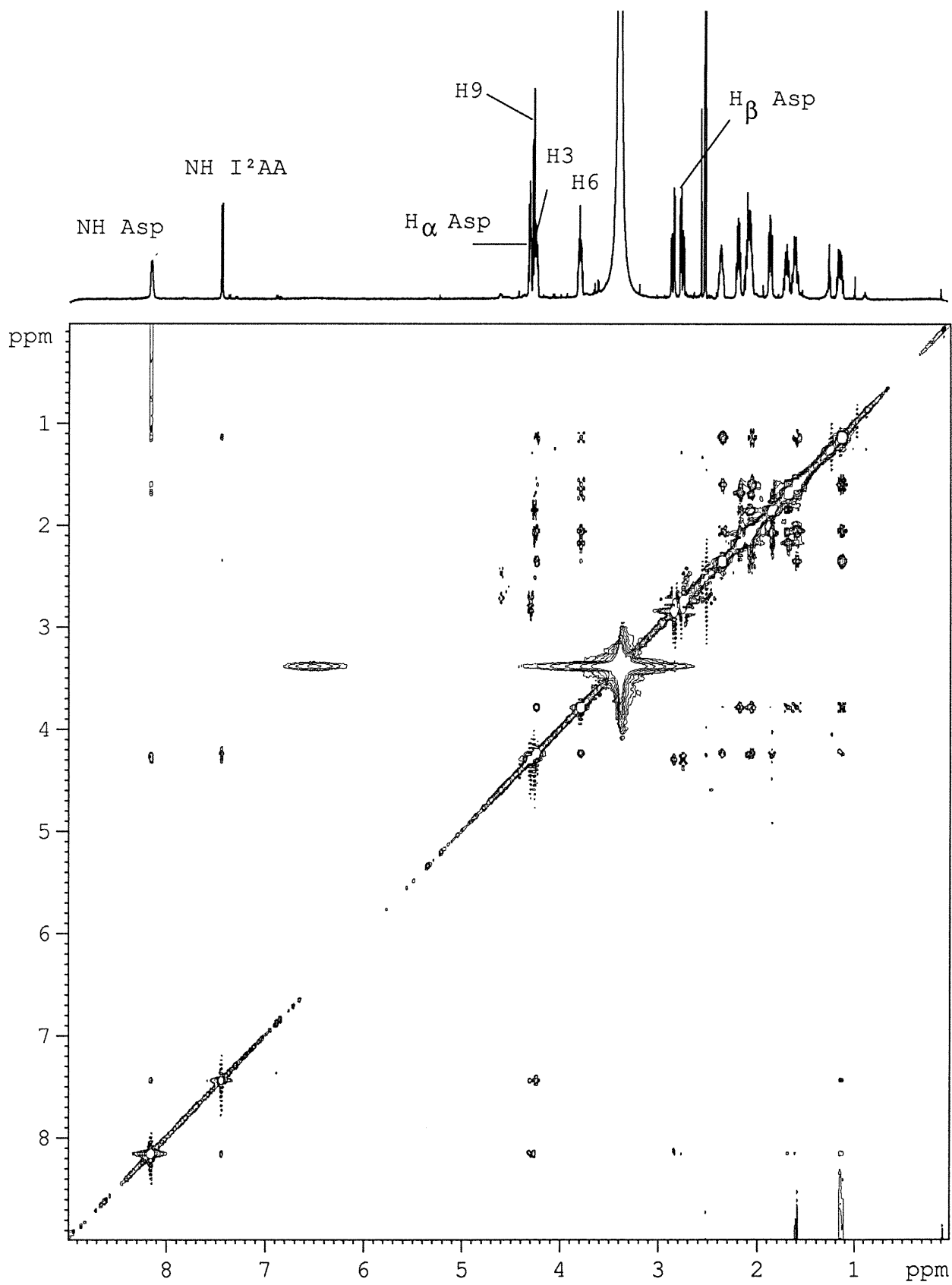
- 1 Lombart, H.-G.; Lubell, W.D. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9437.
- 2 Pascal, R.; Sola, R. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5031.
- 3 Gosselin, F.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2163.
- 4 Ngu, K.; Patel, D. V. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 973.
- 5 Uenishi, J., Kawahama, R., Yonemitsu, O. and Tsuji, J. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8965.
- 6 Kaiser, E. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595.



## **ANNEXES**

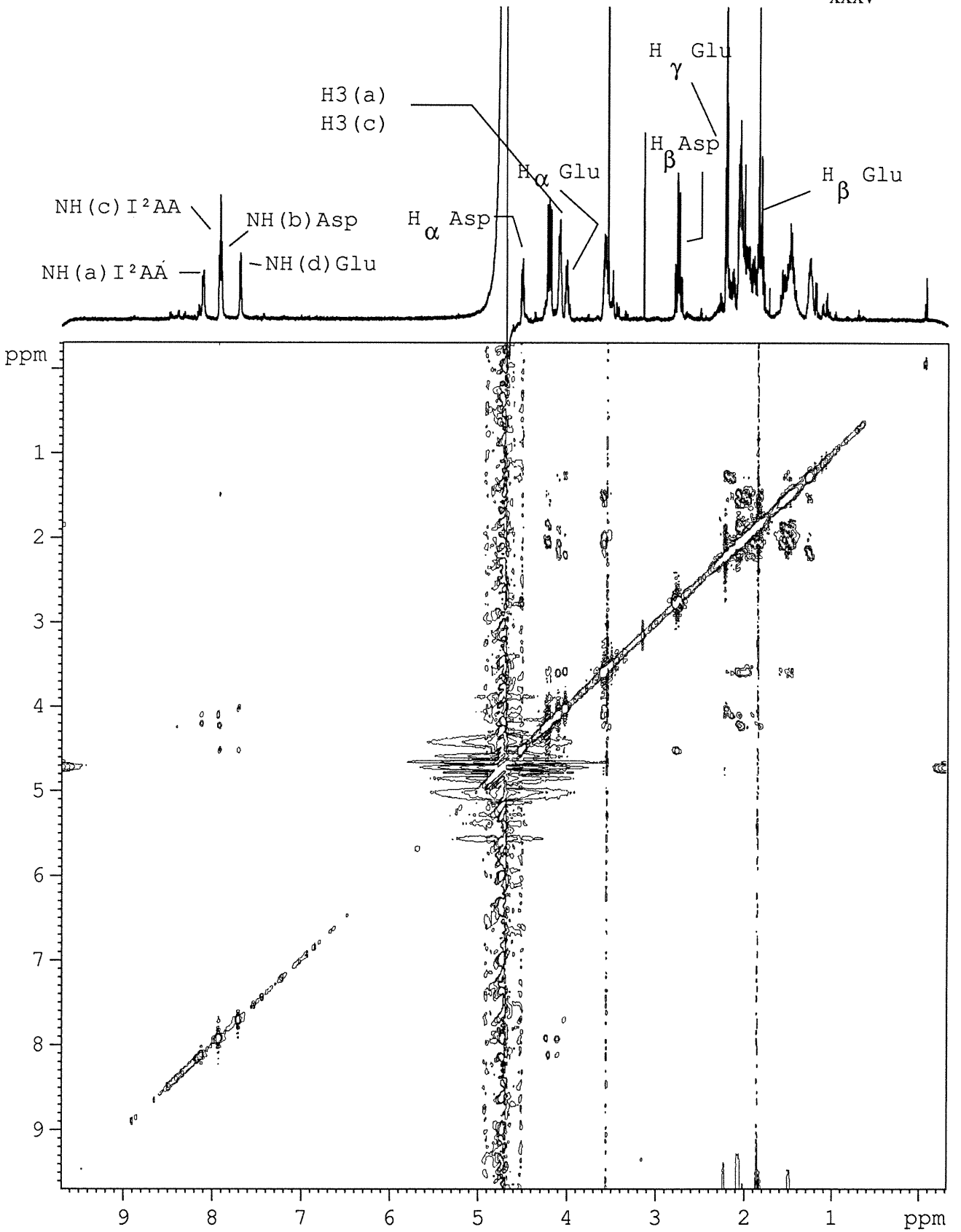
Spectre NOESY du peptide 6 dans 9:1 H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O

(6 mM. 600 MHz. 15 °C)



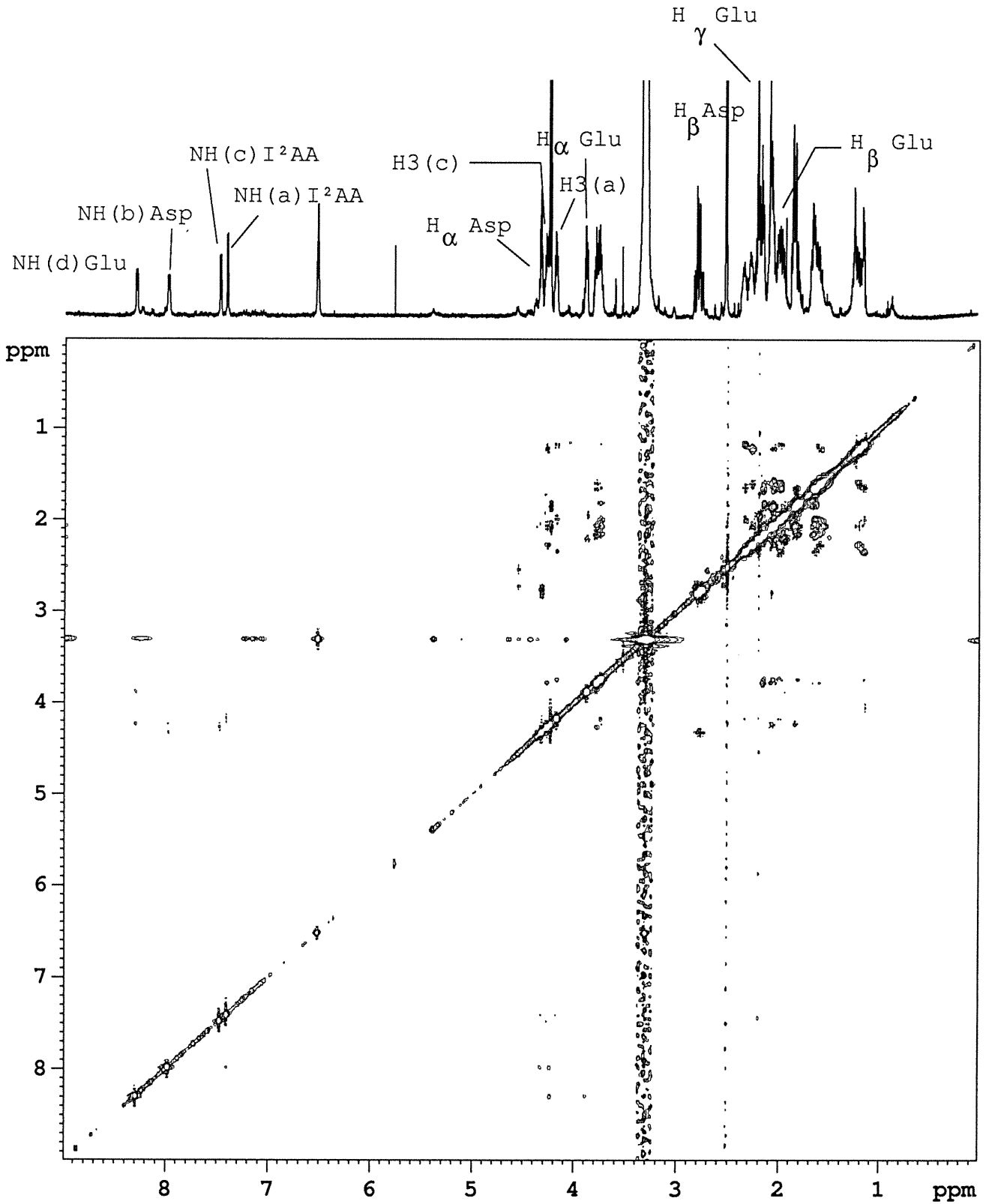
Spectre NOESY du peptide 5 dans le DMSO-d6

(6 mM, 600 MHz, 25 °C)

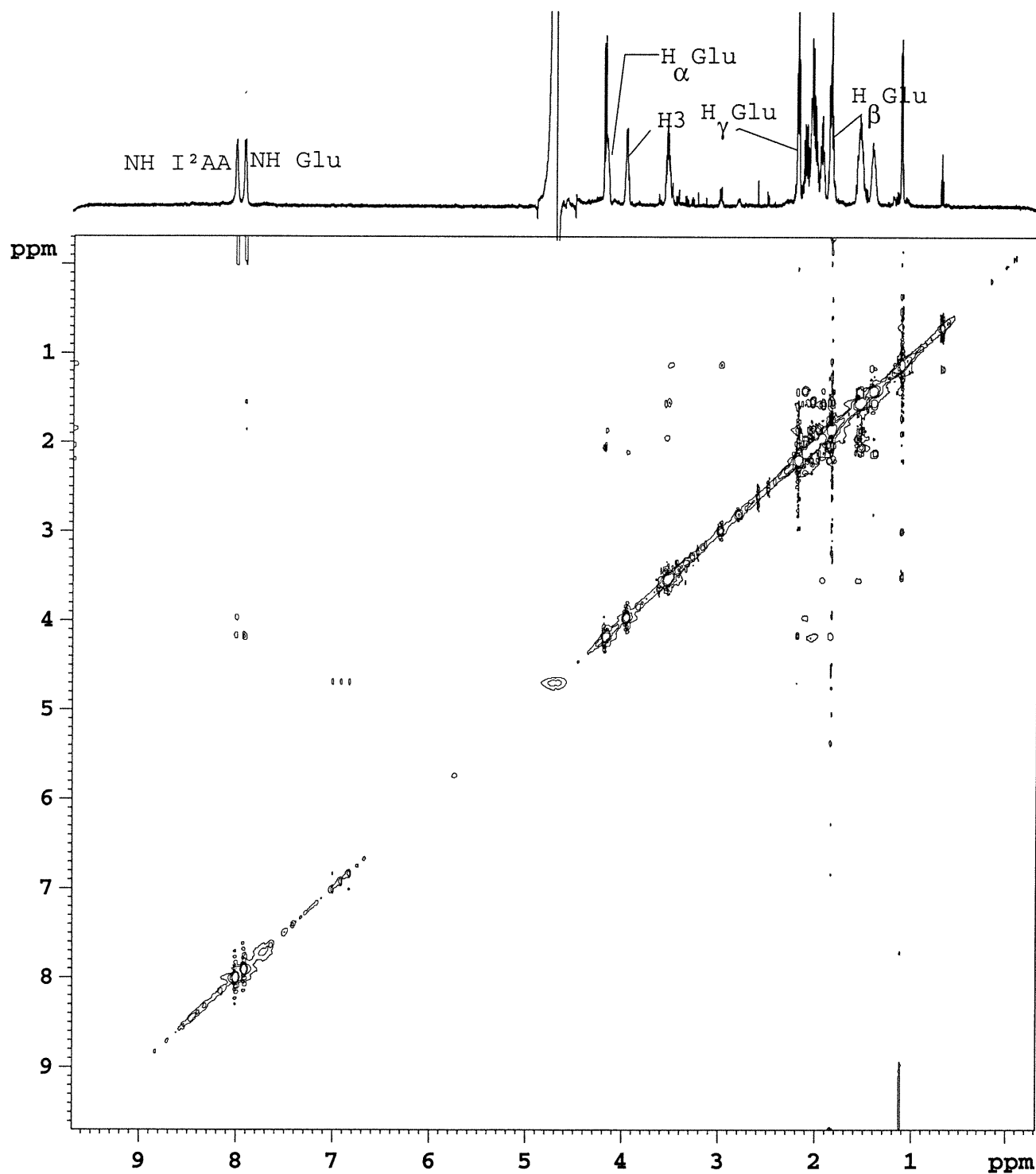


Spectre NOESY du peptide 6 dans 9:1 H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O

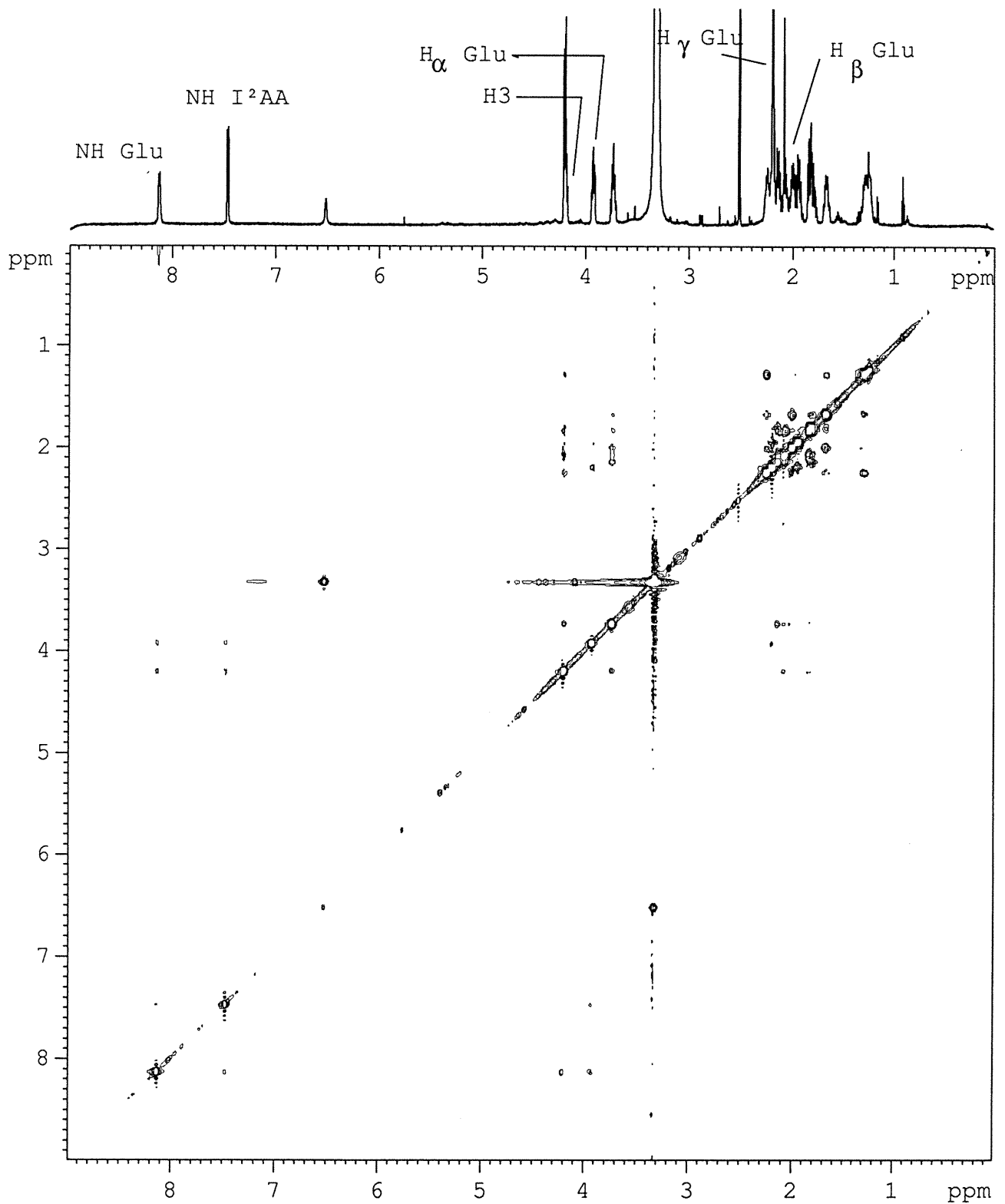
(6 mM, 600 MHz, 15 °C)

Spectre NOESY du peptide 6 dans le  $\text{DMSO-d}_6$ 

(6 mM, 600 MHz, 25 °C)

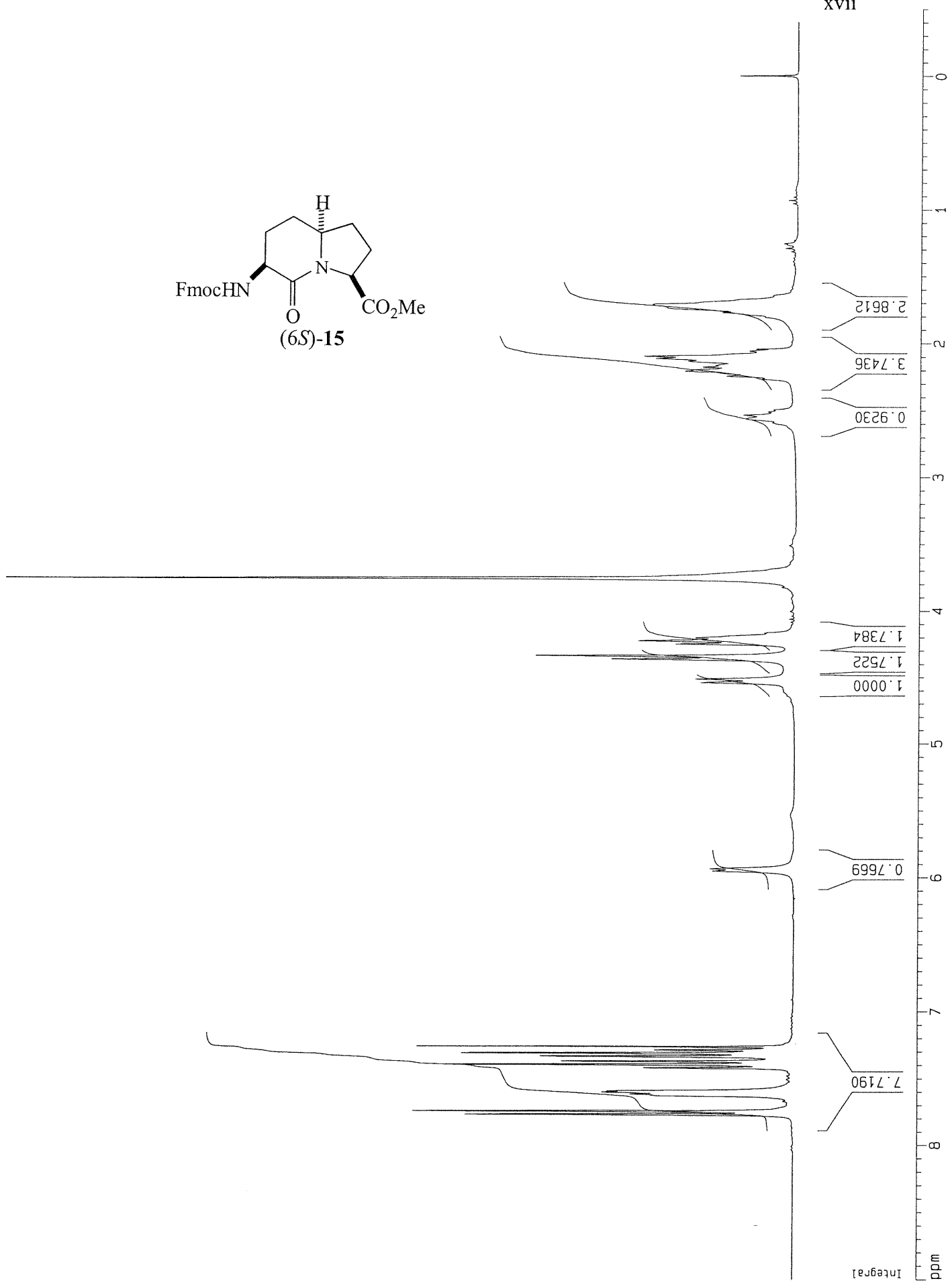
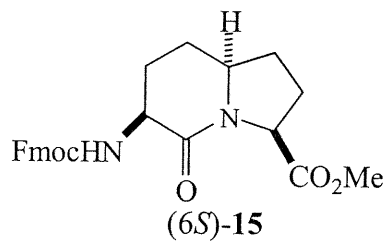
F Spectre NOESY du peptide 7 dans 9:1 H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O

(6 mM, 600 MHz, 15 °C)

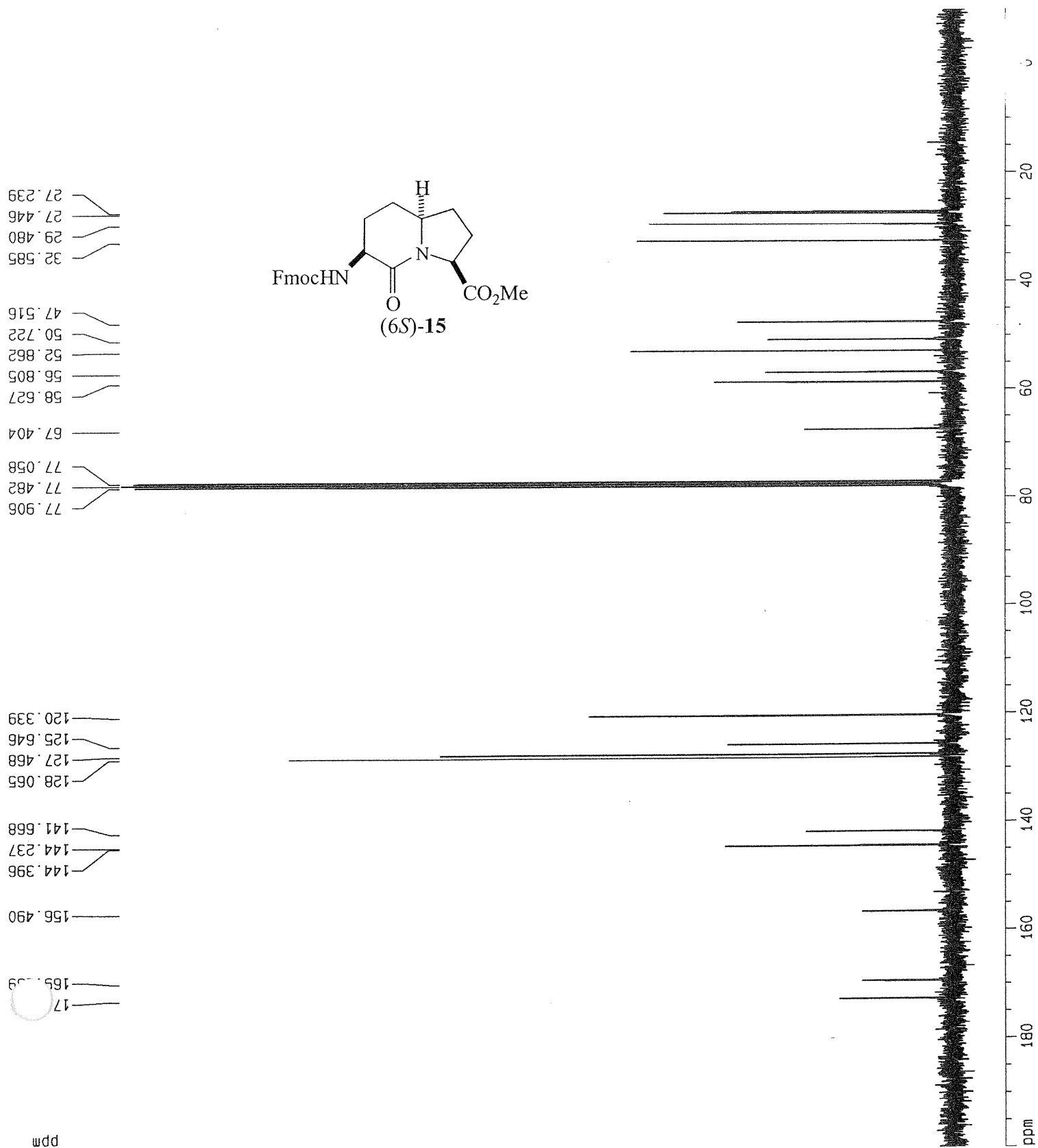
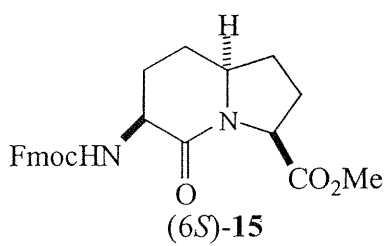
Spectre NOESY du peptide 7 dans le  $\text{DMSO-d}_6$ 

(6 mM, 600 MHz, 25 °C)

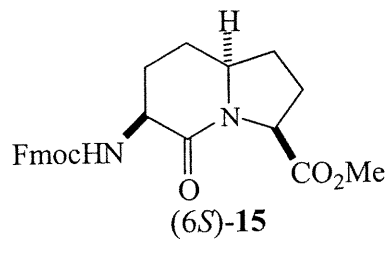
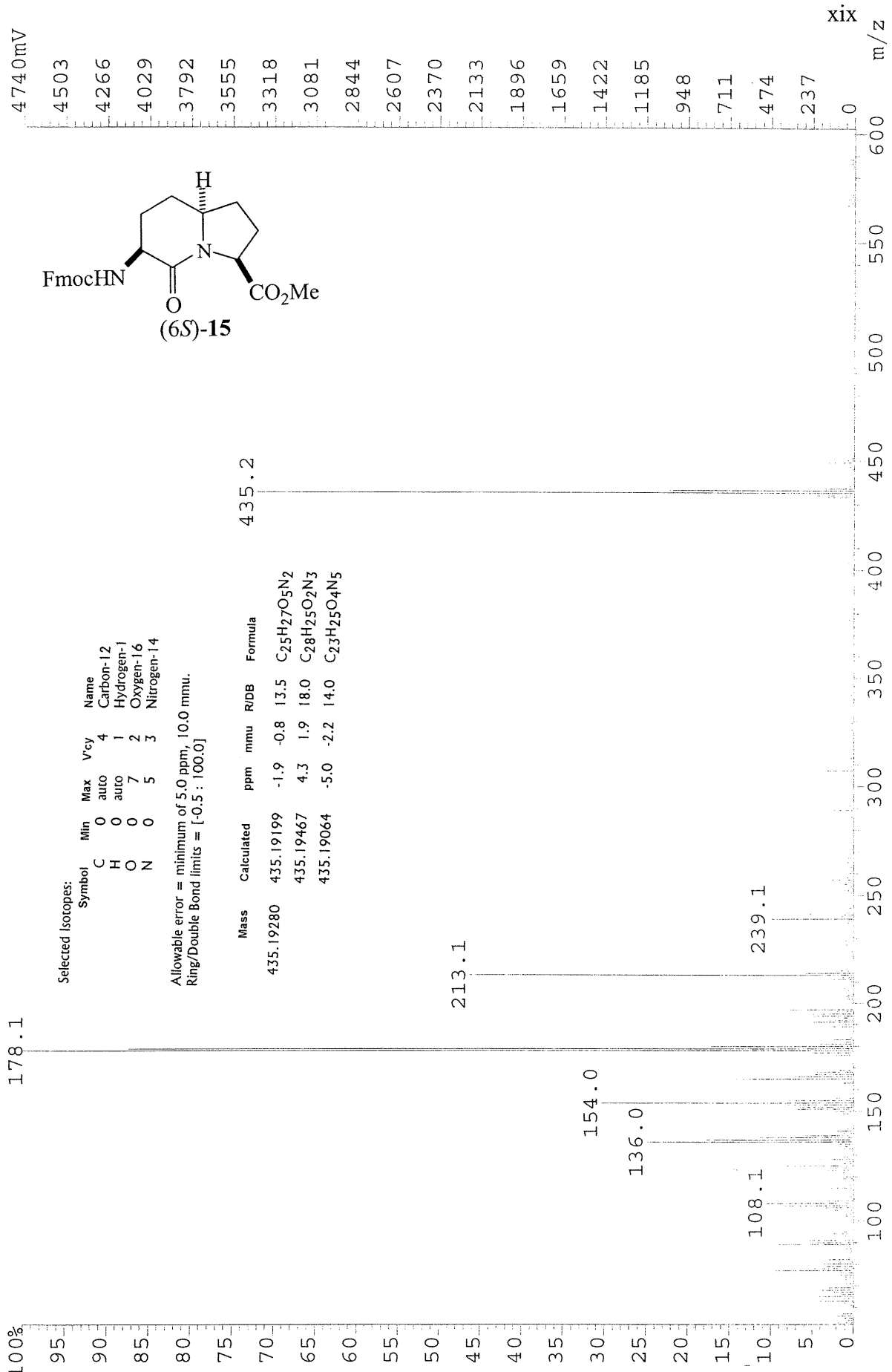
xvii







File: V01B1626FAZ13 Ident: 3 Acq: 16-FEB-2001 15:54:24 +0:16 Cal: GO\_1  
 AutoSpecQ FAB+ Magnet BpI: 6426357 TIC: 60041092 Flags: HALL  
 File Text: KD-5-31S-NBA

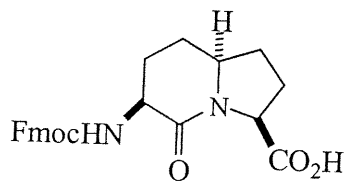


Selected isotopes:

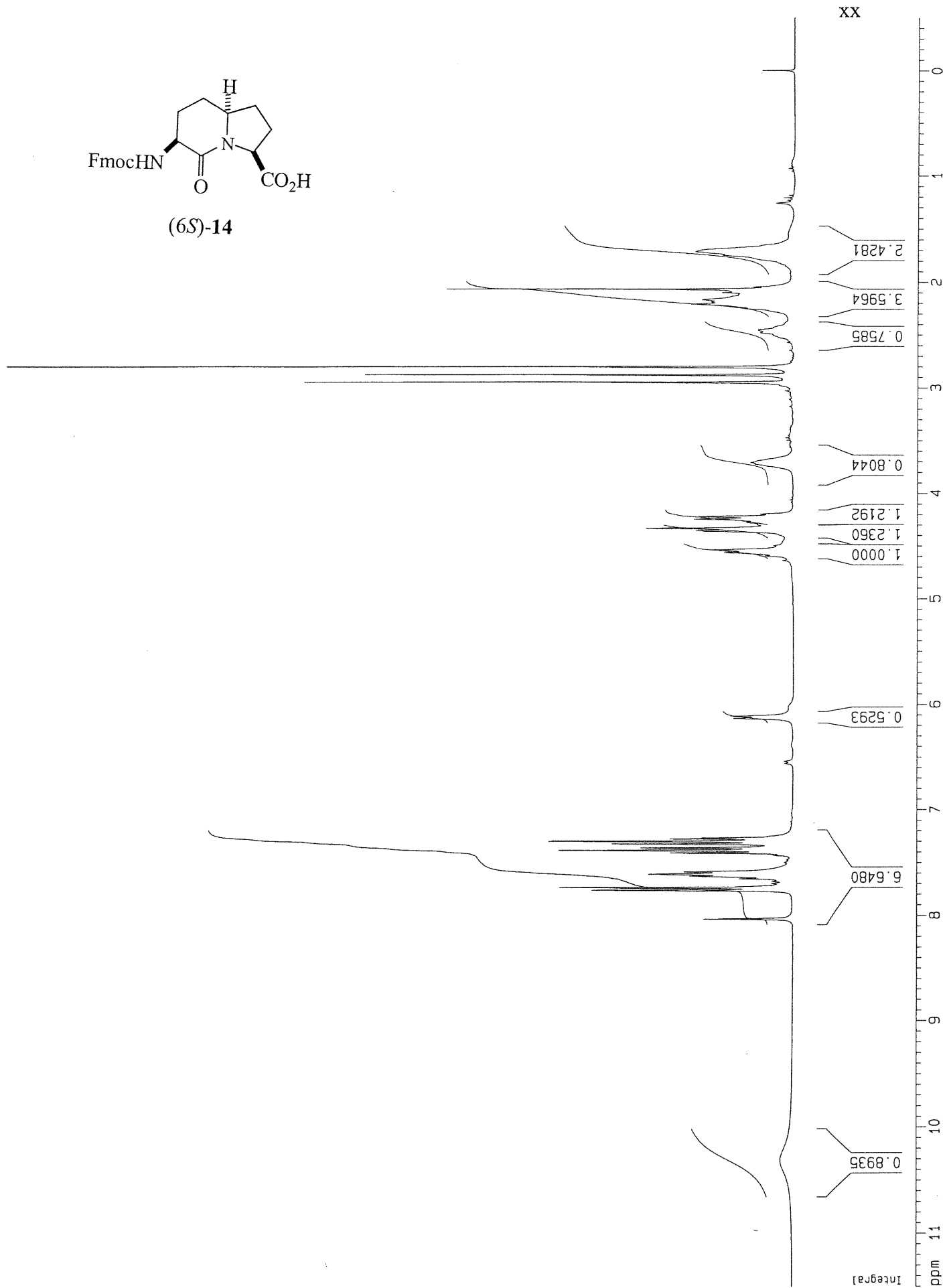
Symbol	Min	Max	V <sub>cy</sub>	Name
C	0	auto	4	Carbon-12
H	0	auto	1	Hydrogen-1
O	0	7	2	Oxygen-16
N	0	5	3	Nitrogen-14

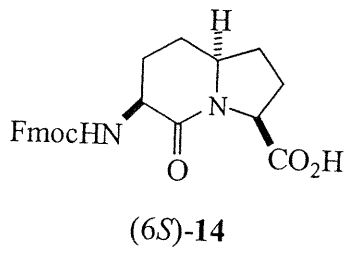
Allowable error = minimum of 5.0 ppm, 10.0 mmu.  
 Ring/Double Bond limits = [-0.5 : 100.0]

Mass	Calculated	ppm	mmu	R/DB	Formula
435.19280	435.19199	-1.9	-0.8	13.5	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> O <sub>5</sub> N <sub>2</sub>
435.19467	435.19467	4.3	1.9	18.0	C <sub>28</sub> H <sub>25</sub> O <sub>2</sub> N <sub>3</sub>
435.19064	435.19064	-5.0	-2.2	14.0	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> O <sub>4</sub> N <sub>5</sub>



(6S)-14



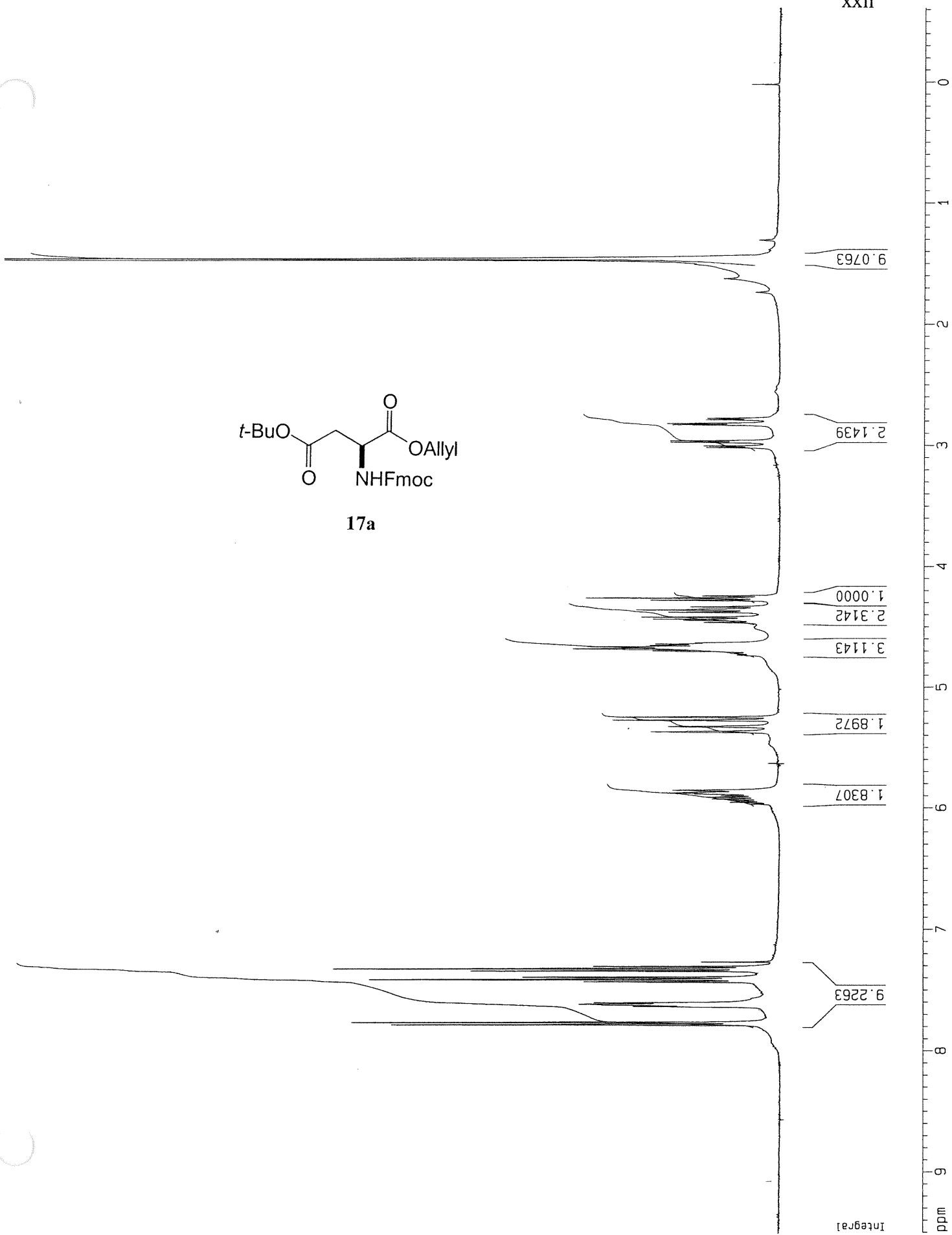
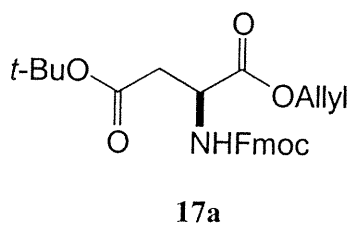


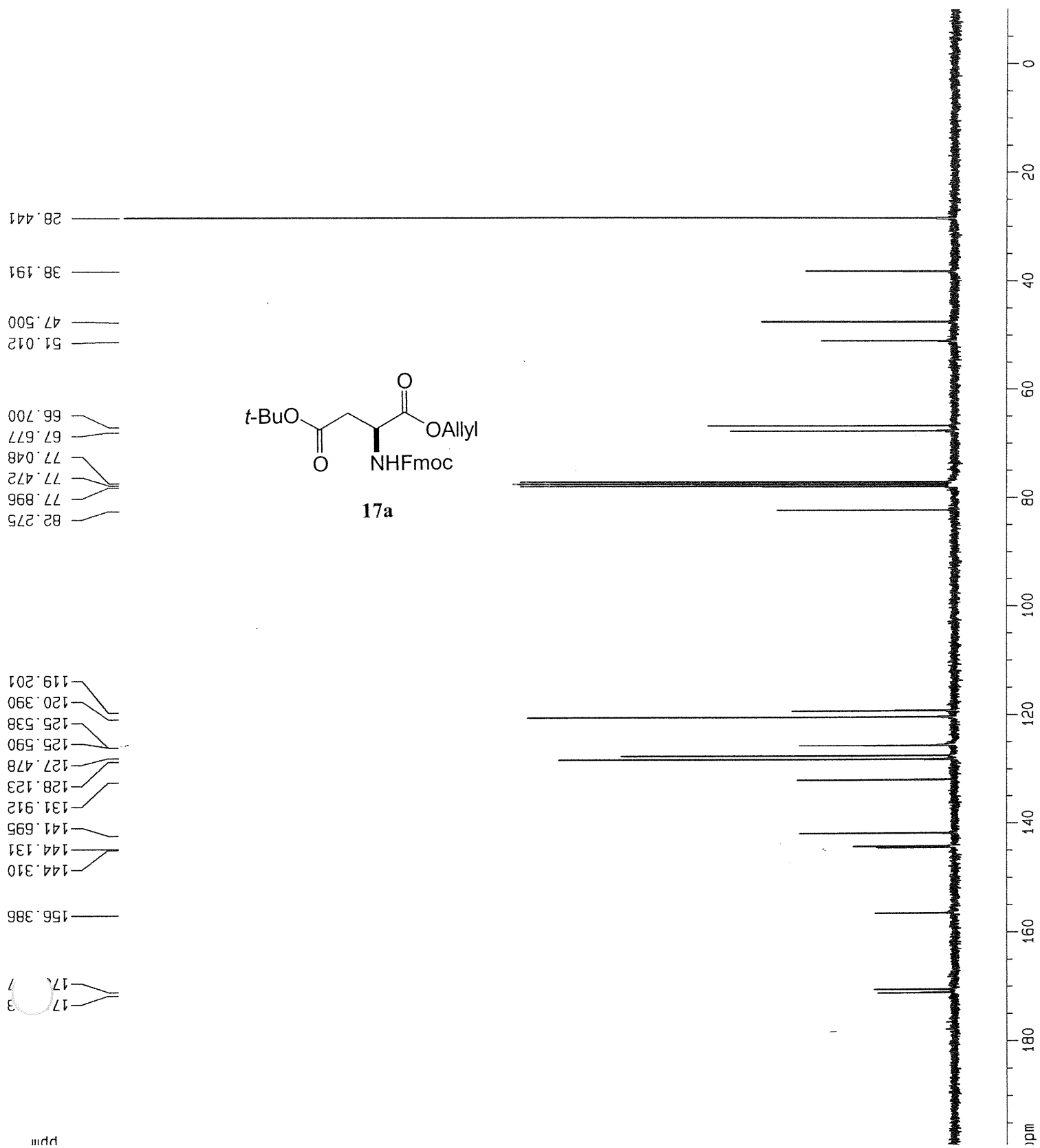
- 21.219
- 27.001
- 27.350
- 29.245
- 32.103
- 32.455
- 37.212
- 39.048
- 47.485
- 50.693
- 57.337
- 59.089
- 67.530
- 77.081
- 77.505
- 77.929

- 120.340
- 120.438
- 125.620
- 125.677
- 126.960
- 127.481
- 128.081
- 130.404
- 141.060
- 141.649
- 141.943
- 144.189
- 144.372
- 156.689
- 163.686
- 170.262
- 174.335
- 176.114

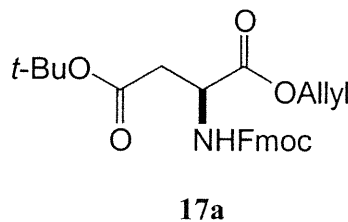
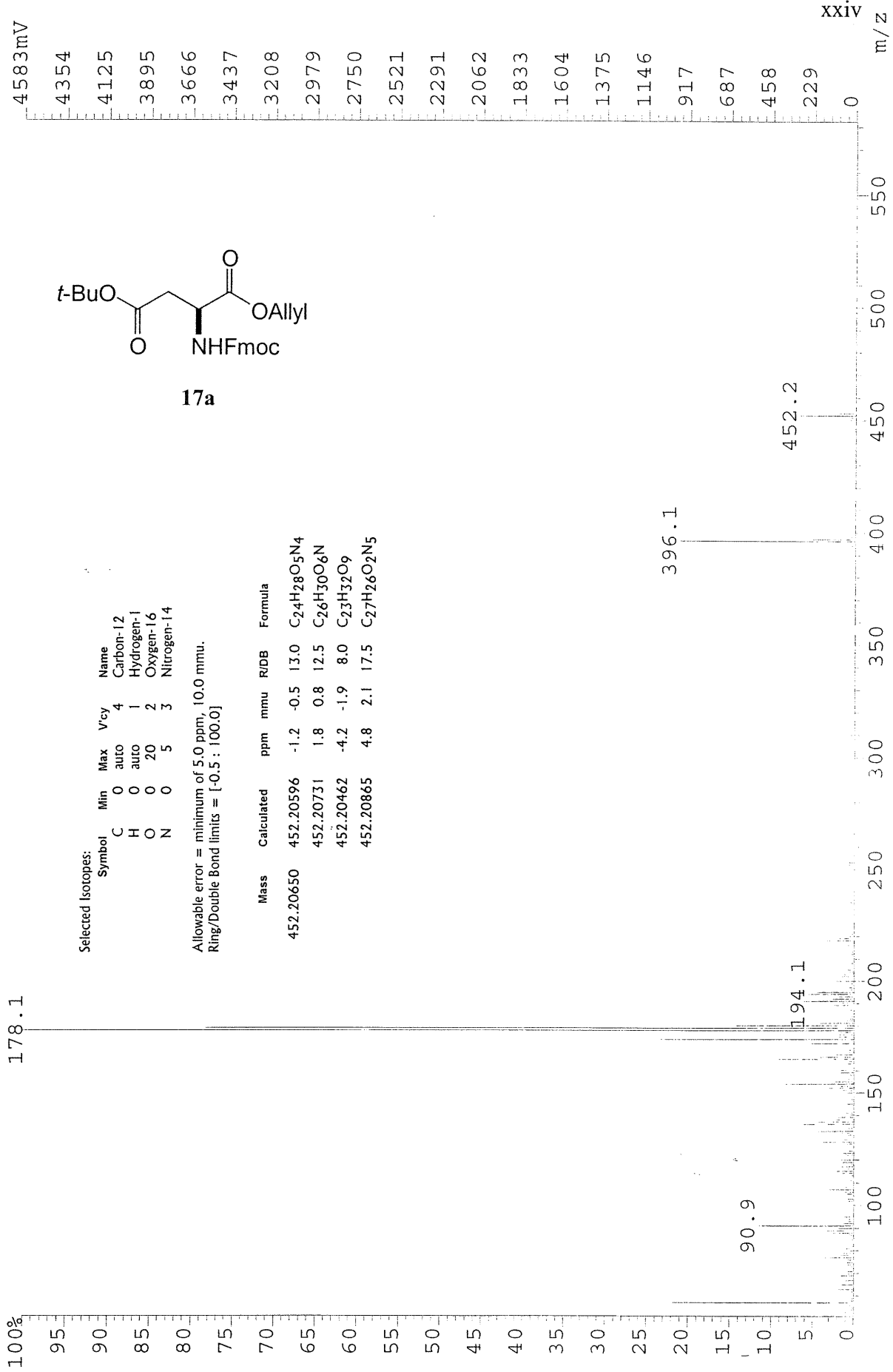
ppm







File: V01B0807FAZ13 Ident: 6 Acq: 8-FEB-2001 10:33:08 +0:28 Cal:GO\_1  
 AutoSpecQ FAB+ Magnet BpI:7624076 TIC:41906532 Flags:HALL  
 File Text:KD-5-23A-NBA



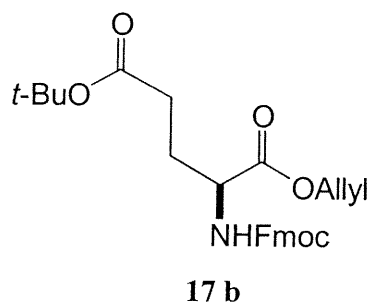
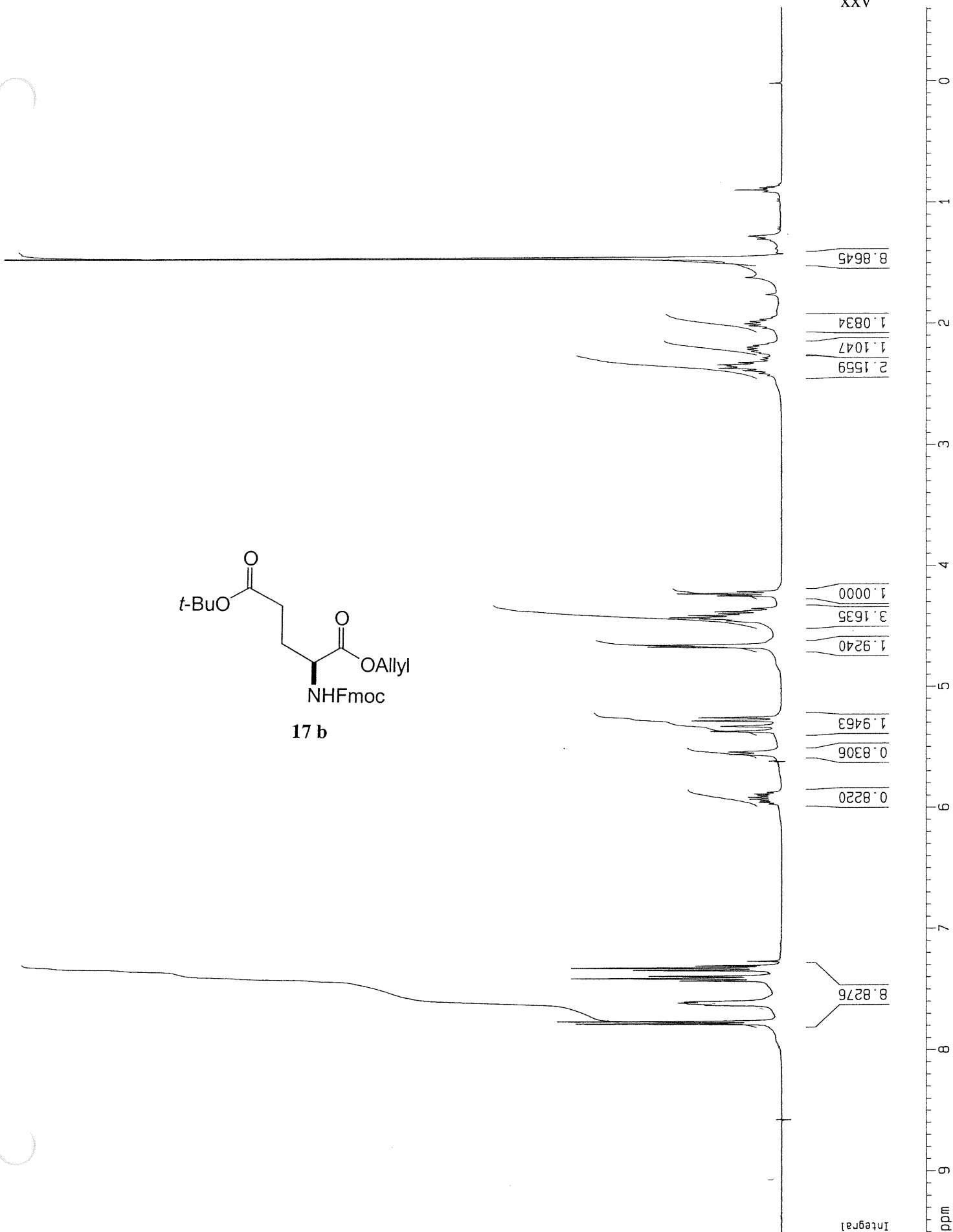
Selected Isotopes:

Symbol	Min	Max	V <sub>cy</sub>	Name
C	0	auto	4	Carbon-12
H	0	auto	1	Hydrogen-1
O	0	20	2	Oxygen-16
N	0	5	3	Nitrogen-14

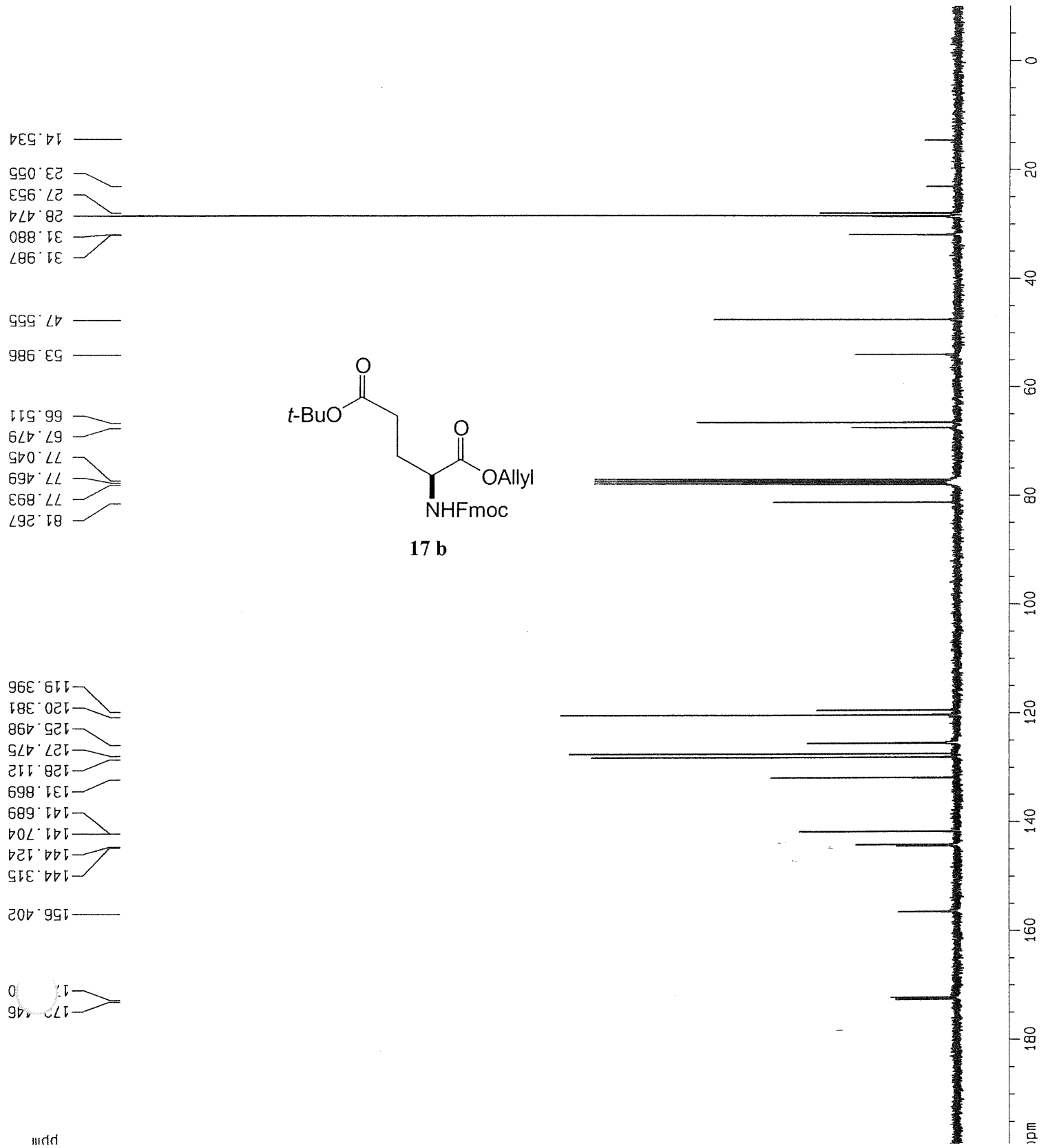
Allowable error = minimum of 5.0 ppm, 10.0 mmu.  
 Ring/Double Bond limits = [-0.5 : 100.0]

Mass	Calculated	ppm	mmu	R/DB	Formula
452.20650	452.20596	-1.2	-0.5	13.0	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub> N <sub>4</sub>
452.20731	452.20731	1.8	0.8	12.5	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub> N
452.20462	452.20462	-4.2	-1.9	8.0	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub>
452.20865	452.20865	4.8	2.1	17.5	C <sub>27</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> N <sub>5</sub>

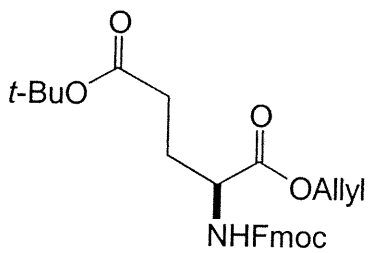
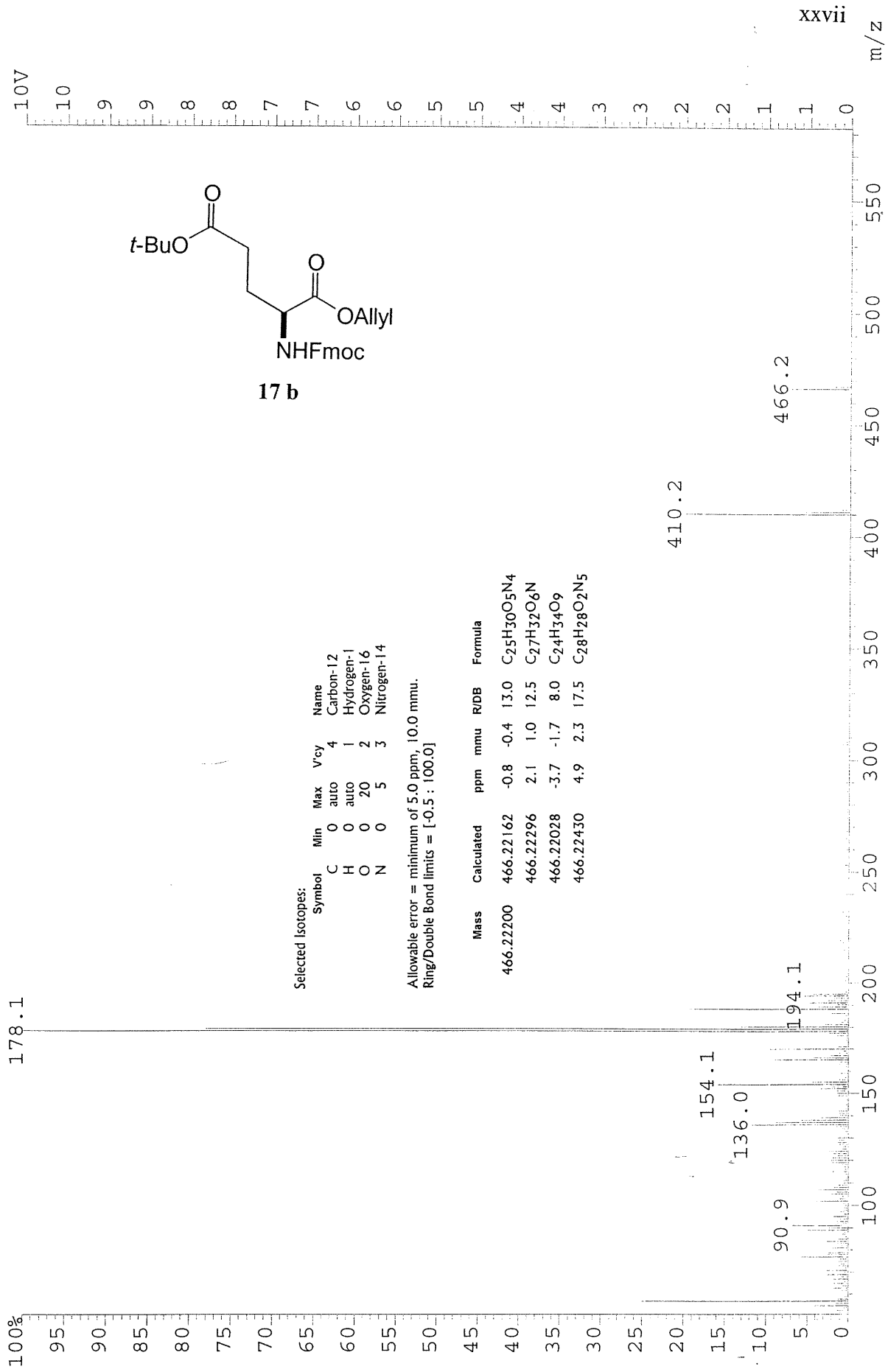
XXX







File: V01B0808FAZ13 Ident: 2 Acq: 8-FEB-2001 10:36:51 +0:09 Cal:GO\_1  
 AutoSpecQ FAB+ Magnet BpI:17453668 TIC:102454000 Flags:HALL  
 File Text:KD-5-23G-NBA



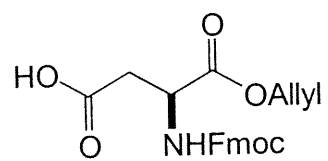
17 b

Selected Isotopes:

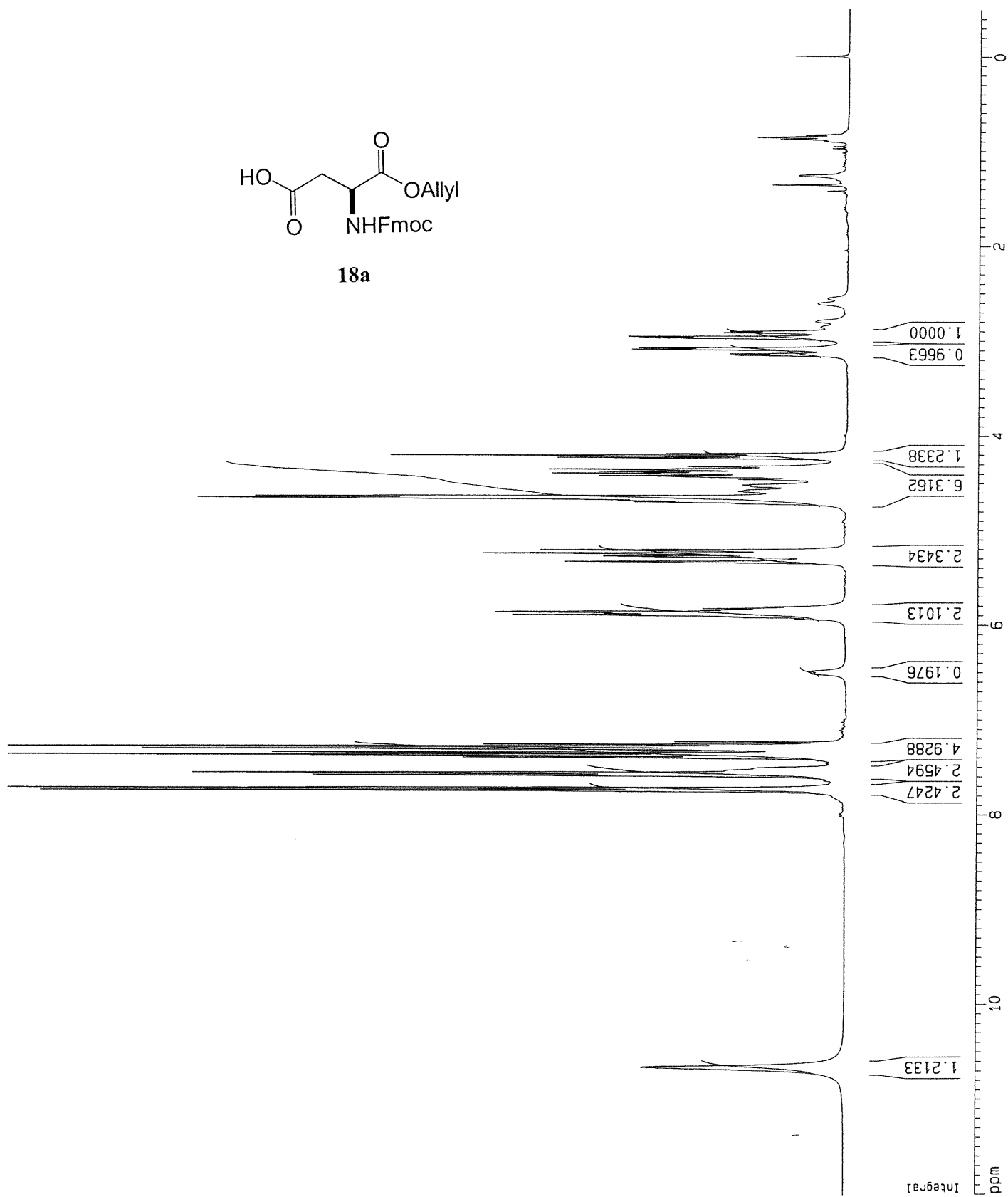
Symbol	Min	Max	V <sub>cy</sub>	Name
C	0	auto	4	Carbon-12
H	0	auto	1	Hydrogen-1
O	0	20	2	Oxygen-16
N	0	5	3	Nitrogen-14

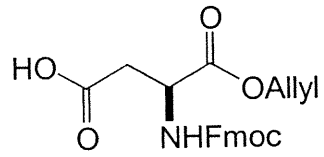
Allowable error = minimum of 5.0 ppm, 10.0 mmu.  
 Ring/Double Bond limits = [-0.5; 100.0]

Mass	Calculated	ppm	mmu	RDB	Formula
466.22200	466.22162	-0.8	-0.4	13.0	C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub> N <sub>4</sub>
	466.22296	2.1	1.0	12.5	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub> N
	466.22028	-3.7	-1.7	8.0	C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>
	466.22430	4.9	2.3	17.5	C <sub>28</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> N <sub>5</sub>

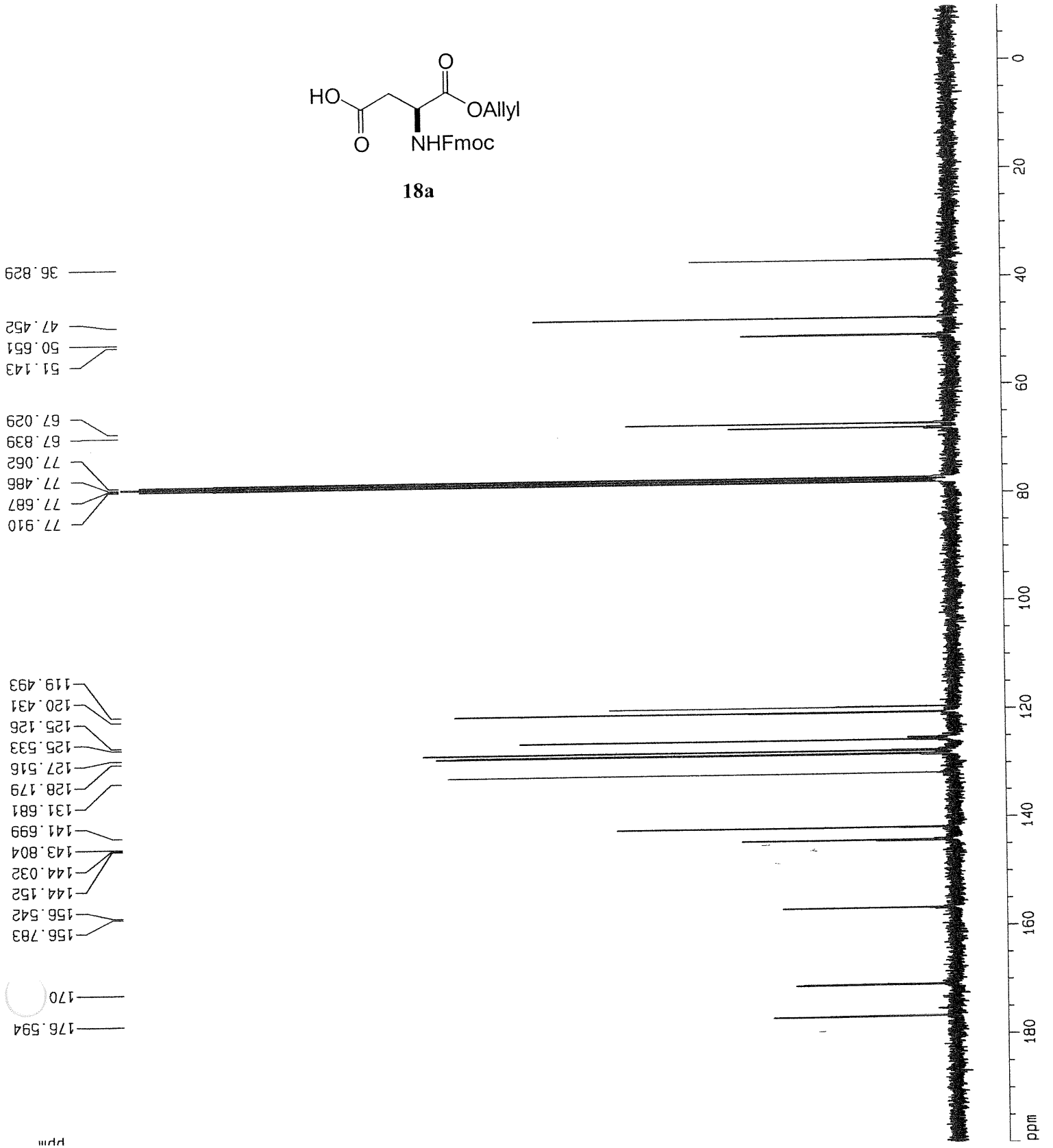


18a

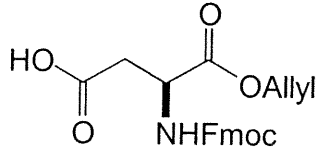
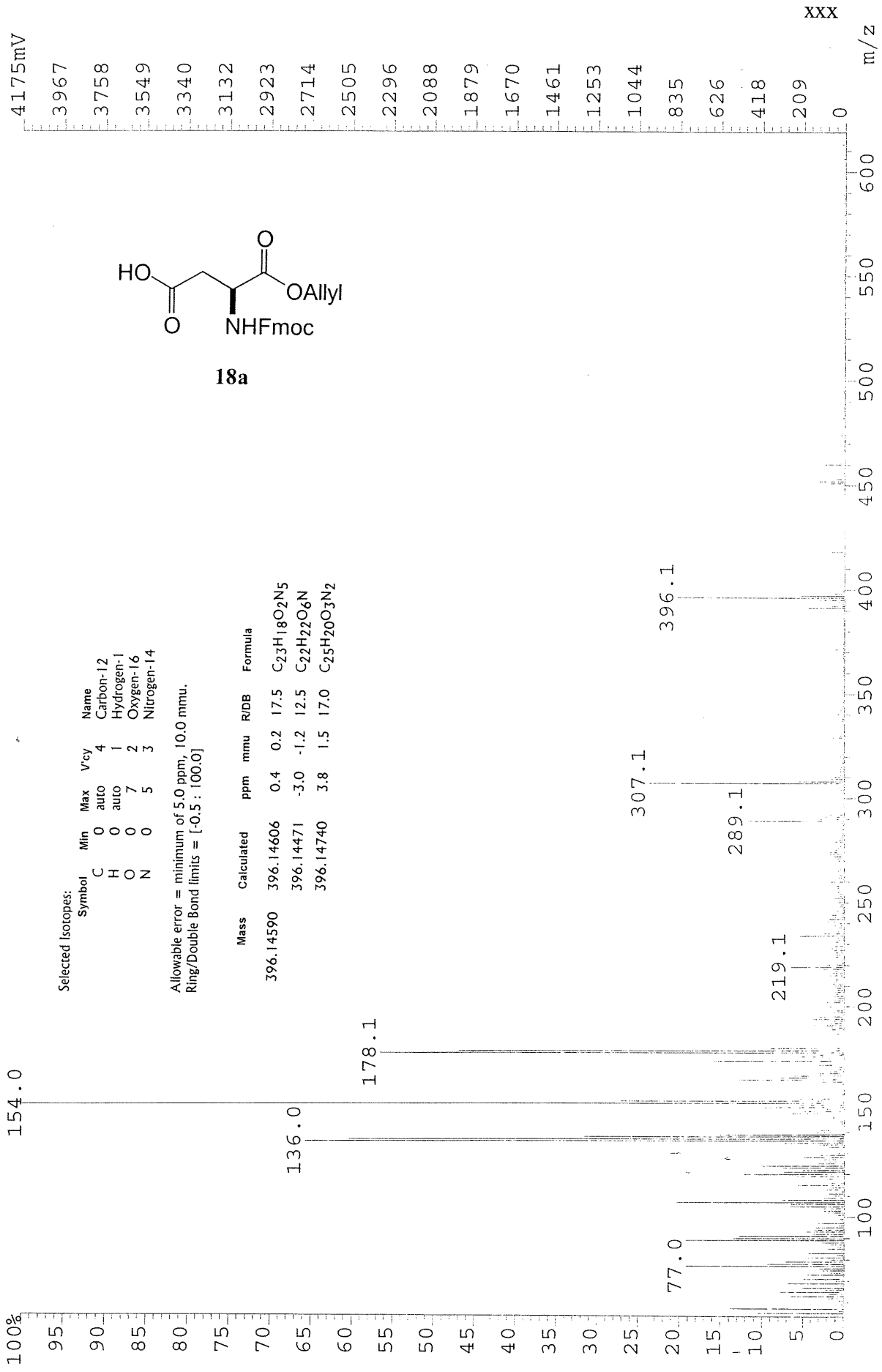




18a



File: V01B1904FAZ13 Ident: 3 Acq: 19-FEB-2001 11:22:06 +0:14 Cal: GO\_1  
 AutoSpecQ FAB+ Magnet BpI: 4115708 TIC: 53190508 Flags: HALL  
 File Text: KD-5-30A-NBA



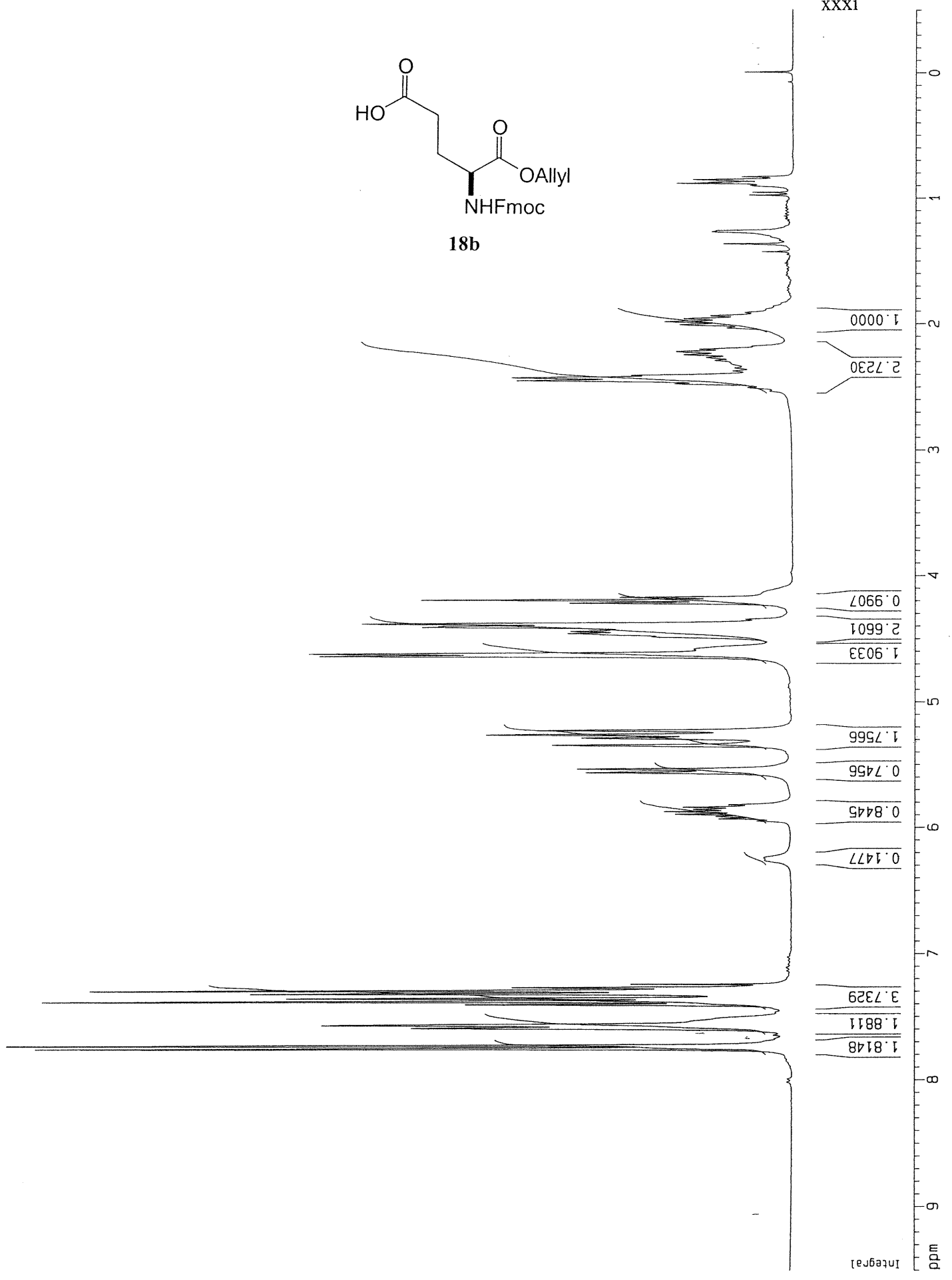
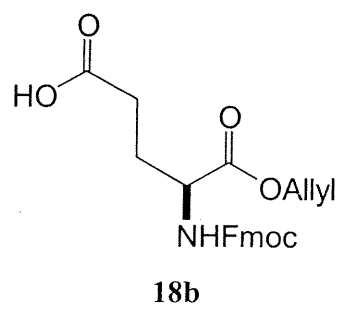
18a

Selected Isotopes:

Symbol	Min	Max	Vcy	Name
C	0	auto	4	Carbon-12
H	0	auto	1	Hydrogen-1
O	0	7	2	Oxygen-16
N	0	5	3	Nitrogen-14

Allowable error = minimum of 5.0 ppm, 10.0 mmu.  
 Ring/Double Bond limits = [-0.5 : 100.0]

Mass	Calculated	ppm	mmu	R/D/B	Formula
396.14590	396.14606	0.4	0.2	17.5	C <sub>23</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> N <sub>5</sub>
396.14471	-3.0	-1.2	12.5		C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub> N
396.14740	3.8	1.5	17.0		C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> N <sub>2</sub>



File: V01B1612FAZ13 Ident: 3 Acq: 16-FEB-2001 11:12:42 +0:18 Cal: GO\_1  
 AutoSpecQ FAB+ Magnet BpI: 16537993 TIC: 225928064 Flags: HALL  
 File Text: KD-5-30G-NBA

