



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire-UMR CNRS-INPL 7568 (LCPM)  
Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques (ENSIC)

Ecole doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources Procédés Produits Environnement  
ED 410 (RP2E)

# Thèse

présentée par

**Cécile ABBAS-QUINTERNET**

en vue de l'obtention du titre de

**Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine**

Spécialité : Génie des Procédés

Soutenue publiquement le 5 octobre 2009

## *Synthèse et études structurales de nouveaux 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères, vers de nouveaux foldamères*

### Membres du jury

**Président** : Dr. Yves CHAPLEUR (DR-CNRS, SRSMC, Université Henri Poincaré Nancy I)

**Rapporteurs** : Dr. Philippe LE GREL (MCF, ICMV, Université de Rennes 1)

Pr. Claude TAILLEFUMIER (Pr., SEESIB, Université Blaise-Pascal Clermont Ferrand)

**Examineurs** : Dr. Florine CAVELIER (DR-CNRS, IBMM, Universités de Montpellier 1 et 2)

Pr. Brigitte JAMART-GREGOIRE (Pr., LCPM, INPL Nancy)

Dr. Régis VANDERESSE (CR-CNRS, LCPM, INPL Nancy)

## **REMERCIEMENTS**

*Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire et plus particulièrement au sein de Groupe de Synthèse Organiques et Biostructures de l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques de Nancy.*

*Je tiens à remercier Madame le Professeur Brigitte Jamart-Grégoire pour avoir dirigé ce travail et pour m'avoir accordé toute sa confiance en m'accueillant dans son laboratoire. Son expérience et ses grandes compétences ont permis l'aboutissement de ce travail. J'ai, durant ces trois années, apprécié avec un grand plaisir nos conversations très enrichissantes.*

*Je remercie particulièrement Monsieur le Docteur Régis Vanderesse, chargé de recherche CNRS, pour avoir co-dirigé cette thèse. Sa collaboration et sa disponibilité ont été un grand soutien notamment au cours de la rédaction de ces travaux et pour la suite...*

*Je suis très sensible à l'honneur que m'ont fait Messieurs le Docteur Philippe Le Grel, maître de conférences à l'université de Rennes, et le Professeur Claude Taillefumier en acceptant de juger ma thèse en tant de rapporteurs. Je leur exprime toute ma reconnaissance pour l'intérêt porté à ce travail. Je suis également très reconnaissante à Monsieur de le Docteur Yves Chapleur, directeur de recherche CNRS, et Madame le Docteur Florine Cavelier, directeur de recherche CNRS, d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.*

*Je remercie chaleureusement Monsieur le Docteur Claude Didierjean, maître de conférences, pour sa collaboration et sans qui la cristallisation des composés ainsi que les études par diffraction des rayons X n'auraient pu être menées à bien. Je remercie également Madame le Docteur Marie-Christine Averlant-Petit, chargée de recherche CNRS, pour les études structurales par simulation numérique ainsi que Monsieur Olivier Fabre pour la spectroscopie RMN.*

*Une forte pensée pour Axelle, maîtres de conférences, avec qui une amitié s'est créée. Merci pour ces fous rires, pour avoir été co-fondatrice des SGP du LCPM !!! Je tiens à mettre en avant son aide et ses conseils professionnels.*

*Enfin, je remercie toutes les personnes qui m'ont entourée et encouragée durant cette thèse, mon mari, Marc, ainsi que mes parents et ma sœur, Caroline,...*

# TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS .....	6
INTRODUCTION GENERALE .....	9
<b>I. INTRODUCTION ET BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>13</b>
<b><i>I.1. Peptides, pseudopeptides et foldamères .....</i></b>	<b>13</b>
<b><i>I.2. Influence de l'introduction d'un résidu aza dans une chaîne peptidique .....</i></b>	<b>14</b>
<b>I.2.1. Historique et intérêt biologique .....</b>	<b>14</b>
<b>I.2.2. Influence structurale d'un résidu acide azaaminé .....</b>	<b>16</b>
<b><i>I.3. Oligomères polyazapeptidiques .....</i></b>	<b>17</b>
<b><i>I.4. Généralités sur les modes de synthèse des azapeptides.....</i></b>	<b>20</b>
<b>I.4.1. Méthode aux isocyanates .....</b>	<b>21</b>
<b>I.4.2. Méthode aux dérivés d'esters activés .....</b>	<b>21</b>
<b>I.4.3. Méthode aux chlorures d'acides .....</b>	<b>22</b>
<b>I.4.4. Réaction des <i>N</i>-azolides avec un partenaire amine.....</b>	<b>23</b>
<b>I.4.5. Ouverture du cycle 1,3,4-oxadiazol-2(3<i>H</i>)-one par un partenaire amine .</b>	<b>24</b>
<b>I.4.6. Conclusion : étude comparée des modes de synthèse des azapeptides.....</b>	<b>24</b>
<b>II. SYNTHÈSE DES PRÉCURSEURS AZADIPEPTIDIQUES Boc-azaAA-AA-OMe.....</b>	<b>26</b>
<b><i>II.1. Introduction .....</i></b>	<b>26</b>
<b><i>II.2. Généralités sur les modes de synthèse choisis.....</i></b>	<b>30</b>
<b>II.2.1. La réaction de Mitsunobu.....</b>	<b>30</b>
<b>II.2.2. Réaction de condensation d'un dérivé isocyanate <i>via</i> le triphosgène .....</b>	<b>33</b>
<b>II.2.3. Réaction de transprotection .....</b>	<b>36</b>
<b><i>II.3. Préparation des précurseurs azadipeptidiques Boc-azaAA-AA-OMe en phase</i></b>	
<b><i>liquide.....</i></b>	<b>37</b>
<b>II.3.1. Synthèse expérimentale des précurseurs azadipeptidiques.....</b>	<b>37</b>
<b>Boc-azaAA-AA-OMe .....</b>	<b>37</b>
<b>II.3.2. Préparation du <i>N</i>-alkylaminophtalimides 8 .....</b>	<b>40</b>
<b>II.3.3. Préparation des Pht-azaAA-Ala-OMe 9 <i>via</i> le triphosgène.....</b>	<b>44</b>
<b>II.3.4. Synthèse des Boc-azaAA-Ala-OMe 5 par réaction de transprotection .....</b>	<b>48</b>
<b>II.3.5. Conclusion.....</b>	<b>50</b>

<b>III. PRÉPARATION DES UNITÉS DE BASE 2:1-[<math>\alpha</math>/AZA]-TRIMÈRES ET RÉACTION D'OLIGOMÉRISEMENT DES AZAPEPTIDES .....</b>	<b>51</b>
<b><i>III.1. Introduction</i></b> .....	<b>51</b>
<b><i>III.2. Généralités sur la synthèse peptidique en solution</i></b> .....	<b>52</b>
<b><i>III.3. Réactivité des précurseurs azadipeptidiques Boc-azaAA-AA-OMe</i></b> .....	<b>55</b>
<b><i>III.4. Préparation des oligomères azapeptidiques</i></b> .....	<b>56</b>
<b>III.4.1. Introduction : Oligomérisation en phase liquide</b> .....	<b>56</b>
<b>III.4.2. Les 1:1-[<math>\alpha</math>/aza]-oligomères</b> .....	<b>56</b>
<b>III.4.3. Les 2:1-[<math>\alpha</math>/aza]-oligomères</b> .....	<b>59</b>
a. Synthèse des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères .....	<b>60</b>
1. Introduction .....	<b>60</b>
2. Synthèse à partir d'une hydrazine monosubstituée .....	<b>61</b>
3. Préparation des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères à partir des précurseurs azadipeptidiques .....	<b>64</b>
b. Préparation des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères .....	<b>68</b>
<b>III.4.4. Conclusion</b> .....	<b>72</b>
<b><i>III.5. Cyclisation des 2:1-[<math>\alpha</math>/aza]-oligomères</i></b> .....	<b>72</b>
<b>III.5.1. Introduction et bibliographie</b> .....	<b>72</b>
<b>III.5.2. Synthèse des 2:1-[<math>\alpha</math>/aza]-cyclooligomères</b> .....	<b>75</b>
<b>IV. ETUDES CONFORMATIONNELLES DES 2:1-[<math>\alpha</math>/AZA]-OLIGOMÈRES .....</b>	<b>78</b>
<b><i>IV.1. Introduction</i></b> .....	<b>78</b>
<b><i>IV.2. Rôle des foldamères</i></b> .....	<b>79</b>
<b><i>IV.3. Notation et description du squelette peptidique et des liaisons hydrogène intramoléculaires dans les peptides</i></b> .....	<b>82</b>
<b>IV.3.1. Le repliement <math>\gamma</math> ou C<sub>7</sub></b> .....	<b>83</b>
<b>IV.3.2. Le repliement <math>\beta</math> ou C<sub>10</sub></b> .....	<b>84</b>
<b>IV.3.3. Les hélices</b> .....	<b>85</b>
<b><i>IV.4. Aspects conformationnels en série pseudopeptidique</i></b> .....	<b>85</b>
<b>IV.4.1. Les <math>\beta</math>-peptides</b> .....	<b>86</b>
<b>IV.4.2. Les hydrazinopeptides</b> .....	<b>87</b>
<b>IV.4.3. Les peptides mixtes : <math>\alpha/\beta</math>-peptides</b> .....	<b>88</b>
<b>IV.4.4. Les N-aminopeptides</b> .....	<b>88</b>
<b>IV.4.5. Structures d'azapeptides</b> .....	<b>90</b>

<i>IV.5. Méthodes et techniques d'études conformationnelles</i> .....	92
<b>IV.5.1. Le dichroïsme circulaire</b> .....	93
<b>IV.5.2. La spectroscopie d'absorption infrarouge</b> .....	94
<b>IV.5.3. La diffraction des rayons X</b> .....	95
<b>IV.5.4. La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire</b> .....	96
<b>IV.5.5. La modélisation moléculaire</b> .....	98
<b>IV.5.6. Conclusion</b> .....	98
<i>IV.6. Contributions spectroscopiques de la substitution <math>N_\alpha/CH_\alpha</math></i> .....	99
<i>IV.7. Etudes structurales des 2:1-[<math>\alpha</math>/aza]-oligomères</i> .....	101
<b>IV.7.1. Etudes préliminaires concernant les précurseurs Boc-azaAA-Ala-OMe</b> .....	102
<b>IV.7.2. Analyses structurales des 2:1-[<math>\alpha</math>/aza]-trimères</b> .....	105
a. Analyse structurale en solution des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères <b>12</b> .....	105
b. Résultats cristallographiques.....	107
c. Comparaison de la structuration du 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimère Boc-Phe-azaAla-Ala-OMe <b>12a</b> avec le peptide parent Boc-Phe-Ala-Ala-OMe <b>17</b> et son homologue dipeptidique Boc-Phe-azaAA-OR <b>18</b> .....	108
d. Influence de la chaîne latérale du résidu acide azaaminé sur la structuration des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères <b>12</b> .....	111
e. Influence de la configuration absolue des carbones asymétriques $CH_\alpha$ des résidus acides $\alpha$ aminés sur la structuration des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères <b>12</b> .....	112
<b>IV.7.3. Etudes conformationnelles des 2:1-[<math>\alpha</math>/aza]-hexamères</b> .....	114
a. Etudes structurales en solution des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamères <b>13</b> .....	114
1. Par résonance magnétique nucléaire .....	114
2. Simulation numérique des structures de l'hexamère.....	119
b. Résultats cristallographiques.....	122
c. Conclusion.....	123
<b>IV.7.4. Analyses structurales en solution des oligomères 2:1-[<math>\alpha</math>/aza]-nonamère <b>14</b> et 2:1-[<math>\alpha</math>/aza]-dodécamère <b>15</b></b> .....	124
 <b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	<b>127</b>
<b>GENERAL METHODS</b> .....	<b>129</b>
<b>EXPERIMENTAL PART</b> .....	<b>130</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

- AA** : résidu acide  $\alpha$  aminé
- AcOEt** : acétate d'éthyle
- ADN** : acide désoxyribonucléique
- Ala** : résidu alanine
- Arg** : résidu arginine
- ARN** : acide ribonucléique
- Asn** : résidu asparagine
- Asp** : résidu acide aspartique
- ATR** : Single Reflexion Attenuated Total Reflectance
- AzaAA** : résidu acide azaaminé
- Boc** : *tert*-butyloxycarbonyle
- Boc<sub>2</sub>O** : dicarbonate de di-*tert*-butyle
- Bop** : hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium
- Bzl** : benzoyle
- CCM** : Chromatographie sur Couche Mince
- COSY** : COrrélation SpectroscopY
- DCC** : dicyclohexylcarbodiimide
- DCM** : dichlorométhane
- DEAD** : diéthylazodicarboxylate
- DIEA** : N,N'-diisopropyléthylamine
- DMAP** : 4,4-diméthylaminopyridine
- DMSO** : diméthylsulfoxyde
- EDC** : 1-éthyl-3-(3'-diméthylaminopropyl)-carbodiimide
- equiv.** : équivalent
- Et** : éthyle
- Fmoc** : 9-fluorénylméthylèneoxycarbonyle
- Fmoc-Cl** : chloroformiate de 9-fluorénylméthylèneoxycarbonyle
- Gly** : résidu glycine
- HATU** : hexafluorophosphate de 2-(1*H*-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium
- hGly** : résidu hydrazinoglycine
- His** : résidu histidine

**HMPT** : hexaméthylphosphotriamide  
**HOBt** : *N*-hydroxybenzotriazole  
**HONp** : para-nitrophénol  
**HOPfp** : pentafluorophénol  
**HOSu** : *N*-hydroxysuccinimide  
**CLHP** : Chromatographie Liquide Haute Performance  
**hPro** : résidu hydrazinoproline  
**HRMS (ESI)** : High Resolution Mass Spectrometry (ElectroSpray Ionization)  
**HSQC** : Heteronuclear Single Quantum Coherence  
**IC<sub>50</sub>** : concentration de composé inhibant 50% de l'effet observé  
**Ile** : résidu isoleucine  
**iPr** : isopropyle  
**IR** : infrarouge  
**Leu** : résidu leucine  
**Me** : méthyle  
**Met** : résidu méthionine  
**mM** : millimolaire  
**Moc** : méthoxycarbonyle  
**NMM** : *N*-méthylmorpholine  
**NOE** : Nuclear Overhauser Effect  
**NOESY** : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy  
**Ph** : phényle  
**pH** : potentiel hydrogène  
**p-ether** : éther de pétrole  
**Phe** : résidu phénylalanine  
**Pht** : phtalimide (français)  
**Phth** : phthalimide (anglais)  
**Piv** : pivaloyle  
**ppm** : partie par million  
**Pro** : résidu proline  
**Rdt** : rendement  
**R<sub>f</sub>** : rapport frontal  
**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire  
**ROESY** : Rotation frame nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

**RT** : room temperature

**RX** : rayons X

**SIDA** : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis

**TA** : température ambiante

**TBTU** : tétrafluoroborate de 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium

**tBu** : *tert*-butyle

**Tcp** : trichlorophényle

**TFA** : acide trifluoroacétique

**THF** : tétrahydrofurane

**Thr** : résidu thréonine

**TLC** : Thin Layer Chromatography

**TNFR** : Tumor Necrosis Factor Receptor

**TOCSY** : TOtally Correlated SpectroscopY

**Tyr** : résidu tyrosine

**UV** : ultraviolet

**Val** : résidu valine

**VIH** : Virus d'Immunodéficiency Humaine

**Xaa** : résidu d'acide aminé a

**Z** : benzyloxycarbonyle

**ZCl** : chloroformiate de benzyloxycarbonyle

**ZOSu** : benzyloxycarbonyle-*N*-hydroxysuccinimide

## INTRODUCTION GENERALE

Les peptides et les protéines sont des éléments nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme, ils jouent un rôle important dans de nombreux processus biologiques, contrôlent et régulent diverses fonctions biologiques.

Les possibilités d'utilisation des peptides à des fins thérapeutiques sont limitées pour trois raisons principales :

- leur biodégradabilité : les peptides sont dégradés par les peptidases dans le système digestif ou dans les fluides biologiques
- leur flexibilité conduisant à une multiplicité d'action
- leur caractère lipophile : ils franchissent parfois difficilement les barrières physiologiques

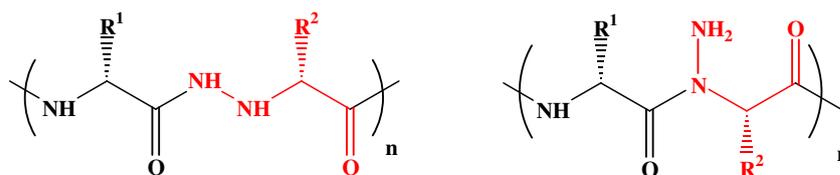
Une approche largement utilisée en pharmacochimie consiste à introduire des modifications chimiques dans le squelette peptidique ou au niveau des chaînes latérales dans le but d'accroître l'activité biologique, la sélectivité, la résistance à l'hydrolyse par les protéases ou d'accentuer le caractère lipophile. Parmi les modifications possibles, celles introduites au niveau du squelette peptidique, et plus particulièrement au niveau de la liaison amide, ont la faveur des pharmacologistes car elles laissent intactes les chaînes latérales, généralement nécessaires à une bonne reconnaissance par le site actif des protéines cibles. On parle alors de pseudopeptides. Par l'introduction de motifs pseudopeptidiques, il est également possible de modifier la structure secondaire du peptide de façon à ce qu'il adopte une conformation permettant une meilleure affinité et une plus grande spécificité avec le récepteur.

Depuis quelques décennies, la synthèse et l'étude structurale de nouvelles molécules destinées à mimer les structures secondaires des peptides et des protéines connaissent un essor exponentiel. Ces composés peuvent présenter un grand intérêt thérapeutique dans la mesure où l'on peut attendre une meilleure résistance aux peptidases, une meilleure pénétration intracellulaire et parfois une meilleure solubilité.

De nombreux travaux ont été réalisés sur la synthèse et l'étude structurale de molécules pseudopeptidiques et une grande variété de liens pseudopeptidiques comme les liens cétométhylène, rétro-inverso, sulfonamide, éthylène, méthylèneamino et bien d'autres ont été

proposés à des fins thérapeutiques<sup>1</sup>. Il est pratiquement impossible de dresser un inventaire complet de ces modifications pseudo-peptidiques, mais une série de revues et d'ouvrages permettent de juger l'ampleur des travaux réalisés dans ce domaine<sup>2</sup>. Récemment, un nouveau concept de pseudo-peptides a vu le jour ; il s'agit des foldamères dans lesquels un même motif pseudo-peptidique est répété régulièrement tout au long de la séquence<sup>3</sup>. Ce terme de foldamère est défini par Samuel Gellman comme « tout oligomère ayant une forte tendance à adopter une conformation compacte bien définie et prévisible en solution ». Les recherches de nouveaux foldamères ont pour objectif principal de découvrir de nouveaux matériaux bio-inspirés qui auraient des propriétés nouvelles et/ou améliorées grâce à leur repliement bien défini.

Depuis sa création, le « Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire » (LCPM, UMR INPL/CNRS 7568), et plus particulièrement le « Groupe Synthèse Organique et Biostructures », s'implique dans la conception, la synthèse et l'étude conformationnelle de pseudo-peptides et d'oligomères pseudo-peptidiques<sup>4-9</sup>. Depuis quelques années, le LCPM s'intéresse plus particulièrement aux composés pseudo-peptidiques bis-azotés. Plusieurs études, menées sur les hydrazino-peptides<sup>10-12</sup> et les *N*-amino-peptides<sup>13</sup>, ont montré que l'insertion d'un atome d'azote supplémentaire dans le squelette peptidique entraîne une résistance accrue à la biodégradabilité<sup>14</sup> et induit des structurations locales originales au sein de ces pseudo-peptides<sup>5</sup> (Figure 1).



**Figure 1 : Liens pseudo-peptidiques hydrazino (à gauche) et *N*-amino (à droite)**

Les travaux de recherche que nous allons développer dans ce mémoire concerne la synthèse et les études structurales de pseudo-peptides contenant un ou plusieurs résidus aza (Figure 2).

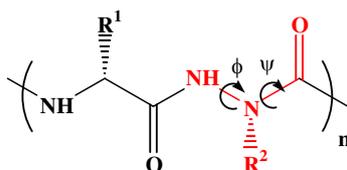


Figure 2 : Azapeptide

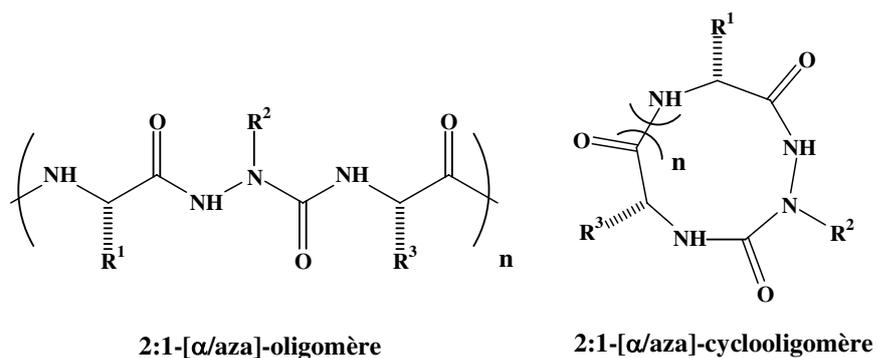
Dans les azapeptides<sup>15</sup>, un ou plusieurs atomes de carbone  $\alpha$  sont remplacés par un atome d'azote. Ce dernier porte la chaîne latérale des acides aminés originaux qui joue un rôle essentiel dans la reconnaissance moléculaire. Par cette substitution  $N-C_{\alpha}-CO \rightarrow N-N_{\alpha}-CO$ , la liaison  $C_{\alpha}-C(O)$ , dont la rotation est libre, est remplacée par une liaison plus rigide  $N_{\alpha}-C(O)$  car la délocalisation du doublet non liant de l'atome d'azote va ralentir la rotation de la liaison. De plus, la répulsion électronique entre les doublets non liants des atomes d'azote adjacents restreint le mouvement autour des angles diédraux  $\Psi$  et  $\Phi$ .

Les composés azapeptidiques semblent donc rassembler les conditions nécessaires à l'élaboration de pseudopeptides intéressants au niveau biologique<sup>16</sup> : la chaîne latérale de l'acide aminé original est conservée et l'atome d'azote supplémentaire induit une rigidité qui pourrait permettre une meilleure sélectivité d'action.

Des travaux concernant la synthèse, l'étude structurale et l'impact biologique d'oligomères pseudopeptidiques comportant un résidu aza ont déjà été décrits<sup>16-23</sup>. L'originalité de ce travail est l'étude d'oligomères mixtes aza/ $\alpha$ . En effet, des unités de base azapeptidiques n'ont jamais été impliquées dans des processus d'oligomérisation.

L'objectif premier de mon travail de thèse a consisté à mettre au point une nouvelle méthode de synthèse d'azapeptides orthogonalement protégés. Nous nous sommes attachés, par la suite, à résoudre deux points essentiels :

- cette méthode devrait être généralisable et conduire à la synthèse d'oligomères mixtes  $\alpha$ /aza par des méthodes classiques de la synthèse peptidique en phase liquide, l'implication de cette série pseudopeptidique dans des réactions de cyclisation a également été abordée (Figure 3)
- des études structurales par spectroscopies RMN, infrarouge, dichroïsme circulaire, diffraction des rayons X et modélisation moléculaire ont ensuite été réalisées sur les oligomères obtenus pour mettre en évidence la potentialité de ces composés à s'auto-structurer et conduire à des foldamères.



**Figure 3 : Formule développée des 2:1-[α/aza]-oligomères  
et des 2:1-[α/aza]-cyclooligomères**

Le présent manuscrit s'articulera en cinq parties :

- I. Introduction et bibliographie
- II. Synthèse des précurseurs azadipeptidiques Boc-azaAA-AA-OMe
- III. Préparation des unités de base 2:1-[α/aza]-trimères et réaction d'oligomérisation des azapeptides
- IV. Etudes conformationnelles des 2:1-[α/aza]-oligomères
- V. Conclusion générale

## I. Introduction et Bibliographie

### I.1. Peptides, pseudopeptides et foldamères

Les peptides sont constitués d'un enchaînement de résidus acides  $\alpha$  aminés. Cet enchaînement constitue la structure primaire du peptide. Les peptides montrent une grande flexibilité due à la liberté rotationnelle de certaines liaisons. Cependant, on peut rencontrer au sein d'un peptide des contraintes spatiales dues à l'encombrement stérique des chaînes latérales. Dans certains cas, l'établissement de liaisons hydrogène intermoléculaires et surtout intramoléculaires induit au peptide une structure secondaire qui régule son activité biologique. Les molécules adoptent alors une conformation privilégiée en hélice, en feuillet ou en coude (Figure 4). Ce sont ces structures secondaires qui sont responsables de la reconnaissance moléculaire par le biais de laquelle nos cellules véhiculent et échangent de l'information. Les peptides jouent donc un rôle fondamental dans le vivant en tant que neurotransmetteurs, hormones, neuromodulateurs... Ces composés contrôlent une série de fonctions vitales telles la respiration, la digestion, la reproduction et les défenses immunitaires.



**Figure 4: Exemples de structures secondaires**

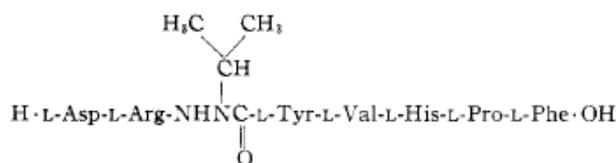
Comme nous l'avons déjà précisé auparavant, l'usage des peptides est limité de par leur biodégradabilité et leur multiplicité d'action. Il est facile d'imaginer l'intérêt que l'on peut porter à la synthèse de molécules pseudopeptidiques qui miment les propriétés structurales et fonctionnelles de leurs homologues biologiques. Une modification pseudopeptidique peut être

introduite soit à un endroit ciblé dans une séquence, comme par exemple au niveau du site de coupure d'un substrat, soit de façon régulière tout au long de la séquence. Intervient alors le terme de foldamère, introduit par Samuel Gellman en 1998<sup>3</sup>, qui caractérise tout oligomère ou polymère ayant une forte tendance à adopter une conformation compacte bien définie et prévisible en solution. Cette auto-structuration est imputable à des interactions faibles de type liaisons hydrogène intramoléculaires ou  $\pi$ -stacking. Dans cette thèse, nous étudierons l'obtention d'oligomères pseudopeptidiques mixtes  $\alpha$ /aza et analyserons structurellement nos molécules synthétiques pour savoir si elles adoptent une structure secondaire stabilisée par des interactions non covalentes sous forme de foldamère.

## **I.2. Influence de l'introduction d'un résidu aza dans une chaîne peptidique**

### **I.2.1. Historique et intérêt biologique**

Hans-Jürgen Hess et ses collaborateurs ont été les premiers à remplacer un résidu acide  $\alpha$  aminé dans un peptide naturel par un résidu acide azaaminé en 1963<sup>24</sup>. Leurs travaux ont consisté à incorporer un résidu azaVal en position 3 pour former un analogue de l'angiotensine bovine II (Figure 5). Les tests effectués ont montré que cet analogue pseudopeptidique possédait une activité biologique certaine de vasoconstriction profonde qui a comme conséquence la croissance de la pression sanguine.



**Figure 5 : Analogue pseudopeptidique de l'angiotensine bovine II**

Les azapeptides ont été par la suite étudiés par de nombreux groupes de recherche pour la conception d'analogues d'hormones ou d'inhibiteurs de protéases. Nous pouvons prendre comme exemple les travaux effectués sur les analogues de l'hormone lulibérine, à partir desquels de puissants agonistes et antagonistes ont été préparés pour produire ou empêcher l'ovulation<sup>22</sup>. Un produit de cette série, le ZOLADEX<sup>®</sup>, a été également introduit

sur le marché pharmaceutique en tant que médicament pour le traitement du cancer de la prostate<sup>22</sup>.

Au laboratoire, des travaux ont été réalisés par l'équipe de Michel Marraud sur la préparation et l'étude structurale d'azapeptides contenant un, deux ou trois résidus<sup>14,25-28</sup>. Les dipeptides et tripeptides sont formés à partir d'un résidu azaAsparagine ou azaAlanine et ont tous la particularité de comporter un résidu proline en amont ou en aval de ce résidu aza. La structure conformationnelle des azapeptides préparés a été analysée par diffraction des rayons X, par spectroscopie RMN et par spectroscopie IR et démontre que :

- la substitution Asn/azaAsn ou Ala/azaAla engendre de fortes modulations conformationnelles. Ainsi, l'atome d'azote  $\alpha$  acquiert une chiralité de type D lorsque le résidu aza est placé en amont d'une L-proline.
- l'atome d'azote  $\alpha$  est inclus dans un repliement de type  $\beta$  lorsque que le résidu aza est en position  $i+1$  et la proline en position  $i+2$ .

Cette conformation n'est pas favorable dans les peptides naturels. Toutefois, il reste une ambiguïté quant aux rôles respectifs des résidus acides azaaminés et proline dans la formation de repliement  $\beta$  car ils peuvent tous deux induire une structuration en coude  $\beta$ .

Ces résidus ont ensuite été introduits dans des peptides d'intérêt biologique : le marqueur de la *N*-glycosylation et le décapeptide MIR (Main Immunogenic Region) dont la séquence *N*-terminale est indispensable au signal biologique<sup>25</sup>.

La *N*-glycosylation consiste en une opération biochimique qui greffe des glucides sur les chaînes peptidiques en croissance dès leur entrée dans le réticulum endoplasmique. L'introduction d'un résidu azaAsn au sein de la séquence étalon R-CO-Asn-Ala-Thr-NHR' codant le processus de la *N*-glycosylation fait que la molécule n'est plus reconnue par l'oligosaccharidyltransférase (OST).

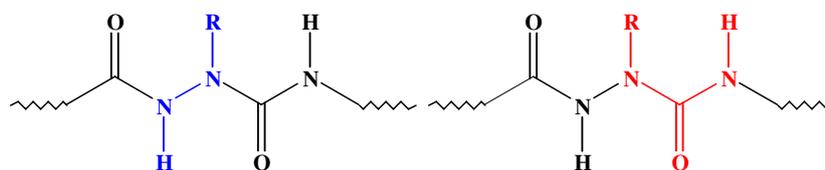
Les malades atteints de Myasthénie développent des anticorps contre leurs propres récepteurs de l'acétylcholine. Il en résulte une interruption de l'influx nerveux et l'apparition d'une paralysie évolutive contre laquelle on ne dispose que de traitements palliatifs et non curatifs. Les auto-anticorps sont en fait principalement dirigés contre une région extracellulaire du récepteur de l'acétylcholine (RACH) appelé MIR (Région Immunogénique Majeure) qui diffère de celle où se fixe l'acétylcholine elle-même. La substitution Asn/azaAsn dans le décapeptide MIR a entraîné d'importants bouleversements conformationnels dans la partie *N*-terminale. Ceci a entraîné la perte totale d'affinité vis-à-vis d'anticorps connu anti-RACH. La

substitution Ala/azaAla dans MIR se traduit par un affaiblissement de l'affinité de liaison pour un anticorps anti-RACH du poisson torpille.

William D. Lubell et ses collaborateurs ont, eux aussi, travaillé sur les azapeptides<sup>23,29,30</sup>. Ils ont effectué un « aza-scanning » de peptides connus dans le but de déceler des composés biologiquement actifs. Ce processus consiste à modifier chimiquement l'un après l'autre les résidus acides  $\alpha$  aminés par un résidu aza acide aminé et d'étudier les modifications structurales locales. William D. Lubell et son équipe ont effectué ces modifications chimiques par synthèse sur phase solide. Ils ont étudié trois peptides biologiquement actifs<sup>23</sup>: l'hormone de croissance sécrétagogue (qui stimule les sécrétions d'organes), l'agoniste du récepteur de la mélanocortine (qui stimule la synthèse de la mélanine dans les cellules de la peau), l'antagoniste de l'hormone peptidique calcitonine humaine (hormone hypocalcémiant et hypophosphorémiant)<sup>29,30</sup>. Les résultats ont montré que la formation d'une coude de type  $\beta_{II}$ ' dans les analogues aza de l'antagoniste de l'hormone peptidique calcitonine humaine augmentait le pouvoir antagoniste de ces derniers. Aucun résultats biologiques concernant l'hormone de croissance sécrétagogue et l'agoniste du récepteur de la mélanocortine n'ont été publiés dans la littérature.

### I.2.2. Influence structurale d'un résidu acide azaaminé

La substitution d'un carbone  $\alpha$  par un azote induit des changements significatifs dans la structure d'un peptide de part la perte du centre asymétrique et de la libre rotation de la liaison  $C_{\alpha}$ -C. L'introduction d'un atome d'azote génère deux éléments de structure : une partie « hydrazine » (en bleu) et un élément « urée » (en rouge) (Figure 6)<sup>31</sup>.



**Figure 6 : Eléments constituant un résidu aza**

De façon à comprendre la conformation des azapeptides, plusieurs modèles ont été étudiés. Ce sont les propriétés du motif hydrazine qui donnent le plus d'information. La conformation

de l'hydrazine et de son dérivé 1,2-diformylé a beaucoup été étudiée en chimie quantique<sup>31</sup>. Les résultats montrent que l'énergie est minimale lorsque les doublets non-liants de l'azote sont perpendiculaires. On a alors une structure plane de l'azote  $\alpha$ . Par contre, si cet azote est substitué, il devient pyramidal.

Il faut retenir de ces calculs empiriques concernant l'hydrazine et la 1,2-diformylhydrazine que les valeurs des angles de torsions correspondent à celles trouvées dans la majorité des coudes  $\beta$ .

La partie urée apporte, elle, une meilleure stabilité chimique que les liens amides.

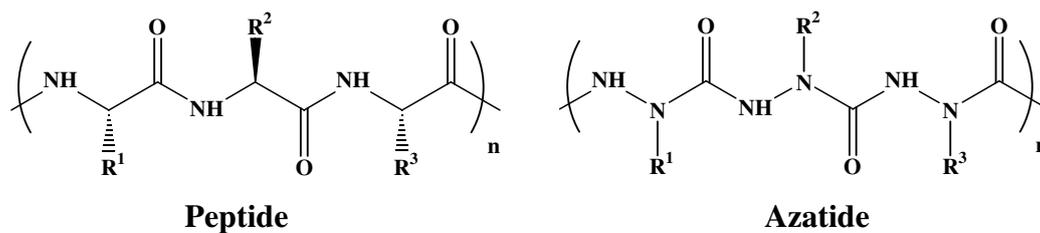
Les études structurales des azapeptides sont limitées à quelques modèles comportant un résidu proline<sup>29</sup>. Ces azapeptides induisent la formation de coudes  $\beta$ . Il faut cependant noter que l'on ne peut pas étendre ces résultats à tout type d'azapeptides car le résidu proline joue, lui-même, un rôle essentiel sur la structuration.

La spectroscopie RMN et les calculs *ab initio*, réalisés sur des peptides modèles contenant différents acides azaaminés, ont montré que la conformation des résidus aza dans la chaîne peptidique est indépendante de la chaîne latérale de ce dernier<sup>16</sup>.

L'ensemble de ces résultats nous laissent penser que les azapeptides sont de très bons candidats en tant qu'unités de base de nouveaux foldamères et pour la conception de nouvelles molécules à intérêt thérapeutique.

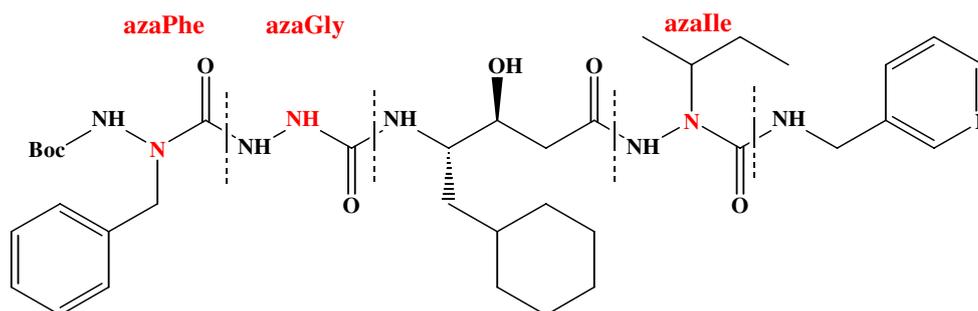
### **I.3. Oligomères polyazapeptidiques**

Kim D. Janda et ses collaborateurs ont été les premiers à synthétiser en phase liquide des oligomères uniquement composés de résidus acides azaaminés<sup>32</sup>. Ils les ont nommés les azatides (Figure 7). Leurs travaux ont été réalisés avec succès et suggèrent que les azatides peuvent être rapidement synthétisés. Cependant, aucune étude concernant les propriétés conformationnelles de ces composés ainsi que les propriétés biologiques n'a été décrite à ce jour.



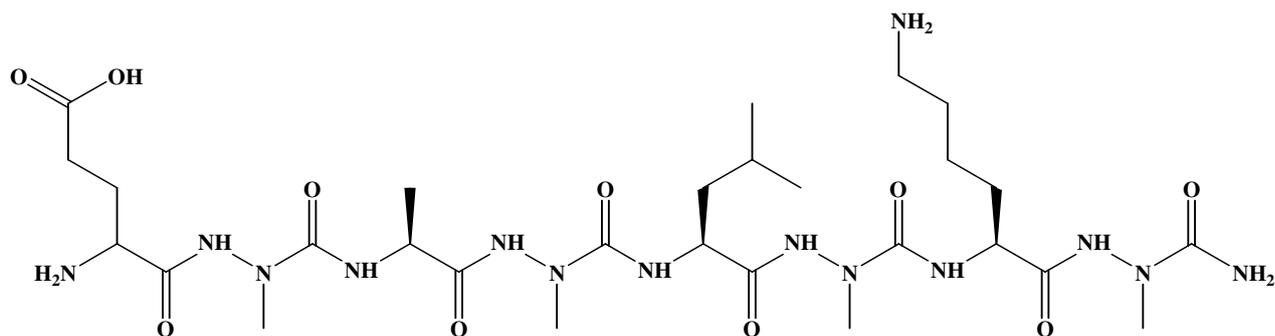
**Figure 7 : Formule développée d'un peptide et d'un azatide**

Joachim Gante et *al.* ont synthétisé un analogue d'un puissant inhibiteur de la rénine<sup>20</sup> en remplaçant les résidus naturels amino-acides par des résidus acides azaaminés (Figure 8). Ils ont conclu que la rigidité induite par le résidu aza diminuait la force d'interaction entre le site actif et le substrat. L'activité inhibitrice de la rénine est donc plus faible avec l'analogue aza qu'avec le peptide parent. En effet, l'IC<sub>50</sub> de la molécule native est de l'ordre du nanomolaire alors l'IC<sub>50</sub> de l'analogue est supérieure à 10<sup>-5</sup>M.



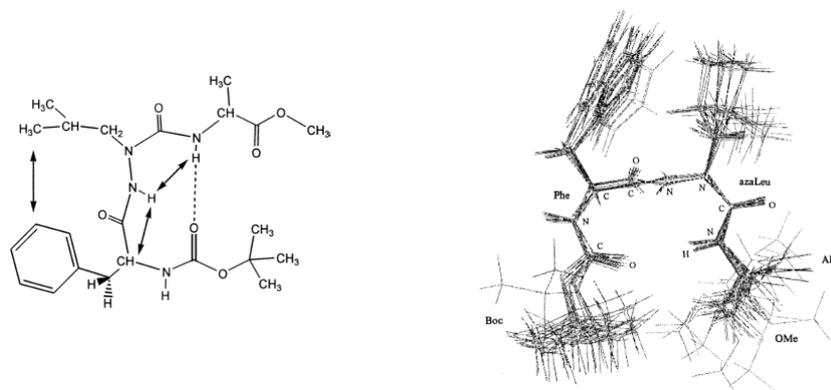
**Figure 8 : Analogue aza de l'inhibiteur de la rénine**

William D. Lubell et son équipe ont évoqué la synthèse d'un octapeptide constitué d'une alternance acide  $\alpha$  aminé naturel/azaAlanine (Figure 9)<sup>33</sup>. Sa synthèse a été réalisée pas à pas sur phase solide en stratégie Fmoc. La technique décrite est limitée car elle ne permet pas d'introduire tout type de résidus acides azaaminés. Les études structurales sur cet octapeptide n'ont pas été publiées.



**Figure 9 : Formule développée de l'octapeptide**

Kang-Bong Lee et ses collaborateurs ont exposé leurs résultats concernant le rôle d'un résidu acide azaaminé dans la formation d'un repliement  $\beta$  et sa stabilité au sein d'un peptide (Figure 10)<sup>34</sup>. Pour ce faire, ils ont surtout utilisé des méthodes de calcul *ab initio* et ont aussi effectué des études spectroscopiques par RMN et IR sur leurs composés tripeptidiques et tétrapeptidiques.



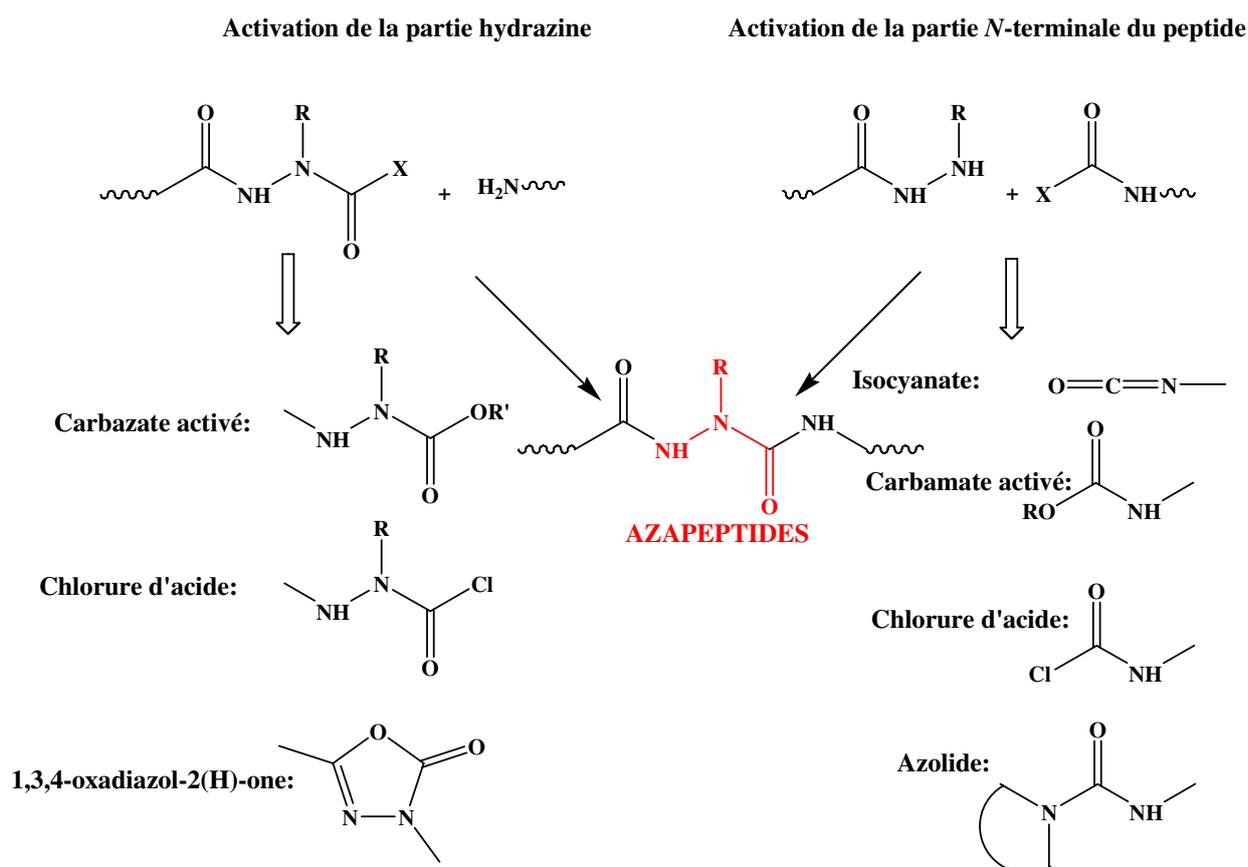
**Figure 10 : Corrélations NOE de Boc-Phe-azaLeu-Ala-OMe (à gauche) et la superposition des 14 structures de plus basse énergie du tripeptide trouvées par dynamique moléculaire sous contraintes (à droite)**

Les travaux de Kang-Bong Lee *et al.* seront décrits avec plus de précision dans le chapitre IV consacré aux études conformationnelles.

### I.4. Généralités sur les modes de synthèse des azapeptides

L'incorporation d'un résidu acide azaaminé dans une chaîne peptidique peut être réalisée par différentes méthodes qui ressemblent fortement à celles utilisées pour les couplages peptidiques classiques mais qui dérivent de la chimie des semicarbazides. En principe, la formation d'un acide azaaminé est issue de la réaction entre un dérivé hydrazine ou hydrazide et un groupement carbonyle (dérivés d'acides carboxyliques activés par exemple). Plus généralement, la synthèse des azapeptides résulte de la combinaison de la chimie des hydrazines et des peptides (Schéma 1).

Compte tenu de la grande diversité des chaînes latérales présentes dans les acides  $\alpha$  aminés, il n'est pas simple de donner un mode opératoire général pour la synthèse des azapeptides. Cependant, nous allons décrire dans cette partie, les techniques de synthèse les plus utilisées, sans être exhaustifs<sup>15,35</sup>.



**Schéma 1 : Méthodes de synthèse des résidus acides azaaminés et incorporation dans une chaîne peptidique**

### I.4.1. Méthode aux isocyanates

La méthode aux isocyanates est la méthode la plus fréquemment utilisée. Celle-ci consiste en l'addition d'une hydrazine correctement protégée sur un isocyanate préalablement obtenu par action du phosgène (Schéma 2). L'addition sur l'atome d'azote substitué est privilégiée, ce qui permet d'obtenir très majoritairement le composé voulu substitué en position  $\alpha$ . Cependant, l'utilisation du phosgène n'est pas des plus recommandée car il est très toxique et le dérivé isocyanate n'est pas très stable.

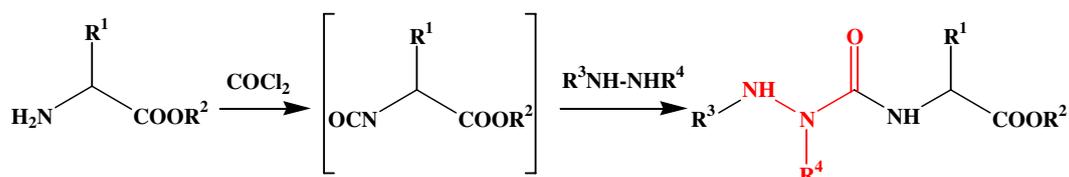


Schéma 2: Addition d'un dérivé d'hydrazine sur un isocyanate

### I.4.2. Méthode aux dérivés d'esters activés (carbazate ou carbamate activés)

Par la méthode aux esters activés, il est possible de procéder à une C-activation, par une activation sur le dérivé hydrazine, ou à une N-activation, par une activation sur l'extrémité N-terminale du peptide. La C-activation est réalisée par réaction de l'hydrazide avec un aryl chloroformiate ou un diarylcarbonate. La N-activation se fait par réaction entre le groupement amine libre de l'extrémité N-terminale de l'acide  $\alpha$  aminé ou de l'acide azaaminé avec les mêmes réactifs (Schéma 3).

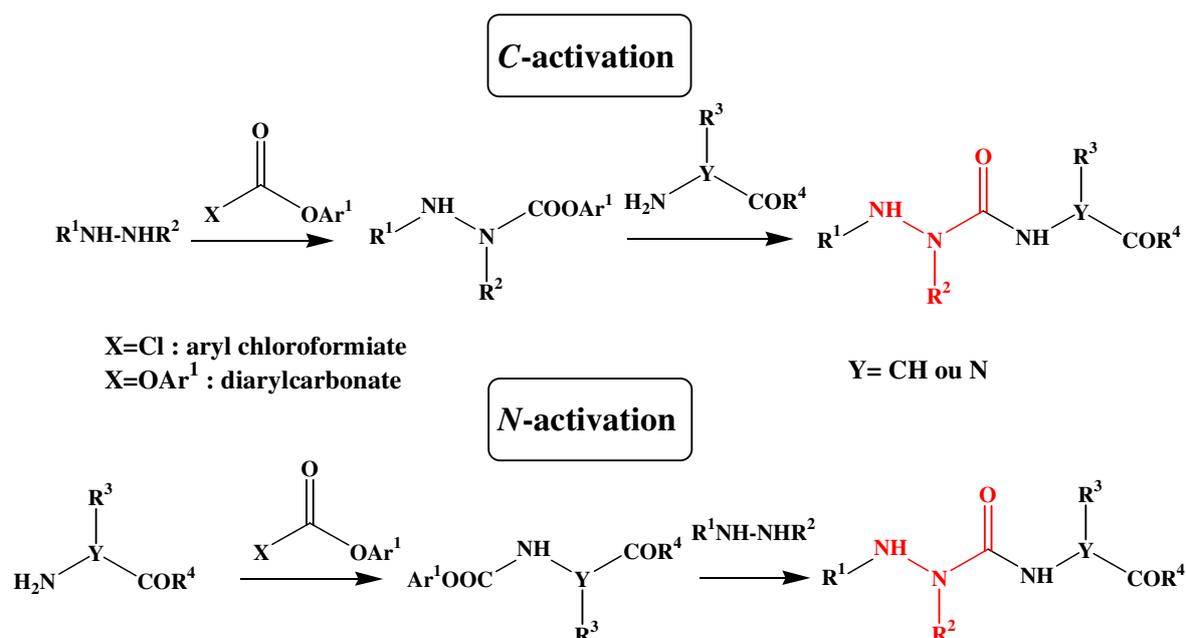


Schéma 3: Formation des azapeptides par la méthode aux esters activés

### I.4.3. Méthode aux chlorures d'acides

La méthode de couplage peptidique aux chlorures d'acides est bien connue et est largement utilisée pour la synthèse peptidique classique. Celle-ci est aussi applicable à la série azapeptidique<sup>25,28,36</sup>. Comme pour la méthode aux esters activés, la *N*-activation et la *C*-activation sont possibles, mais pratiquement toutes les applications de cette méthode utilisent la *C*-activation des dérivés hydrazides (Schéma 4).

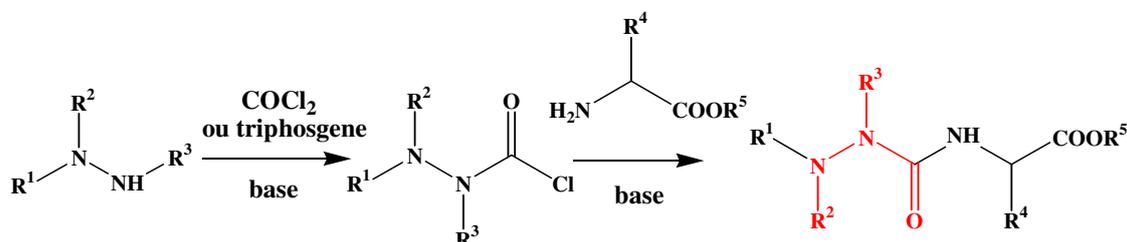


Schéma 4 : Méthode de couplage aux chlorures d'acides

L'hydrazine réagit avec le phosgène ou le triphosgène en présence d'une base pour donner le chlorure d'acide correspondant. Celui-ci réagit avec l'extrémité *N*-terminale du résidu acide

aminé pour conduire à l'azapeptide voulu. Les chlorures d'acides sont isolés sous forme de solides et peuvent être conservés à 4°C. Cette méthode est recommandée pour des couplages difficiles avec des amines secondaires, que ce soit en série azapeptidique ou en série peptidique car elle est connue comme étant une activation forte des intermédiaires réactionnels.

#### I.4.4. Réaction des *N*-azolides avec un partenaire amine

Les *N*-activations sous forme d'azolides peuvent être utilisées pour la synthèse d'azapeptides comme les *N*-activations sous forme d'esters activés. Le partenaire *N*-activé est préparé soit par action d'un azolide sur un dérivé isocyanate soit par réaction entre un acide aminé et le 1,1'-carbonyldiimidazole<sup>37</sup> (Schéma 5).

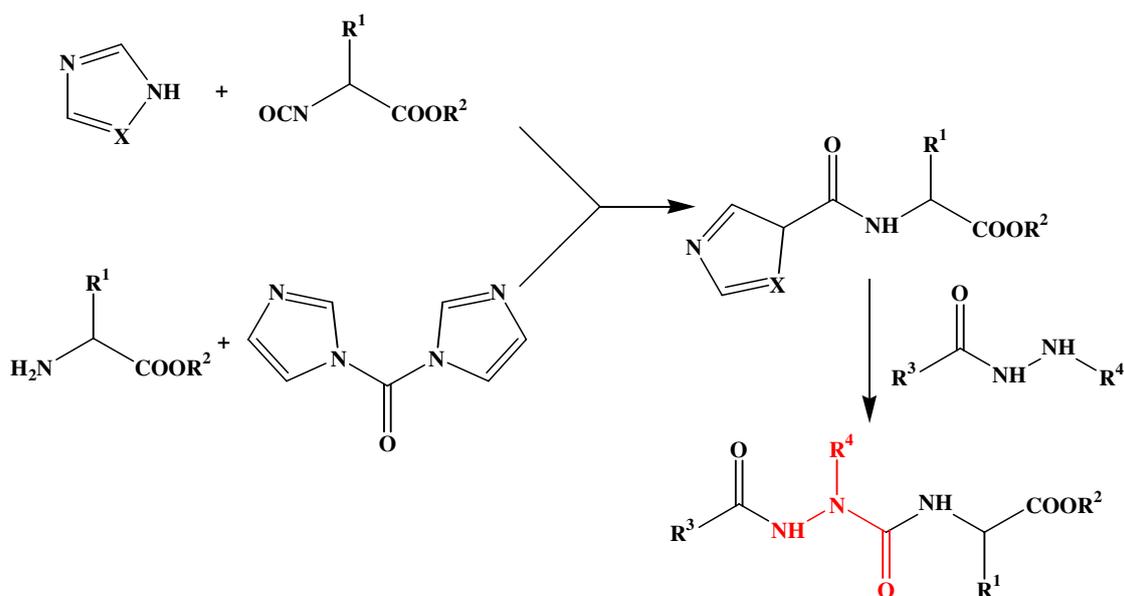


Schéma 5 : Synthèse d'azapeptides *via* les *N*-azolides

La voie utilisant le 1,1'-carbonyldiimidazole semble être beaucoup plus intéressante car elle est facile à mettre en œuvre et ne nécessite pas d'intermédiaire isocyanate toxique et instable.

#### I.4.5. Ouverture du cycle 1,3,4-oxadiazol-2(3H)-one par un partenaire amine

L'ouverture du cycle 1,3,4-oxadiazol-2(3H)-one par un partenaire amine permet de générer des azapeptides par réaction d'une 1,3,4-oxadiazol-2(3H)-one, qui est substituée en position 5 par un groupement alkyle, aryle ou Z-aminoalkyle, avec divers azadipeptides non protégés à leur extrémité N-terminale (Schéma 6)<sup>38</sup>. Par une ouverture du cycle, il est possible d'obtenir directement des azatri- ou azatétrapeptides. L'hétérocycle en question peut être obtenu à partir de l'hydrazide correspondant par action du phosgène ou à partir d'un acide azaaminé protégé à son extrémité C-terminale par un ester 4-nitrophényle en présence d'une base.

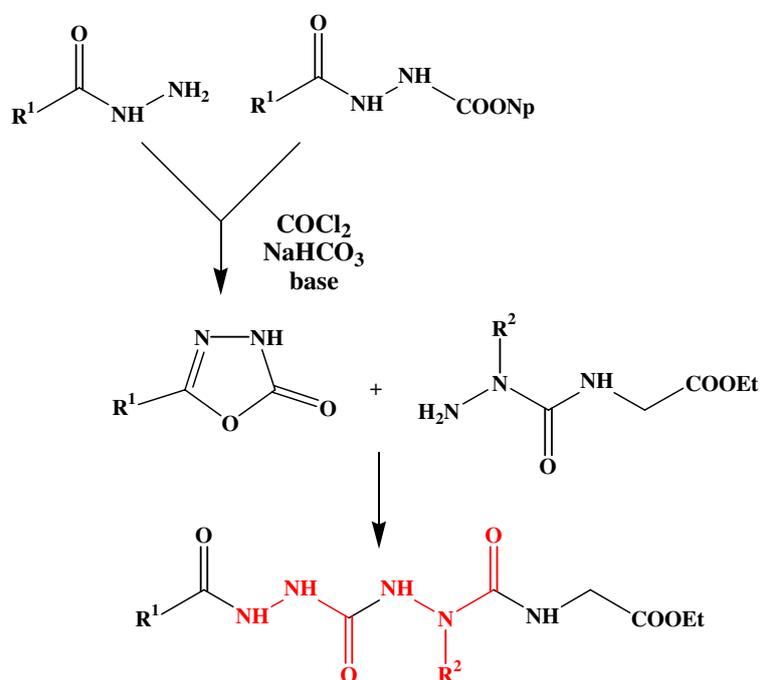


Schéma 6 : Synthèse des azapeptides *via* les 1,3,4-oxadiazol-2(3H)-ones

#### I.4.6. Conclusion : étude comparée des modes de synthèse des azapeptides

Nous avons présenté cinq méthodes de synthèse des azapeptides. Nous pouvons dès à présent envisager la ou les méthodes que nous allons pouvoir appliquer ou pas à nos composés aza peptidiques :

- *Méthodes aux chlorures d'acides* : cette méthode n'est pas applicable à la synthèse peptidique en stratégie Boc parce que HCl est libéré et le groupement Boc est enlevé dans ces conditions.
- *Méthode aux isocyanates* : l'avantage de cette technique est qu'elle génère très peu de sous-produits de réaction. Les purifications sont donc faciles et les rendements sont bons. C'est la méthode la plus rapide et la plus propre pour obtenir des dérivés azapeptidiques. Néanmoins, il n'est pas recommandé d'utiliser du phosgène. Ce problème peut être pallié en utilisant du triphosgène qui est un bon substitut du phosgène.
- *Réaction des N-azolides avec un partenaire amine* : cette méthode ne comporte pas d'avantage par rapport à la méthode aux isocyanates car elle nécessite une étape supplémentaire.
- *Ouverture du cycle 1,3,4-oxadiazol-2(3H)-one par un partenaire amine* : cette méthode nécessite la préparation préalable d'hydrazides. De plus, la réactivité du partenaire amine varie considérablement en fonction de la nature des chaînes latérales R<sup>1</sup> et R<sup>2</sup> de chacun des deux partenaires.
- *Méthodes aux esters activés* : cette méthode permet d'obtenir facilement des dérivés azapeptidiques. Elle nécessite l'utilisation d'hydrazines substituées en début de synthèse. Cette méthode ne constitue pas la meilleure méthode de synthèse de nos composés car il n'existe pas de méthode générale de synthèse d'hydrazines substituées.

Nous ne pouvons pas utiliser la méthode aux chlorures d'acides car nous choisissons de travailler en stratégie Boc.

En conclusion, nous pensons que la méthode de synthèse aux isocyanates en utilisant du triphosgène est la méthode de choix pour obtenir nos oligomères  $\alpha$ /aza en phase liquide et en stratégie Boc.

## II. Synthèse des précurseurs azadipeptidiques Boc-azaAA-AA-OMe

### II.1. Introduction

Toutes les méthodes de synthèse des azapeptides décrites précédemment présentent pour principal inconvénient de ne pas être généralisables et d'être parfois laborieuses à mettre en œuvre. Notre objectif est de développer une nouvelle méthode de synthèse d'oligomères azapeptidiques. Ceci consiste en la synthèse d'une unité de base qui est ensuite engagée dans des réactions de couplages peptidiques de façon à obtenir des oligomères aza/ $\alpha$  réguliers.

Dans un premier temps, nous pouvons envisager une stratégie de synthèse pas à pas dans laquelle les résidus acides azaaminés ou acides  $\alpha$  aminés sont introduits par couplage peptidique à la place voulue (Schéma 7).

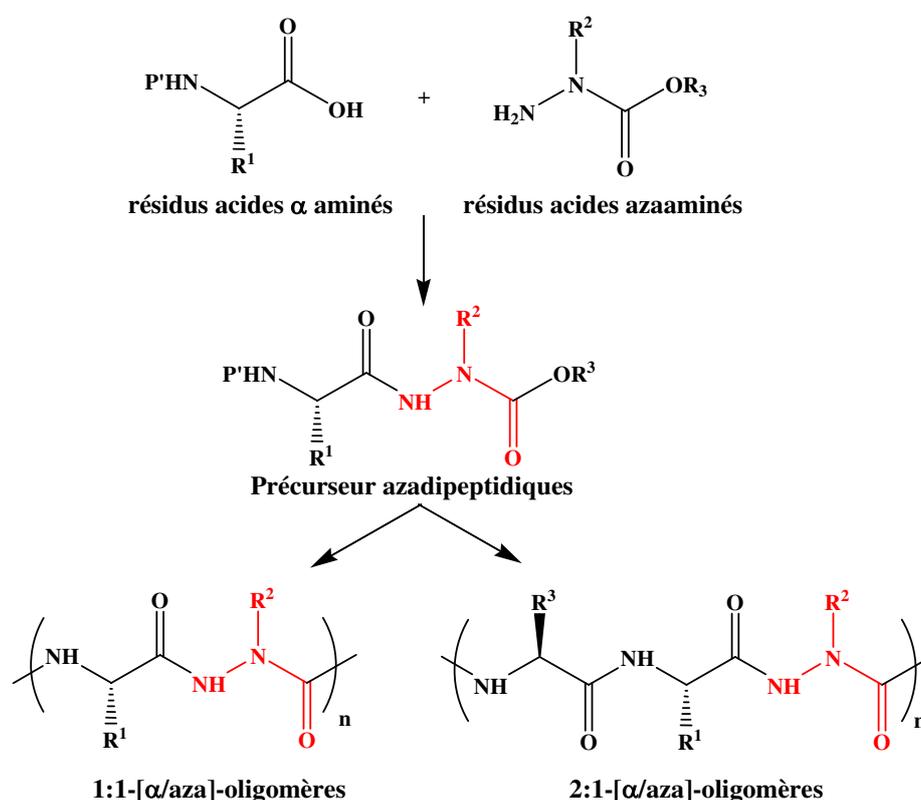


Schéma 7 : Exemple de stratégie de synthèse pas à pas sur des [α/aza]-oligomères

Cette méthode n'a pas été retenue car elle présente deux inconvénients importants :

- il n'est pas aisé d'obtenir des monomères acides azaaminés. Ceux-ci ne sont pas commerciaux, contrairement aux acides  $\alpha$  aminés, et leur synthèse est difficile à mettre en œuvre.

- la synthèse pas à pas est très longue en phase liquide. On incorpore les résidus les uns après les autres dans la chaîne pseudopeptidique ce qui accroît le nombre d'étapes de synthèse et de purification.

Dans un second temps, nous pouvons penser à un schéma réactionnel utilisant des composés précurseurs azadipeptidiques préparés à partir d'un dérivé d'acide  $\alpha$  aminé et d'un dérivé d'hydrazine (Schéma 8).

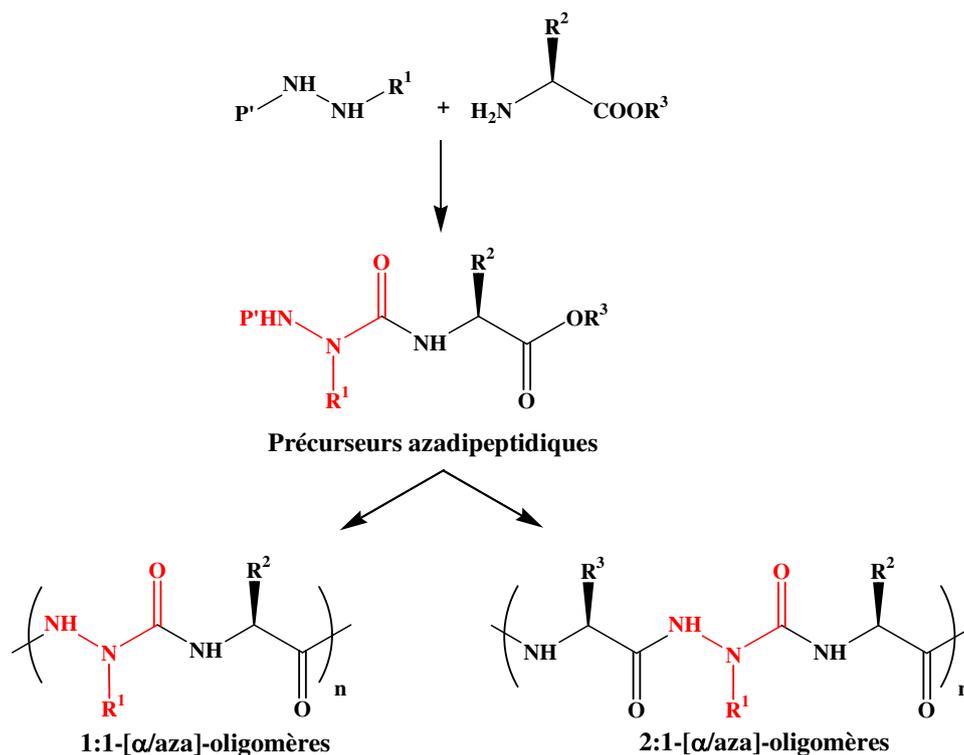


Schéma 8 : Formation d'azapeptides à partir de dérivés d'hydrazine

C'est la méthode que William D. Lubell a retenue pour synthétiser les azapeptides qu'il introduit ensuite dans des peptides biologiquement actifs<sup>23,30</sup>. En série Boc, William D. Lubell et ses collaborateurs ont synthétisé quatre sortes d'hydrazines substituées (Figure 11). En série Fmoc, la même équipe a mis au point la synthèse de plusieurs *N*-(fluorène-9-ylmethyl)-*N'*-alkyl-carbazate à partir du 9-*H*-fluorène-9-ylmethyl-carbazate (Figure 12). Ils les ont ensuite incorporés dans un dipeptide pour finalement obtenir des composés P-azaAA-AA-OH (avec P= Boc ou Fmoc) qui seront engagés en synthèse peptidique sur phase solide.

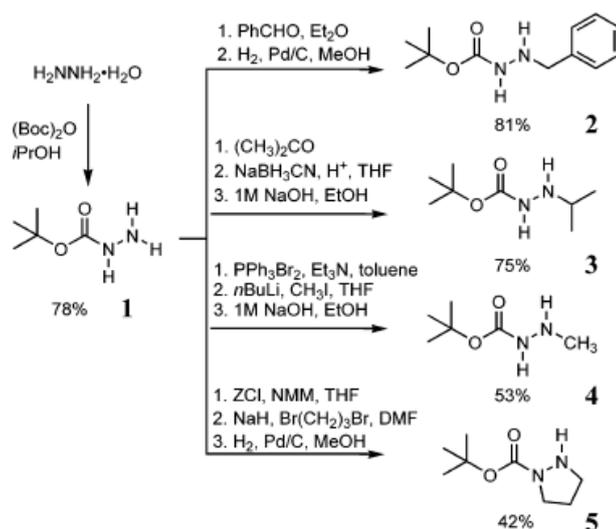


Figure 11 : Synthèse des hydrazines substituées décrite par William D. Lubell *et al.*<sup>30</sup>

De cette façon, il est possible d'introduire dans une chaîne peptidique un grand nombre d'acides azaaminés de différente nature. Cependant, dans toutes les synthèses proposées par William D. Lubell, aucune n'est générale. En effet, en stratégie Boc, quatre stratégies de synthèse sont utilisées pour la synthèse de quatre composés différents. Et en série Fmoc, dix produits sont présentés à partir de quatre méthodes.

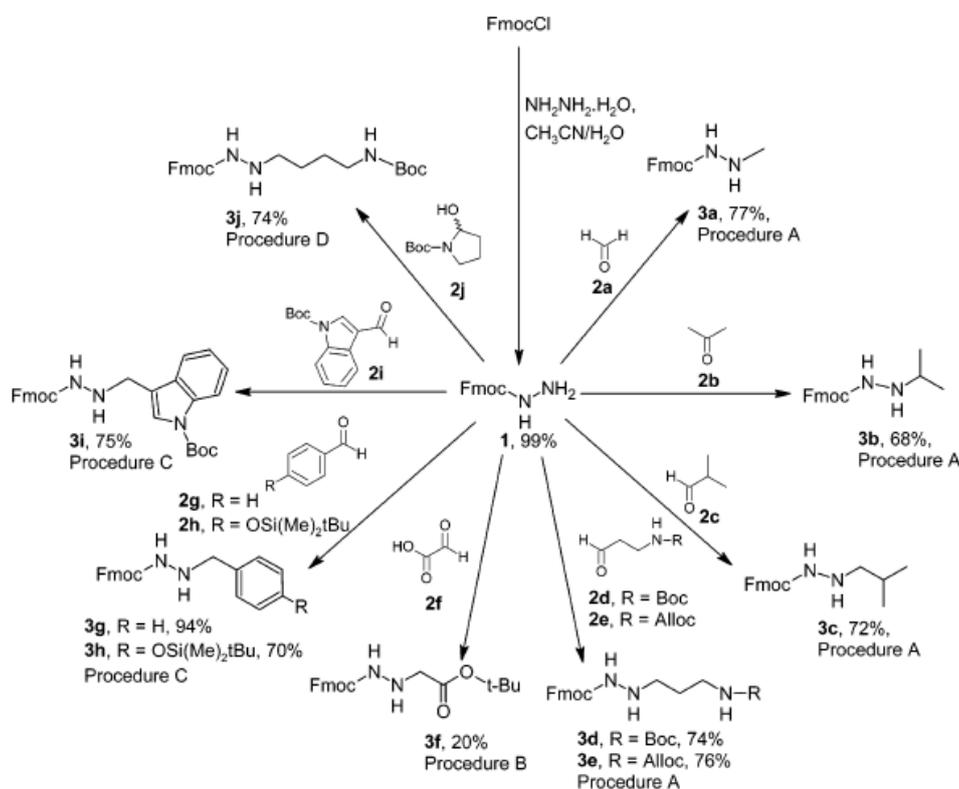


Figure 12 : Synthèse des *N*-(fluoren-9-ylmethyl)-*N'*-alkyl-carbazate par William D. Lubell *et al.*<sup>23</sup>

Dans le but de mettre au point un mode de synthèse généralisable, nous avons réfléchi à une méthode qui utilise des réactions mises au point au laboratoire pour la synthèse de pseudopeptides bis-azotés tels que les hydrazino-peptides et les *N*-aminopeptides (Schéma 9)<sup>127</sup>. Cette méthode met en jeu un motif phtalimide sur lequel s'enchaînent successivement les réactions de Mitsunobu, de déprotection, de condensation et de transprotection pour finalement obtenir l'unité de base désirée.

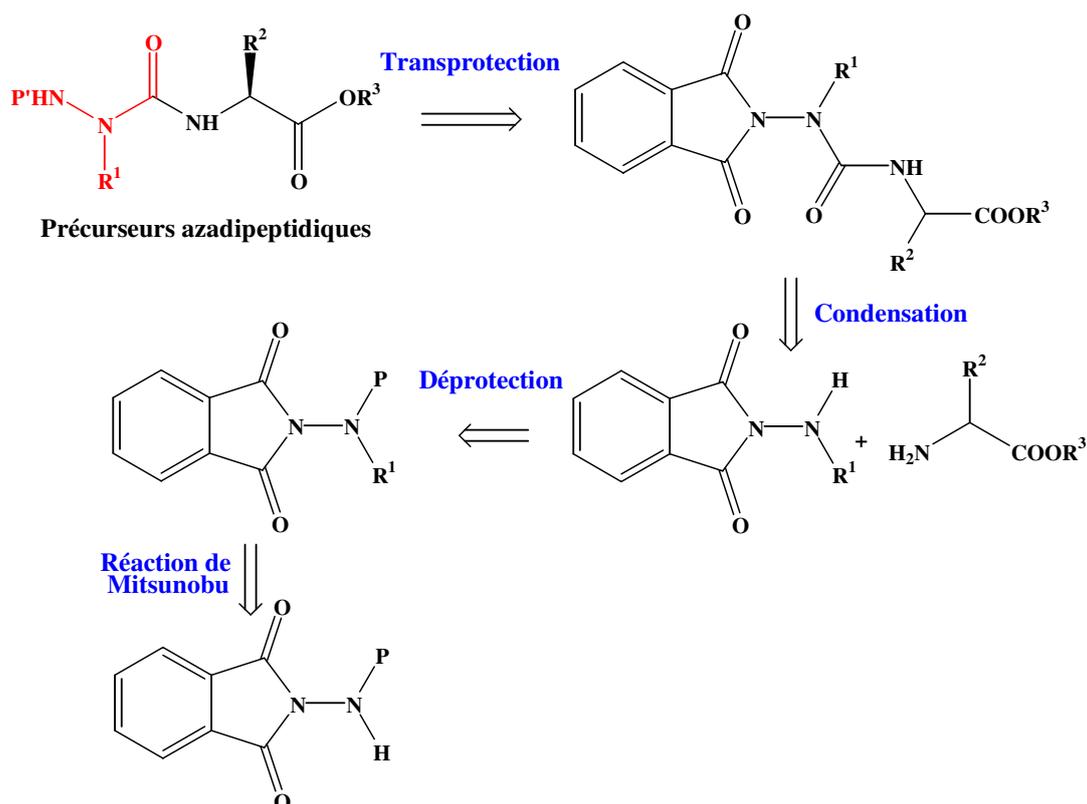


Schéma 9 : Méthode de synthèse de l'unité de base des azapeptides à partir d'un motif phtalimide

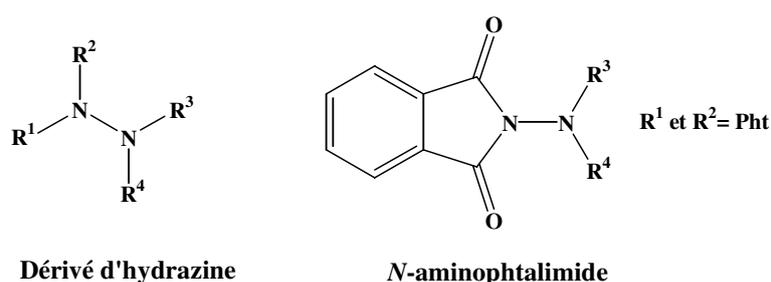
Dans ce chapitre, nous allons tout d'abord faire un résumé général des réactions utilisées puis nous décrirons la synthèse des précurseurs azadipeptidiques Boc-azaAA-AA-OMe.

## II.2. Généralités sur les modes de synthèse choisis

### II.2.1. La réaction de Mitsunobu

La réaction de Mitsunobu permet d'effectuer des *O*- et des *N*-alkylations. Elle est utilisée pour convertir un alcool en un large éventail de dérivés. La réaction se produit dans des conditions douces, entre 0°C et 20°C dans le tétrahydrofurane ou le dichlorométhane, et tolère une grande variété de groupements fonctionnels.

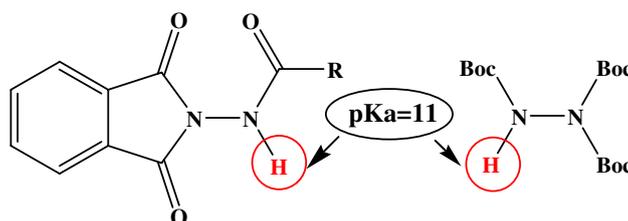
La réaction de Mitsunobu a été appliquée pour la première fois de façon générale et systématique pour la préparation d'alkylhydrazines au Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire<sup>39,40</sup>. En effet, c'est la découverte de nouveaux partenaires acides dérivés des *N*-aminophtalimides qui a ouvert la voie à un nouveau mode de préparation de dérivés d'hydrazines substituées. En effet, un *N*-aminophtalimide est en fait un dérivé hydrazine bisprotégé sur une extrémité par son groupement phtalimide (Figure 13). Comparé aux groupements protecteurs de la fonction hydrazine couramment utilisés, le groupement phtalimide possède des caractéristiques et des potentialités remarquables. Notamment, l'encombrement stérique limité lié à la structure cyclique du motif, conjugué à un effet inductif attracteur du motif phtalimide font de ce groupement un partenaire acide de choix pour la réaction de Mitsunobu à partir de *N*-alkoxycarbonylaminophtalimides. Le groupement phtalimide est d'une part un groupement protecteur de la fonction hydrazine et d'autre part joue un rôle important dans la réactivité des composés *N*-aminophtalimides<sup>40,41</sup>.



**Figure 13 : Le motif *N*-aminophtalimide**

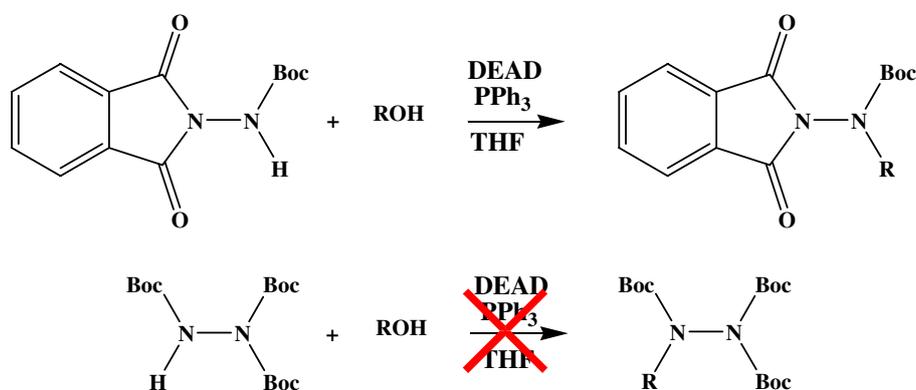
Le seul hydrogène libre de ces composés est rendu particulièrement acide (pKa~11) par la présence de trois groupements carbonyles électroattracteurs. Ainsi, les *N*-aminophtalimides ont pu être engagés comme partenaires acides dans les réactions de Mitsunobu. La réactivité

des *N-tert*-butyloxycarbonylaminophthalimides et des tri-*tert*-butyloxycarbonylhydrazines a été comparée (Figure 14).



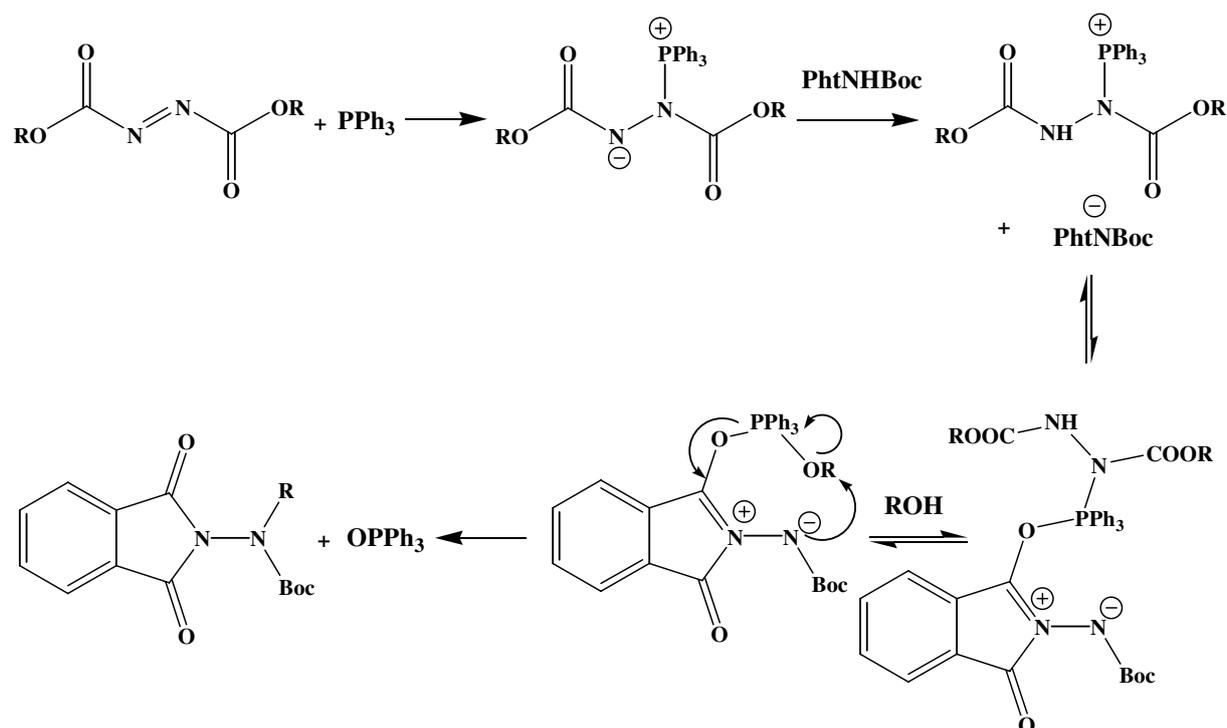
**Figure 14 :** *N-tert*-butyloxycarbonylaminophthalimide (à gauche) et tri-*tert*-butyloxycarbonylhydrazine (à droite)

Bien que leurs pKa soient proches, les réactions d'alkylation échouent avec le substrat protégé par trois groupements Boc alors qu'elles conduisent à de très bons rendements sur le substrat protégé par un groupement phthalimide (Schéma 10). Ceci démontre bien le rôle primordial du groupement phthalimide dans le succès de la réaction.



**Schéma 10 :** *N*-acylation par réaction de Mitsunobu

De plus, le motif phthalimide est impliqué dans la stabilisation du phosphorane intermédiaire. En effet, la forte délocalisation du doublet de l'atome d'azote du groupement phthalimide conduit à une structure présentant une forme zwitterionique marquée qui stabilise, par phénomènes de résonance, un anion porté par l'atome d'azote en  $\alpha$  du motif phthalimide (Schéma 11).

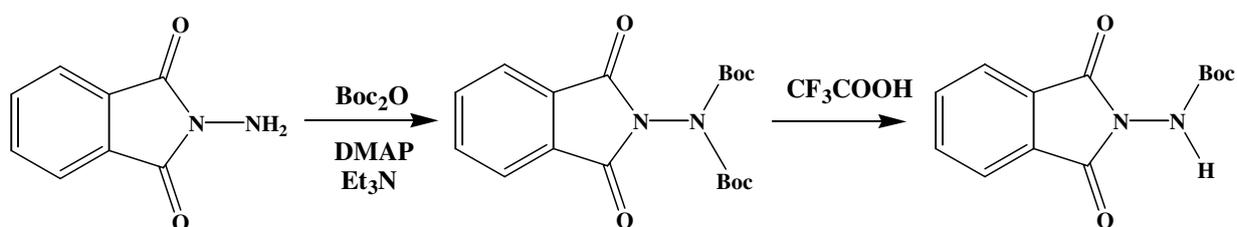


**Schéma 11 : Mécanisme réactionnel de la réaction de Mitsunobu sur des dérivés phthalimides proposé par le GSOB**

L'équipe du GSOB (Groupe de Synthèse Organique et Biostructure) a longuement travaillé sur la synthèse du *N-tert*-butyloxycarbonylaminophthalimide, composé utilisé par la suite pour la synthèse de nos précurseurs azadipeptidiques Boc-azaAA-AA-OMe.

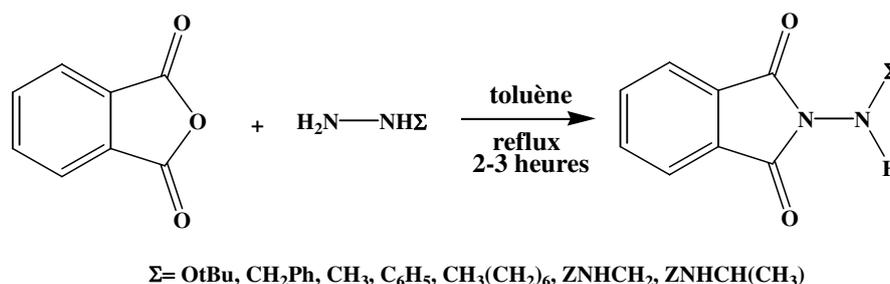
Le *N-tert*-butyloxycarbonylaminophthalimide peut être obtenu en deux étapes en utilisant le *N*-aminophthalimide comme réactif de départ (Schéma 12)<sup>42</sup>. Cette méthode présente cependant certaines limites : - le *N*-aminophthalimide est un composé commercial assez onéreux

- un large excès de di-*tert*-butyldicarbonate est nécessaire à la formation du *N-N'*-di-*tert*-butyloxycarbonylaminophthalimide
- par cette méthode, on ne peut introduire qu'un nombre limité de groupements protecteurs.



**Schéma 12 : Synthèse du *N-tert*-butyloxycarbonylaminophthalimide à partir du *N*-aminophthalimide**

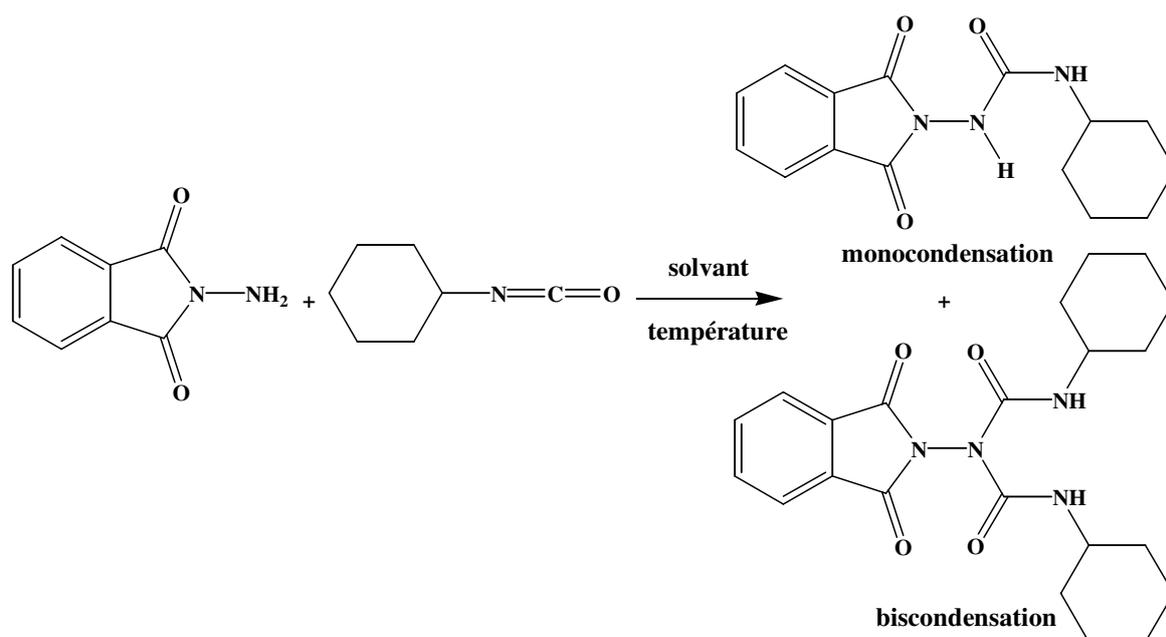
Une issue plus générale et moins onéreuse a donc été recherchée. En se basant sur les travaux décrits par J. G. Krause et *al.*<sup>43</sup> et en faisant varier les conditions opératoires, l'équipe du laboratoire a mis en place un schéma réactionnel permettant d'obtenir les *N*-alkoxycarbonylaminophthalimides en une étape et avec de très bons rendements (Schéma 13)<sup>44</sup>. Celui-ci consiste à placer l'anhydride phthalique à reflux du toluène durant trois heures en présence d'hydrazide ou de carbazate. Cette synthèse ne nécessite pas de purification ultérieure.



**Schéma 13 : Synthèse des *N*-alkoxycarbonylaminophthalimides à partir de l'anhydride phthalique**

### II.2.2. Réaction de condensation d'un dérivé isocyanate *via* le triphosgène

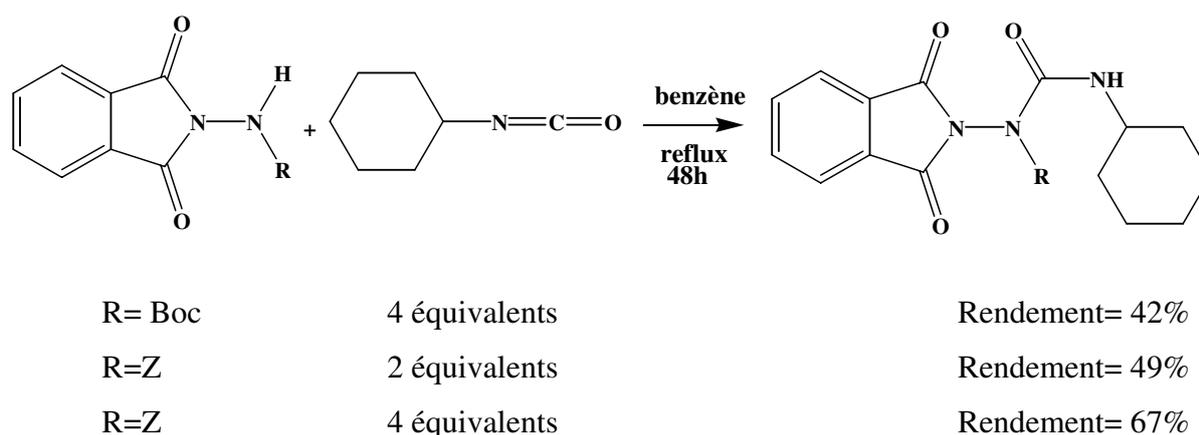
Au sein du laboratoire, des études ont été réalisées sur la réactivité du *N*-aminophthalimide vis-à-vis des isocyanates. Une étude systématique a été réalisée en utilisant le cyclohexylisocyanate, commercial et peu onéreux, en faisant varier la nature du solvant, la température et le nombre d'équivalents d'isocyanate introduits (Schéma 14).



**Schéma 14 : Condensation du cyclohexylisocyanate sur le *N*-aminophthalimide**

Durant cette étude, quatre solvants ont été étudiés : le tétrahydrofurane, le dioxane, le benzène et le chloroforme. A température ambiante et avec un équivalent de cyclohexylisocyanate aucune réaction n'est observée quel que soit le solvant utilisé. Le produit de monocondensation est observé avec un faible rendement de 25% à reflux pendant 48 heures avec un équivalent d'isocyanate. Dès que l'on introduit un excès du partenaire isocyanate, le produit de biscondensation est obtenu à chaque fois de façon majoritaire.

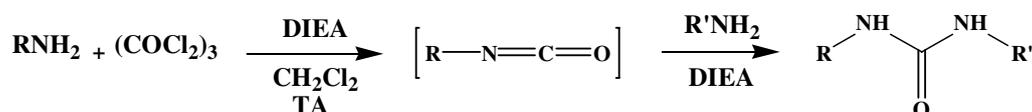
Cette étude montre qu'il est difficile de synthétiser le produit de monocondensation à partir du *N*-aminophthalimide. L'utilisation du *N*-aminophthalimide protégé par un groupement carbamate permet la protection de ce dernier et donc d'éviter la biscondensation. Les conditions réactionnelles décrites dans le Schéma 15 qui ont donné de bons résultats sont retenues : dans le benzène à reflux avec quatre équivalents d'isocyanate.



**Schéma 15 : Condensation du cyclohexylisocyanate sur le N-alkoxycarbonylaminophthalimide**

Dans ces conditions réactionnelles, les rendements sont plus élevés avec le groupement Z qu'avec le groupement Boc. Le nombre d'équivalents du partenaire isocyanate nécessaire à l'obtention d'un rendement acceptable reste cependant élevé et l'utilisation du benzène à reflux n'est pas des plus recommandée. Une autre méthode pouvant pallier ces inconvénients a donc été recherchée.

Les travaux de Pavel Majer et Ramnarayan S. Randad ont montré qu'il est possible d'obtenir en une étape une urée dissymétrique en générant tout d'abord un isocyanate par action d'une amine sur du triphosgène, puis en additionnant au milieu réactionnel une autre amine (Schéma 16)<sup>45</sup>. Cette réaction s'effectue dans des conditions réactionnelles douces et peut être adaptée à des amines secondaires.

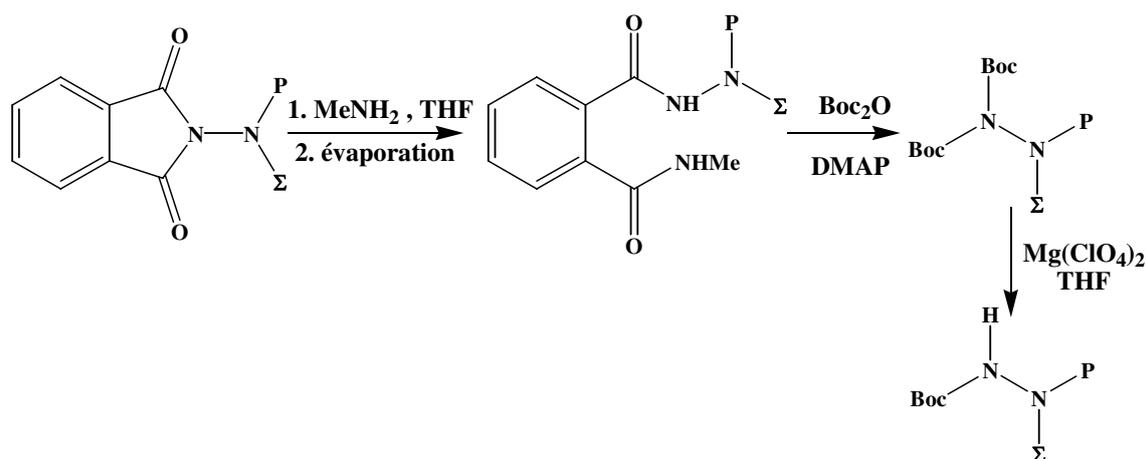


**Schéma 16 : Réaction de condensation d'un isocyanate formé par le triphosgène**

Cette méthode est applicable aux amines fonctionnalisées tels que les acides  $\alpha$  aminés comme partenaire amine  $\text{RNH}_2$  et aux composés N-alkoxycarbonylaminophthalimides comme partenaire amine  $\text{R}'\text{NH}_2$ , ce qui permet d'envisager la synthèse d'azapeptides par cette voie.

### II.2.3. Réaction de transprotection

Bien qu'on ait démontré l'intérêt du groupement phtalimide dans l'étape de synthèse des précurseurs azadipeptidiques utilisant la réaction de Mitsunobu, il est à noter que les conditions nécessaires à sa déprotection ne sont pas compatibles avec des réactions de synthèses peptidiques. Une méthode de transprotection du groupement phtalimide par deux groupements Boc a alors été mise au point au LCPM (Schéma 17)<sup>41</sup>.



**Schéma 17 : Méthode de transprotection utilisant le perchlorate de magnésium**

Cette méthode consiste à ouvrir le motif phtalimide par addition d'une amine primaire, puis à introduire un groupement Boc sur l'azote  $\beta$  favorisant ainsi la coupure de la liaison carbone-azote par une réaction de substitution intramoléculaire. La réaction conduit en fait à la formation de composés bisprotégés par deux groupements Boc. Dans un deuxième temps, il faut utiliser le perchlorate de magnésium pour transformer le motif imidocarbonate (-NBoc<sub>2</sub>) en motif carbamate (-NHBoc) selon le schéma 17<sup>10,41</sup>. Toutefois, cette stratégie de synthèse présente plusieurs problèmes liés d'une part à l'utilisation du perchlorate de magnésium dangereux et, d'autre part à des difficultés rencontrées lors des étapes de purification par chromatographie, rendue difficile par la présence de méthylphtalimide.

Des travaux plus récents<sup>46</sup> ont mené à une méthode générale de transprotection permettant de remplacer directement le motif phtalimide par un seul groupement Boc et ce sans formation du méthylphtalimide (Schéma 18)<sup>10</sup>.

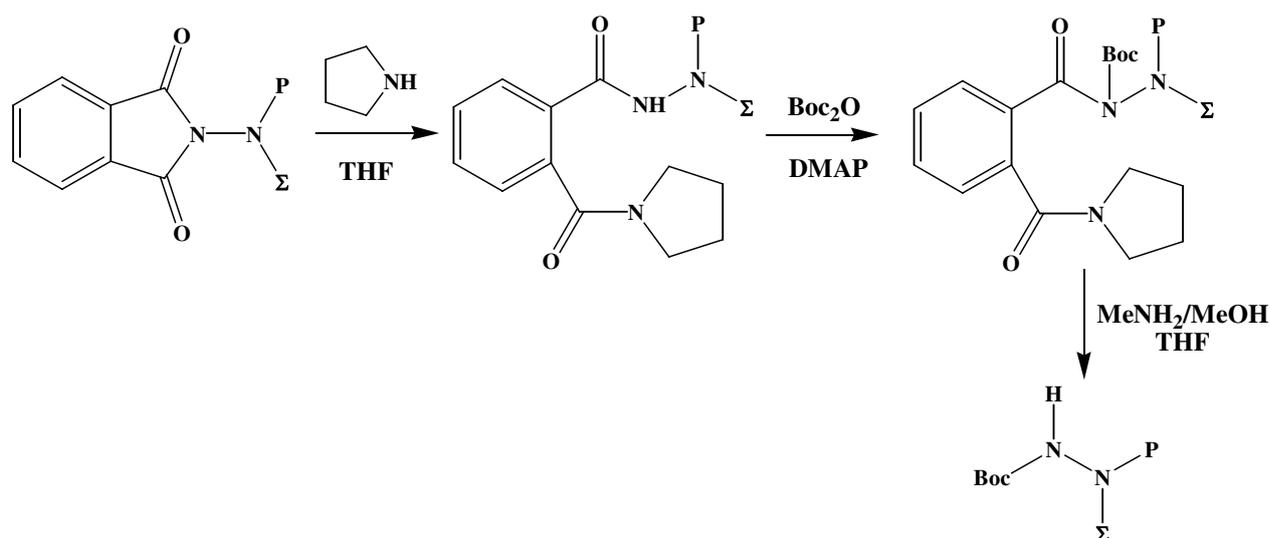


Schéma 18 : Méthode de transprotection utilisant la pyrrolidine

Cette synthèse est possible grâce à l'utilisation d'une amine secondaire à la place de la méthylamine. En fait, la pyrrolidine permet l'ouverture du cycle mais n'est pas assez nucléophile pour réagir de façon intramoléculaire et éliminer le motif aromatique. Les intermédiaires sont stables et caractérisables. L'attaque nucléophile de la méthylamine, dans un second temps, libère les produits monoprotégés avec de bons rendements. Cette réaction de transprotection peut aussi être réalisée « one pot » ce qui améliore encore le rendement global de la transformation.

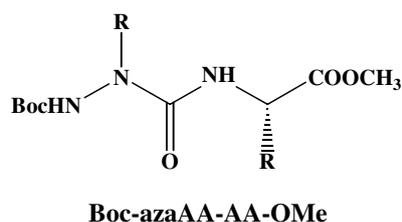
### II.3. Préparation des précurseurs azadipeptidiques Boc-azaAA-AA-OMe en phase liquide

#### II.3.1. Synthèse expérimentale des précurseurs azadipeptidiques

##### Boc-azaAA-AA-OMe

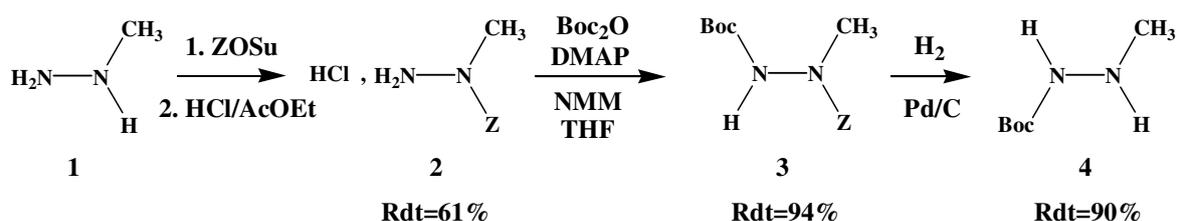
Comme nous l'avons présenté auparavant, la stratégie de synthèse que nous avons choisie nécessite la préparation des dimères Boc-azaAA-AA-OMe (Figure 15). Dans un premier temps, nous avons tenté de synthétiser ces derniers à partir de dérivés d'hydrazines en s'appuyant sur les travaux décrits par William D. Lubell<sup>30</sup> (cf. II.1). Nous savions que la méthode de William D. Lubell *et al.* ne nous permettrait pas de mettre en place une méthode de synthèse générale, mais elle devait nous permettre d'étudier rapidement la possibilité de

formation de nos composés en série azaAlanine en utilisant des méthodes de synthèse déjà décrites.



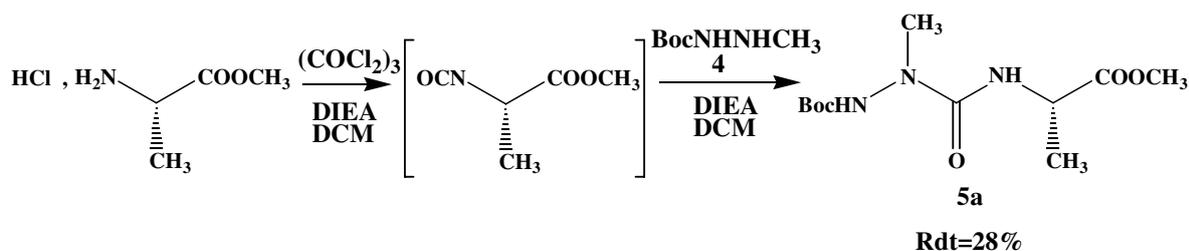
**Figure 15 : Précurseurs azadipeptidiques Boc-azaAA-AA-OMe**

Cette synthèse propose la condensation d'un dérivé isocyanate d'un acide  $\alpha$  aminé sur une hydrazine (Schéma 20). Nous avons choisi d'utiliser l'hydrazine **4** dont la synthèse a été réalisée suivant un mode opératoire mis au point au laboratoire par Michel Marraud et *al.*(Schéma 19)<sup>25</sup>. Par cette méthode, on prépare un dérivé de l'azaAlanine à partir de la méthylhydrazine. Ceci nécessite une protection de la fonction  $N^\beta$  de la méthylhydrazine. Comme il n'existe pas, à notre connaissance, de réactif permettant d'introduire directement et régiosélectivement un groupement Boc en position  $N^\beta$ , nous avons d'abord acylé sélectivement la fonction amine  $\alpha$  de la méthylhydrazine **1** par l'utilisation de ZOSu avant de précipiter le chlorhydrate correspondant **2**. La méthylhydrazine  $N^\alpha/N^\beta$  protégée **3** est obtenue après traitement du composé **2** par  $\text{Boc}_2\text{O}$ . Après une hydrogénéolyse du groupe benzyloxycarbonyle de **3**, nous avons finalement obtenu la méthylhydrazine  $N^\beta$  protégée **4** par un groupement Boc.



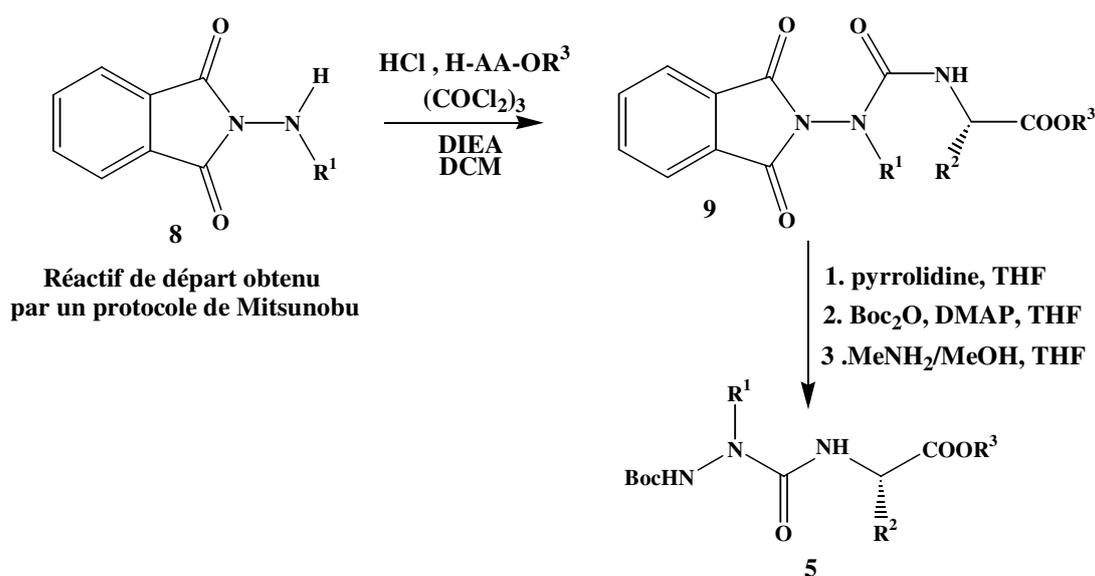
**Schéma 19 : Préparation du dérivé de l'azaAlanine à partir de la méthylhydrazine**

Le précurseur azadipeptidique **5a** est obtenu après condensation sur l'hydrazine **4** d'un dérivé isocyanate d'un acide  $\alpha$  aminé (Schéma 20). Cette méthode a permis l'obtention du premier azadipeptide de notre série et de montrer que celui-ci était stable.



**Schéma 20 : Synthèse du précurseur dipeptidique à partir de la Boc-méthylhydrazine 4**

Cependant cette technique conduit à un rendement très médiocre, de l'ordre de 28%. A partir de l'expérience acquise au laboratoire concernant la synthèse des hydrazinopeptides et des *N*-aminopeptides, nous avons mis en place une nouvelle stratégie de synthèse des azadipeptides impliquant un protocole de Mitsunobu et généralisable à la synthèse des dipeptides Boc-azaAA-AA-OMe (Schéma 21)<sup>127</sup>. Cette méthode permet de faire varier à façon la nature des chaînes latérales des résidus acides azaaminés et/ou des résidus acides  $\alpha$  aminés.



**Schéma 21 : Nouvelle méthode générale de synthèse des azadipeptides**<sup>127</sup>

Une réaction de condensation *via* le triphosgène d'un acide  $\alpha$  aminé sur un *N*-alkylaminophthalimide **8** permet d'obtenir les précurseurs azadipeptidiques di-protégés à leur extrémité *N*-terminale par un groupement phthalimide **9**. Après une réaction de transprotection, on isole les précurseurs azadipeptidiques Boc-azaAA-AA-OMe attendus **5**.

### II.3.2. Préparation des *N*-alkylaminophthalimides 8

La préparation des précurseurs s'effectue en trois étapes<sup>127</sup>. Le *N*-*tert*-butyloxycarbonylaminophthalimide **6** est facilement obtenu en plaçant l'anhydride phtalique à reflux du toluène durant trois heures en présence du *tert*-butylcarbazate (Schéma 22). La formation du produit se fait avec un rendement de 96%<sup>44</sup>.

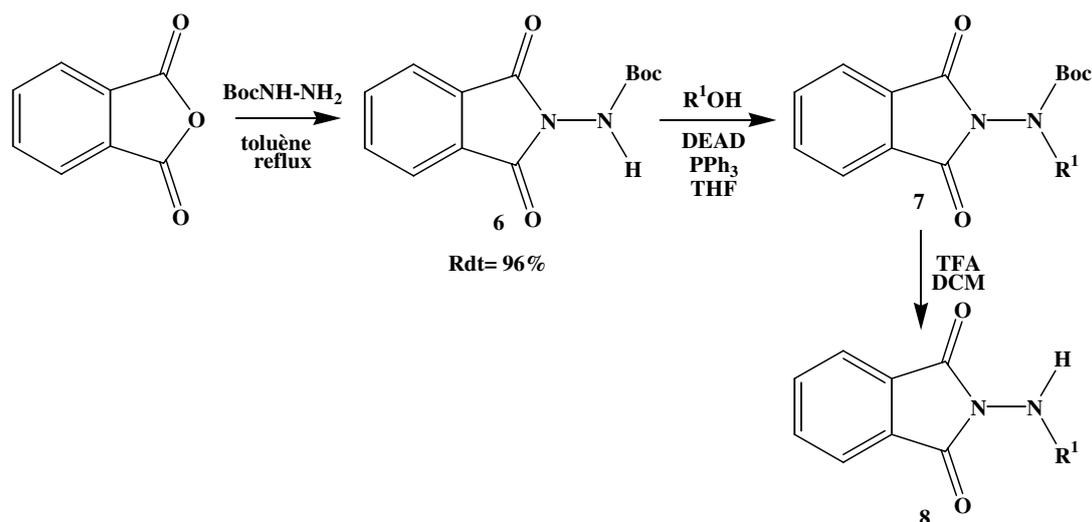


Schéma 22: Synthèse des *N*-alkylaminophthalimides 8

Comme nous l'avons souligné précédemment, le *N*-*tert*-butyloxycarbonylaminophthalimide **6** peut être facilement alkylé en utilisant une réaction de Mitsunobu<sup>39,40</sup>. Cette réaction permet l'introduction d'un nombre varié de groupements alkyles par simple changement du partenaire alcool R<sup>1</sup>OH.

Les alkylations se font généralement avec de bons rendements quelle que soit la classe du groupement alkyle : primaire, secondaire, allylique ou benzylique (Schéma 22). Les résultats expérimentaux sont regroupés dans le Tableau 1. Les conditions réactionnelles sont exactement les mêmes pour tous les composés. Les *N*-alkyl-*N*-*tert*-butyloxycarbonylaminophthalimides **7** sont obtenus avec de très bons rendements. Bien que la réaction de Mitsunobu soit sensible à l'encombrement stérique, nous conservons des rendements très satisfaisants même lorsque R<sup>1</sup> est encombré comme avec le groupement isopropyle (Rdt= 75%).

La purification par colonne chromatographique sur silice est simple pour **7a** et devient plus difficile avec les produits **7b**, **7c**, **7d**, **7e** et **7f**. En effet, dans ces cas, il est plus difficile de séparer le produit voulu du DEAD réduit. Il est connu que la nature du groupement alkyle des dialkylazodicarboxylates n'a pas d'influence sur la réussite de la réaction et donc sur les rendements de réactions. On pourrait donc envisager pour plus de confort d'utiliser différents types de dialkylazodicarboxylates pour lesquels les composés réduits auraient des  $R_f$  différents de ceux des *N*-alkyl-*N*-*tert*-butyloxycarbonylaminophthalimides **7**. Cependant nous ne nous sommes pas penchés sur cette étude systématique lors de nos travaux.

Produit	Rdt (%) <sup>a</sup>	R <sup>1</sup>
<b>7a</b>	98	CH <sub>3</sub>
<b>7b</b>	81	CH <sub>2</sub> Ph
<b>7c</b>	75	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>7d</b>	80	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>7e</b>	98	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>
<b>7f</b>	70	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHZ
<b>7g</b>	85	CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> Ph

<sup>a</sup> rendement en produit isolé calculé par rapport à **6**

**Tableau 1 : Rendements de la réaction de Mitsunobu pour la préparation des *N*-alkyl-*N*-*tert*-butyloxycarbonylaminophthalimides **7**<sup>127</sup>**

Tous les produits obtenus ont été caractérisés par RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C. Nous distinguons sur les spectres un dédoublement de certains signaux (Figure 16). Les rapports d'intégration sont dans tous les cas d'environ 45% et 55%. Le même type de dédoublement est observé en RMN <sup>13</sup>C et en RMN <sup>1</sup>H.

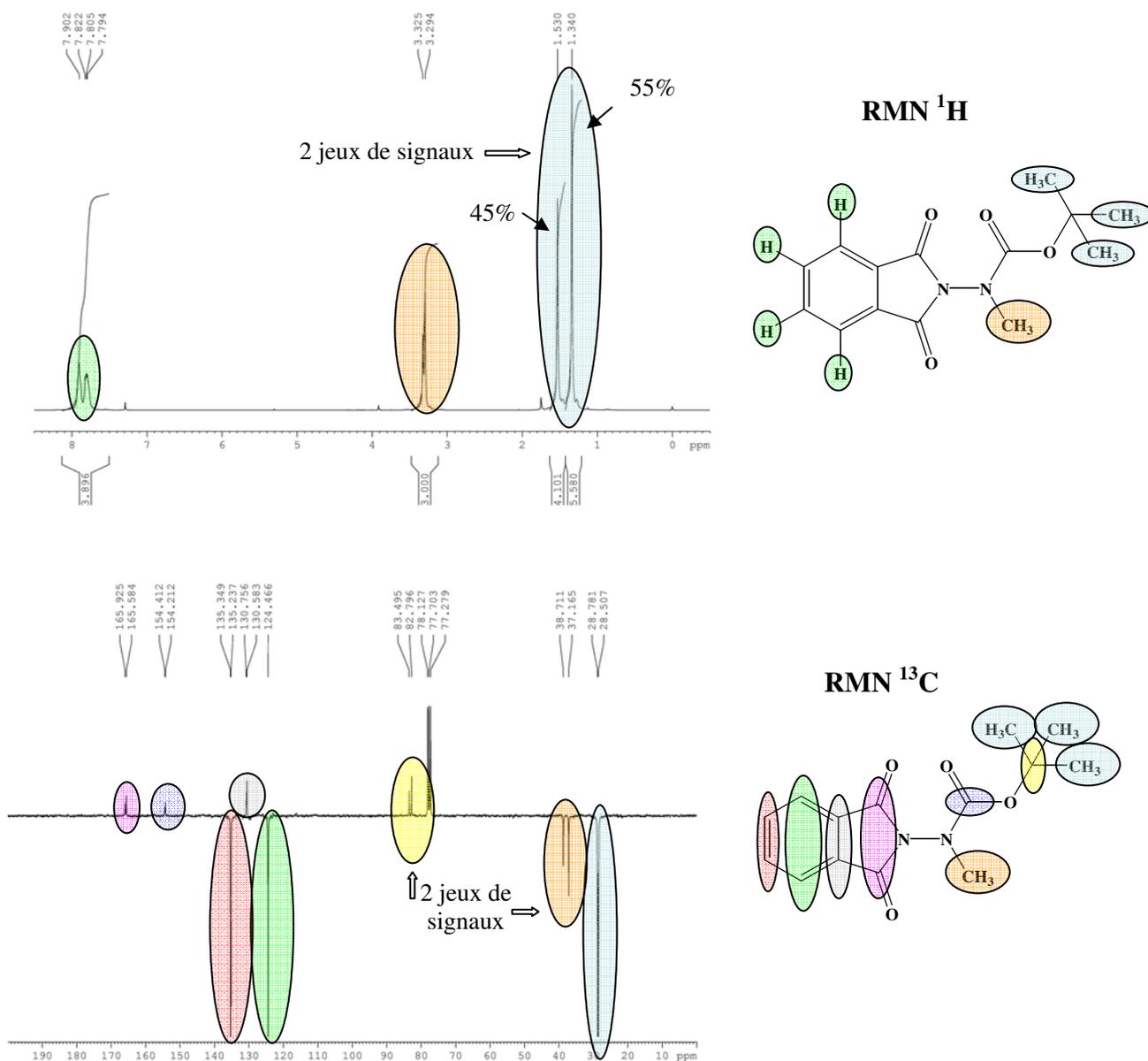
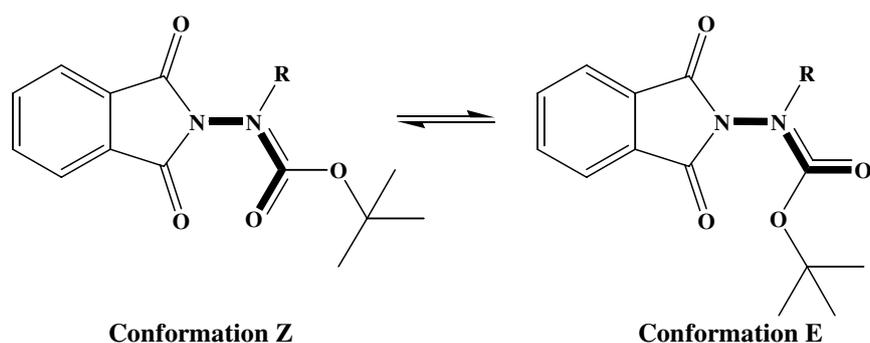


Figure 16 : Mise en évidence de l'isomérisation observée par RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C

En se basant sur les travaux effectués par Maria-Fatima Pinto durant ses travaux de thèse au laboratoire<sup>40,47</sup>, nous pouvons penser que ces signaux résultent d'une isomérie Z/E due au caractère partiellement double de la liaison C-N du lien hydrazide (Figure 17).



**Figure 17 : Isomérisation Z/E des *N*-alkyl-*N*-*tert*-butyloxycarbonylaminophthalimides**

La préparation des *N*-alkylaminophthalimides **8** à partir des *N*-alkyl-*N*-*tert*-butyloxycarbonylaminophthalimides **7** nécessite la déprotection de l'atome d'azote  $N_{\alpha}$  qui est réalisée par de l'acide trifluoroacétique dans du dichlorométhane (Schéma 22). Une étude systématique a montré que les résultats de cette réaction dépendaient de deux paramètres: la proportion d'acide trifluoroacétique par rapport au composé à déprotéger et sa concentration dans le solvant de réaction (dichlorométhane). L'utilisation de dix équivalents d'acide trifluoroacétique à 8% en volume dans le dichlorométhane a conduit au meilleur rendement. Ces conditions ont été reprises pour la synthèse de l'ensemble des *N*-alkylaminophthalimides **8** (Tableau 2). Cette méthode donne de bons rendements et ne nécessite pas de purification des produits.

Produit	Rdt (%) <sup>a</sup>	R
<b>8a</b>	100	CH <sub>3</sub>
<b>8b</b>	100	CH <sub>2</sub> Ph
<b>8c</b>	100	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>8d</b>	96	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>8e</b>	91	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>
<b>8f</b>	96	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHZ
<b>8g</b>	100	CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> Ph

<sup>a</sup> rendement en produit isolé calculé par rapport à **7**

**Tableau 2 : Rendements de la réaction de déprotection pour la préparation des *N*-alkylaminophthalimides **8**<sup>127</sup>**

Les rendements globaux de la synthèse des *N*-alkylaminophthalimides **8** en trois étapes qui s'étalent de 65% à 94% sont très satisfaisants.

### II.3.3. Préparation des Pht-azaAA-Ala-OMe **9** *via* le triphosgène

Les dipeptides aza/ $\alpha$  bisprotégés à leur extrémité *N*-terminale par un groupement phtalimide, Pht-azaAA-Ala-OMe **9**, sont obtenus à partir des *N*-alkylaminophthalimides **8**. Nous avons envisagé cette étape de deux manières différentes (Schéma 23)<sup>127</sup> :

- la méthode aux isocyanates : où le triphosgène réagit sur le dérivé acide  $\alpha$  aminé
- la méthode aux chlorures d'acides : où le triphosgène réagit sur le dérivé phtalimide.

Dés à présent nous pouvons supposer que *via* la méthode aux chlorures d'acides les rendements de réactions seront meilleurs car l'attaque d'une amine primaire est plus efficace que l'attaque d'une amine secondaire.

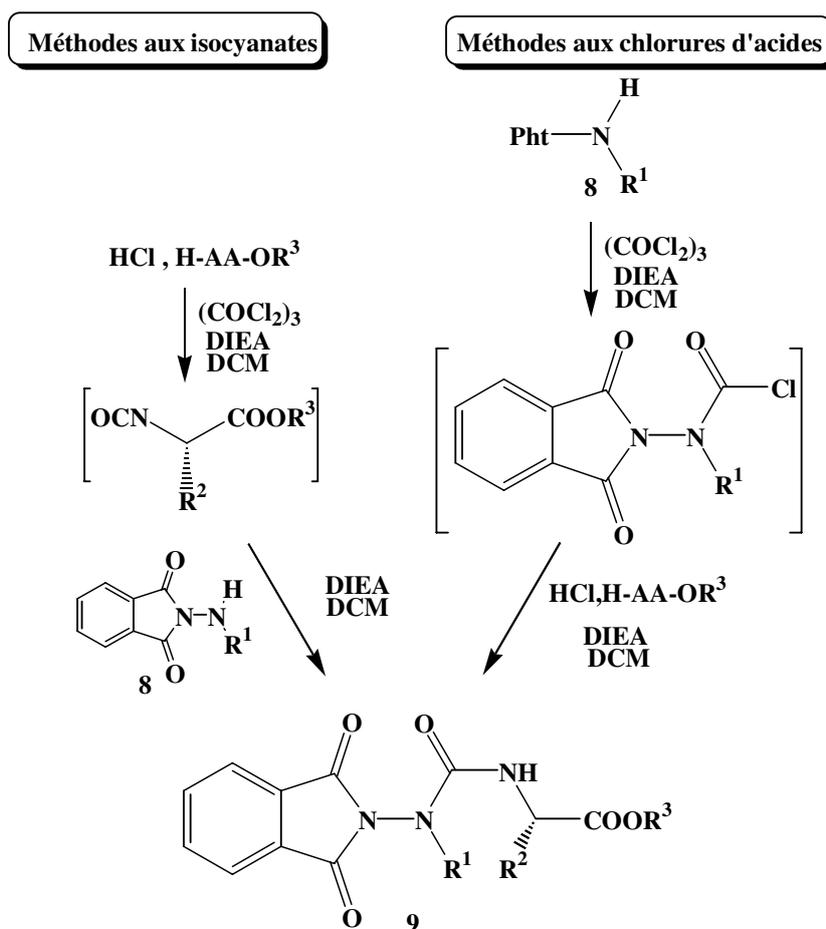


Schéma 23 : Deux méthodes de préparation des Pht-azaAA-Ala-OMe **9** *via* le triphosgène

En se basant sur les travaux réalisés par Pavel Majer et Ramnarayan S. Randad<sup>45</sup>, nous avons tout d'abord réalisé la condensation des *N*-alkylaminophthalimides **8** avec un dérivé isocyanate de l'ester méthylique de l'alanine (Schéma 24). En effet, comme nous l'avons déjà souligné auparavant, cette méthode aux isocyanates s'effectue « one pot » dans des conditions réactionnelles douces et peut être adaptée à des amines secondaires. Par cette réaction, nous avons tout d'abord réalisé la synthèse du composé **9a** (R= CH<sub>3</sub>) qui est obtenu avec un rendement de 80%.

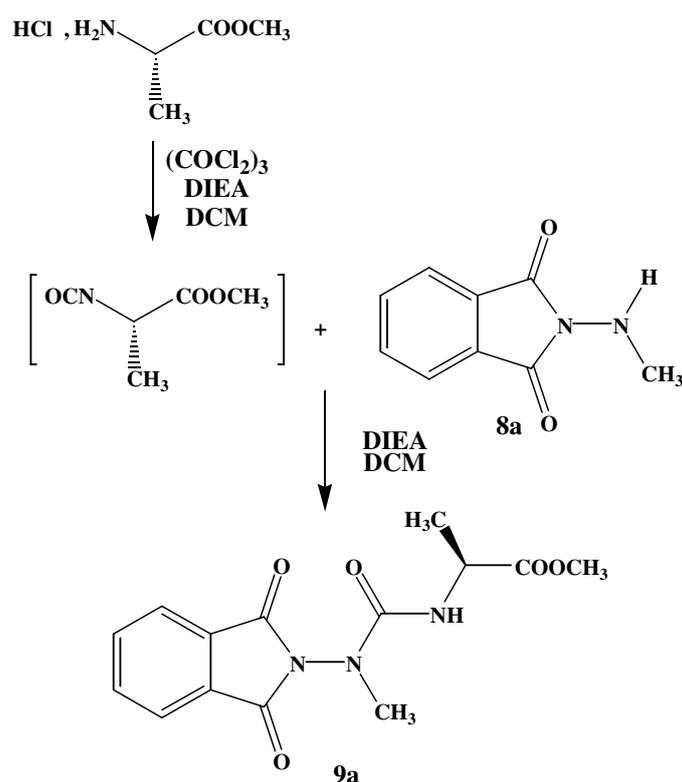


Schéma 24 : Stratégie de synthèse des Pht-azaAA-Ala-OMe **9** via un dérivé isocyanate

Cependant, nous avons rapidement été confrontés à la non reproductibilité de cette synthèse. En effet, les rendements obtenus varient de 25% à 80%. De plus, cette réaction conduit à la formation de l'urée symétrique due à l'attaque, sur le dérivé isocyanate, de l'acide  $\alpha$  aminé qui entre en compétition avec le dérivé phthalimide (Schéma 25 et Schéma 26). Ceci confirme que l'isocyanate se forme et que l'attaque du dérivé *N*-alkylaminophthalimide **8a** n'a pas lieu.

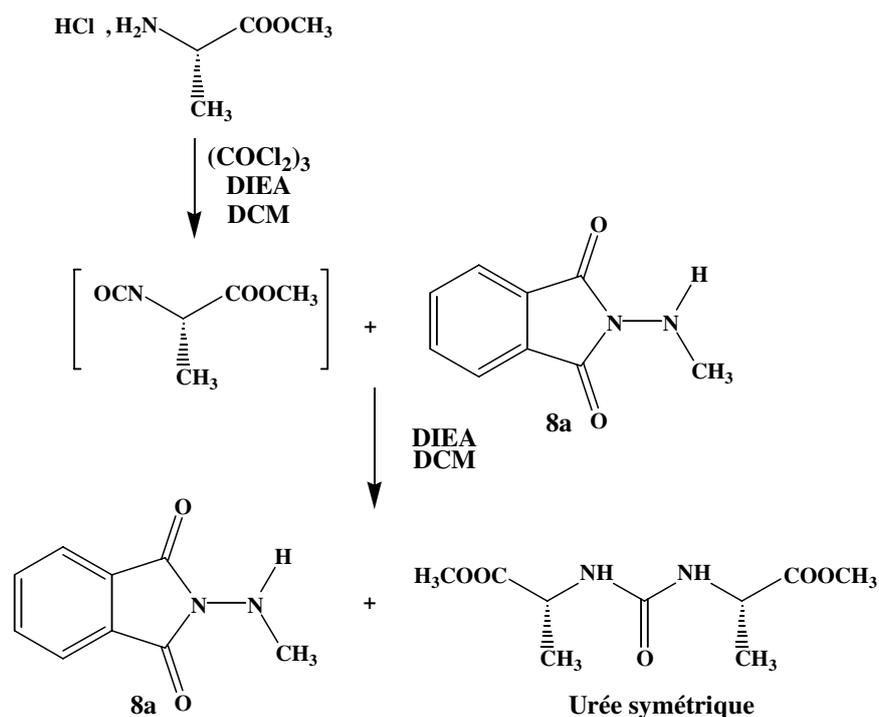


Schéma 25 : Formation de l'urée symétrique

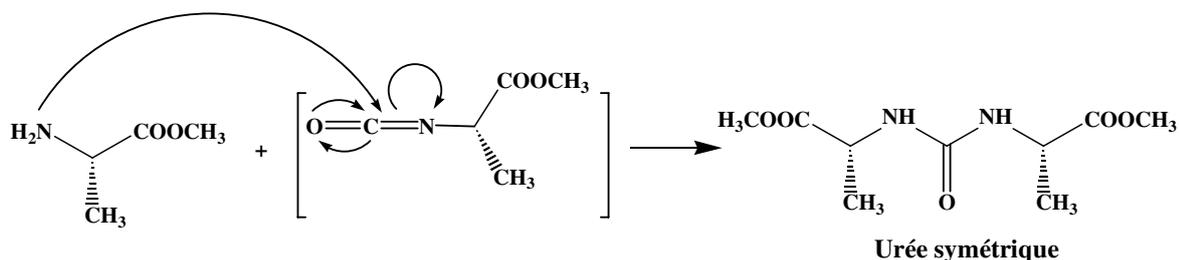


Schéma 26 : Mécanisme de formation de l'urée symétrique

Nous avons réalisé une étude systématique faisant varier plusieurs paramètres indépendamment les uns des autres (solvant anhydre, DIEA distillée, température, réactif de départ, nombre d'équivalents, durée de réaction). En dépit de très nombreux essais, aucune explication permettant de comprendre ce manque de reproductibilité n'a pu être apportée.

Pour pallier cet inconvénient nous avons inversé l'introduction des amines dans le milieu réactionnel. Dans ce cas, le chlorure d'acide du dérivé phthalimide est généré et c'est l'amine primaire qui joue le rôle de nucléophile (Schéma 27). En effet, le triphosgène agit sur une amine secondaire, il se forme alors le chlorure d'acide, l'isocyanate ne pouvant être

généralisé. Il s'ensuit alors l'attaque de l'extrémité *N*-terminale de l'acide  $\alpha$  aminé sur le carbonyle activé.

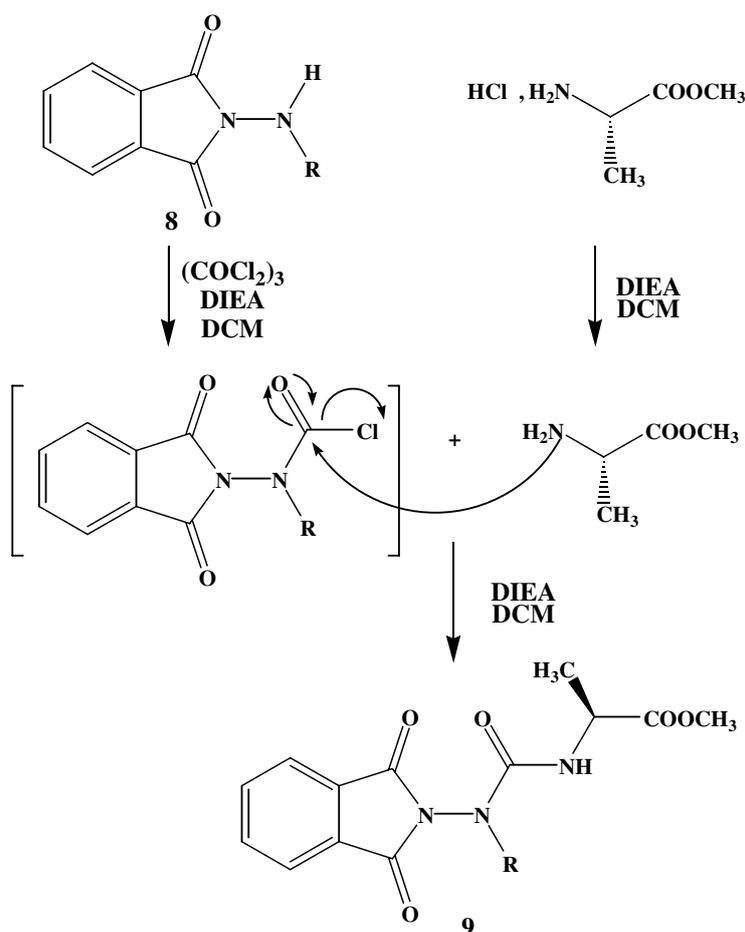


Schéma 27 : Stratégie de synthèse des dipeptides Pht-azaAA-Ala-OMe **9** via un dérivé chlorure d'acide

Les résultats expérimentaux sont réunis dans le Tableau 3. Les produits sont obtenus purs après passage sur colonne de silice. Nous remarquons que cette réaction est sensible à l'encombrement stérique comme l'indique le rendement de 60% pour **9c**. Effectivement, la rotule isopropyle de **9c**, qui n'est pas très flexible, limite l'accès du partenaire amine nucléophile. Avec le dérivé azaAsp(OBzl) la condensation ne fonctionne pas, on obtient après réaction les composés de départ, *N*-benzyloxycarbonylmethyl-aminophthalimide **8g** et H-Ala-OMe, qui n'ont pas réagi. Aucune évolution du milieu réactionnel n'est observée. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle il se formerait une liaison hydrogène intramoléculaire en C<sub>5</sub> entre le groupement carbonyle du fragment CH<sub>2</sub>COOCH<sub>2</sub>Ph et le groupement NH du dérivé phthalimide de la molécule **8g**, rendant ce dernier inerte vis-à-vis de la réaction de condensation via le triphosgène. De façon à vérifier notre postulat, nous avons enregistré le

spectre infrarouge de **8g** à une concentration de  $10^{-2}$  mol/L. Celui-ci ne confirme pas la formation d'une liaison hydrogène. Nous avons également étudié par RMN du proton, l'influence de l'introduction du DMSO- $d_6$  sur le proton NH de la molécule **8g** dans un mélange  $CDCl_3/DMSO-d_6$ . Les résultats montrent que le proton du groupement NH du fragment phthalimide subit l'influence du DMSO- $d_6$ . En effet, son déplacement chimique varie avec l'introduction du solvant polaire. Il n'est donc pas lié par liaison hydrogène intramoléculaire.

Concernant les produits **9e** et **9f**, les rendements ne sont que de 50%. Dans les deux cas, on récupère, après purification, une partie de l'ester méthylique de l'alanine n'ayant pas réagit.

Produit	Rdt (%) <sup>a</sup>	R
<b>9a</b>	90	CH <sub>3</sub>
<b>9b</b>	86	CH <sub>2</sub> Ph
<b>9c</b>	60	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>9d</b>	85	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>9e</b>	50	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>
<b>9f</b>	50	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHZ
<b>9g</b>	0	CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> Ph

<sup>a</sup> rendement en produit isolé calculé par rapport à **8**

**Tableau 3 : Rendements de la réaction de préparation des Pht-azaAA-Ala-OMe **9** via le triphosgène<sup>127</sup>**

De cette façon, nous avons obtenu les dipeptides Pht-azaAA-Ala-OMe **9**, sauf **9g**, avec de bons rendements, comme nous l'avions supposé, tout en s'affranchissant des réactions secondaires décrites auparavant.

#### **II.3.4. Synthèse des Boc-azaAA-Ala-OMe **5** par réaction de transprotection**

Les composés Boc-azaAA-Ala-OMe **5** ont été obtenus, à partir des Pht-azaAA-Ala-OMe **9**, en utilisant une réaction de transprotection mise au point au laboratoire et utilisant successivement la pyrrolidine, le di-*tert*-butyldicarbonate et la méthylamine<sup>127</sup>. La synthèse a été réalisée « one-pot » ce qui permet d'améliorer le rendement global de la transformation (Schéma 28).

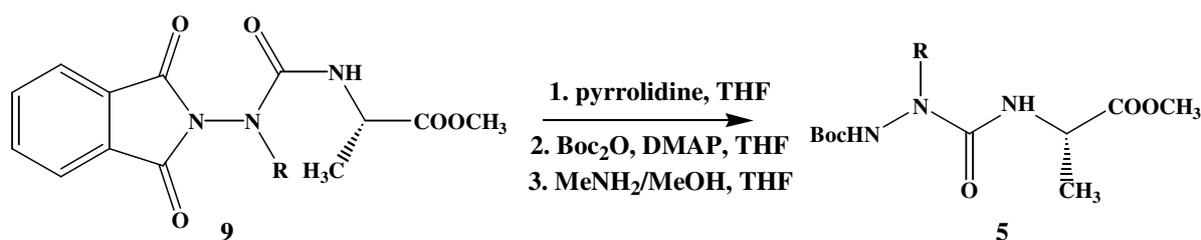


Schéma 28 : Préparation des Boc-azaAA-Ala-OMe 5

Entre chaque étape, on évapore les solvants ainsi que les produits secondaires et les réactifs volatils en excès. Lors de la seconde étape, les sous produits du di-*tert*-butyldicarbonate se dégradent sous forme de dioxyde de carbone, d'isobutylène et d'eau. L'isobutylène est très volatil et s'élimine spontanément. L'eau est éliminée sous pression réduite lorsque l'on évapore le THF car ils forment ensemble un azéotrope à 65°C sous pression atmosphérique.

Les résultats expérimentaux sont réunis dans le Tableau 4.

Produit	Rdt (%) <sup>a</sup>	R
<b>5a</b>	85	CH <sub>3</sub>
<b>5b</b>	97	CH <sub>2</sub> Ph
<b>5c</b>	70	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>5d</b>	75	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>5e</b>	73	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>
<b>5f</b>	75	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHZ
-	-	CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> Ph

<sup>a</sup> rendement en produit isolé calculé par rapport à 9

**Tableau 4 : Rendements de la réaction de transprotection pour la synthèse des composés Boc-azaAA-Ala-OMe 5<sup>127</sup>**

Les rendements en composés 5 sont bons quelle soit la nature de la chaîne latérale. Le produit issu du brut réactionnel après les trois étapes est purifié par chromatographie sur silice. Comme pour la réaction de Mitsunobu, la purification est réalisée sans problème avec 5a mais elle s'avère plus difficile lorsque la chaîne latérale est différente.

### II.3.5. Conclusion

Dans ce chapitre II, nous avons montré qu'il est possible de synthétiser des pseudodipeptides aza/ $\alpha$  5 protégés par un groupement Boc sur l'extrémité *N*-terminale et par un ester méthylique sur l'extrémité *C*-terminale. A partir de l'expérience acquise au laboratoire concernant la synthèse des composés pseudopeptidiques bis-azotés provenant de dérivés phthalimides, nous avons mis au point une synthèse originale qui permet d'obtenir des composés Boc-azaAA-Ala-OMe en phase liquide avec de bons rendements en cinq étapes<sup>127</sup>. Cette méthode est générale car elle permet d'introduire divers résidus acides  $\alpha$  aminés, à partir de leur ester méthylique correspondant, ainsi qu'un grand nombre de résidus acides azaaminés, à partir de l'alcool engagé dans la réaction de Mitsunobu. Les dipeptides aza/ $\alpha$  seront utilisés comme unités de base dans des réactions de couplages peptidiques dans le but d'obtenir des oligomères mixtes comportant des résidus acides azaaminés et acides  $\alpha$  aminés.

### III. Préparation des unités de base 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères et réaction d'oligomérisation des azapeptides

#### III.1. Introduction

Dans ce chapitre nous allons décrire la synthèse des 1:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères, des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères et des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-cyclooligomères à partir des précurseurs azadipeptidiques Boc-azaAA-AA-OMe, dont la synthèse vient d'être décrite (Figure 18). Nous aborderons également l'influence de paramètres tels que la chaîne latérale des résidus acides azaaminés et la configuration absolue des carbones asymétriques sur la réactivité.

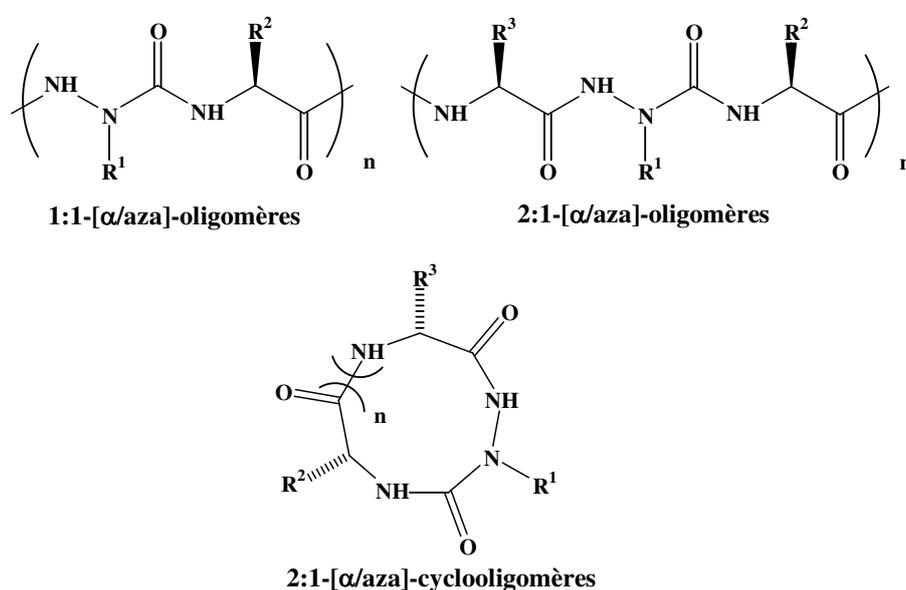


Figure 18 : Formule développée des oligomères

Il est nécessaire dès à présent d'exposer la nomenclature choisie (Figure 19). Plus généralement cette nomenclature s'applique aux oligomères de notre série azapeptidique :

- les 1:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères : le premier chiffre 1 se rapporte au nombre de résidus acides  $\alpha$  aminés présents dans l'unité répétitive et de même, le deuxième chiffre 1 se rapporte au nombre de résidus acides azaaminés dans l'unité de base
- les 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères : le chiffre 2 se rapporte au nombre de résidus acides  $\alpha$  aminés présents dans l'unité répétitive et de même, le chiffre 1 se rapporte au nombre de résidus acides azaaminés dans l'unité de base.

Le terme oligomère indique le nombre total de résidus présents dans la chaîne (trimère pour trois résidus, hexamère pour six résidus, etc...).

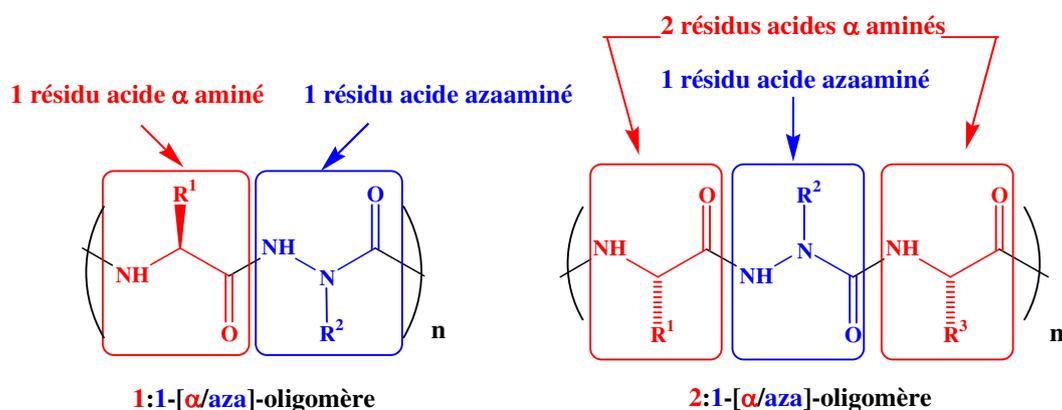


Figure 19 : Nomenclature des 1:1-[α/aza]-oligomères et des 2:1-[α/aza]-oligomères

En préambule, nous présenterons quelques généralités sur les méthodes de synthèse peptidiques, puis nous étudierons la réactivité des précurseurs azadipeptidiques Boc-azaAA-AA-OMe et nous exposerons les résultats obtenus sur la synthèse des oligomères.

### III.2. Généralités sur la synthèse peptidique en solution

Les acides α aminés sont les monomères à partir desquels on forme les peptides par réactions de couplage peptidique. Par convention, on écrit les peptides en plaçant à gauche l'extrémité N-terminale et à droite l'extrémité C-terminale. La liaison entre deux acides aminés est la liaison peptidique aussi appelée liaison amide. Une liaison amide se forme entre un partenaire amine et un partenaire acide. La synthèse d'un peptide se fait par itération des étapes de protection, activation, couplage, déprotection des partenaires amine et acide (Schéma 29).

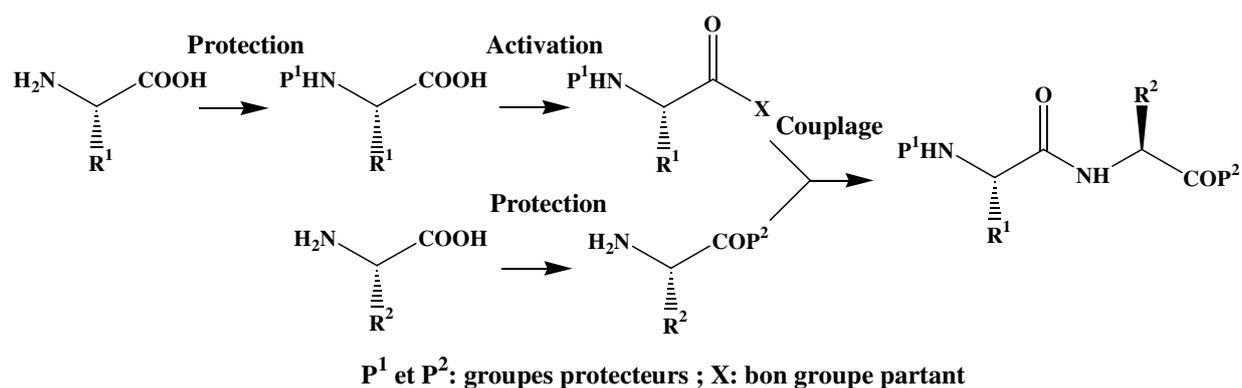


Schéma 29 : Stratégie de la synthèse peptidique

L'allongement de la chaîne peptidique peut être réalisé de deux façons :

- les résidus peuvent être incorporés les uns après les autres de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale (synthèse récurrente) et on parle de synthèse pas à pas
- on introduit des synthons préparés au préalable et on l'appellera synthèse par unité de base.

On donne souvent l'avantage à la deuxième méthode car la synthèse pas à pas est longue et laborieuse à mettre en place en phase liquide. Lorsqu'il s'agit de la synthèse de peptides longs, on peut également envisager la synthèse par fragments.

La synthèse peptidique est applicable à la synthèse pseudo-peptidique. La plupart du temps, les synthons pseudo-peptidiques sont synthétisés antérieurement et sont ensuite engagés dans des réactions de couplage peptidique.

Afin de procéder au couplage, la fonction carboxyle de l'acide aminé N-protégé est activée. Il existe différentes formes d'activation. En effet, certains couplages nécessitent une activation forte alors que d'autres se réalisent assez facilement, une faible activation suffit alors. Il existe un très grand nombre de procédures de couplages peptidiques, nous allons juste énumérer les plus courantes :

- *La réaction de Curtius* : la première réaction de couplage respectant la chiralité des acides aminés a été mise en place par Curtius<sup>48</sup>. Cette méthode n'est plus utilisée de nos jours car la réaction est lente et génère de nombreux produits secondaires.

- *Les carbodiimides* : ce sont des agents de couplages très utilisés en synthèse peptidique. Les plus connus sont la DCC (dicyclohexylcarbodiimide)<sup>49</sup> et l'EDC (1-éthyl-3-(3'-diméthylaminopropyl)carbodiimide)<sup>50</sup>, dont l'urée formée est éliminée par lavage aqueux.
- *Les esters activés* : parmi les plus couramment employés, on peut citer le *N*-hydroxysuccinimide (HOSu)<sup>51</sup>, le pentafluorophénol (HOPfp)<sup>52</sup> et le *p*-nitrophénol (HONp)<sup>53</sup>.
- *Les sels de phosphonium et d'uronium* : le plus connu est le réactif de Castro, l'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium ou BOP<sup>54</sup>. Ce dernier libère au cours du couplage l'hexaméthylphosphotriamide (HMPT) cancérigène. Il est alors remplacé par le TBTU (2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium)<sup>55</sup> ou le HATU (2-(1*H*-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium)<sup>56,57</sup> qui ne demandent pas de précautions particulières et permettent d'atteindre des rendements satisfaisants.
- *Les halogénures d'acides* : il existe les chlorures d'acides, souvent obtenus par action du chlorure de thionyle<sup>58,59</sup>, et les fluorures d'acides<sup>60-62</sup>. Les fluorures d'acides sont plus stables que les chlorures d'acides correspondants et la réaction de couplage utilisant les fluorures d'acides peut être réalisée à température ambiante.
- *Les anhydrides mixtes* : les plus utilisés sont les chloroformiates<sup>63</sup> avec lesquels les méthodes de couplages sont propres et efficaces mais effectuées à -20°C pour éviter la dégradation des anhydrides.

Comme nous l'avons précisé dans le chapitre précédent, nous avons choisi d'utiliser la stratégie d'oligomérisation en phase liquide et en stratégie Boc. La synthèse en milieu homogène possède deux principaux avantages :

- elle permet de travailler sur de grosses quantités de réactifs et permet donc d'obtenir d'importantes quantités de produits
- c'est une méthode facilement contrôlable. Les purifications et caractérisations des composés sont effectuées après chaque étape de couplage ce qui permet de suivre l'avancement des réactions d'oligomérisation.

La synthèse en phase liquide présente néanmoins quelques inconvénients. Si le peptide à synthétiser possède un grand nombre de résidus, la solubilité du composé dans les solvants organiques usuels peut devenir un obstacle majeur. De plus, si les étapes de purification sont

effectuées par chromatographie sur colonne de silice, elles peuvent être longues à mettre en œuvre surtout si l'oligomère est peu soluble.

### III.3. Réactivité des précurseurs azadipeptidiques Boc-azaAA-AA-OMe

De récents travaux effectués au laboratoire ont montré que le remplacement de la fonction amine des acides  $\alpha$  aminés par un motif carbazate conduisait à une diminution de la réactivité rendant difficile le couplage avec un acide aminé originel. Ceci peut s'expliquer par les effets stéréoélectroniques exercés par le groupement carbonyle. En effet, l'effet inductif attracteur exercé par ce groupement aurait pour effet de diminuer le pouvoir nucléophile de l'atome d'azote  $\beta$ .

Si nous comparons les précurseurs aza/ $\alpha$  et les  $\alpha$ -hydrazinoester  $N_\beta$  protégés, nous pouvons remarquer certaines similitudes et penser que leur réactivité en soit proche (Figure 20).

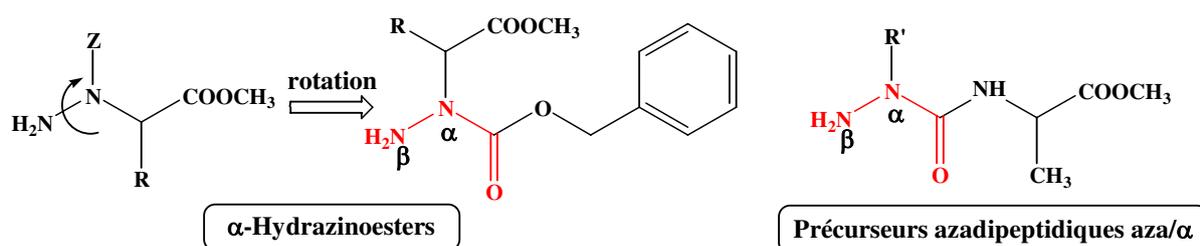


Figure 20 : Comparaison entre les précurseurs aza/ $\alpha$  et les  $\alpha$ -hydrazinoesters

Dans les deux cas, l'atome d'azote  $\alpha$  est substitué par une fonction carbonyle et une fonction alkyle. Pour l' $\alpha$ -hydrazinoester la fonction carbonyle appartient au groupement protecteur Z et la fonction alkyle est le  $CH_\alpha$  d'un acide aminé. Pour le précurseur aza/ $\alpha$  la fonction carbonyle provient du squelette pseudopeptidique et la fonction alkyle est la chaîne latérale du résidu azaaminé.

Une étude systématique effectuée par Isabelle Bouillon a montré que les rendements de couplage des hydrazinopeptides dépendaient fortement de la nature de l'agent de couplage<sup>11,12,46</sup>. Les meilleurs rendements ont été obtenus en utilisant la méthode aux fluorures d'acides.

### III.4. Préparation des oligomères azapeptidiques

#### III.4.1. Introduction : Oligomérisation en phase liquide

Comme pour la préparation pas à pas des peptides, la synthèse des oligomères azapeptidiques fait appel à une succession d'étapes de protection, activation, couplage, déprotection (Schéma 30). L'unité de départ peut être dans ce cas un acide  $\alpha$  aminé ou le précurseur azadipeptidique Boc-azaAA-Ala-OMe.

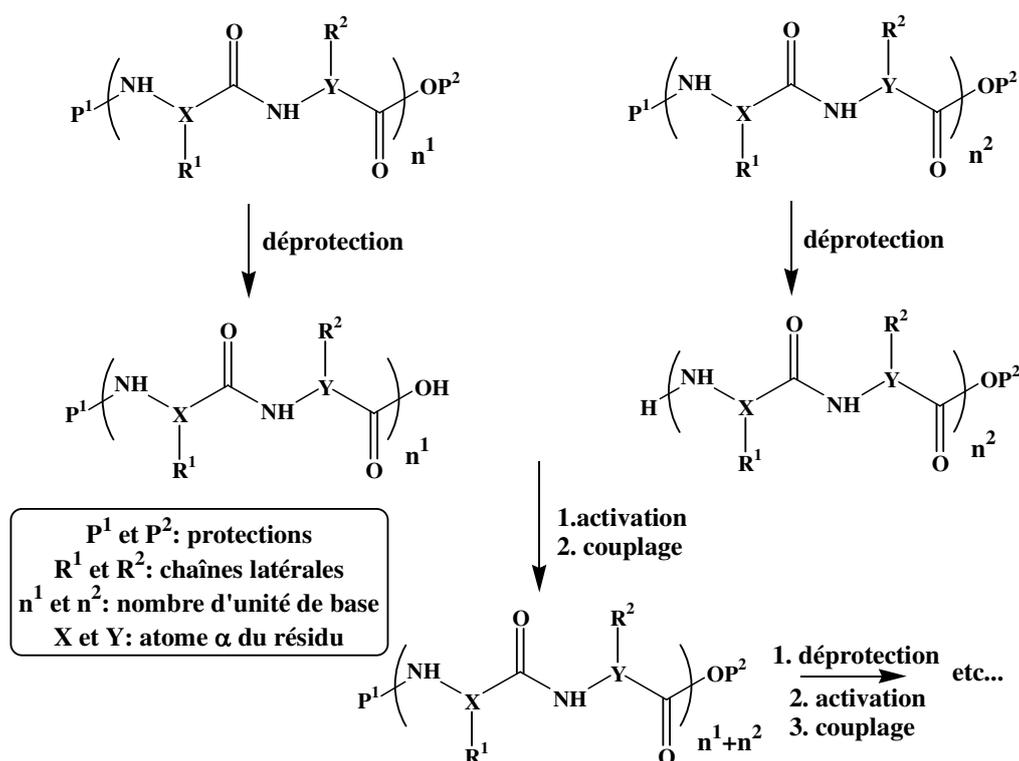


Schéma 30 : Méthode générale d'oligomérisation en phase liquide

#### III.4.2. Les 1:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères

Dans un premier temps, à partir des précurseurs azadipeptidiques, il semblait logique de tenter la synthèse des 1:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères qui se composent en fait d'une alternance régulière d'un résidu acide  $\alpha$  aminé protéinogénique et d'un résidu azaaminé tout au long du squelette (Figure 21).

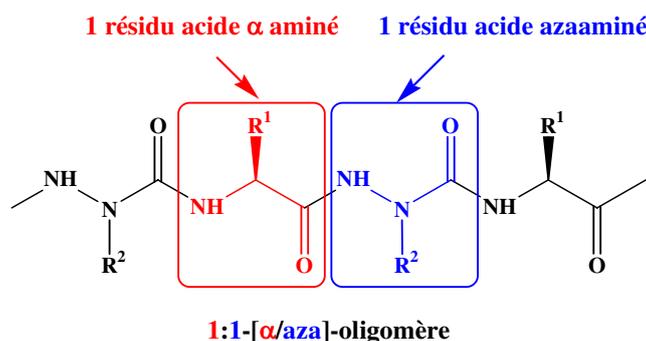


Figure 21 : Les 1:1-[α/aza]-oligomères

Cette synthèse pouvait être envisagée par déprotection des extrémités *N*-terminale et *C*-terminale du précurseur azadipeptidique et couplage (Schéma 31).

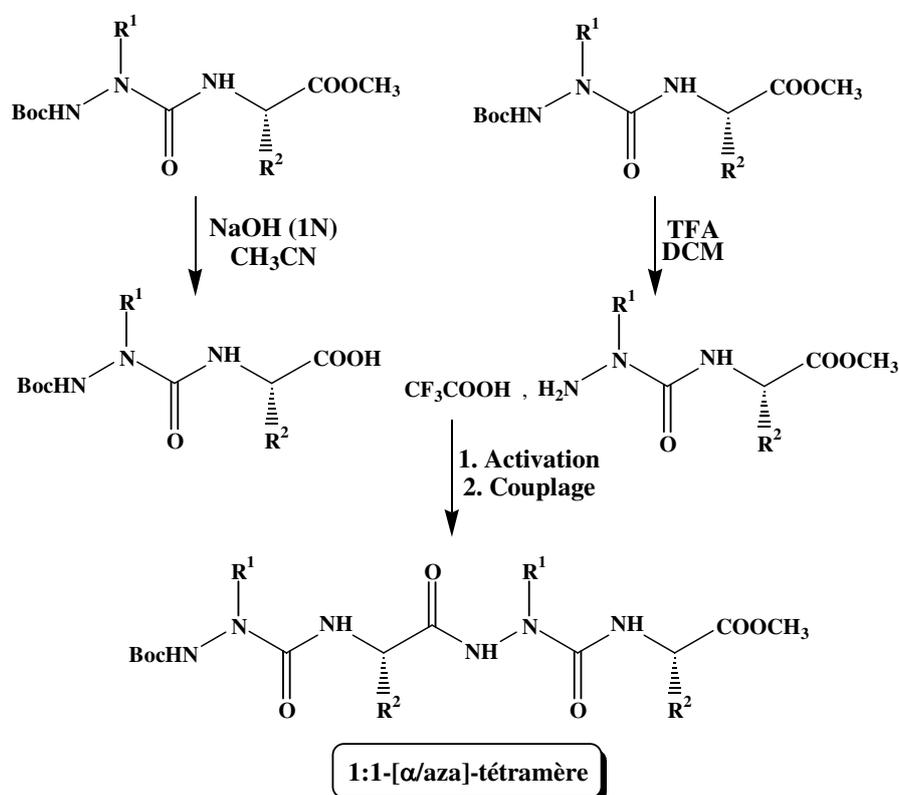


Schéma 31 : Stratégie de synthèse des 1:1-[α/aza]-tétramères par couplage peptidique à partir des précurseurs

Les étapes de déprotection ont été réalisées en utilisant des conditions classiques conduisant à des rendements quantitatifs. Le groupement Boc est enlevé en milieu acide avec de l'acide trifluoroacétique en proportion volumique 50/50 dans le dichlorométhane. L'ester méthylique

quant à lui est déprotégé en milieu basique en utilisant une solution aqueuse de soude 1N dans l'acétonitrile. Le couplage de ces unités a été envisagé en utilisant diverses méthodes de couplages peptidiques classiques. Les conditions de couplage expérimentées sont réunies dans le Tableau 5.

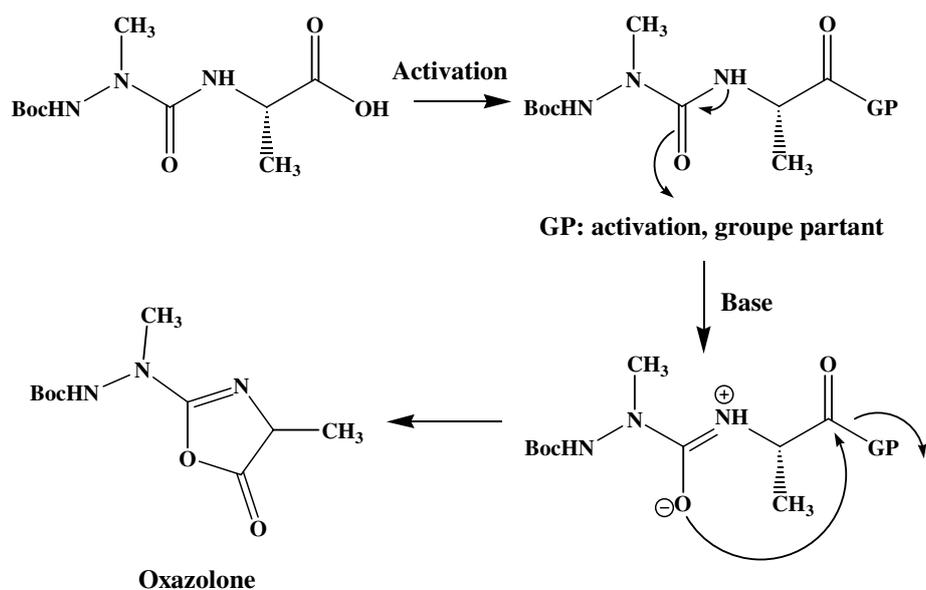
<b>Agent de Couplage</b>	<b>Base</b>	<b>Solvant</b>	<b>Référence</b>
EDC/HOBt	Et <sub>3</sub> N	DCM	50
EDC/HOBt	NaHCO <sub>3</sub>	DCM	50
EDC/HOBt	DIEA	DCM	50
DCC/HOBt	DIEA	THF	49
TBTU/HOBt	DIEA	THF	55
BopCl	DIEA	DCM	64
HBTU	Et <sub>3</sub> N	CH <sub>3</sub> CN	65
C <sub>3</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> / pyridine	DIEA	DCM	61

**Tableau 5 : Conditions de couplage expérimentées pour la synthèse des 1:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères**

Aucune des conditions utilisées n'a permis d'obtenir le tétramère désiré. Dans la majorité des cas, après purifications, nous avons récupéré le précurseur NH<sub>2</sub> libre H-azaAA-AA-OMe. Ce résultat n'est pas étonnant puisque que nous avons pris connaissance de la faible réactivité de l'extrémité NH<sub>2</sub> des précurseurs azadipeptidiques déprotégés. Le partenaire acide Boc-azaAA-AA-OH n'a jamais été isolé après les tentatives de couplage. Nous avons émis deux hypothèses qui pourraient expliquer cet échec :

- une réaction de cyclisation du partenaire acide activé sous forme d'oxazolone (Schéma 32). Une fois formée, l'oxazolone empêche le couplage avec le partenaire amine
- un défaut au niveau de la réaction d'activation du partenaire acide.

Néanmoins, dans les deux cas, les spectroscopies RMN et infrarouge ainsi que le spectre de masse du produit brut réactionnel ne nous ont jamais permis de caractériser avec assurance quel composé que ce soit.

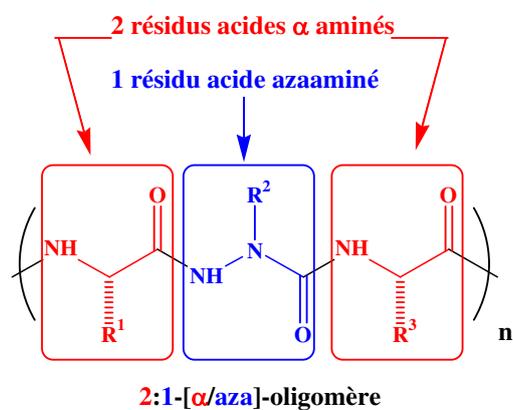


**Schéma 32 : Mécanisme réactionnel de formation d'une oxazolone lors de l'activation du précurseur**

Nous n'avons pas réussi à mener à bien la synthèse prévue des 1:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères, malgré l'utilisation de diverses techniques d'activations et de couplages peptidiques.

### III.4.3. Les 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères

La nomenclature choisie pour les 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères est la même que celle des 1:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères (Figure 22).



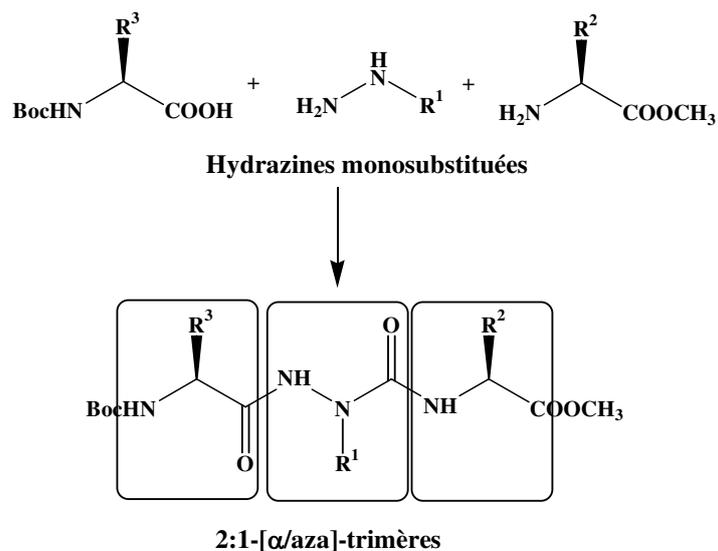
**Figure 22 : Les 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères**

### a. Synthèse des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères

#### 1. Introduction

Nous pouvons envisager la synthèse des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères de deux façons différentes :

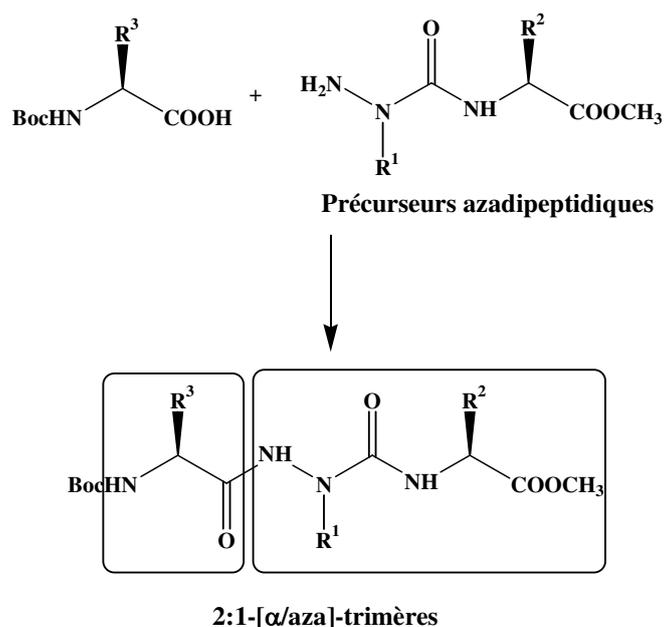
- soit par réaction d'une hydrazine substituée avec deux dérivés acides  $\alpha$  aminés (Figure 23)



**Figure 23 : Synthèse des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères pas à pas à partir d'hydrazines monosubstituées**

Dès à présent, nous pouvons nous poser la question de la régiosélectivité de la réaction d'acylation vis-à-vis des azotes  $\alpha$  et  $\beta$  d'une hydrazine monosubstituée. Dans sa thèse, Alain Lecoq a examiné cette compétition entre les deux atomes d'azote de la méthylhydrazine<sup>5</sup>. La conclusion de ses travaux est que les proportions relatives des deux isomères varient considérablement suivant le réactif et les conditions réactionnelles utilisés. La méthylhydrazine révèle un comportement imprévisible vis-à-vis des réactifs d'acylation. En conclusion, seule l'expérience permet de connaître le résultat du couplage.

- soit à partir des précurseurs azadipeptidiques Boc-azaAA-AA-OMe et d'un acide  $\alpha$  aminé (Figure 24).



**Figure 24:** Synthèse des 2:1-[α/aza]-trimères à partir des précurseurs azadipeptidiques

Comme nous l'avons montré dans le deuxième chapitre, il n'existe pas de méthode générale de synthèse des hydrazines substituées. La méthode utilisant les hydrazines substituées n'est donc pas généralisable. Nous avons choisi la méthode engageant les précurseurs azadipeptidiques car elle permet de faire varier la chaîne latérale du résidu acide azaaminé facilement et avec de bons rendements selon les protocoles décrits dans le chapitre II.

### 2. Synthèse à partir d'une hydrazine monosubstituée

Nous avons choisi de réaliser cette synthèse tout d'abord à partir de la méthylhydrazine qui est commerciale (Schéma 33).

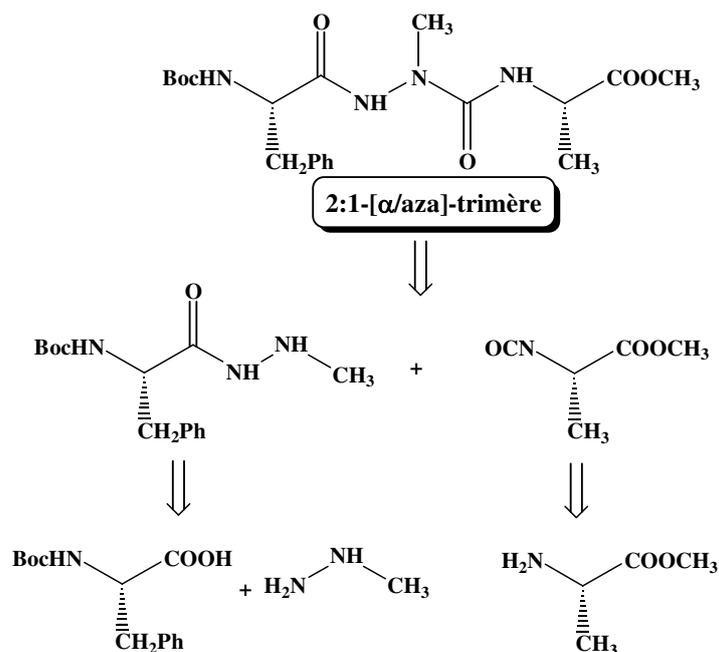


Schéma 33 : Stratégie de synthèse directe des 2:1-[α/aza]-trimères

La première étape utilise des conditions de couplage peptidique et permet la réaction de la méthylhydrazine avec Boc-Phe-OH. Comme précisé précédemment, deux produits pouvaient être attendus, **10a** et **10b** (Schéma 34). Nous avons utilisé la méthode EDC, HOBt pour réaliser cette étape. L'étude RMN du produit brut réactionnel montre un seul jeu de signaux permettant de conclure qu'un seul produit est formé. Cependant en l'état des données il ne nous était pas possible de savoir s'il s'agissait de **10a** ou de **10b**.

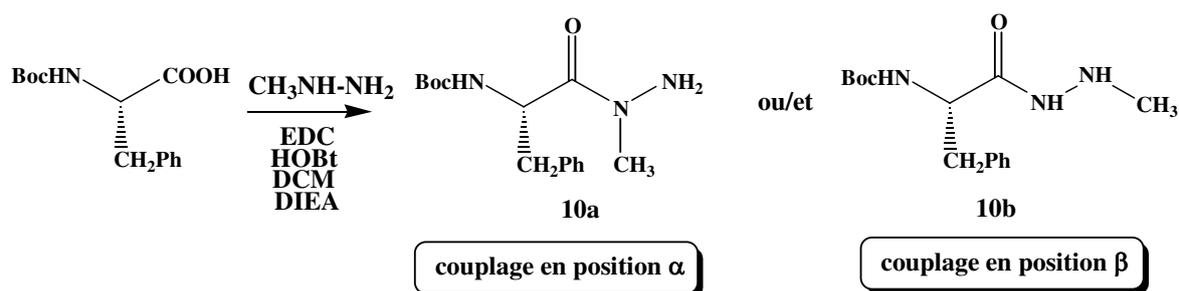


Schéma 34 : Couplage entre la méthylhydrazine et Boc-Phe-OH

En effet, le déplacement chimique et l'allure du signal du groupement méthyle en RMN du proton semble indiquer que le couplage s'est fait en position  $\alpha$  pour obtenir **10a**. Cependant, on ne distingue pas de groupement  $-NH_2$  en RMN du proton. De plus, l'étude RMN de l'azote

15 du composé ne permet malheureusement pas de mettre en évidence le triplet attendu pour l'azote  $\beta$  à l'issue de son couplage avec les deux protons de la fonction amine primaire.

Nous avons tenté une caractérisation chimique par formation d'hydrazone<sup>66</sup>. Dans le cas de la formation de **10a**, la réaction avec un aldéhyde doit conduire à l'hydrazone **11**, aucune réaction n'est attendue avec **10b** (Schéma 35). Après purification sur colonne de silice, le composé obtenu à la suite du couplage, **10a** et/ou **10b**, est mis en présence de benzaldéhyde dans l'éthanol. Le produit brut réactionnel est purifié sur colonne de silice et on obtient l'hydrazone avec 93% de rendement. On en conclut que le couplage s'effectue majoritairement en position  $\alpha$  pour obtenir le composé **11**.

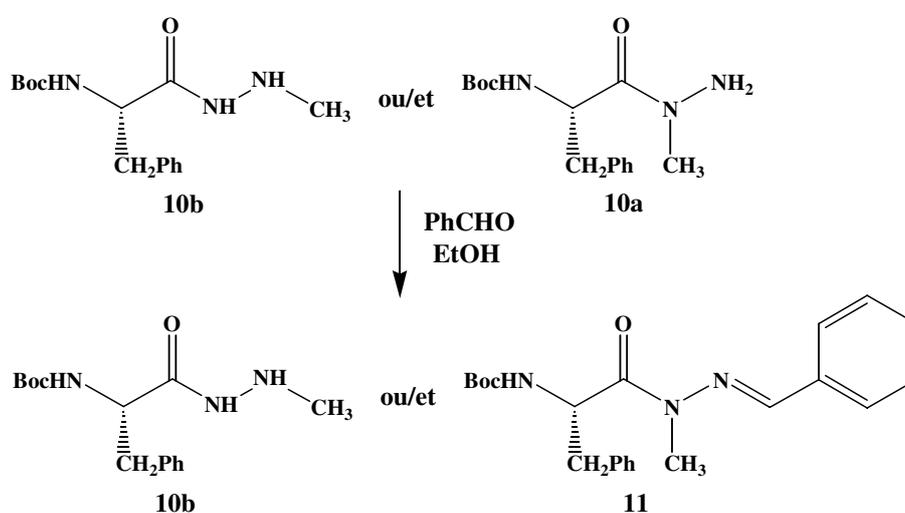


Schéma 35 : Tentative de formation d'hydrazone

Ce résultat montre que la méthode à l'hydrazine n'est pas applicable à l'obtention des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères (Schéma 36).

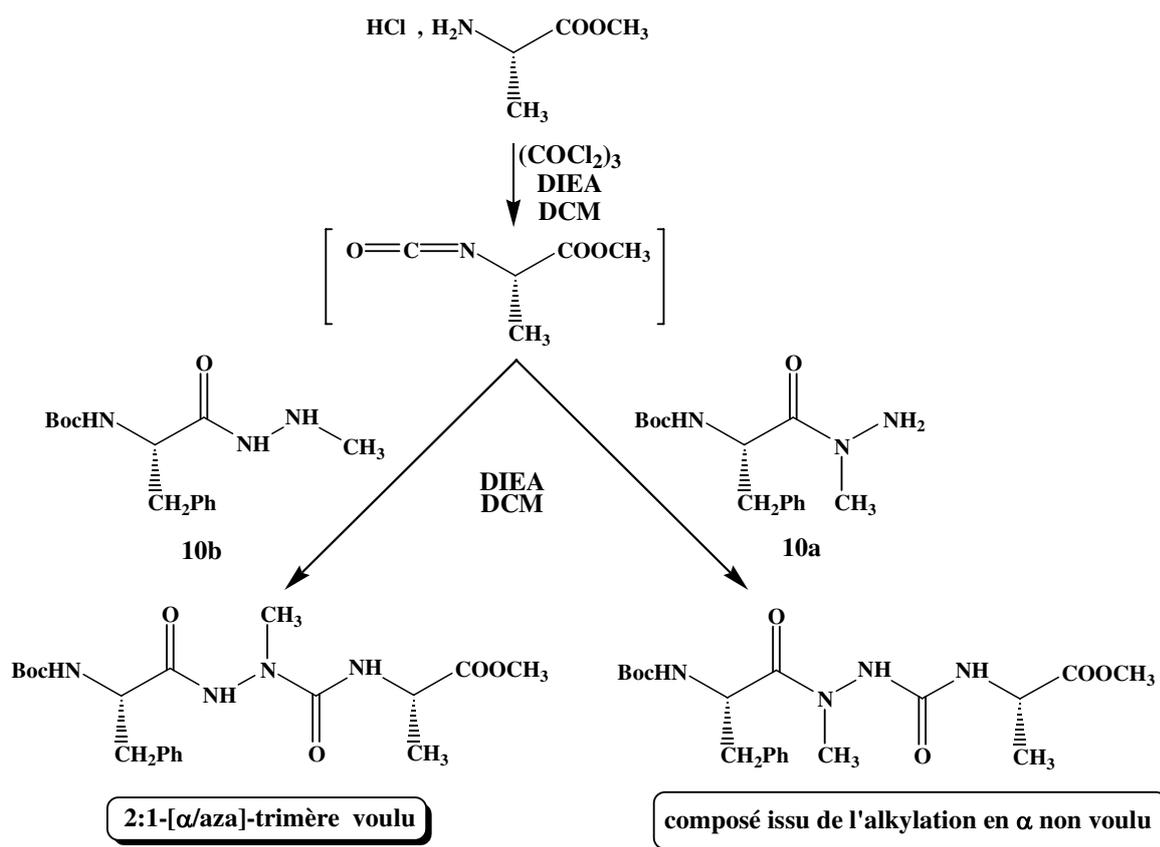
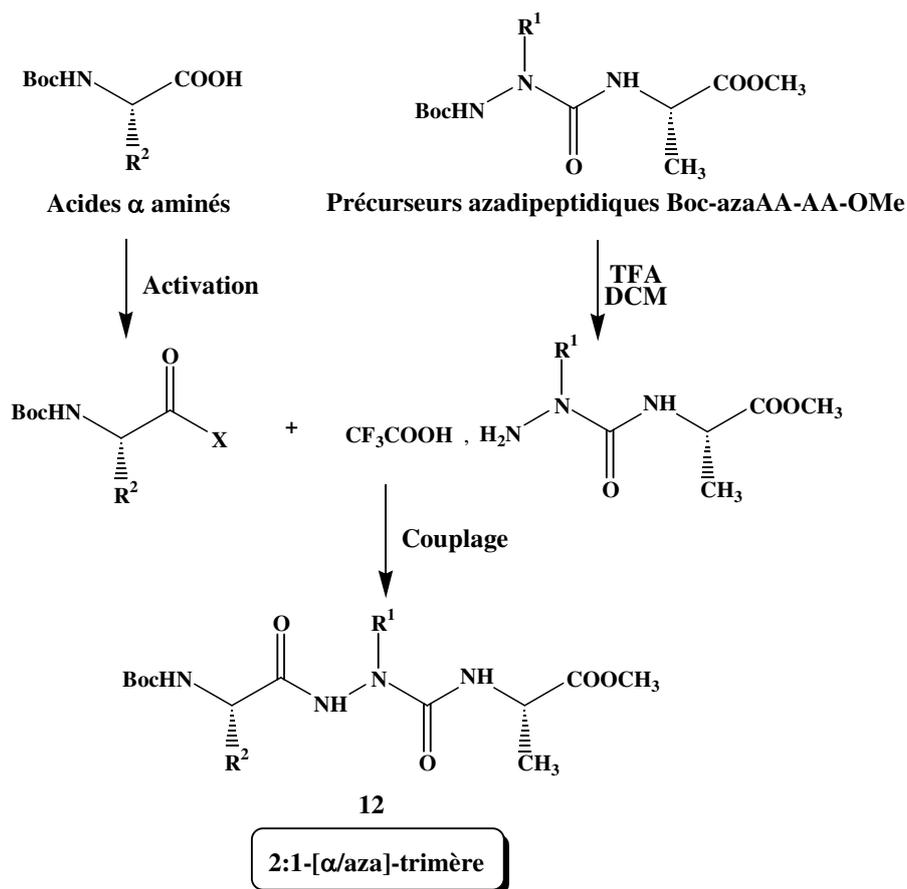


Schéma 36: Deux éventualités de condensation du dérivé isocyanate

### 3. Préparation des 2:1-[α/aza]-trimères à partir des précurseurs azadipeptidiques

A partir des dipeptides Boc-azaAA-AA-OMe dont la synthèse a été décrite dans le deuxième chapitre, nous pouvons envisager la synthèse des 2:1-[α/aza]-trimères qui seront les unités de base de nos oligomères azapeptidiques correspondants. La stratégie consiste en un couplage peptidique entre le précurseur dipeptidique déprotégé à son extrémité *N*-terminale, qui joue le rôle de partenaire amine, et un acide α aminé protégé à son extrémité *N*-terminale par un groupement protecteur Boc, qui joue donc le rôle du partenaire acide (Schéma 37).



**Schéma 37 : Stratégie de synthèse des 2:1-[α/aza]-trimères par couplage peptidique à partir des précurseurs azadipeptidiques Boc-azaAA-AA-OMe**

La réaction de déprotection du groupement Boc des précurseurs est réalisée dans un mélange acide trifluoroacétique/dichlorométhane en proportion volumique 50/50 avec un rendement quantitatif. Pour des questions pratiques, les précurseurs déprotégés sont conservés sous forme de trifluoroacétates. En effet, lorsque l'on réalise des lavages aqueux avec NaHCO<sub>3</sub>, l'amine libérée se solubilise en phase aqueuse et on ne récupère pas le produit désiré dans la phase organique.

Nous avons testé plusieurs méthodes de couplage engageant le précurseur déprotégé H-azaAla-Ala-OMe et Boc-Phe-OH (Tableau 6). Comme nous l'avons prévu, les couplages peptidiques classiques ne permettent pas d'obtenir les 2:1-[α/aza]-trimères avec de bons rendements. Il est donc indispensable d'employer une meilleure activation du partenaire acide.

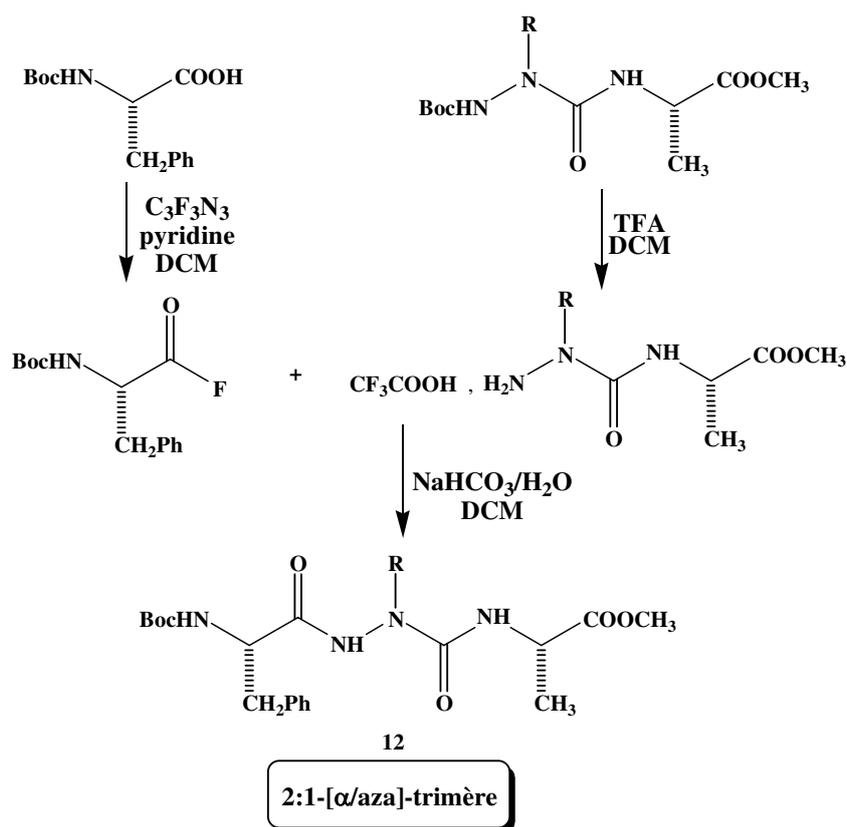
Méthode de couplage	T°C	Rdt (%) <sup>a</sup>
DCC/HOBt	T.A	14
EDC/HOBt	T.A	7 à 58 (non reproductible)
1. C <sub>3</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> , pyridine 2. DIEA	1. -20°C 2. -10°C	58 <sup>61</sup>
1. C <sub>3</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> , pyridine 2. NaHCO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O	1. -20°C 2. 0°C	90 <sup>61</sup>

<sup>a</sup> rendement en produit isolé calculé par rapport au précurseur déprotégé de départ

**Tableau 6: Essais de couplage pour la préparation du 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimère  
Boc-Phe-azaAla-Ala-OMe**

Les meilleurs rendements ont été obtenus en utilisant la méthode de couplage aux fluorures d'acides<sup>61</sup>. L'activation du partenaire acide est réalisée en utilisant le fluorure de cyanuryle à -20°C. Le fluorure d'acide ainsi obtenu avec un rendement d'environ 98% peut être isolé et caractérisé par RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C.

Nous avons testé deux conditions de couplage. L'une engage la DIEA dans le dichlorométhane et l'autre se fait en présence de NaHCO<sub>3</sub> en milieu diphasique eau/dichlorométhane. Avec la première méthode les rendements sont médiocres, de l'ordre de 50-60%. Avec l'hydrogénocarbonate de sodium dans l'eau, les rendements sont par contre excellents et on obtient le 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimère Boc-Phe-azaAla-Ala-OMe avec un rendement de 90%. Nous retiendrons donc pour la suite de l'étude la méthode aux fluorures d'acides avec NaHCO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O. Nous avons appliqué ces conditions à la synthèse des nouveaux 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères (Schéma 38). La purification des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères est préférentiellement réalisée par précipitation dans un mélange de solvant adapté à chaque composé (*cf.* partie expérimentale). En effet, nous avons observé que les rendements se trouvaient réduits après purification par chromatographie. Malgré tout, il a été nécessaire de purifier les 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères **12b** et **12c** sur colonne chromatographique car ils ne précipitent pas dans les solvants testés.



**Schéma 38 : Synthèse des 2:1-[α/aza]-trimères via la méthode aux fluorures d'acides**

Les résultats expérimentaux sont rassemblés dans le Tableau 7. Nous avons fait varier la nature de la chaîne latérale du résidu acide azaaminé ainsi que la configuration absolue des carbones asymétriques des résidus acides α aminés dans le but d'étudier leur influence sur la structuration de ces composés.

Produit	Configuration absolue Phe	Configuration absolue Ala	Rdt (%) <sup>a</sup>	R
<b>12a</b>	S	S	90	CH <sub>3</sub>
<b>12a'</b>	S	R	82	CH <sub>3</sub>
<b>12a''</b>	R	S	87	CH <sub>3</sub>
<b>12b</b>	S	S	70	CH <sub>2</sub> Ph
<b>12c</b>	S	S	52	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>12d</b>	S	S	79	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

<sup>a</sup> rendement en produit isolé calculé par rapport au précurseur déprotégé de départ

**Tableau 7 : Résultats de synthèse des 2:1-[α/aza]-trimères 12**

Nous avons délibérément choisi d'incorporer dans tous les cas la phénylalanine en première position dans la chaîne pseudo-peptidique car son cycle aromatique permet de suivre facilement l'avancement des réactions par chromatographie sur couche mince de silice. En effet, les composés issus de ces synthèses sont révélés aux ultra-violets.

Il ressort de cette étude que le couplage est également sensible à l'encombrement stérique du partenaire amine. On le remarque notamment lors de la synthèse du 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimère Boc-Phe-azaVal-Ala-OMe **12c** avec un rendement de 52%. Par contre, la configuration absolue des carbones asymétriques n'a pas d'influence sur la synthèse des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères.

En conclusion, cette étude nous a permis de confirmer la faible réactivité de l'azote  $\beta$  de nos précurseurs azadipeptidiques qui peut s'expliquer par la diminution de sa nucléophilie due à des effets électroniques du groupement carbonyle proche. Toutefois, l'utilisation des fluorures d'acides nous a permis d'obtenir de très bons rendements pour la synthèse des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères **12**. La suite de ce chapitre sera consacrée à la synthèse des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères.

### b. Préparation des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères

Nous avons envisagé la synthèse des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères en utilisant les 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères comme synthons de départ. L'oligomérisation des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères paraît envisageable par couplage peptidique classique car elle consiste en un couplage entre deux extrémités acide  $\alpha$  aminé. En effet, dans le 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimère le résidu acide azaaminé est au milieu de deux résidus acides  $\alpha$  aminés (Figure 25). Nous devrions, de cette façon, nous affranchir du problème de couplage rencontré pour la synthèse des 1:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères.

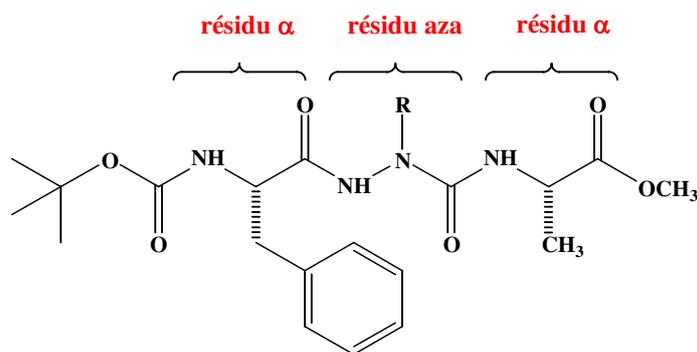


Figure 25

Les étapes de déprotection des parties *N*- et *C*-terminales des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères ont été réalisées en utilisant respectivement le TFA dans le dichlorométhane et NaOH 1N dans l'acétonitrile. Les deux 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères déprotégés ont été placés dans des conditions de couplage peptidique classique. Le choix de l'agent de couplage s'est porté sur l'EDC dont l'urée produite après le couplage est soluble en milieu aqueux ce qui permet de l'éliminer facilement par extraction (Schéma 39).

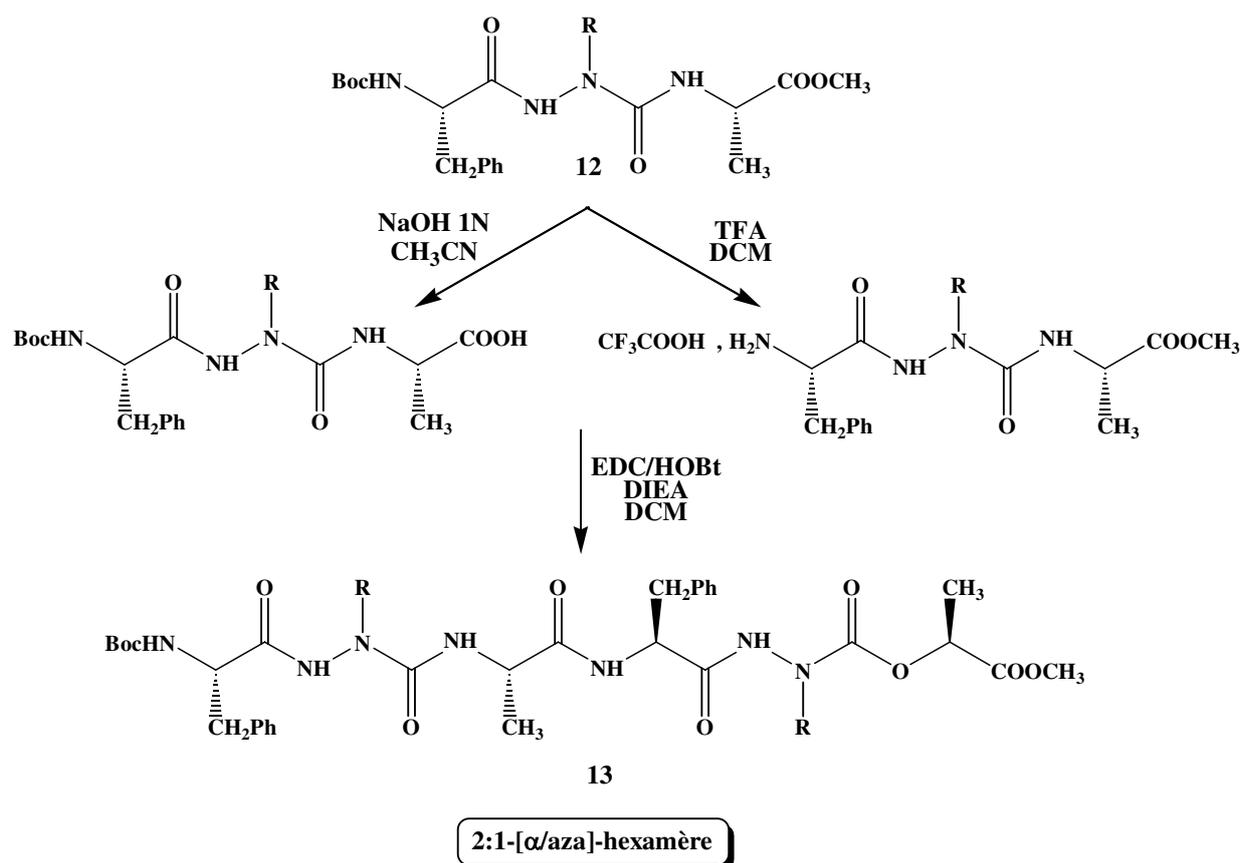


Schéma 39 : Synthèse des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamères

L'étape de couplage permet d'obtenir les 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamères avec d'excellents rendements (Tableau 8). Comme pour le 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimère, la purification des hexamères se fait facilement par trituration du brut réactionnel dans l'éther diéthylique.

Produit	Rdt (%) <sup>a</sup>	R
<b>13a</b>	90	CH <sub>3</sub>
<b>13b</b>	92	CH <sub>2</sub> Ph

<sup>a</sup> rendement en produit isolé calculé par rapport aux 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères 12

Tableau 8 : Résultats de synthèse des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamères 13

Comme nous l'avons prévu, les deux 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères placés dans des conditions de couplage peptidique nous ont permis d'obtenir les premiers 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamères avec d'excellents rendements. Nous avons donc continué sur notre lancée et avons choisi de synthétiser les oligomères homologues supérieurs de la série azaAlanine à partir du trimère et du 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamère correspondants.

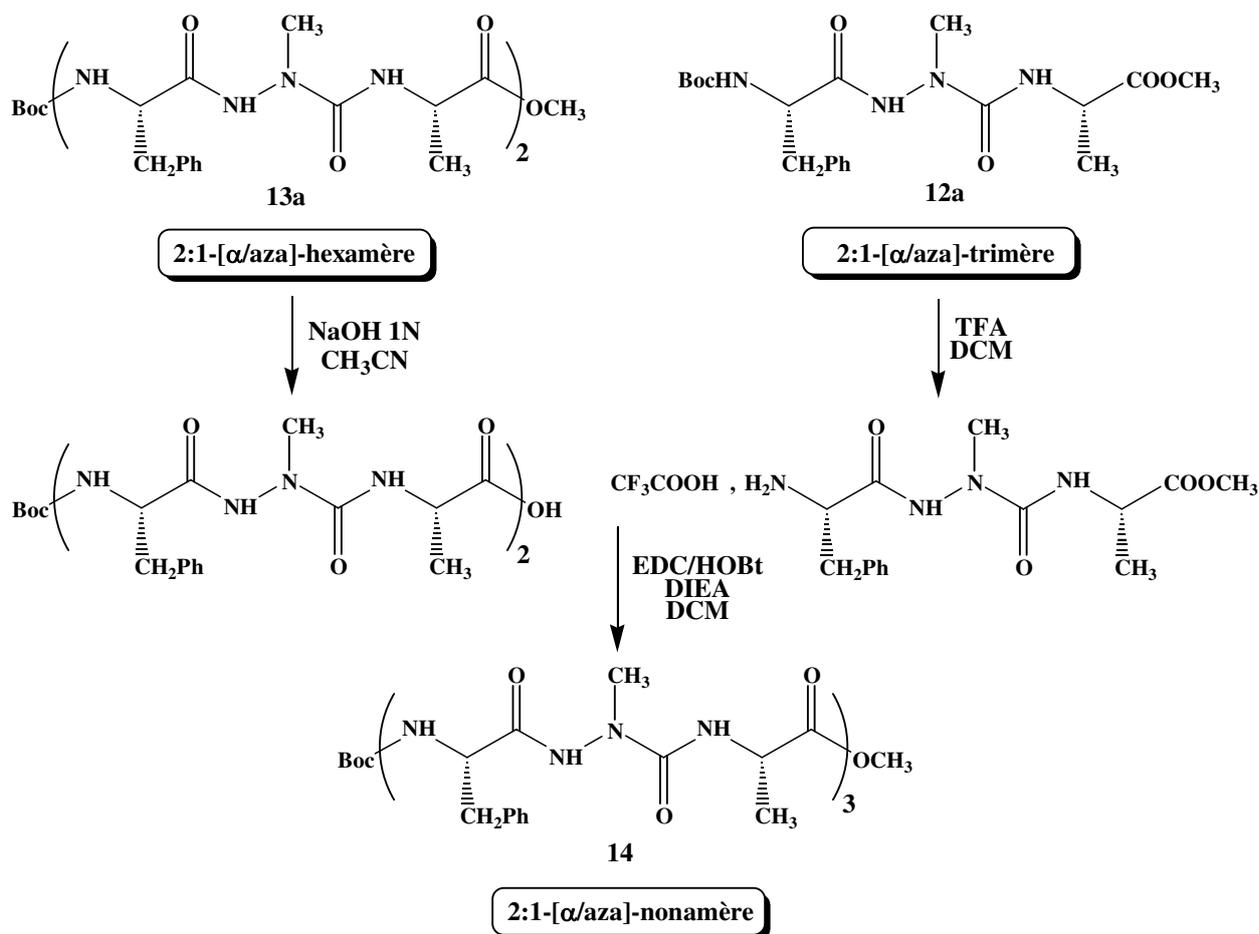


Schéma 40 : Synthèse du 2:1-[ $\alpha$ /aza]-nonamère en série azaAlanine

De la même manière, par couplage peptidique classique avec le couple EDC/HOBt, nous avons obtenu le 2:1-[ $\alpha$ /aza]-nonamère avec un rendement de 92% (Schéma 40) et le 2:1-[ $\alpha$ /aza]-dodécamère avec un rendement de 95% (Schéma 41).

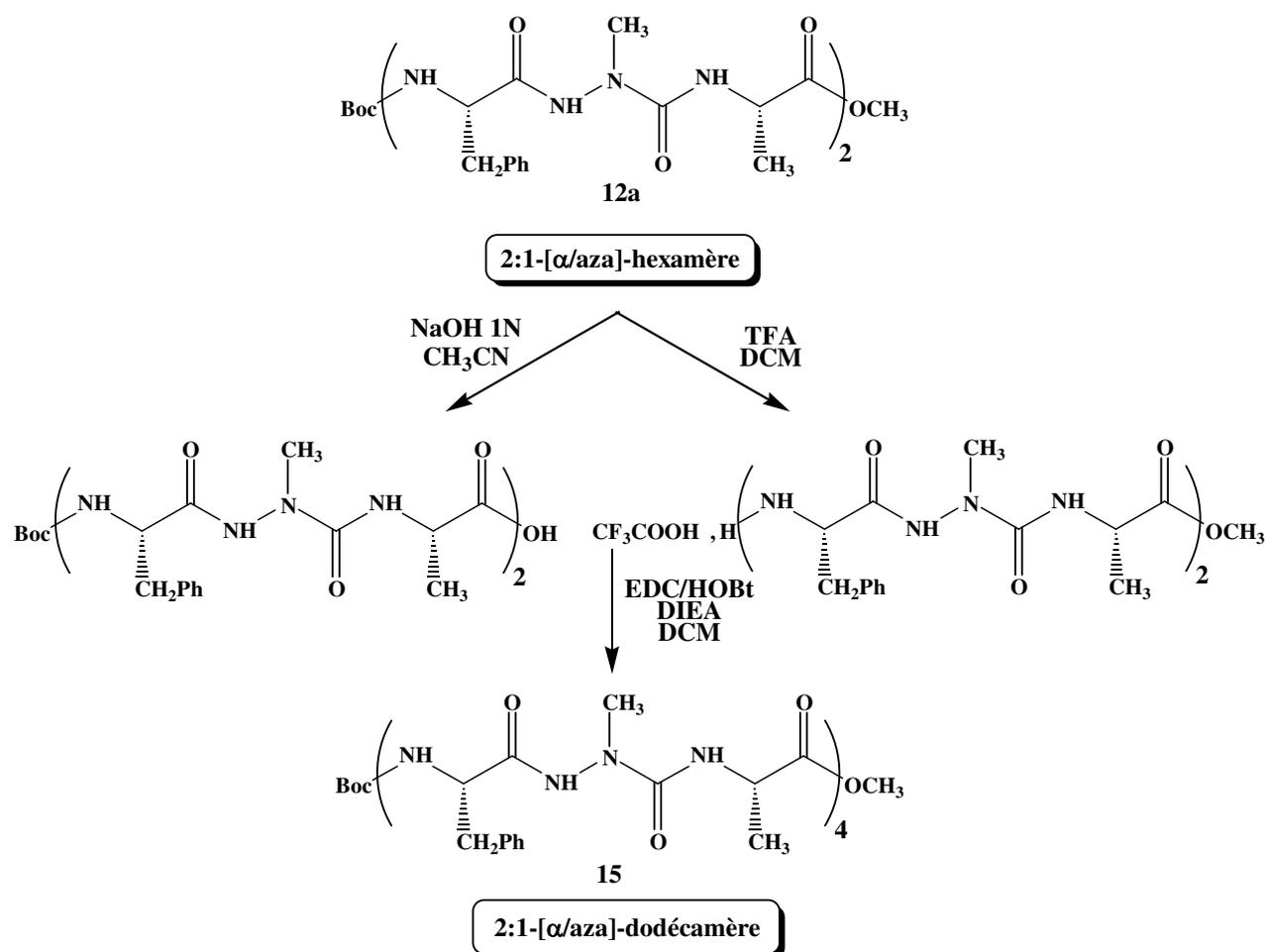


Schéma 41 : Synthèse du 2:1-[α/aza]-dodécamère en série azaAlanine

Au cours des synthèses des 2:1-[α/aza]-oligomères, un paramètre a retenu notre attention. Plus les oligomères ont un nombre élevé de résidus, plus les réactions de déprotection de leurs extrémités *N*- et *C*-terminales deviennent difficiles. Expérimentalement, nous avons observé que les temps de réaction des déprotections sont proportionnels à la taille du composé à déprotéger.

Cela peut laisser penser que les extrémités *N*- et *C*-terminales sont de moins en moins facilement accessibles lorsque la longueur de la chaîne pseudopeptidique augmente. De ce fait plus de temps est nécessaire aux réactifs de déprotection pour atteindre leur cible. Cette observation pourrait être le signe d'une structuration régulière des oligomères en solution ou d'une formation de pelotes statistiques. Cette supposition sera clarifiée dans le chapitre consacré aux études structurales.

### III.4.4. Conclusion

Lorsque nous avons abordé les études concernant l'oligomérisation des précurseurs azadipeptidiques **5**, nous avons pour objectif de synthétiser deux séries se différenciant par le nombre de résidu acides  $\alpha$  aminés se succédant dans la chaîne pseudopeptidique.

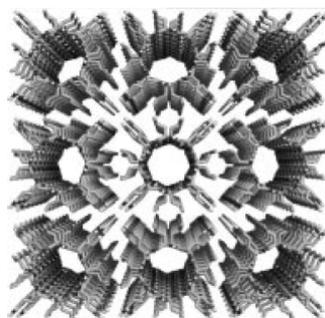
La synthèse des 1:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères, dans lesquels se succèdent un résidu acide  $\alpha$  aminé et un résidu acide azaaminé, s'est avérée irréalisable. La réaction de couplage entre les deux unités, amine et acide, n'a donné aucun résultat.

La synthèse des premiers 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères a été un réel succès. Cette synthèse consiste tout d'abord à préparer les unités de base, les 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères **12**, à partir des précurseurs azadipeptidiques Boc-azaAA-AA-OMe **5**. Les 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères sont ensuite engagés dans des réactions d'oligomérisation par couplages peptidiques classiques. On a ainsi obtenu les 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamères **13**, 2:1-[ $\alpha$ /aza]-nonamère **14** et 2:1-[ $\alpha$ /aza]-dodécamère **15** avec d'excellents rendements.

### III.5. Cyclisation des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères

#### III.5.1. Introduction et bibliographie

Durant les dix dernières années, les travaux concernant la synthèse de molécules qui s'auto-assemblent pour former des structures supramoléculaires ont connu une recrudescence importante. Une catégorie attrayante est constituée par les peptides cycliques composés d'une alternance d'un nombre équivalent de résidus acides  $\alpha$  aminés de configuration D et L (Figure 26).

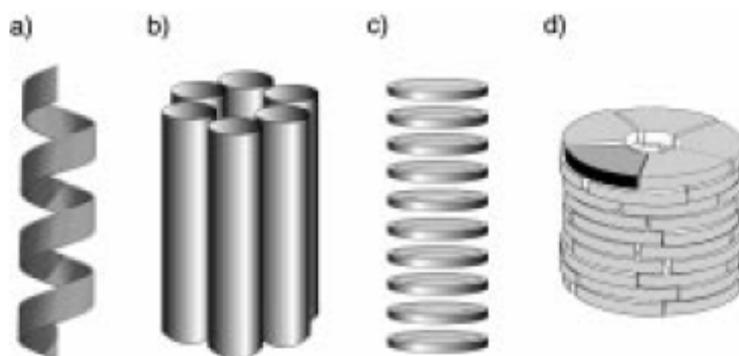


**Figure 26 : Structure cristalline obtenue par microscopie électronique pour un D,L-cyclopeptide :une organisation nanotubulaire est clairement distinguée<sup>67</sup>**

Certains de ces peptides cycliques ont la capacité de s'assembler sous forme de structures tubulaires creuses que l'on appelle les nanotubes (Figure 27). Ils s'agencent en fait par l'intermédiaire de liaisons hydrogène antiparallèles entre les résidus acides  $\alpha$  aminés, de même chiralité, des cycles adjacents.

P. De Santis a été le premier à proposer la formation de ce type de nanotubes en 1974<sup>68,69</sup>. Plus tard, M. Reza Ghadiri et ses collaborateurs ont décrit expérimentalement, à travers de nombreuses études, la synthèse de composés peptidiques cycliques ainsi que leur organisation<sup>70-72</sup>. Ces études ont également montré que le diamètre intérieur du nanotube peut varier en fonction du nombre de résidus acides  $\alpha$  aminés dans le peptide. Il a été démontré que les peptides de cette catégorie peuvent aussi former des canaux transmembranaires artificiels utilisés pour le transport d'ions ou de glucose dans le but d'exercer une activité antibactérienne<sup>73</sup>.

L'équipe de M. Reza Ghadiri a prouvé que des peptides cycliques contenant 24 ou 30 atomes dans le cycle et avec une alternance de résidus acides  $\alpha$  aminés de configuration D et L s'empilent sous forme de feuillets  $\beta$  antiparallèles par formation de liaisons hydrogène conduisant finalement à une structure tubulaire<sup>67,73,74</sup>.



**Figure 27 : Quatre arrangements spatiaux possibles pour les molécules à structure tubulaire : a) hélice qui en s'aplatissant forme une structure repliée creuse, b) tiges formées par des molécules qui s'assemblent pour former des fagots , c) empilement de macrocycles qui forme un tube, d) éléments qui s'assemblent pour donner des disques qui ensuite s'empilent pour former des cylindres continus comme les macrocycles<sup>67</sup>**

Il est très intéressant de noter que des pseudopeptides cycliques tels que les  $\beta$ -peptides cycliques (cycle à 12 et 16 membres)<sup>72,75,76</sup>, les peptides cycliques mixtes  $\alpha/\beta$ -peptides (cycle à 14 membres)<sup>77</sup> et les  $\delta$ -peptides cycliques vinylogues (cycle à 18 membres)<sup>78</sup> forment également des empilements tubulaires. Il a été confirmé expérimentalement que l'alternance

de la configuration absolue D et L des carbones asymétriques est favorable à l'organisation sous forme de nanotubes<sup>67,70,72,71,17,79-81</sup>.

Les nanotubes cyclo-peptidiques et cyclo-pseudopeptidiques ont trouvé des applications biologiques et thérapeutiques. En effet, des macrocycles possédant une symétrie d'ordre trois ont été utilisés pour la reconnaissance moléculaire des sucres<sup>82</sup>, comme récepteurs sélectifs de cations ou d'anions<sup>17,79,83-86</sup>, ou pour mimer la molécule trimérique CD40L qui est un ligand important de la superfamille des TNFR, molécules qui induisent la transduction d'une variété de signaux à l'intérieur de la cellule, comme la prolifération, la différenciation, la survie et la mort<sup>87</sup>.

L'équipe de Gilles Guichard à Strasbourg a réalisé la synthèse de macrocycles à partir de leurs oligomères oligo-urées linéaires. Ils ont obtenu tout d'abord un cycle oligo-urée à 20 atomes portant des chaînes latérales protéinogéniques<sup>88</sup>. Dans la structure cristalline, ce cycle forme un nanotube grâce à l'établissement de liaisons hydrogène entre les groupements NH et carbonyles qui sont dirigés l'un vers l'autre. Plus tard cette même équipe a obtenu, à partir des dipeptides linéaires correspondants, des dimères mixtes urée/amide cycliques<sup>89</sup>. De la même façon, ces cycles s'empilent sous forme de tubes. Ce résultat est d'autant plus intéressant que des études récentes ont démontré que les oligomères mixtes urées/amide pouvaient avoir des propriétés améliorées par rapport aux oligoamides (foldamères antibactériens, récepteurs d'anions avec une forte sélectivité pour les oxyanions<sup>90</sup>).

Philippe Le Grel et ses collaborateurs ont, quant à eux, réalisé la synthèse et l'étude structurale des aza- $\beta^3$ -cyclohexapeptides, cycle à 24 membres<sup>91</sup>. Par des réactions de débenzylation/acylation les chaînes latérales portées par les résidus hydrazidiques ont été modifiées. De cette façon, une grande diversité de composés a pu être obtenue. Les études structurales et spectroscopiques ont montré que les aza- $\beta^3$ -cyclohexapeptides adoptaient une conformation organisée où la configuration relative de l'atome d'azote chiral est alternée. En effet, on y observe un réseau dense de liaisons hydrogène intramoléculaires, tous les groupements NH du cycle sont liés par liaisons hydrogène et les chaînes latérales sont projetées en position équatoriale autour du macrocycle. Ces composés révèlent une inversion lente de l'atome d'azote pyramidal, sans précédent dans des molécules macrocycliques. Ces aza- $\beta^3$ -cyclohexapeptides possèdent une symétrie d'ordre trois ce qui en fait des composés très intéressants au niveau biologique puisque les cyclopeptides ayant une symétrie d'ordre

trois ont été découverts comme étant des mimétiques fonctionnels de la molécule trimérique CD40L<sup>92</sup>.

### **III.5.2. Synthèse des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-cyclooligomères**

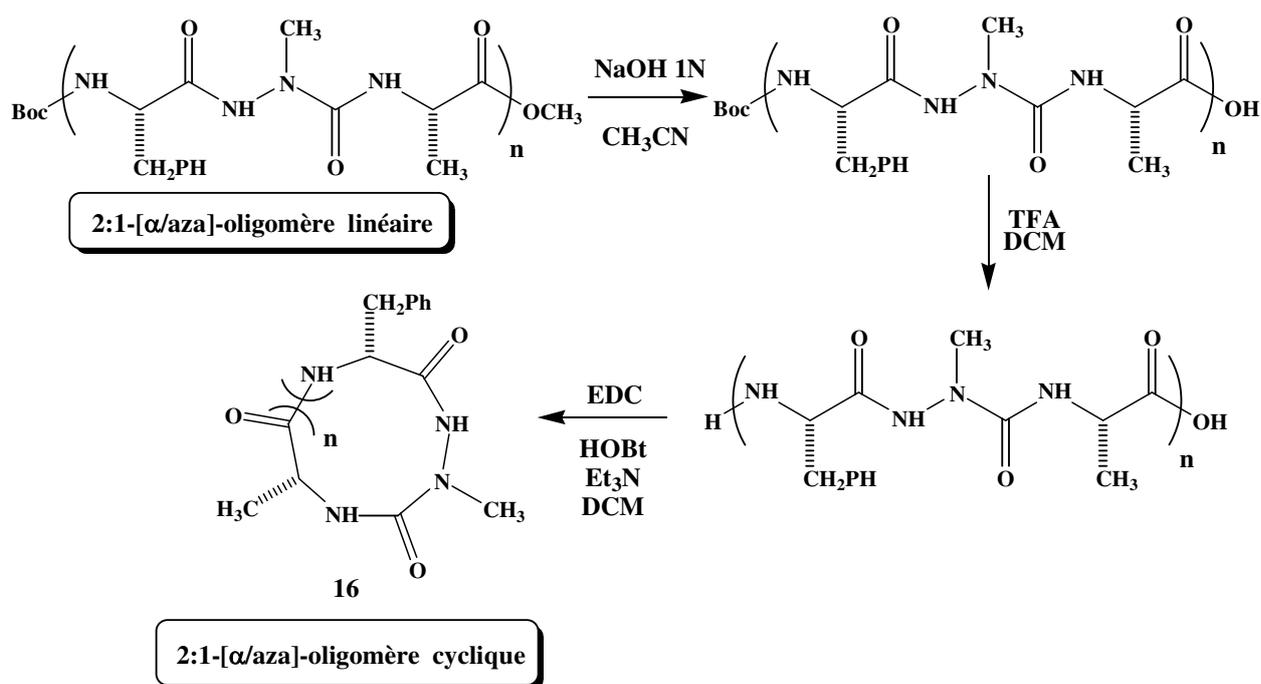
La cyclisation est une méthode simple pour introduire des contraintes stériques et angulaires au sein de peptides ou pseudopeptides. On peut atteindre des exigences conformationnelles nécessaires à une activité biologique. Nous avons alors envisagé de cycliser nos 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères dans le but d'induire un processus d'auto-organisation. Effectivement, les macrocycles devraient être plus rigides que les oligomères linéaires correspondants.

Les extrémités *N*- et *C*-terminales des oligomères linéaires sont déprotégées. Dans un premier temps, l'ester méthylique de l'extrémité *C*-terminale est déprotégé dans un mélange NaOH 1N dans l'acétonitrile. Puis le groupement Boc est supprimé à l'aide d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane. Les cyclisations sont effectuées dans le dichlorométhane contenant un excès d'EDC et d'HOBt comme agents de couplage (Schéma 42). L'oligomère linéaire entièrement déprotégé en solution dans le dichlorométhane est alors ajouté à la solution sous agitation, au goutte à goutte très lent, de façon à obtenir une concentration finale d'environ 1 mM/L.

Les deux paramètres nécessaires à la réussite de la réaction sont :

- un milieu de réaction très dilué de l'ordre de 1mM/L
- un ajout du composé à cycliser par un goutte à goutte très lent

Grâce à cela, on favorise la réaction intramoléculaire et on minimise l'oligomérisation supplémentaire des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères linéaires. Nous avons tout d'abord tenté la synthèse du 2:1-[ $\alpha$ /aza]-cyclotrimère. Le produit attendu n'a pas été isolé. Nous pensons que la longueur du squelette pseudopeptidique n'est pas suffisante pour que le trimère linéaire déprotégé puisse se replier pour que ses extrémités se rencontrent. La synthèse du macrocycle à neuf atomes n'est donc pas envisageable dans cette série pseudopeptidique.



**Schéma 42 : Méthode générale de cyclisation des 2:1-[α/aza]-oligomères**

De cette manière nous avons isolé trois oligomères cycliques, le 2:1-[α/aza]-cyclohexamère **16a**, le 2:1-[α/aza]-cyclononamère **16b** et le 2:1-[α/aza]-cyclododécamère **16c** (Tableau 9).

Leur présence a été confirmée par spectrométrie de masse du produit brut réactionnel. Cependant, il a été très difficile de mettre en place les conditions de purification par HPLC. Ce qui explique que seul le 2:1-[α/aza]-cyclohexamère **16a** a été purifié. Ceci nous a permis de caractériser ce composé par RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ .

Produit	n	Configuration absolue de $\text{CH}_\alpha$ de Phe	Configuration absolue de $\text{CH}_\alpha$ de Ala
<b>16a</b>	2	R	S
<b>16b</b>	3	S	S
<b>16c</b>	4	S	S

**Tableau 9 : Description des trois 2:1-[α/aza]-cyclooligomères 16 synthétisés**

La préparation du 2:1-[α/aza]-cyclohexamère en configuration S pour les résidus acides α aminés a été expérimentée. Celle-ci a échoué. Ici ce n'est pas la longueur de la chaîne qui a empêché la cyclisation puisque nous avons isolé **16a**. Nous avons fait l'hypothèse que le 2:1-[α/aza]-cyclohexamère linéaire déprotégé n'a pas pu se replier suffisamment car la

configuration absolue identique (S, S, S, S) des résidus Alanine et Phénylalanine ne le permet pas. Par contre, lorsqu'il y a alternance des configurations absolues des carbones asymétriques des résidus acides  $\alpha$  aminés, la cyclisation est possible comme avec **16a**.

Concernant les composés **16b** et **16c**, bien que les configurations absolues des carbones asymétriques de l'unité de base soient S pour le résidu phenylalanine et S pour le résidu alanine, la réaction est permise car la longueur de la chaîne pseudopeptidique est assez importante.

Nous avons réalisé la synthèse des premiers oligomères cycliques 2:1-[ $\alpha$ /aza]-cyclooligomères. Nous avons utilisé une méthode qui engage un couplage peptidique à haute dilution entre les extrémités *N*- et *C*-terminales déprotégées de l'oligomère linéaire correspondant. Par manque de temps, nous n'avons pu avancer d'avantage l'étude des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-cyclooligomères.

## IV. Etudes conformationnelles des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères

### IV.1. Introduction

La structure tridimensionnelle d'un peptide ou d'un pseudopeptide est déterminée en premier lieu par sa structure primaire, c'est-à-dire par la nature chimique et la disposition spatiale des chaînes latérales portées par les acides  $\alpha$  aminés et azaaminés dans notre cas. Les propriétés conformationnelles résultent de l'établissement d'interactions intramoléculaires à courte, moyenne et longue distances ainsi que des interactions intermoléculaires. La résolution de la structure tridimensionnelle de protéines et de peptides par radiocristallographie ainsi que l'utilisation de méthodes de calculs empiriques<sup>93</sup> ont permis de mettre en évidence le rôle de certains facteurs dans la structuration, parmi lesquels, le plus étudié, est la formation de liaisons hydrogène.

Le terme de foldamère a été défini par Samuel Gellman, il y a une dizaine d'années, comme « tout oligomère possédant une forte tendance à adopter une conformation compacte en solution »<sup>3</sup>. Les premiers travaux concernant les foldamères ont été réalisés par Samuel Gellman<sup>94</sup> et Dieter Seebach<sup>95,75</sup>. Dans le milieu des années 90's, les deux équipes ont montré que des homo-oligomères de petites tailles composés de résidus non naturels, les acides  $\beta$  aminés, pouvaient s'auto-organiser sous forme de structures secondaires définies, comme les hélices, les feuillets et les tours  $\beta$ , que l'on retrouve dans les peptides naturels, en dépit d'une flexibilité encore plus grande que celle des  $\alpha$  peptides naturels (Figure 28)<sup>96</sup>. De plus, des effets biologiques ciblés ont pu être obtenus d'autant que ces pseudopeptides montrent une grande résistance à la protéolyse. Théoriquement, les interactions moléculaires trouvées dans les oligomères peuvent provenir d'un grand nombre de forces non covalentes telles que les répulsions stériques, les liaisons hydrogène, les interactions électrostatiques, les interactions  $\pi$ - $\pi$  aromatiques, la coordination à un ion métallique ainsi que les effets hydrophobes. Cependant, ce sont les liaisons hydrogène qui jouent le rôle fondamental dans la conception de foldamères car ce sont, le plus souvent, les plus fortes des interactions faibles. L'établissement de liaisons hydrogène est le meilleur moyen de former des interactions intramoléculaires. Elles peuvent permettre de stabiliser un oligomère flexible en instaurant localement une structuration.

Les oligomères ayant une forte tendance à adopter ces conformations spatiales spécifiques sont de bons candidats à la conception de foldamères. De cette manière, ils

peuvent mimer les propriétés structurales et fonctionnelles de leurs homologues biologiques. Ces travaux innovants, accompagnés de leurs résultats prometteurs, ont stimulé d'autres équipes de recherche à s'intéresser à cette discipline. Dans ce chapitre, nous allons décrire les études structurales réalisées sur nos composés mixtes 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères dans le but de déterminer s'ils appartiennent à la famille des foldamères.

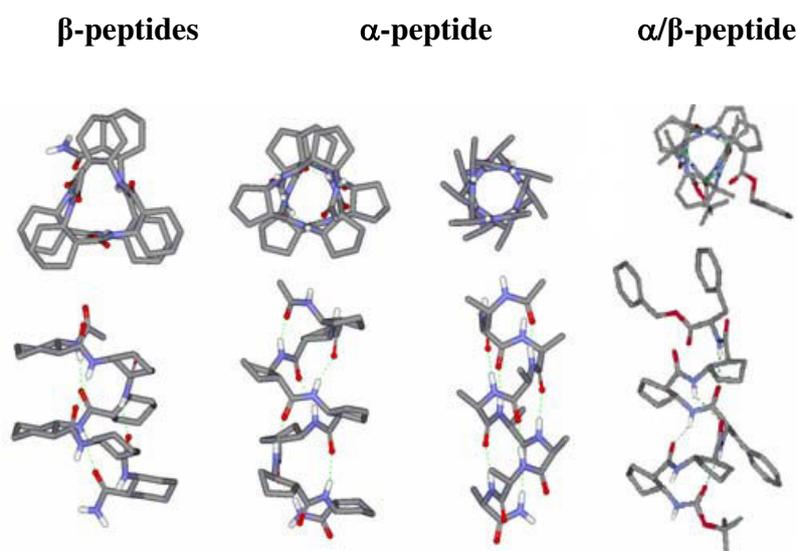


Figure 28 : Structures cristallines d'hélices dans les  $\alpha$ -peptides, les  $\beta$ -peptides et les oligomères mixtes  $\alpha/\beta$ -peptides<sup>96</sup>

#### IV.2. Rôle des foldamères

La structure tridimensionnelle qu'adoptent les macromolécules biologiques telles que l'ADN ou les protéines est un élément indispensable au bon fonctionnement de l'organisme. Par exemple, la transmission de l'information génétique serait impossible si l'ADN n'adoptait pas une structuration en double hélice.

Au cours des ces dernières décennies, de nombreux peptides biologiquement actifs, et présentant un intérêt thérapeutique, ont été isolés et caractérisés. Leur utilisation est cependant limitée par leurs propriétés pharmacocinétiques et métaboliques souvent décevantes, comme nous l'avons souligné dans l'introduction générale et le chapitre I de ce mémoire. C'est la raison pour laquelle de nombreuses équipes de recherche se sont intéressées à la synthèse de

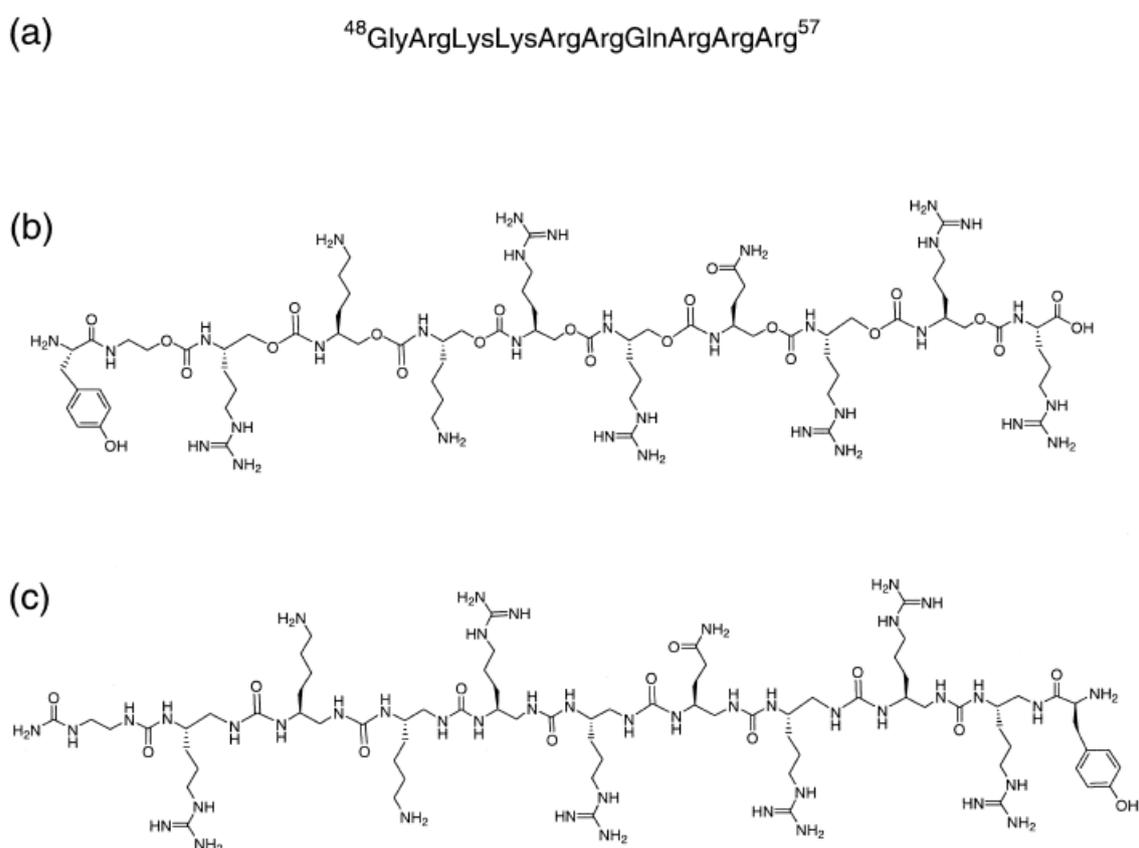
peptides modifiés, les pseudopeptides, qui présentent une plus grande résistance vis-à-vis des protéases de l'organisme.

Certains foldamères possèdent une activité antimicrobienne. Ainsi, beaucoup d'efforts sont fournis dans le domaine de la synthèse de foldamères possédant une activité antibiotique car ces derniers sont moins soumis à la dégradation protéolytique que les peptides composés de résidus protéinogéniques. La plupart des peptides antimicrobiens partagent un même motif structural qui est une hélice, amphipathique et cationique capable de traverser les membranes biologiques ce qui entraîne la lyse de la cellule. La sélectivité des foldamères antibiotiques pour les bactéries est régie par l'établissement d'interactions électrostatiques entre la charge positive du peptide et la charge négative présente à la surface des membranes bactériennes. La sélectivité peut alors être renforcée par une balance entre hydrophobicité et charge électrostatique.

L'équipe de recherche de William F. De Grado a proposé un protocole de design *de novo* d'une structure amphipatique, cationique et monosubstituée d'une hélice 14 basée sur un squelette  $\beta$  peptidique<sup>97</sup>. Ce composé lutte contre les infections par les bactéries GRAM négatives d'*Escherichia Coli*. Malgré un fort pouvoir antibiotique, ce dernier dispose d'une faible sélectivité. D'après les résultats observés, l'équipe de recherche a conclu que la faible sélectivité du  $\beta$  peptide était due à l'hydrophobicité importante de ses chaînes latérales. Par la suite, William F. De Grado et ses collaborateurs ont modifié l'hélice originale en remplaçant les résidus valine par des résidus alanine beaucoup moins hydrophobes. Cette substitution permet d'abolir l'activité hémolytique tout en conservant une bonne efficacité antibactérienne<sup>98</sup>. Ces travaux permettent de conclure que les foldamères formant une hélice cationique et amphiphile avec une balance appropriée entre charge et hydrophobicité sont de bons candidats antibactériens à la fois efficaces et sélectifs. En effet, plusieurs groupes de recherche (équipes de William F. De Grado, de Dieter Seebach, de Samuel Gellman) ont étudiés de tels peptidomimétiques présentant un intérêt certain pour le développement de nouvelles thérapies antibiotiques.

Une autre application des foldamères est basée sur les interactions foldamères/macromolécules. Les peptidomimétiques capables de se lier aux ADN ou aux ARN sont en mesure d'affecter la transcription ou la réplication d'un gène. Ceci représente un intérêt non négligeable pour de futures applications thérapeutiques. Prenons l'exemple de la

réplication du VIH qui est permise par une interaction entre la protéine Tat et une séquence d'ARN possédant une structure en hélice nommée TAR. L'abolition de l'interaction entre le Tat et l'ARN du VIH présente un intérêt pour le développement d'une thérapie de lutte contre le SIDA. Les chercheurs se sont donc focalisés sur la synthèse de foldamères mimant la protéine Tat et capable d'inhiber l'interaction Tat/TAR par un mécanisme compétitif. Natarajan Tamilarasu et ses collaborateurs ont développé des mimes du domaine de liaison de Tat à TAR sous la forme d'oligourées et d'oligocarbamates (Figure 29)<sup>99</sup>. L'équipe de Samuel Gellman a également synthétisé des  $\beta$  peptides mimant le domaine de fixation Tat/TAR avec une activité comparable à celle du peptide natif<sup>100</sup>.

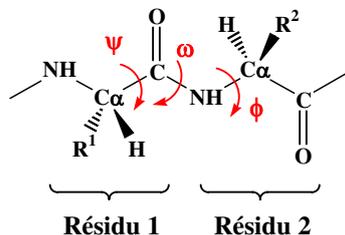


**Figure 29 : (a) Partie du peptide natif Tat nécessaire à l'interaction Tat/TAR (b) oligocarbamates et (c) oligourées qui inhibent l'interaction Tat/TAR**

Au vu de la progression rapide des travaux concernant les foldamères peptidomimétiques, il est évident que le catalogue de foldamères basés sur un squelette autre que celui des  $\beta$  peptides va se développer.

### IV.3. Notation et description du squelette peptidique et des liaisons hydrogène intramoléculaires dans les peptides

La conformation des peptides peut être décrite à l'aide de trois angles de torsion autour des liaisons  $\text{NH-C}_\alpha$ ,  $\text{C}_\alpha\text{-CO}$  et  $\text{CO-NH}$ , respectivement notés  $\Phi$ ,  $\Psi$ ,  $\omega$  (Figure 30). Par convention, ces angles sont comptés positivement lorsque, orientée de l'extrémité *N*-terminale (à gauche) vers l'extrémité *C*-terminale (à droite), la partie en aval (*C*-terminale) tourne dans le sens des aiguilles d'une montre. La valeur nulle correspond à la disposition éclipsée des atomes du squelette peptidique. Du fait de la mésomérie qu'elle induit, on dit couramment que la liaison amide est « partiellement double » car elle se comporte comme une double liaison. Les six atomes  $\text{C}_\alpha 1$ , O, C, N, H et  $\text{C}_\alpha 2$  sont situés dans le même plan. La valeur de l'angle  $\omega$  est donc voisine soit de  $0^\circ$  soit de  $180^\circ$  selon que la liaison peptidique est respectivement *cis* ou *trans*. Seuls les angles  $\Phi$  et  $\Psi$  peuvent prendre des valeurs intermédiaires. Cependant, toutes les valeurs d'angles des couples ( $\Phi$ ,  $\Psi$ ) ne sont pas permises stériquement. Le diagramme de Ramachandran représente les zones énergiquement favorables.



**Figure 30 : Représentation d'un enchaînement de résidus peptidiques et définition des trois angles de torsion qui décrivent la conformation du squelette peptidique**

L'établissement d'une liaison hydrogène au sein d'un peptide met en jeu le site donneur de proton N-H appartenant au résidu *i* et le site accepteur de proton C=O du résidu *i+x*. On note cette interaction  $i \rightarrow i+x$ . La force de cette interaction dépend en partie de la distance  $\text{N}\cdots\text{O}$  qui sépare le site donneur du site accepteur. Cette distance est optimale lorsqu'elle est comprise entre 2,8 et 3,1 Å, quand les trois atomes N-H $\cdots$ O sont colinéaires et lorsque l'angle (N-H,O) a une valeur qui varie entre  $-20^\circ$  et  $+20^\circ$ . Le pseudocycle formé est noté  $\text{C}_n$ , où *n* représente le nombre d'atomes constitutifs (Figure 31). En plus des interactions squelette-squelette, les liaisons hydrogène intramoléculaires peuvent se former tout aussi bien

entre deux résidus éloignés dans le squelette peptidique (interaction à longue distance) qu'entre un atome d'une chaîne latérale polaire et la chaîne principale au sein d'un même résidu (interaction à courte distance) ou avec un autre résidu de la chaîne (interaction à moyenne distance).

Les méthodes d'analyse conformationnelle comme la radiocristallographie, la résonance magnétique nucléaire, la spectroscopie infrarouge et le dichroïsme circulaire ont permis de mettre en évidence différentes interactions intramoléculaires à courtes, moyennes et longues distances dans l'enchaînement peptidique. Nous proposons de donner ici quelques exemples de repliements stabilisés par liaisons hydrogène et responsables d'une structuration locale.

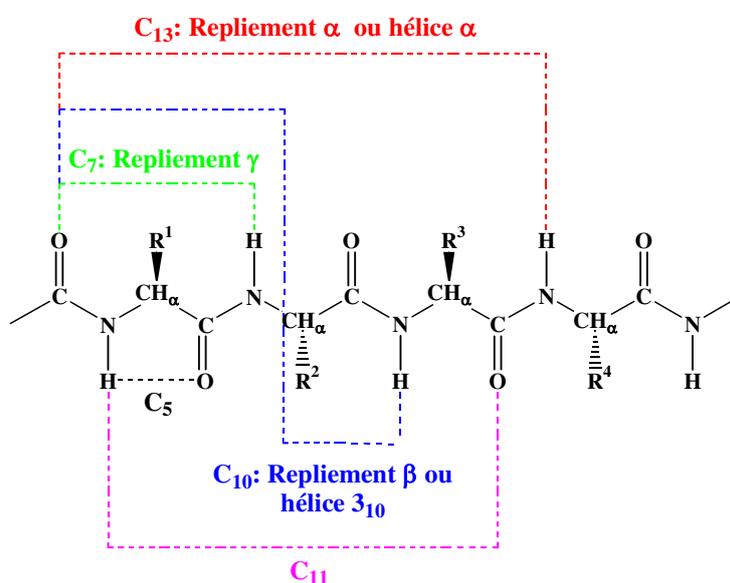


Figure 31 : Principales interactions rencontrées dans les peptides

#### IV.3.1. Le repliement $\gamma$ ou C<sub>7</sub>

Ce type de structure spatiale a été mis en évidence grâce à des études spectroscopiques de dipeptides en solution<sup>28,101</sup>. Cette conformation, où s'exerce l'interaction intramoléculaire de type  $i+2 \rightarrow i$ , est caractérisée par la formation d'un pseudocycle à sept atomes (Figure 32). Il existe sous deux formes, selon l'orientation pseudo-axiale (repliement  $\gamma$ ) ou pseudo-équatoriale (repliement  $\gamma$  inverse) de la chaîne latérale du résidu  $i+1$ . Il est à noter que la conformation équatoriale est généralement la plus stable.

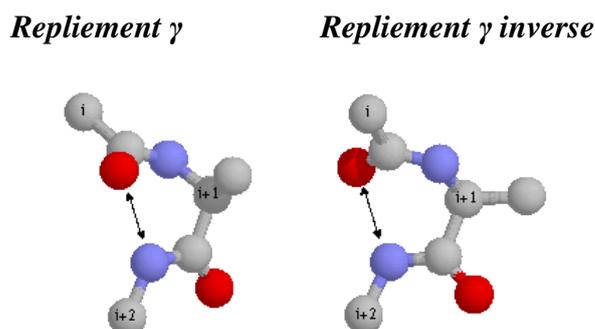


Figure 32 : Repliements  $\gamma$

### IV.3.2. Le repliement $\beta$ ou $C_{10}$

Le repliement  $\beta$  des enchaînements peptidiques concerne une courte séquence de quatre résidus. Il permet d'inverser la direction de propagation d'une chaîne peptidique. Ses propriétés structurales et biologiques ont fait l'objet de nombreuses revues. Dix modes de repliement  $\beta$  ont été décrits à partir des structures cristallines des protéines<sup>102</sup>. Les six repliements  $\beta$  les plus courants sont caractérisés par l'établissement d'une liaison hydrogène  $i+3 \rightarrow i$  entre les sites NH du résidu  $i+3$  et le CO du résidu  $i$ , ce qui correspond à une distance  $N \cdots O$  comprise entre 2,8 et 3,5 Å (Figure 33).

Le coude  $\beta$  se révèle être un élément architectural primordial dans les structures tridimensionnelles des protéines globulaires. Par extension, l'appellation repliement  $\beta$  est aussi utilisée pour toute forme repliée dans les peptides à condition que les  $C_{\alpha}$  des résidus  $i$  et  $i+3$  ne soient pas distants de plus de 7 Å<sup>102</sup>. Les causes de l'existence de structures repliées ont fait l'objet d'un grand nombre d'études expérimentales et théoriques tendant à montrer qu'il s'agit d'une disposition intrinsèquement stable de l'enchaînement peptidique.

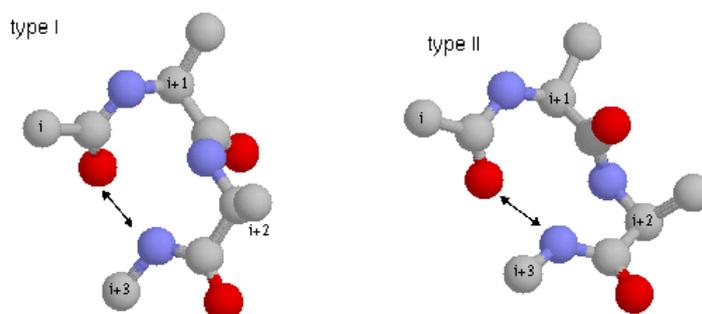


Figure 33 : Coudes  $\beta$  de type I et de type II

Les principaux types de repliements  $\beta$  ainsi que la valeur moyenne des angles de torsions dans les résidus  $i+1$  et  $i+2$  sont regroupés dans le Tableau 10.

Type	Résidu $i+1$		Résidu $i+2$	
	$\Phi$	$\Psi$	$\Phi$	$\Psi$
$\beta_I$	-60	-30	-90	0
$\beta_I'$	60	30	90	0
$\beta_{II}$	-60	120	80	0
$\beta_{II}'$	60	-120	-80	0
$\beta_{III}$	-60	-30	-60	-30
$\beta_{VI}$	-60	120	-120	60

**Tableau 10 : Valeurs moyennes des angles de torsions pour les six principaux modes de repliement  $\beta$  caractérisés par une liaison hydrogène du type  $i+3 \rightarrow i$**

### IV.3.3. Les hélices

L'enchaînement de pseudocycles par établissement de liaisons hydrogène intramoléculaires conduit à la formation d'hélices. On utilise l'écriture « hélice  $a_b$  » où  $a$  et  $b$  représentent respectivement le nombre de résidus acides  $\alpha$  aminés par pas d'hélice et le nombre d'atomes qui participent à la formation du pseudocycle. Le pas de l'hélice est caractérisé par sa longueur en Å et par son enroulement vers la gauche (M) ou vers la droite (P). Dans les protéines, l'hélice  $\alpha$ , caractérisée par un pas droit de 5,4 Å, correspond dans cette nomenclature à l'hélice-3,6<sub>13</sub>.

Les peptides représentent les mêmes types d'hélices que les protéines (Figure 31). On distingue trois grandes classes d'hélices qui diffèrent par le nombre de résidus acide  $\alpha$  aminés par tour et par le pas de l'hélice : hélice  $\alpha$ , hélice 3<sub>10</sub> et hélice  $\pi$ .

## IV.4. Aspects conformationnels en série pseudopeptidique

L'étroite relation entre les propriétés conformationnelles des peptides bioactifs et leur activité biologique est une des raisons qui ont motivé l'étude d'analogues pseudopeptidiques.

C'est en ce sens qu'il est utile de cerner l'influence des modifications chimiques du squelette peptidique sur les propriétés conformationnelles des pseudopeptides résultants. Un des aspects les plus étudié est l'influence de l'introduction de liens pseudopeptidiques sur la stabilité des repliements  $\beta^4$ . Toute altération chimique des sites CO et NH concernés par la liaison hydrogène  $i+3 \rightarrow i$ , par nature, un effet fortement déstabilisant sur ce repliement. Les autres substitutions peuvent avoir un effet bénéfique ou néfaste sur ce motif structural. Toutefois, si l'on considère l'ensemble des changements dont il est fait état, on constate que la plupart d'entre eux stabilisent le repliement  $\beta$ . Par ailleurs, certaines modifications stabilisatrices du coude  $\beta$  induisent un passage de repliement type  $\beta_I \rightarrow \beta_{II}$  ou bien encore  $\beta_I \rightarrow \beta_{VI}$ , qui se traduit essentiellement par une orientation différente des sites polaires du lien amide central<sup>24</sup>. Cet effet peut ne pas être sans importance si ces sites interviennent dans une reconnaissance moléculaire.

Il existe de nombreuses familles de foldamères pseudopeptidiques. Nous présentons ici quelques exemples, non exhaustifs, de modifications pseudopeptidiques de la famille des foldamères qui engendrent des conformations compactes en solution<sup>20,103,104</sup>. Nous présenterons les  $\beta$ -peptides et certains de leurs analogues ainsi que les modifications pseudopeptidiques étudiés au sein du laboratoire.

#### IV.4.1. Les $\beta$ -peptides

Les  $\beta$ -peptides sont constitués de l'assemblage d'acides  $\beta$  aminés, homologues supérieurs des acides  $\alpha$  aminés naturels. Le squelette d'un  $\beta$ -peptide possède un carbone supplémentaire par unité de base (Figure 34).

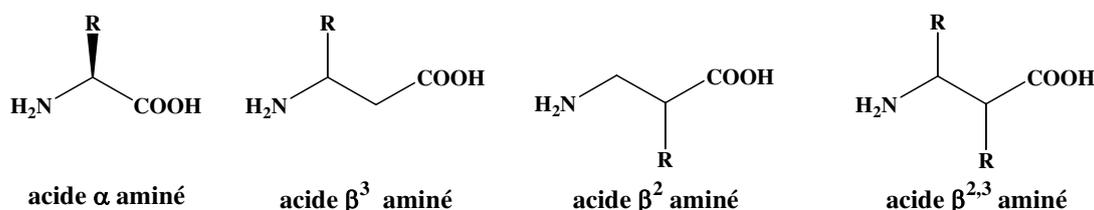


Figure 34 : Différents types d'acides  $\alpha$  et  $\beta$  aminés

Une ou plusieurs chaînes latérales peuvent alors être introduites en position deux et/ou trois par rapport au groupe carboxylique. Le squelette  $\beta$  peptidique possède alors une grande flexibilité structurale qui a été beaucoup exploitée par les équipes de Samuel Gellman<sup>94,19,105-108</sup> et Dieter Seebach<sup>109,110</sup>. Ils y ont identifié six structurations possibles dont la plus favorable est l'hélice  $3_{14}$ , obtenue par un réseau de liaisons hydrogène  $\text{CO}\cdots\text{HN}$  de direction opposée à celle de l'hélice  $\alpha$  (Figure 28 et Figure 35).

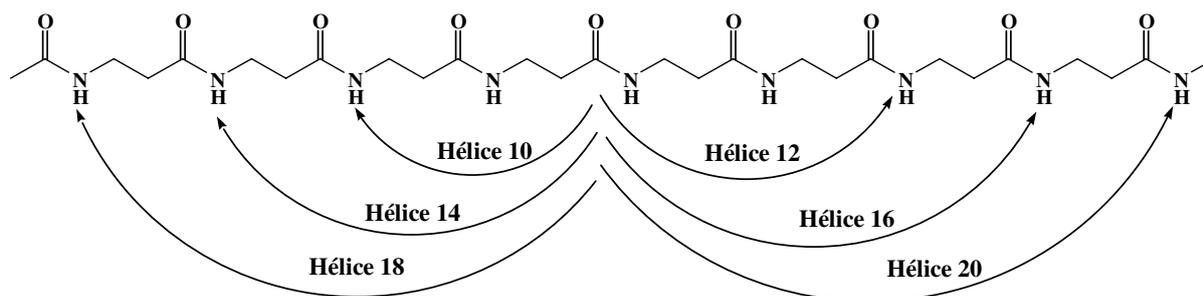


Figure 35 : Liaisons hydrogène potentielles dans un  $\beta$ -peptide

#### IV.4.2. Les hydrazinopeptides

Oehme et ses collaborateurs ont étudié des hydrazinopeptides dérivés de l'élédoisine. Ils ont montré que des hydrazino-acides [ $\text{H}_2\text{N}_\beta\text{-N}_\alpha\text{H-CH(R)-COOH}$ ] pouvaient ainsi être incorporés dans un peptide<sup>111,112</sup>.

Les hydrazinopeptides sont les analogues azotés des  $\beta$  peptides. Des études structurales par diffraction des rayons X ont montré que le lien hydrazinopeptidique pouvait apporter de fortes modifications conformationnelles par rapport au lien peptidique<sup>88</sup>. Ainsi, le résidu acide  $\alpha$  hydraziné sous sa forme diamide (position  $i+1$ ) peut adopter une conformation qui est caractérisée par une interaction bifide intramoléculaire, dans laquelle le site donneur de proton  $\text{NH}$  ( $i+2$ ) interagit à la fois avec le groupement carbonyle ( $i$ ) pour former un cycle à huit atomes, et avec la paire électronique de l'azote  $\text{N}_\alpha$  (hybridation  $\text{sp}^3$ ) fermant ainsi un cycle à cinq atomes (Figure 36). Du point de vue topologique, le repliement hydrazino est analogue au repliement  $\gamma$  des peptides puisqu'il est caractérisé par une liaison hydrogène de même type ( $i+2 \rightarrow i$ ). Cependant, la présence de deux atomes d'azote dans un résidu acide  $\alpha$  hydraziné accroît d'un atome la taille du cycle de chélation. Par comparaison des structures

modélisées, on s'aperçoit en fait que le repliement hydrazino incluant un résidu acide  $\alpha$  hydraziné de configuration L est assez proche du repliement  $\gamma$  équatorial observé dans le cas d'un acide  $\alpha$  aminé de configuration D. Par ailleurs, il semble que le repliement hydrazino soit plus stable que le repliement  $\gamma$  tant à l'état solide qu'en solution<sup>113</sup>.

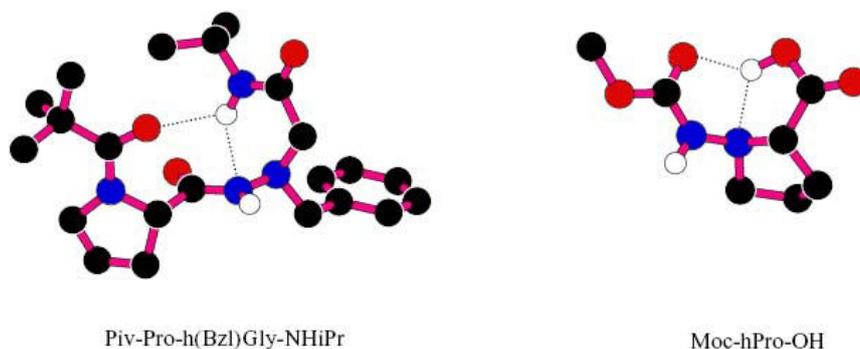


Figure 36 : Liaisons hydrogène bifides observées dans un repliement hydrazino

#### IV.4.3. Les peptides mixtes : $\alpha$ / $\beta$ -peptides

L'équipe de Samuel Gellman a étudié des pseudopeptides mixtes  $\alpha$ / $\beta$ <sup>96,114-116</sup>. Ils ont montré que ces composés mixtes s'autostructuraient et adoptaient des formes identiques aux  $\beta$ -peptides telles que les hélices 11,14/15 et 18 (Figure 28).

#### IV.4.4. Les *N*-aminopeptides

Les *N*-aminopeptides sont des analogues des  $\alpha$  peptides pour lesquels l'hydrogène du lien peptidique est substitué par une fonction amine primaire. Ces composés ont été peu étudiés au niveau structural. Michel Marraud et ses collaborateurs ont été les premiers à effectuer des études structurales en solution par infrarouge et RMN sur un *N*-aminodipeptide de formule Piv-Pro $\Psi$ [CON(NH<sub>2</sub>)]Gly-NHiPr<sup>5</sup>. Ils ont montré l'existence d'une liaison hydrogène refermant un pseudocycle à dix atomes entre l'atome d'hydrogène du groupement NHiPr et l'oxygène du groupement Piv (Figure 37).

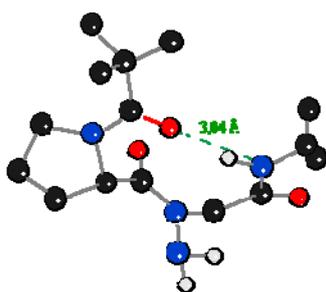


Figure 37 : Structure cristalline de Piv-ProΨ[CON(NH<sub>2</sub>)]Gly-NHiPr

Une étude théorique complète menée sur les *N*-aminopeptides contenant un résidu glycine ou proline confirme le fait que la présence du motif *N*-amino engendre de fortes modifications au niveau de l'isomérisation de la liaison peptidique ainsi que des changements conformationnels dans les dipeptides considérés<sup>117</sup>.

Plus récemment, dans le cadre de la thèse de Sébastien Dautrey au laboratoire, des oligomères mixtes lien amide/lién *N*-amino ont été étudiés. Ces composés ont la particularité d'être protégés sur le groupement NH<sub>2</sub> du lien *N*-amino par un groupement phtalimide<sup>13</sup>. Les études conformationnelles réalisées sur ces oligomères mixtes ont montré que ces composés possèdent la capacité à s'auto-structurer en solution à travers un réseau de liaisons hydrogène intramoléculaires en C<sub>8</sub> faisant intervenir les fonctions carbonyles des groupements phtalimides et les atomes d'hydrogène des groupements NH des liens amides (Figure 38).

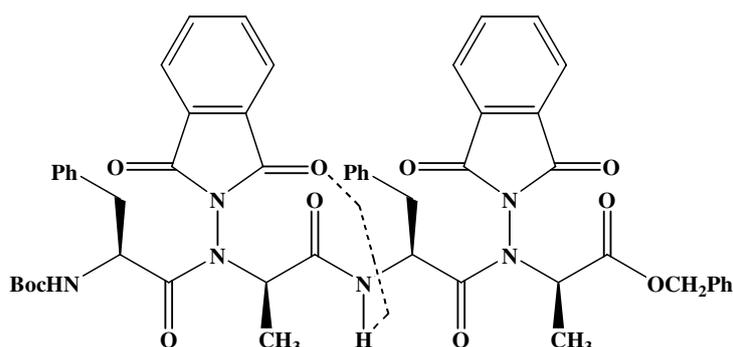


Figure 38 : Exemple de formation d'une liaison hydrogène en C<sub>8</sub> sur un tétramère mixte amide /*N*-amino

#### IV.4.5. Structures d'azapeptides

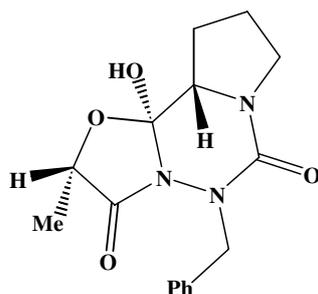
Le Laboratoire de Cristallographie et Modélisation des Matériaux Minéraux et Biologiques LCM3B de l'Université Henri Poincaré Nancy I a beaucoup étudié les azapeptides sur le plan structural. André Aubry et son équipe ont résolu les structures cristallines de peptides contenant l'analogue de la proline (azaPro) ou de l'alanine (azaAla)<sup>5,118</sup>. Les structures cristallines d'un analogue de l'ergopeptine<sup>21</sup> et d'un inhibiteur de la rénine<sup>119</sup> ont également été résolues. Ces travaux ont permis de mesurer les caractéristiques géométriques de ces acides azaaminés. Les propriétés électroniques de l'enchaînement CO-N-N $\alpha$ -CO-N sont à coup sûr différentes de celles de l'enchaînement CO-N-C $\alpha$ -CO-N. Ainsi, on relève une variation des longueurs de liaisons : allongement des liens amides CO-N et raccourcissement attendu des liaisons N-N $\alpha$  et N $\alpha$ -CO par rapport à N-C $\alpha$  et C $\alpha$ -CO respectivement.

Les paramètres cristallins renseignent également sur l'état d'hybridation de l'atome d'azote de substitution N $\alpha$ . Le caractère pyramidal de cet atome d'azote peut être mesuré par l'écart au plan défini par les trois atomes auxquels il est lié, valeur à comparer à 0,48 Å pour un atome d'azote sp<sup>3</sup> (Tableau 11).

Aza-résidu	Ecart au plan (Å)	Référence
azaPro	0,18 à 0,41	5,27
N(Me)azaAla	0,12 à 0,18	27
azaAla	0,04	118
azaPhe (inclus dans un cycle)	0,19	21
azaPhe, azaGly, azaIle	0,02	20

**Tableau 11 : Ecart au plan de l'azote de substitution N $\alpha$  mesuré grâce aux paramètres cristallins d'azapeptides**

Au vu de ces valeurs, il apparaît que le cycle perhydro-1,2,5-triazine incorporant le résidu aza-phénylalanyle<sup>21</sup>, et le cycle pyrazolidine constitutif de l'aza-proline accentuent le caractère pyramidal de l'atome N $\alpha$  (Figure 39). Ce phénomène provient probablement des fortes contraintes induites dans l'hétérocycle qu'entraînerait la planéité des atomes d'azote.



**Figure 39 : Structure cristalline de l'analogue de l'ergopeptine**

D'autre part, il est impossible de prévoir la chiralité acquise par les résidus prochiraux. Ainsi, par exemple, la chiralité des deux atomes d'azotes du motif azaPro est variable selon la séquence, bien que l'angle  $\Phi$  conserve une valeur proche de  $\pm 110^\circ$  dans l'azaproline. Il en résulte ainsi une conformation rigide du motif azaPro qui se reproduit dans tous les cas examinés, quelle que soit la longueur de la chaîne<sup>5,27</sup>.

Les perturbations conformationnelles engendrées lors de l'introduction d'un résidu aza au sein d'une chaîne peptidique sont actuellement imprévisibles. Les études par diffraction des rayons X, réalisées sur des modèles peptidiques contenant l'azaproline, ont montré que celle-ci possède des propriétés structurantes inverses de celles de la proline. Ainsi, contrairement à la proline, elle déstabilise le repliement  $\beta$  dans des séquences azaPro-Xaa, mais favorise le repliement  $\beta_{VI}$  dans les séquences Xaa-azaPro.

Enfin, il est à noter que l'enchaînement Pro-azaAla a permis de mettre en évidence, pour la première fois, un repliement  $\beta$  au sein de la structure cristalline d'un modèle azapeptidique<sup>118</sup>.

Comme nous l'avons émis dans le chapitre I de ce manuscrit de thèse, l'équipe de Kang-Bong Lee a aussi travaillé sur les études structurales de composés comportant un résidu acide azaaminé. En 2000, ils ont exposé leurs résultats concernant le rôle d'un résidu acide azaaminé dans la formation d'un repliement  $\beta$  et sa stabilité au sein d'un peptide<sup>34</sup>. Pour se faire, ils ont utilisé différentes méthodes tels le calcul *ab initio*, les spectroscopies RMN et IR et la modélisation moléculaire pour analyser le tripeptide Boc-Phe-azaLeu-Ala-OMe.

D'après les calculs de chimie quantique, les angles diédraux du tripeptide seraient propices à la formation d'un coude  $\beta$  (angle  $\Phi$  pour la liaison N-N $_{\alpha}$  =  $90^\circ \pm 30^\circ$  ; angle  $\Psi$  pour la liaison N $_{\alpha}$ -C(O) =  $0^\circ \pm 30^\circ$  ou  $180^\circ \pm 30^\circ$ ).

Les spectres RMN TOCSY et ROESY montrent que la rotation de liaison N-N $_{\alpha}$  dans le résidu azaLeu est considérablement ralentie.

Les effets de température en RMN du proton indiquent que le proton NH du résidu Ala est impliqué dans une liaison hydrogène intramoléculaire.

En IR, on observe une bande entre 3400 et 3200  $\text{cm}^{-1}$  qui correspond à une vibration d'élongation de liaison N-H lorsque le proton est impliqué dans une liaison hydrogène.

La présence de certaines corrélations NOE indique que la fonction carbonyle engagée dans la liaison hydrogène intramoléculaire est celle du groupement Boc pour former un pseudocycle à dix chaînons.

En 2007, Kang-Bong Lee et ses coéquipiers ont publié leurs travaux sur la structuration en repliement  $\beta$  de tripeptides contenant un résidu azaPhénylalanine (Figure 40)<sup>120</sup>. Un point important ressort de ces travaux : la structuration du tripeptide est indépendante de l'acide aminé qui précède le résidu aza dans la chaîne. La nature du résidu acide aminé en position i-1 n'influence pas la formation du repliement.

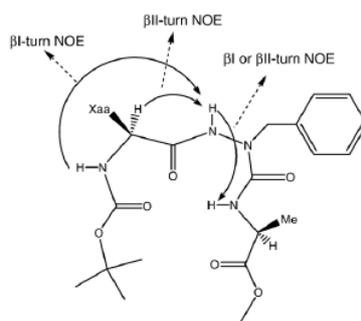


Figure 40 : Corrélations NOEs observées dans Boc-Xaa-azaPhe-Ala-OMe

De la même façon, ils ont étudié le térapeptide Boc-Ala-Phe-azaLeu-Ala-OMe contenant une azaLeucine<sup>121</sup>. Les conclusions sont similaires :

- le proton NH du résidu alanine 4 est lié par liaison hydrogène intramoléculaire en  $C_{10}$
- il se forme alors un repliement  $\beta$

#### IV.5. Méthodes et techniques d'études conformationnelles

Nous allons, dans cette partie, décrire succinctement les outils physico-chimiques permettant la mise en évidence des interactions responsables de la structuration d'un oligomère.

### IV.5.1. Le dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire est une technique spectroscopique qui repose sur la capacité qu'ont les structures optiquement actives d'absorber de façon inégale la lumière polarisée circulairement à droite et la lumière polarisée circulairement à gauche. Cette propriété se rencontre plutôt dans les liquides et les solutions du fait de la structure des molécules. L'absence d'organisation structurale dans la molécule étudiée engendre un spectre de dichroïsme circulaire dont l'intensité est nulle, alors qu'une structuration compacte résulte en un spectre qui peut contenir à la fois des signaux positifs et négatifs.

C'est une méthode très utilisée pour l'analyse conformationnelle des peptides et des protéines. Les éléments de structure secondaire jouent un rôle sur leur signal dichroïque, en particulier les structures en hélice. Ainsi, les structures en hélice  $\alpha$  et feuillet  $\beta$  des protéines ou en double hélice des acides nucléiques présentent des signaux dichroïques caractéristiques.

La répartition spectrale du dichroïsme circulaire donne, dans les domaines des ultraviolets, des informations importantes sur la structure secondaire des protéines. Par exemple, elle indique la proportion relative des fragments de la protéine en hélice  $\alpha$ , feuillet  $\beta$ , coudes ou en structure aléatoire. Il est aussi possible d'observer la dénaturation d'une protéine par l'augmentation du signal correspondant à la structure aléatoire et la diminution des signaux correspondants aux hélices  $\alpha$  et feuillets  $\beta$ . On peut également suivre le repliement de la protéine et déterminer quelle structure secondaire se forme en premier.

Ces informations permettent de réduire énormément les possibilités de structures de la protéine étudiée mais elles ne donnent pas les emplacements des structures secondaires détectées. Cependant, le dichroïsme circulaire est un outil très efficace pour observer les modifications de conformations, par exemple en fonction de la température ou en fonction de la présence d'autres molécules.

Le dichroïsme circulaire donne moins d'informations sur la structure des protéines que la diffraction des rayons X ou que la RMN mais il permet de faire des mesures rapides, sans nécessiter une grande quantité de produits et sans analyses longues des données. De même, il permet d'étudier rapidement les protéines et les peptides en faisant varier les conditions de solvants, la température, le pH, la salinité, etc...

Cette technique possède néanmoins quelques limitations expérimentales. Les spectres de dichroïsme circulaire utilisés dans la détection de la structure secondaire sont liés à l'absorption entre les orbitales  $\pi$  et  $\pi^*$  des liaisons peptidiques. Ces bandes d'absorption résident en partie dans la zone difficile d'accès des ultraviolets. Cette partie est inaccessible à

l'air à cause de la forte absorption de l'oxygène dans cette gamme de longueurs d'ondes. Dans la pratique, on réalise les mesures à l'aide d'instruments remplis d'azote. Récemment, cette méthode a été transposée à l'analyse d'oligomères pseudopeptidiques tels que les  $\beta$  peptides<sup>109,110,76</sup>, les peptoïdes<sup>76</sup> ou encore les oligourées<sup>122</sup>. Néanmoins, on ne peut pas corréler l'allure du signal dichroïque des protéines à celle des pseudopeptides. Chaque type de composés possède sa propre empreinte dichroïque.

#### **IV.5.2. La spectroscopie d'absorption infrarouge**

Les mouvements de vibration électronique d'une molécule, qui s'accompagnent d'une modification, soit en amplitude, soit en direction, de son moment dipolaire électrique, sont à l'origine d'absorption de type vibrationnel dans le domaine des ondes infrarouges.

Les spectres d'absorption infrarouge des molécules peptidiques contiennent, entre autres, les informations relatives aux mouvements d'élongation et de déformation du lien amide présent par ses deux vibreurs N-H et C=O. Parmi les nombreuses bandes de vibration du lien amide on n'en retient le plus souvent et n'en exploite que deux en tant que sondes conformationnelles dans les domaines :

- 3500-3200  $\text{cm}^{-1}$  : élongation de la liaison N-H, bande amide A notée  $\nu(\text{N-H})$
- 1800-1600  $\text{cm}^{-1}$  : élongation de la liaison C=O, bande amide I notée  $\nu(\text{CO})$

Ces deux vibreurs sont particulièrement utiles dans la mise en évidence de liaisons hydrogène de type  $\text{N-H}\cdots\text{O}=\text{C}$ , qui entraînent une diminution de la fréquence d'élongation des deux vibreurs concernés. Ainsi, un échange, même rapide, entre deux conformations se traduit par l'éclatement des bandes  $\nu(\text{N-H})$  et  $\nu(\text{CO})$ . Les variations relatives des fréquences d'absorption reflètent la force des interactions mises en jeu.

Le champ d'application de cette méthode spectroscopique est cependant limité par :

- la transparence des solvants dans les zones de fréquences explorées
- la solubilité des produits dans les solvants transparents
- l'auto-association éventuelle dans des mêmes milieux

De plus, la faible variation des nombres d'ondes observés pour un vibreur donné (C=O par exemple) mais substitué différemment, liée au fait que la largeur de bande à mi-hauteur n'est pas négligeable, font que l'interprétation univoque des spectres est de plus en plus difficile au fur et à mesure que le nombre de vibreurs d'une même famille au sein de la molécule croît.

Même si de nos jours, les programmes informatiques et les algorithmes mathématiques de déconvolution de courbe ou de décomposition en plusieurs composantes ont fait d'énormes progrès, il faut se garder des artéfacts inhérents au support mathématique du logiciel de travail. De ce fait, la superposition des bandes d'absorption de différents vibrateurs rend parfois difficile l'interprétation des spectres, surtout en cas d'équilibre conformationnel.

Il faut enfin retenir que les liaisons hydrogène ne sont pas les seuls phénomènes capables de modifier la fréquence d'élongation d'un vibrateur. Des effets de couplage entre fonctions voisines peuvent également provoquer un éclatement des bandes d'absorption.

### **IV.5.3. La diffraction des rayons X**

La diffraction des rayons X est la méthode expérimentale, avec la RMN, qui fournit le plus d'informations quant à l'existence d'une conformation privilégiée au sein d'un enchaînement peptidique à l'état solide. Elle donne accès à trois types d'informations :

- paramètres géométriques (longueurs et angles de liaisons)
- modes d'interactions intramoléculaires et intermoléculaires (liaisons hydrogène)
- conformations moléculaires

Néanmoins, l'usage de la radiocristallographie reste très dépendant de l'aptitude des produits synthétisés à former des cristaux et de la qualité des monocristaux obtenus. Ainsi, tout recours systématique à la diffraction d'un cristal pour réaliser une étude conformationnelle précise d'un peptide pour lequel on ne peut pas obtenir l'état cristallin est de ce fait exclu.

Par ailleurs, la conformation d'une molécule dans la maille cristalline dépend totalement des forces d'empilement et de cohésion du cristal qui peuvent s'exercer au détriment des interactions intramoléculaires existantes dans la même molécule isolée dans le vide, ou en solution très diluée dans un solvant inerte. En conséquence, le comportement d'une espèce peptidique à l'état solide n'est pas forcément celui que l'on observera en solution très diluée sur des molécules « isolées ».

#### IV.5.4. La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire est incontestablement la méthode physicochimique de choix qui a permis au cours des dernières décennies d'étendre, de manière décisive, nos connaissances sur les propriétés des molécules en solution.

Grâce à la variété de ses techniques expérimentales, elle apporte des informations primordiales pour la détermination des structures : déplacements chimiques, constantes de couplage, effets Overhauser nucléaire, temps de relaxation. Ainsi, ces informations permettent l'étude des propriétés conformationnelles des peptides, par le biais notamment de la mise en évidence de liaisons hydrogène et de la détermination des angles de torsions.

Par ailleurs, la spectroscopie RMN ne permet pas de détecter les différentes conformations qui participent aux équilibres conformationnels rapides. On observe alors un signal moyen, pondéré selon les populations des divers conformères.

L'attribution univoque des signaux et éventuellement le séquençage ultérieur des peptides ou des pseudopeptides sont établis grâce aux techniques particulières de la RMN à deux dimensions. La séquence COSY (CORrelated SpectroscopY) permet de corréler les signaux provenant de noyaux couplés scalairement et éloignés de deux ou trois liaisons ( $^2J$ ,  $^3J$ ). Elle est utilisée pour identifier ou repérer les systèmes de spins intrarésidus, sans toutefois pouvoir effectuer une attribution univoque lorsque plusieurs résidus identiques sont présents dans l'enchaînement peptidique<sup>123,124</sup>. On associe cette expérience COSY à l'expérience TOCSY (TOTally CORrelated SpectroscopY), qui permet l'attribution de tous les spins au sein d'un même résidu.

Pour l'attribution séquentielle d'un peptide comportant une dizaine de résidus (ou plus), on a recours généralement à deux expériences, les séquences ROESY (Rotating frame Overhauser Effect SpectroscopY) et NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY). L'effet Overhauser repose sur les couplages dipolaires entre noyaux à travers l'espace. Ces couplages dipolaires ne sont observables que pour des distances interprotoniques inférieures à 5 Å. Cette technique renseigne sur les distances interatomiques de groupements non directement liés de façon covalente. De cette façon, la recherche des corrélations  $C_{\alpha}H_i/NH_{i+1}$  dans une carte NOESY permet le séquençage univoque de l'enchaînement peptidique étudié et par conséquent l'attribution de tous les signaux présents sur le spectre.

Lors de l'étude de pseudopeptides par RMN, on s'intéresse principalement aux déplacements chimiques des groupements amines et/ou amides de la molécule, qui peuvent établir des liaisons hydrogène intramoléculaires ou intermoléculaires. La recherche de liaisons hydrogène par spectroscopie RMN peut se faire à travers plusieurs méthodes :

- Influence de la température : Cette méthode consiste en l'interprétation des effets de la température selon les propositions suivantes : dans un solvant accepteur de proton, une élévation de la température provoque la rupture des liaisons hydrogène intermoléculaires sous l'effet de l'agitation thermique. Inversement, le déplacement chimique d'un proton NH intramoléculairement lié restera quasiment indépendant de la température, tant que celle-ci ne sera pas suffisante pour briser ce type d'interaction<sup>125</sup>.
- Influence du solvant: Cette méthode, très employée au laboratoire, consiste à étudier l'évolution des déplacements chimiques des protons NH en fonction de la composition du mélange solvant peu polaire ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )/ solvant très polaire (DMSO) dans lesquels le composé étudié est gardé à concentration constante. Lorsqu'on augmente la proportion de DMSO, les signaux des protons NH accessibles au solvant se déplacent rapidement et notablement vers les champs faibles. En revanche, les protons liés par liaison hydrogène intramoléculaire seront peu affectés par le changement de la composition du milieu<sup>28</sup>. La variation relative du déplacement chimique est d'autant plus faible que l'interaction intramoléculaire est forte.
- Influence de la concentration : La probabilité de l'établissement de liaisons hydrogène intermoléculaire augmente lorsque l'on se trouve en milieu concentré. Un proton NH impliqué dans une liaison hydrogène intermoléculaire sera très sensible aux variations de concentration. Cela se traduit sur le spectre par une augmentation de son déplacement chimique vers les champs faibles. Un proton NH impliqué dans une liaison hydrogène intramoléculaire sera peu sensible aux variations de concentrations, ce qui se traduit par un déplacement chimique constant.

#### IV.5.5. La modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire est aujourd'hui un outil indispensable pour accompagner la recherche et la synthèse de nouveaux composés chimiques. Elle a pour but de simuler la structure et la réactivité des molécules. En effet, elle permet d'une part, de représenter les propriétés et les réactions chimiques d'un système et d'autre part, de manipuler les structures tridimensionnelles des molécules. Les méthodes de la modélisation moléculaire peuvent être rangées en trois catégories :

- les méthodes quantiques
- la mécanique moléculaire
- la dynamique moléculaire

Les méthodes quantiques sont basées sur le calcul des orbitales moléculaires. Leur complexité augmente rapidement avec le nombre d'atomes. Ces méthodes comprennent les méthodes « *ab initio* », basées sur la résolution d'équations de la mécanique quantique, et les méthodes semi-empiriques. Seule l'étude de petites molécules est possible car ces méthodes sont limitées par la capacité de calcul dont nous disposons actuellement.

La mécanique moléculaire calcule l'énergie des atomes (et non plus des électrons) au moyen d'approximations. La simplification considérable des calculs qui en résulte permet de travailler sur des molécules de grande taille, telles que les macromolécules biologiques (protéines, acides nucléiques) ou sur des systèmes comportant un grand nombre de molécules.

La dynamique moléculaire a pour but l'exploration de l'espace conformationnel des molécules, le plus souvent à partir des énergies de la mécanique moléculaire, en appliquant des lois de la mécanique classique. Elle permet de simuler l'évolution des systèmes dans le temps. Ces deux méthodes peuvent s'appuyer sur des données expérimentales de spectroscopie vibrationnelle, de données de diffraction des rayons X ou sur des valeurs obtenues par les méthodes « *ab initio* ».

#### IV.5.6. Conclusion

L'établissement de la structure secondaire d'une molécule ne peut être en aucun cas le résultat d'une seule de ces techniques. Le point fondamental à retenir est que toutes ces

techniques d'études structurales de molécules organiques sont complémentaires. Seule la cohérence des données obtenues par l'utilisation de plusieurs outils peut permettre de définir une structuration.

#### IV.6. Contributions spectroscopiques de la substitution $N_{\alpha}/CH_{\alpha}$

Avant d'aborder l'étude approfondie des modèles azapeptidiques étudiés durant nos travaux, il est utile, dans un premier temps, de déterminer les contributions intrinsèques des différents groupements présents au sein d'un azapeptide. Frédéric André, durant sa thèse au laboratoire, a décrit les caractéristiques spectroscopiques (infrarouge et RMN) mises en évidence lors de l'étude en solution des pseudopeptides, Z-azaAla-NHiPr et Boc-azaAla-N(Me)<sub>2</sub> ainsi que celles des peptides non modifiés correspondants, Z-Ala-NHiPr et Boc-Ala-N(Me)<sub>2</sub> (Figure 41 et Tableau 12)<sup>27</sup>.

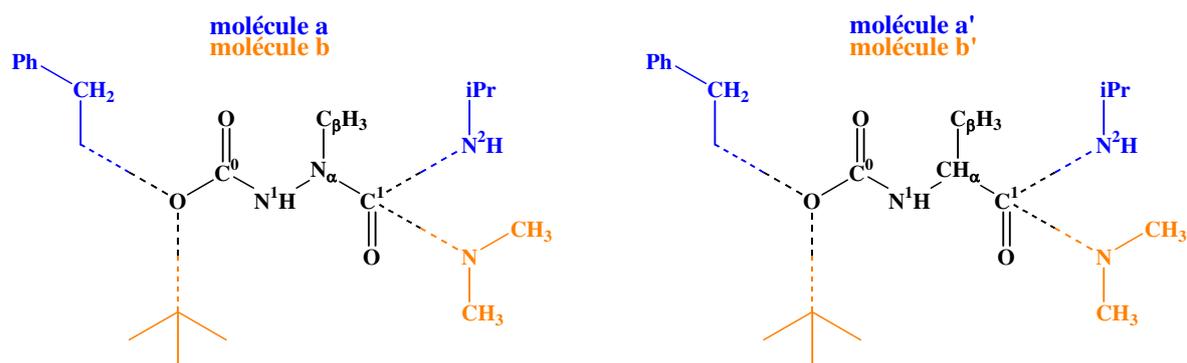


Figure 41 : **a**) Z-azaAla-NHiPr, **b**) Boc-azaAla-N(Me)<sub>2</sub>, **a'**) Z-Ala-NHiPr, **b'**) Boc-Ala-N(Me)<sub>2</sub>

	Amide I (cm <sup>-1</sup> )		Amide A (cm <sup>-1</sup> )		$\delta$ (NH) (ppm)		
	$\nu(C^0=O)$	$\nu(C^1=O)$	$\nu(N^1-H)$	$\nu(N^2-H)$	$\delta(N^1-H)$	$\delta(N^2-H)$	$\delta(C_{\beta}H_3)$
<b>a</b>	1755 et 1737	1672	3437 et 3367	3444 et 3992	6,33	5,05	3,10
<b>b</b>	1739 et 1719	1662	3422 et 3369	-	6,39	-	3,01
<b>a'</b>	1715	1675	3427	3427	5,15	5,95	1,35
<b>b'</b>	1710	1648	3428	-	5,49	-	1,31

Tableau 12 : Caractéristiques spectroscopiques intrinsèques des molécules a, a', b et b'

On constate qu'en solution diluée ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $c = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) chacun des vibrateurs  $\text{N}^1\text{-H}$  et  $\text{C}^0=\text{O}$  du lien acide azaaminé donne naissance à deux composantes infrarouges. Ce dédoublement provient de la nature chimique des acides azaaminés et non pas de la participation de ces sites à une interaction intramoléculaire. Une telle absorption infrarouge dédoublée a déjà été observée pour les hydrazinopeptides contenant le segment hydrazide  $\text{CO-N}_\beta\text{H-N}_\alpha\text{-C}_\alpha$ , et semble dépendre de l'état rotationnel syn ou anti du proton  $\text{N}_\beta\text{H}$  par rapport au doublet libre de  $\text{N}_\alpha$  au tour de la liaison  $\text{N}_\beta\text{-N}_\alpha$ <sup>126</sup>. La résolution de la structure cristalline de plusieurs hydrazinopeptides et l'étude spectroscopique en solution de ces composés ont montré que les composantes basses fréquences du vibrateur  $\text{N}_\beta\text{H}$  et haute fréquence du carbonyle le précédant traduisent la disposition anti de la liaison  $\text{N}_\beta\text{-N}_\alpha$  (Figure 42). Cette interprétation est peut être applicable aux azapeptides dans la mesure où la résolution de la structure cristalline de ces composés a montré que l'atome d'azote  $\text{N}_\alpha$  possède un caractère pyramidal plus ou moins marqué. De plus, les paramètres cristallins ont révélé que la liaison  $\text{N}_\alpha\text{-CO}$  de ces dérivés a une longueur intermédiaire entre la liaison amide secondaire standard et la liaison  $\text{N-C}$ . Dans cette hypothèse, il semblerait alors qu'une légère pyramidalisation de l'azote  $\alpha$  soit suffisante pour observer un dédoublement d'absorption infrarouge. Par ailleurs, il est à noter que dans le cas des azapeptides, les deux contributions infrarouges du vibrateur  $\text{N}_\beta\text{-H}$  présentent un écart d'environ  $50 \text{ cm}^{-1}$  contre  $100 \text{ cm}^{-1}$  dans le cas des hydrazinopeptides. On peut expliquer cette perturbation par le caractère partiellement  $\text{sp}^3$  de l'azote  $\text{N}_\alpha$  dans les azapeptides alors qu'il est totalement  $\text{sp}^3$  dans les hydrazinopeptides<sup>126</sup>.

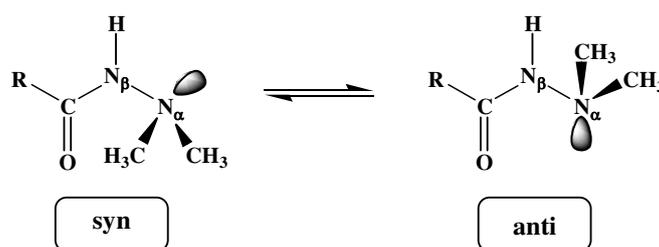


Figure 42 : Equilibre conformationnel de la liaison  $\text{N}_\beta\text{-N}_\alpha$

Cette étude révèle par ailleurs que les deux fréquences propres du vibrateur  $\text{C}^0=\text{O}$  dans le cas du résidu azaAla ont subi un glissement du côté des grands nombres d'ondes par comparaison à la fréquence du vibrateur  $\text{C}^0=\text{O}$  du résidu Alanine. Cet écart peut être expliqué par un effet inductif électroattracteur inhérent à la fonction hydrazide du côté  $\text{C-terminal}$ .

Par ailleurs, le caractère acide du proton  $N^1$ -H est mis en évidence par la forte valeur de son déplacement chimique lorsqu'on passe d'un résidu Alanine à un résidu azaAlanine. Ainsi, l'effet électroattracteur provoqué par la substitution  $N_\alpha/CH_\alpha$  est responsable du glissement vers les champs faibles du signal caractéristique du proton  $N^1$ -H.

En revanche, les vibreurs  $C^1=O$  et  $N^2$ -H de la fonction urée C-terminale ne semblent pas être très affectés par la substitution  $N_\alpha/CH_\alpha$ . On peut penser que l'effet électroattracteur de la partie N-terminale de la molécule est ici compensé par un effet mésomère donneur de  $N_\alpha$  qui serait d'autant plus important que son doublet électronique serait disponible. De plus, ce même effet donneur est mis en évidence par le glissement vers les champs forts du signal caractéristique du proton  $N^2$ -H lorsqu'on passe du résidu Alanine au résidu azaAlanine.

Enfin, le groupement en position  $\beta$  directement lié à  $N_\alpha$  est affecté par la distribution électronique de l'enchaînement principal. L'électronégativité de l'atome d'azote  $\alpha$  est responsable du glissement vers les champs faibles du signal caractéristique des protons  $C_\beta H_3$ .

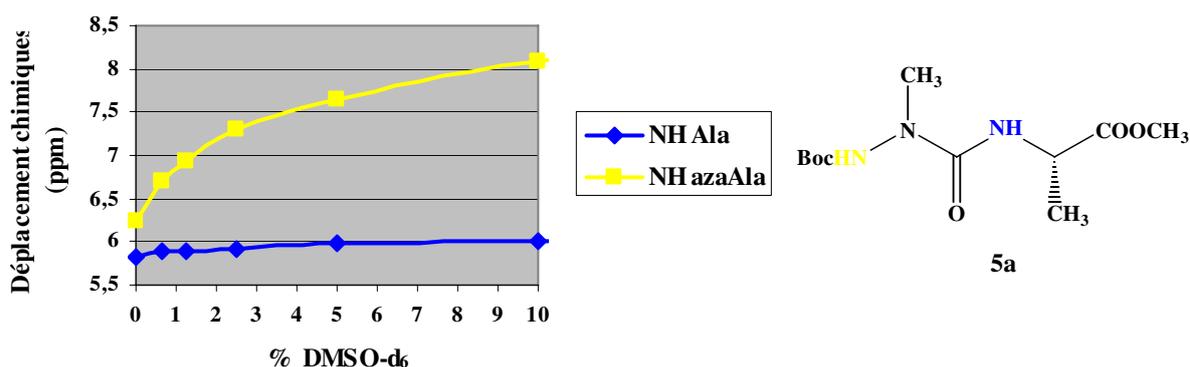
#### **IV.7. Etudes structurales des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères**

Dans la lignée des pseudopeptides, une modification, assez peu exploitée et qui affecte le point d'ancrage de la chaîne latérale, consiste à remplacer le  $CH_\alpha$  de l'acide  $\alpha$  aminé originel par un atome d'azote. Un avantage primordial lié à l'introduction d'un acide azaaminé dans un peptide bioactif réside dans la conservation de l'intégrité chimique de la chaîne latérale qui joue souvent un rôle capital dans les phénomènes de reconnaissance moléculaire. Deux conséquences inhérentes de cette substitution sont la perte du centre chiral  $CH_\alpha$  et la probable modification des caractéristiques électroniques des deux fonctions amides adjacentes. Par ailleurs, ces derniers composés n'ont pas ou peu fait l'objet d'études sur les plans physicochimique et conformationnel dans le but de déterminer s'ils peuvent former des foldamères.

### IV.7.1. Etudes préliminaires concernant les précurseurs Boc-azaAA-Ala-OMe

Nous cherchons ici à déterminer si l'introduction d'un résidu acide azaaminé dans nos précurseurs azadipeptidiques Boc-azaAA-AA-OMe induit une structuration locale.

L'influence du solvant a été étudiée sur le précurseur Boc-azaAla-Ala-OMe **5a** (Figure 43). Nous avons réalisé l'étude dans des mélanges  $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$  où nous avons relevé notamment les déplacements chimiques des protons amides en fonction de la concentration en DMSO. Une faible variation indique que le proton observé est impliqué dans une liaison hydrogène intramoléculaire. Nous avons choisi d'effectuer ce travail pour une concentration de  $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ , suffisamment diluée pour empêcher l'établissement de liaisons hydrogène intermoléculaires. Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance 300 MHz.

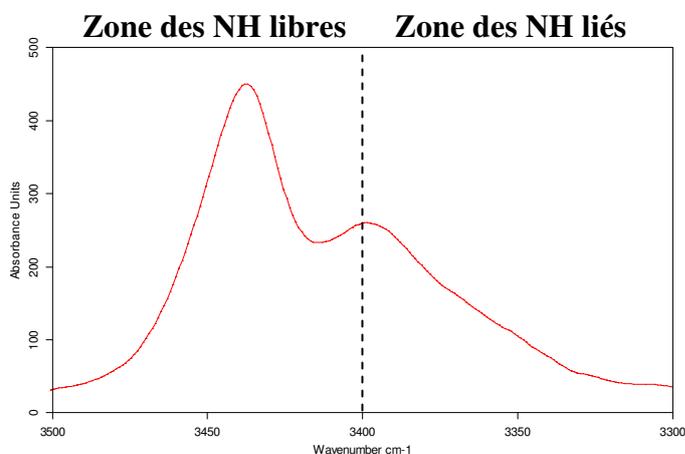


**Figure 43 : Influence du DMSO-d<sub>6</sub> sur les déplacements chimiques des protons NH de **5a****

Nous remarquons que le déplacement chimique du proton NH du résidu azaAlanine (en jaune) varie significativement vers les champs faibles, il n'est donc pas lié par liaisons hydrogène intramoléculaires. Par contre, le proton amidique du résidu Alanine (en bleu) n'est pas très sensible à l'ajout de DMSO dans le milieu ( $\Delta\delta = 0,2 \text{ ppm}$  de 0 à 10% de DMSO-d<sub>6</sub>), il semble donc être impliqué dans une liaison hydrogène intramoléculaire.

Le précurseur **5a** a ensuite été étudié par spectroscopie infrarouge (Figure 44). Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker TENSOR 27. La cellule utilisée a des parois en fluorure de calcium et un chemin optique de 500  $\mu\text{m}$ . De façon à être homogène dans toutes les études conformationnelles, nous nous sommes placés à une concentration de

$10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup> dans le chloroforme pour l'enregistrement des spectres infrarouge, pour la même raison que précédemment. Les spectres ont été traités à l'aide du programme OPUS de Bruker.

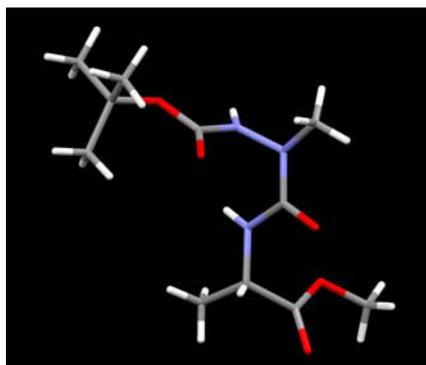


**Figure 44 : Spectre infrarouge de 5a dans la zone des élongations de liaison des groupements NH**

Il a été montré que les vibrations d'élongations des liaisons NH au delà de  $3400\text{ cm}^{-1}$  correspondent à des fonctions NH libres et que celles en deçà de  $3400\text{ cm}^{-1}$  conviennent à des fonctions NH liées par liaisons hydrogène. L'étude par infrarouge ne permet pas de conclure quant à la nature intramoléculaire ou intermoléculaire de la liaison hydrogène.

Nous distinguons, sur la Figure 44, deux bandes qui correspondent aux vibrations d'élongations de liaisons N-H. La bande se situant à  $3437\text{ cm}^{-1}$  correspond à une vibration d'élongation de liaison NH lorsque l'hydrogène est libre, il s'agit donc du groupement NH du résidu azaAla. Et la bande à  $3397\text{ cm}^{-1}$  répond à la vibration d'élongation de la liaison du groupement NH du résidu Ala. Cette dernière se trouve à la limite des deux zones. Les résultats RMN indiquent que le groupe NH du résidu Ala est lié par liaison hydrogène intramoléculaire, l'infrarouge ajoute une nuance, ce proton NH est faiblement lié.

Des monocristaux du précurseur **5a** ont été obtenus par évaporation lente d'éther diéthylique. Son analyse par diffraction des rayons X a été effectuée par l'équipe de Claude Didierjean dans le groupe de Biocristallographie au laboratoire CRM<sup>2</sup> de l'Université Henri Poincaré Nancy I. Sa structure cristalline est donnée dans la Figure 45.



**Figure 45 : Structure moléculaire dans le cristal du précurseur Boc-azaAla-Ala-OMe 5a**

Ce cliché cristallin nous permet de rassembler un ensemble de données sur la géométrie du résidu aza à l'état solide et sur les possibilités d'interactions intramoléculaires. Tout d'abord, à l'état solide la molécule **5a** ne présente pas de liaison hydrogène intramoléculaire, contrairement à ce qu'on a observé en solution par RMN et infrarouge. Néanmoins, on observe que le groupement NH du résidu Ala et la fonction carbonyle du groupement Boc sont dirigés l'un vers l'autre.

Nous avons pu calculer les longueurs de liaisons du précurseur (Tableau 13). Si nous comparons les longueurs de liaisons du résidu azaAla à celles du résidu Ala, nous remarquons rapidement que les liaisons faisant participer l'atome d'azote  $N_\alpha$  sont plus courtes dans le résidu azaAla. Par contre, comme attendu après les travaux d'André Aubry et son équipe, on observe un allongement du lien amide.

<b>Résidu azaAla</b>	$N_\alpha$ -CO	$N_\alpha$ -NH	$N_\alpha$ -C $_\beta$	CO-NH (amont)	CO-NH (aval)
Longueurs de liaisons (Å)	1,392	1,393	1,463	1,363	1,346
<b>Résidu Ala</b>	CH $_\alpha$ -CO	CH $_\alpha$ -NH	CH $_\alpha$ -C $_\beta$	CO-NH (amont)	CO-NH (aval)
Longueurs de liaisons (Å)	1,520	1,449	1,524	1,346	-

**Tableau 13 : Longueurs de liaisons en Å du précurseur 5a à partir de la structure cristalline**

D'autre part, si les groupements carbonyles assurent la même planéité des motifs amides secondaires et tertiaires que dans les peptides (la somme des trois angles de valence est égale

à 360°), l'azote  $N_\alpha$  possède un caractère pyramidal affirmé. La valeur de l'écart de l'azote  $N_\alpha$  au plan, défini par les trois atomes auxquels il est relié, est de 0,269 Å, à comparer à 0,48 Å pour un atome d'azote  $sp^3$ . Cette pyramidalisation a pour conséquence un affaiblissement de la conjugaison électronique de l'atome  $N_\alpha$  avec le carbonyle contigu, ce qui explique que la liaison  $N_\alpha$ -CO est effectivement plus longue que les autres liaisons amides dans la chaîne. Cette particularité confère à l'azote  $N_\alpha$  une géométrie intermédiaire entre celle d'un atome d'azote  $sp^2$  et celle d'un atome d'azote  $sp^3$ .

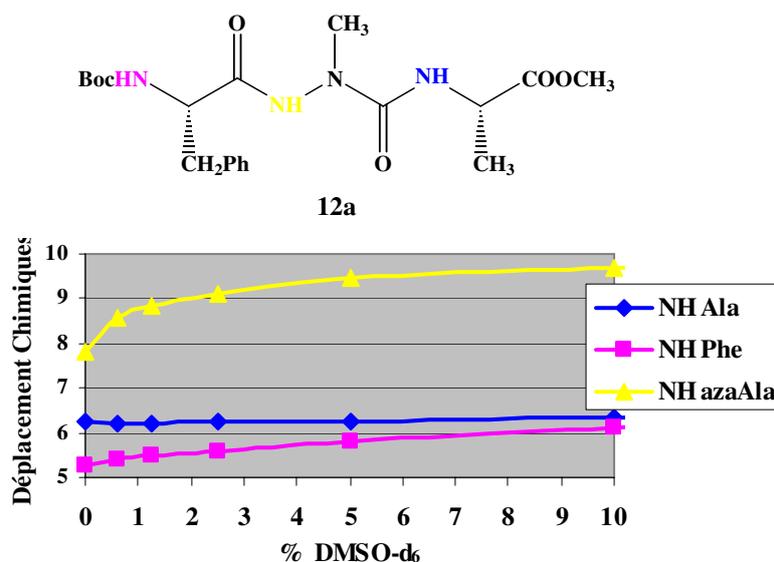
Pour conclure, le précurseur Boc-azaAla-Ala-OMe **5a** ne possède pas la même conformation en solution et à l'état solide. En solution, le groupement NH du résidu alanine est légèrement lié par liaison hydrogène intramoléculaire. A l'état cristallin, ce même proton n'est pas lié. Nous avons remarqué que le remplacement du groupe  $CH_\alpha$  par un atome d'azote entraîne des modifications non négligeables. La conséquence principale de cette transformation est l'apparition d'une chiralité induite de l'azote  $N_\alpha$ . En effet, ce dernier possède un caractère pyramidal prononcé. Nous pensons donc que l'introduction d'un résidu aza dans une chaîne peptidique peut conférer des propriétés structurantes.

#### **IV.7.2. Analyses structurales des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères**

Dans ce paragraphe, nous allons étudier les propriétés structurantes des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères **12** en solution et à l'état solide.

##### **a. Analyse structurale en solution des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères **12****

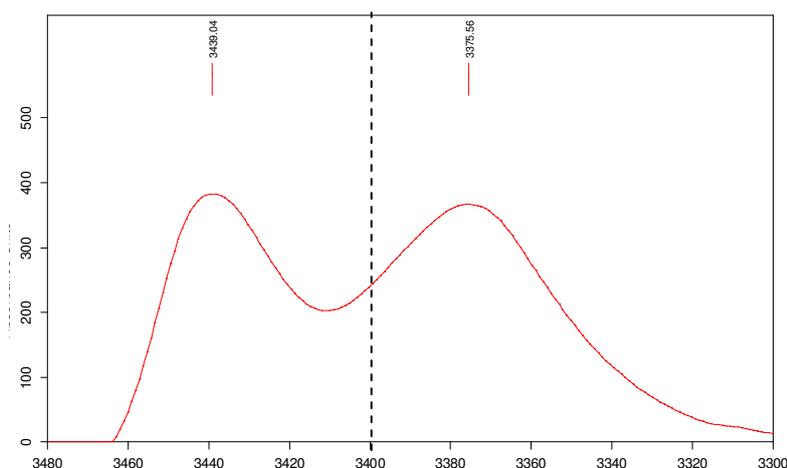
Dans les mêmes conditions que pour le précurseur Boc-azaAla-Ala-OMe **5a** ( $c = 10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup> dans des mélanges CDCl<sub>3</sub>/DMSO-d<sub>6</sub>), l'influence de l'introduction d'un solvant polaire a été étudié par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H pour le trimère Boc-Phe-azaAla-Ala-OMe **12a** (Figure 46). Nous remarquons rapidement que le proton du groupement NH du résidu Alanine (en bleu) ne subit pas l'influence du DMSO-d<sub>6</sub>. Nous en déduisons que ce proton est lié par liaison hydrogène intramoléculaire. Les deux autres protons amidiques ne sont pas liés par liaison hydrogène.



**Figure 46 : Influence du DMSO-d<sub>6</sub> sur les déplacements chimiques des protons NH de **12a****

Contrairement aux résultats décrits par Kang-Bong Lee et *al.*<sup>120</sup>, dans notre cas nous n'observons pas de corrélations ROE nous permettant de déterminer quelle type de liaison hydrogène prend place au sein de notre 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimère Boc-Phe-azaAla-Ala-OMe **12a**.

Ces résultats sont confirmés par l'étude du trimère **12a** par infrarouge. On observe dans ce cas, une bande nettement inférieure à 3400 cm<sup>-1</sup> (Figure 47). Effectivement, le signal à 3375 cm<sup>-1</sup> correspond à la vibration d'élongation de la liaison NH du résidu Alanine lorsque le proton est lié par liaison hydrogène.



**Figure 47 : Spectre infrarouge de **12a** dans la zone des élongations de liaison des groupements NH**

La zone correspondant aux vibrations d'élongations de liaisons C=O entre  $1800\text{ cm}^{-1}$  et  $1600\text{ cm}^{-1}$  du spectre infrarouge est complexe, elle ne permet pas de déduire quel groupement carbonyle est lié au groupement NH du résidu Alanine.

### b. Résultats cristallographiques

Des monocristaux de très bonne qualité du trimère Boc-Phe-azaPhe-Ala-OMe **12b** ont été obtenus par diffusion liquide eau/acétone en proportion volumique 1:1<sup>127</sup>. La structure cristalline par diffraction des rayons X a été résolue par l'équipe de Claude Didierjean dans le groupe de Biocristallographie au laboratoire CRM<sup>2</sup> de l'Université Henri Poincaré Nancy I. Ce cliché nous a permis de déterminer le type de repliement qui prend place au sein de nos 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères (Figure 48). Les distances interatomiques courtes entre sites polaires (distance  $\text{N}\cdots\text{O} = 3,048\text{ \AA}$  et distance  $\text{NH}\cdots\text{O} = 2,19\text{ \AA}$ ) autorisent une liaison hydrogène intramoléculaire entre la fonction carbonyle CO du groupement Boc et le proton du groupement NH du résidu Alanine, refermant ainsi un pseudocycle à 10 atomes de type  $i+3 \rightarrow i$  tel un coude  $\beta$ .

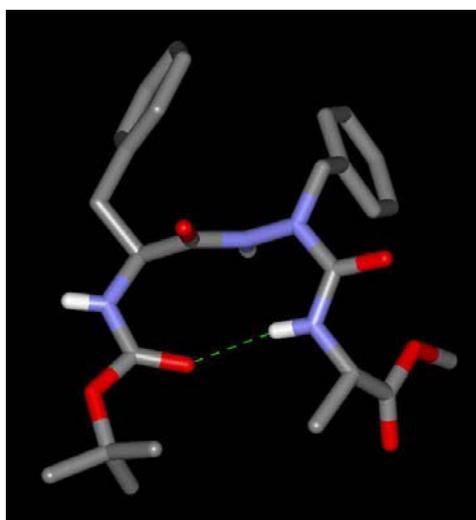


Figure 48 : Structure moléculaire dans le cristal du 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimère Boc-Phe-azaPhe-Ala-OMe **12b**<sup>127</sup>

Tous les liens amides sont plans avec une isomérisation trans. Ceci a également été mis en évidence lors de l'interprétation du spectre RMN ROESY à deux dimensions. Ce dernier contient une corrélation intense entre le proton C $\alpha$ H du résidu phénylalanine et le proton NH du résidu azaPhénylalanine. Le calcul des angles de torsions nous permet de déterminer quel type de coude  $\beta$  prend place dans le trimère (Tableau 14). Si nous nous référons au Tableau 10, nous pouvons conclure que les valeurs des angles de torsions de **12b** sont proches de celles d'un repliement  $\beta_{II}$ <sup>127</sup>.

	Résidu i+1		Résidu i+2	
	$\Phi$	$\Psi$	$\Phi$	$\Psi$
$\beta_{II}$	-60	120	80	0
<b>12b</b>	-54,85	125,36	103,61	-10,95

**Tableau 14 : Angles de torsions du 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimère Boc-Phe-azaPhe-Ala-OMe 12b**

Nous observons également que l'atome d'azote  $\alpha$  du résidu acide azaaminé conserve son caractère légèrement pyramidal avec un écart par rapport au plan, défini par les trois atomes qui lui sont liés, de 0,24(2) Å si bien qu'il adopte une chiralité de type D.

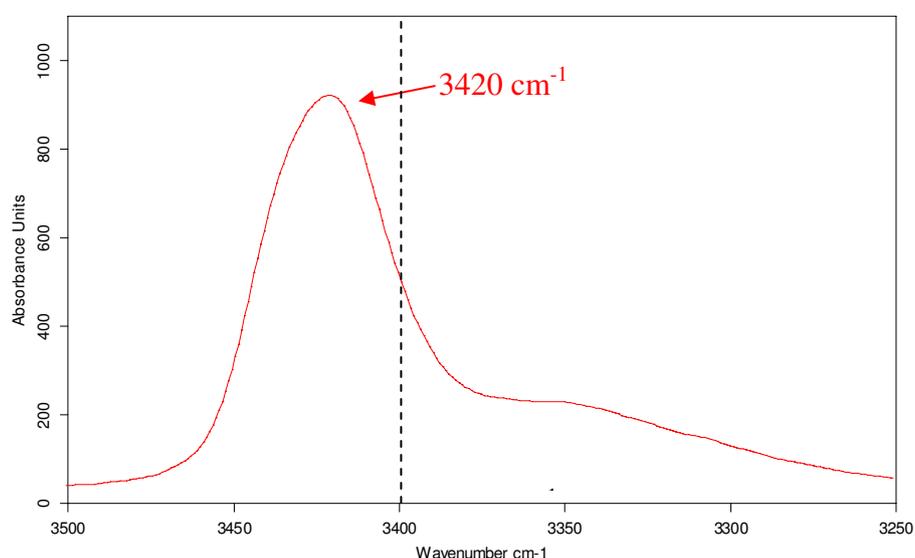
Cette structuration avait été observée par Frédéric André et *al.* dans les séquences Pro-azaAA (avec azaAA= azaAsn ou azaAla)<sup>14</sup>. Leurs résultats avaient montré la formation d'un coude  $\beta$ . Comme nous l'avons soulevé dans le chapitre I, il avait été difficile à l'époque de déterminer si cette structuration était due à la présence du résidu acide azaaminé ou à la présence du résidu proline. Notre résultat est très intéressant car il montre que le résidu acide azaaminé n'a pas besoin de la proline pour induire une structuration sous forme de repliement  $\beta$ . Ce résultat est en total accord avec les études par spectroscopie RMN et les calculs *ab initio* décrits par H. J. Lee et ses collaborateurs<sup>120,34</sup>.

**c. Comparaison de la structuration du 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimère Boc-Phe-azaAla-Ala-OMe 12a avec le peptide parent Boc-Phe-Ala-Ala-OMe 17 et son homologue dipeptidique Boc-Phe-azaAA-OR 18**

Ici, nous comparons la conformation du 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimère Boc-Phe-azaAla-Ala-OMe **12a** avec celle du peptide parent Boc-Phe-Ala-Ala-OMe **17** et avec celle de son homologue

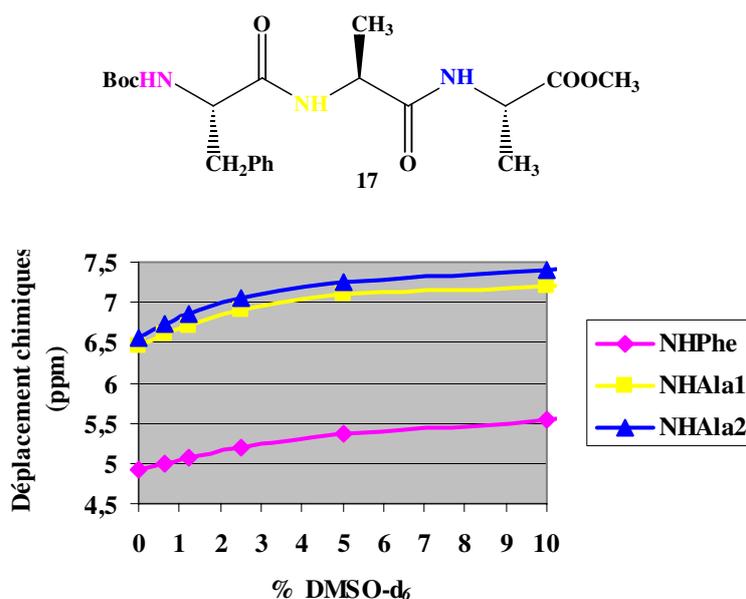
dipeptidique Boc-Phe-azaAA-OBzl **18** dans l'objectif de fixer les conditions indispensables à l'établissement d'un coude  $\beta_{II}$ .

Nous avons synthétisé le tripeptide Boc-Phe-Ala-Ala-OMe **17** par couplage peptidique classique (EDC/HOBt) à partir des acides  $\alpha$  aminés correspondants commerciaux. L'étude par spectroscopie infrarouge montre que cette molécule ne comporte pas de proton NH lié par liaison hydrogène (Figure 49). En effet, les bandes correspondant aux vibrations d'élongations de liaisons NH sont visibles à des nombres d'onde nettement supérieurs à  $3400\text{ cm}^{-1}$ . Le spectre infrarouge décrit une bande large à  $3420\text{ cm}^{-1}$ .



**Figure 49 : Spectre infrarouge du tripeptide parent Boc-Phe-Ala-Ala-OMe 17**

Par RMN du proton, nous avons étudié la sensibilité du déplacement chimique des protons des groupements NH du tripeptide parent **17** en fonction de la composition du solvant ( $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$ ) (Figure 50). En accord avec les études réalisées par spectroscopie infrarouge, ces résultats indiquent qu'aucun proton NH de la molécule n'est lié par liaison hydrogène intramoléculaire car leurs déplacements chimiques varient tous de façon significative avec l'ajout de  $\text{DMSO-d}_6$ .



**Figure 50 : Variation des déplacements chimiques des protons NH du peptide parent Boc-Phe-Ala-Ala-OMe 17 en fonction du solvant**

La comparaison des résultats obtenus avec le 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimère Boc-Phe-azaAla-Ala-OMe **12a** et ceux établis pour un enchaînement peptidique non modifié Boc-Phe-Ala-Ala-OMe **17** montre que nos azapeptides ont un comportement très différent par rapport au peptide parent. Nous pouvons en conclure que l'introduction d'un résidu acide azaaminé en position deux dans un tripeptide induit la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire et plus précisément la formation d'un repliement de type  $\beta_{II}$  entre le NH du résidu  $i+3$  et le CO du résidu  $i$ .

Nous avons également comparé la structure du 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimère Boc-Phe-azaAla-Ala-OMe **12a** avec l'azadipeptide Boc-Phe-azaAla-OBzl **18**. Ce dernier a été synthétisé par couplage peptidique classique (EDC/HOBt) à partir de Boc-Phe-OH, commercial, et de l'hydrazine  $\text{H}_2\text{N-N(CH}_3\text{)(COOBzl)}$  **2**, préparée au laboratoire. En infrarouge, les élongations de liaisons NH ont des nombres d'onde supérieurs à  $3400\text{ cm}^{-1}$ . En RMN du proton, les deux hydrogènes NH de la molécule subissent l'influence de la variation du solvant, leurs déplacements chimiques varient vers les champs faibles lors de l'ajout du solvant polaire. Il est donc évident qu'aucune liaison hydrogène intramoléculaire ne s'établit dans ce dipeptide **18**.

Ainsi, les études physicochimiques et spectroscopiques entreprises sur nos composés azapeptidiques nous ont permis de définir les éléments structuraux nécessaires à l'établissement d'un repliement de type  $\beta_{II}$  :

- présence d'au moins trois résidus
- deux acides  $\alpha$  aminés et un acide azaaminé
- le résidu acide azaaminé doit être positionné au milieu des trois

Il apparaît, par conséquent, que les perturbations conformationnelles engendrées par la substitution  $N_{\alpha}/CH_{\alpha}$  apportent un accroissement de rigidité aux molécules.

#### **d. Influence de la chaîne latérale du résidu acide azaaminé sur la structuration des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères 12**

Nous avons cherché à déterminer la participation ou non de la chaîne latérale du résidu azaaminé à la structuration des trimères. Pour cela, nous avons synthétisé et comparé la conformation de quatre composés, Boc-Phe-azaAla-Ala-OMe **12a**, Boc-Phe-azaPhe-Ala-OMe **12b**, Boc-Phe-azaVal-Ala-OMe **12c** et Boc-Phe-azaLeu-Ala-OMe **12d**. C'est notamment l'encombrement stérique qui varie entre ces quatre trimères.

Les travaux réalisés par spectroscopies RMN et infrarouge montrent que la modification de la chaîne latérale du résidu acide azaaminé n'a pas d'incidence sur la structuration des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères. Lors de l'ajout des DMSO- $d_6$  dans le  $CDCl_3$ , le déplacement chimique, en RMN, du proton du groupement NH du résidu Alanine reste inchangé à 6,2 ppm et ce dans tous les cas. Ceci indique que ce proton NH est lié par liaison hydrogène intramoléculaire (car la concentration de l'échantillon est fixée à  $10^{-2}$  mol.L $^{-1}$ ) dans les quatre composés quelle que soit la chaîne latérale du résidu acide azaaminé. Les vibrations d'élongations de liaisons NH enregistrées en infrarouge, dévoilent deux bandes, une bande large vers 3440  $cm^{-1}$  pour les groupements NH non liés par liaison hydrogène et une bande vers 3375  $cm^{-1}$  pour le NH lié par liaison hydrogène. Les empreintes spectroscopiques des quatre trimères **12a**, **12b**, **12c** et **12d** sont identiques. Nous pouvons affirmer qu'un repliement de type  $\beta_{II}$  s'établit dans les quatre trimères quelle que soit la nature de la chaîne latérale du résidu acide azaaminé. L'encombrement stérique de la chaîne latérale du résidu aza n'a donc aucune influence sur la structuration des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères.

e. Influence de la configuration absolue des carbones asymétriques  $\text{CH}_\alpha$  des résidus acides  $\alpha$  aminés sur la structuration des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères **12**

Nous avons également étudié l'influence de la configuration absolue des carbones asymétriques des résidus acides  $\alpha$  aminés des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères Boc-Phe-azaAla-Ala-OMe **12a**. Nous avons synthétisé les trois tripeptides suivant Boc-(S)Phe-azaAla-(S)Ala-OMe **12a**, Boc-(S)Phe-azaAla-(R)Ala-OMe **12a'** et Boc-(R)Phe-azaAla-(S)Ala-OMe **12a''**. De la même manière que précédemment, les résultats des études conformationnelles en solution par spectroscopies RMN et infrarouge ont été comparés.

En infrarouge, les spectres des trois composés ont la même allure. Les vibrations d'élongations de liaisons NH et CO répondent aux mêmes nombres d'onde quelle que soit la configuration absolue des carbones asymétriques des trimères. Les trois trimères possèdent donc des protons NH non liés par liaisons hydrogène et un proton NH lié par liaison hydrogène. Les études de la sensibilité du déplacement chimique des protons NH en fonction de la composition du mélange ( $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$ ) des trois composés **12a** par RMN donnent les mêmes résultats (Figure 51). Dans tous les cas, le proton NH du résidu Alanine est lié par liaison hydrogène intramoléculaire. Les déplacements chimiques des protons des groupements NH varient sensiblement mais pas significativement ( $\Delta\delta(\mathbf{12a}/\mathbf{12a}') = 0,1$  à  $0,2$  ppm) en fonction de la configuration absolue des carbones asymétriques mais leur comportement vis-à-vis du  $\text{DMSO-d}_6$  est similaire.

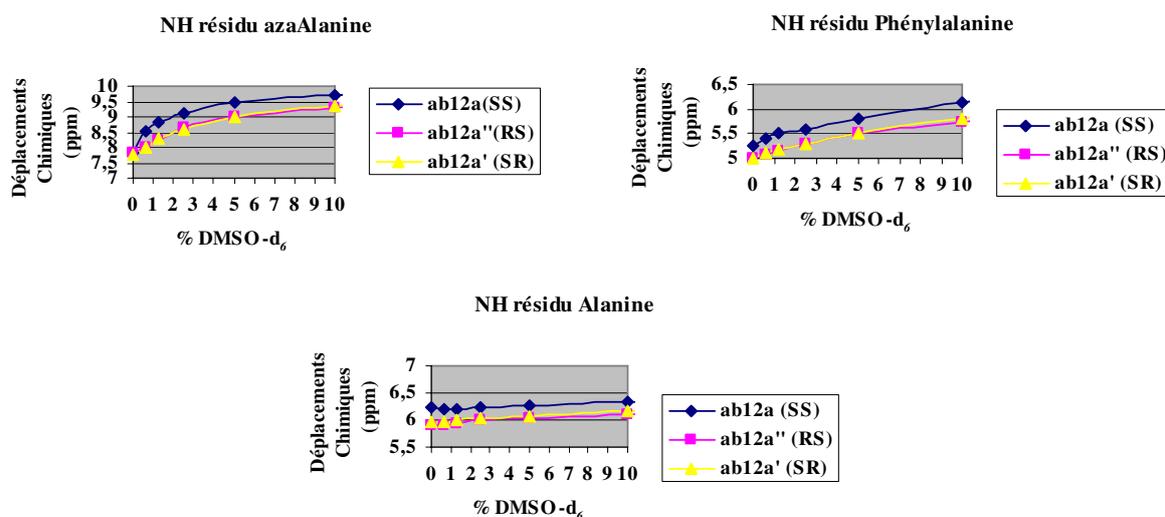
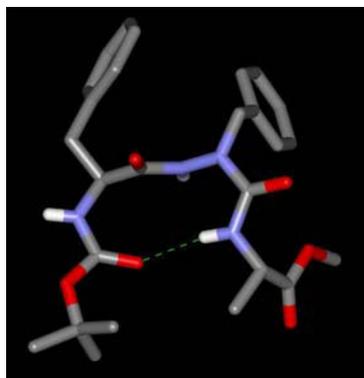
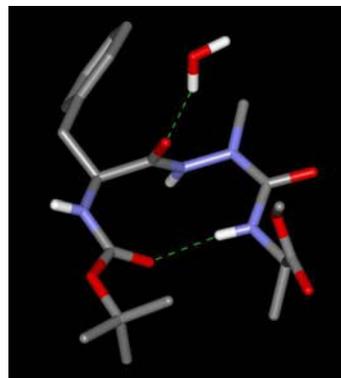


Figure 51 : Comparaison de la sensibilité du déplacement chimique des protons NH des trimères **12a**, **12a'** et **12a''** en fonction de l'ajout de  $\text{DMSO-d}_6$

Nous avons obtenu la structure cristalline du 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimère Boc-(S)Phe-azaAla-(R)Ala-OMe **12a'** que nous avons comparée avec celle du trimère Boc-(S)Phe-azaPhe-(S)Ala-OMe **12b** (Figure 52).



Boc-(S)Phe-azaPhe-(S)Ala-OMe **12b**



Boc-(S)Phe-azaAla-(R)Ala-OMe **12a'**

	Résidu i+1		Résidu i+2	
	$\Phi$	$\Psi$	$\Phi$	$\Psi$
$\beta_{II}$	-60	120	80	0
<b>12b</b>	-54,85	125,36	103,61	-10,95
<b>12a'</b>	-54,69	128,09	85,54	-1,90

**Figure 52 : Influence de la configuration absolue des carbones asymétriques  $CH_{\alpha}$  par comparaison des structures RX**

De la même façon que pour le composé **12b**, dans le trimère Boc-(S)Phe-azaAla-(R)Ala-OMe **12a'**, les distances interatomiques courtes entre sites polaires (distance  $N \cdots O = 2,937 \text{ \AA}$  et distance  $NH \cdots O = 2,09 \text{ \AA}$ ) autorisent une liaison hydrogène intramoléculaire entre la fonction carbonyle CO du groupement Boc et le proton du groupement NH du résidu Alanine, refermant ainsi un pseudocycle à 10 atomes de type  $i+3 \rightarrow i$  tel un coude  $\beta$ .

Nous remarquons que le composé **12a'** qui possède une configuration absolue R du carbone asymétrique de l'alanine forme également un coude de type  $\beta_{II}$ . Néanmoins, l'atome d'azote  $\alpha$  est, dans le cas de **12a'**, plan avec un écart au plan de  $0,011 \text{ \AA}$  alors qu'il adopte une conformation légèrement pyramidale avec un écart au plan de  $0,24(2) \text{ \AA}$  dans le cas de **12b**. Ce résultat prouve que la pyramidalisation de l'atome d'azote du résidu acide azaaminé n'est pas nécessaire à la structuration sous forme de coude  $\beta_{II}$  dans les 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères. Une certaine flexibilité est présente au niveau de cet atome d'azote  $\alpha$ .

Nous avons ainsi démontré que la structuration des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères sous forme de coude  $\beta_{II}$  ne dépend pas de la configuration absolue des carbones asymétriques des résidus acides  $\alpha$  aminés engagés dans la chaîne pseudopeptidique. La présence d'un moins trois résidus dont un acide azaaminé positionné au milieu de deux acides  $\alpha$  aminés sont les éléments structuraux indispensables à la formation d'un repliement  $\beta_{II}$  dans les 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères.

### IV.7.3. Etudes conformationnelles des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamères

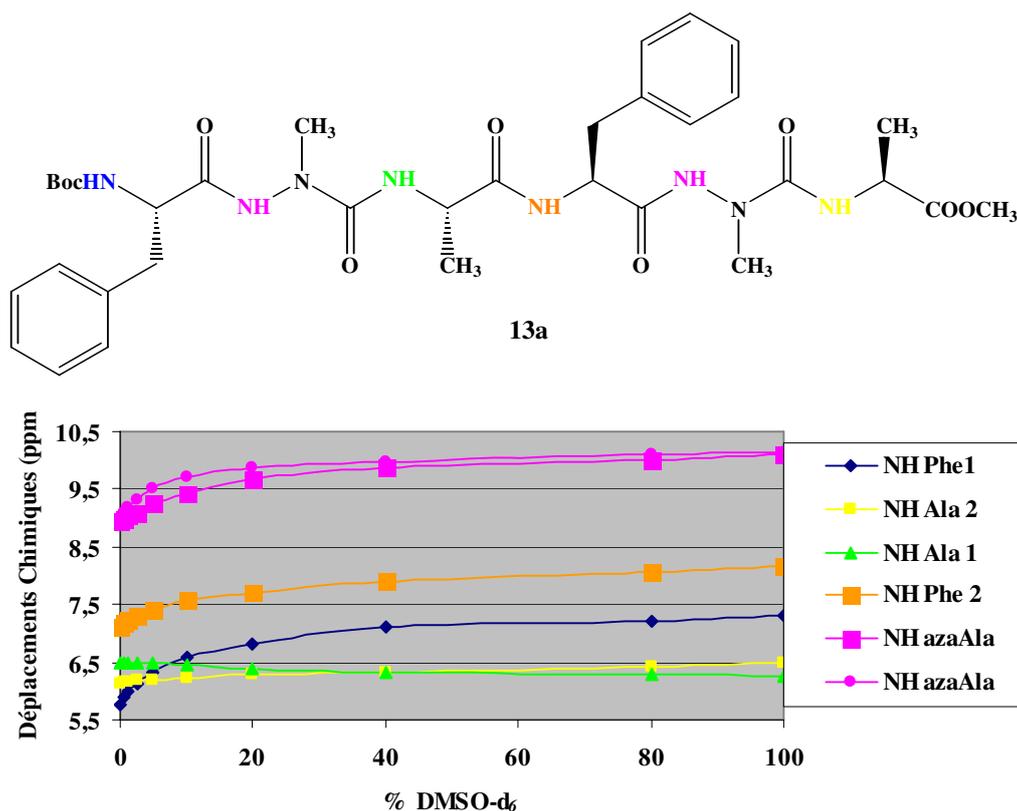
#### a. Etudes structurales en solution des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamères 13

##### 1. Par résonance magnétique nucléaire

Nous avons donc tout d'abord étudié l'influence de l'introduction du DMSO- $d_6$  par spectroscopie RMN  $^1H$  pour les 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamères **13**. Les spectres RMN  $^1H$  dans le  $CDCl_3$  ne possèdent pas une bonne résolution, nous avons alors choisi d'utiliser le  $CD_3CN$  comme solvant apolaire en substitution au chloroforme deutérié.

Les hexamères Boc-(Phe-azaAla-Ala) $_2$ -OMe **13a** et Boc-(Phe-azaPhe-Ala) $_2$ -OMe **13b** ont été étudiés dans des mélanges  $CD_3CN/DMSO-d_6$  à une concentration molaire de  $10^{-2}$  mol.L $^{-1}$ .

Dans les deux cas, nous observons que les protons des groupements NH des résidus alanine sont liés par liaisons hydrogène intramoléculaires car leurs déplacements chimiques ne varient pas avec la variation du milieu dissolvant. A titre d'exemple, nous avons reporté ici le graphique décrivant la variation de déplacement chimique des protons des groupements NH en fonction du pourcentage de DMSO- $d_6$  pour l'hexamère Boc-(Phe-azaAla-Ala) $_2$ -OMe **13a** (Figure 53).



**Figure 53 : Influence du DMSO-d<sub>6</sub> sur les déplacements chimiques des protons NH de **13a****

A ce stade de l'étude, nous pouvons imaginer qu'une structuration régulière prend place au sein de nos hexamères puisque dans les trimères correspondants le proton du groupement NH de l'alanine est lié intramoléculairement pour former un coude  $\beta_{II}$ . Cette hypothèse nécessite cependant des arguments supplémentaires pour être validée.

De façon à savoir si nos composés s'autostructurent en solution et, le cas échéant, sous quelle forme, nous avons approfondi nos études par RMN en relevant les corrélations ROE intéressantes par spectroscopie RMN à deux dimensions. La recherche des corrélations  $C_{\alpha}Hi/NHi$  et  $C_{\alpha}Hi/NHi+1$  dans une carte ROESY nous a permis de connaître les interactions à moyennes distances qui s'établissent dans le composé étudié.

La carte ROESY du composé Boc-(Phe-azaAla-Ala)<sub>2</sub>-OMe **13a** est représentée dans la Figure 54 et celle de la molécule Boc-(Phe-azaPhe-Ala)<sub>2</sub>-OMe **13b** est représentée dans la Figure 55 où les corrélations ROE les plus significatives sont entourées.

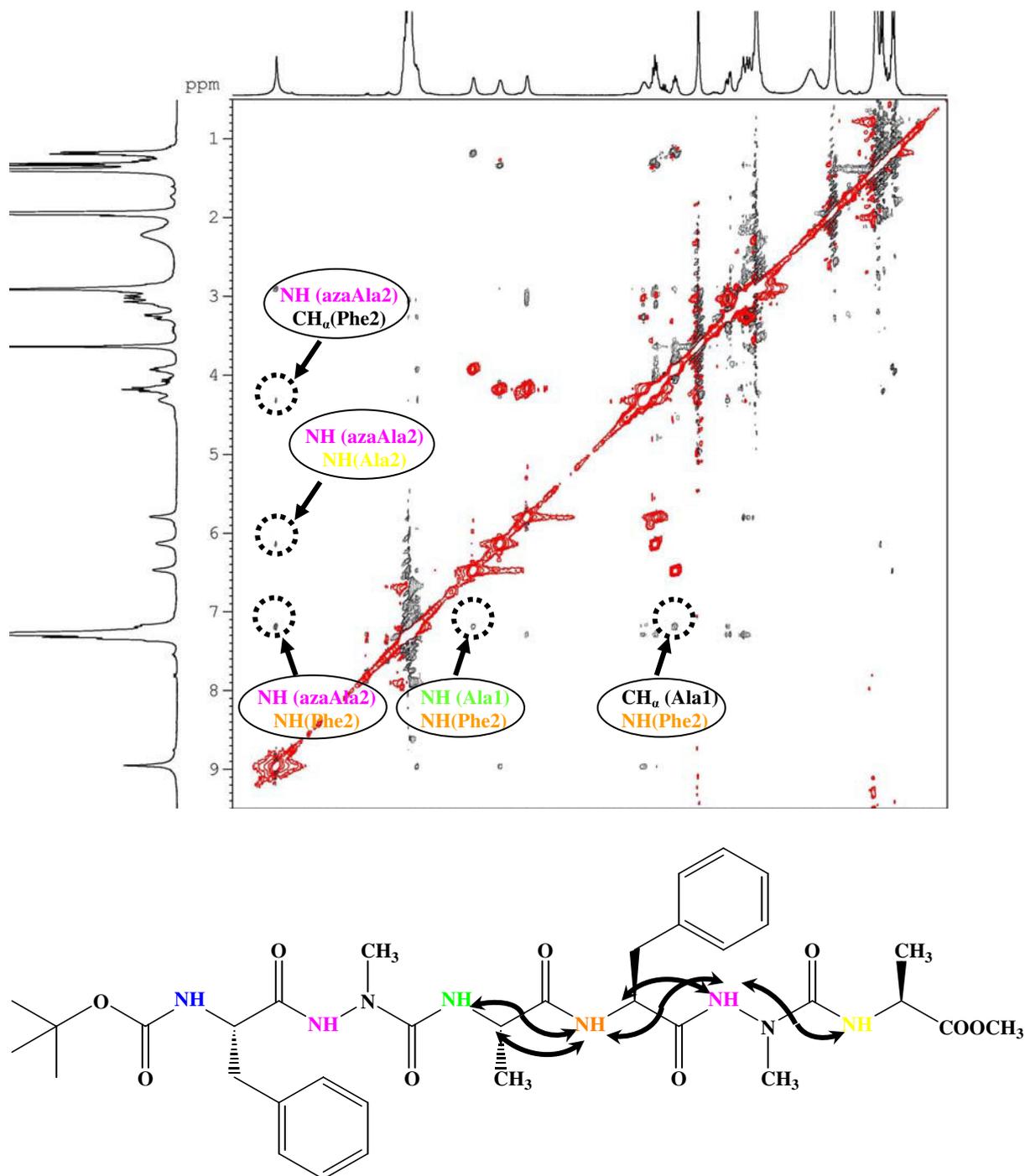


Figure 54 : Carte 2D ROESY du 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamère Boc-(Phe-azaAla-Ala)<sub>2</sub>-OMe 13a

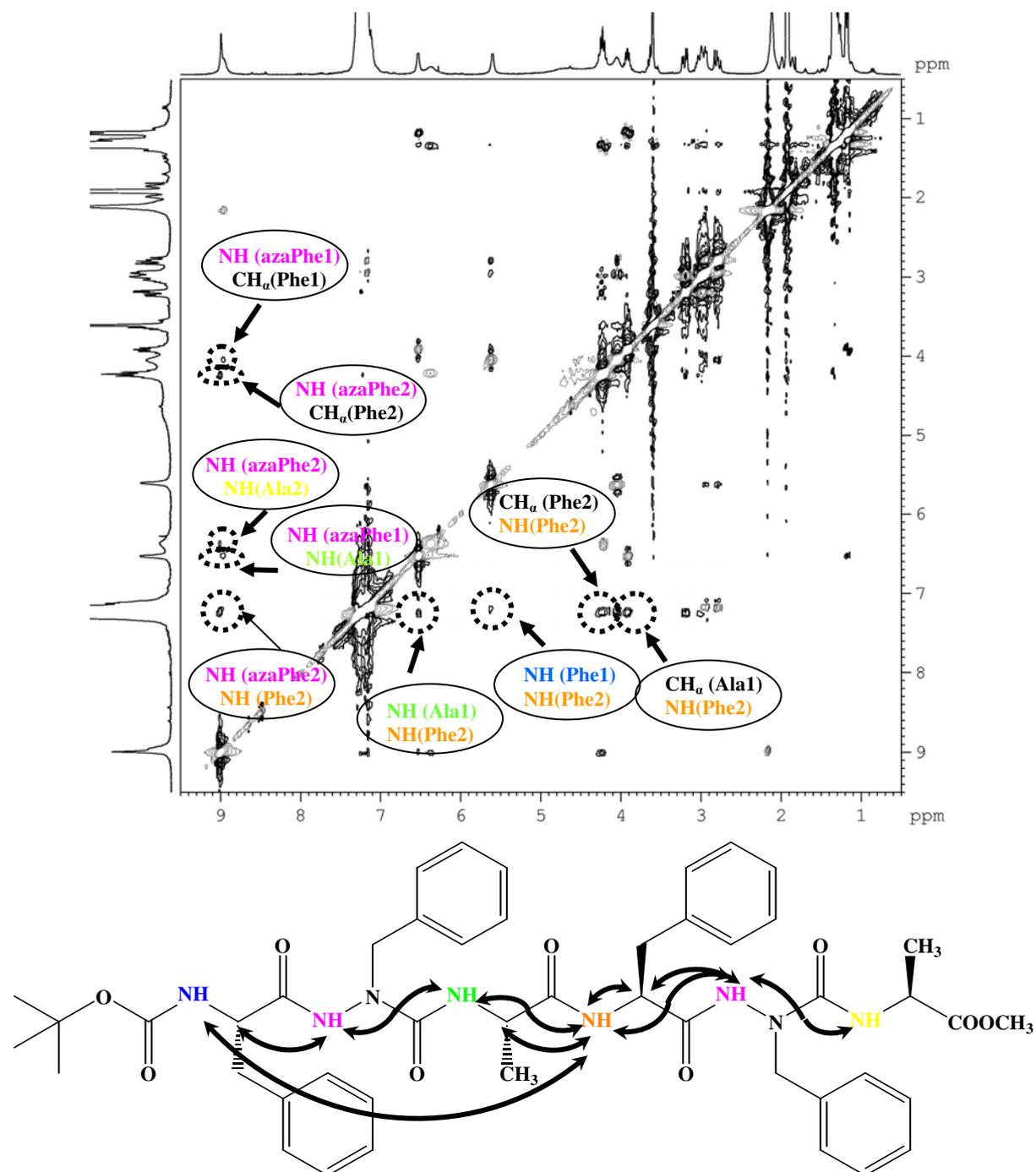
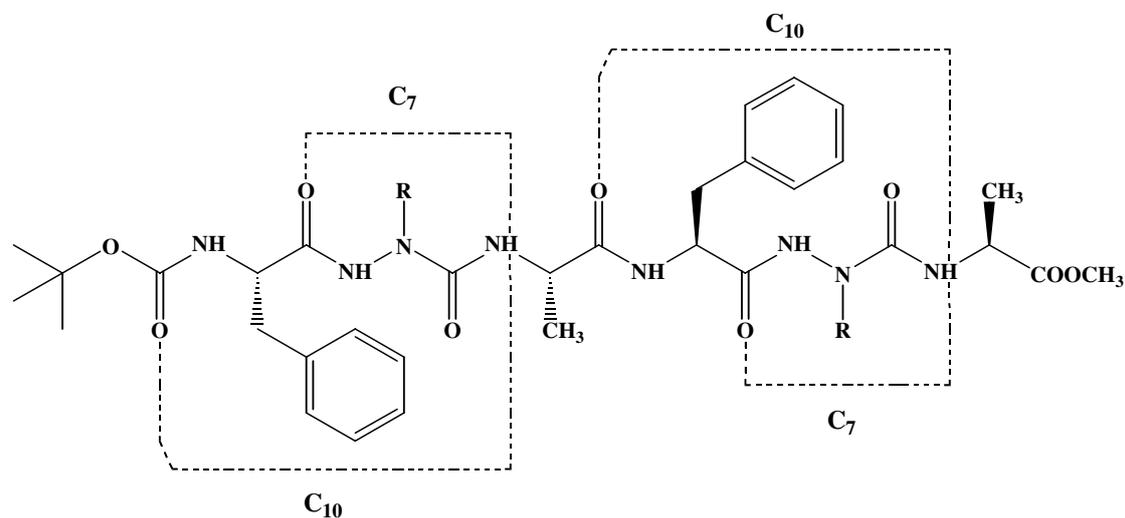


Figure 55 : Carte 2D ROESY du 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamère Boc-(Phe-azaPhe-Ala)<sub>2</sub>-OMe **13b**

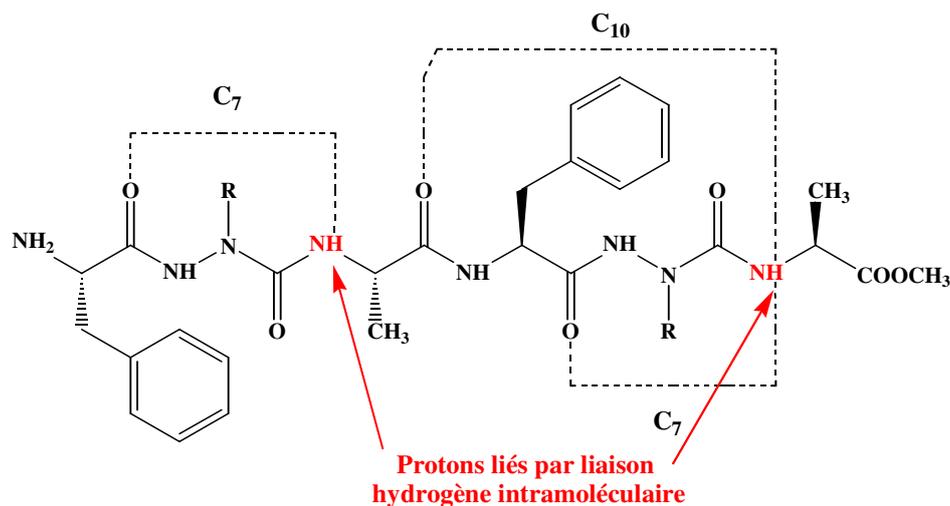
Nous pouvons constater que dans les deux cas, pour **13a** et **13b**, des corrélations ROE s'établissent au niveau de la rotule centrale notamment entre les couples de groupements NHAla1/NHPhe2 et CH<sub>α</sub>Ala1/NHPhe2 pour **13a** et NHAla1/NHPhe2, CH<sub>α</sub>Ala1/NHPhe2, NHPhe2/CH<sub>α</sub>Phe2 et NHPhe1/NHPhe2 pour **13b**. La rotule centrale n'est pas flexible. Cette observation nous permet d'imaginer une rigidité de nos 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamères.

Comme les 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères se structurent sous forme de coude  $\beta_{II}$  selon un repliement en  $C_{10}$ , nous pouvons, dans un premier temps, imaginer qu'il s'établit le même type de repliement au sein des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamères. Néanmoins, deux types de liaisons hydrogène intramoléculaires peuvent s'établir dans ces composés : repliement en  $C_{10}$  ou repliement en  $C_7$  (Figure 56).



**Figure 56 : Liaisons hydrogène intramoléculaires pouvant s'établir au sein des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamères**

Une façon de savoir si le groupement NH du résidu alanine numéro 1 établit une liaison hydrogène intramoléculaire en  $C_{10}$  ou en  $C_7$  est d'étudier l'influence de l'introduction du DMSO- $d_6$  dans le milieu dissolvant pour le 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamère H-(Phe-azaPhe-Ala) $_2$ -OMe déprotégé à son extrémité *N*-terminale. De cette manière, la formation d'une liaison en  $C_{10}$  n'est plus possible puisque le partenaire carbonyle, accepteur de liaison hydrogène, du groupement Boc n'est plus présent. Cette étude montre que les deux protons NH des résidus alanine sont également liés par liaisons hydrogène intramoléculaire dans le cas du 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamère H-(Phe-azaPhe-Ala) $_2$ -OMe. Il ne semble donc pas s'établir de liaison hydrogène  $C_{10}$  pour le repliement engageant le proton NH du résidu alanine numéro 1. Nous émettons l'hypothèse que le premier repliement serait un pseudocycle en  $C_7$  et le deuxième consisterait en un repliement en  $C_7$  ou en  $C_{10}$  pour former un coude  $\beta$  (Figure 57).



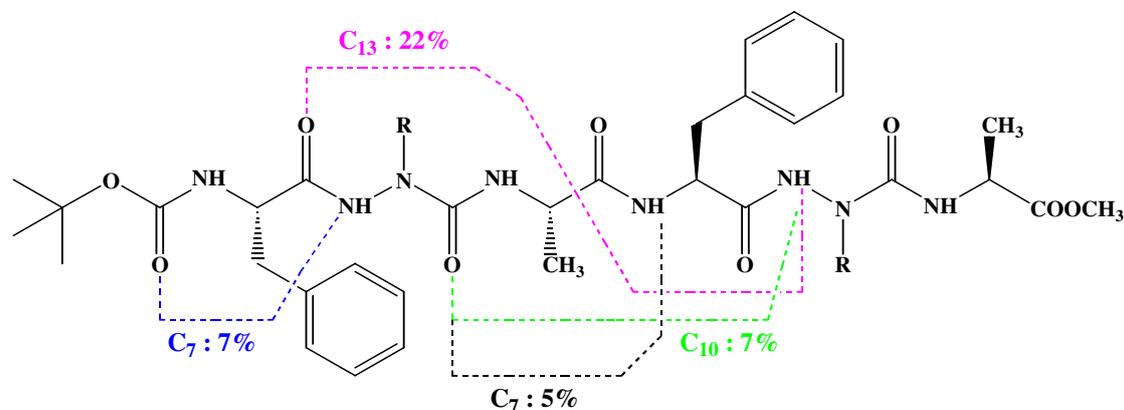
**Figure 57 : Liaisons hydrogène intramoléculaires pouvant s'établir au sein des hexamères H-(Phe-azaAA-Ala)<sub>2</sub>-OMe**

## 2. Simulation numérique des structures de l'hexamère

De façon à simuler la structure de nos 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamères en solution, nous avons utilisé la technique de dynamique moléculaire. Nous allons décrire succinctement les étapes de l'étude :

- Construction de la molécule : construction de la molécule 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamère Boc-(Phe-azaAla-Ala)<sub>2</sub>-OMe dans le logiciel INSIGHT II à partir de la structure cristalline du précurseur azadipeptidique Boc-azaAla-Ala-OMe. Le fichier, une fois créé, est sauvegardé sous un format .mol2 de SYBYL qui peut être lu par le logiciel de dynamique moléculaire AMBER que nous utiliserons par la suite
- Introduction de la molécule dans AMBER : les étapes suivantes consistent à créer des fichiers décrivant la topologie et les paramètres à ajouter au champ de force
- Introduction de la molécule dans une boîte de solvant, minimisation et dynamique moléculaire : la molécule est introduite dans une boîte de solvant (CHCl<sub>3</sub> dans notre cas). Après équilibrage de la boîte et de l'ensemble du système par minimisation d'énergie, on effectue une étape de chauffe lente de 0 à 300K. Enfin la production permet de recueillir les informations de la dynamique moléculaire sur 10 ns par pas de 2 fs.

5000 structures sont générées au long de la dynamique et des analyses statistiques sont réalisées notamment pour visualiser la présence de liaison hydrogène. On obtient finalement une structure moyenne optimale (Figure 58).



**Figure 58 : Pourcentage de liaisons hydrogène intramoléculaires obtenues par dynamique moléculaire sur le 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamère Boc-(Phe-azaAla-Ala)<sub>2</sub>-OMe**

Les résultats obtenus *via* la dynamique moléculaire ne sont pas en accord avec les résultats obtenus expérimentalement par RMN. En effet, par cette étude, les protons des groupements NH des résidus acide azaaminés uniquement sont liés par liaisons hydrogène intramoléculaires. Pourtant, expérimentalement, nous avons bien observé que ces protons n'étaient pas liés par liaisons hydrogène. Ces résultats proviennent sûrement d'une mauvaise paramétrisation de la liaison N-N dans le champ de force d'AMBER.

Nous avons donc choisi de tenter d'expliquer la structuration des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamères par modélisation moléculaire sous contraintes RMN en utilisant les corrélations ROE relevées.

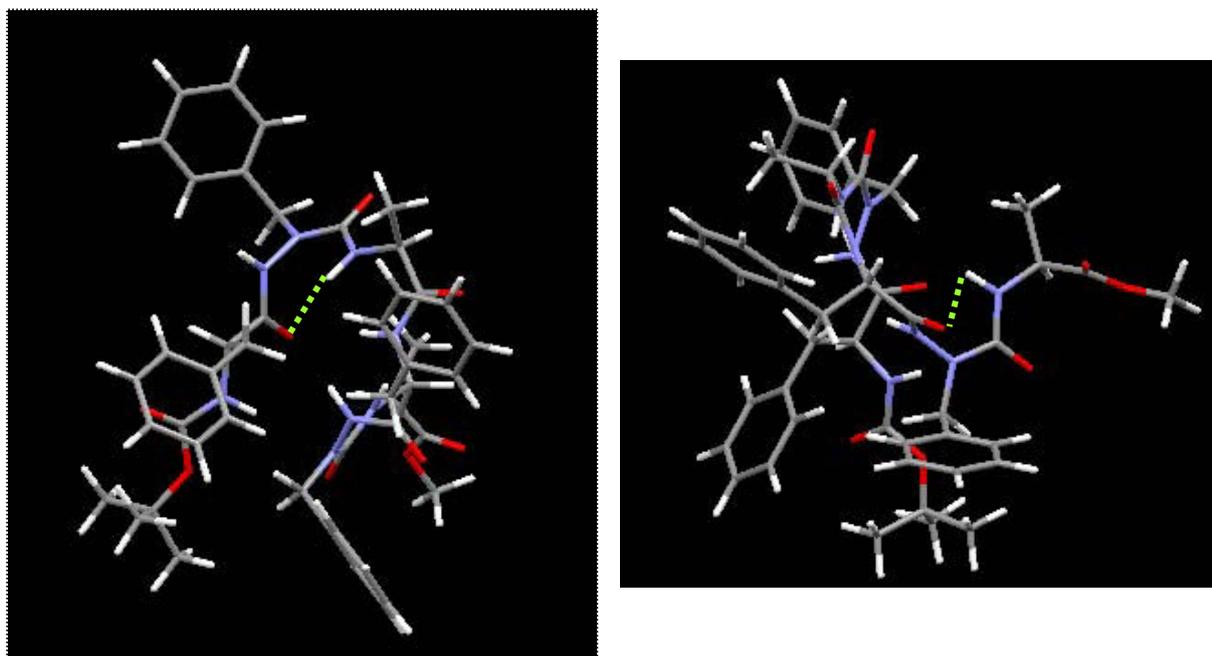
De la même façon que pour la technique de dynamique moléculaire, nous allons décrire succinctement les étapes de l'étude :

- Construction de la molécule : construction de la molécule 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamère Boc-(Phe-azaPhe-Ala)<sub>2</sub>-OMe dans le logiciel INSIGHT II à partir de la structure cristalline du 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimère Boc-Phe-azaPhe-Ala-OMe. Le fichier, une fois créé, est sauvegardé sous un format .mol2 de SYBYL qui peut être lu par le logiciel de dynamique moléculaire AMBER que nous utiliserons par la suite
- Introduction de la molécule dans AMBER : les étapes suivantes consistent à créer des fichiers décrivant la topologie et les paramètres à ajouter au champ de force

- *Introduction des contraintes RMN et recuit simulé*: on introduit les informations issues de la RMN sous forme de distances interatomiques. Pour chaque corrélation proton/proton relevée expérimentalement par RMN ROESY, les bornes larges 1,8-5,0 Å ont été considérées. On effectue ensuite un recuit simulé sur 2 ps par pas de 1fs.

L'utilisation des champs de force de la liaison amide impose à chaque atome d'azote  $\alpha$  d'être plan. Comme nous avons mis en évidence pour les 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères que la pyramidalisation de l'atome d'azote du résidu acide azaaminé n'est pas nécessaire à la structuration, nous avons choisi de considérer les résultats obtenus par modélisation moléculaire sous contraintes RMN en utilisant les champs de force des liens amides.

La structure, du 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamère Boc-(Phe-azaPhe-Ala)<sub>2</sub>-OMe obtenue par modélisation moléculaire sous contrainte RMN, montre que les groupements NH des résidus alanine peuvent être liés par liaisons hydrogène intramoléculaires en formant des pseudocycles en C<sub>7</sub> (Figure 59).

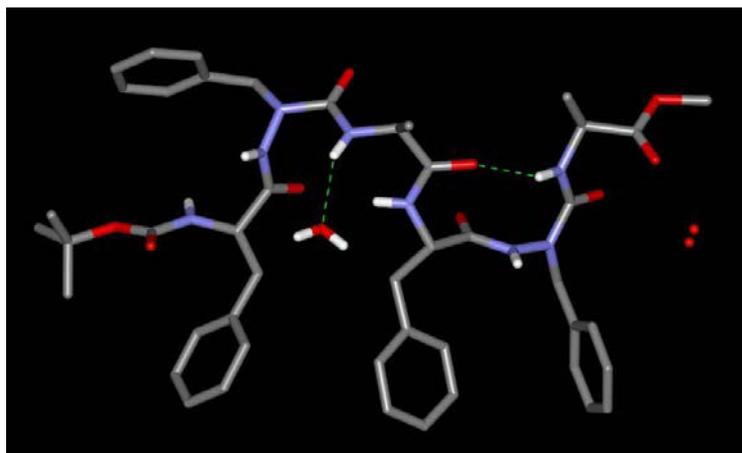


**Figure 59 : Structure du 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamère Boc-(Phe-azaPhe-Ala)<sub>2</sub>-OMe obtenue par modélisation moléculaire sous contrainte RMN par AMBER**

Ce résultat est cohérent avec les résultats obtenus par RMN et infrarouge selon lesquels les protons NH des résidus alanine sont liés par liaisons hydrogène intramoléculaires.

### b. Résultats cristallographiques

Des monocristaux de l'hexamère Boc-(Phe-azaPhe-Ala)<sub>2</sub>-OMe **13b** ont été obtenus. Comme pour les autres composés cristallisés, la structure cristalline par diffraction des rayons X a été résolue par l'équipe de Claude Didierjean dans le groupe de biocristallographie au laboratoire CRM<sup>2</sup> de l'Université Henri Poincaré Nancy I (Figure 60).



**Figure 60 : Structure moléculaire dans le cristal du 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamère Boc-(Phe-azaPhe-Ala)<sub>2</sub>-OMe **13b****

Le calcul des distances interatomiques (distance N<sup>⋯</sup>O (1) = 3,497 Å, distance NH...O (1) = 2,679 Å et distance N<sup>⋯</sup>O (2) = 2,998 Å, distance NH<sup>⋯</sup>O (2) = 2,195 Å) montre qu'il s'établit deux liaisons hydrogène au sein du cristal. Le calcul des angles de torsions nous permet de déterminer quels types de repliements prennent place dans le trimère (Tableau 15).

	Résidu i+1		Résidu i+2			Résidu i+3		Résidu i+4	
	$\Phi$	$\Psi$	$\Phi$	$\Psi$		$\Phi$	$\Psi$	$\Phi$	$\Psi$
$\beta_I$	-60	-30	-90	0	$\beta_{II}$	-60	120	80	0
<b>13b</b>	-70,41	-26,19	-108,98	-10,38		-58,20	125,03	80,85	10,46

**Tableau 15 : Angles de torsions du 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamère Boc-(Phe-azaPhe-Ala)<sub>2</sub>-OMe **13b****

La molécule présente deux coudes, le premier est proche d'un coude de type  $\beta_I$ , et le deuxième est le même que celui observé dans la structure cristalline du 2:1-[ $\alpha$ /aza]-

trimère Boc-Phe-azaPhe-Ala-OMe **12b**, un pseudocycle à 10 atomes de type  $i+3 \rightarrow i$  tel un coude  $\beta_{II}$ . Dans le premier coude la liaison hydrogène n'est pas optimale alors qu'elle l'est dans le deuxième coude. Nous observons que trois molécules d'eau ont co-cristallisé avec l'hexamère. Deux d'entre elles forment un canal de solvant dans le cristal et sont relativement désordonnées. La troisième est emprisonnée dans le cristal entre deux molécules en formant une liaison hydrogène avec celle-ci. C'est le proton NH du résidu alanine numéro 1 qui est lié avec la molécule d'eau. Ceci explique que ce même proton NH n'est pas disponible pour effectuer une liaison hydrogène intramoléculaire avec un groupement carbonyle de la molécule.

### **c. Conclusion**

Les résultats obtenus sont les suivants :

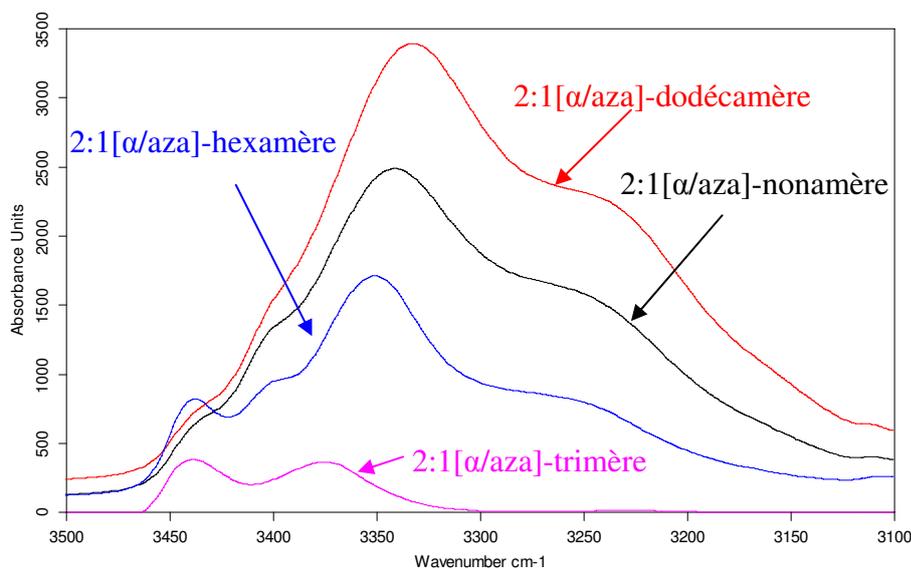
- les études réalisées par dynamique moléculaire ont mis en évidence un échantillon de liaisons hydrogène possibles au sein des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamères
- les résultats obtenus par spectroscopies RMN et IR précisent que seuls les protons des groupements NH des résidus alanine sont liés par liaison hydrogène intramoléculaire
- la simulation numérique réalisée par modélisation moléculaire sous contraintes RMN laisse paraître que les protons NH des résidus alanine peuvent être liés par liaisons hydrogène intramoléculaires en formant des pseudocycles  $C_7$
- La diffraction des RX montre que deux coudes  $\beta$  prennent place dans l'hexamère Boc-(Phe-azaPhe-Ala)<sub>2</sub>-OMe **13b**

Les 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamères n'ont pas le même comportement en solution et à l'état solide. Les molécules d'eau ayant cristallisées avec l'hexamère Boc-(Phe-azaPhe-Ala)<sub>2</sub>-OMe **13b** peuvent expliquer cette différence. En effet, en solution, aucune molécule d'eau n'est présente dans le milieu. Nous pensons qu'il s'établit un équilibre entre liaisons hydrogène en  $C_7$  et liaisons hydrogène en  $C_{10}$  dans les 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamères.

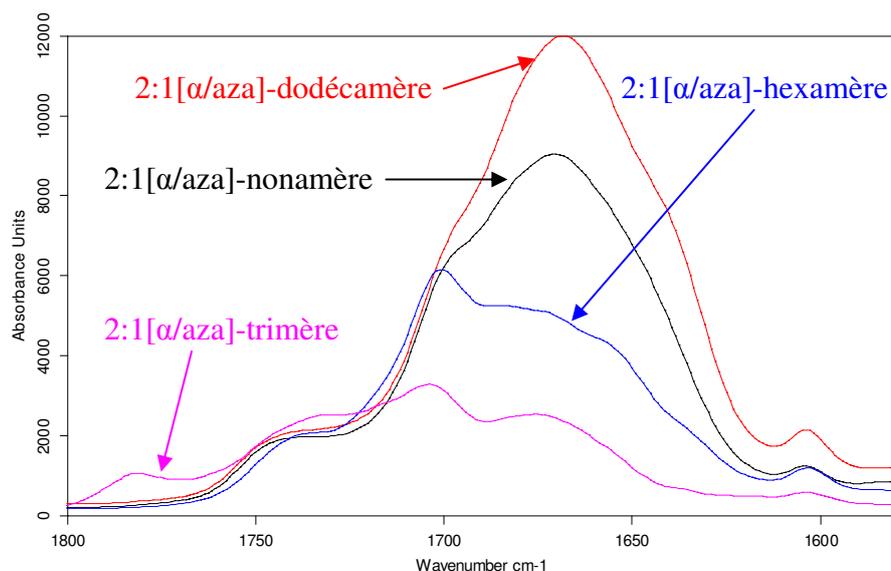
#### IV.7.4. Analyses structurales en solution des oligomères 2:1-[ $\alpha$ /aza]-nonamère 14 et 2:1-[ $\alpha$ /aza]-dodécamère 15

La conformation des oligomères plus longs a été étudiée en solution en série azaAlanine pour le 2:1-[ $\alpha$ /aza]-nonamère **14** et le 2:1-[ $\alpha$ /aza]-dodécamère **15**. Nous avons comparé par spectroscopie infrarouge l'allure des signaux correspondants aux vibrations d'élongations de liaisons des groupements NH (Figure 61) et CO (Figure 62).

Nous observons que plus la chaîne de l'oligomère s'allonge plus les bandes des vibrations d'élongations de liaisons se déplacent vers des fréquences faibles. Ce résultat laisse penser à l'établissement de liaisons hydrogène.



**Figure 61 : Superposition des vibrations d'élongations NH des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères Boc-(Phe-azaAla-Ala)<sub>n</sub>-OMe**



**Figure 62 : Superposition des vibrations d'élongations CO des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères Boc-(Phe-azaAla-Ala)<sub>n</sub>-OMe**

Par RMN  $^1\text{H}$  nous avons étudié l'influence de l'ajout DMSO- $d_6$  dans le milieu dissolvant à une concentration en oligomère de  $10^{-2}$  mol.L $^{-1}$ . Comme pour le trimère Boc-Phe-azaAla-Ala-OMe **12a** et pour l'hexamère Boc-(Phe-azaAla-Ala)<sub>2</sub>-OMe **13a**, les résultats ont montré que les protons des groupements NH des résidus alanine sont liés par liaison hydrogène intramoléculaires.

Malheureusement, les spectres RMN  $^1\text{H}$  à deux dimensions sont très complexes et ils ne nous ont pas permis de retrouver les corrélations ROE qui s'établissent dans le nonamère et le dodécamère.

Nous avons effectué une étude par dichroïsme circulaire de nos 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères. L'étude a été réalisée sur un spectromètre Jobin-Yvon CD6 à des longueurs d'onde comprises entre 190 et 300 nm à température ambiante. Deux séries d'études ont été réalisées :

- dans le méthanol à 0,5 mM
- dans le chloroforme à 0,5 mM

Dans les deux cas, les spectres obtenus ne sont pas exploitables. Il semble que nos composés aient la capacité à répondre fortement en dichroïsme circulaire vers 200 nm. On observe un fort signal dichroïque dans cette zone sous forme de « bruit » mal défini ce qui rend les spectres inexploitables.

De plus, des tentatives de cristallisation des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-nonamère **14** et 2:1-[ $\alpha$ /aza]-dodécamère **15** ont été tentées mais aucun monocristal n'a été obtenu.

Les études réalisées par RMN et infrarouge affirment que des liaisons hydrogène intramoléculaires s'établissent régulièrement au sein des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-nonamère et 2:1-[ $\alpha$ /aza]-dodécamère. Il semble donc que les 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères s'autostructurent en solution. Selon les résultats obtenus par modélisation moléculaire pour les 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamères, un réseau de liaisons hydrogène intramoléculaires en C<sub>7</sub> prendraient place dans nos molécules. Néanmoins, il aurait été plus aisé d'établir avec certitude l'identité des atomes impliqués dans la structuration de ces 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères linéaires avec des études complémentaires des oligomères plus longs par modélisation moléculaire et dynamique moléculaire sous contraintes RMN ainsi que par diffraction des RX des composés concernés.

## CONCLUSION GENERALE

Le travail de thèse présenté dans ce mémoire est consacré à la synthèse et aux études conformationnelles des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères.

Dans un premier temps, nous avons mis au point une méthode de synthèse générale en phase liquide et en stratégie Boc des composés azadipeptidiques orthogonalement protégés de type Boc-azaAA-AA-OMe. L'étape clé de cette synthèse consiste en la condensation d'un chlorure d'acide, formé à partir de la fonction amine d'un dérivé *N*-alkylaminophthalimide obtenu par réaction de Mitsunobu, sur un acide  $\alpha$  aminé.

Puis, nous avons mis au point la synthèse des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères à partir des composés azadipeptidiques. Nous avons montré que, malgré la faible réactivité de leur extrémité *N*-terminale, les composés H-azaAA-AA-OMe peuvent réagir avec des fluorures d'acides  $\alpha$  aminés et conduire à des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères avec de bons rendements. Ces trimères ont ensuite été engagés dans des réactions d'oligomérisation par couplage peptidique classique, ce qui nous a permis d'isoler les tous premiers 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères avec de très bons rendements.

Nous avons également abordé la synthèse des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-cyclooligomères à partir des oligomères linéaires correspondants. Nous avons montré que la cyclisation des oligomères linéaires était possible cependant les rendements de ces synthèses n'ont pas été optimisés et ce travail mérite d'être poursuivi.

Finalement, nous avons réalisé une étude conformationnelle des composés azadipeptidiques ainsi que des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères synthétisés. Ces études ont montré que l'introduction d'un résidu acide azaaminé engendre des changements conformationnels importants. Nous avons ainsi mis en évidence, dans certains cas, une chiralité induite de l'atome d'azote  $\alpha$ . La structure des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères a révélé la formation d'un coude  $\beta_{II}$  en solution et à l'état solide. Concernant les 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamères, ils présentent un comportement différent à l'état cristallin et à l'état dissous. En effet, à l'état solide, une molécule d'eau participe à la structuration de l'hexamère Boc-(Phe-azaPhe-Ala)<sub>2</sub>-OMe alors qu'en solution aucune molécule d'eau n'est présente. Il apparait, suite aux études réalisées par

modélisation moléculaire sous contraintes RMN et par diffraction des rayons X, qu'il s'établit au sein des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamères Boc-(Phe-azaAA-Ala)<sub>2</sub>-OMe, des liaisons hydrogène formant des pseudocycles C<sub>7</sub> et C<sub>10</sub> et engageant les protons NH des résidus alanine. Les études réalisées par RMN et par IR montrent que les 2:1-[ $\alpha$ /aza]-nonamères et les 2:1-[ $\alpha$ /aza]-dodécamères se structurent en solution. Il semblerait qu'un équilibre entre des liaisons hydrogène de type C<sub>7</sub> et C<sub>10</sub> impliquant les protons NH des résidus alanine ait lieu.

Après avoir optimisé les rendements de synthèse des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-cyclooligomères, une étude ultérieure, mettant en œuvre une analyse RMN en température ainsi que la diffraction des rayons X, permettrait de déterminer leurs propriétés conformationnelles et de préciser si ces composés forment des structures tubulaires.

## GENERAL METHODS

Starting materials were purchased from Aldrich, Acros Organics, Merck, Fluka, Novabiochem, etc... and used without further purification. THF was distilled over Na and benzophenone, dichloromethane over P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and methanol over Na.

Reactions were monitored by TLC using aluminium-backed silica gel plates Kieselgel 60 with fluorescent indicator UV<sub>254</sub> (purchased from Merck). Detection was performed by UV or/and by heating the plate after treatment with a staining solution of phosphomolybdic acid.

Column chromatographies were performed using silica gel 60 (70-200µm). All yields have been calculated from pure isolated products.

All compounds were characterized by NMR spectroscopy. NMR spectra were recorded on a BRUKER AVANCE spectrometer operating at 300MHz, using deuterated chloroform (CDCl<sub>3</sub>), deuterated acetonitrile (CD<sub>3</sub>CN) or deuterated dimethylsulfoxide (DMSO-d<sub>6</sub>). Chemical shifts are given in ppm regarding tetramethylsilane (TMS) as internal standard in CDCl<sub>3</sub> (δ=0 ppm for TMS). Multiplicities are reported as follow: s=singlet, d=doublet, t=triplet, q=quartet, m=multiplet, br=broad, arom=aromatic.

Infrared spectra were recorded on a BRUKER TENSOR 27 spectrometer over 256 scans.

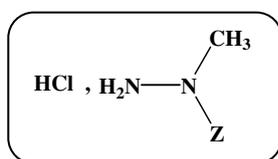
Electron spray ionization mass spectra (ESI-MS) were recorded on a BRUKER MicroTof-Q HR spectrometer in the « Service commun de Spectrométrie de Masse », Faculté des Sciences et Techniques, Vandœuvre -lès-Nancy, France.

Melting points were obtained on a hot-stage apparatus (Köfler bank) and were uncorrected.

## EXPERIMENTAL PART

*N*<sub>α</sub>-Z-methylhydrazine 2

Methylhydrazine **1** (1 equiv) was progressively added to ZOSu (1 equiv) dissolved in THF at 0°C under nitrogen atmosphere. The resulting solution was stirred at room temperature overnight. THF was removed under reduced pressure and the hydrochloride **2** was precipitated by addition of an HCl/AcOEt 3M solution. The precipitate was filtered off and crystallized in absolute ethanol.



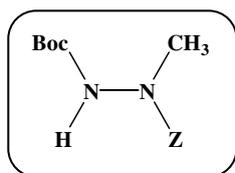
- Formula: C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Cl
- Theoretical Mass: 216.5 g.mol<sup>-1</sup>
- Aspect: White Solid
- Melting Point: 144-146°C
- IR (ATR): 2847 cm<sup>-1</sup> (NH); 1736 cm<sup>-1</sup> (C=O)

<sup>1</sup>H NMR (DMSO): δ 3.17 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 5.20 (s, 2H, CH<sub>2</sub> of Z group), 7.33-7.48 (m, 5H, H arom of Z group).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO): δ 37.7 (NCH<sub>3</sub>), 67.6 (CH<sub>2</sub> of Z group), 127.6-128.4 (CH arom of Z group), 135.5 (C arom of Z group), 154.5 (O=C).

*N*<sub>α</sub>-Z-*N*<sub>β</sub>-Boc-methylhydrazine 3

A suspension of **2** (1 equiv) in THF at 0°C under nitrogen atmosphere was successively treated by Boc<sub>2</sub>O (1.1 equiv), DMAP (0.1 equiv) as a catalyst and NMM (1 equiv). Stirring at room temperature was maintained for 12h. HCl.NMM was filtered off, THF was evaporated and the residue was taken up by CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and the organic phase was washed with brine. Boc-NH-NZ-Me **3** is obtained pure without further purification.



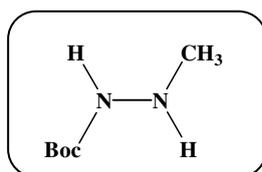
- Formula:  $C_{14}H_{20}N_2O_4$
- Theoretical Mass:  $280 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- Aspect: Colorless Oil

$^1\text{H NMR}$ :  $\delta$  1.42 (s, 9H,  $C(\text{CH}_3)_3$ ), 3.14 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 5.13 (s, 2H,  $\text{CH}_2$  of Z group), 5.58 (br s, 1H, NH), 7.34 (m, 5H, H arom of Z group).

$^{13}\text{C NMR}$ :  $\delta$  27.9 ( $C(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ), 38.3 ( $\text{NCH}_3$ ), 68.0 ( $\text{CH}_2$  of Z group), 81.4 ( $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$ ), 127.8 and 128.0 and 128.3 (CH arom of Z group), 135.9 (C arom of Z group).

### *N*<sub>β</sub>-Boc-methylhydrazine **4**

The Z group of Boc-NH-NZ-Me **3** (1 equiv) was removed in MeOH in the presence of Pd/C 10% as a catalyst and a little amount of acetic acid under vigorous stirring at room temperature and  $\text{H}_2$  atmosphere. After filtration and evaporation of MeOH, *N*<sub>β</sub>-Boc-methylhydrazine **4** was recovered as thin needles without further purification.



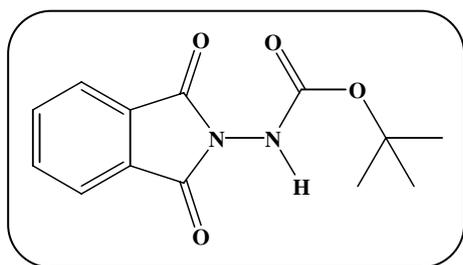
- Formula:  $C_6H_{14}N_2O_2$
- Theoretical Mass:  $146 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- Aspect: White Solid
- Melting Point:  $52\text{-}54^\circ\text{C}$

$^1\text{H NMR}$ :  $\delta$  1.47 (s, 9H,  $C(\text{CH}_3)_3$ ), 2.60 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.92 (br s, 1H,  $\text{NH}\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 6.45 (br s, 1H,  $\text{NH}\underline{\text{B}}\text{oc}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$ :  $\delta$  28.9 ( $C(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ), 39.8 ( $\text{NCH}_3$ ), 80.9 ( $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$ ), 157.3 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

### *N-tert*-butyloxycarbonylaminophthalimide **6**

Phthalic anhydride (1 equiv) and *tert*-butylcarbazate (1 equiv) were dissolved in toluene in a monocol with a Dean-Stark. The suspension is refluxed for 3 h. The mixture was cooled and the *N-tert*-butyloxycarbonylaminophthalimide precipitated. The solid was filtered off and recrystallized with EtOAc.



- Formula: C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>
- Theoretical Mass: 262 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  
[M+H]<sup>+</sup> m/z 263.1032, found 263.1034
- Aspect: White Solid
- Melting Point: 216°C
- IR (KBr): 3395 cm<sup>-1</sup> (NH); 1706 cm<sup>-1</sup>, 1740 cm<sup>-1</sup>, 1783 cm<sup>-1</sup> (C=O)

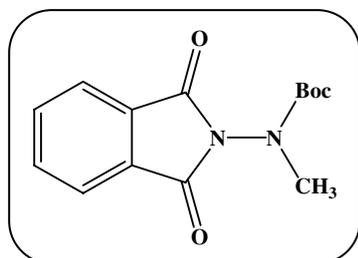
<sup>1</sup>H NMR: δ 1.50 (2 s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 7.76-7.82 (m, 2H, H arom Phth), 7.83-7.89 (m, 2H, H arom Phth), 9.60 (br s, 1H, NH).

<sup>13</sup>C NMR: δ 28.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 83.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 124.3 (CH arom Phth), 130.3 (C arom Phth), 135.1 (CH arom Phth), 153.8 (N-COO<sup>t</sup>Bu), 165.9 (O=C-Phth).

### *N-alkyl-N-tert*-butyloxycarbonylaminophthalimide **7**

To a solution of *N-tert*-butyloxycarbonylaminophthalimide **6** (1 equiv), PPh<sub>3</sub> (1.5 equiv) and alcohol (3 equiv) in dry THF and under N<sub>2</sub> was added in one portion DEAD (1.5 equiv) under stirring at 0-5°C. The resulting solution was stirred overnight (monitored by TLC until completion) and concentrated under vacuum. The residue was triturated in EtOAc, placed in refrigerator and most of the triphenylphosphine oxide removed by filtration. The filtrate was evaporated and the residue was purified by column chromatography on silica gel.

***N*-methyl-*N*-*tert*-butyloxycarbonylaminophtalimide 7a:**

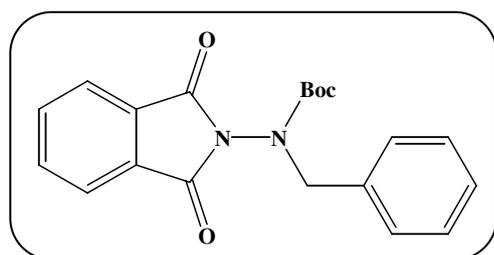


- Corresponding alcohol: methanol
- Purification: eluent EtOAc/p-ether 20/80
- Formula: C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>
- Theoretical Mass: 276 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>5</sub>  
[M+Na+MeOH]<sup>+</sup> m/z 331.1264, found 331.1286
- Aspect: White Solid
- Melting Point: 123°C
- IR (NaCl): 1731 cm<sup>-1</sup>, 1793 cm<sup>-1</sup> (C=O)

**<sup>1</sup>H NMR:** δ 1.34 and 1.53 (2 s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.29 and 3.32 (2 s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 7.78-7.89 (m, 4H, H arom Phth).

**<sup>13</sup>C NMR:** δ 28.5 and 28.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 37.2 and 38.7 (NCH<sub>3</sub>), 82.8 and 83.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 124.5 (CH arom Phth), 130.6 (C arom Phth), 135.2 and 135.3 (CH arom Phth), 154.0 (N-COO<sup>t</sup>Bu), 165.6 (O=C-Phth).

***N*-benzyl-*N*-*tert*-butyloxycarbonylaminophtalimide 7b:**

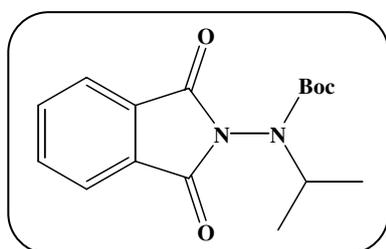


- Corresponding alcohol: benzyl alcohol
- Purification: eluent CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>
- Formula: C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>
- Theoretical Mass: 352 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>4</sub>  
[M+Na]<sup>+</sup> m/z 375.1315, found 375.1314
- Aspect: White Solid
- Melting Point: 108°C
- IR (NaCl): 1737 cm<sup>-1</sup>, 1796 cm<sup>-1</sup> (C=O)

**<sup>1</sup>H NMR:** δ 1.36 and 1.51 (2 s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 4.84 and 4.88 (2 s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 7.26-7.4 (2 m, 5H, H arom Ph), 7.73-7.83 (m, 4H, H arom Phth).

**<sup>13</sup>C NMR:**  $\delta$  28.5 and 28.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 53.3 and 55.2 (NCH<sub>2</sub>), 83.1 and 83.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 124.3 (CH arom Phth), 128.5 (CH arom Ph), 128.9 (CH arom Phth), 129.1 (CH arom Ph), 129.6 (CH arom Ph), 130.3 (C arom), 130.5 (C arom), 135.1 (CH arom Phth), 154.1 (N-COO<sup>t</sup>Bu), 165.6 (O=C-Phth).

***N*-isopropyl-*N*-*tert*-butyloxycarbonylamino**phthalimide **7c**:

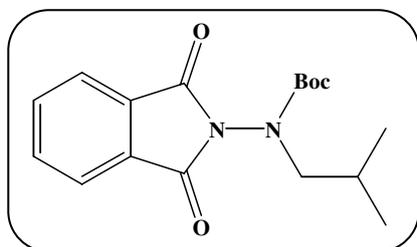


- Corresponding alcohol: 2-propanol
- Purification: elution gradient CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/p-ether  
40/60, 50/50, 100/0
- Formula: C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>
- Theoretical Mass: 304 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>4</sub>  
[M+Na]<sup>+</sup> m/z 327.1315, found 327.1301
- Aspect: White Solid
- Melting Point: 142°C
- IR (NaCl): 1715 cm<sup>-1</sup>, 1734 cm<sup>-1</sup>,  
1797 cm<sup>-1</sup> (C=O)

**<sup>1</sup>H NMR:**  $\delta$  1.22 ( m, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.29-1.56 (m, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 4.45 and 4.64 ( 2 m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 7.80-7.90 (m, 4H, H arom Phth).

**<sup>13</sup>C NMR:**  $\delta$  21.0 and 21.5 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 28.5 and 28.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 50.4 and 52.2 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 82.3 and 83.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 124.4 (CH arom Phth), 130.7 (C arom Phth), 135.3 (CH arom Phth), 153.0 (N-COO<sup>t</sup>Bu), 167.2 and 167.4 (O=C-Phth).

***N*-isobutyl-*N*-*tert*-butyloxycarbonylaminophthalimide 7d:**

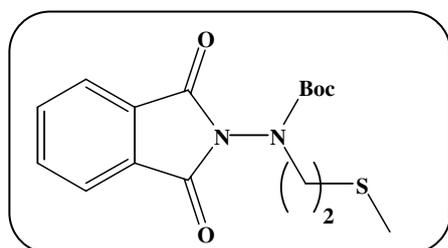


- Corresponding alcohol: 2-methyl-1-propanol
- Purification: elution gradient CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/p-ether  
40/60, 50/50, 100/0
- Formula: C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>
- Theoretical Mass: 318 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>4</sub>  
[M+Na]<sup>+</sup> m/z 341.1472, found 341.1471
- Aspect: yellow oil
- IR (ATR): 1716 cm<sup>-1</sup>, 1727 cm<sup>-1</sup>, 1749 cm<sup>-1</sup>,  
1760 cm<sup>-1</sup> (C=O)

<sup>1</sup>H NMR: δ 1.00 (d, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.32 and 1.51 (2 d, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.81 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.47 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.78-7.89 (m, 4H, H arom Phth).

<sup>13</sup>C NMR: δ 20.6 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 28.2 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 28.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 57.1 and 58.7 (NCH<sub>2</sub>), 82.5 and 83.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 124.4 (CH arom Phth), 130.6 (C arom Phth), 135.2 (CH arom Phth), 154.1 (N-COO<sup>t</sup>Bu), 166.4 (O=C-Phth).

***N*-2-(methylthio)-ethyl-*N*-*tert*-butyloxycarbonylaminophthalimide 7e:**

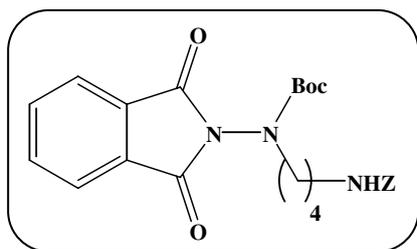


- Corresponding alcohol: 2-(methylthio)-ethanol
- Purification: eluent EtOAc/p-ether 20/80
- Formula: C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S
- Theoretical Mass: 336 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>5</sub>S  
[M+Na+MeOH]<sup>+</sup> m/z 391.1298, found 391.1285
- Aspect: Yellow Solid
- Melting Point: 98-100°C
- IR (ATR): 1713 cm<sup>-1</sup>, 1736 cm<sup>-1</sup> (C=O)

<sup>1</sup>H NMR: δ 1.32 and 1.53 (2 s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.13 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>), 2.74-2.81 (m, 2H, SCH<sub>2</sub>), 3.77-3.86 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 7.78-7.85 (m, 2H, H arom Phth), 7.88-7.92 (m, 2H, H arom Phth).

$^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  16.1 (SCH<sub>3</sub>), 28.5 and 28.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 32.1 and 32.7 (SCH<sub>2</sub>), 49.7 and 51.2 (NCH<sub>2</sub>), 83.1 and 83.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 124.6 (CH arom Phth), 130.6 (C arom Phth), 135.3 (CH arom Phth), 153.4 (N-COO<sup>t</sup>Bu), 166.0 and 166.3 (O=C-Phth).

***N*-4-(*Z*-amino)-butyl-*N*-*tert*-butyloxycarbonylaminothalimide 7f:**

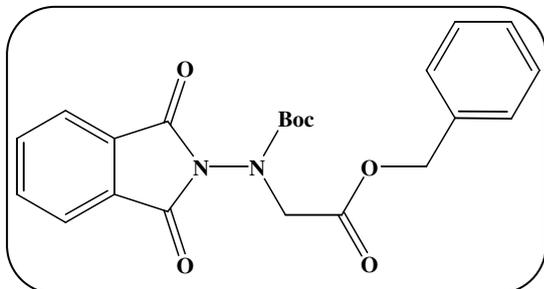


- Corresponding alcohol: 4-(*Z*-amino)-1-butanol
- Purification: eluent EtOAc/p-ether 30/70
- Formula: C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>
- Theoretical Mass: 467 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>6</sub>  
[M+Na]<sup>+</sup> m/z 490.1949, found 490.1946
- Aspect: Colorless Oil
- IR (ATR): 3346 cm<sup>-1</sup> (NH); 1704 cm<sup>-1</sup>, 1717 cm<sup>-1</sup>, 1735 cm<sup>-1</sup> (C=O)

$^1\text{H}$  NMR:  $\delta$  1.31 and 1.51 (d, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.62-1.71 (m, 4H, CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.23 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHZ), 3.68 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.95 (m, 1H, NH), 5.06 (br s, 2H, CH<sub>2</sub> of *Z* group), 7.33 (m, 5H, H arom *Z* group), 7.76-7.81 (m, 2H, H arom Phth), 7.88-7.91 (m, 2H, H arom Phth).

$^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  25.6 and 27.3 (CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.6 and 28.7(C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 41.2 (CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHZ), 49.2 (NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 67.0 (CH<sub>2</sub> of *Z* group), 82.7 and 83.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 124.4 (CH arom Phth), 128.5-129.0 (CH arom of *Z* group), 130.4 (C arom Phth), 135.2 (CH arom Phth), 137.3 (C arom of *Z* group), 153.8 (O=C of *Z* group), 157.0 (N-COO<sup>t</sup>Bu), 166.1 (O=C-Phth).

***N*-benzyloxycarbonylmethyl-*N*-tert-butyloxycarbonylaminophthalimide 7g:**



- Corresponding alcohol: Benzylglycolate
- Purification: eluent CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>
- Formula: C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>
- Theoretical Mass: 410 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>6</sub>  
[M+Na]<sup>+</sup> m/z 433.1370, found 433.1380
- Aspect: Yellow Solid
- Melting Point: 89°C
- IR (ATR): 1722 cm<sup>-1</sup>, 1735 cm<sup>-1</sup>, 1756 cm<sup>-1</sup>  
(C=O)

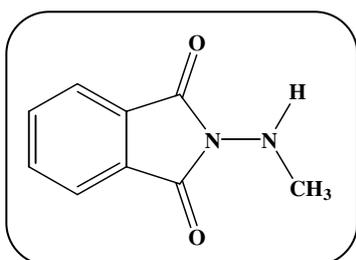
**<sup>1</sup>H NMR:** δ 1.34 and 1.43 (2 s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 4.41 and 4.51 (2 s, 2H, CH<sub>2</sub>N), 5.18 and 2.21 (2 s, 2H, COOCH<sub>2</sub>Ph), 7.30-7.39 (m, 5H, H arom Ph), 7.78-7.89 (m, 4H, H arom Phth).

**<sup>13</sup>C NMR:** δ 28.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 50.8 (CH<sub>2</sub>N), 67.8 (COOCH<sub>2</sub>Ph), 83.9 and 84.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 124.6 (CH arom Phth), 129.2 (CH arom Ph), 130.5 (C arom Phth), 135.4 (CH arom Phth), 136.0 (C arom Ph), 153.0 and 153.4 (N-COO<sup>t</sup>Bu), 165.3 and 165.6 (O=C-Phth), 168.4 (COOCH<sub>2</sub>Ph).

## *N*-alkylaminophthalimide 8

To a solution of *N*-alkyl-*N*-*tert*-butyloxycarbonylaminophthalimide **7** (1 equiv) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added trifluoroacetic acid (10 equiv, 8% in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) at 0°C. The mixture was stirred overnight (monitored by TLC). The solution was concentrated under vacuum. The residue was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, neutralized with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (pH=7) and extracted three times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated under vacuum giving a yellow solid which was immediately used without further purification.

### *N*-methylaminophthalimide **8a**:

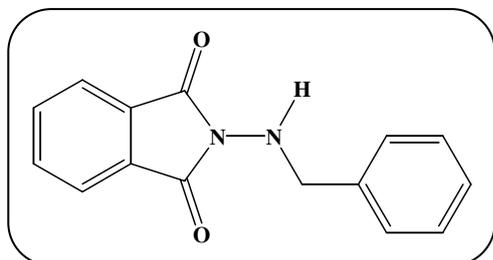


- Formula: C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Theoretical Mass: 176 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
[M+H]<sup>+</sup> m/z 177.0659, found 177.0659
- Aspect: Yellow Solid
- Melting Point: 131-132°C
- IR (NaCl): 3300 cm<sup>-1</sup> (NH); 1721 cm<sup>-1</sup>,  
1779 cm<sup>-1</sup> (C=O)

<sup>1</sup>H NMR: δ 2.86 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 4.58 (s, 1H, NH), 7.74-7.78 (m, 2H, H arom Phth), 7.81-7.85 (m, 2H, H arom Phth).

<sup>13</sup>C NMR: δ 39.3 (NCH<sub>3</sub>), 124.0 (CH arom Phth), 131.0 (C arom Phth), 134.89 (CH arom Phth), 167.0 (O=C-Phth).

**N-benzylaminophthalimide 8b :**

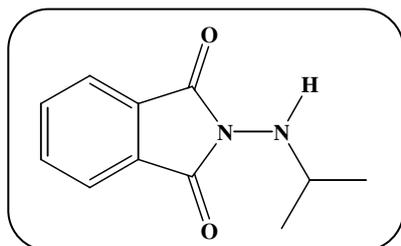


- Formula:  $C_{15}H_{12}N_2O_2$
- Theoretical Mass:  $252 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- HRMS (ESI) calculated for  $C_{15}H_{13}N_2O_2$   
[M+H]<sup>+</sup> m/z 253.0972, found 253.0963
- Aspect: Yellow Solid
- Melting Point:  $109^\circ\text{C}$
- IR (NaCl):  $3290 \text{ cm}^{-1}$  (NH);  $1774 \text{ cm}^{-1}$ ,  
 $1719 \text{ cm}^{-1}$  (C=O)

**<sup>1</sup>H NMR:**  $\delta$  4.22 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.79 (br, 1H, NH), 7.26-7.46 (m, 5H, H arom Ph), 7.70-7.84 (m, 4H, H arom Phth).

**<sup>13</sup>C NMR:**  $\delta$  55.9 (NCH<sub>2</sub>), 124.0 (CH arom Phth), 128.7 (CH arom Ph), 129.2 (CH arom Ph), 129.9 (CH arom Ph), 130.9 (C arom Phth), 134.9 (CH arom Phth), 136.7 (C arom Ph), 167.1 (O=C-Phth).

**N-isopropylaminophthalimide 8c:**

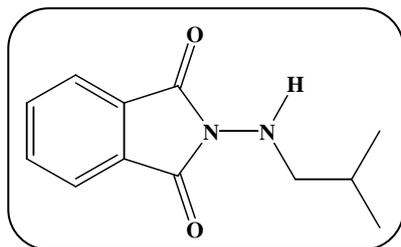


- Formula:  $C_{11}H_{12}N_2O_2$
- Theoretical Mass:  $204 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- HRMS (ESI) calculated for  $C_{11}H_{13}N_2O_2$   
[M+H]<sup>+</sup> m/z 205.0972, found 205.0972
- Aspect: Yellow Solid
- Melting Point:  $78^\circ\text{C}$
- IR (ATR):  $3280 \text{ cm}^{-1}$  (NH);  $1714 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1728 \text{ cm}^{-1}$  (C=O)

**<sup>1</sup>H NMR:**  $\delta$  1.16 (d, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.47 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.85 (br, 1H, NH), 7.73-7.88 (m, 4H, H arom Phth).

**<sup>13</sup>C NMR:**  $\delta$  21.5 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 51.8 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 124.1 (CH arom Phth), 130.8 (C arom Phth), 134.9 (CH arom Phth), 167.8 (O=C-Phth).

***N*-isobutylaminophthalimide 8d:**

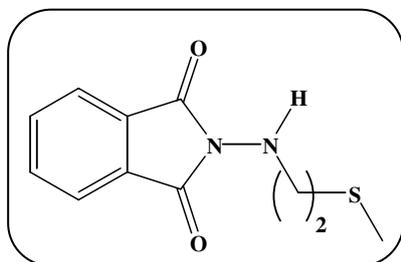


- Formula: C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Theoretical Mass: 218 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
[M+H]<sup>+</sup> m/z 219.1128, found 219.1125
- Aspect: Yellow Oil
- IR (ATR): 3304 cm<sup>-1</sup> (NH); 1719 cm<sup>-1</sup> (C=O)

**<sup>1</sup>H NMR:** δ 1.02 (d, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.83 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.86 (d, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.31 (br, 1H, NH), 7.72-7.86 (m, 4H, H arom Phth) .

**<sup>13</sup>C NMR:** δ 21.0 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 27.6 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 59.9 (NCH<sub>2</sub>), 123.9 (CH arom Phth), 130.9 (C arom Phth), 134.7 (CH arom Phth), 167.2 (O=C-Phth).

***N*-2-(methylthio)-ethyl-aminophthalimide 8e:**

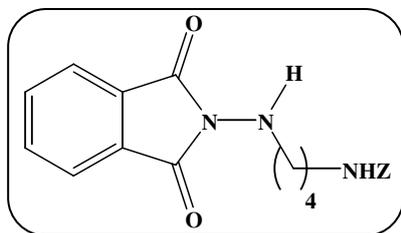


- Formula: C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S
- Theoretical Mass: 236 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S  
[M+H]<sup>+</sup> m/z 237.0692, found 237.0698
- Aspect: Yellow Solid
- Melting Point: 70°C
- IR (ATR): 3322 cm<sup>-1</sup> (NH); 1705 cm<sup>-1</sup>, 1721 cm<sup>-1</sup> (C=O)

**<sup>1</sup>H NMR:** δ 2.16 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>), 2.78 (t, 2H, SCH<sub>2</sub>), 3.24 (t, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.40 (br s, 1H, NH), 7.73- 7.77 (m, 2H, H arom Phth), 7.83-7.87 (m, 2H, H arom Phth).

**<sup>13</sup>C NMR:** δ 15.6 (SCH<sub>3</sub>), 32.8 (SCH<sub>2</sub>), 49.6 (NCH<sub>2</sub>), 124.1 (CH arom Phth), 130.9 (C arom Phth), 134.9 (CH arom Phth), 167.2 (O=C-Phth).

**N-4-(Z-amino)-butyl-aminophthalimide 8f:**

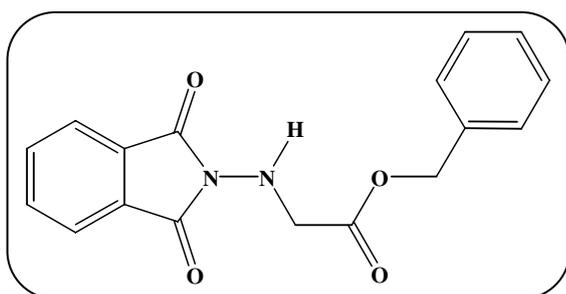


- Formula: C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>
- Theoretical Mass: 367 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
[M+H]<sup>+</sup> m/z 368.1605, found 368.1638
- Aspect: Yellow Oil
- IR (ATR): 3242 cm<sup>-1</sup>, 3264 cm<sup>-1</sup> (NH); 1694 cm<sup>-1</sup>, 1722 cm<sup>-1</sup>, 1746 cm<sup>-1</sup> (C=O)

**<sup>1</sup>H NMR:** δ 1.55-1.68 (m, 4H, CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.04-3.09 (t, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHZ), 3.22-3.24 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 5.07 (br s, 2H, CH<sub>2</sub> of Z group), 7.28-7.34 (m, 5H, H arom Z group), 7.70-7.73 (m, 2H, H arom Phth), 7.81-7.84 (m, 2H, H arom Phth).

**<sup>13</sup>C NMR:** δ 25.6 and 27.8 (CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 41.3 (CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHZ), 51.6 (NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 67.1 (CH<sub>2</sub> of Z group), 124.0 (CH arom Phth), 128.6-129.1 (CH arom of Z group), 130.8 (C arom Phth), 134.9 (CH arom Phth), 137.3 (C arom of Z group), 157.1 (O=C of Z group), 167.4 (O=C-Phth).

**N-benzyloxycarbonylmethyl-aminophthalimide 8g:**



- Formula: C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>
- Theoretical Mass: 310 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>4</sub>  
[M+Na]<sup>+</sup> m/z 333.0846, found 333.0821
- Aspect: Yellow Solid
- Melting Point: 86°C
- IR (CHCl<sub>3</sub>, 10mM): 3319 cm<sup>-1</sup> (NH); 1729 cm<sup>-1</sup>, 1747 cm<sup>-1</sup>, 1787 cm<sup>-1</sup> (C=O)

**<sup>1</sup>H NMR:** δ 3.91 (br s, 2H, CH<sub>2</sub>N), 5.21 (s, 2H, COOCH<sub>2</sub>Ph), 7.34 (m, 5H, H arom Ph), 7.72-7.75 (m, 2H, H arom Phth), 7.83-7.86 (m, 2H, H arom Phth).

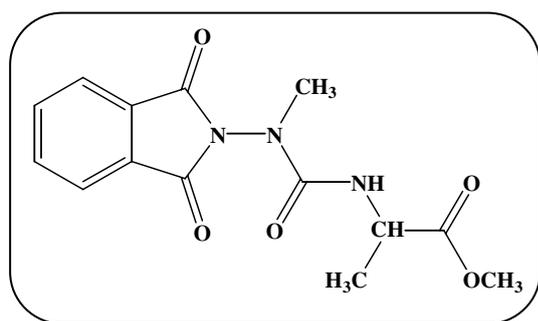
$^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  52.3 8 ( $\text{CH}_2\text{N}$ ), 67.8 ( $\text{COOCH}_2\text{Ph}$ ), 124.2 ( $\text{CH}$  arom Phth), 129.2 ( $\text{CH}$  arom Ph), 129.3 ( $\text{C}$  arom Phth), 135.0 ( $\text{CH}$  arom Phth), 135.8 ( $\text{C}$  arom Ph), 166.7 ( $\text{COOCH}_2\text{Ph}$ ), 169.7 ( $\text{O}=\text{C}$ -Phth).

## Phth-azaAla-Ala-OMe 9: Isocyanate method

### Phth-azaAla-Ala-OMe 9a:

Triphosgene (0.37 equiv) was dissolved in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  under  $\text{N}_2$ . A mixture of alanine methyl ester hydrochloride (1 equiv) and DIEA (2.2 equiv) in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was slowly dropwise added to the stirred solution of triphosgene. After a further 10 min stirring, a solution of *N*-alkylaminophthalmimide **8** (1 equiv) and DIEA (1.5 equiv) in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was added in one portion. The reaction mixture was stirred overnight at RT, evaporated to dryness, diluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , washed with aqueous HCl 1N, aqueous  $\text{NaHCO}_3$  1N and brine, dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/p-ether 50/50).

**Caution:** Phosgene is released. So, a trap of water must be installed at the exit of the apparatus. Finally, it gives  $\text{CO}_2$  and HCl.



- Formula:  $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_5$
- Theoretical Mass:  $305 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- HRMS (ESI) calculated for  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{NaO}_6$   
 $[\text{M}+\text{Na}+\text{MeOH}]^+$  m/z 360.1166, found 360.1149
- Aspect: White Solid
- Melting Point:  $136\text{-}137^\circ\text{C}$
- IR (ATR):  $3318 \text{ cm}^{-1}$ ,  $3358 \text{ cm}^{-1}$  (NH);  $1649 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1676 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1725 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1740 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1750 \text{ cm}^{-1}$  (C=O)

$^1\text{H}$  NMR:  $\delta$  1.45 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.31 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.74 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ), 4.49 (q, 1H, CH), 5.38 (d, 1H, NH), 7.81-7.86 (m, 2H, H arom Phth), 7.92-7.95 (m, 2H, H arom Phth).

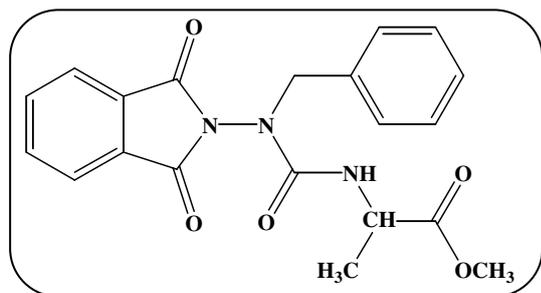
$^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  19.6 (CH<sub>3</sub>), 37.1 (NCH<sub>3</sub>), 50.2 (CH), 53.0 (COOCH<sub>3</sub>), 127.8 (CH arom Phth), 130.6 (C arom Phth), 135.7 (CH arom Phth), 156.2 (O=C-NH), 165.8 (O=C-Phth), 174.6 (COOCH<sub>3</sub>).

### Phth-azaAA-Ala-OMe 9: Acid chloride method

Triphosgene (0.37 equiv) was dissolved in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> under N<sub>2</sub>. A mixture of *N*-alkyl-aminophthalimide **8** (1 equiv) and DIEA (2.2 equiv) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was slowly dropwise added to the stirred solution of triphosgene. After a further 10 min stirring, a solution of alanine methyl ester hydrochloride (1 equiv) and DIEA (1.5 equiv) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added in one portion. The reaction mixture was stirred overnight at RT, evaporated to dryness, diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, washed with aqueous HCl 1N, aqueous NaHCO<sub>3</sub> 1N and brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated.

**Caution:** Phosgene is released. So, a trap of water must be installed at the exit of the apparatus. Finally, it gives CO<sub>2</sub> and HCl.

### Phth-azaPhe-Ala-OMe 9b:

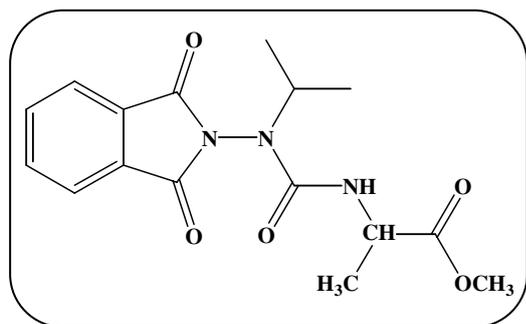


- Purification: Trituration with Et<sub>2</sub>O
- Formula: C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>
- Theoretical Mass: 381 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>6</sub>  
[M+Na+MeOH]<sup>+</sup> m/z 436.1479, found 436.1457
- Aspect: White Solid
- Melting Point: 160°C
- IR (ATR): 3353 cm<sup>-1</sup> (NH); 1647 cm<sup>-1</sup>, 1667 cm<sup>-1</sup>, 1736 cm<sup>-1</sup>, 1751 cm<sup>-1</sup> (C=O)

$^1\text{H}$  NMR:  $\delta$  1.36 and 1.39 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.73 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.54 (m, 1H, CH), 4.89 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.35 (d, 1H, NH), 7.25 (m, 5H, H arom Ph), 7.74-7.77 (m, 2H, H arom Phth), 7.81-7.83 (m, 2H, H arom Phth).

**$^{13}\text{C}$  NMR:**  $\delta$  19.5 (CH<sub>3</sub>), 50.1 (CH), 53.5 (NCH<sub>2</sub>), 53.1 (COOCH<sub>3</sub>), 124.6 (CH arom Phth), 128.8 (CH arom Ph), 129.1 (CH arom Ph), 129.6 (C arom Phth), 135.3 (C arom Ph), 135.5 (CH arom Phth), 156.2 (O=C-NH), 165.9 (O=C-Phth), 174.4 (COOCH<sub>3</sub>).

**Phth-azaVal-Ala-OMe 9c:**

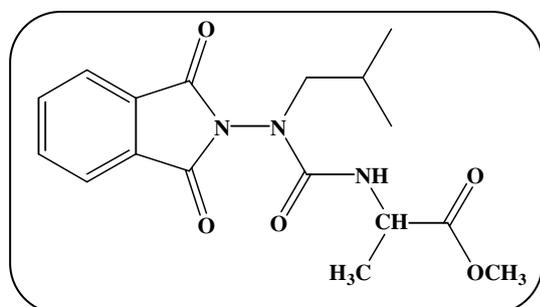


- Purification: Trituration with Et<sub>2</sub>O
- Formula: C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>
- Theoretical Mass: 333 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>  
[M+MeOH+H]<sup>+</sup> m/z 366.1660, found 366.1699
- Aspect: White Solid
- Melting Point: 172°C
- IR (ATR): 3358 cm<sup>-1</sup> (NH); 1665 cm<sup>-1</sup>, 1709 cm<sup>-1</sup>, 1717 cm<sup>-1</sup>, 1739 cm<sup>-1</sup> (C=O)

**$^1\text{H}$  NMR:**  $\delta$  1.26 (m, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.38 and 1.40 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.72 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.53 (m, 2H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> and CH), 5.25 and 5.27 (d, 1H, NH), 7.81-7.84 (m, 2H, H arom Phth), 7.92-7.94 (m, 2H, H arom Phth).

**$^{13}\text{C}$  NMR:**  $\delta$  19.7 (CH<sub>3</sub>), 21.4 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 50.0 (CH), 51.4 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 53.1 (COOCH<sub>3</sub>), 124.7 (CH arom Phth), 130.3 (C arom Phth), 135.6 (CH arom Phth), 155.0 (O=C-NH), 167.2 (O=C-Phth), 174.7 (COOCH<sub>3</sub>).

**Phth-azaLeu-Ala-OMe 9d:**

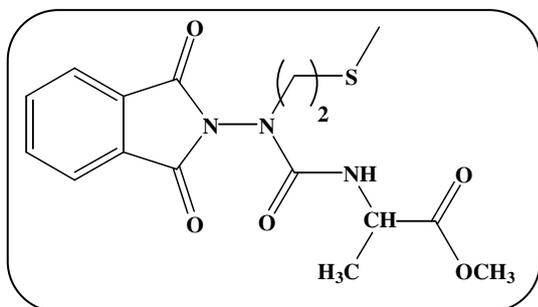


- Purification: Precipitation with p-ether from CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>
- Formula: C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>
- Theoretical Mass: 347 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>  
[M+MeOH+H]<sup>+</sup> m/z 380.1816, found 380.1858
- Aspect: Yellow Solid
- Melting Point: 140°C
- IR (ATR): 3353 cm<sup>-1</sup> (NH); 1670 cm<sup>-1</sup>, 1717 cm<sup>-1</sup>, 1722 cm<sup>-1</sup>, 1738 cm<sup>-1</sup> (C=O)

**<sup>1</sup>H NMR:**  $\delta$  1.02 (d, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.38 and 1.40 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.75 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.48 and 3.50 (d, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.72 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.49 (m, 1H, CH), 5.34 (d, 1H, NH), 7.80-7.83 (m, 2H, H arom Phth), 7.91- 7.94 (m, 2H, H arom Phth).

**<sup>13</sup>C NMR:**  $\delta$  19.6 (CH<sub>3</sub>), 20.7 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 28.1 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 50.1 (CH), 53.1 (COOCH<sub>3</sub>), 57.6 (NCH<sub>2</sub>), 124.7 (CH arom Phth), 130.4 (C arom Phth), 135.6 (CH arom Phth), 156.2 (O=C-NH), 166.1 (O=C-Phth), 174.6 (COOCH<sub>3</sub>).

**Phth-azaMet-Ala-OMe 9e:**



- Purification: Trituration with Et<sub>2</sub>O

- Formula: C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S

- Theoretical Mass: 365 g.mol<sup>-1</sup>

- HRMS (ESI) calculated for C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S

[M+MeOH+H]<sup>+</sup> m/z 398.1380, found 398.1350

- Aspect: White Solid

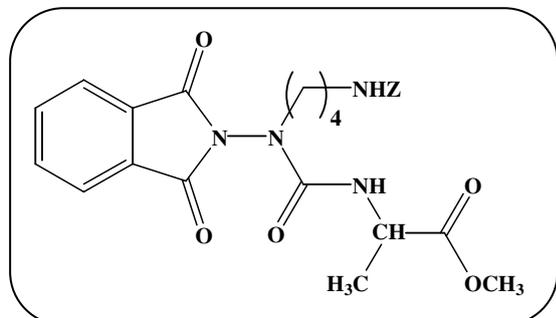
- Melting Point: 138°C

- IR (ATR): 3340 cm<sup>-1</sup> (NH); 1674 cm<sup>-1</sup>, 1708 cm<sup>-1</sup>, 1716 cm<sup>-1</sup>, 1739 cm<sup>-1</sup> (C=O)

**<sup>1</sup>H NMR:**  $\delta$  1.39 and 1.41 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.17 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>), 2.77 (t, 2H, SCH<sub>2</sub>), 3.72 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.89 (t, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.49 (m, 1H, CH), 5.58 (d, 1H, NH), 7.83- 7.85 (m, 2H, H arom Phth), 7.94-7.95 (m, 2H, H arom Phth).

**<sup>13</sup>C NMR:**  $\delta$  16.4 (SCH<sub>3</sub>), 19.5 (CH<sub>3</sub>), 32.9 (SCH<sub>2</sub>), 50.2 (CH), 50.3 (NCH<sub>2</sub>), 53.2 (COOCH<sub>3</sub>), 124.8 (CH arom Phth), 130.4 (C arom Phth), 135.7 (CH arom Phth), 155.7 (O=C-NH), 166.0 (O=C-Phth), 174.4 (COOCH<sub>3</sub>).

**Phth-azaLys(Z)-Ala-OMe 9f:**



- Purification: Column chromatography on silica Gel; elution gradient EtOAc/p-ether 50/50, 80/20, 100/0
- Formula:  $C_{25}H_{28}N_4O_7$
- Theoretical Mass:  $496 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- HRMS (ESI) calculated for  $C_{25}H_{28}N_4NaO_7$   $[M+Na]^+$  m/z 519.1850, found 519.1831
- Aspect: Compact Yellow Oil
- IR (ATR):  $3340 \text{ cm}^{-1}$  (NH);  $1659 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1703 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1735 \text{ cm}^{-1}$  (C=O)

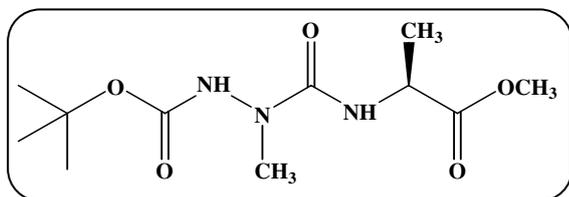
**$^1\text{H}$  NMR:**  $\delta$  1.38 and 1.41 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.62 (br m, 4H,  $\text{CH}_2(\underline{\text{CH}_2})_2\text{CH}_2$ ), 3.17-3.23 (m, 2H,  $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\underline{\text{CH}_2}\text{NHZ}$ ), 3.67-3.74 (s and m, 5H,  $\text{COOCH}_3$  and  $\text{PhthNCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$ ), 4.46-4.51 (m, 1H, CH), 4.92 (br s, 1H, NH), 5.04 (br s, 2H,  $\text{CH}_2$  of Z group), 5.45 and 5.47 (d, 1H, NH), 7.29-7.35 (m, 5H, H arom Z group), 7.79-7.82 (m, 2H, H arom Phth), 7.89-7.92 (m, 2H, H arom Phth).

**$^{13}\text{C}$  NMR:**  $\delta$  19.4 ( $\text{CH}_3$ ), 25.7 and 27.5 ( $\text{CH}_2(\underline{\text{CH}_2})_2\text{CH}_2$ ), 41.0 ( $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\underline{\text{CH}_2}\text{NHZ}$ ), 49.4 ( $\text{PhthNCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$ ), 50.1 (CH), 53.1 ( $\text{COO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 67.2 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2$  of Z group), 124.8 (CH arom Phth), 128.7-129.1 (CH arom of Z group), 130.4 (C arom Phth), 135.6 (CH arom Phth), 137.3 (C arom of Z group), 155.9 (O=C of Z group), 157.3 (O=C-NH), 166.2 (O=C-Phth), 174.5 ( $\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$ ).

## Precursor Boc-azaAA-Ala-OMe 5

To a solution of Phth-azaAA-Ala-OCH<sub>3</sub> **9** (1 equiv) in THF was added pyrrolidine (3 equiv) at RT. The mixture was stirred at RT until completion (overnight, monitored by TLC). The solvent and the excess of amine were removed under vacuum. The yellow solid obtained was dissolved in THF. Then Boc<sub>2</sub>O (1.5 equiv) and a catalytic amount of DMAP (0.2 equiv) were added. The mixture was stirred at RT until completion (overnight, monitored by TLC). The solvent was removed under vacuum, the residue was dissolved in THF and a freshly prepared solution of methylamine (1.5 equiv, 2M in MeOH) was added at RT. After a night (monitored by TLC), the solvent and the excess of amine were removed under vacuum and the residue was purified by column chromatography on silica gel.

## Boc-azaAla-Ala-OMe 5a:



- Purification: eluent EtOAc/p-ether 70/30

- Formula: C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

- Theoretical Mass: 275 g.mol<sup>-1</sup>

- HRMS (ESI) calculated for C<sub>11</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

[M+H]<sup>+</sup> m/z 276.1554, found 276.1571

- Aspect: White Solid

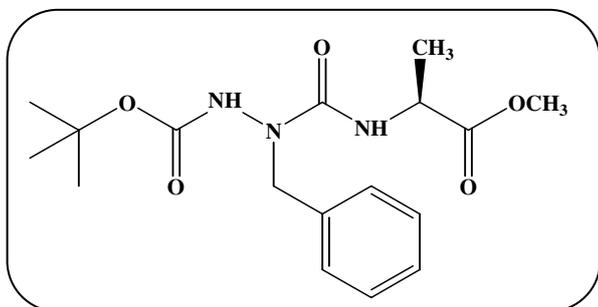
- Melting Point: 84°C

- IR (CHCl<sub>3</sub>, 10mM): 3397 cm<sup>-1</sup>, 3437 cm<sup>-1</sup>  
(NH); 1674 cm<sup>-1</sup>, 1712 cm<sup>-1</sup>, 1720 cm<sup>-1</sup>,  
1742 cm<sup>-1</sup> (C=O)

<sup>1</sup>H NMR: δ 1.39 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.49 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.11 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.74 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.48 (q, 1H, CH), 5.87 (d, 1H, NH), 6.49 (br s, 1H, NHBoc).

<sup>13</sup>C NMR: δ 19.4 (CH<sub>3</sub>), 28.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 36.3 (NCH<sub>3</sub>), 49.7 (CH), 52.9 (COOCH<sub>3</sub>), 82.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 155.2 (COO<sup>t</sup>Bu), 158.1 (O=C-NH), 174.9 (COOCH<sub>3</sub>).

**Boc-azaPhe-Ala-OMe 5b:**

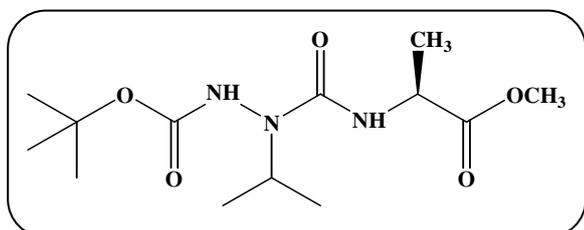


- Purification: eluent EtOAc/p-ether 50/50
- Formula: C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>
- Theoretical Mass: 351 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>  
[M+H]<sup>+</sup> m/z 352.1867, found 352.1878
- Aspect: White Solid
- Melting Point: 90-91°C
- IR (ATR): 3207 cm<sup>-1</sup>, 3415 cm<sup>-1</sup> (NH); 1647 cm<sup>-1</sup>, 1723 cm<sup>-1</sup>, 1732 cm<sup>-1</sup> (C=O)

**<sup>1</sup>H NMR:** δ 1.41-1.50 (m, 12H, CH<sub>3</sub> and C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.75 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.49-4.59 (m, 1H, CH), 4.85 (br s, 2H, NCH<sub>2</sub>), 5.91 and 5.94 (d, 1H, NH), 6.00 (br s, 1H, NHBoc), 7.25-7.35 (m, 5H, H arom Ph).

**<sup>13</sup>C NMR:** δ 19.7 (CH<sub>3</sub>), 28.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 49.9 (CH), 51.3 (NCH<sub>2</sub>), 53.0 (COOCH<sub>3</sub>), 83.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 128.5 (CH arom Ph), 129.6 (CH arom Ph), 136.8 (C arom Ph), 154.9 (COO<sup>t</sup>Bu), 157.6 (O=C-NH), 174.8 (COOCH<sub>3</sub>).

**Boc-azaVal-Ala-OMe 5c:**

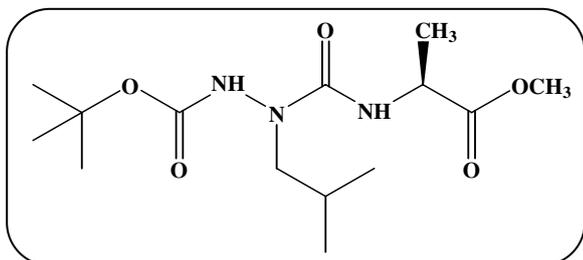


- Purification: eluent EtOAc/p-ether 50/50
- Formula: C<sub>13</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>
- Theoretical Mass: 303 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for C<sub>13</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>5</sub>  
[M+Na]<sup>+</sup> m/z 326.1686, found 326.1691
- Aspect: White Solid
- Melting Point: 82-83°C
- IR (ATR): 3203 cm<sup>-1</sup>, 3446 cm<sup>-1</sup> (NH); 1633 cm<sup>-1</sup>, 1736 cm<sup>-1</sup>, 1745 cm<sup>-1</sup> (C=O)

**$^1\text{H}$  NMR:**  $\delta$  1.11 (m, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.38 and 1.40 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.49 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 3.73 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ), 4.47-4.52 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 4.61-4.66 (m, 1H, CH), 5.68 (br s, 1H, NH), 6.28 (br s, 1H, NHBoc).

**$^{13}\text{C}$  NMR:**  $\delta$  19.8 ( $\text{CH}_3$ ), 21.2 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 21.4 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 28.7 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 48.7 (CH), 49.7 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 52.9 ( $\text{COOCH}_3$ ), 82.5 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 157.2 ( $\text{O}=\text{C}-\text{NH}$ ), 175.1 ( $\text{COOCH}_3$ ).

**Boc-azaLeu-Ala-OMe 5d:**



- Purification: eluent EtOAc/p-ether 40/60

- Formula:  $\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_5$

- Theoretical Mass:  $317 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

- HRMS (ESI) calculated for  $\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{NaO}_5$   
 $[\text{M}+\text{Na}]^+$  m/z 340.1842, found 340.1888

- Aspect: White Solid

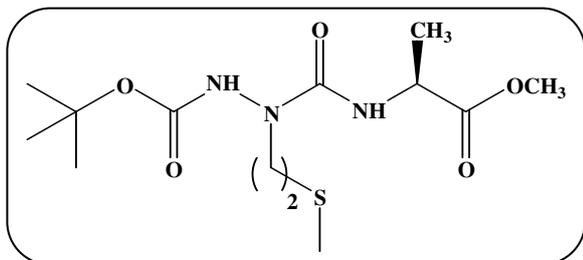
- Melting Point:  $102-104^\circ\text{C}$

- IR (ATR):  $3198 \text{ cm}^{-1}$ ,  $3433 \text{ cm}^{-1}$  (NH);  $1641 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1735 \text{ cm}^{-1}$  (C=O)

**$^1\text{H}$  NMR:**  $\delta$  0.87-0.93 (m, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.38 and 1.40 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.49 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.81-1.90 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 3.35 (br s, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.73 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ), 4.49 (m, 1H, CH), 5.80 and 5.83 (d, 1H, NH), 6.34 (br s, 1H, NHBoc).

**$^{13}\text{C}$  NMR:**  $\delta$  19.7 ( $\text{CH}_3$ ), 20.7 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 27.3 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 28.8 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 49.8 (CH), 52.9 ( $\text{COOCH}_3$ ), 56.1 ( $\text{NCH}_2$ ), 82.9 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 157.9 ( $\text{O}=\text{C}-\text{NH}$ ), 174.9 ( $\text{COOCH}_3$ ).

**Boc-azaMet-Ala-OMe 5e:**



- Purification: eluent EtOAc/p-ether 50/50

- Formula:  $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$

- Theoretical Mass:  $335 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

- HRMS (ESI) calculated for  $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{NaO}_5\text{S}$   
 $[\text{M}+\text{Na}]^+$  m/z 358.1407, found 358.1403

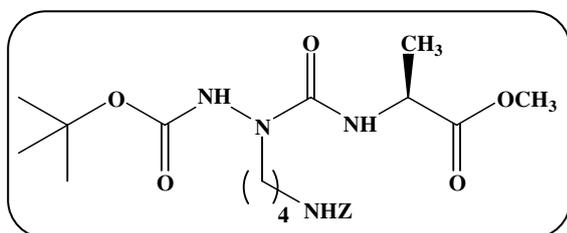
- Aspect: Colorless Oil

- IR (ATR):  $3260 \text{ cm}^{-1}$  (NH);  $1649 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1717 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1739 \text{ cm}^{-1}$  (C=O)

**<sup>1</sup>H NMR:**  $\delta$  1.39 and 1.41 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.50 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.12 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>), 2.72 (t, 2H, SCH<sub>2</sub>), 3.67-3.81 (s and br s, 5H, COOCH<sub>3</sub> and NCH<sub>2</sub>), 4.48 (q, 1H, CH), 5.85 and 5.88 (d, 1H, NH), 6.67 (br s, 1H, NHBoc).

**<sup>13</sup>C NMR:**  $\delta$  15.6 (SCH<sub>3</sub>), 19.3 (CH<sub>3</sub>), 28.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 32.5 (SCH<sub>2</sub>), 47.5 (NCH<sub>2</sub>), 49.6 (CH), 52.8 (COOCH<sub>3</sub>), 82.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 155.1 (COO<sup>t</sup>Bu), 157.4 (O=C-NH), 174.6 (COOCH<sub>3</sub>).

**Boc-azaLys(Z)-Ala-OMe 5f:**



- Purification: Elution gradient EtOAc/p-ether 50/50 and 70/30

- Formula: C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>

- Theoretical Mass: 466 g.mol<sup>-1</sup>

- HRMS (ESI) calculated for C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>7</sub> [M+Na]<sup>+</sup> m/z 489.2320, found 489.2282

- Aspect: Colorless Oil

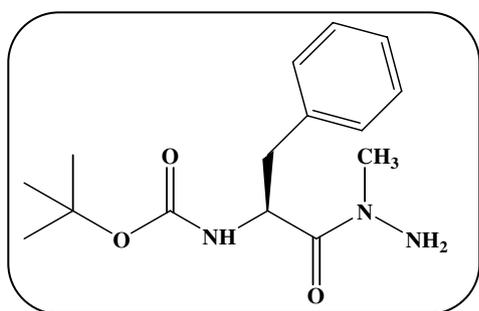
- IR (ATR): 3318 cm<sup>-1</sup> (NH); 1652 cm<sup>-1</sup>, 1721 cm<sup>-1</sup> (C=O)

**<sup>1</sup>H NMR:**  $\delta$  1.37 and 1.41 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.48 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.55-1.64 (br m, 4H, CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.19-3.21 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHZ), 3.54 (br s, 2H, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.73 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.44-4.49 (q, 1H, CH), 4.96 (br s, 1H, NH), 5.09 (br s, 2H, CH<sub>2</sub> of Z group), 5.78 and 5.80 (d, 1H, NH), 6.62 (br s, 1H, NH), 7.27- 7.35 (m, 5H, H arom Z group).

**<sup>13</sup>C NMR:**  $\delta$  19.6 (CH<sub>3</sub>), 24.9 and 27.8 (CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 41.3 (CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHZ), 48.5 (NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 49.8 (CH), 52.9 (COOCH<sub>3</sub>), 67.3 (CH<sub>2</sub> of Z group), 82.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 128.7 and 129.1 (CH arom of Z group), 137.3 (C arom of Z group), 155.2 (COO<sup>t</sup>Bu), 157.3 (O=C of Z group), 157.9 (O=C-NH), 174.9 (COOCH<sub>3</sub>).

## Compounds 10

To a stirred solution of Boc-Phe-OH (1 equiv) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  were successively added at  $0^\circ\text{C}$  EDC (1 equiv), HOBt (1 equiv), methylhydrazine (1 equiv) and finally DIEA (1 equiv). After a night at RT, the mixture was diluted with aqueous HCl 1N under vigorously stirring (pH=2). The HOBt.HCl salt that precipitates was separated by filtration and the organic layer was washed with water, aqueous  $\text{NaHCO}_3$  0.5N, brine, dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated. The residue was purified by column chromatography on silica gel.



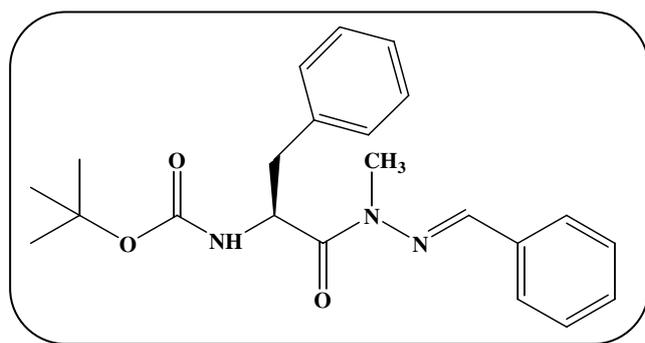
- Purification: eluent EtOAc/p-ether 70/30 ( $\text{I}_2$  revelation)
- Formula:  $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3$
- Theoretical Mass:  $293 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- Aspect: White foam
- IR (ATR):  $3340 \text{ cm}^{-1}$  (NH);  $1661 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1693 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1712 \text{ cm}^{-1}$  (C=O)

$^1\text{H NMR}$ :  $\delta$  1.39 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 2.88-2.97 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.06 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.28 (br s, 1H, CH), 5.30 and 5.51 (2 m, 2H,  $2^*\text{NH}$ ), 7.19-7.29 (m, 5H, H arom Ph).

$^{13}\text{C NMR}$ :  $\delta$  30.3 ( $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ), 39.2 ( $\text{NCH}_3$ ), 40.8 ( $\text{CH}_2$ ), 52.3 (CH), 80.1 ( $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$ ), 127.3 and 128.8 and 129.9 (CH arom Ph), 137.7 (C arom Ph), 155.9 ( $\underline{\text{C}}\text{OO}^t\text{Bu}$ ), 174.6 ( $\text{O}=\text{C}-\text{N}$ ).

## Hydrazone 11

To benzaldehyde (1.5 equiv) dissolved in EtOH, hydrazine **10** was added in one portion and the solution was stirred overnight at RT. Evaporation of the solvent gave the crude hydrazone which was purified by column chromatography on silica gel.



- Purification: eluent EtOAc/p-ether 20/80
- Formula: C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>
- Theoretical Mass: 384 g.mol<sup>-1</sup>
- Aspect: White solid
- Melting Point: 82°C
- IR (ATR): 3371 cm<sup>-1</sup> (NH); 1667 cm<sup>-1</sup>, 1679 cm<sup>-1</sup>, 1682 cm<sup>-1</sup>, 1705 cm<sup>-1</sup> (C=O)

**<sup>1</sup>H NMR:**  $\delta$  1.40 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.98-3.02 and 3.13-3.17 (2 m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.40 and 5.43 (d, 1H, NH), 5.74 (m, 1H, CH), 7.14-7.24 (m, 5H, H arom Phe), 7.39-7.45 (m, 3H, H arom Ph), 7.66-7.71 (m, 3H, H arom Ph and CH=N).

**<sup>13</sup>C NMR:**  $\delta$  28.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.0 (NCH<sub>3</sub>), 40.1 (CH<sub>2</sub>), 53.2 (CH), 80.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 127.2 and 128.0 and 128.8 and 129.0 and 129.4 and 130.1 and 130.7 and 130.8 (CH arom Ph and CH arom Phe), 134.9 (C arom Phe), 137.5 (C arom Ph), 140.7 (CH=N), 155.9 (COO<sup>t</sup>Bu), 173.9 (O=C-N).

## 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimer 12

### ***Boc deprotection:***

To a stirred solution of Boc protected compound (1 equiv) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , trifluoroacetic acid (10 equiv) was added at  $0^\circ\text{C}$ . The resulting solution was stirred until completion monitored by TLC (4h to 12h) and concentrated under vacuum. The trifluoroacetic acid was coevaporated with toluene (3 times),  $\text{Et}_2\text{O}$  (twice) and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The residue was used in coupling reaction without further purification.

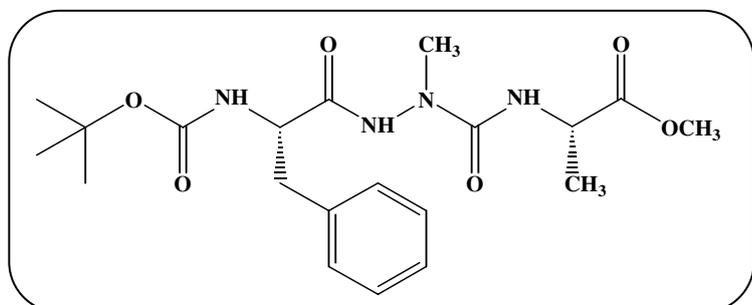
### ***Acid fluoride preparation:***

To a stirred solution of Boc-Phe-OH (1.5 equiv) in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and pyridine (1.5 equiv) kept under a  $\text{N}_2$  atmosphere was slowly dropwise added cyanuric fluoride (3 equiv) at  $-20^\circ\text{C}$ . The solution was stirred at  $-10^\circ\text{C}$  during 1 or 2 hours and a precipitate or emulsion formed and gradually increased amount. Crushed ice was added along with an additional  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The organic layer was separated and the aqueous layer extracted with cold  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The combined organics layers were washed with ice-cold water and dried over  $\text{MgSO}_4$ , and the solvent was removed with a rotary evaporator at room temperature.

### ***Coupling reaction:***

Boc-Phe-F (1.5 equiv) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was added dropwise to a stirred solution of  $\text{CF}_3\text{COOH}$ , H-azaAA-Ala-OMe (1 equiv) in an heterogeneous medium of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and  $\text{NaHCO}_3$  (2 equiv) in  $\text{H}_2\text{O}$  (pH=7). The mixture was stirred at RT overnight. After washing of the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  solution twice with HCl 1N,  $\text{NaHCO}_3$  1N and saturated NaCl, it was dried over  $\text{MgSO}_4$  and the solvent was removed under vacuum.

**Boc-Phe-azaAla-Ala-OMe 12a:**

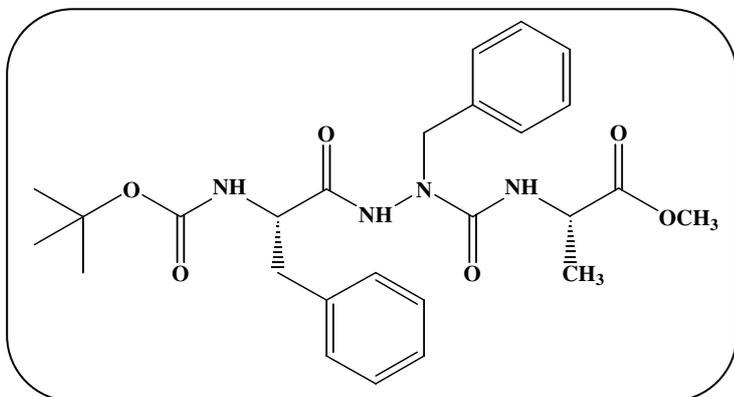


- Purification: Precipitation with p-ether from CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>
- Formula: C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>
- Theoretical Mass: 422 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>6</sub> [M+Na]<sup>+</sup> m/z 445.2058, found 445.2055
- Aspect: White foam
- IR (CHCl<sub>3</sub>, 10mM): 3375 cm<sup>-1</sup>, 3439 cm<sup>-1</sup> (NH); 1703 cm<sup>-1</sup>, 1735 cm<sup>-1</sup>; 1743 cm<sup>-1</sup>, 1783 cm<sup>-1</sup> (C=O)

**<sup>1</sup>H NMR:** δ 1.36 and 1.38 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.41 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.91 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.03-3.11 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.71 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.11 (m, 1H, CH), 4.39 (m, 1H, CH), 4.99 and 5.01 (d, 1H, NHBoc), 6.01 (br s, 1H, NH), 7.21-7.36 (m, 5H, CH arom Ph), 7.6 (br s, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C NMR:** δ 18.6 (CH<sub>3</sub>), 28.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 36.2 (NCH<sub>3</sub>), 38.1 (CH<sub>2</sub>), 50.1 (CH), 52.9 (COOCH<sub>3</sub>), 56.1 (CH), 81.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 127.6 (CH arom Ph), 129.6 (CH arom Ph), 130.5 (CH arom Ph), 136.6 (C arom Ph), 156.5 (COO<sup>t</sup>Bu), 157.9 (O=C-NH), 171.3 (O=C-NH), 175.2 (COOCH<sub>3</sub>).

**Boc-Phe-azaPhe-Ala-OMe 12b:**

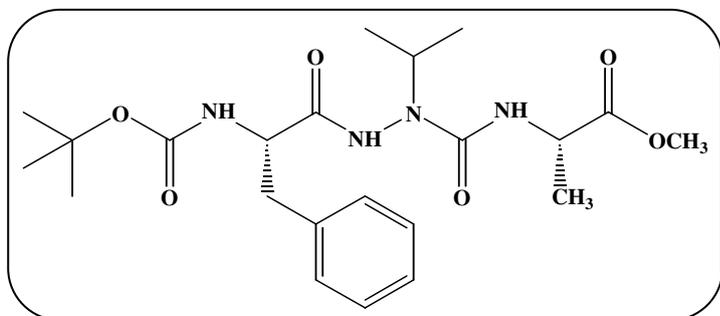


- Purification: Column chromatography on silica gel; eluent EtOAc/p-ether 50/50
- Formula: C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>
- Theoretical Mass: 498 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>6</sub> [M+Na]<sup>+</sup> m/z 521.2371, found 521.2344
- Aspect: White Solid
- Melting Point: 149-150°C
- IR (ATR): 3220 cm<sup>-1</sup>, 3344 cm<sup>-1</sup> (NH); 1651 cm<sup>-1</sup>, 1666 cm<sup>-1</sup>, 1698 cm<sup>-1</sup>, 1714 cm<sup>-1</sup>, 1728 cm<sup>-1</sup> (C=O)

**<sup>1</sup>H NMR:** δ 1.37-1.45 (m, 12H, CH<sub>3</sub> and C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.88-2.95 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.01-3.08 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.71 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.02 (m, 1H, CH), 4.28 (br s, 1H, NHBoc), 4.45-4.50 (m, 1H, CH), 4.88-4.95 (br m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 6.18 (br s, 1H, NH), 7.06-7.30 (m, 10H, H arom Ph), 7.68 (br s, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C NMR:** δ 18.7 (CH<sub>3</sub>), 28.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 37.9 (CH<sub>2</sub>), 50.1 (CH), 52.0 (NCH<sub>2</sub>), 52.9 (COOCH<sub>3</sub>), 56.0 (CH), 81.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 128.1 (CH arom Ph), 128.3 (CH arom Ph), 129.2 (CH arom Ph), 129.4 (CH arom Ph), 129.7 (CH arom Ph), 129.9 (CH arom Ph), 136.5 (C arom Ph), 137.1 (C arom Ph), 156.5 (COO<sup>t</sup>Bu), 157.6 (O=C-NH), 171.1 (O=C-NH), 174.9 (COOCH<sub>3</sub>).

**Boc-Phe-azaVal-Ala-OMe 12c:**

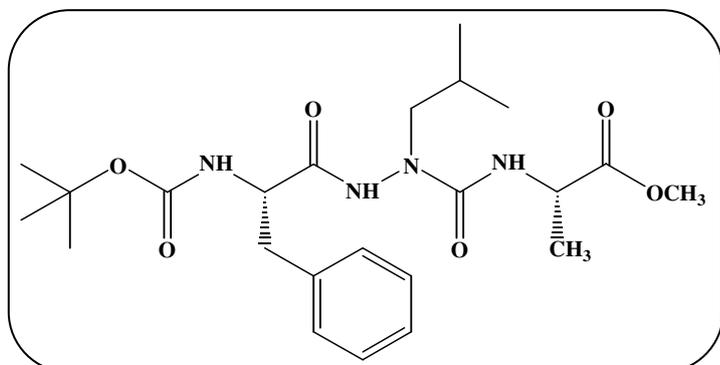


- Purification: Column chromatography on silica gel ; eluent EtOAc
- Formula:  $C_{22}H_{34}N_4O_6$
- Theoretical Mass:  $450 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- HRMS (ESI) calculated for  $C_{22}H_{34}N_4NaO_6$   $[M+Na]^+$  m/z 473.2371, found 473.2392
- Aspect: Colorless Oil
- IR (ATR):  $3251 \text{ cm}^{-1}$ ,  $3340 \text{ cm}^{-1}$  (NH);  $1649 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1684 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1746 \text{ cm}^{-1}$  (C=O)

**$^1\text{H}$  NMR:**  $\delta$  1.14-1.16 (m, 6H,  $\text{CH}(\underline{\text{CH}}_3)_2$ ), 1.41 (m, 12H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$  and  $\text{CH}_3$ ), 3.10 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.75 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ), 4.47-4.62 (m, 3H, 2 CH and  $\underline{\text{CH}}(\text{CH}_3)_2$ ), 5.02 and 5.04 (d, 1H, NH), 5.51 and 5.54 (d, 1H, NH), 7.25-7.39 (m, 5H, H arom Ph), 7.77 (br s, 1H, NH).

**$^{13}\text{C}$  NMR:**  $\delta$  19.1 ( $\text{CH}_3$ ), 20.0 ( $\text{CH}(\underline{\text{CH}}_3)_2$ ), 20.5 ( $\text{CH}(\underline{\text{CH}}_3)_2$ ), 28.9 ( $\text{C}(\underline{\text{CH}}_3)_3$ ), 37.9 ( $\text{CH}_2$ ), 48.8 (CH), 50.1 ( $\text{N}\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$ ), 52.9 ( $\text{COO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 56.2 (CH), 81.6 ( $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$ ), 128.1 (CH arom Ph), 129.7 (CH arom Ph), 129.9 (CH arom Ph), 136.5 (C arom Ph), 156.7 ( $\underline{\text{C}}\text{OO}^t\text{Bu}$ ), 157.3 ( $\text{O}=\text{C}-\text{NH}$ ), 172.2 ( $\text{O}=\text{C}-\text{NH}$ ), 175.4 ( $\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$ ).

**Boc-Phe-azaLeu-Ala-OMe 12d:**



- Purification: Precipitation with p-ether from CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>
- Formula: C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>
- Theoretical Mass: 464 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>6</sub> [M+Na]<sup>+</sup> m/z 487.2527, found 487.2532
- Aspect: White Solid
- Melting Point: 156-158°C
- IR (ATR): 3304 cm<sup>-1</sup> (NH); 1645 cm<sup>-1</sup>, 1653 cm<sup>-1</sup>, 1692 cm<sup>-1</sup>, 1736 cm<sup>-1</sup> (C=O)

**<sup>1</sup>H NMR:** δ 0.74-0.77 (m, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.32 and 1.36 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.42 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.84 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.97-3.08 and 3.27-3.34 (2 m, 4H, CH<sub>2</sub> and NCH<sub>2</sub>), 3.70 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.09 (m, 1H, CH), 4.39-4.44 (m, 1H, CH), 4.99 and 5.02 (d, 1H, NHBoc), 6.06 (br s, 1H, NH), 7.21-7.35 (m, 5H, H arom Ph), 7.66 (br s, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C NMR:** δ 18.7 (CH<sub>3</sub>), 20.4 and 20.6 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 27.0 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 28.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 37.9 (CH<sub>2</sub>), 50.0 (CH), 52.9 (COOCH<sub>3</sub>), 55.9 (NCH<sub>2</sub>), 56.2 (CH), 81.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 128.1 (CH arom Ph), 129.3 (CH arom Ph), 129.7 (CH arom Ph), 128.9 (CH arom Ph), 136.4 (C arom Ph), 156.6 (COO<sup>t</sup>Bu), 157.7 (O=C-NH), 171.0 (O=C-NH), 175.2 (COOCH<sub>3</sub>).

## 2:1[ $\alpha$ /aza]-oligomer

After successively deprotection, all the 2:1[ $\alpha$ /aza]-hexamer, 2:1[ $\alpha$ /aza]-nonamer and 2:1[ $\alpha$ /aza]-dodecamer were obtained by classical peptidic coupling.

### ***Boc deprotection:***

To a stirred solution of Boc protected compound (1 equiv) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , trifluoroacetic acid (10 equiv) was added at  $0^\circ\text{C}$ . The resulting solution was stirred until completion monitored by TLC (4h to 12h) and concentrated under vacuum. The trifluoroacetic acid was coevaporated with toluene (3 times),  $\text{Et}_2\text{O}$  (twice) and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The residue was used in coupling reaction without further purification.

### ***Methyl ester deprotection:***

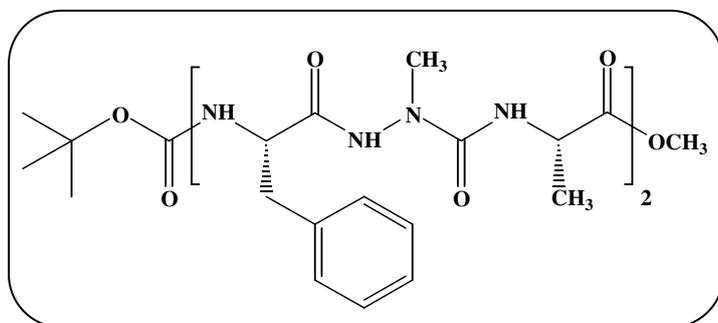
To a stirred solution of methyl ester protected compound (1 equiv) in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , an aqueous solution of NaOH 1N (2 equiv) was added at  $0^\circ\text{C}$ . The resulting solution was stirred until completion monitored by TLC (4h to 12h) and aqueous HCl 2N was added under vigorously stirring (pH=2). Then  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was added and aqueous layer was extracted twice with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated. The residue was used in coupling reaction without further purification.

NB: Sometimes a little amount of MeOH is necessary to dissolve the starting compound or/and to minimize the emulsion during the extraction.

### ***Coupling reaction:***

To a stirred solution of the  $\text{CF}_3\text{COOH}$ , amine partner (1 equiv) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  were successively added at RT DIEA (2.2 equiv), acid partner (1.1 equiv), EDC (1.2 equiv) and HOBt (1.2 equiv). After a night to 24 h, the mixture was diluted with aqueous HCl 1N under vigorously stirring (pH=2). The HOBt.HCl salt that precipitates was separated by filtration and the organic layer was washed with water, aqueous  $\text{NaHCO}_3$  0.5N, brine, dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated.

**Boc-(Phe-azaAla-Ala)<sub>2</sub>-OMe 13a:**

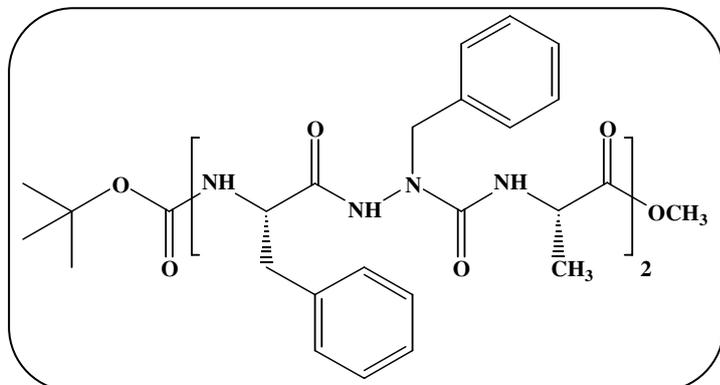


- Purification: Trituration with Et<sub>2</sub>O
- Formula: C<sub>34</sub>H<sub>48</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub>
- Theoretical Mass: 712 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for C<sub>34</sub>H<sub>49</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup> m/z 713.3617, found 713.3636
- Aspect: Yellow foam
- IR (CHCl<sub>3</sub>, 10mM): 3250 cm<sup>-1</sup>, 3446 cm<sup>-1</sup>, 3400 cm<sup>-1</sup>, 3438 cm<sup>-1</sup> (NH); 1700 cm<sup>-1</sup>, 1739 cm<sup>-1</sup> and multiple bands between 1640 cm<sup>-1</sup> and 1680 cm<sup>-1</sup> (C=O)

**<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN):** δ 1.16 and 1.19 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.31 and 1.33 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.39 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.91 (s, 6H, 2\*NCH<sub>3</sub>), 3.81-3.25 (m, 4H, 2\*CH<sub>2</sub>), 3.63 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.92 (m, 1H, CH), 4.18 (m, 2H, 2\*CH), 4.32 (m, 1H, CH), 5.77 (br s, 1H, NH), 6.14 (br s, 1H, NH), 6.46 (br s, 1H, NH), 7.24-7.34 (m, 12H, 2\*NH and CH arom Ph), 8.95 (br s, 2H, 2\*NH).

**<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN):** δ 17.3 (CH<sub>3</sub>), 17.9 (CH<sub>3</sub>), 28.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 35.9 (NCH<sub>3</sub>), 36.6 (NCH<sub>3</sub>), 37.1 (CH<sub>2</sub>), 37.4 (CH<sub>2</sub>), 50.3 (CH), 52.6 (CH and COOCH<sub>3</sub>), 55.6 (CH), 57.3 (CH), 81.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 125.0 and 125.5 and 127.8 and 128.1 and 129.5 and 129.7 and 130.2 and 130.5 (CH arom Ph), 137.6 and 138.5 (C arom Ph), 158.4 (O=C-NH), 159.9.3 (O=C-NH), 171.4 (O=C-NH), 175.4 (O=C-NH), 175.7 (COOCH<sub>3</sub>).

**Boc-(Phe-azaPhe-Ala)<sub>2</sub>-OMe 13b:**

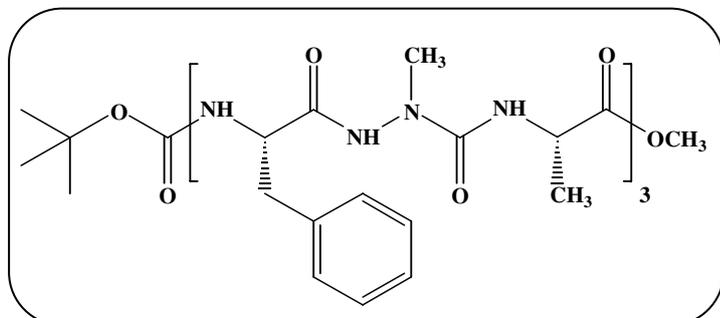


- Purification: Trituration with Et<sub>2</sub>O then p-ether
- Formula: C<sub>46</sub>H<sub>56</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub>
- Theoretical Mass: 864 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for C<sub>46</sub>H<sub>57</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup> m/z 865.4243, found 865.4258
- Aspect: Yellow Foam
- IR (ATR): 3225 cm<sup>-1</sup>, 3318 cm<sup>-1</sup> (NH); 1649 cm<sup>-1</sup>, 1688 cm<sup>-1</sup>, 1746 cm<sup>-1</sup> (C=O)

**<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN):** δ 1.10 and 1.19 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.27-1.36 (m, 12H, CH<sub>3</sub> and C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.79 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.94-3.02 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.17-3.18 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.60 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.92-3.94 (m, 1H, CH), 4.02 (m, 1H, CH), 4.20-4.25 (m, 2H, 2\*CH), 4.64 (br m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 5.61 (br s, 1H, NH), 6.37 (br s, 1H, NH), 6.52 (br s, 1H, NH), 7.17-7.28 (m, 21H, H arom Ph and NH), 8.99 (br s, 2H, 2\*NH).

**<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN):** δ 17.3 (CH<sub>3</sub>), 18.2 (CH<sub>3</sub>), 28.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 37.2 (CH<sub>2</sub>), 37.4 (CH<sub>2</sub>), 50.5 (CH), 52.3 (NCH<sub>2</sub>), 52.6 (CH and COOCH<sub>3</sub>), 53.3 (NCH<sub>2</sub>), 81.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 127.8 and 128.1 and 128.2 and 128.4 and 129.2 and 129.3 and 129.5 and 129.7 and 129.8 and 130.3 and 130.4 (CH arom Ph), 137.6 and 138.0 and 138.5 and 139.9 (C arom Ph), 158.3 (O=C-NH), 159.7(O=C-NH), 171.4 (O=C-NH), 175.3 (COOCH<sub>3</sub>).

**Boc-(Phe-azaAla-Ala)<sub>3</sub>-OMe 14:**



- Purification: Trituration with Et<sub>2</sub>O

- Formula: C<sub>48</sub>H<sub>66</sub>N<sub>12</sub>O<sub>12</sub>

- Theoretical Mass: 1002 g.mol<sup>-1</sup>

- HRMS (ESI) calculated for

C<sub>46</sub>H<sub>57</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup> m/z

1003.4996, found 1003.5054

- Aspect: Yellow Foam

- IR (CHCl<sub>3</sub>, 10mM): 3248 cm<sup>-1</sup>,

3341 cm<sup>-1</sup>, 3401 cm<sup>-1</sup>, 3437 cm<sup>-1</sup>

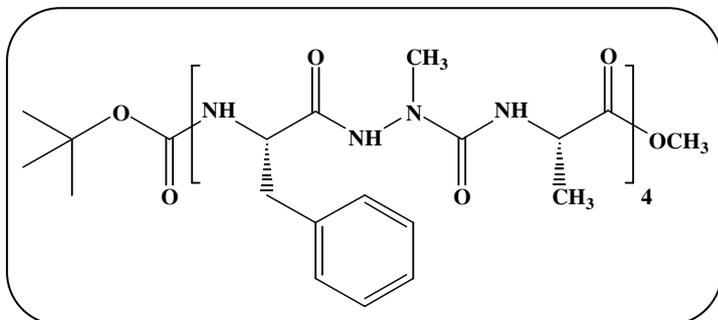
(NH); 1670 cm<sup>-1</sup>, 1682 cm<sup>-1</sup>, 1698

cm<sup>-1</sup>, 1745 cm<sup>-1</sup> (C=O)

**<sup>1</sup>H NMR:** δ 1.23-1.29 (m, 9H, 3\*CH<sub>3</sub>), 1.41 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.81-3.29 (m, 15H, 3\*NCH<sub>3</sub> and 3\*CH<sub>2</sub>), 3.64 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.00 (m, 2H, 2\*CH), 4.11-4.13 (m, 1H, CH), 4.36-4.46 (m, 2H, 2\*CH), 4.65 (m, 1H, CH), 5.83 (br s, 1H, NH), 6.25 and 6.27 (d, 1H, NH), 6.49 (br s, 1H, NH), 6.79 (br s, 1H, NH), 7.21-7.37 (m, 17H, 2\*NH and CH arom Ph), 9.31 (br s, 1H, NH), 9.54 (br s, 1H, NH), 9.75 (br s, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C NMR:** δ 17.1 (2\*CH<sub>3</sub>), 18.5 (CH<sub>3</sub>), 28.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 36.4 (NCH<sub>3</sub>), 36.6 (NCH<sub>3</sub>), 37.0 (NCH<sub>3</sub>), 37.5 (3\*CH<sub>2</sub>), 50.2 (2\*CH), 52.7 (CH and COOCH<sub>3</sub>), 53.4 (CH), 56.9 (CH), 58.4 (CH), 81.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 127.4 and 127.7 and 128.1 and 129.2 and 129.6 and 129.8 and 130.0 (CH arom Ph), 136.5 and 137.4 and 137.7 (C arom Ph), 157.7 and 158.6 and 160.3 and 160.4 and 171.4 and 171.8 and 173.8 and 175.1 and 177.0 (O=C-NH and COOCH<sub>3</sub>).

**Boc-(Phe-azaAla-Ala)<sub>4</sub>-OMe 15:**



- Purification: Trituration with Et<sub>2</sub>O

- Formula: C<sub>62</sub>H<sub>84</sub>N<sub>16</sub>O<sub>15</sub>

- Theoretical Mass: 1292 g.mol<sup>-1</sup>

- HRMS (ESI) calculated for

C<sub>62</sub>H<sub>85</sub>N<sub>16</sub>O<sub>15</sub> [M+H]<sup>+</sup> m/z

1293.6375, found 1293.6382

- Aspect: Yellow Foam

- IR (CHCl<sub>3</sub>, 10mM): 3237 cm<sup>-1</sup>,  
3334cm<sup>-1</sup>, 3401 cm<sup>-1</sup>, 3437 cm<sup>-1</sup>  
(NH); 1667 cm<sup>-1</sup>, 1698 cm<sup>-1</sup>,  
1745 cm<sup>-1</sup> (C=O)

**<sup>1</sup>H NMR:** δ 1.18-1.32 (m, 12H, 4\*CH<sub>3</sub>), 1.41 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.92-3.25 (m, 20H, 4\*NCH<sub>3</sub> and 4\*CH<sub>2</sub>), 3.62 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.93 (m, 2H, 2\*CH), 4.18 (m, 3H, 3\*CH), 4.37 (br m, 3H, 3\*CH), 5.89 (br s, 1H, NH), 6.15 (br s, 1H, NH), 6.51 (br s, 1H, NH), 6.61 (br s, 1H, NH), 7.31 (m, 25H, CH arom Ph and 5\*NH), 9.02 (br s, 1H, NH), 9.12 (br s, 1H, NH), 9.56 (br s, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C NMR:** δ 17.1 (CH<sub>3</sub>), 17.2 (2\*CH<sub>3</sub>), 18.2 (CH<sub>3</sub>), 28.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 36.0 (2\*NCH<sub>3</sub>), 36.8 (2\*NCH<sub>3</sub>), 36.9 (CH<sub>2</sub>), 37.3 (CH<sub>2</sub>), 37.5 (2\*CH<sub>2</sub>), 50.4 (3\*CH), 52.6 (2\*CH and COOCH<sub>3</sub>), 53.4 (CH), 55.6 (CH), 55.8 (CH), 81.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 127.7 and 127.9 and 128.1 (CH arom Ph), 129.5 and 129.6 (CH arom Ph), 130.4 and 130.5 (CH arom Ph), 137.6 and 137.9 and 138.1 and 138.6 (C arom Ph), 158.5 (O=C-NH), 160.3 (O=C-NH), 171.5 (O=C-NH), 175.2 (O=C-NH), 175.6 (COOCH<sub>3</sub>).

## 2:1-[ $\alpha$ /aza]-cyclooligomer 16

After successively methyl ester deprotection and Boc deprotection, all the 2:1[ $\alpha$ /aza]-cyclohexamer, 2:1[ $\alpha$ /aza]-cyclononamer and 2:1[ $\alpha$ /aza]-cyclododecamer were obtained by high dilution peptidic coupling.

### *Methyl ester deprotection:*

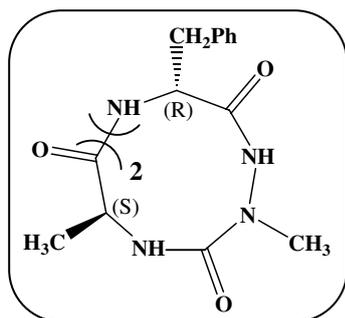
To a stirred solution of methyl ester protected compound (1 equiv) in CH<sub>3</sub>CN, an aqueous solution of NaOH 1N (2 equiv) was added at 0°C. The resulting solution was stirred until completion monitored by TLC (4h to 12h) and aqueous HCl 2N was added under vigorously stirring (pH=2). Then CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added and aqueous layer was extracted twice with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. The residue was used in coupling reaction without further purification.

NB: Sometimes a little amount of MeOH is necessary to dissolve the starting compound or/and to minimize the emulsion during the extraction.

### *Boc deprotection and macrocyclisation procedure:*

To a stirred solution of Boc protected compound (1 equiv) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, trifluoroacetic acid (10 equiv) was added at 0°C. The resulting solution was stirred until completion monitored by TLC (4h to 12h) and concentrated under vacuum. The excess of trifluoroacetic acid was coevaporated with toluene (3 times), Et<sub>2</sub>O (twice) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> until a white foam appeared. The crude residue was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200mL for about 1g of crude reagent) and Et<sub>3</sub>N was added (10 equiv). This solution was poured drop by drop into a solution of EDC (6 equiv) and HOBt (6 equiv) in 1,5L of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. This slow addition ran during 6h to 7h. The reaction was stirred vigorously for 48h. The volume was then reduced to around 100mL. The addition of 20mL of 1N HCl aqueous solution under stirring gave rise to the apparition of a white solid (HOBt, HCl) which was filtered by suction. The solution was then washed successively with 20mL of water, twice with 20mL of NaHCO<sub>3</sub>, dried on MgSO<sub>4</sub>, and evaporated.

**2:1-[ $\alpha$ /aza]-cyclohexamer 16a :**



- Formula:  $C_{28}H_{36}N_8O_6$
- Theoretical Mass: 580 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for  $C_{28}H_{37}N_8O_6$  [M+H]<sup>+</sup> m/z  
581.2831, found 581.2868
- Aspect: White solid

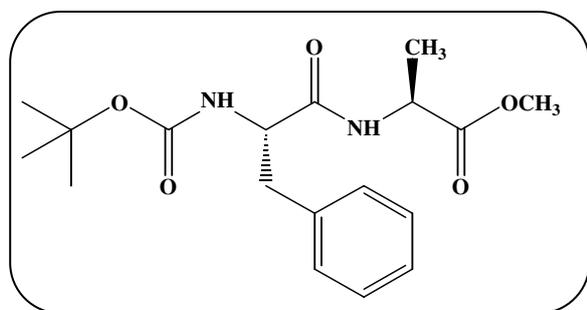
**<sup>1</sup>H NMR (DMSO):**  $\delta$  1.09 and 1.11 (d, 6H, 2\*CH<sub>3</sub>), 2.56 (s, 6H, 2\*NCH<sub>3</sub>), 2.85-2.94 (m, 4H, 2\*CH<sub>2</sub>), 4.13-4.19 (m, 4H, 4\*CH), 6.25 and 6.68 (d, 2H, 2\*NH), 7.18-7.29 (m, 10H, CH arom Ph), 8.52 and 8.53 (d, 2H, 2\*NH), 10.23 (br s, 2H, 2\*NH).

**<sup>13</sup>C NMR (DMSO):**  $\delta$  21.3 (2\*CH<sub>3</sub>), 36.0 (2\*NCH<sub>3</sub>), 37.2 (2\*CH<sub>2</sub>), 50.2 (2\*CH), 54.4 (2\*CH), 127.7 and 129.3 and 130.4 (CH arom Ph), 137.6 (C arom Ph), 157.4 (O=C-NH), 171.4 (O=C-NH), 173.2 (O=C-NH).

## Tripeptide Boc-Phe-Ala-OMe 17

### First peptidic coupling:

To a stirred solution of HCl,H-Ala-OMe (1.1 equiv) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> were successively added at RT DIEA (2.2 equiv), Boc-Phe-OH (1 equiv), EDC (1.2 equiv) and HOBT (1.2 equiv). After a night to 24 h, the mixture was diluted with aqueous HCl 1N under vigorously stirring (pH=2). The HOBT.HCl salt that precipitates was separated by filtration and the organic layer was washed with water, aqueous NaHCO<sub>3</sub> 0.5N, brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. The crude product Boc-Phe-Ala-OMe is engaged in the next step without further purification.



- Formula: C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>
- Theoretical Mass: 350 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>5</sub> [M+Na]<sup>+</sup> m/z 373.1734, found 373.1706
- Aspect: White solid
- Melting Point: 120-125°C
- IR (CHCl<sub>3</sub>, 10mM): 3426 cm<sup>-1</sup> (NH); 1678 cm<sup>-1</sup>, 1705 cm<sup>-1</sup>, 1714 cm<sup>-1</sup>, 1741 cm<sup>-1</sup> (C=O)

<sup>1</sup>H NMR: δ 1.33 and 1.36 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.41 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.05-3.09 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.71 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.34 (m, 1H, CH), 4.52 (m, 1H, CH), 4.97 (br s, 1H, NH Phe), 6.37 and 6.39 (d, 1H, NH Ala), 7.19-7.32 (m, 5H, CH arom Ph).

<sup>13</sup>C NMR: δ 19.1 (CH<sub>3</sub>), 28.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 39.0 (CH<sub>2</sub>), 48.8 (CH), 53.1 (COOCH<sub>3</sub>), 56.3 (CH), 80.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 127.7 (CH arom Ph), 128.9 (CH arom Ph), 129.3 (CH arom Ph), 137.2 (C arom Ph), 155.9 (COO<sup>t</sup>Bu), 171.4(O=C-NH), 173.5 (COOCH<sub>3</sub>).

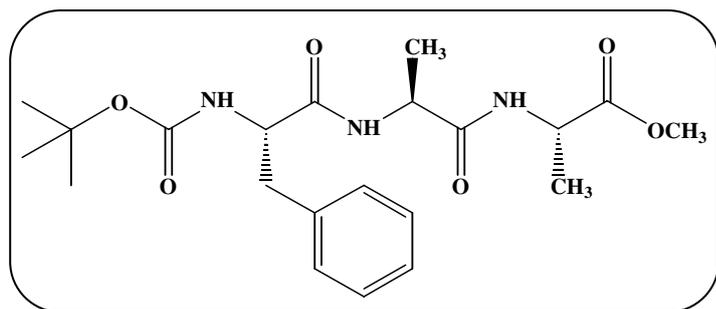
### Methyl ester deprotection:

To a stirred solution of Boc-Phe-Ala-OMe (1 equiv) in CH<sub>3</sub>CN, an aqueous solution of NaOH 1N (2 equiv) was added at 0°C. The resulting solution was stirred until completion monitored by TLC (4h) and aqueous HCl 2N was added under vigorously stirring (pH=2). Then CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added and aqueous layer was extracted twice with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Combined organic layers

were dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated. The residue was used in coupling reaction without further purification.

**Second peptidic coupling:**

To a stirred solution of  $\text{HCl}$ ,  $\text{H-Ala-OMe}$  (1.1 equiv) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  were successively added at RT DIEA (2.2 equiv),  $\text{Boc-Phe-Ala-OH}$  (1 equiv), EDC (1.2 equiv) and HOBT (1.2 equiv). After a night to 24 h, the mixture was diluted with aqueous  $\text{HCl}$  1N under vigorously stirring ( $\text{pH}=2$ ). The HOBT. $\text{HCl}$  salt that precipitates was separated by filtration and the organic layer was washed with water, aqueous  $\text{NaHCO}_3$  0.5N, brine, dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated. The obtained compound **17** doesn't required purification and was obtained with a yield of 92% (calculated from  $\text{Boc-Phe-Ala-OH}$ ).



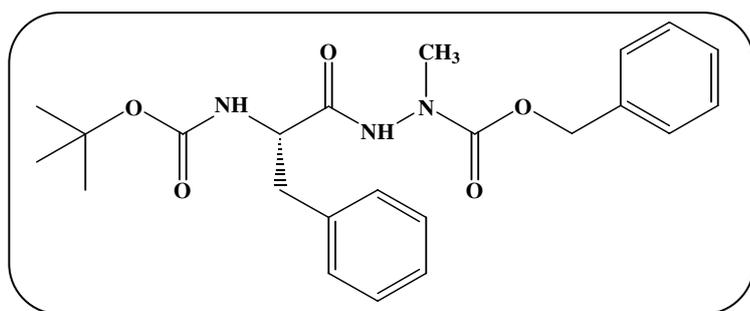
- Formula:  $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_6$
- Theoretical Mass:  $421 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- HRMS (ESI) calculated for  $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{NaO}_6$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  444.2105, found 444.2143
- Aspect: White solid
- Melting Point:  $110^\circ\text{C}$
- IR ( $\text{CHCl}_3$ , 10mM):  $3422 \text{ cm}^{-1}$  (NH);  $1670 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1687 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1706 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1741 \text{ cm}^{-1}$  (C=O)

**$^1\text{H}$  NMR:**  $\delta$  1.26 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.34 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.39 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 3.04-3.13 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.74 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ), 4.38 (m, 1H, CH), 4.45-4.56 (m, 2H, 2\*CH), 5.05 and 5.07 (d, 1H, NH Phe), 6.64 and 6.67 (d, 1H, NH Ala1), 6.83 and 6.86 (d, 1H, NH Ala2), 7.17-7.31 (m, 5H, CH arom Ph).

**$^{13}\text{C}$  NMR:**  $\delta$  18.7 ( $\text{CH}_3$ ), 18.9 ( $\text{CH}_3$ ), 28.9 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 38.9 ( $\text{CH}_2$ ), 48.8 (CH), 49.5 (CH), 53.1 ( $\text{COOCH}_3$ ), 56.4 (CH), 81.1 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 127.7 (CH arom Ph), 129.3 (CH arom Ph), 130.0 (CH arom Ph), 137.1 (C arom Ph), 156.1 ( $\text{COO}^t\text{Bu}$ ), 171.8 ( $\text{O}=\text{C}-\text{NH}$ ), 172.0 ( $\text{COOCH}_3$ ), 173.7 ( $\text{O}=\text{C}-\text{NH}$ ).

## Dipeptide Boc-Phe-azaAla-OBzl 18

To a stirred solution of *N*<sub>α</sub>-Z-methylhydrazine **2** (1.1 equiv) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> were successively added at RT DIEA (2.2 equiv), Boc-Phe-OH (1 equiv), EDC (1.2 equiv) and HOBt (1.2 equiv). After a night to 24 h, the mixture was diluted with aqueous HCl 1N under vigorously stirring (pH=2). The HOBt.HCl salt that precipitates was separated by filtration and the organic layer was washed with water, aqueous NaHCO<sub>3</sub> 0.5N, brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. The residue was purified by column chromatography on silica gel with a gradient elution EtOAc/p-ether 20/80, 30/70 and 50/50. Compound **18** was obtained with a yield of 77%.



- Formula: C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>
- Theoretical Mass: 427 g.mol<sup>-1</sup>
- HRMS (ESI) calculated for C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>5</sub> [M+Na]<sup>+</sup> m/z 450.1999, found 450.2015
- Aspect: White Solid
- Melting Point: 104°C
- IR (CHCl<sub>3</sub>, 10mM): 3412 cm<sup>-1</sup>, 3431 cm<sup>-1</sup> (NH); 1704 cm<sup>-1</sup>, 1725 cm<sup>-1</sup> (C=O)

<sup>1</sup>H NMR: δ 1.38 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.03 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.09 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 4.35 (m, 1H, CH), 4.96 (br s, 1H, NH), 5.13 (m, 2H, CH<sub>2</sub> of Z group), 7.20-7.32 (m, 10H, CH arom Ph), 7.9 (br s, 1H, NH).

<sup>13</sup>C NMR: δ 28.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 38.2 (NCH<sub>3</sub>), 38.7 (CH<sub>2</sub>), 54.8 (CH), 68.7 (CH<sub>2</sub> of Z group), 81.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 127.7 and 128.6 and 128.9 and 129.2 and 129.3 and 130.0 (CH arom Ph), 136.6 and 137.0 (C arom Ph), 156.2 (COO<sup>t</sup>Bu), 156.6 (COOBzl), 170.6 (O=C-NH).

1. Spatola, A. F. *In Chemistry of amino-acids, Peptides and Proteins*, (B. Weinstein, ed) M. Dekker, New York **1983**, 7, 267-357.
2. *Houben Weyl: Methods of Organic Chemistry: E22 Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, (M. Goodman, ed) Thieme Stuttgart, New York **2002-2003**, E22.
3. Gellman, S. H. *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 173-180.
4. Aubry, A.; Boussard, G.; Cung, M. T.; Marraud, M.; Vitoux, B. *J. Chim. Phys. Phys. Chim Biol.* **1988**, 85, 345-359.
5. Lecoq, A. *Thèse d'université: N-amino et hydrazino peptides. Aspects chimiques et structuraux* **1991**, INPL Nancy.
6. Grand, V.; Aubry, A.; Dupont, V.; Vicherat, A.; Marraud, M. *J. Pept. Sci.* **1996**, 2, 381-391.
7. Andre, F.; Vicherat, A.; Boussard, G.; Aubry, A.; Marraud, M. *J. Pept. Res.* **1997**, 50, 372-381.
8. Vanderesse, R.; David, L.; Grand, V.; Marraud, M.; Mangeot, J. P.; Aubry, A. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 2669-2672.
9. Vanderesse, R.; Grand, V.; Limal, D.; Vicherat, A.; Marraud, M.; Didierjean, C.; Aubry, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 9444-9451.
10. Bouillon, I.; Brosse, N.; Vanderesse, R.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 3569-3572.
11. Bouillon, I.; Brosse, N.; Vanderesse, R.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron* **2007**, 63, 2223-2234.
12. Bouillon, I.; Vanderesse, R.; Brosse, N.; Fabre, O.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron* **2007**, 63, 9635-9641.
13. Felten, A.-S.; Dautrey, S.; Bodiguel, J.; Vanderesse, R.; Didierjean, C.; Arrault, A.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron* **2008**, 64, 10741-10753.
14. Frederic André; Guy.Boussard; Bayeul, D.; Didierjean, C.; Aubry, A.; Marraud, M. *J. Pept. Res.* **1997**, 49, 556-562.
15. Zega, A.; Urleb, U. *Acta Chim. Slov.* **2002**, 49, 649-662.
16. Zega, A. *Curr. Med. Chem.* **2005**, 12, 589-597.
17. Yang, D.; Qu, J.; Li, W.; Zhang, Y.-H.; Ren, Y.; Wang, D.-P.; Wu, Y.-D. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 12410-12411.
18. Randolph, J. T.; Zhang, X.; Huang, P. P.; Klein, L. L.; Kurtz, K. A.; Konstantinidis, A. K.; He, W.; Kati, W. M.; Kempf, D. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 2745-2750.

19. Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Klien, D. F.; Powell, D. R.; Huang, X.; Barchi, J. J.; Gellman, S. H. *Nature* **1997**, *387*.
20. Gante J.; Krug M.; Lauterbach, G.; Weitzel, R.; Hiller, W. *J. Pept. Sci.* **1995**, *1*, 201-206.
21. Pinnen, F.; Luisi, G.; Lucente, G.; Gavuzzo, E.; Cerrini, S. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1993**, 819-824.
22. Dutta, A. S.; Furr, B. J. A.; Denis, M. B. In *Annual Reports in Medicinal Chemistry*; Academic Press, 1985; pp. 203-214.
23. Boeglin, D.; Lubell, W. D. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 864-878.
24. Hess, H.-J.; Moreland, W. T.; Laubach, G. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 4040-4041.
25. Frédéric André; Marraud, M.; Tsouloufis, T.; Tzartos, S. J.; Boussard, G. *J. Pep. Sci.* **1997**, *3*, 429-441.
26. André, F.; Boussard, G.; Marraud, M.; Didierjean, C.; Aubry, A. *Letters in Peptide Science* **1995**, *2*, 239-242.
27. André, F.; Marraud, M.; Boussard, G.; Didierjean, C.; Aubry, A. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 183-186.
28. Frédéric André; Vicherat, A.; Boussard, G.; Aubry, A.; Marraud, M. *J. Pept. Res.* **1997**, *50*, 372-381.
29. Boeglin, D.; Hamdan, F. F.; Melendez, R. E.; Cluzeau, J.; Laperriere, A.; Heroux, M.; Bouvier, M.; Lubell, W. D. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1401-1408.
30. Melendez, R. E.; Lubell, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6759-6764.
31. Thormann, M.; Hofmann, H.-J. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **1999**, *469*, 63-76.
32. Han, H.; Janda, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2539-2544.
33. Boeglin, D. R.; Ramana Rao, M. H. V.; Demers, J.-P.; Lubell, W. D. In *Understanding Biology Using Peptides*, 2006; pp. 184-185.
34. H.-J. Lee; Lee, K. B.; Ahn, I. A.; Ro, S.; Choi, K. H.; Choi, Y. S. *J. Pept. Res.* **2000**, *56*, 35-46.
35. Gante, J.; Kessler, H.; Gibson, C. *Houben-Weyl* **2002**, *E22c*, 311-323.
36. Gibson, C.; Goodman, S. L.; Hahn, D.; Holzemann, G.; Kessler, H. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7388-7394.
37. Wiczerczak, E.; Drabik, P.; Lankiewicz, L.; Oldziej, S.; Grzonka, Z.; Abrahamson, M.; Grubb, A.; Bromme, D. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4202-4211.
38. Gray, C. J.; Ireson, J. C.; Parker, R. C. *Tetrahedron* **1977**, *33*, 739-743.
39. Brosse, N.; Pinto, M.-F.; Jamart-Gregoire, B. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4370-4374.

40. Brosse, N.; Pinto, M.-F.; Bodiguel, J.; Jamart-Gregoire, B. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2869-2873.
41. Brosse, N.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 249-251.
42. Brosse, N.; Pinto, M.-F.; Jamart-Gregoire, B. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1* **1998**, 3685-3688.
43. Krause, J. G.; Kwon, S.; George, B. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 2040-2042.
44. Brosse N; Pinto M-F; Jamart-Grégoire B. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003*, 4757-4764.
45. Majer, P.; Randad, R. S. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1937-1938.
46. Bouillon, I. *Thèse d'université: Synthèse d'alpha-hydrazinopeptides* **2006**, INPL Nancy.
47. Pinto, M.-F. *Thèse: Nouvelles voies de synthèse d'hydrazines fonctionnalisées. Application à la préparation d'isoniazides monomarqués à l'azote 15 et d'alpha-hydrazinoesters chiraux.* **2002**, INPL-Nancy.
48. Curtius, T. *Chem. Ber.* **1902**, *35*, 3226-3228.
49. Sheehan, J. C.; Hess, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067-1068.
50. T. Kimura; Takai, M.; Masui, Y.; Morikawa, T.; Sakakibara, S. *Biopolymers* **1981**, *20*, 1823-1832.
51. Anderson, G. W.; Zimmerman, J. E.; Callahan, F. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3039-3039.
52. Kovacs, J.; Kisfaludy, L.; Ceprini, M. Q.; Johnson, R. H. *Tetrahedron* **1969**, *25*, 2555-2573.
53. Bodanszky, M.; du Vigneaud, V. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 6072-6075.
54. Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G.; Selve, C. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 1219-1222.
55. Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillessen, D. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927-1930.
56. Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
57. Albericio, F.; Bofill, J. M.; El-Faham, A.; Kates, S. A. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678-9683.
58. Carpino, L. A.; Cohen, B. J.; Stephens, K. E.; Sadat-Aalae, S. Y.; Tien, J. H.; Langridge, D. C. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3732-3734.
59. Beyermann, M.; Bienert, M.; Niedrich, H.; Carpino, L. A.; Sadat-Aalae, D. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 721-728.
60. Bertho, J.-N.; Loffet, A.; Pinel, C.; Reuther, F.; Sennyey, G. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1303-1306.

61. Carpino, L. A.; Mansour, E.-S. M. E.; Sadat-Aalae, D. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2611-2614.
62. Carpino, L. A.; Sadat-Aalae, D.; Chao, H. G.; DeSelms, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9651-9652.
63. Vaughan, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 3547-3547.
64. Dyker, H.; Scherkenbeck, J.; Gondol, D.; Goehrt, A.; Harder, H. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3760-3766.
65. Dorn H; Zubek A; Karlheinz W. *Liebigs Annalen* **1967**, *707*, 100-106.
66. Carmeli, M.; Shefer, N.; Rozen, S. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 8969-8972.
67. Bong D-T.; Clark T-D.; Granja J-R.; Ghadiri M-R. *Angew. Chem. Int. Ed* **2001**, *40*, 988-1011.
68. Ascoli F.; De Angelis G.; Del Bianco F.; De Santis P. *Biopolymers* **1975**, *14*, 1109-1114.
69. De Santis, P.; Morosetti, S.; Rizzo, R. *Macromolecules* **1974**, *7*, 52-58.
70. Hartgerink, J. D.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 43-50.
71. Clark, T. D.; Buriak, J. M.; Kobayashi, K.; Isler, M. P.; McRee, D. E.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8949-8962.
72. Clark, T. D.; Buehler, L. K.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 651-656.
73. Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10785-10786.
74. Ghadiri M-R.; Kobayashi K.; Granja J-R.; Chadha R-K.; McRee D-E. *Angew. Chem. Int. Ed* **1995**, *34*, 93-95.
75. Seebach D.; Matthews J-L.; Meden A.; Wessels T.; Baerlocher C.; McCusker L-B. *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 173-182.
76. Gademann K.; Seebach D. *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 957-962.
77. Karle, I. L.; Handa, B. K.; Hassall, C. H. *Acta Cryst. B* **1975**, *31*, 555-560.
78. Gauthier D.; Baillargeon P.; Drouin M.; Dory Y-L. *Angew. Chem. Int. Ed* **2001**, *40*, 4635-4638.
79. Yang D.; Li X.; Sha Y.; Wu Y-D. *Chemistry, Eur. J.* **2005**, *11*, 3005-3009.
80. Khazanovich, N.; Granja, J. R.; McRee, D. E.; Milligan, R. A.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6011-6012.
81. Rosenthal-Aizman, K.; Svensson, G.; Unden, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3372-3373.
82. Bitta, J.; Kubik, S. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2637-2640.

83. Kubik, S.; Goddard, R. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9475-9486.
84. Kubik, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5846-5855.
85. Kubik S.; Goddard R. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001*, 311-322.
86. Heinrichs, G.; Kubik, S.; Lacour, J.; Vial, L. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4498-4501.
87. Trouche, N.; Wieckowski, S.; Sun, W.; Chaloin, O.; Hoebeke, J.; Fournel, S.; Guichard, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13480-13492.
88. Semetey V.; Didierjean C.; Briand J-P.; Aubry A.; Guichard G. *Angew. Chem. Int. Ed* **2002**, *41*, 1895-1898.
89. Fischer L.; Decossas M.; Briand J-P.; Didierjean C.; Guichard G. *Angew. Chem. Int. Ed* **2009**, *48*, 1625-1628.
90. Brooks S-J.; García-Garrido S-E.; Light M-E.; Cole P-A.; Gale P-A. *Chemistry, Eur. J.* **2007**, *13*, 3320-3329.
91. Cheguillaume, A.; Salaun, A.; Sinbandhit, S.; Potel, M.; Gall, P.; Baudy-Floc'h, M.; Le Grel, P. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4923-4929.
92. Le Grel, P.; Salaun, A.; Potel, M.; Le Grel, B.; Lassagne, F. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 5638-5645.
93. Venkatachalam, C. M. *Biopolymers* **1968**, *6*, 1425-1436.
94. Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13071-13072.
95. Seebach D.; Overhand M.; Kühnle F-N-M.; Martinoni B.; Oberer L.; Hommel U.; Widmer H. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 913-941.
96. Schmitt, M. A.; Choi, S. H.; Guzei, I. A.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4538-4539.
97. Tew, G. N.; Liu, D.; Chen, B.; Doerksen, R. J.; Kaplan, J.; Carroll, P. J.; Klein, M. L.; DeGrado, W. F. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 5110-5114.
98. Liu, D.; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7553-7559.
99. Tamilarasu, N.; Huq, I.; Rana, T. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 505-507.
100. Umezawa, N.; Gelman, M. A.; Haigis, M. C.; Raines, R. T.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 368-369.
101. Boussard, G.; Marraud, M.; Neel, J. *J. Chim. Phys.* **1974**, *71*, 1081.
102. Némethy, G.; Scheraga, H. A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *95*, 320-327.
103. Stigers, K. D.; Soth, M. J.; Nowick, J. S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 714-723.
104. Cubberley, M. S.; Iverson, B. L. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 650-653.

105. Krauthauser, S.; Christianson, L. A.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11719-11720.
106. Lipshutz, B. H.; Chung, D. W.; Rich, B.; Corral, R. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5069-5072.
107. Appella, D. H.; Barchi, J. J.; Durell, S. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2309-2310.
108. Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6206-6212.
109. Seebach, D.; Kimmerlin, T.; Sebesta, R.; Campo, M. A.; Beck, A. K. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 7455-7506.
110. Gérald Lelais, D. S. *Biopolymers* **2004**, *76*, 206-243.
111. Oehme, P.; Niedrich, H.; Jung, F.; Rudel, M. *Acta Biol. Med. Germ.* **1969**, *22*, 345-358.
112. Oehme, P.; Glaesmer, R.; Klasu, W.; Heine, U. *Acta Biol. Med. Germ.* **1970**, *24*, 141-153.
113. Aubry, A.; Mangeot, J. P.; Vidal, J.; Collet, A.; Zerkout, A.; Marraud, M. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *38*, 603-605.
114. Schmitt, M. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6848-6849.
115. Schmitt, M. A.; Choi, S. H.; Guzei, I. A.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13130-13131.
116. Ahlke Hayen; Schmitt, M. A.; Ngassa, F. N.; Thomasson, K. A.; Gellman, S. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 505-510.
117. Aleman, C. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 1441-1449.
118. Benatalah, Z.; Aubry, A.; Boussard, G.; Marraud, M. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *38*, 603-5.
119. Gante J; Krug M; Lauterbach G; Weitzel R; Hiller W. *J. Pept. Sci.* **1995**, *1*, 201-206.
120. Lee, H.-J.; Park, H.-M.; Lee, K.-B. *Biophys. Chem.* **2007**, *125*, 117-126.
121. Lee, H. J.; Choi, K. H.; Ahn, I. A.; Ro, S.; Jang, H. G.; Choi, Y. S.; Lee, K. B. *J. Mol. Struct.* **2001**, *569*, 43-54.
122. Violette, A.; Averlant-Petit, M. C.; Semetey, V.; Hemmerlin, C.; Casimir, R.; Graff, R.; Marraud, M.; Briand, J.-P.; Rognan, D.; Guichard, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2156-2164.
123. Bax, A.; Freeman, R.; Morris, G. *J. Magn. Reson.* **1981**, *42*, 164-168.
124. Bax, A.; Freeman, R. *J. Magn. Reson.* **1981**, *44*, 542-561.

125. Iqbal M.; Balaram, P. *Biopolymers* **1982**, *21*, 1427-1433.
126. Zerkout, S.; Dupont, V.; Aubry, A.; Vidal, J.; Collet, A.; Vicherat, A.; Marraud, M. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *44*, 378-387.
127. Abbas, C. ; Pickaert, G. ; Didierjean, C. ; Jamart-Grégoire, B. ; Vanderesse, R. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4158-4160.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE  
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL  
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur Philippe LE GREL, Maître de Conférences, ICMV, Rennes**

**Monsieur Claude TAILLEFUMIER, Professeur, UFR-ST SEESIB, Aubière**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

**Madame Cécile ABBAS**

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,  
une thèse intitulée :

**"Synthèse et études structurales de nouveaux 2:1-[a/aza]-oligomères, vers de nouveaux  
foldamères"**

NANCY BRABOIS  
2, AVENUE DE LA  
FORET-DE-HAYE  
BOITE POSTALE 3  
F - 54501  
VANDŒUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Génie des Procédés et des Produits** »

Fait à Vandoeuvre, le 14 septembre 2009

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



## Synthèse et études structurales de nouveaux 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères Vers de nouveaux foldamères

Les foldamères sont considérés comme étant des oligomères capables de s'auto-structurer en solution par le biais de liaisons non covalentes. Ces composés peuvent présenter un grand intérêt biologique dans la mesure où l'on peut en attendre une meilleure résistance aux peptidases, la possibilité de se conjuguer aux ARN et ADN, etc... Au sein des oligomères azapeptideptidiques, le point d'ancrage de la chaîne latérale est affecté car le  $\text{CH}_\alpha$  de l'acide aminé originel est remplacé par un atome d'azote. Cette substitution engendre la perte du centre chiral  $\text{CH}_\alpha$  et la perturbation des caractéristiques électroniques et structurales des deux liaisons amides adjacentes.

Ce travail concerne l'élaboration de nouvelles voies de synthèse de 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères en solution. Nous avons mis au point un protocole de synthèse généralisable des précurseurs azadipeptidiques Boc-azaAA-AA-OMe orthogonalement protégés. Les 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères, obtenus à partir des précurseurs azadipeptidiques, ont ensuite été engagés dans des réactions d'oligomérisation par couplage peptidique, ce qui nous a permis d'isoler les tous premiers 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères avec de très bons rendements.

La structure des composés préparés a été analysée par spectroscopies RMN, IR, diffraction des RX et par modélisation moléculaire. L'examen des 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimères a révélé la formation d'un coude  $\beta_{\text{II}}$ . Les 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamères ont la capacité à s'auto-structurer. D'une manière générale, grâce aux études réalisées par RMN et par IR, nous pouvons fortement envisager que nos 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomères se structurent en solution pour former des foldamères.

**Mots clefs**: azapeptides, foldamères, synthèse peptidique, pseudopeptides

## Synthesis and structural studies of 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomers Toward new foldamers

Foldamers are described as any oligomers with a strong tendency to adopt a specific compact conformation in solution through non covalent interactions. These compounds can make duplexes with RNA and DNA and are more resistant to peptidases. Thus foldamers can have a biological activity. Among azapeptide oligomers, substitution of a nitrogen for the  $\text{CH}_\alpha$  group is a way to preserve the side chains of analogous peptides. This substitution entails the lost of chiral center and the overall conformational and local electronic states might be affected.

We have synthesized 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomers on liquid phase. We have developed a new general protocol for obtaining various Boc-azaAA-AA-OMe. Then, 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimers, obtained from the precursors, were used in oligomerization reaction by peptidic coupling. By this way, we obtained the first 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomers in very good yields.

The structure of the obtained oligomers was analysed by NMR and IR spectroscopies, X-ray diffraction and molecular modelling. The 2:1-[ $\alpha$ /aza]-trimers show a  $\beta_{\text{II}}$ -turn and the 2:1-[ $\alpha$ /aza]-hexamers structure themselves. On the whole, by NMR and IR spectroscopies, we can strongly consider that our 2:1-[ $\alpha$ /aza]-oligomers structure themselves in solution to form foldamers.

**Keywords**: azapeptides, foldamers, peptide synthesis, pseudopeptides