

THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par Juliette FREMAUX

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Chimie organique

**Foldamères peptidomimétiques à base d'urées : vers le
développement de structures complexes mimes d'architectures
biologiques**

Directeur de thèse : Dr. Gilles Guichard

Mme ALEZRA, Valérie

M. TAILLEFUMIER, Claude

M. HUC, Ivan

M. CLAYDEN, Jonathan

M. GUICHARD, Gilles

Maître de conférence, Université Paris-Sud 11

Professeur, Université Blaise Pascal

Directeur de recherche CNRS, Université Bordeaux 1

Professeur, University of Manchester, UK

Directeur de recherche CNRS, Université Bordeaux 1

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Membre invité

Directeur de thèse

Remerciements

Je souhaiterais dans un premier temps remercier le Dr Erick Dufour directeur du laboratoire de Chimie et Biologie des Membranes et des Nanoobjets (CBMN) ainsi que le Dr Jean-Jacques Toulmé et le Dr Ivan Huc, directeur et co-directeur de l'Institut Européen de Chimie et de Biologie (IECB), pour m'avoir accueillie dans leur institut et permis de travailler dans les meilleures conditions.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr Gilles Guichard pour avoir été un excellent directeur de recherche et m'avoir accordé sa confiance tout au long de ces trois années. Son enthousiasme, très communicatif, pour ses projets de recherche n'a pas mis longtemps à me convaincre d'apporter ma contribution, et je n'ai jamais regretté ce choix. J'ai eu la chance de participer à un projet de recherche passionnant tout en bénéficiant d'un encadrement extrêmement motivant.

Je remercie également les membres de mon jury de thèse, le Dr Valérie Alezra, le Pr Claude Taillefumier, le Dr Ivan Huc et le Pr Jonathan Clayden pour avoir accepté de juger mon travail.

Je souhaiterais aussi remercier le Pr. Jonathan Clayden pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire à Manchester pendant 11 semaines. Cette collaboration a été particulièrement enrichissante autant sur le plan scientifique que personnel. Je voudrais d'ailleurs en profiter pour remercier tous les membres du laboratoire qui m'ont accueillie chaleureusement et intégrée à toutes leurs activités. J'ai vraiment passé trois mois inoubliables.

Je remercie aussi toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce projet. Merci à Brice Kauffmann d'avoir résolu toutes mes structures cristallographiques (ou presque), à Axelle Grelard, Vanessa Zhendre et Estelle Morvan pour leurs conseils et leur aide précieuse en RMN.

Merci à Karine Gionnet et Céline Douat pour leur disponibilité, leur aide et leurs conseils avisés. J'adresse aussi de chaleureux remerciements à toutes les personnes ayant à un moment ou un autre constitué l'équipe de chimistes (ou bio-cristallographes) du laboratoire et avec lesquels j'ai pris grand plaisir à travailler. Lucile, Nagendar, Yella-Reddy, Neil, Arnaud, Karolina, Caterina, Gavin, Christel, Claire et Stéphanie. Merci d'avoir partagé avec moi les bons comme les mauvais résultats. Tous ces moments passés ensemble, que ce soit au laboratoire ou à l'extérieur, ont fortement contribué à rendre ces années inoubliables. Merci aussi à tous les « biologistes » avec qui j'ai partagé mes repas. Une attention spéciale pour Lucile, Fabien et Claire, notamment pour ces excellents après-midi passés autour de jeux de société. A ce sujet, Fabien, laisse-nous gagner de temps en temps !

Enfin je tiens à remercier mes parents sans qui rien de tout cela n'aurait été possible ainsi que tous mes proches et mes amis pour leur présence et leur soutien tout au cours de ces trois années, en particulier Stéphanie, Claire, Marie et Mathilde.

Quentin tu as partagé cette expérience avec moi au quotidien. Merci d'avoir été là pour moi à chaque instant, dans les périodes de stress et de découragement comme dans les bons moments.

Sommaire

RESUME	9
---------------------	----------

CHAPITRE I. : Développement des foldamères vers des structures plus ordonnées : Mimes artificiels de protéines.....	17
--	-----------

I. Approche vers le design de structures tertiaires	19
--	-----------

1. Assemblage d'hélices peptidomimétiques.....	20
a) Association d'hélices de peptoides.....	20
b) Association d'hélices de β -peptides.....	23
c) Oligomères aromatiques	24
2. Protéines semi-synthétiques	28
a) Incorporation d'une boucle β -peptidique dans une enzyme.....	29
b) Remplacement de l'hélice terminale d'une cytokine par un segment artificiel.....	29

II. Structures quaternaires	31
--	-----------

1. Faisceaux d'hélices.....	31
a) Vers l'association d'hélices de β -peptides en milieux aqueux	32
b) Approche descendante (top down) à partir d' α/β -peptides.....	33
c) Approche ascendante (bottom-up) à partir de β -peptides.....	37
3. Hélices multiples	40
a) Stabilisation par des interactions hydrogène	41
b) Stabilisation par des interactions π - π	42
4. Assemblage de feuillets.....	47
a) Dimère de mimes de feuillet β	48
b) Assemblage de feuillets β macrocycliques.....	48
c) Les feuillets β macrocycliques comme inhibiteurs d'agrégation	50

III. Conclusion et objectifs de la thèse	52
---	-----------

CHAPITRE II. : Oligomères hélicoïdaux à base d'urée : Influence de résidus achiraux sur le repliement.....	55
---	-----------

I. Introduction d'un résidu gem-diméthyle au centre d'une oligourée.....	59
---	-----------

1. Synthèse.....	61
a) Synthèse des monomères activés des résidus canoniques	62
b) Synthèse des monomères gem-diméthyles	63
c) Synthèse des oligomères	64
2. Etude conformationnelle en solution.....	65
a) Par Dichroïsme circulaire.....	65
b) Par RMN.....	66
3. Etude structurale par diffraction des rayons X	71

II. Introduction de plusieurs résidus gem-diméthyle consécutifs	73
--	-----------

1. Synthèse.....	73
2. Etude conformationnelle en solution.....	74
a) Par dichroïsme circulaire.....	74
b) Par RMN 1H	75
3. Etude conformationnelle à l'état solide.....	77

III. Segment trimérique canonique comme contrôleur chiral.....	78
---	-----------

IV. Vers des hélices d'oligourées majoritairement achirales	81
1. Oligourée entièrement achirale.....	81
2. Induction de la chiralité par contrôleur chiral	82
V. Conclusion.....	85
CHAPITRE III. : Résidus cycliques de type pyrrolidine : Influence conformationnelle et application en synthèse	89
I. Etude de la compatibilité des cycles pyrrolidine avec l'hélice canonique des oligourées.....	92
1. Introduction d'un résidu pyrrolidine	92
a) <i>Synthèse du monomère activé de type pyrrolidine M7</i>	92
b) <i>Etude conformationnelle des oligomères en solution</i>	93
c) <i>Structure à haute résolution</i>	96
2. Oligourées composées uniquement de résidus pyrrolidine	97
3. Introduction de plusieurs résidus pyrrolidine consécutifs au milieu d'une séquence canonique	99
II. Nouvelle méthode de synthèse par condensation de segments pour l'élaboration de longues hélices d'oligourées.	103
1. Principe de la condensation de segments pour la synthèse d'oligomères d'urées.....	104
2. Synthèse.....	106
a) <i>Synthèse du segment activé</i>	106
b) <i>Couplages</i>	107
3. Etudes des molécules en solution	109
a) <i>Par RMN</i>	109
b) <i>Par dichroïsme circulaire</i>	110
4. Etude dans l'état cristallin par diffraction des rayons X.....	111
III. Conclusion.....	113
CHAPITRE IV. : Architectures plus complexes : vers l'assemblage quaternaire d'hélices en milieu aqueux.....	117
I. Premier design dans l'objectif de former un faisceau d'hélices	120
1. Synthèse.....	120
a) <i>Synthèse des monomères</i>	121
b) <i>Synthèse des fragments</i>	123
c) <i>Couplage, déprotection et purification</i>	125
2. Etude structurale en solution par dichroïsme circulaire	128
II. Essai de stabilisation de la structure par des ponts salins intra moléculaires. 129	129
1. Synthèse.....	130
2. Analyses en solution.....	134
3. Analyses à l'état solide.....	135
a) <i>Caractérisation de la structure secondaire</i>	136
b) <i>Détail de l'assemblage supramoléculaire des hélices dans le cristal de IV.D</i>	140
III. Conclusion et perspectives.....	146
CHAPITRE V. : Synthèse d'hélices chimères α-peptide /oligourée.....	151

I.	Molécules chimères α-peptide /oligourée en milieu organique	153
1.	Synthèse.....	153
	a) <i>Synthèse en solution de l'oligomère α-peptide/oligourée V.A.....</i>	<i>154</i>
	b) <i>Synthèse en phase solide de l'oligomère V.B.....</i>	<i>155</i>
2.	Analyse conformationnelle des oligomères chimères	156
	a) <i>En solution par CD dans le TFE à 0.2 mM.....</i>	<i>156</i>
	b) <i>En solution par RMN.....</i>	<i>157</i>
	c) <i>En phase cristalline.....</i>	<i>162</i>
II.	Molécules chimères solubles en milieu aqueux.....	166
1.	Synthèse du segment peptidique	167
2.	Couplage et déprotection.....	167
3.	Etude préliminaire en solution.....	168
	Conclusion et perspectives.....	173
	Partie expérimentale	181
I.	General.....	181
II.	Compounds described in Chapter 2	184
III.	Compounds described in Chapter 3	205
IV.	Compounds described in Chapter 4 (water-soluble oligoureas).....	224
V.	Compounds described in chapter 5 (chimeric oligomers).....	243
	Références	257

Abréviations

δ	déplacement chimique (ppm)
%	pourcent
° = deg	degré
2D	deux dimensions
Å	angström
ACHC	acide aminocyclohexanecarboxylique
ADN	acide désoxyribonucléique
ANS	8-anilidonaphtalène-1-sulfonate
AU	ultracentrifugation analytique
Bn	benzyle
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyle
BOP	hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yloxy-tris(diméthylamino)-phosphonium
Bu	butyle
Bn	benzyle
C	celsius
Cbz = Z	benzyloxycarbonyle
CCM	chromatographie sur couche mince
CD	dichroïsme circulaire
CHx	cyclohexyle
cm	centimètre
COSY	COrelated SpectroscopY
Cu	cuivre
DADME	1,2-diamino-1,1 diméthylethane
DIAD	Diisopropyl azodicarboxylate
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DMF	diméthylformamide
dmol	decimole
DMSO	diméthylsulfoxyde
DSC	carbonate de disuccinimide
EMPR	ellipticité molaire par résidu
éq.	équivalent
ESI-MS	analyse de masse par ionisation par electrospray
EtOAc	acétate d'éthyle
Fmoc	fluorenylméthoxyloxy-carbonyle
g	gramme
h	heure
HBTU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetraméthyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl) uronium hexafluorophosphate
hIL-8	Interleukine 8 humaine
HOBT	1-hydroxybenzotriazole
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
Hz	Hertz

IBCF	chloroformiate d'isobutyle
iBu	isobutyle
iPr	isopropyle
kcal	kilocalorie
kDa	kilodalton
kg	kilogramme
λ	longueur d'onde
M	mol.litre ⁻¹
Me	méthyle
mg	milligramme
MHz	mégahertz
min	minute
mL	millilitre
mM	millimolaire
mmol	millimole
mol	mole
MPD	2-méthyl-2,4-pentanediol
Mw	Masse molaire
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
nm	nanomètre
NMM	<i>N</i> -méthylmorpholine
NOE	Nuclear Overhauser Effect
ppm	partie par million
PS	polystyrène
quant.	quantitatif
RCPG	récepteur couplé aux protéines G
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMSD	root mean square deviation
RNase	Ribonucléase
ROESY	Rotating-frame nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
s	seconde
TFA	acide trifluoroacétique
TFE	2,2,2-trifluoroéthanol
THF	tétrahydrofurane
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TPR	tetratricopeptide repeat
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
W	Watt
Δδ	écart de déplacement chimique (ppm)
μ	micro

Nomenclature utilisée

Les acides α aminés seront indifféremment désignés sous leur nom complet ou sous leur code à trois lettres. Par exemple, l'alanine sera nommée Ala. Les acides β -aminés seront eux précédés du signe β . (β^3 -homoalanine : β^3 hAla).

Les résidus de type urée seront désignés par le code de trois lettres de l'acide aminé dont ils sont issus suivi en exposant de la lettre « u ». Ainsi le résidu dérivé de l'alanine sera nommé Ala^u (Figure 1).

Lorsque ce sera nécessaire, les atomes de carbone de la chaîne principale seront désignés par des lettres grecques α , β , γ , δ , et ϵ comme présenté sur la Figure 1.

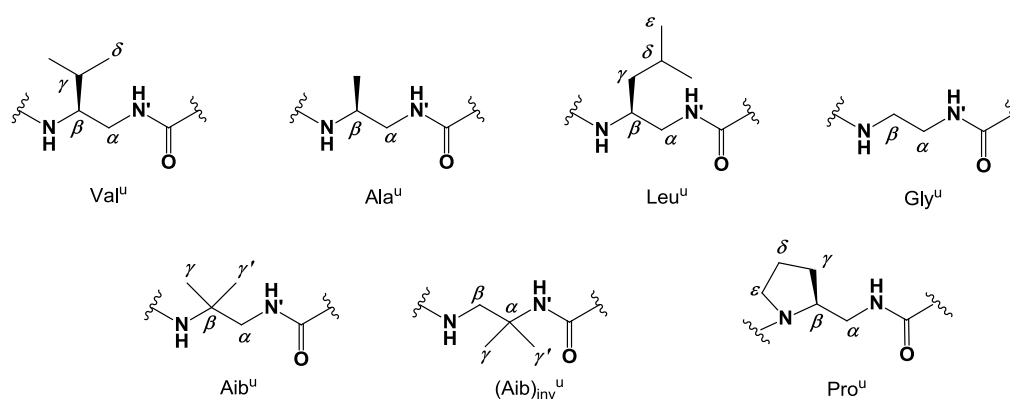


Figure 1 : exemple de notation des résidus de type urée

De la même manière une oligourée protégée par un groupement *tert*-butoxy carbonyle et comportant trois résidus dérivés de la valine, de l'alanine et de la leucine sera notée Boc-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe. Les résidus des oligourées seront numérotés en partant de l'extrémité couplée à la méthylamine qui sera décrite comme l'extrémité C-terminale de l'oligomère (par analogie avec les peptides) alors que l'extrémité protégée par le groupement Boc sera N-terminale. Ainsi la position P1 correspondra au résidu terminal couplé à la méthylamine comme présenté sur la Figure 2.

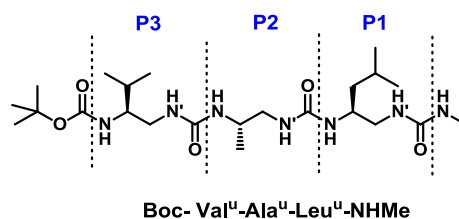


Figure 2 : Numérotation des résidus dans une oligourée

Les angles dièdres (ϕ , θ_1 , θ_2) seront définis par $\phi = \text{CO-NH}^\beta\text{C}^\alpha\text{C}$, $\theta_1 = \text{NH}^\beta\text{C}^\alpha\text{C-N}^\gamma\text{H}$ et $\theta_2 = \beta\text{C}^\alpha\text{C-N}^\gamma\text{H-CO}$ comme décrit sur la Figure 3.

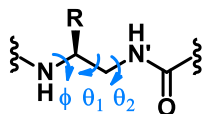


Figure 3 : Angles dièdres des résidus dans une oligourée

La plupart des composés rapportés font l'objet d'une numérotation systématique, suivant leur ordre d'apparition dans ce manuscrit, réinitialisée au début de chaque nouveau chapitre. D'autres sont désignés suivant des nomenclatures particulières. Ainsi les monomères seront désignés par la lettre **M** suivie de leur ordre d'apparition dans le manuscrit, comme présenté sur la Figure 4.

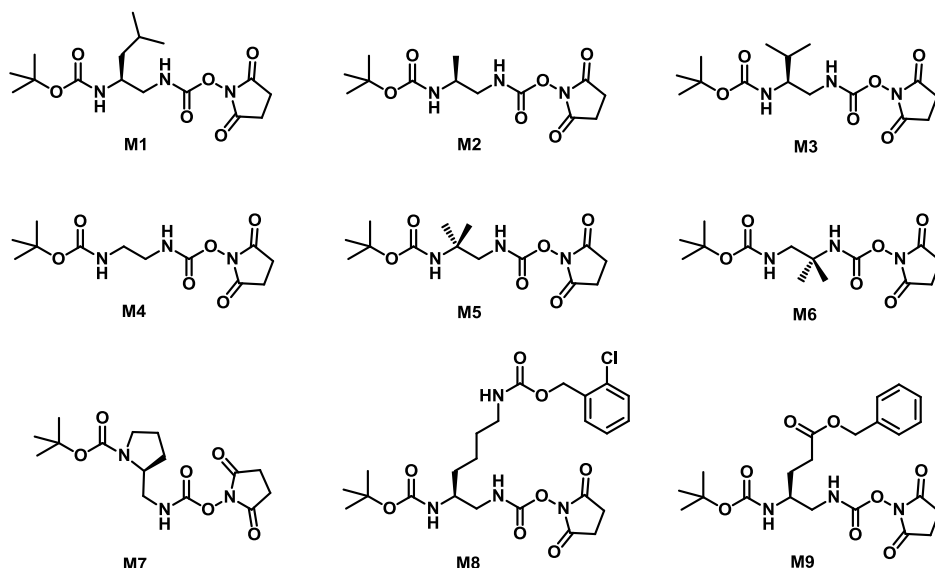


Figure 4 : Numérotation des monomères activés

Dans les chapitres II et III les oligourées seront nommées en fonction de la longueur des segments dits canoniques, situés de part et d'autre des résidus contraints de type Aib^u, Aib_{inv}^u, et Pro^u.

- Les segments canoniques de 3 résidus Boc-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe seront nommés « **3** » ceux de 6 résidus canoniques Boc-Val^u-Ala^u-Leu^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe « **6** ».
- Le résidu Pro^u sera nommé **P** ; le résidu Leu^u, **L** ; le résidu Aib^u, **A** et le résidu Aib_{inv}^u, **B**.

Ce qui donnera par exemple :

- Boc-**Leu**^u-Val^u-Ala^u-Leu^u- Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe → **L6**
- Boc-Val^u-Ala^u-Leu^u-**Aib**^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe → **3A3**
- Boc-(Val^u-Ala^u-Leu^u)₂-**Pro**^u-(Val^u-Ala^u-Leu^u)₂-NHMe → **6P6**.

RESUME

RESUME

Les structures des protéines jouent un rôle fondamental dans leur activité biologique (catalyse, transport, ...), c'est pourquoi de nombreux chercheurs se sont inspirés de ces biopolymères pour créer des architectures synthétiques capables d'adopter des structures repliées bien définies, les foldamères. Parmi ceux-ci, des oligoamides aliphatiques et aromatiques synthétisés à partir de résidus d'acides aminés non naturels très divers (acides β -, γ -, δ - aminés,...) et les oligourées aliphatiques ont montré de bonnes capacités à mimer les structures secondaires des protéines. Récemment l'intérêt s'est porté vers l'élaboration de structures plus complexes tels que des repliements tertiaires ou des assemblages quaternaires.

Au laboratoire, nous nous intéressons particulièrement à une famille de foldamères peptidomimétiques à base d'urées de structure canonique $[-NH-\beta CH(R)-\alpha CH_2-N'H]_n$ capables d'adopter des structures en hélice de type 2.5 (c.-à-d. 2.5 résidus par tour), stabilisées par un réseau de liaisons hydrogène à trois centres. Au cours de ces travaux de thèse, nous nous sommes, dans un premier temps, attachés à mieux comprendre les règles qui régissent le repliement de ces oligourées en étudiant la compatibilité de différents résidus comportant de fortes contraintes stériques avec la formation des hélices. Nous nous sommes ensuite penchés sur l'élaboration de molécules susceptibles d'adopter des structures plus complexes et sur la possibilité d'utiliser ces hélices particulièrement stables pour induire l'hélicité dans des segments α -peptidiques associés.

L'acide α -aminoisobutyrique (Aib) est connu pour ses capacités à induire et stabiliser les hélices dans les peptides. C'est pourquoi nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'influence de l'introduction, au centre d'une oligourée canonique, de résidus achiraux *gem*-diméthyle dérivés de cet acide aminé. Cette partie du projet a été réalisée à l'Université de Manchester en collaboration avec le Pr J. Clayden avec l'idée de générer des hélices achirales et d'étudier l'influence de contrôleurs chiraux sur l'hélicité. Les études réalisées en solution et à l'état solide montrent que l'insertion d'un ou deux résidus alkylés sur le αC , (Aib^u_{inv}) ou le βC , (Aib^u) est compatible avec la formation de l'hélice 2.5 d'oligourée (Figure R1). Cependant celle-ci semble plus stable lorsque la substitution est réalisée sur le carbone α . Dans le cas contraire la présence des deux groupements méthyles provoque un réarrangement conformationnel local déstabilisant la structure hélicoïdale.

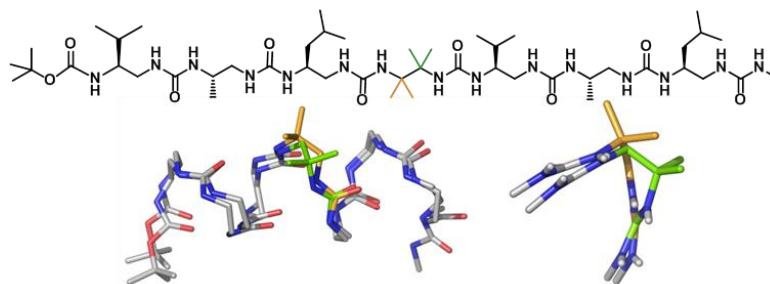


Figure R1 : Schéma et structures cristallographiques des molécules comportant un résidu *gem*-diméthyle sur le $^{\alpha}\text{C}$ (vert) ou le $^{\beta}\text{C}$ (orange)

Finalement pour se rapprocher des oligomères entièrement achiraux, nous avons introduit trois unités de type Aib à l'extrémité d'un segment canonique lui-même formé de trois résidus chiraux pour induire l'hélicité. Seule la molécule comportant les Aib^u_{inv}, présente les caractéristiques de la formation d'une hélice 2.5 en solution. Dans le cas des Aib^u, tout indique que la molécule n'adopte pas de structure secondaire particulière. Le segment chiral est donc capable d'induire l'hélicité dans un segment achiral lorsque la substitution *gem*-diméthyle est réalisée sur le carbone $^{\alpha}\text{C}$. Une étude préliminaire effectuée sur une oligourée entièrement composée de résidus *gem*-diméthyle a d'ailleurs mis en évidence la nécessité d'ajouter un inducteur chiral approprié pour induire l'hélicité.

Nous nous sommes de la même manière, intéressés à la compatibilité de résidus cycliques contraints dérivés de la proline. En raison de la contrainte stérique imposée par le cycle pyrrolidine et de l'absence d'un donneur de liaison hydrogène au niveau de l'amide tertiaire, le résidu proline est connu pour induire des coudes au centre des hélices α . Les études en solution par RMN et dichroïsme circulaire ainsi qu'à l'état solide montrent que le cycle pyrrolidine, lorsqu'il est introduit au centre d'une séquence oligourée canonique, est compatible avec la formation de l'hélice 2.5 même s'il a tendance à la déstabiliser localement. L'introduction de plusieurs dérivés proline consécutifs (Figure R2) est possible mais semble provoquer une déstabilisation croissante de l'hélice qui devient trop importante au-delà de cinq résidus. L'obtention de structures cristallographiques confirme la formation d'une hélice jusqu'à 3 unités pyrrolidine consécutives centrales. De même, une oligourée composée uniquement de dérivés pyrrolidine ne semble pas (du moins pour les longueurs de chaînes étudiées) adopter de conformation bien définie. Comme précédemment, nous avons ainsi pu mettre en évidence la nécessité d'induire l'hélicité avec un segment canonique.

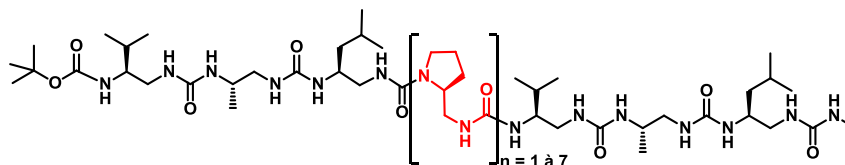


Figure R2 : Schéma des molécules comportant plusieurs dérivés pyrrolidine consécutifs

En exploitant la compatibilité du résidu pyrrolidine avec la géométrie en hélice 2.5, nous avons pu développer une nouvelle stratégie de synthèse des oligourées par condensation de segment, l'idée étant de coupler une oligourée activée sous forme de carbamate de succinimidyle (Figure R3a) sur une deuxième oligourée présentant une fonction amine libre. En effet, lorsque le cycle pyrrolidine est introduit comme premier résidu (Figure R3c), l'alkylation de l'azote urée empêche une réaction secondaire conduisant à la formation d'un dérivé biuret cyclique (Figure R3b).

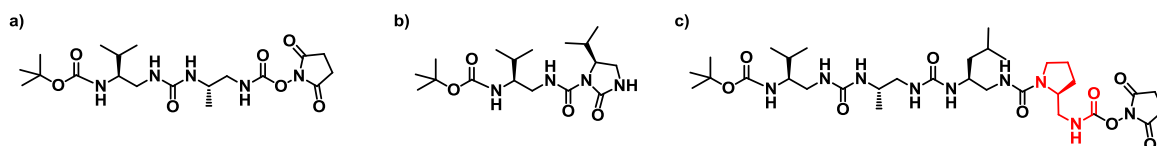


Figure R3 : a) segment activé ; b) hétérocycle biuret formé en présence de base ; c) segment activé comportant un cycle pyrrolidine

Par cette méthode, nous avons pu synthétiser de longues oligourées (de 7 à 20 résidus) par couplage itératif de segments activés trimériques et hexamériques, en un nombre restreint d'étapes et avec de bons, voir très bons, rendements (entre 64% et 93%). La plupart de ces molécules ont pu être cristallisées (Figure R4) et chacune d'entre elles adopte une structure en hélice, régulière, sans coude apparent, quel que soit le nombre de résidus pyrrolidine et la longueur des segments. Cette nouvelle stratégie pourrait donc nous permettre de synthétiser plus facilement en solution de longues molécules (≥ 10 résidus) en diversifiant les chaînes latérales.

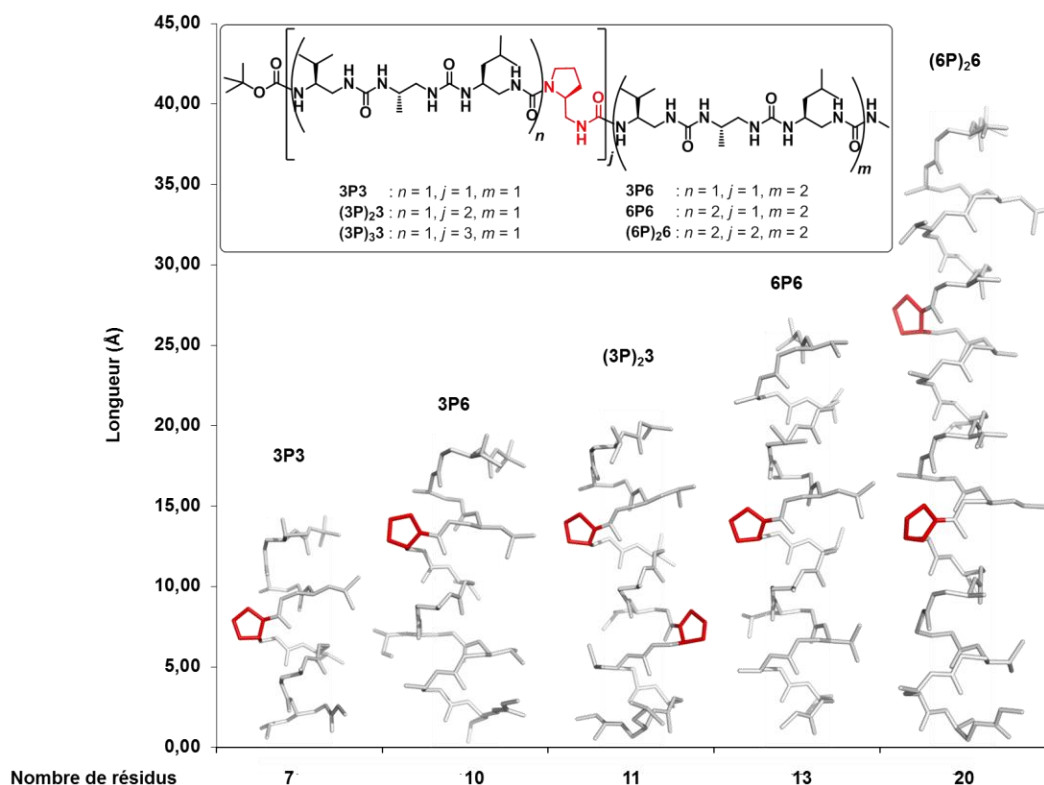


Figure R4 : Séquences et structures cristallographique de certaines oligourées préparées par condensation de segment.

Un autre aspect du projet a d'ailleurs consisté à concevoir et synthétiser des oligourées solubles dans l'eau susceptibles de former des architectures quaternaires par assemblage non covalent contrôlé des hélices. C'est un domaine encore peu exploré dans la chimie des foldamères. Grâce à cette nouvelle stratégie de synthèse, plusieurs oligourées amphiphiles comportant une face hydrophobe ont pu être obtenues. D'après les études en solution, les molécules issues d'un premier design semblent adopter une structuration en hélice (au moins partiellement) en milieu aqueux, cependant nous n'avons pas pu mettre en évidence la formation d'un assemblage de plus haut degré. Un oligomère issu d'un deuxième design favorisant la formation de ponts salins intramoléculaires a quant à lui montré une capacité d'agrégation en solution et a pu être cristallisé en milieu aqueux (Figure R5). La structure cristallographique a révélé la formation d'une hélice 2.5 stabilisée par un réseau de liaisons hydrogène à trois centres très similaire à celui observé en milieu organique. Contrairement à ce qui était attendu, les interactions électrostatiques et hydrophobes intermoléculaires permettent aux hélices de s'associer entre elles pour former un canal d'un diamètre de 15 Å. La paroi interne comportant les chaînes latérales chargées est recouverte de molécules d'eau alors que l'extérieur hydrophobe permet l'association des canaux entre eux. Même s'il ne s'agit pas d'un assemblage discret, ces canaux représentent cependant une avancée très intéressante. Les informations à haute résolution obtenues grâce à cette structure cristalline nous permettent de mieux appréhender les principes de formation de cet assemblage, mais aussi de mieux comprendre comment modifier la séquence pour moduler la structure interne et le diamètre du canal ou encore former d'autres architectures comme des faisceaux d'hélices de stœchiométrie contrôlée.

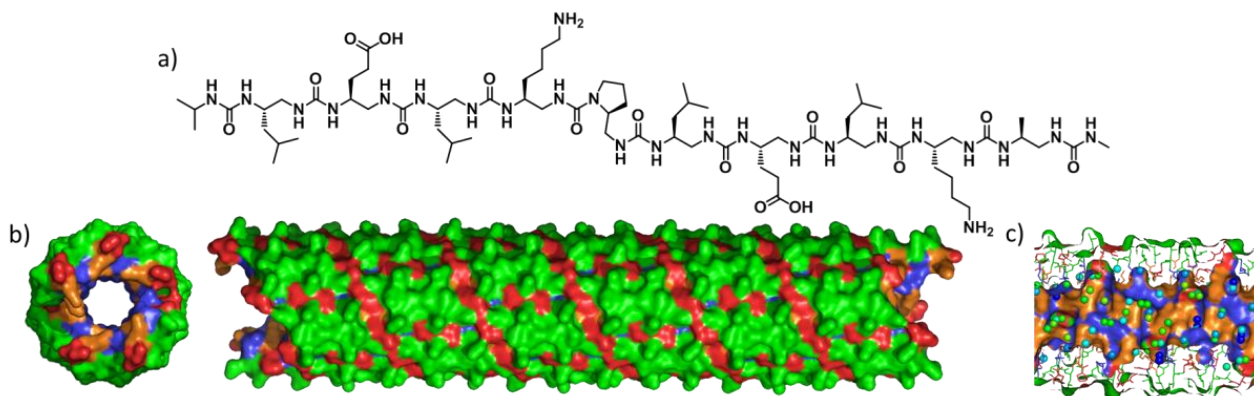


Figure R5 : a) Schéma de l'oligourée amphiphile ; b) structure cristallographique du canal qu'elle forme par auto-assemblage ; c) molécules d'eau présentes à l'intérieur du canal (colorées en fonction de leur facteur d'agitation thermique).

Les hélices d'oligourées, en raison notamment de leur robustesse et de leur stabilité à la protéolyse, présentent un potentiel intéressant pour une utilisation en chimie médicinale, notamment pour mimer des hélices protéiques et inhiber des interactions protéine-protéine dans le cas de pathologies associées. Une difficulté associée à la conception de mimes d'hélices- α est de reproduire la distribution des chaînes latérales à la surface de l'hélice naturelle. Un moyen serait de ne remplacer qu'une partie de la séquence peptidique par un squelette peptidomimétique de manière à conserver

l'orientation native d'une partie des chaînes latérales. Nous avons donc préparé et analysé les préférences conformationnelles d'une série d'oligomères chimères constitués de segments α -peptidiques et oligourées juxtaposés. Les analyses par RMN et dichroïsme circulaire suggèrent la formation d'une structure hélicoïdale continue parcourant toute la séquence. Ces informations ont été renforcées par la résolution de la structure cristallographique d'une molécule possédant un court segment peptidique fixé à l'oligourée par son extrémité C-terminale (Figure R6). On observe effectivement la formation d'une hélice unique : le segment oligourée adopte une structure en hélice 2.5 qui se poursuit dans le segment peptidique en une structure très proche de l'hélice α .

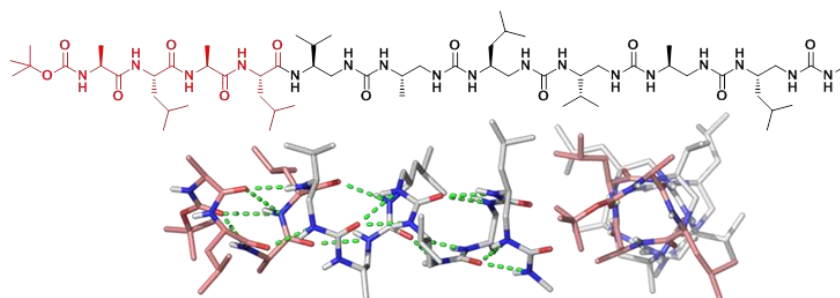


Figure R6 : Schéma et structure cristallographique d'un oligomère chimère peptide (rouge)-oligourée (gris)

Ces résultats nous ont encouragés à effectuer une étude préliminaire en milieu aqueux. Un oligomère chimère, comportant cinq acides α -aminés et cinq résidus de type urée avec des chaînes hydrosolubles a été synthétisé par condensation de segment. D'après les études de dichroïsme circulaire, la molécule n'adopte pas de structure particulière dans une solution de tampon phosphate à pH 7.1, mais l'ajout d'un pourcentage de 2,2,2-trifluoroéthanol semble induire un repliement en hélice proche des hélices α . Bien que ces résultats ne soient que préliminaires, ils sont malgré tout encourageants et cette étude mérite d'être poursuivie en variant la taille des oligomères et le ratio lien amide/lién urée. S'il s'avère que les oligourées sont capables d'induire la formation d'une hélice dans un segment peptidique plus long, on pourra alors envisager de développer des séquences hybrides pour cibler des interactions protéine-protéine spécifiques mettant en jeu des domaines en hélice.

CHAPITRE I

Développement des foldamères vers des structures plus ordonnées : Mimes artificiels de protéines

CHAPITRE I. : Développement des foldamères vers des structures plus ordonnées : Mimes artificiels de protéines

Les protéines, présentes dans tout organisme vivant, sont impliquées dans chaque procédé biologique et leurs propriétés fonctionnelles sont très nombreuses. Elles peuvent jouer un rôle aussi bien catalytique, que structural. On les retrouve aussi, entre autres, dans les processus de transport, de défense, de stockage et de régulation de l'expression de gène.

Bien que les séquences protéiques ne soient construites qu'à partir d'une vingtaine d'acides aminés différents, elles sont capables de se replier sur elles-mêmes pour adopter une multitude de conformations spécifiques et compactes, stabilisées par des interactions intramoléculaires. Ce sont les arrangements tridimensionnels des groupes fonctionnels portés entre autres par les chaînes latérales, qui conduisent à la formation des sites actifs et définissent ainsi les propriétés caractéristiques de chaque protéine.

On peut remarquer plusieurs degrés d'organisation. Tout d'abord l'arrangement tridimensionnel local des résidus qui peut conduire à la formation d'une structure secondaire spécifique comme les hélices α , les feuillets β , ou encore les coudes. La structure tertiaire de la protéine correspond à l'association dans l'espace des différents motifs secondaires. On parle de structure quaternaire lorsqu'un assemblage généralement non covalent de plusieurs chaînes polypeptidiques est observé (Figure I.1).

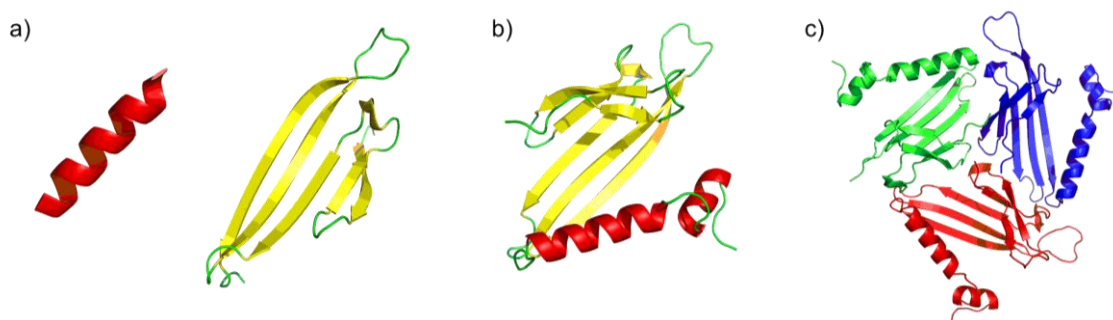


Figure I.1: a) Structures secondaires : hélice α en rouge et feuillet β en jaune. b) structure tertiaire, c) assemblage quaternaire de 3 sous unités (PDB : 1FR5)

L'activité biologique d'une protéine est intimement liée à sa structure spécifique (l'échec du repliement d'une protéine dans sa forme attendue peut être à l'origine de pathologies graves comme les maladies neurodégénératives). Ainsi l'étude approfondie de ces structures a permis, au cours des dernières décennies, de mieux appréhender les relations structure-activité et de réaliser de grandes

avancées dans le domaine thérapeutique. Cependant, malgré des succès retentissants sur la conception *de-novo* de structures protéiques artificielles,^[1-3] il est toujours difficile de prévoir l'agencement tridimensionnel d'une protéine à partir de son seul enchaînement d'acides aminés. Dans ce contexte, il peut être intéressant d'essayer de mimer ces structures en utilisant des molécules synthétiques pour mieux comprendre les règles qui régissent leur repliement et leurs mécanismes d'interactions. On pourra ensuite envisager d'utiliser ces peptidomimes pour des applications thérapeutiques, par exemple en reconnaissance moléculaire, ou pour inhiber des interactions protéine-protéine.

Les foldamères, oligomères artificiels capables de se replier sur eux même pour adopter des structures secondaires bien définies, ont donc suscité un intérêt croissant au cours des vingt dernières années.^[4-8] On a pu voir que les motifs des structures secondaires des protéines n'étaient pas exclusivement rencontrés dans les peptides α mais aussi dans de nombreuses familles d'oligomères synthétiques. Les β -^[4, 9], γ -^[10-12] et δ -^[13] peptides ont été les plus étudiés, mais les peptoïdes^[14, 15] (oligomères de *N*-alkyl glycine), les oligomères aromatiques^[16] et les peptides synthétisés à partir d'acides nucléiques^[17, 18] ont aussi montré leur capacité à adopter des structures secondaires spécifiques. Le repliement des foldamères est issu de forces non covalentes similaires à celles observées dans les α -peptides comme les répulsions stériques, les interactions électrostatiques et aromatique-aromatique, les effets de solvants, les liaisons hydrogène, et la coordination à des ions métalliques. Les liaisons hydrogène jouant un rôle majeur dans le repliement des protéines, la fonction amide a été largement utilisée pour construire ces oligomères artificiels. Depuis quelques années de nouveaux squelettes où la fonction amide est remplacée par des liaisons de type urée, hydrazide ou hydroxyamide ont aussi été étudiés (Figure I.2).

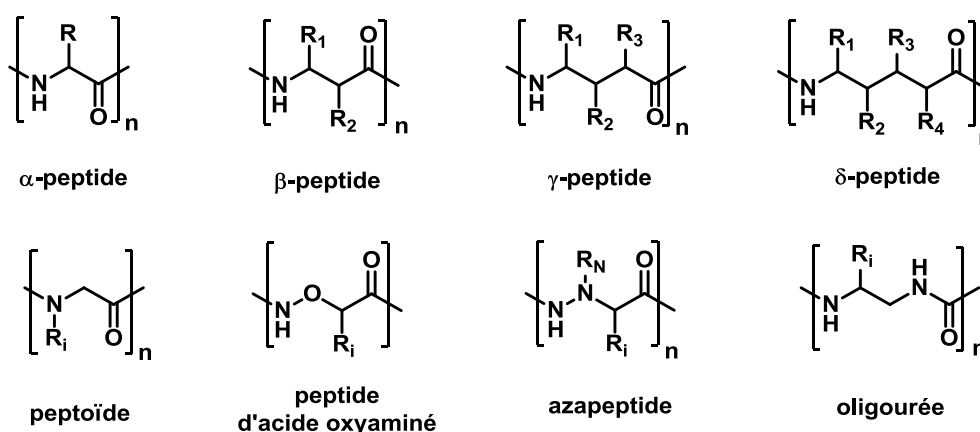


Figure I.2: Différents types de foldamères comportant des structures aliphatiques

Ces nouveaux monomères sont généralement conçus avec l'idée de créer des repliements secondaires bien définis et stables. Des progrès importants ont ainsi été réalisés dans ce secteur de la chimie des foldamères à savoir la création d'unités monomériques possédant une forte propension à

stabiliser de nouveaux éléments de structure secondaire. Si les hélices ont été très largement étudiées et caractérisées, de plus en plus de groupes s'intéressent à la formation de feuillets ou de repliements en épingle à cheveux (« hairpin »). Cependant les motifs secondaires seuls ne sont qu'une étape vers la création d'objets s'approchant davantage des dimensions et de la complexité des biopolymères naturels. Récemment des efforts importants ont été initiés pour construire des foldamères capables de former des assemblages discrets tertiaires ou quaternaires. Ainsi nous aborderons au cours de cette étude bibliographique différents exemples de peptidomimes conçus pour former des structures tertiaires, puis nous nous intéresserons à certains foldamères capables d'adopter des structures quaternaires.

I. Approche vers le design de structures tertiaires

Afin de mimer les différents domaines de protéines, des études ont été menées vers la création de structures artificielles tertiaires. Dans ces dernières, les éléments de structures secondaires peuvent interagir de manière non covalente via des liaisons hydrogène, des interactions électrostatiques, des interactions de Van der Waals, et des contacts hydrophobes, mais aussi grâce à des interactions covalentes comme les ponts disulfures. Un des motifs tertiaires le plus étudié au sein des foldamères est l'assemblage de plusieurs hélices de manière covalente ou non.

Les associations d'hélices sont des motifs très fréquemment trouvés dans les protéines notamment via l'enchaînement hélice-boucle-hélice. Les travaux sur les protéines à répétition de type hélice-boucle-hélice TPR (tetratricopeptide repeat) et DARPin (Designed ankyrin repeat proteins) respectivement par les groupes de Lynne Regan (Yale, USA)^[19] et Andreas Plückthun (U. Zürich, Suisse)^[20] sont un bel exemple d'ingénierie des protéines visant à exploiter les sites hypervariables de ces structures pour la reconnaissance spécifique de protéines. En chimie des peptides, les superstructures secondaires de type hélice-boucle-hélice ont été utilisées pour introduire par exemple des sites de coordination à des métaux,^[21] ou bien même un site de liaison de l'hème comme dans les cytochromes.^[22] Plus récemment, des oligomères non naturels ont également été utilisés pour élaborer de telles superstructures secondaires. On citera notamment les peptoïdes et les β -peptides dans la catégorie des foldamères aliphatiques dits bio inspirés qui possèdent un squelette oligoamide voisin de celui des peptides naturels.

1. Assemblage d'hélices peptidomimétiques

a) Association d'hélices de peptoïdes

Les peptoïdes sont des hétéropolymères de glycine *N*-substituée dont la structure est très proche des α -peptides. Ils ont attiré l'attention grâce à cette similitude qui leur permet de conserver une grande partie des caractères de leurs modèles naturels, notamment l'espacement des chaînes latérales et la diversité chimique.^[14, 15] Cependant avec ce type de squelette très proche des peptides, la chaîne latérale est déplacée du carbone α sur l'atome d'azote de la fonction amide. Cette migration provoque donc la disparition de possibles liaisons hydrogène intramoléculaires favorisant les équilibres *cis/trans* autour de la nouvelle liaison amide tertiaire ainsi que la perte de la chiralité du carbone, ce qui, à priori, ne facilite pas la formation d'une architecture contrôlée mais présente l'avantage de générer des composés résistants à la protéolyse. Grâce à des outils de calculs, Zuckermann et coll. ont montré qu'il était nécessaire d'introduire des chaînes latérales chirales et encombrées pour induire la formation d'une hélice dans les peptoïdes^[23]. La chiralité étant nécessaire pour générer un sens d'hélicité, et l'encombrement pour influencer la conformation de la chaîne principale en jouant notamment sur l'équilibre *cis/trans* autour de la liaison amide.

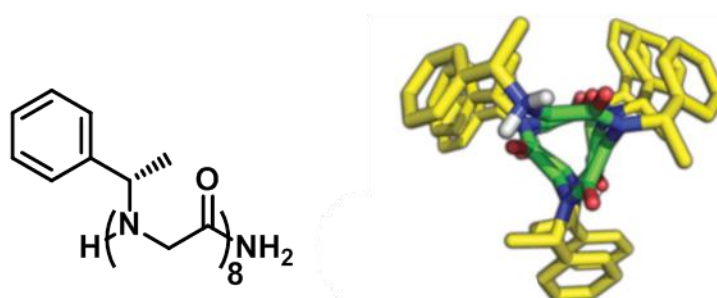


Figure I.3: exemple de peptoïde adoptant une structure hélicoïdale.^[23]

Zuckermann et coll. ont donc synthétisé des premières molécules sur ce principe. Des analyses par dichroïsme circulaire et RMN ont montré que ces peptoïdes comportant une chiralité de type *S* sur le carbone de la chaîne latérale, adoptaient une structure en hélice droite particulièrement stable avec 3 résidus par tour^[14, 24, 25]. De nombreuses perspectives ont alors vu le jour et ont amené Zuckermann et coll. à s'interroger sur l'aptitude de ces molécules à s'auto-assembler sous forme de faisceaux afin de mimer des systèmes biologiques.^[26, 27]

i. Assemblage de peptoïdes hélicoïdaux amphiphiles

Pour obtenir un assemblage tertiaire de plusieurs hélices, il leur était nécessaire de développer des hélices amphiphiles solubles dans l'eau capables de s'assembler autour d'un cœur hydrophobe. Zuckermann et coll. ont donc dû introduire des chaînes hydrophobes et hydrophiles tous les trois

résidus pour obtenir des oligomères amphipathiques tout en conservant des chaînes latérales chirales pour stabiliser l'hélice (Figure I.4).^[26]

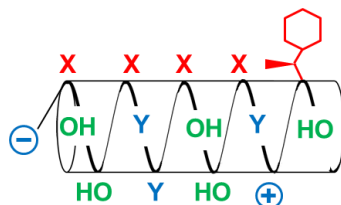


Figure I.4: Schéma d'un peptoïde amphiphile. Les chaînes hydrophobes tous les trois résidus sont représentées en rouge, les chaînes ioniques en bleu et les chaînes polaires non ioniques en vert

Ils ont ainsi pu réaliser sur support solide, une chimiothèque d'oligomères constitués de quinze résidus. Grâce à une technique de fluorescence impliquant le 8-anilino-naphtalène-1-sulfonate (ANS) (la fluorescence de ce dernier augmente lorsqu'il est retenu dans un environnement hydrophobe), les auteurs se sont aperçus que les molécules qui s'assemblent autour d'un cœur hydrophobe comportent des chaînes latérales hydrophobes possédant une substitution chirale sur le méthyle ainsi que des chaînes latérales aromatiques favorisant la liaison grâce à des interactions π - π .

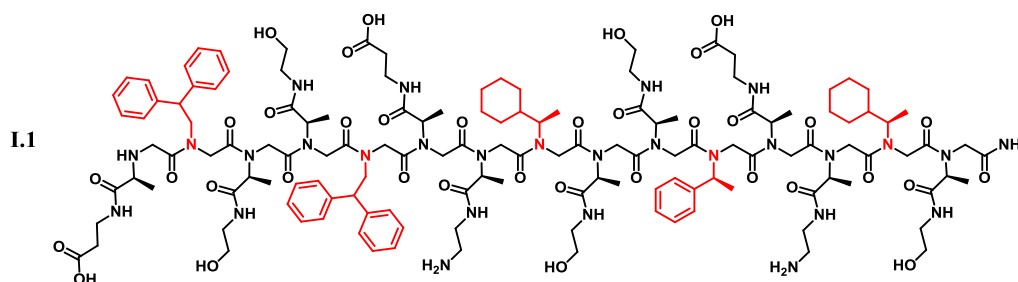


Figure I.5: Schéma du peptoïde I.1^[26]

Malheureusement les tests de fluorescence ne donnent pas d'informations sur la structure. Ils ont donc étudié l'une de ces molécules **I.1** par ultracentrifugation analytique (AU) et dichroïsme circulaire (CD). D'après les résultats obtenus, **I.1** semble s'auto-assembler selon un modèle d'équilibre monomère-dimère-tétramère ressemblant plutôt à une agrégation non spécifique de plusieurs molécules.

ii. Vers des faisceaux d'hélices ordonnés

Pour évaluer la capacité de ces peptoïdes à s'auto-assembler en structure tertiaire, Zuckermann et coll, ont donc décidé de lier plusieurs hélices amphiphiles **I.1** de quinze résidus de manière covalente par des liaisons disulfure et oxime (Figure I.6)^[27] en variant l'orientation relative des hélices (liaison tête à tête ou tête à queue).

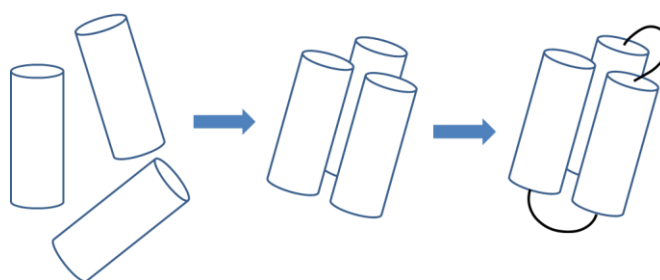


Figure I.6: Formation d'un faisceau d'hélice par conjugaison chimique^[27]

Grâce à plusieurs techniques d'analyses ils se sont aperçus que l'assemblage était favorisé dans le cas d'une association de trois hélices. Ils ont pu montrer que le repliement était principalement dirigé par des interactions hydrophobes et qu'il était nécessaire d'avoir des résidus chiraux pour former la structure secondaire en hélice. Ils ont ainsi pu mettre en évidence la formation d'un assemblage de trois hélices autour d'un cœur hydrophobe stable semblable à celui des protéines.

iii. Création d'un site de liaison du zinc

Le zinc est bien connu pour stabiliser la structure native des protéines ou agir comme cofacteur pour la catalyse enzymatique.^[28, 29] Suite à leurs premiers résultats, Zuckermann et coll. ont voulu réaliser un assemblage de deux hélices amphipathiques capables de lier le zinc^[30]. Ils ont pour cela introduit deux chaînes latérales thiol et deux chaînes imidazole sur chaque hélice, de manière à ce que le zinc soit lié uniquement lorsque le faisceau est formé. Auparavant, ce genre d'approche avait été utilisé avec succès dans le domaine des peptides pour mimer les motifs à doigts de zinc de type Cys₂His₂.^[31, 32] Pour générer la boucle, ils ont choisi le motif Gly-Pro-Gly-Gly bien connu pour ses capacités à induire des coudes β dans les protéines.^[33]

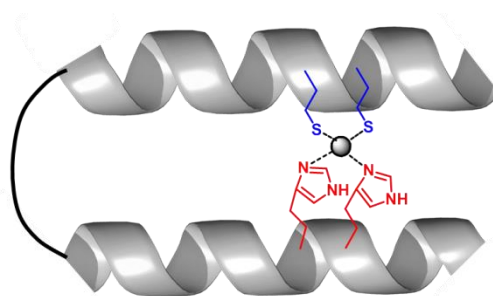


Figure I.7: Schéma du faisceau de deux hélices peptidiques stabilisé par liaison avec le zinc^[30]

Ils ont mis en évidence un repliement sur un cœur hydrophobe renforcé et stabilisé par la présence de zinc qui maintient les deux segments hélicoïdaux proches l'un de l'autre.

Finalement Zuckermann et coll. ont développé un faisceau de deux hélices peptidiques capable de lier le zinc. La formation de cette structure tertiaire est plutôt simple comparé au repliement des

protéines mais c'est un premier pas vers le design de structures plus robustes capables de reconnaissance moléculaire précise ou de catalyse.

b) Association d'hélices de β -peptides

Dès 1996, S. Gellman^[4] et D. Seebach^[34] ont mis en évidence l'aptitude des β -peptides à adopter des structures secondaires en hélices particulièrement stables. Parmi les différents types d'hélices reportés, l'hélice 14 a fait partie des mieux caractérisées. Ces oligomères ont ensuite suscité un intérêt croissant et se sont présentés comme de bons candidats pour le développement de structures plus complexes.

Le motif hélice-coude-hélice, est une des structures tertiaires la plus simple rencontrée dans les protéines et impliquée dans un grand nombre de fonctions comme la fixation de l'ADN. C'est pour cette raison que de nombreux chimistes se sont appliqués à mimer cette structure.

A.C. Kunwar et coll. ont essayé de réaliser un motif de type hélice-coude-hélice à partir de β -oligomères^[35]. Ils ont montré que des oligomères composés de résidus carbohydate β^3 -acide aminé (Caas) adoptaient des structures en hélices 12/10 aussi bien gauche que droite^[36]. Ils se sont donc basés sur ces résidus pour synthétiser le peptide **I.2** (Figure I.8), en choisissant le motif Pro-Gly pour former la boucle.

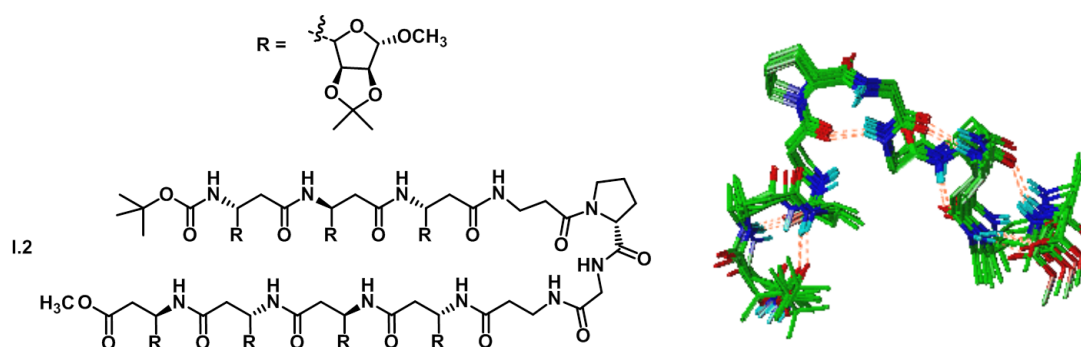


Figure I.8: a) Schéma de la molécule **I.2** ; b) Structures obtenues par dynamique moléculaire (superposition des quinze structures de minimum énergie), les résidus carbohydate ont été remplacés par des méthyles pour simplifier

Grâce à des analyses par RMN ^1H du composé **I.2**, ils ont mis en évidence la présence d'un coude β de type II' ainsi que de deux hélices 12/10 particulièrement stables. Des simulations de dynamique moléculaire ont révélé une orientation presque orthogonale des deux hélices avec un angle d'environ 80° .

W.F. Degrado et coll. se sont intéressés à l'assemblage tertiaire d'hélices β -peptidique. Ils ont ainsi essayé de connecter deux hélices β -peptide afin qu'elles s'associent pour former un faisceau

d'hélices 14.^[37] Ils ont construit leur modèle à partir d'une hélice 14 amphiphile possédant une face hydrophobe, et des chaînes chargées en positions i , $i+3$ de façon à stabiliser le repliement par des interactions électrostatiques intra et inter moléculaires. Ils ont ensuite dimérisé ce peptide grâce à un pont disulfure (Figure I.9).

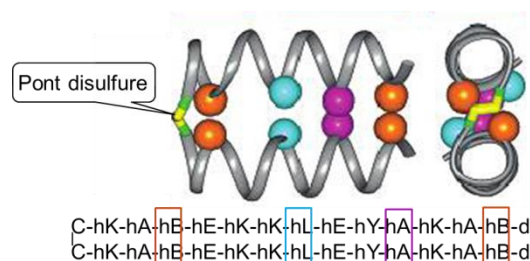


Figure I.9: Schéma du faisceau d'hélices parallèles relié par un pont disulfure^[37]

Ils ont pu démontrer par dichroïsme circulaire et ultracentrifugation analytique, la formation d'une association intramoléculaire des deux hélices majoritairement stabilisée par des interactions entre les chaînes apolaires (formation d'un cœur hydrophobe) plutôt que par des forces électrostatiques. Ils ont développé un foldamère dont la structure tertiaire est stabilisée par des interactions longues distances entre les deux hélices connectées de manière covalente. Des études structurales à haute résolution seraient nécessaires pour déterminer dans quelle mesure la conformation repliée correspond à la structure attendue.

c) *Oligomères aromatiques*

Parmi les différents résidus pouvant composer les oligomères aromatiques, l'acide 8-amino-2-quinoline carboxylique fait partie de la classe des δ peptides. Il a été conçu par I. Huc et coll. et permet d'obtenir des foldamères hélicoïdaux facilement synthétisables et dont la conformation est prévisible et stable. Grâce à ces résidus, les structures secondaires de ces oligomères aromatiques sont principalement stabilisées par des liaisons hydrogène intra résidu et par des empilements aromatiques intramoléculaires. Ces résidus ne présentant pas de groupes chiraux, les hélices qu'ils forment peuvent aussi bien être droites (P) que gauches (M).

i. *Introduction d'un espaceur entre deux segments hélicoïdaux*

Pour réaliser des structures tertiaires la plupart des équipes ont choisi de relier plusieurs éléments secondaires par un connecteur et de diriger le repliement par la formation d'un cœur hydrophobe et de liaisons hydrogène. La stratégie envisagée par I. Huc et coll. dans le cas des oligomères aromatiques est très différente de celles présentées jusqu'à maintenant. Ils ont en effet choisi d'introduire un résidu possédant une faible propension à l'hélicité entre deux segments

hélicoïdaux stables (Figure I.10)^[38]. Suivant sa position ce maillon pourra transmettre l'hélicité d'un segment à l'autre et conduire principalement à l'obtention des énantiomères PP et MM, ou au contraire induire un centre d'inversion. Dans ce cas-là il sera possible d'observer un mélange des espèces PM et PP/MM, la proportion entre les espèces *méso* dégénérées (PM) et le racémique (PP/MM) étant directement corrélée à la propension du résidu central à maintenir l'hélicité.

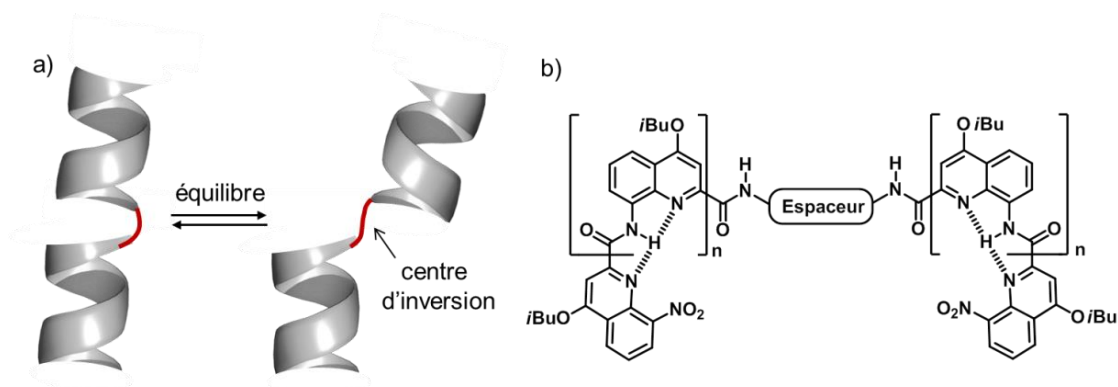


Figure I.10: a) principe d'un centre d'inversion ; b) Schéma général des oligoamides aromatiques synthétisés par I. Huc et coll.

Ainsi un grand nombre de résidus centraux flexibles, semi-rigides ou rigides supposés provoquer un centre d'inversion dans les hélices ont été testés.

Grâce à des études de RMN en solution et de diffraction des rayons X à l'état solide (Figure I.11), il a été montré que les connecteurs flexibles présentaient une forte propension à l'hélicité et transmettaient le sens d'hélicité d'un segment à l'autre conduisant à la formation préférentielle des espèces PP/MM (Figure I.11a).

De la même manière, ils ont montré que les connecteurs semi-rigides pouvaient interrompre complètement la communication du sens de l'hélice quand la structure n'était pas compatible (Figure I.11 b et c).^{[38] [39]}

Pour finir, l'influence d'espaceurs rigides au milieu d'une hélice a été testée.^[40] Ils se sont aperçus que ces résidus provoquaient une exclusion stérique réciproque des deux segments hélicoïdaux qui s'orientaient donc dans des directions opposées en adoptant un sens d'hélicité inversé conduisant à la formation majoritaire de l'hélice *méso* PM (Figure I.11d).

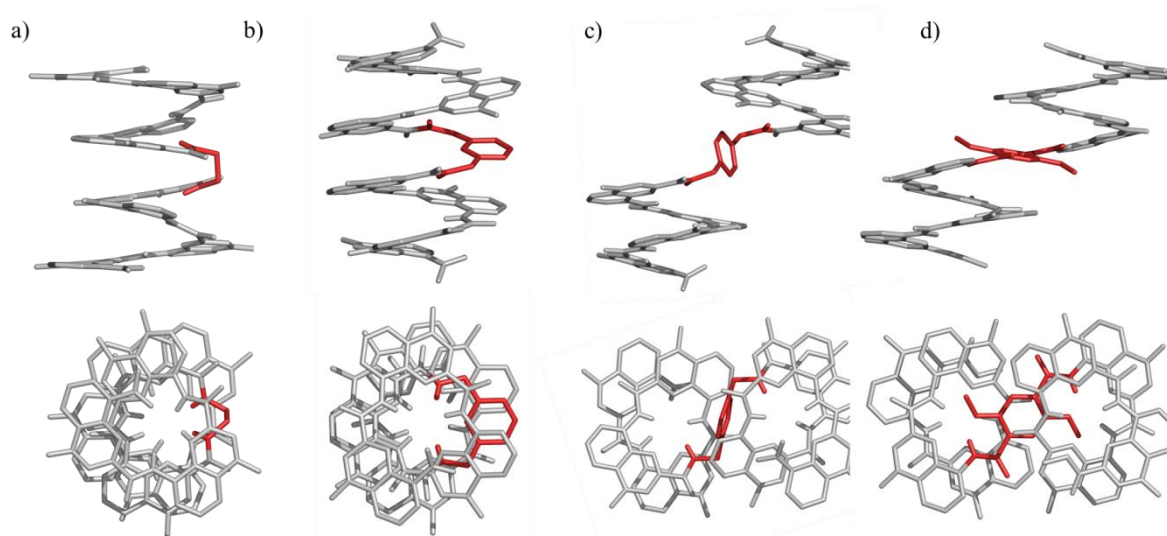


Figure I.11: Structures cristallographiques d'oligoamides aromatiques avec un connecteur central a) flexible de type éthylène diamine^[39], b) et c) semi rigide de type *m*- et *p*-xylylène respectivement^[38, 39] d) rigide de type diméthoxyterephthaloyle^[40] (pour plus de clarté les chaînes isobutyle ont été omises)

Ainsi I. Huc et coll. ont réussi à concevoir des hélices *méso* de manière contrôlée et ainsi obtenir des structures tertiaires n'impliquant pas d'interactions entre les deux éléments secondaires.

ii. Structures tertiaires stabilisées par coordination avec des métaux

De la même manière et afin de réaliser des boucles comportant des angles non conventionnels, I. Huc et coll. se sont intéressés à l'utilisation des complexes métalliques pour connecter et orienter deux segments aromatiques entre eux. Par coordination des métaux tels que les ions Cu^{I} tétraédrique et Fe^{II} octaédrique, ils ont réussi à connecter des segments oligoamides aromatiques composés comme précédemment d'acides 8-amino-2-quinoline carboxyliques.^[41] Ils ont ensuite étudié le sens d'hélicité des deux segments (P ou M) ainsi que la chiralité du complexe métallique (Δ ou Λ).

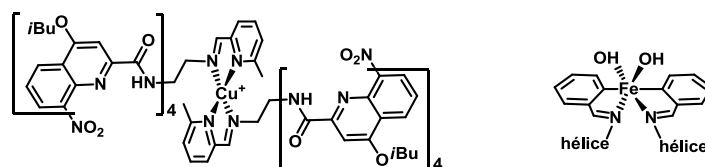


Figure I.12: Schéma des complexes métalliques de Cu^{I} et de Fe^{II} ^[41]

Selon la chiralité adoptée par le complexe de Cu^{I} et par l'hélice d'oligoquinoline, plusieurs espèces étaient attendues dans chacun des cas notamment des paires homohélicoïdales dans lesquelles les deux hélices ont le même sens PΔP/MΔM et PΔP/MΔM et une paire hétérohélicoïdale ou les deux hélices sont de sens contraires PΔM/PΔM.

Les études par RMN leur ont permis de voir qu'il existait un fort degré de communication entre les sens de chaque hélice et la configuration du centre métallique voisin. Certaines structures ont formé des cristaux et ont pu être caractérisées à l'état solide (Figure I.13). Pour le complexe avec le cuivre, P Δ P/M Δ M et P Δ M/P Δ M ont cristallisé comme racémique dans deux solvants différents sous forme de complexe tétraédrique avec le Cu^I provoquant ainsi une orientation perpendiculaire inhabituelle des deux hélices. En ce qui concerne le Fe^{II}, malgré l'observation par spectroscopie de masse d'un complexe formé par trois segments, seul le complexe comportant deux ligands hélicoïdaux a pu être cristallisé pour donner la structure du racémique M Δ M/ P Δ P Fe^{II}. Dans ce complexe, les deux hélices sont presque parallèles et ce en raison de la géométrie octaédrique du Fe^{II} et des deux autres ligands hydroxyde.

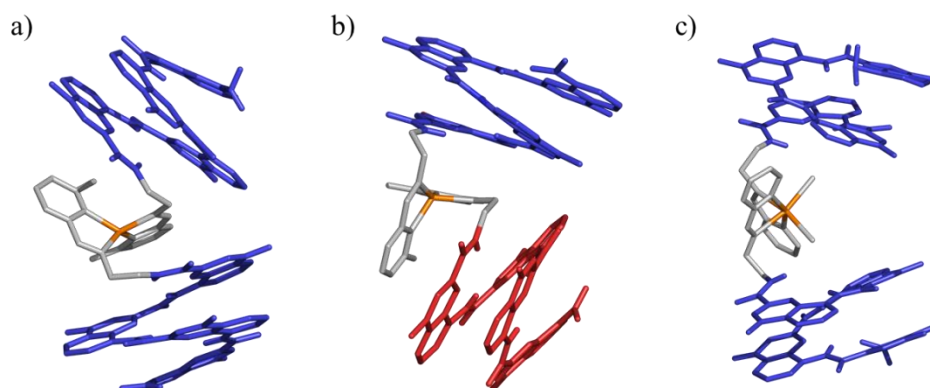


Figure I.13: a) Cu M Δ M, b) Cu P Δ M, c) Fe M Δ M ^[41]

I. Huc et coll. ont ainsi montré que l'assemblage dynamique de fragments hélicoïdaux dirigé par les métaux est une approche efficace pour orienter les oligoamides aromatiques de manière précise. Ils ont pu développer et caractériser un nouveau motif tertiaire possédant deux segments hélicoïdaux quasiment perpendiculaires.

iii. Connexion de deux hélices avec un linker central

Afin de se rapprocher de la structure des protéines en termes de taille et de complexité structurale. I. Huc et coll. ont élaboré un foldamère aromatique dont la taille (>8 kDa) est comparable à celle d'une petite protéine. Comme les longues séquences linéaires sont relativement difficiles à synthétiser, ils ont choisi de réaliser une structure ramifiée en connectant cette fois de manière latérale, deux longues hélices de quinoline par un petit espaceur éthylène glycol ^[42, 43].

Grâce à l'obtention des structures cristallographiques ils ont pu montrer que l'espèce prédominante était la forme méso PM dans le CDCl₃ (93%) alors que les proportions étaient inversées dans le toluène-*d*₈ ou l'espèce PP/MM était majoritaire (70%) (Figure I.14). Ce changement indique

que les deux segments hélicoïdaux interagissent de manière directe ou par l'intermédiaire des molécules de solvant.

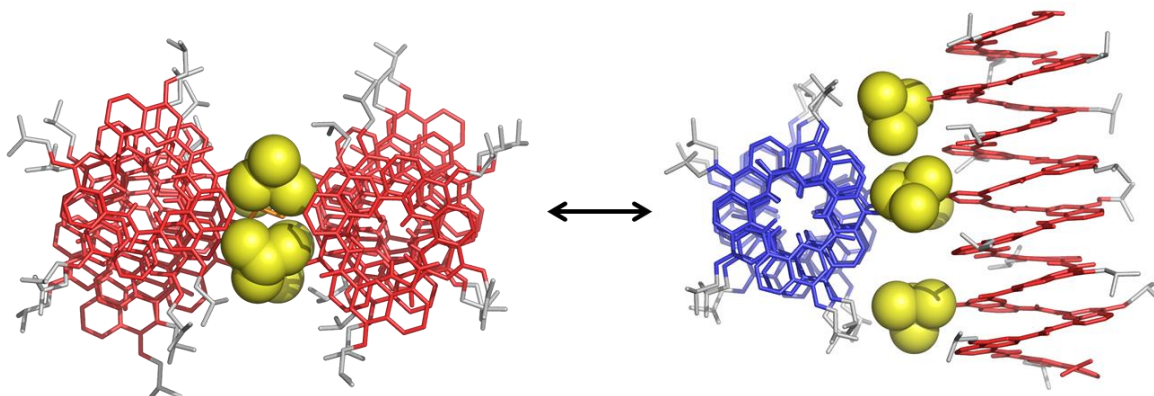


Figure I.14: Structures cristallographiques des deux hélices reliées par un espaceur éthylène glycol. Hélices P en rouge et M en bleu^[43]

Il s'est avéré que la formation de l'un ou l'autre des isomères dépendait de la conformation *gauche* ou *anti* de l'espaceur éthylène glycol, le sens des hélices étant ensuite dirigé par des interactions entre les chaînes latérales.

Ainsi I. Huc et coll. ont pu concevoir une des premières structures tertiaires artificielles de taille comparable à celle d'une petite protéine (15 kDa). Cette méthode leur a permis de contrôler l'orientation de deux hélices et de mettre en évidence une communication intramolécule du sens des hélices via des interactions entre les chaînes latérales et probablement des molécules de solvant.

2. Protéines semi-synthétiques

La synthèse totale de protéines s'est beaucoup développée au cours des dernières années et les nouvelles méthodes de ligation chimique permettent à présent d'incorporer des modules non protéinogéniques dans des protéines de différentes tailles.^[44, 45] Toujours dans l'objectif de mimer les architectures plus complexes, R. T. Raines et A. G. Beck-Sickinger se sont servis de cette méthode pour remplacer des portions d'enzymes ou de cytokines par des segments artificiels β -peptidiques connus pour leur capacité à adopter des structures secondaires spécifiques et stables. Ils ont ainsi pu voir que ces fragments foldamériques participaient à la formation de la structure tertiaire de la protéine et ne modifiaient que légèrement ses propriétés biologiques.

a) Incorporation d'une boucle β -peptidique dans une enzyme

La Ribonucléase A (RNase A) est une enzyme pancréatique qui a fait l'objet de nombreuses études^[46] et dont la structure a pu être parfaitement caractérisée.^[47] Les coudes β , en plus d'être des éléments de structure secondaire jouant un rôle critique dans la stabilité structurale des protéines, sont aussi impliqués dans de nombreuses interactions avec les partenaires biologiques (protéines, acides nucléiques). Comme ces coudes sont souvent des sites préférentiels pour la dégradation protéolytique. R. T. Raines *et coll.* ont décidé de remplacer les acides aminés Asn113 et Pro114 impliqués dans une boucle de la RNase A, par des acides aminés β , les acides *R*- et *S*-nipecotique (*R*-Nip-*S*-Nip) (Figure I.15).^[48]

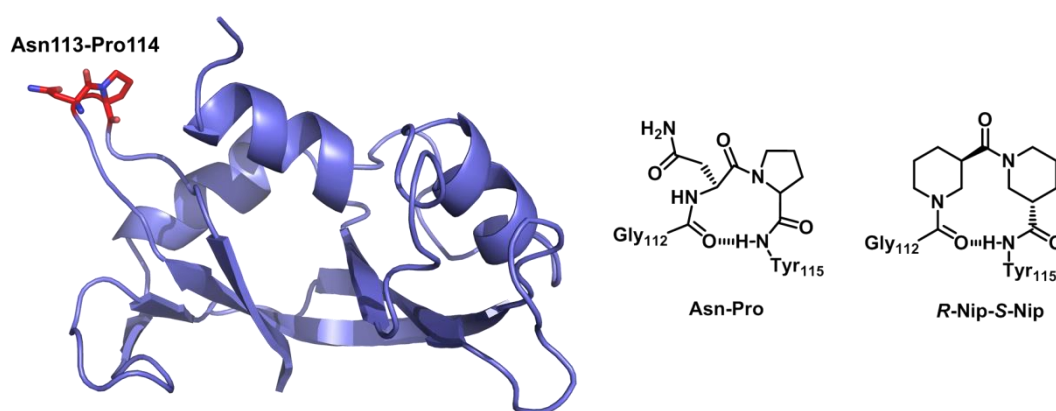


Figure I.15: Ribonucléase A, Dipeptide α Asn-Pro et dipeptide β R-Nip-S-Nip

L'échange des acides aminés α par le di- β -peptide a été réalisé par ligation chimique. L'activité enzymatique de cette protéine semi-synthétique a ensuite été testée et il a été montré qu'elle était identique à celle de l'enzyme initiale. Les auteurs ont aussi pu voir qu'en plus d'être compatible avec la structure tertiaire, le module *R*-Nip-*S*-Nip augmentait légèrement la stabilité conformationnelle de la protéine. R.T. Raines *et coll.* ont ainsi montré que l'échange d'un coude dans la RNase A par un segment di- β -peptidique conservait l'activité enzymatique de la protéine et par conséquent maintenait la structure tertiaire native. Toutefois, il n'existe pas à ce jour de structure à haute résolution d'une telle protéine modifiée.

b) Remplacement de l'hélice terminale d'une cytokine par un segment artificiel

Afin d'étudier l'influence des éléments de structure secondaire sur la fonction générale d'une protéine, A. Beck-Sickinger *et coll.* se sont quant à eux intéressés à l'Interleukine 8 humaine (hIL-8) dont la structure a été caractérisée par diffraction des rayons X.^[49] Cette molécule est caractérisée par un feuillet β central, stabilisé par une α -hélice amphiphile terminale via des interactions hydrophobes.

Pour mieux comprendre le rôle de cette hélice α , A. Beck-Sickinger et coll. l'ont remplacée par différents segments artificiels et notamment par un β -peptide^[50]. Ils ont construit ce dernier afin qu'il adopte une structure en hélice 3_{14} amphiphile et de longueur équivalente à l'hélice α initiale. Les trois faces positive, négative et hydrophobe du peptide ont ainsi été mimées (vues du dessus de la Figure I.16 b et c), cependant ce type d'oligomère composé d'acides aminés β se replie selon une conformation gauche et un sens du dipôle de l'hélice opposé à celui de l'hélice native.

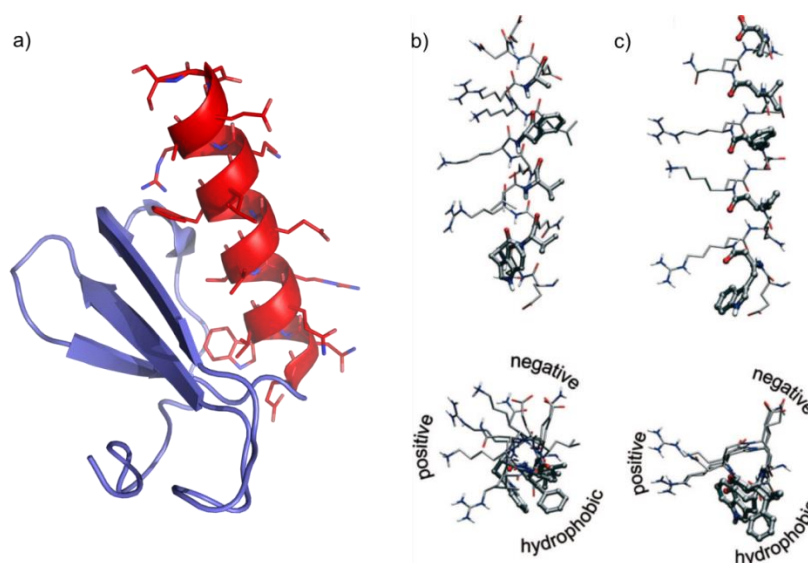


Figure I.16: a) Structure cristallographique de l'Interleukine 8 humaine. b) structure de l'hélice α de hIL-8 ; c) structure du β -peptide conçu pour mimer l'hélice α

Grâce à cette étude A. Beck-Sickinger et coll. ont montré que l'hélice était indispensable et jouait probablement un rôle structural dans la liaison et la dissociation de la chemokine de la matrice extracellulaire. Ils se sont aperçus que le segment peptidique permettait de conserver en grande partie l'activité de la molécule même si l' EC_{50} était dix fois plus élevé et l'activité au récepteur plus faible. Ces différences étant probablement dues à l'inversion de la direction du dipôle et du sens d'hélicité.

En conclusion, A. Beck-Sickinger et coll. ont prouvé qu'il était possible de remplacer d'importants éléments de structure secondaire par des séquences peptidiques non-naturelles tout en gardant en grande partie l'activité de la protéine native. Toutefois, cette étude ne présente aucune donnée structurale et il est difficile de conclure quant à l'impact de la modification introduite sur le repliement et sur la dynamique de repliement.

Ces travaux précurseurs apportent ainsi des informations utiles pour la conception de nouvelles protéines synthétiques chimères, mais aussi pour le développement de leurs applications en vue de moduler ou reproduire les fonctions de protéines pour des exploitations biomédicales.

II. Structures quaternaires

La plupart des protéines contiennent plus d'une chaîne polypeptidique. Ce sont les interactions entre ces chaînes qui caractérisent la structure quaternaire de cette dernière. Les interactions mises en jeu sont les mêmes que celles impliquées dans les structures tertiaires, notamment les interactions hydrophobes et électrostatiques et les liaisons hydrogène. Les chaînes constituant ces protéines peuvent aussi bien être identiques que différentes et c'est souvent à l'interface de ces sous-unités que se situent les sites catalytiques ou de liaison. Ces protéines multimériques sont à l'origine de nombreuses activités biologiques et c'est donc sans surprise que plusieurs groupes se sont attelés à créer des foldamères capables de s'auto-assembler pour mimer ces structures quaternaires.

1. Faisceaux d'hélices

Les faisceaux d'hélices ou « coiled coil » sont parmi les motifs de repliements des protéines les plus présents dans la nature^[51] et sont impliqués dans de nombreux procédés de régulations intracellulaires comme la transcription et la fusion de membranes. Ces motifs résultent de l'agrégation de plusieurs hélices et les interactions mises en jeux sont complexes.^[52] Cependant de nombreuses études ont permis de mettre en évidence certains principes récurrents. Généralement les différentes chaînes s'assemblent autour d'un cœur hydrophobe et sont stabilisées par des interactions électrostatiques entre les chaînes latérales. La structure primaire de ces hélices est le plus souvent caractérisée par un motif répétitif de 7 acides aminés (*abcdefg*)_n appelé heptade (Figure I.17). Les positions *a* et *d* sont typiquement occupées par des résidus hydrophobes alors que les positions *e* et *g* comportent généralement des chaînes latérales chargées complémentaires pour former des ponts salins stabilisant entre les brins. La stœchiométrie du faisceau dépend de la séquence d'acides aminés et peut varier en fonction des résidus utilisés.^[53, 54] Par exemple, M. Lu et coll ont montré que le remplacement des résidus hydrophiles aux positions *e* et *g* de la séquence du faisceau de deux hélices de GCN4 par des résidus alanine apolaires conduisait à la formation d'un heptamère dans l'eau.^[55] P.B. Harbury et coll. ont quant à eux mis en évidence la formation d'un tétramère en échangeant les résidus leucine du cœur hydrophobe de GCN4-p1 par des résidus isoleucine.^[56]

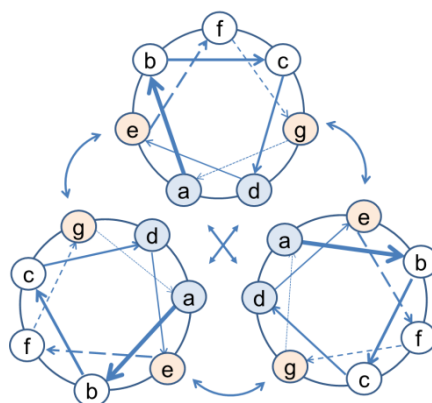


Figure I.17: Schéma d'un faisceau de 3 hélices. Les positions hydrophobes sont indiquées en bleu et les chaînes chargées en rouge

La conception de structures similaires avec des squelettes peptidiques non naturels représente donc un défi que certains chimistes ont entrepris de relever. Très récemment, S. Gellman et A. Schepartz se sont intéressés aux associations intermoléculaires de foldamères hélicoïdaux dans l'objectif de former des faisceaux d'hélices en milieu aqueux.

Deux approches différentes ont été envisagées par ces deux groupes. La première approche qualifiée de descendante (top-down), consiste à modifier de manière contrôlée une séquence α -peptidique connue (dérivant généralement d'une séquence naturelle) choisie pour sa capacité à former des assemblages quaternaires bien définis. Il s'agit de remplacer un nombre choisi de résidus de cette séquence par des acides aminés homologués (acides β -aminés) afin de conserver dans une large mesure les interactions mises en jeu dans le peptide naturel pour ne pas altérer la structure secondaire et les propriétés d'assemblage. La deuxième approche qualifiée d'ascendante (Bottom-up), repose sur la recherche *de novo* de foldamères capables de s'assembler en faisceaux discrets d'hélices. Il s'agit d'exploiter les données structurales à haute résolution disponibles pour une famille donnée de foldamères à conformation hélicoïdale afin de concevoir des séquences amphiphiles susceptibles de s'associer de manière contrôlée pour former un cœur hydrophobe comme dans les protéines naturelles.

a) Vers l'association d'hélices de β -peptides en milieux aqueux

Ainsi S.H. Gellman et coll. ont commencé par montrer que les hélices de β -oligomères amphiphiles étaient capables de s'auto-associer en solution aqueuse.^[57] Ils avaient déjà montré que les résidus cycliques de type acide *trans*-2-aminocyclohexanecarboxylique (*trans*-2-ACHC) induisaient de manière notable la formation des hélices 14 de par leur contrainte stérique.^[4] Ils ont ainsi synthétisé une première molécule **I.3** amphiphile principalement composée de ACHC et possédant trois résidus ammonium sur une face (Figure I.18).

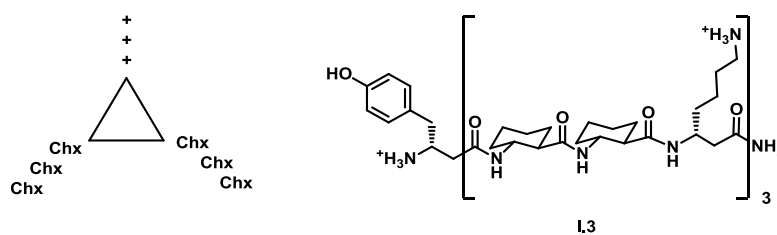


Figure I.18 : Schéma d'un oligomère β peptidique amphiphile^[57]

Les analyses en solution ont souligné la capacité de ces hélices de β -peptides **I.3** à s'auto assembler en petits agrégats solubles dans l'eau et cohérent avec la formation d'un faisceau d'hélices assemblé autour d'un cœur hydrophobe, mais ils n'ont pas pu mettre en évidence la formation d'une structure tertiaire discrète.

b) Approche descendante (top down) à partir d' α/β -peptides

S. Gellman et coll. ont choisi l'approche descendante pour concevoir des faisceaux d'hélices composés d'une alternance régulière d'acides aminés α et β (de 25-33% de résidus β). Le même groupe avait montré auparavant que de tels α,β -peptides en alternance 1 : 1 pouvaient adopter des structures secondaires en hélice bien définies proches de l'hélice α .^[58]

i. Faisceaux d'hélices α/β -peptides

C'est le domaine de dimérisation (leucine zipper) du facteur de transcription GCN4 des levures, un modèle parfaitement établi structurellement^[59], qui a été choisi par le groupe de Gellman comme point de départ pour l'insertion d'acides β -aminés afin de valider leur approche. Le segment de 33 résidus GCN4-p1 est connu pour former un faisceau de deux hélices α parallèles maintenu par le repliement sur les surfaces hydrophobes. S. Gellman et coll. ont en fait utilisé un analogue de ce facteur de transcription, GCN4-pLI^[56] (dans lequel des résidus Ile remplacent des résidus Leu et Val) connu pour former un faisceau de quatre hélices. Ils ont remplacé systématiquement des résidus α de l'heptade de GCN4-pLI par des résidus β (acycliques, substitués en position 3 pour conserver les chaînes latérales initiales protéinogéniques) en utilisant différentes séquences de type $\alpha\beta\alpha\alpha\alpha\beta$ **I.4**^[60] et **I.9**^[34] mais aussi, $\alpha\alpha\alpha\beta$ **I.5**, $\alpha\alpha\beta$ **I.6**, $\alpha\alpha\beta\alpha\beta\alpha\beta$ **I.7** et $\alpha\beta$ **I.8**.^[61] (Figure I.19)

		a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d			
α peptide GCN4-p1	Ac R	M	K	Q	L	E	D	K	V	E	L	L	S	K	N	Y	H	L	E	N	E	V	A	R	L	K	K	L	V	G	E	R	O	H		
α peptide GCN4-pLI	Ac R	M	K	Q	I	E	D	K	L	E	E	I	L	S	K	L	Y	H	I	E	N	E	L	A	R	I	K	K	L	L	G	E	R	O	H	
α/β peptide I.4	$\alpha\beta\alpha\alpha\beta$	Ac R	M	K	Q	I	E	D	K	L	E	E	I	L	S	K	L	Y	H	I	E	N	E	L	A	R	I	K	K	L	L	G	E	R	O	H
α/β peptide I.5	$\alpha\alpha\alpha\beta$	Ac R	M	K	Q	I	E	D	K	L	E	E	I	L	S	K	L	Y	H	I	E	N	E	L	A	R	I	K	K	L	L	G	E	R	O	H
α/β peptide I.6	$\alpha\alpha\beta$	Ac R	M	K	Q	I	E	D	K	L	E	E	I	L	S	K	L	Y	H	I	E	N	E	L	A	R	I	K	K	L	L	G	E	R	O	H
α/β peptide I.7	$\alpha\alpha\beta\alpha\beta\alpha\beta$	Ac R	M	K	Q	I	E	D	K	L	E	E	I	L	S	K	L	Y	H	I	E	N	E	L	A	R	I	K	K	L	L	G	E	R	O	H
α/β peptide I.8	$\alpha\beta$	Ac R	M	K	Q	I	E	D	K	L	E	E	I	L	S	K	L	Y	H	I	E	N	E	L	A	R	I	K	K	L	L	G	E	R	O	H
α/β peptide β ad I.9	$\alpha\alpha\beta\alpha\alpha\beta$	Ac R	M	K	Q	I	E	D	K	L	E	E	I	L	S	K	L	Y	H	I	E	N	E	L	A	R	I	K	K	L	L	G	E	R	O	H

Figure I.19 : Tableau des β peptides synthétisés. Les acides aminés β sont en bleu et les résidus hydrophobes en gris. [60] [34] [61]

Ils sont parvenus à obtenir les structures cristallographiques des α/β peptides **I.4**, **I.5** et **I.6** et ont pu voir que chacun de ces oligomères s’assemblait sous forme d’un faisceau de 4 hélices équivalent à celui obtenu pour l’ α -peptide GCN4-pLI. Le réseau de liaisons hydrogène ainsi que les angles dièdres sont semblables et les structures obtenues se superposent bien à la structure α -peptidique modèle (Figure I.20). La distribution des acides β -aminés le long de l’hélice varie d’un design à l’autre : alignés pour **I.4** et distribués en spirale pour **I.5** et **I.6**. La présence de certains résidus β dans le cœur hydrophobe ne semble pas modifier la structure quaternaire (**I.5**, **I.6**) alors que la substitution de tous les résidus hydrophobes en position *a* et *d* (β ad **I.9**) conduit quant à elle à un arrangement insolite rectangulaire de quatre hélices antiparallèles. [62]

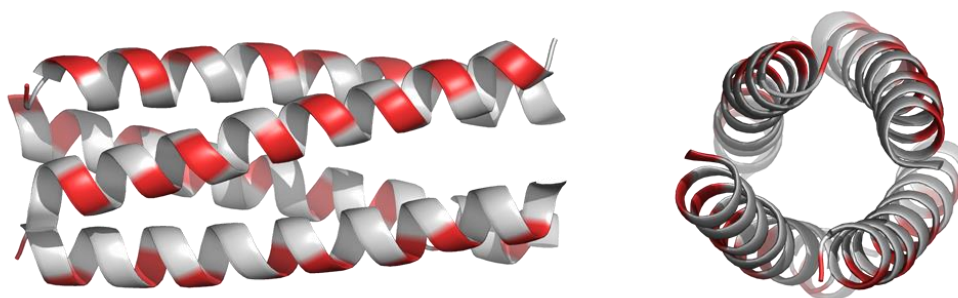


Figure I.20: Structure cristallographique de **I.4** [60] avec répétition d’une heptade $\alpha\beta\alpha\alpha\beta$. (Résidus β en rouge et α en gris.). Dans ce design, les résidus d’acide β -aminé sont alignés le long de la face opposée au cœur hydrophobe.

Cependant aucune association n’a pu être mise en évidence pour les α/β peptides **I.7** et **I.8** comportant des acides β -aminés tous les deux résidus. Il semblerait donc que la présence rapprochée de nombreux résidus β déstabilise la structure quaternaire. Deux explications ont été envisagées : (1) la topologie de l’hélice est trop différente de l’hélice α ce qui modifie trop fortement la position des chaînes latérales ou (2) ces résidus étant plus flexibles que les acides α -aminés, l’entropie du système est plus importante.

Pour vérifier la validité de la deuxième hypothèse S. Gellman et coll. ont décidé d'incorporer des résidus β cycliques plus contraints. La présence des cycles à cinq chaînons permet de réduire les rotations possibles autour de la liaison $C_\alpha-C_\beta$ et ainsi de diminuer l'entropie conformationnelle des résidus. Ils ont donc remplacé les résidus β^3 hydrophobes par l'acide (*S, S*)-*trans*-2-aminocyclopentanoïque (ACPC ; X) et les résidus cationiques (ex : β^3 -Lys) par un de ses analogues de type pyrrolidine (Z), dont ils avaient déjà montré les capacités à promouvoir le repliement en hélice en milieu aqueux (Figure I.21).^[63] Ils ont ainsi révélé que les résidus cycliques étaient capables de mimer les résidus β^3 et permettaient de rigidifier la structure secondaire et donc de stabiliser la structure quaternaire. Cependant la perte d'information due à la modification des chaînes latérales ne permet pas de reproduire complètement la structure de l' α -peptide initial.

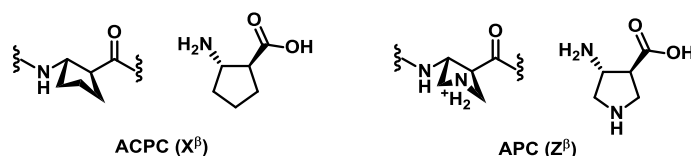


Figure I.21 : Résidus β ACPC et APC

ii. Assemblage hétérogène foldamère α/β -peptide et α -peptide

Des assemblages hétérogènes peuvent aussi être réalisés en associant des hélices possédant des séquences complémentaires. S. Gellman et coll. se sont ainsi basés sur les séquences **Acid-pLL** et **Base-pLL** de Kim et coll.^[64], qui s'associent pour former un faisceau de quatre hélices hétéro-tétramériques. Ils ont choisi, comme précédemment de remplacer un acide aminé α sur deux par des acides β -aminés uniquement dans la **Base pLL** (Figure I.22).^[65] Des études par dichroïsme circulaire et par ultracentrifugation analytique d'un mélange d'**Acid-pLL** et d' α/β peptide **I.10** dans une solution de tampon phosphate à pH 7 leur ont permis de mettre en évidence la formation d'un assemblage quaternaire hétérogène de quatre hélices plutôt stabilisé par des interactions hydrophobes que par des interactions électrostatiques.



Figure I.22 : Séquences des peptides **Acid-pLL**, **Base-pLL**^[64] et du mime α/β peptide **I.10**^[65] (les résidus β sont indiqués en bleu)

De la même manière Gellman et coll. ont mimé la séquence d'un α -peptide dérivé du domaine de répétition d'heptade C-terminal de la protéine gp41 du VIH qui possède une très bonne efficacité antivirale (par inhibition de l'étape de fusion du virus), par un oligomère substitué selon une séquence

$\alpha\alpha\beta\alpha\alpha\beta$. Ils se sont aperçus que cet α/β -peptide s'associait avec l' α -peptide issu du domaine de répétition *N*-terminal initial pour former un faisceau de 6 hélices hétéromérique (Figure I.23). Des tests de fusion de cellules et d'infection des cellules par le virus ont révélé que ce mime α/β -peptide de gp41 bloquait effectivement la fusion des cellules par un mécanisme similaire à celui de l' α -peptide initial.^[66]

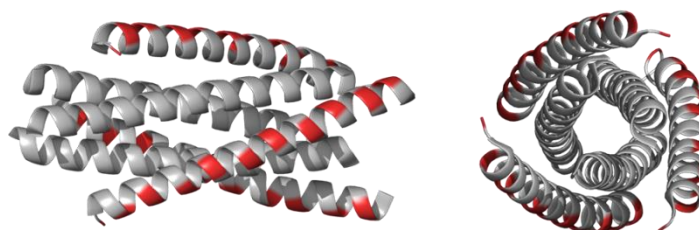


Figure I.23 : Faisceau de 6 hélices obtenu par co-cristallisation du domaine de répétition de l'heptade *N*-terminale de gp41 (en gris) et de l' α/β peptide analogue du peptide dérivé de la répétition d'heptade *C*-terminale de gp41^[66] (les résidus β sont en rouge)

Pour conclure, S. Gellman et coll ont donc développé une nouvelle stratégie descendante « top-down » efficace pour former des structures artificielles quaternaires discrètes. Le remplacement de certains résidus α par des résidus β de manière systématique ne semble pas modifier la topologie de l'hélice (Figure I.24) tant que la fréquence de substitution n'est pas trop élevée (entre 25 et 33%) et permet de former des faisceaux d'hélices principalement dirigés par l'enfouissement des chaînes latérales hydrophobes au cœur de la structure.

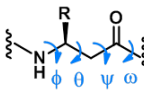
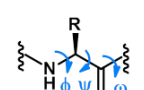
	caractéristiques	hélice 14	hélice 12	hélice α
	ϕ (°)	-134,3	95,0	-57,0
	θ (°)	60,0	-94,3	
	ψ (°)	-139,9	103,0	-47,0
	ω (°)	180,0	-180,0	180,0
	rayon (Å)	2,7	2,3	2,2
	résidus/tour	3,0	2,5	3,6
	élévation/résidu (Å)	1,6	2,1	1,5

Figure I.24 : angles de torsions et paramètres des hélices de β -peptides^[9] et de l'hélice α

Cette approche a été validée également pour l'inhibition de la fusion du virus VIH dans les cellules et pourrait être étendue à d'autres virus développant un mécanisme d'entrée similaire. Ces nouveaux peptides montrent des activités biologiques comparables à celles des α -peptides initiaux et présentent l'avantage d'offrir une bonne résistance à l'activité protéolytique. Cette stratégie pourrait donc permettre le développement de nouveaux composés antiviraux à base de séquences hybrides α/β -peptidiques.

c) *Approche ascendante (bottom-up) à partir de β -peptides*

i. *Premier design : hétéro-oligomère Acid-1F/Base-1F*

La stratégie ascendante a été utilisée par A. Schepartz et coll. pour concevoir des assemblages quaternaires de faisceaux d'hélices foldamères. Il est maintenant bien établi que les oligomères d'acides aminés β^3 de configuration (*S*) (obtenus par homologation des acides aminés L) adoptent une structure secondaire en hélice-14 gauche comportant 3 faces distinctes.^[9] Le groupe de Schepartz s'est donc servi de ces oligomères pour imaginer une séquence conduisant à la formation de petites hélices amphiphiles capables de s'auto-assembler de manière non covalente pour former une structure quaternaire. Une alternance de chaînes latérales positives et négatives sur une face permet de favoriser la formation de ponts salins et ainsi de stabiliser la formation d'une hélice en milieu aqueux. Des résidus β^3 -homoleucine (β^3 -hLeu) ont été introduits pour former une face hydrophobe et deux résidus β^3 -homophénylalanine (β^3 -hPhe) pour favoriser les interactions intermoléculaires et diminuer les agrégations non spécifiques. Finalement deux résidus β^3 -homoornithine (**Base-1F**) ou deux acides β^3 -homoglutamique (**Acid-1F**) en positions 1 et 10 ont été introduits pour privilégier la formation d'un hétérodimère (Figure I.25).^[67] En réalisant un mélange équimolaire des deux espèces **Base-1F** et **Acid-1F**, A. Schepartz et coll. ont pu montrer la formation d'un hétéro-oligomère relativement stable en solution par dichroïsme circulaire et par ultracentrifugation analytique. Cependant des analyses structurales à haute résolution restent nécessaires pour déterminer précisément le type d'arrangement obtenu.

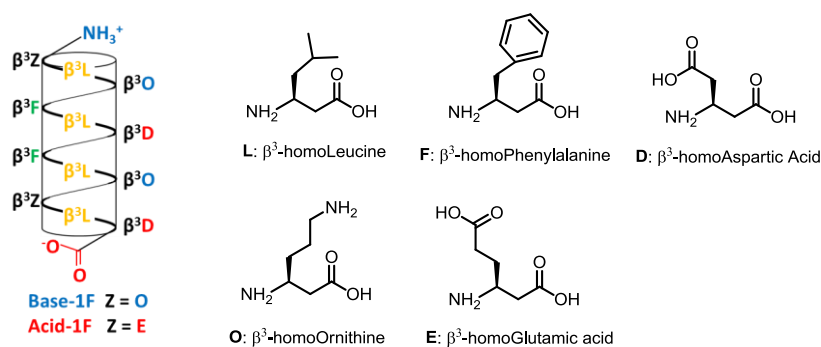


Figure I.25 : Séquences des **Acid-1F** et **Base-1F**^[67]

ii. *Homo-oligomère Zwit-1F*

En se basant sur les séquences précédentes, A. Schepartz et coll. ont ensuite réalisé un β -peptide de deuxième génération **Zwit-1F**^[68] possédant cette fois ci deux charges complémentaires (O et E) sur la même face pour induire une homo-oligomérisation (Figure I.26).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Base 1F	O	L	O	F	L	D	F	L	O	O	L	D
Acid 1F	E	L	O	F	L	D	F	L	O	E	L	D
Zwit 1F	E	L	O	F	L	D	F	L	O	O	L	D

Figure I.26 : Séquence des Acid-1F, Base-1F et Zwit-1F^[68]

La résolution de la structure cristallographique de **Zwit-1F** a révélé la formation d'une structure quaternaire de huit hélices, l'assemblage étant composé de deux « mains » comportant chacune deux dimères parallèles orientés entre eux de manière antiparallèle. Les hélices s'associent autour d'un cœur hydrophobe similaire à celui observé dans les protéines globulaires. Les études en solution ont révélé que l'octamère **Zwit-1F** possède une stabilité thermodynamique comparable à celles observées dans le cas de faisceaux d'hélices α -peptidiques comme GCN4 par exemple.

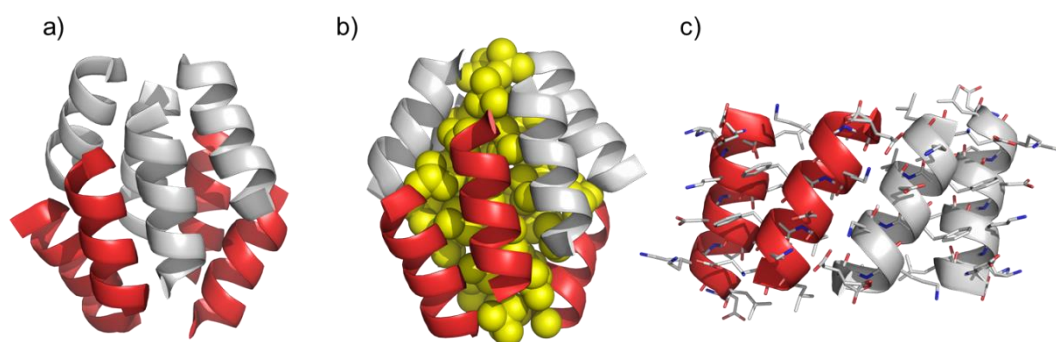


Figure I.27: a) Structure cristallographique du faisceau de 8 hélices de **Zwit-1F**, b) mise en évidence du cœur hydrophobe en jaune ; c) « main » composée de deux dimères parallèles (l'un rouge et l'autre gris) orientés de manière antiparallèle.^[68]

Pour simplifier la stœchiométrie octamérique du système qui complique les interprétations, A. Schepartz et coll ont essayé de convertir les dimères du faisceau de 8 hélices de **Zwit-1F** en une chaîne linéaire de 28 résidus capables de s'assembler en tétramère et de reproduire la structure de **Zwit-1F**. Ils ont donc choisi d'inverser l'orientation relative des deux monomères internes, en transformant 4 copies d'un dimère parallèle non covalent en 4 copies d'un dimère antiparallèle covalent.^[69]

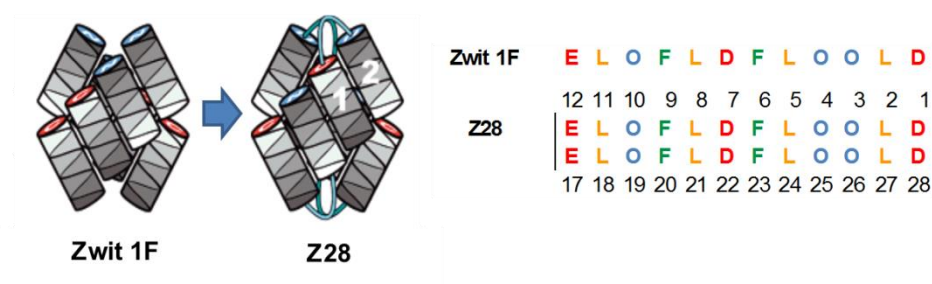


Figure I.28 : Séquence de Z28.^[69]

Les analyses par dichroïsme circulaire et l'étude de l'équilibre de sédimentation par ultracentrifugation analytique ont montré que **Z28** formait effectivement un assemblage tétramérique légèrement plus stable que son homologue **Zwit-1F**. L'influence de **Z28** sur la fluorescence de l'ANS révèle que ce dernier possède un cœur hydrophobe un peu moins compact que **Zwit-1F**. Cependant ce type de faisceau d'hélices n'est pas vraiment idéal car la séquence offre peu de flexibilité pour pouvoir effectuer des mutations ponctuelles sans modifier l'assemblage.

iii. Optimisation du design du faisceau d'hélices

Toujours dans le cadre d'une approche ascendante, A. Schepartz et coll. ont diversifié les chaînes latérales des séquences de **Zwit-1F** et **Acid-1F** afin d'améliorer la stabilité et faire varier la stœchiométrie du faisceau d'hélices formé (Figure I.29).

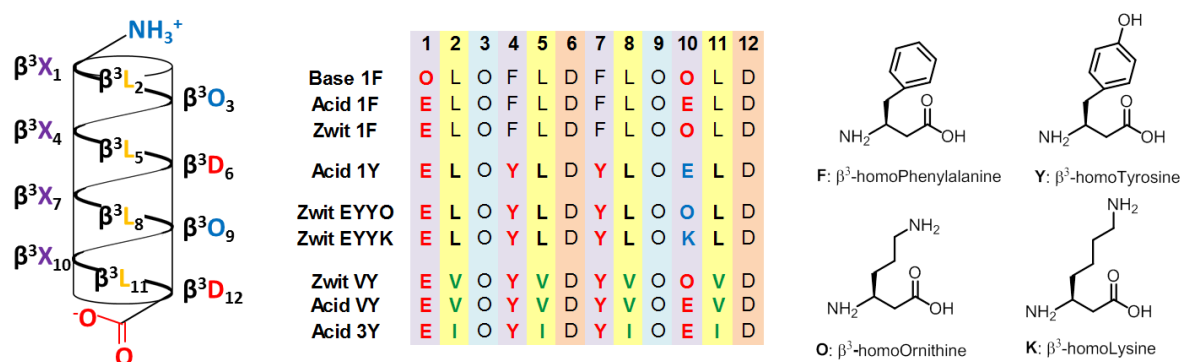


Figure I.29 : Séquences des différents β -peptides testés ^[70] ^[71] ^[72] ^[73]

Les auteurs ont montré que l'introduction de résidus β^3 -homotyrosine (**Acid-1Y** ^[70] et **Zwit-EYYO** ^[71]) améliorerait la stabilité du complexe certainement en raison des liaisons hydrogène supplémentaires, relayées par les molécules d'eau.

De plus ils ont observé que les distances entre les atomes impliqués dans les ponts salins intermoléculaires de **Zwit-1F** étaient plus longues que celles généralement trouvées dans les protéines naturelles, en particulier la distance entre l'azote du résidu β^3 hOrn₁₀ d'une hélice et l'oxygène carbonyle du partenaire β^3 hAsp₁₂ de l'hélice parallèle qui est de 5.9 Å contre 5 Å pour les protéines. Afin d'optimiser la stabilité thermodynamique de l'assemblage quaternaire, A. Schepartz et coll. ont donc augmenté la longueur de la chaîne latérale impliquée dans les ponts salins en remplaçant le résidu β^3 hOrn₁₀ par une β^3 -homolysine (**Zwit-EYYK** ^[71]). Les études en solution et l'obtention de la structure cristallographique leur ont permis de valider leur hypothèse (la distance étant réduite à 4.0 Å) et de montrer que cet oligomère formait un assemblage octamérique plus stable que ceux obtenus précédemment (Figure I.30).

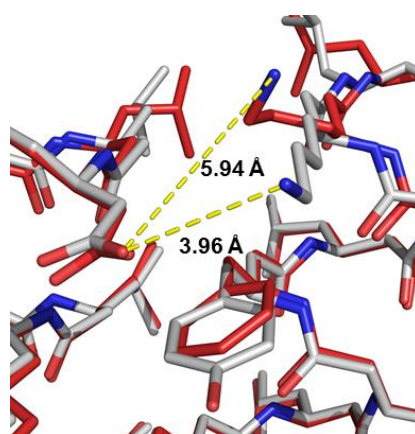


Figure I.30 : Zoom de l'interface entre les hélices montrant le pont salin entre les résidus β hAsp12 sur une hélice et β hLys10 sur l'hélice parallèle de **Zwit-EYYK** (gris), et le pont salin équivalent β hAsp12- β hOrn10 de **Zwit-1F** (rouge). ^[71]

Finalement, la stœchiométrie du faisceau d'hélice peut être modulée comme cela a déjà été montré pour le peptide CGN4 ^[56], en échangeant les résidus hydrophobes de type leucine par des résidus β^3 -homovaline (**Acid-VY** et **Zwit-VY**) ^[72] et β^3 -homoisoleucine (**Acid-3Y**) ^[73] pour modifier les contacts dans le cœur hydrophobe. En l'absence de structure cristallographique, la caractérisation en solution a permis de montrer que ces oligomères s'assemblaient en faisceaux tétramériques stables et discrets.

En suivant une stratégie ascendante et en s'inspirant de règles utilisées pour l'ingénierie des faisceaux d'hélices α -peptidiques, A. Schepartz et coll. ont su développer des β -peptides capables de s'auto assembler de manière discrète en milieu aqueux pour former des faisceaux à 8 ou 4 hélices.

3. Hélices multiples

Les hélices multiples sont des structures moléculaires essentielles dans les systèmes biologiques et sont notamment trouvées dans l'ADN, le collagène ou encore dans de courts peptides comme la gramicidine A ^[74]. Les méthodes d'associations sont multiples et les assemblages peuvent aussi bien être dirigés par des métaux que par des liaisons hydrogène ou des interactions aromatique-aromatique, ou encore par des interactions de Van der Waals. Il est aussi possible d'observer des associations homomériques de deux brins identiques ou hétéromériques de brins différents. L'intérêt pour la synthèse d'oligomères synthétiques capables de former des hélices doubles s'est développé très récemment et plusieurs groupes sont parvenus à concevoir des hélices multiples avec une structure prévisible en utilisant différents types de résidus et notamment en série oligoamides aromatiques.

a) Stabilisation par des interactions hydrogène

i. Oligomères de cycles pyridine et dioxyde de thiazine

Jennings et coll. ont utilisé la complémentarité de donneur et d'accepteur d'hydrogènes pour réaliser des oligomères capables de former des hélices doubles.^[75] Ils ont donc alterné des cycles dioxyde de thiazine donneurs d'hydrogènes avec des cycles pyridine et ont pu observer la formation d'un assemblage de deux hélices (Figure I.31).

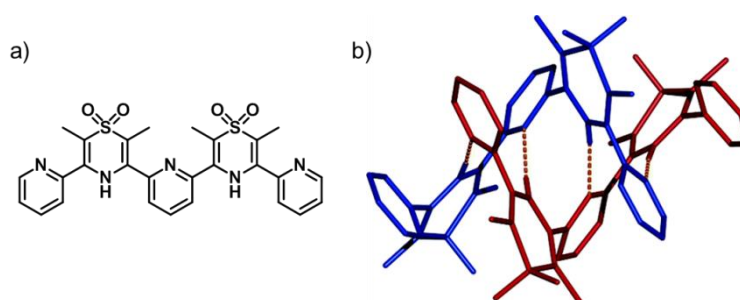


Figure I.31 : Oligomères composés d'une alternance de donneurs (cycle dioxyde de thiazine) et d'accepteurs d'hydrogènes (pyridine)^[75]

ii. Dérivés *m*-terphényle

De la même manière E. Yashima et coll. se sont servis de ponts salins amidinium-carboxylate très connus pour leur stabilité, pour développer des hélices doubles hétéromériques. Dans leur cas l'assemblage est principalement dirigé par des liaisons hydrogène qui conduisent à un entrelacement de complexes binaires supramoléculaires. Ils ont utilisé des dérivés *m*-terphényle en forme de croissants, sur lesquels sont greffés des groupes amidine chiraux (**A**) ou carboxyl achiraux (**C**) pour créer des sites de liaisons complémentaires (**A-C**) (Figure I.32).^[76] Les auteurs ont ainsi montré que les deux dérivés terphényle s'entrelaçaient autour des ponts salins pour conduire à la formation d'une hélice double.

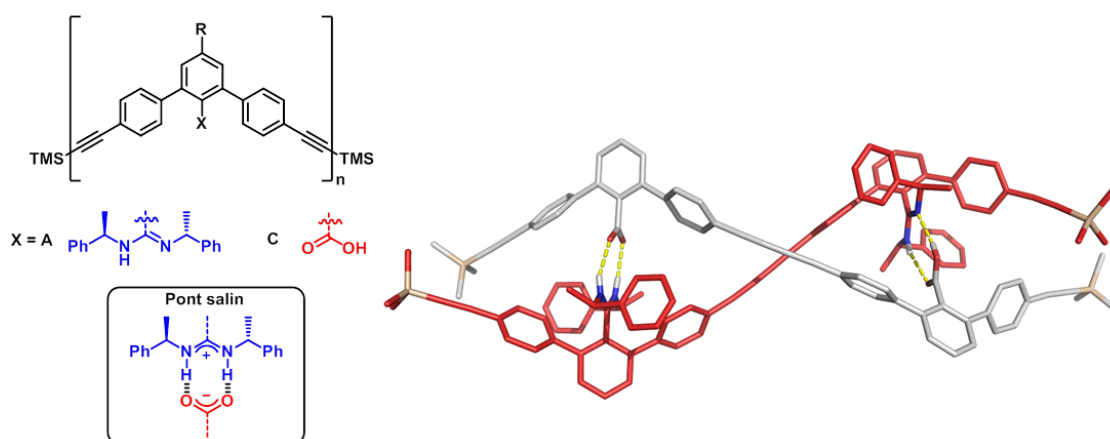


Figure I.32 : Structure cristallographique d'une hélice double réalisée à partir de dérivés *m*-terphényle ^[76]

En étudiant des brins de différentes tailles ils se sont aperçus que les oligomères s'associaient sélectivement avec des oligomères de même longueur et de séquence complémentaire rappelant de ce fait la complémentarité des bases azotées de l'ADN. Par exemple le trimère **ACA** s'associe de manière sélective avec le trimère complémentaire **CAC** via la formation de ponts salins amidinium-carboxylate.^[77]

b) Stabilisation par des interactions π - π

La stabilisation des hélices doubles par des interactions aromatiques a tout d'abord été introduite par Gabriel et Iverson.^[78] Ils ont en effet montré qu'une alternance de systèmes aromatiques riches (1,5 dialkoxy-naphtalène) et pauvres (1,4,5,8-naphtalène-tetracarboxylique diimine) en électrons permettaient de stabiliser la formation de ce type de structure. Ce principe d'interactions π - π existe aussi dans le cas d'autres types d'oligomères.

i. Oligoresorcinols

Outre leur rôle énergétique (glycogène) et leur présence comme constituants de molécules fondamentales (acides nucléiques), les saccharides jouent également un rôle essentiel dans les mécanismes de régulation et de communication cellulaire ainsi que dans les mécanismes de défense immunitaire (diapédèse, reconnaissance par les protéines de type lectine par exemple). Cependant il est difficile de réaliser des récepteurs artificiels capables de reconnaître les saccharides en milieu aqueux car ils sont en compétition avec les molécules d'eau pour la formation des liaisons hydrogène.

E. Yashima et coll se sont donc intéressés aux oligoresorcinols qui possèdent un motif simple semblable à celui des oligophénols. Ils ont pu observer la cristallisation d'une hélice simple dans un mélange chloroforme/acétonitrile et d'une hélice double dans l'eau montrant ainsi que la formation de cette structure tertiaire est principalement dirigée par les interactions aromatiques dans l'eau.^[79] Ils se

sont ensuite aperçus que les macrocycles β -cyclodextrines (β -CD) étaient capables de dérouler ces hélices doubles d'oligoresorcinol puis de les encapsuler grâce à leur cavité chirale formant ainsi un pseudo rotaxane (Figure I.33).^[80] L'ajout d'adamantane permet ensuite d'expulser le brin d'oligoresorcinol et de régénérer la double hélice.

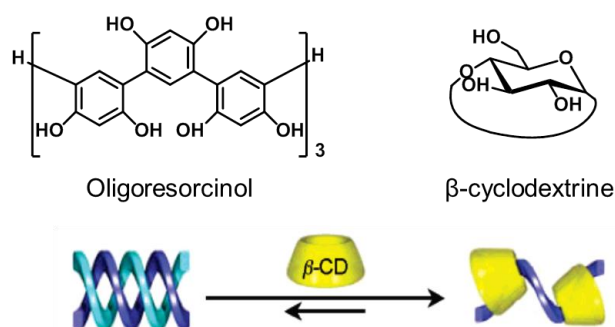


Figure I.33 : Schéma d'encapsulation de l'oligoresorcinol par la β -cyclodextrine ^[80]

En se basant sur ces premiers résultats, E. Yashima et coll. se sont interrogés sur la capacité de leurs hélices doubles à reconnaître spécifiquement des oligosaccharides linéaires.^[81] Ils ont pu montrer par spectroscopie RMN, CD et d'absorption que la double hélice d'oligoresorcinol formée dans l'eau, se dépliait et se ré-enroulait par complexation avec un oligosaccharide de type D-glucose spécifique pour former une hélice double hétéromérique stabilisée par des interactions entre les unités sucre et les cycles aromatiques. L'allongement des chaînes oligosaccharide favorisant la formation de l'hétéroduplexe ils ont pu mettre en évidence une forte affinité de liaison avec un dextrose comportant 20 unités glucose. Ils ont ainsi développé un nouveau récepteur d'oligosaccharide capable de former un complexe avec des saccharides linéaires (Figure I.34).

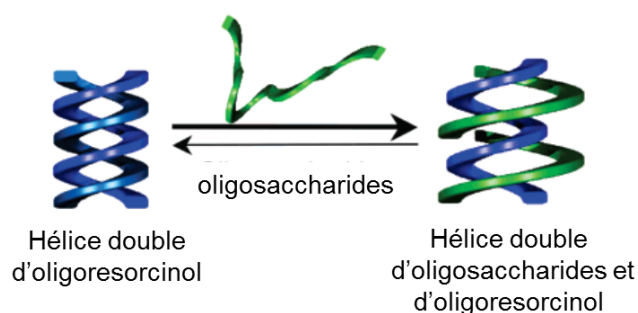


Figure I.34 : Schéma de complexation d'une hélice d'oligoresorcinol avec un oligosaccharide. ^[81]

ii. Oligomères éthynylhéliques

M. Yamaguchi et coll. se sont intéressés aux oligomères éthynylhéliques comportant de deux à neuf résidus héliques. Ils ont observé, en solution, que ces oligomères adoptaient des structures

hélicoïdales à partir de 7 résidus et s'assemblaient grâce des interactions π - π sous forme de dimères (Figure I.35).^[82, 83]

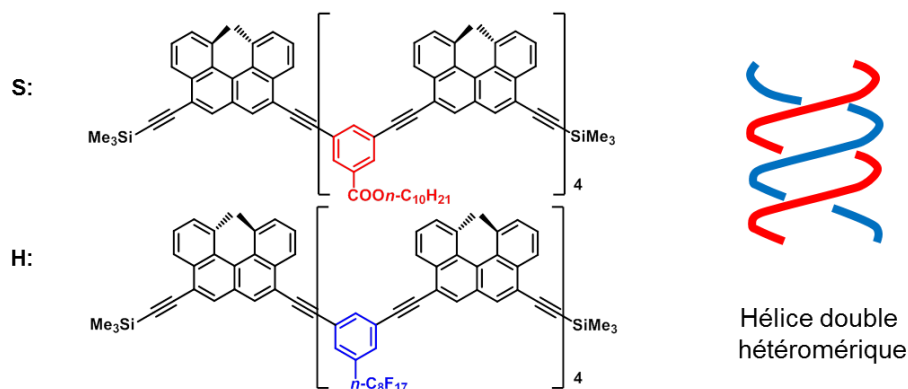


Figure I.35 : Schéma des oligomères éthynylhelicènes conçus pour former une hélice double hétéromérique^[82, 83]

Les auteurs ont montré que la nature du résidu phényle influençait le sens de formation des hélices doubles. En effet les études en solution ont montré que chacun des deux oligomères (*P*)-**S** et (*P*)-**H** adoptait une structure en hélice double homodimérique de sens opposé bien que les configurations des hélicènes soient les mêmes. En réalisant un mélange de deux oligomères de configurations différentes (*P*)-**H**/*(M)*-**S** ils ont ainsi pu mettre en évidence la formation d'une hélice double hétéro-dimérique.

iii. Hélices multiples d'oligoamides aromatiques

Les hélices multiples d'oligoamides aromatiques ont fait l'objet de nombreuses études au cours des dernières années. J.M. Lehn et coll. se sont tout d'abord intéressés à la capacité des brins oligopyridine-dicarboxamide préorganisés en hélice^[84] à se dimériser en hélice double.^[85] Ils ont montré que le repliement du monomère en hélice simple en milieu dilué était favorisé par des liaisons hydrogène mais que cet oligomère pouvait aussi se dimériser pour former une hélice double maintenue par des interactions de recouvrement π - π aromatique intermoléculaires. Dans ce cas-là les liaisons hydrogène servent surtout à stabiliser la structure hélicoïdale de chaque monomère. Ils ont ainsi montré que l'équilibre entre les deux structures en hélice double ou simple dépend de la polarité des solvants, en effet un solvant polaire favorise la formation de l'hélice simple alors qu'un mélange de solvants moins polaires oriente vers une hélice double

I. Huc et coll. ont pour leur part imaginé des systèmes oligopyridines de différentes longueurs de brins (de 3 à 8 résidus)^[86, 87] et porteurs de différentes chaînes latérales (Figure I.36).^[86, 88] Ils ont mis en évidence la formation des duplexes de la même manière que précédemment et ont montré que l'hybridation était maximale pour des oligomères de longueurs intermédiaires de 5 résidus. En modifiant les chaînes latérales ils se sont aperçus que l'introduction de substituants alkoxy augmentait

la constante de dimérisation probablement en raison du caractère donneur des substituants et que les chaînes benzyloxy stabilisaient la formation de l'hélice double par des interactions intermoléculaires entre les chaînes latérales (Figure I.37).

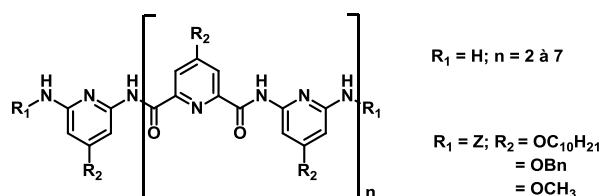


Figure I.36 : Diversification de la longueur des oligomères et des chaînes latérales. [86-88]

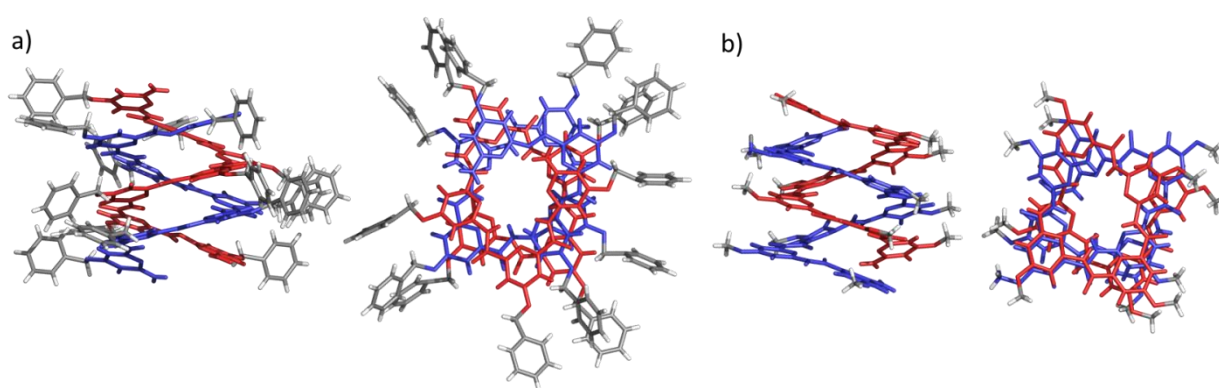


Figure I.37: Hélice double d'oligoamide aromatique comportant des chaînes latérales a) benzyloxy b) méthoxy^[88]

Pour former une hélice double il est nécessaire d'allonger l'hélice simple pour permettre l'insertion d'une deuxième hélice. Ce phénomène pourrait être comparé à l'élongation d'un ressort possible grâce à des torsions des liaisons aryl-amide. Pour pouvoir obtenir la même extension mais avec des angles de torsions plus faibles, et du même coup réduire le coût enthalpique, il faudrait élargir le diamètre de l'hélice double. Il serait ensuite intéressant d'utiliser les cavités intérieures en reconnaissance moléculaire. I. Huc et coll. ont ainsi montré qu'il était possible d'augmenter le diamètre des hélices doubles d'oligoamides et ainsi de les stabiliser en remplaçant la pyridine centrale par un résidu plus large diazaanthracène possédant 3 cycles aromatiques fusionnés^[89] ou en introduisant des résidus quinoline possédant deux cycles aromatiques fusionnés. Pour favoriser la conformation hélicoïdale, ils ont introduit un atome de fluor ou de chlore accepteur de liaisons hydrogène, en position 8 de chaque quinoline.^[90, 91] Ils ont ainsi montré que ces molécules s'agrégeaient pour former des hélices multiples possédant une cavité centrale partiellement occupée.

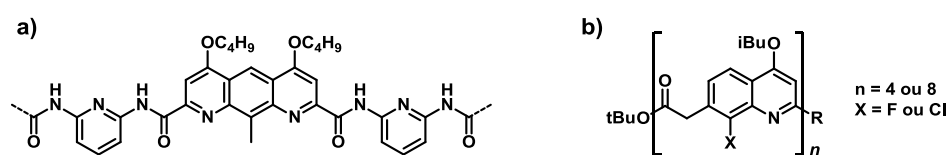


Figure I.38 : Oligoamides aromatiques a) comportant un résidu diazaanthracène central ^[89]; b) composé de cycles quinolines^[90, 91]

Afin d'obtenir une cavité plus large et moins encombrée I.Huc et coll. ont conçu des hélices multiples synthétisées à partir de dérivés naphtyridine (Figure I.39).^[92] La cavité ainsi obtenue est plus large et permet de recevoir une molécule de solvant. De plus les analyses cristallographiques ont révélé la formation de deux hélices triples distinctes l'une parallèle, l'autre antiparallèle. L'arrangement parallèle encore jamais observé dans les autres oligoamides aromatiques, étant possible grâce aux cycles naphtyridine. Bien que ces résidus présentent un fort moment dipolaire, celui-ci est orienté dans un plan perpendiculaire à l'axe de l'hélice et ne contribue donc pas au macrodipôle de l'hélice.

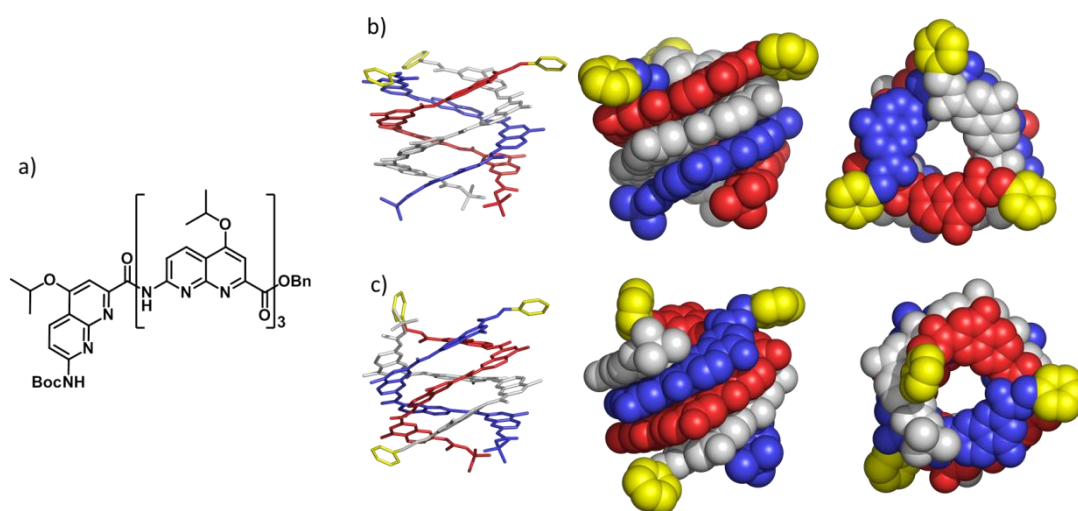


Figure I.39:a) oligoamide aromatique composé de dérivés naphtyridine ^[92] b) hélice triple parallèle, c) hélice triple antiparallèle (sans les chaînes isobutoxy pour plus de clarté)

Ce concept a ensuite été étendu à différentes combinaisons de divers monomères pour réaliser des hélices doubles plus larges au centre qu'aux extrémités formant des capsules ^[93] capables d'accueillir de petites molécules sphériques ^[94] comme par exemple l'acide tartrique ^[95] ou en forme de bâtonnets (Figure I.40).^[96, 97] En combinant un dérivé diazaanthracène avec des fluoroquinolines encadrés par des dérivés pyridine, il est possible de faire varier le diamètre et la taille de la capsule formée par la double hélice. Un oligoamide hélicoïdal capable de s'enrouler autour d'une petite molécule en forme de bâtonnet a ainsi pu être conçu.^[98]

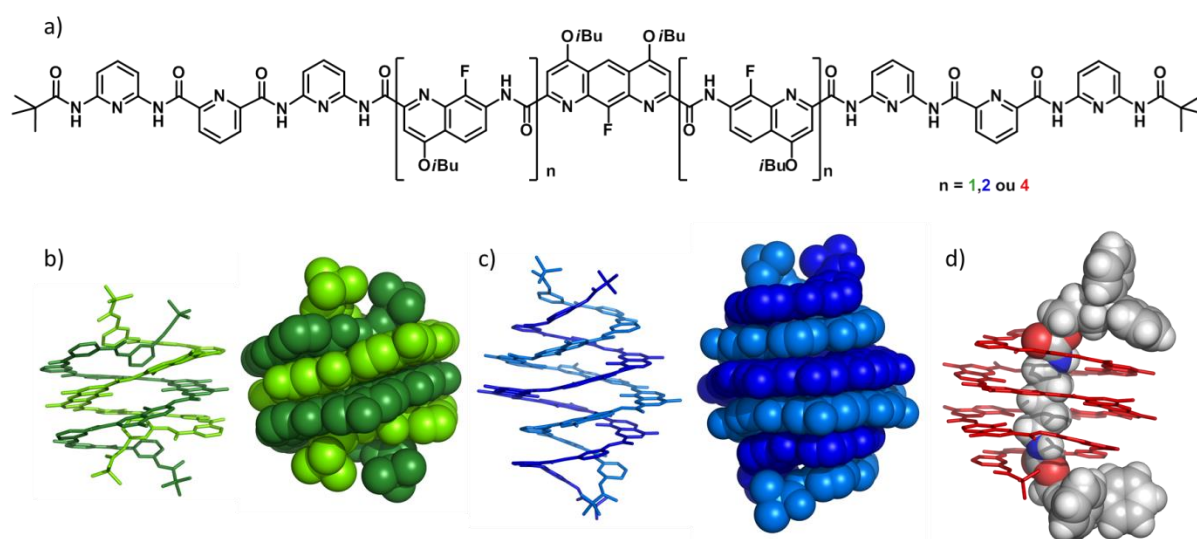


Figure I.40 : a) Schéma d'un oligoamide aromatique composé de différents monomères conçu pour former des capsules. b), c) et d) Structures cristallographiques de capsules de différentes tailles ^[98]

Ce travail a permis de développer de nouvelles hélices d'oligoamides capables de s'assembler sous forme d'hélices multiples stables. I.Huc et coll. ont également montré qu'il était possible de contrôler le diamètre, la forme et la cavité intérieure de ces hélices doubles en variant la nature des résidus qui les composent. Des capsules de différentes tailles capables de reconnaître de petites molécules sphériques ou linéaires ont été préparées. L'ensemble de ce travail constitue un premier pas vers la reconnaissance moléculaire spécifique et la conception de machines moléculaires à partir d'hélices assemblées.

4. Assemblage de feuillets

Une grande part de l'effort visant à concevoir des architectures tertiaires et quaternaires à partir de molécules synthétiques s'est concentré sur des assemblages d'hélices « plus faciles » à caractériser. Cependant les interactions intermoléculaires de feuillets β sont aussi très importantes dans les structures quaternaires des protéines notamment pour la reconnaissance moléculaire et l'agrégation ou la dimérisation de protéines. Elles sont également associées à un certain nombre de pathologies amyloïdes (formation de plaques amyloïdes). Leur étude est compliquée du fait que les feuillets β ont souvent tendance à s'agréger de manière incontrôlée ce qui conduit à la formation majoritaire d'agrégats non discrets. Chaque brin peptidique possède en effet des groupes susceptibles de former des liaisons hydrogène de chaque côté, ainsi que deux faces qui peuvent participer à des interactions supplémentaires (hydrophobes par exemple). Cependant des modèles peptidiques ont été développés très récemment permettant la dimérisation contrôlée de systèmes dans des solvants organiques non compétitifs. La stratégie employée consiste à bloquer un côté du feuillet alors que le deuxième reste

disponible pour des liaisons hydrogène. Le système se complique en milieu aqueux car les molécules d'eau peuvent se lier aux fonctions amides et ainsi entrer en compétition avec les liaisons hydrogène intermoléculaires.

a) *Dimère de mimes de feuillet β*

Pour étudier les interactions quaternaires de feuillets β , il est intéressant de développer des systèmes synthétiques dont le degré d'agrégation est limité et contrôlé (dimerisation exclusivement). C'est la stratégie développée par le groupe de J. Nowick. La conception de ces mimes de feuillets β repose sur la connexion covalente d'un résidu rigide à squelette aromatique (Hao^[99]) permettant à la fois de stabiliser un des brins du feuillet peptidique en structure étendue et d'en bloquer une face. La connexion est réalisée par la chaîne latérale d'un résidu ornithine (δ Orn) inséré dans la séquence du brin peptidique (Figure I.41).^[100] Ils ont ainsi montré que combiné à un brin peptidique, ces deux éléments sont capables de nucléer une structure en feuillet β ^[101, 102] susceptible de s'associer dans les solvants organiques sous forme de dimère antiparallèle via un réseau de liaisons hydrogène intermoléculaires.

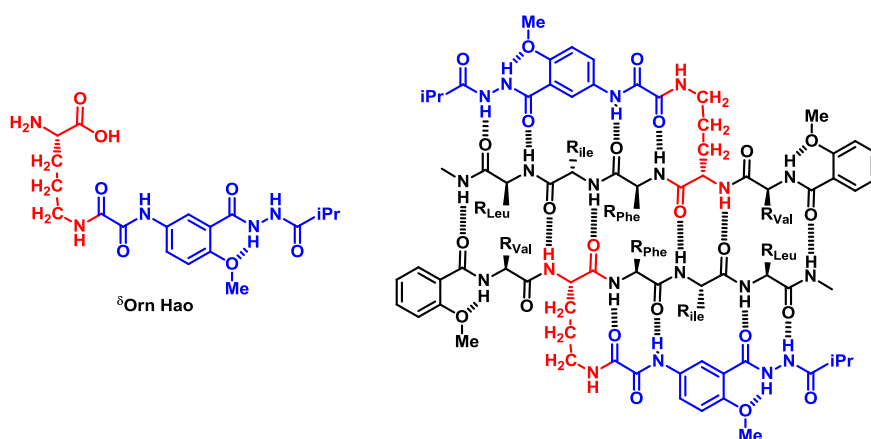


Figure I.41 : Résidu δ Orn Hao et schéma du feuillet β dimérique

b) *Assemblage de feuillets β macrocycliques*

Afin d'étudier la formation de ce type de dimère en solution aqueuse, Nowick et coll. ont finalement utilisé les unités Hao et le connecteur δ Orn pour créer des peptides macrocycliques de différentes tailles (de 42 à 102 atomes) solubles dans l'eau et capables de former des feuillets β .^[103, 104]

En particulier, ils ont développé un macrocycle composé de deux unités Hao et de deux δ Orn reliées par un segment peptidique inspiré de la séquence du peptide NuG2 dérivé de la protéine G qui forme un dimère à l'état solide.^[105] La solubilité dans l'eau a ensuite été améliorée en introduisant des mutations dans la séquence peptidique et en ajoutant notamment des chaînes polaires. Il s'est avéré

que ce peptide formait un assemblage tetramérique en solution assuré par des interactions aromatiques et probablement la formation d'un cœur hydrophobe. Comme attendu, le peptide macrocyclique forme un feuillet qui s'oligomerise sous forme de dimère stabilisé par des interactions hydrogène côté-côté. Ce dimère est ensuite à nouveau dimérisé grâce à des interactions hydrophobes face-à-face entre les chaînes Phe₃ et Tyr₅ situées à l'intérieur. Afin de stabiliser ces structures ils ont également réalisé un pontage covalent (pont disulfure) entre deux feuillets β macrocycliques en introduisant des cystéines.^[106]

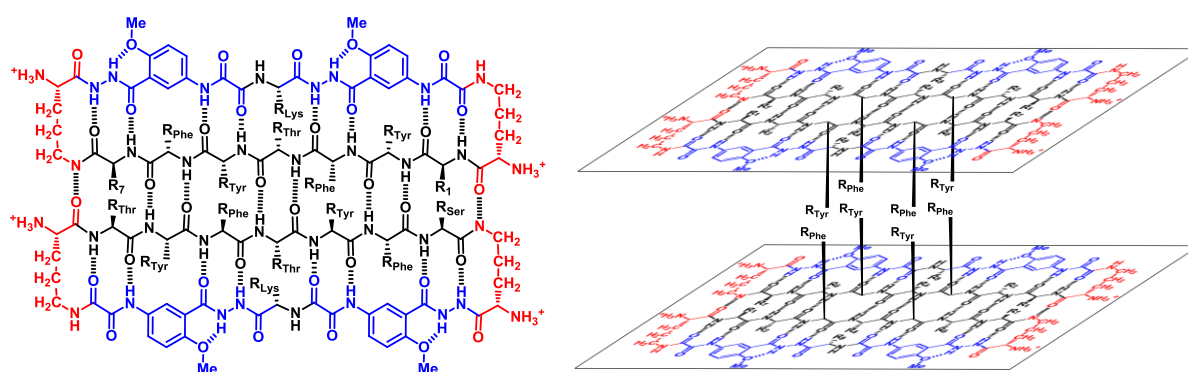


Figure I.42 : Assemblage quaternaire tetramérique de feuillets β macrocycliques

Ils sont parvenus à cristalliser plusieurs de ces macrocycles mettant ainsi en évidence la formation d'assemblages tetramériques. L'un de ces composés comportant un résidu 4-bromophénylalanine^[107] a quant à lui cristallisé sous forme d'un hexamère (association de trois dimères), certainement en raison de la concentration élevée dans le milieu de cristallisation.

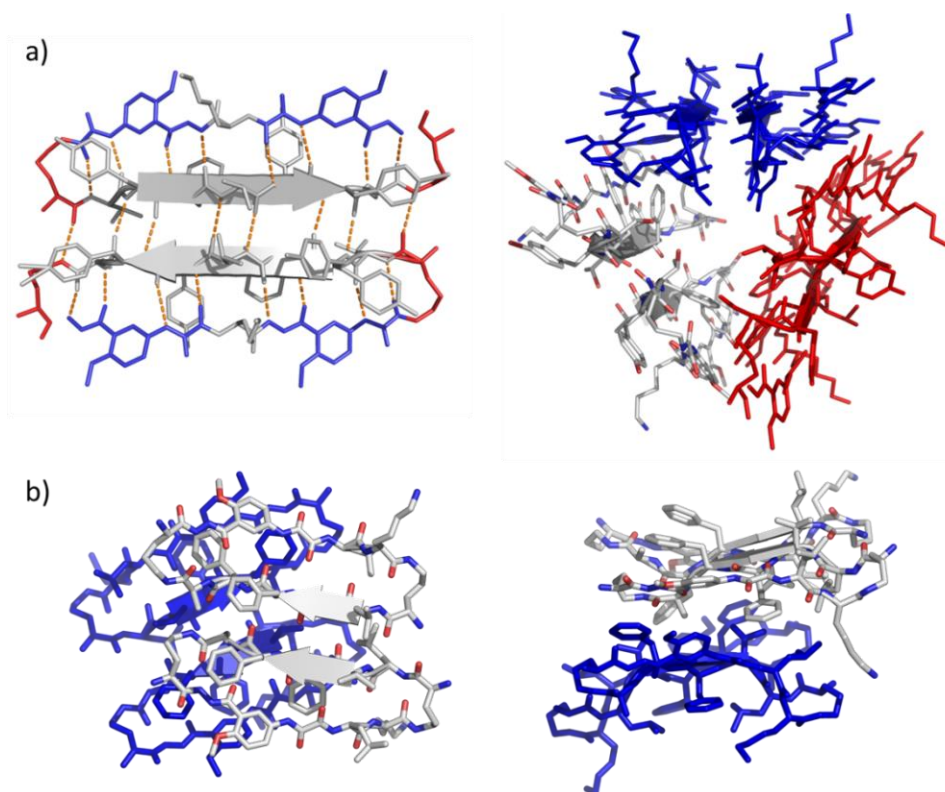
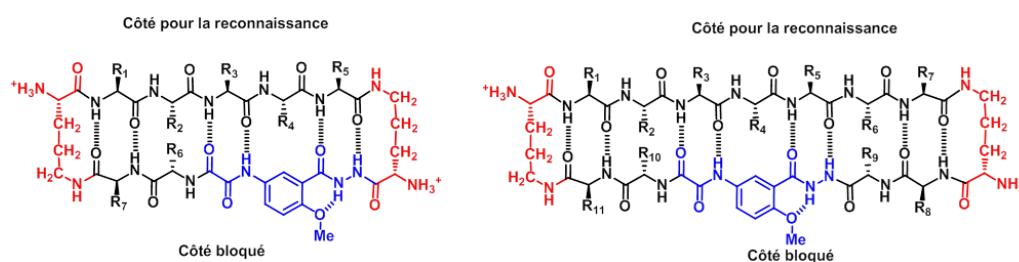


Figure I.43: a) Structure cristallographique d'un dimère de feuillet β macrocyclique s'assemblant sous forme de trimère. b) exemple d'une structure quaternaire tetramérique de feuillet β

c) Les feuillets β macrocycliques comme inhibiteurs d'agrégation

La présence d'agrégats de bêta-amyloïde et de protéine Tau sont les signes caractéristiques de la maladie d'Alzheimer mais ce phénomène apparaît aussi dans d'autres types de maladies comme la maladie de Parkinson et le diabète de type II. Grâce à l'obtention des structures cristallographiques de leur macrocycles, J. Nowick et coll. ont donc réalisé des macrocycles conçus pour se lier aux feuillets β intermédiaires impliqués dans les procédés d'agrégation et ainsi bloquer ce processus et en limiter la toxicité en s'inspirant des séquences de peptides amyloïdes (Figure I.44).^[108-110]



macrocycle	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉	R ₁₀	R ₁₁
I.11a (basé sur Tau ₃₀₆₋₃₁₀)	Val	Gln	Ile	Val	Tyr	Lys	Leu				
I.11b (basé sur A β ₁₇₋₂₁)	Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Leu	Lys				
I.11c (basé sur A β ₃₀₋₃₄)	Ala	Ile	Ile	Gly	Leu	Tyr	Lys				
I.12a (basé sur A β ₃₀₋₃₆)	Lys	Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Lys	Leu	Leu	Glu
I.12b (basé sur h β_2 M ₆₃₋₆₉)	Tyr	Leu	Leu	Tyr	Tyr	Thr	Glu	Lys	Val	Val	Lys
I.12c (basé sur H α Syn ₇₅₋₈₁)	Tyr	Ala	Val	Ala	Asn	Lys	Thr	Val	Phe	Tyr	Lys

Figure I.44 : Schéma et séquence des macrocycles inspirés des peptides amyloïdes ^[108] ^[110] ^[111]

Ils ont ainsi montré que ces molécules possèdent des propriétés d'inhibition de l'agrégation des peptides dont ils sont issus grâce essentiellement à des liaisons hydrogène côté à côté et des interactions hydrophobes face à face. Ainsi ils se sont aperçus que la molécule **I.11a** inhibait l'agrégation d'un hexapeptide amyloïde de la protéine Tau qui forme des enchevêtrements neurofibrillaires.^[108] Dans ce mécanisme deux macrocycles se lient simultanément à deux couches de feuillet β du peptide grâce à des liaisons hydrogène. Ainsi la molécule **I.12a** inhibe l'agrégation de peptides amyloïdes β (A β) et diminue la toxicité des agrégats.^[110] En connectant deux macrocycles **I.11b** et **I.11c** par un dérivé polyéthylène-glycol ils ont montré que ce composé hétérodivalent comportant deux feuillets β macrocycliques liés inhibe plus fortement l'agrégation des A β que les composés monovalents, ou homovalents.^[111] Le macrocycle **I.12b** empêche quant à lui l'agrégation des β_2 -microglobulines humaines et le macrocycle **I.12c** inhibe l'agrégation des α -synucléines humaines associées à la maladie de parkinson.^[110]

III. Conclusion et objectifs de la thèse

Les structures secondaires particulièrement stables et bien définies des foldamères ont permis d'ouvrir la voie vers la formation d'assemblages tertiaires et quaternaires protéomimétiques. La grande diversité de résidus non naturels accessibles a permis d'envisager la conception de nombreuses structures diverses et originales similaires à celles observées dans les systèmes biologiques. Ainsi des premiers pas ont été réalisés vers des assemblages tertiaires d'hélices et les premières structures quaternaires discrètes de faisceaux d'hélices et de feuilletts β ont pu être mises en évidence. Ceci ne représente pour l'instant qu'un début et de nombreuses études, notamment d'activité biologique, restent à entreprendre.

Parmi tous ces types de foldamères, les oligourées aliphatiques font aussi l'objet d'études approfondies. Leur squelette particulier leur permet d'adopter des structures en hélice 2.5 très proches des hélices α naturelles, stabilisées par un réseau de liaisons hydrogène à trois centres. Leur stabilité remarquable et la diversité des résidus qui les composent en font de bons candidats pour l'élaboration de structures tertiaires et quaternaires. Afin de pouvoir développer des structures plus complexes, il nous a semblé nécessaire de mieux comprendre les paramètres qui déterminent la formation de l'hélice. Nous nous sommes donc, dans un premier temps, intéressés à l'effet de l'introduction de différents résidus non canoniques comportant des contraintes stériques. Dans le cadre d'une collaboration avec le professeur J. Clayden, j'ai tout d'abord testé la compatibilité de résidus achiraux *gem*-diméthylés dans l'objectif d'évaluer l'importance de l'effet Thorpe-Ingold^[112] sur la formation des hélices et de développer des hélices entièrement achirales capables de s'interconvertir en solution.

Pour s'approcher des structures de types polyprolines naturelles, je me suis ensuite penchée sur l'influence de résidus cycliques contraints de type pyrrolidine. Après avoir étudié la compatibilité d'un ou plusieurs de ces résidus nous avons essayé de développer une nouvelle stratégie de synthèse par condensation de segments que nous avons exploitée pour préparer des hélices plus longues et ce beaucoup plus rapidement.

Avec toutes ces informations, nous nous sommes finalement intéressés à la conception d'hélices d'oligourées capables de s'assembler de manière discrète sous forme de faisceaux d'hélices en milieu aqueux. Il s'agissait dans un premier temps de développer des oligourées amphiphiles solubles dans l'eau, puis d'évaluer la capacité de ces structures à former des assemblages quaternaires à l'état solide dans un premier temps. Nous avons ainsi étudié l'influence de différents paramètres tels que la nature (hydrophobie, charge ou aromaticité) et la position des chaînes latérales.

Dans l'objectif de mimer de manière plus précise les hélices α naturelles, je me suis aussi intéressée à la synthèse de nouvelles molécules chimères α -peptide/oligourée et à l'étude de leurs propriétés conformationnelles qui ont été évaluées en solution (en milieux organique et aqueux) et à l'état solide.

CHAPITRE II

Oligomères hélicoïdaux à base d'urée : Influence de résidus achiraux sur le repliement

CHAPITRE II. : Oligomères hélicoïdaux à base d'urée : Influence de résidus achiraux sur le repliement

Parmi les différentes classes de foldamères existantes, les oligomères comportant des liaisons urées entre les résidus ont reçu une attention croissante au cours des dernières années. Ces oligourées sont des analogues aza des γ -peptides et possèdent donc un site donneur de liaison hydrogène supplémentaire par rapport à leurs homologues oligoamides. La 1^{ère} synthèse d'oligourée a été décrite en 1995 par Burgess et coll.^[113, 114] qui se sont concentrés sur le criblage et la recherche d'activités biologiques sur de petites séquences. Par la suite, les propriétés de repliement de ces oligomères peptidomimétiques ont fait l'objet d'études approfondies dans notre laboratoire. Des études structurales haute résolution en solution^[115, 116] et à l'état solide^[117] ont permis de montrer que ces oligourées adoptent des structures en hélice droite 2.5 bien définies, stabilisées par un réseau de liaisons hydrogène à 3 centres. Bien que cette structure se rapproche de la structure hélicoïdale adoptée par les γ -peptides^[11], l'hélice est ici caractérisée par un réseau de liaisons hydrogène plus complexe avec la formation de pseudo-cycles à 12 et 14 atomes résultant des liaisons hydrogène $C=O_i \cdots HN'_{i-2}$ et $C=O_i \cdots HN_{i-3}$.

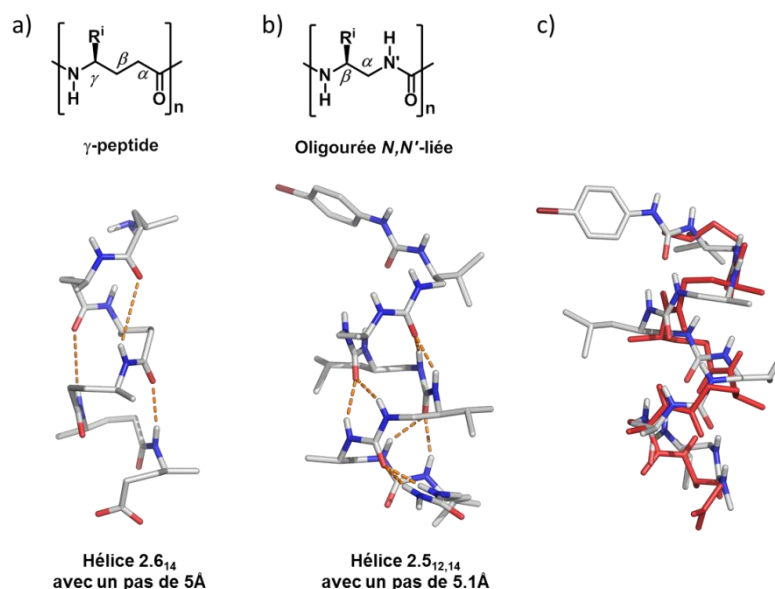


Figure II.1: Comparaison des structures cristallines d'une hélice a) de γ^4 -peptide^[11] et b) d'oligourée^[117]. c) superposition d'une hélice γ -peptide (rouge) et d'une hélice oligourée (gris)

Différentes méthodes d'analyse ont été utilisées pour caractériser ces structures hélicoïdales en solution. Des informations précises sur le mode de repliement peuvent être extraites des spectres RMN du proton à une ou deux dimensions.^[115, 118, 119] Une étude préliminaire sur l'influence du solvant a

révélé que la pyridine stabilise très bien la formation de l'hélice suivie par l'acétonitrile, puis le méthanol et finalement le DMSO.^[115, 119] En présence d'une hélice d'oligourée, on observe une forte dispersion des signaux correspondants aux NHs et une faible dépendance à la température de ces signaux, signe qu'ils sont impliqués dans des liaisons hydrogène. Des valeurs de constantes de couplage vicinal 3J (NH, $^{\beta}\text{CH}$) élevées ($\approx 9-10$ Hz) caractérisant un arrangement antipériplanaire des protons NH et $^{\beta}\text{CH}$ de la chaîne principale sont également mesurées dans ces structures en hélice (Figure II.2a). La forte diastéréotopie des protons $^{\alpha}\text{CH}_2$ mesurée par des écarts de déplacement chimique ($\Delta\delta$) importants et la faible dépendance de ces valeurs à la température renseignent également sur l'homogénéité de l'hélice (Figure II.2c). Des valeurs $\Delta\delta$ comprises entre 1.1 et 1.5 ppm peuvent être relevées pour les résidus centraux les plus stabilisés dans des séquences courtes en hélice. Finalement les corrélations NOE (*Nuclear Overhauser effect*) à moyenne distance (de type $i/i+2$ et $i/i+3$) répétées le long de la séquence sont caractéristiques d'une structure en hélice et ont été utilisées pour obtenir un modèle tridimensionnel de l'hélice des oligourées (Figure II.2b). Le dichroïsme circulaire (CD) est également une technique d'analyse utile pour étudier la formation des hélices d'oligourées (Figure II.2d). En effet dans le 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE), ces hélices présentent une signature caractéristique avec un minimum à 188 nm et un maximum d'ellipticité à 202 nm.^[120]

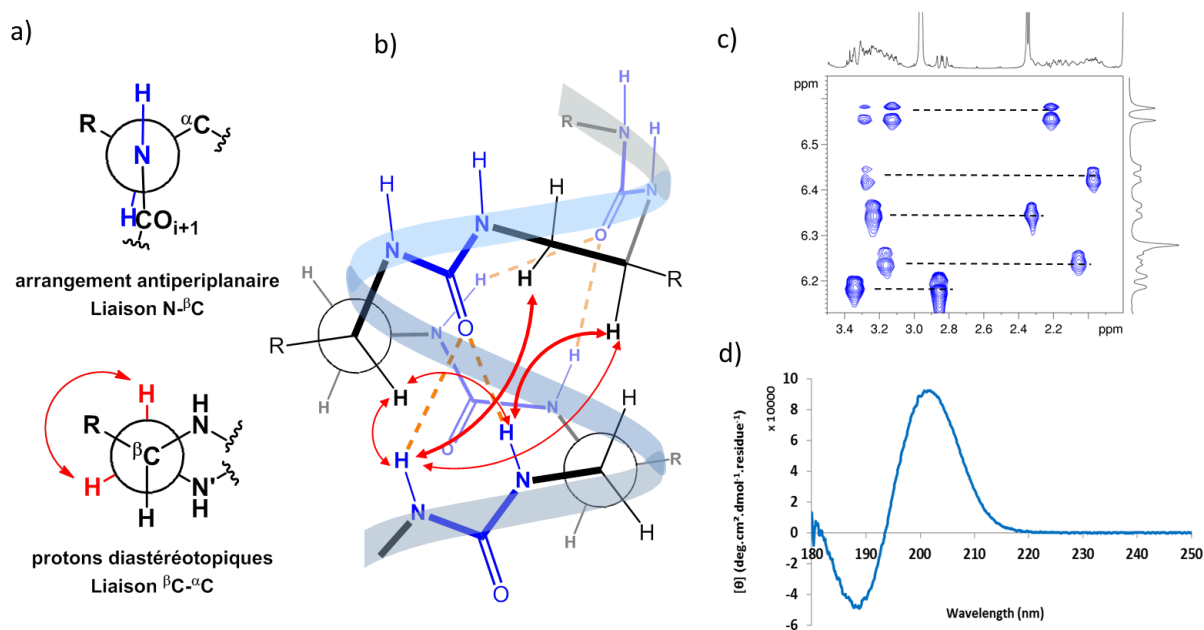


Figure II.2: a) Informations structurales obtenues par RMN ; b) Connexions NOE caractéristiques de l'hélice oligourée (en rouge sur un schéma simplifié de l'hélice oligourée) ; c) Spectre TOCSY (CD_3OH) : Ecart de déplacement chimique entre les protons $^{\alpha}\text{CH}_2$ diastéréotopiques d'une séquence oligourée ; d) Spectre de dichroïsme circulaire d'une hélice d'oligourée dans le 2,2,2-trifluoroéthanol.

Les différentes études réalisées en solution ont permis de montrer que ces oligourées forment des hélices stables à partir de 4 résidus dans des milieux aussi bien protique (méthanol) que polaire et aprotique (DMSO, CH₃CN)^[115]. La stabilité dans ces différents solvants montre bien la forte implication des liaisons hydrogène intramoléculaires qui sont peu concurrencées par les molécules de solvants.

A partir de ces informations structurales, des séquences oligourées peuvent être spécialement pensées afin de présenter certaines chaînes latérales à la surface de l'hélice dans le but d'interagir avec une cible (biologique). Ainsi, dans l'objectif de mimer les α -peptides antimicrobiens, des oligourées amphiphiles de séquence spécifique capables de présenter une face polaire chargée positivement et une face hydrophobe ont été synthétisées.^[121, 122]

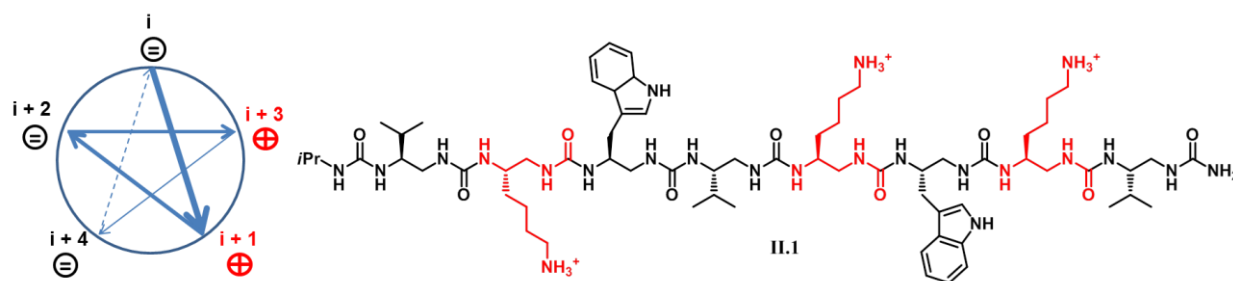


Figure II.3: Schéma de l'hélice amphiphile **II.1** et structure chimique de l'oligourée possédant une activité antimicrobienne intéressante.^[121]

Des études de relation structure-activité ont été réalisées en faisant varier la nature et le nombre des résidus chargés et hydrophobes, la longueur de la chaîne et la nature des extrémités afin de déterminer les séquences optimales pour l'activité antimicrobienne.^[121] La séquence **II.1** (Figure II.3) a été identifiée comme l'une des plus actives avec un spectre d'action assez large similaire à celui de la mélittine, un peptide dérivé du venin d'abeille à activité antimicrobienne. La molécule **II.1** s'est avérée être aussi efficace contre des bactéries de staphylocoque doré (*S. aureus*) résistantes à la méticilline. Des études par dichroïsme circulaire ont permis de montrer que l'oligourée adoptait une conformation en hélice 2.5 dans un environnement lipidique comme celui rencontré dans les membranes bactériennes.

Finalement, la résistance de ces oligourées à la protéolyse a été mise en évidence puisqu'aucune dégradation de l'oligourée n'a été observée après cinq jours d'incubation dans du sérum de souris.

Grâce à leur structure secondaire en hélice stable et bien définie ces oligomères d'urées représentent de très bons candidats pour des applications biologiques. Il est alors important de mieux comprendre les règles de leur repliement afin de mieux maîtriser la formation des hélices et contrôler l'arrangement des chaînes latérales à leur surface dans l'objectif de créer des hélices fonctionnelles dans d'autres systèmes.

Dans une étude récente réalisée par Nagendar Pendem, la compatibilité de différents types de substitutions avec la formation de l'hélice a été testée.^[123] Des résidus non canoniques possédant divers degrés de préorganisation (cyclique ou acyclique) et différentes stéréochimies ont été insérés au centre d'une séquence oligourée courte (5-mer). La stabilité de l'hélice formée a ensuite été évaluée par dichroïsme circulaire, spectroscopie RMN et Infra-rouge et comparée à l'état solide avec l'oligourée de référence **II.2** (Figure II.4).

Les résultats démontrent qu'un résidu sans chaîne latérale peut s'adapter à la structure en hélice même s'il la déstabilise légèrement (**II.3**). De plus l'hélice semble accommoder parfaitement le résidu *cis*-diaminocyclohexane (**II.4**) alors que son isomère *trans* empêche le repliement. Et finalement l'introduction d'une chaîne latérale sur le carbone α est tolérée à condition d'inverser la configuration (**II.5**).

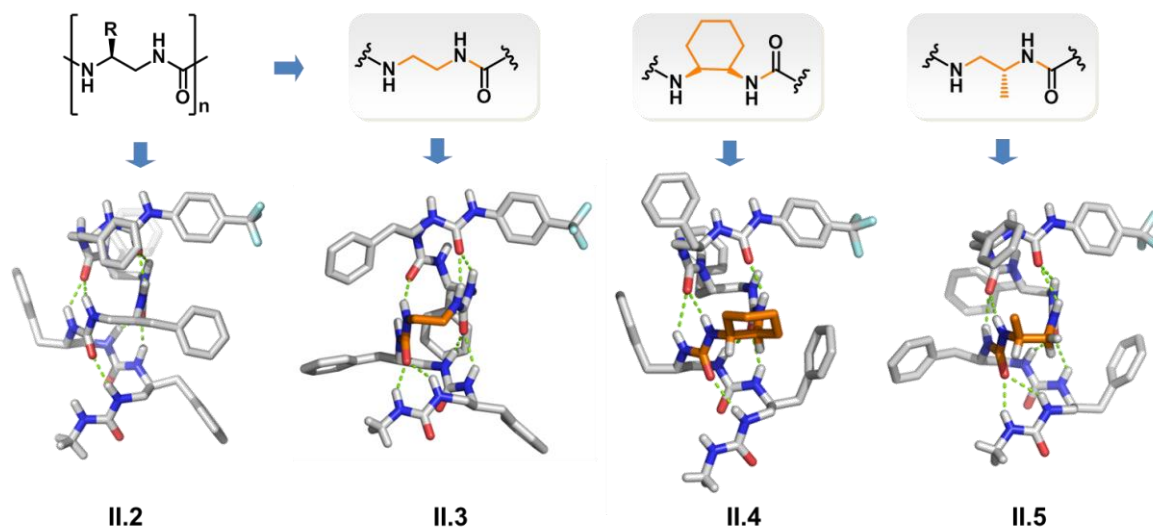


Figure II.4: Comparaison des structures cristallographiques des oligourées **II.2**, **II.3**, **II.4** et **II.5**. Les atomes de carbone des résidus non canoniques sont représentés en orange.^[123]

Dans la continuité de cette étude je me suis intéressée à l'introduction de résidus achiraux en particulier les dérivés éthylènediamine non substitués et *gem*-diméthylés.

I. Introduction d'un résidu *gem*-diméthyle au centre d'une oligourée

L'introduction de carbone quaternaire sur une chaîne alkyle est un moyen bien connu pour améliorer le taux de cyclisation de certaines réactions.^[124] Ce qui a ensuite été appelé l'effet Thorpe Ingold permet aussi de contrôler la conformation de petits peptides. En effet la présence de deux groupements alkyles sur le carbone ^αC d'un acide aminé impose une restriction de l'espace conformationnel disponible.^[112] L'acide aminoisobutyrique (Aib) est l'acide aminé le plus simple appartenant à cette famille. Avec des valeurs d'angles dièdres (ϕ, ψ) de l'ordre de ($\pm 30^\circ, \pm 60^\circ$), l'Aib est idéalement préorganisé pour induire des structures hélicoïdales de types 3_{10} ou α .^[125]

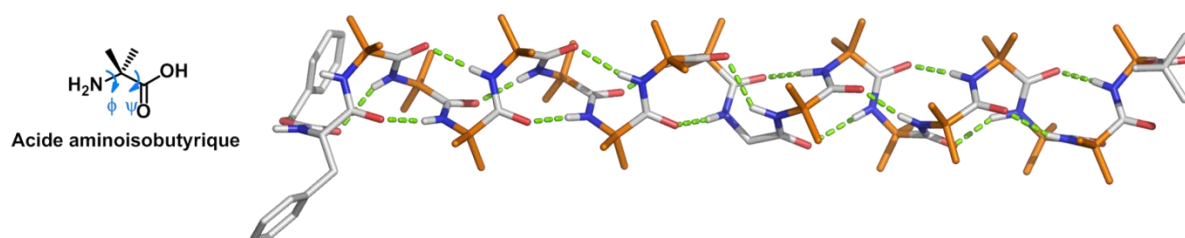


Figure II.5 : Schéma de l'Aib et structure d'une hélice 3_{10} construite à partir d'Aib et de Gly^[126].

Comme le dérivé Aib est un résidu achiral, des oligomères comportant uniquement ces résidus peuvent aussi bien adopter les conformations en hélice gauche que droite qui s'inter-convertissent rapidement en solution. Plusieurs équipes ont montré qu'il était toutefois possible de contrôler le sens d'hélicité en ajoutant un inducteur chiral (de manière covalente ou non) à une extrémité de l'hélice.

Inai et Kuroda^[127, 128]^[129] ont étudié l'induction d'un sens d'hélicité préférentiel de manière non covalente. Ils ont synthétisé des oligomères à partir d'Aib, de dehydrophénylalanine (Δ^2 Phe) et d'acide aminopipéridine carboxylique pour promouvoir la formation d'une hélice 3_{10} (Figure II.6).

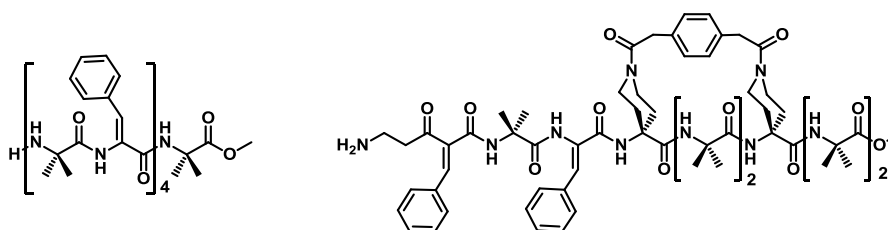


Figure II.6: Oligomères achiraux étudiés par Inai et coll.^[127, 128]

Ils ont ainsi montré qu'il était possible d'induire un sens de rotation préférentiel par des interactions non covalentes en position *N*-terminale de l'hélice avec une molécule chirale de type acide aminé L (Boc-L-Leu-OH ou Boc-L-Pro-OH). Kuroda a même démontré que ce sens d'hélicité pouvait

être conservé après le retrait du contrôleur chiral. Il a ainsi mis en évidence un premier exemple de système à mémoire de chiralité dans un oligomère hélicoïdal (Figure II.7).^[129]

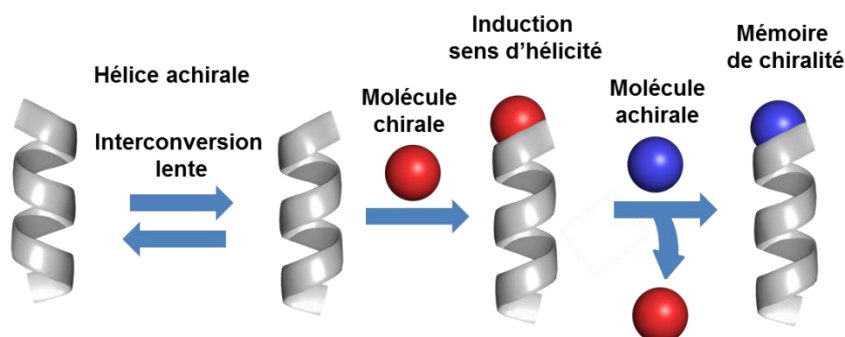


Figure II.7: Schéma de l'induction de la chiralité de manière non covalente.^[129]

Plusieurs équipes ont aussi traité ce sujet mais cette fois en introduisant l'inducteur chiral de manière covalente. Les travaux de Toniolo et coll. avec des petits oligomères d'Aib^[130] et Inai et coll. avec des oligomères Aib- Δ^Z Phe^[131] ont révélé qu'il était possible d'induire un sens d'hélicité préférentiel détectable par dichroïsme circulaire en introduisant un résidu chiral terminal. Enfin plus récemment, J. Clayden et coll. ont inséré un contrôleur chiral de type Cbz-L-Phe à l'extrémité *N*-terminale d'un oligomère construit à partir d'Aib et de Glycine.^{[132] [126] [133]} Ils ont ainsi pu observer une orientation préférentielle par dichroïsme circulaire et par RMN (Figure II.8).

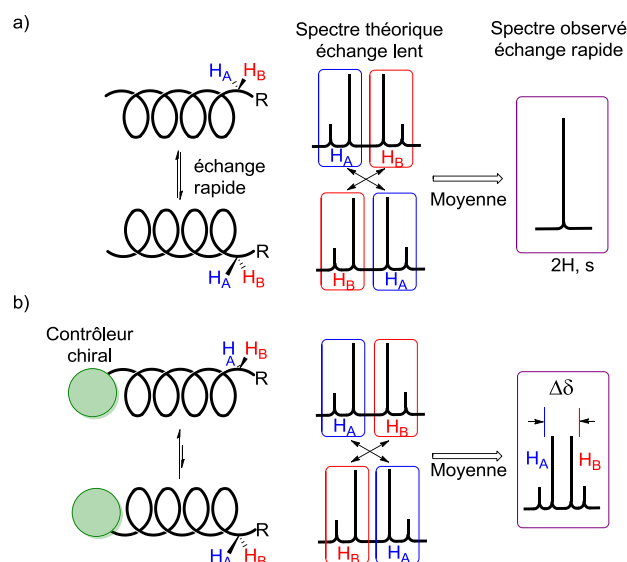


Figure II.8: Technique de RMN pour détecter la transmission du signal a) échange rapide entre les formes *M* et *P* d'une hélice uniquement composée de monomères achiraux : H_A et H_B apparaissent isochrones; b) le contrôleur chiral déplace l'équilibre vers un sens préférentiel de l'hélice : H_A et H_B apparaissent anisochrones, le $\Delta\delta$ est caractéristique de l'induction de l'hélicité.^[126]

Les systèmes biologiques utilisent souvent les changements conformationnels des macromolécules induits par des ligands pour transmettre des signaux (signalisation par les récepteurs de surface par exemple). Pour aller plus loin, J. Clayden et coll. se sont donc aussi intéressés à ce type de communication. Ils ont choisi comme contrôleur chirale un ester de benzoate dont la configuration peut être facilement inversé^[134] et ont effectué un marquage isotopique d'un groupement méthyle de l'Aib C-terminal pour détecter le sens d'hélicité à l'extrémité C-terminale.^[135]

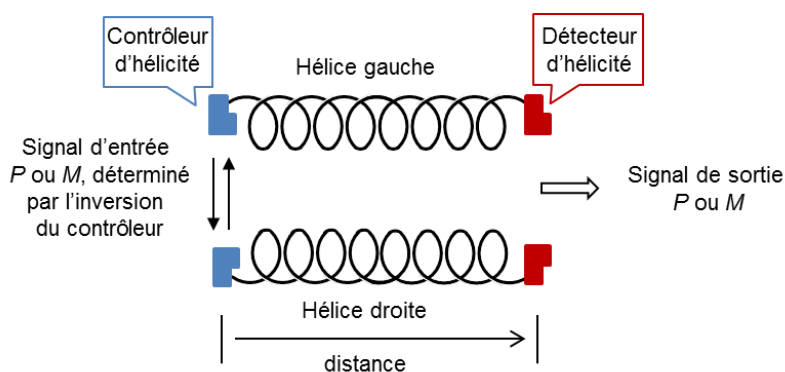


Figure II.9: Mécanisme de communication basé sur le sens d'hélicité. ^[134]

Ils ont alors pu observer par RMN ¹³C la transmission de l'information chimique du résidu N-terminal jusqu'au détecteur C-terminal. Cette étude représente un premier pas vers le développement de systèmes bioinspirés capables de transmettre des informations en réponse à un stimulus.

Afin d'évaluer la possibilité de développer des systèmes semblables avec un squelette oligourée nous avons étudié les propriétés conformationnelles de résidus achiraux *gem*-diméthylés et leur compatibilité avec la géométrie des hélices d'oligourées. Nous avons notamment introduit un ou plusieurs résidus 1,2-diamino-1,1diméthylethane (DADME) *gem*-diméthylés au centre d'une séquence modèle de type Boc-Val^u-Ala^u-Leu^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe et mesuré l'impact sur la structuration en hélice.

Ce projet sur les résidus *gem*-diméthylés a été réalisé en collaboration avec le Professeur J. Clayden grâce au programme COST (Action CM0803) qui m'a permis de passer onze semaines dans son laboratoire à Manchester.

1. Synthèse

Le squelette de nos molécules, semblable à celui des γ -peptides, nous permettait d'introduire les deux substituants méthyle sur le carbone ^αC ou le carbone ^βC. Pour la molécule **3A3** les deux méthyles ont été introduits sur le carbone ^βC (résidu Aib^u en orange sur la Figure II.10) alors que la substitution a été réalisée sur le carbone ^αC (résidu Aib_{inv}^u en vert sur la Figure II.10) pour la molécule **3B3**. Afin

de pouvoir comparer l'influence de ces résidus *gem*-diméthyle, nous avons utilisé une molécule de référence **L6** comportant sept résidus canoniques.

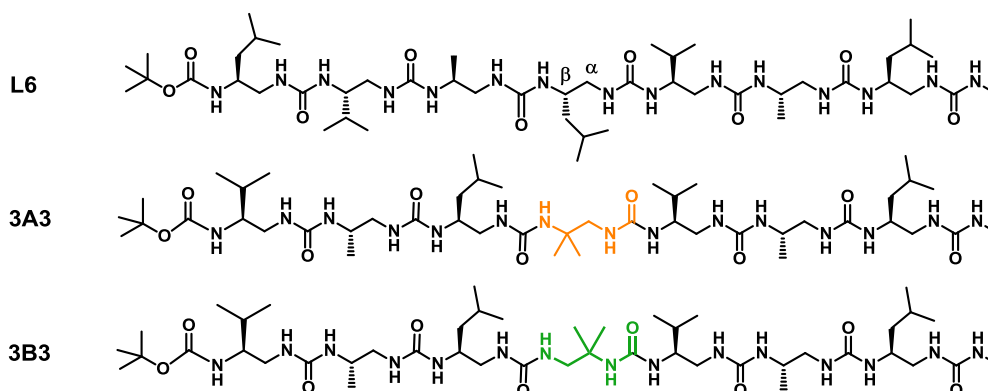


Figure II.10: Schéma des molécules **L6** (référence), **3A3** et **3B3**

a) Synthèse des monomères activés des résidus canoniques

Différentes méthodes de synthèse des urées mono-, di-, tri- et tétra-substituées ont été décrites dans la littérature. Ces méthodes sont généralement basées sur la réaction d'une amine avec un agent de carbonylation (phosgène et ses dérivés^[136, 137], différents carbonates^[138, 139], *N,N'*-carbonylediimidaazole^[140] ou 1,1'-bisbenzotriazole^[141]), des isocyanates^[114, 142] ou des carbamates.^[143-145]

Pour la synthèse des oligourées, deux approches de synthèse sur support solide utilisant le couplage de différents monomères activés ont été reportées dans la littérature. En 1995, Burgess et coll^[113, 114] ont couplé des dérivés d'isocyanate protégés par un groupement phtalimide. De manière similaire Schultz et coll, ont utilisé des carbamates activés de 4-nitrophényle comme monomère.^[146]

Notre laboratoire a quant à lui choisi une méthode impliquant la réaction de condensation d'un dérivé carbamate de succinimide sur une amine.^[147] Les monomères carbamates activés sont obtenus à partir des acides α -aminés correspondants, l'amine étant protégée par un groupement *tert*-butoxycarbonyle (Boc). Après la réduction de l'acide en alcool, une réaction de Mitsunobu permet de former le dérivé phtaloïde.^[148] Il reste ensuite à déprotéger l'amine par réduction avec de l'hydrazine monohydrate (réaction de Gabriel) avant de l'activer grâce au carbonate de disuccinimidyle pour former le carbamate désiré avec de bons rendements.

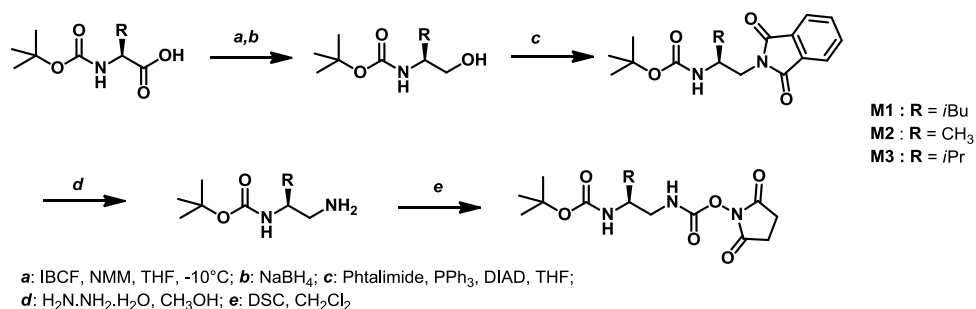


Figure II.11: Schéma de synthèse des monomères M1, M2 et M3

b) Synthèse des monomères gem-diméthyles

Deux monomères activés différents M5 et M6 ont été préparés (Figure II.12). Leur synthèse a été effectuée à partir du 1,2-diamino-1,1-diméthyléthane commercial via des étapes de protection et déprotection sélectives des amines pour finir par l'activation de l'amine non protégée.

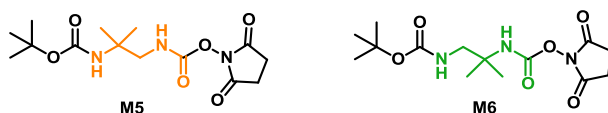


Figure II.12 : Schéma des deux monomères activés M5 et M6

i. Monomère M5

Le monomère M5 a été synthétisé par Christel Dolain. L'amine située sur le carbone primaire est protégée sélectivement et quantitativement par réaction avec du benzyl phényl carbonate selon une procédure décrite dans la littérature par Pittelkow et coll.^[149] puis la seconde amine située sur le carbone quaternaire est protégée par un groupement Boc (Figure II.13). L'hydrogénation catalytique permet la déprotection sélective du groupement Cbz conduisant à l'amine libre II.8 qui est finalement activée pour former le carbamate désiré M5 avec un rendement global de 45%.

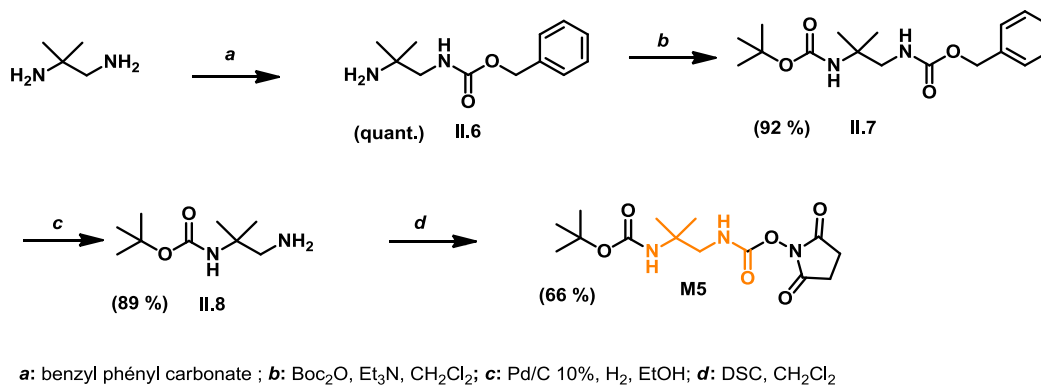


Figure II.13: Schéma de synthèse du monomère M5

ii. Monomère M6

La méthode utilisée pour la synthèse du monomère **M6** est plus simple et ne nécessite que deux étapes. L'amine située sur le carbone primaire est tout d'abord protégée par le groupement Boc puis la seconde amine est activée par le carbamate de succinimide (Figure II.14). Cette procédure permet d'obtenir le monomère activé **M6** avec un bon rendement global de 72%.

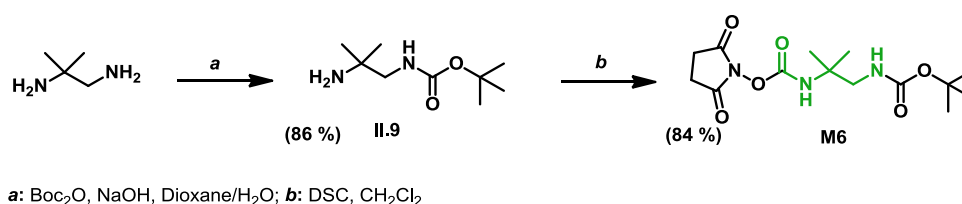


Figure II.14: Schéma de synthèse du monomère **M6**

Ces deux monomères ont ensuite été utilisés pour introduire les résidus de type *gem*-diméthyle dans les séquences d'oligourées ciblées.

c) Synthèse des oligomères

La synthèse de nos oligourées peut aussi bien être réalisée en solution que sur support solide. Cependant jusqu'à très récemment, la synthèse sur support solide présentait plusieurs inconvénients. Elle ne pouvait être réalisée que sur des quantités limitées (une centaine de milligrammes), nécessitait l'utilisation d'un large excès de monomère et le clivage final de la résine par traitement avec de l'acide fluorhydrique.^[122] Lors de cette étude, nos oligomères étant en plus de courtes séquences, nous avons choisi la méthode de synthèse en solution qui permet entre autre de travailler sur des échelles plus importantes (plusieurs centaines de milligrammes).

Les deux oligomères **3A3** et **3B3** ont été synthétisés en solution par des cycles successifs de déprotection du groupement Boc et de couplage des monomères activés (Figure II.15). Après condensation du chlorhydrate de méthylamine, l'extrémité protégée de l'oligomère est déprotégée à l'aide d'acide trifluoroacétique (TFA) pour permettre la réaction du carbamate de succinimide en présence de diisopropyléthylamine (DIEA) avec des rendements de couplage variant de 56 à 97%.

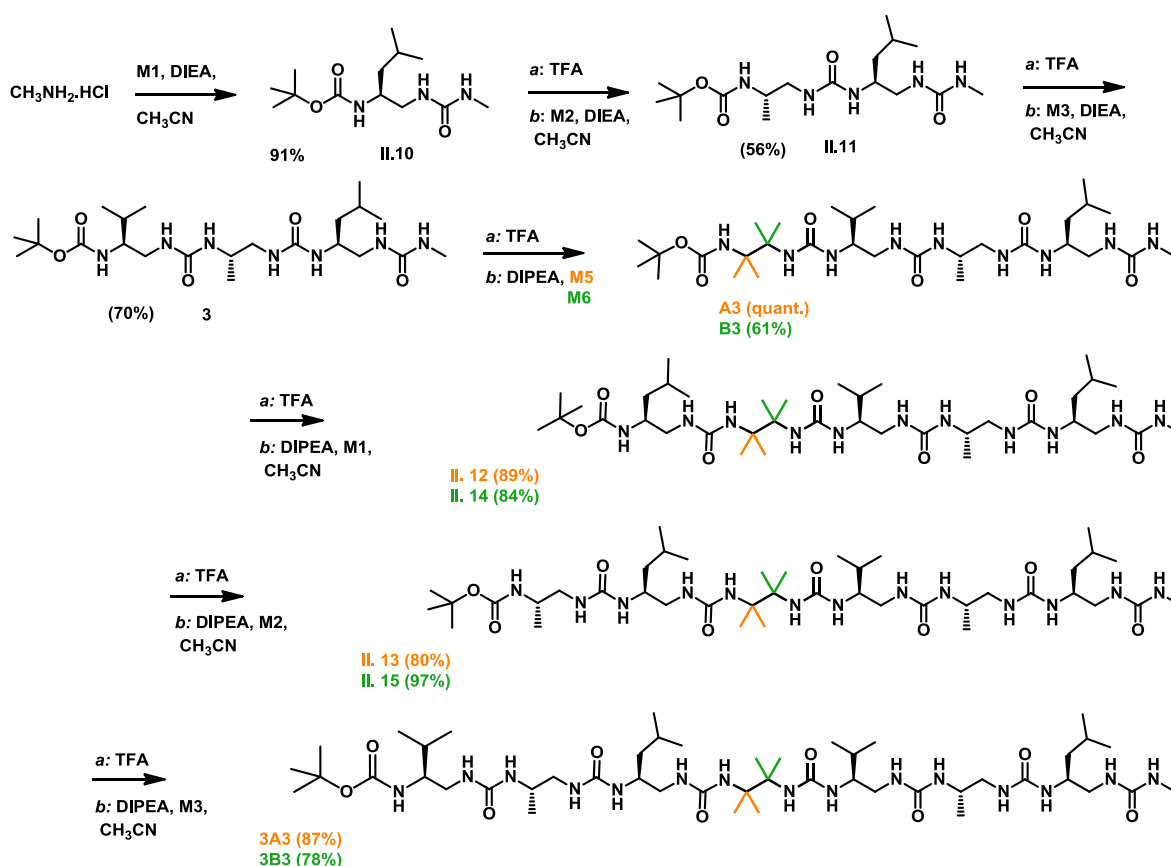


Figure II.15: Schéma de synthèse des oligourées **3A3** (substitution du résidu achiral sur le $^{\beta}\text{C}$ en orange) et **3B3** (substitution du résidu achiral sur le $^{\alpha}\text{C}$ en vert)

2. Etude conformationnelle en solution

a) Par Dichroïsme circulaire

Les trois molécules ont été étudiées par dichroïsme circulaire dans le 2,2,2-trifluoroéthanol à 0.2 mM (Figure II.16). Dans chacun des cas il est possible d'observer la signature caractéristique de l'hélice 2.5 avec un minimum d'ellipticité à 188 nm et un maximum positif à 203 nm. Il a aussi été montré que l'intensité de ce maximum pouvait être liée à la stabilité relative de l'hélice.^[115] Ici, la valeur de l'ellipticité molaire par résidu à 203 nm pour les composés **3A3** et **3B3** est inférieure à celle observée pour la molécule de référence **L6** ce qui suggère une déstabilisation partielle de l'hélice.

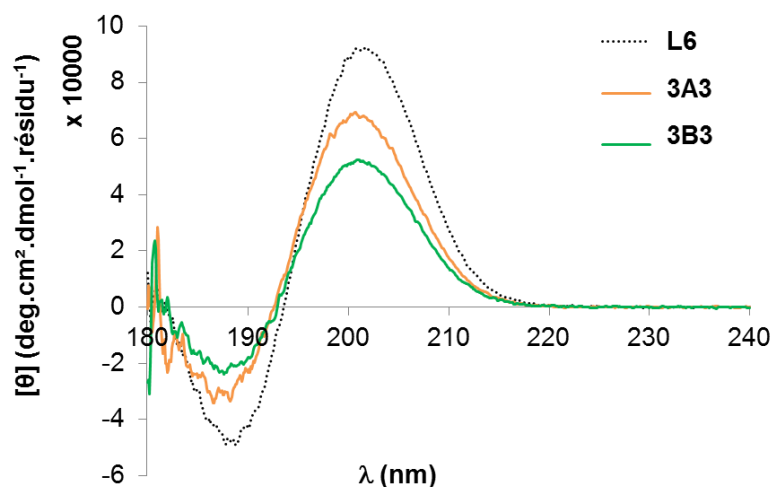


Figure II.16: Spectres CD obtenus pour **L6**, **3A3** et **3B3**

Il semblerait donc que les résidus *gem*-diméthyle soient compatibles avec la formation de l'hélice 2.5 même s'ils ont tendance à la déstabiliser. De plus, l'intensité du signal est plus faible pour la molécule **3B3** substituée sur le carbone $^{\alpha}\text{C}$, que pour la molécule **3A3** ce qui tendrait à montrer que l'hélice est plus stable lorsque le résidu *gem*-diméthyle est introduit dans le sens habituel avec la substitution sur le carbone $^{\beta}\text{C}$. Des analyses par RMN nous ont permis d'obtenir des informations supplémentaires plus précises sur la formation de la structure secondaire dans ces deux cas.

b) Par RMN

Les spectres RMN réalisés dans le CD_3OH présentent des données caractéristiques d'une structuration en hélice (Figure II.17). Par exemple pour chacune des molécules, une forte dispersion des signaux correspondants aux NHs (situés entre 5.6 et 6.8 ppm), des valeurs significatives de constantes de couplage vicinal entre les protons NH et $^{\beta}\text{CH}$ (entre 9.8 et 10.4 Hz) ainsi qu'un écart de déplacement chimique entre les protons $^{\alpha}\text{CH}_2$ diastéréotopiques peuvent être observés. Toutes ces informations combinées confirment un fort degré d'hélicité pour les deux oligourées **3A3** et **3B3**. Il est aussi intéressant de noter l'écart de déplacement chimique entre les deux groupements méthyle des résidus achiraux. Des valeurs de 0.21 ppm pour **3A3** et de 0.31 ppm pour **3B3** ont été mesurées ce qui témoigne à nouveau d'une conformation repliée.

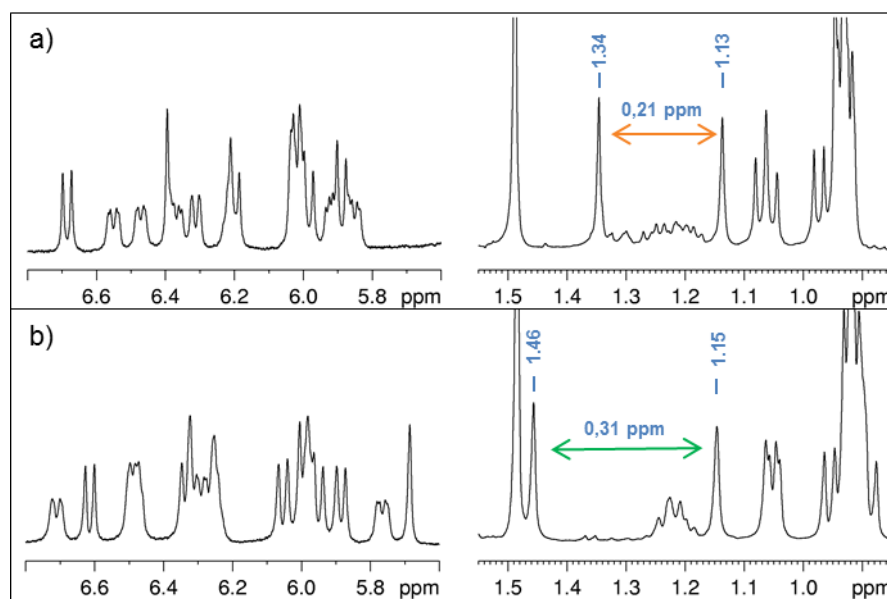


Figure II.17: Spectres RMN ^1H (CD_3OH , 400 MHz): région des protons NHs et CH_3 des oligourées a) **3A3** et b) **3B3**

Grâce aux expériences RMN COSY, TOCSY et ROESY nous avons pu attribuer tous les systèmes de spin et ainsi mesurer les écarts de déplacements chimiques $\Delta\delta$ entre les protons $^{\alpha}\text{CH}_2$ de la chaîne principale pour chaque résidu. Les valeurs obtenues sont regroupées sous forme de graphique dans la Figure II.18. Pour les résidus canoniques P1 à P3 et P5 à P6 elles sont similaires aux valeurs mesurées pour la molécule de référence **L6** (de 0.91 à 1.29 ppm) suggérant un effet mineur de l'effet *gem*-diméthyle du résidu central sur la géométrie de l'hélice par rapport au résidu mono substitué. Cependant, en s'intéressant au résidu *gem*-diméthyle central P4, on constate que pour la molécule **3A3** la valeur chute à 0.49 ppm alors qu'elle est maximale (1.37 ppm) pour **L6**. Il semblerait donc que le résidu achiral modifie localement la géométrie de l'hélice lorsqu'il est inséré dans le sens habituel (substitution sur le carbone $^{\beta}\text{C}$). Le $\Delta\delta$ de 1.41 ppm observé pour la molécule **3B3** est identique à la valeur de référence mais il n'est pas hautement significatif car il ne correspond pas aux mêmes protons. En effet dans cette molécule **3B3** l'écart de déplacement chimique entre les CH_2 du résidu central est mesuré pour les protons $^{\beta}\text{CH}_2$ alors que les autres mesures concernent les protons $^{\alpha}\text{CH}_2$.

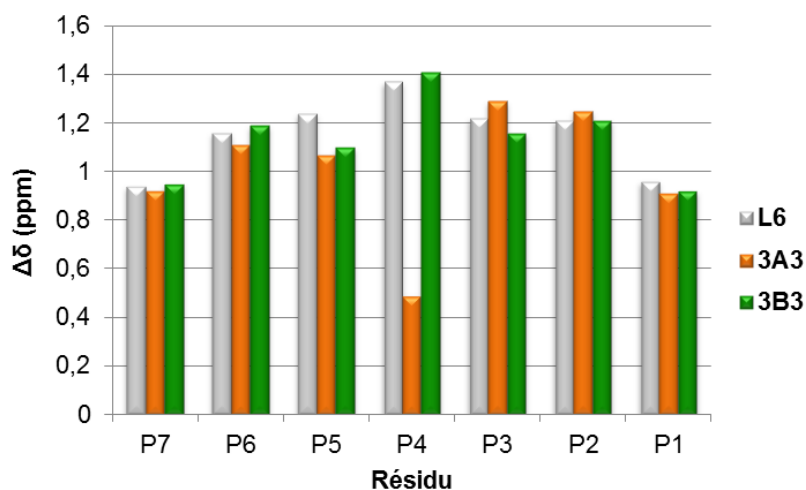


Figure II.18: Comparaison des $\Delta\delta$ des protons CH_2 diastéréotopiques des molécules **L6**, **3A3** et **3B3**

Pour finir plusieurs corrélations NOE représentatives des structures en hélice ont pu être observées entre les protons de différents résidus (Figure II.19 et Figure II.20). Elles ont été représentées par des flèches sur les schémas des molécules. Les corrélations entre les protons $\text{NH}(i)$ et ${}^{\beta}\text{CH}(i+2)$ répétées le long de la séquence de la molécule **3B3** sont compatibles avec une conformation hélicoïdale. Une tendance similaire est observée pour la molécule **3A3**, mais toutes les corrélations n'ont pas pu être attribuées en raison d'un recouvrement partiel de certains signaux. Quelques corrélations attribuées à une isomérisation Z-E (*cis-trans*) de la liaison urée ont également été observées entre les protons $\text{N}'\text{H}(i+1)$ et ${}^{\beta}\text{CH}(i)$ (en pointillé).^[115]

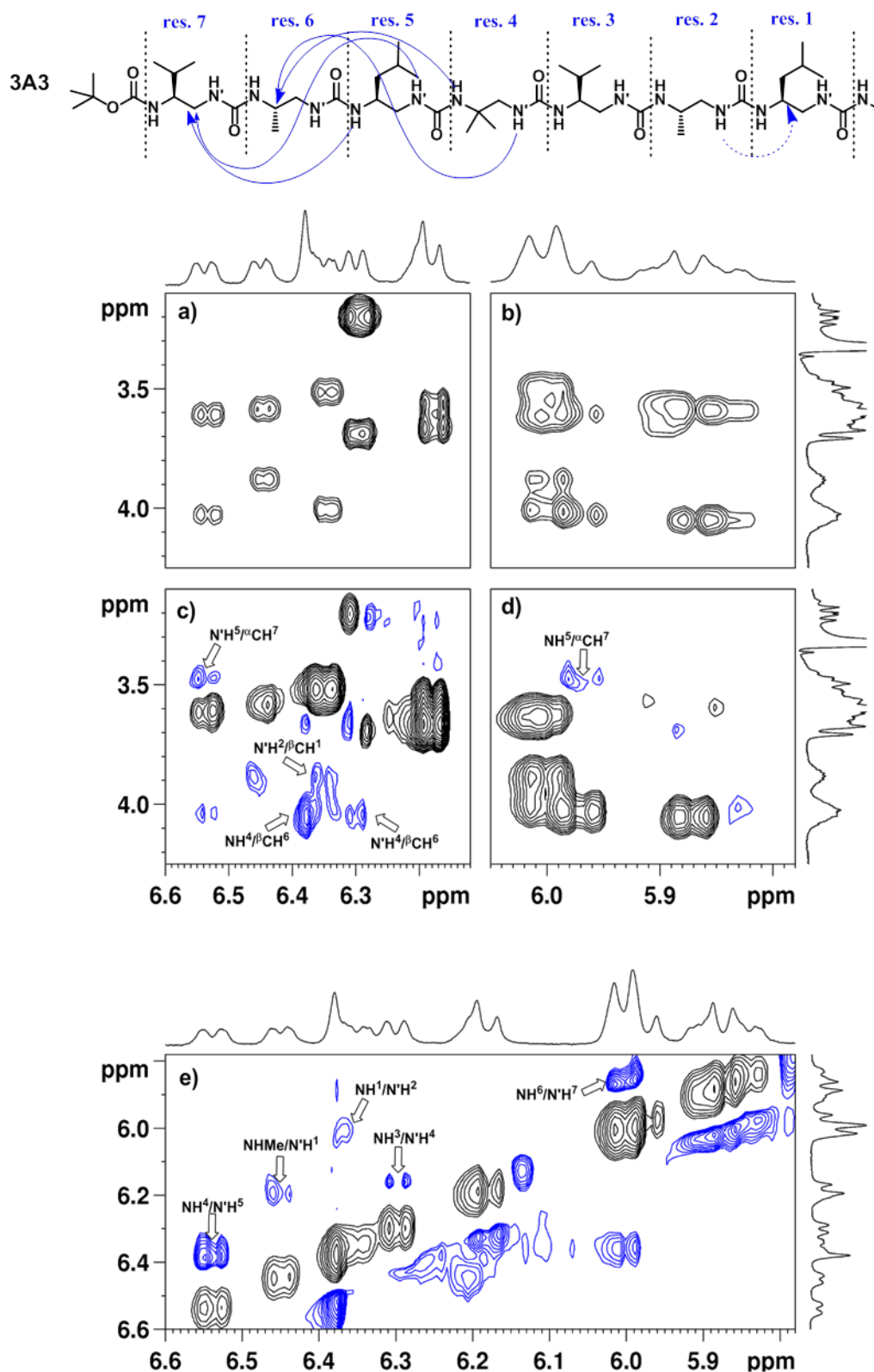


Figure II.19: Corrélations NOE observées par RMN pour la molécule **3A3** (CD₃OH, 400 MHz). a) et b) parties du spectre TOCSY montrées pour comparaison ; c) et d) Parties de la région NH/CH du spectre ROESY ; e) Partie de la région NH/NH du spectre ROESY.

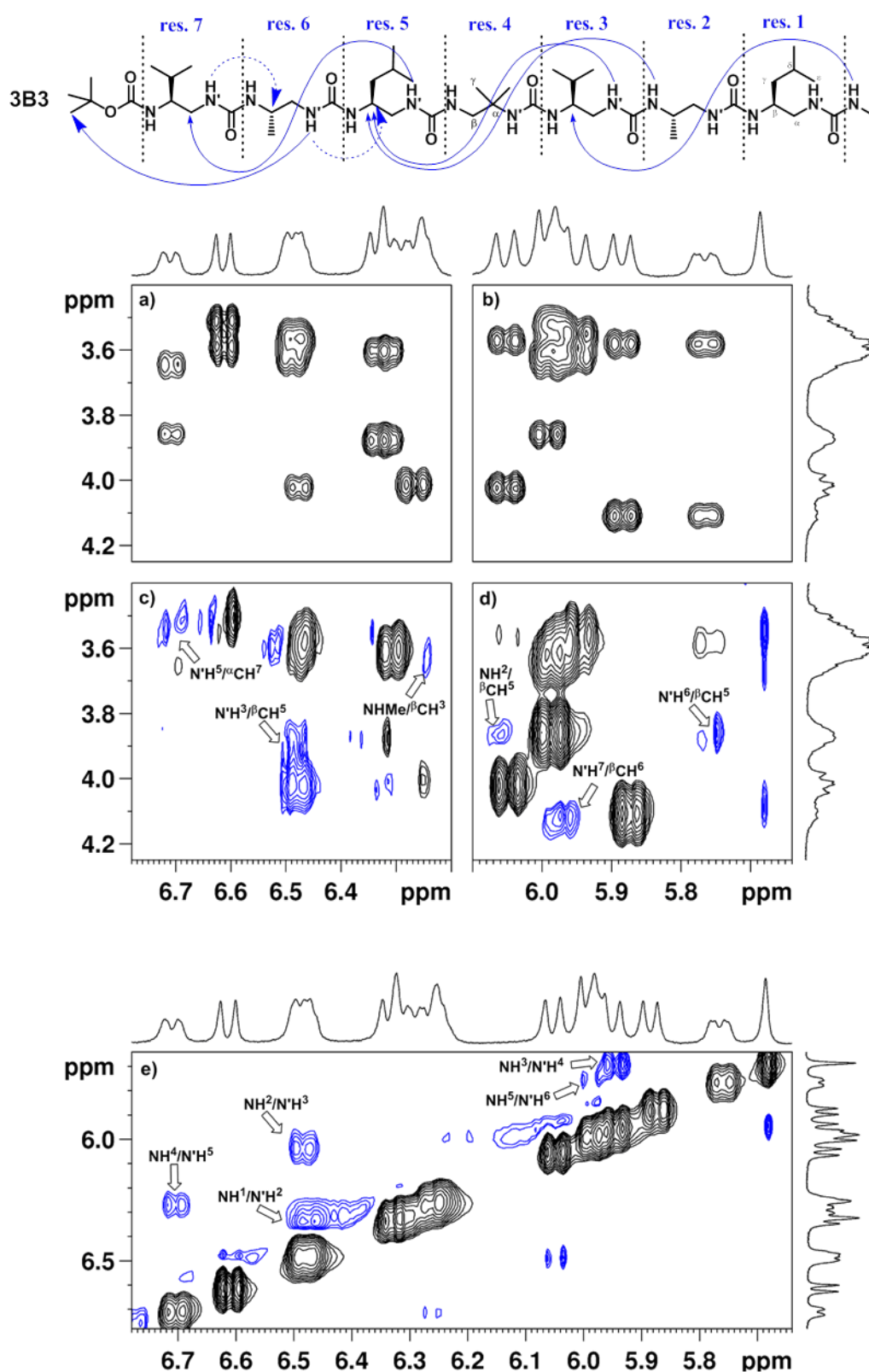


Figure II.20 : Corrélations NOE observées par RMN pour la molécule **3B3** (CD₃OH, 400 MHz). a) et b) parties du spectre TOCSY montrées pour comparaison ; c) et d) Parties de la région NH/CH du spectre ROESY ; e) Partie de la région NH/NH du spectre ROESY.

Toutes ces études en solution s'accordent sur le fait que chacune des deux oligourées **3A3** et **3B3** adopte une structure en hélice proche de l'hélice canonique 2.5. Il semblerait malgré tout que la *gem*-diméthylation sur le carbone $^{\beta}\text{C}$ conduise à une réorganisation conformationnelle locale dans la molécule **3A3**.

3. Etude structurale par diffraction des rayons X

Les molécules **3A3** et **3B3** ont pu être cristallisées dans le DMSO dans les groupes d'espaces P1 et P2₁ respectivement (Figure II.21). Les données cristallographiques confirment que ces deux molécules adoptent une structure en hélice droite très voisine de la forme canonique des hélices d'oligourées. Par exemple, les angles de torsions moyens (ϕ , θ_1 , θ_2) des résidus canoniques de chaque molécule, $(-97.7^\circ, +58.8^\circ, +78.0^\circ)$ pour **3A3** et $(-98.9^\circ, +58.2^\circ, +84.2^\circ)$ pour **3B3**, correspondent très bien aux angles généralement trouvés dans les hélices canoniques d'oligourées. (Les données cristallographiques de ces deux structures sont données sous forme de tableau dans la partie expérimentale)

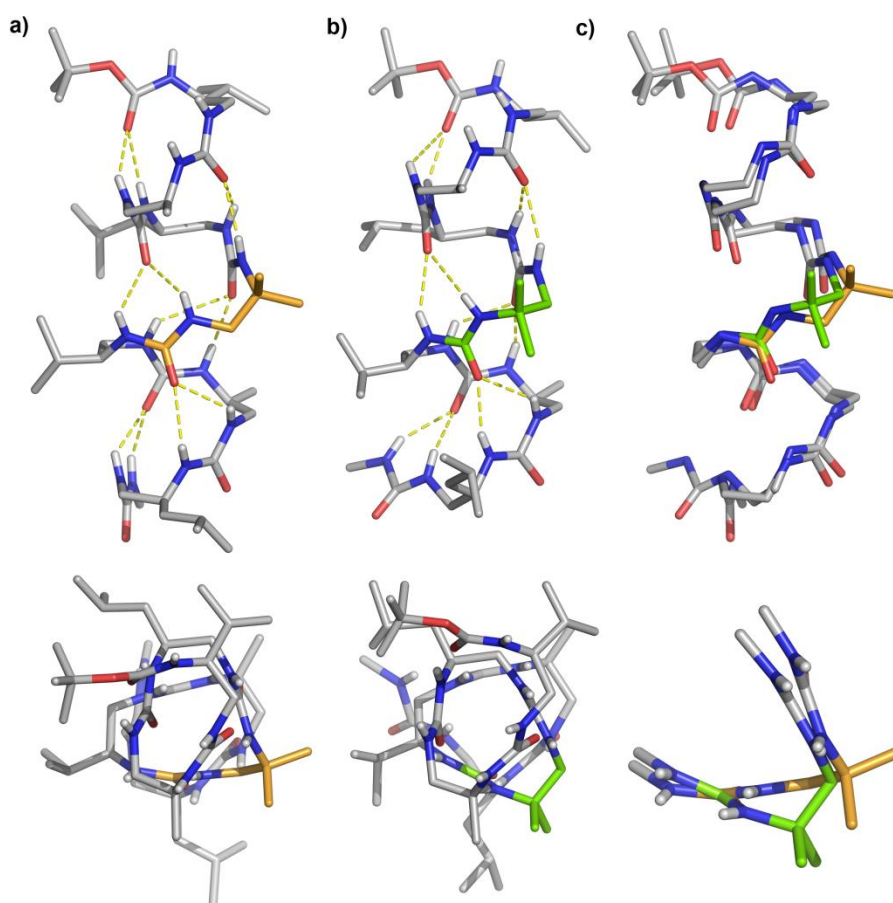


Figure II.21: Structures cristallographiques (vue de côté et de dessus) a) **3A3** ; b) **3B3** ; c) superposition des deux molécules **3A3** et **3B3** (RMSD = 0.650 Å)

Cependant une étude plus approfondie des résidus centraux révèle une différence entre les deux molécules (Figure II.22). Pour le résidu achiral $\text{Aib}_{\text{inv}}^{\text{u}}$ de la molécule **3B3** les valeurs des angles dièdres sont très proches des valeurs de référence et la molécule se superpose très bien avec une hélice canonique. En revanche les valeurs sont très différentes pour la molécule **3A3** avec un angle θ_1 de signe opposé et un angle θ_2 proche de 180° . Ces différences donnent lieu à une réorganisation conformationnelle locale avec une orientation des deux groupements méthyle perpendiculaire à la direction de l'hélice.

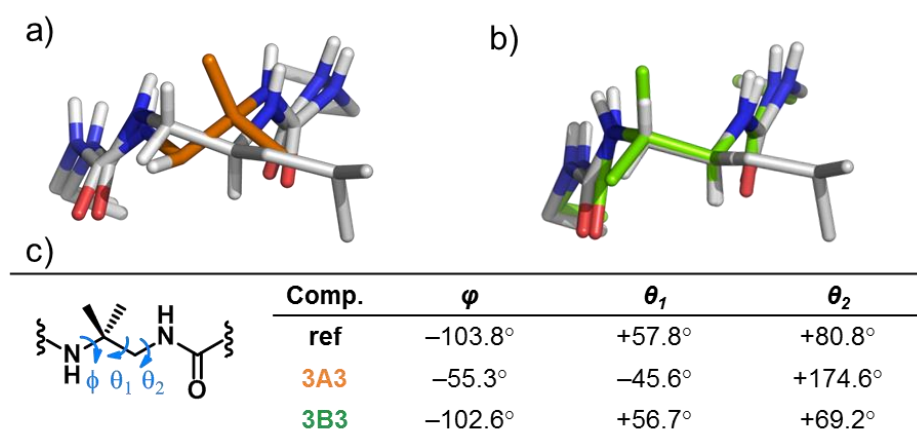


Figure II.22: superposition du résidu achiral de la molécule a) **3A3** (orange) b) **3B3** (vert) avec une hélice canonique (gris). c) tableau des angles dièdres des résidus Aib^{u} et $\text{Aib}_{\text{inv}}^{\text{u}}$ dans les molécules **3A3** et **3B3** comparés aux valeurs généralement observées dans les hélices canoniques d'oligourées.^[117]

En résumé nous avons montré que l'insertion de résidus achiraux *gem*-diméthyle de types Aib au centre d'une hélice canonique d'oligourée conserve la structure en hélice 2.5. La stabilité de l'hélice dépend cependant de la position de la substitution ($^{\alpha}\text{C}$ ou $^{\beta}\text{C}$). En effet, l'analyse des structures cristallographiques montre que la structure est très proche de la géométrie de l'hélice 2.5 lorsque les deux méthyles sont introduits sur le carbone $^{\alpha}\text{C}$ (**3B3**). Pour confirmer cette tendance et évaluer si la structure hélicoïdale peut se propager à travers plusieurs résidus *gem*-diméthylés nous avons synthétisé deux nouvelles molécules comportant deux unités Aib^{u} et $\text{Aib}_{\text{inv}}^{\text{u}}$ centrales.

II. Introduction de plusieurs résidus *gem*-diméthyle consécutifs

Les deux molécules réalisées sont similaires à celles étudiées précédemment. Elles comportent cette fois deux résidus *gem*-diméthylés consécutifs insérés dans un sens et dans l'autre et encadrés de chaque côté par trois résidus canoniques, **3A₂3** et **3B₂3** (Figure II.23).

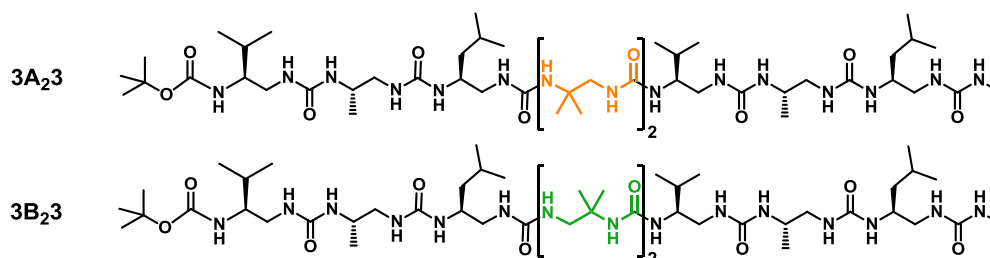


Figure II.23: Schémas des molécules comportant deux unités achirales substituées sur le carbone $^{\beta}\text{C}$, Aib^u, **3A₂3**, et sur le carbone $^{\alpha}\text{C}$, Aib^{rev}, **3B₂3**.

1. Synthèse

Les molécules ont été synthétisées selon la même procédure que précédemment par déprotection et couplages successifs de monomères activés à partir des intermédiaires **A3** et **B3** décrits précédemment (Figure II.24).

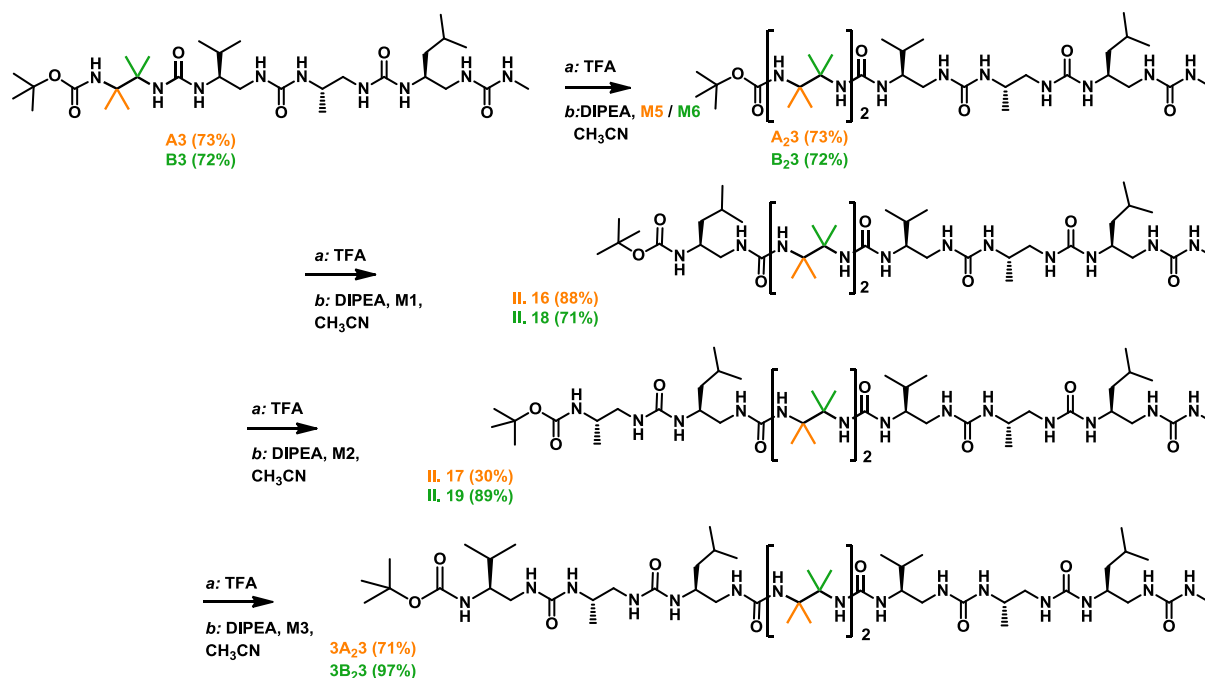


Figure II.24: Schéma de synthèse des molécules **3A₂3** et **3B₂3**

2. Etude conformationnelle en solution

a) Par dichroïsme circulaire

Les spectres CD des molécules **3A₂3** et **3B₂3** ont été réalisés dans le TFE à 0.2 mM et comparés aux spectres des molécules précédentes ne comportant qu'un résidu *gem*-diméthyle (Figure II.25). Dans les deux cas, un maximum à 203 nm signe de la formation d'une structure hélicoïdale est observé. Cependant, l'intensité maximale pour le composé **3A₂3** est environ trois fois inférieure à celle obtenue pour la molécule comportant un seul résidu dans le même sens **3A3** (2.3×10^4 contre 6.6×10^4 deg.cm².dmol⁻¹.résidu⁻¹, Figure II.25a). La présence de deux résidus *gem*-diméthyle consécutifs Aib^u semble déstabiliser fortement la structure de l'hélice. Au contraire, lorsque les résidus achiraux sont introduits dans le sens inverse (disubstitution sur le carbone ^uC), l'ellipticité molaire par résidu à 203nm augmente légèrement avec l'insertion de la deuxième unité Aib_{inv}^u (5.1×10^4 deg.cm².dmol⁻¹.résidu⁻¹ pour **3B3** contre 6.5×10^4 deg.cm².dmol⁻¹.résidu⁻¹ pour **3B₂3**, Figure II.25b) suggérant une augmentation de la stabilité de l'hélice.

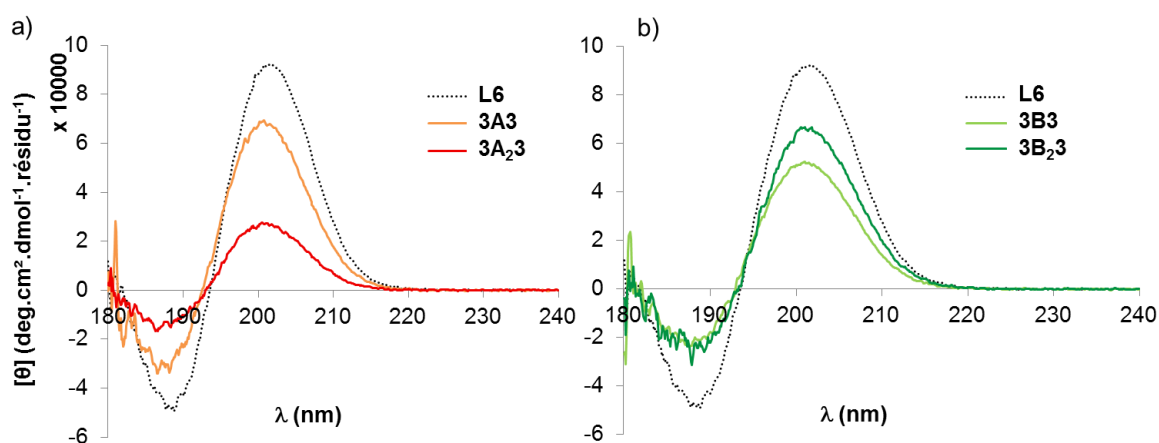


Figure II.25: comparaison des spectres CD de la molécule de référence **L6** avec les molécules comportant une et deux unités *gem*-diméthyle a) Aib^u, **3A3** et **3A₂3** ; b) Aib_{inv}^u, **3B3** et **3B₂3**

Afin de préciser la contribution de l'effet Thorpe-Ingold dans ces spectres CD, nous avons choisi de comparer les molécules **3A₂3** et **3B₂3** avec le composé **3G₂3** (Figure II.26) comportant deux résidus achiraux de type Gly^u dans lequel la contrainte stérique imposée par les groupements *gem*-diméthyle est absente (voir la partie expérimentale pour le schéma de synthèse et les analyses des intermédiaires).

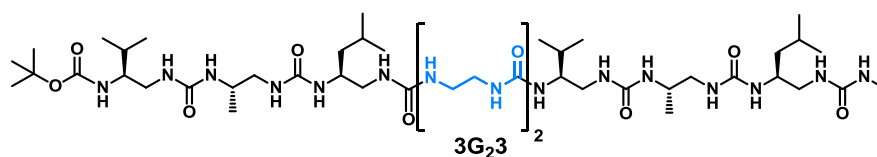


Figure II.26 : Schéma de la molécule **3G₂3** comportant deux résidus achiraux non substitués

Le spectre de la molécule **3G₂3**, réalisé dans le 2,2,2-trifluoroéthanol à 0.2 mM, présente la signature caractéristique d'une hélice 2.5. L'intensité du maximum à 203 nm est voisine de celle observée pour le composé **L6** (EMPR $\approx 8.9 \times 10^4$ deg.cm².dmol⁻¹.résidu⁻¹) suggérant une excellente stabilité de la structure hélicoïdale (Figure II.27). L'intensité maximale du spectre CD est plus faible lorsque des résidus achiraux *gem*-diméthyle Aib^u sont introduits contrairement à ce qu'aurait pu provoquer l'effet Thorpe-Ingold en verrouillant la structure. Il semblerait donc que le repliement soit majoritairement dirigé par les résidus chiraux situés de part et d'autre plutôt que par la présence du carbone quaternaire qui introduit une distorsion dans l'hélice canonique.

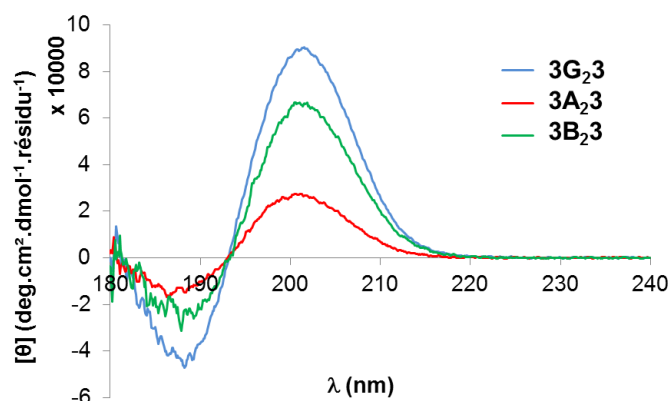


Figure II.27 : spectres CD des molécules **3G₂3**, **3A₂3** et **3B₂3** dans le TFE à 0.2 mM.

b) Par RMN ¹H

Les spectres RMN réalisés pour les molécules **3A₂3** et **3B₂3** présentent les mêmes signes caractéristiques de la formation d'une hélice 2.5 d'oligourée que leurs homologues ne comportant qu'un seul résidu *gem*-diméthyle (Figure II.28). Par exemple, chacune des deux molécules affiche des valeurs de constantes de couplage vicinal ³J (NH, ^βCH) élevées (entre 9.1 et 10.6 Hz), une forte dispersion des signaux correspondants aux NHs (entre 5.7 et 6.7 ppm) ainsi qu'un grand Δδ des protons ^αCH₂ diastéréotopiques (entre 0.8 et 1.3 ppm) pour les résidus canoniques (Figure II.29). Pour les deux résidus centraux Aib^u de **3A₂3**, les valeurs de Δδ sont assez faibles, et diminuent même pour le deuxième résidu (0.42 et 0.23 ppm).

Comme précédemment il est possible de mesurer un écart de déplacement chimique entre les deux groupements méthyle diastéréotopiques des résidus achiraux (Figure II.28). Cependant dans les deux cas cet écart diminue pour le deuxième résidu. De plus ces valeurs sont plus faibles pour l'oligourée **3A₂3**.

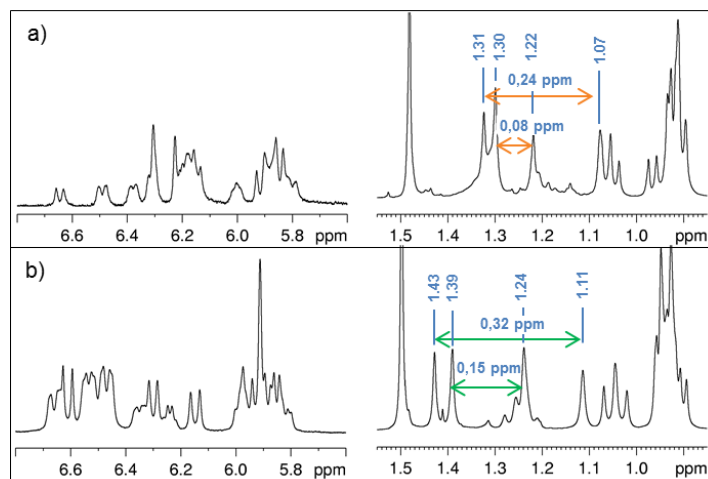


Figure II.28 : Spectres RMN ¹H : région des protons NH_s et CH₃ des oligourées a) **3A₂3** et b) **3B₂3**

En ce qui concerne l'oligourée **3G₂3**, le spectre RMN du proton présente toutes les caractéristiques des hélices canoniques d'oligourées (spectre présenté dans la partie expérimentale).

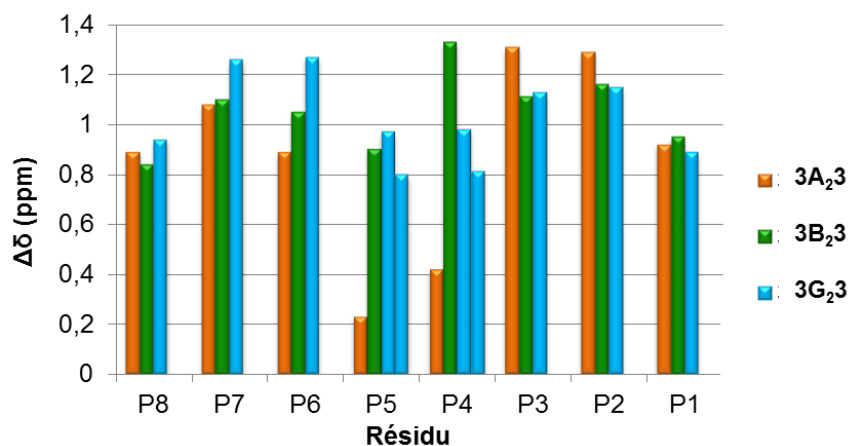


Figure II.29 : Comparaison des $\Delta\delta$ (ppm) des protons CH₂ diastéréotopiques des molécules **3A₂3**, **3B₂3** et **3G₂3**

Toutes ces données RMN tendent à confirmer les informations obtenues par dichroïsme circulaire. Il semble que l'ajout d'un deuxième résidu *gem*-diméthyle n'empêche pas la formation de l'hélice mais qu'il déstabilise fortement la structure lorsque la substitution est effectuée sur le carbone ^βC. En revanche l'insertion de deux résidus Aib_{inv}^u ou Gly^u est bien tolérée.

3. Etude conformationnelle à l'état solide

L'oligomère **3B₂3** a pu être cristallisé et sa structure résolue dans le groupe d'espace P2₁ comme **3B3**. Conformément aux données obtenues en solution, cette molécule adopte une structure hélicoïdale. Les angles dièdres des deux résidus non canoniques sont, comme attendu similaires à ceux généralement observés pour les résidus chiraux dans l'hélice 2.5 (Figure II.30).

Comp.	φ	θ_1	θ_2
ref	-103.8°	+57.8°	+80.8°
3B₂3 P4	-106.3°	+63.2°	+69.6°
3B₂3 P5	-94.3°	+72.9°	+55.0°

Figure II.30 : tableau des angles dièdres des résidus Aib_{inv}^u de la molécule **3B₂3** comparés aux valeurs généralement observées dans l'hélice canonique d'oligourées.

Le réseau de liaisons hydrogène à 3 centres est conservé excepté au niveau du résidu P5 Aib_{inv}^u. A cette position le réseau est relayé par une molécule d'eau provoquant une flexion de l'hélice. Ce coude est peut-être causé par des interactions de répulsion entre le méthyle du résidu Aib_{inv}^u en P5 et le méthyle du résidu Ala^u en P7.

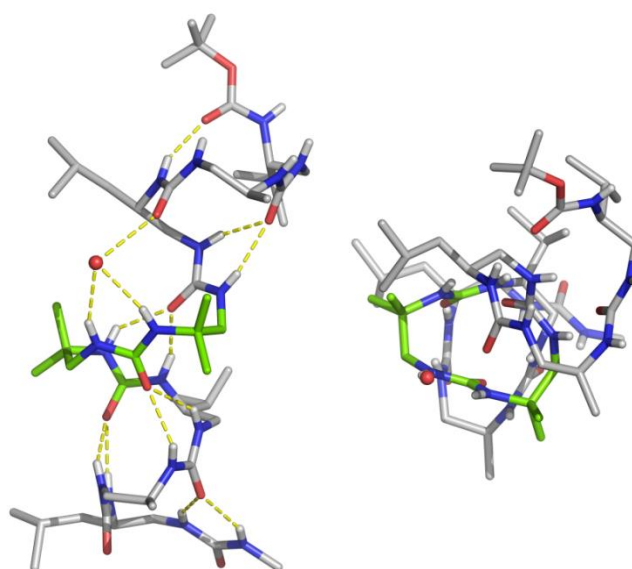


Figure II.31: Structure cristallographique de la molécule **3B₂3**. (Les atomes de carbone des résidus Aib^u sont en vert)

Toutes ses informations sont cohérentes et confirment que les résidus *gem*-diméthyle sont davantage compatibles avec la formation d'une hélice 2.5 lorsque la substitution est effectuée sur le carbone ¹³C même si la structure est alors légèrement déstabilisée. En examinant cette structure cristallographique, il semblerait aussi qu'un segment comportant 3 résidus canoniques chiraux à une extrémité puisse suffire pour induire l'hélice à travers plusieurs résidus achiraux *gem*-diméthyle.

III. Segment trimérique canonique comme contrôleur chiral

En cherchant à augmenter le rapport des résidus achiraux/chiraux, nous avons préparé des molécules comportant 3 résidus *gem*-diméthylés accolés à un segment trimérique canonique pour induire l'hélicité (Figure II.32). Comme précédemment nous avons souhaité comparer l'influence du sens d'introduction des résidus achiraux. La première molécule **A₃3** comporte trois résidus *gem*-diméthyle alkylés sur le carbone ^βC (Aib^u)₃ et trois résidus chiraux (Val^u-Ala^u-Leu^u). La deuxième molécule **B₃3** a été construite sur le même modèle mais les résidus achiraux ont été introduits dans le sens inverse (Aib^{inv}^u, alkylation sur le carbone ^αC).

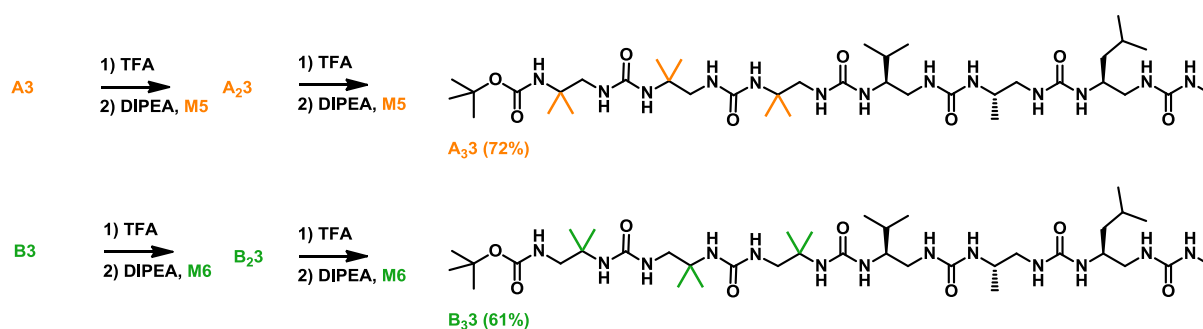


Figure II.32 : Schéma des molécules **A₃3** et **B₃3**

L'influence de l'élongation de la séquence avec des résidus de type Aib achiraux a été évaluée pour les différentes molécules comportant un (**A₃**, **B₃**), deux (**A₂3**, **B₂3**) et trois résidus *gem*-diméthyle (**A₃3**, **B₃3**), par dichroïsme circulaire (Figure II.33). Les spectres obtenus dans le TFE à 0.2 mM confirment les résultats obtenus précédemment. Une faible diminution de l'intensité du signal est observée avec l'élongation de la séquence pour chacune des deux séries de molécules. L'ajout de résidus achiraux semble donc légèrement déstabiliser la structure. De plus, les signaux sont deux fois plus intenses pour les molécules dont la *gem*-diméthylation est effectuée sur le carbone ^αC (**B₃**, **B₂3** et **B₃3**). Ces résultats suggèrent qu'un enchaînement de résidus Aib^{inv}^u est davantage compatible avec la progression d'une hélice induite par des résidus canoniques qu'un enchaînement de résidus Aib^u.

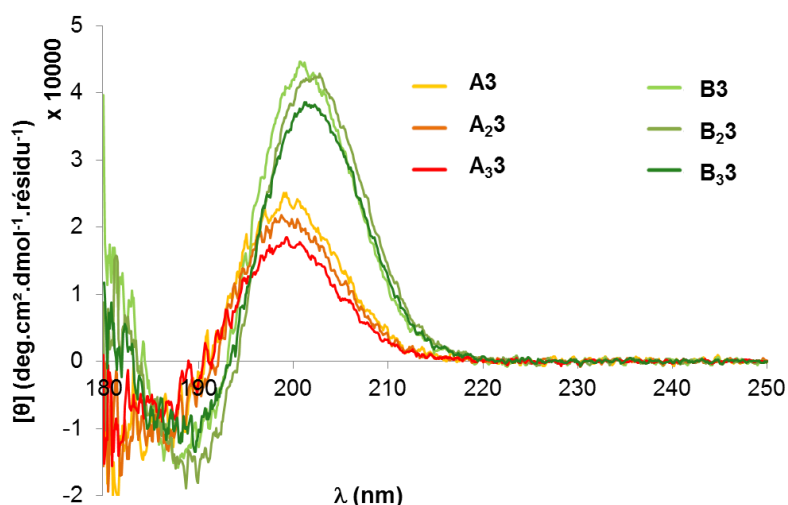


Figure II.33 : Spectres CD des molécules **A3**, **A₂₃**, **A₃₃**, **B3**, **B₂₃** et **B₃₃** (TFE, 0.2 mM).

Les spectres RMN obtenus dans le CD_3OH confirment ces informations. En effet le spectre RMN ^1H de la molécule **A₃₃** ne présente pas les caractéristiques de la formation d'une hélice d'oligourée (Figure II.34a). Les signaux correspondants aux NHs sont peu dispersés, les groupements CH_3 des résidus Aib^u sont tous superposés entre 1.2 et 1.3 ppm, et il est impossible de mesurer un écart de déplacement chimique entre les protons diastéréotopiques $^u\text{CH}_2$ de la chaîne principale. Cette molécule ne semble donc pas adopter de structure hélicoïdale contrairement à l'oligourée **B₃₃** qui possède toutes les caractéristiques de la formation de l'hélice (Figure II.34b). Dans ce cas-là, les signaux des NHs sont majoritairement dispersés malgré un recouvrement partiel de ceux correspondants aux résidus $\text{Aib}_{\text{inv}}^u$ et il est possible de différencier tous les groupements CH_3 des résidus *gem*-diméthyle. (Figure II.35)

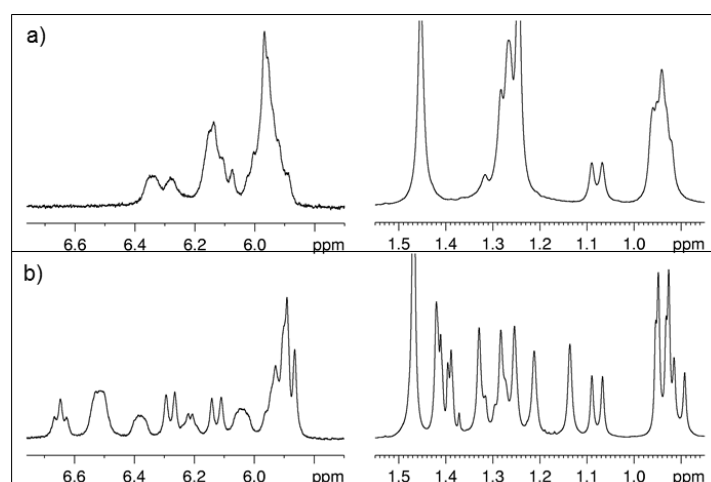


Figure II.34 : Spectres RMN ^1H des molécules a) **A₃₃** ; b) **B₃₃** (CD_3OH , 400M Hz)

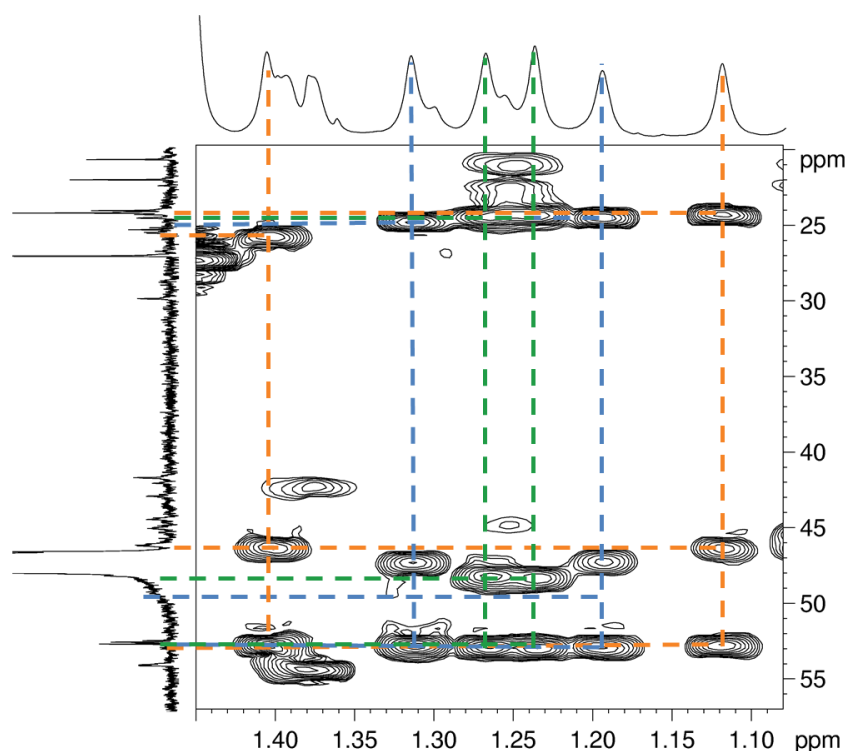


Figure II.35 : HMBC de la zone des CH₃ de la molécule **B₃₃**.

Le $\Delta\delta$ des protons $^{\beta}\text{CH}_2$ a aussi pu être mesuré pour la molécule **B₃₃** (Figure II.36). Les valeurs obtenues sont suffisamment importantes pour être attribuées à la formation d'une structure en hélice notamment la valeur $\Delta\delta$ du premier résidu Aib_{inv}^u P4 de 1.24 ppm. Cependant ces valeurs diminuent pour les résidus P5 et P6 indiquant une perte du contrôle chirale en bout de séquence. La diastéréotopie des $^{\alpha}\text{CH}_2$ sur la portion chirale de la séquence persiste mais les $\Delta\delta$ sont plus faibles que pour une séquence homochirale de six résidus.

	P6	P5	P4	P3	P2	P1
B₃₃	0,11	0,56	1,24	0,88	0,81	0,56

Figure II.36 : $\Delta\delta$ (en ppm) des protons $^{\beta}\text{CH}_2$ diastéréotopiques de la molécule **B₃₃**

Il faudrait à présent continuer d'allonger cette séquence avec des résidus Aib_{inv}^u pour déterminer si l'hélicité se propage ou si elle continue de diminuer fortement dès les résidus P5 et P6.

Les résultats obtenus concordent avec ceux des études précédentes. Les résidus achiraux *gem*-diméthylés Aib_{inv}^u avec la dialkylation sur le carbone $^{\alpha}\text{C}$ sont plus appropriés pour propager l'hélice induite par une courte séquence chirale. Malheureusement nous n'avons à ce jour pas obtenu de cristaux de ces molécules pour confirmer ces informations.

IV. Vers des hélices d'oligourées majoritairement achirales

Afin de s'orienter vers des structures en hélice achirales susceptibles de changer de configuration en solution, nous avons réalisé une étude préliminaire sur des oligourées majoritairement composées de résidus achiraux

1. Oligourée entièrement achirale

Pour étudier d'éventuelles inversions de configuration des hélices et pouvoir ensuite induire un sens préférentiel d'hélicité, il était tout d'abord nécessaire d'évaluer la capacité d'oligourées composées uniquement de résidus achiraux à adopter des structures en hélice.

Nous avons réalisé une étude préliminaire sur un oligomère composé uniquement de résidus achiraux *gem*-diméthyle **II.24** (Figure II.37). Cette oligourée a été synthétisée à partir de benzylamine sur laquelle nous avons couplé quatre monomères **M6**, ce qui correspond au nombre minimum de résidus chiraux nécessaires pour observer la formation d'une hélice canonique.

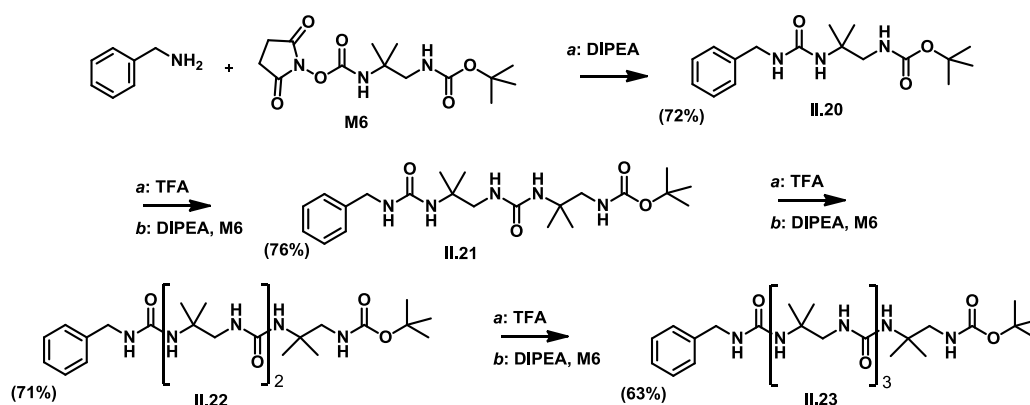


Figure II.37 : Schéma de synthèse de l'oligourée **II.23**

Le spectre RMN de cette molécule ne présente pas les signes caractéristiques de la formation d'une hélice (Figure II.38). Les signaux correspondants aux NHs sont principalement situés entre 5.0 et 5.5 ppm, et aucun écart de déplacement chimique entre les protons CH₂ de la chaîne principale n'a pu être observé. Une expérience de RMN a été réalisée à -40°C pour essayer de ralentir une éventuelle dynamique conformationnelle. Cependant aucune différence n'a été observée. De plus la molécule n'est presque pas soluble à cette température.

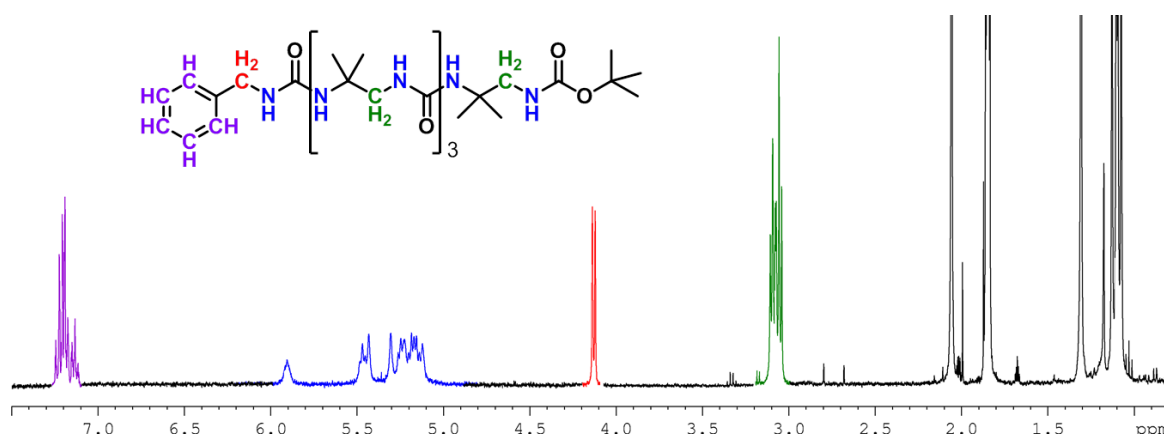


Figure II.38 : Spectre RMN ^1H du composé **II.23** à 20°C (CD_3CN)

Cette oligourée entièrement achirale ne semble donc pas adopter de structure en hélice suggérant que les résidus Aib^u à la différence des résidus d'acide aminé Aib sont faiblement hélicogènes. Il serait probablement nécessaire d'introduire un inducteur chiral à une extrémité de la séquence pour forcer l'induction d'une structure en hélice.

2. Induction de la chiralité par contrôleur chiral

Une étude précédente réalisée au laboratoire a montré que le résidu *cis*-cyclohexyldiamine est préorganisé de manière idéale pour la formation d'une hélice d'oligourée. Il a donc été choisi comme contrôleur chiral et introduit à l'extrémité *N*-terminale de la séquence. Scott France, étudiant en master dans l'équipe du Professeur J. Clayden, a initié le projet et synthétisé un premier oligomère comportant le résidu *cis*-cyclohexylamine et trois résidus *gem*-diméthyle. Afin de compléter ses résultats, nous avons réalisé un oligomère analogue plus long, comportant quatre résidus achiraux (Figure II.39).

Le contrôleur chiral a été préparé à partir du *cis*-1,2-diaminocyclohexane par désymétrisation enzymatique selon une procédure décrite par Berkessel et coll.^[150], pour former le carbamate d'allyle suivi par le couplage de l'isocyanate d'isopropyle pour obtenir l'urée correspondante. Le carbamate d'allyle est ensuite retiré pour permettre le couplage des monomères activés **M6**.

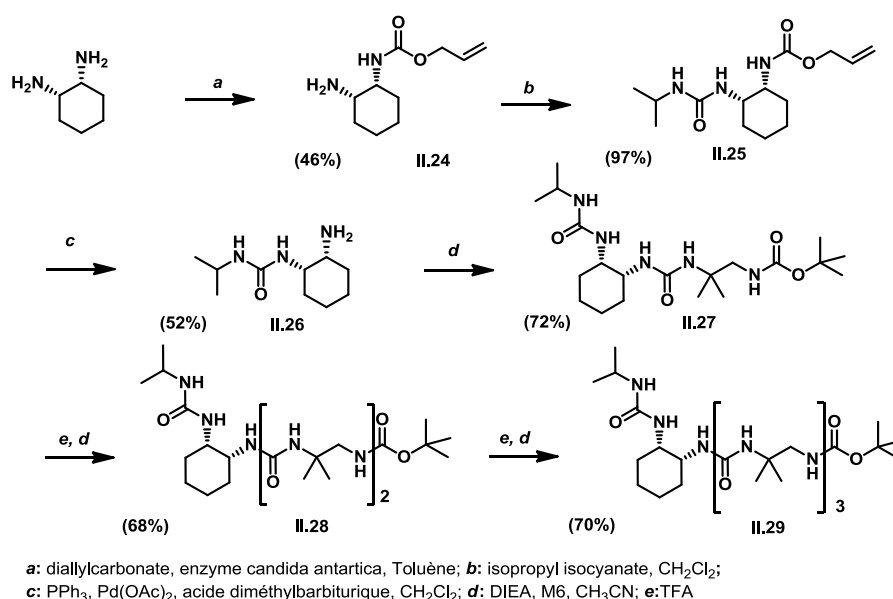
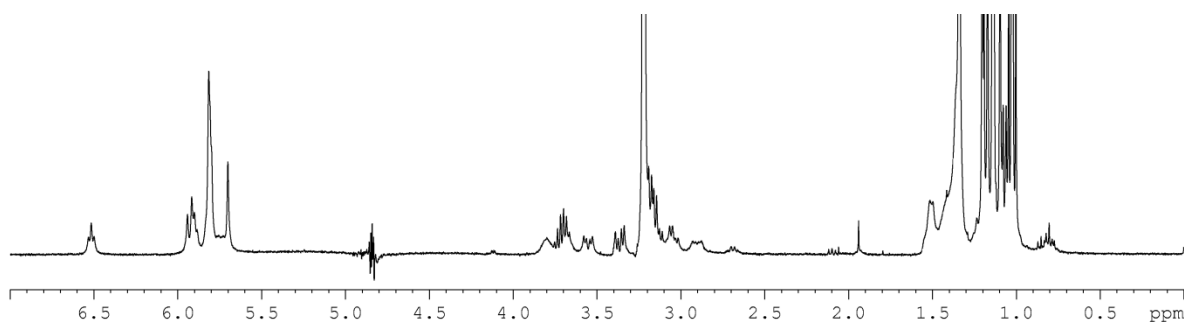


Figure II.39 : Schéma de synthèse du composé II.29

La RMN de ce composé a été réalisée dans le CD₃OH. Les signaux correspondants aux NHs sont en partie superposés mais un écart de déplacement chimique entre les protons CH₂ des chaînes principales est malgré tout observé, ce qui témoigne d'un faible repliement (Figure II.41). Ces valeurs restent cependant très faibles et diminuent en s'éloignant du contrôleur chiral pour atteindre une valeur quasiment nulle. Il semblerait donc que le *cis*-1,2-diaminocyclohexane induise un repliement hélicoïdal modeste des résidus les plus proches.

Figure II.40 : Spectre RMN ¹H du composé II.29 (CD₃OH)

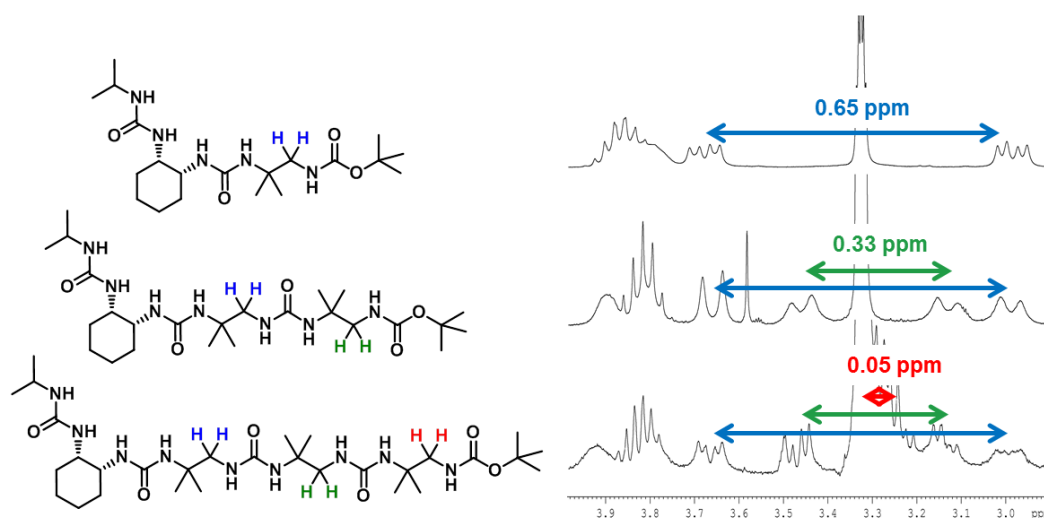


Figure II.41 : région des protons CH_2 de la chaîne principale des molécules II.27, II.28, et II.29

Pour conclure, contrairement à leur homologues α -peptides, les oligourées uniquement composées de résidus *gem*-diméthyle ne seraient pas capables de se replier spontanément sous forme d'hélice. Toutefois des séquences plus longues doivent encore être évaluées puisque ces travaux se sont limités à l'étude d'un tétramère et que les effets de bout de chaîne sont probablement importants. L'introduction d'un contrôleur chiral à une extrémité semble nécessaire pour favoriser le repliement. L'étude préliminaire réalisée avec le contrôleur *cis*-1,2-diaminocyclohexane a montré que cette unité était capable d'induire l'hélicité sur les résidus les plus proches mais pas à longue distance. Ce contrôleur n'est sûrement pas le plus adapté et des études plus approfondies sont sans doute nécessaires pour découvrir un contrôleur chiral plus efficace.

V. Conclusion

En conclusion, cette étude a permis de montrer que l'insertion d'un ou deux résidus achiraux *gem*-diméthyle au centre d'une séquence canonique de type Boc-Val^u-Ala^u-Leu^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe n'empêchait pas la formation des hélices d'oligourées. Les études en solution ont révélé que les résidus *gem*-diméthyle étaient plus compatibles avec la structure hélicoïdale lorsque la disubstitution était effectuée sur le carbone ^αC plutôt que sur le carbone ^βC comme pour les résidus canoniques. L'obtention des structures cristallographiques nous a permis de confirmer ce résultat. En effet chacune des deux molécules adopte une structure en hélice stabilisée par un réseau de liaisons hydrogène à 3 centres. Contrairement au résidu Aib_{inv}^u, les valeurs des angles dièdres des résidus Aib^u sont très différentes de celles généralement observées pour les résidus canoniques et révèlent un réarrangement conformationnel de la structure.^[151]

Pour se rapprocher de séquences majoritairement achirales, nous avons poursuivi ce travail en étudiant une oligourée composée de trois résidus Aib_{inv}^u accolés à un segment trimérique canonique. D'après les analyses réalisées en solution, il semblerait que le trimère canonique soit capable d'induire l'hélicité sur deux des trois résidus *gem*-diméthyle à condition une fois encore que le *gem*-diméthyle soit en position α . Pour confirmer ces informations, il faudrait à présent poursuivre l'allongement de la séquence avec d'autres résidus achiraux et déterminer ainsi si l'induction peut se propager à plus longue distance dans la séquence.

Une étude préliminaire nous a permis de découvrir que les oligourées synthétisées uniquement à partir de résidus *gem*-diméthyle ont un faible pouvoir hélicogène, révélant de ce fait la nécessité d'introduire un inducteur chiral à une extrémité de la séquence. Le résidu *cis*-1,2-diaminocyclohexane testé ici, s'est avéré capable d'induire un transfert de chiralité uniquement sur les résidus proches. Ce contrôleur n'est probablement pas le plus adapté et il serait intéressant d'utiliser les trois résidus canoniques Val^u-Ala^u-Leu^u précédents. La position du contrôleur chiral à l'une ou l'autre des extrémités de l'hélice n'a pas non plus été étudiée et fera elle aussi l'objet d'une étude future.

CHAPITRE III

Résidus cycliques de type pyrrolidine : Influence conformationnelle et applications en synthèse

CHAPITRE III. : Résidus cycliques de type pyrrolidine : Influence conformationnelle et application en synthèse

L'acide α -aminé proline (Pro) joue un rôle fonctionnel et structural essentiel dans les protéines. Souvent trouvé dans des motifs répétitifs responsables de diverses fonctions comme la contraction des muscles, ce petit résidu confère des propriétés conformationnelles uniques aux structures des protéines. La chaîne latérale propyle de ce résidu est liée de manière covalente à l'atome d'azote formant un cycle pyrrolidine à 5 atomes, la proline est de ce fait le seul acide aminé naturel qui soit *N*-substitué. La valeur restreinte de l'angle de torsion autour de la liaison N-C ($\varphi \approx -60^\circ$) limite le nombre de conformations et impose une contrainte sur les structures secondaires canoniques des chaînes polypeptidiques. La liaison amide tertiaire résultant de l'insertion d'un résidu proline dans une séquence a deux conséquences importantes : (1) la perte d'un donneur de liaisons hydrogène dans la chaîne principale et (2) la possibilité de former plus facilement des liaisons amides de conformation *cis* en raison d'une barrière d'isomérisation abaissée (autour de 20 kcal.mol⁻¹)^[152, 153]. Les prolines sont généralement trouvées au début, plutôt qu'au milieu, des hélices, sur les bords des feuillets β ou plus généralement dans les boucles et les régions désordonnées des protéines. En effet la présence d'une proline dans une hélice α induit généralement un coude en raison de l'absence de liaisons hydrogène et de la contrainte stérique imposée par le cycle (Figure III.1).

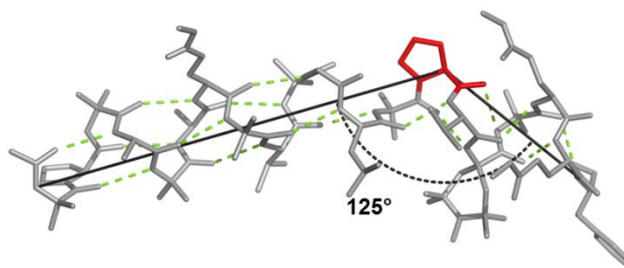


Figure III.1 : Structure cristallographique d'un analogue de l'alaméthicine.^[154]

Ces propriétés conformationnelles se traduisent de manière dynamique et fonctionnelle dans les protéines. Par exemple les prolines sont fréquemment trouvées dans les hélices α transmembranaires où elles induisent des distorsions à l'origine de changements d'états (activé/désactivé) de récepteurs.^[155, 156] Par exemple les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et les canaux ioniques sont tous les deux capables de reconnaître et transmettre des signaux d'un côté à l'autre des membranes. Dans les canaux ioniques le signal est transmis par l'ouverture du canal qui conduit au passage des ions à travers la membrane. Pour le RCPG le signal est une activation de changement conformationnel qui modifie les interactions entre le récepteur et une protéine G intracellulaire.^[156]

De nombreuses études ont montré que cette transmission d'information s'opère grâce à un changement conformationnel provoqué par la liaison d'un ligand ou des changements de voltage des membranes. Plusieurs équipes se sont intéressées au rôle du résidu proline dans ce phénomène. Par exemple Weinstein et coll ont montré que la substitution de la proline (par Gly, Ala, ou Val) dans un segment transmembranaire impliqué dans un mécanisme d'ouverture d'une jonction communicante (gap-junction) dépendant du voltage (connexin32), affectait la fonction du canal.^[157] Mark Samsom et coll. ont, quant à eux, mis en évidence l'importance du motif Pro-Val-Pro (PVP) dans les canaux ioniques (K^+) dépendant du voltage (Figure III.2a).^[158] Un grand nombre d'études de mutagenèse réalisées sur des RCPG ont aussi révélé le rôle essentiel des prolines dans le repliement et la fonction de ses protéines.^[159] Ainsi, bien que des distorsions d'hélice α puissent être observées en l'absence de proline, ces échanges de conformations sont souvent générés par des motifs contenant des résidus proline qui jouent alors un rôle de pivot.

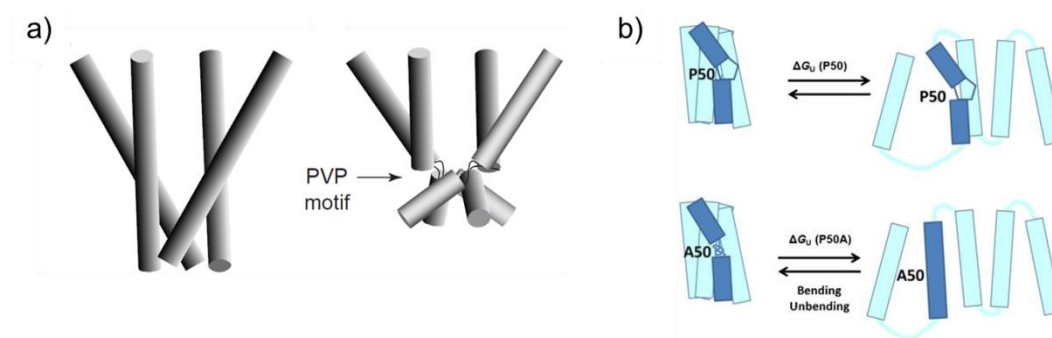


Figure III.2 : a) Modèle basé sur la structure cristallographique de canal K^+ KcsA^[158] b) Schéma illustrant l'effet de la substitution de la proline dans les hélices transmembranaires.^[160]

Si lorsqu'elle est isolée la proline conduit généralement à la formation de coude dans les hélices, les motifs de type polyproline conduisent quant à eux à la formation de structures hélicoïdales particulières (Figure III.3). La proline est alors plus généralement associée à une structure hélicoïdale gauche de type polyproline II (PPII) dans laquelle les liaisons amide adoptent une conformation *trans* (angle dièdre θ de 180°).^[161] Dans des solvants tels que le propanol ou le butanol les liaisons amide tertiaire adoptent plutôt une conformation *cis* (angle 0°) et conduisent alors à la formation d'une hélice droite polyproline I (PPI). Au contraire de l'hélice PPI qui n'est pas vraiment rencontrée dans le contexte biologique, l'hélice de type PPII est fréquemment rencontrée dans les protéines telles que l'hélice triple du collagène ou les trois brins sont repliés selon une conformation PPII.^[162] De plus ce motif joue un rôle important dans les reconnaissances protéine-protéine et protéine-ligand (ex : ligand SOS lié au domaine Src homology 3 (SH3)).^[163, 164]

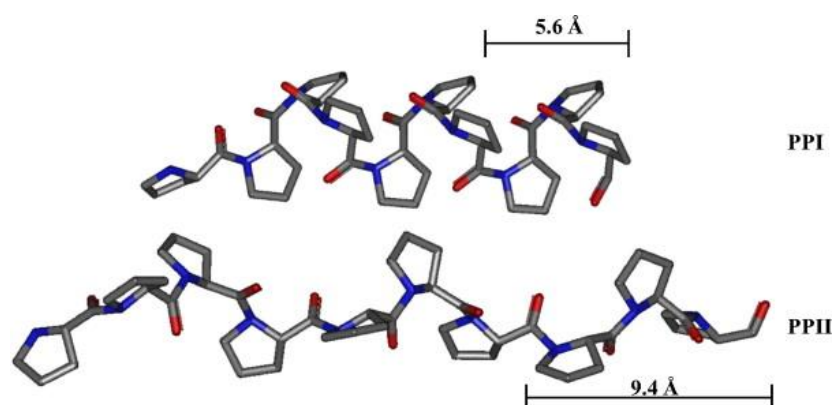


Figure III.3 : Représentation des conformères PPI et PPII de la décaproline.^[165]

En utilisant une combinaison de prolines et d'acides aminoisobutyriques, Toniolo et coll. ont réussi à synthétiser un nouveau type de structure secondaire hélicoïdale appelée « β -bend ribbon ». ^[166] Cette structure peut être considérée comme une sous-catégorie d'hélice 3_{10} car elle adopte presque le même type de repliement avec environ trois résidus par tour et des liaisons hydrogène entre les résidus en $i+4$ et i .



Figure III.4 : Structure cristallographique de la molécule pBrBz-Aib-(L-Pro-Aib)₃-OMe obtenue par Toniolo et coll. ^[166]

L'intérêt pour ces résidus incorporant un cycle pyrrolidine s'est aussi répandu dans le domaine des foldamères. Ainsi S. Gellman et coll. ont montré que des β -peptides comportant uniquement des résidus 2,2-disubstitués d'acide pyrrolidine-4-carboxylique se caractérisant par l'absence de liaisons hydrogène dans le squelette présentaient des préférences conformationnelles particulières. ^[167] Malheureusement, l'absence de données structurales à l'état solide ne leur a pas permis de corroborer ces informations obtenues en solution.

Nous avons, nous aussi, souhaité explorer la compatibilité de ce type de contrainte (cycle pyrrolidine) avec l'hélice canonique des oligourées.

I. Etude de la compatibilité des cycles pyrrolidine avec l'hélice canonique des oligourées

Toujours dans notre optique de mieux comprendre les règles qui déterminent le repliement en hélice de nos oligourées, nous avons voulu étudier l'influence de dérivés cycliques contraints de type pyrrolidine sur la formation de ces hélices.

1. Introduction d'un résidu pyrrolidine

Comme dans le chapitre précédent, nous avons dans un premier temps introduit un résidu pyrrolidine (Pro^u) au centre de notre séquence modèle Boc-Val^u-Ala^u-Leu^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe pour former la molécule **3P3** (Figure III.5). Pour déterminer si ce résidu cyclique provoque un coude au centre de l'hélice nous l'avons comparé à notre oligomère de référence **L6** de même longueur mais ne comportant pas de résidu contraint ainsi qu'à un segment plus court de quatre résidus terminé par une pyrrolidine **P3**. (Nomenclature : Pour ce chapitre le segment de 3 résidus Val^u-Ala^u-Leu^u sera noté **3** et le résidu pyrrolidine sera indiqué par la lettre **P**)

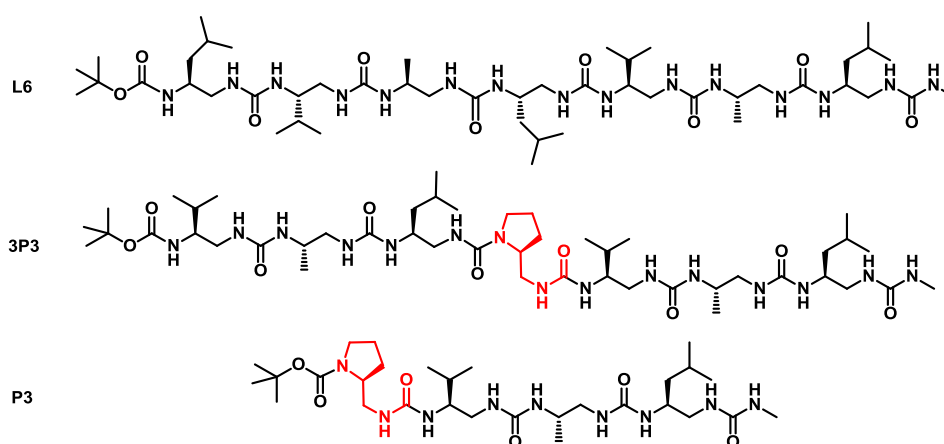


Figure III.5 : Schéma des molécules **L6**, **3P3** et **P3**

a) Synthèse du monomère activé de type pyrrolidine **M7**

Pour obtenir ces séquences, nous avons dû préparer un nouveau monomère à partir de la Boc-L-Pro-OH. Ce précurseur a été synthétisé selon la procédure décrite Figure III.6. Après réduction de l'acide aminé de départ en alcool et activation de celui-ci par un groupement mesylate, l'azoture **III.3** est formé par réaction avec de l'azoture de sodium.^[168] Sa réduction par hydrogénation catalytique, puis l'activation de l'amine résultante avec le disuccinimide carbonate conduisent à la formation du monomère désiré **M7** avec de très bons rendements.

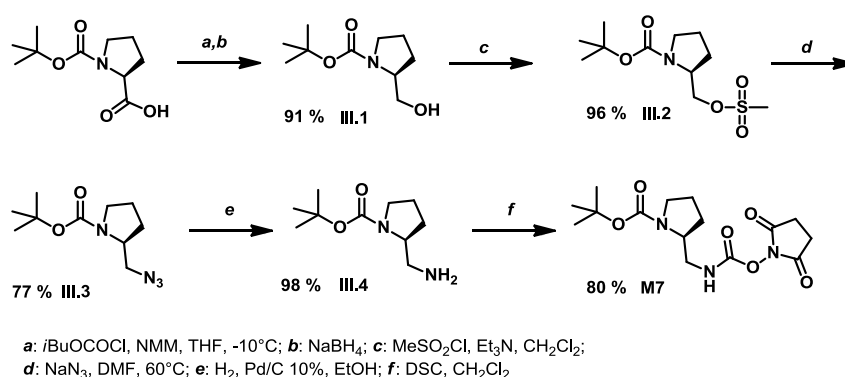


Figure III.6 : Schéma de synthèse du monomère M7

b) Etude conformationnelle des oligomères en solution

La capacité de ces oligourées incorporant une unité pyrrolidine à adopter des structures secondaires a tout d'abord été examinée par dichroïsme circulaire (CD) dans le TFE à 0.2 mM (Figure III.7). La présence d'une bande positive intense à 203 nm, signature typique de la formation d'une hélice, a pu être observée pour les molécules de sept résidus **L6** et **3P3**. Cependant, l'ellipticité molaire par résidu (EMPR) maximale est deux fois plus faible avec une pyrrolidine centrale (**3P3**), ce qui suggère une déstabilisation partielle de la structure hélicoïdale causée par le résidu Pro^u. Néanmoins, le segment plus court de quatre résidus **P3** présente une valeur d'EMPR à 203 nm inférieure à celle de **3P3**. Cette observation montre que l'hélice est capable de se propager sur toute la longueur de l'oligourée **3P3** et pas uniquement sur le premier segment. Il semblerait donc que le résidu pyrrolidine provoque plutôt une déstabilisation partielle de la structure résultant d'un équilibre entre une forme hélicoïdale étendue et une forme partiellement en hélice. Cette dernière pourrait être caractérisée par la formation d'un coude résultant localement de la perte d'une ou plusieurs liaisons hydrogène au niveau du résidu Pro^u.

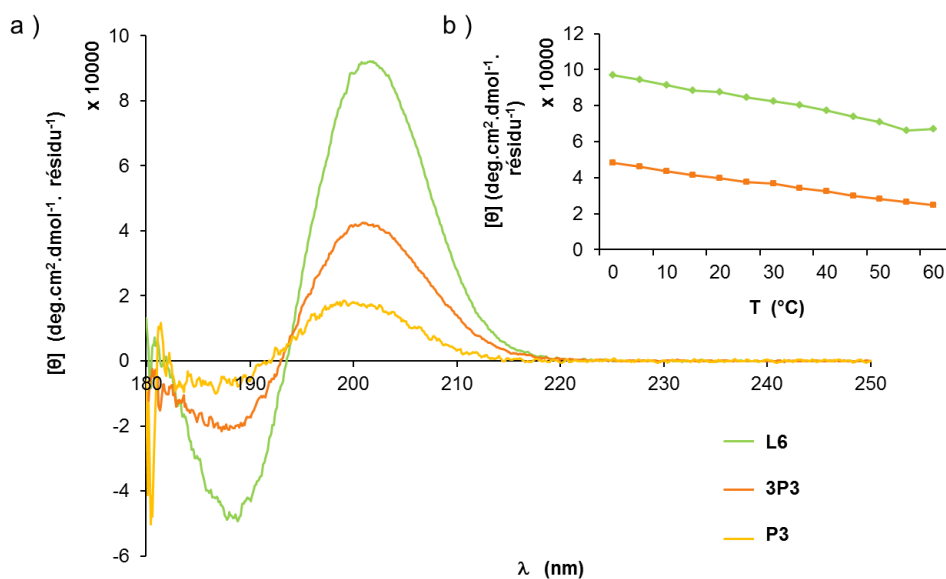


Figure III.7 : Spectre CD à 0.2 mM dans le TFE a) des molécules **L6**, **3P3** et **P3**. b) valeurs du signal CD à 203 nm des molécules **L6** et **3P3** en fonction de la température.

Pour déterminer l'impact de l'insertion d'un résidu Pro^u sur la stabilité thermique des hélices d'oligourées, nous avons réalisé des expériences en température à 203 nm entre 0°C et 60°C pour les deux heptamères d'urées (Figure III.7b). Une diminution linéaire de l'ellipticité avec une pente similaire est observée dans chacun des cas, ce qui suggère que l'insertion d'une pyrrolidine n'accroît pas le dépliement thermique de l'hélice dans des solvants organiques.

Le spectre RMN de l'oligourée **3P3** réalisé dans le CD₃OH présente toutes les caractéristiques de la formation de l'hélice canonique des oligourées (Figure III.8): notamment une dispersion notable des signaux correspondants aux NHs qui permet de tous les attribuer et des constantes de couplage vicinal entre les NHs et les β CHs supérieures à 9 Hz.

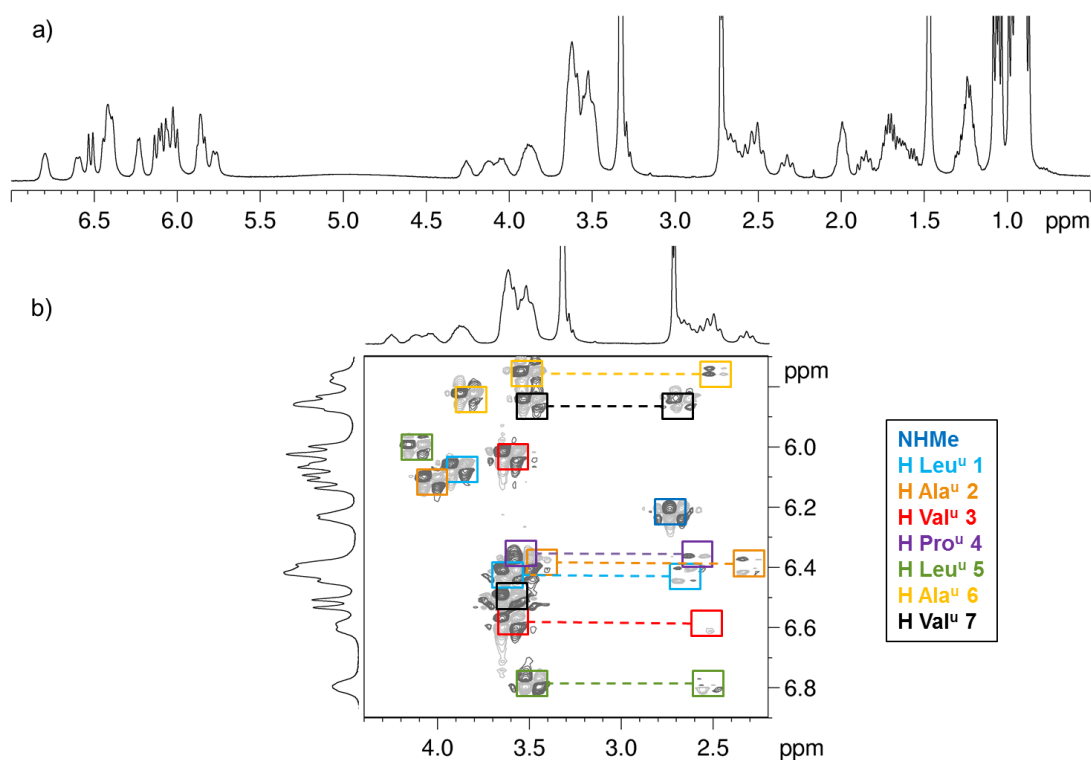


Figure III.8 : a) Spectre RMN ^1H b) zone correspondant aux corrélations $\text{NH}-\beta\text{CH}$ et $\text{NH}-\alpha\text{CH}$ du spectre COSY de la molécule **3P3**. (CD_3OH , 400MHz)

L'attribution de tous les signaux a pu être réalisée grâce aux spectres RMN 2D COSY et TOCSY, permettant ainsi de mesurer les écarts de déplacements chimiques ($\Delta\delta$) entre les protons $^{\alpha}\text{CH}_2$ pour chaque résidu (Figure III.9). Pour la molécule **3P3**, les valeurs sont situées entre 0.83 et 1.23 ppm ce qui est cohérent avec un repliement en hélice 2.5. Cependant les valeurs observées pour les résidus Pro^u en P4 et Leu^u en P5 sont légèrement inférieures aux valeurs obtenues pour la molécule de référence **L6** ce qui suggère que le résidu pyrrolidine ne déstabilise que localement la structure hélicoïdale en accord avec l'interprétation des résultats de dichroïsme circulaire.

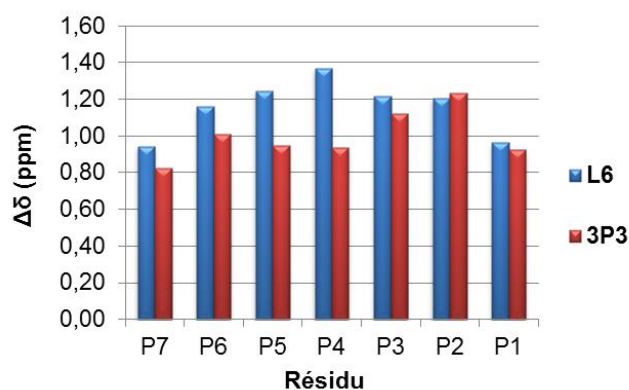


Figure III.9 : Ecarts de déplacements chimiques $\Delta\delta$ (ppm) observés pour les différents résidus de **L6** et **3P3**

Toutes ces analyses en solution suggèrent donc que l'insertion d'un résidu pyrrolidine est compatible avec la formation d'une hélice 2.5 bien qu'il lui confère une certaine flexibilité.

c) Structure à haute résolution

L'oligourée **3P3** comportant un résidu pyrrolidine central a pu être cristallisée dans le DMSO et sa structure cristalline révèle une conformation en hélice bien définie sans coude apparent, qui se superpose parfaitement avec une hélice d'oligourée canonique^[117] (Figure III.10c). Les angles de torsions du résidu Pro^u, ($\varphi, \theta_1, \theta_2$) = (-104.3°, +58.7°, +91.2°) sont très proches des valeurs moyennes généralement reportées pour les hélices canoniques 2.5 (-103.8°, +57.8°, +80.8°). Le réseau de liaisons hydrogène à trois centres est conservé excepté au centre de la molécule. En effet la présence du résidu pyrrolidine impose un réarrangement local qui conduit à un déplacement du carbonyle C=O(7) vers le N^uH(5) pour former une liaison hydrogène de 2.85 Å, l'éloignant ainsi de l'azote du cycle pyrrolidine (distance CO(7)-N(4) = 3.76 Å)

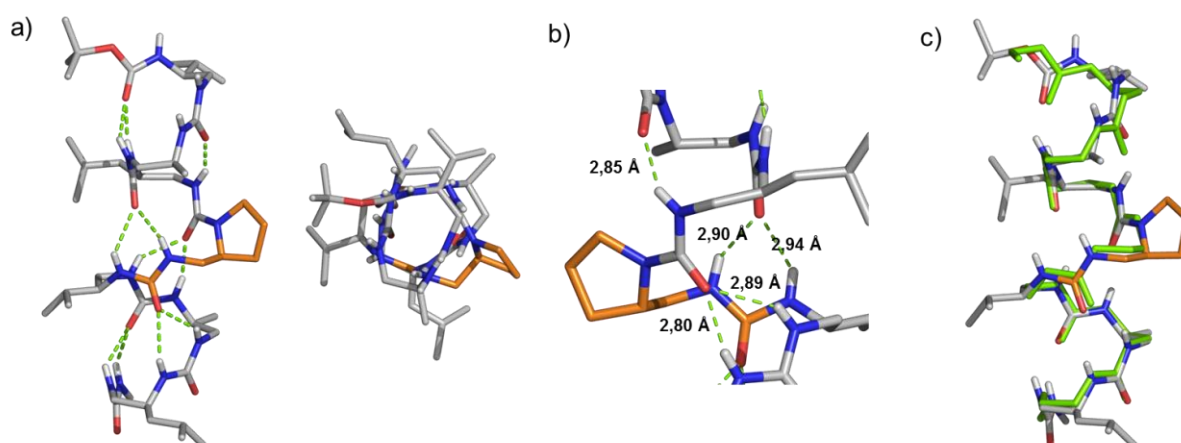


Figure III.10 : Structure cristallographique de la molécule **3P3** a) de côté et de dessus b) zoom de la région centrale. c) superposition avec une hélice 2.5 canonique en vert (RMSD 0.41 Å)

Il est aussi intéressant de noter que parmi les deux conformères possibles C_γ-exo (enveloppe) ou C_γ-endo (demi chaise), le cycle à cinq atomes de la pyrrolidine adopte ici une conformation C_γ-endo (Figure III.11) comme le confirment les mesures des angles dièdres du cycle pyrrolidine (Figure III.12).^[169]

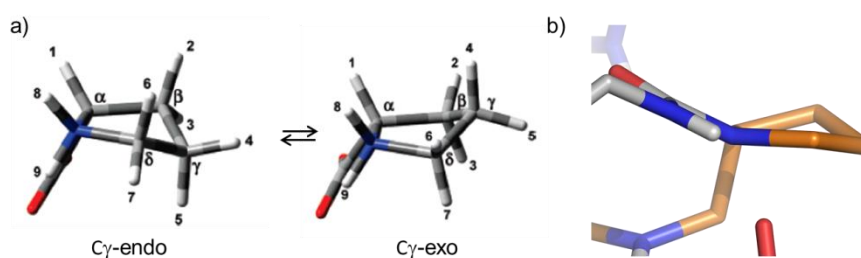


Figure III.11 : a) exemple d'équilibre entre les deux conformères C_{γ} -endo et C_{γ} -exo de la L-proline zwitterionique^[170] ; b) conformation C_{γ} -endo du cycle pyrrolidine en orange dans **3P3**

angles dièdres (°)		3P3 (Pro ^{II} (4))	C_{γ} -endo	C_{γ} -exo
	χ_1	28,36	34	-27
	χ_2	-33,05	-41	39
	χ_3	22,89	34	-37
	χ_4	-5,00	-12	20
	χ_5	-15,51	-14	4

Figure III.12 : valeurs des angles dièdres du résidu pyrrolidine dans **3P3**, comparés aux angles dièdres moyens observés dans les conformations C_{γ} -endo et C_{γ} -exo de la L-proline^[170]

2. Oligourées composées uniquement de résidus pyrrolidine

Nous avons montré qu'un résidu à cycle pyrrolidine inséré dans une séquence canonique est compatible avec la géométrie de l'hélice oligourée mais semble induire une déstabilisation locale de la structure. Afin d'évaluer les propriétés conformationnelles de ce résidu dans des homoligomères inspirés par les séquences de type polyproline, nous avons synthétisé des oligourées **P₆** et **P₉** uniquement composées de résidus de type pyrrolidine (six et neuf résidus) (Figure III.13).

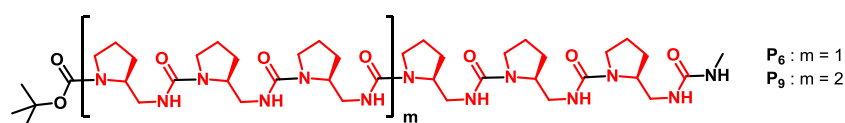


Figure III.13 : Schéma des molécules **P₆** et **P₉**, composées uniquement de résidus pyrrolidine.

Les études en solution suggèrent que ces deux molécules n'adoptent probablement pas de structure secondaire bien définie. Le spectre de dichroïsme circulaire dans le TFE ne présente ni la bande négative à 188 nm ni la bande intense positive à 203 nm qui sont des signes de la formation d'une hélice 2.5. Le signal d'EMPR est faible mais son intensité semble augmenter avec la taille de l'oligomère suggérant que des molécules de longueur de chaîne plus importante (12 ou 15 résidus par exemple) pourraient peut-être présenter un signal plus intense, caractéristique d'une structure secondaire de type hélice 2.5 ou autre.

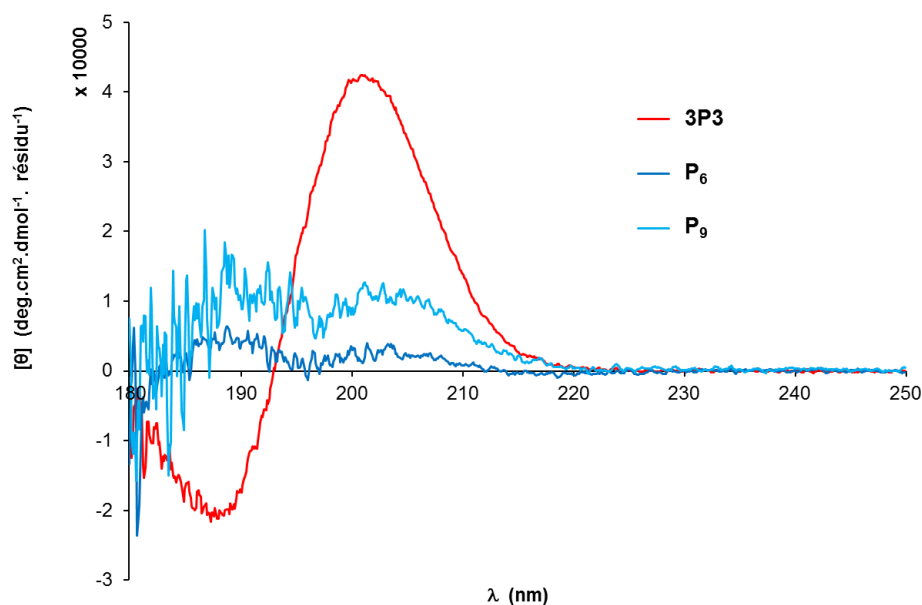


Figure III.14 : Spectres de dichroïsme circulaire des molécules **3P3**, **P₆** et **P₉** dans le TFE à 0.2 mM.

Les spectres de RMN ^1H (Figure III.15) confirment les données structurales observées par CD. Les signaux correspondants aux NHs sont très larges et presque tous superposés vers 7.0 ppm. Les protons $^{\alpha}\text{CH}_2$ de la chaîne principale semblent tous situés dans la même zone entre 3.0 et 3.5 ppm indiquant une faible diastéréotopie. De plus, la solubilité dans le CD_3OH diminue avec l'élongation de la séquence. Ces observations rendent difficile une étude plus approfondie par RMN et sont davantage indicatrices de l'absence d'une structure définie pour **P₆** et **P₉** et de la possible formation d'agrégats résultant de liaisons hydrogène intermoléculaires dans des solvants étudiés.

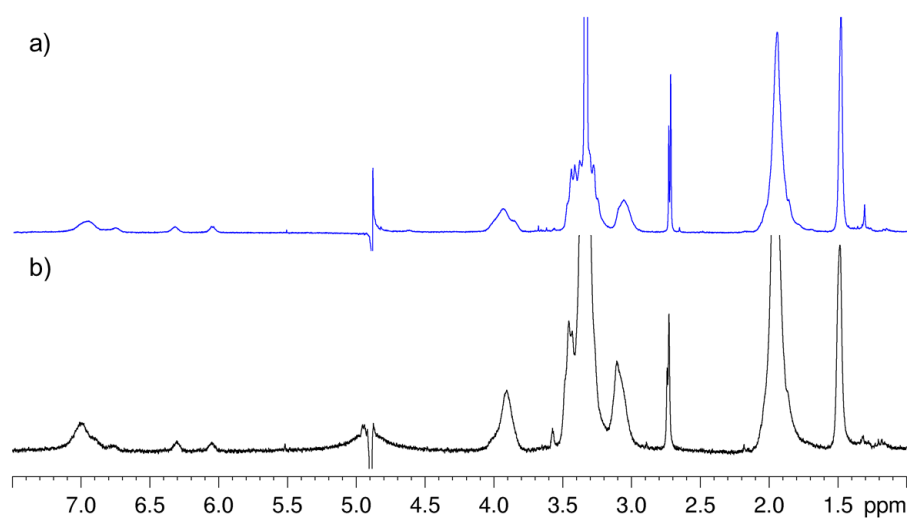


Figure III.15 : Spectres RMN ^1H des molécules a) **P₆** et b) **P₉** dans le CD_3OH .

3. Introduction de plusieurs résidus pyrrolidine consécutifs au milieu d'une séquence canonique

Les études précédentes suggèrent qu'un segment canonique minimal est nécessaire pour induire la formation de l'hélice 2.5 dans des séquences contenant des résidus de type pyrrolidine. Plusieurs nouvelles molécules comportant de 2 à 7 résidus de type pyrrolidine ont donc été synthétisées sur le modèle de la molécule **3P3**. Dans ces oligourées, les résidus Pro^u sont consécutifs, situés au centre de la molécule et encadrés de chaque côté par trois résidus non contraints.

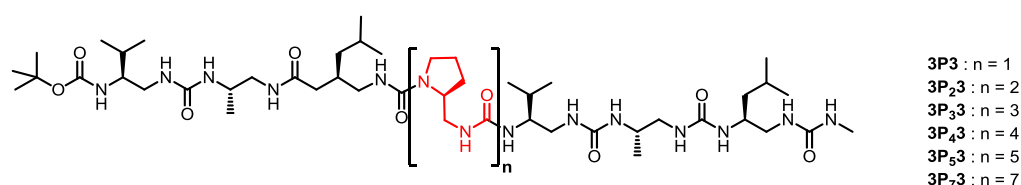


Figure III.16 : Schéma des molécules **3P_n3**

Les spectres CD de toutes ces molécules réalisés dans le TFE (Figure III.17), montrent la signature caractéristique de l'hélice 2.5 mais avec une EMPR plus faible. En effet, une chute brutale de l'intensité du signal est observée en passant de un à deux résidus Pro^u puis l'intensité diminue progressivement avec l'ajout de nouveaux résidus pyrrolidine jusqu'à devenir presque négligeable au-dessus de 5 unités cycliques. Le spectre CD de la molécule **3P₇3** rejoint celui mesuré pour la molécule **P₉**. Les segments canoniques de part et d'autre ne sont donc plus suffisants pour imposer la formation de l'hélice tout le long d'une séquence de pyrrolidine.

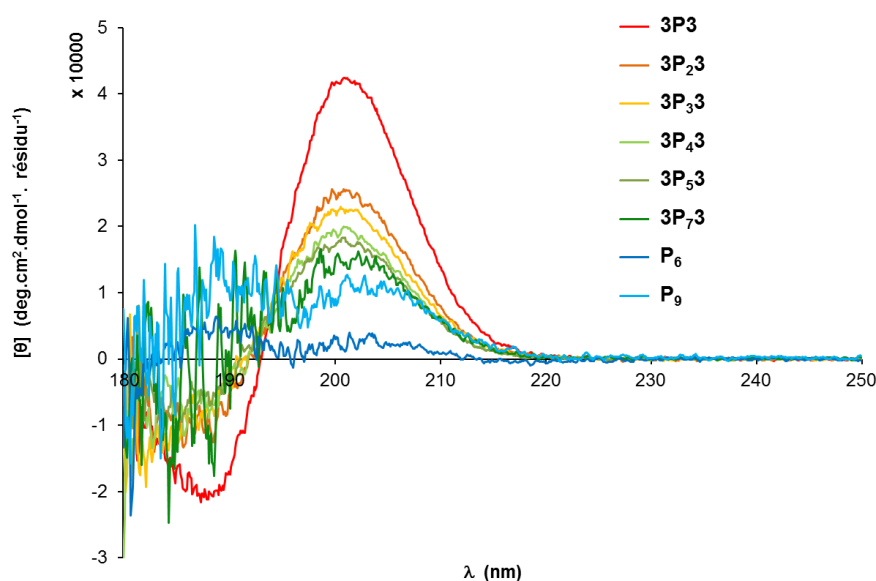


Figure III.17 : Spectres de dichroïsme circulaire dans le TFE à 0.2 mM des molécules **3P_n3**, **P₆** et **P₉**.

Les informations obtenues grâce aux spectres RMN du proton enregistrés dans le CD_3OH sont cohérentes avec ces observations. En effet l'écart de déplacement chimique entre les protons $^{\alpha}\text{CH}_2$ diastéréotopiques ainsi que la dispersion des signaux correspondants aux NHs diminuent avec l'augmentation du nombre de résidus Pro^u. Cette tendance montre que l'introduction d'un nombre croissant de résidus Pro^u réduit la propension de la molécule à adopter une structure hélicoïdale. Il est aussi important de noter une baisse de la solubilité due à l'augmentation du nombre de résidus de type pyrrolidine, de ce fait la molécule **3P₇3** n'a pas pu être étudiée par RMN dans le CD_3OH .

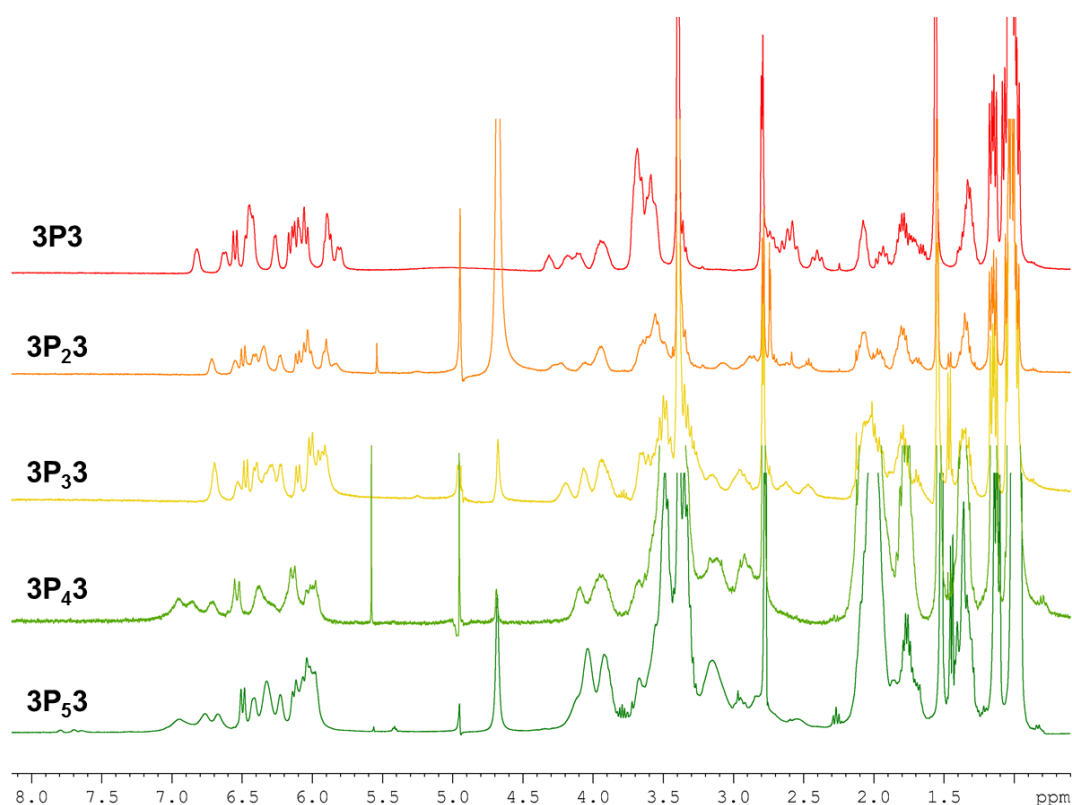


Figure III.18 : Spectres RMN des molécules **3P3** à **3P₅3**

Les écarts de déplacements chimiques entre les protons $^{\alpha}\text{CH}_2$ diastérotopiques ont été mesurés pour les résidus canoniques non contraints de chaque molécule lorsque le spectre RMN le permettait. Pour les molécules **3P₄3** et **3P₅3** de nombreux recouvrements ont empêché l'attribution de tous les signaux et certains $\Delta\delta$ n'ont pas pu être obtenus. Malgré tout, une diminution des écarts est observée avec l'ajout des dérivés de type pyrrolidine, ce qui concorde avec les résultats obtenus précédemment indiquant que les résidus de type pyrrolidine ont un effet déstabilisant sur la structure. Cette déstabilisation semble davantage perceptible sur la fin de la séquence, les deux premiers résidus étant largement épargnés.

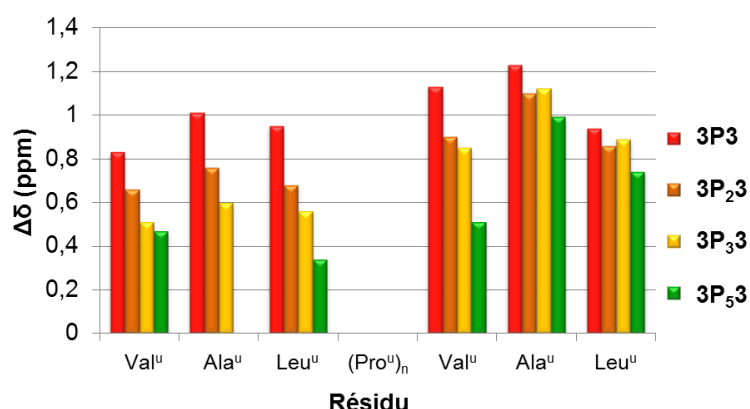


Figure III.19 : écarts de déplacement chimiques entre les protons CH₂ diastéréotopiques de chaque résidu des composés **3P3**, **3P₂3**, **3P₃3** et **3P₅3**.

Cette étude montre qu'il est nécessaire d'introduire des segments canoniques aux extrémités de la molécule pour induire l'hélicité dans des séquences composées de résidus de type pyrrolidine consécutifs. Afin de déterminer lequel des segments *N*-terminal (Boc protégé) ou *C*-terminal (terminaison NHMe) est le plus impliqué dans ce processus nous avons réalisé des molécules comportant trois résidus Pro^u et un segment Val^u-Ala^u-Leu^u d'un côté **P₃3** ou de l'autre **3P₃**.

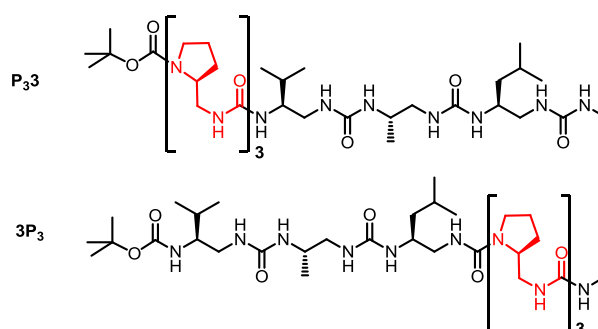


Figure III.20 : Schéma des molécules **P₃3** et **3P₃**

Le spectre CD de la molécule **P₃3** possédant le segment canonique en position *C*-terminale, présente la signature caractéristique d'une hélice 2.5 avec une intensité maximale proche de celle observée pour la molécule **3P₃3** qui possède deux segments canoniques de part et d'autre des trois résidus Pro^u (Figure III.21). Quant à la molécule **3P₃**, son spectre CD n'est pas vraiment représentatif d'une structure hélicoïdale canonique. Ceci suggère que la répétition du motif Pro^u à l'extrémité *N*-terminale d'une séquence canonique peut servir d'amorceur à la formation d'une hélice canonique par l'engagement de ses groupements carbonyles dans la formation de liaisons hydrogène à trois centres. A l'inverse, la répétition du résidu Pro^u à l'autre extrémité ne permet pas la création de liaisons hydrogène optimales (à trois centres) permettant de stabiliser l'hélice.

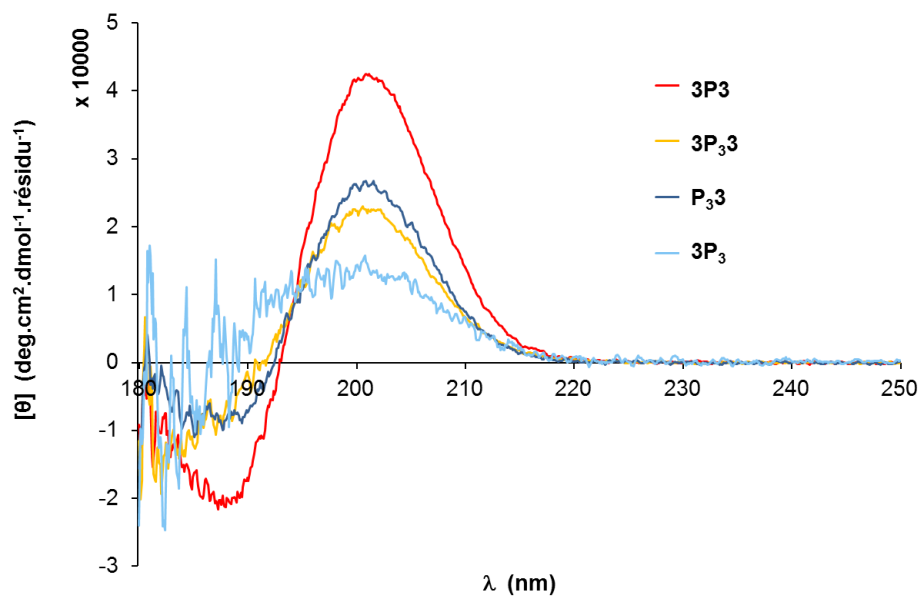


Figure III.21 : Spectres CD des molécules P_33 et $3P_3$ comparés aux molécules $3P_33$ et $3P_3$. (TFE, 0.2 mM)

Les deux molécules $3P_23$ et $3P_3P$ ont pu être cristallisées (Figure III.22). Leurs structures cristallines révèlent dans les deux cas la formation d'une hélice 2.5 parfaitement rectiligne, sans coude apparent. Les valeurs des angles dièdres (φ , θ_1 , θ_2) mesurées pour tous les résidus pyrrolidine sont proches des valeurs moyennes généralement observées dans les hélices canoniques d'oligourées (Figure III.23).

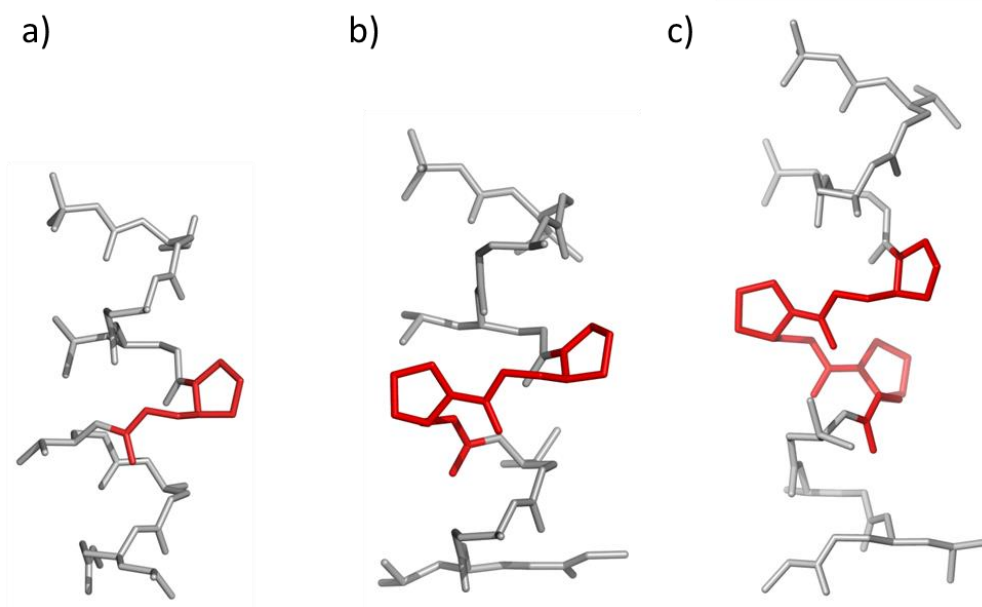


Figure III.22 : Structures cristallographiques des molécules $3P_3$, $3P_23$ et $3P_33$

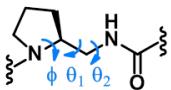
	Comp	φ	θ_1	θ_2	
	3P3	P4	-104,3°	58,7°	91,2°
	3P₂3	P4	-97,1°	45,9°	86,3°
		P5	-100,3°	66,6°	74,1°
	3P₃3	P4	-95,1°	50,3°	93,2°
		P5	-98,6°	54,2°	73,3°
		P6	-90,2°	68,9°	87,9°

Figure III.23 : Valeurs des angles dièdres des résidus pyrrolidine dans les molécules **3P3**, **3P₂3** et **3P₃3**.

II. Nouvelle méthode de synthèse par condensation de segments pour l'élaboration de longues hélices d'oligourées.

Dans le domaine des foldamères, un des défis actuels est de concevoir et synthétiser de très longues structures repliées semblables à celles des biopolymères naturels. Malgré les difficultés rencontrées, des progrès importants ont été réalisés au cours des dernières années dans cette direction et certains groupes sont parvenus à synthétiser de longs segments « foldamériques » capables dans certains cas de mimer les hélices alpha et d'inhiber des interactions protéine-protéine. Par exemple, comme on a pu le voir dans le chapitre I, S. Gellman et coll ont synthétisé un analogue α/β -peptide de 38 résidus d'une séquence de la protéine gp41 du VIH (Figure III.24). Ils ont pu montrer que ce peptide bloquait effectivement la fusion du virus dans les cellules par un mécanisme comparable à celui des α -peptides et qu'il était aussi plus résistant à la dégradation protéolytique.^[66]

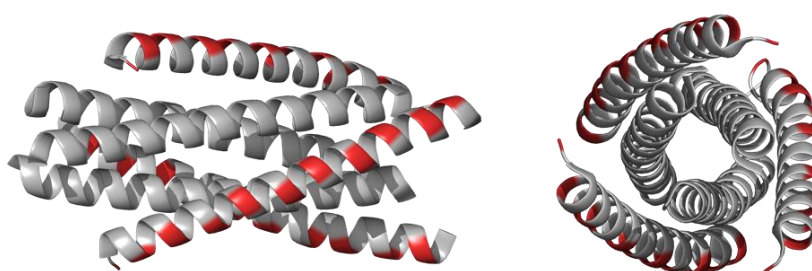


Figure III.24 : Structure cristallographique du faisceau de 6 hélices mime du peptide α dérivé de gp41.^[66] (les acides aminés β étant représentés en rouge)

Pour réaliser des foldamères de haut poids moléculaire il est cependant nécessaire de développer des méthodes de synthèse particulièrement efficaces. Des procédures impliquant la condensation convergente de segments activés ont été développées et optimisées dans le cas des oligoamides aliphatiques et aromatiques. Par exemple D. Seebach et coll ont mis au point une stratégie de synthèse

sur support solide par couplage de di- ou tripeptides préalablement préparés en solution. Cette méthode leur a ainsi permis d'améliorer la pureté de leurs peptides et de faciliter la purification.^[171]

De la même manière I. Huc et coll. ont mis en œuvre une stratégie de synthèse convergente qui leur permet de doubler la taille de leurs oligomères à chaque étape et donc d'accéder rapidement à de longues molécules de haut poids moléculaire.^[13, 172] Ils ont ainsi réussi à synthétiser de longs oligoamides aromatiques et notamment une séquence de 40 résidus, grâce à l'utilisation de résidus acide 6-aminométhyl-2-pyridinecarboxylique facilitant le couplage entre les segments (Figure III.25). Ils ont montré par RMN que cet oligomère adoptait une structure en hélice comportant 16 tours d'une longueur remarquable de 5.6 nm.^[173]

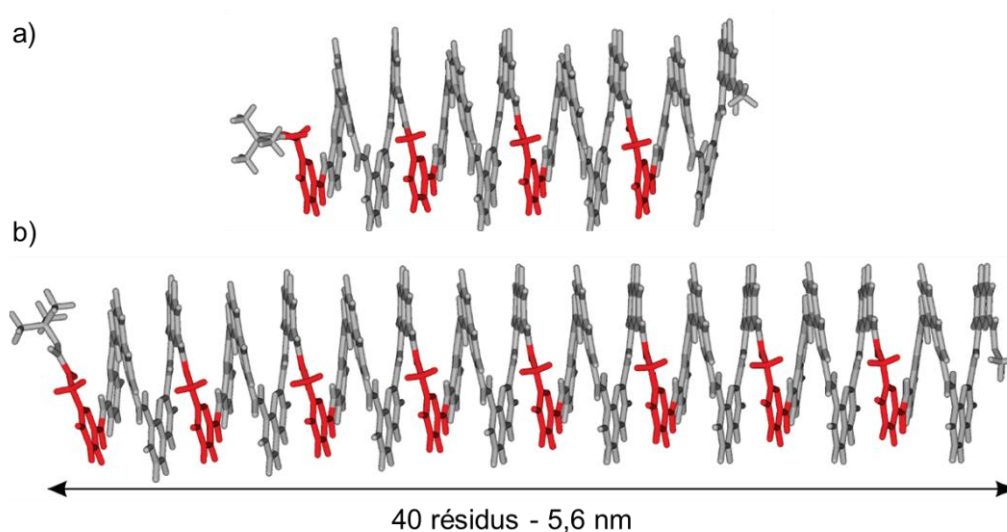


Figure III.25 : a) structure cristallographique d'un oligomère aromatique de 20 résidus ; b) structure d'énergie minimale d'un oligomère aromatique de 40 résidus.^[173]

1. Principe de la condensation de segments pour la synthèse d'oligoamides d'urées

Les techniques de synthèse des oligoamides développées dans l'équipe jusqu'à présent, que ce soit en solution ou sur support solide, ne permettent que difficilement d'accéder à des oligomères de plus d'une dizaine de résidus. Suivant le principe détaillé précédemment, nous avons souhaité développer une nouvelle stratégie de synthèse par condensation de segments activés. Nous souhaitons tout d'abord activer un premier segment contenant une fonction amine libre avec du carbonate de dissuccinimidyle puis le coupler directement sur l'amine libre d'un second segment selon le schéma de la Figure III.26.

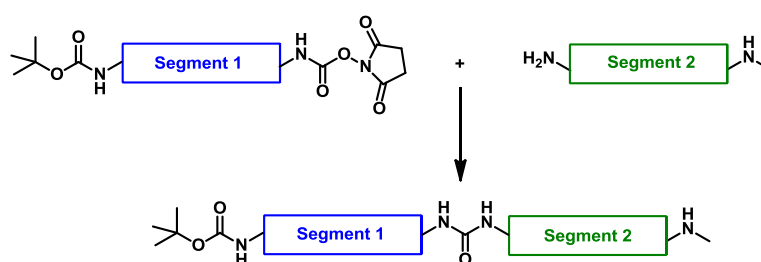


Figure III.26 : Schéma de la stratégie de synthèse par condensation de segments

Cependant dans les conditions classiques en présence d'une base telle que la DIEA, le NH le plus proche du carbamate est suffisamment nucléophile pour attaquer le carbamate activé et conduire à la formation d'un hétérocycle biuret comme exemplifié dans la Figure III.27. Cette réaction secondaire rend difficile l'obtention du carbamate activé (par exemple **III.5**) et diminue fortement le rendement de couplage, seul le produit biuret pouvant être isolé (par exemple **III.8** avec un rendement de 27%).^[174]

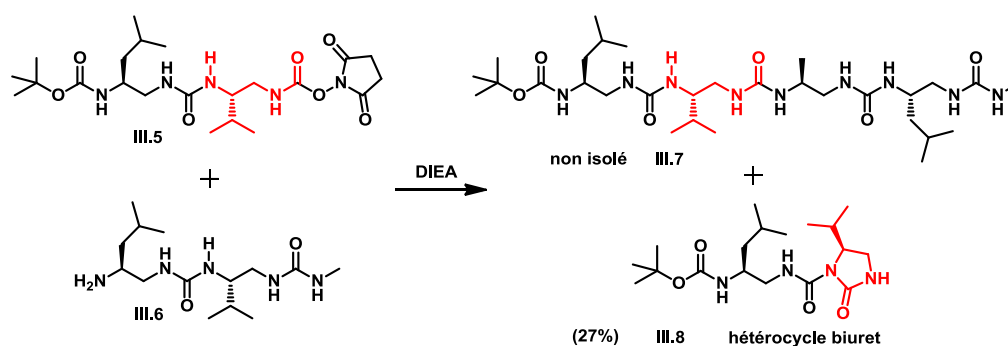


Figure III.27 : Formation du produit secondaire biuret **III.8**

Pour pouvoir réaliser ce type de couplage il est donc nécessaire de bloquer le dernier azote de la fonction urée. Cette réaction secondaire avait déjà été rencontrée par V. Semetey au cours de la synthèse de macrocycles d'oligourées et il avait alors choisi de protéger le NH urée réactif par un groupement protecteur benzyle pouvant être éliminé par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon.^[175] Cette méthode était envisageable dans notre cas, mais les étapes de synthèses supplémentaires auraient rendu notre stratégie trop longue et compliquée d'autant que l'étape d'hydrogénation du groupement benzyle est délicate.

Finalement nous avons envisagé une deuxième approche consistant à introduire un résidu *N*-alkylé fixe à la position terminale.^[174] Au vu des résultats que nous avons obtenus précédemment, le résidu pyrrolidine nous a semblé parfaitement adapté.

2. Synthèse

Nous avons donc synthétisé deux segments composés de trois résidus canoniques, le premier segment **3P_{OSu}** comportant en plus un résidu pyrrolidine terminal activé par un carbonate de succinimide. Et le deuxième segment **3** déjà présenté dans le chapitre II.

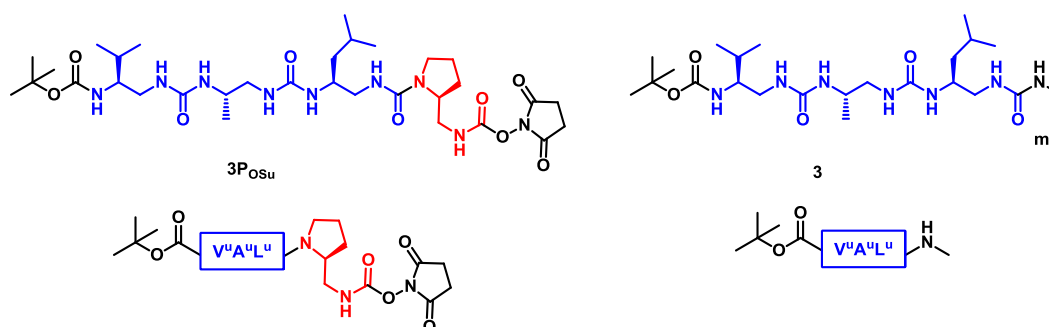


Figure III.28 : Schéma des segments cibles **3P_{OSu}** et **3**

a) Synthèse du segment activé

Le segment activé **3P_{OSu}** a été synthétisé à partir du précurseur azoture **III.3** décrit précédemment. Le groupement Boc est à chaque fois déprotégé dans le TFA pour permettre le couplage du monomère désiré **M1**, **M2** ou **M3**. Lorsque tous les résidus sont couplés, l'azoture est alors réduit par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon pour former l'amine correspondante qui est activée avec le carbonate de dissuccinimide. Le rendement global du segment **3P_{OSu}** à partir de **III.3** est de 23 %

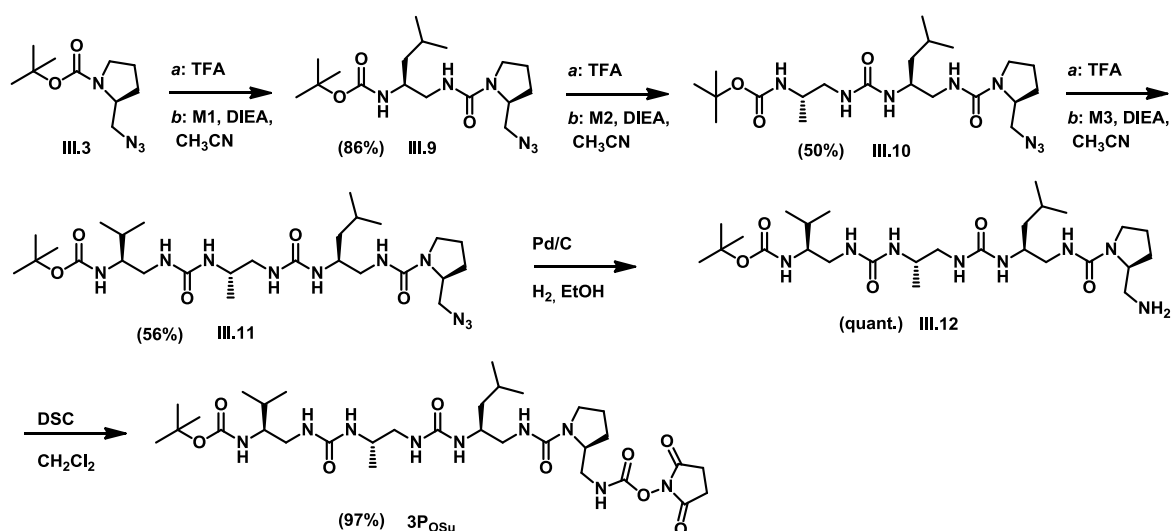


Figure III.29 : Schéma de synthèse du segment activé **3P_{OSu}**

b) *Couplages*

Pour former directement une oligourée plus longue de 7 résidus il suffit alors de déprotéger le segment trimérique **3** dans le TFA, puis de coupler le deuxième segment activé 3P_{OSu} en présence de DIEA pour former la molécule $3\text{P}3$ étudiée précédemment avec un bon rendement de couplage de 65%. Des séquences plus longues de 11 ($(3\text{P})_23$) et 15 résidus ($(3\text{P})_33$) sont ensuite obtenues facilement par couplage itératif du segment activé 3P_{OSu} avec des rendements respectifs de 70% et 75%.

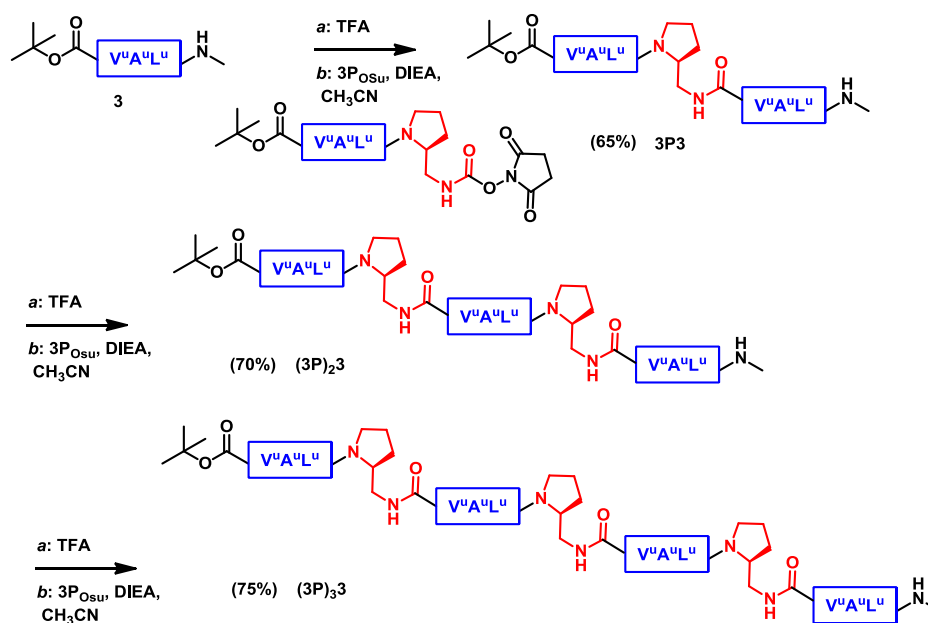


Figure III.30 : Schéma de synthèse par couplage itératif des molécules $3\text{P}3$, $(3\text{P})_23$ et $(3\text{P})_33$.

Cette technique de condensation de segments permet donc de réaliser de longues oligourées en quelques étapes par couplage successif de segments activés avec de très bons rendements. Les molécules 3P_n3 et P_n ont d'ailleurs toutes été synthétisées selon cette technique (Figure III.31 et Figure III.32).

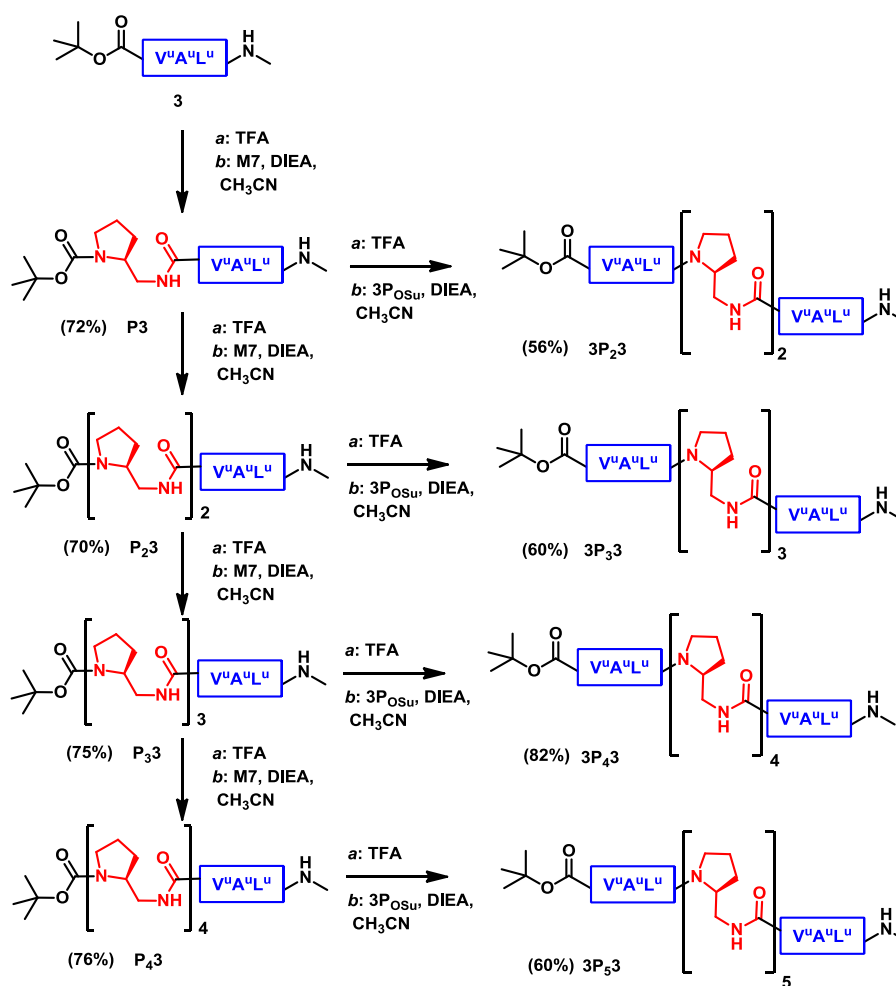


Figure III.31 : Schéma de synthèse des molécules $3P_n3$ ($n = 1$ à 5)

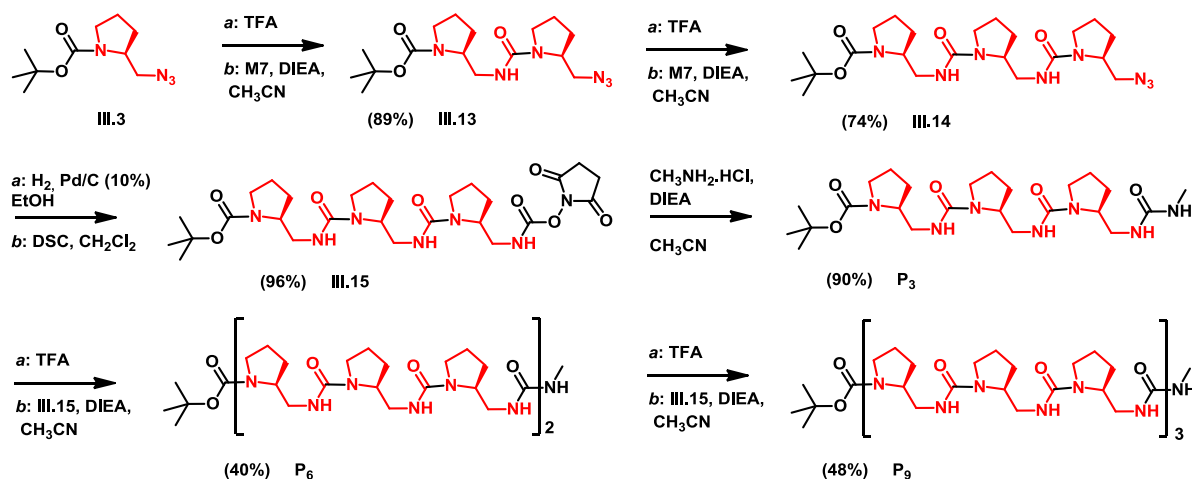


Figure III.32 : Schéma de synthèse des molécules **P₆** et **P₉**.

Lucile Fischer a ensuite effectué le même travail avec des segments plus longs comportant 6 résidus canoniques (**6P_{OSu}** et **6**)

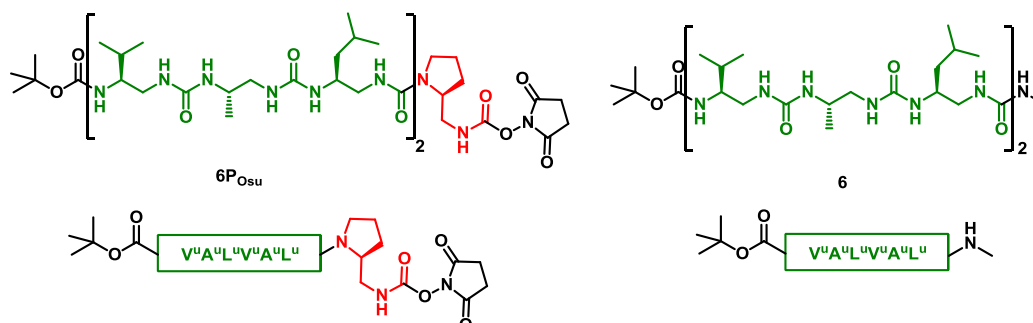


Figure III.33 : Schéma des segments **6P_{OSu}** et **6**

Les couplages de ces segments ont conduit à la formation des molécules **3P6** de 10 résidus, **6P6** de 13 résidus et **(6P)₂6** de 20 résidus avec de bons et très bons rendements de 64% à 93%.

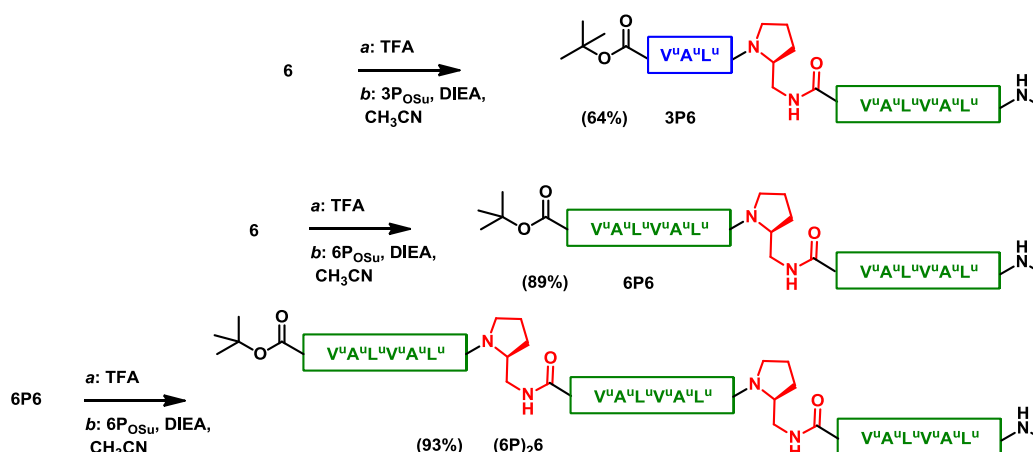


Figure III.34 : Schéma de synthèse des molécules **3P6**, **6P6**, **(6P)₂6**

3. Etudes des molécules en solution

a) Par RMN

La stratégie de synthèse étant bien maîtrisée, il s'agissait ensuite de déterminer l'aptitude de ces molécules comportant des résidus de type pyrrolidine à adopter des structures secondaires hélicoïdales. La plupart des oligourées ont été caractérisées par RMN ¹H dans le CD₃OH (Figure III.35), excepté les plus longues molécules de 13 et 20 résidus synthétisées à partir des plus longs segments pour des raisons de plus faible solubilité dans le méthanol. Les spectres de ces oligourées possèdent tous les caractéristiques de la formation des hélices 2.5 et sont très proches du spectre observé précédemment pour la molécule **3P3**. Les signaux des NHs sont dispersés entre 5.7 et 7.5 ppm

et les valeurs des constantes de couplages entre les protons NH et β CH mesurables sont situées entre 9.8 et 10.2 Hz. Les écarts de déplacements chimiques entre les protons diastéréotopiques semblent similaires dans chacun des cas mais n'ont pas pu être mesurés pour chacun des résidus en raison d'une superposition des signaux.

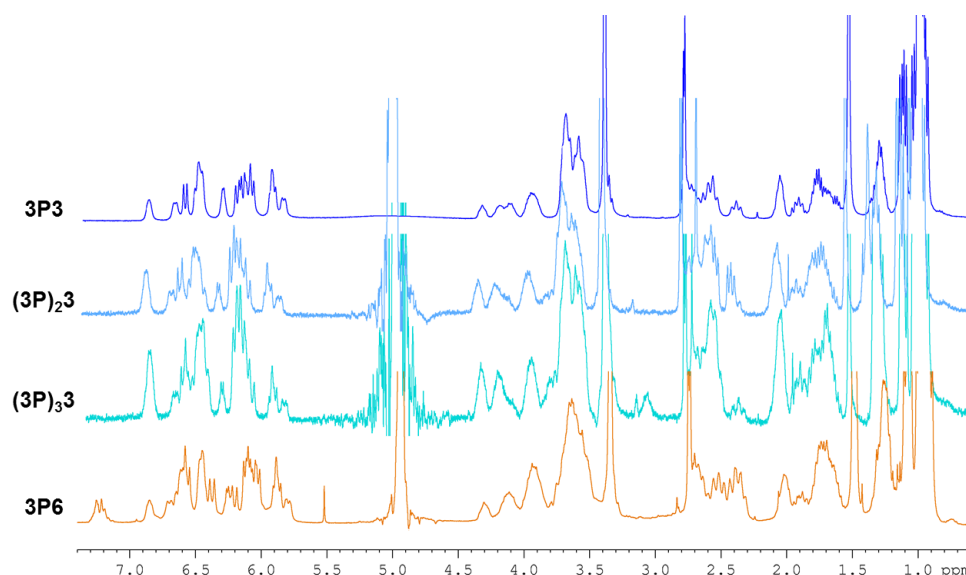


Figure III.35 : Spectres RMN ^1H (CD_3OH) des différentes oligourées de tailles croissantes présentant de multiples résidus pyrrolidine non contigus

b) *Par dichroïsme circulaire*

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été mesurés pour toutes les molécules et chacune d'entre elles présente le signal caractéristique de la formation de l'hélice 2.5 quel que soit le nombre de résidus pyrrolidine introduits et la longueur des segments canoniques intermédiaires. Il semblerait cependant que la taille du fragment canonique joue un rôle dans la stabilité de l'hélice. En effet plus le segment situé de part et d'autre du résidu Pro^u est long, plus la structure est stable (Figure III.36a). Ces résultats s'inscrivent donc dans la continuité de l'étude précédente qui avait mis en évidence l'importance des résidus canoniques non contraints pour induire et stabiliser l'hélice.

L'étude détaillée de la série de molécules réalisée à partir des segments plus courts, (en bleu sur la Figure III.36b) montre que l'élongation de la séquence conduit à une augmentation du signal même en présence de 3 résidus pyrrolidine. Cependant la tendance s'inverse pour la série de molécules synthétisée à partir des segments plus longs (en vert sur la Figure III.36b). Dans ce cas-là, le maximum d'EMPR diminue avec l'ajout d'un second segment. Deux phénomènes semblent donc être en compétition, l'élongation de la séquence tend à stabiliser l'hélice alors que l'introduction de résidus pyrrolidine supplémentaires tend aussi à la déstabiliser.

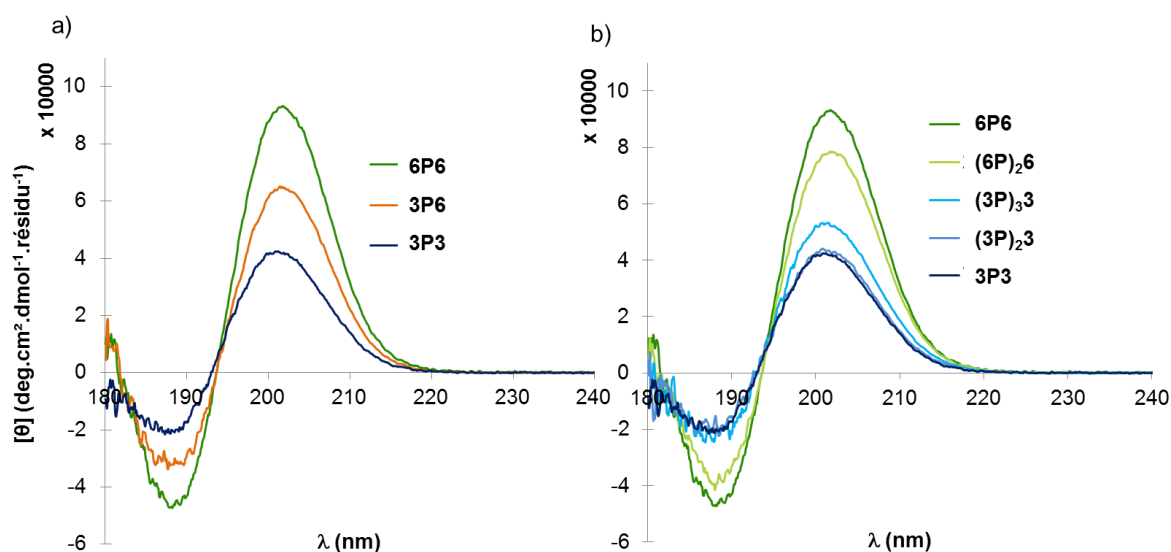


Figure III.36 : Spectres CD réalisés dans le TFE à 0.2 mM

4. Etude dans l'état cristallin par diffraction des rayons X

Des données complémentaires sur la structure de ces molécules ont pu être obtenues par diffraction des rayons X. Quatre oligourées supplémentaires, comportant de 1 à 2 résidus pyrrolidine et composées de segments plus ou moins longs ont pu être cristallisées (**3P6**, **(3P)₂3**, **6P6** et **(6P)₂6**, Figure III.37). Il est intéressant de noter que toutes ces molécules adoptent des structures hélicoïdales régulières sans aucun coude, quel que soit le nombre de résidus pyrrolidine et la longueur des segments. Chacune de ces hélices présente une répétition presque parfaite de 2.5 résidus par tour et des paramètres semblables à ceux observés généralement pour les hélices d'oligourées avec un pas de 5.1 Å et une élévation par résidu de 2.1 Å. Les longueurs de ces hélices varient de 15 Å pour la molécule **3P3** jusqu'à presque 40 Å pour la molécule **(6P)₂6** ce qui correspond à la plus longue hélice d'oligourée cristallisée par l'équipe à ce jour. Toutes les molécules comportant des segments de 6 résidus adoptent un groupe d'espace $P2_12_12_1$ (orthorhombique), alors que les molécules comportant uniquement des segments plus courts de 3 résidus adoptent un groupe d'espace P1 (triclinique).

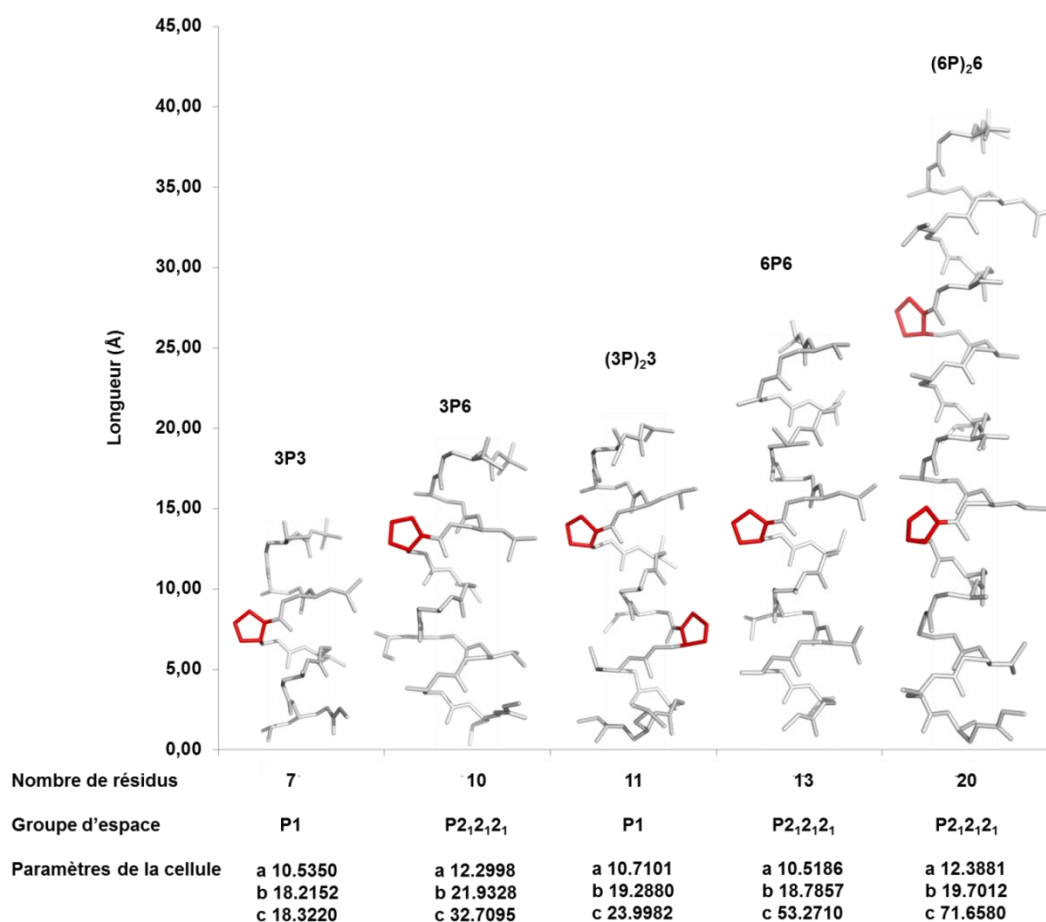


Figure III.37 : Structures cristallographiques des molécules **3P3**, **3P6**, **(3P)₂3**, **6P6**, **(6P)₂6**.^[174]

Comme cela avait été remarqué pour la molécule **3P3**, les valeurs moyennes des angles dièdres des résidus canoniques et des résidus pyrrolidine sont toutes similaires et proches des valeurs généralement observées pour des hélices 2.5 (Figure III.38). Il en est de même pour les longueurs moyennes des liaisons hydrogène (d(O-H)) qui sont situées entre 2.1 et 2.5 Å et ce quel que soit le type de résidu contraint ou non.

Résidus	3P3		3P6		(3P)₂3		6P6		(6P)₂6		
	Can.	Pyr.	Can.	Pyr.	Can.	Pyr.	Can.	Pyr.	Can.	Pyr.	
Angles dièdres moyens (°)	φ	-101,0	-110,8	-100,5	-96,4	-108,5	-103,2	-101,4	-101,6	-96,0	-94,5
	θ_1	57,4	59,8	52,3	52,7	56,9	60,2	54,5	57,3	54,8	57,7
	θ_2	77,6	94,4	82,1	87,1	74,8	77,5	80,1	87,3	80,4	84,9
Distances moyennes des liaisons H (Å)	C=O ... N'H _{i-2}	2,3	2,1	2,3	2,2	2,4	2,3	2,3	2,3	2,2	2,5
	C=O ... NH _{i-3}	2,1	-	2,2	-	2,2	-	2,2	-	2,2	-
Longueur de la molécule (Å)	14,3		19,5		20,9		25,8		39,6		

Figure III.38 : Tableau récapitulatif des valeurs moyennes des angles dièdres, des longueurs des liaisons hydrogène et de la longueur des hélices dans les structures cristallographiques des molécules préparées par jonction de segments

III. Conclusion

Nous avons montré dans cette partie que le résidu de type pyrrolidine analogue urée de la proline, Pro^u est compatible avec la formation des hélices 2.5 d'oligourées même s'il semble les déstabiliser légèrement. La résolution de la structure cristallographique de **3P3** révèle la formation d'une hélice rectiligne qui se superpose parfaitement au squelette des hélices d'oligourées canoniques. L'introduction de plusieurs résidus consécutifs de ce type provoque une déstabilisation supplémentaire qui est en partie compensée par les résidus canoniques situés de part et d'autre permettant d'imposer une structuration en hélice. Cependant nous avons pu voir que les séquences composées exclusivement de résidus Pro^u (6- et 9-mers) ne sont, quant à elles, pas capables de former de structure secondaire bien définie et qu'il est donc nécessaire d'introduire un segment canonique à l'extrémité C-terminale pour promouvoir la formation d'une hélice canonique.

Ainsi le résidu pyrrolidine, possédant une propension à l'hélicité légèrement plus faible que les autres résidus acycliques, confère une plus grande flexibilité à la structure. Cette étude indique qu'il pourrait probablement jouer un rôle de pivot similaire à celui observé dans les hélices- α (transmembranaires) incorporant un résidu proline au milieu de la séquence.

Finalement grâce au résidu de type pyrrolidine nous avons pu développer une nouvelle stratégie de synthèse par condensation de segments, simple et efficace.^[174] Cette technique nous a permis de synthétiser une hélice relativement longue de presque 40 Å composée de 20 résidus. Nous avons aussi pu voir que les hélices d'oligourées ne sont pas déstabilisées par la présence de multiples résidus pyrrolidine non adjacents. Grâce à cette nouvelle stratégie nous avons essayé de diversifier les chaînes latérales et concevoir des séquences capables de mimer des molécules biologiques. Nous nous sommes notamment intéressés à la synthèse de séquences particulières, conçues pour former des assemblages quaternaires en milieu aqueux.

CHAPITRE IV

**Architectures plus complexes : vers l'assemblage
quaternaire d'hélices en milieu aqueux**

CHAPITRE IV. : Architectures plus complexes : vers l'assemblage quaternaire d'hélices en milieu aqueux

Les fonctions biologiques des protéines dérivent dans une large mesure de leurs structures tertiaires et quaternaires bien définies. Les faisceaux d'hélices sont un des motifs de repliement les plus souvent rencontrés dans les protéines. Ils ont en effet été identifiés dans les protéines de structures (comme la kératine^[176] et le collagène^[162]) mais ils jouent aussi un rôle très important dans différents mécanismes de régulation intracellulaires comme par exemple la fusion de membranes (ex : protéine du VIH^[177]) et les processus de transcription de l'ADN (ex : opéron lactose chez *Escherichia coli*^[178]). Cette architecture qui se manifeste sous des formes très diverses résulte de l'association de plusieurs hélices enroulées les unes autour des autres de manière parallèle ou anti parallèle sous forme d'une « super » hélice. La stœchiométrie des assemblages est très variable (Figure IV.1). Les faisceaux dimériques sont fréquemment impliqués dans la régulation des gènes comme par exemple les protéines à domaine MADS (hélices anti parallèles)^[179] ou encore l'activateur de transcription GCN4. Les faisceaux trimériques peuvent être impliqués dans des procédés de coagulation du sang^[180] et de signalisation cellulaire^[181] ou encore observés sur le pourtour des virus comme le VIH^[177] où ils permettent la propagation de l'infection à travers la fusion avec la cellule hôte. Plus le degré d'oligomérisation augmente plus le nombre de structures à résolution atomique diminue mais certaines architectures comportant 5 ou 6 monomères ont pu être mises en évidence. Les faisceaux pentamériques fonctionnent souvent comme des pores pour le transport de métaux ou de petites molécules organiques.^[182] Une des seules protéines naturelles contenant un faisceau hexamérique est une enzyme Cobalamine adenosyltransférase.^[183] Afin de faciliter la prédiction et la conception de structures de ce type, Woolfson et coll. ont répertorié les différents faisceaux d'hélices peptidiques et les ont classés de manière systématique sous forme de « table périodique » (http://coiledcoils.chm.bris.ac.uk/ccplus/search/periodic_table).^[51]

L'augmentation du nombre de structures résolues par diffraction des rayons X ou par RMN a permis de mieux comprendre ces repliements et de déterminer certains principes récurrents de la formation et de la fonction des faisceaux d'hélices. Cependant les séquences primaires des faisceaux d'hélices naturelles présentent des discontinuités qui rendent les études et les interprétations difficiles. Dans ce domaine, la stratégie *de novo* qui consiste à remodeler une séquence naturelle choisie en y introduisant des mutations ponctuelles pour en moduler les propriétés structurales et comprendre plus finement les règles régissant la formation des assemblages résultant a été exploitée par de nombreux groupes.

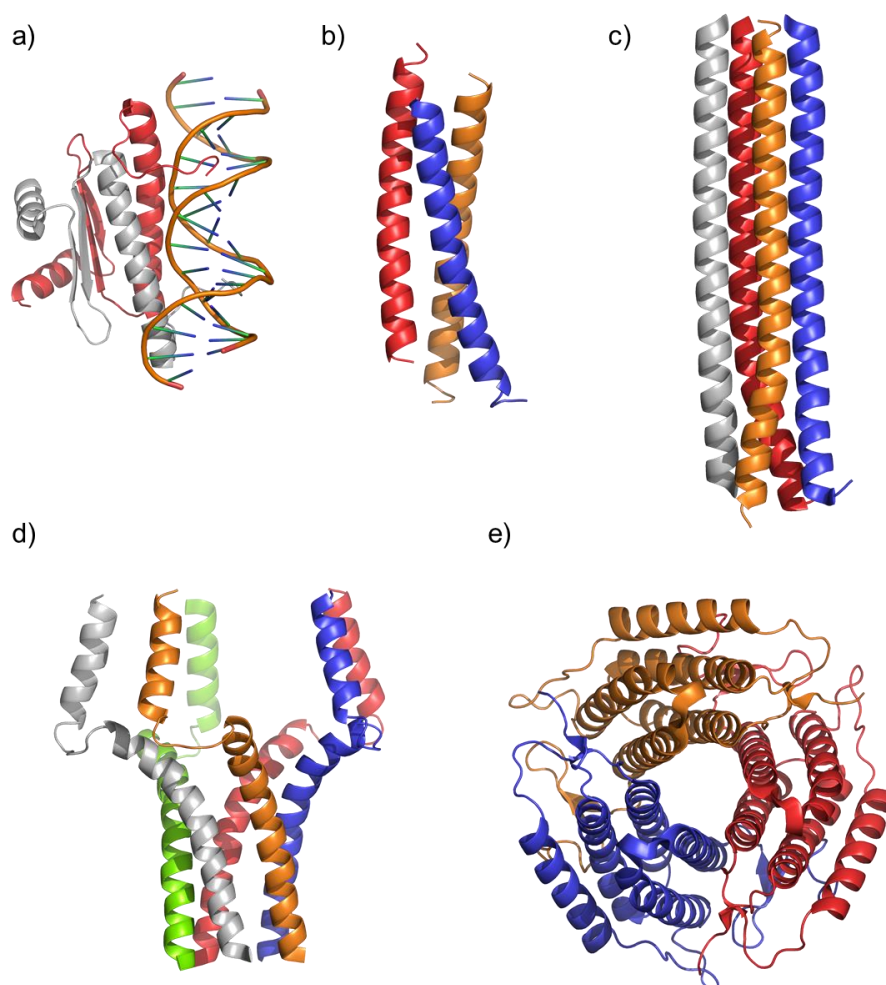


Figure IV.1 : Exemple de faisceaux d'hélices α -peptide a) dimérique, (facteur de transcription MEF2 lié à l'ADN PDB : 1EGW)^[179] ; b) trimérique, (glycoprotéine gp41, PDB : 1AIK)^[177] ; c) tétramérique, (tetrabrachion, PDB : 1FE6)^[184] ; d) pentamérique (phospholamban cardiaque, PDB : 1ZLL)^[182] et e) hexamérique (Cobalamine adenosyltransférase, PDB : 2NT8)^[183]

Certaines règles de base ont ainsi pu être établies.^[54] Tout d'abord il a été montré que l'assemblage est principalement dirigé et maintenu par des forces hydrophobes. Les hélices possédant une face composée uniquement de résidus apolaires (généralement aux positions *a* et *d* de l'heptade) s'assemblent afin de minimiser la surface hydrophobe en contact avec le solvant. Cependant ces interactions ne sont pas spécifiques et ne permettent pas de déterminer la stœchiométrie du faisceau et l'orientation des hélices. Ce sont donc les forces de van der Waals et les contraintes stériques qui permettent de moduler la taille du cœur hydrophobe et par conséquent la stœchiométrie du faisceau. Par exemple Harbury et coll. ont formé des faisceaux de trois^[185] et quatre hélices^[56] à partir d'une structure dimérique de GCN4-p1^[186] en remplaçant les résidus en position *a* et *d* (hydrophobes pour la plupart à l'exception d'un résidu asparagine) par des résidus isoleucine et leucine (Figure IV.2).

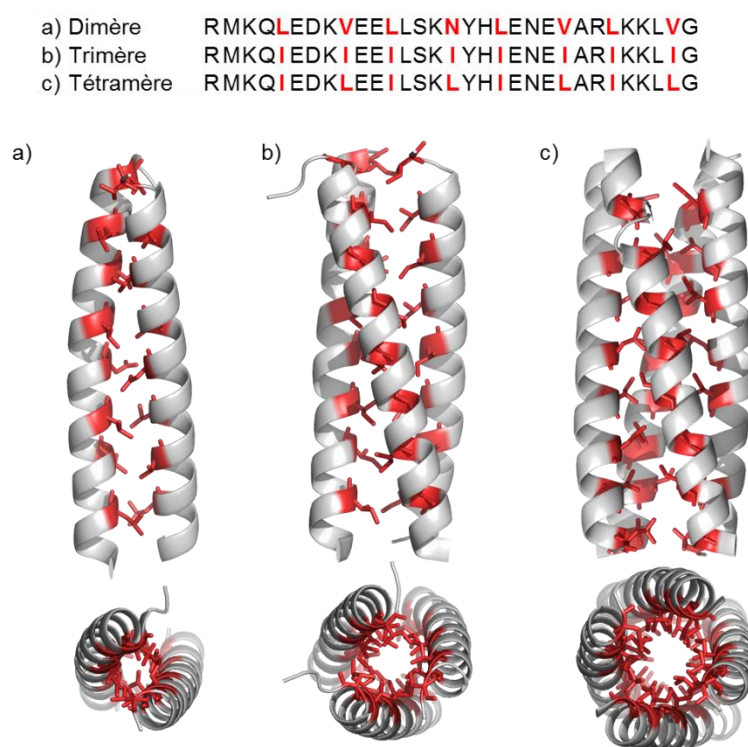


Figure IV.2 : Structures cristallographiques des faisceaux d'hélices a) dimérique^[186], b) trimérique^[185] et c) tétramérique^[56] obtenus à partir de mutation de GCN4-p1. Les résidus hydrophobes en positions *a* et *d* sont représentés en rouge.

Finalement les interactions électrostatiques via des ponts salins entre les chaînes latérales situées de chaque côté de la face hydrophobe influencent l'orientation parallèle ou anti-parallèle des faisceaux d'hélices ainsi que la formation d'hétéro ou d'homo-oligomères.

La meilleure compréhension de ces systèmes a permis de développer un certain nombre d' α -peptides non naturels s'assemblant sous forme de faisceaux d'hélices. Cependant la coopérativité mise en jeu est souvent difficile à prendre en compte dans sa globalité ce qui rend les prédictions difficiles. Le développement des foldamères constitue une alternative intéressante à ces problèmes. En effet ces petits oligomères non naturels sont capables d'adopter une variété de conformations qu'il est *a priori* possible de prévoir. Il n'y a donc plus de coopérativité dans le phénomène de repliement. Plusieurs exemples d'assemblages quaternaires d'hélices foldamères ont été décrits dans la littérature. Comme nous avons pu le voir dans le Chapitre I, S. Gellman et A. Schepartz ont notamment synthétisé et caractérisé différents faisceaux d'hélices à partir respectivement d' α/β -peptides et de β -peptides en utilisant des stratégies descendante ou ascendante.

De la même manière, les oligourées adoptent des structures en hélices 2.5 particulièrement stables permettant de contrôler et de prévoir la position des chaînes latérales. Ainsi nous avons, en utilisant une stratégie ascendante, essayé de développer des hélices d'oligourées amphiphiles capables de s'auto-assembler pour former des faisceaux d'hélices en milieu aqueux.

I. Premier design dans l'objectif de former un faisceau d'hélices

Nous nous sommes donc appliqués à concevoir une première hélice amphiphile possédant une séquence simple de 10 résidus permettant de créer une face hydrophobe complète correspondant à 2/5^{ème} de la surface de l'hélice (Figure IV.3). Les hélices d'oligourées possédant 5 faces (*abcde*), nous avons choisi d'insérer des résidus leucine aux positions *b* et *e* et des résidus chargés dérivés de la lysine et de l'acide glutamique pour la formation de ponts salins intermoléculaires aux positions *c* et *d* respectivement. Nous avons choisi d'introduire un résidu pyrrolidine au centre de la séquence en position *a* pour permettre une synthèse en solution par condensation de segment (voir chapitre III).

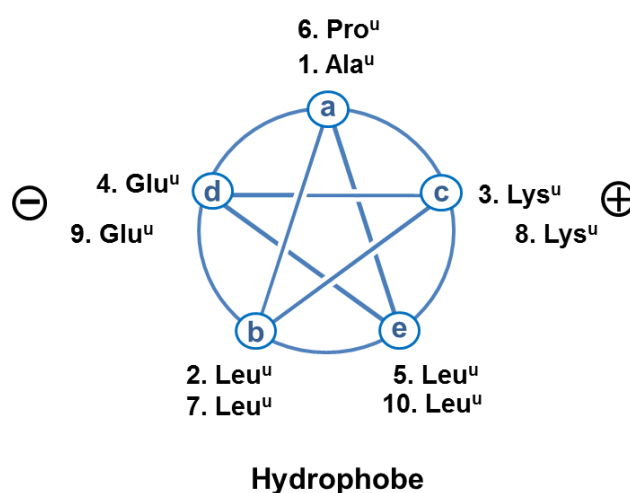


Figure IV.3 : Séquence de l'oligourée IV.A amphiphile

1. Synthèse

Afin de coupler les différents résidus, il était nécessaire de protéger les chaînes latérales chargées de type Glu et Lys respectivement par des groupements benzyle et 2-Chlorobenzoyloxycarbonyl orthogonaux au groupement protecteur Boc et éliminables en fin de synthèse par hydrogénation catalytique. L'assemblage de cette séquence impliquait la synthèse de deux segments IV.2 et IV.3 composés chacun de 5 résidus et protégés par un groupement Boc à l'extrémité N-terminale (Figure IV.4). Le résidu pyrrolidine du segment IV.3 a quant à lui été activé sous forme de carbamate de succinimide pour permettre le coulage final.

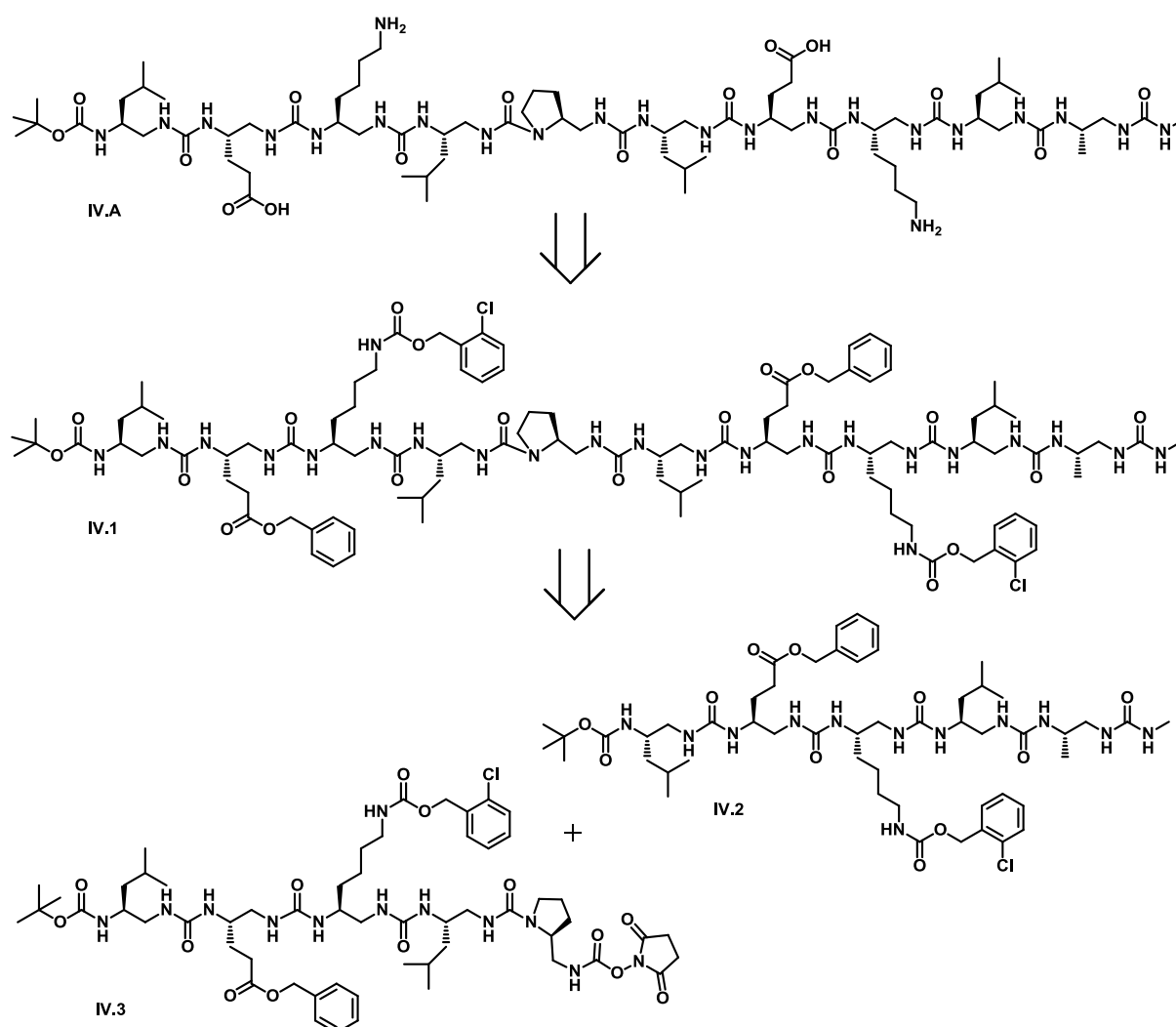


Figure IV.4 : Schéma rétrosynthétique de la synthèse de IV.A par condensation de segments

a) Synthèse des monomères

Pour réaliser ces molécules il était nécessaire de synthétiser deux nouveaux monomères activés dérivés de la lysine et de l'acide glutamique **M8** et **M9**.

i. Synthèse du monomère dérivé de la lysine **M8**

Le carbamate activé dérivé de la lysine a été obtenu à partir de l'acide aminé protégé Boc-L-Lys(2-ClZ)-OH (Figure IV.5), suivant la même procédure que pour les précédents monomères (**M1**, **M2**, et **M3** Chapitre II). Après réduction de l'acide en alcool, une réaction de Mitsunobu^[148] donne le dérivé phtalimide correspondant. L'amine obtenue par réaction avec l'hydrazine hydratée est ensuite activée avec le carbonate de dissuccinimide pour donner le monomère désiré avec un rendement global de 38%.

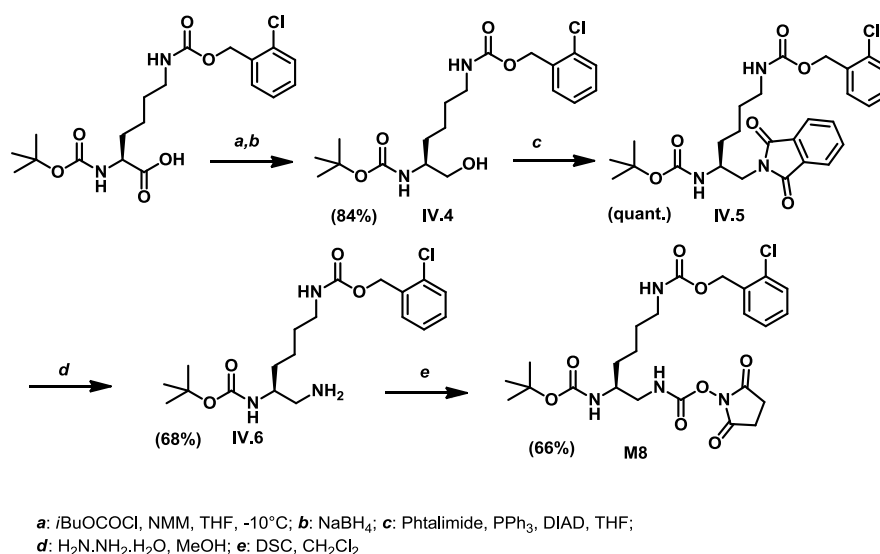


Figure IV.5 : Schéma de synthèse du monomère activé **M8** dérivé de la lysine

ii. Synthèse du monomère dérivé de l'acide glutamique **M9**

La séquence réactionnelle décrite précédemment (Figure IV.5) n'a pas permis d'accéder au monomère **M9** dérivé de l'acide glutamique. Le traitement du dérivé phtalimide avec l'hydrazine conduit à la déprotection du groupement benzyle suivi d'une réaction de cyclisation. Une deuxième stratégie déjà utilisée au laboratoire^[147] impliquant le réarrangement de Curtius de l'acide β-aminé correspondant et le traitement de l'isocyanate formé avec du *N*-hydroxysuccinimide a donc été envisagée (Figure IV.6). L'acide β aminé Boc-β³hGlu(OBn)-OH **IV.8** est obtenu à partir de Boc-Glu(OBn)-OH commercial par une homologation d'Arndt-Eistert.^[34] Cette voie de synthèse a permis d'obtenir le monomère **M9** avec un rendement global de 40%.

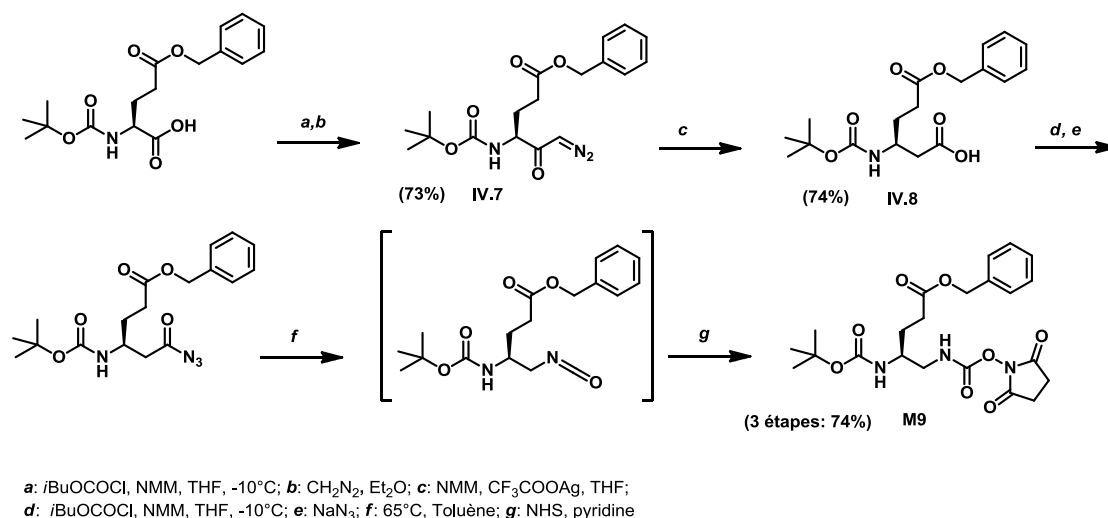


Figure IV.6 : Schéma de synthèse du monomère activé **M9** dérivé de l'acide glutamique

b) Synthèse des fragments

Chacun des deux segments **IV.2** et **IV.3** a été synthétisé en solution par répétition de cycles de déprotection (élimination du groupement Boc par du TFA) et de couplage du monomère activé (Figure IV.7). Les rendements de couplages varient de 60% à 90%.

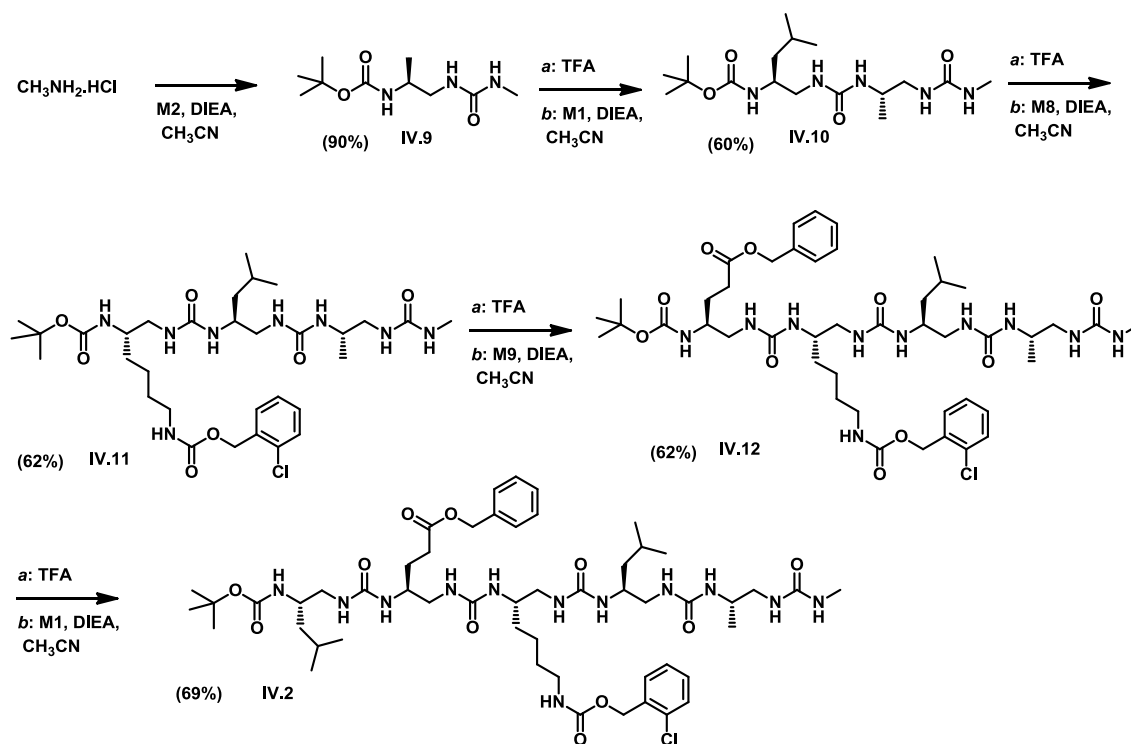


Figure IV.7 : Schéma de synthèse du segment **IV.2**

Le deuxième segment a été synthétisé à partir du précurseur azoture **III.3** déjà décrit dans le chapitre précédent (Figure IV.8). A la fin de l'assemblage, l'azoture est réduit en amine pour permettre l'activation de l'oligomère par le carbonate de dissuccinimide. La présence des groupements protecteurs sur les chaînes latérales ne permet pas de réaliser une réduction de l'azoture par hydrogénation catalytique qui déprotégerait également les groupements ester de benzyle et benzyloxycarbonyle. Un premier essai de réduction par la réaction de Staudinger avec la triméthylphosphine n'a pas permis d'obtenir le composé avec un bon rendement car il est difficile d'éliminer l'oxyde de phosphine formé. Nous nous sommes donc intéressés à l'utilisation de triphénylphosphine sur support solide permettant d'éliminer le produit secondaire par filtration. Malheureusement cette réaction nécessite plusieurs jours d'agitation pour obtenir une conversion totale et l'amine formée, assez instable, commence à se dégrader après 2 jours. Pour accélérer la cinétique de cette réaction nous l'avons reconduite sous champ micro-ondes (70°C, 25W). Grâce à cette méthode l'azoture est réduit en quatre heures et l'amine résultante est directement engagée dans

la réaction d'activation pour former le carbamate de succinimide avec un rendement global des deux dernières étapes de 78 %.

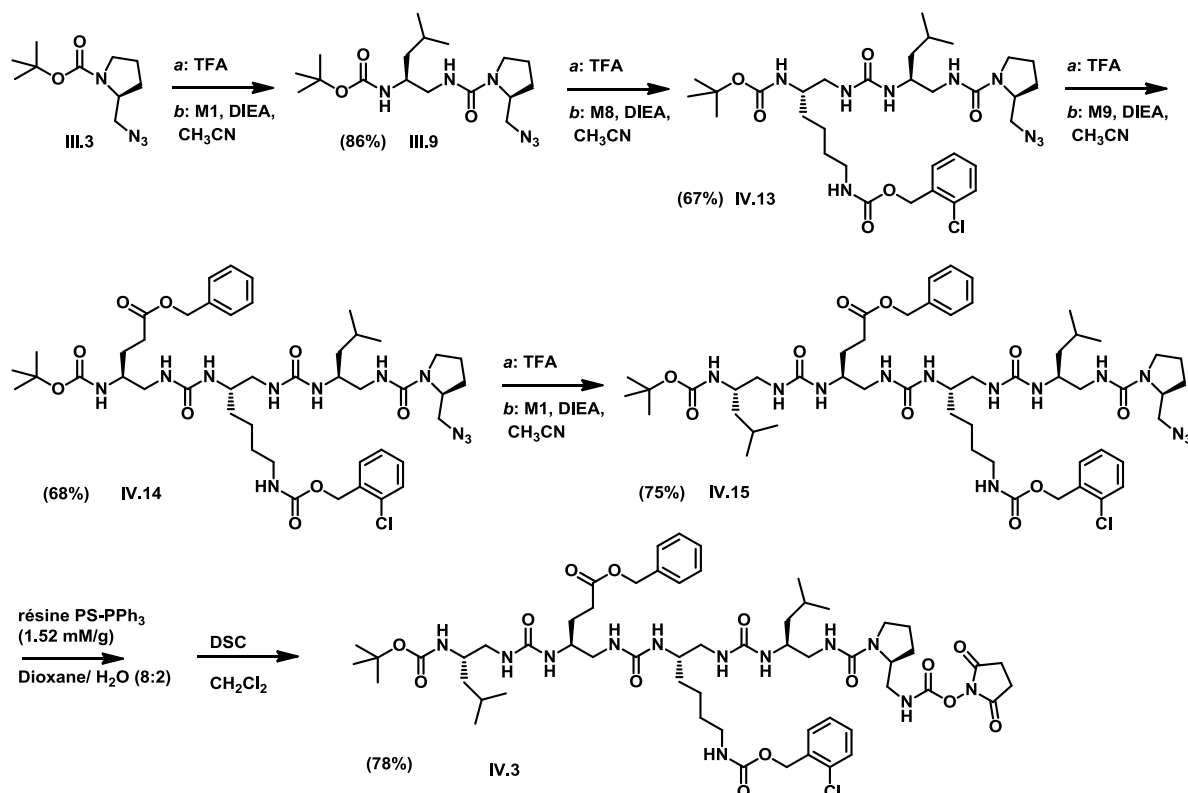


Figure IV.8 : Schéma de synthèse du composé IV.3

Le produit est ensuite purifié par précipitation dans l'Et₂O. La formation du carbamate est observée par RMN ¹H (CD₃CN) avec l'apparition du singulet à 2.75 ppm correspondant aux (CH₂)₂ du groupement succinimidyle et du signal du NH(OSu) déblindé à 8.4 ppm (Figure IV.9).

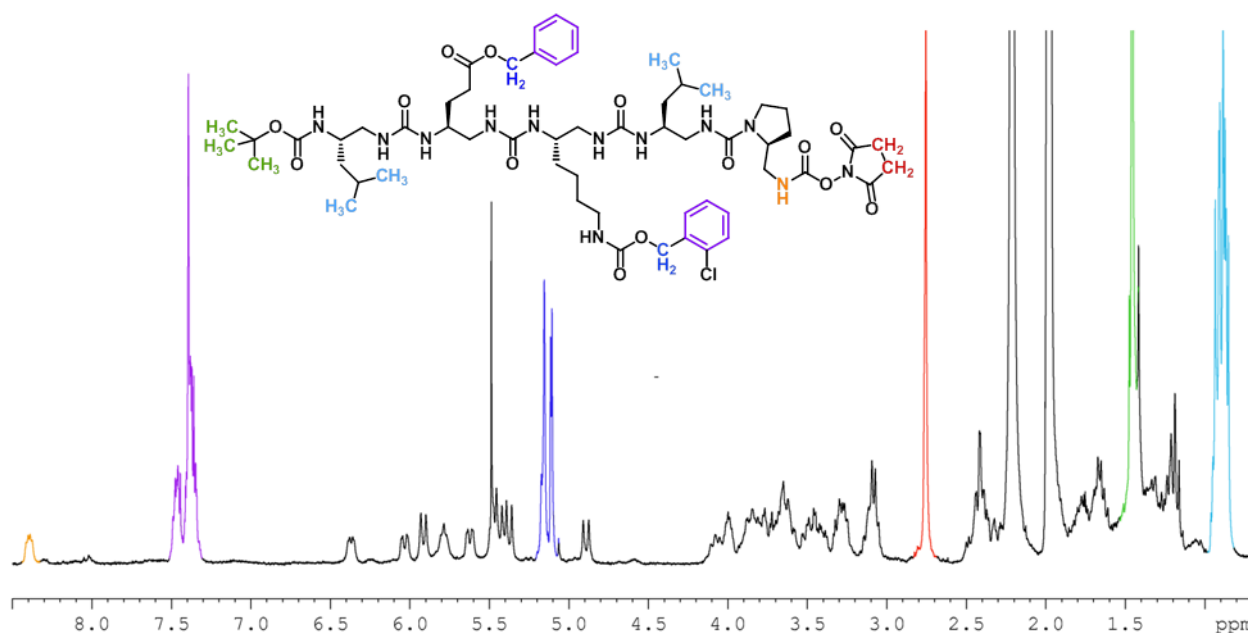


Figure IV.9 : RMN ^1H du segment activé IV.3 dans le CD_3CN (300 MHz)

c) Couplage, déprotection et purification

Des premiers essais de couplage des deux fragments ont été réalisés en solution en présence de DIEA à température ambiante mais les rendements étaient plutôt faibles, de l'ordre de 30 % après 20h d'agitation. Les micro-ondes ont donc été utilisées pour accélérer la réaction et tenter d'améliorer les rendements de couplages. Le produit désiré est finalement obtenu après 4h de réaction (50 °C, 25 W) et une purification par chromatographie éclair sur colonne de silice avec un rendement de 69 % (Figure IV.10).

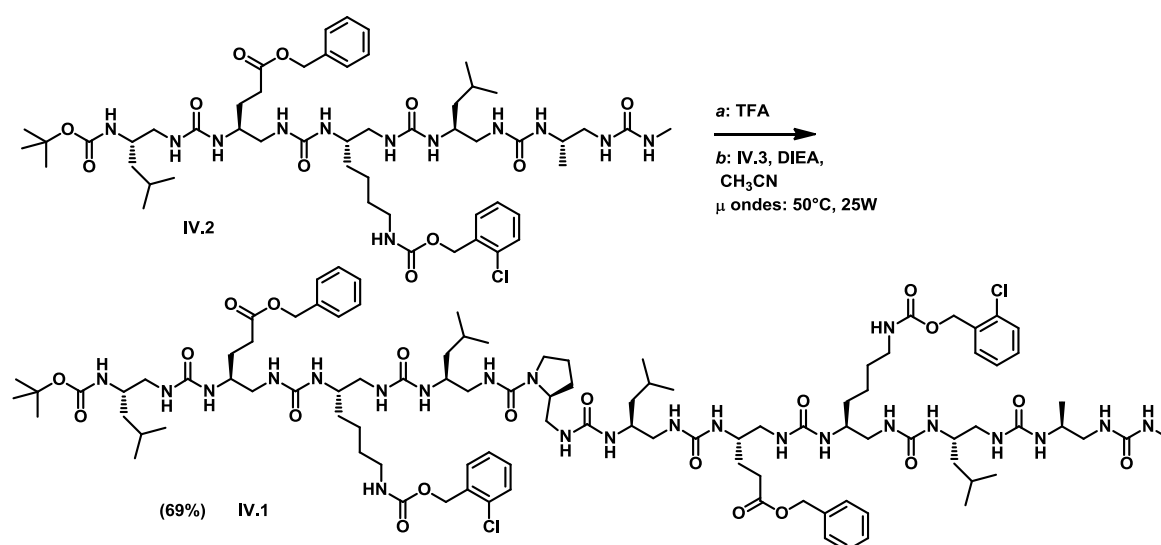


Figure IV.10 : Schéma de synthèse du composé IV.1

La RMN de ce composé réalisé dans le CD_3CN présente toutes les caractéristiques de la formation d'une hélice 2.5 (Figure IV.11). Les signaux correspondants aux protons NHs (vingt pour la chaîne principale et deux pour les chaînes latérales de type lysine) sont clairement dispersés et différenciables. Les constantes $^3J(\text{NH}, ^\beta\text{CH})$ mesurables sont de l'ordre d'une dizaine de Hertz ce qui est cohérent avec un arrangement antipériplanaire des protons NH et $^\beta\text{CH}$.

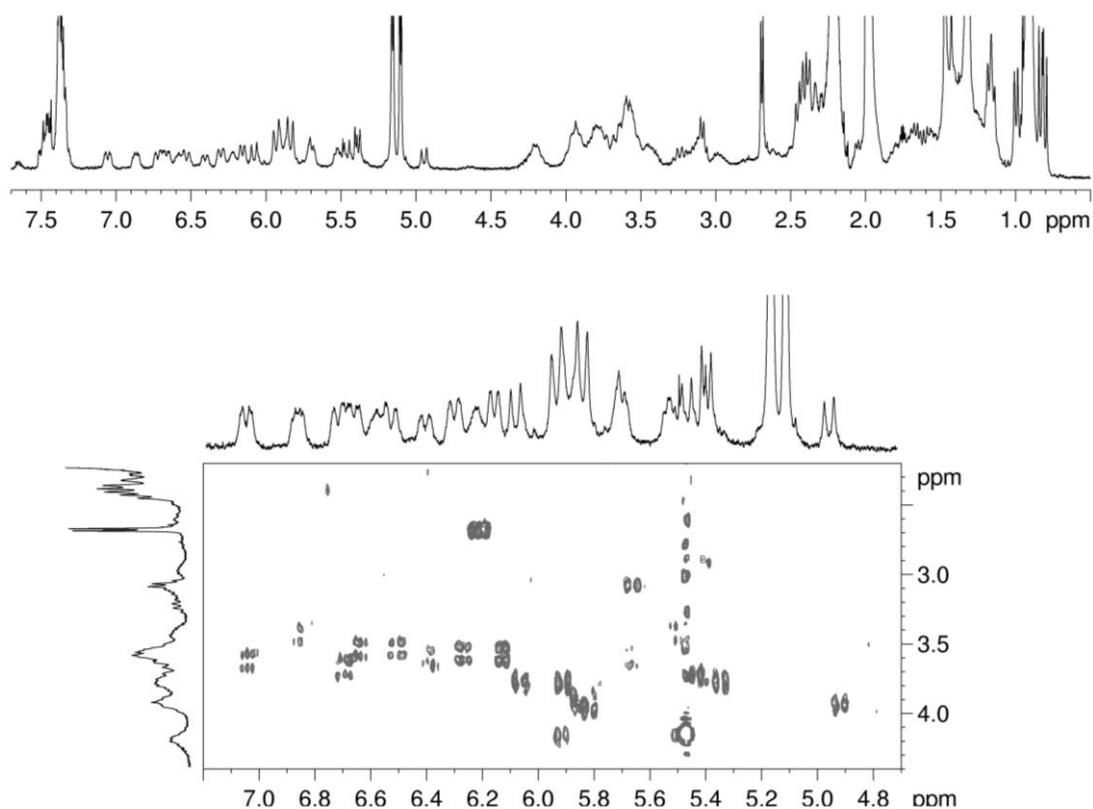


Figure IV.11 : RMN ^1H et détail du spectre COSY du composé **IV.1** (CD_3CN , 400MHz)

Afin d'évaluer l'influence de la longueur de la molécule nous avons également synthétisé **IV.16** (Figure IV.12), un oligomère de 15 résidus obtenu à partir de **IV.1** par élimination du groupement Boc et deuxième couplage du segment **IV.3**.

Le groupement *N*-terminal pouvant jouer un rôle dans l'agrégation axiale des hélices d'oligourées, nous avons également remplacé le groupement Boc de **IV.1** par une terminaison urée (**IV.17**, Figure IV.12) en couplant le sel de TFA correspondant avec l'isocyanate d'isopropyle.

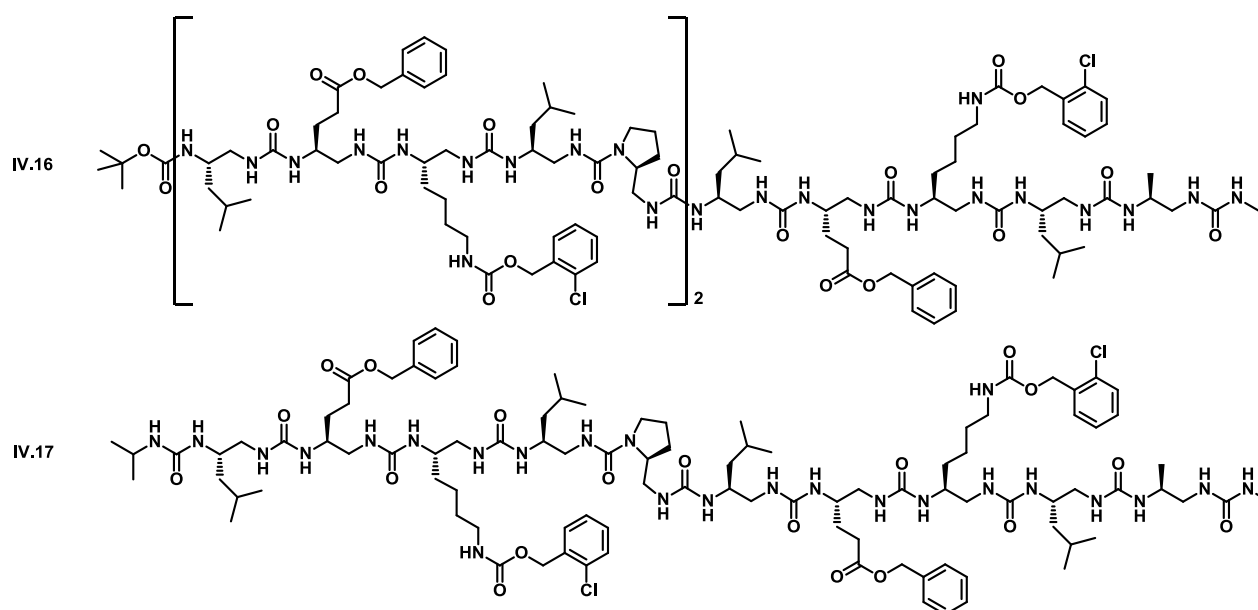


Figure IV.12 : Schéma des molécules IV.16 et IV.17

Les groupements protecteurs des chaînes latérales ont ensuite été déprotégés par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon (10 %) dans un mélange d'éthanol, d'eau et d'acide acétique pour solubiliser à la fois le composé initial protégé, soluble en milieu organique, et le produit final soluble en milieu aqueux (Figure IV.13).

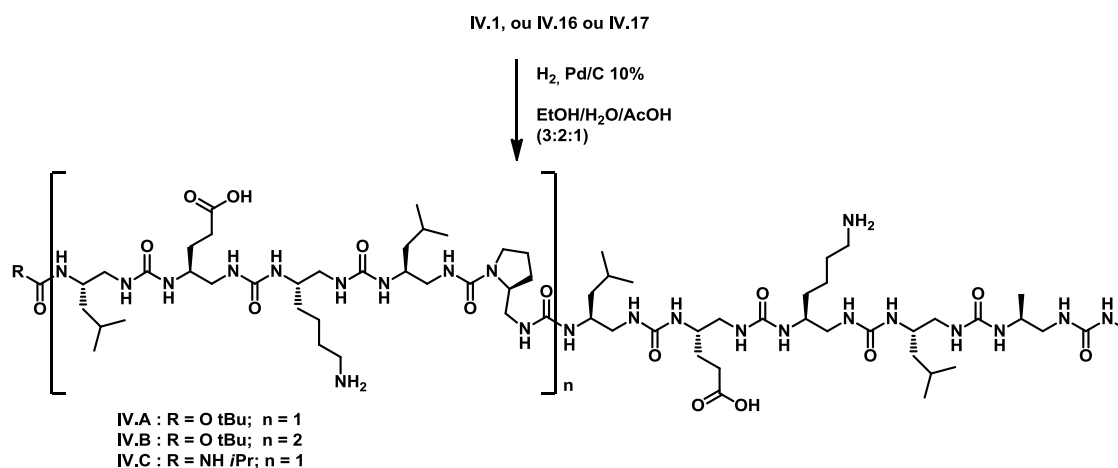


Figure IV.13 : Déprotection des chaînes latérales par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon (10% w/w)

La déprotection par hydrogénation catalytique permet d'obtenir des composés relativement propres d'une pureté HPLC moyenne de 83%. Le produit pur est ensuite obtenu par HPLC semi-préparative en phase inverse avec un gradient croissant d'acétonitrile (0.1% de TFA) dans l'eau (0.1% TFA) (Figure IV.14).

Les premiers essais de cristallisation de ces molécules ont exclusivement conduit à la formation de cristaux de sels. Afin de s'affranchir de la présence des contre-ions trifluoroacétates introduits lors de l'étape de purification et qui pourraient perturber la croissance cristalline, les oligomères purifiés ont finalement été lyophilisés en présence d'acide chlorhydrique afin d'échanger ces contre-ions par des ions chlorures.

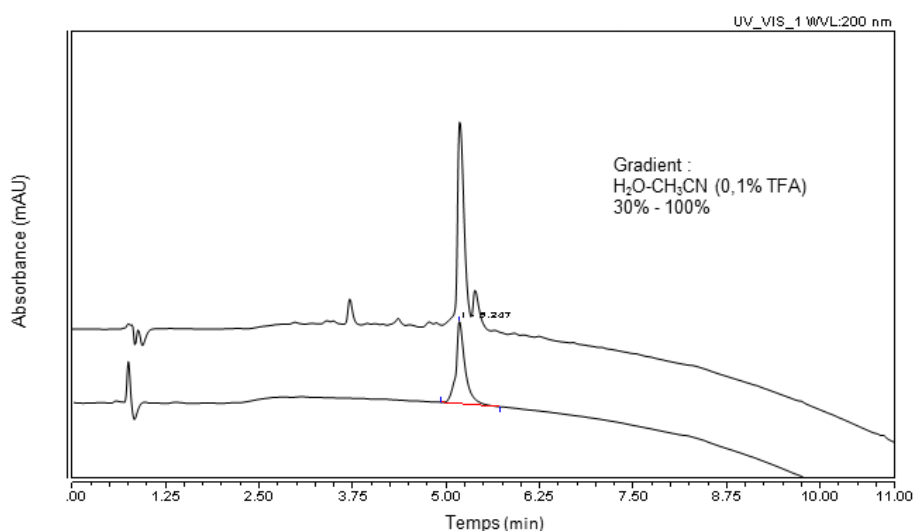


Figure IV.14 : Exemple de profil HPLC obtenu après l'étape de déprotection des chaînes latérales pour le composé **IV.A** avant (haut) et après purification (bas) par HPLC semi-préparative en phase inverse.

2. Etude structurale en solution par dichroïsme circulaire

Ces molécules ont ensuite été analysées par dichroïsme circulaire à une concentration de 0.2 mM dans un tampon phosphate à pH 7,1. Comme les intensités sont relativement faibles, les spectres ont été lissés pour plus de lisibilité (Figure IV.15, a) avant lissage, b) après lissage). Chacune des molécules **IV.A**, **IV.B** et **IV.C** présente la signature caractéristique des hélices d'oligourées avec une EMPR maximale à 203 nm. Cependant les intensités restent faibles comparées à celles généralement observées en solvant organique (CH₃OH ou TFE) ce qui témoigne d'un plus faible degré d'hélicité dans l'eau. La molécule **IV.C** comportant une urée terminale semble légèrement plus stable que ses homologues *N*-Boc protégés.

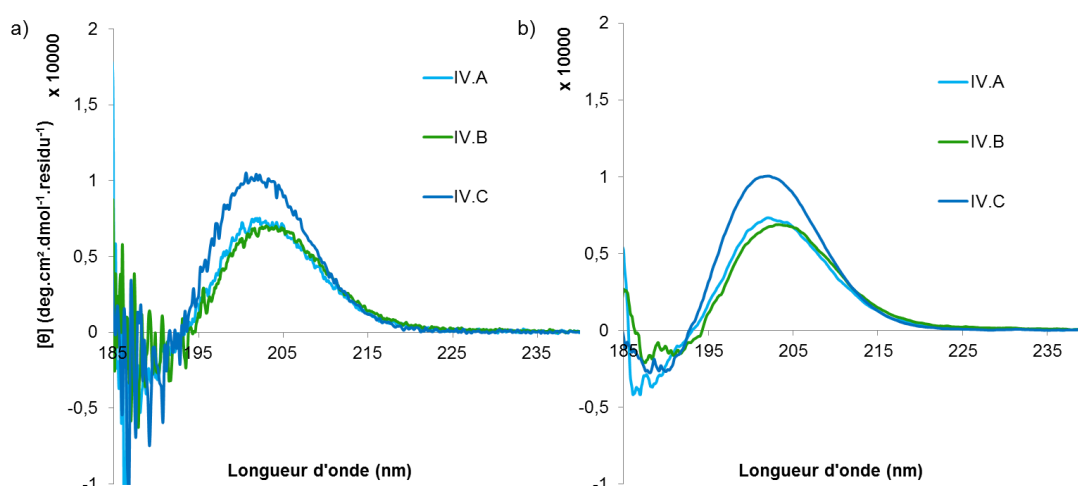


Figure IV.15 : Spectres CD des molécules IV.A, IV.B et IV.C réalisés dans un tampon phosphate (pH 7,1) à 0.2 mM a) avant lissage, b) après lissage

Afin de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu, des essais de cristallisation en milieu aqueux ont été réalisés par Gavin Collie, chercheur post-doctorant en bio-cristallographie au laboratoire. De nombreuses conditions ont été testées mais malheureusement aucune n'a conduit à l'obtention de monocristaux utilisables pour la diffraction des rayons X.

II. Essai de stabilisation de la structure par des ponts salins intramoléculaires

Pour améliorer la stabilité des structures secondaires dans l'eau, nous avons choisi de modifier la position des chaînes latérales chargées pour favoriser la formation de ponts salins intramoléculaires. Les résidus dérivés de la leucine et de la lysine situés en position *b* et *c* ont donc été échangés pour déplacer la face électropositive à proximité de la face électronégative (relation *i* et *i*+2) tout en conservant un cœur hydrophobe (Figure IV.16, Figure IV.17).

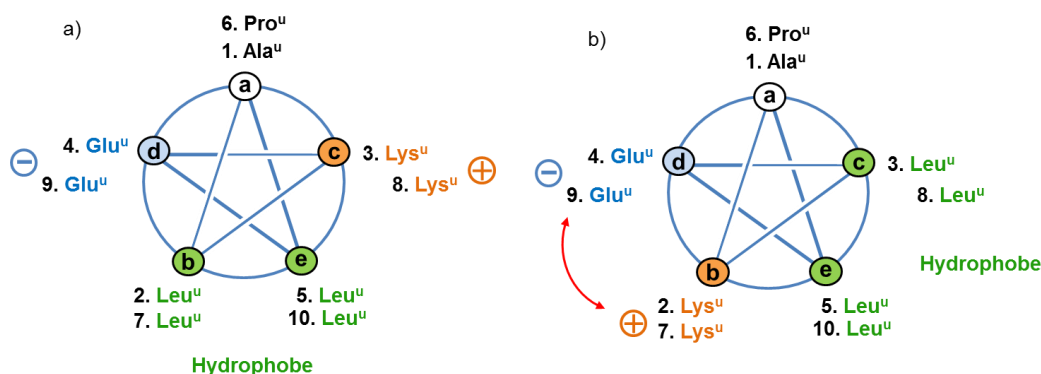


Figure IV.16 : a) premier design réalisé ; b) second design optimisé pour former des ponts salins intramoléculaires

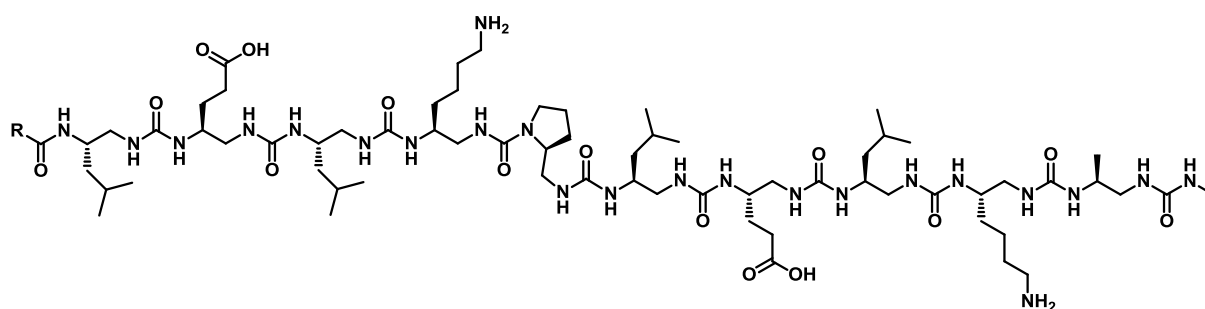


Figure IV.17 : séquence correspondant au nouveau modèle

1. Synthèse

Deux segments ont donc été synthétisés sur le même principe que précédemment, si ce n'est que les chaînes de type lysine ont été couplées avant les résidus dérivés de la leucine (Figure IV.18, Figure IV.19).

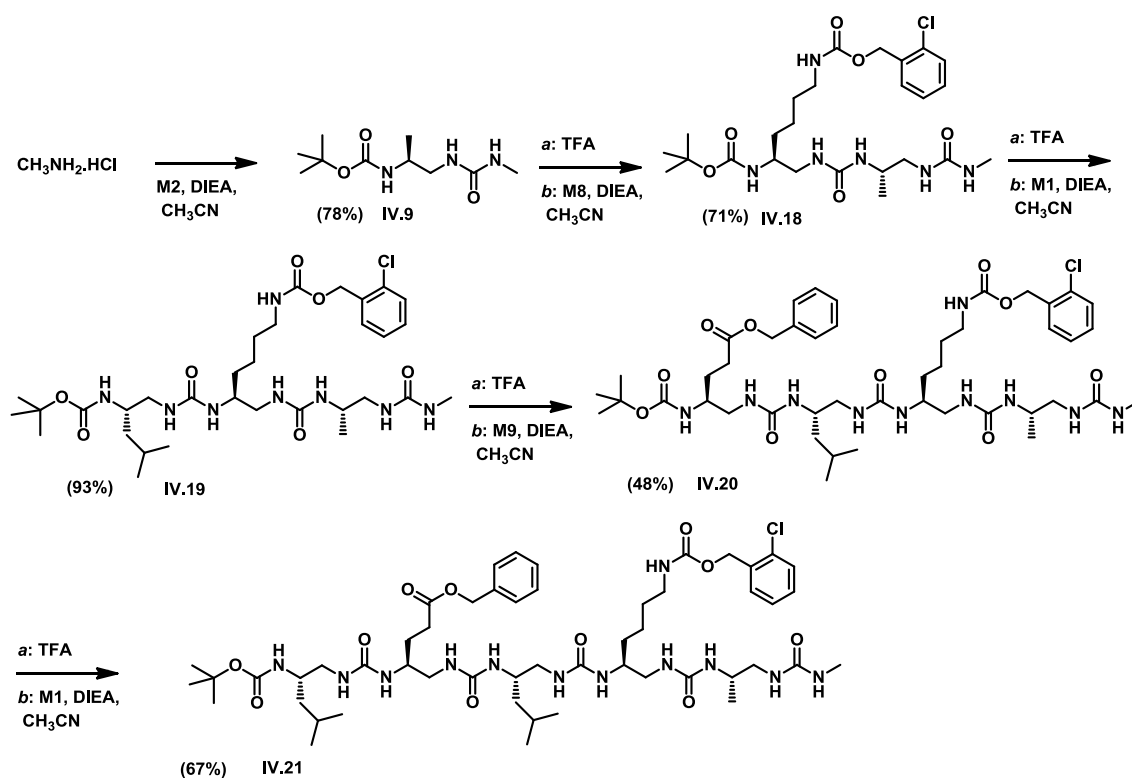


Figure IV.18 : Schéma de synthèse du segment IV.21

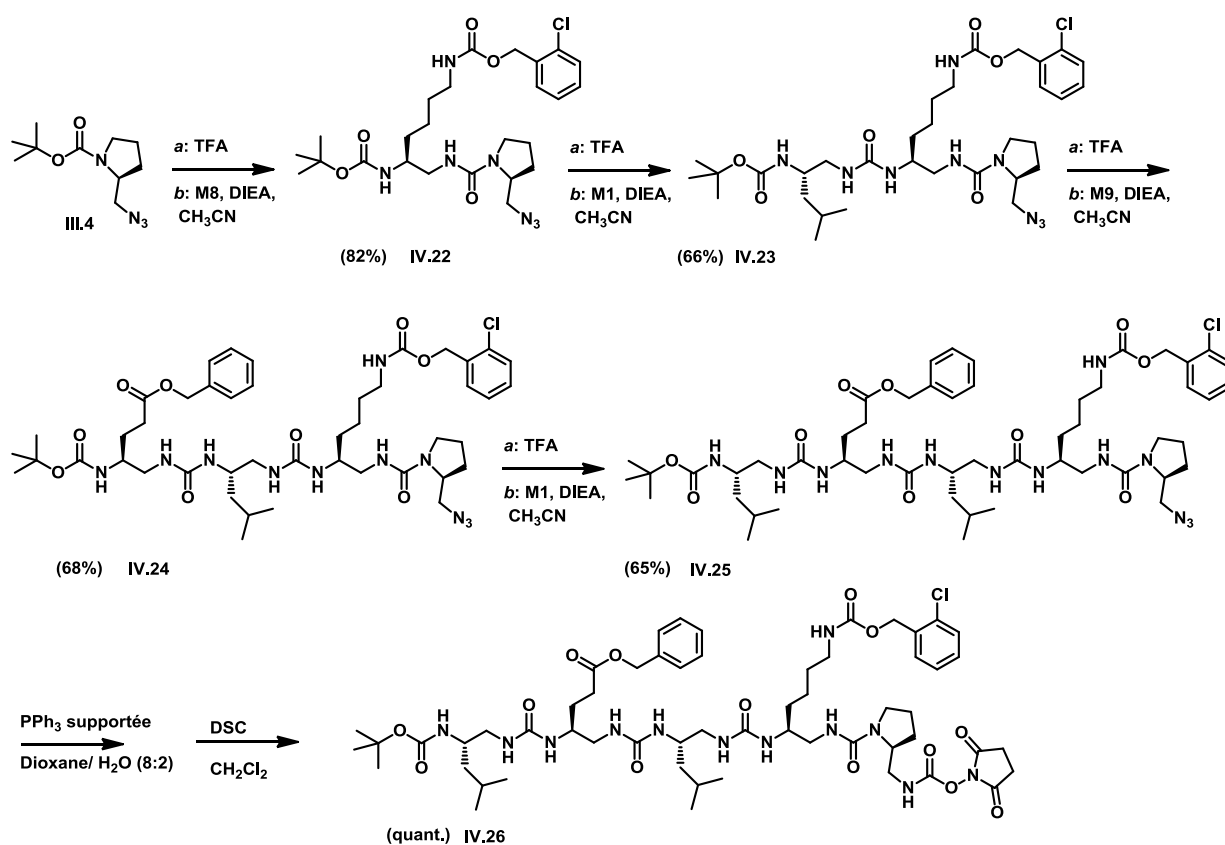
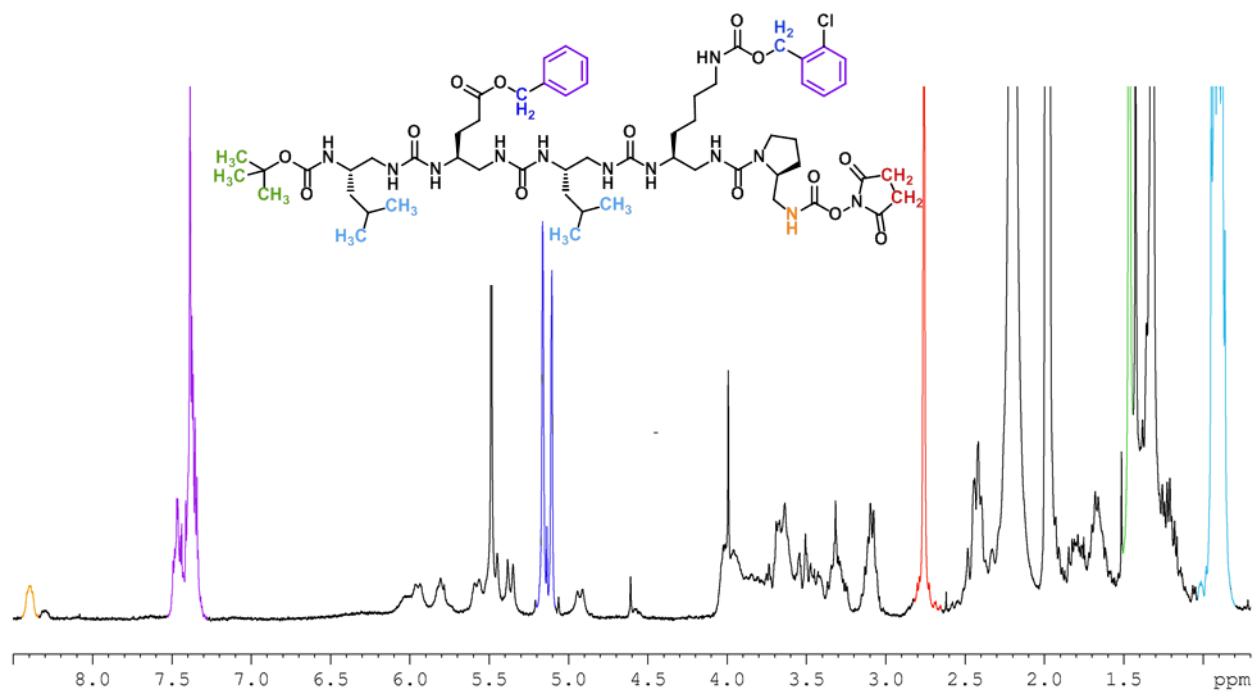


Figure IV.19 : Schéma de synthèse du segment activé IV.26

Figure IV.20 : RMN ^1H du segment activé IV.26 réalisé dans le CD_3CN (300 MHz)

L'oligomère **IV.27** a ensuite été obtenu par couplage du second segment activé **IV.26** sur le premier **IV.21** préalablement déprotégé dans le TFA, suivi d'une purification par chromatographie éclair sur colonne de silice. Pour favoriser un empilement axial des hélices, le groupement Boc a finalement été déprotégé pour permettre le couplage d'un isocyanate d'isopropyle sur l'amine terminale et donner **IV.28** (Figure IV.21).

Comme plusieurs études ont montré que les groupements aromatiques pouvaient favoriser des assemblages intermoléculaires grâce à des interactions π - π ,^[187, 188] nous avons également choisi d'introduire une terminaison bromophényl urée à l'extrémité de la séquence (**IV.29**).

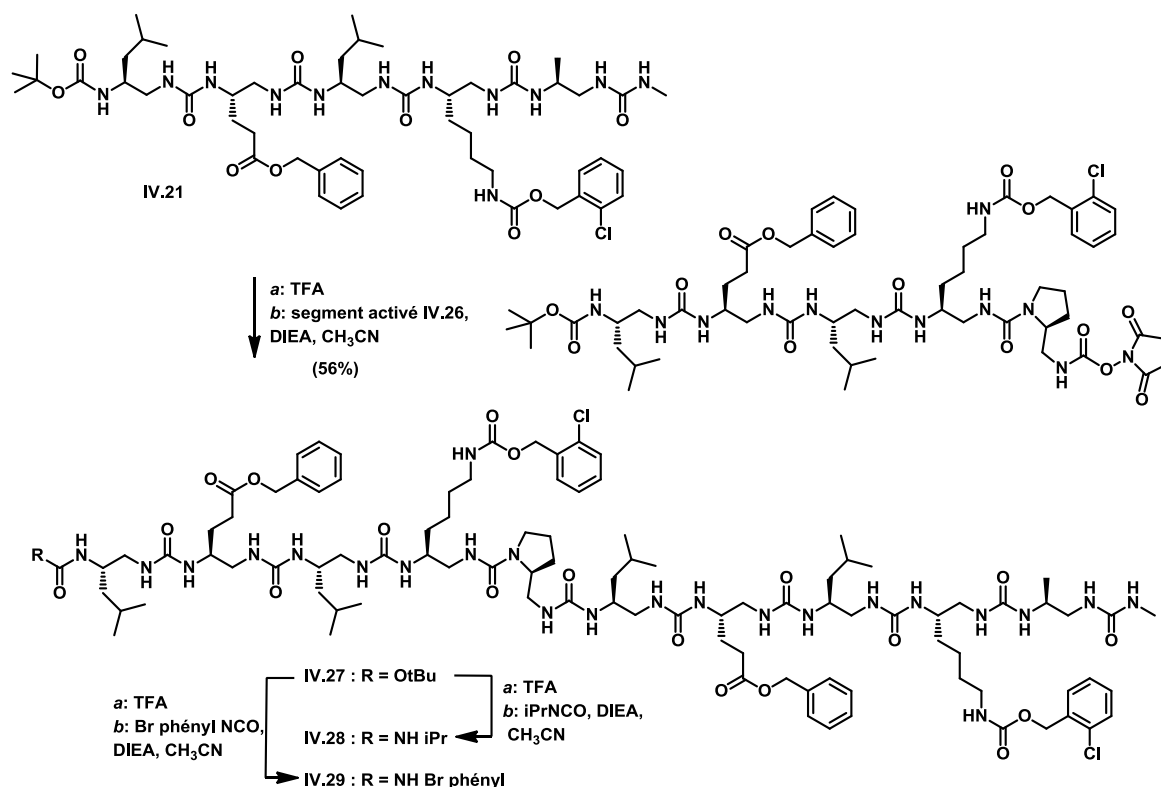


Figure IV.21 : Schéma de synthèse des oligomères **IV.27**, **IV.28** et **IV.29**

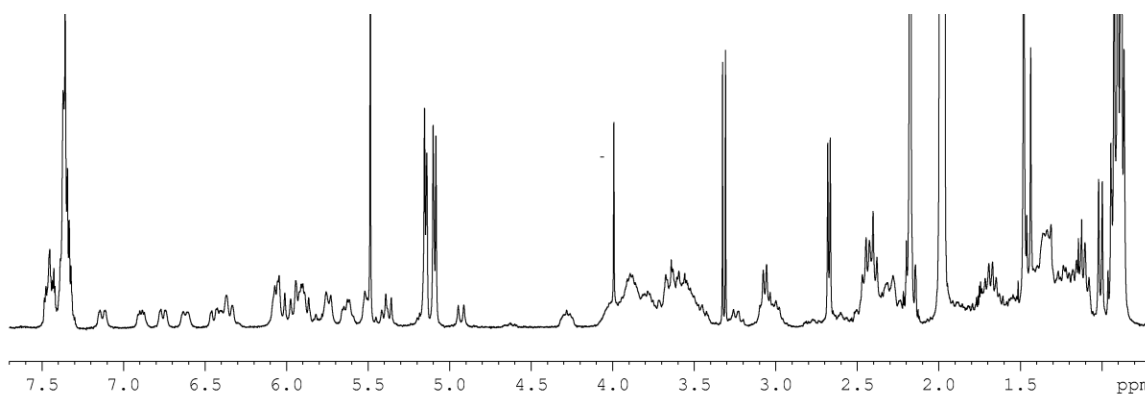


Figure IV.22 : RMN ¹H du composé comportant le groupement Boc terminal **IV.27**

Ces réactions étant réalisées sur de petites quantités, les deux molécules comportant des urées terminales **IV.28** et **IV.29** (Figure IV.23) n'ont pas subi de purification supplémentaire après le couplage des isocyanates. La déprotection des chaînes latérales par hydrogénation catalytique a donc été réalisée sur le produit brut ce qui explique que les composés soient beaucoup moins propres que les oligourées précédentes à l'issue de l'hydrogénation. (Figure IV.24, pureté HPLC 38%)

Les molécules **IV.D** et **IV.E** ont néanmoins été isolées et purifiées par HPLC semi-préparative.

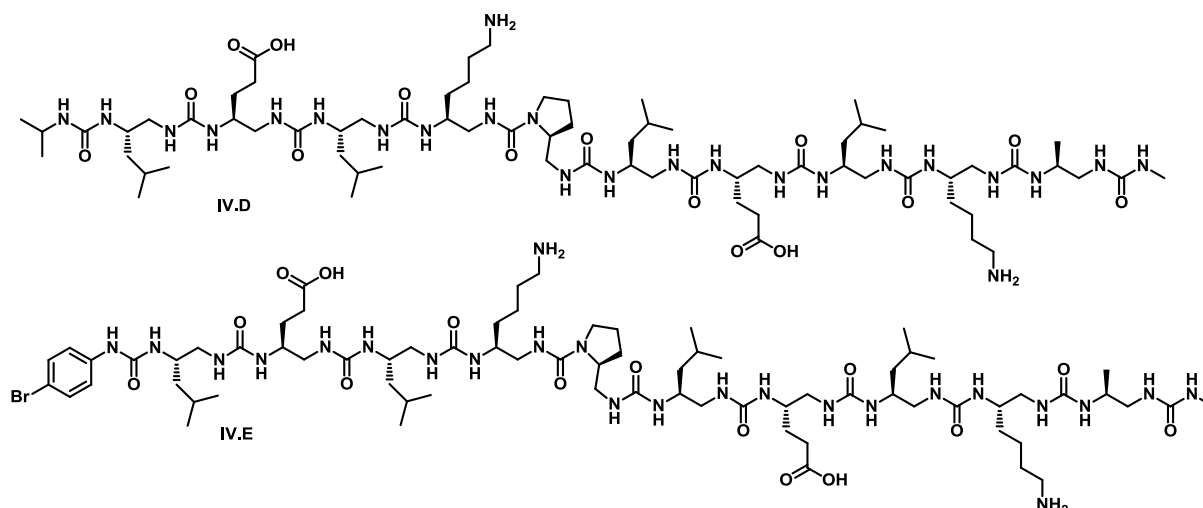


Figure IV.23 : Schéma des molécules **IV.D** et **IV.E**

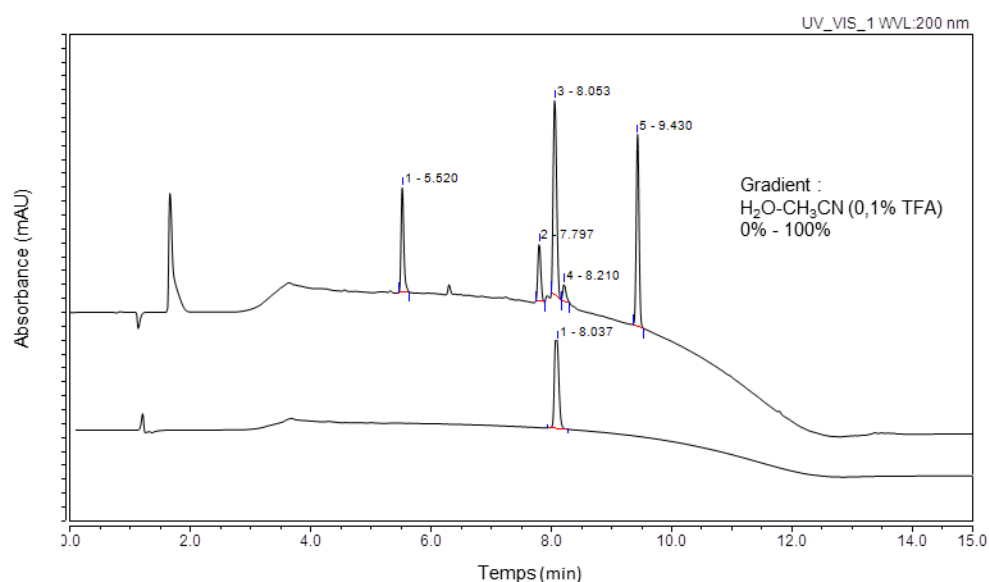


Figure IV.24 : Profil HPLC avant et après purification par HPLC semi préparative du composé **IV.D**

Les analyses par spectrométrie de masse ont révélé une masse inférieure de 80 g/mol à la masse attendue pour le composé **IV.E** ce qui correspond à une absence de l'atome de Brome ($M_w(\text{IV.E}) = 1655 \text{ g/mol}$, $M_{\text{observée}} = 1576 \text{ g/mol}$). Ce dernier n'a donc pas résisté à l'étape d'hydrogénation. De plus

ce composé n'est finalement pas suffisamment soluble en milieu aqueux pour permettre des essais de cristallisation. L'extrémité *N*-terminale n'est donc pas la position la plus favorable pour l'introduction d'un groupement aromatique.

2. Analyses en solution

Le spectre de dichroïsme circulaire du composé **IV.D** a été réalisé dans la même solution tampon phosphate (20 mM) à pH 7,1 que celle utilisée pour les molécules précédentes (Figure IV.25a). La présence d'un maximum d'ellipticité molaire par résidu à 203 nm indique que la molécule **IV.D** adopte effectivement une structure en hélice en milieu aqueux. De plus l'intensité du signal est plus importante que pour la molécule comportant une terminaison urée issue du design précédent **IV.C** (14837 versus 10040 deg.cm².dmol⁻¹.résidu⁻¹), ce qui indique que l'hélice est davantage stabilisée dans ce cas. La stabilité thermodynamique de cette molécule a été étudiée entre 5 et 90°C dans le tampon phosphate à 0.2 mM (Figure IV.25b). Les valeurs de l'ellipticité maximale à 202 nm, reportées dans le graphique Figure IV.25b, diminuent de manière graduelle et linéaire (pente de -106 deg.cm².dmol⁻¹.résidu⁻¹.K⁻¹) avec l'augmentation de la température ce qui témoigne d'une bonne stabilité thermodynamique de la structure secondaire. De plus, après avoir augmenté la température jusqu'à 90°C, une nouvelle mesure effectuée à 20°C a révélé que la déstabilisation occasionnée par la température est réversible et que l'oligomère ne se dégrade pas sur cette plage de température.

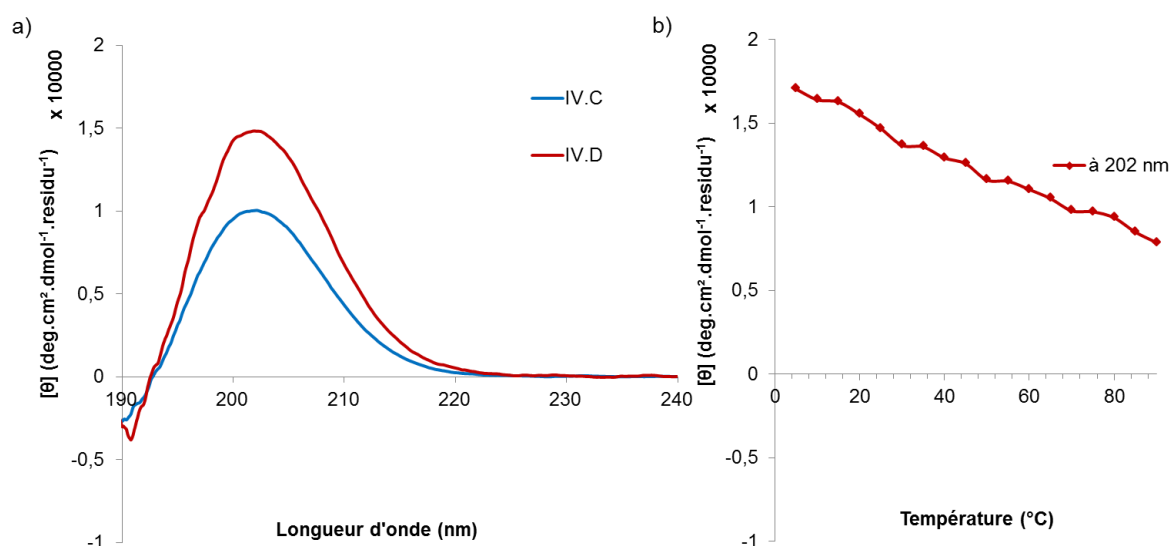


Figure IV.25 : a) Spectres de dichroïsme circulaire lissés des molécules **IV.C** et **IV.D** réalisés dans un tampon sodium phosphate à pH 7,1 et à 0.2 mM ; b) étude en température à 202 nm de la molécule **IV.D**

La concentration étant un paramètre déterminant dans la formation des structures quaternaires, nous avons réalisé des spectres de dichroïsme circulaire de la molécule **IV.D** à différentes

concentrations entre 200 μM et 12,5 μM dans la solution de tampon phosphate à pH 7,1 (Figure IV.26). L'ellipticité maximale à 202 nm ne varie que faiblement entre 200 et 100 μM , puis chute brutalement en dessous de 50 μM pour atteindre une valeur proche de zéro. L'allure de cette courbe qui montre une stabilisation de l'hélice dépendante de la concentration suggère la formation d'un assemblage de plusieurs oligomères comme cela a été observé pour des α -peptides^[189] et des β -peptides^[70] formant des faisceaux d'hélices.

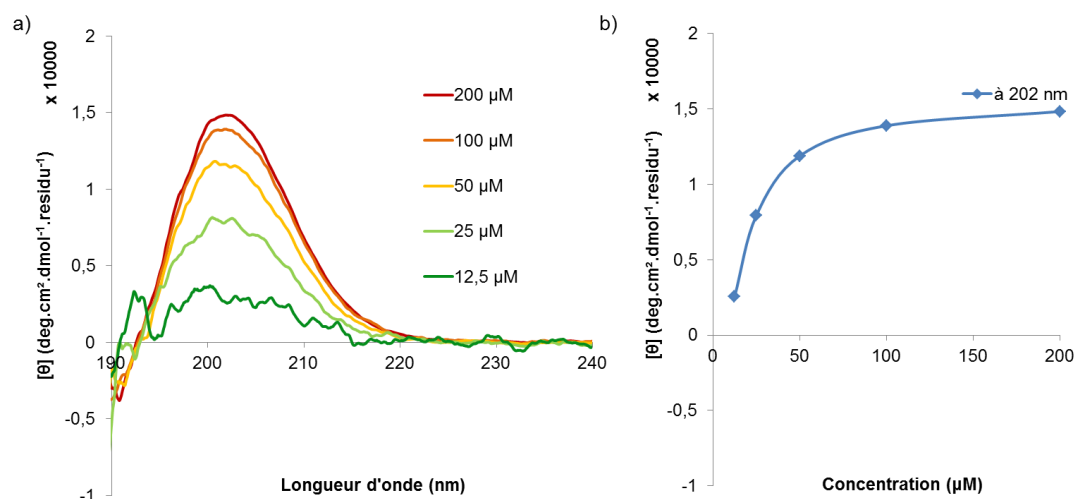


Figure IV.26 : a) Spectres de dichroïsme circulaire lissés à différentes concentrations de la molécule **IV.D** ; b) Valeur de l'ellipticité molaire par résidu à 202 nm, en fonction de la concentration

3. Analyses à l'état solide

La molécule **IV.D** a pu être cristallisée par G. Collie dans deux conditions distinctes en utilisant la méthode de la goutte suspendue. Deux familles de monocristaux d'aspects très différents ont été obtenues (Figure IV.27). Les structures ont été résolues par remplacement moléculaire avec une résolution d'environ 1,3 Å en utilisant la conformation de l'oligomère aliphatique de 13 résidus **6P6** comme modèle. De manière surprenante, les deux types de cristaux ont conduit à l'obtention du même groupe d'espace $P6_122$ et à la même structure.

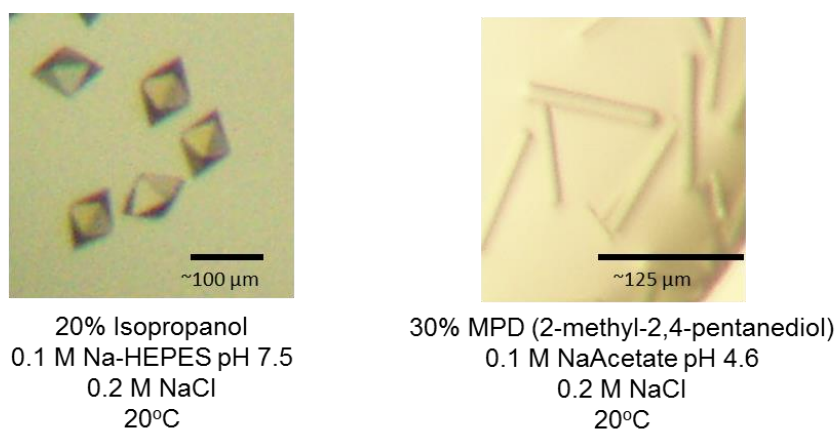


Figure IV.27 : Deux familles de cristaux apparus dans deux conditions différentes dans des gouttes de 20 mg/ml.

a) Caractérisation de la structure secondaire

i. Unité asymétrique

La molécule adopte effectivement une structure en hélice stabilisée par un réseau de liaisons hydrogène à trois centres. L'unité asymétrique est ici composée de deux hélices parallèles qui s'assemblent via une interface hydrophobe composée des résidus de type leucine, les molécules d'eau étant situées de part et d'autre des deux hélices (Figure IV.28). Comme prévu, les chaînes latérales sont positionnées de façon à former une face électropositive, une face électronégative et une troisième face plus large, hydrophobe.

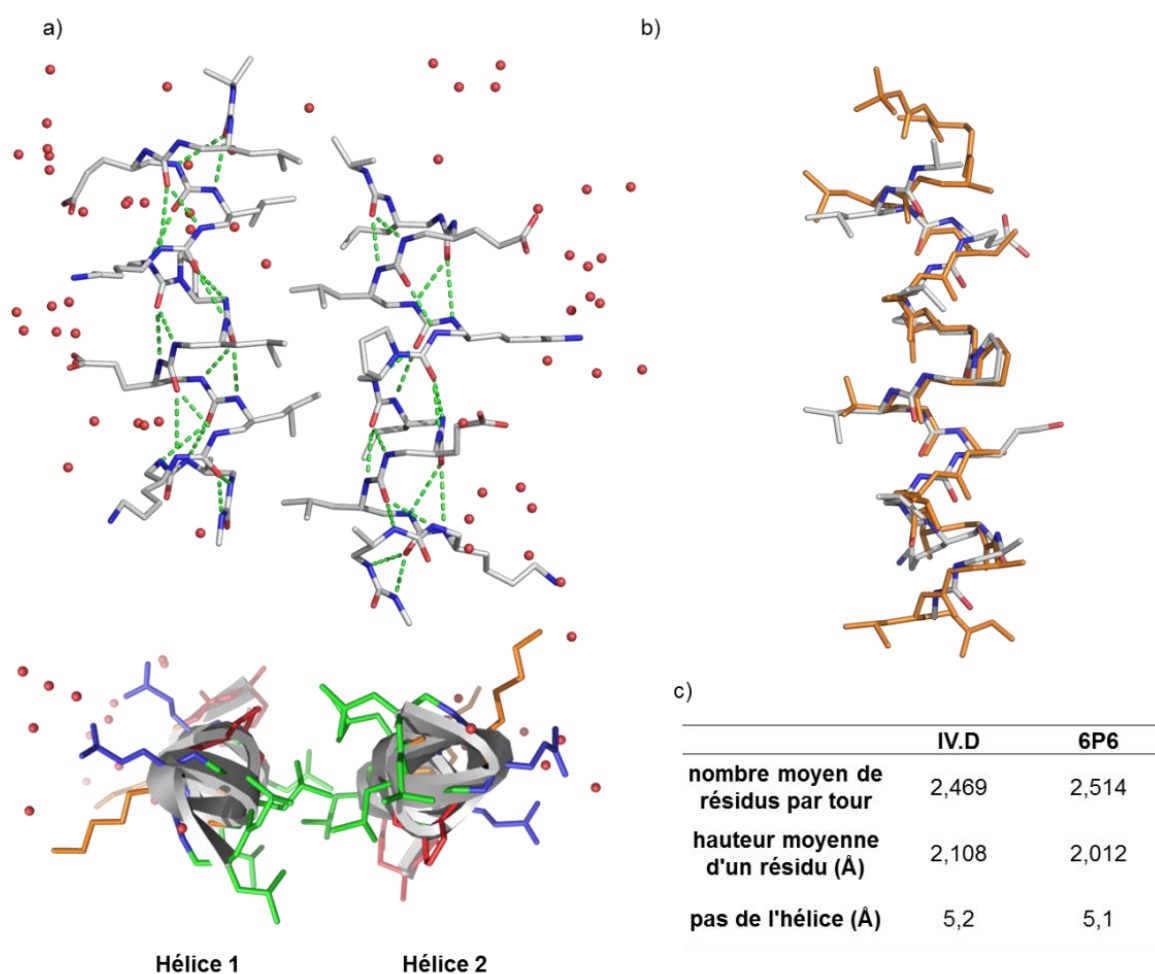


Figure IV.28 : a) Unité de maille cristallographique de la molécule **IV.D** vue de côté et de dessus (les résidus Glu^u sont en bleu, les Lys^u en orange, les Leu^u en vert, et les résidus Pro^u et Ala^u en rouge) ; b) Superposition de l'hélice **6P6** (orange) et **IV.D** (gris) (RMSD 0.78 Å) ; c) tableau comparatif des paramètres des hélices **IV.D** et **6P6**

La structure est très similaire à celle observée pour la molécule **6P6** du chapitre II (Figure IV.28b et c). Les valeurs des angles dièdres sont du même ordre de grandeur que celles généralement observées pour les hélices d'oligourées en milieu organique (Figure IV.29). Par contre les distances N-O des liaisons hydrogène sont légèrement plus grandes en milieu aqueux avec une moyenne de 2.99 Å pour 2.94 Å dans le cas de **6P6** en milieu organique ce qui augmente faiblement le pas de l'hélice à 5.2Å (Figure IV.30).

angles dièdres	Hélice 1			Hélice 2		
	φ	θ_1	θ_2	φ	θ_1	θ_2
P10	-117,22	59,70	92,32	-110,34	49,31	93,07
P9	-100,01	54,57	74,60	-94,67	58,53	70,80
P8	-87,03	56,22	79,27	-94,38	53,04	83,10
P7	-90,13	54,95	75,02	-89,41	52,95	77,77
P6	-104,90	52,86	92,46	-103,08	58,21	92,66
P5	-99,19	53,26	79,34	-103,11	54,29	77,44
P4	-115,98	58,93	76,69	-106,25	57,33	81,29
P3	-95,65	53,35	80,21	-95,64	57,27	71,99
P2	-112,06	53,47	95,30	-112,13	57,86	102,42
P1	-94,54	49,97	80,21	-96,72	45,22	81,26
moyenne	-101,7	54,7	82,5	-100,6	54,4	83,2

Figure IV.29 : Tableau des angles dièdres de chaque résidu dans les deux hélices de l'unité asymétrique de IV.D

Distance d(N-O) en Å de la liaison	Hélice 1		Hélice 2	
	C=O _i ...N'H _{i-2}	C=O _i ...NH _{i-3}	C=O _i ...N'H _{i-2}	C=O _i ...NH _{i-3}
i = 11	2,99	2,89	2,95	2,93
i = 10	2,87	3,29	2,85	3,18
i = 9	2,96	-	2,89	-
i = 8	3,04	2,95	2,97	2,97
i = 7	2,98	2,81	3,00	2,83
i = 6	2,95	2,83	2,87	2,93
i = 5	2,95	3,45	3,03	3,46
i = 4	3,02	2,86	2,93	2,82
i = 3	3,41	2,75	3,36	2,85
moyenne	3,02	2,98	2,98	3,00

Figure IV.30 : Tableau des longueurs des liaisons hydrogène présentes dans les deux hélices de l'unité asymétrique de IV.D

ii. Interactions intermoléculaires

Plusieurs autres interactions intermoléculaires entrent en jeu dans l'assemblage de ces molécules. Contrairement à ce qui était attendu, la position des chaînes latérales ne permet pas la formation de ponts salins intramoléculaires susceptibles de stabiliser les structures secondaires. Par contre il est possible d'en observer intermoléculairement avec une distance de 2.85 Å, entre les atomes d'azote et d'oxygène des résidus Lys^u et Glu^u de deux hélices antiparallèles voisines (Figure IV.31a).

Les résidus pyrrolidine jouent aussi un rôle important dans l'assemblage. En effet les résidus Pro^u et Ala^u semblent constituer à eux deux une face hydrophobe supplémentaire intervenant dans l'association de deux hélices antiparallèles (Figure IV.31b).

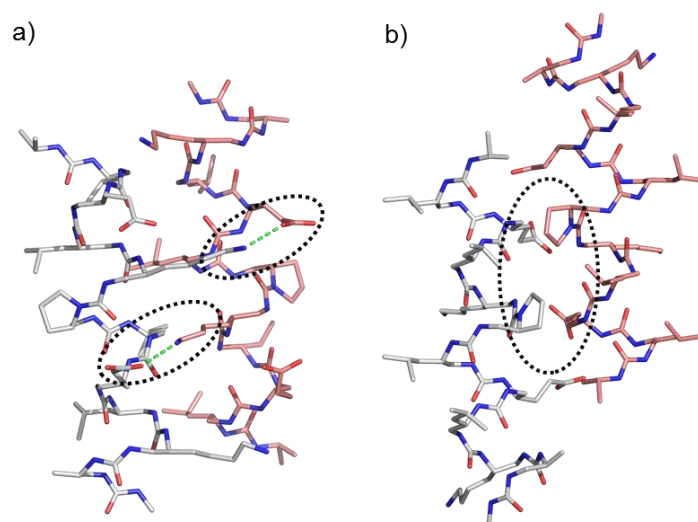


Figure IV.31 : a) ponts salins intermoléculaires, b) assemblage le long de la face hydrophobe supplémentaire constituée par les résidus Pro^{II}.

Il apparaît aussi que les hélices sont superposées selon leur axe longitudinal dans un empilement tête à queue similaire à celui observé dans les structures cristallines obtenues en solvant organique (Figure IV.32). Cet assemblage est maintenu par des liaisons hydrogène intermoléculaires entre les carbonyles et les NHs aux extrémités des deux molécules, relayées dans un cas par une molécule d'eau.

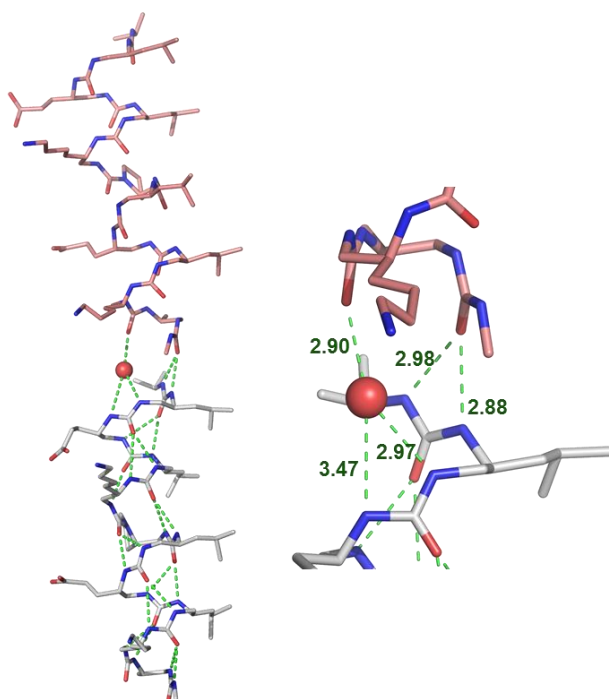


Figure IV.32 : assemblage longitudinal de deux hélices et détail du réseau de liaisons hydrogène intermoléculaires faisant apparaître un relai par une molécule d'eau.

b) Détail de l'assemblage supramoléculaire des hélices dans le cristal de IV.D

Toutes les interactions décrites ci-dessus participent à la formation d'une architecture organisée, principalement dirigée par des assemblages entre les chaînes hydrophiles d'une part, et les chaînes hydrophobes d'autre part. La large face composée de résidus hydrophobes aux trois positions *a*, *c* et *e* de l'hélice, conduit à la formation de canaux d'un diamètre de 15 Å. L'intérieur de ces canaux est polaire et composé par les chaînes latérales dérivées de l'acide glutamique (en bleu sur la Figure IV.33) et de la lysine (en orange sur la Figure IV.33), alors que la surface extérieure est hydrophobe et composée de chaînes de type leucine en vert et proline ou alanine en rouge.

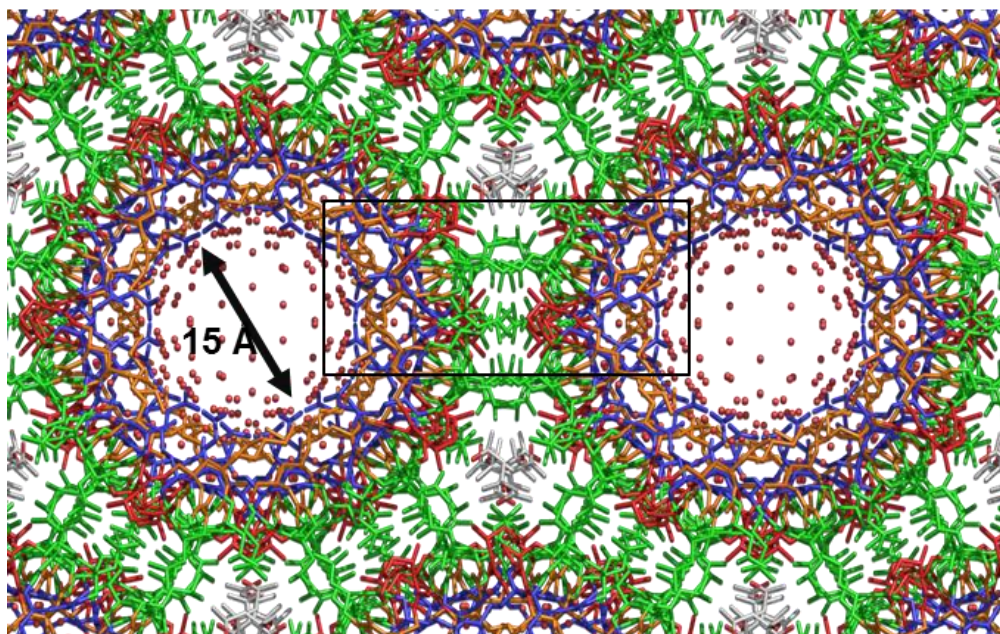
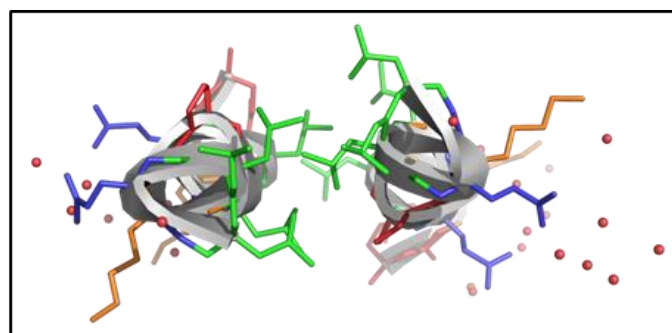


Figure IV.33 : Auto-assemblage des molécules IV.D dans le cristal (vue orthoscopique)

Les canaux et les structures tubulaires sont très présents dans les systèmes biologiques et notamment dans les membranes des cellules où ils permettent le transport de petites molécules. Il existe, entre autres, des canaux ioniques pouvant être sélectifs ou non à un type d'ion comme par

exemple la gramicidine plutôt perméables aux cations monovalents^[190], ou encore les canaux aqueux ne laissant passer que les molécules d'eau^[191]. Mais il est aussi possible d'observer des assemblages tubulaires dans d'autre cas comme certaines capsides virales (exemple : virus de la mosaïque du tabac^[192]).

Toutes ces structures et leur implication dans le transport de molécules ont poussé les chimistes à s'intéresser à la formation de canaux synthétiques à partir de peptides ou d'autres molécules. Par exemple, S. Matile et coll. ont synthétisé des molécules en forme de bâtonnets rigides (à partir de p-octiphenyle) conçues pour former des canaux ioniques dans les membranes.^[193] B. Gong et coll. ont formé des structures tubulaires à partir d'oligoamides macrocycliques^[194], et V. Percec et coll. ont quant à eux étudié la formation de canaux composés de dipeptides dendritiques (Figure IV.34).^[195]

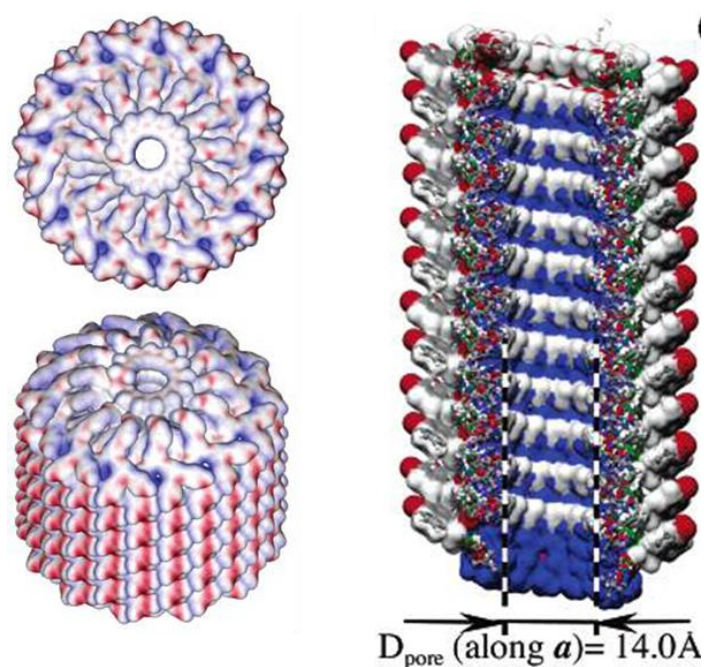


Figure IV.34 : Canal composé de dipeptides dendritiques^[195]

Dans les peptides, les faisceaux d'hélices peuvent adopter différents états d'oligomérisation, les plus communs étant les faisceaux comportant de 2 à 5 hélices. Il faut s'avoir qu'à partir de cinq hélices les faisceaux possèdent tous un canal central souvent utilisé pour le transport d'ions ou de petites molécules. Très peu de structures de haut degré d'oligomérisation ont été mises en évidence à ce jour. Cependant certains assemblages ont pu être résolus, notamment un faisceau du transporteur bactérien naturel TolC qui facilite le passage direct de substrats à travers deux membranes.^[196] Ce faisceau a la particularité d'être formé de 12 hélices, et peut atteindre un diamètre interne de 35 Å dans sa partie centrale (Figure IV.35).

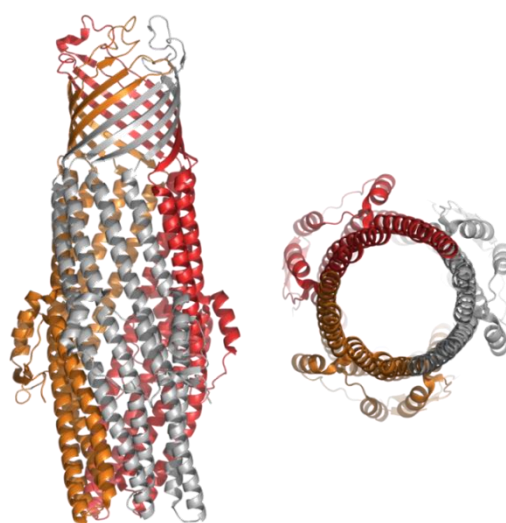


Figure IV.35 : Structure cristallographique d'une partie de la protéine membranaire TolC comportant un faisceau de 12 hélices^[196]

i. Description de la formation du canal

La formation du canal dans la structure de **IV.D** résulte de l'association de dimères d'hélices antiparallèles (Figure IV.36). Les chaînes polaires de types acide glutamique (bleu) et lysine (orange) sont situées à l'intérieur du canal alors que l'extérieur est composé des chaînes hydrophobes de type leucine (orange), proline (rouge) et alanine (rouge). Des ponts salins sont observables entre deux hélices voisines antiparallèles mais aussi entre deux hélices distantes parallèles. Les canaux sont reliés les uns aux autres par un assemblage dense résultant d'interactions de van des Waals entre les faces hydrophobes constituées par les chaînes isobutyle.

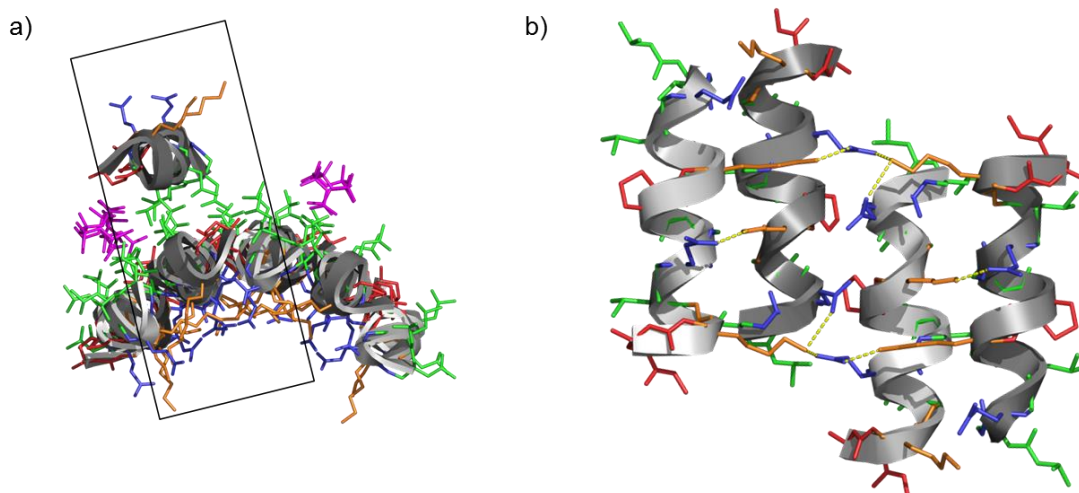


Figure IV.36 : a) partie de la paroi d'un faisceau, l'unité asymétrique étant encadrée ; b) ponts salins régissant l'assemblage de deux dimères antiparallèles

A plus large échelle, il s'avère que les dimères d'hélices antiparallèles s'assemblent selon une « super hélice » double, composée de 12 hélices par tour formant ainsi un canal infini (Figure IV.37).

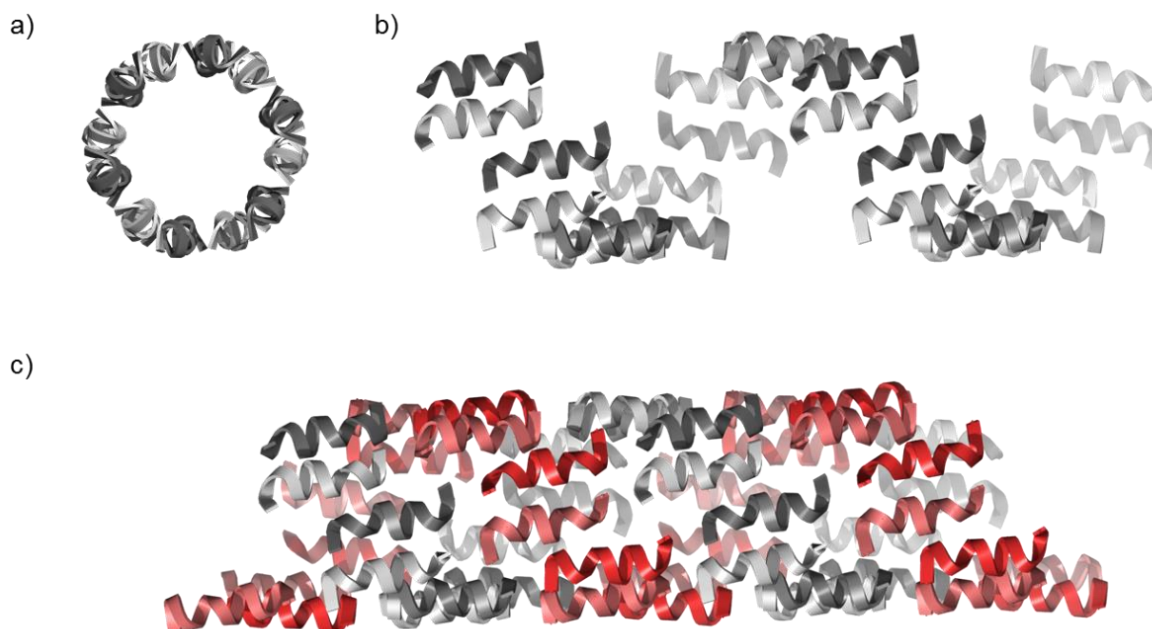


Figure IV.37 :a) et b) « super » hélice simple composée de 12 hélices par tour; c) assemblage sous forme de «super » hélice double.

ii. Canal ionique / canal aqueux

La paroi extérieure du canal composée des résidus Leu^u, Ala^u et Pro^u étant complètement hydrophobe, on pourrait imaginer que cette structure assemblée puisse se former et s'insérer dans des membranes lipidiques et jouer un rôle de pore. A l'inverse, la cavité intérieure est tapissée de chaînes chargées de types lysine et acide glutamique, elle est donc entièrement hydrophile et pourrait ainsi permettre le passage non sélectif de petites molécules polaires et de divers ions (Figure IV.38). De nombreuses études se sont intéressées à la formation de canaux ioniques artificiels mais peu de progrès ont été réalisés dans le domaine des canaux aqueux synthétiques. Dans notre cas, la présence de nombreuses molécules d'eau à l'intérieur de cette cavité hydrophile a pu être mise en évidence évoquant ainsi ce type de structure.

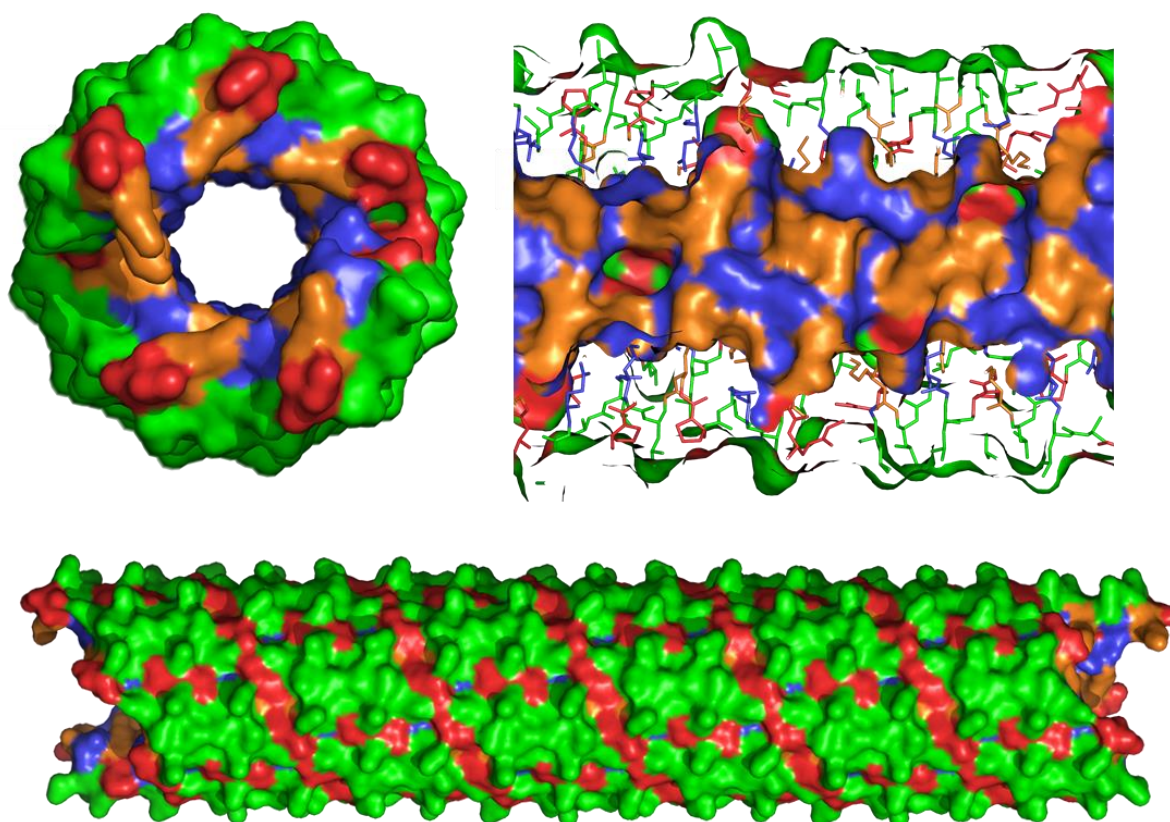


Figure IV.38 : Canal vu de dessus, de côté et en coupe transversale

Les aquaporines font partie de cette catégorie de canaux qui facilite le transport de l'eau à travers les membranes biologiques mais elles permettent aussi d'empêcher le passage des ions H_3O^+ . La résolution de certaines structures de ce type a permis de mieux comprendre les interactions mises en jeu dans ce transport sélectif.^[197] Il s'agit généralement de faisceau d'hélices transmembranaires comportant un rétrécissement du diamètre du canal jusqu'à 2.8 Å ne permettant ainsi le passage que d'une seule molécule d'eau à la fois tout en les orientant de manière à empêcher la formation de liaisons hydrogène susceptibles de relayer le transfert de protons (Mécanisme de Grothuss^[198]). Des répulsions électrostatiques générées par des chaînes électropositives de type arginine permettent ensuite d'empêcher le passage des ions. Très récemment, R. Neutze et coll. ont mis en évidence la présence de deux régions centrales impliquées dans cette fonction sélective qui sont le motif typique des aquaporines composé des résidus asparagine-proline-alanine et le filtre ionique comportant des résidus aromatiques et arginine situé près de l'entrée extracellulaire.^[191]

Dans notre cas le canal d'un diamètre de 15 Å, est trop large pour être sélectif. Les molécules d'eau présentes à l'intérieur de la cavité ont été représentées en couleur en fonction de la valeur du facteur d'agitation thermique (Figure IV.39 b et c). Les couleurs froides (bleues et vertes) signalent les

molécules les moins mobiles alors que les couleurs plus chaudes (jaune, orange et rouge) témoignent d'une dynamique accentuée. Les molécules les moins mobiles sont donc situées à proximité des résidus chargés ou elles sont stabilisées par des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogène. Ces chaînes latérales forment notamment des poches hydrophiles qui retiennent les molécules d'eau. A l'inverse les molécules situées au centre sont trop éloignées pour interagir directement avec la paroi du canal et sont donc plus mobiles.

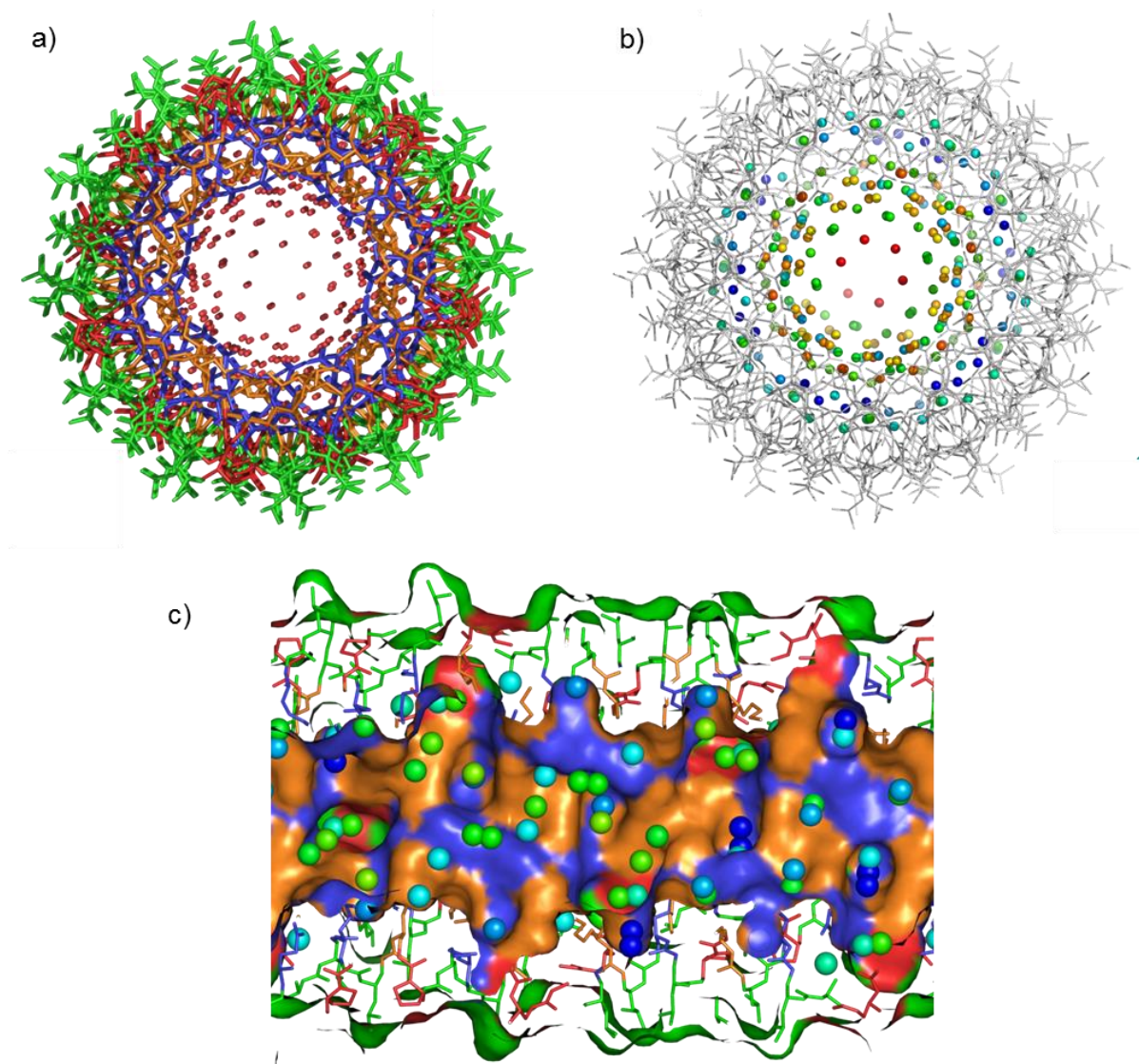


Figure IV.39 : a) représentation des molécules d'eau présentes à l'intérieur du canal ; b) Les molécules sont colorées en fonction de leur degré de mobilité, plus elles sont mobiles plus les tons sont chauds (du bleu vers le rouge) c) coupe transversale du canal illustrant les cavités polaires dans lesquelles se logent les molécules d'eau proche de la paroi intérieure

III. Conclusion et perspectives

Pour conclure nous sommes parvenus à adapter la stratégie de synthèse par condensation de segments développée dans le chapitre précédent à la synthèse d'oligourées amphiphiles solubles dans l'eau grâce à l'utilisation des microondes. Les études spectroscopiques en milieu aqueux suggèrent que ces molécules (**IV.A**, **IV.B**, **IV.C**) adoptent toujours une structure en hélice 2.5 similaire à celles obtenues pour les oligourées en milieu organique, mais de stabilité atténuée. Nous n'avons pas pu mettre en évidence la formation d'un assemblage d'ordre plus élevé. Afin d'améliorer la stabilité de ces structures secondaires et renforcer leur capacité à s'assembler, nous avons développé un nouveau design permettant la formation de ponts salins intramoléculaires en rapprochant les chaînes latérales polaires de types acide glutamique et lysine (**IV.D** et **IV.E**). Les analyses en solution révèlent une amélioration de la stabilité de la structure secondaire ainsi qu'une très bonne stabilité thermique. Les études de dichroïsme circulaire réalisées à différentes concentrations évoquent quant à elles la formation d'un assemblage bien défini d'ordre plus complexe qui a pu être confirmé par l'obtention de la structure cristallographique. Cette molécule **IV.D** adopte effectivement une structure secondaire hélicoïdale stabilisée par un réseau de liaisons hydrogène à trois centres proche de l'hélice canonique des oligourées. Les hélices interagissent entre elles par une collection d'interactions de type van der Waals (contact entre les chaînes isobutyles) et électrostatiques (pont salins entre les résidus chargés) pour former un assemblage complexe présentant une topologie de type pore. Finalement, il s'avère que le résidu pyrrolidine utilisé pour la jonction des segments lors de la synthèse participe à la création d'une face hydrophobe supplémentaire essentielle pour l'interconnexion des hélices et la formation du canal. Le canal se caractérise par une surface extérieure hydrophobe et une cavité intérieure polaire contenant de nombreuses molécules d'eau. Le diamètre relativement large de 15 Å ne permet pas d'assimiler cette structure aux canaux aqueux biologiques mais il évoque cependant la structure des canaux ioniques observables dans les membranes cellulaires. Il serait donc intéressant de tester la capacité de ces molécules à former des canaux dans les membranes lipidiques. Il devrait également être aisé de moduler cette séquence par l'introduction de mutations ponctuelles pour disséquer les déterminants structuraux de ce canal auto assemblé, ou pour en moduler certains paramètres comme la polarité ou le diamètre.

Cette première structure d'oligourée en milieu aqueux constitue un précédent important et est une source d'inspiration pour la conception de nouvelles séquences visant à former des assemblages discrets de topologies différentes. Pour s'approcher de la formation d'un assemblage quaternaire discret, on peut envisager par exemple de réduire le nombre de résidus hydrophobes afin de « resserrer » la structure assemblée autour d'un cœur hydrophobe plus compact. Pour ce faire, nous pourrions par exemple remplacer le cycle pyrrolidine par un résidu polaire de type hydroxyproline ou tyrosine. Il est également possible de moduler la taille de ce cœur en variant la longueur des chaînes

hydrophobes, par exemple en introduisant des chaînes isopropyles (type valine) ou bien *sec*-butyles (type isoleucine).

Ainsi, tout récemment, ces principes ont été appliqués avec succès par K. Pulka une stagiaire post-doctorale dans l'équipe. Une de ces molécules de seconde génération a été cristallisée par G. Collie et la structure cristallographique révèle une structure quaternaire discrète (Figure IV.40), stabilisée par la formation d'un cœur hydrophobe compact impliquant six hélices, finalement assez voisine de celle décrite par Alanna Schepartz avec les β -peptides.^[68]

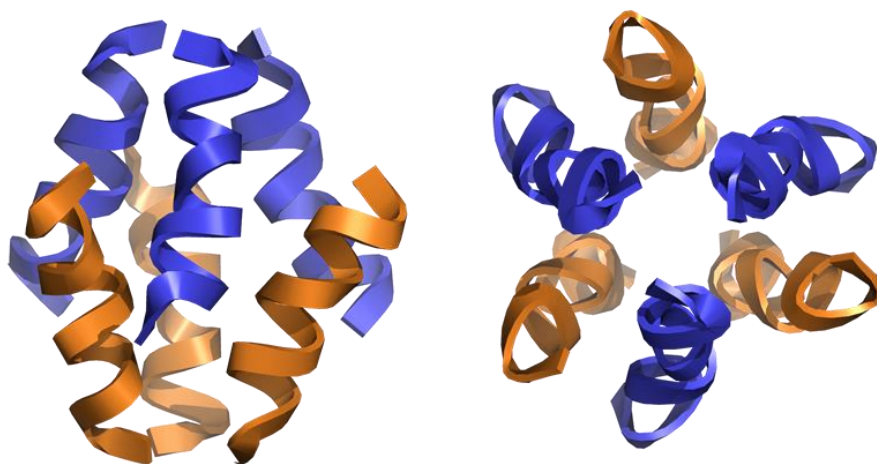


Figure IV.40 : Structure cristallographique d'un faisceau à six hélices formé à partir d'une séquence oligomère amphiphile de deuxième génération (K. Pulka, données non publiées)

CHAPITRE V

Synthèse d'hélices chimères α -peptide /oligourée

CHAPITRE V. : Synthèse d'hélices chimères α -peptide /oligourée

Les techniques de synthèse de protéines natives ont beaucoup évolué au cours des dernières années, mais tout récemment, avec le développement des foldamères, l'intérêt s'est porté sur la création de biomacromolécules hybrides avec l'objectif d'améliorer la stabilité thermodynamique des structures, de développer de nouveaux modes d'interactions ou encore de modifier les propriétés pharmacocinétiques (stabilité à la protéolyse,...).

Ainsi la synthèse de protéines semi-synthétiques, comme présentée dans le Chapitre I, paragraphe I.2, a attiré une attention croissante de la communauté. Une nouvelle méthode de synthèse par ligation chimique a notamment permis à plusieurs groupes de remplacer des segments plus ou moins longs de protéines par des segments non naturels. Par exemple R.T. Raines associé à S. Gellman ont montré que le remplacement d'un tour β de la ribonucléase A par un segment β peptidique améliorait la stabilité de la structure tout en conservant l'activité catalytique.^[48] L'équipe de A.G. Beck-Sickinger associée à celle de D. Seebach a quant à elle remplacé un élément entier de structure secondaire de l'interleukine 8 humaine par une hélice composée d'acides aminés β et montré que l'activité était comparable à celle de la protéine native malgré quelques différences structurales entre le β -peptide et l' α -peptide initial.^[50]

Un grand nombre d'interactions assurées par les protéines implique des domaines α -hélicoïdaux, c'est pourquoi les hélices α synthétiques et leurs mimes suscitent aujourd'hui un intérêt croissant pour moduler notamment les interactions protéine-protéine en vue d'applications thérapeutiques.^[199] Dans ce contexte les foldamères hélicoïdaux représentent de très bons supports pour mimer des fragments de peptides. Cependant il est parfois difficile de reproduire la distribution spatiale des chaînes latérales clés impliquées dans les mécanismes de liaison à la surface de la protéine cible en utilisant seulement des homo-oligomères synthétiques. L'attention s'est portée plus récemment sur la synthèse d'oligomères chimériques combinant une séquence α -peptidique avec une chaîne oligomérique non naturelle.

K. Kirshenbaum et coll.^[200] ont décrit une stratégie pour synthétiser des molécules hybrides par condensation d'un segment peptoïdique avec un segment peptidique (Figure V.1). Ils espèrent à présent utiliser cette méthode pour synthétiser des macromolécules plus complexes alliant les capacités structurales et fonctionnelles des deux familles d'oligomères.

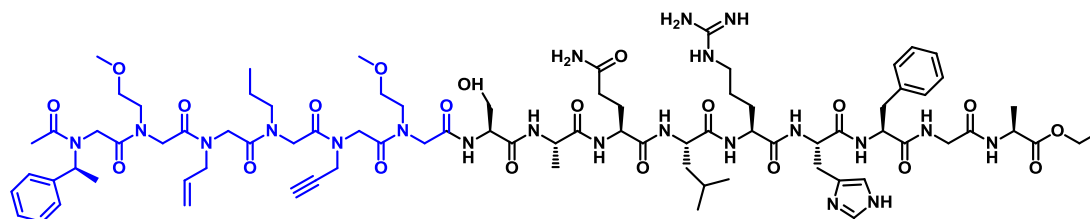


Figure V.1 : Schéma d'une molécule hybride peptoïde/ α -peptide.^[200]

S. Gellman et coll. sont allés plus loin et sont parvenus à reproduire la structure d'un peptide dérivé d'une séquence de la protéine du VIH gp41 connu pour son efficacité antivirale.^[66] En mimant la partie α -peptidique C-terminale par une séquence chimérique ($\alpha+\alpha/\beta$) peptidique (Figure V.2), ils ont observé une affinité de liaison au peptide issu de la région N-terminale de gp41 identique à celle de l' α -peptide initial et montré que cette molécule interagit avec la région N-terminale de gp41 en adoptant une structure quaternaire très similaire. Les molécules hybrides synthétisées sont également capables de bloquer la fusion des cellules de VIH grâce à un mécanisme comparable à celui des α -peptides dérivés de la protéine gp41.

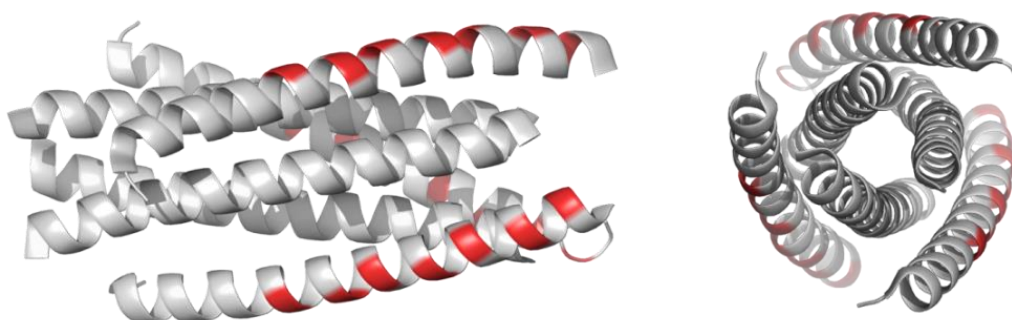


Figure V.2 : Structure cristallographique du faisceau d'hélices formé par un assemblage d'hélices α -peptides et de séquences hybrides ($\alpha+\alpha/\beta$) peptidique.^[66]

Ces auteurs ont utilisé une stratégie équivalente pour mimer le domaine hélicoïdal BH3 des membres de la famille Bcl-2.^[201, 202] Ils ont montré que l'hélice d'un peptide chimérique non périodique ($\alpha/\beta+\alpha$) V.1 conservait l'affinité de liaison à la protéine cible contrairement à un homooligomère β -peptide (Figure V.3). Les corrélations NOE indiquent que cette molécule V.1 adopte une structure particulière en hélice 14/15 dans sa région N-terminale qui se poursuit par une hélice α dans la région C-terminale.

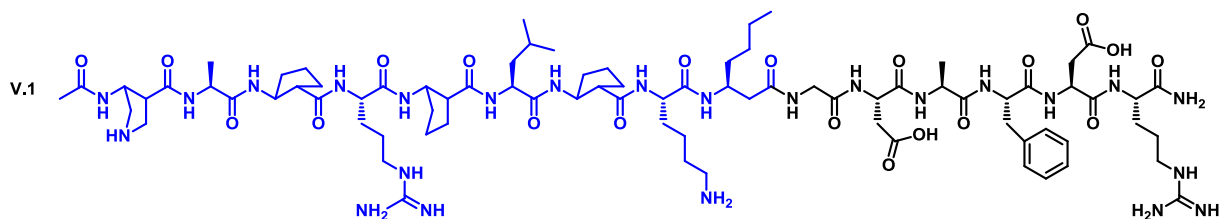
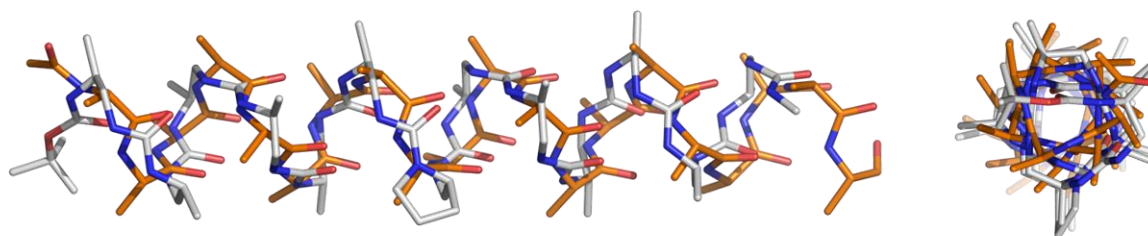


Figure V.3 : Formule de l'oligomère hybride ($\alpha/\beta+\alpha$) peptide V.1 ^[201]

Avec un objectif similaire nous avons souhaité étudier l'aptitude des foldamères d'oligourées à promouvoir la formation d'hélices α -peptidiques dans des oligomères chimères α -peptide /oligourée.

I. Molécules chimères α -peptide /oligourée en milieu organique

Les oligomères à base d'urée adoptent des structures secondaires en hélice 2.5 similaires aux hélices α . Une différence majeure entre les deux familles d'hélices réside cependant dans le nombre de résidus par tour qui est de 3.6 pour les hélices α contre 2.5 pour celles d'oligourées (Figure V.4). La position des chaînes latérales dans l'espace est donc sensiblement différente compliquant ainsi la conception de séquences non peptidiques capables de mimer des hélices α .



	nombre de résidu par tour	élévation par résidu (Å)	pas de l'hélice (Å)	rayon moyen (Å)
hélice α	3,6	1,5	5,4	2,3
hélice d'oligourée	2,5	2,0	5,1	2,6

Figure V.4 : Superposition d'une hélice α et d'une hélice 2.5 d'oligourée^[174] (le RMSD sur 11 paires de carbones asymétriques est de 1.08 Å) et tableau comparatif des paramètres des deux types d'hélices

1. Synthèse

Nous nous sommes donc intéressés à la synthèse de molécules chimères comportant un segment α -peptide lié à une oligourée. Nous avons conçu deux séquences chimères V.A et V.B l'une avec le segment oligourée couplé à l'extrémité N-terminale d'un court peptide et l'autre avec le segment

oligourée couplé à l'extrémité C-terminale du peptide (Figure V.5). Le segment oligourée sélectionné est un hexamère de séquence Val^u-Ala^u-Leu^u-Val^u-Ala^u-Leu^u connu pour adopter une conformation en hélice 2.5 particulièrement stable. La séquence du térapeptide modèle choisi pour cette étude est Ala-Leu-Ala-Leu.

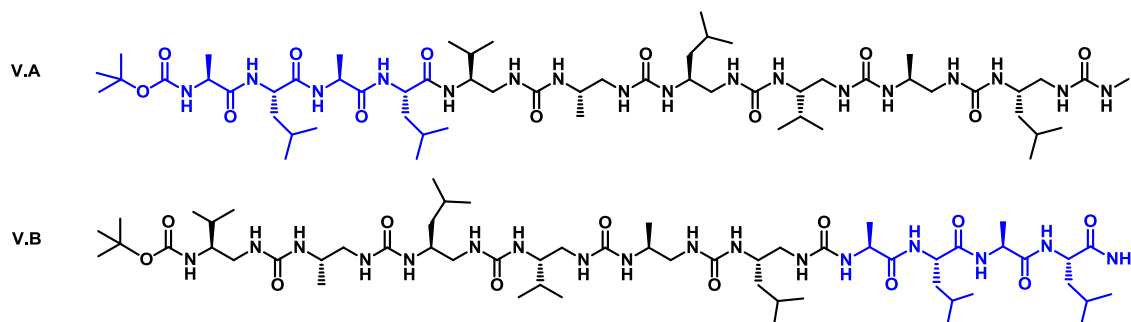


Figure V.5 : Schéma des molécules V.A et V.B

a) Synthèse en solution de l'oligomère α -peptide/oligourée V.A

L'oligomère V.A a été synthétisé à partir de l'oligourée de 6 résidus **6** (déjà utilisée dans le chapitre III pour la synthèse des composés de la série (**6P**)_n) par couplage peptidique séquentiel des acide α -aminés protégés par un groupement Boc. A la fin de chaque étape, le produit est tout d'abord précipité par ajout d'eau puis purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (Figure V.6).

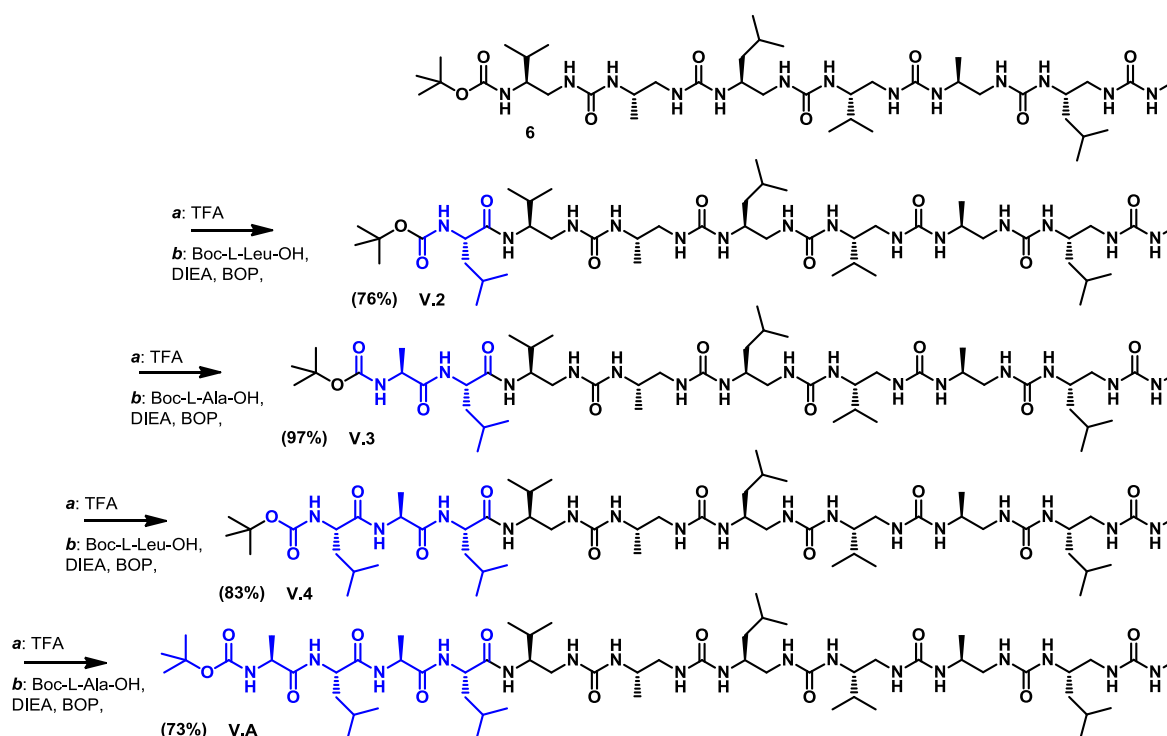


Figure V.6 : Schéma de synthèse en solution de l'oligomère chimère V.A

Afin d'évaluer l'influence de l'hélicité de la chaîne oligourée sur la conformation du segment peptidique nous avons synthétisé deux autres molécules plus courtes. La première ne comportant que deux résidus de type oligourée accolés à la partie peptidique **V.C** et la deuxième correspondant uniquement au peptide de 4 acides aminés **V.D** (Figure V.7) (les schémas de synthèses sont présentés dans la partie expérimentale).

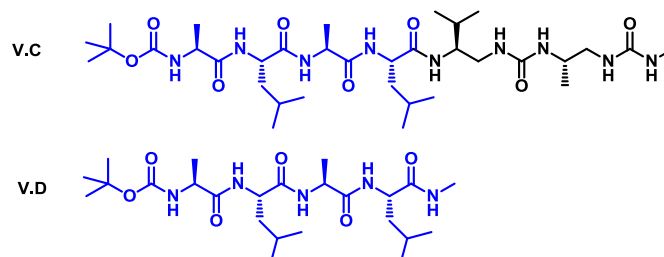
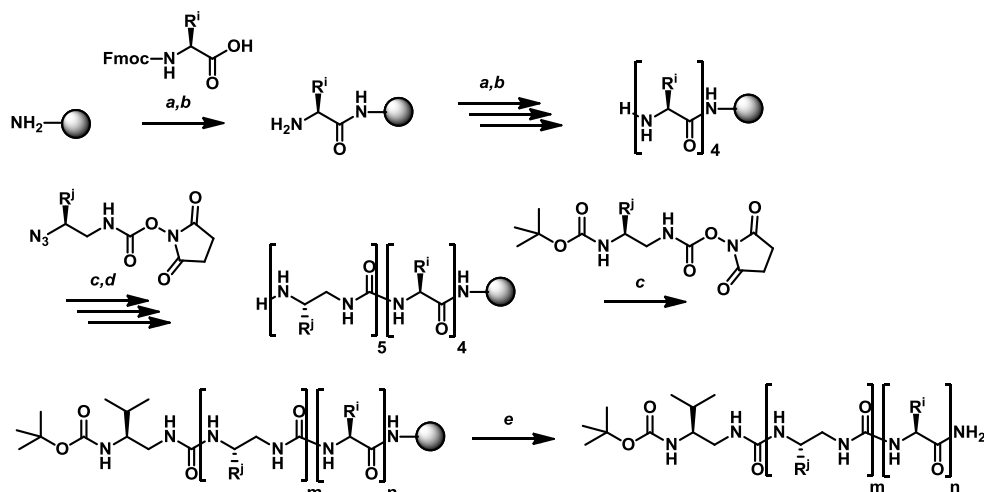


Figure V.7 : Schéma des molécules **V.C** et **V.D**

b) Synthèse en phase solide de l'oligomère **V.B**

Pendant une grande partie de mon travail de thèse, j'ai privilégié la synthèse en solution des oligourées en raison de sa flexibilité et des développements que nous avons pu proposer. Toutefois des travaux récents au sein de l'équipe rendent aujourd'hui la synthèse des oligourées sur support solide très compétitive en termes de rapidité et de modularité. La synthèse des oligourées a été adaptée très tôt sur support solide.^[114, 146] Toutefois, la méthodologie utilisée dans le laboratoire^[122] bien que très robuste restait limitée à l'utilisation de monomères *N*-Boc protégés, nécessitait l'utilisation d'un large excès de monomère (3 équivalents), et la molécule finale devait être clivée par un traitement à l'acide fluorhydrique. Très récemment une nouvelle approche de synthèse sur support solide, rapide et compatible avec l'emploi de résines sensibles aux acides comme le TFA (ex résine rink amide) a été développée au laboratoire par C. Douat-Casassus et K. Pulka.^[203] Cette méthode utilise le couplage sous champ micro-ondes de monomères azoture activés sous forme de carbamate de succinimide. L'azoture est réduit par la triméthylphosphine pour permettre le couplage du monomère suivant. K. Pulka s'est servie de cette stratégie pour préparer l'oligomère **V.B** possédant le segment α -peptidique en position *C*-terminale (Figure V.8). Pour pouvoir introduire et conserver un groupement Boc terminal, elle s'est servie de la résine Sieber^[204] qui peut être clivée dans des conditions très faiblement acides (1-2% de TFA dans CH_2Cl_2). Les acides α -aminés protégés par un groupement Fmoc ont été couplés en présence d'HBTU et d'HOBt. La molécule a finalement été purifiée par chromatographie éclair sur gel de silice après clivage de la résine.



a: Fmoc-AA, DIEA, HBTU, HOBT, 50W, 50°C, 10min ; b: piperidine, DMF, 50W, 50°C, 8 min ;
 c: monomère azoture activé, DIEA, DMF, 50W, 50°C, 20min; d: PMe_3 (1M), THF, 50W, 50°C, 30 min ;
 e: TFA 1% dans le CH_2Cl_2 , pyridine 10% dans le CH_3OH

Figure V.8 : Schéma de synthèse sur support solide de l'oligomère chimère V.B

2. Analyse conformationnelle des oligomères chimères

a) En solution par CD dans le TFE à 0.2 mM

Comme les molécules chimères contiennent deux types de chromophores, les spectres de dichroïsme circulaire n'ont pas été rapportés au nombre de résidus.

Toutes les molécules comportant un segment oligourée de 6 résidus présentent le signal caractéristique des hélices 2.5 dans le TFE. L'ellipticité molaire à 203 nm (de l'ordre de $50 \times 10^4 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) est similaire pour la molécule uniquement composée de résidus de type urée (6) et les deux autres molécules auxquelles nous avons accolé un segment peptidique (V.A et V.B). L'ajout de ce segment de 4 acides aminés ne modifie pas ou peu le signal (Figure V.9).

Les molécules plus courtes majoritairement composées d'acides α -aminés V.C et V.D présentent quant à elles un signal de faible intensité comportant un maximum vers 185 nm et un minimum négatif autour de 200 nm (ellipticité molaire de l'ordre de $-100 \times 10^4 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$). Ce signal ne correspond pas à celui observé pour les hélices α qui est composé d'une bande positive à 195 nm et de deux bandes négatives à 208 et 222 nm.^[205]

Pour étudier l'influence du segment peptidique sur la formation des hélices chimères, nous avons additionné de manière théorique les signaux du segment de 4 acides aminés (V.D) et celui de l'hexamère de type oligourée (6) (violet sur la Figure V.9). L'intensité du signal résultant est légèrement inférieure à celle observée réellement pour les molécules V.A et V.B. Ainsi dans V.A et V.B, le signal CD négatif résultant de la contribution peptidique à 200 nm est compensé par une augmentation du signal caractéristique de l'hélice oligourée. Le segment peptidique n'a donc pas d'effet déstabilisateur sur la conformation hélicoïdale adoptée par la partie oligourée

Même si le signal est très similaire pour les deux molécules chimères, une légère différence est identifiable à 220 nm. Dans le cas de l'oligomère comportant les acides aminés en position *N*-terminale (**V.A**), une légère bande négative est observée à 220 nm ($-3,5 \times 10^4 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) correspondant probablement à la contribution du segment peptidique. Cependant cette signature n'apparaît pas lorsque ce dernier est positionné à l'extrémité *C*-terminale (**V.B**). Bien qu'il soit tentant de relier ce signal à la bande caractéristique à 220 nm des hélices peptidiques, il reste difficile de conclure sur la base de ces expériences de dichroïsme circulaire.

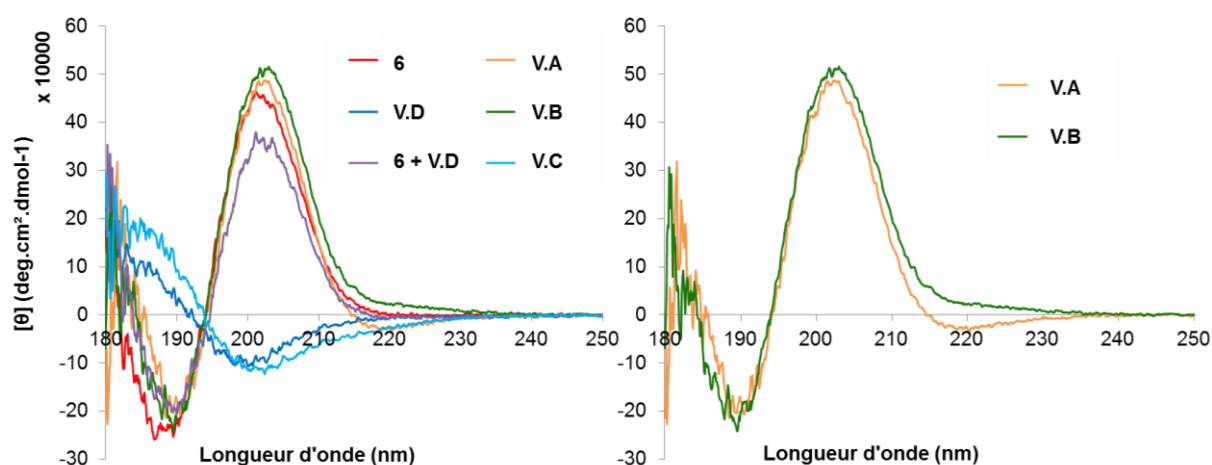


Figure V.9 : Spectres de dichroïsme circulaire réalisés dans le TFE à 0.2 mM

b) En solution par RMN

Les spectres RMN réalisés dans le CD_3OH des deux molécules **V.A** et **V.B** présentent toutes les caractéristiques de la formation d'une hélice, notamment une très bonne dispersion des signaux correspondants aux NHs (Figure V.10). On peut voir que les protons amides des acides α aminés sont déblindés (entre 7.2 et 9.2 ppm) par rapport aux protons urées et que les constantes de couplages en 3J sont relativement élevées entre 5.9 et 7.6 Hz alors qu'elles sont généralement situées autour de 4-5 Hz pour les conformations α -hélicoïdales des polypeptides. En ce qui concerne les NHs des fonctions urées, on retrouve des constantes $^3J(\text{NH}, ^\beta\text{CH})$ autour de 10 Hz caractéristiques des hélices 2.5 d'oligourées.

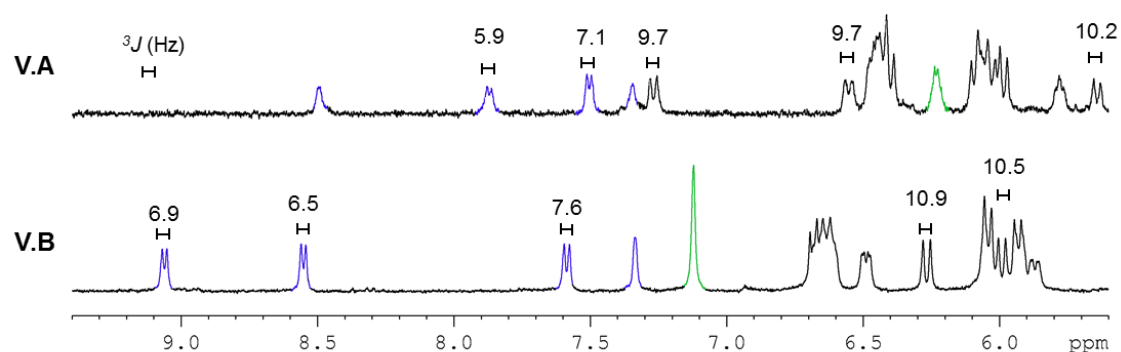


Figure V.10 : Zones des spectres RMN ^1H correspondant aux NHs des molécules chimères **V.A** et **V.B** (les NHs des acides α -aminés sont représentés en bleu et les NH en position C-terminale, NHMe pour **V.A** et NH_2 pour **V.B**, en vert) réalisés dans le CD_3OH (400 MHz)

Nous nous sommes ensuite intéressés à la vitesse d'échange des protons NH avec le deutérium à 4 mg/ml dans le CD_3OD . Une étude rapide réalisée à température ambiante montre que les protons des fonctions amides s'échangent presque instantanément dans le cas de la molécule **V.A** (Figure V.11). En revanche les protons des fonctions urées des résidus centraux NH_3 , NH_4 , $\text{N}'\text{H}_4$, NH_5 et $\text{N}'\text{H}_6$ persistent plus d'une heure ce qui indique une forte implication dans les liaisons hydrogène intramoléculaires.

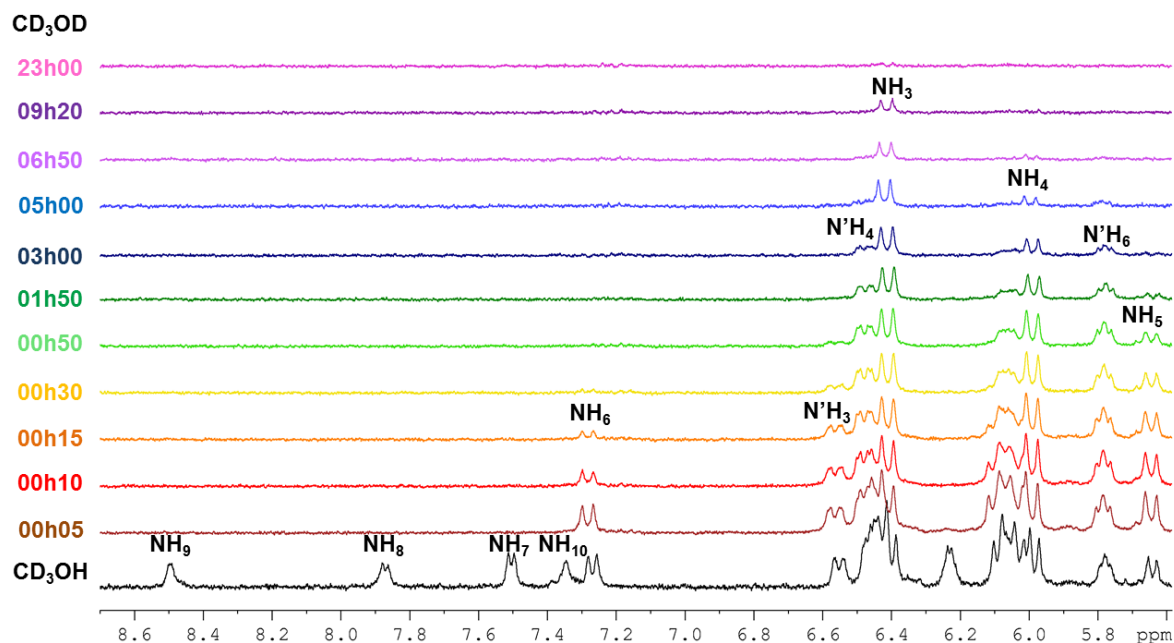


Figure V.11 : zone des spectres RMN ^1H correspondant aux NHs, présentant l'évolution des échanges protons/deutériums pour la molécule **V.A** en fonction du temps (4 mg/ml, CD_3OD , 300 MHz, 20°C)

En ce qui concerne la molécule **V.B**, les premières observations sont similaires (Figure V.12). Les protons des fonctions amides s'échangent très rapidement avec le deutérium même si la cinétique est globalement plus lente que pour la molécule **V.A**. Le signal du proton amide NH_4 , situé à la jonction entre les deux segments met quant à lui plusieurs heures à disparaître ce qui révèle sa participation à des liaisons hydrogène. De la même manière que précédemment les protons NH des fonctions urées ne s'échangent que très lentement. Cependant on peut noter une grande différence de cinétique générale. En effet dans le cas de la molécule **V.B**, des signaux sont toujours visibles après plus de 47h, alors que ces signaux ont entièrement disparus après une vingtaine d'heures pour la molécule **V.A**. Il semblerait donc que les liaisons hydrogène soient plus robustes lorsque le segment peptidique est introduit en position *C*-terminale.

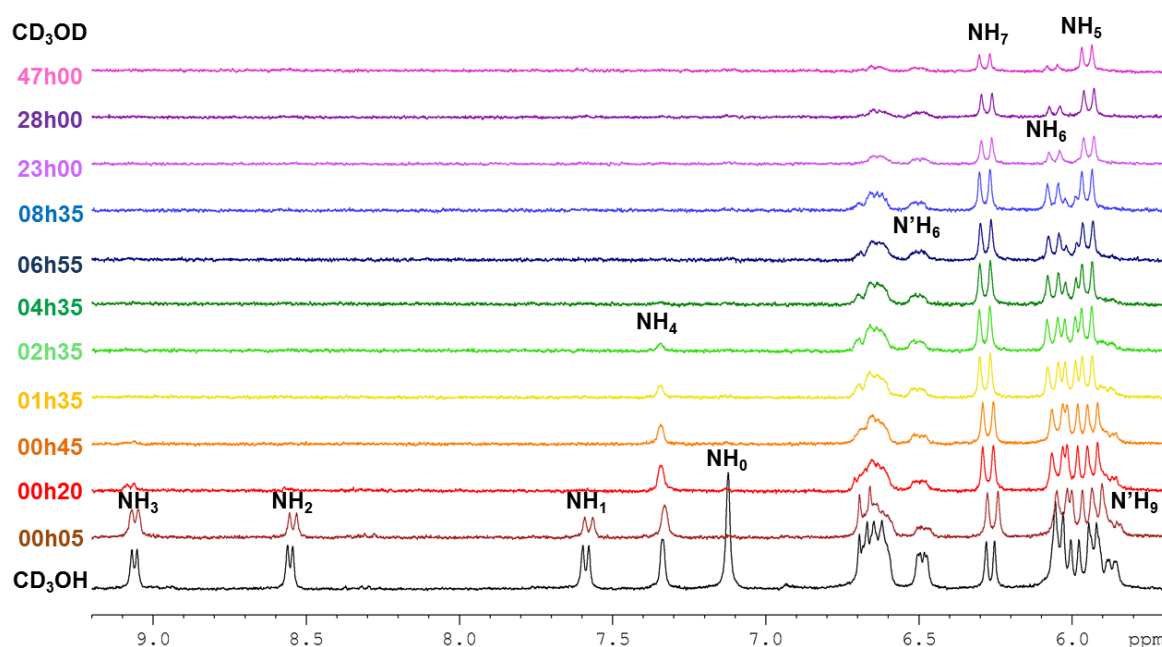


Figure V.12 : zone des spectres RMN ¹H correspondant aux NHs présentant l'évolution des échanges protons/deutériums pour la molécule **V.B** en fonction du temps (4 mg/ml, CD₃OD, 300 MHz, 20°C)

Les spectres 2D COSY et TOCSY nous ont permis d'attribuer tous les signaux et de mesurer les écarts de déplacements chimiques pour les protons ^αCH₂ des résidus urée de la chaîne principale (Figure V.13). Il s'avère que les valeurs sont relativement élevées, entre 0.81 et 1.36 ppm pour chacune des deux molécules. Cependant les valeurs diminuent à la jonction avec la partie peptidique pour la molécule **V.A** (0.81 ppm à la position P6) ce qui n'est pas le cas pour la molécule **V.B** qui conserve des valeurs élevées (1.27 ppm pour le résidu Leu^u dans **V.B** versus 0.93 ppm dans **V.A**) compatibles avec une stabilisation de la structure hélicoïdale à la jonction avec la partie peptidique et avec une possible persistance de la structure hélicoïdale au niveau des premiers résidus d'acides β-aminés.

$\Delta\delta$ (ppm)	α -pept.	Val ^u	Ala ^u	Leu ^u	Val ^u	Ala ^u	Leu ^u	α -pept.
6	X	0,98	1,22	1,21	1,36	1,29	0,94	X
V.A	-	0,81	1,08	1,12	1,15	1,19	0,93	X
V.B	X	0,93	1,29	1,36	1,14	1,25	1,27	-

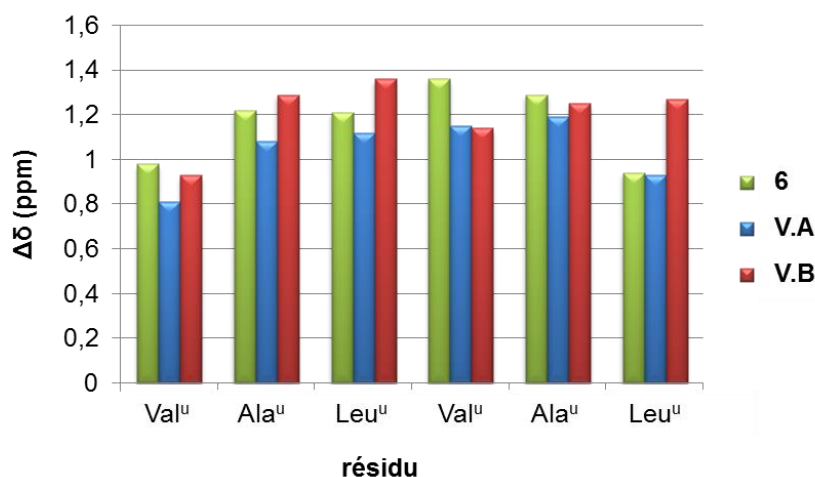


Figure V.13 : Ecart de déplacement chimiques $\Delta\delta$ ($^u\text{CH}_2$) mesurés pour les différents résidus de type urée des molécules **6**, **V.A** et **V.B**

Nous avons aussi pu observer certaines corrélations NOE qui permettent d'affirmer que la molécule **V.A** adopte une structure hélicoïdale (Figure V.14). Les corrélations entre les protons N^iH_i et $^{\beta}\text{CH}_{i+2}$ témoignent de la formation d'une hélice 2.5 dans le segment hexamérique de type urée. Celles observées entre les protons NH_i et $^{\alpha}\text{CH}_{i+3}$, et NH_i et $^{\alpha}\text{CH}_{i+1}$ indiquent que l'hélice se poursuit dans la partie peptidique mais il n'y a pas suffisamment de corrélations pour déterminer exactement de quel type d'hélice il s'agit.

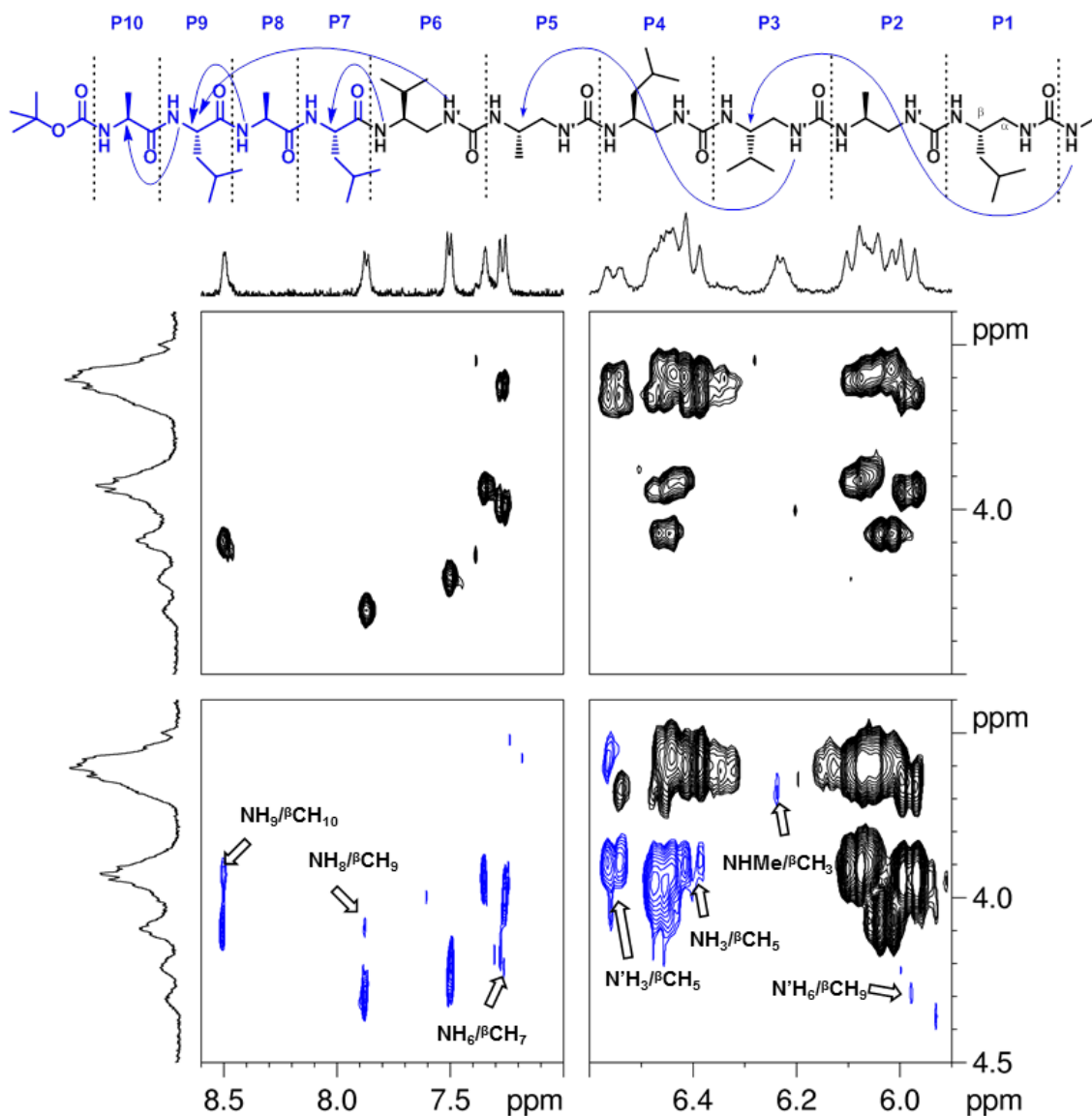


Figure V.14 : Corrélations NOE observées pour la molécule V.A dans le CD₃OH

Les mêmes types d'observations ont été réalisés sur la molécule V.B (Figure V.15). En effet les multiples corrélations entre les protons NⁱH_i et ^βCH_{i+2} dans la partie oligourée sont caractéristiques de la formation d'une hélice 2.5. De plus la présence de corrélations directes entre les deux segments de l'oligomère (comme par exemple entre NH₂-^βCH₅) révèle une continuité de la structure hélicoïdale.

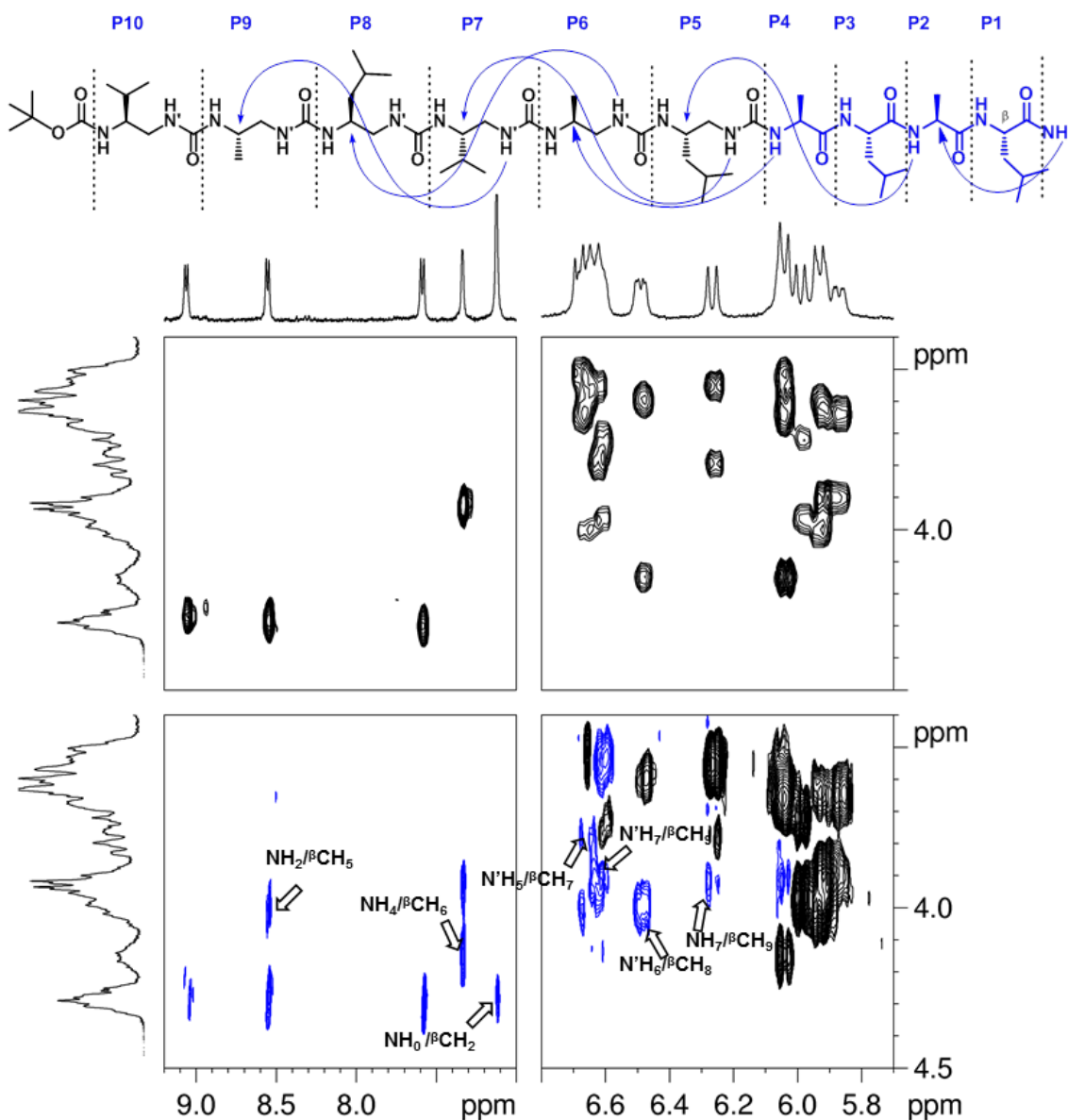


Figure V.15 : Corrélations NOE observées pour la molécule **V.B** dans le CD_3OH (400 MHz)

Ainsi il semblerait que les segments de type oligourée de ces deux molécules chimères adoptent des structures en hélice 2.5 capables d'induire une structuration possiblement en hélice du petit segment peptidique situé à l'une ou l'autre des extrémités.

c) En phase cristalline

Différentes conditions de cristallisation ont été testées pour les deux oligomères chimériques et des cristaux des deux molécules **V.A** et **V.B** ont été obtenus. A ce jour, seule la structure de la molécule **V.A** possédant le segment peptidique en position *N*-terminale a pu être résolue (Figure V.16). Une optimisation des cristaux de **V.B** reste nécessaire. Comme suggéré par les analyses en solution, la molécule **V.A** adopte une structure en hélice continue entre la partie oligourée et

peptidique. Dans une maille cristallographique, deux hélices 1 et 2 légèrement différentes d'un point de vue conformationnel, sont orientées de manière antiparallèle (Figure V.16).

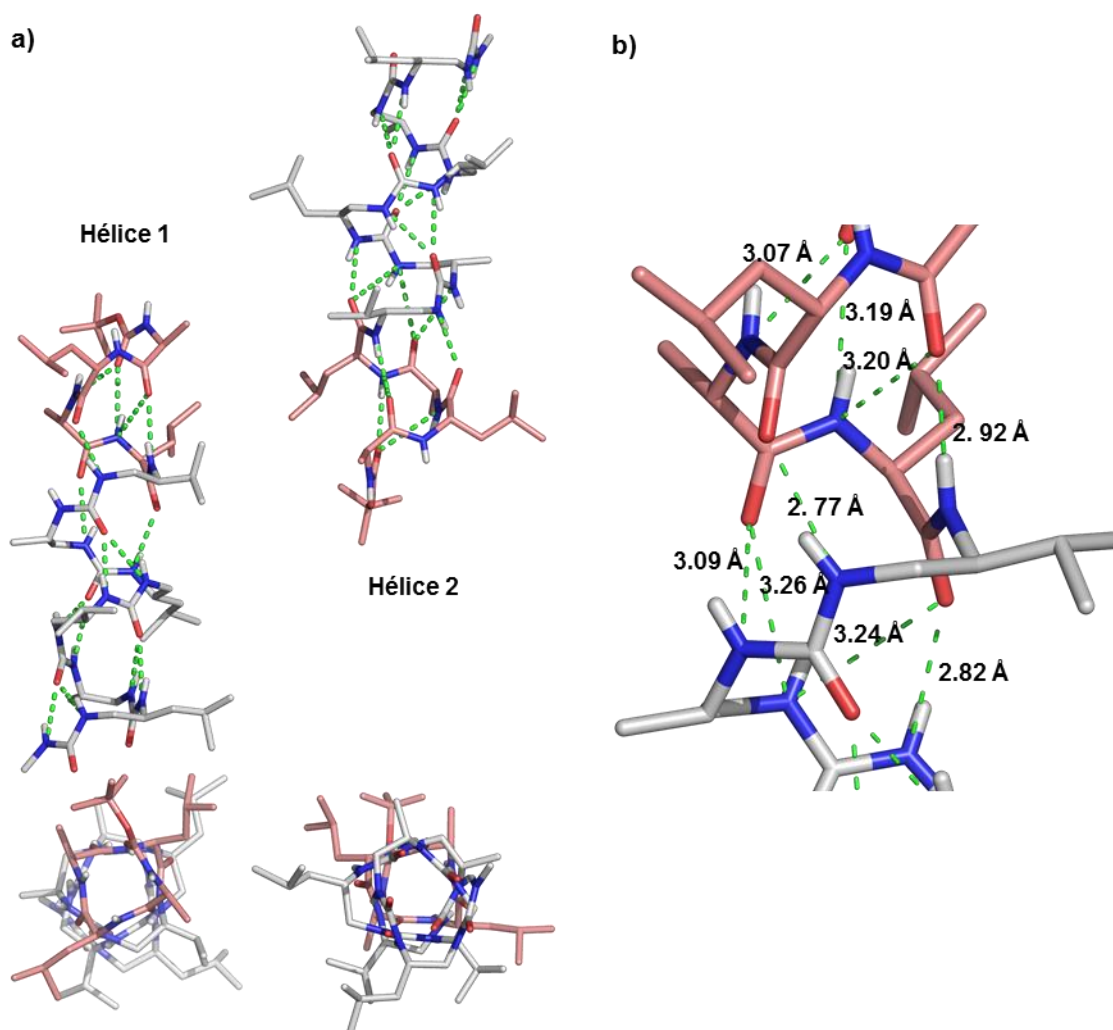


Figure V.16 : Structure cristallographique de la molécule **V.A** ; a) unité asymétrique comportant deux hélices antiparallèles ; b) réseau de liaisons hydrogène (hélice 2) à la jonction entre les deux parties oligourée et peptidique

La structure est stabilisée par des liaisons hydrogène présentes tout le long de la séquence (Figure V.17). Comme attendu, le réseau de liaisons hydrogène à 3 centres caractéristique de la formation des hélices 2.5 est conservé dans la partie oligourée. Dans la partie peptide, on observe également la formation de liaisons hydrogène à 3 centres de type 1 \leftarrow 3 et 1 \leftarrow 4 fermant respectivement des pseudocycles à 10 et 13 atomes. En ce qui concerne la jonction entre les deux types de segments, on observe plutôt des liaisons de type 1 \leftarrow 3 entre les CO_i et les NH_{i-3} ou N'H_{i-3}, conduisant à la formation de pseudo cycles à 13 et 15 atomes.

distance des liaisons O-N (Å)	Hélice 1		Hélice 2		nb atomes pseudo cycle	
CO _{Boc} ---NH ₈	2,98		3,07		10	
CO _{Boc} ---NH ₇	3,18		3,19		13	
CO ₁₀ ---NH ₇	3,09		3,20		10	
CO ₁₀ ---NH ₆	3,05		2,92		13	
CO ₉ ---N'H ₆	2,76		2,77		13	
CO ₈ ---NH ₅	-		3,09		12	
CO ₈ ---N'H ₅	3,06		3,26		15	
CO ₇ ---N'H ₅	-		3,24		12	
CO ₇ ---NH ₄	2,88		2,82		13	
CO ₆ ---N'H ₄ CO ₆ ---NH ₃	2,87	2,85	2,88	2,89	12	14
CO ₅ ---N'H ₃ CO ₅ ---NH ₂	2,92	3,01	2,91	2,88	12	14
CO ₄ ---N'H ₂ CO ₄ ---NH ₁	2,84	2,94	2,94	3,00	12	14
CO ₃ ---N'H ₁ CO ₃ ---NHMe	2,98	2,89	2,93	2,90	12	14
Moyenne	2,95		2,99			

Figure V.17 : Tableau récapitulatif des longueurs des liaisons hydrogène

Les valeurs des angles dièdres des résidus de type acide α -aminé (P7 à P10) de la molécule **V.A** sont assez différentes de celles généralement observées dans les hélices α et 3_{10} , même si elles restent plus proches de celles des hélices α (Figure V.18).

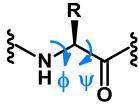
angles dièdres	ϕ (°)	ψ (°)
 V.A partie α-peptide	-65,1	-39,5
hélice α	-57	-47
hélice 3_{10}	-49	-26

Figure V.18 : valeurs moyennes des angles dièdres (ϕ , ψ) des quatre acides α -aminés de **V.A**, comparé aux valeurs observées dans les hélices α et 3_{10}

Il est aussi intéressant de remarquer que les hélices se superposent selon leur axe longitudinal et sont reliées entre elles par deux liaisons hydrogène intermoléculaires entre les carbonyles des résidus urée et les NHs des acides α -aminés, assurant ainsi la continuité de l'hélice (Figure V.19).

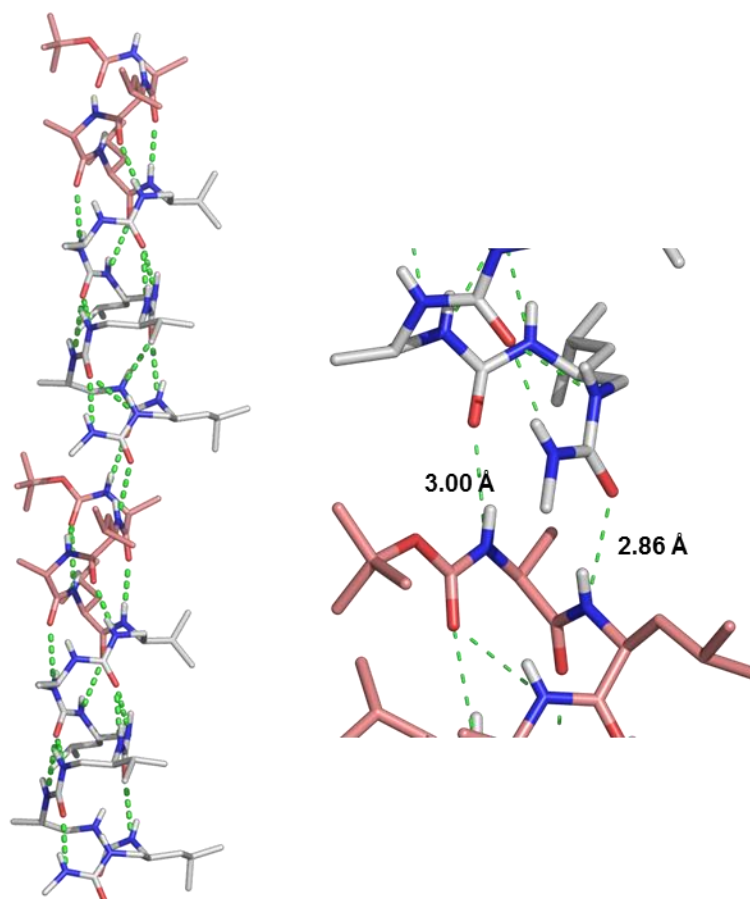
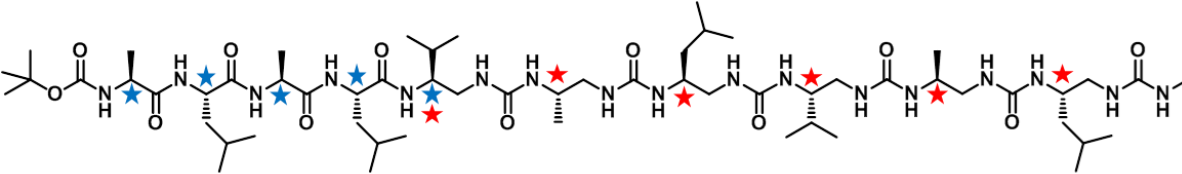


Figure V.19 : superposition des hélices selon leur axe longitudinal

Grâce au logiciel HELANAL^[206] disponible sur internet, nous avons pu calculer les paramètres des deux parties de l'hélice chimère en utilisant les carbones asymétriques portant les différentes chaînes latérales ($^{\beta}\text{C}$ pour les résidus de type urée, et $^{\alpha}\text{C}$ pour les acides aminés). Pour la partie oligourée, nous nous sommes servis des carbones des 6 premiers résidus de type urée. Comme la partie peptidique ne comporte que 4 résidus et qu'au minimum 5 valeurs sont nécessaires pour ces calculs, nous avons inclus le $^{\beta}\text{C}$ du dernier résidu urée dans le calcul pour la séquence peptidique. Les valeurs obtenues ont été reportées dans le tableau suivant (Figure V.20) et comparées aux valeurs généralement observées pour les hélices peptidiques 3_{10} ^[207], α et π ^[208]

Les différents paramètres mesurés pour la partie oligourée sont caractéristiques des hélices 2.5 avec un pas de l'hélice de 5.1 Å et une élévation par résidu de 2.1 Å.^[117] En ce qui concerne la partie α -peptidique, les valeurs obtenues sont très proches des paramètres de l'hélice α même si le pas de l'hélice est légèrement plus grand.



	résidus par tour	élévation par résidu (Å)	rayon de l'hélice (Å)	pas de l'hélice (Å)	liaisons hydrogène CO-NH	nb atomes pseudo cycle
hélice 3_{10}	3,0	2,0	1,9	6,0	$i \rightarrow i-3$	10
hélice α	3,6	1,5	2,3	5,4	$i \rightarrow i-4$	13
hélice π	4,3	1,1	2,8	4,7	$i \rightarrow i-5$	15
partie oligourée ^a ★	2,5	2,1	2,6	5,1	$i \rightarrow i-2; i-3$	12 ; 14
partie α -peptide ^a ★	3,7	1,5	2,3	5,6	$i \rightarrow i-4; i-3$	13; (10; 15)

Figure V.20 : Paramètres des deux parties hélicoïdales de la molécule V.A comparé à ceux des hélices 3_{10} , α et β .

^a moyenne des paramètres des deux molécules de l'unité asymétrique)

Ainsi, le segment de type oligourée semble capable de propager une conformation hélicoïdale pouvant s'apparenter à une hélice α , dans un court segment peptidique attenant.

II. Molécules chimères solubles en milieu aqueux

Suite à ces résultats encourageants, nous avons voulu étudier le comportement de ce type de molécule chimère en milieu aqueux. Pour la partie oligourée nous nous sommes servis de la première séquence étudiée dans le chapitre IV. En ce qui concerne la partie peptidique, nous nous sommes inspirés du travail de Fairlie et coll. qui ont conçu de petits peptides de 5 acides aminés capables de former des structures en hélice α stabilisées par la formation d'un pont salin^[209]. Comme ils ont montré que l'hélice était davantage stabilisée lorsque les chaînes latérales constituant le pont salin étaient placées en position i et $i+4$, nous avons introduit une lysine et un acide glutamique à ces deux positions et des alanines aux positions intermédiaires. La séquence que nous avons sélectionnée est présentée Figure V.21 et comporte six acides α -aminés suivis de 5 résidus de type urée V.E.

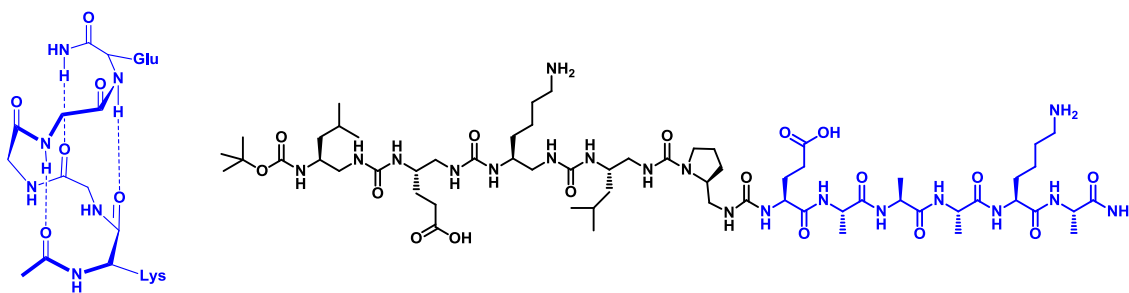


Figure V.21 : Séquence de l'oligomère chimère V.E soluble en milieu aqueux.

1. Synthèse du segment peptidique

La partie peptidique a été préalablement synthétisée par déprotection du groupement Boc et couplage successif de l'acide aminé désiré en présence de BOP et DIEA avec de bons rendements supérieurs à 70% (Figure V.22).

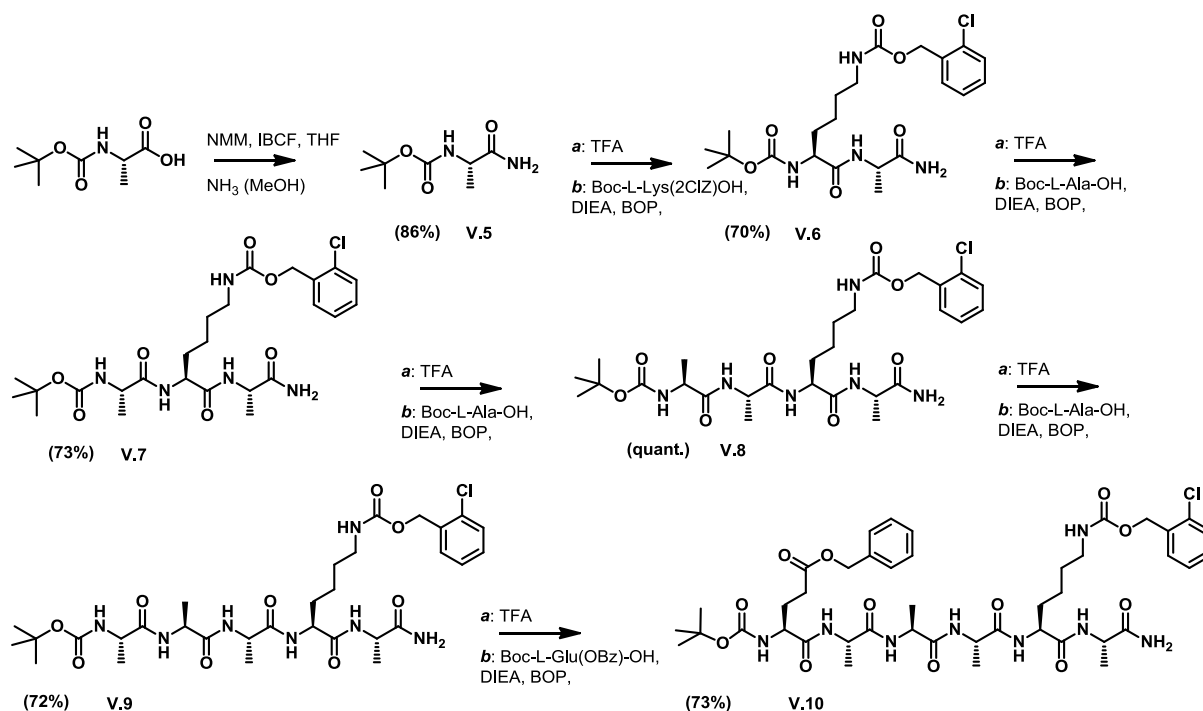


Figure V.22 : Schéma de synthèse du segment peptidique V.10

2. Couplage et déprotection

Ce segment a ensuite été déprotégé en présence de TFA pour permettre le couplage du segment activé IV.3. La déprotection des chaînes latérales en présence de palladium sur charbon permet d'obtenir la molécule chimère V.E (Figure V.23) qui est purifiée par HPLC semi-préparative en phase inverse.

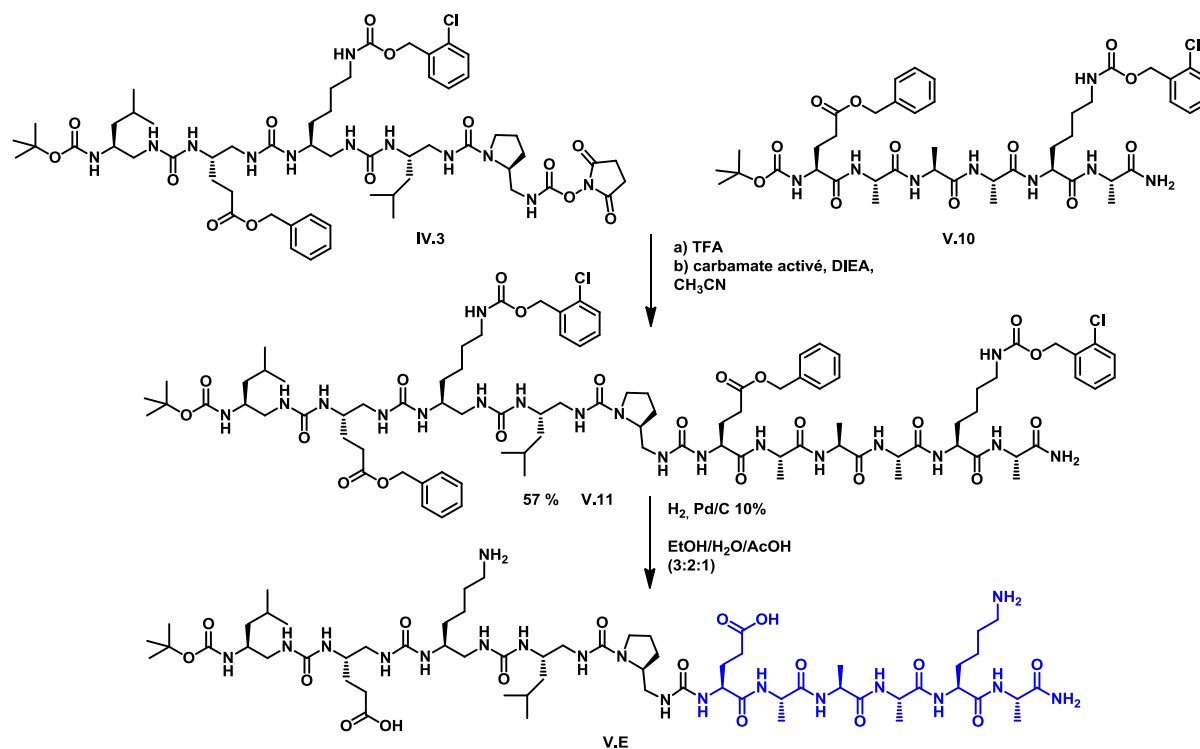


Figure V.23 : Schéma des étapes de couplage et de déprotection conduisant à la formation de la molécule V.E

3. Etude préliminaire en solution

Une étude préliminaire a été effectuée par dichroïsme circulaire (Figure V.24). Le spectre réalisé dans le tampon phosphate à pH 7.1 et une concentration de 0.2 mM ne présente ni la signature habituelle de l'hélice des oligourées ni celle de l'hélice α , mais correspondrait plutôt au signal d'une pelote statistique. Cependant, le spectre évolue en présence de TFE, et on observe l'apparition d'un premier minimum vers 218 nm, d'un deuxième vers 202 nm, ainsi que d'un maximum vers 188 nm. Ce signal se rapproche de ceux observés par D. Fairlie et coll. dans le cas de petits α -peptides de 5 résidus.^[209] En effet pour une longue hélice α le signal caractéristique présente un maximum d'intensité à 190 nm, et deux minimums à 208 et 222 nm, alors que dans le cas de petits peptides le signal est légèrement décalé avec des minimums à 215 et 207 nm (étude théorique ^[210]). L'augmentation du pourcentage de TFE de 50 à 90%, ne semble quant à lui pas modifier le signal de manière significative.

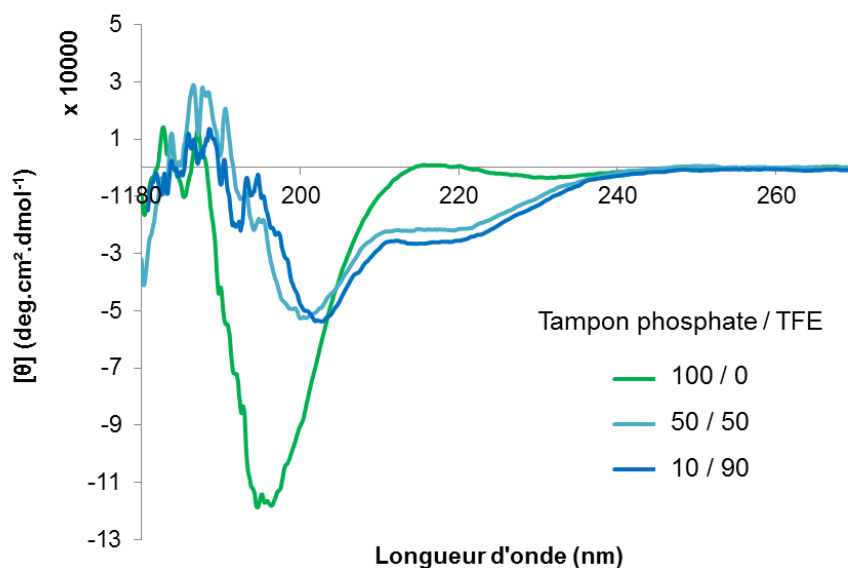


Figure V.24 : Dichroïsme circulaire de la molécule V.E réalisé à 0.2 mM dans un mélange de solvants : solution de tampon phosphate à pH 7.1 (vert), avec 50% de TFE (bleu clair) et avec 90% de TFE (bleu foncé)

Il semblerait donc que le TFE permette de stabiliser une structure secondaire. La présence d'un signal de CD similaire à celui d'une hélice α témoigne probablement de la formation d'une structure hélicoïdale dans le segment peptidique, en revanche l'absence du signal caractéristique des hélices 2.5 d'oligourées est surprenant et semble indiquer que cette partie de la molécule n'est à priori pas repliée même si elle participe sûrement à l'induction de l'hélice α dans la partie peptidique. Il serait intéressant de synthétiser et d'étudier un oligomère Pro^U-Glu-Ala-Ala-Ala-Lys-Ala afin de déterminer le rôle du premier résidu urée. Ceci n'est cependant qu'une étude préliminaire et de nombreuses questions restent en suspens. Le segment de type oligourée est peut-être trop court pour adopter lui-même une structure en hélice de ce type, ou bien situé du mauvais côté. Le résidu de type pyrrolidine déstabilise peut être trop la structure secondaire pour permettre une bonne propagation de la structure hélicoïdale. Il faudrait à présent synthétiser et étudier d'autres séquences pour mieux comprendre ce qu'il se passe. La présence de deux chromophores dans des ratios qui varient d'une séquence à l'autre complique fortement l'interprétation des spectres CD et des études complémentaires par spectroscopie RMN sont nécessaires.

Ainsi nous avons montré qu'un segment de 6 résidus permettait d'induire la formation d'une hélice α dans un court segment peptidique de 4 résidus. Une étude préliminaire réalisée sur une molécule chimère soluble dans l'eau semble montrer qu'il est aussi possible d'induire la formation d'une hélice α dans un segment de 6 acides α -aminés grâce à un segment de type oligourée. Cependant des études plus approfondies sont encore nécessaires pour mieux comprendre ce mécanisme mais les premiers résultats sont encourageants.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Les structures des protéines jouent un rôle fondamental dans leur activité biologique, c'est pourquoi de nombreux chercheurs se sont passionnés pour la synthèse des foldamères, molécules artificielles capables d'adopter des structures repliées bien définies. Parmi ces foldamères, des oligoamides aliphatiques et aromatiques synthétisés à partir de résidus d'acides aminés non naturels très divers (acides β -, γ -, δ - aminés,...) et les oligourées aliphatiques ont montré de bonnes capacités à mimer les structures secondaires des protéines. Récemment l'intérêt s'est porté vers l'élaboration de structures plus complexes telles que des repliements tertiaires ou des assemblages quaternaires. Par exemple, les assemblages d'hélices sous forme de faisceau ou de motif hélice-coude-hélice ont été particulièrement étudiés et quelques faisceaux réalisés à partir d' α/β -peptides et de β -peptides ont pu être caractérisés en milieu aqueux. Des hélices multiples parfois capables d'encapsuler de petites molécules ont également été développées à partir de différents types de résidus. Finalement certains assemblages quaternaires de feuillets β ont aussi été conçus même s'ils ont été beaucoup moins étudiés.

Au laboratoire, nous nous intéressons particulièrement à une famille de foldamères peptidomimétiques à base d'urées capables d'adopter des structures en hélice de type 2.5, stabilisées par un réseau de liaisons hydrogène à trois centres. Au cours de ces travaux de thèse, nous nous sommes dans un premier temps attachés à mieux comprendre les règles qui régissent le repliement de ces oligourées en étudiant la compatibilité de différents résidus comportant de fortes contraintes stériques avec la formation des hélices. Nous nous sommes ensuite penchés sur l'élaboration de molécules susceptibles d'adopter des structures plus complexes et sur la possibilité d'utiliser ces hélices particulièrement stables pour induire l'hélicité dans des segments α -peptidiques associés.

Nous avons tout d'abord étudié l'influence de l'introduction de résidus achiraux *gem*-diméthyle dérivés de l'acide aminoisobutyrique (Aib) au centre d'une oligourée canonique. Les études réalisées en solution et à l'état solide montrent que l'insertion d'un résidu alkylé sur le $^{\alpha}\text{C}$, Aib $^{\text{u}}$ _{inv} (**3B3**) ou le $^{\beta}\text{C}$, Aib $^{\text{u}}$ (**3A3**) est compatible avec la formation de l'hélice (Figure 1). Cependant celle-ci semble plus stable lorsque la substitution est réalisée sur le carbone α . Dans le cas contraire (**3A3**, substitution sur le $^{\beta}\text{C}$) la présence des deux groupements méthyles provoque un réarrangement conformationnel peu compatible avec la géométrie de l'hélice. Ces observations ont été confirmées par l'étude de molécules similaires comportant deux résidus *gem*-diméthyle consécutifs **3A₂3** et **3B₂3**. Même si la présence de ces monomères déstabilise localement la structure, les segments canoniques qui sont situés de part et d'autres permettent d'induire et de stabiliser la formation de l'hélice.

Finalement pour se rapprocher des oligomères entièrement achiraux, nous avons introduit trois unités de type Aib à l'extrémité d'un segment canonique lui-même formé de trois résidus chiraux pour

induire l'hélicité (Figure 1). Seule la molécule comportant les Aib^u_{inv}, **B₃3** présente les caractéristiques de la formation d'une hélice 2.5 en solution. Dans l'autre cas, tout indique que la molécule **A₃3** n'adopte pas de structure secondaire particulière. Le segment chiral est donc capable d'induire l'hélicité dans un segment entièrement achiral lorsque la substitution est réalisée sur le carbone ^uC. Il s'agit à présent de poursuivre ces travaux en introduisant un nombre croissant de résidus achiraux consécutifs pour étudier la capacité du segment canonique chiral à induire l'hélicité dans un oligomère achiral et s'approcher ainsi du travail réalisé par J. Clayden sur les peptides (Aib)_n. Une étude préliminaire effectuée sur une oligourée entièrement composée de résidus *gem*-diméthyle a mis en évidence la nécessité d'ajouter un inducteur chiral approprié pour induire l'hélicité. Afin de poursuivre ces travaux, nous pourrions envisager d'explorer différents contrôleurs chiraux et considérer l'influence de la position de ces résidus à l'une ou l'autre des extrémités.

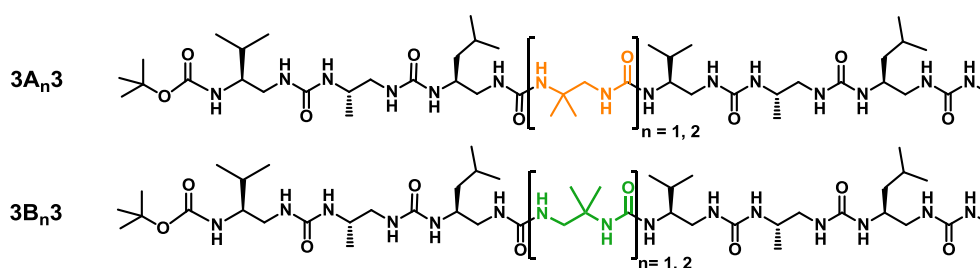


Figure 1 : Schéma des molécules **3A3**, **3A₂3** et **3B3**, **3B₂3**

Nous nous sommes de la même manière, intéressés à la compatibilité de résidus cycliques contraints dérivés de la proline. Les études en solution par RMN et dichroïsme circulaire ainsi qu'à l'état solide montrent que le cycle pyrrolidine, lorsqu'il est introduit au centre d'une séquence canonique, est compatible avec la formation de l'hélice 2.5 même s'il a tendance à la déstabiliser localement. D'après les analyses par dichroïsme circulaire, l'introduction de plusieurs dérivés proline consécutifs semble provoquer une déstabilisation croissante de l'hélice. L'obtention de structures cristallographiques confirme la formation d'une hélice jusqu'à 3 unités pyrrolidine consécutives centrales. En revanche les analyses en solution suggèrent une déstabilisation trop importante au-delà de cinq résidus. De même, une oligourée composée uniquement de dérivés pyrrolidine (similaire aux molécules de type polyproline) ne semble pas (du moins pour les longueurs de chaînes étudiées) adopter de structure en hélice. Comme précédemment, nous avons ainsi pu mettre en évidence la nécessité d'induire l'hélicité avec un segment canonique. L'utilisation d'un résidu pyrrolidine dans une hélice 2.5 d'oligourée pourrait être intéressante dans le cadre d'étude de relation structure-fonction pour mieux comprendre comment une déstabilisation locale d'un segment oligourée module la reconnaissance d'une surface (protéine ou membrane phospholipidique par exemple).

Grâce à la compatibilité du résidu pyrrolidine avec la géométrie en hélice 2.5, nous avons pu développer une nouvelle stratégie de synthèse par condensation de segments. En effet l'alkylation de

l'azote urée dans le cycle pyrrolidine empêche la réaction secondaire de cyclisation observée dans le cas d'un NH libre lors de l'étape d'activation de la fonction amine terminale par du carbonate de succinimide. Nous avons ainsi pu synthétiser de longues oligourées par couplage itératif de segments activés trimériques et hexamériques, en un nombre restreint d'étapes. Des oligourées de 7 à 20 résidus ont ainsi été préparées (Figure 2) et un grand nombre d'entre elles a pu être cristallisé. Toutes ces molécules adoptent des structures en hélice, régulières, sans coude apparent, quel que soit le nombre de résidus pyrrolidine et la longueur des segments.

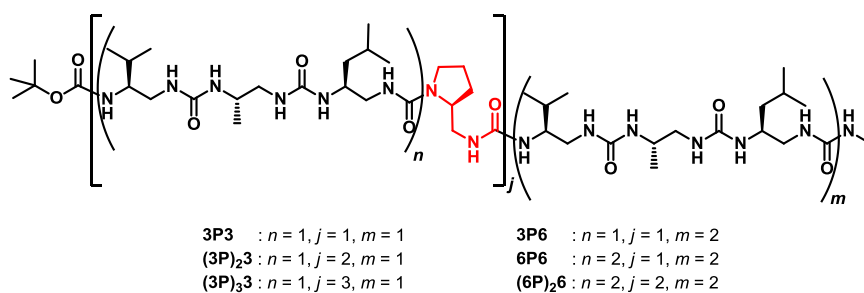


Figure 2 : Séquence des oligourées préparées par condensation de segment

On pourrait à présent imaginer utiliser cette méthode pour polymériser de petits segments activés et ainsi obtenir de très longues hélices polydisperses.

Cette stratégie peut aussi nous permettre de synthétiser plus facilement en solution de longues molécules (≥ 10 résidus) en diversifiant les chaînes latérales. Un autre aspect du projet a d'ailleurs consisté à concevoir et synthétiser des oligourées solubles dans l'eau susceptibles de former des faisceaux d'hélices. Grâce à cette nouvelle stratégie de synthèse, une première série de trois oligourées amphiphiles a été obtenue. D'après les études en solution, ces premières molécules semblent adopter une structuration en hélice (au moins partiellement) en milieu aqueux, cependant nous n'avons pas pu mettre en évidence la formation d'un assemblage de plus haut degré. Un oligomère **IV.D** issu d'un deuxième design favorisant la formation de ponts salins intramoléculaires a quant à lui montré une capacité d'agrégation en solution et a pu être cristallisé en milieu aqueux (Figure 3). La structure cristallographique a révélé la formation d'une hélice 2.5 stabilisée par un réseau de liaisons hydrogène à trois centres similaire à celui observé en milieu organique. Les interactions électrostatiques et hydrophobes intermoléculaires conduisent à la formation d'un assemblage d'hélices. Contrairement à ce qui était attendu, ces molécules forment un canal d'un diamètre de 15 Å dont l'intérieur est composé de résidus hydrophiles et l'extérieur de résidus hydrophobes. La paroi interne comportant les chaînes latérales chargées est recouverte de molécules d'eau alors que l'extérieur hydrophobe permet l'association des canaux entre eux. De plus, le résidu pyrrolidine constitue dans ce cas une troisième face hydrophobe.

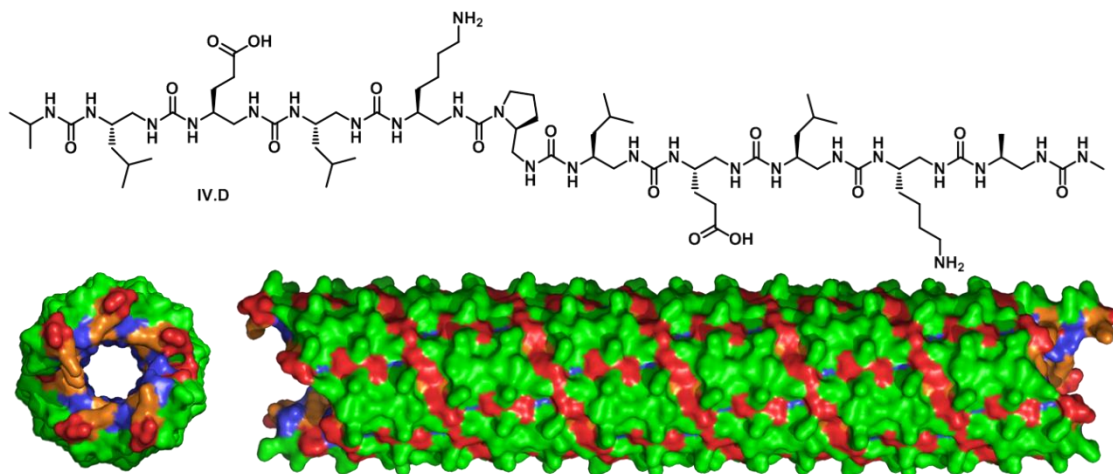


Figure 3 : Schéma et structure cristallographique de la molécule **IV.D**

Même s'ils ne correspondent pas à la structure quaternaire attendue, ces canaux représentent cependant une avancée très intéressante. Nous pourrions par exemple, imaginer les introduire dans des membranes où ils pourraient peut-être jouer le rôle de pores ou de canaux ioniques (si l'assemblage est conservé). Les informations à haute résolution obtenues grâce à cette structure cristalline nous permettent de mieux appréhender les principes de formation de cet assemblage mais aussi de mieux comprendre comment modifier la séquence pour s'approcher de la formation initialement désirée d'un faisceau d'hélices discret. Nous pourrions par exemple diminuer le nombre de faces hydrophobes en remplaçant le résidu pyrrolidine par un dérivé hydroxyproline. Il serait aussi possible de faire varier la nature et la longueur des chaînes latérales afin de moduler les interactions électrostatiques et hydrophobes mises en jeu. Une nouvelle molécule amphiphile de ce type vient d'ailleurs d'être synthétisée par Karolina Pulka et cristallisée par Gavin Collie. Il s'avère que cette oligourée adopte de manière remarquable une structure quaternaire en faisceau d'hélices. Les perspectives de ce projet sont à présent multiples et de nombreux paramètres restent à tester pour maîtriser complètement la formation de ce type d'assemblage en milieu aqueux.

Les squelettes de nos oligourées ne nous permettent pas toujours de mimer de manière précise la position des chaînes latérales des hélices α biologiques. Pour pallier ce problème, nous avons voulu déterminer la capacité des oligourées à induire la formation d'une hélice dans un segment α -peptidique. Pour ce faire, nous avons synthétisé des oligomères chimères constitués d'un court segment α -peptidique et d'un segment oligourée situé d'un côté ou de l'autre (**V.A** et **V.B**) (Figure 4). Les analyses par RMN et dichroïsme circulaire suggèrent la formation d'une structure hélicoïdale continue parcourant toute la séquence. Ces informations ont été renforcées par la résolution de la structure cristallographique de **V.A** possédant le segment peptidique en position *N*-terminale. Le

segment oligourée adopte effectivement une structure en hélice 2.5 qui se poursuit dans le segment peptidique selon une structure proche de celle de l'hélice α .

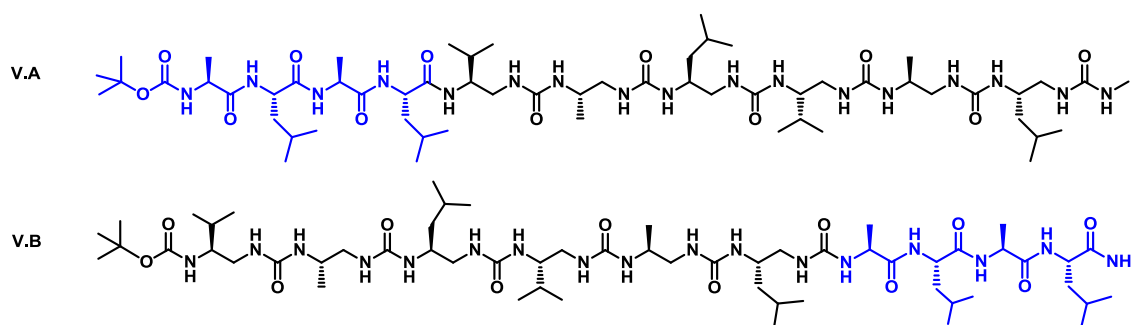


Figure 4 : Schéma des oligomères chimères **V.A** et **V.B**

Ces résultats nous ont encouragés à effectuer une étude préliminaire en milieu aqueux. Un oligomère chimère soluble dans l'eau, comportant cinq acides α -aminés et cinq résidus de type urée a donc été synthétisé par condensation de segments. D'après les études de dichroïsme circulaire, la molécule n'adopte pas de structure particulière dans la solution de tampon phosphate, mais l'ajout de TFE semble induire un repliement en hélice proche des hélices α . Bien que ces résultats ne soient que préliminaires, ils sont malgré tout encourageants et cette étude mérite d'être poursuivie. Par exemple, la longueur du segment oligourée et sa position par rapport au segment peptidique sont deux éléments à étudier en priorité. Le cycle pyrrolidine n'est probablement pas le plus adapté pour ce type de structure, et une diversification des résidus s'impose. S'il s'avère que les oligourées sont capables d'induire la formation d'une hélice dans un segment peptidique plus long, on pourra alors envisager de développer des séquences hybrides pour cibler des interactions protéine-protéine spécifiques. Par ailleurs, dans le cadre du projet portant sur les hélices achirales, nous pourrions envisager de coupler une hélice $(Aib)_n$ achirale avec un segment oligourée lui-même achiral (Aib_{inv}^u) (Figure 5). Cette fois-ci l'hélice peptidique pourrait servir à induire l'hélicité dans la portion urée. Il serait ainsi possible d'étudier comment la propagation de l'hélicité peut être modulée en présence d'un contrôleur chiral R^* , par rapport à un peptide $(Aib)_n$.

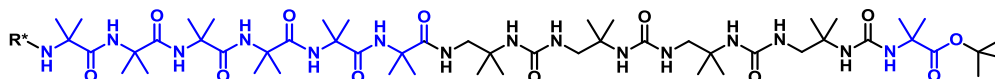


Figure 5 : Exemple de molécule chimère achirale à étudier (R^* représente un inducteur chiral)

PARTIE

EXPERIMENTALE

Partie expérimentale

I. General

The solvents were purchased from Sigma-Aldrich and used without any purification except for THF, CH₂Cl₂ and toluene which were purified by a solvent purification system SPS 800 Manual from MBraun. The *N*-protected amino acids were purchased from Polypeptide Laboratories or Iris Biotech

Thin layer chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 F254 (Merk) with detection by UV light and charring with 1% w/w ninhydrin in ethanol followed by heating. Flash column chromatography was carried out on silica gel from Sigma-Aldrich (40-63 μm).

Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC) purifications were carried out using a 21 mm x 250 mm column containing a Macherey-Nagel Nucleodur® C18 packing (3 μm). Elution was achieved using gradient mixture of CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA.

¹H NMR and ¹³C NMR spectra were recorded on an Avance II NMR spectrometer (Bruker Biospin) with a vertical 7.05T narrow-bore/ultrashield magnet operating at 300 MHz for ¹H observation and 75 MHz for ¹³C observation by means of a 5-mm direct BBO 1H/19F_XBB probe with Z gradient capabilities, and on an Avance/DPX NMR spectrometer (Bruker Biospin) with a vertical 9.4T narrow-bore/ultrashield magnet operating at 400 MHz for ¹H observation and 100 MHz for ¹³C observation by means of a 5-mm direct QNP 1H/19F_31P_13C probe with Z gradient capabilities.

Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) relative to the ¹H residual signal of the deuterated solvent used. ¹H NMR splitting patterns with observed first-order coupling are designated as singlet (s), doublet (d), triplet (t), or quartet (q). Coupling constants (*J*) are reported in hertz.

ESI-MS analyses were carried out on a ThermoElectron LCQ Advantage spectrometer equipped with an ion trap mass analyzer and coupled with a ThermoElectron Surveyor HPLC system.

All Circular dichroism (CD) spectra were recorded on a J-815 Jasco dichrographe (Jasco France, Nantes, France). Spectra were acquired between 300 and 180 nm at a concentration of 0.2 mM in 2,2,2-trifluoroethanol (NMR grade, ≥99.5%) using a quartz cell with a path length of 1 mm or 2mm (Hellma, Paris, France). Sample temperature was regulated at 20°C. Data were collected in continuous scan mode with a data pitch of 0.1 nm, a scanning speed of 50 nm.min⁻¹, 2 nm bandwidth and 2 accumulations per sample.

Sample Data were collected as raw ellipticity (ψ in mdeg) and converted to mean residue ellipticity (MRE or $[\theta]$) in $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}.\text{residue}^{-1}$ using the following equation:

$$[\theta] = \frac{\psi \times 10^{-3}}{\text{res} \times l \times c}$$

Where *res* is the number of residues in the oligomer, *l* is the pathlength in cm, and *c* is the oligourea concentration in dmol.cm^{-3} .

For X Ray diffractions studies, data collections have been performed on a Bruker AXS X8-Proteum rotating anode at the copper k alpha wavelength at 120K. All the crystals were mounted on a cryoloop after quick soaking on Paratone—N oil from Hampton research (<http://hamptonresearch.com>) and flash-frozen.

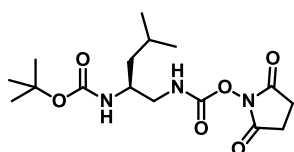
1. General procedure A for the preparation of O-succinimidyl carbamates M1, M2.

The *N*-protected α -amino acid was dissolved in anhydrous THF under N_2 and cooled to -10°C . After addition of NMM (1.1 eq) and IBCF (1.0 eq), the mixture was stirred at -10°C for 45 min. The precipitated *N*-methylmorpholine hydrochloride was removed by filtration and washed with THF. The filtrate and washings were combined in a flask. At 0°C , a solution of NaBH_4 (2.00 eq) in water was added and the resulting solution was stirred at room temperature overnight. The THF was removed under vacuum and the residue was quenched with an aqueous solution of KHSO_4 1M. The organic layer was diluted in AcOEt and washed with saturated NaHCO_3 solution, water and brine. The organic layer was dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure to give the compound which crystallized slowly.

To an ice-cooled solution of Boc-protected alcohol in anhydrous THF (15 mL) under N_2 were added Phtalimide (1.20 eq) and PPh_3 (1.20 eq). The reaction mixture was stirred for 10 min and DIAD (1.20 eq) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature over night. The THF was removed under vacuum and the mixture was dissolved in methanol and heated to 70°C under N_2 . Hydrazine (3.00 eq) was added slowly and the mixture was allowed to stir at 70°C over night. The insoluble product was filtered off and washed with methanol. The filtrate and washings were combined and the solvent was removed under vacuum. The mixture was dissolved in NaHCO_3 and CH_2Cl_2 . The organic layer was washed with saturated NaHCO_3 , dried over Na_2SO_4 , and concentrated under reduced pressure. The resulting oil was dissolved in concentrated HCl (pH 2-3) and the aqueous layer was washed with Et_2O and EtOAc, the aqueous layer was then basified with K_2CO_3 until pH 8.

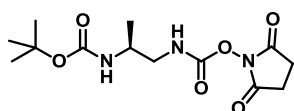
The compound was extracted from the aqueous layer with CH_2Cl_2 (three times) and the organic phases were combined, dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduce pressure.

To an ice-cooled solution of the Boc-protected amine dissolved in anhydrous CH_2Cl_2 , was added DSC (1.20 eq) previously dissolved in CH_2Cl_2 and the mixture was stirred for 2h at room temperature. The mixture was diluted in CH_2Cl_2 , the insoluble compounds were filtered off and washed with CH_2Cl_2 . Then the organic layer was washed with saturated Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The desired activated building block was crystallised in a mixture of Et_2O and pentane and recovered by filtration.



(2-tert-Butoxycarbonylamino-4-methyl-pentyl)-carbamic acid 2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl ester (M1)

Boc-L-Leu-OH. H_2O (5 g, 20.06 mmol) was transformed according to the general procedure A. The monomère **M1** was obtained by recrystallization as a white solid (4.07 g, 11.4 mmol, 56 %). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 6.15 (m, 1H, NH), 4.47 (m, 1H, NH), 3.79 (m, 1H, CHN), 3.46-3.32 (m, 1H, CH_2N), 3.27-3.17 (m, 1H, CH_2N), 2.83 (s, 4H, CH_2), 1.77-1.61 (m, 1H, CH), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.37-1.25 (m, 2H, CH_2), 0.97-0.90 (m, 6H, CH_3). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 170.12, 156.39, 152.08, 79.80, 48.59, 47.17, 41.39, 28.31, 25.47, 24.73, 22.97, 22.00. **ESI-MS** (M_w 357.40) : m/z 380.07 $[\text{M}+\text{Na}]^+$



(2-tert-Butoxycarbonylamino-propyl)-carbamic acid 2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl ester (M2)

Boc-L-Ala-OH (12 g, 63.42 mmol) was transformed according to the general procedure A. Monomer **M2** was obtained after recrystallization as a white solid (5 g, 25 %). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 6.18 (m, 1H, NH), 4.56 (m, 1H, NH), 3.83 (m, 1H, CHN), 3.43-3.17 (m, 2H, CH_2N), 2.83 (s, 4H, CH_2), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.20 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH_3). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 170.07, 156.24, 152.09, 47.92, 46.37, 28.33, 25.48, 25.42, 18.30. **ESI-MS** (M_w 315.32) : m/z 338.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

2. General procedure B for oligourea coupling.

Boc-protected oligourea (1.0 eq) was dissolved in TFA (3 ml / g) and stirred for 45 min. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure and the resulting residue was coevaporated 3 times with cyclohexane. The crude product was then dissolved in CH_3CN (5 ml / g).

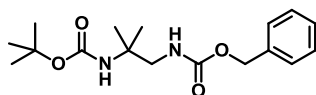
DIPEA (3.0 eq) was then added and the mixture was cooled to 0°C prior to the dropwise addition of the following carbamate, **M1-M9**, dissolved in CH₃CN. Completion of the reaction was monitored by TLC.

Compounds **3** and **6**^[117], **L6**^[174] and activated monomer **M3**^[147] were prepared using a previously described procedure.

II. Compounds described in Chapter 2

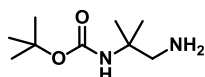
1. Preparation of O-succinimidyl carbamates **M5** and **M6**

Compound **II.6** was prepared using a procedure described in literature^[149]



(2-Benzyloxycarbonylamino-1,1-dimethyl-ethyl)-carbamic acid *tert*-butyl ester, (**II.7**)

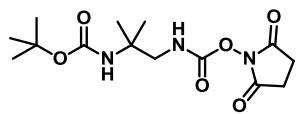
To a stirred solution of **II.6** (3 g, 13.5 mmol) in CH₂Cl₂ (25 mL), triethylamine (2.3 mL, 16.2 mmol) and di-*tert*-butyl dicarbonate (3.54 g, 16.2 mmol) were successively added and the reaction mixture was allowed to stir at room temperature overnight. CH₂Cl₂ was concentrated under reduced pressure and the resulting crude mixture was purified by flash chromatography on silica gel (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 95:5). Compound **II.7** was obtained as a colorless oil (4.03 g, 92% yield). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.30-7.40 (m, 5H, CH_{Ar}), 5.36 (s, 1H, NH), 5.11 (s, 2H, CH₂Ar), 4.57 (s, 1H, NH), 3.40 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂N), 1.42 (s, 9H, Boc), 1.25 (s, 6H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 156.8, 154.6, 136.3, 128.1, 127.7, 78.8, 66.4, 53.0, 49.3, 28.1, 24.8. ESI-MS (M_w 322.19): *m/z* 345.1 [M + Na]⁺



(2-Amino-1,1-dimethyl-ethyl)-carbamic acid *tert*-butyl ester, (**II.8**)

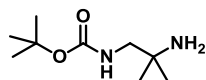
To a stirred solution of **II.7** (3.88 g, 12.0 mmol) in EtOH (30 mL) at room temperature, 10% Pd/C (390 mg) was added and the reaction mixture was stirred under positive H₂ atmosphere for 20 h. The reaction mixture was then filtered over glass microfiber filter, the filtrate was concentrated under reduced pressure and dried under vacuum to afford amine **II.8** as a colorless oil (2.02 g, 89% yield), which was used for the next step without further purification. ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃): δ = 4.79

(s, 1H, NH), 2.74 (s, 2H, NH₂), 1.53 (s, 2H, CH₂N), 1.42 (s, 9H, Boc), 1.24 (s, 6H, CH₃). ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃): δ = 154.7, 78.6, 52.4, 49.6, 28.0, 24.6. **ESI-MS** (M_w 188.15): *m/z* 188.9 [M+H]⁺



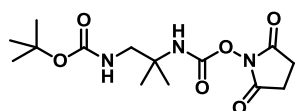
(2-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-methyl-propyl)-carbamic acid 2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl ester (M5)

To a stirred solution of **II.8** (1.8 g, 9.6 mmol) in dry CH₂Cl₂ (30 mL), a solution of *N,N'*-disuccinimidyl carbonate (2.94 g, 11.5 mmol) in dry CH₂Cl₂ (30 mL) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. CH₂Cl₂ was removed under reduced pressure, the residue was dissolved in EtOAc (50 mL) and washed with an aqueous solution of 1M KHSO₄ (3 × 20 mL). The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum to afford compound **M5** as a white solid (2.1 g, 66% yield). ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃): δ = 6.50 (s, 1H, NH), 4.52 (s, 1H, NH), 3.46 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₂N), 2.81 (s, 4H, CH₂), 1.43 (s, 9H, Boc), 1.27 (s, 6H, CH₃). ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃): δ = 169.8, 155.2, 151.9, 79.9, 53.0, 50.3, 28.3, 25.6, 25.4. **ESI-MS** (M_w 329.35): *m/z* 352.15 [M+Na]⁺, 681.30 [2M +Na]⁺



(2-Amino-2-methyl-propyl)-carbamic acid *tert*-butyl ester, (II.9)

To a solution of 1,2-diamino-2-methylpropane (0.57 mL, 5.50 mmol) and sodium hydroxide (0.25 g, 4.50 mmol) in dioxane/water (1:1 v/v, 20 mL) at 0°C was added dropwise a solution of di-*tert*-butyl dicarbonate (1.20 g, 5.50 mmol) in dioxane. The reaction was stirred at 0°C for 3.5 h and at room temperature for 2.5 h. The reaction was concentrated under reduced pressure then water added. The product was extracted into CH₂Cl₂, the organic layers combined, dried over MgSO₄ and the solvent removed under reduced pressure. This afforded **II.9** as a white solid (0.89 g, 86 %). ¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ = 4.95 (s, 1H, NH), 3.00 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂N), 1.44 (s, 9H, Boc), 1.12 (s, 2H, NH₂), 1.08 (s, 6H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 156.5, 79.1, 52.2, 50.1, 28.4, 28.2 **ESI-MS** (M_w 189.15): *m/z* 189.16 [M + Na]⁺



(2-*tert*-Butoxycarbonylamino-1,1-dimethyl-ethyl)-carbamic acid 2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl ester, (M6)

To a suspension of disuccinimidyl carbonate (4.08 g, 15.9 mmol) in CH₂Cl₂ was added **II.9** (2.50 g, 13.3 mmol). The reaction was stirred at room temperature overnight. After removal of insoluble white solid, organic phase was washed with aqueous 1M KHSO₄ solution and water, dried

over MgSO_4 and the solvent removed under reduced pressure. The residue was re-dissolved in CH_2Cl_2 and diethyl ether was added. The solid precipitate formed was isolated by filtration and dried under vacuum to afford **M6** as a white crystalline solid (3.70 g, 84 %). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 6.23 (s, 1H, NH), 4.98 (s, 1H, NH), 3.26 (d, J = 6.8 Hz, 2H, CH_2N), 2.81 (s, 4H, CH_2), 1.46 (s, 9H, Boc), 1.35 (s, 6H, CH_3) $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ = 169.96, 157.33, 149.72, 80.23, 77.25, 56.00, 49.37, 28.33, 25.49, 24.06. **ESI-MS** (M_w 329.16): m/z 347 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

2. Part I: Oligoureas with one Aib type residue

Boc-Aib^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe, (A3)

A3 was prepared from **M5** (125 mg, 0.378 mmol) and **3** (200 mg, 0.398 mmol) as described in the general procedure B. After completion (12h), the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO_3 aqueous solution, 1M KHSO_4 aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over MgSO_4 and evaporated. Flash column chromatography (CH_2Cl_2 -MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **A3** as a white product. (250 mg, quant.). $^1\text{H NMR}$: (300MHz, CD_3OH) δ = 6.32 (m, 1H, NH), 6.25 (m, 1H, NH), 6.17-5.99 (m, 4H, NH), 5.98-5.79 (m, 3H, NH), 4.03-3.80 (m, 2H, CHN), 3.77-3.63 (m, 1H, CHN), 3.59-3.37 (m, 4H, CH_2N), 2.30-2.21 (m, 1H, CH_2N), 2.81-2.75 (m, 2H, CH_2N), 2.72 (d, J = 4.7 Hz, 1H, CH_3N), 2.60-2.48 (m, 1H, CH_2N), 1.77-1.62 (m, 2H, CH), 1.45 (s, 9H, Boc), 1.35-1.28 (m, 2H, CH_2), 1.27-1.21 (m, 6H, CH_3), 1.06 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH_3), 0.97-0.89 (m, 12H, CH_3) **ESI-MS** (M_w 615.81): m/z 616.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 638.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1253.0 $[\text{2M}+\text{Na}]^+$

Boc-Leu^u-Aib^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe, (II.12)

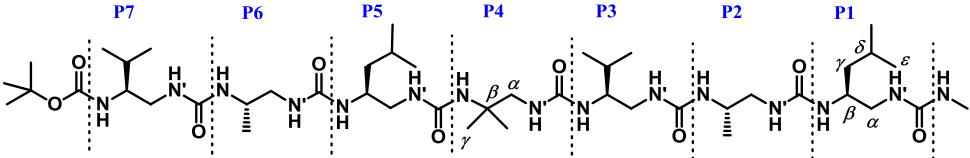
II.12 was prepared from **M1** (55 mg, 0.154 mmol) and **A3** (100 mg, 0.162 mmol) as described in the general procedure B. After completion (12h), the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO_3 aqueous solution, 1M KHSO_4 aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over MgSO_4 and evaporated. Flash column chromatography (CH_2Cl_2 -MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **II.12** as a white product. (116 mg, 89%) $^1\text{H NMR}$: (300MHz, CD_3OH) δ = 6.47 (d, J = 9.3 Hz, 1H, NH), 6.37 (m, 1H, NH), 6.21-6.12 (m, 2H, NH), 6.09-6.00 (m, 2H, NH), 5.97-5.81 (m, 5H, NH), 4.04-3.93 (m, 1H, CHN), 3.92-.379 (m, 1H, CHN), 3.78-3.62 (m, 2H, CHN), 3.61-3.40 (m, 5H, CH_2N), 3.28-3.10 (m, 2H, CH_2N), 2.84-2.75 (m, 1H, CH_2N), 2.72 (d, J = 4.7 Hz, 3H, CH_3N), 2.70-2.58 (m, 1H, CH_2N), 2.55-2.41 (m, 1H, CH_2N), 1.78-1.57 (m, 3H, CH), 1.48 (s, 9H, CH_3), 1.31 (s, 3H, CH_3), 1.28-1.22 (m, 4H, CH_2), 1.19 (s, 3H, CH_3), 1.07 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH_3), 0.97-0.89 (m, 18H, CH_3). **ESI-MS** (M_w 758.01): m/z 780 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

Boc-Ala^u-Leu^u-Aib^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe, (II.13)

II.13 was prepared from **M2** (27 mg, 0.077 mmol) and **II.12** (50 mg, 0.081 mmol) as described in the general procedure B. After completion (12h), the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over MgSO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **II.13** as a white product (56 mg, 80%). ¹H NMR : (400MHz, CD₃CN) δ = 6.21 (d, J = 8.0 Hz, 1H, NH), 6.11 (m, 1H, NH), 5.99-5.90 (m, 2H, NH), 5.85-5.77 (m, 2H, NH), 5.66 (m, 1H, NH), 5.62-5.56 (m, 2H, NH), 5.52 (d, J = 9.7 Hz, 1H, NH), 5.48 (d, J = 8.0 Hz, 1H, NH), 5.46 (d, J = 9.4 Hz, 1H, NH), 5.12 (d, J = 9.8 Hz, 1H, NH), 3.95-3.84 (m, 1H, CHN), 3.84-3.67 (m, 3H, CHN), 3.64 (dd, J = 12.0, 2.8 Hz, 1H, CHN), 3.57-3.36 (m, 5H, CH₂N), 3.29-3.19 (m, 1H, CH₂N), 2.82-2.74 (m, 1H, CH₂N), 2.55 (d, J = 4.7 Hz, 3H, CH₃N), 2.52-2.48 (m, 1H, CH₂N), 2.46-2.36 (m, 1H, CH₂N), 2.34-2.26 (m, 1H, CH₂N), 2.24-2.15 (m, 1H, CH₂N), 2.18-2.09 (m, 1H, CH₂N), 1.62-1.49 (m, 2H, CH), 1.47-1.37 (m, 1H, CH), 1.36 (s, 9H, Boc), 1.28 (s, 3H, CH₃), 1.14-1.04 (m, 4H, CH₂), 0.99 (s, 3H, CH₃), 0.97 (d, J = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 0.92 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 0.83-0.73 (m, 18H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 857,62): m/z 880 [M + Na]⁺

Boc-Val^u-Ala^u-Leu^u-Aib^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe, (3A3)

3A3 was prepared from **M3** (19 mg, 0.055 mmol) and **II.13** (50 mg, 0.058 mmol) as described in the general procedure B. After completion (12h), the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over MgSO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **3A3** as a white product (50 mg, 87%). ¹H NMR : (400MHz, CD₃OH) δ = 6.65 (d, J = 10.6 Hz, 1H, NH), 6.53 (dd, J = 10.3, 2.9 Hz, 1H, NH), 6.45 (dd, 1H, NH), 6.37 (s, 1H, NH), 6.34 (dd, J = 9.9, 3.8 Hz, 1H, NH), 6.29 (d, J = 9.9 Hz, 1H, NH), 6.20 (m, 1H, NH), 6.17 (d, J = 10.5 Hz, 1H, NH), 6.03-5.98 (m, 3H, NH), 5.97 (d, J = 11.0 Hz, 1H, NH), 5.90 (dd, J = 8.6, 4.5 Hz, 1H, NH), 5.86 (d, J = 10.3 Hz, 1H, NH), 5.83 (dd, J = 9.9, 3.6 Hz, 1H, NH), 4.10-3.95 (m, 3H, CHN), 3.92-3.79 (m, 1H, CHN), 3.75-3.41 (m, 9H, 2 CHN-7 CH₂N), 3.19 (dd, J = 12.8, 9.3 Hz, 1H, CH₂N), 2.70 (d, J = 4.8 Hz, 3H, CH₃N), 2.67-2.24 (m, 6H, CH₂N), 1.76-1.57 (m, 4H, CH), 1.48 (s, 9H, Boc), 1.33 (s, 3H, CH₃ (Aib)), 1.31-1.14 (m, 4H, CH₂), 1.12 (s, 3H, CH₃ (Aib)), 1.07-1.01 (m, 6H, CH₃), 0.98-0.88 (m, 24H, CH₃). ¹³C NMR (400 MHz, CD₃OH) δ = 162.84, 162.26, 161.13, 160.66, 160.64, 160.00, 159.91, 158.76, 79.39, 56.88, 55.51, 52.52, 47.11, 46.05, 45.72, 45.31, 45.24, 43.94, 43.16, 42.94, 41.95, 31.12, 31.09, 27.85, 26.52, 25.94, 25.28, 25.06, 24.90, 22.79, 22.70, 21.50, 21.21, 19.21, 19.18, 18.10, 17.76, 17.72, 17.47. **ESI-MS** (M_w 985,71): m/z 1009 [M + Na]⁺

Table 1: ^1H NMR chemical shifts (in ppm) of **3A3** in CD_3OH (400 MHz)


Residue	N'H	NH	$^{\alpha}\text{CH}^1$	$^{\alpha}\text{CH}^2$	$^{\beta}\text{CH}$	$^{\gamma}\text{CH}$	$^{\delta}\text{CH}$	$^{\epsilon}\text{CH}$	term CH
NH-Me		6,20							2,71
Leu ^u P1	6,44	5,99	3,58	2,66	3,88	1,23	1,70	0,93	
Ala ^u P2	6,34	6,00	3,51	2,40	4,01	1,06			
Val ^u P3	5,89	6,17	3,56	2,49	6,67	1,61	0,92		
Aib ^u P4	6,30	6,37	3,69	3,20		1,34 1,13			
Leu ^u P5	6,53	5,97	3,61	2,32	4,03	1,19	1,72	0,92	
Ala ^u P6	5,83	5,87	3,59	2,34	4,05	1,04			
Val ^u P7	6,00	6,65	3,47	2,56	3,63	1,64	0,94		
Boc									1,48

Boc-(Aib^u)_{rev}-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe, (B3)

B3 was prepared from **M6** (197 mg, 0.598 mmol) and **3** (300 mg, 0.598 mmol) as described in the general procedure B. After completion (12h), the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO_3 aqueous solution, 1M KHSO_4 aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over MgSO_4 and evaporated. Flash column chromatography (CH_2Cl_2 -MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **B3** as a white product (225 mg, 61%). ^1H NMR : (300MHz, CD_3OH) δ = 6.88 (m, 1H, NH), 6.41 (m, 1H, NH), 6.29 (m, 1H, NH), 6.23-6.11 (m, 2H, NH), 5.94 (m, 1H, NH), 5.86-5.75 (m, 2H, NH), 5.63 (d, J = 9.8 Hz, 1H, NH), 4.10-3.95 (m, 1H, CHN), 3.94-3.83 (m, 1H, CHN), 3.77 (dd, J = 13.7, 7.9 Hz, 1H, CHN), 3.69-3.45 (m, 4H, CH_2N), 2.85 (dd, J = 14.0, 5.3 Hz, 1H, CH_2N), 2.73 (d, J = 4.6 Hz, 3H, CH_3N), 2.70-2.63 (m, 1H, CH_2N), 2.56-2.34 (m, 2H, CH_2N), 1.78-1.56 (m, 2H, CH), 1.49 (s, 9H, Boc), 1.38 (s, 3H, $\text{CH}_3(\text{Aib})$), 1.32-1.20 (m, 2H, CH_2), 1.16 (s, 3H, $\text{CH}_3(\text{Aib})$), 1.06 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH_3), 0.97-0.86 (m, 12H, CH_3) **ESI-MS** (M_w 615.81): m/z 616.2 [$M + \text{H}$]⁺, 639.3 [$M + \text{Na}$]⁺, 1230.8 [$2M + \text{H}$]⁺, 1256.0 [$2M + \text{Na}$]⁺

Boc-Leu^u-(Aib^u)_{rev}-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe, (II.14)

II.14 was prepared from **M1** (34 mg, 0.097 mmol) and **B3** (60 mg, 0.097 mmol) as described in the general procedure B. After completion (12h), the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO_3 aqueous solution, 1M KHSO_4 aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over MgSO_4 and evaporated. Flash column chromatography (CH_2Cl_2 -MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **II.14** as a white product (62 mg, 84%). ^1H NMR : (300MHz, CD_3OH) δ = 6.51 (d, J = 9.4 Hz, 1H, NH), 6.47-6.38 (m, 2H, NH), 6.31-6.10 (m, 5H, NH),

5.96 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, NH), 5.76 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, NH), 5.42 (s, 1H, NH), 4.05-3.78 (m, 3H, CHN), 3.79-3.66 (m, 2H, CHN), 3.64-3.49 (m, 4H, CH₂N), 3.42-3.35 (m, 1H, CH₂N), 3.28-3.16 (m, 1H, CH₂N), 2.71 (d, $J = 4.0$ Hz, 3H, CH₃N), 2.68-2.57 (m, 2H, CH₂N), 2.56-2.45 (m, 1H, CH₂N), 2.43-2.31 (m, 1H, CH₂N), 1.75-1.50 (m, 3H, CH), 1.45 (s, 9H, CH₃), 1.42 (s, 3H, CH₃), 1.35-1.17 (m, 4H, CH₂), 1.047 (s, 3H, CH₃), 1.04 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH₃), 0.95-0.83 (m, 18H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 758.01): m/z 758.3 [M + H]⁺, 781.4 [M + Na]⁺, 1514.9 [2M + H]⁺, 1538.9 [2M + Na]⁺

Boc-Ala^u-Leu^u-(Aib^u)_{rev}-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe, (II.15)

II.15 was prepared from **M2** (24 mg, 0.077 mmol) and **II.14** (62 mg, 0.081 mmol) as described in the general procedure B. After completion (12h), the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over MgSO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **II.15** as a white product (84 mg, 97%). **¹H NMR** : (400MHz, CD₃OH) $\delta = 6.59$ (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, NH), 6.51-6.41 (m, 2H, NH), 6.36-6.28 (m, 2H, NH), 6.27-6.10 (m, 3H, NH), 6.07 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H, NH), 6.00 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H, NH), 5.89 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, NH), 5.83 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, NH), 5.75 (s, 1H, NH), 4.07-3.94 (m, 2H, CHN), 3.94-3.78 (m, 3H, CHN), 3.71-3.46 (m, 6H, CH₂N), 2.91-2.77 (m, 1H, CH₂N), 2.74 (d, $J = 4.7$ Hz, 3H, CH₃N), 2.71-2.33 (m, 5H, CH₂N), 1.80-1.62 (m, 3H, CH), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.46 (s, 3H, CH₃), 1.32-1.21 (m, 4H, CH₂), 1.14 (s, 3H, CH₃), 1.12-1.03 (m, 6H, CH₃), 0.99-0.87 (m, 24H, CH₃)

Boc-Val^u-Ala^u-Leu^u-(Aib^u)_{rev}-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe, (3B3)

3B3 was prepared from **M3** (32 mg, 0.093 mmol) and **II.15** (84 mg, 0.097 mmol) as described in the general procedure B. After completion (12h), the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over MgSO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **3B3** as a white product (75 mg, 78%). **¹H NMR** : (400MHz, CD₃OH) $\delta = 6.71$ (m, 1H, NH), 6.61 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H, NH), 6.53-6.45 (m, 2H, NH), 6.37-6.20 (m, 4H, NH), 6.05 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H, NH), 6.02-5.97 (m, 2H, NH), 5.95 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H, NH), 5.88 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, NH), 5.77 (m, 1H, NH), 5.68 (s, 1H, NH), 4.18-3.97 (m, 3H, CHN), 3.93-3.81 (m, 2H, CHN), 3.70-3.46 (m, 8H, CHN-CH₂N), 2.72 (d, $J = 4.6$ Hz, 3H, CH₃), 2.69-2.53 (m, 3H, CH₂N), 2.55-2.31 (m, 3H, CH₂N), 1.76-1.52 (m, 4H, CH), 1.49 (s, 9H, CH₃), 1.46 (s, 3H, CH₃), 1.27-1.17 (m, 4H, CH₂), 1.14 (s, 3H, CH₃), 1.08-1.01 (m, 6H, CH₃), 0.99-0.82 (m, 24H, CH₃). **¹³C NMR** (400 MHz, CD₃OH) δ 161.23, 161.12, 160.67, 160.48, 160.38, 159.97, 159.89, 158.68, 79.31, 56.65, 54.85, 53.40, 46.29, 45.60, 45.38, 45.32, 43.73, 43.16, 42.85, 42.32, 31.23, 31.06, 27.86, 26.23, 25.94, 25.29, 24.95, 24.88, 22.78, 22.73, 21.86, 21.52, 19.14, 19.12, 18.01, 17.62, 17.43. **ESI-MS** (M_w 985,71): m/z 1008.7 [M + Na]⁺

Table 2: ^1H NMR chemical shifts (in ppm) of **3B3** in CD_3OH (400 MHz)

Residue	N'H	NH	αCH^1	αCH^2	βCH	γCH	δCH	ϵCH	term CH
NH-Me		6,25							2,73
Leu ^u	U1	6,29	6,34	3,60	2,65	3,87	1,22	1,70	0,92
Ala ^u	U2	6,47	6,05	3,57	2,38	4,02	1,06		
Val ^u	U3	6,49	5,95	3,55	2,45	3,62	1,58	0,90	
(Aib) _{rev} ^u	U4	5,69	6,27			4,01-2,60	1,46-1,15		
Leu ^u	U5	6,71	5,99	3,64	2,48	3,86	1,21	1,71	0,91
Ala ^u	U6	5,76	5,88	3,58	2,37	4,11	1,05		
Val ^u	U7	5,98	6,61	3,51	2,59	3,59	1,64	0,93	
Boc									1,49

3. Part II: Oligopeptides with several Aib type residues

Boc-Aib^u-Aib^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe, (**A₂3**)

A₂3 was prepared from **M5** (50 mg, 0.154 mmol) and **A3** (100 mg, 0.162 mmol) as described in the general procedure B. After completion (12h), the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO_3 aqueous solution, 1M KHSO_4 aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over MgSO_4 and evaporated. Flash column chromatography (CH_2Cl_2 -MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **A₂3** as a white product (90 mg, 73%). ^1H NMR : (300MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 6.46 (s, 1H, NH), 6.10 (m, 1H, NH), 6.02-5.86 (m, 8H, NH), 5.82 (m, 1H, NH), 3.75-3.65 (m, 1H, CHN), 3.64-3.57 (m, 1H, CHN), 3.57-3.46 (m, 1H, CHN), 3.28-3.15 (m, 6H, CH_2N), 3.09-3.04 (m, 2H, CH_2N), 2.71-2.60 (m, 2H, CH_2N), 2.54 (d, $J = 4.5$ Hz, 3H, CH_3N), 1.67-1.54 (m, 2H, CH), 1.36 (s, 9H, Boc), 1.21-1.15 (m, 2H, CH_2), 1.17-1.07 (m, 12H, CH_3), 0.93 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3), 0.88-0.75 (m, 12H, CH_3). ESI-MS (M_w 729,95): m/z 752 [$M + \text{Na}$]⁺

Boc-Leu^u-Aib^u-Aib^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe, (**II.16**)

II.16 was prepared from **M1** (27 mg, 0.078 mmol) and **A₂3** (60 mg, 0.082 mmol) as described in the general procedure B. After completion (12h), the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO_3 aqueous solution, 1M KHSO_4 aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over MgSO_4 and evaporated. Flash column chromatography (CH_2Cl_2 -MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **II.16** as a white product (63 mg, 88%). ^1H NMR : (400MHz, CD_3CN) δ = 6.05 (m, 1H, NH), 5.86-5.78 (m, 2H, NH), 5.74-5.54 (m, 4H, NH), 5.52-5.38

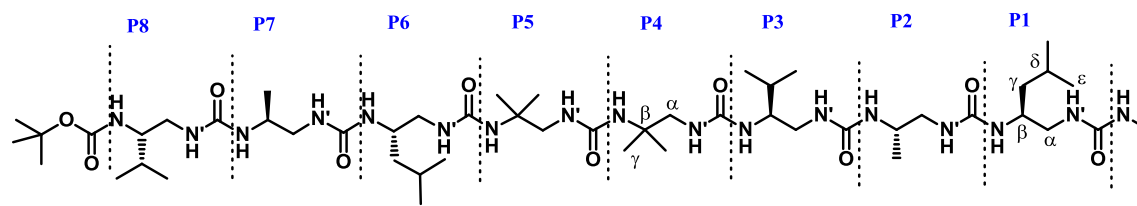
(m, 5H, NH), 5.33 (m, 1H, NH), 3.97-3.87 (m, 1H, CHN), 3.85-3.74 (m, 1H, CHN), 3.69-3.50 (m, 8H, CHN-CH₂N), 3.46-3.34 (m, 2H, CH₂N), 3.27-2.98 (m, 2H, CH₂N), 2.65 (d, J = 4.7 Hz, 3H, CH₃N), 2.59-2.48 (m, 2H, CH₂N), 1.70-1.56 (m, 3H, CH), 1.43 (s, 9H, Boc), 1.36-1.14 (m, 16H, CH₂-CH₃), 1.01 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 0.94-0.85 (m, 18H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 872,15): *m/z* 894 [M + Na]⁺

Boc-Ala^u-Leu^u-Aib^u-Aib^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe, (II.17)

II.17 was prepared **M2** (10 mg, 0.032 mmol) and **II.16** (30 mg, 0.034 mmol) as described in the general procedure B. After completion (12h), the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over MgSO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **II.17** as a white product (10 mg, 30%). **¹H NMR** : (400MHz, CD₃CN) δ = 6.13 (m, 1H, NH), 6.02 (m, 1H, NH), 5.96 (m, 1H, NH), 5.87 (m, 1H, NH), 5.83-5.65 (m, 4H, NH), 5.63-5.47 (m, 4H, NH), 5.37 (m, 1H, NH), 5.23 (m, 1H, NH), 4.99 (m, 1H, NH), 3.99-3.75 (m, 4H, CHN), 3.71-3.33 (m, 10H, CHN-CH₂N), 3.15-3.01 (m, 2H, CH₂N), 2.65 (s, 3H, CH₃N), 2.63-2.42 (m, 4H, CH₂N), 1.73-1.55 (m, 3H, CH), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.35-1.27 (m, 6H, CH₃), 1.26-1.17 (m, 4H, CH₂), 1.16-1.07 (m, 6H, CH₃), 1.06-0.97 (m, 6H, CH₃), 0.96-0.84 (m, 18H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 972,27): *m/z* 994 [M + Na]⁺

Boc-Val^u-Ala^u-Leu^u-Aib^u-Aib^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe, (3A₂3)

3A₂3 was prepared from **M3** (3 mg, 0.009 mmol) and **II.17** (10 mg, 0.010 mmol) as described in the general procedure B. After completion (12h), the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over MgSO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **3A₂3** as a white product (8 mg, 71%). **¹H NMR** : (400MHz, CD₃OH) δ = 6.57 (d, J = 11.6 Hz, 1H, NH), 6.39 (m, 1H, NH), 6.28 (m, 1H, NH), 6.25-6.17 (m, 2H, NH), 6.15-6.02 (m, 5H, NH), 5.93 (m, 1H, NH), 5.86-5.68 (m, 6H, NH), 3.97-3.83 (m, 3H, CHN), 3.76 (m, 1H, CHN), 3.65-3.32 (m, 10H, CHN-CH₂N), 3.23-3.08 (m, 2H, CH₂N), 2.61 (d, J = 4.5 Hz, 3H, CH₃), 2.59-2.03 (m, 6H, CH₂N), 1.67-1.46 (m, 4H, CH), 1.37 (s, 9H, Boc), 1.21 (s, 3H, CH₃), 1.20-1.18 (m, 2H, CH₂), 1.19 (s, 6H, CH₃), 1.11 (s, 3H, CH₃), 0.99-0.91 (m, 6H, CH₃), 0.88-0.76 (m, 24H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 1099,79): *m/z* 573 [M/2 + Na]⁺, 1122 [M + Na]⁺

Table 3: ¹H NMR chemical shifts (in ppm) of **3A₂3** in CD₃OH (400 MHz)


Residue	N'H	NH	^α CH ¹	^α CH ²	^β CH	^γ CH	^δ CH	^ε CH	term CH
NH-Me		6,18							2,71
Leu ^u P1	6,37	6,14	3,56	2,67	3,85	1,68	1,20	0,90	
Ala ^u P2	6,20	5,84	3,49	2,41	3,96	1,04			
Val ^u P3	5,87	5,84	3,50	2,61	3,69	1,63	0,91		
Aib ^u P4	6,16	6,22	3,55	3,32		1,30	1,22		
Aib ^u P5	6,32	6,30	3,68	3,26		1,31	1,07		
Leu ^u P6	6,49	5,90	3,57	2,26	3,98	1,71	1,18	0,91	
Ala ^u P7	5,80	5,87	3,61	2,32	4,02	1,06			
Val ^u P8	5,99	6,64	3,47	2,55	3,63	1,64	0,93		
Boc									1,47

Boc-(Aib^u)_{rev}-(Aib^u)_{rev}-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe, (**B₂3**)

B₂3 was prepared from **M6** (63 mg, 0.193 mmol) and **B3** (125 mg, 0.203 mmol) as described in the general procedure B. After completion (12h), the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over MgSO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **B₂3** as a white product (110 mg, 72 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃OH) δ= 6.74 (m, 1H, NH), 6.58-6.45 (m, 2H, NH), 6.33 (m, 1H, NH), 6.27-6.19 (m, 2H, NH), 6.07-5.98 (m, 2H, NH), 5.88 (s, 1H, NH), 5.72 (d, J = 10.0 Hz, 1H, NH), 5.65 (s, 1H, NH), 4.09-3.95 (m, 1H, CHN), 3.94-3.81 (m, 2H, CHN), 3.68-3.49 (m, 4H, CH₂N), 3.36-3.32 (m, 2H, CH₂N), 3.09-3.00 (m, 1H, CH₂N), 2.74 (d, J = 3.8 Hz, 3H, CH₃N), 2.73-2.62 (m, 1H, CH₂N), 2.59-2.39 (m, 2H, CH₂N), 1.79-1.55 (m, 2H, CH), 1.48 (s, 9H, CH₃), 1.42 (s, 3H, CH₃), 1.33 (s, 3H, CH₃), 1.29-1.23 (m, 2H, CH₂), 1.22 (s, 3H, CH₃), 1.11 (s, 3H, CH₃), 1.06 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 0.97-0.87 (m, 12H, CH₃). ESI-MS (M_w 729.95): m/z 730.3 [M + H]⁺, 753.4 [M + Na]⁺, 1459.9 [2M + H]⁺, 1484.1 [2M + Na]⁺

Boc-Leu^u-(Aib^u)_{rev}-(Aib^u)_{rev}-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe, (**II.18**)

II.18 was prepared from **M1** (51 mg, 0.144 mmol) and **B₂3** (100 mg, 0.137 mmol) as described in the general procedure B. After completion (12h), the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over MgSO₄ and evaporated. Flash column chromatography

(CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **II.18** as a white product (85 mg, 71 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃OH) δ = 6.49 (m, 1H, NH), 6.40 (m, 2H, NH), 6.33 (m, 1H, NH), 6.27-6.16 (m, 3H, NH), 6.13-6.02 (m, 3H, NH), 5.90-5.83 (m, 2H, NH), 5.79 (d, J = 10.0 Hz, 1H, NH), 4.05-3.94 (m, 1H, CHN), 3.94-3.80 (m, 2H, CHN), 3.76-3.66 (m, 1H, CHN), 6.65-3.48 (m, 5H, CH₂N), 3.33-3.21 (m, 1H, CH₂N), 3.07-2.96 (m, 2H, CH₂N), 2.74 (d, J = 3.8 Hz, 3H, CH₃N), 2.72-2.65 (m, 2H, CH₂N), 2.59-2.37 (m, 2H, CH₂N), 1.77-1.56 (m, 3H, CH), 1.47 (s, 9H, CH₃), 1.42 (s, 3H, CH₃), 1.34 (s, 3H, CH₃), 1.31-1.25 (m, 4H, CH₂), 1.23 (s, 3H, CH₃), 1.13 (s, 3H, CH₃), 1.06 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 0.99-0.88 (m, 18H, CH₃).

Boc-Ala^u-Leu^u-(Aib^u)_{rev}-(Aib^u)_{rev}-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe, (II.19)

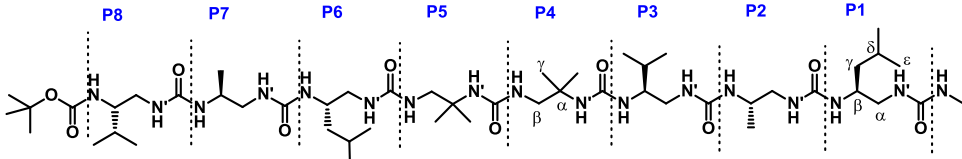
II.19 was prepared from **M2** (30 mg, 0.096 mmol) and **II.18** (80 mg, 0.091 mmol) as described in the general procedure B. After completion (12h), the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over MgSO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **II.19** as a white product (80 mg, 89 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃OH) δ = 6.60 (d, J = 9.1 Hz, 1H, NH), 6.53 (m, 1H, NH), 6.50-6.41 (m, 2H, NH), 6.36 (m, 1H, NH), 6.29 (d, J = 9.1 Hz, 1H, NH), 6.26-6.19 (m, 2H, NH), 6.16-6.00 (m, 3H, NH), 5.95 (s, 1H, NH), 5.88 (s, 1H, NH), 5.83 (m, 2H, NH), 4.07-3.79 (m, 4H, CHN), 3.78-3.65 (m, 1H, CHN), 3.64-6.40 (m, 5H, CH₂N), 3.33-3.21 (m, 2H, CH₂N), 2.97-2.84 (m, 1H, CH₂N), 2.83-2.76 (m, 1H, CH₂N), 2.75 (d, J = 3.9 Hz, 3H, CH₃N), 2.71-2.40 (m, 5H, CH₂N), 1.79-1.54 (m, 3H, CH), 1.47 (s, 9H, CH₃), 1.43 (s, 3H, CH₃), 1.39 (s, 3H, CH₃), 1.35-1.25 (m, 4H, CH₂), 1.23 (s, 3H, CH₃), 1.12 (s, 3H, CH₃), 1.09-1.04 (m, 6H, CH₃), 0.98-0.88 (m, 18H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 972.27): *m/z* 973.4 [M + H]⁺, 995.5 [M + Na]⁺, 1102.0 [M + K]⁺

Boc-Val^u-Ala^u-Leu^u-(Aib^u)_{rev}-(Aib^u)_{rev}-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe, (3B₂3)

3B₂3 was prepared from **M3** (29 mg, 0.086 mmol) and **II.19** (80 mg, 0.082 mmol) as described in the general procedure B. After completion (12h), the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over MgSO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **3B₂3** as a white product (88 mg, 97 %). ¹H NMR : (700MHz, CD₃OH) δ = 6.66 (m, 1H, NH), 6.61 (d, J = 10.1 Hz, 1H, NH), 6.57-6.51 (m, 2H, NH), 6.50-6.43 (m, 2H, NH), 6.35 (m, 1H, NH), 6.30 (d, J = 9.1 Hz, 1H, NH), 6.24 (m, 1H, NH), 6.15 (d, J = 10.0 Hz, 1H, NH), 6.01-5.93 (m, 2H, NH), 5.92-5.92 (m, 2H, NH), 5.88 (m, 1H, NH), 5.85 (m, NH), 5.82 (m, 1H, NH), 4.17-3.82 (m, 4H, CHN), 3.81-3.71 (m, 1H, CHN), 3.70-3.46 (m, 9H, CHN-CH₂N), 2.91-2.82 (m, 1H, CH₂N), 2.79-2.69 (m, 1H, CH₂N), 2.75 (d, J = 3.8 Hz, 3H, CH₃N), 2.68-2.42 (m, 5H, CH₂N), 2.42-2.29 (m, 1H, CH₂N), 1.79-1.56 (m, 4H, CH), 1.50 (s, 9H, CH₃), 1.43 (s, 3H, CH₃),

1.39 (s, 3H, CH₃), 1.31-1.25 (m, 4H, CH₂), 1.24 (s, 3H, CH₃), 1.12 (s, 3H, CH₃), 1.08-1.01 (m, 6H, CH₃), 0.98-0.88 (m, 24H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OH) δ 160.68, 160.64, 160.21, 160.02, 159.66, 159.45, 159.20, 158.32, 78.93, 56.23, 56.13, 54.56, 54.46, 52.99, 52.89, 52.54, 52.45, 46.62, 46.34, 45.49, 45.25, 44.96, 44.78, 43.15, 42.82, 42.72, 42.29, 42.18, 30.68, 30.42, 27.50, 25.98, 25.93, 25.63, 25.50, 25.07, 24.72, 24.57, 24.48, 24.44, 22.39, 21.14, 21.12, 18.85, 18.78, 17.60, 17.50, 17.28, 17.18. ESI-MS (M_w 1100.44): *m/z* 1100.5 [M + H]⁺, 1122.6 [M + Na]⁺

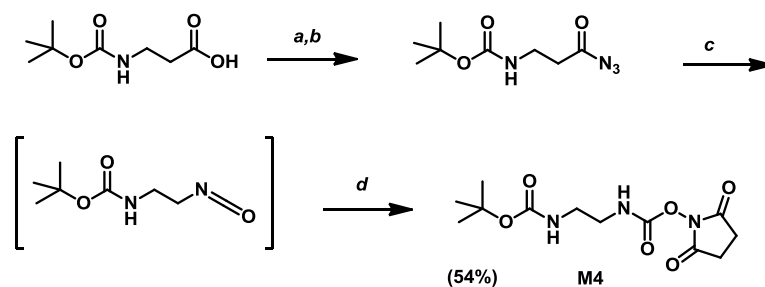
Table 4: ¹H NMR chemical shifts (in ppm) of **3B₂3** in CD₃OH (700 MHz)



Residue	N'H	NH	^α CH ¹	^α CH ²	^β CH	^γ CH	^δ CH	^ε CH	term CH
NH-Me		6,23							2,73
Leu ^u	P1	6,34	6,29	3,57	2,73	3,85	1,71	1,25	0,93
Ala ^u	P2	6,53	6,14	3,55	2,45	4,00	1,05		
Val ^u	P3	6,46	5,86	3,56	2,51	3,55	1,61	0,91	
(Aib) _{rev} ^u	P4	5,91	6,53			3,96	2,63	1,41	1,08
(Aib) _{rev} ^u	P5	5,90	6,46			3,76	2,86	1,38	1,22
Leu ^u	P6	6,65	5,94	3,65	2,54	3,98	1,72	1,22	0,94
Ala ^u	P7	5,81	5,84	3,50	2,34	4,08	1,02		
Val ^u	P8	5,96	6,61	3,53	2,58	3,53	1,63	0,93	
Boc									1,48

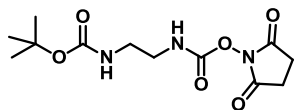
4. Part II: Oligourea with two adjacent glycine type residues

M4 was synthesized by N. Pendem from (*tert*-butoxycarbonylamino) propionic acid.^[123]



a: *t*BuOCOC_l, NMM, THF, -10°C; b: NaN₃; c: 65°C, Toluène; d: NHS, pyridine

Figure Exp 1 : Schéma de synthèse du monomère activé **M4**



O-Succinidimyl-2-(tert-butoxycarbonylamino-ethyl) carbamate (M4)

3-(tert-butoxycarbonylamino) propionic acid (1.5 g, 7.94 mmol) was dissolved in THF (15 mL) under Ar and the reaction mixture was cooled down to -15°C NMM (0.92 mL, 8.34 mmol) and IBCF (1.08 mL, 8.34 mmol) were successively added and the reaction mixture was gently stirred for 20 minutes. The resulting white suspension was allowed to warm up to -5°C and was treated with an aqueous solution of NaN_3 (1.3 g, 19.85 mmol in 5 mL). The reaction mixture was next stirred for 5 min, diluted with EtOAc, washed one time with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure to give the corresponding acyl azide intermediate, which was then diluted in toluene under Ar. The resulting reaction mixture was heated to 65°C . Once gas evolution has stopped, N-hydroxysuccinimide (1.04 g, 8.73 mmol) and pyridine (0.73 mL, 8.73 mmol) were added. The reaction mixture was stirred for 10 min. at 65°C and then cooled down to room temperature. The precipitate was filtered off and washed with toluene to afford **M4** (1.3 g, 54.4%) as a white solid. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6) δ = 8.27 (t, J = 5.0 Hz, 1NH), 6.88 (t, J = 5.1 Hz, 1NH), 3.13–3.05 (m, 2H), 3.04–2.97 (m, 2H), 2.76 (s, 4H), 1.38 (s, 9H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO d}_6$) δ 169.28, 115.84, 151.26, 41.62, 39.33, 27.53, 24.74; **ESI-MS** (M_w 301.30): m/z 302.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 324.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

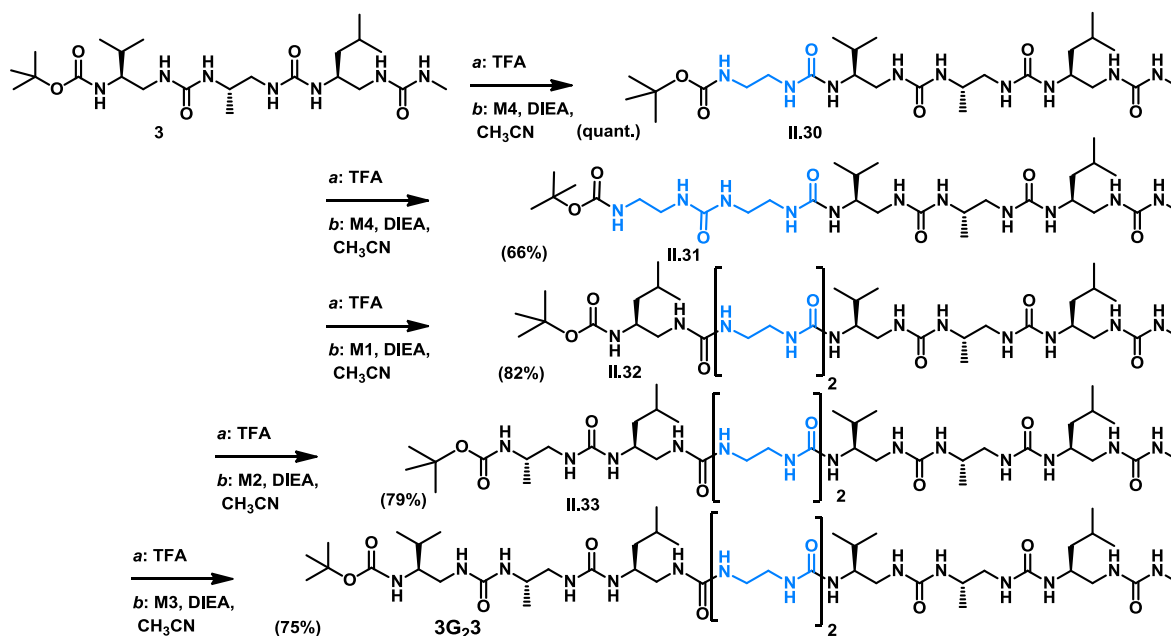


Figure Exp 2 : Schéma de synthèse de la molécule 3G₂3

Boc Gly^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe, (II.30)

II.30 was prepared from **M4** (171 mg, 0.568 mmol) and **3** (300 mg, 0.598 mmol) as described in the general procedure B. After completion (12h), the desired compound was precipitated upon

addition of water and washed with 1M KHSO₄ aqueous solution and water. Finally **II.30** was dried over vacuum. (360 mg, quantitative). ¹H NMR : (300MHz, CD₃OH) δ= 6.72 (m, 1H, NH), 6.36 (m, 1H, NH), 6.27 (m, 1H, NH), 6.17 (m, 1H, NH), 6.09 (m, 1H, NH), 5.99 (d, J = 9.4 Hz, 1H, NH), 5.91-5.79 (m, 3H, NH), 4.08-3.96 (m, 1H, CHN), 3.94-3.83 (m, 1H, CHN), 3.69-3.44 (m, 4H, CHN-CH₂N), 3.11-2.94 (m, 2H, CH₂N), 2.73 (d, J = 4.1 Hz, 3H, CH₃N), 2.70-2.42 (m, 5H, CH₂N), 1.78-1.58 (m, 2H, CH), 1.48 (s, 9H, Boc), 1.37-1.21 (m, 2H, CH₂), 1.06 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 0.99-0.89 (m, 12H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 587.76) : m/z 588.3 [M+H]⁺, 611.4 [M+Na]⁺

Boc Gly^u-Gly^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe, (II.31)

II.31 was prepared from **M4** (112 mg, 0.371 mmol) and **II.30** (230 mg, 0.391 mmol) as described in the general procedure B. After completion (12h), the desired compound **II.31** was precipitated upon addition of water and washed with 1M KHSO₄ aqueous solution and water. Finally **II.31** was dried over vacuum. (175 mg, 66 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃OH) δ= 6.70 (m, 1H, NH), 6.40 (m, 1H, NH), 6.32 (m, 1H, NH), 6.28-6.14 (m, 3H, NH), 6.12-5.95 (m, 4H, NH), 5.87 (d, J = 9.8 Hz, 1H, NH), 4.08-3.96 (m, 1H, CHN), 3.95-3.84 (m, 1H, CHN), 3.68-3.43 (m, 7H, CHN-CH₂N), 3.30-2.80 (m, 6H, CH₂N), 2.73 (d, J = 4.3 Hz, 3H, CH₃N), 2.65-2.54 (m, 1H, CH₂N), 2.51-2.40 (m, 1H, CH₂N), 1.78-1.58 (m, 2H, CH), 1.48 (s, 9H, Boc), 1.34-1.22 (m, 2H, CH₂), 1.06 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 1.00-0.86 (m, 12H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 673.85) : m/z 674.3 [M+H]⁺, 697.4 [M+Na]⁺

Boc Leu^u-Gly^u-Gly^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe, (II.32)

II.32 was prepared from **M1** (80 mg, 0.225 mmol) and **II.31** (160 mg, 0.237 mmol) as described in the general procedure B. After completion (12h), the desired compound was precipitated upon addition of water and washed with 1M KHSO₄ aqueous solution and water. Finally **II.32** was dried over vacuum. (160 mg, 82 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃OH) δ= 6.52 (d, J = 9.3 Hz, 1H, NH), 6.46-6.35 (m, 3H, NH), 6.31 (m, 1H, NH), 6.22 (m, 1H, NH), 6.20-6.00 (m, 6H, NH), 5.97 (m, 1H, NH), 4.13-3.98 (m, 1H, CHN), 3.95-3.85 (m, 1H, CHN), 3.84-3.75 (m, 1H, CHN), 3.71-3.38 (m, 9H, CHN-CH₂N), 3.01-2.77 (m, 4H, CH₂N), 2.74 (d, J = 4.1 Hz, 3H, CH₃N), 2.71-2.62 (m, 2H, CH₂N), 2.60-2.49 (m, 1H, CH₂N), 2.48-2.37 (m, 1H, CH₂N), 1.79-1.57 (m, 3H, CH), 1.49 (s, 9H, Boc), 1.37-1.19 (m, 4H, CH₂), 1.07 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 1.00-0.86 (m, 18H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 816.5) : m/z 817.5 [M+H]⁺, 839.5 [M+Na]⁺

Boc Ala^u-Leu^u-Gly^u-Gly^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe, (II.33)

II.33 was prepared from **M2** (51 mg, 0.163 mmol) and **II.32** (140 mg, 0.172 mmol) as described in the general procedure B. After completion (12h), the desired compound **II.33** was precipitated upon addition of water and washed with 1M KHSO₄ aqueous solution and water. Finally **II.33** was dried over vacuum. (125 mg, 79 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃OH) δ= 6.70-6.57 (m, 2H,

NH), 6.49-6.34 (m, 5H, NH), 6.26-6.19 (m, 2H, NH), 6.16-5.98 (m, 6H, NH), 4.14-3.98 (m, 1H, CHN), 3.96-3.85 (m, 1H, CHN), 3.83-3.73 (m, 1H, CHN), 3.70-3.38 (m, 10H, CHN-CH₂N), 3.14-2.77 (m, 4H, CH₂N), 2.74 (d, *J* = 4.5 Hz, 3H, CH₃N), 2.72-2.62 (m, 2H, CH₂N), 2.59-2.35 (m, 4H, CH₂N), 1.80-1.55 (m, 3H, CH), 1.49 (s, 9H, Boc), 1.36-1.20 (m, 4H, CH₂), 1.14-1.04 (m, 6H, CH₃), 1.00-0.86 (m, 18H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 916.17): *m/z* 918.5 [M+H]⁺, 940.7 [M+Na]⁺

Boc Val^u-Ala^u-Leu^u-Gly^u-Gly^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe, (3G₂3)

3G₂3 was prepared from **M3** (35 mg, 0.104 mmol) and **II.33** (100 mg, 0.109 mmol) as described in the general procedure B. After completion (12h), the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over MgSO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **3G₂3** as a white product (85 mg, 75 %). **¹H NMR** : (300MHz, CD₃OH) δ = 6.73-6.62 (m, 3H, NH), 6.53 (m, 1H, NH), 6.50-6.39 (m, 3H, NH), 6.30-6.20 (m, 3H, NH), 6.18-5.96 (m, 5H, NH), 5.92 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, NH), 5.84 (m, 1H, NH), 4.15-3.84 (m, 4H, CHN), 3.80-3.46 (m, 12H, CHN-CH₂N), 2.93-2.79 (m, 3H, CH₂N), 2.74 (d, *J* = 4.0 Hz, 3H, CH₃N), 2.71-2.31 (m, 7H, CH₂N), 1.81-1.57 (m, 4H, CH), 1.50 (s, 9H, Boc), 1.35-1.21 (m, 4H, CH₂), 1.11-1.04 (m, 6H, CH₃), 1.01-0.87 (m, 24H, CH₃). **¹³C NMR**: (101 MHz, CD₃OH) δ 161.39, 161.24, 161.12, 161.03, 160.71, 160.58, 159.92, 158.72, 79.36, 56.81, 55.37, 46.40, 45.83, 45.36, 45.31, 43.74, 43.19, 42.90, 42.09, 41.59, 41.36, 39.64, 39.59, 31.07, 30.96, 27.86, 25.96, 25.29, 24.91, 24.29, 22.67, 21.72, 21.51, 19.16, 18.10, 17.83, 17.57, 17.31. **ESI-MS** (M_w 1044.34) : *m/z* 1044.7 [M+H]⁺, 1066.7 [M+Na]⁺

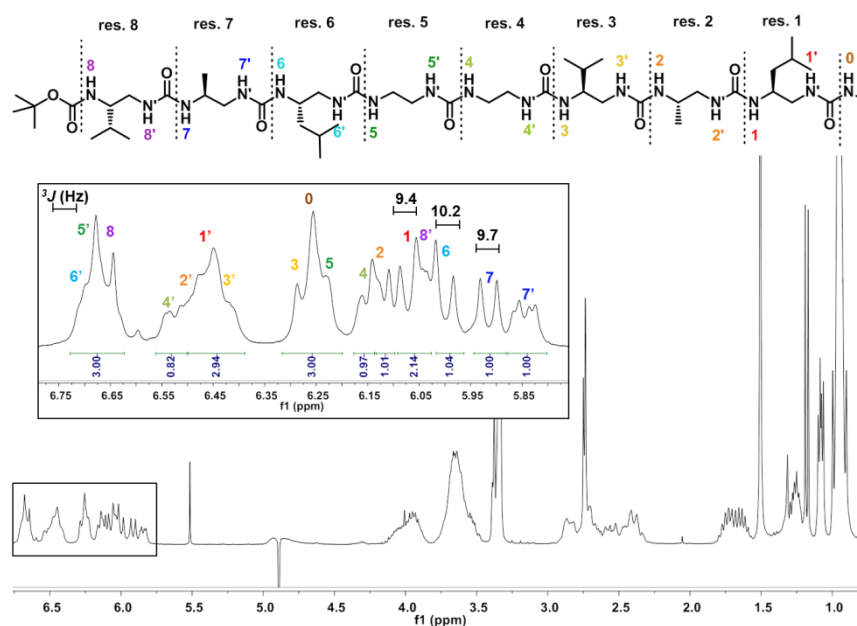
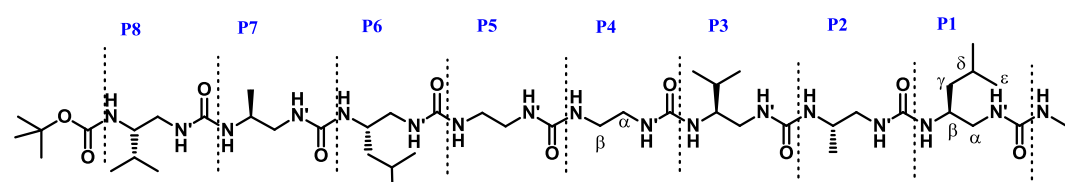


Figure Exp 3: Spectre RMN ¹H de l'oligourée **3G₂3** (CD₃OH) avec l'attribution des signaux des NHs et les constantes de couplage vicinal ³J (NH,^βCH) (Hz).

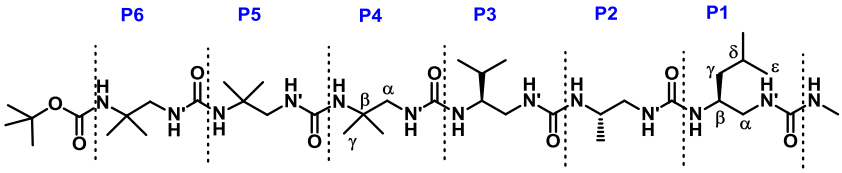
Table 5: ^1H NMR chemical shifts (in ppm) of **3G₂3** in CD_3OH (400 MHz)


Residue	N'H	NH	αCH^1	αCH^2	βCH	γCH	δCH	ϵCH	term CH
NH-Me		6.23							2.72
Leu ^u	P1	6.44	6.05	3.57	2.68	3.89	1.70	1.24	0.93
Ala ^u	P2	6.45	6.10	3.55	2.40	4.03	1.04		
Val ^u	P3	6.41	6.26	3.63	2.50	3.63	1.59	0.90	
Gly ^u	P4	6.51	6.13	3.62	2.81	3.69	2.71		
Gly ^u	P5	6.66	6.22	3.64	2.84	3.65	2.68		
Leu ^u	P6	6.68	5.98	3.65	2.38	3.98	1.72	1.22	0.93
Ala ^u	P7	5.82	5.90	3.61	2.35	3.92	1.06		
Val ^u	P8	6.02	6.65	3.51	2.57	3.63	1.65	0.95	
Boc									1.48

5. Part III : trimeric canonical segment as chiral controleur

Boc-Aib^u-Aib^u-Aib^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe, (**A₃3**)

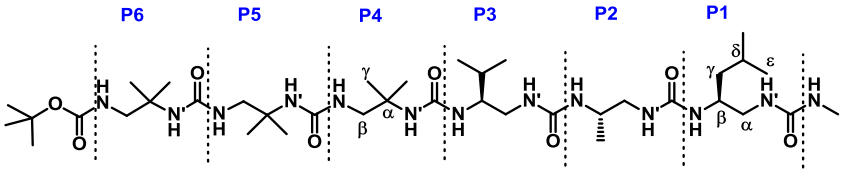
A₃3 was prepared from **M5** (11 mg, 0.032 mmol) and **A₂3** (25 mg, 0.034 mmol) as described in the general procedure B. After completion (12h), the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO_3 aqueous solution, 1M KHSO_4 aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over MgSO_4 and evaporated. Flash column chromatography (CH_2Cl_2 -MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **A₃3** as a white product (21 mg, 72 %). ^1H NMR : (400MHz, CD_3OH) δ = 6.38-6.24 (m, 2H, NH), 6.18-6.05 (m, 4H, NH), 6.01-5.85 (m, 7H, NH), 3.96-3.88 (m, 1H, CHN), 3.87-3.78 (m, 1H, CHN), 3.71-3.60 (m, 1H, CHN), 3.51-3.31 (m, 6H, CH_2N), 3.28-3.19 (m, 3H, CH_2N), 2.85-2.74 (m, 2H, CH_2N), 2.72 (d, J = 4.3 Hz, 3H, CH_3N), 2.64-2.54 (m, 1H, CH_2N), 1.77-1.64 (m, 2H, CH), 1.44 (s, 9H, Boc), 1.31-1.19 (m, 20H, CH_2 - CH_3), 1.06 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CH_3), 0.97-0.88 (m, 12H, CH_3). ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OH) δ 161.05, 161.01, 160.77, 160.44, 160.00, 159.71, 159.67, 55.37, 53.57, 53.48, 53.38, 51.16, 46.52, 45.76, 45.26, 43.38, 42.53, 42.50, 30.86, 27.82, 26.05, 25.22, 25.11, 24.93, 24.12, 22.73, 21.43, 19.18, 17.64, 17.33. **ESI-MS** (M_w 844.1): m/z 844.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 866.7 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1688.53 $[2\text{M} + \text{H}]^+$, 1709.5 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$.

Table 6 : ^1H NMR chemical shifts (in ppm) of **A₃3** in CD_3OH (400 MHz)


Residue	N'H	NH	$^{\alpha}\text{CH}^1$	$^{\alpha}\text{CH}^2$	βCH	γCH	δCH	ϵCH	term CH
NH-Me		6,13							2,72
Leu ^u	P1	6,33	6,07	3,44	2,80	3,82	1,24	1,68	0,92
Ala ^u	P2	6,13	5,88	3,42	2,58	3,92	1,06		
Val ^u	P3	5,94	5,91	3,43	2,75	3,65	1,67	0,92	
Aib ^u	P4	-	-	-	-				
Aib ^u	P5	-	-	-	-				
Aib ^u	P6	-	-	-	-				
Boc									1,44

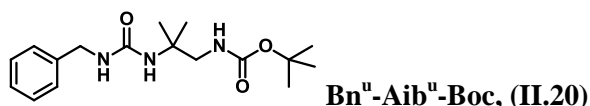
Boc-(Aib^u)_{rev}-(Aib^u)_{rev}-(Aib^u)_{rev}-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe, (B₃3**)**

B₃3 was prepared from **M6** (5 mg, 0.014 mmol) and **B₂3** (10 mg, 0.014 mmol) as described in the general procedure B. After completion (12h), the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO_3 aqueous solution, 1M KHSO_4 aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over MgSO_4 and evaporated. Flash column chromatography (CH_2Cl_2 -MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **B₂3** as a white product (7.5 mg, 61 %). ^1H NMR : (400MHz, CD_3OH) δ = 6.65 (m, 1H, NH), 6.55-6.47 (m, 2H, NH), 3.67 (m, 1H, NH), 6.27 (d, J = 8.6 Hz, 1H, NH), 6.21 (m, 1H, NH), 6.12 (d, J = 9.8 Hz, 1H, NH), 6.03 (m, 1H, NH), 5.96-5.83 (m, 5H, NH), 4.03-3.88 (m, 2H, CHN), 3.87-3.78 (m, 1H, CHN), 3.77-3.69 (m, 1H, NH), 3.62-3.35 (m, 6H, CHN- CH_2N), 3.27-3.20 (m, 1H, CH_2N), 3.01-2.94 (m, 1H, CH_2N), 2.85 (m, 1H, CH_2N), 2.74 (d, J = 4.4 Hz, 3H, CH_3N), 2.70-2.53 (m, 3H, CH_2N), 1.77-1.58 (m, 2H, CH), 1.45 (s, 9H, Boc), 1.41 (s, 3H, CH_3), 1.32 (s, 3H, CH_3), 1.27 (s, 3H, CH_3), 1.25 (m, 2H, CH_2), 1.24 (s, 3H, CH_3), 1.20 (s, 3H, CH_3), 1.12 (s, 3H, CH_3), 1.05 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CH_3), 0.95-0.87 (m, 12H, CH_3). ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OH) δ 161.01, 160.82, 160.52, 160.02, 159.49, 159.44, 157.62, 79.07, 54.89, 54.84, 53.46, 53.35, 53.32, 53.23, 46.97, 46.91, 45.81, 45.21, 43.70, 42.85, 42.47, 30.62, 27.81, 26.07, 25.29, 25.06, 24.96, 24.80, 22.76, 21.42, 19.29, 17.76, 17.32. **ESI-MS** (M_w 844.1): m/z 844.5 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 866.6 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1710.3 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$.

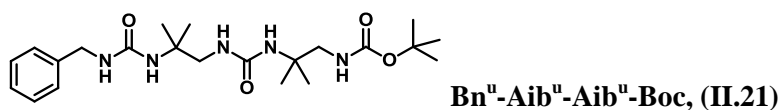
Table 7 : ^1H NMR chemical shifts (in ppm) of **B₃3** in CD_3OH (400 MHz)


Residue	N'H	NH	$^{\alpha}\text{CH}^1$	$^{\alpha}\text{CH}^2$	βCH	γCH	δCH	ϵCH	term CH
NH-Me		6,20							2,73
Leu ^u	P1	6,36	6,26	3,41	2,85	3,81	1,25	1,69	0,92
Ala ^u	P2	6,50	6,11	3,41	2,60	3,96	1,05		
Val ^u	P3	6,49	5,89	3,48	2,60	3,56	1,62	0,90	
(Aib) _{rev} ^u	P4	5,88	6,02			3,91	2,67	1,41	1,12
(Aib) _{rev} ^u	P5	5,84	5,92			3,53	2,97	1,32	1,20
(Aib) _{rev} ^u	P6	5,86	6,64			3,34	3,23	1,27	1,24
Boc									1,45

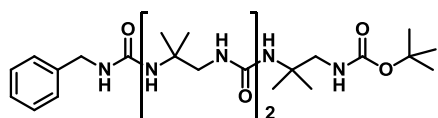
6. Part IV : Oligoureas mainly composed of achiral residues



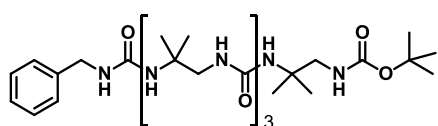
II.20 was prepared from **M6** (240 mg, 0.709 mmol) and benzylamine (80 mg, 0.746 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the product was precipitated upon addition of water and filtered to give **II.20** as a white product (170 mg, 72%). ^1H NMR : (400MHz, CD_3CN) δ = 7.39-7.21 (m, 5H, Ar), 6.03 (s, 1H, NH), 5.26 (s, 1H, NH), 5.07 (s, 1H, NH), 4.26 (d, J = 6.1 Hz, 2H, CH_2N), 3.22 (d, J = 6.0 Hz, 2H, CH_2N), 1.43 (s, 9H, Boc), 1.23 (s, 6H, CH_3). **ESI-MS** (M_w 321.41): m/z 322 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 344 $[\text{M} + \text{Na}]^+$



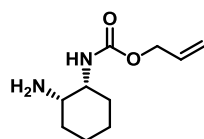
II.21 was prepared from **M6** (95 mg, 0.289 mmol) and **II.20** (98 mg, 0.305 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the product was precipitated upon addition of water and filtered to give **II.21** as a white product (101 mg, 76 %). ^1H NMR : (300MHz, CD_3CN) δ = 7.38-7.20 (m, 5H, Ar), 6.04 (s, 1H, NH), 5.37-5.20 (m, 3H, NH), 5.08 (s, 1H, NH), 4.25 (d, J = 6.1 Hz, 2H, CH_2N), 3.19 (m, 4H, CH_2N), 1.41 (s, 9H, Boc), 1.21 (s, 12H, CH_3). **ESI-MS** (M_w 435,56): m/z 436 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 458 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 871 $[2\text{M} + \text{H}]^+$, 894 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$, 1306 $[3\text{M} + \text{H}]^+$, 1329 $[3\text{M} + \text{Na}]^+$

**Bn^u-Aib^u-Aib^u-Aib^u-Boc, (II.22)**

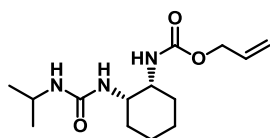
II.22 was prepared from **M6** (61 mg, 0.185 mmol) and **II.21** (85 mg, 0.195 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the product was precipitated upon addition of water and filtered to give **II.22** as a white product (76 mg, 71 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃CN) δ = 7.37-7.13 (m, 5H, Ar), 5.96 (s, 1H, NH), 5.42 (m, 2H, NH), 5.27 (m, 3H, NH), 5.11 (s, 1H, NH), 4.20 (d, J = 6.1 Hz, 2H, CH₂N), 3.20-3.08 (m, 6H, CH₂N), 1.38 (s, 9H, Boc), 1.21-1.15 (s, 18H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 549,71): m/z 550 [M + H]⁺, 572 [M + Na]⁺

**Bn^u-Aib^u-Aib^u-Aib^u-Aib^u-Boc, (II.23)**

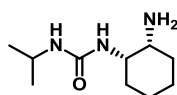
II.23 was prepared from **M6** (28 mg, 0.086 mmol) and **II.22** (50 mg, 0.091 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the product was precipitated upon addition of water and filtered to give **II.23** as a white product (38 mg, 63 %). ¹H NMR : (400MHz, CD₃CN) δ = 7.25-7.09 (m, 5H, Ar), 5.90 (s, 1H, NH), 5.50-5.41 (m, 2H, NH), 5.34-5.08 (m, 6H, NH), 4.14 (d, J = 6.1 Hz, 2H, CH₂N), 3.15-3.03 (m, 8H, CH₂N), 1.31 (s, 9H, Boc), 1.16-1.03 (s, 24H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 663.44): m/z 686 [M + Na]⁺

**(2-Amino-cyclohexyl)-carbamic acid allyl ester, (II.24)**

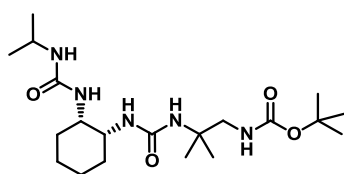
To a stirred suspension of *Candida antarctica* lipase B (600 mg, Novozyme-435, $\geq 10,000$ U/g), in toluene (20 mL) was added *cis*-1,2-diaminocyclohexane (526 μ L, 4.37 mmol) and diallyl carbonate (630 μ L, 4.37 mmol). The reaction was stirred at room temperature for 96 h. Methanol (5 mL) was added and the reaction mixture was filtered through celite (eluting with methanol washings). The solvent was removed by evaporation to afford a yellow residue. The residue was subjected to silica gel column chromatography (95:5 CH₂Cl₂:CH₃OH) to afford **II.24** as a yellow oil (400 mg, 46 %). ¹H NMR : (400MHz, CDCl₃) δ = 5.95 (m, 1H, CH=), 5.32 (ddd, J = 17.2, 3.1, 1.6 Hz, 1H, CH₂=), 5.29 (s, 1H, NH), 5.22 (ddd, J = 10.4, 2.7, 1.3 Hz, 1H, CH₂=), 4.57 (d, J = 5.2 Hz, 2H, CH₂OCO), 3.72-3.61 (m, 1H, CHN), 3.04 (dt, J = 6.9, 3.7 Hz, 1H, NH), 1.70-1.60 (m, 2H, CH₂), 1.59-1.45 (m, 4H, CH₂), 1.46-1.40 (m, 2H, CH₂), 1.39 (s, 2H, NH₂). **ESI-MS** (M_w 198,14): m/z 199 [M + H]⁺

[2-(3-Isopropyl-ureido)-cyclohexyl]-carbamic acid allyl ester, (**II.25**)

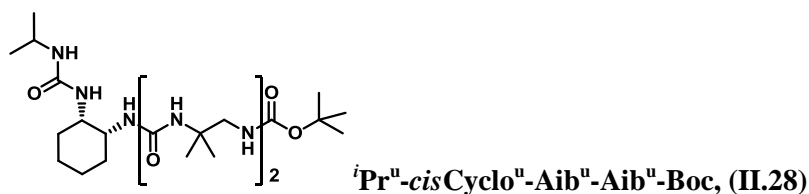
To a solution of **II.24** (400 mg, 2.01 mmol) in CH_2Cl_2 at 0°C was added isopropyl isocyanate (343 mg, 4.03 mmol) dropwise. The reaction was stirred at 0°C for 30 min then at room temperature overnight. The solvent and remaining isocyanate were both removed under reduced pressure to give a sticky brown residue which was subjected to silica gel column chromatography (95:5 CH_2Cl_2 :MeOH) to give **II.25** as viscous yellow oil (555 mg, 97%). $^1\text{H NMR}$: (400MHz, CDCl_3) δ = 5.99-5.87 (m, 1H, CH=), 5.60 (s, 1H, NH), 5.32 (ddd, J = 17.2, 3.1, 1.5 Hz, 1H, CH_2 =), 5.31 (s, 1H, NH), 5.22 (ddd, J = 10.4, 2.6, 1.3 Hz, 1H, CH_2 =), 4.57 (d, J = 5.2 Hz, 2H, CH_2OCO), 3.91 (m, 1H, CHN), 3.85 (td, J = 13.1, 6.6 Hz, 1H, CHN), 3.77 (m, 1H, CHN), 1.86-1.68 (m, 2H, CH_2), 1.61-1.39 (m, 6H, CH_2), 1.14 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH_3). **ESI-MS** (M_w 283,19): m/z 284 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 306 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

1-(2-Amino-cyclohexyl)-3-isopropyl-urea, (**II.26**)

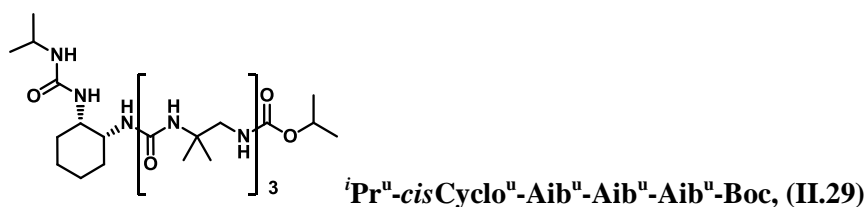
To a solution of $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (44 mg, 0.19 mmol) and triphenylphosphine (254 mg, 0.97 mmol) in CH_2Cl_2 was added 1,3-dimethylbarbituric acid (910 mg, 5.82 mmol) and a solution of **II.25** (550 mg, 1.94 mmol) in CH_2Cl_2 . The reaction was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the residue subjected to silica gel column chromatography (90:10:1 CH_2Cl_2 :MeOH: Et_3N) to afford **II.26** a viscous yellow oil (200 mg, 52 %). $^1\text{H NMR}$: (400MHz, CDCl_3) δ = 5.10 (s, 1H, NH), 4.67 (s, 1H, NH), 3.82-3.66 (m, 2H, CHN), 2.95 (m, 1H, CHNH₂), 1.66-1.40 (m, 6H, CH_2), 1.38-1.28 (m, 2H, CH_2), 1.09-1.04 (m, 6H, CH_3). **ESI-MS** (M_w 199,17): m/z 200 $[\text{M} + \text{H}]^+$

*iPr*^u-*cis*Cyclo^u-Aib^u-Boc, (**II.27**)

II.27 was prepared from **M6** (330 mg, 1.003 mmol) and **II.26** (200 mg, 1.003 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the product was precipitated upon addition of water and filtered to give **II.27** as a white product (300 mg, 72 %). $^1\text{H NMR}$: (400MHz, CD_3CN) δ = 6.35 (s, 1H, NH), 5.13 (d, J = 8.3 Hz, 1H, NH), 4.90-4.82 (m, 2H, NH), 4.75 (s, 1H, NH), 3.86 (m, 2H, CHN), 3.71 (s, 1H, CHN), 3.64 (dd, J = 13.5, 6.1 Hz, 1H, CH_2N), 2.98 (dd, J = 13.5, 6.9 Hz, 1H, CH_2N), 1.62-1.56 (m, 2H, CH_2), 1.52-1.34 (m, 6H, CH_2), 1.43 (s, 9H, Boc), 1.17-1.04 (m, 12H, CH_3). **ESI-MS** (M_w 413,30): m/z 414 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 436 $[\text{M} + \text{Na}]^+$



II.28 was prepared from **M6** (113 mg, 0.344 mmol) and **II.27** (150 mg, 0.362 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the product was precipitated upon addition of water and filtered to give **II.28** as a white product (130 mg, 68%) $^1\text{H NMR}$: (300MHz, Pyridine d^5) δ = 9.02 (m, 1H, NH), 7.77 (m, 1H, NH), 7.66 (m, 1H, NH), 7.54-7.39 (m, 2H, NH), 7.27-7.13 (m, 2H, NH), 5.65 (m, 1H, CHN), 5.54-5.41 (m, 2H, CHN), 5.40-5.30 (m, 1H, CH₂N), 5.21-5.09 (m, 1H, CH₂N), 4.984-4.73 (m, 1H, CH₂N), 4.65-4.50 (m, 1H, CH₂N), 2.87-2.47 (m, 23H, CH₃-Cycl), 2.39-2.21 (m, 12H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 247,38): m/z 528 [M + H]⁺, 550 [M + Na]⁺



II.29 was prepared from **M6** (41 mg, 0.126 mmol) and **II.28** (70 mg, 0.132 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the product was precipitated upon addition of water and filtered to give **II.29** as a white product (60 mg, 70 %). $^1\text{H NMR}$: (400MHz, CD₃CN) δ = 6.51 (m, 1H, NH), 5.96-5.86 (m, 2H, NH), 5.86-5.66 (m, 6H, NH), 3.80 (m, 1H, CHN), 3.76-3.63 (m, 2H, CHN), 3.55 (dd, J = 14.5, 6.4 Hz, 1H, CH₂N), 3.36 (dd, J = 14.1, 6.6 Hz, 1H, CH₂N), 3.21-3.09 (m, 2H, CH₂N), 3.04 (dd, J = 13.4, 6.8 Hz, 1H, CH₂N), 2.90 (dd, J = 13.2, 6.8 Hz, 1H, CH₂N), 1.57-1.37 (m, 8H, CH₂), 1.34 (s, 9H, Boc), 1.23-0.97 (m, 24H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 641,46): m/z 642 [M + H]⁺, 664 [M + Na]⁺

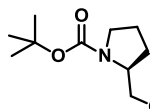
7. X-ray crystallography

Table 8 : Crystallographic data for compounds 3A3, 3B3 and 3B₂3

Compound	3A3	3B3	3B ₂ 3
CCDC code	922576	922577	922578
Formula	C23.50 H48.50 N7.50 O5 S0.50	C90 H183 N30 O19	C25 H50.50 N8.50 O6
M	532.23	1989.66	566.24
Crystal system	triclinic	monoclinic	monoclinic
Space group	P1	P2(1)	P2(1)
<i>a</i> /Å	9.866(2)	14.2758(7)	10.658(2)
<i>b</i> /Å	10.472(2)	10.5020(7)	18.807(4)
<i>c</i> /Å	16.893(3)	39.927(3)	17.672(4)
α /°	96.60(3)	90.00	90.00
β /°	95.35(3)	90.983(6)	106.39(3)
γ /°	113.94(3)	90.00	90.00
<i>V</i> /Å ³	1565.7(5)	5985.1(6)	3398.2(12)
T /K	293(2)	293(2)	293(2)
Z	2	2	4
ρ /g cm ⁻¹	1.129	1.104	1.107
size (mm)	0.2x 0.02x 0.01	0.05x 0.05x 0.01	0.1x0.02x0.01
λ / Å	1.54178	1.54178	1.54178
μ /mm ⁻¹	0.951	0.641	0.656
Independent reflections	8949	9534	5521
measured reflections	18961	56320	13718
parameters/restraints	677/3	1284/1	708/4
<i>R</i> 1, <i>wR</i> 2	0.1196/ 0.3192	0.0459/ 0.0833	0.0676/0.1834
goodness of fit	1.113	0.874	1.072

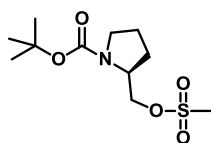
III. Compounds described in Chapter 3

1. Preparation of O-succinimidyl carbamate M7



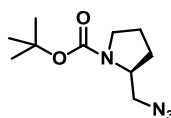
2-Hydroxymethyl-pyrrolidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester (III.1)

Boc-L-Pro-OH (5.00 g, 23.23 mmol) was dissolved in anhydrous THF (100 ml) under positive N₂ atmosphere, cooled to -10 °C and NMM (2.81 ml, 25.55 mmol) was added. IBCF (3.20 ml, 24.39 mmol) was dissolved in anhydrous THF and added dropwise. After addition, the mixture was stirred at -10°C for 45 min. The insoluble white solid was filtered off and washed with THF. NaBH₄ (1.76 g, 46.46 mmol) was dissolved in a small amount of distilled water at 0°C. The previous mixture of anhydride was added dropwise and the resulting solution was stirred at room temperature overnight. The THF was removed under reduced pressure and the residue was quenched with 1M KHSO₄ aqueous solution. Then it was diluted in AcOEt and the organic layer was washed with saturated NaHCO₃ solution, water and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure to give the desired alcohol **III.1** (4.30 g, 91 %). ¹H NMR: (300MHz, CDCl₃) δ = 4.01-3.89 (m, 1H), 3.67-3.52 (m, 2H), 3.51-3.39 (m, 1H), 3.37-3.24 (m, 1H), 2.08,1.94 (m, 1H), 1.91-1.68 (m, 2H), 1.67-1.53 (m,1H), 1.47 (s, 9H). ESI-MS (M_w 201.27): m/z 223.9 [M + Na]⁺, 424.8 [2M + Na]⁺

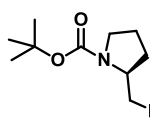


2-Methanesulfonyloxymethyl-pyrrolidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester (III.2)

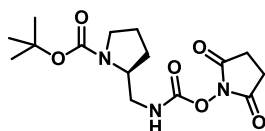
Alcohol **III.1** (4.30 g, 21.36 mmol) was dissolved in anhydrous CH₂Cl₂ and cooled to 0°C under N₂. After 5 min stirring, Et₃N (4.44 ml, 32.05 mmol) and MeSO₂Cl (2.49 ml, 32.05 mmol) were added dropwise, the reaction mixture was stirred 2h at 0°C. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting oil was diluted with AcOEt and saturated NaHCO₃ solution. The organic layer was washed with saturated NaHCO₃ solution, water, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure to give **III.2** (5.74 g, 96 %). ¹H NMR: (300MHz, CDCl₃) δ = 4.36-4.25 (m, 1H, CHN), 4.20-3.95 (m, 2H, CH₂N), 3.49-3.28 (m, 2H, CH₂O), 3.00 (s, 3H, CH₃SO₃), 2.12-1.76 (m, 4H, CH₂), 1.47 (s, 9H).

**2-Azidomethyl-pyrrolidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester (III.3)**

III.2 (5.74 g, 20.55 mmol) was dissolved in DMF and heated to 60°C. NaN₃ (3.34 g, 51.37 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at 60°C for 24h. The mixture was diluted with AcOEt. The organic layer was washed with 1M KHSO₄ aqueous solution, water and brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. Flash column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 4:6) over silica gel gave **III.3** as colorless oil (3.58 g, 77 %). ¹H NMR: (300MHz, CDCl₃) δ = 3,86 (s, 1H, CHN), 3,61-3,22 (m, 4H, CH₂N), 2,04-1,70 (m, 4H, CH₂), 1,43 (s, 9H). **ESI-MS** (M_w 226.28): *m/z* 248.9 [M + Na]⁺, 474.8 [2M + Na]⁺

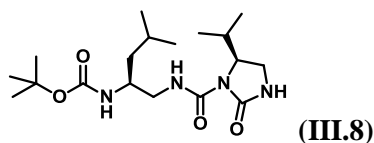
**2-Aminomethyl-pyrrolidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester (III.4)**

III.3 (1.2 g, 4.30 mmol) was dissolved in ethanol. Pd/C 10% (0.12 g) was introduced under Ar atmosphere. The reaction mixture was put under vacuum then flushed with H₂ (three times) and the mixture was finally stirred at room temperature under H₂ for 12h. Pd/C was then removed by microfiltration, washed with EtOH and the solvent was then completely evaporated under vacuum to afford pure product **III.4** (0.86 g, 98 %). ¹H NMR: (300MHz, CDCl₃) δ = 3.90-3.66 (m, 1H, CHN), 3.55-3.25 (m, 2H, CH₂N), 2.95-2.62 (m, 2H, CH₂N), 2.07-1.68 (m, 6H), 1.47 (s, 9H).

**2-[(2,5-Dioxo-pyrrolidin-1-yloxycarbonylamino)-methyl]-pyrrolidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester (M7)**

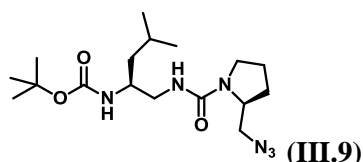
Disuccinimidyl carbonate (1.47 g, 5.73 mmol) was suspended in dry CH₂Cl₂ (30 mL) and **III.4** (0.86 g, 4.77 mmol) was added portion wise. The reaction mixture was stirred at room temperature under N₂ for 2h. After 2h stirring a white precipitate was formed (HOSu). CH₂Cl₂ was added and the precipitate was filtered off and washed with CH₂Cl₂. Organic phase was washed with a 1M KHSO₄ aqueous solution and water, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. 1mL of CH₂Cl₂ was added to the residue and the product **M7** was finally precipitated as a white solid after addition of Et₂O (1.3 g, 80 %). ¹H NMR: (300MHz, CDCl₃) δ = 4.03 (s, 1H), 3.51-3.18 (m, 4H, CH₂N), 2.82 (s, 4H), 2.09-1.62 (m, 4H, CH₂), 1.49 (s, 9H). ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 169.92, 151.76, 80.41, 56.57, 47.62, 47.28, 29.53, 28.44, 25.49, 23.88. **ESI-MS** (M_w 341.36): *m/z* 363.2 [M + Na]⁺

2. Biuret Heterocycle

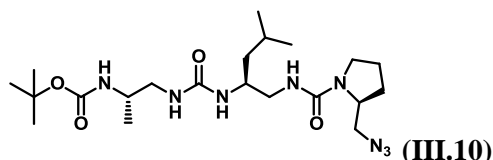


III.6 (0.05 g, 0.134 mmol) was dissolved in TFA at 0°C under N₂ and stirred for 45 min. the reaction mixture was then concentrated under reduced pressure and coevaporated 3 times with cyclohexane. The crude product was dissolved in CH₃CN (5 ml). DIPEA (0.34 ml, 2 mmol) was then added and the mixture was cooled to 0°C prior to the dropwise addition of **III.5** (0.061 g, 0.127 mmol). After 3h stirring, CH₃CN was evaporated and the residue was dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **III.8** as a white product (0.024 g, 27 %). **¹H NMR:** (300MHz, CD₃CN) δ = 8.36 (s, 1H, NH), 5.51 (s, 1H, NH), 5.22 (m, 1H, NH), 4.32-4.23 (m, 1H, CHN), 3.78-3.64 (m, 1H, CHN), 3.44-3.03 (m, 4H, CH₂), 2.44-2.29 (m, 1H, CH), 1.77-1.56 (m, 1H, CH), 1.40 (s, 9H, CH₃), 1.35-1.14 (m, 4H), 0.95-0.81 (m, 12H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 370.26): m/z 393.1 [M + Na]⁺, 763.1 [2M + Na]⁺.

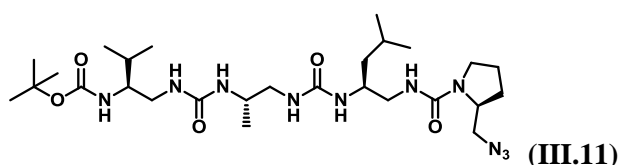
3. Oligoureas with non adjacent pyrrolidine residues



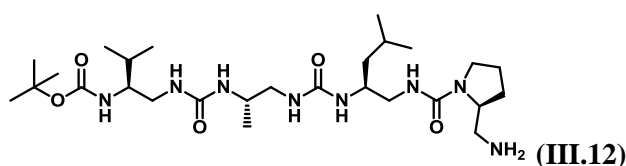
III.9 was prepared from **M1** (3.0 g, 8.39 mmol) and **III.3** (2.0 g, 8.83 mmol) as described in the general procedure B. After completion (12h), the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **III.9** as a white product (2.8 g, 86 %). **¹H NMR:** (300MHz, CD₃CN) δ = 5.35 (d, J = 7.6 Hz, 1H, NH), 5.24 (s, 1H, NH), 4.02-3.94 (m, 1H, CHN), 3.74-3.58 (m, 1H, CHN), 3.47 (dd, J = 12.1, 6.5 Hz, 1H), 3.37 (dd, J = 12.1, 3.8 Hz, 1H), 3.30-3.20 (m, 2H, CH₂N), 3.18-3.02 (m, 2H, CH₂N), 1.98-1.74 (m, 4H), 1.72-1.58 (m, 1H), 1.42 (s, 9H), 1.34-1.17 (m, 2H), 0.92 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 0.91 (d, J = 6.4 Hz, 3H). **ESI-MS** (M_w 368.47): m/z 391.1 [M + Na]⁺, 759.0 [2M + Na]⁺



III.10 was prepared from **M2** (1.62 g, 5.15 mmol) and **III.9** (2.0 g, 5.42 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **III.10** as a white product (1.24 g, 50 %). **¹H NMR:** (300MHz, CD₃CN) δ = 5.79 (s, 1H, NH), 5.56 (s, 1H, NH), 5.41 (s, 1H, NH), 5.08 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 4.03-3.93 (m, 1H, CHN), 3.81-3.66 (m, 1H, CHN), 3.65-3.51 (m, 1H, CHN), 3.46 (dd, J = 12.1, 6.6 Hz, 1H), 3.37 (dd, J = 12.1, 3.9 Hz, 1H), 3.32-3.21 (m, 2H, CH₂N), 3.17-3.01 (m, 4H, CH₂N), 2.02-1.76 (m, 4H), 1.74-1.61 (m, 1H), 1.42 (s, 9H), 1.36-1.24 (m, 2H), 1.06 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.93 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.89 (d, J = 6.6 Hz, 3H). **ESI-MS** (M_w 468.59): m/z 491.1 [M + Na]⁺, 958.9 [2M + Na]⁺

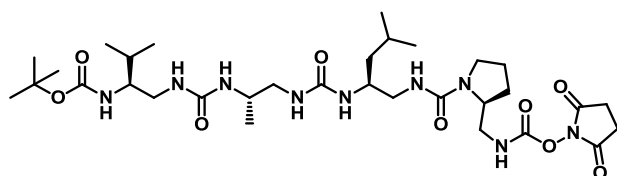


III.11 was prepared from **M3** (0.56 g, 1.62 mmol) and **III.10** (0.80 g, 1.70 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **III.11** as a white product (0.54 g, 56 %). **¹H NMR:** (300MHz, CD₃CN) δ = 5.95 (s, 1H, NH), 5.50-5.37 (m, 2H, NH), 5.33 (s, 1H, NH), 5.26 (s, 1H, NH), 5.09 (d, J = 8.4 Hz, 1H, NH), 4.07-3.99 (m, 1H, CHN), 3.86-3.68 (m, 2H, CHN), 3.57-3.20 (m, 8H), 2.89-2.70 (m, 2H), 2.68-2.52 (m, 1H), 2.00-1.77 (m, 4H), 1.75-1.59 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.31-1.19 (m, 2H), 1.03 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.92 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.91 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.90 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.87 (d, J = 6.8 Hz, 3H). **ESI-MS** (M_w 596.77): m/z 597.1 [M + H]⁺, 619.2 [M + Na]⁺, 1214.7 [2M + Na]⁺



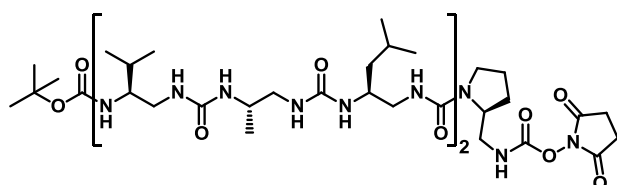
Compound **III.11** (0.50 g, 0.837 mmol) was solubilized in ethanol. Pd/C 10% (0.05 g) was introduced under positive Ar atmosphere. The reaction mixture was put under vacuum then flushed with H₂ (three times) and the mixture was finally stirred at room temperature under H₂ atmosphere for

12h. Pd/C was then removed by microfiltration, washed with EtOH and the solvent was then completely evaporated under vacuum to afford pure product **III.12** (0.40 g, 97%). $^1\text{H NMR}$: (300MHz, CD_3CN) δ = 6.86 (s, 1H, NH), 5.56 (d, J = 8.6 Hz, 1H, NH), 5.52-5.45 (m, 1H, NH), 5.41-5.17 (m, 3H, NH), 3.91-3.65 (m, 3H), 3.55-3.17 (m, 6H), 2.95-2.61 (m, 5H), 2.00-1.59 (m, 6H), 1.43 (s, 9H), 1.32-1.17 (m, 2H), 1.02 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.92 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.91 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.89 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.88 (d, J = 6.8 Hz, 3H). **ESI-MS** (M_w 570.77): m/z 571.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 593.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1141.1 $[2\text{M} + \text{H}]^+$, 1163.1 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$



Boc-Val^u-Ala^u-Leu^u-Pro^u-NHOSu (**3P_{Osu}**)

Disuccinimidyl carbonate (0.20 g, 0.735 mmol) was suspended in dry CH_2Cl_2 (8mL) and **III.12** (0.350 g, 0.61 mmol) was added portionwise. The reaction mixture was stirred at room temperature under N_2 for 4h. After 4h stirring a white precipitate was formed (HOSu). CH_2Cl_2 was added and the precipitate was filtered off and washed with CH_2Cl_2 . The organic layers were combined, washed with a 1M KHSO_4 aqueous solution and water, dried over Na_2SO_4 , and concentrated under reduced pressure. 1mL of CH_2Cl_2 was added to the crude residue and the product **3P_{Osu}** was finally precipitated as a white solid after addition of Et_2O (0.44 g, 95%). $^1\text{H NMR}$: (300MHz, CD_3CN) δ = 6.26 (s, 1H, NH), 6.23 (s, 1H, NH), 5.74 (d, J = 9.4 Hz, 1H, NH), 5.41-5.28 (m, 2H, NH), 5.20 (t, J = 5.8 Hz, 1H, NH), 4.87 (d, J = 9.4 Hz, 1H, NH), 4.13-3.80 (m, 3H), 3.67-3.76 (m, 1H), 3.64-3.40 (m, 5H), 3.33-3.21 (m, 2H), 2.75 (s, 4H), 2.66-2.38 (m, 2H), 2.34-2.08 (m, 3H), 1.94-1.58 (m, 6H), 1.45 (s, 9H), 1.25-1.14 (m, 2H), 0.98 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.95 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.91 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.90 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.88 (d, J = 6.7 Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$: (75MHz, CD_3OH) δ 170.97, 160.17, 159.38, 158.29, 157.82, 153.35, 78.65, 57.09, 56.25, 43.80, 42.23, 41.56, 30.49, 27.98, 27.46, 25.02, 24.89, 24.66, 23.43, 22.41, 20.93, 18.70, 17.51, 17.26. **ESI-MS** (M_w 711.85): m/z 712.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 734.2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1422.8 $[2\text{M} + \text{H}]^+$, 1444.8 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$



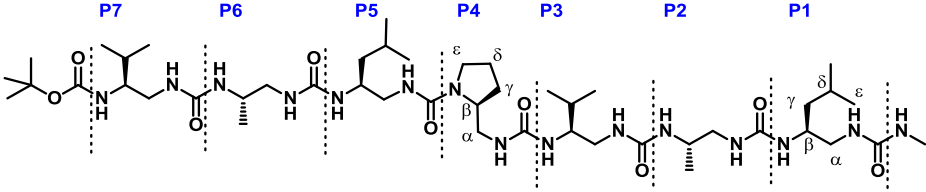
Boc-Val^u-Ala^u-Leu^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-Pro^u-NHOSu (**6P_{Osu}**)

6P_{Osu} was prepared using a previously described procedure.^[174]

¹H-NMR (300 MHz, CD₃CN) δ = 8.44 (dd, J= 7.9, 3.4 Hz, 1H, NH), 6.50-6.57 (m, 2H, NH), 6.42 (dd, J= 9.4, 2.6 Hz, 1H, NH), 6.25 (dd, J= 10.2, 2.6 Hz, 1H, NH), 6.12 (d, J= 9.7 Hz, 1H, NH), 6.10 (d, J= 10.4 Hz, 1H, NH), 5.77 (d, J= 10.5 Hz, 1H, NH), 5.71 (dd, J= 9.8, 3.1 Hz, 1H, NH), 5.64 (d, J= 10.3 Hz, 1H, NH), 5.52 (J= 7.1, 5.0 Hz, 1H, NH), 5.46 (d, J= 10.4 Hz, 1H, NH), 5.15 (d, J= 10.0 Hz, 1H, NH), 3.26-4.17 (m, 16H), 2.76 (s, 4H, CH₂), 2.13-2.60 (m, 7H, CH₂), 1.59-1.84 (m, 8H, CH and CH₂), 1.48 (s, 9H, CH₃), 1.15-1.22 (m, 4H, CH₂), 1.05 (d, J= 6.9 Hz, 3H, CH₃), 0.85-0.97 (m, 27H, CH₃); **¹³C NMR** (75 MHz, CD₃CN) δ 170.9, 160.6, 160.0, 159.9, 159.4, 159.1, 158.2, 158.0, 152.9, 79.4, 56.9, 56.4, 54.8, 48.6, 47.8, 47.0, 46.9, 46.8, 46.6, 46.0, 45.8, 44.4, 43.6, 43.5, 42.8, 41.8, 41.3, 30.6, 30.4, 28.1, 27.8, 25.3, 25.0, 24.9, 24.2, 22.5, 21.6, 21.3, 19.4, 19.1, 18.0, 17.3. **ESI-MS** (M_w 1082.34): m/z 1104.5 [M + Na]⁺.

Boc-Val^u-Ala^u-Leu^u-Pro^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe (3P3)

3P3 was prepared from **3P_{OSu}** (0.067 g, 0.094 mmol) and **3** (0.050 g, 0.099 mmol) as described in the general procedure B. After completion, a white precipitate was formed which was filtered, washed with CH₃CN, saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution, brine and dried under vacuum to give **3P3** as a white product (0.065 g, 65 %). **¹H NMR**: (400MHz, CD₃OH) δ = 6.80 (m, 1H, NH), 6.60 (m, 1H, NH), 6.52 (d, J = 10.0 Hz, 1H, NH), 6.46-6.34 (m, 3H, NH), 6.23 (m, 1H, NH), 6.12 (d, J = 10.0 Hz, 1H, NH), 6.08 (d, J = 9.7 Hz, 1H, NH), 6.04 (d, J = 10.0 Hz, 1H, NH), 6.01 (d, J = 10.4 Hz, 1H, NH), 5.90-5.81 (m, 2H, NH), 5.80-5.73 (m, 1H, NH), 4.31-4.22 (m, 1H, CHN), 4.18-3.98 (m, 2H, CHN), 3.95-3.79 (m, 2H, CHN), 3.70-3.43 (m, 10H, CHN-CH₂N), 2.72 (d, J = 4.4 Hz, 3H, CH₃N), 2.70-2.45 (m, 6H, CH₂N), 2.04-1.92 (m, 2H, CH₂), 1.92-1.81 (m, 1H, CH), 1.78-1.55 (m, 5H), 1.47 (s, 9H, CH₃), 1.33-1.15 (m, 4H, CH₂), 1.07 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CH₃), 1.04 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 1.01-0.85 (m, 24H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 998.31): m/z 998.4 [M + H]⁺, 1020.5 [M + Na]⁺.

Table 9: ^1H NMR chemical shifts (in ppm) of **3P3** in CD_3OH (400 MHz)


Residue	N'H	NH	αCH^1	αCH^2	βCH	γCH	δCH	ϵCH	CH_3
NH-Me		6,23							2,73
Leu ^u P1	6,44	6,08	3,60	2,66	3,88	1,25	1,71	0,94	
Ala ^u P2	6,42	6,12	3,54	2,31	4,03	1,04			
Val ^u P3	6,59	6,04	3,62	2,49	3,61	1,54	0,88		
Pro ^u P5	6,390	-	3,54	2,61	4,22	1,05		1,99	
Leu ^u P6	6,79	6,00	3,49	2,54	4,11	1,21	1,72	0,91	
Ala ^u P7	5,77	5,83	3,50	2,49	3,83	1,06			
Val ^u P8	5,86	6,52	3,5	2,67	3,61	1,69	0,95		
Boc									1,48

Boc-(Val^u-Ala^u-Leu^u-Pro^u)₂-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe ((3P)₂3)

(3P)₂3 was prepared from **3P_{OSu}** (0.013 g, 0.018 mmol) and **3P3** (0.019 g, 0.019 mmol) as described in the general procedure B. After completion, a white precipitate was formed which was filtered, washed with CH_3CN , saturated NaHCO_3 aqueous solution, 1M KHSO_4 aqueous solution, brine and dried under vacuum to give **(3P)₂3** as a white product (0.065 g, 70 %). **^1H NMR:** (300MHz, CD_3OH) δ = 6.86-6.76 (m, 2H, NH), 6.61 (m, 1H, NH), 6.55 (d, J = 10.0 Hz, 2H, NH), 6.50-6.33 (m, 5H, NH), 6.26 (m, 1H, NH), 6.19-6.00 (m, 7H, NH), 5.91-5.83 (m, 2H, NH), 5.83-5.77 (m, 1H, NH), 4.33-4.23 (m, 2H, CHN), 4.21-4.00 (m, 3H, CHN), 3.97-3.81 (m, 4H, CHN), 3.79-3.45 (m, 18H, CHN- CH_2N), 2.74 (d, J = 4.6 Hz, 3H, CH_3N), 2.71-2.43 (m, 10H, CH_2N), 2.07-1.95 (m, 4H, CH_2), 1.91-1.81 (m, 2H, CH), 1.80-1.54 (m, 8H), 1.48 (s, 9H, CH_3), 1.37-1.20 (m, 6H, CH_2), 1.12-1.03 (m, 9H, CH_3), 1.02-0.86 (m, 36H, CH_3). **ESI-MS** (M_w 1494.96): m/z 1494.74 [$M + \text{H}$]⁺, 1516.9 [$M + \text{Na}$]⁺.

Boc-(Val^u-Ala^u-Leu^u-Pro^u)₃-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe ((3P)₃3)

(3P)₃3 was prepared from **3P_{OSu}** (0.007 g, 0.010 mmol) and **(3P)₂3** (0.015 g, 0.010 mmol) as described in the general procedure B. After completion, a white precipitate was formed which was filtered, washed with CH_3CN , saturated NaHCO_3 aqueous solution, 1M KHSO_4 aqueous solution, brine and dried under vacuum to give **(3P)₃3** as a white product (0.015 g, 75 %). **^1H NMR:** (300MHz, CD_3OH) δ = 6.87-6.75 (m, 3H, NH), 6.62 (m, 1H, NH), 6.58-6.33 (m, 10H, NH), 6.26 (m, 1H, NH), 6.20-6.00 (m, 10H, NH), 5.93-5.84 (m, 2H, NH), 5.81-5.77 (m, 1H, NH), 4.35-4.23 (m, 2H, CHN),

4.23-4.00 (m, 3H, CHN), 3.99-3.83 (m, 4H, CHN), 3.83-3.42 (m, 26H), 2.74 (d, $J = 4.6$ Hz, 3H, CH₃N), 2.71-2.42 (m, 16H, CH₂N), 2.08-1.94 (m, 6H, CH₂), 1.95-1.53 (m, 14H), 1.49 (s, 9H, CH₃), 1.34-1.19 (m, 8H, CH₂), 1.13-1.03 (m, 12H, CH₃), 1.02-0.84 (m, 48H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 1991.6): m/z 1990.9 [M + H]⁺.

Boc-Val^u-Ala^u-Leu^u-Pro^u-(Val^u-Ala^u-Leu^u)₂-NHMe (3P6)

3P6 was prepared from **3P_{OSu}** (0.015 g, 0.019 mmol) and **6** (0.014 g, 0.020 mmol) as described in the general procedure B. After completion, a white precipitate was formed which was filtered, washed with CH₃CN, saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution, brine and dried under vacuum to give **3P6** as a white product (0.017 g, 64 %). **¹H NMR**: (300MHz, CD₃OH) $\delta =$ 7.21 (m, 1H, NH), 6.85 (m, 1H, NH), 6.70 (m, 1H, NH), 6.64-6.52 (m, 4H, NH), 6.51-6.41 (m, 3H, NH), 6.37 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H, NH), 6.30-6.16 (m, 2H, NH), 6.14-6.00 (m, 4H, NH), 5.92-5.85 (m, 2H, NH), 5.79 (m, 1H, NH), 4.35-4.24 (m, 1H, CHN), 4.20-4.04 (m, 2H), 4.03-3.80 (m, 5H), 3.79-3.46 (m, 14H), 2.74 (d, $J = 4.5$ Hz, 3H, CH₃), 2.71-2.27 (m, 10H), 2.08-1.84 (m, 4H, CH₂), 1.80-1.54 (m, 6H, CH), 1.48 (s, 9H, CH₃), 1.38-1.18 (m, 6H, CH₂), 1.10-1.04 (m, 9H, CH₃), 1.04-0.81 (m, 36H, CH₃). **ESI-MS**: (M_w 1368.80): 1368.6 [M + H]⁺, 1390.7 [M + Na]⁺

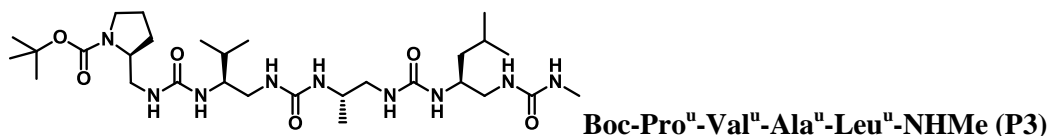
Boc-(Val^u-Ala^u-Leu^u)₂-Pro^u-(Val^u-Ala^u-Leu^u)₂-NHMe (6P6)

6P6 was prepared from **6P_{OSu}** (0.051 g, 0.047 mmol) and TFA-(Val^u-Ala^u-Leu^u)₂-NHMe (0.045 g, 0.040 mmol) (obtained from **6**) as described in the general procedure B. After completion, a white precipitate was formed which was filtered off, washed with CH₃CN, saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution, brine and dried under vacuum to give **6P6** as a white product (0.079 g, 89 %). **¹H NMR** : (300MHz, [D₆]-DMSO) $\delta =$ 6.94-6.68 (m, 3H, NH), 6.62-5.74 (m, 22H, NH), 5.66 (m, 1H, NH), 4.18-3.41 (m, 22H), 2.56 (d, $J = 4.4$ Hz, 3H, CH₃), 2.46-2.13 (m, 12H), 1.97-1.70 (m, 2H), 1.72-1.48 (m, 8H), 1.42 (s, 9H, CH₃), 1.27-1.04 (m, 8H), 1.02-0.90 (m, 12H, CH₃), 0.90-0.70 (m, 48H, CH₃). **ESI-MS**: (M_w 1739.29): 1760.9 [M + Na]⁺

Boc-[(Val^u-Ala^u-Leu^u)₂-Pro^u]₂-(Val^u-Ala^u-Leu^u)₂-NHMe ((6P)₂6)

(6P)₂6 was prepared from **6P_{OSu}** (0.011 g, 0.012 mmol) and **6P6** (0.010 g, 0.018 mmol) as described in the general procedure B. After completion, a white precipitate was formed which was filtered off, washed with CH₃CN, saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution, brine and dried under vacuum to give **(6P)₂6** as a white product (0.027 g, 93 %). **¹H NMR**: (300MHz, CD₂Cl₂) $\delta =$ 7.37-5.60 (m, 39H, NH), 4.35-3.20 (m, 42H), 2.78 (m, 3H, CH₃), 2.64-2.10 (m, 18H), 2.11-1.55 (m, 26H), 1.50 (s, 9H, CH₃), 1.37-0.61 (m, 100H). **ESI-MS**: (M_w 2606.43): 1303.7 [M + 2H]²⁺, 1325.7 [M + 2Na]²⁺

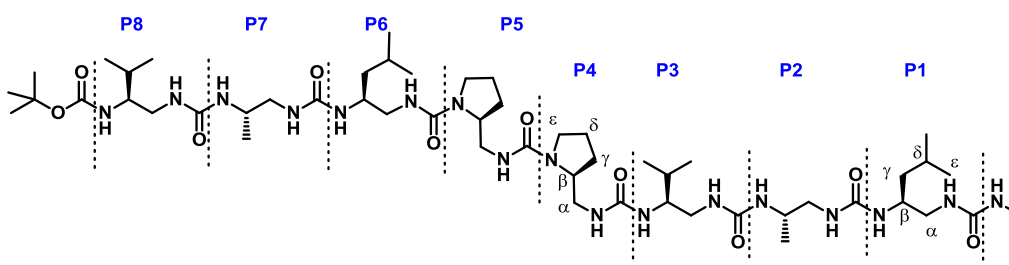
4. Oligoureas with several consecutives pyrrolidine residues



P3 was prepared from **M7** (0.064 g, 0.189 mmol) and **3** (0.100 g, 0.199 mmol) as described in the general procedure B. After completion, a white precipitate was formed which was filtered off, washed with CH₃CN, saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution, brine and dried under vacuum to give **P3** as a white product. However a part of the product was still in the reaction mixture. CH₃CN was thus evaporated, and the crude was dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **P3** as a white product (0.090 g, 72 %). ¹H NMR: (300MHz, CD₃OH) δ = 6.43-6.29 (m, 2H, NH), 6.23-5.98 (m, 4H, NH), 5.92 (s, 1H, NH), 5.80 (d, J = 9.7 Hz, 1H, NH), 4.09-3.94 (m, 1H, CHN), 3.94-3.74 (m, 2H, CHN), 3.72-3.31 (m, 5H), 3.20-2.82 (m, 2H), 2.73 (d, J = 4.5 Hz, 3H, CH₃), 2.64-2.30 (m, 3H), 2.03-1.81 (m, 4H, CH₂), 1.82-1.60 (m, 2H, CH), 1.50 (s, 9H, CH₃), 1.34-1.20 (m, 2H, CH₂), 1.04 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 0.98-0.89 (m, 12H, CH₃). ESI-MS (M_w 627.82): *m/z* 628.2 [M + H]⁺, 650.3 [M + Na]⁺, 1280.1 [2M + Na]⁺

Boc Val^u-Ala^u-Leu^u-Pro^u-Pro^u-Val^u-Ala^u-Leu^u NHMe (3P₂3)

3P₂3 was prepared from **3P_{OSu}** (0.021 g, 0.030 mmol) and **P3** (0.020 g, 0.032 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **3P₂3** as a white product (0.020 g, 56 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃OH) δ = 6.73 (3, 1H, NH), 6.57 (m, 1H, NH), 6.52 (d, J = 9.8 Hz, 1H, NH), 6.43 (m, 2H, NH), 6.35 (m, 2H, NH), 6.23 (m, 1H, NH), 6.13-5.96 (m, 4H, NH), 5.92-5.85 (m, 2H, NH), 5.82 (m, 1H, NH), 4.34-4.12 (m, 1H, CHN), 4.09-3.83 (m, 4H, CHN), 3.70-3.39 (m, 14H, CHN-CH₂N), 3.05-2.95 (m, 1H, CH₂N), 2.88-2.74 (m, 3H, CH₂N), 2.73 (d, J = 4.6 Hz, 3H, CH₃N), 2.65-2.33 (m, 3H, CH₂N), 2.09-1.83 (m, 6H, CH₂), 1.81-1.56 (m, 4H, CH-CH₂), 1.48 (s, 9H, Boc), 1.34-1.22 (m, 4H, CH₂), 1.13-1.02 (m, 6H, CH₃), 0.99-0.85 (m, 24H, CH₃). ESI-MS (M_w 1124.47) : *m/z* 585.0 [M+2Na]²⁺, 1146.8 [M+Na]⁺

Table 10 : ^1H NMR chemical shifts (in ppm) of **3P₂3** in CD_3OH (400 MHz)


Residue	N'H	NH	$^{\alpha}\text{CH}^1$	$^{\alpha}\text{CH}^2$	βCH	γCH	δCH	ϵCH	CH_3
NH-Me		6,19							2,7
Leu ^u P1	6,37	6,07	3,56	2,70	3,88	1,25	1,70	0,93	
Ala ^u P2	6,32	3,00	3,5	2,40	4,00	1,04			
Val ^u P3	6,42	6,01	3,44	2,54	3,57	1,59	0,9		
Pro ^u P4	6,30		3,28	2,84	4,17	1,99-1,86-1,71		3,43	
Pro ^u P5	6,69		3,29	3,00	4,22	1,97-1,88-1,75		3,48	
Leu ^u P6	6,52	5,98	3,47	2,79	3,91	1,26	1,71	0,92	
Ala ^u P7	5,79	5,87	3,40	2,64	3,87	1,07			
Val ^u P8	5,86	6,46	3,44	2,78	3,55	1,68	0,94		
Boc									1,46

Boc Pro^u-Pro^u-Val^u-Ala^u-Leu^u NHMe (P₂3)

P₂3 was prepared from **M7** (0.217 g, 0.030 mmol) and **P3** (0.280 g, 0.032 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO_3 aqueous solution, 1M KHSO_4 aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na_2SO_4 and evaporated. Flash column chromatography (CH_2Cl_2 -MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **P₂3** as a white product (0.320 g, 70 %). ^1H NMR : (300MHz, CD_3CN) δ = 6.85 (m, 1H, NH), 6.26 (m, 1H, NH), 6.14 (d, J = 8.6 Hz, 1H, NH), 6.11 (d, J = 9.8 Hz, 1H, NH), 6.04 (m, 1H, NH), 5.74 (d, J = 9.7 Hz, 1H, NH), 5.67 (d, J = 10.8 Hz, 1H, NH), 5.62 (m, 1H, NH), 5.22 (d, J = 10.3 Hz, 1H, NH), 4.29-4.15 (m, 2H, CHN), 4.08-3.92 (m, 1H, CHN), 3.91-3.77 (m, 1H, CHN), 6.68-3.48 (m, 5H, CHN, CH_2N), 3.46-3.13 (m, H, CH_2N), 2.77-2.68 (m, 1H), 2.65 (d, J = 4.7 Hz, 3H, CH_3N), 2.55-2.30 (m, 3H), 2.07-1.50 (m, 9H), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.21-1.12 (m, 2H, CH_2), 0.98 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CH_3), 0.92 (d, J = 6.5 Hz, 3H, CH_3), 0.90 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CH_3), 0.85 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CH_3), 0.81 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH_3). ESI-MS (M_w 753.98) : m/z 776.5 [$M+\text{Na}$]⁺

Boc Val^u-Ala^u-Leu^u- Pro^u-Pro^u-Pro^u-Val^u-Ala^u-Leu^u NHMe (3P₃3)

3P₃3 was prepared from **3P_{OSu}** (0.027 g, 0.038 mmol) and **P₂3** (0.030 g, 0.040 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO_3 aqueous solution, 1M KHSO_4 aqueous

solution and brine. The organic layer was then dried over Na_2SO_4 and evaporated. Flash column chromatography (CH_2Cl_2 -MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **3P₃3** as a white product (0.030 g, 60 %). **¹H NMR**: (300MHz, CD_3OH) δ = 6.68 (m, 2H, NH), 6.51 (m, 1H, NH), 6.45 (d, J = 9.9 Hz, 1H, NH), 6.42-6.14 (m, 5H, NH), 6.08 (d, J = 9.2 Hz, 1H, NH), 6.01-5.81 (m, 6H, NH), 4.21-4.10 (m, 1H, CHN), 4.08-3.97 (m, 2H, CHN), 3.95-3.81 (m, 3H, CHN), 3.68-3.17 (m, 19H, CHN- CH_2N), 3.17-3.02 (m, 2H, CH_2N), 3.01-2.79 (m, 3H, CH_2N), 2.73 (d, J = 4.6 Hz, 3H, CH_3N), 2.70 (1H, CH_2N), 2.65-2.49 (m, 1H, CH_2N), 2.49-2.34 (m, 1H, CH_2N), 2.11-1.90 (m, 12H, CH_2) 1.79-1.60 (m, 4H, CH), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.33-1.22 (m, 4H, CH_2), 1.13-1.02 (m, 6H, CH_3), 0.99-0.84 (m; 24H, CH_3). **ESI-MS** (M_w 1250.62) : m/z 1250.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1272.7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Boc Pro^u-Pro^u-Pro^u-Val^u-Ala^u-Leu^u NHMe (P₃3)

P₃3 was prepared from **M7** (0.135 g, 0.397 mmol) and **P₂3** (0.300 g, 0.397 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO_3 aqueous solution, 1M KHSO_4 aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na_2SO_4 and evaporated. Flash column chromatography (CH_2Cl_2 -MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **P₃3** as a white product (0.260 g, 75 %). **¹H NMR** : (300MHz, CD_3OH) δ = 6.69 (m, 1H, NH), 6.56 (m, 1H, NH), 6.46-6.15 (m, 5H, NH), 6.10 (d, J = 8.8 Hz, 1H, NH), 6.05-5.88 (m, 2H, NH), 4.29-3.81 (m, 4H, CHN), 3.68-3.50 (m, 4H, CHN- CH_2N), 3.44-3.23 (m, 10H, CH_2N), 3.22-3.03 (m, 3H, CH_2N), 2.81-2.74 (m, 1H, CH_2N), 2.73 (d, J = 4.7 Hz, 3H, CH_3), 2.66-2.51 (m, 1H, CH_2N), 2.51-2.38 (m, 1H, CH_2N), 2.12-1.81 (m, 12H, CH_2), 1.79-1.59 (m, 2H, CH), 1.50 (s, 9H, Boc), 1.34-1.21 (m, 2H, CH_2), 1.06 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH_3), 0.97-0.86 (m, 12H, CH_3). **ESI-MS** (M_w 880.13) : m/z 902.6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Boc Val^u-Ala^u-Leu^u-Pro^u-Pro^u-Pro^u-Pro^u-Val^u-Ala^u-Leu^u NHMe (3P₄3)

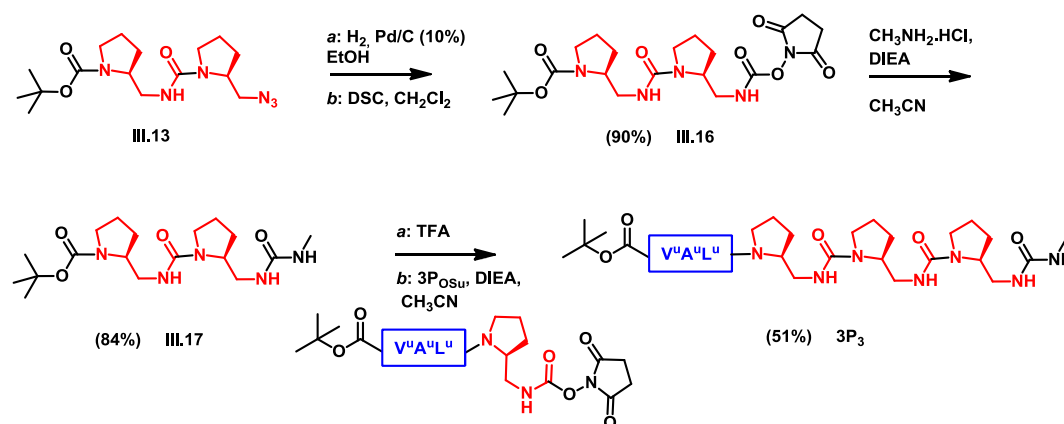
3P₄3 was prepared from **3P_{OSu}** (0.102 g, 0.143 mmol) and **P₃3** (0.120 g, 0.136 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO_3 aqueous solution, 1M KHSO_4 aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na_2SO_4 and evaporated. Flash column chromatography (CH_2Cl_2 -MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **3P₄3** as a white product (0.140 g, 82 %). **¹H NMR** : (300MHz, DMSO) δ = 6.88 (m, 1H, NH), 6.79 (m, 1H, NH), 6.57 (d, J = 9.1 Hz, 1H, NH), 6.42 (m, 1H, NH), 6.20 (m, 1H, NH), 6.10-5.71 (m, 12H, NH), 3.96-3.46 (m, 10H, CHN), 3.26-2.55 (m, 28H, CH_2N), 2.55 (d, 3H, CH_3), 1.93-1.72 (m, 16H, CH_2), 1.70-1.52 (m, 4H, CH), 1.39 (s, 9H, Boc), 1.18-1.07 (m, 4H, CH_2), 0.99-0.91 (m, 6H, CH_3), 0.90-0.75 (m, 24H, CH_3). **ESI-MS** (M_w 1376.78) : m/z 689.0 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 1376.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$

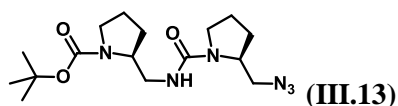
Boc Pro^u-Pro^u-Pro^u-Pro^u-Val^u-Ala^u-Leu^u NHMe (P₄3)

P₄3 was prepared from **M7** (0.049 g, 0.143 mmol) and **P₃3** (0.120 g, 0.136 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **P₄3** as a white product (0.104 g, 76 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃CN) δ = 6.87 (m, 1H, NH), 6.53 (m, 1H, NH), 6.32 (m, 1H, NH), 6.27-6.14 (m, 2H, NH), 6.08 (m, 1H, NH), 5.99 (m, 1H, NH), 5.89-5.69 (m, 3H, NH), 4.46-4.32 (m, 1H, CHN), 4.30-4.12 (m, 2H, CHN), 4.10-3.93 (m, 2H, CHN), 3.90-3.77 (m, 1H, CHN), 3.67-3.49 (m, 5H, CH₂N), 3.47-3.12 (m, 12H, CH₂N), 3.11-2.81 (m, 2H, CH₂N), 2.78-2.70 (m, 1H, CH₂N), 2.66 (d, J = 4.7 Hz, 3H, CH₃N), 2.60-2.30 (m, 3H, CH₂N), 2.13-1.77 (m, 13H, CH₂), 1.75-1.50 (m, 5H, CH-CH₂), 1.48 (s, 9H, Boc), 1.25-1.15 (m, 2H, CH₂), 1.00 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 0.93 (d, J = 6.5 Hz, 3H, CH₃), 0.92 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CH₃), 0.87 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CH₃), 0.82 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CH₃)

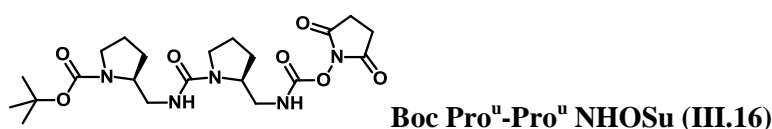
Boc Val^u-Ala^u-Leu^u-Pro^u-Pro^u-Pro^u-Pro^u-Val^u-Ala^u-Leu^u NHMe (3P₅3)

3P₅3 was prepared from **3P_{OSu}** (0.074 g, 0.104 mmol) and **P₄3** (0.100 g, 0.099 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **3P₄3** as a white product (0.090 g, 60 %). ¹H NMR : (300MHz, DMSO) δ = 7.0-6.75 (m, 2H, NH), 6.56 (d, J = 8.9 Hz, 1H, NH), 6.41 (m, 1H, NH), 6.20 (m, 1H, NH), 6.09-5.72 (m, 13H, NH), 3.95-3.47 (m, 11H, CHN), 3.42 (d, 3H, CH₃N), 3.30-2.75 (m, 32H, CH₂N), 1.95-1.71 (m, 20H, CH₂), 1.69-1.50 (m, 4H, CH), 1.39 (s, 9H, Boc), 1.29-1.16 (m, 4H, CH₂), 0.99-0.90 (m, 6H, CH₃), 0.90-0.74 (m, 24H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 1502.94) : m/z 752.0 [M+2H]²⁺, 1502.6 [M+H]⁺, 1524.8 [M+Na]⁺

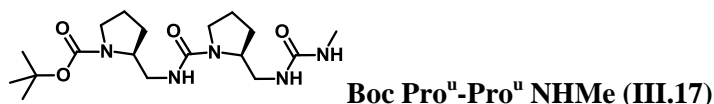
Figure Exp 4 : Synthesis of 3P₃



III.13 was prepared from **M7** (0.729 g, 2.137 mmol) and **III.3** (0.509 g, 2.25 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **III.13** as an oil (0.710 g, 89 %). ¹H NMR : (300MHz, CDCl₃) δ = 6.38 (s, 1H, NH), 4.16-4.01 (m, 2H, CHN), 3.56-3.11 (m, 8H, CH₂N), 2.11-1.78 (m, 8H, CH₂), 1.49 (s, 9H, Boc)



Compound **III.13** (0.120 g, 0.306 mmol) was solubilized in ethanol. Pd/C 10% was introduced under Argon. The reaction mixture was put under vacuum then flushed with H₂ (three times) and the mixture was finally stirred at room temperature under H₂ atmosphere for 12h. Pd/C was then removed by microfiltration, washed with EtOH and the solvent was then completely evaporated under vacuum. Disuccinimidyl carbonate (0.094 g, 0.367 mmol) was suspended in dry CH₂Cl₂ (8mL) and the amine (0.100 g, 0.306 mmol) was added portionwise. The reaction mixture was stirred at room temperature under N₂ for 4h. After 4h stirring a white precipitate was formed (HOSu). CH₂Cl₂ was added and the precipitate was filtered off and washed with CH₂Cl₂. The organic layers were combined, washed with a 1M KHSO₄ aqueous solution and water, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. 1mL of CH₂Cl₂ was added to the residue and the product **III.16** was precipitated as a white solid after addition of Et₂O (0.130 g, 90%). ¹H NMR : (300MHz, CDCl₃) δ = 8.14 (s, 1H, NH), 6.53 (s, 1H, NH), 4.27-4.06 (m, 2H, CHN), 3.48-3.30 (m, 5H, CH₂N), 3.29-3.11 (m, 3H, CH₂N), 2.83 (s, 4H, CH₂), 2.10-1.69 (m, 8H, CH₂), 1.47 (s, 9H, Boc). ESI-MS (M_w 476.52) : m/z 490.1 [M+Na]⁺, 956.8 [2M+Na]⁺

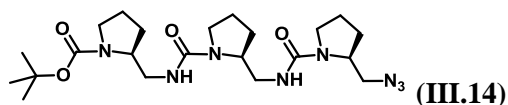


Methylamine hydrochloride (0.188 g, 0.280 mmol) was dissolved in CH₃CN. DIPEA (0.14 ml, 0.830 mmol) was then added and the mixture was cooled to 0°C prior to the dropwise addition of **III.16** (0.130 g, 0.280 mmol), dissolved in CH₃CN. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **III.17** (0.090 g, 84%). ¹H

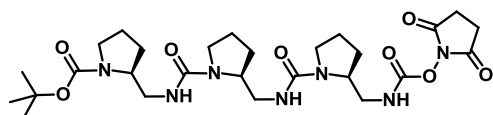
NMR : (300MHz, CD₃OH) δ = 6.64 (m, 1H, NH), 6.33 (m, 1H, NH), 6.04 (m, 1H, NH), 4.07-3.81 (m, 2H, CHN), 3.49-3.04 (m, 8H, CH₂N), 2.73 (d, J = 4.6 Hz, 3H, CH₃N), 2.08-1.72 (m, 8H, CH₂), 1.49 (m, 9H, Boc). **ESI-MS** (M_w 383.49) : m/z 384.0 [M+H]⁺, 406.1 [M+Na]⁺

Boc Val^u-Ala^u-Leu^u-Pro^u-Pro^u-Pro^u NHMe (**3P₃**)

3P₃ was prepared from **3P_{OSu}** (0.053 g, 0.074 mmol) and **III.17** (0.030 g, 0.078 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **3P₃** as a white product (0.035 g, 51 %). **¹H NMR** : (300MHz, CD₃OH) δ = 7.15 (m, 1H, NH), 6.96 (m, 1H, NH), 6.76 (m, 1H, NH), 6.62-6.50 (m, 2H, NH), 6.23-5.93 (m, 5H, NH), 4.15-3.79 (m, 5H, CHN), 3.76-3.62 (m, 1H, CHN), 3.61-3.06 (m, 16H, CH₂N), 2.94-2.78 (m, 2H, CH₂N), 2.75 (d, J = 4.6 Hz, 3H, CH₃N), 2.09-1.80 (m, 12H, CH₂), 1.78-1.62 (m, 2H, CH), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.37-1.26 (m, 2H, CH₂), 1.08 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 0.99-0.88 (m, 12H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 880.13) : m/z 902.6 [M+Na]⁺



III.14 was prepared from **M7** (0.609 g, 1.78 mmol) and **III.13** (0.662 g, 1.87 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **III.14** as an oil (0.665 g, 74 %). **¹H NMR** : (300MHz, CDCl₃) δ = 6.91 (s, 1H, NH), 6.54 (s, 1H, NH), 4.28-4.15 (m, 1H, CHN), 4.16-4.03 (m, 2H, CHN), 3.54-3.08 (m, 12H, CH₂N), 2.10-1.83 (m, 10H, CH₂), 1.83-1.64 (m, 2H, CH₂), 1.49 (s, 9H, Boc). **ESI-MS** (M_w 478.59) : m/z 501.3 [M+Na]⁺, 979.0 [2M+Na]⁺



Boc Pro^u-Pro^u-Pro^u NHOSu (**III.15**)

Compound **III.14** (0.640 g, 0.418 mmol) was dissolved in ethanol. Pd/C 10%(0.060 g) was introduced under Ar atmosphere. The reaction mixture was put under vacuum then flushed with H₂ (three times) and the mixture was finally stirred at room temperature under H₂ for 12h. Pd/C was then removed by microfiltration, washed with EtOH and the solvent was then completely evaporated under vacuum. Disuccinimidyl carbonate (0.410 g, 1.62 mmol) was suspended in dry CH₂Cl₂ (10 mL) and

the amine (0.610 g, 1.35 mmol) was added portionwise. The reaction mixture was stirred at room temperature under N₂ atmosphere for 4h. After 4h stirring a white precipitate was formed (HOSu). CH₂Cl₂ was added and the precipitate was filtered and washed with CH₂Cl₂. Organic phase was washed with a 1M KHSO₄ aqueous solution and water, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. 1mL of CH₂Cl₂ was added to the residue and the product **III.15** was precipitated as a white solid by adding Et₂O (0.770 g, 96%). ¹H NMR : (300MHz, CDCl₃) δ = 8.23 (s, 1H, NH), 7.08 (s, 1H, NH), 6.63 (s, 1H, NH), 4.33-4.19 (m, 1H, CHN), 4.18-4.02 (m, 2H, CHN), 3.55-3.03 (m, 12H, CH₂N), 2.82 (s, 4H, CH₂), 2.10-1.80 (m, 10H, CH₂), 1.79-1.65 (m, 2H, CH₂), 1.49 (s, 9H, Boc). **ESI-MS** (M_w 593.67) : *m/z* 616.3 [M+Na]⁺

Boc Pro^u-Pro^u-Pro^u NHMe (P₃)

Methylamine hydrochloride (0.044 g, 0.65 mmol) was dissolved in CH₃CN. DIPEA (0.3 ml, 0.151 mmol) was then added and the mixture was cooled down to 0°C prior to the dropwise addition of **III.15** (0.350 g, 0.590 mmol), dissolved in CH₃CN. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **P₃** (0.268 g, 90%). ¹H NMR : (300MHz, CD₃CN) δ = 6.61 (m, 1H, NH), 6.33 (m, 1H, NH), 2.74 (m, 1H, NH), 5.37 (m, 1H, NH), 4.02-3.74 (m, 3H, CHN), 3.41-3.11 (m, 10H, CH₂N), 3.08-2.82 (m, 2H, CH₂N), 2.67 (d, J = 4.7 Hz, 3H, CH₃N), 2.00-1.71 (m, 12H, CH₂), 1.47 (s, 9H, Boc). **ESI-MS** (M_w 509.64): *m/z* 529.3 [M+Na]⁺

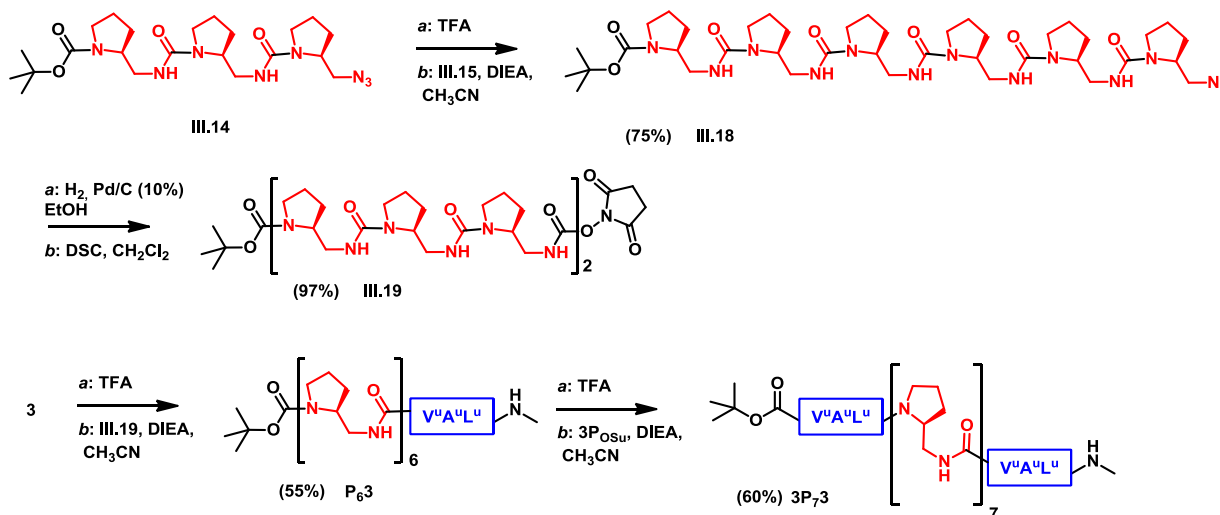
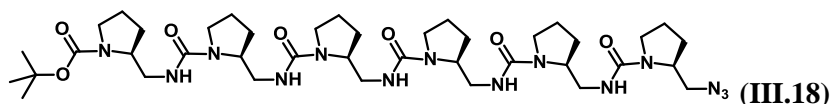
Boc Pro^u-Pro^u-Pro^u-Pro^u-Pro^u NHMe, (P₆)

P₆ was prepared from **III.15** (0.110 g, 0.186 mmol) and **P₃** (0.100 g, 0.196 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **P₆** as a white product (0.070 g, 40 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃OH) δ = 7.06-6.89 (m, 4H, NH), 6.75 (s, 1H, NH), 6.33 (s, 1H, NH), 6.05 (s, 1H, NH), 4.06-3.79 (m, 6H, CHN), 3.49-3.18 (m, 18H, CH₂N), 3.13-2.97 (m, 6H, CH₂N), 2.73 (d, J = 4.0 Hz, 3H, CH₃N), 2.10-1.77 (m, 24H, CH₂), 1.48 (s, 9H, Boc). **ESI-MS** (M_w 888.11): *m/z* 910.6 [M+Na]⁺

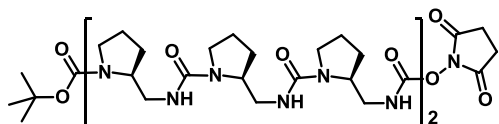
Boc Pro^u-Pro^u-Pro^u -Pro^u-Pro^u-Pro^u-Pro^u-Pro^u NHMe, (P₉)

P₉ was prepared from **III.15** (0.040 g, 0.067 mmol) and **P₆** (0.060 g, 0.067 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography

(CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **P₉** as a white product (0.041 g, 48 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃OH) δ = 7.11-6.84 (m, 7H, NH), 6.76 (s, 1H, NH), 6.30 (s, 1H, NH), 6.06 (s, 1H, NH), 4.08-3.79 (m, 9H, CHN), 3.53-3.18 (m, 27H, CH₂N), 3.17-2.97 (m, 9H, CH₂N), 2.73 (d, J = 4.1 Hz, 3H, CH₃N), 2.10-1.75 (m, 36H, CH₂), 1.48 (s, 9H, Boc). **ESI-MS** (M_w 1266.58): *m/z* 1266.3 [M+H]⁺, 1288.7 [M+Na]⁺

Figure Exp 5 : Synthesis of 3P_{7,3}

III.18 was prepared from **III.15** (0.053 g, 0.089 mmol) and **III.14** (0.045 g, 0.094 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 95:5) over silica gel gave **III.18** as a white product (0.060 g, 75 %). ¹H NMR : (300MHz, CDCl₃) δ = 7.29-7.06 (m, 4H, NH), 6.63 (s, 1H, NH), 4.32-4.01 (m, 6H, CHN), 3.61-3.02 (m, 24H, CH₂N), 2.15-1.83 (m, 20H, CH₂), 1.80-1.67 (m, 4H, CH₂), 1.50 (s, 9H, Boc). **ESI-MS** (M_w 857.06) : *m/z* 857.2 [M+H]⁺, 879.3 [M+Na]⁺



Boc-Pro^u-Pro^u-Pro^u-Pro^u-Pro^u-Pro^u-NHOSu (III.19)

Compound **III.18** (0.630 g, 0.740 mmol) was dissolved in ethanol. Pd/C 10%(0.060 g) was introduced under Ar atmosphere. The reaction mixture was put under vacuum then flushed with H₂ (three times) and the mixture was finally stirred at room temperature under H₂ for 12h. Pd/C was then removed by microfiltration, washed with EtOH and the solvent was then completely evaporated under vacuum. Disuccinimidyl carbonate (0.225 g, 0.880 mmol) was suspended in dry CH₂Cl₂ (10 mL) and the amine (0.610 g, 0.734 mmol) was added portionwise. The reaction mixture was stirred at room temperature under N₂ atmosphere for 4h. After 4h stirring a white precipitate was formed (HOSu). CH₂Cl₂ was added and the precipitate was filtered and washed with CH₂Cl₂. Organic phase was washed with a 1M KHSO₄ aqueous solution and water, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. 1mL of CH₂Cl₂ was added to the residue and the product **III.19** was precipitated as a white solid after addition of Et₂O (0.690 g, 97%). ¹H NMR : (300MHz, CDCl₃) δ = 8.31 (s, 1H, NH), 7.31-7.22 (m, 3H, NH), 7.18 (s, 1H, NH), 6.63 (s, 1H, NH), 4.28-4.03 (m, 6H, CHN), 3.53-3.05 (m, 24H, CH₂N), 2.83 (s, 4H, CH₂), 2.11-1.84 (m, 20H, CH₂), 1.81-1.66 (m, 4H, CH₂), 1.48 (s, 9H, Boc). ESI-MS (M_w 972.14) (in MeOH the methyl ester is formed Mw 888) : *m/z* 889.2 [M+H]⁺, 911.4 [M+Na]⁺

Boc Pro^u-Pro^u-Pro^u-Pro^u-Pro^u-Pro^u Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe (P₆3)

P₆3 was prepared from **III.19** (0.020 g, 0.020 mmol) and **3** (0.011 g, 0.020 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 60:40) over silica gel gave **P₆3** as a white product (0.015 g, 55 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃CN) δ = 6.87 (m, 1H, NH), 6.65 (m, 1H, NH), 6.43 (m, 1H, NH), 6.52-6.38 (m, 2H, NH), 6.35-6.14 (m, 4H, NH), 6.12-5.99 (m, 1H, NH), 5.90-5.79 (m, 2H, NH), 5.76 (m, 1H, NH), 4.43-4.31 (m, 1H, CHN), 4.28-4.18 (m, 1H, CHN), 4.14-3.71 (m, 6H, CHN), 3.70-3.49 (m, 4H, CHN-CH₂N), 3.74-3.07 (m, 20H, CH₂N), 3.05-2.82 (m, 3H, CH₂N), 2.66 (d, J = 4.7 Hz, 3H, CH₃N), 2.57-2.27 (m, 4H, CH₂N), 1.97-1.73 (m, 24H, CH₂), 1.71-1.54 (m, 2H, CH), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.27-1.09 (m, 2H, CH₂), 1.00 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 0.94-0.77 (m, 12H, CH₃). ESI-MS (M_w 1258.60) : *m/z* 652.1 [2M+Na]²⁺, 1280.8 [M+Na]⁺

Boc-Val^u-Ala^u-Leu^u-Pro^u-Pro^u-Pro^u-Pro^u-Pro^u-Pro^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe (3P₇3)

3P₇3 was prepared from **3P₀Su** (0.008 g, 0.011 mmol) and **P₆3** (0.015 g, 0.011 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 60:40) over silica gel gave **3P₇3** as a white product (0.013 g, 60 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃CN) δ = 6.84 (m, 1H, NH), 6.41 (m, 1H, NH), 6.30 (m, 2H, NH), 6.23-6.13 (m, 2H, NH), 6.11-5.95 (m, 3H, NH), 5.89-5.79 (m, 3H, NH), 5.77-5.48 (m, 8H, NH), 4.41-4.31 (m, 1H, CHN), 4.27-4.13 (m, 1H, CHN), 4.10-3.75 (m, 6H, CHN), 3.70-3.13 (m, 20H, CHN-CH₂N), 3.10-2.73 (m, 10H, CH₂N), 2.67 (d, J = 4.6 Hz, 3H, CH₃N), 2.62-2.08 (m, 15H, CH₂N), 1.94-1.54 (m, 32H, CH₂), 1.44 (s, 9H, Boc), 1.33-1.09 (m, 4H, CH₂), 1.08-0.99 (m, 6H, CH₃), 0.93-0.78 (m, 24H, CH₃). ESI-MS (M_w 1798.27) : m/z 900.0 [2M+H]²⁺

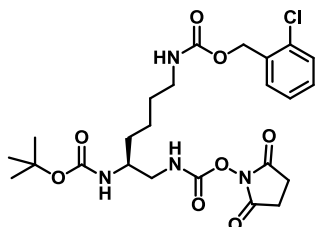
5. X Ray crystallography

Table 11 : Crystallographic data for compounds **3P3**, **3P₂3**, **3P₃3**, **3P6**, **6P6**, **(3P)₂3** and **(6P)₂6**

Compound	3P3	3P₂3	3P₃3	3P6	6P6	(3P)₂3	(6P)₂6
CCDC code	836810	-	-	836814	836812	836811	836813
Formula	C48 H96 N15 O10 S	C55.5 H101 N18 O11	C58 H109 N19 O11	C67 H135 N21 O15 S2	C83 H167 N28 O16	C40 H0 N12 O6	C119 H227 N41 O31
M	1075,46	1196.54	1248.64	1539.08	1813.45	744.52	2728.42
Crystal system	triclinic	monoclinic	monoclinic	orthorhombic	orthorhombic	triclinic	orthorhombic
Space group	P1	P2 ₁	C2	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P1	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
<i>a</i> /Å	10.5350(10)	10.379(2)	18.609(4)	12.2998(8)	10.5186(8)	10.7101(7)	1238.81(5)
<i>b</i> /Å	18.2152(16)	33.918(7)	20.000(4)	21.9328(13)	18.7857(14)	19.288	1970.12(9)
<i>c</i> /Å	18.3220(17)	19.627(4)	21.577(4)	32.7095(19)	53.271(4)	23.9982(9)	7165.8(4)
α /°	107.660(6)	90	90	90	90	68.412(11)	90
β /°	99.013(6)	99.06(3)	107.06(3)	90	90	82.347(15)	90
γ /°	103.946(6)	90	90	90	90	81.006(16)	90
<i>V</i> /Å ³	3149.5(5)	6823(2)	7677(3)	8824.0(9)	10526.2(14)	4537.6(3)	17.4890(14)
T /K	120(2)	293(2)	213(2)	200(2)	293(2)	293(2)	293(2)
Z	2	4	4	4	4	4	4
ρ /g cm ⁻¹	1.134	1.165	1.080	1.159	1.144	1.090	1.036
size (mm)	0.2x0.1x0.02	-	0.1x0.01x0.01	0.2x0.01x0.01	0.1x0.03x0.03	0.1x0.02x0.02	0.01x0.01x0.01
λ / Å	1.54178	1.54178	1.54178	1.54178	1.54178	1.54178	1.54178
μ /mm ⁻¹	0.951	0.675	0.621	1.099	0.657	0.661	0.626
Independent reflections	19376	15187	5332	8513	11856	14019	16131
measured reflections	44182	15187	-	64755	98255	21024	118368
parameters/res traints	1334/3	1558/2	794/1	3/947	1145/0	1949/61	1691/35
R1, wR2	0.099/0.2065	0.0514/0.1337	0.0832/0.2188	0.0777/0.1938	0.0547/0.1465	0.1306/0.3493	0.1715/0.4054
goodness of fit	0.973	1.036	1.053	1.037	1.065	1.251	1.897

IV. Compounds described in Chapter 4 (water-soluble oligoureas)

1. Preparation of O-succinimidyl carbamates M8 and M9

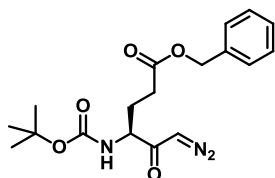


[5-*tert*-Butoxycarbonylamino-6-(2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yloxycarbonylamino)-hexyl]-carbamic acid 2-chloro-benzyl ester (M8)

Boc-L-Lys(2ClZ)-OH (5 g, 20.06 mmol) was transformed according to the general procedure A. The monomer **M8** was obtained as a white solid after recrystallization. $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ = 7,48-7,34 (m, 4H, CH_{Ar}), 6,18 (s, 1H, NH), 5,22 (s, 2H, CH_2Ar), 4,96 (s, 1H, NH), 4,73 (s, 1H, NH), 3,69 (s, 1H, CHN), 3,46-3,15 (m, 4H, CH_2N), 2,80 (s, 4H, CH_2), 1,64-1,47 (m, 6H, CH_2) 1,46 (s, 9H, Boc). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 170.10, 156.48, 152.23, 132.18, 132.05, 129.73, 129.45, 129.32, 128.65, 128.48, 126.90, 63.81, 50.42, 40.38, 31.54, 29.48, 28.35, 25.46, 22.64. **ESI-MS** (M_w 540.99) : m/z 563.1 [$M+\text{Na}$] $^+$

Preparation of diazomethane

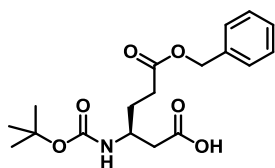
KOH (3.37 g, 60.00 mmol) was dissolved in diethylene glycol monoethyl ether (20 ml), Et_2O (6 ml) and H_2O (6 ml) and heated to 70°C . Diazald (6.43 g, 30.00 mmol), was dissolved in Et_2O (50 ml) and added dropwise carefully. The diazomethane formed compound was co-evaporated with Et_2O and condensed in a second flask cooled at -78°C with dry ice and acetone.



4-*tert*-Butoxycarbonylamino-6-diazo-5-oxo-hexanoic acid benzyl ester (IV.7)

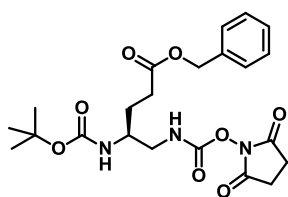
Boc-Glu(OBz)-OH (5.06 g, 15.00 mmol) was dissolved in anhydrous THF (80 mL) under N_2 , and cooled down to -10°C . NMM (2.14 ml, 19.50 mmol) was added followed by IBCF (2.95 ml, 22.50 mmol) dissolved in anhydrous THF. The reaction mixture was stirred at -10°C for 1h. The insoluble white solid was filtered off and washed with THF. Filtrate was cooled down to 0°C and freshly prepared diazomethane was added (2eq). The mixture was stirred at room temperature overnight. 1mL of acetic acid was added to neutralize diazomethane and the mixture was stirred strongly for 1h to

evaporate the excess of diazomethane. 1 mL of acetic acid, Et₂O and NaHCO₃ were successively added. The organic layer was washed with KHSO₄ and brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. **IV.7** was recrystallized in Et₂O and Hexane (3.94 g, 73 %). ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ = 7.46-7.29 (m, 5H, CH_{Ar}), 5.47 (s, 1H, CHN₂), 5.25 (m, 1H, NH), 5.14 (s, 2H, CH₂Ar), 4.26 (m, 1H, CHN), 2.60-2.38 (m, 2H, CH₂), 2.23-2.10 (m, 1H, CH₂), 1.93-1.77 (m, 1H, CH₂), 1.45 (s, 9H, Boc).



3-*tert*-Butoxycarbonylamino-hexanedioic acid 6-benzyl ester (**IV.8**)

IV.7 (3.00 g, 8.30 mmol), was dissolved in a mixture of THF (50 ml) and water (10 ml). The round bottom flask was covered with aluminium and cooled to 0°C. CF₃COOAg (0.37 g, 1.66 mmol) was added followed by a dropwise addition of NMM (2.28 ml, 20.75 mmol). The reaction mixture was stirred 2h. THF was then removed under vacuum and the resulting oil was diluted with KHSO₄ and EtOAc. The organic layer was washed with KHSO₄ and brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced. **IV.8** was recrystallized in Et₂O and hexane (2.17 g, 74 %). ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ = 7.42-7.31 (m, 5H, CH_{Ar}), 5.13 (s, 2H, CH₂Ar), 4.00 (m, 1H, NH), 4.03-3.90 (m, 1H, CHN), 2.70-2.56 (m, 2H, CH₂COOH), 2.54-2.40 (m, 2H, CH₂), 1.98-1.85 (m, 2H, CH₂), 1.45 (s, 9H, Boc).

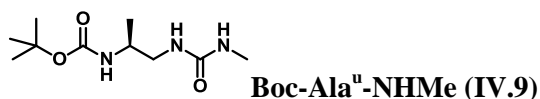


4-*tert*-Butoxycarbonylamino-5-(2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl)oxycarbonylamino-pentanoic acid benzyl ester (**M9**)

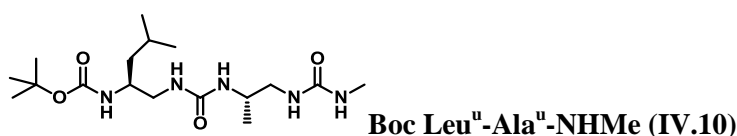
IV.8 (0.64 g, 1.82 mmol) was dissolved in THF (15 mL) under Ar and cooled to -20 °C. After addition of NMM (0.24 ml, 2.19 mmol) and IBCF (0.28 ml, 2.19 mmol), the reaction mixture was stirred at -20 °C for 20 min. The resulting white suspension was allowed to warm to -5 °C and was treated with an aqueous solution of NaN₃ (0.30 g, 4.55 mmol). The mixture was stirred for 5 min, diluted with EtOAc, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure to give the acyl azide, which was used without further purification. Toluene (15 mL) was added under Ar, and the resulting solution was heated to 65 °C under stirring. After the gas evolution had stopped (ca. 10 min), *N*-hydroxysuccinimide (0.21 g, 1.82 mmol) and pyridine (0.15 ml, 1.82 mmol) were

added. The reaction mixture was stirred for 5 min at 65 °C and then cooled down to room temperature. The solvent was removed under vacuum and the residue was purified by was recrystallization in EtOAc and Hexane to give **M9** (0.63 g, 74 %). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7,45-7,33 (m, 5H, CH_{Ar}), 6,08 (s, 1H, NH), 5,14 (s, 2H, CH_2Ar), 4,74 (m, 1H, NH), 3,82-3,68 (m, 1H, CHN), 3,45-3,22 (m, 2H, CH_2N), 2,83 (s, 4H, CH_2), 2,55-2,44 (m, 2H, CH_2), 1,98-1,69 (m, 2H, CH_2), 1,45 (s, 9H, Boc). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 173.07, 170.17, 156.41, 152.27, 135.80, 128.59, 128.27, 128.22, 80.00, 66.51, 50.26, 46.27, 30.73, 28.30, 27.17, 25.48. **ESI-MS** (M_w 463.48) : m/z 486.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

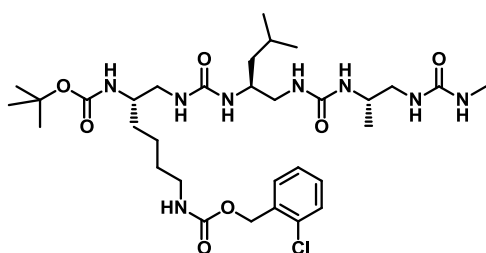
2. Oligoureas from the 1st design



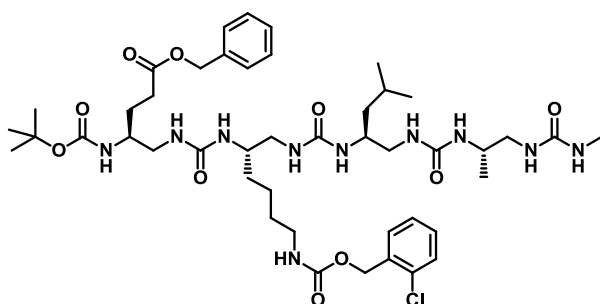
Methylamine hydrochloride (0.260 g, 3.81 mmol) was dissolved in CH_3CN . DIPEA (1.29 ml, 7.61 mmol) was then added and the mixture was cooled down to 0°C prior to the dropwise addition of **M2** (0.80 g, 2.54 mmol), dissolved in CH_3CN . After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO_3 aqueous solution, 1M KHSO_4 aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na_2SO_4 and evaporated to give **IV.9** (0.531 g, 90%). $^1\text{H NMR}$: (300MHz, DMSO d_6) δ = 6.65 (m, 1H, NH), 5.88 (m, 1H, NH), 5.80 (m, 1H, NH), 3.46-3.35 (m, 1H, CHN), 3.05-2.84 (m, 2H, CH_2N), 2.53 (d, 3H, CH_3N), 1.37 (s, 9H, Boc), 0.95 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CH_3)



IV.10 was prepared from **M1** (1.39 g, 3.89 mmol) and **IV.9** (0.90 g, 3.89 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO_3 aqueous solution, 1M KHSO_4 aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na_2SO_4 and evaporated. Flash column chromatography (CH_2Cl_2 -MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **IV.10** as a white product (0.85 g, 60 %). $^1\text{H NMR}$: (300MHz, CD_3CN) δ = 5.51 (m, 1H, NH), 5.41 (m, 1H, NH), 5.27 (m, 1H, NH), 5.15 (m, 1H, NH), 5.06 (m, 1H, NH), 3.76-3.64 (m, 2H, CHN), 3.27-3.14 (m, 2H, CH_2N), 2.97-2.83 (m, 2H, CH_2N), 2.66 (d, J = 4.7 Hz, 3H, CH_3N), 1.73-1.58 (m, 1H, CH), 1.44 (s, 9H, Boc), 1.35-1.20 (m, 2H, CH_2), 1.06 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CH_3), 0.97-0.90 (m, 6H, CH_3). **ESI-MS** (M_w 373.5) m/z 373.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 396.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 746.9 $[2\text{M} + \text{H}]^+$, 768.9 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$.

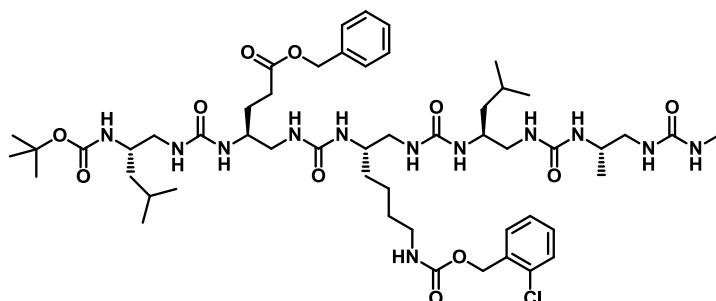
Boc Lys(2ClZ)^u-Leu^u-Ala^u-NHMe (IV.11)

IV.11 was prepared from **M8** (0.96 g, 1.78 mmol) and **IV.10** (0.70 g, 1.87 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **IV.11** as a white product (0.81 g, 62 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃CN) δ = 57.53-7.31 (m, 4H, CH_{Ar}), 6.54 (m, 1H, NH), 6.08-5.95 (m, 2H, NH), 5.54-5.32 (m, 4H, NH), 5.18 (s, 2H, CH₂OCO), 4.88 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, NH), 3.99-3.80 (m, 2H, CHN), 3.76-3.62 (m, 1H, CHN), 3.61-3.47 (m, 2H, CH₂N), 3.43-3.33 (m, 1H, CH₂N), 3.23-3.11 (m, 1H, CH₂N), 3.06-2.84 (m, 1H, CH₂N), 2.68 (d, *J* = 4.7 Hz, 3H, CH₃N), 2.64-2.57 (m, 1H, CH₂N), 2.56-2.43 (m, 2H, CH₂N), 1.76-1.59 (m, 1H, CH), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.42-1.15 (m, 8H, CH₂), 0.99 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃), 0.96-0.88 (m, 6H, CH₃). ESI-MS (M_w 699.3) *m/z* 699.2 [M + H]⁺, 721.3 [M + Na]⁺, 1397.1 [2M + H]⁺, 1419.1 [2M + Na]⁺.

Boc Glu(OBz)^u-Lys(2ClZ)^u-Leu^u-Ala^u-NHMe (IV.12)

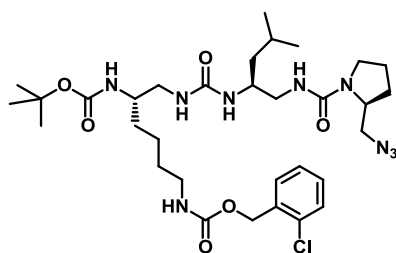
IV.12 was prepared from **M9** (0.428 g, 0.92 mmol) and **IV.11** (0.68 g, 0.97 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **IV.12** as a white product (0.57 g, 62 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃CN) δ = 7.54-7.32 (m, 9H, CH_{Ar}), 6.63 (m, 1H, NH), 6.23-6.10 (m, 2H, NH), 6.07 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, NH), 5.71-5.59 (m, 3H, NH), 5.50-5.38 (m, 2H, NH), 5.16 (s, 2H, CH₂OCO), 5.12 (s, 2H, CH₂OCO), 4.96 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, NH), 4.00-3.85 (m, 2H, CHN), 3.81-3.65 (m, 2H, CHN), 3.63-3.44 (m, 4H, CH₂N), 3.25-3.11 (m, 1H, CH₂N), 3.05-2.92 (m, 1H, CH₂N), 2.69 (d, *J* = 4.7 Hz, 3H, CH₃N), 2.64-2.49 (m, 2H, CH₂N), 2.46-2.38 (m, 2H, CH₂N), 2.34-2.23 (m, 2H, CH₂COO), 1.88-1.51

(m, 3H, CH-CH₂), 1.46 (s, 9H, Boc), 1.44-1.11 (m, 8H, CH₂), 0.98 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH₃), 0.92-0.86 (m, 6H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 947.58) m/z 947.4 [M + H]⁺, 969.5 [M + Na]⁺



Boc Leu^D-Glu(OBz)^D-Lys(2ClZ)^D-Leu^D-Ala^D-NHMe (IV.2)

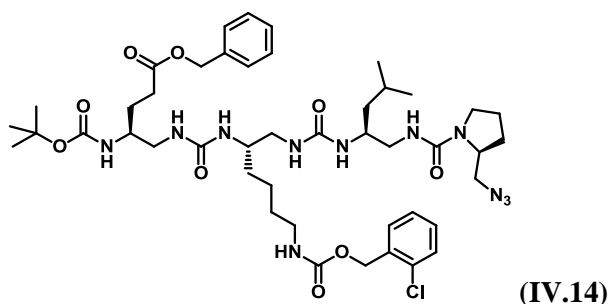
IV.2 was prepared from **M1** (0.21 g, 0.60 mmol) and **IV.12** (0.57 g, 0.60 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **IV.2** as a white product (0.45 g, 69 %). **¹H NMR** : (300MHz, CD₃CN) $\delta = 7.52$ -7.30 (m, 9H, CH_{Ar}), 6.60-6.47 (m, 2H, NH), 6.25-6.09 (m, 3H, NH), 6.81-5.73 (m, 2H, NH), 5.63-5.51 (m, 3H, NH), 5.41 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, NH), 5.16 (s, 2H, CH₂OCO), 5.10 (s, 2H, CH₂OCO), 5.02 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H, NH), 4.04-3.86 (m, 2H, CHN), 3.86-3.69 (m, 3H, CHN), 3.66-3.49 (m, 4H, CH₂N), 3.49-3.38 (m, 1H, CH₂N), 3.23-3.10 (m, 1H, CH₂N), 3.03-2.91 (m, 1H, CH₂N), 2.69 (d, $J = 4.7$ Hz, 3H, CH₃N), 2.64-2.53 (m, 1H, CH₂N), 2.52-2.20 (m, 6H, CH₂N-CH₂COO), 1.84-1.52 (m, 4H, CH-CH₂), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.38-1.07 (m, 10H, CH₂), 0.99 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH₃), 0.96-0.86 (m, 12H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 1089.76) m/z 1089.5 [M + H]⁺, 1111.6 [M + Na]⁺



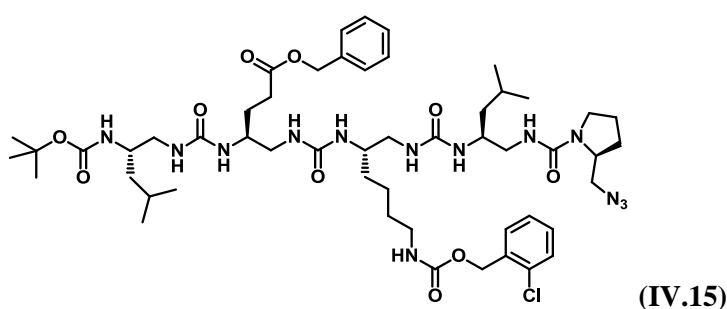
(IV.13)

IV.13 was prepared from **M8** (1.10 g, 2.04 mmol) and **III.9** (0.750 g, 2.04 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **IV.13** as a white product (0.950 g, 67 %). **¹H NMR** : (300MHz, CD₃CN) $\delta = 7.50$ -7.31 (m, 4H, CH_{Ar}), 5.87 (m, 1H, NH), 5.72 (m, 1H, NH), 5.62 (m, 1H, NH), 5.54-5.35 (m, 1H, NH), 5.18 (s, 2H, CH₂OCO), 5.06 (m, 1H, NH), 4.02-3.93 (m, 1H, CHN),

3.80-3.63 (m, 1H, CHN), 3.58-3.22 (m, 6H, CHN-CH₂N), 3.18-3.00 (m, 5H, CH₂N), 1.94-1.63 (m, 4H, CH₂), 1.56-1.46 (m, 3H, CH-CH₂), 1.45 (s, 9H, Boc), 1.40-1.22 (m, 6H, CH₂), 0.96-0.87 (m, 6H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 694.28): m/z 694.3 [M+H]⁺, 1389.13 [2M+H]⁺

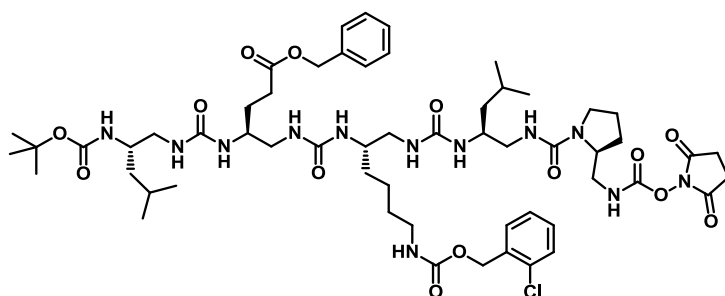


IV.14 was prepared from **M9** (0.57 g, 1.22 mmol) and **IV.13** (0.850 g, 1.22 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **IV.14** as a white product (0.780 g, 68 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃CN) δ = 7.51-7.31 (m, 9H, CH_{Ar}), 5.92-5.79 (m, 2H, NH), 5.63 (m, 1H, NH), 5.50-5.19 (m, 3H, NH), 5.21-5.18 (m, 1H, NH), 5.17 (s, 2H, CH₂ OCO), 5.12 (s, 2H, CH₂ OCO), 4.06-3.87 (m, 1H, CHN), 3.84-3.57 (m, 3H, CHN), 3.52-3.19 (m, 7H, CH₂N), 3.19-2.99 (m, 3H, CH₂N), 2.93-2.75 (m, 1H, CH₂N), 2.74-2.61 (m, 1H, CH₂N), 2.45-2.36 (m, 2H, CH₂COO) 1.94-1.51 (m, 10H, CH-CH₂), 1.44 (s, 9H, Boc), 1.39-1.19 (m, 5H, CH₂), 0.96-0.84 (m, 6H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 942.54): m/z 964.5 [M+Na]⁺



IV.15 was prepared from **M1** (0.29 g, 0.83 mmol) and **IV.14** (0.78 g, 0.83 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **IV.15** as a white product (0.680 g, 75 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃CN) δ = 7.50-7.30 (m, 9H, CH_{Ar}), 6.08 (m, 1H, NH), 5.91 (d, J = 9.2 Hz, 1H, NH), 5.79 (m, 1H, NH), 5.69 (d, J = 8.8 Hz, 1H, NH), 5.61-5.47 (m, 2H, NH), 5.46-5.37 (m, 2H, NH), 5.17 (s, 2H,

CH₂ OCO), 5.11 (s, 2H, CH₂OCO), 5.01 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H, NH), 4.08-4.00 (m, 1H, CHN), 3.90-3.70 (m, 4H, CHN), 3.67-3.55 (m, 2H, CH₂N), 3.51-3.26 (m, 6H, CH₂N), 3.17-3.07 (m, 3H, CH₂N), 2.81-2.70 (m, 1H, CH₂N), 2.58-2.47 (m, 1H, CH₂N), 2.45-2.39 (m, 2H, CH₂COO), 2.40-2.28 (m, 1H, CH₂N), 1.95-1.48 (m, 10H, CH-CH₂), 1.44 (s, 9H, Boc), 1.42-1.14 (m, 8H, CH₂), 0.95-0.86 (m, 12H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 1084.74): m/z 1084.5 [M+H]⁺, 1106.7 [M+Na]⁺



Boc Leu^D-Glu(OBz)^D-Lys(2ClZ)^D-Leu^D-Pro^D-NHOSu (IV.3)

Compound **IV.15** (0.050 g, 0.046 mmol) was dissolved in a dioxane/H₂O (80:20) solvent mixture. PL-TPP resin (1.5 mmol/g) (0.300 g) was introduced and the reaction mixture was stirred under microwaves (50W, 50°C) during 2h. After completion, the resin was filtered off, washed with dioxane and H₂O. The filtrate was then completely evaporated under vacuum to give the amine which was directly engaged in the next step. Disuccinimidyl carbonate (0.014 g, 0.057 mmol) was suspended in dry CH₂Cl₂ (10 mL) and the amine was added portionwise. The reaction mixture was stirred at room temperature under N₂ atmosphere for 4h. After 4h stirring, a white precipitate was formed (HOSu). CH₂Cl₂ was added and the precipitate was filtered off and washed with CH₂Cl₂. Organic layers were combined, washed with a 1M KHSO₄ aqueous solution and water, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. 1mL of CH₂Cl₂ was added to the residue and the product **IV.3** was precipitated as a white solid after addition of Et₂O (0.040 g, 78%). **¹H NMR** : (300MHz, CD₃CN) $\delta = 8.39$ (m, 1H, NHOSu), 7.51-7.30 (m, 9H, CH_{Ar}), 6.37 (m, 1H, NH), 6.03 (m, 1H, NH), 5.92 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, NH), 5.78 (m, 1H, NH), 5.62 (m, 1H, NH), 5.49 (m, 1H, NH), 5.44 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H, NH), 5.38 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H, NH), 5.15 (s, 2H, CH₂ OCO), 5.11 (s, 2H, CH₂OCO), 4.89 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H, NH), 4.15-3.95 (m, 2H, CHN), 3.95-3.56 (m, 7H, CHN-CH₂N), 3.56-3.36 (m, 3H, CH₂N), 3.36-3.20 (m, 2H, CH₂N), 3.16-3.03 (m, 3H, CH₂N), 2.76 (s, 4H, CH₂CO), 2.53-2.45 (m, 1H, CH₂N), 2.46-2.36 (m, 2H, CH₂COO), 2.37-2.27 (m, 1H, CH₂N), 1.90-1.50 (m, 10H, CH-CH₂), 1.45 (s, 9H, Boc), 1.40-1.08 (m, 8H, CH₂), 0.96-0.82 (m, 12H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 1199.83): m/z 1199.53 [M+H]⁺, 1221.6 [M+Na]⁺

Boc-Leu^D-Glu(OBz)^D-Lys(2ClZ)^D-Leu^D-Pro^D-Leu^D-Glu(OBz)^D-Lys(2ClZ)^D-Leu^D-Ala^D-NHMe (IV.1)

Boc-protected oligopeptide **IV.2** (0.100 g, 0.091 mmol) was dissolved in TFA (3 ml) and stirred for 45 min. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure and coevaporated 3 times with cyclohexane. The crude product was then dissolved in a CH₃CN/DMF solvent mixture (4:1, 2.5 ml). DIPEA 0.05 ml, 0.27 mmol) and **IV.3** (0.104 g, 0.087 mmol) were added. The reaction mixture was then stirred under microwave irradiation (50°C, 25W) for 3h. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **IV.1** as a white product (0.130 g, 69 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃CN) δ = 7.542-7.30 (m, 18H, CH_{Ar}), 7.05 (m, 1H, NH), 6.86 (m, 1H, NH), 6.71 (m, 1H, NH), 6.66 (m, 1H, NH), 6.59-6.49 (m, 2H, NH), 6.40 (m, 1H, NH), 6.30 (m, 1H, NH), 6.23 (m, 1H, NH), 6.15 (m, 1H, NH), 6.08 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H, NH), 5.97-5.80 (m, 6H, NH), 5.73-5.65 (m, 2H, NH), 5.54 (m, 1H, NH), 5.46 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H, NH), 5.38 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, NH), 5.17 (s, 2H, CH₂OCO), 5.15 (s, 2H, CH₂OCO), 5.11 (s, 2H, CH₂OCO), 5.10 (s, 2H, CH₂OCO), 4.96 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H, NH), 4.27-4.14 (m, 2H, CHN), 4.04-3.36 (m, 22H, CHN-CH₂N), 3.32-3.04 (m, 5H, CH₂N), 3.03-2.92 (m, 1H, CH₂N), 2.69 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H, CH₃N), 2.66-2.26 (m, 15H, CH₂N-CH₂COO), 1.94-1.52 (m, 14H, CH-CH₂), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.45-1.12 (m, 14H, CH₂), 1.00 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃), 1.02-0.79 (m, 24H, CH₃). ESI-MS (M_w 2074.38): *m/z* 1060.27 [M+ 2Na]²⁺

Boc Leu^u-Glu^u-Lys^u-Leu^u-Pro^u-Leu^u-Glu^u-Lys^u-Leu^u-Ala^u-NHMe (deprotected) (IV.A)

Compound **IV.1** (0.030 g, 0.014 mmol) was dissolved in EtOH/H₂O/Acetic acid (v/v; 5:2:1). Pd/C 10% (0.006 g) was introduced under Ar atmosphere. The reaction mixture was put under vacuum then flushed with H₂ (three times) and the mixture was finally stirred at room temperature under H₂ for 24h. Pd/C was then removed by microfiltration, washed with EtOH/H₂O/Acetic acid. EtOH was then completely evaporated under vacuum and the compound was lyophilized and purified by semi-preparative HPLC (H₂O/CH₃CN (0.1 % TFA) from 30% to 100% of CH₃CN)). **IV.A** was then dissolved in HCl (0.1M) and lyophilized three times to exchange the trifluoroacetate ions. C₁₈-HPLC *t_R* = 5.24 min (A: 0.1% TFA in H₂O; B: 0.1% TFA in CH₃CN, 30-100% B; 1 ml/min: 10 min)

Boc-Leu^u-Glu(OBz)^u-Lys(2ClZ)^u-Leu^u-Pro^u-Leu^u-Glu(OBz)^u-Lys(2ClZ)^u-Leu^u-Pro^u-Leu^u-Glu(OBz)^u-Lys(2ClZ)^u-Leu^u-Ala^u-NHMe (IV.16)

Boc-protected oligourea **IV.1** (0.050 g, 0.024 mmol) was dissolved in TFA (3 ml) and stirred for 45 min. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure and coevaporated 3 times with cyclohexane. The crude product was then dissolved in CH₃CN/DMF (4:1, 2.5 ml). DIPEA 0.05 ml, 0.27 mmol) and **IV.3** (0.027 g, 0.023 mmol) were added. The reaction mixture was then stirred under microwave irradiations (50°C, 25W) for 3h. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **IV.16** as a white product (0.037 g, 51 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃CN) δ = 7.53-7.29 (m, 27H, CH_{Ar}), 7.10-6.96 (m, 3H, NH), 6.86 (m, 1H, NH), 6.72 (m, 1H, NH), 6.66 (m, 1H, NH), 6.62-6.48 (m, 4H, NH), 6.40 (m, 1H, NH), 6.29 (m, 1H, NH), 6.25-6.08 (m, 4H, NH), 6.03 (m, 1H, NH), 5.97-5.78 (m, 7H, NH), 5.77-5.65 (m, 3H, NH), 5.55-5.43 (m, 3H, NH), 5.37 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, NH), 5.20-5.14 (m, 6H, CH₂OCO), 5.13-5.08 (m, 6H, CH₂OCO), 4.94 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, NH), 4.28-4.12 (m, 3H, CHN), 4.02-3.38 (m, 28H, CHN-CH₂N), 3.30-2.91 (m, 13H, CH₂N), 2.69 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H, CH₃N), 2.66-2.26 (m, 17H, CH₂N-CH₂COO), 1.91-1.49 (m, 22H, CH-CH₂), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.45-1.08 (m, 38H, CH₂), 1.00 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃), 0.95-0.77 (m, 36H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 3059) *m/z* 1019.9 [M + 3H]³⁺, 1528.9 [M + 2H]²⁺

Boc-Leu^u-Glu^u-Lys^u-Leu^u-Pro^u-Leu^u-Glu^u-Lys^u-Leu^u-Pro^u-Leu^u-Glu^u-Lys^u-Leu^u-Ala^u-NHMe (IV.B)

Compound **IV.16** (0.037 g, 0.012 mmol) was solubilized in EtOH/H₂O/Acetic acid (v/v; 5:2:1). Pd/C 10% (0.006 g) was introduced under Argon. The reaction mixture was put under vacuum then flushed with H₂ (three times) and the mixture was finally stirred at room temperature under H₂ for 24h. Pd/C was then removed by microfiltration, washed with EtOH/H₂O/Acetic acid. EtOH was then completely evaporated under vacuum and the compound was lyophilized and purified by semi-preparative HPLC ((H₂O/CH₃CN (0.1 % TFA) from 30% to 100% of CH₃CN)). **IV.B** was then dissolved in HCl (0.1M) and lyophilized three times to exchange the trifluoroacetate ions. (0.010, 36%) **ESI-MS** (M_w 2281) *m/z* 761.9 [M + 3H]³⁺, 1141.9 [M + 2H]²⁺ **C₁₈-HPLC** t_R = 8.06 min (A: 0.1% TFA in H₂O; B: 0.1% TFA in CH₃CN, 35-60% B; 1 ml/min: 10 min)

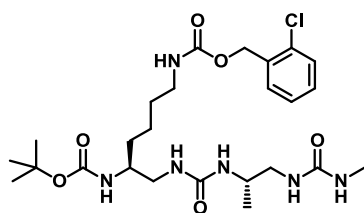
ⁱProp^u-Leu^u-Glu(OBz)^u-Lys(2ClZ)^u-Leu^u-Pro^u-Leu^u-Glu(OBz)^u-Lys(2ClZ)^u-Leu^u-Ala^u-NHMe (IV.17)

Boc-protected oligourea **IV.1** (0.030 g, 0.014 mmol) was dissolved in TFA (3 ml) and stirred for 45 min. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure and coevaporated 3 times with cyclohexane. The crude product was then dissolved in CH₃CN/DMF (4:1, 2.5 ml). DIPEA 0.05 ml, 0.27 mmol) and isopropyl isocyanate (0.0014 g, 0.0014 mmol) were added. The reaction mixture was then stirred under microwave irradiations (50°C, 25W) for 3h. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. The compound **IV.17** was not purified by flash column chromatography to save it. ¹H NMR : (300MHz, CD₃CN) δ = 7.54-7.32 (m, 18H, CH_{Ar}), 7.06 (m, 1H, NH), 6.90 (m, 1H, NH), 6.75-6.63 (m, 2H, NH), 6.60-6.51 (m, 2H, NH), 6.37 (m, 1H, NH), 6.29 (m, 1H, NH), 6.21 (m, 1H, NH), 6.18-6.05 (m, 3H, NH), 5.98-5.79 (m, 4H, NH), 5.70 (m, 1H, NH), 5.47-5.28 (m, 2H, NH), 5.17 (s, 2H, CH₂OCO), 5.16 (s, 2H, CH₂OCO), 5.11 (s, 2H, CH₂OCO), 5.10 (s, 2H, CH₂OCO), 4.97-4.82 (m, 4H, NH), 4.37-4.12 (m, 4H, CHN), 4.06-3.40 (m, 20H, CHN-CH₂N), 3.27-2.82 (m, 8H, CH₂N), 2.69 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H, CH₃N), 2.66-2.25 (m, 10H, CH₂N-CH₂COO), 1.94-1.52 (m, 14H, CH-CH₂), 1.48-1.09 (m, 18H, CH₂), 1.00 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃), 1.02-0.79 (m, 24H, CH₃). ESI-MS (M_w 2071) *m/z* 1058.7 [M+ 2Na]²⁺

ⁱProp^u-Leu^u-Glu^u-Lys^u-Leu^u-Pro^u-Leu^u-Glu^u-Lys^u-Leu^u-Ala^u-NHMe (IV.C)

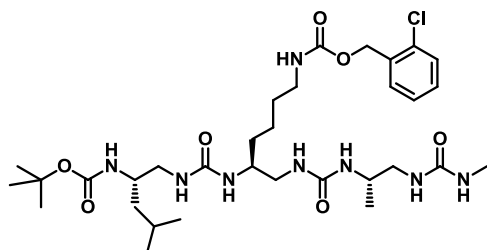
Compound **IV.17** (0.020 g, 0.009 mmol) was solubilized in EtOH/H₂O/Acetic acid (v/v; 5:2:1). Pd/C 10% (0.006 g) was introduced under Argon. The reaction mixture was put under vacuum then flushed with H₂ (three times) and the mixture was finally stirred at room temperature under H₂ for 24h. Pd/C was then removed by microfiltration, washed with EtOH/H₂O/Acetic acid. EtOH was then completely evaporated under vacuum and the compound was lyophilized and purified by semi-preparative HPLC ((H₂O/CH₃CN (0.1 % TFA) from 30% to 100% of CH₃CN)). **IV.C** was then dissolved in HCl (0.1M) and lyophilized three times to exchange the trifluoroacetate ions. (0.009, 59%) ESI-MS (M_w 1555) *m/z* 778.7 [M + 2H]²⁺, 1555.7 [M + H]⁺ C₁₈-HPLC t_R = 5.85 min (A: 0.1% TFA in H₂O; B: 0.1% TFA in CH₃CN, 35-60% B; 1 ml/min: 10 min)

3. Oligoureas from the 2nd design



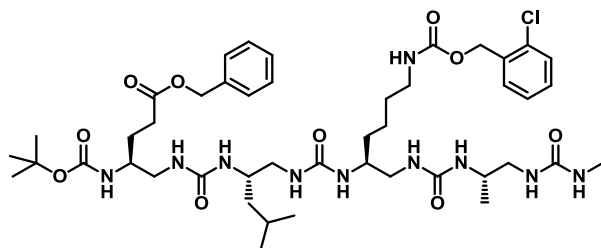
Boc Lys(2ClZ)^u-Ala^u-NHMe (IV.18)

IV.18 was prepared from **M8** (1.38 g, 2.54 mmol) and **IV.9** (0.620 g, 2.68 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **IV.18** as a white product (1.06 g, 71 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃CN) δ = 7.51-7.32 (m, 4H, CH_{Ar}), 5.83 (m, 1H, NH), 5.60 (m, 1H, NH), 5.38-5.25 (m, 2H, NH), 5.18 (s, 2H, CH₂OCO), 5.12-5.02 (m, 2H, NH), 3.74-3.63 (m, 1H, CHN), 3.61-3.50 (m, 1H, CHN), 3.25-3.07 (m, 4H, CH₂N), 3.06-2.91 (m, 2H, CH₂N), 2.66 (d, *J* = 4.7 Hz, 3H, CH₃N), 1.58-1.46 (m, 2H, CH₂), 1.45 (s, 9H, Boc), 1.42-1.29 (m, 4H, CH₂), 1.07 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 556.28) *m/z* 579.2 [M + Na]⁺, 1134.8 [2M + Na]⁺



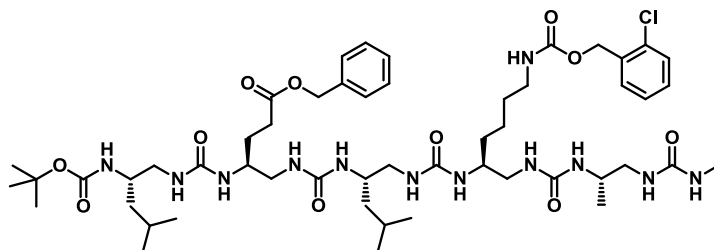
Boc Leu^u-Lys(2ClZ)^u-Ala^u-NHMe (IV.19)

IV.19 was prepared from **M1** (0.64 g, 1.80 mmol) and **IV.18** (1.00 g, 1.80 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **IV.19** as a white product (1.25 g, 93 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃OH) δ = 7.49-7.29 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.12 (m, 1H, NH), 6.53 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, NH), 6.04 (m, 1H, NH), 5.94 (m, 1H, NH), 5.89 (m, 1H, NH), 5.81 (m, 1H, NH), 5.19 (s, 2H, CH₂OCO), 3.92-3.72 (m, 3H, CHN), 3.57-3.40 (m, 2H, CH₂N), 3.20-3.11 (m, 2H, CH₂N), 2.90-2.79 (m, 2H, CH₂N), 2.72 (d, *J* = 3.9 Hz, 3H, CH₃N), 2.68-2.44 (m, 2H, CH₂N), 1.76-1.61 (m, 1H, CH), 1.60-1.51 (m, 2H, CH₂), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.44-1.15 (m, 6H, CH₂), 1.08 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃), 0.99-0.87 (m, 6H, CH₃) **ESI-MS** (M_w 698.39) *m/z* 699.2 [M + H]⁺, 721.3 [M + Na]⁺



Boc Glu(OBz)^u-Leu^u-Lys(2ClZ)^u-Ala^u-NHMe (IV.20)

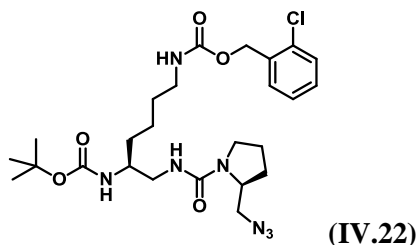
IV.20 was prepared from **M9** (0.86 g, 1.86 mmol) and **IV.19** (1.30 g, 1.86 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **IV.20** as a white product (0.86 g, 48 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃OH) δ = 7.51-7.28 (m, 9H, CH_{Ar}), 7.10 (m, 1H, NH), 6.66 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, NH), 6.40 (m, 1H, NH), 6.28 (m, 1H, NH), 6.20 (m, 1H, NH), 6.08-5.99 (m, 2H, NH), 5.93 (m, 1H, NH), 5.82-5.75 (m, 2H, NH), 5.19 (s, 2H, CH₂OCO), 5.13 (s, 2H, CH₂OCO), 4.01-3.66 (m, 4H, CHN), 3.60-3.42 (m, 4H, CH₂N), 3.16-3.07 (m, 2H, CH₂N), 2.86-2.75 (m, 1H, CH₂N), 2.73 (d, *J* = 3.9 Hz, 3H, CH₃N), 2.68-2.51 (m, 2H, CH₂N), 2.49-2.40 (m, 2H, CH₂COO), 2.40-2.32 (m, 1H, CH₂N), 1.91-1.78 (m, 1H, CH), 1.76-1.51 (m, 4H, CH₂), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.42-1.16 (m, 6H, CH₂), 1.08 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃), 0.96-0.88 (m, 6H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 946.50) *m/z* 947.3 [M + H]⁺, 969.4 [M + Na]⁺



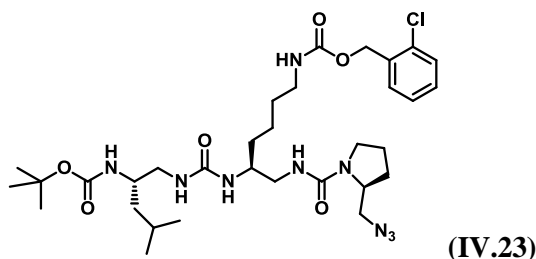
Boc Leu^u-Glu(OBz)^u-Leu^u-Lys(2ClZ)^u-Ala^u-NHMe (IV.21)

IV.21 was prepared from **M1** (0.113 g, 0.317 mmol) and **IV.20** (0.300 g, 0.317mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **IV.21** as a white product (0.23 g, 67 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃OH) δ = 7.51-7.32 (m, 9H, CH_{Ar}), 6.51 (m, 1H, NH), 6.30 (m, 1H, NH), 6.12 (m, 1H, NH), 6.07 (m, 1H, NH), 5.82 (m, 1H, NH), 5.80-5.72 (m, 3H, NH), 5.69 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H, NH), 5.64 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H, NH), 5.52 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, NH), 5.24 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, NH), 5.16 (s, 2H, CH₂OCO), 5.09 (s, 2H, CH₂OCO), 4.04-3.72 (m, 5H, CHN), 3.70-3.38 (m, 5H, CH₂N), 3.13-3.05 (m, 2H, CH₂N), 2.67 (d, *J* = 4.7 Hz, 3H, CH₃N), 2.65-2.46 (m, 2H, CH₂N), 2.45-2.37 (m, 2H, CH₂COO), 2.37-2.28 (m, 3H, CH₂N), 1.83-1.53 (m, 4H, CH-CH₂), 1.46 (s, 9H, Boc),

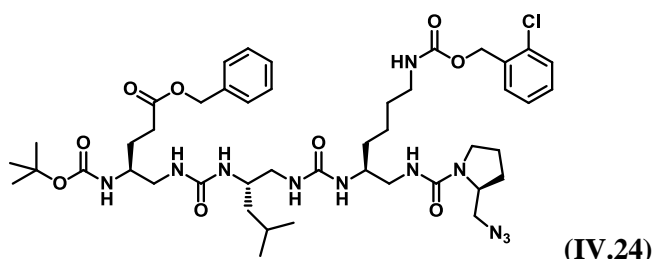
1.44-1.16 (m, 8H, CH₂), 1.15-1.07 (m, 2H, CH₂), 1.01 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH₃), 0.95-0.84 (m, 12H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 1088.61) m/z 1089.5 [M + H]⁺, 1111.5 [M + Na]⁺



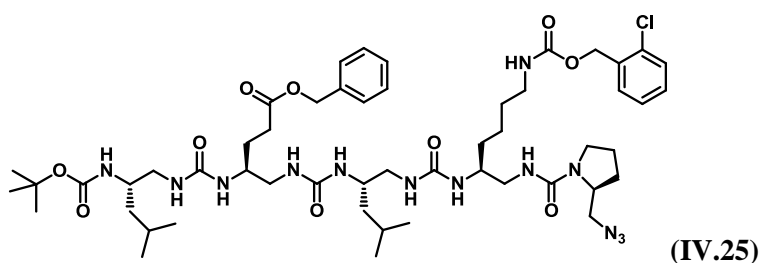
IV.22 was prepared from **M8** (0.43 g, 2.65 mmol) and **III.4** (0.600 g, 2.65 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **IV.22** as a white product (1.2 g, 82 %). **¹H NMR** : (300MHz, CD₃CN) $\delta = 7.74$ -7.33 (m, 4H, CH_{Ar}), 5.82 (m, 1H, NH), 5.51 (s, 1H, NH), 5.32 (m, 1H, NH), 5.17 (s, 2H, CH₂OCO), 4.04-3.97 (m, 1H, CHN), 3.59-3.52 (m, 1H, CHN), 3.48 (dd, $J = 12.1$, 6.5 Hz, 1H, CH₂N), 3.37 (dd, $J = 12.1$, 3.8 Hz, 1H, CH₂N), 3.33-3.23 (m, 2H, CH₂N), 3.21-3.09 (m, 4H, CH₂N), 2.03-1.78 (m, 4H, CH₂), 1.56-1.45 (m, 3H, CH₂), 1.43 (s, 9H, Boc), 1.41-1.30 (m, 3H, CH₂). **ESI-MS** (M_w 552.07) m/z 279.09 [M + 2H]²⁺, 574.25 [M + Na]⁺



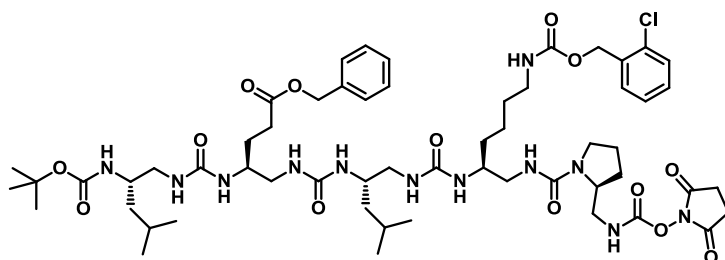
IV.23 was prepared from **M1** (0.77 g, 2.17 mmol) and **IV.22** (1.20 g, 2.17 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **IV.23** as a white product (1.00 g, 66 %). **¹H NMR** : (300MHz, CD₃CN) $\delta = 7.53$ -7.35 (m, 4H, CH_{Ar}), 5.87 (m, 1H, NH), 5.68-5.53 (m, 2H, NH), 5.39 (m, 1H, NH), 5.18 (s, 2H, CH₂OCO), 5.12 (m, 1H, NH), 4.07-3.98 (m, 1H, CHN), 3.70-3.56 (m, 2H, CHN), 3.48 (dd, $J = 12.1$, 6.6 Hz, 1H, CH₂N), 3.38 (dd, $J = 12.1$, 3.8 Hz, 1H, CH₂N), 3.34-3.26 (m, 2H, CH₂N), 3.21-2.99 (m, 6H, CH₂N), 1.96-1.77 (m, 4H, CH₂), 1.72-1.47 (m, 4H, CH₂), 1.43 (s, 9H, Boc), 1.40-1.20 (m, 5H, CH₂), 0.95-0.88 (m, 6H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 694.26) m/z 694.38 [M + H]⁺, 716.36 [M + Na]⁺



IV.24 was prepared from **M9** (0.63 g, 1.36 mmol) and **IV.23** (0.95 g, 1.36 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **IV.22** as a white product (0.88 g, 68 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃CN) δ = 7.51-7.32 (m, 9H, CH_{Ar}), 6.00-5.88 (m, 2H, NH), 5.67 (m, 1H, NH), 5.54-5.38 (m, 3H, NH), 5.16 (s, 2H, CH₂OCO), 5.11 (s, 2H, CH₂OCO), 4.06-4.00 (m, 1H, CHN), 3.86-3.61 (m, 3H, CHN), 3.51-3.24 (m, 7H, CH₂N), 3.15-3.07 (m, 2H, CH₂N), 2.96-2.80 (m, 2H, CH₂N), 2.72-2.57 (m, 1H, CH₂N), 2.45-2.38 (m, 2H, CH₂COO), 1.95-1.73 (m, 4H, CH₂), 1.73-1.59 (m, 2H, CH₂), 1.52-1.45 (m, 3H, CH-CH₂), 1.44 (s, 9H, Boc), 1.39-1.29 (m, 4H, CH₂), 1.28-1.17 (m, 2H, CH₂), 0.96-0.85 (m, 6H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 942.49) *m/z* 942.49 [M + H]⁺, 980.45 [M + Na]⁺



IV.25 was prepared from **M1** (0.32 g, 0.90 mmol) and **IV.24** (0.85 g, 0.90 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **IV.25** as a white product (0.64 g, 65 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃CN) δ = 7.50-7.33 (m, 9H, CH_{Ar}), 6.12 (m, 1H, NH), 5.99-5.87 (m, 2H, NH), 5.75 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, NH), 5.57-5.48 (m, 2H, NH), 5.43-5.37 (m, 2H, NH), 5.17 (s, 2H, CH₂OCO), 5.10 (s, 2H, CH₂OCO), 4.97 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H, NH), 4.08-4.02 (m, 1H, CHN), 3.95-3.74 (m, 3H, CHN), 3.73-3.50 (m, 4H, CHN-CH₂N), 3.49-3.29 (m, 5H, CH₂N), 3.14-3.06 (m, 2H, CH₂N), 2.85-2.75 (m, 1H, CH₂N), 2.58-2.45 (m, 1H, CH₂N), 2.44-2.36 (m, 2H, CH₂COO), 2.37-2.28 (m, 2H, CH₂N), 1.93-1.53 (m, 8H, CH-CH₂), 1.45 (s, 9H, Boc), 1.43-1.10 (m, 10H, CH₂), 0.95-0.86 (m, 12H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 1084) *m/z* 1084.4 [M + H]⁺, 1106.5 [M + Na]⁺



Boc Leu^u-Glu(OBz)^u-Leu^u-Lys(2ClZ)^u-Pro^u-NHOSu (IV.26)

Compound **IV.25** (0.30 g, 0.260 mmol) was solubilized in dioxane/H₂O solvent mixture (80:20, 8 ml). PL-TPP resin (1.5 mmol/g) (0.200 g) was introduced and the reaction mixture was stirred under microwave irradiations (50W, 50°C) for 2h. After reaction completion, the resin was filtered off, washed with dioxane and H₂O. The filtrate was then completely evaporated under vacuum to give the amine which is used without further purification. Disuccinimidyl carbonate (0.080 g, 0.31 mmol) was suspended in dry CH₂Cl₂ (10 mL) and the amine was added portion wise. The reaction mixture was stirred at room temperature under N₂ atmosphere for 4h. After 4h stirring a white precipitate was formed (HOSu). CH₂Cl₂ was added and the precipitate was filtered off and washed with CH₂Cl₂. The organic layers were combined, washed with a 1M KHSO₄ aqueous solution and water, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. 1mL of CH₂Cl₂ was added to the residue and the product **IV.26** was precipitated as a white solid by adding Et₂O (0.340 g, quant.). ¹H NMR : (300MHz, CD₃CN) δ = 8.40 (s, 1H, NHOSu), 7.51-7.31 (m, 9H, CH_{Ar}), 6.09-5.89 (m, 2H, NH), 5.80 (m, 1H, NH), 5.57 (m, 1H, NH), 5.46 (m, 1H, NH), 5.37 (d, J = 10.2 Hz, 1H, NH) 5.16 (s, 2H, CH₂OCO), 5.11 (s, 2H, CH₂OCO), 4.93 (m, 1H, NH), 4.07-3.21 (m, 14H, CHN-CH₂N), 3.18-3.04 (m, 2H, CH₂N), 2.76 (s, 4H, CH₂), 2.55-2.27 (m, 6H, CH₂N), 1.95-1.50 (m, 8H, CH-CH₂), 1.46 (s, 9H, Boc), 1.42-1.11 (m, 10H, CH₂), 0.98-0.83 (m, 12H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 1199.83) *m/z* 1199.4 [M + H]⁺, 1221.6 [M + Na]⁺

Boc-Leu^u-Glu(OBz)^u-Leu^u-Lys(2ClZ)^u-Pro^u-Leu^u-Glu(OBz)^u-Leu^u-Lys(2ClZ)^u-Ala^u-NHMe (IV.27)

Boc-protected oligopeptide **IV.21** (0.130 g, 0.119 mmol) was dissolved in TFA (3 ml) and stirred for 45 min. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure and coevaporated 3 times with cyclohexane. The crude product was then dissolved in DMF (3 ml). DIPEA (0.06 ml, 0.36 mmol) and **IV.26** (0.143 g, 0.119 mmol) were added. The reaction mixture was then stirred under microwave irradiations (50°C, 25W) for 3h. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **IV.27** as a white product (0.140 g,

56 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃CN) δ = 7.50-7.31 (m, 18H, CH_{Ar}), 7.13 (m, 1H, NH), 6.90 (m, 1H, NH), 6.76 (m, 1H, NH), 6.62 (m, 1H, NH), 6.48-6.30 (m, 3H, NH), 6.10-5.84 (m, 8H, NH), 5.80-5.70 (m, 2H, NH), 5.68-5.58 (m, 2H, NH), 5.54-5.51 (m, 1H, NH), 5.37 (d, J = 10.0 Hz, 1H, NH), 5.16 (s, 2H, CH₂OCO), 5.14 (s, 2H, CH₂OCO), 5.10 (s, 2H, CH₂OCO), 5.9 (s, 2H, CH₂OCO), 4.93 (d, J = 10.3 Hz, 1H, NH), 4.33-4.24 (m, 1H, CHN), 4.09-3.40 (m, 19H, CHN-CH₂N), 3.30-3.19 (m, 2H, CH₂N), 3.13-2.92 (m, 4H, CH₂N), 2.84-2.71 (m, 1H, CH₂N), 2.67 (d, J = 4.6 Hz, 3H, CH₃N), 2.65-2.53 (m, 2H, CH₂N), 2.52-2.20 (m, 12H, CH₂N-CH₂COO), 1.95-1.50 (m, 16H, CH-CH₂), 1.48 (s, 9H, Boc), 1.43-1.05 (m, 16H, CH₂), 1.01 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CH₃), 0.95-0.82 (m, 24H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 2074.38) m/z 1060.4 [M + 2Na]²⁺

Isopropyl Leu^u-Glu(OBz)^u-Leu^u-Lys(2ClZ)^u-Pro^u-Leu^u-Glu(OBz)^u-Leu^u-Lys(2ClZ)^u-Ala^u-NHMe (IV.28),

Boc-protected oligopeptide **IV.27** (0.065 g, 0.031 mmol) was dissolved in TFA (3 ml) and stirred for 45 min. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure and coevaporated 3 times with cyclohexane. The crude product was then dissolved in CH₃CN/DMF solvent mixture (4:1, 2.5 ml). DIPEA (0.016 ml, 0.094 mmol) and isopropyl isocyanate (0.005 ml, 0.05 mmol) were added. The reaction mixture was then stirred under microwave irradiations (50°C, 25W) for 3h. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. The compound **IV.28** was not purified by flash column chromatography to save it. **ESI-MS** (M_w 2059.37) m/z 1049.4 [M + 2Na]²⁺

Isopropyl-Leu^u-Glu^u-Leu^u-Lys^u-Pro^u-Leu^u-Glu^u-Leu^u-Lys^u-Ala^u-NHMe (IV.D)

Compound **IV.28** (0.065 g, 0.031 mmol) was solubilized in EtOH/H₂O/Acetic acid (v/v; 5:2:1). Pd/C 10% (0.006 g) was introduced under Ar atmosphere. The reaction mixture was put under vacuum then flushed with H₂ (three times) and the mixture was finally stirred at room temperature under H₂ for 24h. Pd/C was then removed by microfiltration, washed with EtOH/H₂O/Acetic acid. EtOH was then completely evaporated under vacuum and the compound was lyophilized and purified by semi-preparative HPLC ((H₂O/CH₃CN (0.1 % TFA) from 25% to 70% of CH₃CN)). **IV.D** was then dissolved in HCl (0.1M) and lyophilized three times to exchange the trifluoroacetate ions. **ESI-MS** (M_w 1541.9) m/z 771.6 [M + 2H]²⁺, 1541.9 [M + H]⁺ **C₁₈-HPLC** t_R = 8.04 min (A: 0.1% TFA in H₂O; B: 0.1% TFA in CH₃CN, 0-100% B; 1 ml/min: 10 min)

Bromophenyl Leu^u-Glu(OBz)^u-Leu^u-Lys(2ClZ)^u-Pro^u-Leu^u-Glu(OBz)^u-Leu^u-Lys(2ClZ)^u-Ala^u-NHMe (IV.29)

Boc-protected oligourea **IV.27** (0.040 g, 0.019 mmol) was dissolved in TFA (3 ml) and stirred for 45 min. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure and coevaporated 3 times with cyclohexane. The crude product was then dissolved in CH₃CN/DMF solvent mixture (4:1, 2.5 ml). DIPEA (0.009 ml, 0.058 mmol) and bromophenyl isocyanate (0.006 ml, 0.029 mmol) were added. The reaction mixture was then stirred under microwave irradiations (50°C, 25W) for 3h. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. The compound **IV.29** was not purified by flash column chromatography to save it. **ESI-MS** (M_w 2172.28) m/z 1106.0 [M + 2Na]²⁺

Bromophenyl-Leu^u-Glu^u-Leu^u-Lys^u-Pro^u-Leu^u-Glu^u-Leu^u-Lys^u-Ala^u-NHMe (IV.E)

Compound **IV.29** (0.040 g, 0.019 mmol) was dissolved in EtOH/H₂O/Acetic acid solvent mixture (v/v/v; 5:2:1). Pd/C 10% (0.010 g) was introduced under Ar atmosphere. The reaction mixture was put under vacuum then flushed with H₂ (three times) and the mixture was finally stirred at room temperature under H₂ for 24h. Pd/C was then removed by microfiltration, washed with EtOH/H₂O/Acetic acid. EtOH was then completely evaporated under vacuum and the compound was lyophilized and purified by semi-preparative HPLC ((H₂O/CH₃CN (0.1 % TFA) from 25% to 70% of CH₃CN)). **IV.E** was then dissolved in HCl (0.1M) and lyophilized three times to exchange the trifluoroacetate ions. **ESI-MS** (M_w 1654.88; M_w -M(Br) = 1575) m/z 788.4 [M + 2Na]²⁺, 1576 [M + Na]⁺ **C₁₈-HPLC** t_R = 8.38 min (A: 0.1% TFA in H₂O; B: 0.1% TFA in CH₃CN, 0-100% B; 1 ml/min: 10 min)

4. X-Ray crystallography

Crystallisation

For crystallisation trials, a lyophilised sample of **IV.D** (as an HCl salt) was dissolved in ddH₂O to a final concentration of 20 mg/ml. Crystals were grown at 20°C in standard hanging drops composed of 0.5 µL of the oligourea plus an equal volume of a crystallisation reagent composed of 30% MPD (2-methyl-2,4-pentanediol), 200 mM sodium chloride and 100 mM sodium acetate (pH 4.6). Crystals appeared overnight and were left to grow for 2 weeks before data collection.

Data collection, structure solution and refinement.

Single crystals of **IV.D** were frozen in liquid nitrogen and diffraction data collected on beam line ID23-2 at the European Synchrotron Radiation Facility. Diffraction images were processed (indexed and integrated) using XDS^[211] and scaled in Scala^[212] (from the CCP4 suite^[213]). The crystals belong to space group *P* 6₁22 with cell dimensions: *a* = *b* = 38.14, *c* = 54.98.

The structure was solved by molecular replacement using Phaser^[214] (from CCP4), using a modified version of a previously published crystal structure of an aliphatic oligourea helix (**6P6**) as a search model (CCDC code = 836812^[174]). Iterative cycles of model building and maximum-likelihood restrained refinement were performed using Coot^[215] and Refmac5^[216]. Restraints for the oligourea were generated using the PRODRG server^[217]. The final structure was refined using data to 1.4 Å, with *R*_{work} and *R*_{free} values of 17.3 % and 20.8 %, respectively. Anisotropic thermal displacement parameters were not included in the refinement (B-factors were refined isotropically). The asymmetric unit contains two oligourea molecules, 19 water molecules and one MPD molecule.

Table 12 : Data collection and refinement statistics for IV.D

<i>Synch. ref.</i>	<i>489-p1</i>
<i>Beamline</i>	<i>ID23-2</i>
<i>Tray ref.</i>	<i>T133_C2_Dr.3</i>
Data Collection	
Space group	<i>P 6₁22</i>
a, b, c (Å)	38.14, 38.14, 54.98
α, β, γ (°)	90.0, 90.0, 120.0
Resolution (Å)	33.016 – 1.40 (1.48 – 1.40)
R_{int} (%) overall	6.2 (31.0)
I / σ	33.20 (11.04)
Completeness (%)	99.7 (99.0)
Reflections (total)	73,553
Reflections (unique)	5,050
Redundancy	14.6
Refinement	
Resolution (Å)	33.02 – 1.40
Reflections	4813
R_{work} / R_{free} (%)	17.3 / 20.8
No. of atoms	248
Ions	0
Waters	19
Overall B-factor (Å²)	14.12
RMS deviations	
Bond-lengths (Å)	0.035
Bond-angles (°)	3.880

V. Compounds described in chapter 5 (chimeric oligomers)

1. General procedure C for peptide coupling

The oligomer was dissolved in TFA at 0°C under N₂ atmosphere. After stirring for 1h, TFA was removed under vacuum and co-evaporated with cyclohexane. The amino acid (0.95eq.) was dissolved in a small quantity of DMF with BOP (0.95 eq.) and cooled down to 0°C under N₂, DIPEA (3.0 eq.) and the TFA salt were successively added and the reaction was allowed to stir over night. The reaction mixture was then diluted with NaHCO₃ and EtOAc. The organic layer was washed with NaHCO₃, KHSO₄ and brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The resulting solid was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 2%)

2. Chimeric oligomers in organic solvent

Boc-Leu-Val^u-Ala^u-Leu^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe (V.2)

V.2 was prepared from Boc-L-Leu-OH.H₂O (0.014 g, 0.076 mmol) and **6** (0.070 g, 0.080 mmol) as described in the general procedure C. After completion, the compound was precipitated upon addition of water, washed with saturated NaHCO₃ aqueous solution, and Et₂O. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **V.2** as a white product (0.073 g, 95 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃OH) δ = 7.60 (d, J = 9.6 Hz, 1H, NH), 7.12 (d, J = 6.4 Hz, 1H, NH), 6.56-6.35 (m, 5H, NH), 6.12-5.95 (m, 5H, NH), 5.81 (d, J = 9.6 Hz, 1H, NH), 5.71 (m, 1H, NH), 4.14-4.02 (m, 3H, CHN), 3.99-3.82 (m, 4H, CHN), 3.79-3.53 (m, 6H, CH₂N), 2.74 (d, J = 4.7 Hz, 3H, CH₃N), 2.64-2.51 (m, 2H, CH₂N), 2.50-2.31 (m, 4H, CH₂N), 1.83-1.67 (m, 4H, CH), 1.65-1.56 (m, 3H, CH-CH₂), 1.51 (s, 9H, Boc), 1.32-1.17 (m, 4H, CH₂), 1.10-0.85 (m, 36H, CH₃). ESI-MS (M_w 985.31): *m/z* 985.5 [M+H]⁺

Boc-Ala-Leu-Val^u-Ala^u-Leu^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe (V.3)

V.3 was prepared from Boc-L-Ala-OH (0.011 g, 0.057 mmol) and **V.2** (0.060 g, 0.060 mmol) as described in the general procedure C. After completion, the compound was precipitated upon addition of water, washed with saturated NaHCO₃ aqueous solution, and Et₂O to give **V.3** as a white product (0.063 g, 97 %). ¹H NMR : (400MHz, CD₃OH) δ = 8.30 (d, J = 5.7 Hz, 1H, NH), 7.19 (m, 2H, NH), 6.54 (d, J = 6.8 Hz, 1H, NH), 6.48-6.6 (m, 4H, NH), 6.24 (m, 1H, NH), 6.13-6.05 (m, 2H, NH), 6.04-5.96 (m, 2H, NH), 5.81 (d, J = 10.1 Hz, 1H, NH), 5.651 (m, 1H, NH), 4.28-4.18 (m, 1H, CHN), 4.14-4.01 (m, 2H, CHN), 3.99-3.82 (m, 4H, CHN), 3.78-3.53 (m, 7H, CHN-CH₂N), 2.74 (d, J = 4.6 Hz, 3H, CH₃N), 2.72-2.62 (m, 2H, CH₂N), 2.54-2.32 (m, 4H, CH₂N), 1.85-1.56 (m, 7H, CH-CH₂), 1.51 (s, 9H,

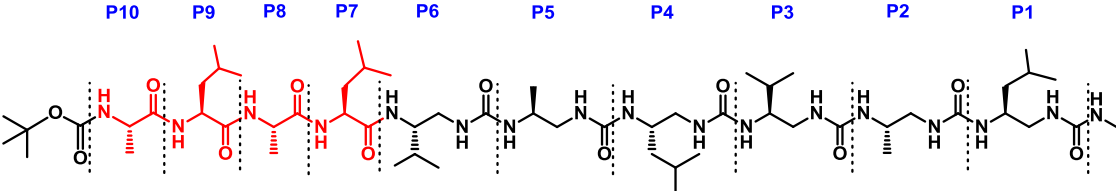
Boc), 1.38 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH₃), 1.30-1.19 (m, 4H, CH₂), 1.08-0.87 (m, 36H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 1056.39): m/z 1056.4 [M+H]⁺, 1078.5 [M + Na]⁺

Boc-Leu-Ala-Leu-Val^u-Ala^u-Leu^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe (V.4)

V.4 was prepared from Boc-L-Leu-OH.H₂O (0.013 g, 0.054 mmol) and **V.3** (0.060 g, 0.056 mmol) as described in the general procedure C. After completion, the compound was precipitated upon addition of water, washed with saturated NaHCO₃ aqueous solution, and Et₂O to give **V.4** as a white product (0.055 g, 83 %). **¹H NMR** : (400MHz, CD₃OH) $\delta = 8.55$ (s, 1H, NH), 7.78 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NH), 7.12 (s, 1H, NH), 7.03 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, NH), 6.53 (m, 1H, NH), 6.50-6.37 (m, 4H, NH), 6.24 (m, 1H, NH), 6.13-5.98 (m, 4H, NH), 5.87-5.74 (m, 2H, NH), 4.39-4.28 (m, 1H, CHN), 4.28-4.16 (m, 1H, CHN), 4.14-4.02 (m, 1H, CHN), 4.03-3.81 (m, 6H, CHN), 3.77-3.51 (m, 6H, CH₂N), 2.88-2.76 (m, 1H, CH₂N), 2.71-2.60 (m, 1H, CH₂N), 2.53-2.32 (m, 4H, CH₂N), 1.85-1.67 (m, 10H, CH), 1.54 (s, 9H, Boc), 1.49-1.41 (m, 3H, CH₃), 1.36-1.20 (m, 4H, CH₂), 1.11-0.85 (m, 42H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 1169.5): m/z 1169.6 [M+H]⁺

Boc-Ala-Leu-Ala-Leu-Val^u-Ala^u-Leu^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe (V.A)

V.A was prepared from Boc-L-Ala-OH (0.006 g, 0.032 mmol) and **V.4** (0.040 g, 0.034 mmol) as described in the general procedure C. After completion, the compound was precipitated upon addition of water, washed with saturated NaHCO₃ aqueous solution, and Et₂O. Flash column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **V.A** as a white product (0.031 g, 73 %). **¹H NMR** : (400MHz, CD₃OH) $\delta = 8.50$ (m, 1H, NH), 7.90 (m, 1H, NH), 7.52 (m, 1H, NH), 7.40 (m, 1H, NH), 7.28 (m, 1H, NH), 6.62-6.36 (m, 5H, NH), 6.26 (m, 1H, NH), 6.19-5.97 (m, 4H, NH), 5.81 (m, 1H, NH), 5.67 (m, 1H, NH), 4.37-4.27 (m, 1H, CHN), 4.26-4.17 (m, 1H, CHN), 4.15-4.03 (m, 2H, CHN), 4.02-3.83 (m, 5H, CHN-CH₂N), 3.75-3.51 (m, 7H, CH₂N), 2.89-2.76 (m, 1H, CH₂N), 2.74 (d, $J = 4.6$ Hz, 3H, CH₃N), 2.73-2.63 (m, 1H, CH₂N), 2.62-2.34 (m, 4H, CH₂N), 1.90-1.58 (m, 10H, CH-CH₂), 1.53 (s, 9H, Boc), 1.52 (d, 3H, CH₃), 1.40 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH₃), 1.33-1.17 (m, 4H, CH₂), 1.13-0.85 (m, 42H, CH₃). **¹³C NMR** (101 MHz, CD₃OH) δ 175.78, 175.46, 175.12, 161.32, 161.27, 161.23, 161.10, 160.96, 160.62, 160.49, 159.67, 125.46, 80.57, 55.35, 55.27, 55.01, 54.36, 53.24, 51.72, 51.62, 45.98, 45.89, 45.41, 45.20, 44.92, 43.70, 42.92, 42.88, 41.89, 40.76, 40.71, 40.25, 39.64, 31.04, 31.03, 27.75, 25.95, 25.26, 25.02, 24.92, 22.68, 22.66, 22.31, 21.89, 21.87, 21.52, 21.23, 20.61, 19.15, 19.08, 17.86, 17.79, 17.65, 17.47, 16.55, 16.38. **ESI-MS** (M_w 1240.62): m/z 1240.6 [M+H]⁺.

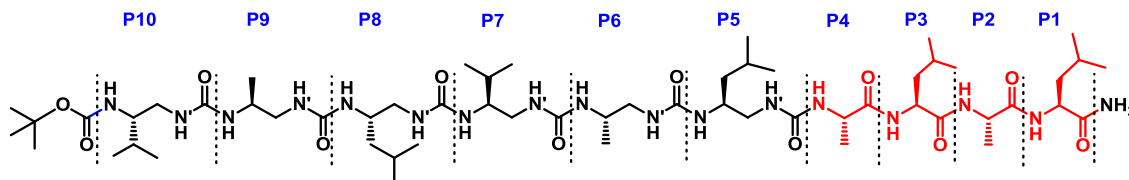
Table 13 : ^1H NMR chemical shifts (in ppm) of **V.A** in CD_3OH (400 MHz)


Residue	N'H	NH	αCH^1	αCH^2	βCH	γCH	δCH	ϵCH	Term CH
NHMe		6,23							
Leu ^u P1	6,08	6,43	3,60	2,67	3,91	1,25	1,72	0,94	
Ala ^u P2	6,45	6,02	3,57	2,38	4,07	1,05			
Val ^u P3	6,55	6,40	3,59	2,44	3,65	1,60	0,90		
Leu ^u P4	6,46	5,98	3,64	2,52	3,94	1,24	1,76	0,93	
Ala ^u P5	6,06	5,64	3,59	2,51	3,89	1,06			
Val ^u P6	5,77	7,26	3,62	2,81	3,99	1,74	0,94		
Leu ^u P7		7,50			4,20	1,67	1,80	0,99-0,93	
Ala ^u P8		7,87			4,31	1,50			
Leu ^u P9		8,50			4,09	1,62	1,74	1,01-0,95	
Ala ^u P10		7,35			3,93	1,38			
Boc									1,52

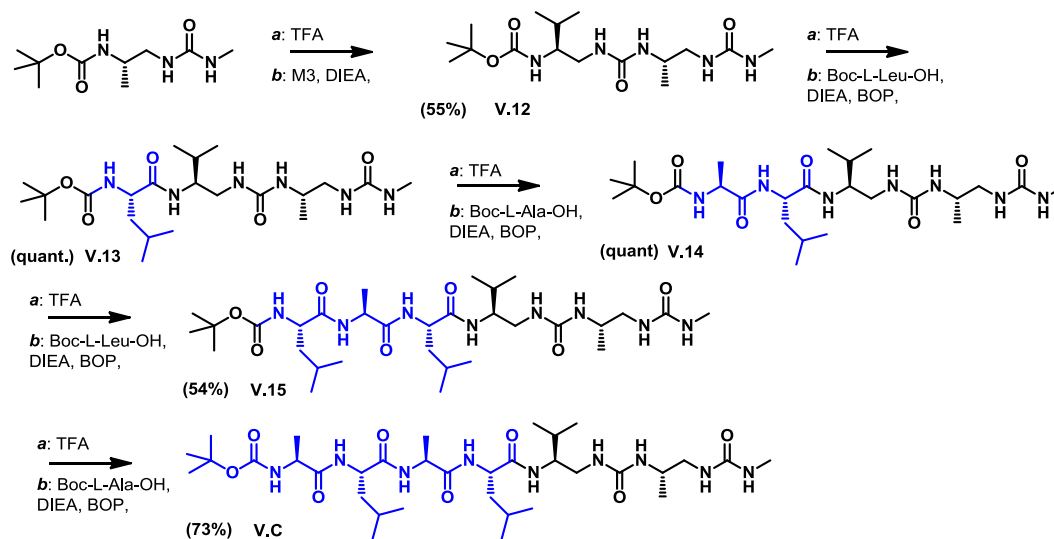
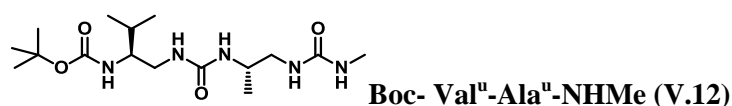
Boc-Val^u-Ala^u-Leu^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-Ala-Leu-Ala-Leu NH₂ (V.B)

V.B was synthesized by Karolina Pulka by solid phase strategy using a sieber resin (loading $0.67 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$)

^1H NMR : (400MHz, CD_3OH) δ = 9.05 (d, J = 6.9 Hz, 1H, NH), 8.54 (d, J = 6.5 Hz, 1H, NH), 7.58 (d, J = 7.6 Hz, 1H, NH), 7.33 (s, 1H, NH), 7.12 (s, 2H, NH), 6.71-6.58 (m, 4H, NH), 6.48 (m, 1H, NH), 6.25 (d, J = 10.9 Hz, 1H, NH), 6.07-6.02 (m, 2H, NH), 5.98 (d, J = 10.5 Hz, 1H, NH), 5.96-5.90 (m, 2H, NH), 5.86 (m, 1H, NH), 4.33-4.23 (m, 3H, CHN), 4.15 (m, 1H, CHN), 4.05-3.86 (m, 4H, CHN), 3.86-3.48 (m, 8H, CHN- CH_2N), 2.63-2.53 (m, 1H, CH_2N), 2.46-2.27 (m, 5H, CH_2N), 2.13-2.00 (m, 1H, CH), 1.94-1.57 (m, 9H, CH- CH_2), 1.51 (d, 3H, CH_3), 1.50 (s, 9H, Boc), 1.39 (d, J = 7.3 Hz, 3H, CH_3), 1.37-1.16 (m, 4H, CH_2), 1.10-1.02 (m, 6H, CH_3), 1.00-0.85 (m, 36H, CH_3). ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OH) δ 178.22, 177.07, 176.02, 174.66, 161.20, 161.18, 161.06, 160.63, 159.89, 159.76, 158.73, 79.41, 56.81, 55.76, 54.08, 52.49, 52.44, 50.73, 48.54, 48.48, 48.33, 48.26, 47.02, 46.27, 45.79, 45.70, 43.46, 43.01, 41.82, 41.20, 40.28, 38.48, 31.15, 31.07, 27.87, 25.34, 25.26, 25.05, 24.85, 22.94, 22.76, 22.68, 22.59, 21.70, 21.10, 20.19, 19.75, 19.18, 19.15, 18.13, 17.68, 17.58, 17.22, 16.90, 16.50. **ESI-MS** (M_w 1226.60): m/z 1226.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1248.7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

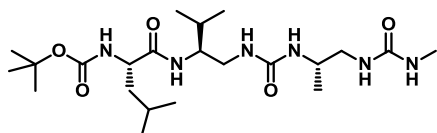
Table 14 : ^1H NMR chemical shifts (in ppm) of **V.B** in CD_3OH (400 MHz)


Residue	N'H	NH	αCH^1	αCH^2	βCH	γCH	δCH	ϵCH	Term CH
	NH ₂		7,12						
Leu	P1		7,58		4,30	1,68	1,80	0,93	
Ala	P2		8,54		4,28	1,51			
Leu	P3		9,05		4,26	1,89-1,57	2,06	0,96	
Ala	P4		7,33		3,93	1,39			
Leu ^u	P5	6,65	5,92	3,58	2,31	4,00	1,23	1,77	0,86
Ala ^u	P6	6,48	6,03	3,59	2,34	4,15	1,04		
Val ^u	P7	6,62	6,25	3,55	2,41	3,79	1,64	0,93	
Leu ^u	P8	6,60	5,98	3,71	2,35	3,96	1,22	1,74	0,94
Ala ^u	P9	5,86	5,91	3,64	2,35	3,90	1,07		
Val ^u	P10	6,04	6,67	3,51	2,58	3,63	1,66	0,95	
Boc									1,50

Figure Exp 6 : Synthesis of **V.C**

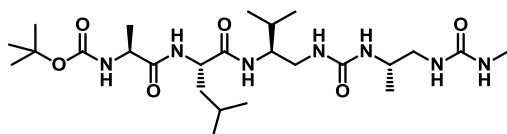
V.12 was prepared from **M3** (0.155 g, 0.454 mmol) and **IV.9** (0.85 g, 0.90 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO_3 aqueous solution, 1M KHSO_4 aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na_2SO_4 and evaporated. Flash column chromatography

(CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **V.12** as a white product (0.085 g, 55 %). ¹H NMR : (300MHz, CD₃CN) δ= 5.50 (m, 1H, NH), 5.32 (m, 1H, NH), 5.19 (m, 1H, NH), 5.20-5.13 (m, 2H, NH), 3.75-3.63 (m, 1H, CHN), 3.48-3.34 (m, 1H, CHN), 3.31-3.11 (m, 2H, CH₂N), 3.09-2.88 (m, 2H, CH₂N), 2.67 (d, J = 4.8 Hz, 3H, CH₃), 1.81-1.64 (m, 1H, CH), 1.44 (s, 9H, Boc), 1.07 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CH₃), 0.96-0.87 (m, 6H, CH₃).



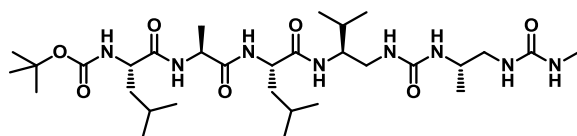
Boc-Leu-Val^u-Ala^u-NHMe (V.13)

V.13 was prepared from Boc-L-Leu-OH.H₂O (0.051 g, 0.204 mmol) and **V.12** (0.070 g, 0.194 mmol) as described in the general procedure C. After completion, the compound was precipitated upon addition of water, washed with saturated NaHCO₃ aqueous solution, and Et₂O to give **V.13** as a white product (0.097 g, quant.). ¹H NMR : (300MHz, CD₃CN) δ= 6.74 (m, 1H, NH), 5.75 (m, 1H, NH), 5.12 (m, 1H, NH), 4.06-3.95 (m, 1H, CHN), 3.83-3.65 (m, 2H, CHN), 3.53-3.13 (m, 2H, CH₂N), 2.92-2.75 (m, 2H, CH₂N), 2.67 (s, 3H, CH₃N), 1.81-1.63 (m, 2H, CH), 1.59-1.49 (m, 2H, CH₂), 1.46 (s, 9H, Boc), 1.07 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CH₃), 0.98-0.88 (m, 12H, CH₃).



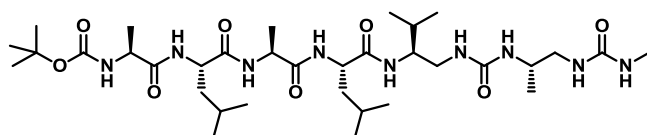
Boc-Ala-Leu-Val^u-Ala^u-NHMe (V.14)

V.14 was prepared from Boc-L-Ala-OH (0.040 g, 0.211 mmol) and **V.13** (0.095 g, 0.201 mmol) as described in the general procedure C. After completion, the compound was precipitated upon addition of water, washed with saturated NaHCO₃ aqueous solution, and Et₂O to give **V.14** as a white product (0.110 g, quant.). ¹H NMR : (300MHz, CD₃OH) δ= 8.08 (m, 1H, NH), 7.48 (m, 1H, NH), 6.99 (m, 1H, NH), 6.10-6.01 (m, 2H, NH), 5.88 (d, J = 8.1 Hz, 1H, NH), 5.70 (m, 1H, NH), 4.37-4.28 (m, 1H, CHN), 4.11-4.01 (m, 1H, CHN), 3.85-3.72 (m, 2H, CHN), 3.54-3.42 (m, 1H, CH₂N), 3.36-3.21 (m, 1H, CH₂N), 3.06-2.92 (m, 2H, CH₂N), 2.73 (d, J = 4.7 Hz, 3H, CH₃N), 1.80-1.60 (m, 4H, CH-CH₂), 1.48 (s, 9H, Boc), 1.34 (d, J = 7.2 Hz, 3H, CH₃), 1.11 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CH₃), 1.00-0.88 (m, 12H, CH₃).



Boc-Leu-Ala-Leu-Val^u-Ala^u-NHMe (V.15)

V.15 was prepared from Boc-L-Leu-OH.H₂O (0.048 g, 0.184 mmol) and **V.14** (0.100 g, 0.218 mmol) as described in the general procedure C. After completion, the compound was precipitated upon addition of water, washed with saturated NaHCO₃ aqueous solution, and Et₂O to give **V.15** as a white product (0.065 g, 54 %). **¹H NMR** : (300MHz, CD₃OH) δ = 8.44 (m, 1H, NH), 7.86 (d, J = 7.9 Hz, 1H, NH), 7.25 (d, J = 9.5 Hz, 1H, NH), 7.05 (m, H, NH), NH missing, 4.44-4.37 (m, 1H, CHN), 4.29-4.20 (m, 1H, CHN), 4.03-3.78 (m, 3H, CHN), 3.61-3.51 (m, 1H, CH₂N), 3.05-2.92 (m, 3H, CH₂N), 2.76 (s, 3H, CH₃N), 1.87-1.69 (m, 5H, CH-CH₂), 1.63-1.56 (m, 2H, CH₂), 1.54 (s, 9H, Boc), 1.45 (d, J = 7.4 Hz, 3H, CH₃), 1.14 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CH₃), 1.04-0.94 (m, 18H, CH₃).



Boc-Ala-Leu-Ala-Leu-Val^u-Ala^u-NHMe (V.C)

V.C was prepared from Boc-L-Ala-OH (0.019 g, 0.099 mmol) and **V.14** (0.065 g, 0.099 mmol) as described in the general procedure C. After completion, the compound was precipitated upon addition of water, washed with saturated NaHCO₃ aqueous solution, and Et₂O to give **V.C** as a white product (0.053 g, 73%) **¹H NMR** : (300MHz, CD₃OH) δ = 8.36 (m, 1H, NH), 8.01 (m, 1H, NH), 7.62 (m, 1H, NH), 7.18 (m, 2H, NH), 5.79 (m, 1H, NH), 5.61 (m, 1H, NH), NH missing, 4.31-4.21 (m, 2H, CHN), 4.19-4.11 (m, 1H, CHN), 4.03-3.78 (m, 3H, CHN), 3.58-3.49 (m, 1H, CH₂N), 3.42-3.36 (m, 1H, CH₂N), 3.03-2.83 (m, 2H, CH₂N), 2.73 (d, J = 4.7 Hz, 3H, CH₃N), 1.89-1.57 (m, 6H, CH-CH₂), 1.51 (s, 9H, Boc), 1.48 (d, 3H, CH₃), 1.38 (d, J = 7.2 Hz, 1H, CH₃), 1.11 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CH₃), 1.04-0.88 (m, 18H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 727.94): m/z 728.2 [M + H]⁺, 750.3[M + Na]⁺, 1476.8 [2M + Na]⁺

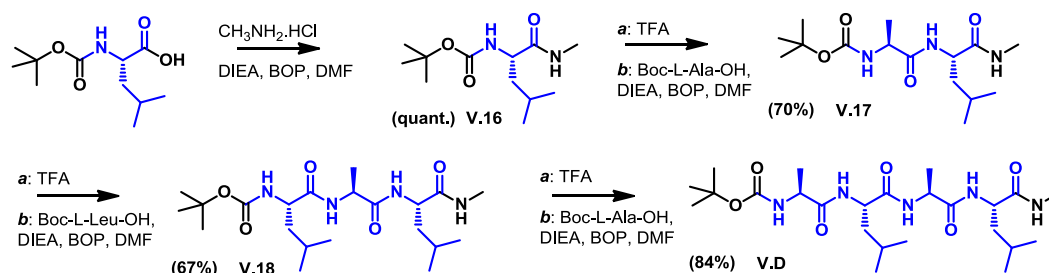
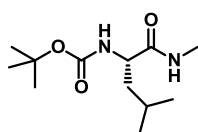
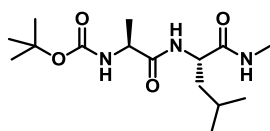


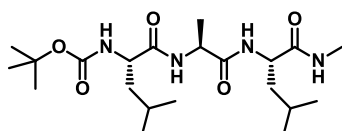
Figure Exp 7 : Synthesis of V.D

**Boc-Leu-NHMe (V.16)**

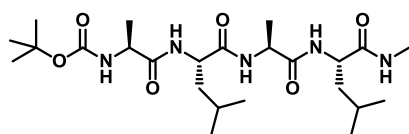
V.16 was prepared from Boc-L-Leu-OH.H₂O (0.184 g, 0.740 mmol) and methylamine hydrochloride (0.050 g, 0.082 mmol) as described in the general procedure C. After completion, the compound was precipitated upon addition of water, washed with saturated NaHCO₃ aqueous solution, and Et₂O to give **V.16** as a white product (0.183 g, quant.). ¹H NMR : (300MHz, CD₃CN) δ = 6.59 (s, 1H, NH), 5.46 (s, 1H, NH), 3.99 (m, 1H, CHN), 2.69 (d, J = 4.8 Hz, 3H, CH₃N), 1.72-1.60 (m, 1H, CH), 1.55-1.48 (m, 2H, CH₂), 1.47 (s, 9H, Boc), 0.99-0.89 (m, 6H, CH₃)

**Boc-Ala-Leu-NHMe (V.17)**

V.17 was prepared from Boc-L-Ala-OH (0.142 g, 0.750 mmol) and **V.16** (0.180 g, 0.75 mmol) as described in the general procedure C. After completion, the compound was precipitated upon addition of water, washed with saturated NaHCO₃ aqueous solution, and Et₂O to give **V.17** as a white product (0.164 g, 70%). ¹H NMR : (300MHz, CD₃CN) δ = 6.89-6.67 (m, 2H, NH), 5.70 (s, 1H, NH), 4.32-4.23 (m, 1H, CHN), 4.05-3.94 (m, 1H, CHN), 2.68 (d, J = 4.7 Hz, 3H, CH₃N), 1.72-1.50 (m, 3H, CH-CH₂), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.30 (d, J = 7.2 Hz, 3H, CH₃), 0.96-0.88 (m, 6H, CH₃)

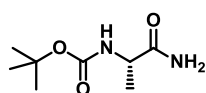
**Boc-Leu-Ala-Leu-NHMe (V.18)**

V.18 was prepared from Boc-L-Leu-OH.H₂O (0.129 g, 0.520 mmol) and **V.17** (0.164 g, 0.520 mmol) as described in the general procedure C. After completion, the compound was precipitated upon addition of water, washed with saturated NaHCO₃ aqueous solution, and Et₂O to give **V.18** as a white product (0.150 g, 67%). ¹H NMR : (300MHz, CD₃CN) δ = 7.16 (s, 1H, NH), 6.97 (s, 1H, NH), 6.83 (s, 1H, NH), 5.72 (s, 1H, NH), 4.31-4.21 (m, 1H, CHN), 4.20-4.11 (m, 1H, CHN), 3.96 (dd, J = 13.7, 7.3 Hz, 1H, CHN), 2.68 (d, J = 4.7 Hz, 3H, CH₃N), 1.80-1.60 (m, 3H, CH-CH₂), 1.60-1.50 (m, 3H, CH-CH₂), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.35 (d, J = 7.2 Hz, 3H, CH₃), 1.02-0.87 (m, 12H, CH₃)

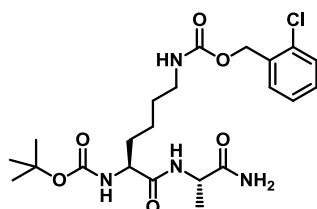
**Boc-Ala-Leu-Ala-Leu-NHMe (V.D)**

V.D was prepared from Boc-L-Ala-OH (0.065 g, 0.343 mmol) and **V.18** (0.147 g, 0.343 mmol) as described in the general procedure C. After completion, the compound was precipitated upon addition of water, washed with saturated NaHCO₃ aqueous solution, and Et₂O to give **V.D** as a white product (0.145 g, 84%). ¹H NMR : (300MHz, CD₃OH) δ = 8.11 (m, 1H, NH), 7.75 (m, 1H, NH), 7.67 (m, 2H, NH), 7.01 (s, 1H, NH), 4.38-4.25 (m, 3H, CHN), 4.08-3.96 (m, 1H, CHN), 2.76 (d, J = 4.7 Hz, 3H, CH₃N), 1.82-1.55 (m, 6H, CH-CH₂), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.41 (d, J = 7.2 Hz, 3H, CH₃), 1.34 (d, J = 7.2 Hz, 3H, CH₃), 1.01-0.90 (m, 12H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 499.64): *m/z* 522.2 [M + Na]⁺, 1021.0 [2M + Na]⁺

3. Chimeric oligomer equipped with water-solubilizing side chains

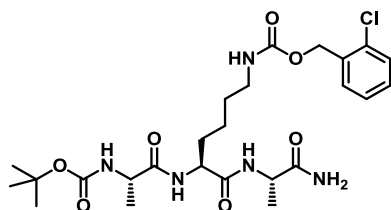
**Boc-Ala-NH₂ (V.5)**

Boc-L-Ala-OH (2.0 g, 10.57 mmol) was dissolved in anhydrous THF under N₂ and cooled down to -10 °C. After addition of NMM (1.39 ml, 12.68 mmol) and IBCF (1.66 ml, 12.68 mmol), the reaction mixture was stirred at -10°C for 45 min. In a second flask, a solution of ammonia in CH₃OH (7M) was heated to 40°C and the vapour was sent in the previous solution for 5h. After reaction completion, the THF was removed under vacuum and the residue was quenched with an aqueous solution of KHSO₄ 1M and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure to give **V.5** (1.7 g, 86%). ¹H NMR : (300MHz, CDCl₃) δ = 6.15 (s, 1H, NH), 5.52 (s, 1H, NH), 4.99 (s, 1H, NH), 4.20 (m, 1H, CHN), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.40 (d, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 188.22): *m/z* 210.9 [M+Na]⁺

**Boc-Lys(2ClZ)-Ala-NH₂ (V.6)**

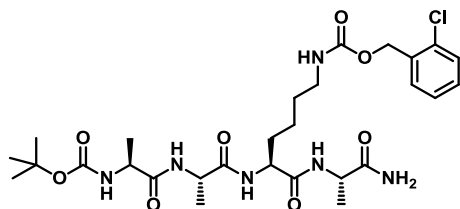
V.6 was prepared from Boc-L-Lys(2ClZ)-OH (2.09 g, 5.05 mmol) and **V.5** (1.00 g, 5.31 mmol) as described in the general procedure C. After completion, the compound was precipitated upon addition of water, washed with saturated NaHCO₃ aqueous solution, and Et₂O to give **V.6** as a white product (1.8 g, 70%). ¹H NMR : (300MHz, CD₃CN) δ = 7.74-7.61 (m, 4H, CH_{Ar}), 6.92 (m, 1H, NH),

6.70 (m, 1H, NH), 5.56 (s, 2H, NH₂), 5.28 (m, 1H, NH), 5.22 (s, 2H, CH₂Ar), 4.54-4.38 (m, 1H, CHN), 4.05 (m, 1H, CHN), 3.26-3.15 (m, 2H, CH₂N), 2.14-1.49 (m, 6H, CH₂), 1.45 (s, 9H, Boc), 1.38 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CH₃)



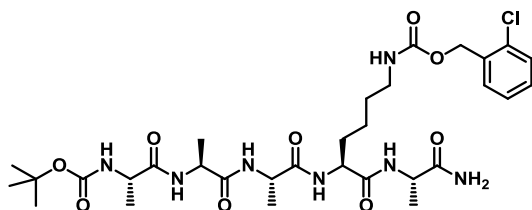
Boc-Ala-Lys(2ClZ)-Ala-NH₂ (V.7)

V.7 was prepared from Boc-L-Ala-OH (0.667 g, 3.52 mmol) and **V.6** (1.80 g, 3.71 mmol) as described in the general procedure C. After completion, the compound was precipitated upon addition of water, washed with saturated NaHCO₃ aqueous solution, and Et₂O to give **V.7** as a white product (1.5 g, 73%). ¹H NMR : (300MHz, CDCl₃) δ = 7.46-7.61 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.02 (m, 1H, NH), 6.79 (m, 1H, NH), 5.31 (s, 2H, NH₂), 5.24 (s, 2H, CH₂Ar), 5.09 (m, 1H, NH), 5.03 (m, 1H, NH), 4.57-4.42 (m, 1H, CHN), 4.27-4.17 (m, 1H, CHN), 4.07-3.99 (m, 1H, CHN), 3.40-3.12 (m, 2H, CH₂N), 2.05-1.54 (m, 6H, CH₂), 1.45 (s, 9H, Boc), 1.42 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CH₃), 1.33 (d, J = 7.2 Hz, 3H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 556.05): *m/z* 578.2 [M+Na]⁺



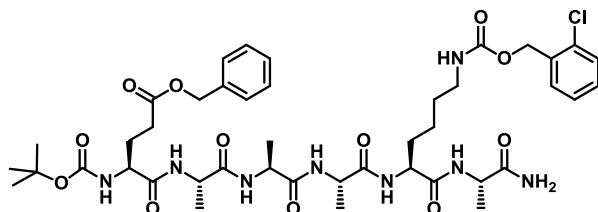
Boc-Ala-Ala-Lys(2ClZ)-Ala-NH₂ (V.8)

V.8 was prepared from Boc-L-Ala-OH (0.43 g, 2.25 mmol) and **V.7** (1.32 g, 2.37 mmol) as described in the general procedure C. After completion, the compound was precipitated upon addition of water, washed with saturated NaHCO₃ aqueous solution, and Et₂O to give **V.8** as a white product (1.68 g, quant.). ¹H NMR : (300MHz, DMSO d₆) δ = 7.98-7.85 (m, 2H, NH), 7.80 (d, J = 6.5 Hz, 1H, NH), 7.50-7.31 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.23 (m, 1H, NH), 6.99 (m, 2H, NH₂), 5.09 (s, 2H, CH₂Ar), 4.29-4.12 (m, 4H, CHN), 4.00-3.88 (m, 1H, NH), 3.02-2.91 (m, 2H, CH₂N), 1.72-1.41 (m, 4H, CH₂), 1.38 (s, 9H, Boc), 1.30-1.23 (m, 2H, CH₂), 1.23-1.12 (m, 9H, CH₃).



Boc-Ala-Ala-Ala-Lys(2ClZ)-Ala-NH₂ (V.9)

V.9 was prepared from Boc-L-Ala-OH (0.43 g, 2.25 mmol) and **V.8** (1.49 g, 2.37 mmol) as described in the general procedure C. After completion, the compound was precipitated upon addition of water, washed with saturated NaHCO₃ aqueous solution, and Et₂O to give **V.9** as a white product (1.2 g, 72%). ¹H NMR : (300MHz, DMSO d₆) δ = 8.01 (d, J = 7.0 Hz, 1H, NH), 7.91 (d, J = 7.1 Hz, 1H, NH), 7.85 (d, J = 7.4 Hz, 1H, NH), 7.79 (d, J = 7.2 Hz, 1H, NH), 7.50-7.31 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.23 (m, 1H, NH), 7.01-6.95 (m, 2H, NH₂), 5.08 (s, 2H, CH₂Ar), 4.30-4.11 (m, 5H, CHN), 3.97-3.90 (m, 1H, NH), 3.02-2.91 (m, 2H, CH₂N), 1.72-1.41 (m, 4H, CH₂), 1.37 (s, 9H, Boc), 1.31-1.26 (m, 2H, CH₂), 1.23-1.14 (m, 12H, CH₃).



Boc-Glu(Obz)-Ala-Ala-Ala-Lys(2ClZ)-Ala-NH₂ (V.10)

V.10 was prepared from Boc-L-Glu(Obz)-OH (0.55 g, 1.63 mmol) and **V.9** (1.20 g, 1.72 mmol) as described in the general procedure C. After completion, the compound was precipitated upon addition of water, washed with saturated NaHCO₃ aqueous solution, and Et₂O to give **V.10** as a white product (1.16 g, 73%). ¹H NMR : (300MHz, DMSO d₆) δ = 8.08 (d, J = 7.3 Hz, 1H, NH), 7.97-7.89 (m, 2H, NH), 7.84 (d, J = 7.7 Hz, 1H, NH), 7.79 (d, J = 7.4 Hz, 1H, NH), 7.50-7.31 (m, 9H, CH_{Ar}), 7.23 (m, 1H, NH), 7.00 (m, 2H, NH₂), 5.08 (s, 4H, CH₂Ar), 4.30-4.09 (m, 6H, CHN), 4.01-3.90 (m, 1H, NH), 3.01-2.92 (m, 2H, CH₂N), 2.45-2.36 (m, 2H, CH₂COO), 1.97-1.41 (m, 6H, CH₂), 1.41 (s, 9H, Boc), 1.30-1.24 (m, 2H, CH₂), 1.23-1.15 (m, 12H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 917.44): *m/z* 939.4 [M+Na]⁺

Boc-Leu^u-Glu(Obz)^u-Lys(2ClZ)^u-Leu^u-Pro^u-Glu(Obz)-Ala-Ala-Ala-Lys(2ClZ)-Ala-NH₂ (V.11)

V.11 was prepared from **IV.3** (0.098 g, 0.081 mmol) and **V.10** (0.075 g, 0.081 mmol) as described in the general procedure B. After completion, the reaction mixture was evaporated, dissolved in EtOAc and treated with saturated NaHCO₃ aqueous solution, 1M KHSO₄ aqueous solution and brine. The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Flash column

chromatography (CH₂Cl₂-MeOH (v/v), 90:10) over silica gel gave **V.11** as a white product (0.089 g, 57 %). ¹H NMR (300MHz, CD₃CN) δ = 9.12 (d, J = 7.2 Hz, 1H, NH), 7.91 (d, J = 6.3 Hz, 1H, NH), 7.69 (m, 1H, NH), 7.53-7.32 (m, 18H, CH_{Ar}), 7.28 (m, 1H, NH), 7.22 (m, 1H, NH), 6.83-6.70 (m, 2H, NH), 6.44 (m, 2H, NH), 6.12 (m, 1H, NH), 5.94-5.31 (m, 8H, NH), 5.23-5.05 (m, 8H, CH₂Ar), 4.90 (m, 1H, NH), 4.46-3.00 (m, 21H, CHN-CH₂N), 2.55-2.29 (m, 6H, CH₂N), 1.91-1.57 (m, 16H, CH-CH₂), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.44-1.03 (m, 26H, CH₂-CH₃), 0.96-0.77 (m, 12H, CH₃). **ESI-MS** (M_w 1902.07): *m/z* 1902.9 [M+H]⁺, 1924.9 [M+Na]⁺

Boc-Leu^u-Glu^u-Lys^u-Leu^u-Pro^u-Glu-Ala-Ala-Ala-Lys-Ala-NH₂ (V.E)

Compound **V.11** (0.080 g, 0.042 mmol) was dissolved in a EtOH/H₂O/Acetic acid solvent mixture (v/v/v; 5:2:1). Pd/C 10% (0.010 g) was introduced under Argon. The reaction mixture was put under vacuum then flushed with H₂ (three times) and the mixture was finally stirred at room temperature under H₂ for 24h. Pd/C was then removed by microfiltration, washed with EtOH/H₂O/Acetic acid solvent mixture. EtOH was then completely evaporated under vacuum. The compound was lyophilized and then purified by semi-preparative HPLC ((H₂O/CH₃CN (0.1 % TFA) from 25% to 70% of CH₃CN)). **IV.E** was then dissolved in HCl (0.1M) and lyophilized three times to exchange the trifluoroacetate ions. **ESI-MS** (M_w 1384.67): *m/z* 692.9 [M+2H]²⁺, 1384.7 [M+H]⁺. **C₁₈-HPLC** t_R = 7.09 min (A: 0.1% TFA in H₂O; B: 0.1% TFA in CH₃CN, 0-80% B; 1 ml/min: 10 min)

4. X Ray crystallography

Compound	V.A
Formula	C74 H113 N17 O12.50
M	1440.81
Crystal system	monoclinic
Space group	P2(1)
<i>a</i>/Å	19.3249(9)
<i>b</i>/Å	22.3751(11)
<i>c</i>/Å	20.9737(15)
α/o	90
β/o	99.620(7)
γ/o	90
<i>V</i>/Å³	8941.49)
T /K	566(2)
Z	4
ρ/g cm⁻¹	1.070
size (mm)	0.200x 0.200x 0.200
λ/ Å	1.54178
μ/mm⁻¹	0.602
Independent reflections	24491
measured reflections	39652
parameters/restraints	1865/1
R1, wR2	0.1048/ 0.2653
goodness of fit	0.960

REFERENCES

Références

- [1] Cooper, S.; Khatib, F.; Treuille, A.; Barbero, J.; Lee, J.; Beenen, M.; Leaver-Fay, A.; Baker, D.; Popovic, Z.; players, F., *Nature*, (2010) **466**, 756.
- [2] King, N. P.; Sheffler, W.; Sawaya, M. R.; Vollmar, B. S.; Sumida, J. P.; André, I.; Gonen, T.; Yeates, T. O.; Baker, D., *Science*, (2012) **336**, 1171.
- [3] Koga, N.; Tatsumi-Koga, R.; Liu, G.; Xiao, R.; Acton, T. B.; Montelione, G. T.; Baker, D., *Nature*, (2012) **491**, 222.
- [4] Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D. R.; Gellman, S. H., *Journal of the American Chemical Society*, (1996) **118**, 13071.
- [5] Gellman, S. H., *Accounts of Chemical Research*, (1998) **31**, 173.
- [6] Hill, D. J.; Mio, M. J.; Prince, R. B.; Hughes, T. S.; Moore, J. S., *Chemical Reviews*, (2001) **101**, 3893.
- [7] Bautista, A. D.; Craig, C. J.; Harker, E. A.; Schepartz, A., *Current Opinion in Chemical Biology*, (2007) **11**, 685.
- [8] Martinek, T. A.; Fulop, F., *Chemical Society Reviews*, (2012) **41**, 687.
- [9] Cheng, R. P.; Gellman, S. H.; DeGrado, W. F., *Chemical Reviews*, (2001) **101**, 3219.
- [10] Hanessian, S.; Luo, X.; Schaum, R.; Michnick, S., *Journal of the American Chemical Society*, (1998) **120**, 8569.
- [11] Hintermann, T.; Gademann, K.; Jaun, B.; Seebach, D., *Helvetica Chimica Acta*, (1998) **81**, 983.
- [12] Bouillère, F.; Thétiot-Laurent, S.; Kouklovsky, C.; Alezra, V., *Amino Acids*, (2011) **41**, 687.
- [13] Jiang, H.; Léger, J.-M.; Dolain, C.; Guionneau, P.; Huc, I., *Tetrahedron*, (2003) **59**, 8365.
- [14] Kirshenbaum, K.; Barron, A. E.; Goldsmith, R. A.; Armand, P.; Bradley, E. K.; Truong, K. T. V.; Dill, K. A.; Cohen, F. E.; Zuckermann, R. N., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (1998) **95**, 4303.
- [15] Zuckermann, R. N., *Peptide Science*, (2011) **96**, 545.
- [16] Huc, I., *European Journal of Organic Chemistry*, (2004) **2004**, 17.
- [17] Nielsen, P. E., *Pharmacology & Toxicology*, (2000) **86**, 3.
- [18] Nielsen, P. E.; Egholm, M., *Current Issues in Molecular Biology*, (1999) **1**, 89.
- [19] Sawyer, N.; Chen, J.; Regan, L., *Journal of Molecular Biology*, (2013) **425**, 1826.
- [20] Boersma, Y. L.; Plückthun, A., *Current Opinion in Biotechnology*, (2011) **22**, 849.
- [21] Xing, G.; DeRose, V. J., *Current Opinion in Chemical Biology*, (2001) **5**, 196.
- [22] Choma, C. T.; Lear, J. D.; Nelson, M. J.; Dutton, P. L.; Robertson, D. E.; DeGrado, W. F., *Journal of the American Chemical Society*, (1994) **116**, 856.
- [23] Armand, P.; Kirshenbaum, K.; Falicov, A.; Dunbrack Jr, R. L.; Dill, K. A.; Zuckermann, R. N.; Cohen, F. E., *Folding and Design*, (1997) **2**, 369.
- [24] Wu, C. W.; Sanborn, T. J.; Huang, K.; Zuckermann, R. N.; Barron, A. E., *Journal of the American Chemical Society*, (2001) **123**, 6778.
- [25] Sanborn, T. J.; Wu, C. W.; Zuckermann, R. N.; Barron, A. E., *Biopolymers*, (2002) **63**, 12.
- [26] Burkoth, T. S.; Beausoleil, E.; Kaur, S.; Tang, D.; Cohen, F. E.; Zuckermann, R. N., *Chemistry & Biology*, (2002) **9**, 647.
- [27] Lee, B.-C.; Zuckermann, R. N.; Dill, K. A., *Journal of the American Chemical Society*, (2005) **127**, 10999.
- [28] Maret, W.; Li, Y., *Chemical Reviews*, (2009) **109**, 4682.
- [29] Lipscomb, W. N.; Sträter, N., *Chemical Reviews*, (1996) **96**, 2375.
- [30] Lee, B.-C.; Chu, T. K.; Dill, K. A.; Zuckermann, R. N., *Journal of the American Chemical Society*, (2008) **130**, 8847.
- [31] Coleman, J. E., *Annual Review of Biochemistry*, (1992) **61**, 897.
- [32] Berg, J. M.; Godwin, H. A., *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, (1997) **26**, 357.
- [33] Hutchinson, E. G.; Thornton, J. M., *Protein Science*, (1994) **3**, 2207.

- [34] Seebach, D.; Overhand, M.; Kühnle, F. N. M.; Martinoni, B.; Oberer, L.; Hommel, U.; Widmer, H., *Helvetica Chimica Acta*, (1996) **79**, 913.
- [35] Sharma, G. V. M.; Subash, V.; Narsimulu, K.; Sankar, A. R.; Kunwar, A. C., *Angewandte Chemie International Edition*, (2006) **45**, 8207.
- [36] Sharma, G. V. M.; Reddy, K. R.; Krishna, P. R.; Sankar, A. R.; Narsimulu, K.; Kumar, S. K.; Jayaprakash, P.; Jagannadh, B.; Kunwar, A. C., *Journal of the American Chemical Society*, (2003) **125**, 13670.
- [37] Cheng, R. P.; DeGrado, W. F., *Journal of the American Chemical Society*, (2002) **124**, 11564.
- [38] Dolain, C.; Léger, J.-M.; Delsuc, N.; Gornitzka, H.; Huc, I., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (2005) **102**, 16146.
- [39] Delsuc, N.; Poniman, L.; Léger, J.-M.; Huc, I., *Tetrahedron*, (2012) **68**, 4464.
- [40] Maurizot, V.; Dolain, C.; Leydet, Y.; Léger, J.-M.; Guionneau, P.; Huc, I., *Journal of the American Chemical Society*, (2004) **126**, 10049.
- [41] Delsuc, N.; Hutin, M.; Campbell, V. E.; Kauffmann, B.; Nitschke, J. R.; Huc, I., *Chemistry – A European Journal*, (2008) **14**, 7140.
- [42] Delsuc, N.; Léger, J.-M.; Massip, S.; Huc, I., *Angewandte Chemie International Edition*, (2007) **46**, 214.
- [43] Delsuc, N.; Massip, S.; Léger, J.-M.; Kauffmann, B.; Huc, I., *Journal of the American Chemical Society*, (2011) **133**, 3165.
- [44] Muir, T. W.; Sondhi, D.; Cole, P. A., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (1998) **95**, 6705.
- [45] Evans, T. C.; Benner, J.; Xu, M.-Q., *Protein Science*, (1998) **7**, 2256.
- [46] Raines, R. T., *Chemical Reviews*, (1998) **98**, 1045.
- [47] Leonidas, D. D.; Shapiro, R.; Irons, L. I.; Russo, N.; Acharya, K. R., *Biochemistry*, (1999) **38**, 10287.
- [48] Arnold, U.; Hinderaker, M. P.; Nilsson, B. L.; Huck, B. R.; Gellman, S. H.; Raines, R. T., *Journal of the American Chemical Society*, (2002) **124**, 8522.
- [49] Baldwin, E. T.; Weber, I. T.; St Charles, R.; Xuan, J. C.; Appella, E.; Yamada, M.; Matsushima, K.; Edwards, B. F.; Clore, G. M.; Gronenborn, A. M., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (1991) **88**, 502.
- [50] David, R.; Günther, R.; Baumann, L.; Lühmann, T.; Seebach, D.; Hofmann, H.-J. r.; Beck-Sickinger, A. G., *Journal of the American Chemical Society*, (2008) **130**, 15311.
- [51] Moutevelis, E.; Woolfson, D. N., *Journal of Molecular Biology*, (2009) **385**, 726.
- [52] Steinmetz, M. O.; Jelesarov, I.; Matousek, W. M.; Honnappa, S.; Jahnke, W.; Missimer, J. H.; Frank, S.; Alexandrescu, A. T.; Kammerer, R. A., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (2007) **104**, 7062.
- [53] Grigoryan, G.; Keating, A. E., *Current Opinion in Structural Biology*, (2008) **18**, 477.
- [54] Woolfson, D. N., The Design of Coiled-Coil Structures and Assemblies, In *Advances in Protein Chemistry*, David, A. D. P.; John, M. S. Eds.; Academic Press: (2005); Vol. Volume 70, pp 79.
- [55] Liu, J.; Zheng, Q.; Deng, Y.; Cheng, C.-S.; Kallenbach, N. R.; Lu, M., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (2006) **103**, 15457.
- [56] Harbury, P.; Zhang, T.; Kim, P.; Alber, T., *Science*, (1993) **262**, 1401.
- [57] Raguse, T. L.; Lai, J. R.; LePlae, P. R.; Gellman, S. H., *Organic Letters*, (2001) **3**, 3963.
- [58] Hayen, A.; Schmitt, M. A.; Ngassa, F. N.; Thomasson, K. A.; Gellman, S. H., *Angewandte Chemie International Edition*, (2004) **43**, 505.
- [59] O'Shea, E.; Klemm, J.; Kim, P.; Alber, T., *Science*, (1991) **254**, 539.
- [60] Horne, W. S.; Price, J. L.; Keck, J. L.; Gellman, S. H., *Journal of the American Chemical Society*, (2007) **129**, 4178.
- [61] Horne, W. S.; Price, J. L.; Gellman, S. H., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (2008) **105**, 9151.
- [62] Giuliano, M. W.; Horne, W. S.; Gellman, S. H., *Journal of the American Chemical Society*, (2009) **131**, 9860.

- [63] Schmitt, M. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H., *Journal of the American Chemical Society*, (2004) **126**, 6848.
- [64] Lumb, K. J.; Kim, P. S., *Biochemistry*, (1995) **34**, 8642.
- [65] Price, J. L.; Horne, W. S.; Gellman, S. H., *Journal of the American Chemical Society*, (2007) **129**, 6376.
- [66] Horne, W. S.; Johnson, L. M.; Ketas, T. J.; Klasse, P. J.; Lu, M.; Moore, J. P.; Gellman, S. H., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (2009) **106**, 14751.
- [67] Qiu, J. X.; Petersson, E. J.; Matthews, E. E.; Schepartz, A., *Journal of the American Chemical Society*, (2006) **128**, 11338.
- [68] Daniels, D. S.; Petersson, E. J.; Qiu, J. X.; Schepartz, A., *Journal of the American Chemical Society*, (2007) **129**, 1532.
- [69] Petersson, E. J.; Schepartz, A., *Journal of the American Chemical Society*, (2008) **130**, 821.
- [70] Goodman, J. L.; Petersson, E. J.; Daniels, D. S.; Qiu, J. X.; Schepartz, A., *Journal of the American Chemical Society*, (2007) **129**, 14746.
- [71] Craig, C. J.; Goodman, J. L.; Schepartz, A., *ChemBioChem*, (2011) **12**, 1035.
- [72] Goodman, J. L.; Molski, M. A.; Qiu, J.; Schepartz, A., *ChemBioChem*, (2008) **9**, 1576.
- [73] Wang, P. S.-P.; Craig, C. J.; Schepartz, A., *Tetrahedron*, (2012) **68**, 4342.
- [74] Langs, D. A.; Smith, G. D.; Courseille, C.; Précigoux, G.; Hospital, M., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (1991) **88**, 5345.
- [75] Li, J.; Wisner, J. A.; Jennings, M. C., *Organic Letters*, (2007) **9**, 3267.
- [76] Tanaka, Y.; Katagiri, H.; Furusho, Y.; Yashima, E., *Angewandte Chemie International Edition*, (2005) **44**, 3867.
- [77] Ito, H.; Furusho, Y.; Hasegawa, T.; Yashima, E., *Journal of the American Chemical Society*, (2008) **130**, 14008.
- [78] Gabriel, G. J.; Iverson, B. L., *Journal of the American Chemical Society*, (2002) **124**, 15174.
- [79] Goto, H.; Katagiri, H.; Furusho, Y.; Yashima, E., *Journal of the American Chemical Society*, (2006) **128**, 7176.
- [80] Goto, H.; Furusho, Y.; Yashima, E., *Journal of the American Chemical Society*, (2006) **129**, 109.
- [81] Goto, H.; Furusho, Y.; Yashima, E., *Journal of the American Chemical Society*, (2007) **129**, 9168.
- [82] Sugiura, H.; Nigorikawa, Y.; Saiki, Y.; Nakamura, K.; Yamaguchi, M., *Journal of the American Chemical Society*, (2004) **126**, 14858.
- [83] Amemiya, R.; Saito, N.; Yamaguchi, M., *The Journal of Organic Chemistry*, (2008) **73**, 7137.
- [84] Berl, V.; Huc, I.; Khoury, R. G.; Lehn, J.-M., *Chemistry – A European Journal*, (2001) **7**, 2798.
- [85] Berl, V.; Huc, I.; Khoury, R. G.; Krische, M. J.; Lehn, J.-M., *Nature*, (2000) **407**, 720.
- [86] Berl, V.; Huc, I.; Khoury, R. G.; Lehn, J.-M., *Chemistry – A European Journal*, (2001) **7**, 2810.
- [87] Jiang, H.; Maurizot, V.; Huc, I., *Tetrahedron*, (2004) **60**, 10029.
- [88] Haldar, D.; Jiang, H.; Léger, J.-M.; Huc, I., *Tetrahedron*, (2007) **63**, 6322.
- [89] Berni, E.; Kauffmann, B.; Bao, C.; Lefeuvre, J.; Bassani, D. M.; Huc, I., *Chemistry – A European Journal*, (2007) **13**, 8463.
- [90] Gan, Q.; Bao, C.; Kauffmann, B.; Grélard, A.; Xiang, J.; Liu, S.; Huc, I.; Jiang, H., *Angewandte Chemie International Edition*, (2008) **47**, 1715.
- [91] Gan, Q.; Li, F.; Li, G.; Kauffmann, B.; Xiang, J.; Huc, I.; Jiang, H., *Chemical Communications*, (2010) **46**, 297.
- [92] Ferrand, Y.; Kendhale, A. M.; Garric, J.; Kauffmann, B.; Huc, I., *Angewandte Chemie International Edition*, (2010) **49**, 1778.
- [93] Berni, E.; Garric, J.; Lamit, C.; Kauffmann, B.; Leger, J.-M.; Huc, I., *Chemical Communications*, (2008) **0**, 1968.
- [94] Bao, C.; Kauffmann, B.; Gan, Q.; Srinivas, K.; Jiang, H.; Huc, I., *Angewandte Chemie International Edition*, (2008) **47**, 4153.

- [95] Ferrand, Y.; Chandramouli, N.; Kendhale, A. M.; Aube, C.; Kauffmann, B.; Grélard, A.; Laguerre, M.; Dubreuil, D.; Huc, I., *Journal of the American Chemical Society*, (2012) **134**, 11282.
- [96] Ferrand, Y.; Gan, Q.; Kauffmann, B.; Jiang, H.; Huc, I., *Angewandte Chemie International Edition*, (2011) **50**, 7572.
- [97] Gan, Q.; Ferrand, Y.; Chandramouli, N.; Kauffmann, B.; Aube, C.; Dubreuil, D.; Huc, I., *Journal of the American Chemical Society*, (2012) **134**, 15656.
- [98] Gan, Q.; Ferrand, Y.; Bao, C.; Kauffmann, B.; Grélard, A.; Jiang, H.; Huc, I., *Science*, (2011) **331**, 1172.
- [99] Nowick, J. S.; Chung, D. M.; Maitra, K.; Maitra, S.; Stigers, K. D.; Sun, Y., *Journal of the American Chemical Society*, (2000) **122**, 7654.
- [100] Nowick, J. S., *Accounts of Chemical Research*, (1999) **32**, 287.
- [101] Nowick, J. S.; Tsai, J. H.; Bui, Q.-C. D.; Maitra, S., *Journal of the American Chemical Society*, (1999) **121**, 8409.
- [102] Nowick, J. S.; Lam, K. S.; Khasanova, T. V.; Kemnitzer, W. E.; Maitra, S.; Mee, H. T.; Liu, R., *Journal of the American Chemical Society*, (2002) **124**, 4972.
- [103] Khakshoor, O.; Demeler, B.; Nowick, J. S., *Journal of the American Chemical Society*, (2007) **129**, 5558.
- [104] Cheng, P.-N.; Nowick, J. S., *The Journal of Organic Chemistry*, (2011) **76**, 3166.
- [105] Nauli, S.; Kuhlman, B.; Le Trong, I.; Stenkamp, R. E.; Teller, D.; Baker, D., *Protein Science*, (2002) **11**, 2924.
- [106] Khakshoor, O.; Nowick, J. S., *Organic Letters*, (2009) **11**, 3000.
- [107] Khakshoor, O.; Lin, A. J.; Korman, T. P.; Sawaya, M. R.; Tsai, S.-C.; Eisenberg, D.; Nowick, J. S., *Journal of the American Chemical Society*, (2010) **132**, 11622.
- [108] Zheng, J.; Liu, C.; Sawaya, M. R.; Vadla, B.; Khan, S.; Woods, R. J.; Eisenberg, D.; Goux, W. J.; Nowick, J. S., *Journal of the American Chemical Society*, (2011) **133**, 3144.
- [109] Liu, C.; Sawaya, M. R.; Cheng, P.-N.; Zheng, J.; Nowick, J. S.; Eisenberg, D., *Journal of the American Chemical Society*, (2011) **133**, 6736.
- [110] Cheng, P.-N.; Liu, C.; Zhao, M.; Eisenberg, D.; Nowick, J. S., *Nature Chemistry*, (2012) **4**, 927.
- [111] Cheng, P.-N.; Spencer, R.; Woods, R. J.; Glabe, C. G.; Nowick, J. S., *Journal of the American Chemical Society*, (2012) **134**, 14179.
- [112] Toniolo, C.; Crisma, M.; Formaggio, F.; Peggion, C., *Peptide Science*, (2001) **60**, 396.
- [113] Burgess, K.; Shin, H.; Linthicum, D. S., *Angewandte Chemie International Edition*, (1995) **34**, 907.
- [114] Burgess, K.; Ibarzo, J.; Linthicum, D. S.; Russell, D. H.; Shin, H.; Shitangkoon, A.; Totani, R.; Zhang, A. J., *Journal of the American Chemical Society*, (1997) **119**, 1556.
- [115] Violette, A.; Averlant-Petit, M. C.; Semetey, V.; Hemmerlin, C.; Casimir, R.; Graff, R.; Marraud, M.; Briand, J.-P.; Rognan, D.; Guichard, G., *Journal of the American Chemical Society*, (2005) **127**, 2156.
- [116] Semetey, V.; Rognan, D.; Hemmerlin, C.; Graff, R.; Briand, J.-P.; Marraud, M.; Guichard, G., *Angewandte Chemie International Edition*, (2002) **41**, 1893.
- [117] Fischer, L.; Claudon, P.; Pendem, N.; Miclet, E.; Didierjean, C.; Ennifar, E.; Guichard, G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, (2010) **49**, 1067.
- [118] Guichard, G.; Violette, A.; Chassaing, G.; Miclet, E., *Magnetic Resonance in Chemistry*, (2008) **46**, 918.
- [119] Violette, A.; Lancelot, N.; Poschalko, A.; Piotto, M.; Briand, J.-P.; Raya, J.; Elbayed, K.; Bianco, A.; Guichard, G., *Chemistry – A European Journal*, (2008) **14**, 3874.
- [120] Hemmerlin, C.; Marraud, M.; Rognan, D.; Graff, R.; Semetey, V.; Briand, J.-P.; Guichard, G., *Helvetica Chimica Acta*, (2002) **85**, 3692.
- [121] Violette, A.; Fournel, S.; Lamour, K.; Chaloin, O.; Frisch, B.; Briand, J.-P.; Monteil, H.; Guichard, G., *Chemistry & Biology*, (2006) **13**, 531.
- [122] Claudon, P.; Violette, A.; Lamour, K.; Decossas, M.; Fournel, S.; Heurtault, B.; Godet, J.; Mély, Y.; Jamart-Grégoire, B.; Averlant-Petit, M.-C.; Briand, J.-P.; Duportail, G.; Monteil, H.; Guichard, G., *Angewandte Chemie International Edition*, (2010) **49**, 333.

- [123] Pendem, N.; Douat, C.; Claudon, P.; Laguerre, M.; Castano, S.; Desbat, B.; Cavagnat, D.; Ennifar, E.; Kauffmann, B.; Guichard, G., *Journal of the American Chemical Society*, (2013) **135**, 4884.
- [124] Jung, M. E.; Piizzi, G., *Chemical Reviews*, (2005) **105**, 1735.
- [125] Venkatraman, J.; Shankaramma, S. C.; Balaram, P., *Chemical Reviews*, (2001) **101**, 3131.
- [126] Solà, J.; Helliwell, M.; Clayden, J., *Journal of the American Chemical Society*, (2010) **132**, 4548.
- [127] Inai, Y.; Tagawa, K.; Takasu, A.; Hirabayashi, T.; Oshikawa, T.; Yamashita, M., *Journal of the American Chemical Society*, (2000) **122**, 11731.
- [128] Ousaka, N.; Inai, Y., *The Journal of Organic Chemistry*, (2008) **74**, 1429.
- [129] Ousaka, N.; Inai, Y.; Kuroda, R., *Journal of the American Chemical Society*, (2008) **130**, 12266.
- [130] Pengo, B.; Formaggio, F.; Crisma, M.; Toniolo, C.; Maria Bonora, G.; B. Broxterman, Q.; Kamphuis, J.; Saviano, M.; Iacovino, R.; Rossi, F.; Benedetti, E., *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (1998) **0**, 1651.
- [131] Inai, Y.; Kurokawa, Y.; Hirabayashi, T., *Biopolymers*, (1999) **49**, 551.
- [132] Clayden, J.; Castellanos, A.; Solà, J.; Morris, G. A., *Angewandte Chemie International Edition*, (2009) **48**, 5962.
- [133] Solà, J.; Morris, G. A.; Clayden, J., *Journal of the American Chemical Society*, (2011) **133**, 3712.
- [134] Solà, J.; Fletcher, S. P.; Castellanos, A.; Clayden, J., *Angewandte Chemie International Edition*, (2010) **49**, 6836.
- [135] Fletcher, S. P.; Sola, J.; Holt, D.; Brown, R. A.; Clayden, J., *The Journal of Organic Chemistry*, (2011) **7**, 1304.
- [136] Majer, P.; Randad, R. S., *The Journal of Organic Chemistry*, (1994) **59**, 1937.
- [137] Scialdone, M. A.; Shuey, S. W.; Soper, P.; Hamuro, Y.; Burns, D. M., *The Journal of Organic Chemistry*, (1998) **63**, 4802.
- [138] Takeda, K.; Akagi, Y.; Saiki, A.; Tsukahara, T.; Ogura, H., *Tetrahedron Letters*, (1983) **24**, 4569.
- [139] Izdebski, J.; Pawlak, D., *Synthesis*, (1989), 423.
- [140] Zhang, X.; Rodrigues, J.; Evans, L.; Hinkle, B.; Ballantyne, L.; Pena, M., *The Journal of Organic Chemistry*, (1997) **62**, 6420.
- [141] Katritzky, A. R.; Pleyntet, D. P. M.; Yang, B., *The Journal of Organic Chemistry*, (1997) **62**, 4155.
- [142] Nowick, J. S.; Powell, N. A.; Nguyen, T. M.; Noronha, G., *The Journal of Organic Chemistry*, (1992) **57**, 7364.
- [143] Martinez, J.; Oiry, J.; Imbach, J. L.; Winternitz, F., *Journal of Medicinal Chemistry*, (1982) **25**, 178.
- [144] Hutchins, S. M.; Chapman, K. T., *Tetrahedron Letters*, (1994) **35**, 4055.
- [145] Thavonekham, B., *Synthesis*, (1997), 1189.
- [146] Kim, J.-M.; Bi, Y.; Paikoff, S. J.; Schultz, P. G., *Tetrahedron Letters*, (1996) **37**, 5305.
- [147] Guichard, G.; Semetey, V.; Didierjean, C.; Aubry, A.; Briand, J.-P.; Rodriguez, M., *J. Org. Chem.*, (1999) **64**, 8702.
- [148] Mitsunobu, O.; Wada, M.; Sano, T., *Journal of the American Chemical Society*, (1972) **94**, 679.
- [149] Pittelkow, M.; Lewinsky, R.; Christensen, J. B., *Synthesis*, (2002), 2195.
- [150] Berkessel, A.; Ong, M. C.; Nachi, M.; Neudörfl, J. M., *ChemCatChem*, (2010) **2**, 1215.
- [151] Fremaux, J.; Dolain, C.; Kauffmann, B.; Clayden, J.; Guichard, G., *Chem. Commun.*, (2013) **49**, 7415.
- [152] Fischer, S.; Dunbrack, R. L.; Karplus, M., *Journal of the American Chemical Society*, (1994) **116**, 11931.
- [153] Beausoleil, E.; Lubell, W. D., *Journal of the American Chemical Society*, (1996) **118**, 12902.
- [154] Crisma, M.; Peggion, C.; Baldini, C.; MacLean, E. J.; Vedovato, N.; Rispoli, G.; Toniolo, C., *Angewandte Chemie International Edition*, (2007) **46**, 2047.

- [155] Cordes, F. S.; Bright, J. N.; Sansom, M. S. P., *Journal of Molecular Biology*, (2002) **323**, 951.
- [156] S.P. Sansom, M.; Weinstein, H., *Trends in Pharmacological Sciences*, (2000) **21**, 445.
- [157] Ri, Y.; Ballesteros, J. A.; Abrams, C. K.; Oh, S.; Verselis, V. K.; Weinstein, H.; Bargiello, T. A., *Biophysical Journal*, (1999) **76**, 2887.
- [158] Shrivastava, I. H.; Capener, C. E.; Forrest, L. R.; Sansom, M. S. P., *Biophysical Journal*, (2000) **78**, 79.
- [159] Kristiansen, K.; Dahl, S. G.; Edvardsen, Ø., *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, (1996) **26**, 81.
- [160] Cao, Z.; Bowie, J. U., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (2012) **109**, 8121.
- [161] Adzhubei, A. A.; Sternberg, M. J. E.; Makarov, A. A., *Journal of Molecular Biology*, (2013) **425**, 2100.
- [162] Shoulders, M. D.; Raines, R. T., *Annual Review of Biochemistry*, (2009) **78**, 929.
- [163] Kay, B. K.; Williamson, M. P.; Sudol, M., *The FASEB Journal*, (2000) **14**, 231.
- [164] Rath, A.; Davidson, A. R.; Deber, C. M., *Peptide Science*, (2005) **80**, 179.
- [165] Ashtari, M.; Cann, N. M., *Journal of Chromatography A*, (2012) **1265**, 70.
- [166] Di Blasio, B.; Pavone, V.; Saviano, M.; Lombardi, A.; Nastro, F.; Pedone, C.; Benedetti, E.; Crisma, M.; Anzolin, M.; Toniolo, C., *Journal of the American Chemical Society*, (1992) **114**, 6273.
- [167] Huck, B. R.; Fisk, J. D.; Guzei, I. A.; Carlson, H. A.; Gellman, S. H., *Journal of the American Chemical Society*, (2003) **125**, 9035.
- [168] O'Brien, P. M.; Sliskovic, D. R.; Blankley, C. J.; Roth, B. D.; Wilson, M. W.; Hamelehle, K. L.; Krause, B. R.; Stanfield, R. L., *Journal of Medicinal Chemistry*, (1994) **37**, 1810.
- [169] DeTar, D. F.; Luthra, N. P., *Journal of the American Chemical Society*, (1977) **99**, 1232.
- [170] Aliev, A. E.; Courtier-Murias, D., *The Journal of Physical Chemistry B*, (2007) **111**, 14034.
- [171] Arvidsson, P. I.; Frackenpohl, J.; Seebach, D., *Helvetica Chimica Acta*, (2003) **86**, 1522.
- [172] Maurizot, V.; Dolain, C.; Huc, I., *European Journal of Organic Chemistry*, (2005) **2005**, 1293.
- [173] Sánchez-García, D.; Kauffmann, B.; Kawanami, T.; Ihara, H.; Takafuji, M.; Delville, M.-H. I. n.; Huc, I., *Journal of the American Chemical Society*, (2009) **131**, 8642.
- [174] Fremaux, J.; Fischer, L.; Arbogast, T.; Kauffmann, B.; Guichard, G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, (2011) **50**, 11382.
- [175] Semetey, V.; Didierjean, C.; Briand, J.-P.; Aubry, A.; Guichard, G., *Angewandte Chemie International Edition*, (2002) **41**, 1895.
- [176] Pauling, L.; Corey, R. B., *Nature*, (1953) **171**, 59.
- [177] Chan, D. C.; Fass, D.; Berger, J. M.; Kim, P. S., *Cell*, (1997) **89**, 263.
- [178] Lewis, M.; Chang, G.; Horton, N. C.; Kercher, M. A.; Pace, H. C.; Schumacher, M. A.; Brennan, R. G.; Lu, P., *Science*, (1996) **271**, 1247.
- [179] Santelli, E.; Richmond, T. J., *Journal of Molecular Biology*, (2000) **297**, 437.
- [180] Pechik, I.; Yakovlev, S.; Mosesson, M. W.; Gilliland, G. L.; Medved, L., *Biochemistry*, (2006) **45**, 3588.
- [181] Ng, K. K. S.; Park-Snyder, S.; Weis, W. I., *Biochemistry*, (1998) **37**, 17965.
- [182] Oxenoid, K.; Chou, J. J., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (2005) **102**, 10870.
- [183] Maurice, M. S.; Mera, P. E.; Taranto, M. P.; Sesma, F.; Escalante-Semerena, J. C.; Rayment, I., *Journal of Biological Chemistry*, (2007) **282**, 2596.
- [184] Stetefeld, J.; Jenny, M.; Schulthess, T.; Landwehr, R.; Engel, J.; Kammerer, R. A., *Nature Structural & Molecular Biology*, (2000) **7**, 772.
- [185] Harbury, P. B.; Kim, P. S.; Alber, T., *Nature*, (1994) **371**, 80.
- [186] Oshaben, K. M.; Salari, R.; McCaslin, D. R.; Chong, L. T.; Horne, W. S., *Biochemistry*, (2012) **51**, 9581.
- [187] Aravinda, S.; Shamala, N.; Das, C.; Sriranjini, A.; Karle, I. L.; Balaram, P., *Journal of the American Chemical Society*, (2003) **125**, 5308.
- [188] Meyer, E. A.; Castellano, R. K.; Diederich, F., *Angewandte Chemie International Edition*, (2003) **42**, 1210.

- [189] Kaumaya, P. T.; Berndt, K. D.; Heidorn, D. B.; Trehella, J.; Kezdy, F. J.; Goldberg, E., *Biochemistry*, (1990) **29**, 13.
- [190] Kelkar, D. A.; Chattopadhyay, A., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, (2007) **1768**, 2011.
- [191] Kosinska Eriksson, U.; Fischer, G.; Friemann, R.; Enkavi, G.; Tajkhorshid, E.; Neutze, R., *Science*, (2013) **340**, 1346.
- [192] Sachse, C.; Chen, J. Z.; Coureux, P.-D.; Stroupe, M. E.; Fändrich, M.; Grigorieff, N., *Journal of Molecular Biology*, (2007) **371**, 812.
- [193] Sakai, N.; Mareda, J.; Matile, S., *Accounts of Chemical Research*, (2005) **38**, 79.
- [194] Yang, Y.; Feng, W.; Hu, J.; Zou, S.; Gao, R.; Yamato, K.; Kline, M.; Cai, Z.; Gao, Y.; Wang, Y.; Li, Y.; Yang, Y.; Yuan, L.; Zeng, X. C.; Gong, B., *Journal of the American Chemical Society*, (2011) **133**, 18590.
- [195] Roche, C.; Percec, V., *Israel Journal of Chemistry*, (2013) **53**, 30.
- [196] Koronakis, V.; Sharff, A.; Koronakis, E.; Luisi, B.; Hughes, C., *Nature*, (2000) **405**, 914.
- [197] Agre, P., *Angewandte Chemie International Edition*, (2004) **43**, 4278.
- [198] Agmon, N., *Chemical Physics Letters*, (1995) **244**, 456.
- [199] Estieu-Gionnet, K.; Guichard, G., *Expert Opinion on Drug Discovery*, (2011) **6**, 937.
- [200] Levine, P. M.; Craven, T. W.; Bonneau, R.; Kirshenbaum, K., *Organic & Biomolecular Chemistry*, (2013) **11**, 4142.
- [201] Sadowsky, J. D.; Schmitt, M. A.; Lee, H.-S.; Umezawa, N.; Wang, S.; Tomita, Y.; Gellman, S. H., *Journal of the American Chemical Society*, (2005) **127**, 11966.
- [202] Sadowsky, J. D.; Fairlie, W. D.; Hadley, E. B.; Lee, H.-S.; Umezawa, N.; Nikolovska-Coleska, Z.; Wang, S.; Huang, D. C. S.; Tomita, Y.; Gellman, S. H., *Journal of the American Chemical Society*, (2007) **129**, 139.
- [203] Douat-Casassus, C.; Pulka, K.; Claudon, P.; Guichard, G., *Organic Letters*, (2012) **14**, 3130.
- [204] Sieber, P., *Tetrahedron Letters*, (1987) **28**, 2107.
- [205] D. Silva, R. A. G.; Yasui, S. C.; Kubelka, J.; Formaggio, F.; Crisma, M.; Toniolo, C.; Keiderling, T. A., *Biopolymers*, (2002) **65**, 229.
- [206] Bansal, M.; Kumart, S.; Velavan, R., *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, (2000) **17**, 811.
- [207] Pavone, V.; di Blasio, B.; Santini, A.; Benedetti, E.; Pedone, C.; Toniolo, C.; Crisma, M., *Journal of Molecular Biology*, (1990) **214**, 633.
- [208] Fodje, M. N.; Al-Karadaghi, S., *Protein Engineering*, (2002) **15**, 353.
- [209] Shepherd, N. E.; Hoang, H. N.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P., *Journal of the American Chemical Society*, (2005) **127**, 2974.
- [210] Tinoco, I., Jr.; Woody, R. W.; Bradley, D. F., *Journal of Chemical Physics*, (1963) **38**, 1317.
- [211] Kabsch, W., *Acta Crystallographica Section D*, (2010) **66**, 125.
- [212] Evans, P., *Acta Crystallographica Section D*, (2006) **62**, 72.
- [213] Winn, M. D.; Ballard, C. C.; Cowtan, K. D.; Dodson, E. J.; Emsley, P.; Evans, P. R.; Keegan, R. M.; Krissinel, E. B.; Leslie, A. G. W.; McCoy, A.; McNicholas, S. J.; Murshudov, G. N.; Pannu, N. S.; Potterton, E. A.; Powell, H. R.; Read, R. J.; Vagin, A.; Wilson, K. S., *Acta Crystallographica Section D*, (2011) **67**, 235.
- [214] McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C.; Read, R. J., *Journal of Applied Crystallography*, (2007) **40**, 658.
- [215] Emsley, P.; Cowtan, K., *Acta Crystallographica Section D*, (2004) **60**, 2126.
- [216] Murshudov, G. N.; Vagin, A. A.; Dodson, E. J., *Acta Crystallographica Section D*, (1997) **53**, 240.
- [217] Schuttelkopf, A. W.; van Aalten, D. M. F., *Acta Crystallographica Section D*, (2004) **60**, 1355.

Résumé

La fonction d'une protéine dépend dans une large mesure de sa structure tridimensionnelle, c'est pourquoi de nombreux chercheurs se sont passionnés pour la synthèse des foldamères, molécules de synthèse, bioinspirées, capables d'adopter des structures repliées bien définies. Parmi les différentes classes de foldamères, les oligourées aliphatiques étudiées dans notre laboratoire s'organisent pour former des structures hélicoïdales voisines de l'hélice α des polypeptides naturels. Pour développer des hélices fonctionnelles mimes de structures biologiques, il est intéressant de mieux comprendre les règles de leur repliement, par exemple en modifiant la nature des unités monomériques. Au cours de cette thèse, nous avons donc testé la compatibilité de la géométrie de l'hélice d'oligourée avec des résidus comportant de fortes contraintes stériques comme des groupements *gem*-diméthyles et des cycles pyrrolidines. En utilisant les résidus pyrrolidine, nous avons ensuite développé une nouvelle stratégie de synthèse par condensation de segments permettant de concevoir des hélices de grande taille (jusqu'à 4 nm). Grâce à cette nouvelle stratégie de synthèse et aux informations obtenues sur la stabilité des hélices nous avons pu concevoir des architectures plus complexes (structures quaternaires) résultant de l'assemblage programmé d'hélices hydrosolubles.

Summary

The biological functions of proteins are mainly correlated to their tridimensional structure. For this reason a large number of chemists are interested in the synthesis of foldamers, which are bioinspired artificial molecules possessing well-defined folded conformations. In particular, in our laboratories we focused on the study of oligouraea foldamers, which form well-defined and remarkably stable helical structures, analogous to the natural polypeptides α -helix. In order to develop artificial functional helices able to mimic biological structures, it is interesting to understand the rules governing their folding, for example by comparing different residues substitution patterns. During this thesis we have investigated the compatibility of the helix geometry with residues containing steric constraints, such as *gem*-dimethylated units or pyrrolidine cycle. We have developed a new segment condensation strategy based on these residues, which enabled the facile synthesis of long helical segments (up to 4 nm). The use of this novel approach, combined with the information acquired on helical stability allowed us to produce more complex architectures (quaternary structures) resulting from the controlled assembly of water soluble helices.

Mots clés

Foldamères, oligourées hélicoïdales, résidus *gem*-diméthyle, cycle pyrrolidine, assemblage contrôlé, oligomères chimères.