

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

THESE

Présentée pour obtenir le titre de
Docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille

Mention Chimie Organique et Macromoléculaire

par

Fabienne JEAN



**INCORPORATION D'UN MIME DE COUDE β
DANS DEUX PROTEINES**

Etudes synthétiques, structurales et fonctionnelles

Docteur André MÉNEZ
Professeur Maurice GOELDNER
Professeur Dirk TOURWÉ
Docteur Guy LIPPENS
Docteur Oleg MELNYK
Professeur Jean-Pierre BOHIN
Professeur André TARTAR

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Remerciements

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de Chimie des Biomolécules à l'Institut Pasteur de Lille et à l'Institut de Biologie de Lille. Il a été financé par l'Institut Pasteur de Lille et par une bourse BDI cofinancée par le CNRS et la Région Nord-Pas de Calais.

Je tiens à remercier :

Monsieur André TARTAR de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir confié ce sujet. Ce fut pour moi l'occasion d'aborder des domaines très différents, ce qui a rendu ce travail de thèse très motivant et enrichissant.

Monsieur André MENEZ de me faire l'honneur de présider le jury de thèse.

Messieurs Maurice GOELDNER et Dirk TOURWE d'avoir accepté d'examiner ce travail en tant que rapporteurs.

Monsieur Jean-Pierre BOHIN d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Guy LIPPENS pour son soutien, et pour m'avoir fait découvrir une partie du vaste domaine de la RMN des protéines.

Oleg MELNYK pour son aide et ses précieux conseils en chimie.

Hélène GRAS-MASSE pour m'avoir accueillie dans son équipe.

Je tiens également à exprimer ma très sincère reconnaissance aux personnes qui ont participé à ce travail et auprès desquelles j'ai beaucoup appris :

*Hervé DROBECQ, à qui la petite « Scylla-DBF » doit beaucoup,
Eric BUISINE, pour avoir permis de visualiser cette même « Scylla-DBF »,
Michel HUGUES, qui lui a découvert son rôle de toxine,
Benoît ODAERT, pour son enthousiasme à étudier un certain « BIG-DBF » quelque peu récalcitrant parfois.
Christophe BOUTILLON, pour son soutien constant.*

Je remercie chaleureusement :

Gérard MONTAGNE, pour sa patience même dans les moments où notre humeur a été mise à rude épreuve devant le dichro, Jean-Michel WIERUSZESKI pour son enthousiasme et sa disponibilité, Eric DIESIS pour son aide en synthèse peptidique, Marc BOSSUS pour avoir résolu d'inévitables problèmes informatiques.

Carole pour sa présence et pour avoir résolu au mieux et avec une grande efficacité problèmes et tracas administratifs, Steve pour ses encouragements et Claudine pour son aide.

La chaleureuse équipe RMN, et il me reste à citer Céline, Christophe, Mircea, Dragos, Seeta, avec qui j'ai passé quelques très bons moments, et puis Nathalie pour sa bonne humeur.

*L'ensemble des membres du laboratoire, sans oublier la jeune équipe CEREP, parce que chacun, à un moment ou à un autre, m'a aidée ou encouragée.
J'ai une pensée émue pour Ginette.*

J'ai eu l'occasion et la chance d'effectuer un stage de trois mois dans le laboratoire du Professeur Robert RAMAGE à Edimbourg. Je tiens à le remercier, ainsi que la joyeuse équipe du « lab 29 » pour leur accueil très chaleureux.

C'est à Strasbourg que j'ai fait mes premiers pas en recherche, en particulier dans le laboratoire LUU NAKATANI OURISSON, et j'aimerais exprimer à toute l'équipe mes très sincères remerciements pour leur accueil et leur amitié.

J'ai également beaucoup appris lors de stages, certains effectués dans le cadre du magistère de chimie-biologie et je remercie Elizabeth BLEE, Rémi BORDONNE et Jacques VICENS, Marc PORT et Robert LETT (Roussel-Uclaf-Romainville), et Welf VON DAEHNE (Leo Pharmaceuticals Products-Danemark) de m'avoir accueillie dans leur équipe et pour leur encadrement.

Enfin, je tiens à remercier particulièrement mes amis Christine, Cécile, Estelle, Marie, Joëlle et Claude, Juliette et Thomas, Jeroen, Benoît, Nathalie, Christelle, Christel, Catherine, Roger, mes amis du Danemark, d'Espagne, d'Ecosse, et ma famille pour leur présence et leur soutien.

Ce travail de thèse a donné lieu aux publications et communications suivantes :

Publications

One-pot synthesis of dissymmetrical 4,6-disubstituted dibenzofurans

Fabienne JEAN, Oleg MELNYK et André TARTAR
Tetrahedron Letters, 1995, **36**, 7657-7660

Incorporation of a β -turn mimic into the scorpion toxin scyllatoxin

Fabienne JEAN, Oleg MELNYK, Hervé DROBECQ, Michel HUGUES, Eric BUISINE, Guy LIPPENS et André TARTAR
Proceeding European Peptide Symposium 1996 - Edinburgh - sous presse

Incorporation of a β -turn mimic in the N-terminal fragment of the B1 domain of streptococcal protein G

Oleg MELNYK, Christophe BOUTILLON, Lynda DRAFFAN, Benoît ODAERT, Fabienne JEAN, Guy LIPPENS et André TARTAR
Accepté pour publication dans *Letters in Peptide Science*

Synthesis, structural and functional evaluation of a protein modified with a β -turn mimic

Fabienne JEAN, Eric BUISINE, Oleg MELNYK, Hervé DROBECQ, Michel HUGUES, Guy LIPPENS et André TARTAR
Soumis à *Journal of the American Chemical Society*

Synthesis, activity and folding of the β -turn mimic modified B1 domain of streptococcal Protein G

Benoît ODAERT, Fabienne JEAN, Christophe BOUTILLON, Eric BUISINE, Oleg MELNYK, Guy LIPPENS et André TARTAR
Manuscrit en préparation

Communications orales

Incorporation d'un mime de coude β dans une toxine de venin de scorpion : la scyllatoxine

Fabienne JEAN, Oleg MELNYK, Hervé DROBECQ, Guy LIPPENS et André TARTAR
Semaine d'Étude de Chimie Organique XXXIII - La Grande Motte - Juin 1996

Incorporation d'un mime de coude β dans une toxine de venin de scorpion : la scyllatoxine

Fabienne JEAN, Oleg MELNYK, Eric BUISINE, Hervé DROBECQ, Michel HUGUES, Guy LIPPENS et André TARTAR
Colloque Lille - Université Libre de Bruxelles - Bruxelles - Janvier 1997

Third generation of protein design : incorporation of β -turn mimics in small proteins

Oleg MELNYK, Fabienne JEAN, Benoît ODAERT, Eric BUISINE, Hervé DROBECQ, Michel HUGUES, Christophe BOUTILLON, Guy LIPPENS, Hélène GRAS-MASSÉ et André TARTAR
Peptido Mimetic Symposium - Spa - Avril 1997

Synthèse, évaluation structurale et fonctionnelle d'une protéine modifiée avec un mime de coude β

Fabienne JEAN, Oleg MELNYK, Eric BUISINE, Hervé DROBECQ, Michel HUGUES, Guy LIPPENS
et André TARTAR

Congrès de la Société Française de Chimie - Bordeaux - Septembre 1997

Communications par affiche

Le dibenzofurane : études d'*ortho* métallations dirigées et dissymétrisation "one pot"

Fabienne JEAN, Oleg MELNYK et André TARTAR

Journées de Chimie Organique de la Société Française de Chimie - Palaiseau - Septembre 1995

Incorporation of a β -turn mimic into the scorpion toxin scyllatoxin

Oleg MELNYK, Fabienne JEAN, Hervé DROBECQ, Michel HUGUES, Eric BUISINE, Guy LIPPENS
et André TARTAR

European Peptide Symposium - Edinburgh - Septembre 1996

Synthesis of a fully active and structurally conserved scorpion toxin modified with a β -turn mimic

Fabienne JEAN, Eric BUISINE, Oleg MELNYK, Hervé DROBECQ, Michel HUGUES, Guy LIPPENS
et André TARTAR

Peptido Mimetic Symposium - Spa - Avril 1997

Synthesis and structural study of the protein-G B1 domain modified with a β -turn mimic

Fabienne JEAN, Benoît ODAERT, *Oleg MELNYK*, Christophe BOUTILLON, Guy LIPPENS, Héléne
GRAS-MASSE et André TARTAR

Peptido Mimetic Symposium - Spa - Avril 1997

Synthèse, évaluation structurale et fonctionnelle d'une protéine modifiée avec un mime de coude β

Fabienne JEAN, Oleg MELNYK, Eric BUISINE, Hervé DROBECQ, Michel HUGUES, Guy LIPPENS
et André TARTAR

Congrès de la Société Française de Chimie - Bordeaux - Septembre 1997

SOMMAIRE

SOMMAIRE

<i>Remerciements</i>	3
SOMMAIRE	5
<i>Abréviations</i>	11
<i>Nomenclature des acides aminés</i>	13
INTRODUCTION GENERALE	14
<i>Introduction</i>	14
<i>Présentation du travail de thèse</i>	15
1. Les coudes β et les mimes de coudes β	17
1.1. Les coudes β	17
1.1.1. Définition.....	17
1.1.2. Rôles.....	21
1.1.2.1. Rôle dans la reconnaissance inter-moléculaire.....	21
1.1.2.2. Rôle dans le repliement des protéines.....	21
1.2. Les mimes de coudes β	22
1.2.1. Etudes de la relation structure/activité biologique - Recherche d'analogues actifs.....	22
1.2.2. Initiation de la formation de feuillets β	26
1.3. Le mime de coude β à structure dibenzofurane de Kelly et coll.....	29
1.3.1. Conception et propriétés.....	29
1.3.2. Conclusion.....	33
2. Synthèse peptidique	34
2.1. Introduction.....	34
2.2. Principe.....	36
2.3. Synthèse.....	36
2.3.1. Stratégies de synthèse peptidique en phase solide.....	36
2.3.1.1. Stratégie Boc.....	37
2.3.1.2. Stratégie Fmoc.....	37
2.3.2. Protection des chaînes latérales des acides aminés.....	38
2.3.2.1. Stratégie Boc.....	38
2.3.2.2. Stratégie Fmoc.....	38
2.3.3. Support solide et liaison peptide-résine.....	38
2.3.3.1. Le support solide.....	38
2.3.3.2. Fonctionnalisation du support.....	39
2.3.3.2.1. Stratégie Boc.....	39
2.3.3.2.2. Stratégie Fmoc.....	40
2.3.4. Méthodes de couplage.....	40
2.3.4.1. Le dicyclohexylcarbodiimide.....	40
2.3.4.2. Les esters activés.....	41
2.3.5. Suivi de synthèse.....	41
2.3.6. Coupure de la liaison peptide-résine et déprotection des chaînes latérales.....	42
2.3.6.1. Stratégie Boc.....	42
2.3.6.2. Stratégie Fmoc.....	43
2.3.7. Conclusion.....	43
2.3.7.1. Comparaison des stratégies Fmoc et Boc.....	43
2.3.7.2. Compatibilité du mime avec la SPPS.....	43

PARTIE I : NOUVELLE APPROCHE DE LA SYNTHÈSE DU MÏME DE COUDE β A STRUCTURE DIBENZOFURANE 46

Introduction 47

CHAPITRE I : SYNTHÈSE DU MÏME DE COUDE β A STRUCTURE DIBENZOFURANE D'APRES J. KELLY 47

CHAPITRE II : NOUVELLE APPROCHE DE SYNTHÈSE DU MÏME A STRUCTURE DIBENZOFURANE 48

2.1. Nouveau schéma de synthèse..... 48

2.2. Dissymétrisation du dibenzofurane 50

2.2.1. Monolithiation du noyau dibenzofurane..... 50

2.2.2. Formylation du 4-lithio dibenzofurane 51

2.3. Etude de la régiosélectivité de la deuxième étape de lithiation..... 52

2.3.1. L'effet *ortho*-directeur..... 52

2.3.2. Nature du groupement *ortho*-directeur 53

2.3.3. Résultats..... 55

2.3.3.1. Traitement des données 55

2.3.3.2. Résultats - Discussion..... 61

a - Effet de la stoechiométrie 62

b - Le phénomène d'agrégation 62

c - Effet de la température et du temps de réaction..... 65

d - Silylation de l'intermédiaire 65

e - Utilisation de *t*-BuLi..... 65

2.3.3.3. Conclusion des tests des différents paramètres..... 66

2.3.4. Piégeage des dérivés lithiés avec deux autres électrophiles 66

2.3.5. Essai de préparation de dérivés du dibenzofurane 3,4,6-trisubstitués - Utilisation de TMEDA..... 67

2.3.6. Conclusion..... 72

2.4. Synthèse du synthon silylé 72

2.4.1. Résultats - Discussion..... 72

2.4.2. Conclusion..... 73

2.5. Les dernières étapes de la nouvelle synthèse du mime et perspectives..... 74

2.6. Conclusion..... 77

PUBLICATION 78

PARTIE II : INCORPORATION DU MÏME DE COUDE β A STRUCTURE DIBENZOFURANE DANS LA SCYLLATOXINE 79

Introduction 80

CHAPITRE I : CHOIX DU MODELE SCYLLATOXINE 81

1. Cahier des charges..... 81

1.1. La taille..... 81

1.2. Les éléments de structure secondaire 81

1.3. L'activité biologique..... 81

2. Choix du premier modèle : la scyllatoxine 81

2.1. Toxines de scorpion et ingénierie des protéines..... 82

2.2. Choix de la scyllatoxine..... 83

2.3. La scyllatoxine 84

2.3.1. Présentation..... 84

2.3.2. Activité biologique..... 84

2.3.3. Synthèse 86

2.3.4. Structure 88

2.3.4.1. Eléments de structure secondaire 88

2.3.4.2. Structure tridimensionnelle	88
2.3.4.3. Relation structure / activité biologique.....	89
3. Conclusion	91
CHAPITRE II : INCORPORATION DU MIME A STRUCTURE DIBENZOFURANE DANS LA SCYLLATOXINE	92
1. Etude préliminaire par modélisation moléculaire.....	92
2. Synthèse de la scyllatoxine-DBF	92
2.1. Suivi de la synthèse.....	93
2.2. Difficultés de couplage	95
2.2.1. Résultats.....	95
2.2.2. Comparaison avec la synthèse de la scyllatoxine-DBF avec protection orthogonale des cystéines.....	96
2.2.3. Hypothèses sur les difficultés de couplage.....	97
2.3. Coupure de la liaison peptide-résine et déprotection	98
2.4. Conclusion.....	98
3. Formation des ponts disulfure et purification de la scyllatoxine-DBF	99
3.1. Introduction	99
3.2. Résultats	100
3.2.1. Essais d'oxydation sur le peptide brut	100
3.2.2. Oxydation du peptide pré-purifié	103
3.2.3. Etude de l'étape de repliement oxydatif	103
3.3. Conclusion.....	104
CHAPITRE III : ETUDE STRUCTURALE DE LA SCYLLATOXINE-DBF	106
1. Introduction	106
2. Principe général de la détermination de la structure tridimensionnelle d'une protéine par RMN.....	106
2.1. Introduction	106
2.2. Attribution des systèmes de spin et attribution séquentielle.....	109
2.2.1. Les spectroscopies de corrélation.....	110
2.2.1.1. La spectroscopie COSY	110
2.2.1.2. La spectroscopie TOCSY.....	110
2.2.2. La spectroscopie NOESY.....	111
2.3. Identification des éléments de structure secondaire	112
2.3.1. A partir de distances proton-proton caractéristiques	112
2.3.2. A partir des constantes de couplage $^3J_{NH-H\alpha}$	115
2.3.3. A partir des expériences d'échange H / D	115
2.3.4. Attribution stéréospécifique.....	116
2.3.5. Conclusion.....	116
2.4. Modélisation moléculaire.....	117
2.4.1. Géométrie des distances.....	117
2.4.2. Dynamique moléculaire.....	117
2.4.2.1. L'énergie	117
2.4.2.2. Les contraintes RMN.....	118
2.4.2.3. Recuit simulé	119
2.4.3. Raffinement des structures	119
3. Résultats - Détermination de la structure tridimensionnelle de la scyllatoxine-DBF.....	120
3.1. Analyse des données RMN	120
3.1.1. Attribution.....	120
3.1.2. Eléments de structure secondaire	124
3.1.3. Contacts de structure tertiaire	127
3.2. Détermination de la structure par modélisation moléculaire.....	128
3.2.1. Stratégie	128
3.2.2. Résultats.....	134
3.2.2.1. Structure générale	134

3.2.2.2. Etude de l'environnement du mime.....	134
4. Conclusion de l'étude structurale.....	135
5. Présence d'un produit secondaire.....	135
CHAPITRE IV : EVALUATION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DE LA SCYLLATOXINE-DBF.....	137
1. Introduction.....	137
2. Résultats.....	137
2.1. Activité biologique - contraction de <i>Taenia coli</i> de cobaye.....	138
2.2. Activité pharmacologique - compétition avec l'apamine ¹²⁵ I.....	138
3. Conclusion de l'évaluation biologique.....	139
CHAPITRE V : DISCUSSION SUR L'INCORPORATION DU MIME-DBF DANS LA SCYLLATOXINE.....	140
PARTIE III : INCORPORATION DU MIME DE COUDE β A STRUCTURE DIBENZOFURANE DANS LE DOMAINE B1 DE LA PROTEINE G DU STREPTOCOQUE.....	142
<i>Introduction.....</i>	143
CHAPITRE I : CHOIX DU SECOND MODELE : LE DOMAINE B1 DE LA PROTEINE G.....	144
1. La protéine G.....	144
1.1. Présentation.....	144
1.2. Les domaines de liaison aux IgG.....	146
2. Le domaine B1 de la protéine G (B1G).....	147
2.1. Présentation.....	147
2.2. Synthèse.....	148
2.3. Structure tridimensionnelle.....	148
2.4. Interaction avec les IgG.....	151
2.5. B1G : un modèle d'étude.....	153
3. Conclusion.....	154
CHAPITRE II : INCORPORATION DU MIME-DBF DANS LE FRAGMENT N-TERMINAL DE B1G (B1G₂₋₁₉).....	155
1. Résultats de l'étude de B1G₂₋₁₉.....	155
2. Résultats de l'étude de B1G₂₋₁₉-DBF.....	155
2.1. Etude par dichroïsme circulaire.....	155
2.2. Etude structurale par RMN.....	156
3. Conclusion.....	157
CHAPITRE III : INCORPORATION DU MIME-DBF DANS B1G.....	159
1. Synthèse de B1G-DBF.....	159
1.1. Introduction.....	159
1.2. Déroulement de la synthèse.....	159
1.3. Clivage de la liaison peptide-résine et déprotection finale.....	160
1.4. Conclusion.....	160
2. Repliement et purification de B1G-DBF.....	161
3. Conclusion.....	161
CHAPITRE IV : ETUDE STRUCTURALE DE B1G-DBF.....	162
1. Introduction.....	162
2. Résultats de l'étude structurale.....	162
2.1. Comparaison des déplacements chimiques.....	162
2.1. Etude des contacts NOE.....	163

3. Conclusion	165
CHAPITRE V : ETUDE DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE	167
1. Principe du test ELISA	167
2. Résultats	167
3. Conclusion	168
CHAPITRE VI : DISCUSSION SUR L'INCORPORATION DU MIME-DBF DANS B1G	169
CONCLUSION DE L'INCORPORATION DU MIME DE COUDE β A STRUCTURE DIBENZOFURANE DANS LES DEUX MODELES D'ETUDE	170
PUBLICATION	171
PARTIE IV : COUPLAGE DE FRAGMENTS AVEC UN NOUVEAU REACTIF DE COUPLAGE	172
<i>Introduction</i>	174
1. Couplage de fragment	175
1.1. La méthode azide	176
1.2. Le bras espaceur « hydrazine ».....	177
2. HOCT : un nouveau réactif de couplage	177
3. Utilisation de TbFmoc	178
4. Résultats et discussion	180
4.1. Préparation du bras espaceur « hydrazine »	180
4.2. Préparation du fragment hydrazide du peptide C de la Proinsuline.....	181
4.3. Préparation du fragment amine.....	181
4.4. Réaction de couplage de fragments	181
Conclusion	182
CONCLUSION GENERALE	185
PARTIE EXPERIMENTALE	189
Partie I	190
Parties II et III	204
Partie IV	221
ANNEXES	231
BIBLIOGRAPHIE	234

ABREVIATIONS

aa	acide aminé
Abu	acide 2-aminobutyrique
Acm	acétamidométhyle
APTS	acide <i>p</i> -toluène sulfonique
B1G	domaine B1 de la protéine G (résidus 2-56)
B1G-DBF	domaine B1 de la protéine G modifié avec le mime de coude β à structure dibenzofurane
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CCM	chromatographie sur couche mince
CG	chromatographie en phase gaz
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
CVFF	<i>consistent valence force field</i>
DCC	dicyclohexylcarbodiimide
DCU	dicyclohexylurée
DIC	diisopropylcarbodiimide
DMAP	4-N,N-diméthylaminopyridine
DMF	N,N-diméthylformamide
DMS	diméthylsulfure
DQF-COSY	<i>double quantum filtered COSY</i>
DTT	dithiothréitol
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
éq.	équivalent
IR-TF	spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier
GDM	groupement directeur de métallation
Gnd.HCl	chlorure de guanidinium
GSH	glutathion (γ Glu-Cys-Gly) sous forme réduite
GSSG	glutathion sous forme oxydée
HCl	acide chlorhydrique
HF	acide fluorhydrique
HOBt	hydroxybenzotriazole
HOHAHA	<i>homonuclear Hartmann-Hahn experiment</i>
HPLC	chromatographie liquide haute performance
HSQC	heteronuclear simple quantum correlation
IC ₅₀	concentration inhibitrice 50
IE	impact électronique

K _{Ca}	canaux potassium, calcium dépendants
kd	kilodalton
LH-RH	<i>luteinising hormone-releasing hormone</i>
Me	méthyl
MNDO	<i>Modified Neglected Differential Overlap</i>
Mob	méthoxybenzyle
MOD	métallation <i>ortho</i> -dirigée
NOESY	<i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
Om	ornithine
RMN	résonance magnétique nucléaire
rmsd	<i>root mean square deviation</i>
Scyllatoxine-DBF	scyllatoxine modifiée avec le mime de coude β à structure dibenzofurane
SM	spectrométrie de masse
SPPS	synthèse peptidique en phase solide
t.a.	température ambiante
TFA	acide trifluoroacétique
TFE	trifluoroéthanol
TMEDA	tétraméthyléthylènediamine
TMS	triméthylsilyl
TMSP	sel de sodium de l'acide triméthyl-2,2',3,3'-D-propionique
TNBS	acide 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
Trt	trityle
VIH	virus d'immunodéficience humain

NOMENCLATURE DES 20 ACIDES AMINES

Ala	A	Alanine
Arg	R	Arginine
Asn	N	Asparagine
Asp	D	Acide aspartique
Cys	C	Cystéine
Gln	Q	Glutamine
Glu	E	Acide glutamique
Gly	G	Glycine
His	H	Histidine
Ile	I	Isoleucine
Leu	L	Leucine
Lys	K	Lysine
Met	M	Méthionine
Phe	F	Phénylalanine
Pro	P	Proline
Ser	S	Serine
Thr	T	Thréonine
Trp	W	Tryptophane
Tyr	Y	Tyrosine
Val	V	Valine

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Introduction

Parmi les grands thèmes développés en biochimie, l'étude des mécanismes du repliement des protéines enthousiasme de nombreuses équipes de recherche. Plusieurs approches sont utilisées à cette fin. La première consiste à étudier la protéine entière et à analyser son comportement à l'aide, entre autre, d'expériences de dénaturation thermique (ALEXANDER et coll., 1992) ou chimique (FRANK et coll., 1995), d'études sur la dynamique de la chaîne polypeptidique (BARCHI et coll., 1994) et d'échange hydrogène/deutérium (ORBAN et coll., 1995) suivies par des expériences de RMN. Une seconde approche consiste à s'intéresser aux éléments de structure secondaire (hélices α , feuillets β , coudes β) qui, reliés entre eux, constituent la structure tridimensionnelle d'une protéine. La formation des éléments de structure secondaire est proposée pour être un des mécanismes intervenant dans les étapes précoces du repliement des protéines. Alors que pour les hélices α , les études sont bien avancées et les mécanismes de formation élucidés (MUÑOZ et SERRANO, 1994a,b,c) il n'en est pas de même pour les feuillets β . Il est, en effet, difficile de travailler sur ces éléments car ils possèdent une grande propension à l'agrégation et à la précipitation. Pourtant, les feuillets β constituent une part importante de la structure des protéines (FRISHMAN et MEWES, 1997) et peuvent jouer des rôles fonctionnels importants en particulier dans la reconnaissance protéine-protéine (DERRICK et WIGLEY, 1992), protéine-ADN ou protéine-ARN (SMITH et REGAN, 1997). Ils représentent donc un enjeu majeur dans les recherches menées sur le repliement des protéines.

La recherche d'unités autonomes de repliement a conduit certains groupes à tenter d'obtenir, en solution, des feuillets β isolés. A ce jour, seuls BLANCO et coll. (1994) sont parvenus à obtenir un feuillet β , monomérique en solution dans l'eau, 40% des molécules adoptant le repliement natif présent dans la protéine. Les autres feuillets obtenus en solution sont issus de peptides modifiés de manière à leur conférer la capacité de se structurer en feuillets β . Pour cela, différentes approches sont utilisées et elles sont essentiellement focalisées sur le coude β ou le tournant reliant les deux brins β du feuillet. Elles ont consisté en l'incorporation, au niveau du coude β , d'acides aminés naturels choisis pour leur probabilité à se structurer en un type de coude β déterminant la conformation du feuillet β (DE ALBA et coll., 1997), d'acides aminés non naturels (HAQUE et coll., 1996) ou d'éléments non peptidiques servant d'éléments de structuration pour maintenir les brins β correctement positionnés pour établir un feuillet β (KELLY et coll., 1994; NOWICK, 1995).

Nous abordons alors le domaine de l'ingénierie des protéines qui, outre son apport dans la compréhension de leurs mécanismes de repliement, fournit les outils nécessaires à la conception *de novo* de protéines (HECHT, 1994; DESJARLAIS et NADEL, 1995; TUSCHERER et MUTTER, 1995; BRYSON et coll., 1995; BEASLEY et HECHT, 1997). Celles-ci peuvent alors être dotées d'une structure pré-définie (HECHT et coll., 1990; OSTERHOUT et coll., 1992; STRUTHERS et coll., 1996; BETZ et coll., 1997), ou d'une fonction particulière comme, par exemple, un site de liaison à un métal (PESSI et coll., 1993).

L'incorporation d'éléments non naturels dans les protéines a évolué en plusieurs étapes. Dans un premier temps, les modifications respectaient le modèle oligomère de la chaîne peptidique en introduisant des acides aminés D, des chaînes latérales modifiées ou en mimant la liaison peptidique.

Dans le cadre de ce travail, nous proposons de nous placer à un niveau plus avancé de l'ingénierie des protéines en incorporant un élément non naturel qui va venir remplacer un motif structural. Nous verrons quelles en ont été les conséquences pour les protéines modifiées, au niveau structural et fonctionnel. Cet élément possède en outre des propriétés structurantes connues à l'échelle de peptides, il nous a donc semblé important d'évaluer leurs implications dans un contexte protéique et les informations que l'on peut en retirer au niveau du repliement des protéines.

Présentation du travail de thèse

Les travaux de KELLY et coll., qui s'inscrivent dans le cadre de la conception d'éléments de structuration destinés à obtenir des feuillets β en solution, nous ont particulièrement intéressés. Ils se basent, comme nous le verrons plus loin, sur l'utilisation d'un mime de coude β à structure dibenzofurane qui, lorsqu'il est incorporé dans des peptides, et dans des conditions favorables (les acides aminés adjacents au mime doivent être hydrophobes), permet leur structuration en feuillet β . Le mime de coude β à structure dibenzofurane, que nous nommerons « mime-DBF » dans les parties II et III, est particulièrement bien décrit (DIAZ et coll., 1991, 1992, 1993a, 1993b, TSANG et coll. 1994, GRACIANI et coll., 1994) mais n'a été incorporé que dans des peptides. Nous voulions donc savoir comment les règles établies dans des peptides pouvaient s'appliquer au contexte d'une protéine entière, et étudier le comportement d'un tel mime dans un environnement spatial défini, constitué par la structure tridimensionnelle d'une protéine.

Trois points ont motivé notre travail :

- 1 - Vérifier la faisabilité de l'incorporation d'un élément structurant non naturel dans le contexte d'une protéine;
- 2 - Analyser les conséquences structurales de l'incorporation d'un élément, décrit comme élément structurant dans les peptides, dans une protéine, ainsi que les conséquences fonctionnelles qui en découlent;
- 3 - Etudier les propriétés de la protéine modifiée, notamment au niveau de la stabilité.

Pour réaliser ces études, nous avons entrepris l'incorporation du mime-DBF dans deux protéines modèles, connues au laboratoire, et répondant à des critères que nous avons imposés et qui seront énoncés plus loin. Les deux protéines retenues sont la scyllatoxine, une toxine de scorpion, et le domaine B1 de la protéine G du streptocoque. Les deux analogues modifiées avec le mime-DBF seront respectivement appelées « scyllatoxine-DBF » et « B1G-DBF ».

La synthèse des protéines modifiées nécessite, au préalable, l'utilisation des techniques de la chimie organique pour produire le mime-DBF. L'incorporation subséquente du mime dans les protéines est effectuée à l'aide de la synthèse peptidique en phase solide. Celle-ci constitue une technique plus souple, pour l'incorporation d'éléments non naturels, que l'approche biosynthétique. En effet, la voie chimique comporte des avantages majeurs par rapport à l'approche biosynthétique. Elle permet l'incorporation d'un large éventail de molécules et les quantités de produit obtenu sont plus importantes. Cependant, il faut signaler les progrès récents dans le domaine biosynthétique avec les travaux de ELLMAN et coll. (1992), MENDEL et coll. (1992), CHUNG et coll. (1993), NOWAK et coll. (1995), HOHSAKA et coll. (1996).

Nous verrons dans une première partie comment nous avons abordé une nouvelle synthèse du mime-DBF dans le but de le fonctionnaliser. Les deuxième et troisième parties seront consacrées à l'incorporation du mime-DBF dans la scyllatoxine et dans le domaine B1. Enfin la quatrième partie présentera le travail effectué sur le couplage de fragments peptidiques, dans le cadre d'un stage réalisé au sein du laboratoire du Professeur RAMAGE, à Edimbourg.

1. LES COUDES β ET LES MIMES DE COUDES β

1.1. Les coudes β

1.1.1. Définition

Les coudes constituent une classe fondamentale d'élément structural et sont définis comme des sites d'inversion de la direction de la chaîne polypeptidique. Jusqu'à un tiers des acides aminés présents dans une protéine sont susceptibles d'être impliqués dans une structure en coude. Ce sont des structures polaires et peuvent être impliqués dans les phénomènes de reconnaissance moléculaire : liaison à un récepteur, reconnaissance antigène/anticorps, site de modifications post-traductionnelles.

On rencontre essentiellement deux types de coudes : les coudes β et les coudes γ . Ils comportent respectivement 4 et 3 résidus et ils peuvent être stabilisés par la présence d'une liaison hydrogène intramoléculaire, bien que celle-ci ne soit pas obligatoirement présente (Figure 1). Au cours de ces travaux, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux coudes β .

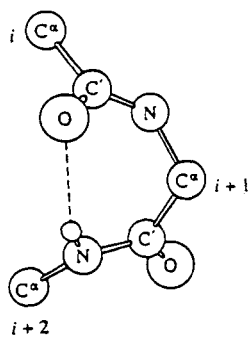
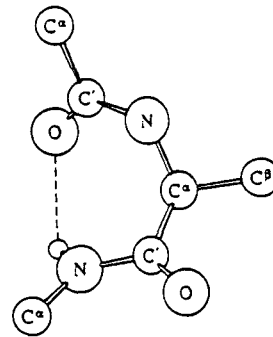
La première définition des coudes β a été proposée par VENKATACHALAM (1968) et elle mentionnait la présence d'une liaison hydrogène entre le CO du résidu i et le NH du résidu $i+3$. Cette définition a été précisée par LEWIS (1973) en imposant que la distance entre le $C\alpha$ du résidu i et le $C\alpha$ du résidu $i+3$ soit inférieure à 7 Å (Figure du Tableau 2) et que la chaîne peptidique ne soit pas en conformation hélicoïdale. La liaison hydrogène reliant le CO du résidu i et le NH du résidu $i+3$ est absente dans environ 25% des cas. C'est maintenant la classification de RICHARDSON (1981) qui fait le plus souvent référence, et les coudes β y sont classés en différentes catégories suivant la valeur des angles ϕ et ψ des résidus centraux du coude β : les résidus $i+1$ et $i+2$ (Tableau 2 et Figure 1). Parmi les différents types de coudes, les coudes de type I sont les plus représentés (deux à trois fois plus que le type II). Les coudes de types I' et II' sont les images dans un miroir (au niveau du squelette peptidique) des coudes de types I et II mais sont plus rares. Le type III est une courte portion d'hélice 3_{10} , il n'est donc pas repris dans toutes les classifications.

L'analyse détaillée de la composition en acides aminés des différents types de coudes β a permis de mettre en évidence que certains résidus étaient plus représentés à certaines positions du coude. Ainsi, les acides aminés rencontrés le plus fréquemment à certaines positions des coudes β de type I et II sont indiqués à titre d'exemple au Tableau 1 (WILMOT et THORNTON, 1988).

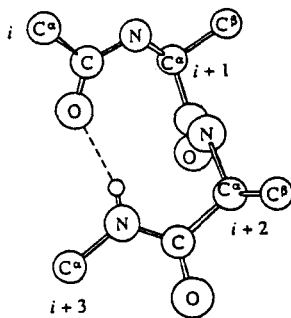
Position dans le coude β	Type I	Type II
i	Asp, Asn, Ser, Cys	
i+1	Asp, Ser Thr, Pro	Pro
i+2	Asp, Ser, Asn, Arg	Gly, Asn
i+3	Trp, Met	Arg

Tableau 1 : Acides aminés les plus rencontrés dans les différentes positions d'un coude β de type I ou II (d'après WILMOT et THORNTON, 1988).

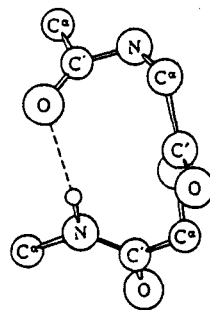
Ces préférences ont été expliquées par des interactions spécifiques entre chaînes latérales observées dans des structures obtenues par radiocristallographie (WILMOT et THORNTON, 1988).

Coudes γ Coude γ classiqueCoude γ inverseCoudes β

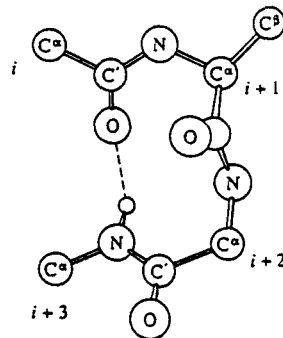
Type I



Type I'



Type II



Type II'

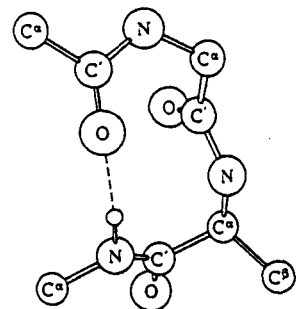
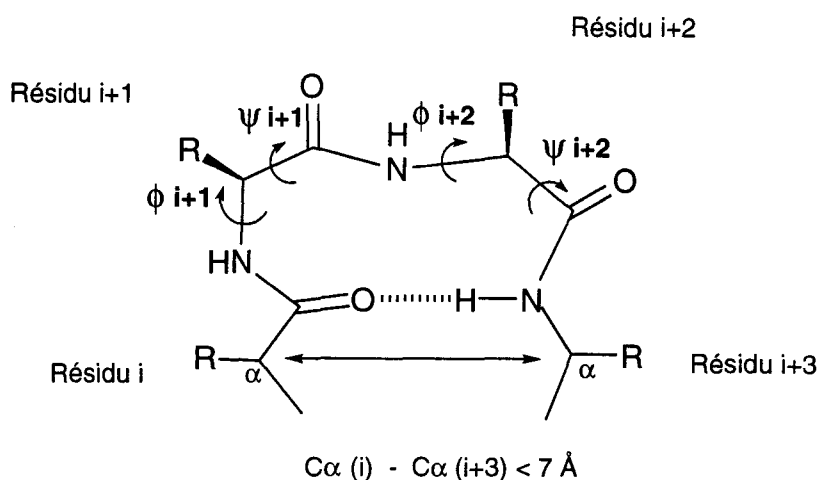


Figure 1 : Représentation des coudes γ et des coudes β les plus couramment rencontrés. D'après ROSE et coll.(1985)



Type de coude β	Position i+1		Position i+2	
	ϕ ($^\circ$)	ψ ($^\circ$)	ϕ ($^\circ$)	ψ ($^\circ$)
I	-60	-30	-90	0
I'	60	30	90	0
II	-60	120	80	0
II'	60	-120	-80	0
III	-60	-30	-60	-30
III'	60	30	60	30
VIa	-60	120	-90	0
VIb	-120	120	-60	0
VIII	-60	-30	-120	120

Tableau 2 : Classification des coudes β d'après RICHARDSON (1981) et ROSE et coll., (1985)

De part leur intérêt en modélisation et en simulation moléculaire, les coudes β ont fait l'objet d'études de prédiction (WILMOT et THORNTON, 1988), de description topologique (BALL et coll., 1990) (MILNER-WHITE et POET, 1987), d'identification dans les protéines (WINTJENS et coll., 1994) et d'analyse conformationnelle (RAMAKRISHNAN et coll., 1996). D'autres études plus spécifiques ont été décrites sur des coudes particuliers comme le coude « ASX-Pro » (WILSON et FINLAY, 1997) ou un modèle sur le coude β de type VI (MÜLLER et coll., 1993), sur le rôle de la solvatation dans la formation de certains coudes (BASHFORD et coll., 1997) ou encore sur la simulation du repliement de certains types de coudes (YAN et coll., 1995).

1.1.2. Rôles

1.1.2.1. Rôle dans la reconnaissance inter-moléculaire

La localisation des coudes à la surface des protéines et la présence d'acides aminés à chaînes latérales hydrophiles et potentiellement réactives vis-à-vis d'une modification post-traductionnelle (Asn, Ser, Thr, Tyr, Pro ou Lys) ont très tôt suscité leur implication dans les phénomènes de reconnaissances inter-moléculaires ou de modifications post-traductionnelles. ROSE et coll. (1985) ont fait une revue très précise des activités biologiques dans lesquelles les coudes peuvent être impliqués. Nous ne mentionnerons ici que les aspects les plus importants.

Les coudes peuvent intervenir dans la reconnaissance immunologique et ont été localisés dans certaines protéines au niveau de sites antigéniques. Ils sont potentiellement le site de modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation, la glycosylation ou l'hydroxylation des résidus Pro.

1.1.2.2. Rôle dans le repliement des protéines

Le rôle des coudes dans la structure, le repliement et la stabilité des protéines n'est pas encore bien compris. Deux positions s'opposent quant au rôle que l'on peut leur attribuer dans le repliement des protéines. Certains auteurs y voient des sites de nucléation potentiels lors des étapes précoces du repliement permettant l'établissement des éléments de structure secondaire comme les feuillets β , alors que d'autres les considèrent comme des structures inertes et dont la présence ne serait que la conséquence du repliement du reste de la chaîne faisant d'eux des éléments flexibles liant des éléments plus rigides (ROSE et coll. 1985). Ces deux extrêmes ne s'opposent pas mutuellement et certaines études ont montré que dans une même protéine, la ribonucléase T1, un coude sur les cinq présents semblait critique pour un repliement correct et/ou la stabilité thermodynamique de la protéine. Ce coude a été proposé par les auteurs pour être un site potentiel de nucléation du repliement de la ribonucléase T1 pour initier la formation d'un feuillet β anti-parallèle (GARRET et coll., 1996).

D'autres travaux se sont axés sur la substitution des acides aminés constituant le coude pour tester la tolérance de la structure à cet endroit de la séquence et étudier les conséquences au niveau de la stabilité de la protéine. Le coude central de la plastocyanine (YBE et HECHT, 1996) est considéré comme jouant un rôle crucial dans la détermination de la structure tridimensionnelle finale de la protéine.

D'autre part, l'implication des résidus des coudes dans la stabilité des protéines a été étudiée par PREDKI et coll. (1996) par des expériences de mutagenèse. Les auteurs ont pu établir

la corrélation entre la stabilité de la protéine et la préférence pour certains angles dièdres du squelette peptidique pouvant être dictée par l'environnement local. ZHOU et coll. (1996) ont, quant à eux, montré que les coudes β semblent soumis à la pression sélective de l'évolution dans le but de favoriser les structures protéiques les plus stables thermodynamiquement.

1.2. Les mimes de coude β

Les facteurs intervenant sur la structure, la fonction et le repliement des protéines peuvent être étudiés à partir des protéines elles-mêmes. Cependant, des études détaillées sur l'importance de facteurs individuels sont également menées sur des molécules de plus faible poids moléculaire pouvant servir de modèles (RIZO et GIERASH, 1992). L'avantage de cette approche est de pouvoir concevoir à volonté des séquences, pouvant comporter des éléments non naturels. On peut ensuite, dans le cas de peptides actifs, tenter de déterminer les éléments indispensables à conserver pour maintenir la fonction biologique voire l'améliorer. Dans un cadre plus structural, on est amené à se poser des questions spécifiques sur les propriétés conformationnelles intrinsèques, sur des interactions particulières et leurs propriétés thermodynamiques, sorties de leur contexte protéique. Des peptides modifiés peuvent ainsi être conçus pour mimer certaines parties de protéines avec une structure secondaire pré-définie et en tirer des informations sur les règles qui gouvernent le repliement des protéines.

Nous allons donc aborder dans cette partie les deux aspects de la conception des mimes de coudes β : leur rôle dans la recherche d'analogues actifs et dans l'étude de la relation structure/activité biologique, et leur utilisation comme élément nucléateur de feuillet β .

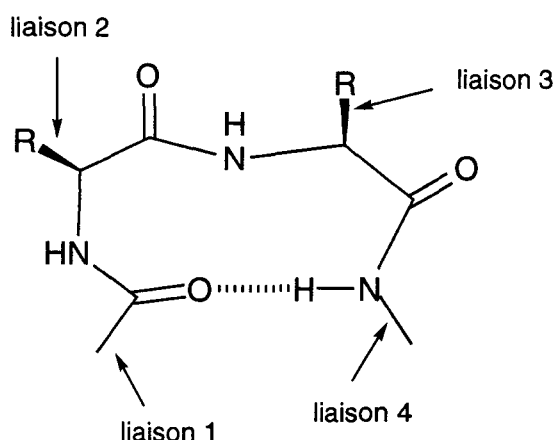
1.2.1. Etude de la relation structure/activité biologique - Recherche d'analogues actifs

C'est en 1980 que FREIDINGER et coll. sont parvenus à mimer efficacement une conformation active de l'hormone LR-RH, contenant un coude β , par une unité conformationnellement contrainte. Depuis, l'intérêt pour la conception de mimes de coudes β s'est considérablement développé, grâce à des approches et des motivations différentes.

Au départ, la motivation était la recherche d'analogues hautement actifs de peptides ayant une activité biologique intéressante. Le but était bien sûr de concevoir des analogues présentant une plus grande sélectivité et une faible toxicité. Pour cela, la détermination de la conformation active du peptide sur le récepteur peut apporter beaucoup d'informations dans le cadre de la

conception d'analogues de peptides actifs. L'introduction d'une contrainte conformationnelle adéquate dans un peptide initialement flexible, peut permettre de se rapprocher de la conformation active et, ainsi, limiter la perte d'entropie liée à la liaison au récepteur dans le bilan énergétique de cette interaction. De plus, la présence d'éléments non peptidiques permet d'augmenter le temps de demi-vie *in vivo* grâce à une meilleure résistance à la protéolyse par rapport au peptide naturel. L'étude des contraintes conformationnelles peut également fournir des informations sur les conditions requises par le ligand d'un récepteur pour produire une activité agoniste ou antagoniste (BALL et ALEWOOD, 1990).

Les coudes β sont rencontrés dans nombre de structures peptidiques impliquées dans une activité biologique (ROSE et coll., 1985). C'est donc logiquement que s'est développé un intérêt particulier pour la conception de molécules non peptidiques rigides mimant les coudes β . Cette conception doit reposer sur la topologie même du coude β en tenant compte de certains critères :



- la disposition des liaisons 2 et 3 l'une par rapport à l'autre, et par rapport au reste de la molécule, est importante pour l'orientation des chaînes latérales des acides aminés centraux du coude et qui peut être très déterminante pour l'activité biologique;
- l'angle selon lequel la chaîne peptidique entre dans le coude par rapport à celui selon lequel elle en sort est défini par les liaisons 1 et 4;
- la géométrie du squelette peptidique est importante car elle détermine la position des liaisons 1, 2, 3 et 4, et doit éventuellement permettre la présence d'une liaison hydrogène.

BALL et ALEWOOD (1990a) ont proposé deux approches différentes dans la conception de mimes de coudes β : ils ont introduit la notion de « mime interne » et de « mime externe ». Dans les mimes de coude β internes la structure rigide introduite se situe dans l'espace occupé par le coude β original et remplace approximativement le squelette peptidique (exemple 4, Figure 2), alors que dans le cas des mimes externes elle se place à l'extérieur du pseudo cycle à 10 chaînons comprenant le pont hydrogène éventuel (exemple 1 Figure 2). De très nombreux exemples de mimes de coudes β ont été décrits (BALL et ALEWOOD, 1990a; HÖLZEMANN, 1993; KAHN, 1988a, 1989, 1993, MARSHALL, 1993) et nous en présentons quelques exemples à la Figure 2.

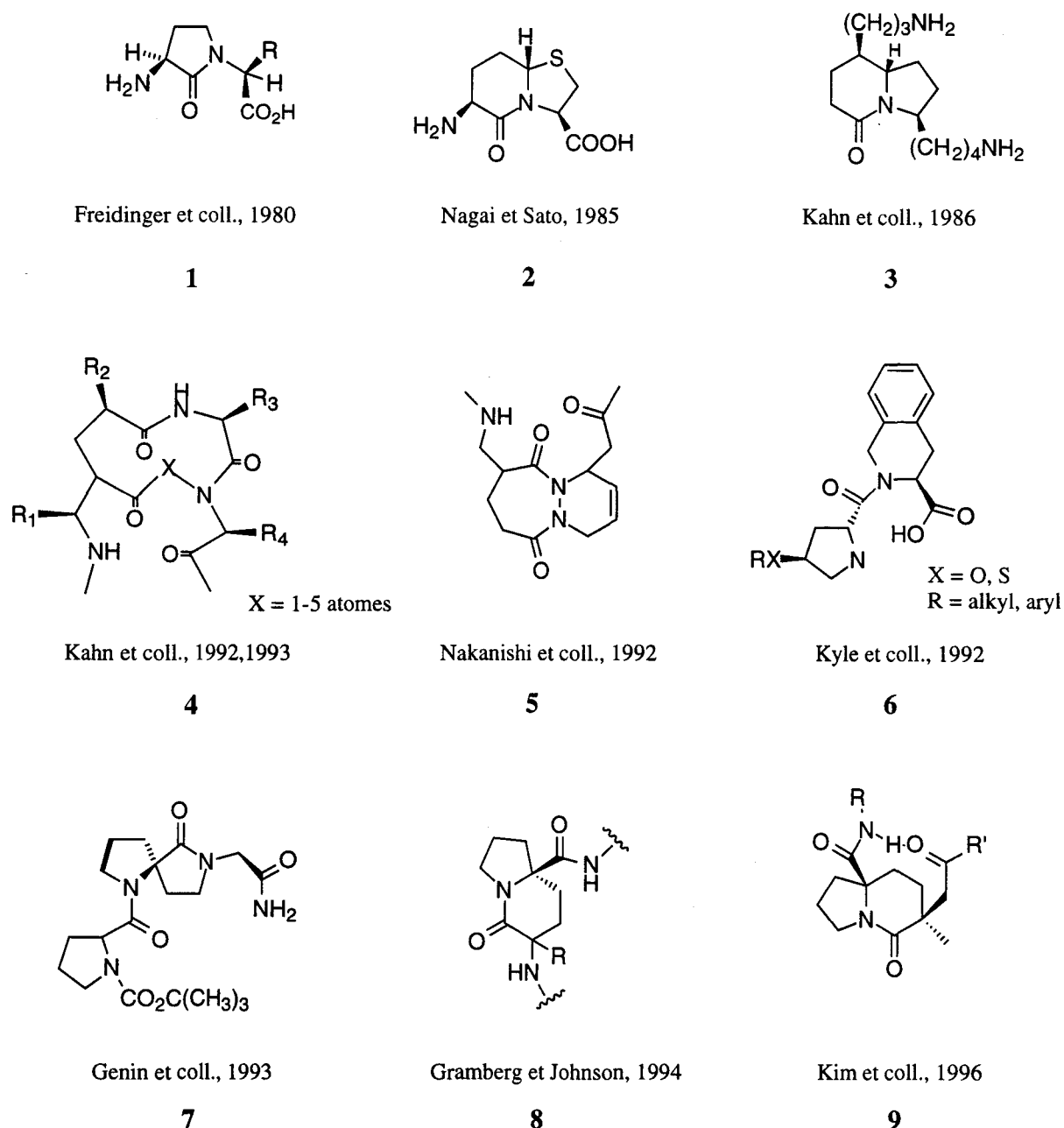


Figure 2 : mimes de coudes β utilisés pour la synthèse d'analogues de peptides actifs et l'étude de la relation structure/activité biologique

Comme nous l'avons précisé précédemment, le premier exemple d'un peptide modifié par un élément appliquant une contrainte conformationnelle a été décrit par FREIDINGER et coll. (1980). Dans cette étude, le γ -lactame **1** ($R = \text{CH}_2\text{CHMe}_2$) remplace Gly 6 et Leu 7 de LH-RH et l'activité agoniste est alors augmentée de 8,9 fois *in vitro* par rapport à la molécule non modifiée.

Le mime **2**, abrégé par **BTD** (*Bicycle Turned Dipeptide*) conçu au départ pour mimer un coude de type II' (NAGAI et SATO, 1985), a été introduit dans différents modèles : dans la gramicidine S (SATO et NAGAI, 1986; BACH et coll., 1991) dans différents peptides actifs (NAGAI et coll., 1993) ou encore dans une protéine la protéase de VIH-1 (BACA et coll., 1993). C'est, à notre connaissance, le seul exemple décrit de l'incorporation d'un élément non naturel dans une protéine par voie chimique. La protéine modifiée n'a pas été purifiée à homogénéité. Les tests biologiques indiquent que l'activité catalytique est partiellement conservée. La protéine modifiée présente, d'autre part, une résistance accrue à l'inactivation thermique. Aucune étude structurale n'a cependant été menée sur ce modèle.

L'équipe de KAHN a utilisé le squelette de l'indolizidinone pour concevoir le mime **3** qui a remplacé efficacement les résidus Lys et Arg d'un tripeptide immunosuppresseur (KAHN et DEVENS, 1986).

Le mime **4** et ses dérivés ont fait l'objet de nombreuses études. Un premier modèle avait été proposé (KAHN et coll., 1988b) mais c'est avec le modèle **4** que les applications se sont développées. L'analyse de la conformation active de l'enképhaline sur son récepteur a été réalisée en utilisant **4** pour mimer le coude (GARDNER et coll., 1993; SU et coll., 1993). Un peptide modifié, dérivé de **4** a permis de mimer les activités de reconnaissance et de liaison à un anticorps monoclonal (SARAGOVIC et coll., 1991). Un mime de coude β de ce type, remplaçant la partie Gln 40-Thr 45 du CD4, a également été obtenu et il inhibe la liaison de la glycoprotéine gp120 à son récepteur (CHEN et coll., 1992; RAMURTHY, et coll., 1994).

Le coude β centré sur les résidus Glu 11 et Gly 12, présent dans la conformation active de la fibronectine A quand elle est liée à la thrombine, a pu être identifié et mimé par grâce à **5** (NAKANISHI et coll., 1992).

KYLE et coll. (1992) ont proposé d'étudier la topologie de récepteurs de peptides à l'aide de **6**.

Le mime **7** a été conçu, dans un but plus structural, pour mimer les coudes β de type II (GENIN et coll., 1993) et, **8** et **9** les coudes β de type VI (GRAMBERG et ROBINSON, 1994; KIM et coll., 1996).

Il est également intéressant de signaler, pour la conception de mimes servant à l'étude de la relation structure/activité biologique, l'utilisation de dérivés de la proline (ZERKOUT et coll., 1994; LECOQ et coll., 1993), et celle de peptides hydrazine (AUBRY et coll., 1994).

1.2.2. Initiation de la formation de feuillets β

De façon à mieux comprendre la structure et le repliement des feuillets β (NESLONEY et KELLY, 1996a), des systèmes modèles ont été conçus. Pour obtenir un repliement défini, une approche consiste à concevoir un peptide qui aura la capacité de se structurer facilement. L'introduction d'éléments rigides facilitant le repliement a ainsi été utilisée dans des peptides pour tester leur capacité à adopter une structure définie en feuillets β (SCHNEIDER et KELLY, 1995b). Le premier exemple de molécule capable de servir de support à la formation d'un feuillet β a été conçu par KEMP et coll. (1990) sur le noyau de l'épindolidione (**10** Figure 3). Puis les essais se sont portés sur des molécules remplaçant les coudes et faisant la jonction entre les brins du feuillet. Les principaux exemples sont présentés à la Figure 3.

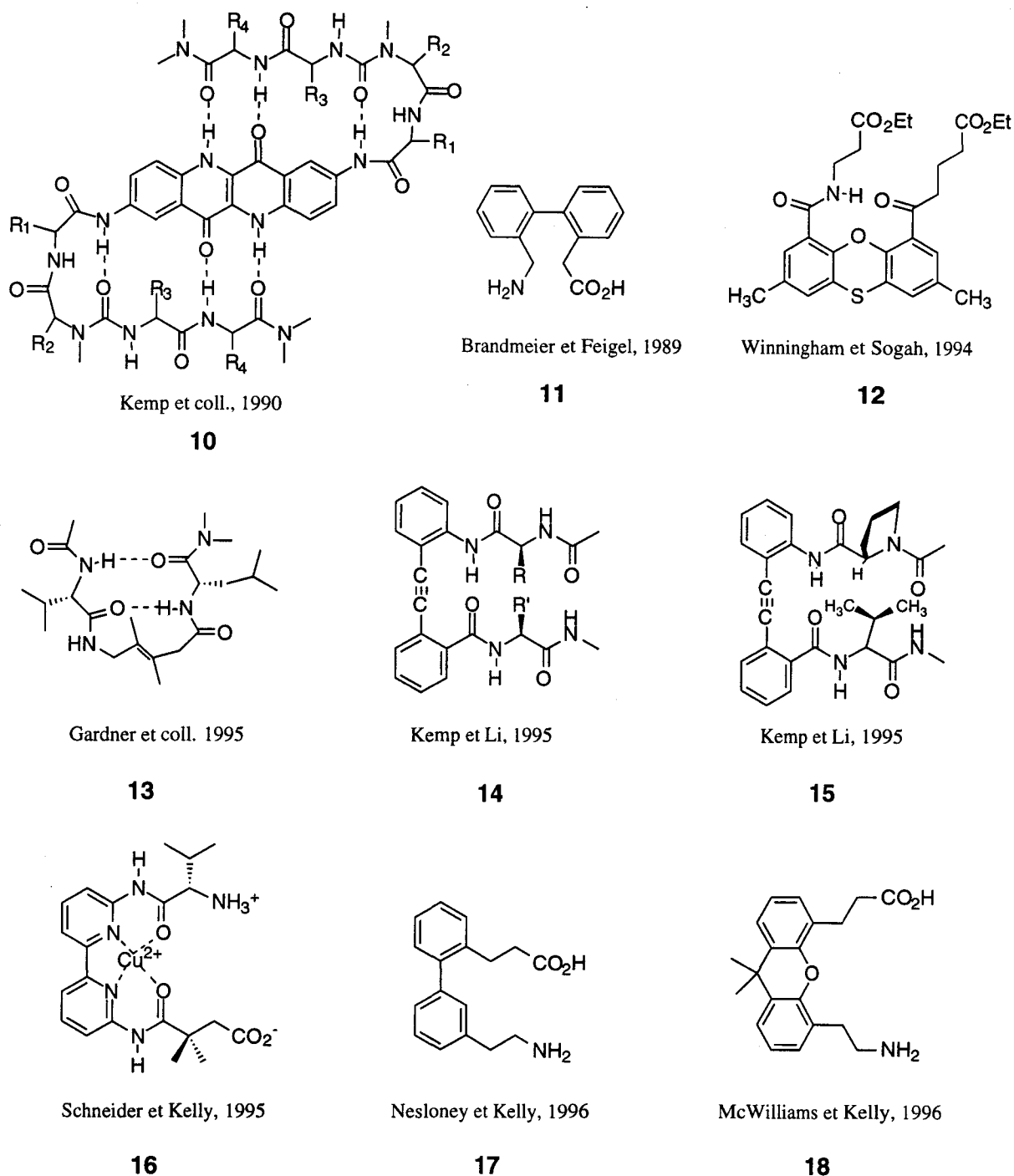


Figure 3 : mimes de coude β (excepté 10) nucléateurs ou nucléateurs potentiels de feuillet β .

Le mime 11 a été incorporé dans un peptide cyclique comprenant deux acides aminés naturels et deux acides aminés à structure biphenyle 11 (BRANDMEIER et FEIGEL, 1989). Les études de RMN montrent que le peptide obtenu se présente sous la forme d'un mélange de diastéréoisomères (au niveau des phényles) en équilibre entre des conformations de type feuillet β et coude γ . Des études réalisées dans des peptides de plus grande taille sont compatibles avec

une structure étendue mais des études complémentaires doivent être effectuées pour vérifier la présence d'un feuillet β .

La molécule **12** représente un nucléateur de feuillet β potentiel (WINNINGHAN et SOGAH, 1994). La liaison hydrogène est effective et pourrait donc permettre d'initier la formation d'un feuillet β .

La structure peptidique modifiée représentée en **13** et développée par GARDNER et coll. (1995) a été étudiée par RMN et FT-IR et se présente comme une structure compacte avec des liaisons hydrogène, favorable à l'établissement d'un feuillet β . Toutefois, sa caractérisation n'a pour l'instant été faite que dans CH_2Cl_2 .

Les unités **14** et **15** décrites par KEMP et LI (1995a,b) ont été analysées par RMN et dichroïsme circulaire. Les résultats obtenus sont compatibles avec une conformation en feuillet β court. Malgré la présence du résidu Pro dans **15**, les contacts NOE et les spectres de dichroïsme circulaire observés ne sont pas significativement différents de ceux obtenus avec **14**.

KELLY et coll. ont récemment publié d'autres exemples de nucléateurs potentiels de feuillet β . La molécule **16** a la particularité, lorsqu'elle est incorporée dans le peptide suivant : K-V-T-V-K-**16**-K-V-T-V-K-NH₂, de promouvoir la formation d'un feuillet β (caractérisé par dichroïsme circulaire) lorsqu'elle est liée à 1 éq. de Cu^{2+} en solution aqueuse à pH 9,5 (SCHNEIDER et KELLY, 1995a,b).

L'incorporation de **17** dans le peptide K-V-K-V-K-V-**17**-V-K-V-K-V-K-NH₂ permet, là, aussi la formation d'un feuillet. L'analyse par RMN révèle la présence d'un complexe hydrophobe entre les cycles aromatiques de **17** et les chaînes latérales des résidus Val directement adjacents. D'autre part, ce peptide s'auto-associe pour former des fibrilles de haut poids moléculaire (NESLONEY et KELLY, 1996a,b).

Le dernier nucléateur potentiel de feuillet β décrit par KELLY et coll. est basé sur la structure du diméthylxanthène (**18**). La capacité de **18** sous forme diamide à former une liaison hydrogène entre le NH et le CO du résidu xanthène a été démontré par RMN et IR-TF (MCWILLIAMS et KELLY, 1996). La capacité de formation de feuillet β de **18** doit maintenant être testée en l'incorporant dans des peptides.

L'élément le mieux décrit pour initier la formation de feuillet β est le dérivé du dibenzofurane, que nous n'avons pas encore présenté mais dont la description et les propriétés font l'objet du prochain paragraphe.

1.3. Le mime de coude β à structure dibenzofurane de KELLY et coll.

1.3.1. Conception et propriétés

Parmi les mimes de coudes β conçus pour initier la formation des feuillets β , le mime de coude β à structure dibenzofurane A (Figure 4) développé par l'équipe de KELLY est le mieux décrit.

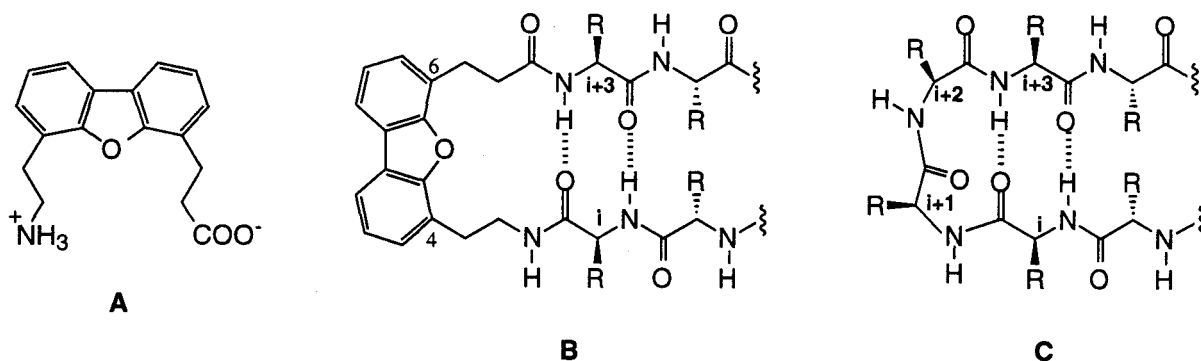
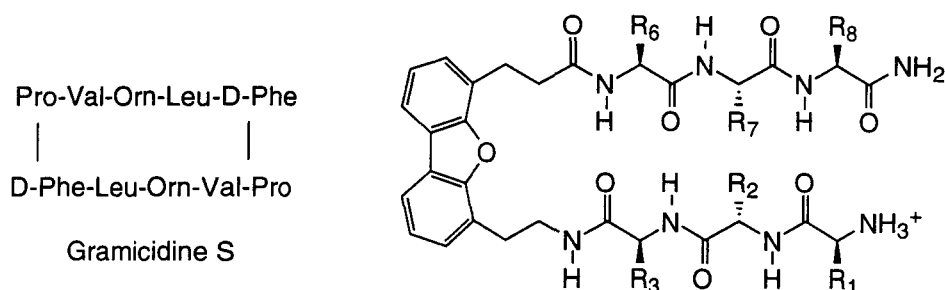


Figure 4 : A. Nucléateur de feuillet β à structure dibenzofurane (acide 4-(2-aminoéthyl)-6-dibenzofurane propanoïque). B. (A) remplace les résidus centraux $i+1$ et $i+2$ du coude β représenté en C.

Le but n'était pas de concevoir un mime qui ressemblerait à un coude β authentique mais de disposer d'une molécule capable d'inverser la direction de la chaîne polypeptidique, de promouvoir la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires et de favoriser l'établissement d'interactions hydrophobes tertiaires, ce qui devait permettre d'initier la formation d'un feuillet β . La conception de ce mime a, en fait, reposé sur les hypothèses proposées pour la formation des feuillets β . En effet, la formation de complexes hydrophobes entre les chaînes latérales des acides aminés, pendant les étapes précoces du repliement, est suggérée comme l'un des facteurs par lequel, une séquence d'acides aminés linéaire, verrait le nombre de ses voies de repliement possibles diminuer pour parvenir au repliement favorable (NESLONEY et KELLY, 1996). L'incorporation d'un élément rigide, comme la molécule A (Figure 4) devrait donc permettre de baisser le coût entropique nécessaire à la chaîne peptidique pour former le feuillet β . D'autre part, le « mime nucléateur » doit respecter la géométrie des feuillets β et permettre la formation des liaisons hydrogène. La distance de 4,85 Å séparant les carbones C4 et C6 de A (Figure 4 B) est compatible avec la distance séparant les deux brins d'un feuillet β anti-parallèle (4,9 Å) (DIAZ et KELLY, 1991).

Si l'on regarde de plus près la molécule **A**, deux possibilités de liaisons hydrogène sont envisageables : celle reliant le NH et le CO du mime formant un pseudo cycle à 13 chaînons, ou la liaison hydrogène représentée à la Figure 4 **B** formant un pseudo cycle à 15 chaînons. C'est cette dernière qui a été déterminée comme préférentiellement formée (DIAZ et coll., 1992). De plus, elle correspond à la liaison hydrogène que l'on peut trouver dans les coudes β entre le CO du résidu i et le NH du résidu $i+3$ (Figure 4 **C**).

Une autre condition devait également être remplie : tester la capacité du mime-DBF à former un complexe hydrophobe avec les chaînes latérales des acides aminés adjacents. Pour cela, deux paramètres ont été étudiés : la longueur des chaînes aliphatiques du mime et la nature des acides aminés adjacents. Les chaînes aminoéthyle et acide propanoïque (Figure 4 **A**, **B**) sont les seules favorables à la formation d'un complexe hydrophobe (TSANG et coll., 1994a). Pour déterminer les acides aminés permettant la formation du complexe hydrophobe, différents cas de figure ont été étudiés et ils sont résumés dans le Tableau 3.



Peptide	R ₁	R ₂	R ₃	R ₆ -R ₇	R ₆	R ₇	R ₈	Feuillet β
1	Val	Lys	Leu	A	Val	Lys	Leu-NH ₂	+
2	Val	Leu	Lys	A	Lys	Val	Leu-NH ₂	-
3	Lys	Val	Leu	A	Val	Leu	Lys-NH ₂	+
4	Val	Lys	Leu	A	Ala	Lys	Leu-NH ₂	±
5	Val	Lys	Ala	A	Ala	Lys	Leu-NH ₂	-
6	Val	Lys	Leu	A	Leu	Lys	Leu-NH ₂	+
7	Val	Lys	Leu	A	Phe	Lys	Leu-NH ₂	+
8	Val	Lys	Phe	A	Phe	Lys	Leu-NH ₂	+
9	Val	Lys	Leu	A	His	Lys	Leu-NH ₂	+
10	Val	Lys	His	A	His	Lys	Leu-NH ₂	+ (pH<7,5)
11	Val	Lys	Ala	A	His	Lys	Leu-NH ₂	-
12	Val	Orn	Leu	A	Val	Orn	Leu-NH ₂	+
13	Val	Orn	Leu	Gly-Gly	Val	Orn	Leu-NH ₂	-

Tableau 3 : Les peptides testés sont initialement basés sur la séquence de l'antibiotique gramicidine S, où le résidu ornithine a été substitué par le résidu Lys plus courant dans les protéines (peptide 1). Les deux résidus centraux des coudes (D-Phe -Pro) ont été enlevés et l'un des deux coudes est remplacé par A (Figure 1) (d'après SCHNEIDER et KELLY, 1995). La dernière colonne indique la présence de feuillet β.

La capacité des peptides-DBF (peptides où A a été incorporé) à former un feuillet β a été évaluée par dichroïsme circulaire (signal à 213 nm) et RMN (pour le peptide 1). Le peptide 1 a été plus particulièrement étudié. Tout d'abord, il a été montré qu'il se présentait en solution sous forme monomérique, par des expériences d'ultracentrifugation à l'équilibre, et par des analyses de dichroïsme circulaire faites sur une gamme importante de concentration (5-1000 μM) (TSANG et coll., 1994). Le spectre de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain est compatible avec une structure en feuillet β, accompagnée d'une proportion de peptide non structuré. L'analyse du spectre dans l'UV proche indique un signal caractéristique, attribué par les auteurs au chromophore dibenzofurane qui serait placé dans un milieu asymétrique, pouvant correspondre

à un complexe hydrophobe. Cela est confirmé par les expériences RMN. En effet, l'analyse des spectres NOESY révèle la présence de contacts NOE entre les protons aromatiques du mime et les protons des résidus Leu et Val adjacents au mime. De plus, les déplacements chimiques des protons de ces mêmes résidus sont déplacés vers les champs forts, sous l'influence magnétique du dibenzofurane. Ces informations suggèrent donc la présence d'un complexe hydrophobe, nécessaire d'après les auteurs, pour la formation du feuillet β (DIAZ et coll., 1992). Un contact NOE entre les deux brins pouvant correspondre à un contact entre le NH de Leu (R3) et NH de Val (R6) a également été observé mais n'a pas pu être attribué avec certitude à cause du recouvrement (TSANG et coll., 1994).

D'autres acides aminés ont été incorporés en position adjacente à A pour déterminer l'importance de leur nature (Tableau 3). Il apparaît nécessaire que ces résidus possèdent un caractère hydrophobe (peptides **1**, **3**, **6**, **12**) et ils peuvent être aromatiques (peptides **7**, **8**). Le méthyle constituant la chaîne latérale du résidu Ala n'est pas suffisant pour la formation d'un complexe hydrophobe organisé et la nucléation du feuillet β (peptides **4** et **5**).

Le résidu His peut, dans une gamme de pH où le cycle imidazole est protoné ($\text{pH} < 7,5$), interagir selon des interactions de type cation- π et ainsi former un complexe permettant l'initiation de la formation d'un feuillet β (peptide **10**) (GRACIANI et KELLY, 1994). La situation où l'on trouve un seul résidu His, accompagné d'un résidu hydrophobe comme Leu, n'est plus dépendante du pH car elle bénéficie de la présence de Leu qui maintient un complexe hydrophobe et une structure partielle en feuillet β (peptide **9**). Dans le cas du peptide **11**, le manque d'interaction du méthyle de Ala avec le dibenzofurane ne permet pas le maintien de ce complexe.

La corrélation qui existe entre la formation du complexe hydrophobe et la nucléation de feuillet β apporte, d'après les auteurs, des arguments en faveur de l'importance de cette caractéristique structurale.

La présence de deux résidus Lys adjacents au mime ne permet pas au peptide correspondant (peptide **2**) de se structurer en feuillet β . Les auteurs notent que la comparaison des peptides **1** et **2**, réalisée à l'aide des modèles CPK, révèle que la partie aliphatique de la chaîne latérale de Lys ne prend pas une place suffisamment importante pour interagir avec le dibenzofurane. Cela expliquerait l'absence de formation du complexe hydrophobe (TSANG et coll., 1994). Cependant, le peptide : V-K-V-K-V-K-A-K-V-K-V-K-V-NH₂ est capable de se structurer en feuillet β mais à des pH supérieurs à 8,5 (CHOO et coll., 1996). A ces valeurs de pH, la fonction amine de la chaîne de la Lys serait suffisamment neutralisée pour permettre à celle-ci d'interagir plus efficacement avec le dibenzofurane.

Le remplacement de Lys par un résidu ornithine (Orn) ne modifie pas la capacité de formation du feuillet β (peptide **12**). D'autre part, le remplacement de A (Figure 4) par deux résidus Gly montre que la structuration en feuillet β est bien due à la présence de A (comparaison des peptides **12** et **13**) (DIAZ et coll., 1993b).

La synthèse d'un peptide plus grand (tridécapeptide : K-V-K-V-K-V-A-V-K-V-K-V-K-NH₂) a été réalisée et l'analyse par dichroïsme circulaire suggère une structure en feuillet β bien établie (DIAZ et coll., 1993). Cependant le peptide n'est pas monomérique mais serait tétramérique d'après les analyses par ultracentrifugation.

1.3.2. Conclusion

Le nucléateur de feuillet β à structure dibenzofurane A présente donc la capacité de promouvoir la formation d'un feuillet β anti-parallèle en solution. Il est nécessaire pour cela de veiller à la présence d'acides aminés à chaîne latérale hydrophobe, ou la présence de deux résidus His, ou d'un seul avec un résidu hydrophobe. Les chaînes latérales de ces acides aminés forment un complexe hydrophobe avec la partie aromatique dibenzofurane de A, ce qui, d'après les auteurs, serait nécessaire pour la nucléation du feuillet β .

Mais ces règles sont établies dans des peptides, et les peptides en eux mêmes ne représentent pas des mimes absolus de protéines. Nous nous sommes donc attachés à étudier le comportement de A dans le contexte d'une protéine.

Au niveau de la terminologie employée pour A, il est plus adapté de parler de « nucléateur » dans le cas des travaux de KELLY qui recherche les conditions nécessaires à l'établissement d'un feuillet β . Nous avons choisi le terme de « mime » (mime-DBF) dans le cas de l'incorporation de cette molécule dans les deux protéines que nous avons retenues.

2. SYNTHÈSE PEPTIDIQUE

2.1. Introduction

L'outil nous permettant d'aborder l'élaboration de peptides et de protéines modifiées est la synthèse peptidique en phase solide (SPPS). D'une manière générale, l'intérêt que constitue les peptides, tant au niveau thérapeutique qu'au niveau de l'étude de la relation structure activité biologique par exemple, a contribué au développement de la SPPS. Il est en effet nécessaire de produire les peptides facilement et quelquefois en quantité importante. Le principe de la SPPS, tel que l'a introduit MERRIFIELD en 1963, permet l'obtention de peptides dans des conditions ayant permis facilement l'automatisation.

L'utilisation *in vivo* de peptides composés d'acides aminés naturels se heurte cependant au problème du temps de demi-vie qui est relativement faible à cause de la dégradation du peptide par des protéases endogènes. L'introduction de modifications, comme la présence d'acides aminés de la série D ou d'éléments non naturels permet de diminuer le phénomène. La SPPS est une technique suffisamment souple pour permettre l'incorporation de molécules non naturelles dans la chaîne peptidique. Et nous verrons, après quelques rappels sur les principes de base sur la SPPS, dans quelle mesure cela peut être fait, et quelles sont les contraintes.

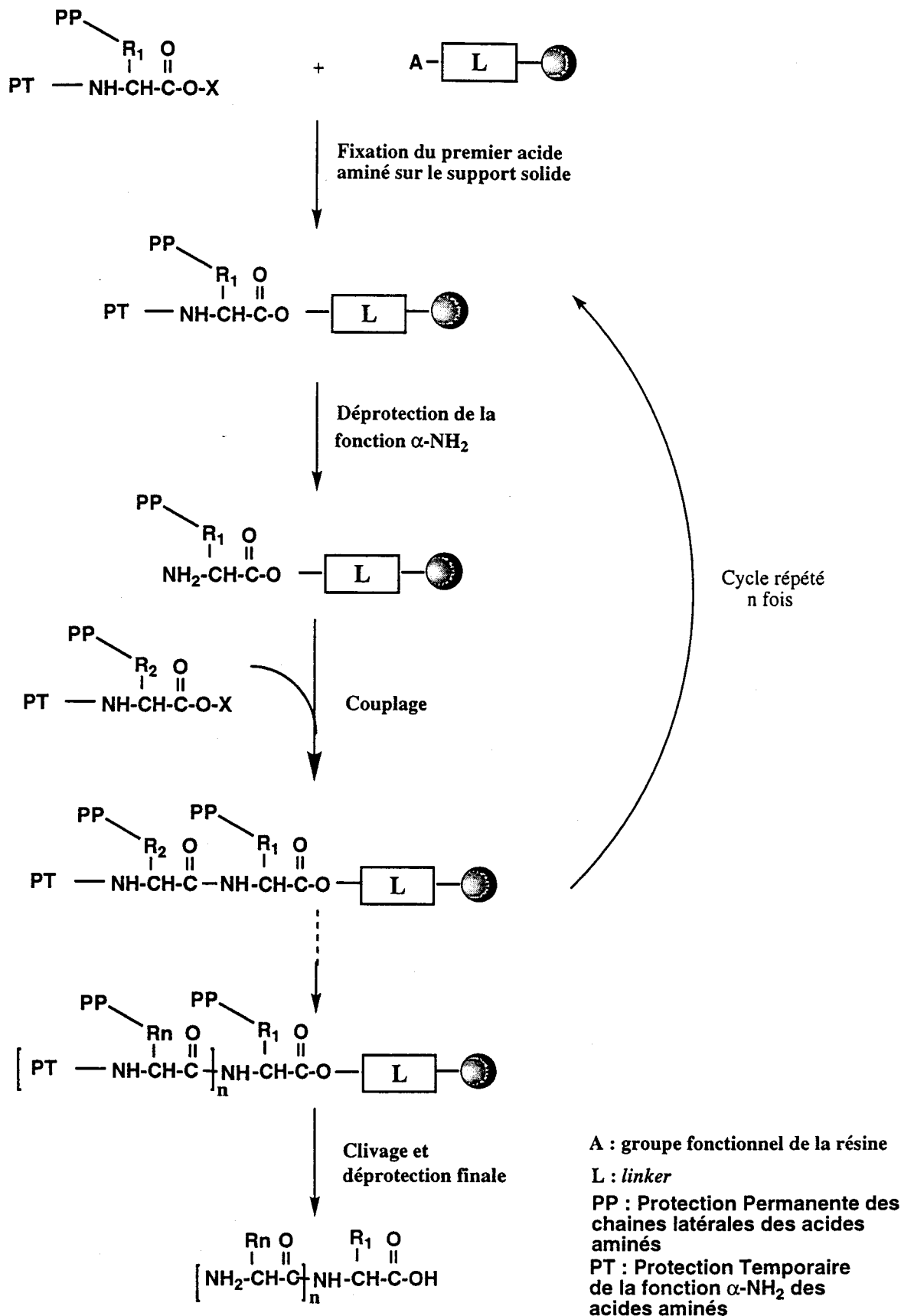


Schéma 1

2.2. Principe

Le concept de synthèse peptidique en phase solide introduit par Merrifield est basé sur l'utilisation d'un support polymérique insoluble (résine) sur lequel s'effectue l'addition séquentielle d'acides aminés. La synthèse d'un peptide se fait, en général, de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale. Les acides aminés incorporés sont protégés sur leur fonction α -NH₂ par une protection dite temporaire : *t*-butyloxycarbonyle (Boc) ou 9-fluorenylméthoxyloxycarbonyl (Fmoc). Le choix de la protection temporaire détermine la « stratégie » ou « chimie » utilisée pour la synthèse du peptide et le choix des protections des chaînes latérales dites « protections permanentes ». En effet, certains acides aminés possèdent une chaîne latérale dont la fonction peut réagir lors des réactions de couplage. Les protections permanentes devront rester stables tout au long de la synthèse et ne seront clivées, en général, qu'au moment de la coupure de la liaison peptide-résine.

Le schéma 1 décrit le principe de la SPPS :

- le premier acide aminé est fixé au support solide par sa fonction acide carboxylique après activation;
- les cycles de déprotection et de couplage sont répétés *n* fois jusqu'à l'obtention du peptide désiré
- en fin de synthèse les fonctions des chaînes latérales sont déprotégées et la liaison peptide-résine est rompue.

L'utilisation d'un support insoluble permet de simplifier les protocoles de synthèse car les purifications intermédiaires ne sont plus possibles. Des lavages successifs de la résine permettent d'éliminer les excès de réactifs et certains produits secondaires de réaction. Il en résulte un gain de temps.

2.3. Synthèse

2.3.1. Stratégies de synthèse peptidique en phase solide

La nature du groupement protecteur de la fonction α -NH₂ des acides aminés détermine le choix des groupes protecteurs des chaînes latérales, et du réactif de coupure de la liaison peptide-résine. Les deux stratégies de protection temporaires principalement utilisées sont basées sur des fonctions de type uréthane que l'on retrouve dans les groupements Boc ou Fmoc.

2.3.1.1. Stratégie Boc

Le groupement *t*-butyloxycarbonyl, mis au point par MERRIFIELD (1963), est clivé par les acides forts comme l'acide trifluoroacétique et l'acide fluorhydrique mais il est insensible à l'hydrogénolyse. Le Schéma 2 indique le mécanisme de clivage par acidolyse. La libération d'un cation *t*-butyle peut nécessiter l'utilisation d'une molécule piégeant le carbocation (*scavenger*) comme l'éthanedithiol pour éviter l'alkylation de chaînes latérales sensibles.

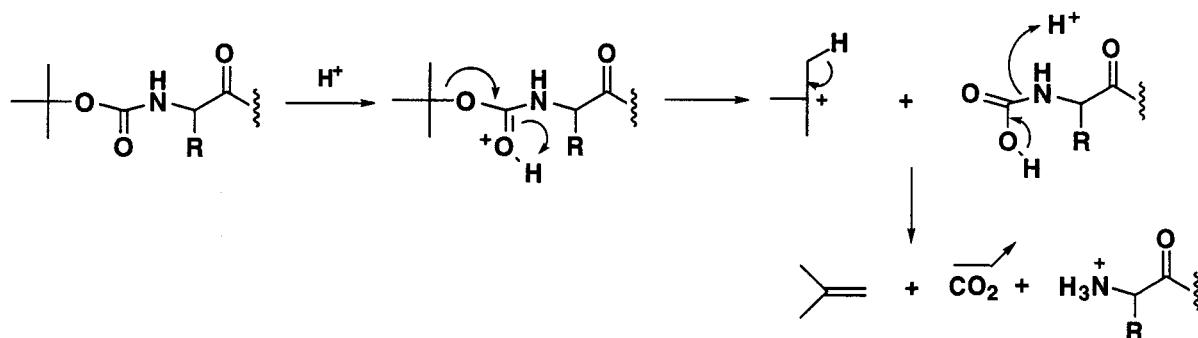


Schéma 2

2.3.1.2. Stratégie Fmoc

Introduit un peu plus tard par CARPINO et HAN (1970, 1986), le groupe fluorenylmethyloxycarbonyl est quant à lui clivé, par β -élimination en milieu basique selon le Schéma 3. La base la plus utilisée est la pipéridine. La réaction de déprotection peut être suivie en mesurant l'absorption à 300 nm de l'adduit A formé entre le dibenzofulvène et la pipéridine. Ce système de détection peut être installé directement sur le synthétiseur.

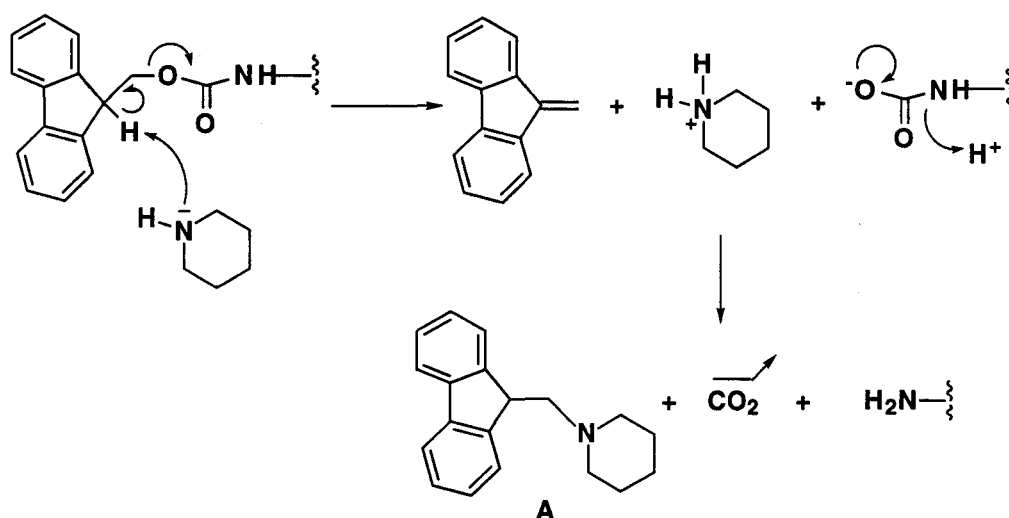


Schéma 3

2.3.2. Protection des chaînes latérales des acides aminés

Les groupes protecteurs des chaînes latérales, dites protections permanentes, doivent être stables pendant la synthèse et donc pendant les étapes de clivage des protections temporaires. Elles sont en général clivées au cours de l'étape de coupure de la liaison peptide-résine.

2.3.2.1. Stratégie Boc

Les groupes protecteurs utilisés dans le cas d'une stratégie Boc doivent être stables aux traitements répétés au TFA et pouvoir être clivés lors du traitement HF final : le groupe benzyle pour la protection de la fonction hydroxyle des acides aminés Ser et Thr, le groupe cyclohexyle pour la fonction acide carboxylique des acides aminés Asp et Glu. Le tryptophane peut être protégé par un groupe formyle. D'autres protections existent pour les autres acides aminés, mais il apparaît que leur choix doit aussi se faire en fonction du type de synthèse et de la longueur du peptide à synthétiser.

2.3.2.2. Stratégie Fmoc

Les groupes protecteurs utilisés dans le cas d'une stratégie Fmoc doivent être stables à l'action de la pipéridine et clivés en présence de TFA lors de la coupure finale. Ils sont de type *t*-butyle, pour la protection de la fonction hydroxyle de Ser, Thr, de la fonction acide carboxylique des acides aminés Asp et Glu. Là aussi les protections doivent être adaptées au type de synthèse envisagée.

2.3.3. Support solide et liaison peptide-résine

2.3.3.1. Le support solide

Le rôle du support solide est important. Il doit répondre aux critères suivants :

- être inerte vis-à-vis des réactifs utilisés en cours de synthèse;
- permettre la diffusion rapide des solvants et réactifs par un gonflement adéquat de la résine;
- porter une fonction réactive permettant la fixation du premier acide aminé.

Le support le plus couramment utilisé est un support polystyrène réticulé avec 1% de divinylbenzène. Cette composition s'est révélée être le meilleur compromis pour obtenir un polymère suffisamment solide pour résister aux multiples étapes de filtration intervenant en SPPS, tout en permettant un gonflement correct de la résine. Cependant, d'autres types de

supports sont maintenant disponibles. Ils ont été conçus dans le but de disposer d'un polymère de polarité comparable à celle d'une chaîne peptidique, et favoriser une solvataion optimale des deux types de chaînes polymériques (résines de type polyamide). Des résines plus élaborées de type polyacrylamide renforcée avec une structure poreuse inorganique ont été mises au point pour répondre aux contraintes physiques de certains types d'applications comme la synthèse en flu continu.

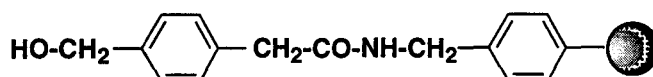
2.3.3.2. Fonctionnalisation du support

La fonctionnalisation du support permet l'introduction d'un bras espaceur (*linker*) dont la fonction est de faire le lien entre le peptide et le support solide. La nature du *linker* permet l'obtention, après clivage de la liaison peptide-résine, de peptides dont la nature de l'extrémité C-terminale peut varier de la fonction acide carboxylique classique : elle peut être amide, hydrazide, etc. La conception de *linkers* labiles en conditions faiblement acides s'est également développée pour obtenir des peptides protégés utilisables en couplage de fragments lors de synthèses convergentes.

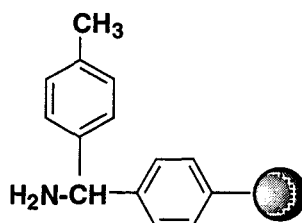
Le choix du type de fonctionnalisation de la résine dépend de la stratégie envisagée pour la synthèse.

2.3.3.2.1. Stratégie Boc

En stratégie Boc, la liaison reliant la fonction acide carboxylique du premier acide aminé à la résine doit résister aux traitements répétés de TFA mais doit être clivée par HF anhydre. C'est une liaison de type ester benzylique qui est généralement retenue. Une résine classiquement rencontrée est la résine PAM (4-(hydroxyméthyl)phénylacétamidométhyl) :

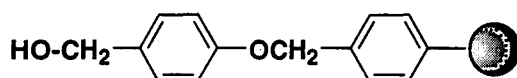


La synthèse de peptides possédant une extrémité amidée peut être réalisée à partir de résines MBHA (4-méthylbenzhydramine) :

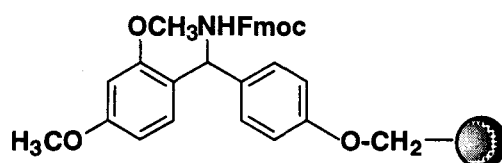


2.3.3.2.2. Stratégie Fmoc

Dans le cas de la stratégie Fmoc, la liaison intervenant entre le premier acide aminé et la résine est aussi de type ester benzylique mais elle doit être clivée par le TFA et stable en milieu basique. L'effet mésomère donneur de l'éther de phénol augmente la sensibilité aux acides. La résine de Wang (4-benzyloxybenzyl alcool) est très utilisée pour la synthèse de peptides dont l'extrémité doit être obtenue sous forme acide carboxylique libre :



Les peptides possédant une extrémité amidée peuvent être synthétisés à partir d'une résine amide Rink (4-(2',4'-diméthoxyphényl-Fmoc-aminométhyl)-phénoxy) :



2.3.4. Méthodes de couplage

La formation de la liaison amide reliant deux acides aminés nécessite l'activation de la fonction α -COOH de l'acide aminé N- α protégé à coupler. L'activation se fait par l'intermédiaire d'anhydrides ou d'esters activés.

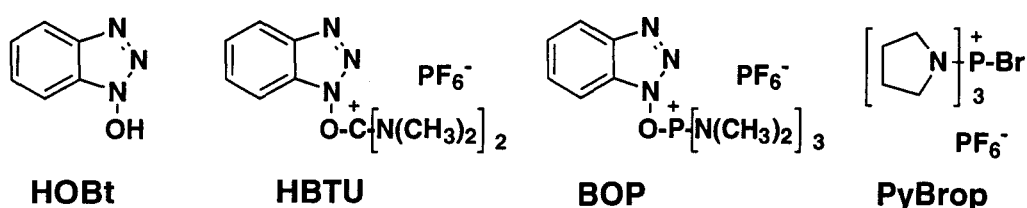
2.3.4.1. Le dicyclohexylcarbodiimide

Le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) a été le premier agent couplant utilisé par Merrifield et est resté très populaire. Il permet l'activation de la fonction acide via la formation d'une O-

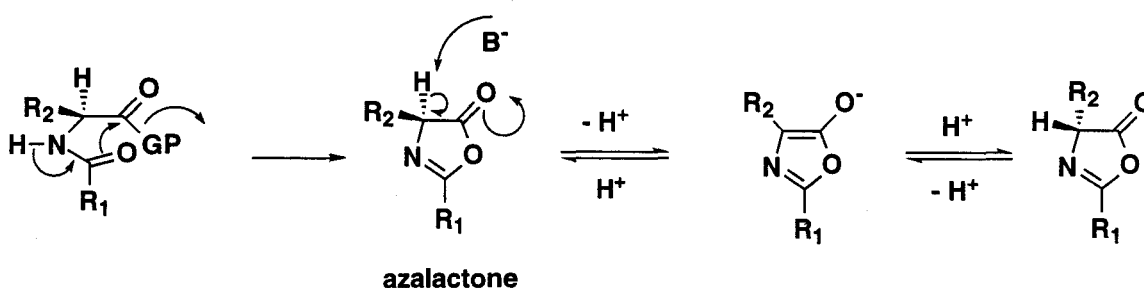
acylisourée, en présence d'un équivalent d'acide aminé, ou d'un anhydride symétrique, en présence de deux équivalents d'acide aminé. La DCC comporte quelques désavantages : une utilisation peu pratique, un produit secondaire, la dicyclohexylurée (DCU), pas toujours facile à éliminer, et une tendance à provoquer la déshydratation des résidus Asn et Gln, que l'on peut éviter par l'addition d'HOBt. D'autres carbodiimides sont également employés, comme par exemple, le diisopropylcarbodiimide (DIC). Il se présente sous forme liquide, il est donc plus facile à prélever et l'urée formée est plus soluble dans le dichlorométhane que la DCU.

2.3.4.2. Les esters activés

Les esters activés peuvent être par exemple des esters pentafluorophényl, esters d'HOBt. Ces derniers peuvent être obtenus à partir de différents réactifs comme l'HBTU, le BOP (CASTRO et coll., 1975), le PyBOP, qui sont parmi les plus utilisés. Le PyBrop (COSTE et coll., 1990, 1991) est un autre type d'agent activant qui a été développé plus récemment. Il semble présenter moins de risques de racémisation et être très efficace.



Remarque : les études menées pour le développement de nouveaux agents d'activation ont bien sûr pour but d'augmenter leur efficacité pour obtenir les meilleurs rendements de couplage possibles, important en synthèse peptidique, et aussi pour éliminer le problème de la racémisation. Une des causes de la racémisation est la formation d'azalactone. Elle se forme lors des couplages, à partir des acides activés, et possède un hydrogène acide pouvant être attaqué par une base B^- :



GP : groupe partant (ex. : ^-OBt)

2.3.5. Suivi de synthèse

L'efficacité du couplage d'un acide aminé peut être appréciée à l'aide d'un test mettant en jeu une réaction colorimétrique entre des fonctions amines libres et un réactif comme par exemple la ninhydrine (test de Kaiser) (KAISER et coll., 1970), l'acide trinitrobenzènesulfonique (TNBS) (HANCOCK et coll., 1976) ou l'acide picrique (ARAD et HOUGHTEN, 1990). Le test de Kaiser (SARIN et coll., 1981) et le test à l'acide picrique permettent une mesure de la quantité d'amines libres et donne donc accès au rendement de couplage.

La composition en acides aminés de la peptidyl-résine peut, par ailleurs, être déterminée à différents moments de la synthèse après hydrolyse acide totale et analyse d'acide aminé d'un échantillon. Cela permet de suivre l'évolution de l'incorporation des acides aminés en cours de synthèse.

2.3.6. Coupure de la liaison peptide-résine et déprotection des chaînes latérales

Dans les deux stratégies Boc et Fmoc, la réaction de coupure de la liaison peptide-résine implique également la déprotection de la plupart des chaînes latérales fonctionnalisées. Il y a donc libération de cations réactifs (cations *t*-butyles, benzyles, etc) pouvant alkyler le peptide. La présence de molécules (*scavengers*) piégeant ces carbocations est donc indispensable.

2.3.6.1. Stratégie Boc

Le clivage de la liaison peptide-résine implique l'emploi d'un acide fort : HF anhydre. A température ambiante, c'est un gaz extrêmement dangereux qu'il convient de manipuler dans un appareillage spécial, en téflon, et avec beaucoup de précautions.

La coupure HF standard procède selon un mécanisme de type SN1. Les carbocations libérés sont piégés par des *scavengers* : anisole, diméthylsulfure (DMS), thioanisole, *p*-thiocrésol ou thiophénol. Le choix des *scavengers*, de la température, du temps de réaction dépend de la séquence en acides aminés du peptide.

Lorsque de faibles concentrations en HF sont utilisées avec une quantité équimolaire de DMS par exemple, le mécanisme de clivage est alors de type SN2. Certaines chaînes latérales sont déprotégées tout en évitant des réactions d'alkylation par les carbocations benzyles ou *t*-butyles, et cela permet, en présence de DMS, la réduction de la méthionine sulfoxyde. A l'issue de ce protocole, le peptide étant toujours fixé à la résine et certaines chaînes latérales toujours protégées, il faut ensuite procéder à la coupure HF standard.

- Remarques :**
- 1 - Il est nécessaire d'enlever le groupe Boc de l'acide aminé N-terminal ainsi que le groupe formyl de Trp (par un traitement basique à la pipéridine) avant de procéder à la coupure finale.
 - 2 - Une alternative à l'utilisation de HF anhydre est l'acide trifluorométhanesulfonique (TFMSA).

2.3.6.2. Stratégie Fmoc

L'acide fort généralement utilisé pour le clivage peptide-résine est le TFA. Dans ce cas aussi, l'emploi de *scavengers* est nécessaire (anisole, *m*-crésol, DMS, éthanedithiol, H₂O, phénol, thianisole, *p*-thiocrésol ou thiophénol). Les conditions de déprotections (température, temps, choix des *scavengers*) se font en fonction des acides aminés présents dans le peptide.

Remarque : Le groupe Fmoc de l'acide aminé N-terminal doit être enlevé avant la réaction de coupure finale.

2.3.7. Conclusion

2.3.7.1. Comparaison des stratégies Fmoc et Boc

La stratégie Boc comporte un certains nombres de désavantages. Les traitements TFA répétés pour les étapes de déprotection conduisent à des réactions secondaires et peuvent altérer les liaisons sensibles. De plus l'emploi de HF est peu commode et dangereux. La stratégie Fmoc a, quant à elle, souffert des prix élevés des réactifs mais de nombreux progrès en méthodologie et en production ont contribué à son développement. Les conditions de mise en oeuvre sont plus faciles que pour la stratégie Boc et des études montrent sa supériorité dans nombre de cas (FIELDS et coll., 1990). Cependant, la réussite d'une synthèse dépend aussi de la séquence du peptide à synthétiser, et la stratégie à adopter doit donc s'y adapter.

2.3.7.2. Compatibilité du mime avec la SPPS

Connaissant les caractéristiques des deux stratégies Boc et Fmoc, il était nécessaire de vérifier la compatibilité du mime-DBF avec les méthodes utilisées en SPPS.

a - Stratégie Boc

La stratégie Boc a été utilisée par KELLY (1994) pour incorporer le mime dans de petits peptides et aucun problème particulier n'avait été mentionné. Or, lors d'une première tentative de synthèse de la scyllatoxine en stratégie Boc, nous avons constaté après analyse du brut de coupure par HPLC et spectrométrie de masse, la présence de fragments tronqués ayant subi une réaction d'alkylation. Le site le plus probable pour cette réaction est la partie aromatique dibenzofurane du mime-DBF. Il était donc nécessaire de prévenir cette alkylation par l'utilisation d'un *scavenger* et nous avons choisi le dibenzofurane. Celui-ci devra être utilisé à chaque étape de déprotection du groupement Boc qui suit l'incorporation du mime-DBF.

b - Stratégie Fmoc

En stratégie Fmoc, c'est pour l'étape finale de déprotection et de coupure de la liaison peptidyl-résine, où il y a entre autre libération de carbocations *t*-butyles, qu'il est nécessaire d'ajouter du dibenzofurane aux *scavengers* habituels.

D'autre part, la préparation du dérivé Fmoc du mime-DBF est difficile à cause de sa faible solubilité, ce qui pose également problème lors de son couplage.

c - Formation des ponts disulfure

Pour la synthèse de la scyllatoxine-DBF, nous envisageons une première stratégie de synthèse où les cystéines seront toutes protégées avec le groupement trityle et une seconde où elles seront protégées de façon orthogonale. Les groupements protecteurs envisagés sont : trityle (Trt), méthoxybenzyle (Mob) et acétamidométhyle (Acm). Les conditions nécessaires à la déprotection sélective du groupement Acm et à la formation du pont disulfure nécessitent l'utilisation d'iode. Il fallait donc vérifier la stabilité du mime-DBF vis-à-vis de l'iode. L'étude a été menée sur un composé apparenté au mime-DBF : l'acide 4,6-dibenzofurane propanedioïque. Celui-ci a été placé en présence de 1,4 éq. d'iode dans le mélange acide acétique / D₂O (80/20) et le suivi par RMN ¹H pendant 14 jours n'a révélé aucune évolution. Cette stratégie de protection pouvait donc être envisagée.

PARTIE I

***NOUVELLE APPROCHE DE LA SYNTHÈSE DU MIMÈ
DE COUDE β A STRUCTURE DIBENZOFURANE***

PARTIE I

NOUVELLE APPROCHE DE LA SYNTHÈSE DU MIME DE COUDE β A STRUCTURE DIBENZOFURANE

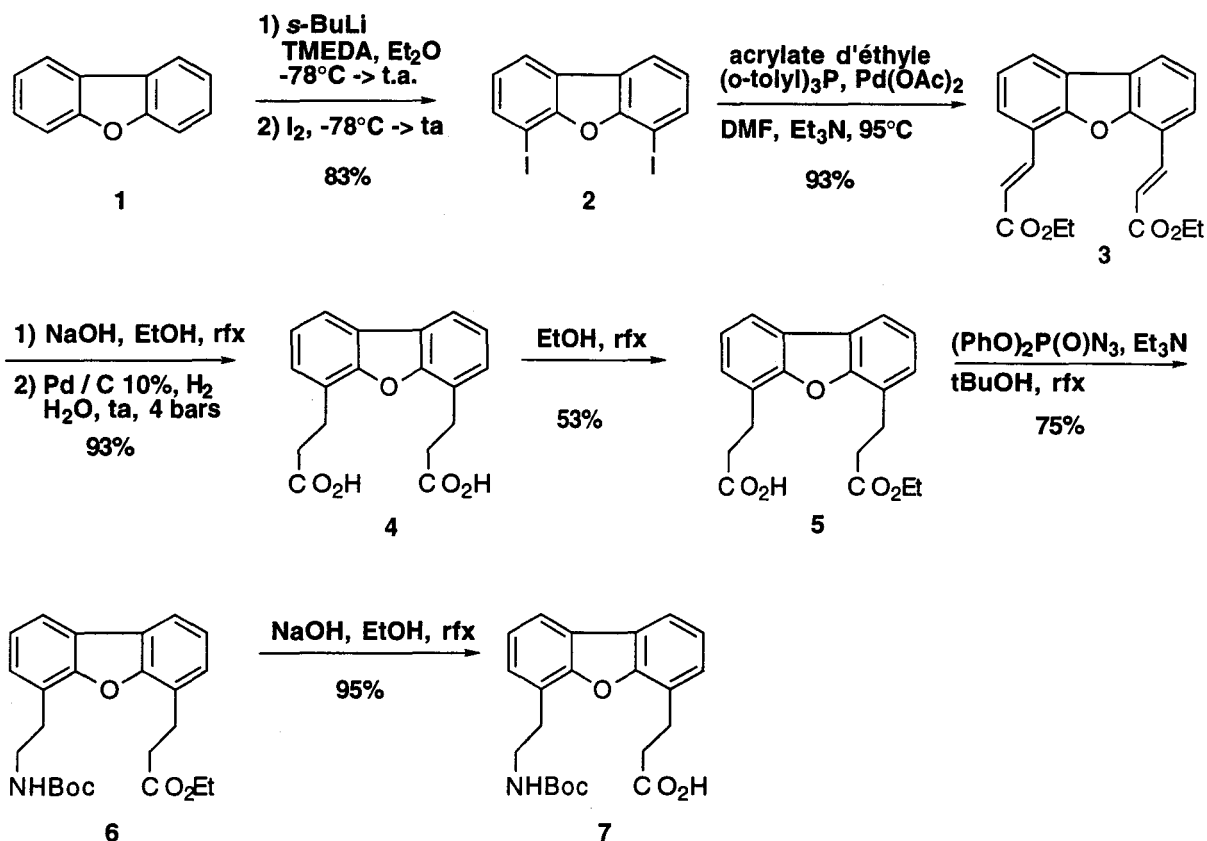
Introduction

La synthèse du mime de coude β à structure dibenzofurane (mime-DBF) a été décrite par KELLY et coll. en 1994. Comme nous le verrons, celle-ci comporte des inconvénients, et nous proposons une nouvelle approche de synthèse afin de les réduire. Le nouveau schéma de synthèse repose sur une réaction de lithiation impliquant une compétition entre deux groupements directeurs. Après avoir rappelé la synthèse décrite par KELLY et coll., nous présenterons le nouveau schéma, l'étude de la régiosélectivité de réaction de lithiation ainsi que des possibilités de fonctionnalisation du mime-DBF.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE DU MIME DE COUDE β A STRUCTURE DIBENZOFURANE D'APRES J. KELLY

Le Schéma 1 décrit la synthèse conçue et réalisée par l'équipe de J. KELLY (TSANG et coll., 1994). Elle comprend 7 étapes avec un rendement global de 27%. Le dibenzofurane subit d'abord une réaction de dilithiation (*s*-BuLi et TMEDA à -78°C) puis un piégeage par l'iode pour former le dérivé 4,6 diiodo-dibenzofurane **2**. Celui-ci est soumis à une réaction de HECK avec l'acrylate d'éthyle, catalysée au palladium. L'ester éthylique α,β -insaturé **3** est ensuite saponifié et hydrogéné pour former le diacide symétrique **4**, qui est mono-estérifié et converti en *t*-butyl carbamate grâce à un réarrangement de SCHMIDT. La saponification de l'ester **6** permet l'obtention du mime **7**. Le mime est ainsi directement utilisable en synthèse peptidique (stratégie Boc/benzyle) puisqu'il est protégé au niveau de la fonction amine primaire par un groupement Boc. Cette synthèse comporte des désavantages, notamment lors de la dissymétrisation par la réaction de mono-estérification (transformation de **4** en **5**) qui est une étape limitante (53 % de rendement).

D'autre part, cette synthèse permet difficilement l'accès à des analogues du mime comportant des fonctionnalités rendant le mime plus hydrophile par exemple. Un autre schéma de synthèse a donc été proposé.

Schéma 1 : Synthèse du mime de coude β à structure dibenzofurane décrite par KELLY et coll.

CHAPITRE II : NOUVELLE APPROCHE DE SYNTHÈSE DU MIME A STRUCTURE DIBENZOFURANE

2.1. Nouveau schéma de synthèse

La mise au point d'une nouvelle synthèse doit répondre à un certain nombre d'exigences. Etant donné la nécessité de disposer d'une quantité importante de mime pour son utilisation en synthèse peptidique, le schéma de synthèse envisagé doit comporter un nombre minimal d'étapes avec des réactions faciles à mettre en oeuvre. D'autre part, il est très intéressant d'avoir accès à des analogues fonctionnalisés du mime. La nouvelle approche (Schéma 2) propose donc une synthèse en 4 étapes où la dissymétrisation intervient sur le produit de départ : le dibenzofurane. Des analogues peuvent être obtenus à partir du composé nitro $\alpha\text{-}\beta$ insaturé **10**, et en fonctionnalisant la partie aromatique par des réactions de métallation successives (SNIIECKUS, 1990a).

La dissymétrisation est donc envisagée dès la première étape par une réaction de monolithiation du noyau dibenzofurane. Le dérivé mono-lithié formé réagit avec le DMF pour donner l'intermédiaire **8** où l'effet *ortho*-directeur du groupe α -N,N-diméthylaminoalcoxy devra être minimisé lors de la deuxième réaction de lithiation. En effet, au niveau de l'intermédiaire **8** les effets de deux groupements *ortho*-directeurs vont entrer en compétition : l'oxygène du dibenzofurane et le groupement α -N,N-diméthylaminoalcoxy. Afin d'optimiser la régio-sélectivité de la deuxième étape de lithiation différents paramètres ont été testés : la température, le temps de réaction, la nature et la stoechiométrie de l'agent de lithiation, la composition du solvant. Le but de l'optimisation est d'obtenir les conditions les plus abordables possibles : temps de réaction et conditions de température raisonnables, minimum de purifications intermédiaires; c'est-à-dire obtenir, à l'issue d'une séquence réactionnelle *one pot*, un dérivé du dibenzofurane 4,6 disubstitué et dissymétrique.

La chaîne portant l'acide carboxylique est introduite par une addition 1,4 de l'intermédiaire **8**, ayant subi la lithiation, sur un acrylate silylé. La présence de l'atome de silicium devrait faciliter la réaction, car son effet électroattracteur stabilise l'anion formé en position α (SOMMER et coll., 1954), et minimiser la polymérisation car l'anion est rendu moins réactif. La chaîne amino-éthyle est quant à elle obtenue par condensation du nitrométhane sur l'aldéhyde **9** pour former un composé possédant une fonction nitro α - β insaturée, qui est ensuite réduite. Le mime est obtenu après saponification de l'ester **11**. Suivant la stratégie de SPPS envisagée, la fonction amine du mime est protégée par un groupement Fmoc ou Boc.

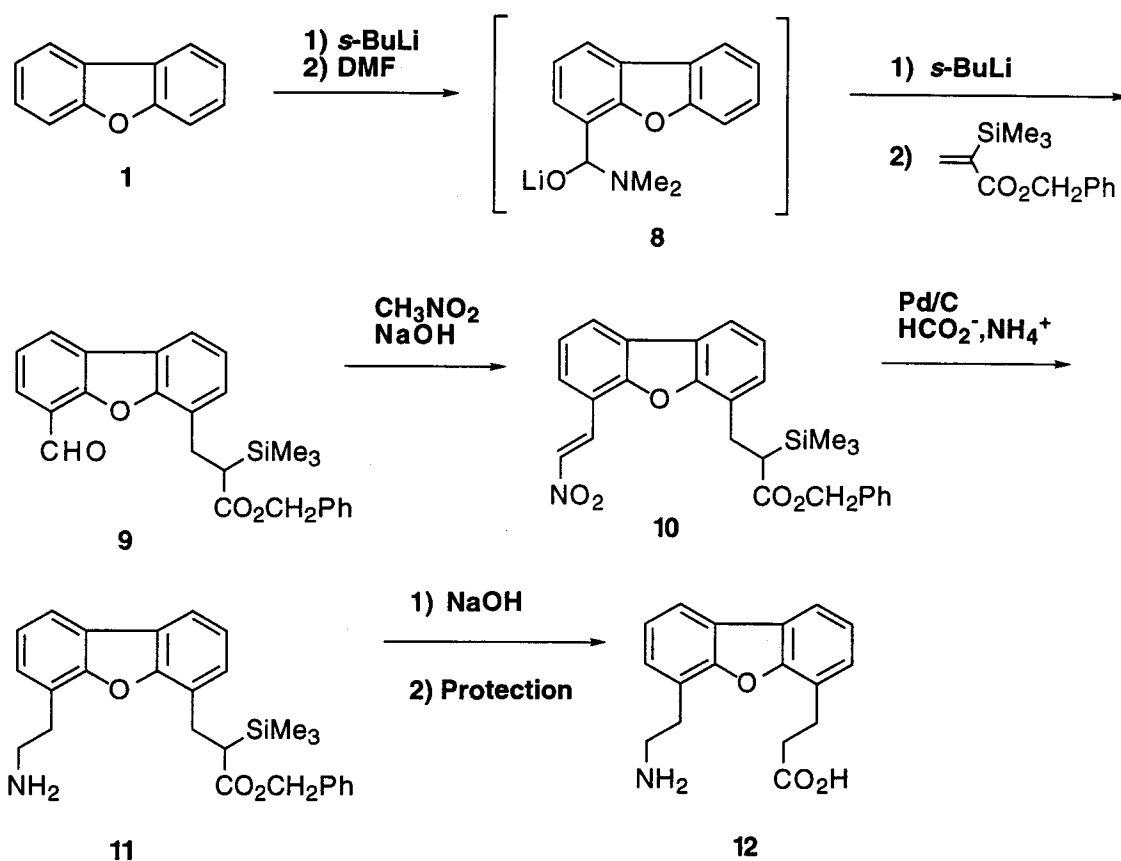


Schéma 2 : Nouvelle voie proposée pour la synthèse du mime de coude β à structure dibenzofurane

2.2. Dissymétrisation du dibenzofurane

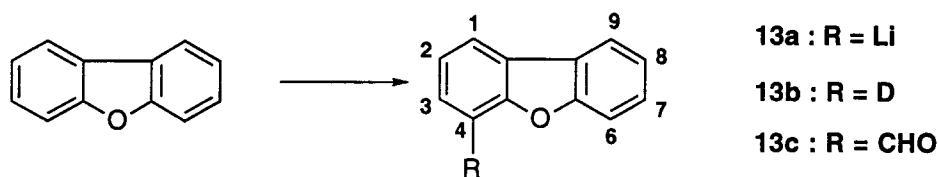


Schéma 3

2.2.1. Monolithiation du noyau dibenzofurane

La dissymétrisation du dibenzofurane a nécessité une optimisation des conditions réactionnelles, pour obtenir une monolithiation en position 4 avec un rendement maximum. Ces expériences sont réalisées en milieu strictement anhydre et sous atmosphère inerte. Afin d'avoir accès à la quantité de dérivé lithié formé, un moyen consiste à piéger le milieu réactionnel par un électrophile simple comme D₂O. Le composé lithié est ainsi transformé en dérivé deutéré que l'on peut ensuite analyser par RMN.

Un premier essai tenté avec *n*-BuLi, suivi d'un piégeage du milieu réactionnel avec D₂O, n'a permis d'obtenir que 30% de deutération en 4 (Schéma 3). L'optimisation des conditions, nature de l'agent de lithiation et stoechiométrie, temps de réaction, température, nous a conduit à utiliser 1,2 éq. *s*-BuLi, pendant 30 min à température ambiante, pour obtenir 100% de deutération en position 4 (produit **13b**, Schéma 3).

Remarque : Le pourcentage de deutération en 4 est déterminé à partir de l'intégration du signal correspondant aux protons 4 et 6.

2.2.2. Formylation du 4-lithio dibenzofurane

Les conditions de mono-lithiation étant maintenant au point, il est nécessaire de vérifier la formation du dérivé **8**. Cela revient à optimiser les conditions opératoires de l'étape de formylation. Le DMF, distillé sur hydrure de calcium, est ajouté à la solution de 4-lithio dibenzofurane. Une quantité minimale de DMF doit être ajoutée car un excès serait piégé par le lithien ajouté lors de la deuxième réaction de lithiation. Après hydrolyse à 0°C, le 4-formyl dibenzofurane **13c** (Schéma 3) est obtenu avec 79% de rendement. Il est absolument nécessaire de réaliser l'hydrolyse à 0°C pour minimiser une réaction de CANNIZZARO c'est-à-dire la formation de l'alcool **14** et de l'acide **15** (Schéma 4). Lorsque l'hydrolyse a été faite à température ambiante, l'alcool **14** a pu être isolé.

La réaction de CANNIZZARO intervient sur des aldéhydes non enolisables portés par des aromatiques par exemple (FUENTES et coll., 1987). En milieu alcalin, l'aldéhyde est transformé en acide et en alcool.

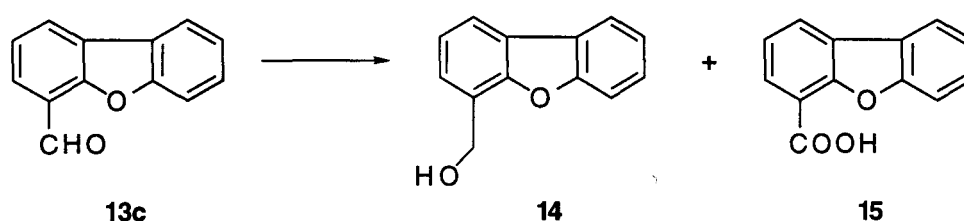


Schéma 4



A ce stade, les paramètres sont suffisamment au point pour entreprendre dans de bonnes conditions les études sur la régiosélectivité de la lithiation de l'intermédiaire **8** (Schéma 2).

2.3. Etude de la régiosélectivité de la deuxième étape de lithiation

2.3.1. L'effet *ortho*-directeur

La métallation *ortho*-dirigée (MOD) est une méthode de choix pour la fonctionnalisation de cycles aromatiques. Cette réaction consiste en la déprotonation du site situé en *ortho* d'un groupement comportant un ou plusieurs hétéroatomes, appelé groupement directeur de métallation (GDM), par une base forte, habituellement un alkyllithien, et conduisant à une espèce *ortho*-lithiée **18** (Schéma 5). Cette espèce, après traitement par un électrophile, conduit au produit **19**.

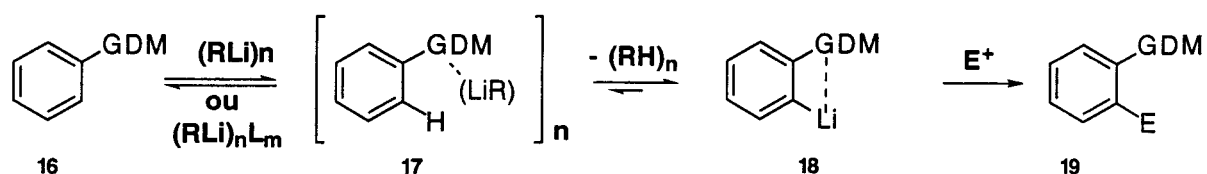
Plus de 40 GDM ont été répertoriés (SNIECKUS, 1990a) parmi lesquels :

- les groupements forts : $-\text{CONH-R}$, $-\text{CONR}_2$, $-\text{CN}$,  , ...
- les groupements modérés : $-\text{CF}_3$,  , ...
- les groupements faibles : CH(OR)_2 , $-\text{CH}_2\text{O}$, $-\text{Ph}$, $-\text{OPh}$, $-\text{OMe}$, NR_2 , ...

Le processus de métallation *ortho*-dirigée demande l'utilisation de bases alkyllithiées dans des solvants organiques où elles présentent habituellement une grande solubilité grâce à la formation d'agrégats : principalement des hexamères dans les solvants hydrocarbonés ou tétramères-dimères dans les solvants basiques. La présence de solvants basiques (éthers, amines, phosphines) provoque la dissociation par une réaction de type acide/base au sens de Lewis et, par exemple, la coordination du THF à $(n\text{-BuLi})_6$ conduit à $(n\text{-BuLi})_4$ (SNIECKUS, 1990a). De plus, l'addition de ligands bidentés comme la TMEDA, dissocie les agrégats d'alkyllithiens, forme des dimères ou monomères en solution, et augmente ainsi considérablement leur basicité. Par exemple, la déprotonation du benzène n'est possible avec $n\text{-BuLi}$ qu'en présence de TMEDA.

Le schéma simplifié du mécanisme d'*ortho*-métallation peut être représenté sous forme de 3 étapes comme indiqué au Schéma 5 :

- coordination de l'agrégat $(\text{RLi})_n$ à l'hétéroatome du GDM (étape 16 \rightarrow 17)
- déprotonation pour donner l'espèce *ortho*-lithiée coordinée (étape 17 \rightarrow 18)
- réaction avec l'électrophile pour donner le produit (étape 18 \rightarrow 19)

Schéma 5 : Mécanisme simplifié de la réaction d'*ortho*-métallation

Les premières études menées sur le mécanisme d'*ortho*-lithiation suggéraient une stabilisation de l'espèce *ortho*-lithiée par un phénomène de coordination avec le groupement *ortho*-directeur. Les mesures de pKa, les effets stériques, les calculs *ab initio*, vont effectivement dans le sens d'une stabilisation thermodynamique de l'espèce *ortho*-lithiée **18** quand GDM = OMe (SNECKUS, 1990). On ne peut cependant pas exclure un effet acidifiant de la complexation (intermédiaire **17**) comme l'ont montré des études par RMN quantitative, cinétique isotopique et effet stérique.

Le groupement *ortho*-directeur dirige donc la régiochimie mais a également une influence sur l'accélération de la vitesse de la réaction.

2.3.2. Nature du groupement *ortho*-directeur

Pour obtenir une déprotonation efficace, le GDM doit posséder deux propriétés : être un bon site de coordination pour l'alkyllithien et un électrophile pauvre pour éviter l'attaque de la base sur le GDM. La présence d'un hétéroatome sur le GDM est donc indispensable. GSCHWEND et RODRIGUEZ (1979) avaient suggéré l'existence de deux types de mécanisme : « coordination seule » ou « acide-base » (effet inductif). Entre ces deux extrêmes, il existe des intermédiaires où les deux effets interviennent simultanément à des degrés variant suivant le type de GDM. De plus, l'influence du facteur stérique n'est pas négligeable, et doit être pris en considération notamment lors de la compétition entre deux groupements directeurs.

L'interprétation des résultats de compétition entre deux groupements *ortho*-directeurs doit prendre en compte les effets stériques et inductifs qui affectent l'agrégation et la complexation des alkyllithiens.

Nous avons donc été amenés ici à tester, lors de la réaction de métallation sur l'intermédiaire **8**, rappelée Schéma 6, la force *ortho*-directrice de deux groupements *ortho*-directeurs : l'oxygène du dibenzofurane et le groupement α -N,N diméthylaminoalcoxy. Il apparaissait assez difficile de prédire *a priori* quelle serait la tendance de la régiosélectivité de la lithiation sur l'intermédiaire **8**. Nous cherchions à privilégier la lithiation de la position 6 mais la

position 3 pouvait également être lithiée. La présence de composés dilithiés ou non lithiés devait également être envisagée.

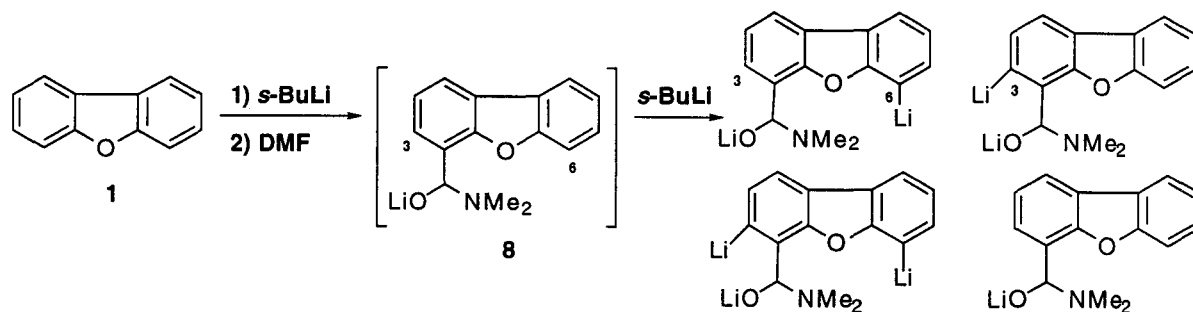


Schéma 6

L'étude de la littérature fournit quelques éléments sur la réactivité de ces groupements. Pour la synthèse *one pot* d'aryl cétones *ortho*-substituées, BARSKY et coll. (1976) ont utilisé avec succès l'intermédiaire tétraédrique **21**, généré par l'addition de RLi à l'arylcaboxamide tertiaire **20**, comme groupement *ortho*-directeur (Schéma 7). Ces groupements α -aminoalcoxy apparaissent comme étant stables aux réactifs alkyllithiens, et convertis facilement en aldéhyde ou cétone après hydrolyse. Les rendements isolés obtenus sont moyens (37 à 56 %) étant donné le nombre d'opérations pour obtenir le produit. Mais, peu d'études de compétition ont été faites pour situer le pouvoir *ortho*-directeur du groupe α -aminoalcoxy. SNECKUS (1990a) le décrit comme un groupe *ortho*-directeur « modéré ».

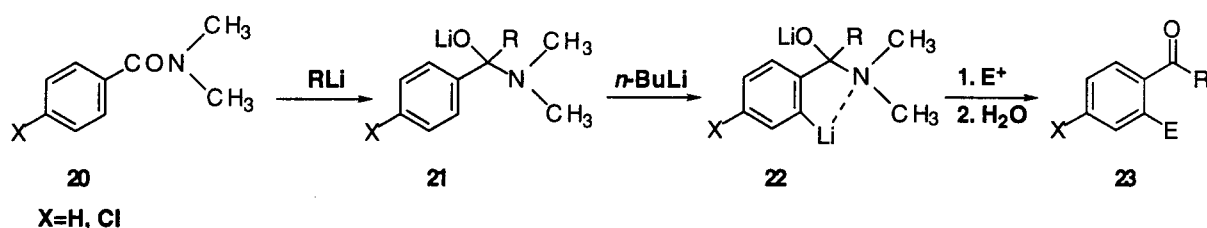


Schéma 7

Depuis, COMINS et coll. ont également prouvé l'utilité synthétique des groupements α -aminoalcoxy, préparés à partir d'un amidure de lithium réagissant sur des aldéhydes aromatiques (COMINS et coll., 1984; 1989; 1992), des 2-thiophénecarboxaldéhydes ou des 2-furaldéhydes (COMINS et coll. 1987; 1992), et la régiosélectivité semblait dépendre grandement de l'amine utilisée. D'autre part, les conditions décrites sont assez drastiques pour obtenir les dérivés *ortho*-substitués avec des rendements suffisants (3 éq. *n*-BuLi, benzène, reflux, 10h). Nous verrons dans quelles mesures des conditions plus douces peuvent être utilisées.

L'autre partenaire intervenant comme groupement *ortho*-directeur dans la réaction de lithiation compétitive, qui nous intéresse ici, est l'oxygène du dibenzofurane. Moins de données sont disponibles sur ce sujet. Cependant, on connaît depuis longtemps la capacité du dibenzofurane à subir une réaction de lithiation en position 4, dirigée par l'oxygène (GILMAN et coll., 1945). Une réaction de lithiation sur le 4-méthoxydibenzofurane **24** décrite Schéma 8 a permis d'obtenir le dérivé 4,6 disubstitué **25**, après réaction avec le soufre élémentaire puis hydrolyse, avec un rendement de 43% (KEMP et coll., 1986a). Cela suppose donc un effet *ortho*-directeur prédominant de l'oxygène furanique puisque les auteurs précisent que l'analyse par HPLC du produit brut ne montre pas d'isomères de position.

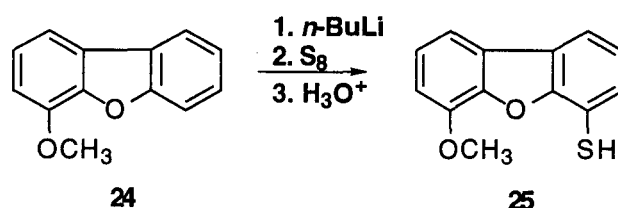


Schéma 8

Dans l'intermédiaire **8** (Schéma 6), l'oxygène furanique et le groupement α -N,N-diméthylaminoalcoxy représentent deux groupements *ortho*-directeurs de force non négligeable mais on peut difficilement prédire, à partir de ces études, leur comportement mutuel vis-à-vis d'une réaction de lithiation. La dominance de l'influence d'un groupement *ortho*-directeur peut se jouer au niveau de leur force relative mais des facteurs d'ordre stérique liés au phénomène d'agrégation des composés organolithiés peuvent également intervenir.

2.3.3. Résultats

2.3.3.1. Traitement des données

A l'issue de la deuxième réaction de lithiation (Schéma 6), et après piégeage par D₂O, quatre produits différents peuvent apparaître dans le mélange réactionnel : le dérivé **A** mono-deutééré en position 6 (produit voulu), le dérivé **B** mono-deutééré en position 3, le dérivé **C** di-deutééré en position 3 et 6 et le dérivé **D** n'ayant pas réagi donc non deutéré (Schéma 9). Et l'on recherche les valeurs de P_A , P_B , P_C et P_D leurs proportions respectives dans le mélange. Le spectre RMN ne peut pas donner accès à ces informations car les intégrations des protons 3 et 6 correspondent à la superposition des signaux provenant de chaque composé. L'utilisation d'une autre technique d'analyse devient donc indispensable. La spectrométrie de masse par impact électronique fournit la proportion des composés non, mono- ou di-deutéérés. Le principe du calcul est expliqué ci-après.

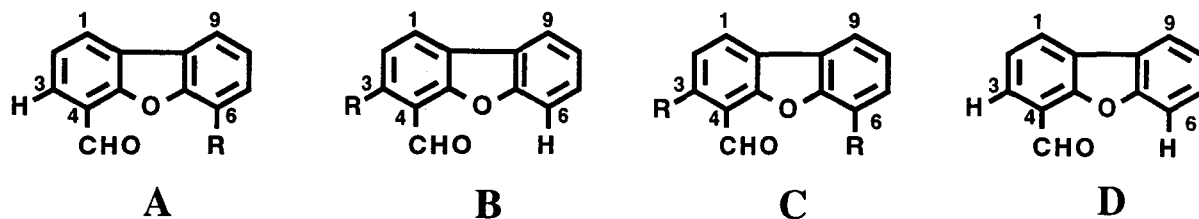


Schéma 9

a - Analyses des spectres de RMN ^1H

Les informations fournies par la RMN sont d'ordre quantitatif et qualitatif. Elles vont en effet donner la proportion d'incorporation de deutérium aux positions susceptibles d'être deutérées. Ainsi, l'intégration des pics correspondant respectivement aux positions 3 et 6 (Schéma 10) donne la proportion d'hydrogène restant à ces positions respectives, le complément étant donc la proportion de deutérium. D'autre part, l'intégration des doublets apparaissant aux positions adjacentes des positions deutérées (positions 2 et 7) est une information redondante avec la précédente mais nécessaire lorsque le spectre est mal défini pour certaines positions, à cause de recouvrements de signaux.

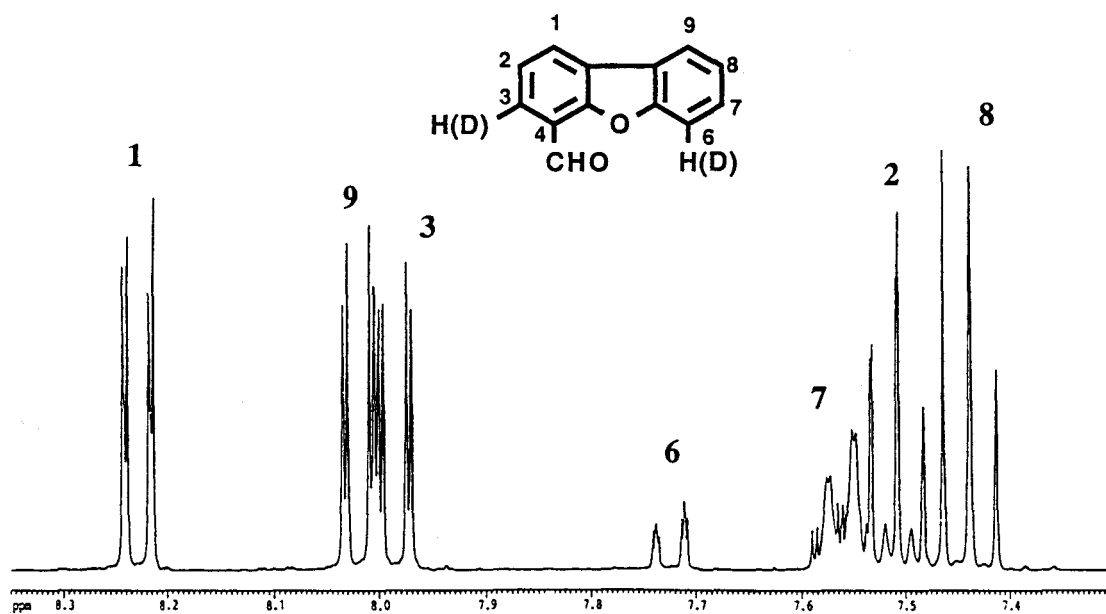
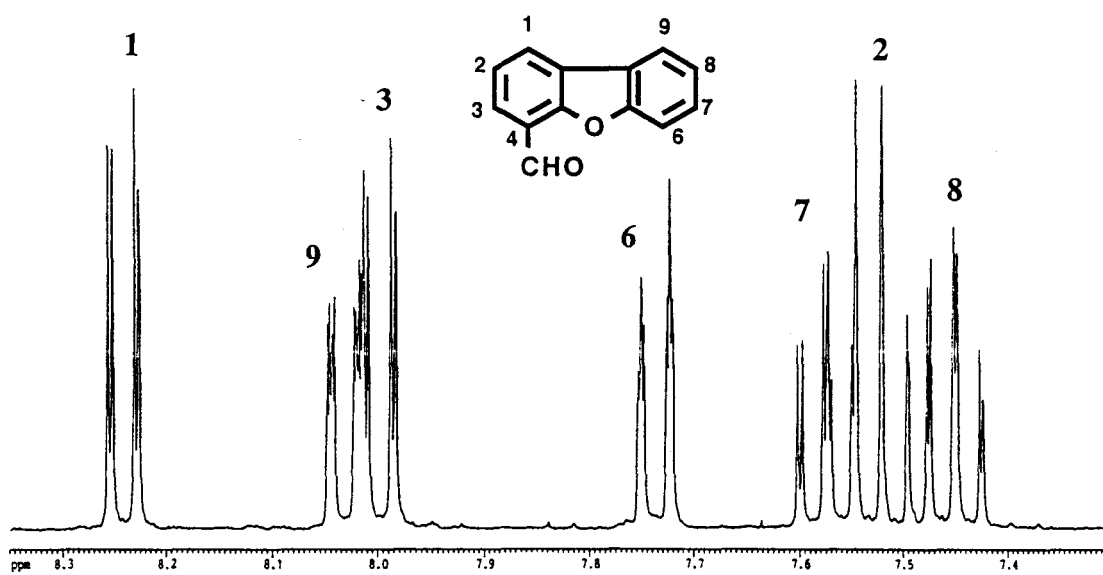
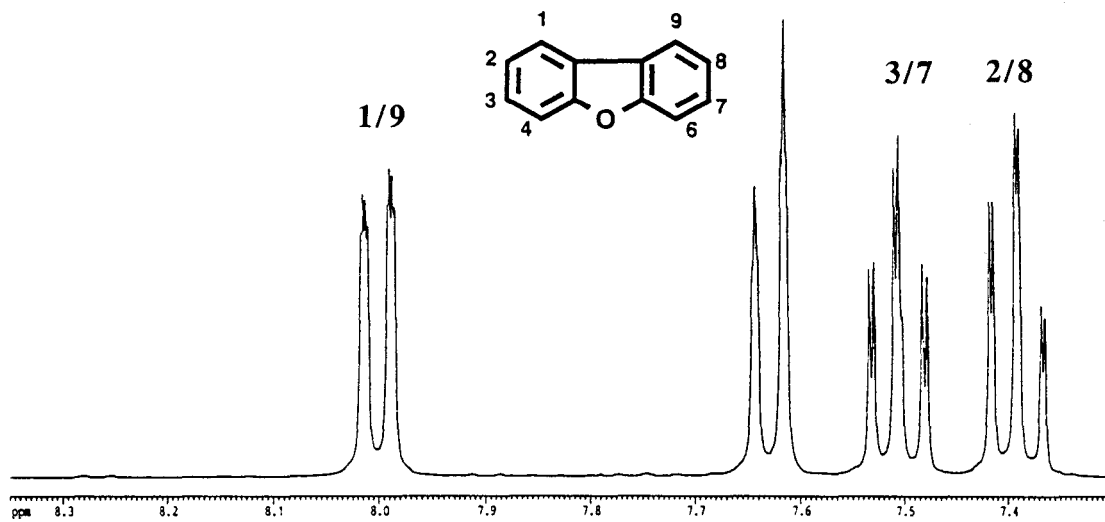


Schéma 10

Ici, nous allons utiliser l'intégration du signal du proton 6, appelée S_6 , et l'intégration du doublet apparaissant en 2, appelée $S_{2(d)}$, et correspondant à la suppression du couplage avec la position 3 deutérée (Schéma 10).

Soient P_A , P_B , P_C , et P_D les proportions relatives des composés A, B, C et D, définis précédemment.

On a donc $S_6 = P_B + P_D$ car B et D non deutérés en 6

soit $P_B = S_6 - P_D$ (1)

D'autre part $S_{2(d)} = P_B + P_C$ (2) car B et C deutérés en 3

ou encore $1 - S_{2(d)} = P_A + P_D$ correspond au complément

soit $P_A = 1 - P_D - S_{2(d)}$ (3)

A ce stade, ayant deux inconnues pour une équation, il est nécessaire d'incorporer les données issues de l'analyse des spectres de masse.

b - Analyse des spectres de masse

- Soient **x**, **y** et **z** les proportions respectives en dérivés non deutéré (**D**), mono-deutérés (**A** et **B**) et di-deutérés (**C**).

L'analyse des spectres de masse (impact électronique) donne une information quantitative sur les proportions **x**, **y** et **z**.

- La masse du 4-formyl dibenzofurane (**D**) est de 196 ($M^+_{\mathbf{D}}$), et l'on va s'intéresser d'une part au pic 195 correspondant à $[M^+_{\mathbf{D}} - H]$ et d'autre part au pic 196 correspondant à $[M^+_{\mathbf{D}}]$ et $[M^+_{\mathbf{A+B}} - H]$.

- Pour le 4-formyl dibenzofurane **D**, donc non deutéré, la hauteur des pics 195 et 196 a pour valeur **a** et **b** respectivement.
- Dans le mélange à analyser, les hauteurs des pics 195 et 196 sont respectivement **H**₁₉₅ et **H**₁₉₆. Lorsque l'on étudie un mélange à l'issue d'une réaction de métallation et que l'on analyse les valeurs obtenues pour les différents pics, on peut écrire :

Pour le pic 195 on a : $H_{195} = x \cdot a$

Pour le pic 196 on a : $H_{196} = x \cdot b + y \cdot a$

Le rapport donne donc :
$$\frac{H_{196}}{H_{195}} = \frac{x \cdot b + y \cdot a}{x \cdot a}$$

$$\frac{H_{196}}{H_{195}} = \frac{b}{a} + \frac{y}{x}$$

soit :

$$\boxed{\frac{H_{196}}{H_{195}} - \frac{b}{a} = \frac{y}{x} = R}$$

Le rapport des proportions en composés mono-deutérés sur non deutérés est donné par :

$$R = \frac{y}{x} \quad \text{et donc} \quad R = \frac{P_A + P_B}{P_D}$$

soit $R \cdot P_D = P_A + P_B$ et d'après (3) et (1) on a :

$$R \cdot P_D = (1 - P_D - S_{2(d)}) + (S_6 - P_D)$$

$$R \cdot P_D = 1 - 2P_D - S_{2(d)} + S_6$$

donc $(R + 2) P_D = 1 - S_{2(d)} + S_6$

et donc

$$P_D = \frac{1 - S_{2(d)} + S_6}{R + 2}$$

Et d'après (1)

$$P_B = S_6 - P_D$$

D'après (3)

$$P_A = 1 + S_{2(d)} - P_D$$

D'après (2)

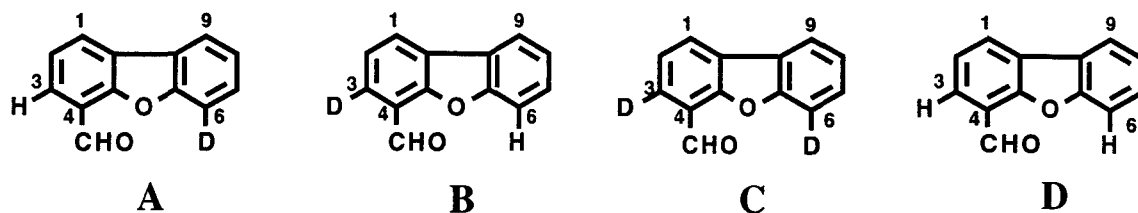
$$P_C = S_{2(d)} - P_B$$

La vérification se fait par :

$$\sum_A^D P_i = 1$$

2.3.3.2. Résultats - Discussion

Le tableau suivant présente les résultats de l'optimisation.



Entrée	<i>s</i> -BuLi (eq.) ^a	T (°C)	Temps (h)	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	rendement ^b % (ratio A/B)
1	1.2	t.a.	0.5	54	20	5	21	63 (2.7)
2	1.5	t.a.	0.5	66	17	4	13	63 (3.9)
3	1.5	0	0.5	66	13	4	17	65 (5.1)
4	1.5	0	1	68	13	3	15	63 (5.2)
5	1.5	-10	2	64	13	4	19	68 (4.9)
6	1.5	-30	3	57	13	3	27	61 (4.4)
7	1.5	-50	3	37	8	4	51	64 (4.7)
8	2	t.a.	0.5	75	13	8	4	62 (5.7)
9b	2	0	0.5	72	12	6	10	62 (6.0)
10c	2	0	0.5	77	13	0	10	60 (5.9)
11c	2	0	0.5	70	13	1	16	63 (5.4)
12	4	t.a.	0.5	63	12	23	2	63
13	4	t.a.	17	53	11	34	2	61
14	2x4	t.a.	17 et 6	39	4	56	1	55

Tableau 1 : Résultats de l'étude de la régiosélectivité de la réaction de lithiation de l'intermédiaire α -N,N-diméthylaminoalcoxy. a. Rendement pour le mélange des aldéhydes A-D purifiés par chromatographie éclair; b. Pas de cyclohexane ajouté avant la deuxième métallation; ratio final cyclohexane/ether : 39%; c. Cyclohexane anhydre ajouté avant la deuxième métallation; ratio final cyclohexane/ether : 50% pour l'entrée 11 et 65% pour l'entrée 12.

a - Effet de la stoechiométrie

La première expérience tentée (entrée 1) a permis de montrer que la tendance de la régiosélectivité était encourageante dans le sens où l'on obtient une valeur de 2,7 pour le ratio **A/B**, et donc un rapport en faveur d'une lithiation en position 6 désirée. Cependant le pourcentage en composés non deutérés restait important. L'augmentation de la stoechiométrie de l'agent de lithiation, *s*-BuLi, a permis d'accroître la régiosélectivité (ratio **A/B**) comme le montre la comparaison des entrées 1, 2 et 8 pour lesquelles on obtient respectivement un ratio de 2,7 - 3,9 et 5,7. Mais si l'on utilise 4 équivalents de *s*-BuLi la proportion en **C** devient alors trop importante et le rendement en composé **A** diminue (entrées 12,13).

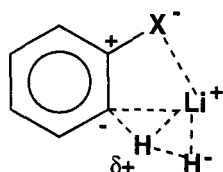
Une amélioration de la régiosélectivité en faveur de la position 6 peut tenir dans le fait que l'augmentation de la stoechiométrie de *s*-BuLi a pour effet la formation d'agrégats plus importants autour du groupement α -N,N-diméthylaminoalcoxy, rendant ainsi la position 3 moins accessible. D'autre part, l'augmentation de la quantité de *s*-BuLi correspond aussi à une augmentation de la concentration en cyclohexane dans le milieu réactionnel. Ce facteur va dans le même sens que le précédent car la présence d'un solvant hydrocarboné favorise aussi la formation d'agrégats de taille importante (GSCHWEND et coll., 1979). Cependant, l'ajout de cyclohexane dans la solution (entrées 10 et 11) n'augmente pas la régiosélectivité mais supprime pratiquement la formation de composés dilithiés **C**. La taille des agrégats alors formés semble donc défavorable à une attaque sur les 2 sites et ne permet même pas de favoriser la position 6. Le phénomène d'agrégation semble donc d'importance et quelques études apportent des éléments quant à l'influence de ce phénomène sur la réactivité des espèces lithiées.

b - Le phénomène d'agrégation

L'état d'agrégation des composés organolithiés détermine leur réactivité. Ces composés sont en effet plus basiques quand la taille des agrégats diminue (GSCHWEND et coll., 1979). L'agrégation dépend d'un certain nombre de facteurs dont la nature du solvant (hauts degrés d'agrégation observés dans les solvants hydrocarbonés), et la présence d'agents de complexation comme la TMEDA par exemple. La taille des agrégats peut varier jusqu'à un état hexamère, voire plus dans un solvant hydrocarboné (BERGANDER et coll., 1994). L'agrégation des composés organolithiés a fait l'objet d'études diverses, notamment par RMN ^1H , ^{13}C et ^6Li , pour étudier la dynamique d'agrégation du propyllithium (FREANKEL, et coll., 1980), la formation d'agrégats mixtes d'organolithiens lors d'une lithiation assistée par un hétéroatome (BAUER et coll., 1989; GROS et coll., 1995; CAUBERE et coll., 1994; WIJKENS et coll., 1995), le comportement d'agrégation de composés organolithiés dans différents solvants (BERGANDER et coll., 1994), les agrégats mixtes entre des énoates lithiés et la 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine

(HALL et coll., 1991). Il ressort de ces études une certaine complexité du phénomène due essentiellement aux caractéristiques des différents partenaires en présence, et aux conditions utilisées (nature du solvant, température). Pour connaître plus en détail les mécanismes réactionnels en question, une étude spécifique est donc à envisager pratiquement pour chaque cas.

Toutefois, il est intéressant de se reporter aux travaux de VAN EIKEMA HOMMES et VON RAGUE SCHLEYER (1994) qui se sont intéressés aux mécanismes de lithiation aromatique, ainsi qu'à l'influence de l'agrégation et des groupements directeurs. Ils soulignent la difficulté de l'analyse quand on étudie la force de complexation des agrégats par rapport à leur réactivité et à la régiochimie de la réaction. En effet, si le complexe initial est faiblement lié, la fraction d'espèces réactives qui prend part à la complexation sera faible et la régiosélectivité également. Si la complexation est forte, une haute régiosélectivité est attendue, mais l'énergie de complexation doit être surmontée pour pouvoir atteindre l'état de transition. Ainsi, une haute régiosélectivité serait accompagnée d'une faible réactivité ce qui est contraire aux constatations expérimentales. Les auteurs avancent plutôt l'argument d'une stabilisation des structures de transition plutôt que celle du complexe initial. Le métal serait impliqué dans des liaisons partielles et la coordination à l'hétéroatome deviendrait plus forte que dans le complexe de départ. La distribution de charges montre de plus, dans le cas des benzènes substitués, une alternance favorable de charges positives et négatives dans le complexe de transition :



Les calculs *ab initio* effectués montrent que la réaction du méthyllithium sur des composés aromatiques ne procède pas par une substitution électrophile aromatique (Figure a, Schéma 11) mais par un transfert d'hydrogène impliquant un lithium « actif » (hautement insaturé) liant le carbanion méthyl et l'atome de carbone à lithier, et subissant donc le transfert (Figure b, Schéma 11). Avec l'hydrure de lithium, l'agrégation ne change pas le mécanisme mais des liaisons intra-agrégat stabilisent le lithium actif. Le dimère mixte méthyllithium et hydrure de lithium est prédit comme étant plus réactif que le monomère méthyl lithium dans la lithiation du benzène à cause d'interactions du lithium « passif » avec le système aromatique π et l'atome de carbone subissant la lithiation (Figure c, Schéma 11).

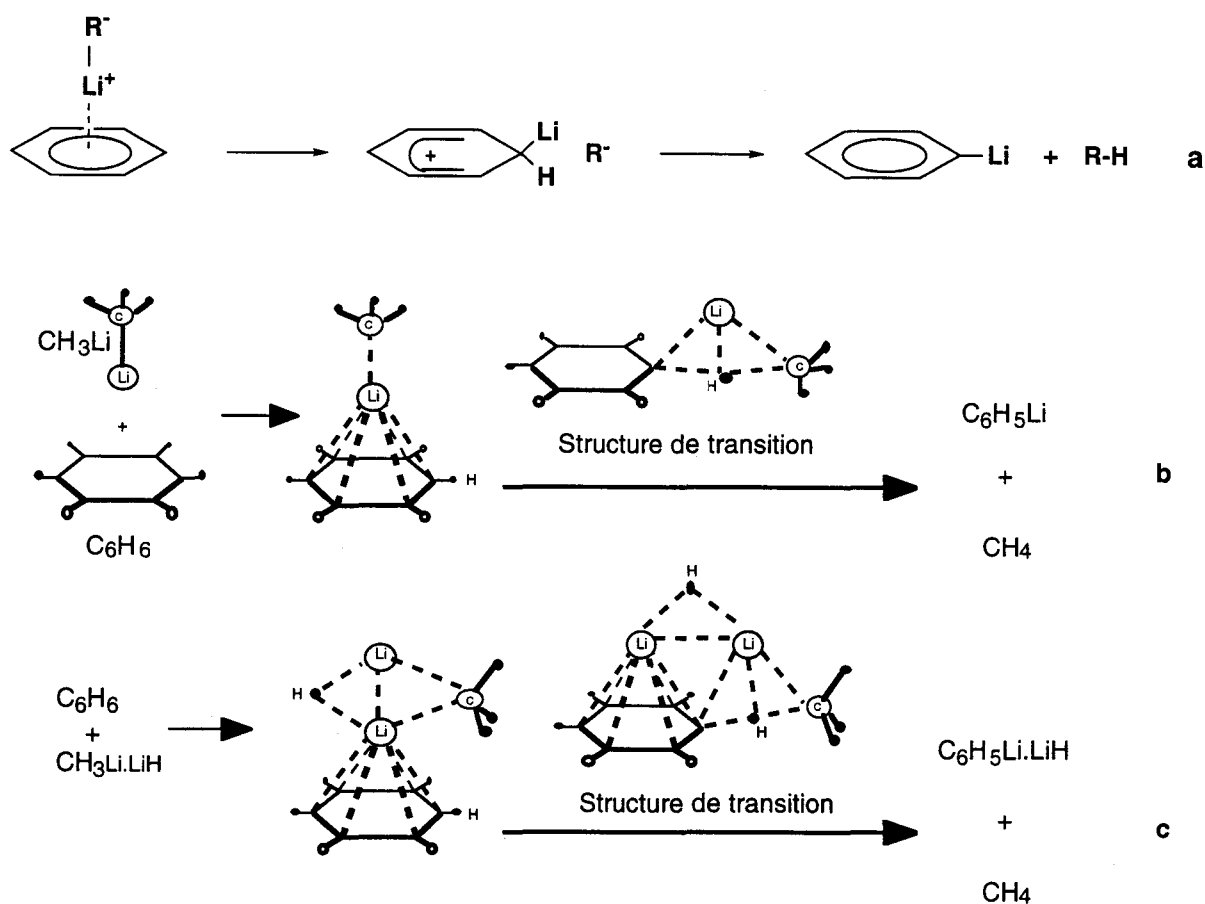


Schéma 11

L'effet d'accélération et *ortho*-directeur de la réaction, par les substituants de type base de Lewis, seraient donc dus à la stabilisation du lithium « actif » dans l'état de transition et à des interactions électrostatiques favorables. Ces effets de stabilisation sont plus forts pour un monomère mais sont aussi significatifs pour la réaction de l'anisole avec un dimère mixte méthyllithium et hydruide de lithium. En conclusion, les calculs montrent que les interactions stabilisantes dans l'état de transition déterminent la réactivité. Grâce à l'interaction de lithiums « passifs » (situés dans l'agrégat mais pas directement impliqués dans la réaction) avec le système aromatique π , les organolithiums dimériques sont plus réactifs que les monomères dans la réaction de lithiation du benzène. La complexation intramoléculaire du lithium par un substituant de type base de Lewis dans l'état de transition et surtout des forces électrostatiques favorables, réduisent de façon importante la barrière d'activation de la réaction d'*ortho*-lithiation. Ces effets stabilisants, et non la complexation initiale du réactif organolithié, seraient responsables, d'après les auteurs, des effets d'accélération cinétique et *ortho*-directeur des substituants.

L'ensemble de ces études montrent toute la difficulté d'analyse de résultats d'expériences d'*ortho*-lithiation, dont les mécanismes apparaissent complexes et dépendants de plusieurs facteurs.

c - Effet de la température et du temps de réaction

Un autre paramètre testé est la température. La régiosélectivité augmente quand on passe de température ambiante à 0°C, comme indiqué dans les entrées 8, 9. Mais si l'on baisse d'avantage la température (entrées 5, 6 et 7 - Tableau 1), le ratio A/B reste pratiquement constant et l'on observe une augmentation de la proportion en composés **D** non deutérés et ce malgré un temps de réaction plus long. La température de 0°C semble donc être optimale pour cette réaction.

Le temps de réaction n'apparaît pas comme un facteur réellement déterminant : doubler le temps de réaction de 30 min à 1 h (entrées 3 et 4) n'augmente pas significativement les rendements en composés voulus. D'autre part, il faut tenir compte du temps de demi-vie des composés organolithiés. Il y a peu d'intérêt à prolonger une réaction si le composé organolithié n'a pas une durée de vie suffisante en solution (STANETTY et coll., 1997). Les mécanismes de clivage de l'éther par des organolithiens ont d'ailleurs été étudiés (MAERKER et coll., 1973,1987). Pour certaines conditions utilisées ici, le *s*-BuLi dans l'éther et à 0°C (entrées 3, 4 ou 9) a une demi-vie de 2,32 h ce qui permet de travailler dans de bonnes conditions.

d - Silylation de l'intermédiaire

Une autre expérience a également été tentée qui consistait à augmenter l'encombrement stérique autour du groupement α -N,N-diméthylaminoalcoxy en lui faisant subir une réaction de silylation sur l'oxygène. Pour cela, on laisse agir TBDMSCl pendant 17h, puis on ajoute 2 éq. de *s*-BuLi. Mais le résultat n'est pas satisfaisant car le pourcentage de deutération est faible. Les proportions obtenues sont les suivantes : **A** : 16%; **B** : 2%; **C** : 2%; **D** : 80% (65% de rendement total).

e - Utilisation de *t*-BuLi

Deux expériences ont été faites avec *t*-BuLi à -50°C. Les rendements observés sont faibles : il reste une grande proportion de composés **D** non deutérés : **A** : 17%; **B** : 7%; **C** : 3%; **D** : 73% (78% de rendement total).

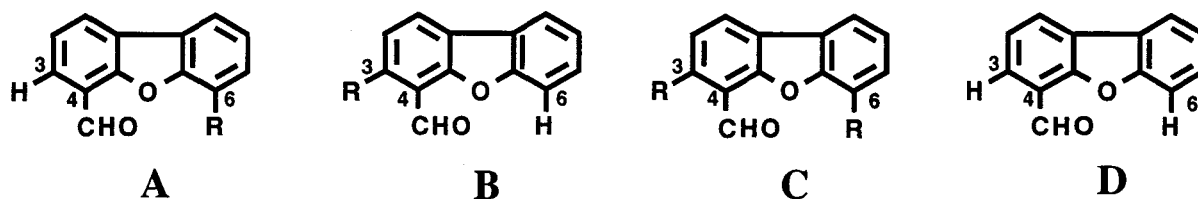
D'autres conditions n'ont pas été testées car l'utilisation de *t*-BuLi reste plus difficile que celle de *s*-BuLi.

2.3.3.3. Conclusion des tests des différents paramètres

L'optimisation des paramètres : temps de réaction, température, stoechiométrie de *s*-BuLi, composition du solvant (ajout de cyclohexane), a permis d'obtenir une régiosélectivité satisfaisante (ratio A/B = 6,0; entrée 9 - Tableau 1) pour l'obtention du dérivé du dibenzofurane disubstitué et dissymétrique recherché dans des conditions faciles à mettre en oeuvre.

2.3.4. Piégeage des dérivés lithiés avec deux autres électrophiles

Afin de tester la validité de ces expériences deux électrophiles autres que D₂O ont été utilisés : le chlorure de triméthylsilyle et l'iodure de méthyle (Tableau 3).



R = SiMe₃, Me

Entrée	E (eq.)	temps (T)	A (%)		B (%)		C (%)		D (%)		Ratio A/B	
			a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
1	Me ₃ SiCl (4)	1h15 (0°C) et 45 min (t.a.)	25	49	4	9	2	5	16	37	6,3	5,4
2	Me ₃ SiCl (4)	17h (t.a.)	46	72	4	8	2	4	8	16	11,5	9,0
3	MeI (4)	17h (t.a.)	57	79	7	8	4	4	7	9	8,1	9,9

a : rendement isolé; b : déterminé par RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

Tableau 3 : Résultats de piégeage du milieu réactionnel, après lithiation de l'intermédiaire 8 par les électrophiles chlorure de triméthylsilyle (Me₃SiCl) ou l'iodure de méthyle (MeI).

Le Tableau 3 donne les pourcentages des différents dérivés obtenus après leur isolement par chromatographie sur colonne de silice ou dosage par RMN, dans le brut réactionnel, du proton aldéhydique, bien différencié dans chaque cas.

Les dérivés A avec R = SiMe₃ et R = Me sont isolés, après 17 h, avec respectivement 46 et 57% de rendement. Les vitesses de réaction, assez lentes si l'on compare les entrées 1 et 2, peuvent

être expliquées par un degré d'agrégation important des espèces lithiées ($R = Li$) limitant l'accès des électrophiles aux fonctions réactives.

On remarque cependant que l'augmentation du temps de réaction pour les expériences avec Me_3SiCl (entrées 1 et 2) conduit préférentiellement à la formation du composant **A** qui passe de 49 % à 72 % dans le brut réactionnel, alors que la quantité de **B** formé ne progresse pas.

La comparaison entre les expériences menées avec D_2O et les électrophiles n'est possible que si l'on considère que la réaction des électrophiles sur les espèces lithiées est totale. Or ce n'est peut-être pas le cas, et la réaction avec les électrophiles pourrait alors être considérée comme une étape réactionnelle à part entière, ayant sa propre régiosélectivité. Les électrophiles réagiront en effet plus facilement avec les positions plus accessibles c'est-à-dire impliquées plus faiblement dans les agrégats des espèces lithiées. On constate ici que le ratio **A/B** augmente, comme indiqué dans la dernière colonne du tableau : le ratio est de 9,0 avec Me_3SiCl (entrée 2, colonne **b** ratio **A/B**) et de 9,9 avec MeI (entrée 3 colonne **b** ratio **A/B**) alors que le ratio **A/B** obtenu après piégeage dans D_2O était de 6,0 dans les mêmes conditions de lithiation que celles utilisées ici (entrée 9 tableau 1). Cependant, l'augmentation du ratio **A/B** peut aussi être due à la consommation préférentielle de **B** qui serait peu impliqué dans les agrégats, et transformé en **D** par introduction concomitante de H^+ avec l'électrophile.

Remarques : 1 - Les différences observées sur le ratio entre les colonnes **a** et **b**, c'est-à-dire après et avant isolement des composés, sont dues aux difficultés rencontrées lors de leurs purification. Le ratio **A/B** de la colonne **a** doit donc être interprété avec prudence.

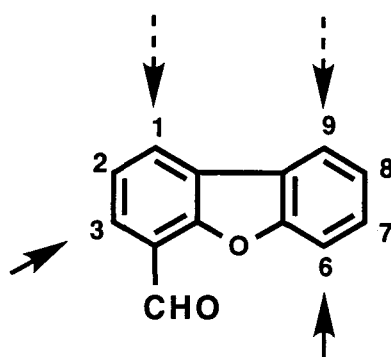
2 - Les dérivés triméthylsilylés comportent l'intérêt de pouvoir subir des réactions d'*ipso* substitution permettant la fonctionnalisation du dibenzofurane à volonté.

2.3.5. Essai de préparation de dérivés du dibenzofurane 3,4,6-trisubstitués - Utilisation de TMEDA

En marge de l'étude sur la régiosélectivité de la deuxième réaction de lithiation, nous avons cherché à former des dérivés trisubstitués (c'est-à-dire des dérivés du 4-formyl dibenzofurane substitués en 3 et 6 : Figure Tableau 2). Etant donné que l'augmentation de la quantité de *s*-BuLi (4 éq. - tableau 1, entrées 12-14) introduit ne semblait pas suffisante pour obtenir les composés 3,6-dilithiés, nous avons utilisé la tétraméthyléthylènediamine (TMEDA). Celle-ci a pour effet, en complexant le lithium, de rendre la base alkyllithiée plus basique.

Mais au lieu d'observer une proportion plus importante en composé **C**, un phénomène surprenant et complexe a été observé. Les spectres RMN correspondant au mélange de dérivés

obtenus après réaction de lithiation et piégeage par D₂O sont apparus plus complexes. L'analyse a montré que les positions 1 et 9 avaient été touchées. Etant donné le nombre de combinaisons potentielles des différents isomères deutérés que l'on peut alors obtenir, il n'est pas possible de déterminer la proportion de chacun, mais on peut, à partir du spectre RMN, évaluer l'incorporation de deutérium au niveau de chaque position. L'analyse des spectres de masse (impact électronique) permet quant à elle de déterminer les proportions en composés non, mono-, di- ou tri-deutérés, respectivement **d₀**, **d₁**, **d₂** et **d₃**. Ces résultats sont présentés dans le tableau 2.



				Positions deutérées Incorporation de deutérium (%)				Proportion en composés deutérés (SM IE)			
	<i>s</i> -BuLi	T(°C)	Temps (h)	1	3	6	9	d₀	d₁	d₂	d₃
1	1,5	0	0,5	6	7	52	0	31	57	12	0
2	4	ta	0,5	25	18	74	10	1	53	46	0
3	4	ta	17	31	11	73	26	2	47	48	3

Tableau 2 : Résultats des expériences obtenues par addition de TMEDA au milieu réactionnel de la deuxième réaction de lithiation. Le rapport *s*-BuLi / TMEDA utilisé est de 1/1. L'incorporation de deutérium aux positions indiquées 1, 3, 6 et 9 a été déterminée par RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz). Les proportions **d₀**, **d₁**, **d₂** et **d₃** correspondent respectivement aux proportions de dérivés non, mono-, di- ou tri-deutérés déterminées par spectrométrie de masse par impact électronique.

Les résultats issus de ces expériences montrent que même avec 1,5 éq. de *s*-BuLi/TMEDA (entrée 1) la position 1 est attaquée, et ce préférentiellement à la position 9. Le pourcentage de composés dideutérés n'est pas négligeable (12 %). Avec 4 éq. de *s*-BuLi, on observe une augmentation importante en composés deutérés aux positions 1 et 9, toujours avec

une prépondérance de la position 1 qui s'atténue dans le temps (entrée 3 à 17h) impliquant peut être un phénomène d'équilibration.

Il est à noter que KELLY ne mentionne pas la lithiation des positions 1 et 9 dans les conditions de formation du 4,6-dilithio dibenzofurane c'est-à-dire 3 éq. de *n*-BuLi /TMEDA (1/1) dans l'éther, à température ambiante, pendant 24 heures (TSANG et coll., 1994). D'autre part HEANEL et coll. (1993) ont montré sans ambiguïté par RMN ^1H et ^{13}C que seul le 4,6- D_2 dibenzofurane est formé après lithiation (2 éq. *n*-BuLi/TMEDA dans l'hexane à reflux pendant 1 h (HEANEL et coll., 1991) et piégeage avec de l'éthanol deutéré (EtOD).

Mais des lithiations en positions 1 et 9 ont été décrites par HAENEL sur le dibenzothiophène. Dans un premier article (HEANEL et coll., 1991), les auteurs mentionnent la préparation de 4,6-bis(diphénylphosphino)dibenzofurane et de 4,6-bis(diphénylphosphino)dibenzothiophène. Or, en voulant optimiser la synthèse du dibenzothiophène disubstitué en employant un solvant de plus haut point d'ébullition, les auteurs ont observé la formation d'une deuxième diphosphine qu'ils ont caractérisée, sans ambiguïté cette fois, comme étant 4,6 disubstituée. La diphosphine décrite dans le premier article n'était donc pas 4,6-disubstituée mais disubstituée aux positions 1 et 9 (Schéma 12). Le deuxième article publié (HEANEL et coll. 1993) corrige l'attribution et confirme donc l'attaque des positions 1 et 9 par le complexe *n*-BuLi/TMEDA en l'occurrence.

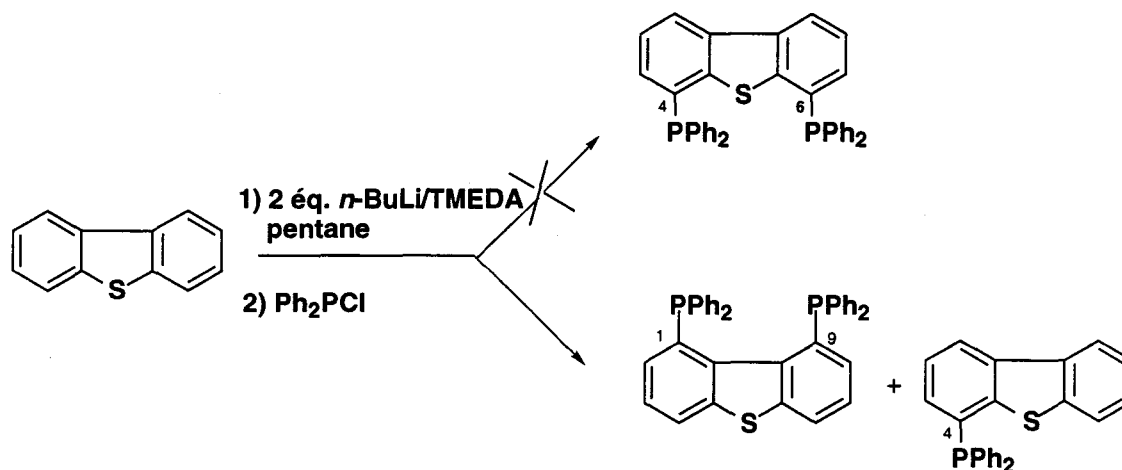


Schéma 12

Un schéma mécanistique est proposé par les auteurs après étude de l'influence de la température sur le mécanisme de lithiation du dibenzothiophène avec 2 équivalent de *n*-BuLi/TMEDA. Ils décrivent l'apparition dans un rapport 3:1 d'un mélange 4,6- et 1,9-dilithiodibenzothiophène (observé de t.a. à reflux). Le mécanisme proposé est le suivant : après une première lithiation en position 4, la seconde lithiation produit, dans un rapport 3:1, un mélange de dérivés 4,6- et 1,4- (et/ou 4,9-) disubstitués. Les dérivés 1,4- (et/ou 4,9-) s'isomérisent pour former le dérivé 1,9-disubstitué, thermodynamiquement plus stable.

D'autres éléments de la littérature indiquent, en présence de TMEDA, la lithiation d'aromatiques polycycliques dans la région « Bay » (ASHE et coll., 1990). Les auteurs montrent, outre la dilithiation du diphenyl **25**, la dilithiation du triphénylène (**27**), du phénanthrène (**28**), et du chrysène (**29**) (Schéma 13), ce qui nous rapproche du cas « dibenzofurane », où les cycles aromatiques sont rigidifiés dans une structure, contrairement au diphenyl.

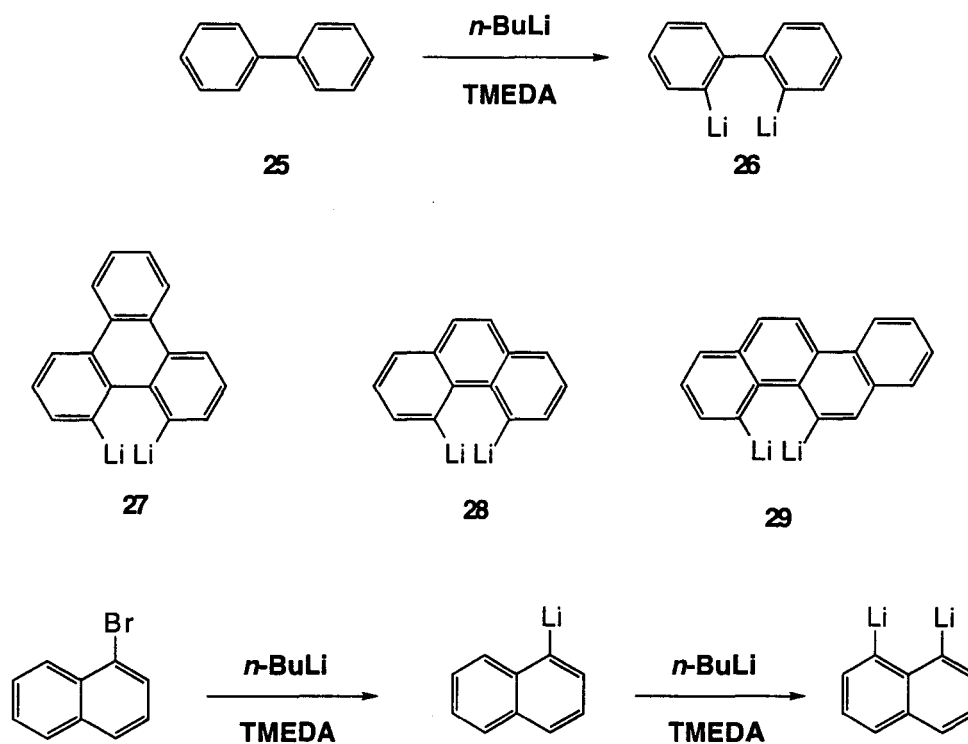
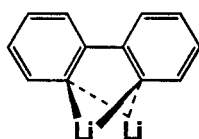


Schéma 13

Des calculs MNDO ont montré que la stabilisation de l'espèce dilithiée est favorisée par un double pontage (NEUGEBAUER et coll., 1982) :



Et lorsque l'on fait subir une seconde métallation au 1-lithionaphtalène ou au 9-lithioanthracène (NEUGEBAUER et coll., 1983), une lithiation en position *peri* est observée dans les deux cas (Schéma 14).

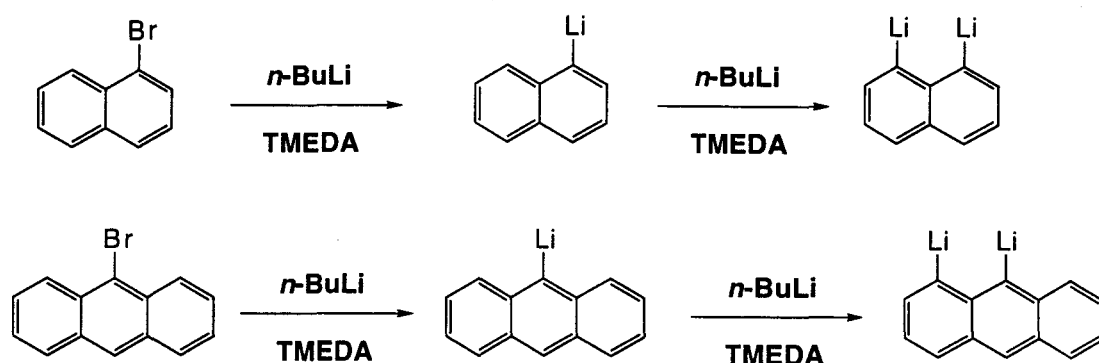
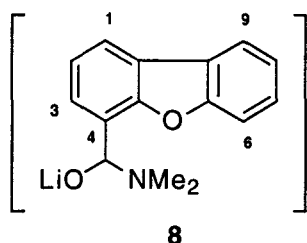


Schéma 14

Les arguments mécanistiques pour de telles réactions de lithiation dirigées sont fournis par les calculs MNDO. Là aussi l'espèce dilithiée apparaît stabilisée par un double pontage symétrique, impliquant une force motrice thermodynamique, mais les hydrogènes de l'espèce monolithiée semblent aussi activés, avec des longueurs de liaisons C-H plus grandes.

Dans le cas qui nous intéresse ici, à savoir le dibenzofurane substitué en 4 par le groupement α -N,N-diméthylaminoalcoxy (8), on peut envisager, de part l'effet de la présence de ce groupement et l'utilisation de TMEDA, une activation de la position 1, ce qui favoriserait par la suite l'attaque de la position « *peri* » 9.



Cela expliquerait les différences observées pour les proportions de deutération en 1 et 9 des entrées 2 et 3 (Tableau 2), où la position 9 serait lithiée plus lentement. L'incorporation de lithium en position 9 peut avoir deux origines : une lithiation proprement dite provenant d'une lithiation dirigée par la position 1, mais aussi une isomérisation avec la position 3 puisque l'on constate que la proportion de deutérium en 3 diminue passant de 18 % à 11% entre 30 min et 1 h (entrées 2 et 3, Tableau 2).

2.3.6. Conclusion

La dissymétrisation du noyau dibenzofurane a été réalisée par l'application d'une séquence réactionnelle *one pot* impliquant une double réaction de lithiation. La deuxième étape de lithiation comportait une compétition entre deux groupements *ortho*-directeurs : l'oxygène furanique et le groupement α -N,N-diméthylaminoalcoxy. L'optimisation des paramètres température, stoechiométrie de l'agent de lithiation, temps de réaction ont permis d'obtenir une bonne régiosélectivité en faveur d'une lithiation en position 6. Les conditions opératoires décrites sont faciles à mettre en oeuvre. Il n'en demeure pas moins que ces réactions de lithiation nécessitent des conditions strictement contrôlées (conditions anhydres, atmosphère inerte) pour assurer la fiabilité des résultats.

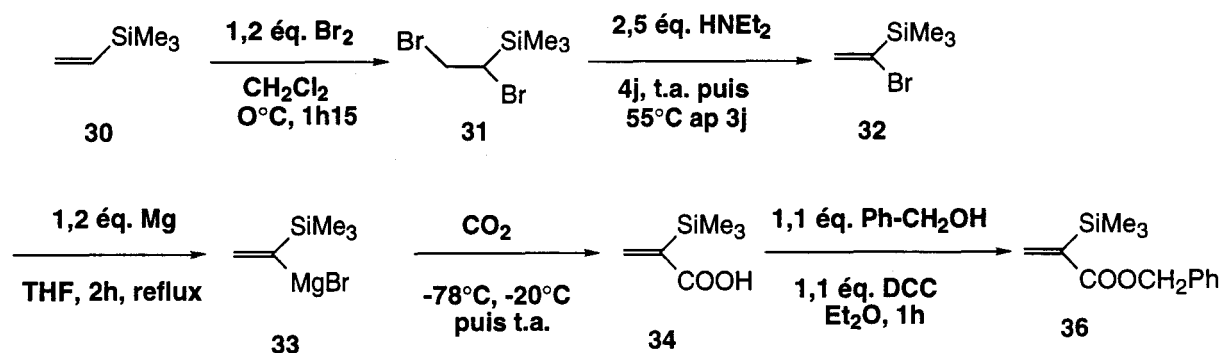
Au niveau synthétique, les expériences avec les électrophiles ont montré l'efficacité de la méthode de dissymétrisation et l'intérêt que cela représente pour la fonctionnalisation du dibenzofurane.

2.4. Synthèse du synthon silylé

Pour poursuivre la synthèse du mime à structure dibenzofurane, la fonctionnalisation du noyau dibenzofurane suite à la dissymétrisation doit se faire par le couplage de l'ester α -triméthylsilylacrylate **35** (Schéma 15).

2.4.1. Résultats - Discussion

La synthèse de **35** a été réalisée selon le schéma suivant :



Sch\u00e9ma 15 : Synth\u00e8se du synthon silyl\u00e9

La synthèse commence par une bromation du vinyltriméthylsilane **30**. Cette étape ne comporte pas de difficulté particulière et le produit dibromé **31** est obtenu avec 96% de rendement.

L'étape suivante est la déshydrobromation par la diéthylamine (OTTOLENGHI et coll., 1963). L'avancement de la réaction est suivi par RMN ¹H en regardant l'apparition des deux protons vinyliques. Après 4 jours de réaction et distillation du brut réactionnel, le 1-bromo-vinyltriméthylsilane **32** est obtenu avec 60% de rendement.

Le bromure est ensuite transformé en acide *via* la formation d'un organomagnésien. Celui-ci réagit avec CO₂ produit à partir de carboglace, pour produire l'acide **34** avec un rendement de 86 %.

C'est l'étape d'estérification qui a posé problème car les produits générés sont très volatils. Un premier essai avec l'éthanol a été tenté mais on n'a pu que constater l'extrême volatilité du produit. Assez de produit a cependant été recueilli pour l'analyse et la caractérisation de l'ester. Un alcool plus lourd, l'alcool benzylique a donc été utilisé pour une nouvelle estérification faite selon une méthode utilisant la DCC et la DMAP (HASSNER ET ALEXANIAN, 1978).

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer le faible rendement obtenu : volatilité toujours présente, désilylation, qui a pu être confirmée par l'identification du produit, polymérisation, bien connue pour les composés de type acrylique (OTTOLENGHI et coll., 1963) ou perte lors de la purification.

Supprimer la DMAP ne permet pas d'initier l'estérification avec l'alcool benzylique comme l'a montré un suivi de la réaction par RMN. Il est donc nécessaire d'utiliser un autre agent d'activation de l'acide comme le BOP, utilisé en synthèse peptidique mais également pour l'activation d'acides carboxyliques (COSTE et coll., 1995).

2.4.2. Conclusion

La synthèse du synthon silylé **35**, qui fait appel à des méthodes relativement classiques, nécessite cependant l'optimisation de la réaction d'estérification. Elle doit se faire en tenant compte de la sensibilité du produit aux attaques nucléophiles (provoquant la désilylation), des risques de polymérisation et de l'inconvénient inhérent aux petites molécules silylées qui est leur caractère volatil.

2.5. Les dernières étapes de la nouvelle synthèse du mime et perspectives

Le nouveau schéma de synthèse envisagé, présenté Schéma 16, rappelle les étapes qui restent à effectuer pour compléter la synthèse du mime.

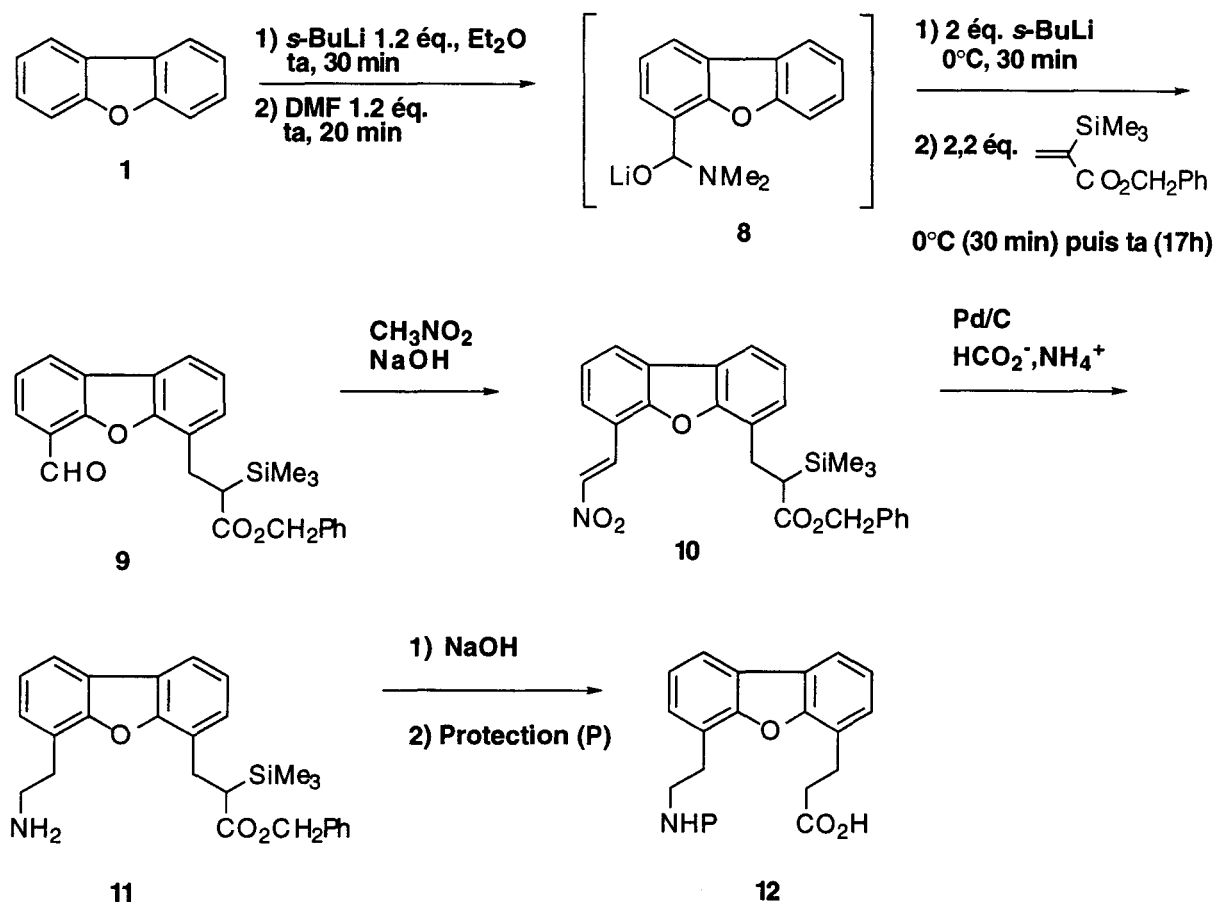


Schéma 16

La réaction d'addition de l'ester vinylique silylé sur l'intermédiaire **8** ayant subi la seconde réaction de lithiation, a été tentée. Celle-ci doit être favorisée par la présence du silicium qui a la capacité de stabiliser la charge négative formée lors du couplage. Un rendement de 30% à partir du dibenzofurane a été obtenu, ce qui est encourageant étant donné le nombre et le type d'étapes impliquées. L'optimisation des conditions devrait permettre d'augmenter significativement le rendement. Le grand intérêt de cette séquence réactionnelle à partir du dibenzofurane repose sur l'obtention d'un produit complexe en une seule étape.

La suite de la synthèse met en jeu la condensation du nitrométhane sur l'aldéhyde (VOGEL, 1991). L'essai réalisé semble montrer que l'étape limitante était la déshydratation pour obtenir le nitro α - β insaturé.

Il est intéressant de noter ici les applications synthétiques dont les groupements nitro α - β insaturés peuvent être l'objet et qui constituent leur intérêt en vue de fonctionnalisations. Ils peuvent par exemple être utilisés dans des réactions de DIELS-ALDER (FUJI et coll., 1990) ou comme accepteurs de MICHAEL (POSNER, 1990) (Schéma 17).

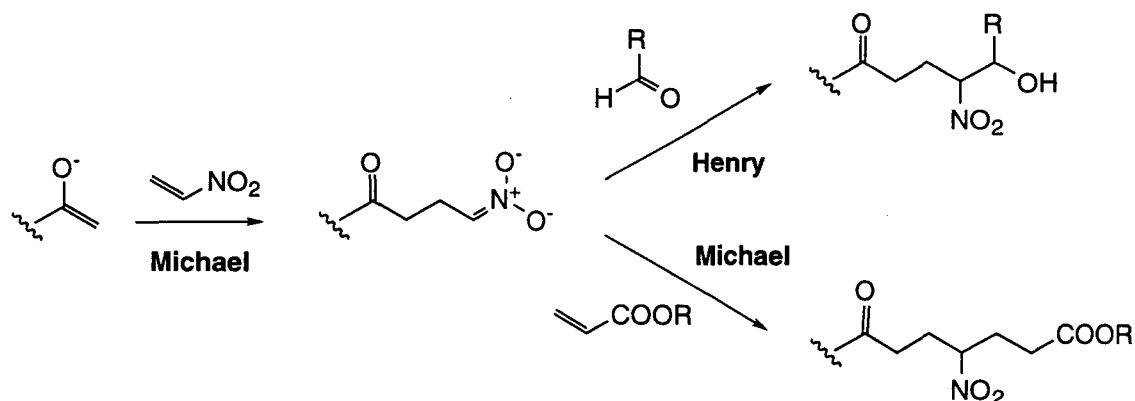


Schéma 17

Ils sont également les précurseurs de nombreux composés (KUMARAN et coll., 1994) (KABALKA, 1990) comme l'illustre le Schéma 18.

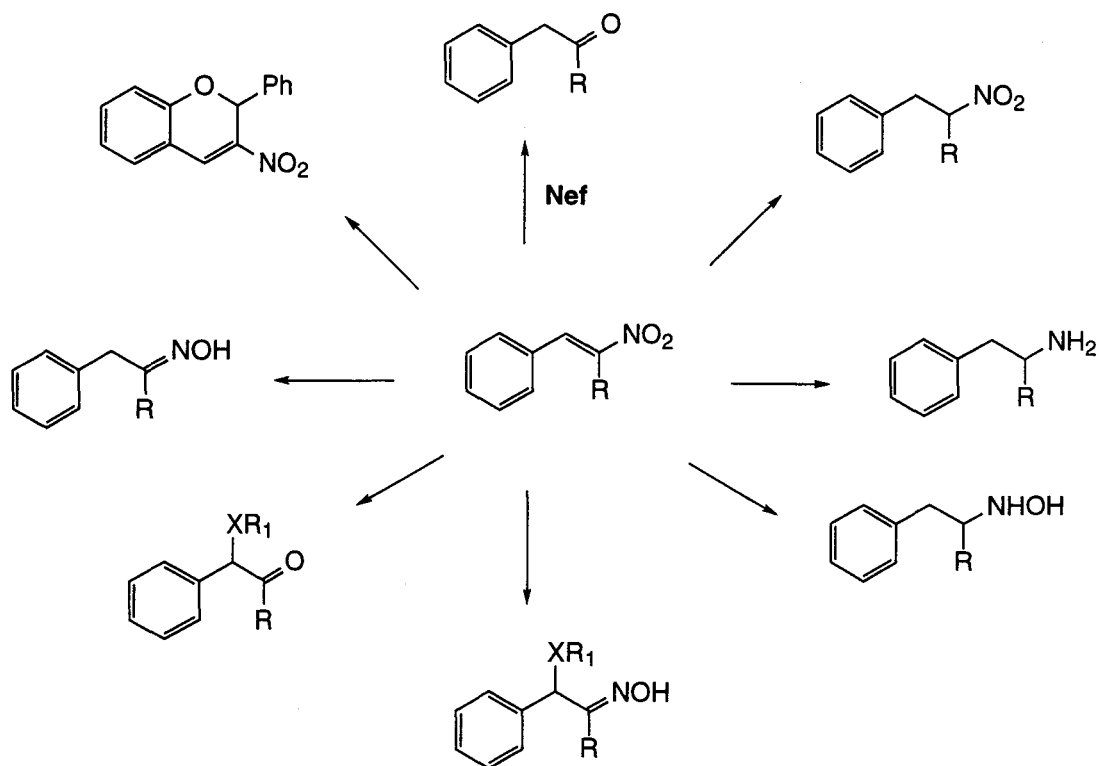
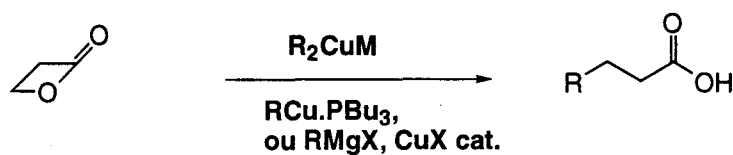


Schéma 18

La suite du schéma de synthèse implique la réduction de la fonction nitro α - β insaturée et la déprotection de l'ester, envisagées dans des conditions douces par transfert d'hydrogène (BARRET, 1988) (RAM et coll., 1988) (TROST, Vol 8, p 84). Le mime protégé peut être obtenu après action de la soude (pour enlever le groupement triméthylsilyl) et protection de la fonction amine par un groupement Boc ou Fmoc suivant la stratégie envisagée pour la synthèse peptidique.

Alternative au synthon silylé

L'homologation de trois carbones sur le noyau dibenzofurane, nécessaire à la formation de la chaîne portant l'acide, est également possible par l'ouverture de la β -propiolactone avec des réactifs organocuprates (KAWASHIMA et coll., 1989) :



Cela sous-entend la préparation du dérivé cuprate, qui peut être obtenu par addition de CuI à l'issue de la deuxième réaction de métallation. Cette séquence de réactions est peut être un

peu ambitieuse mais lorsque les conditions seront mises au point, on pourra obtenir directement l'acide 4-formyl 6-dibenzofuranepropanoïque. Il ne restera alors qu'à fonctionnaliser l'aldéhyde et former la chaîne aminoéthyle.

2.6. Conclusion

La nouvelle synthèse du mime à structure dibenzofurane proposée possède l'avantage de diminuer le nombre d'étapes et de permettre l'accès à des dérivés du mime, plus hydrophiles par exemple, en fonctionnalisant l'intermédiaire nitro α - β insaturé.

Pour cette nouvelle approche, les études de dissymétrisation du dibenzofurane peuvent être étendues et fournissent une méthode simple et originale de fonctionnalisation de noyaux aromatiques.

PUBLICATION

*One-pot synthesis of dissymmetrical
4,6-disubstituted dibenzofurans*

Fabienne JEAN, Oleg MELNYK et André TARTAR

Tetrahedron Letters, 1995, **36**, 7657-7660



0040-4039(95)01595-7

One-Pot Synthesis of Dissymmetrical 4,6-Disubstituted Dibenzofurans

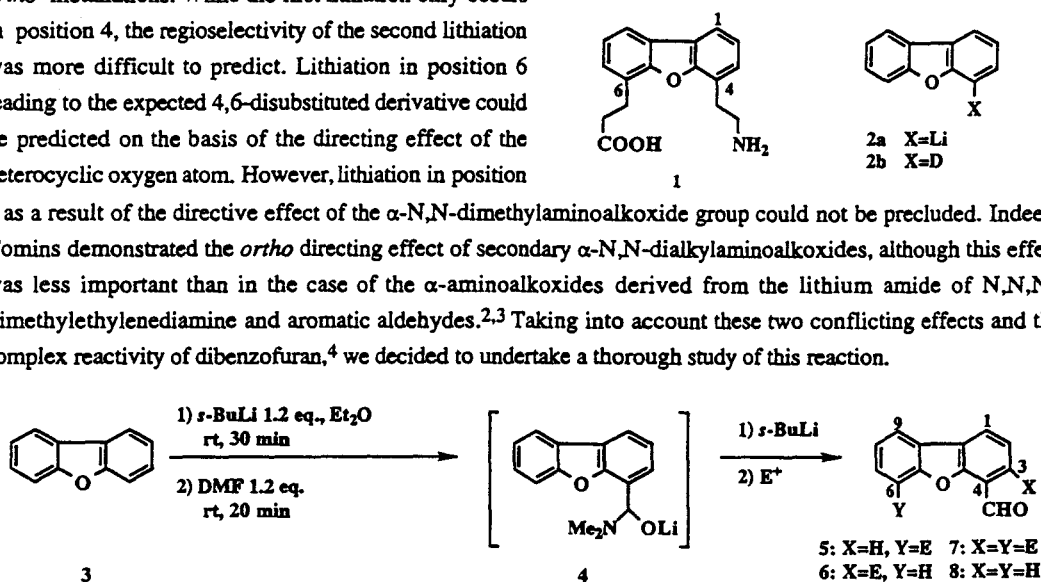
Fabienne Jean, Oleg Melnyk* and André Tartar

Laboratoire de Chimie des Biomolécules associé au CNRS, Institut Pasteur de Lille
1 rue du Professeur Calmette BP 245, 59019 Lille Cedex, France

Abstract: The one-pot dissymmetrization of dibenzofuran has been achieved using directed *ortho* metallations. Effects of temperature, reaction time, stoichiometry of the lithiation reagent, and solvent were studied to obtain the best selectivity.

In the course of a new synthesis of the β -turn mimic **1** first synthesized by Kelly and coworkers,¹ our work led us to study the dissymmetrization of dibenzofuran according to scheme 1. This strategy requires two successive *ortho* metallations. While the first lithiation only occurs in position 4, the regioselectivity of the second lithiation was more difficult to predict. Lithiation in position 6 leading to the expected 4,6-disubstituted derivative could be predicted on the basis of the directing effect of the heterocyclic oxygen atom. However, lithiation in position

3 as a result of the directive effect of the α -N,N-dimethylaminoalkoxide group could not be precluded. Indeed, Comins demonstrated the *ortho* directing effect of secondary α -N,N-dialkylaminoalkoxides, although this effect was less important than in the case of the α -aminoalkoxides derived from the lithium amide of N,N,N'-trimethylethylenediamine and aromatic aldehydes.^{2,3} Taking into account these two conflicting effects and the complex reactivity of dibenzofuran,⁴ we decided to undertake a thorough study of this reaction.



Scheme 1

The initial step involving the preparation of 4-lithiodibenzofuran **2a** was significantly improved by using *s*-BuLi instead of *n*-BuLi. The utilization of *s*-BuLi allowed the reaction to be performed in ether at room temperature instead of refluxing and reduced the reaction time from 15 h to 30 min.⁵ Quenching the reaction medium with D₂O yielded **2b** (99%, mp=80-81°C, lit⁵ 81-82°C). When treated with DMF (1.2 eq.), the monolithiated **2a** led to **4** which upon hydrolysis gave **8** (79%, mp=85-86°C). In order to study the

regioselectivity of the second metallation, intermediate **4** was subjected to different reaction conditions: temperature, reaction time, stoichiometry of *s*-BuLi and solvent. The resulting reaction medium was then treated with the electrophile D₂O, leading to the mixture of compounds **5** to **8** (E=D) in different proportions.

Table 1. Quenching Experiments with D₂O (for **5-8** E=D)

Entry	<i>s</i> -BuLi (eq.) ^a	T (°C)	Time(h)	5 (%)	6 (%)	7 (%)	8 (%)	Total yield %, (ratio 5/6) ^b
1	1.2	rt	0.5	54	20	5	21	63 (2.7)
2	1.5	rt	0.5	66	17	4	13	63 (3.9)
3	1.5	0	0.5	66	13	4	17	65 (5.1)
4	1.5	-10	2	64	13	4	19	68 (4.9)
5	1.5	-20	3	57	13	3	27	61 (4.4)
6	1.5	-50	3	37	8	4	51	64 (4.7)
7	2	rt	0.5	75	13	8	4	62 (4.7)
8 ^c	2	0	0.5	72	12	6	10	62 (6.0)
9 ^d	2	0	0.5	77	13	0	10	60 (5.9)
10 ^d	2	0	0.5	70	13	1	16	63 (5.4)
11	4	rt	0.5	63	12	23	2	63
12	4	rt	17	53	11	34	2	61
13	2x4	rt	17 and 6	39	4	56	1	55

a. *s*-BuLi added to intermediate **4** over 5 min; b. Mixture of aldehydes **5-8** purified by flash chromatography; c. No cyclohexane added before the second metallation step; final ratio cyclohexane/ether: 39%; d. Anhydrous cyclohexane added before the second metallation step; final ratio cyclohexane/ether: 50% for entry 9 and 65% for entry 10.

The ratio of the different deuterated isomers **5-8** (E=D) determined by ¹H NMR⁶ and mass spectroscopy analysis (EI) are shown in table 1. The best selectivity was obtained using 2 eq. *s*-BuLi at 0°C for 30 min (entry 8, table 1). However, several interesting observations can be made. First, a small amount of 3,6-dideuterated aldehyde **7** (E=D) was formed using the optimized conditions, although 10% of non deuterated aldehyde **8** remains (entry 8). This phenomenon has been confirmed with other electrophiles (see table 2). Considering the ease of dimetallation, we tried to improve the formation of dilithiated **7** (E=Li) by using a large excess of *s*-BuLi (entries 11-13). Unexpectedly, the amount of dideuterated aldehyde **7** (E=D) remained low for entries 11 and 12. These experiments indicate that under these conditions, among the two monolithiated derivatives, only **5** and not **6** (E=Li) underwent a second metallation to give **7** (E=Li). Another striking feature is the sensitivity of the ratio **5/6** (E=D) to the amount of *s*-BuLi introduced in the reaction medium (entries 1, 2, 7 and 3, 8). The total amount of *s*-BuLi (1.3 M in cyclohexane/hexane 92:8) added to the reaction mixture determines the ratio cyclohexane/ether. Increasing the quantity of *s*-BuLi simultaneously increases the cyclohexane/ether ratio. Both factors are expected to favour the formation of bulky aggregates which could have limited access to the more sterically hindered position 3. On the other hand, adding anhydrous cyclohexane to the reaction medium after the formation of **4** (E=Li) and before the second metallation step did not improve the ratio **5/6** (entries 9 and 10, table 1). Moreover, the increase of cyclohexane concentration in the reaction medium during *s*-BuLi addition could also be responsible for the decrease of the rate of dimetallation explaining why formation of the dideuterated aldehyde **7**

(E=D) is suppressed in entries 9 and 10 (table 1). This effect could also be responsible for the difficulties encountered entries 11-13, to obtain the dideuterated compound 7 (E=D) by using a large excess of *s*-BuLi.

Using *t*-BuLi instead of *s*-BuLi in the conditions of entry 6 (table 1) led to a mixture of aldehydes 5-8 (E=D) containing the non deuterated 8 as the major product (5: 17%, 6: 7%, 7: 3%, 8: 73%, 78% total yield).

In order to extend the scope of this reaction, we used other electrophiles (Me₃SiCl and MeI, table 2) under the conditions of entry 8 (table 1). Columns B indicate the composition of the crude mixture as determined by ¹H NMR after integration of the aldehydic protons.⁷ Aldehydes 5 (E=Me₃Si, E=Me) were isolated with 46% and 57% yield respectively after chromatography. 5 represents an interesting intermediate as it allows the functionalization of the dibenzofuran ring by electrophilic *ipso* substitution. We were surprised to observe low reaction rates for these experiments, which is clearly demonstrated by comparing entries 1 and 2 (table 2). It seems that intermediate 5 (E=Li) is highly aggregated in solution and for this reason less exposed to the electrophilic reagents (entries 1 and 2 of table 2, column B). Indeed, the crude mixture obtained in entry 1 contained 49% of monosilylated aldehyde 5 (E=Me₃Si) and 37% of aldehyde 8. Increasing the reaction time led to a larger amount of 5 (E=Me₃Si) but did not change the proportion of compounds 6 and 7 (E=Me₃Si).

Table 2. Quenching Experiments with Me₃SiCl and MeI in the Conditions of Entry 8 (Table 1)

Entry	E (eq.)	Time (T)	5 (%)		6 (%)		7 (%)		8 (%)	
			A	B	A	B	A	B	A	B
1	Me ₃ SiCl (4)	1h15 (0°C) then 45 min (rt)	25	49	4	9	2	5	16	37
2 ⁸	Me ₃ SiCl (4)	17h (rt)	46	72	4	8	2	4	8	16
3	MeI (4)	17h (rt)	57	79	7	8	4	4	7	9

A: isolated yield; B: determined by ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)

In conclusion, this new strategy permits the successful one-pot synthesis of dissymmetrical 4,6-disubstituted dibenzofurans.

Acknowledgments: We thank Dr. Guy Ricart for mass spectroscopy studies and Gérard Montagne for NMR experiments. We gratefully acknowledge financial support from Glaxo, Institut Pasteur de Lille and CNRS.

References and Notes

- Tsang, K.Y.; Diaz, H.; Graciani, N.; Kelly, J.W. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3988-4005.
 - Diaz, H.; Tsang, K.Y.; Choo, D.; Kelly, J.W. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3533-3545.
 - Diaz, H.; Espina, J. R.; Kelly, J.W. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8316-8318.
 - Diaz, H.; Tsang, K.Y.; Choo, D.; Espina, J.R.; Kelly, J.W. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3790-3791.
 - Diaz, H.; Kelly, J.W. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 5725-5728.
- Comins, D.L. *Synlett* **1992**, 615-625.
 - Comins, D.L.; Brown, J.D. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *54*, 3730-3732.
 - Comins, D.L.; Brown, J.D. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 1078-1083.

3. Snieckus, V. *Chem. Rev.* 1990, 90, 879-933.
4. Bird, C.W.; Cheeseman, G.W.H. in *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*; Katritzky, A.R.; Pergamon Press: Oxford, 1984; Vol. 4, Part 3, pp. 1-153.
5. Kemp, D.S.; Galakatos, N.G. *J. Org. Chem.* 1986, 51, 1821-1829.
6. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) for 8: δ 10.63 (d, 1H, CHO, $J_{\text{CHO}-2}=0.5$ Hz); 8.24 (dd, 1H, H_1 , $J_{1-2}=8$ Hz, $J_{1-3}=1$ Hz); 8.03 (ddd, 1H, H_9 , $J_{9-8}=8$ Hz, $J_{9-7}=1.4$ Hz, $J_{9-6}=0.7$ Hz); 8.00 (dd, 1H, H_3 , $J_{3-2}=8$ Hz, $J_{3-1}=1$ Hz); 7.73 (dt, 1H, H_6 , $J_{6-7}=8$ Hz, $J_{6-8}=J_{6-9}=0.7$ Hz); 7.57 (td, 1H, H_7 , $J_{7-6}=J_{7-8}=8$ Hz, $J_{7-9}=1$ Hz); 7.51 (td, 1H, H_2 , $J_{2-1}=J_{2-3}=8$ Hz, $J_{2-\text{CHO}}=0.5$ Hz); 7.45 (td, 1H, H_8 , $J_{8-7}=J_{8-9}=8$ Hz, $J_{8-6}=1$ Hz).
7. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) for: 5 ($\text{Y}=\text{SiMe}_3$): δ 10.73 (d, 1H, CHO, $J_{\text{CHO}-2}=0.5$ Hz); 8.22 (dd, 1H, H_1 , $J_{1-2}=8$ Hz, $J_{1-3}=1$ Hz); 8.03 (dd, 1H, H_9 , $J_{9-8}=8$ Hz, $J_{9-7}=1$ Hz); 7.99 (dd, 1H, H_3 , $J_{3-2}=8$ Hz, $J_{3-1}=1$ Hz); 7.63 (dd, 1H, H_7 , $J_{7-8}=8$ Hz, $J_{7-9}=1$ Hz); 7.49 (td, 1H, H_2 , $J_{2-1}=J_{2-3}=8$ Hz, $J_{2-\text{CHO}}=0.5$ Hz); 7.44 (t, 1H, H_8 , $J_{8-7}=J_{8-9}=8$ Hz); 0.52 (s, 9H, SiMe_3). 6 ($\text{X}=\text{SiMe}_3$): δ 10.91 (d, 1H, CHO, $J_{\text{CHO}-2}=0.5$ Hz); 8.16 (d, 1H, H_1 , $J_{1-2}=8$ Hz); 8.01 (m, 1H, H_9); 7.69 (m, 2H, H_2 and H_6); 7.54 (td, 1H, H_7 , $J_{7-6}=J_{7-8}=8$ Hz, $J_{7-9}=1$ Hz); 7.43 (td, 1H, H_8 , $J_{8-7}=J_{8-9}=8$ Hz, $J_{8-6}=1$ Hz); 0.42 (s, 9H, SiMe_3). 7 ($\text{X}=\text{Y}=\text{SiMe}_3$): δ 10.95 (d, 1H, CHO, $J_{\text{CHO}-2}=0.5$ Hz); 8.16 (d, 1H, H_1 , $J_{1-2}=8$ Hz); 8.03 (dd, 1H, H_9 , $J_{9-8}=8$ Hz, $J_{9-7}=1$ Hz); 7.69 (dd, 1H, H_2 , $J_{2-1}=8$ Hz, $J_{2-\text{CHO}}=0.5$ Hz); 7.63 (dd, 1H, H_7 , $J_{7-8}=8$ Hz, $J_{7-9}=1$ Hz); 7.43 (t, 1H, H_8 , $J_{8-7}=J_{8-9}=8$ Hz); 0.51 (s, 9H, SiMe_3); 0.43 (s, 9H, SiMe_3). 5 ($\text{Y}=\text{Me}$): δ 10.72 (d, 1H, CHO, $J_{\text{CHO}-2}=0.5$ Hz); 8.20 (dd, 1H, H_3 or H_1 , $J=8$ Hz, $J=1$ Hz); 7.99 (dd, 1H, H_1 or H_3 , $J=8$ Hz, $J=1$ Hz); 7.84 (m, 1H, H_7 or H_9); 7.49 (td, 1H, H_2 , $J_{2-1}=J_{2-3}=8$ Hz, $J_{2-\text{CHO}}=0.5$ Hz); 7.37 (m, 1H, H_7 or H_9); 7.34 (t, 1H, H_8 , $J_{8-9}=J_{8-7}=8$ Hz); 2.69 (d, 3H, Me, $J_{\text{Me}-7}=0.5$ Hz). 6 ($\text{X}=\text{Me}$): δ 10.95 (d, 1H, CHO, $J_{\text{CHO}-2}=0.5$ Hz); 8.05 (d, 1H, H_1 , $J_{1-2}=8$ Hz); 7.97 (ddd, 1H, H_9 , $J_{9-8}=8$ Hz, $J_{9-7}=1.4$ Hz, $J_{9-6}=0.7$ Hz); 7.68 (dt, 1H, H_6 , $J_{6-7}=8$ Hz, $J_{6-8}=J_{6-9}=0.7$ Hz); 7.52 (td, 1H, H_7 , $J_{7-8}=8$ Hz, $J_{7-9}=1$ Hz); 7.42 (td, 1H, H_8 , $J_{8-7}=J_{8-9}=8$ Hz, $J_{8-6}=1$ Hz); 7.26 (dd, 1H, H_2 , $J_{2-\text{CHO}}=0.5$ Hz); 2.85 (s, 3H, Me). 7 ($\text{X}=\text{Y}=\text{Me}$): δ 10.98 (d, 1H, CHO, $J_{\text{CHO}-2}=0.5$ Hz); 8.00 (d, 1H, H_1 , $J=8$ Hz); 7.77 (m, 1H, H_7 or H_9); 7.31 (m, H_8 and H_7 or H_9); 7.22 (dd, 1H, H_2 , $J_{2-1}=8$ Hz, $J_{2-\text{CHO}}=0.5$ Hz); 2.82 (s, 3H, Me); 2.65 (s, 3H, Me).
8. Typical procedure (synthesis of 5, 6, 7 ($\text{E}=\text{Me}_3\text{Si}$) in the conditions of entry 2 table 2): *s*-BuLi (1.65 ml, 2.14 mmol, 1.3 M in cyclohexane/hexane 92:8) was added dropwise at rt over 10 min, under an inert atmosphere of argon, to a solution of dibenzofuran (300 mg, 1.79 mmol) in anhydrous ether (6.9 ml). The reaction mixture was stirred at rt for 30 min, forming a yellow coloured anion. DMF (165 μl , 2.14 mmol) was then added dropwise. After 20 min the reaction mixture was cooled to 0°C for the second dropwise addition over 10 min of *s*-BuLi (2.75 ml, 3.57 mmol) and stirred for 30 min after which time freshly distilled Me_3SiCl (907 μl , 7.14 mmol) was added. After stirring for 17h at rt, 30 ml of a saturated solution of KH_2PO_4 was added at 0°C with vigorous stirring. After extraction with dichloromethane (3x60 ml), the organic layers were combined, dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and the solvents removed *in vacuo*. Purification by column chromatography on silica gel ($\text{C}_6\text{H}_{12}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 3:1) furnished 5, 6, 7 ($\text{E}=\text{Me}_3\text{Si}$) and 8.

(Received in France 22 July 1995; accepted 22 August 1995)

PARTIE II

***INCORPORATION DU MIME DE COUDE β A
STRUCTURE DIBENZOFURANE DANS
LA SCYLLATOXINE***

PARTIE II

INCORPORATION DU MIME DE COUDE β A STRUCTURE DIBENZOFURANE DANS LA SCYLLATOXINE

Introduction

En parallèle de l'étude sur une nouvelle approche de synthèse du mime de coude β à structure dibenzofurane (mime-DBF), celui-ci a été synthétisé selon le protocole décrit par KELLY, pour être incorporé dans deux modèles de protéine. Cette seconde partie présente l'incorporation du mime-DBF dans le premier modèle : la scyllatoxine.

Le choix du modèle protéique repose sur un certain nombre de critères qui seront tout d'abord présentés. Après avoir vérifié par modélisation moléculaire que l'incorporation du mime dans la scyllatoxine, selon des critères stériques et géométriques était possible, la synthèse de la toxine modifiée a été entreprise. Nous verrons quelle a été l'influence du mime sur le déroulement de la synthèse et sur l'étape de repliement et de formation des ponts disulfure. Enfin, l'évaluation structurale et fonctionnelle de la scyllatoxine modifiée avec le mime-DBF (scyllatoxine-DBF) sera présentée.

CHAPITRE I : CHOIX DU MODELE SCYLLATOXINE

1. Cahier des charges

1.1. La taille

La taille du modèle devait être compatible avec les techniques de synthèse peptidique en phase solide couramment employées. La synthèse a en effet été envisagée de façon récurrente, une séquence trop longue compromettrait l'obtention en quantité suffisante de la chaîne peptidique modifiée. D'autre part, la taille est également un facteur déterminant au niveau de l'analyse structurale par RMN. En effet, lorsque l'on étudie la structure de protéines possédant plus de 70 résidus environ, il est nécessaire de recourir à des techniques particulières comme l'enrichissement de certains résidus, ou de tous, en ^{15}N et/ou ^{13}C et/ou ^2H (BAX, 1994).

1.2. Les éléments de structure secondaire

Pour étendre l'étude des applications possibles du mime-DBF, qui n'a été incorporé que dans de petits peptides (études de KELLY exposées dans l'Introduction Générale), nous avons décidé de l'incorporer dans un contexte de protéine, défini par une structure tridimensionnelle.

Malgré une taille raisonnable, le modèle doit cependant posséder les éléments de structure secondaire que l'on rencontre habituellement dans les protéines, c'est-à-dire au moins un coude β , indispensable dans le cadre de cette étude, une hélice α , un feuillet β .

1.3. L'activité biologique

L'activité biologique est une très bonne sonde de la conservation ou non de l'intégrité de la structure tertiaire de la protéine modifiée. Le modèle retenu doit donc posséder une activité biologique connue et facilement mesurable. Cependant, elle ne doit pas impliquer les résidus du coude β , pour conserver la possibilité de détecter l'activité dans la protéine modifiée.

D'autre part, l'incorporation d'un élément non naturel dans un modèle possédant une activité biologique est important si l'on envisage, à plus long terme, la conception de molécules à visée thérapeutique.

2. Choix du premier modèle : la scyllatoxine

2.1. Toxines de scorpion et ingénierie des protéines

Les toxines de scorpion se présentent sous deux grandes familles : les toxines à chaîne longue (60-70 résidus) et les toxines à chaîne courte (30-40 résidus).

Les toxines de scorpion, à chaîne courte en particulier, sont des molécules présentant un grand intérêt en ingénierie des protéines et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, leur taille est réduite (30 à 40 résidus) ce qui permet, d'une part, une synthèse facile à l'aide des stratégies classiques de synthèse peptidique en phase solide, et d'autre part, une étude structurale facilitée : l'étude RMN est moins complexe que pour de grosses protéines. Malgré leur petite taille ces mini-protéines possèdent les éléments de structure secondaire que l'on rencontre couramment dans les protéines : hélice α , feuillet β , coude β , boucle, adoptant un repliement caractéristique $\alpha\beta$ (hélice α sur feuillet β) (BONTEMS et coll., 1991). De plus, la présence de ponts disulfure confère à la structure une grande stabilité. Ce point est probablement à l'origine de la grande tolérance de ces motifs structuraux à des mutations ponctuelles d'acides aminés (GRANIER et coll., 1978; SABATIER et coll., 1994) et a été exploité lors de l'incorporation de séquences de plusieurs acides aminés, support d'une activité biologique exogène particulière. Ainsi, le site de liaison au métal de l'anhydrase carbonique B (VITA et coll., 1995; PIERRET et coll., 1995) ou la partie d'un feuillet d'une toxine de serpent qui a la capacité de se lier aux récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (DRAKOPOULOU et coll., 1996; ZINN-JUSTIN et coll., 1996), ont été intégrés dans la charybdotoxine. Cette adaptabilité a également été testée avec l'apamine, toxine d'abeille à deux ponts disulfure, dans laquelle a été incorporé un fragment de séquence du peptide S de la ribonuclease A (PEASE et coll., 1990). La grande tolérance de ce motif $\alpha\beta$ par rapport à la séquence en acides aminés se traduit au niveau fonctionnel par la diversité des cibles de ces toxines. En effet, leur activité s'exerce, avec une grande spécificité, sur différents types de canaux : les canaux K^+ de faible conductance (scyllatoxine (AUGUSTE et coll., 1990)), les canaux K^+ de grande conductance (charybdotoxine (SMITH et coll., 1986)), les canaux Cl^- (chlorotoxine (LIPPENS et coll., 1995)). De part ces activités, les toxines sont des outils pharmacologiques puissants pour l'exploration de nombreux types de canaux, permettant ainsi l'étude de mécanismes biologiques (TSUTSUMI et coll., 1995).

Dans une approche plus structurale de l'utilisation de ces toxines, la recherche d'un motif structural minimal basé sur le repliement $\alpha\beta$ de la scyllatoxine a été réalisée. Il comprend l'hélice α et le feuillet β mais seulement deux ponts disulfure, le pont Cys 3 - Cys 21 étant supprimé. L'étude structurale montre une structure globalement conservée mais avec de légères différences par rapport à la charybdotoxine, prise comme modèle de référence, notamment au niveau de l'orientation de l'hélice α . L'axe du feuillet forme un angle de 16° par rapport à l'axe de l'hélice, cet angle étant de -45° dans le cas de la charybdotoxine. Aucune validation biologique n'a été effectuée (PAGEL et WEMMER, 1994).

Les toxines de scorpion apparaissent donc comme des molécules extrêmement intéressantes au niveau structural grâce au motif $\alpha\beta$ et permettent d'envisager une approche de la relation structure/activité biologique sur un modèle structural relativement simple servant d'« échafaudage moléculaire » (VITA et coll., 1995). A notre connaissance, seuls des éléments naturels y ont été insérés et nous envisageons ici l'incorporation d'un élément de structuration non naturel, en l'occurrence un mime de coude β à structure dibenzofurane.

2.2. Choix de la scyllatoxine

Considérant les différents points mentionnés précédemment, le choix du premier modèle dans lequel le mime-DBF a été incorporé, s'est porté sur une toxine de scorpion : la scyllatoxine (figure 1). Cette toxine à chaîne courte de 31 acides aminés, est de taille parfaitement compatible avec la synthèse peptidique, sa synthèse est d'ailleurs maîtrisée au laboratoire. Sa taille est également compatible avec une étude structurale par RMN. La structure tridimensionnelle de la scyllatoxine est connue (MARTINS et coll., 1990, 1995). Enfin, elle possède une activité biologique bien définie : elle agit sur les canaux potassium, calcium-dépendants (K_{Ca}), de faible conductance (AUGUSTE et coll., 1990).

La scyllatoxine a d'abord été appelée leiurotoxine I, mais pour ne pas la confondre avec les leiurotoxines actives sur les canaux Na^+ , et également la distinguer de la charybdotoxine, autre toxine extraite du même venin et active sur les canaux potassium calcium-dépendants mais de grande conductance, AUGUSTE et coll. (1990) ont proposé le nom de scyllatoxine.

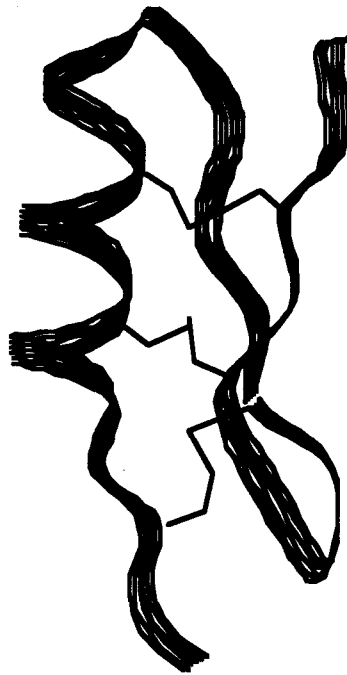


Figure 1 : Représentation en ruban de la scyllatoxine

2.3. La scyllatoxine

2.3.1. Présentation

La scyllatoxine a été identifiée (CASTLE et coll., 1986) (Abia, 1986), isolée et caractérisée (CHICCHI et coll., 1988) à partir du venin de scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, où elle représente moins de 0,02% des protéines du venin. Sa séquence est la suivante :



L'extrémité C-terminale de la toxine est amidée. Elle possède trois ponts disulfure liant les Cys 3 et 21, 8 et 26, 12 et 28.

2.3.2. Activité biologique

La scyllatoxine a la capacité d'inhiber la fixation de l'apamine sur son récepteur. L'apamine est une toxine de 18 résidus, présentant deux pont disulfure et extraite du venin de l'abeille *Apis mellifera*. La liaison de l'apamine à son récepteur a été corrélée avec l'inhibition

d'une classe spécifique de canaux potassium calcium-dépendants de certains neurones, ce qui conduit à une atténuation de la phase lente d'après hyperpolarisation qui suit normalement le potentiel d'action (HUGUES et coll., 1982 a,b,c).

Apamine et scyllatoxine (Schéma 1) ont pour point commun de présenter toutes deux dans leur séquence de nombreux résidus basiques et de posséder une His amidée en position C-terminale. Mais il n'y a pas de reconnaissance immunologique croisée. Cependant, la scyllatoxine possède les mêmes caractéristiques fonctionnelles que l'apamine, présentées ci-après.



Schéma 1

L'évaluation biologique de la scyllatoxine a été effectuée sur la base de différents tests : au niveau pharmacologique avec la compétition avec l'apamine marquée à l'iode 125, au niveau biologique avec le test de contraction de *Taenia coli* de cobaye et effet électrophysiologique sur des cellules musculaires en culture.

a - Compétition avec l'apamine

Apamine et scyllatoxine inhibent totalement la fixation de ¹²⁵I-apamine sur des membranes synaptosomales de cerveau de rat avec IC₅₀ = 20 pM et 365 pM respectivement. Le K_i apparent est de 75 pM pour la scyllatoxine. La scyllatoxine est ainsi 10 à 20 fois moins active que l'apamine (CHICCHI et coll., 1988). Les analyses de Scatchard ont montré que la scyllatoxine est un inhibiteur compétitif de la fixation de l'apamine sur son récepteur (AUGUSTE et coll., 1990).

b - Contraction de *Taenia coli* de cobaye

Apamine et scyllatoxine provoquent la contraction de *Taenia coli* préalablement détendu par un traitement à l'épinéphrine qui inhibe toute contraction spontanée. Les concentrations nécessaires pour induire 50% de la contraction (ED₅₀) sont de 1,2 nM et 6,5 nM respectivement (CHICCHI et coll., 1988). La scyllatoxine induit une activité contractile rythmique, réversible par simple lavage. Les analogues [Tyr²] scyllatoxine et iodo-[Tyr²] scyllatoxine possèdent les mêmes ED₅₀ : 6 ± 1,5 nM (AUGUSTE et coll., 1990).

c - Effet électrophysiologique sur cellules musculaires en culture

L'effet électrophysiologique a été testé sur des cellules musculaires de rat en culture. AUGUSTE et coll. (1990) ont montré que la scyllatoxine bloque la phase d'après hyperpolarisation suivant le potentiel d'action. Celle-ci est normalement due à l'activation d'une conductance K^+ , Ca^{2+} -dépendante, spécifiquement bloquée par l'apamine.

L'action de la scyllatoxine a également été testée et localisée sur d'autres modèles comme la lignée cellulaire humaine neuroblastome NB-OK 1 (GOSSEN et coll., 1991) ainsi que sur les neurones d'hippocampe et les ganglions sympathiques de grenouille (GOH et coll., 1992). Il faut également noter qu'un équivalent endogène de la scyllatoxine a été caractérisé dans la lignée cellulaire tumorale phéochromocytome (PC 12) (AUGUSTE et coll., 1992a). Ce ligand endogène entre également en compétition avec l'apamine en se liant aux canaux K^+ , Ca^{2+} -dépendants. Il bloque sélectivement la phase d'hyperpolarisation suivant le potentiel d'action, ce qui est l'expression physiologique d'une famille de canaux K^+ , Ca^{2+} -dépendants, et il contracte *Taenia coli* de cobaye après relaxation par l'épinéphrine. Il possède donc les principales activités biologiques de la scyllatoxine. Au niveau de sa caractérisation, il est de nature peptidique car il ne résiste pas aux traitements des protéases et il semble posséder des ponts disulfure car reste stable à la dénaturation thermique. Enfin, il n'est pas reconnu par les anticorps dirigés contre l'apamine mais est reconnu par des anticorps anti-scyllatoxine ce qui suggère la présence d'éléments structuraux communs.

2.3.3. Synthèse

Dans un premier temps, la synthèse de la scyllatoxine a été réalisée au laboratoire sur synthétiseur automatique et selon une stratégie Boc/benzyle (AUGUSTE et coll., 1990). La synthèse a ensuite été optimisée par l'utilisation de la stratégie Fmoc/*t*-butyle. C'est donc cette stratégie qui a été retenue pour la synthèse de la scyllatoxine modifiée avec le mime-DBF.

A



B

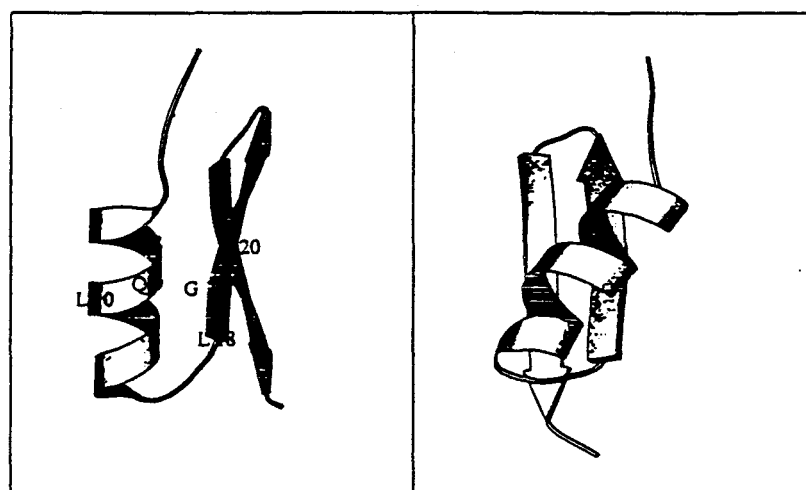


Figure 2 : A. Vues stéréo de la scyllatoxine. B. Représentation en ruban faisant apparaître le « twist » du feuillet β .

2.3.4. Structure

2.3.4.1. Eléments de structure secondaire

Les éléments de structure secondaire de la scyllatoxine ont été déterminés par RMN par MARTINS et coll. (1990). Cette étude fait apparaître la présence d'une hélice α (Arg 6 - Gly 16), et d'un feuillet β (Leu 18 - Val 29) constitué de deux brins anti-parallèles reliés par un coude β centré sur les résidus Gly 23 et Asp 24.

2.3.4.2. Structure tridimensionnelle

La détermination de la structure tridimensionnelle réalisée par MARTINS et coll. (1995) a été faite par RMN (Figure 2). Elle a permis de mieux cerner les limites des éléments de structure secondaire notamment pour l'hélice α qui forme 2,5 tours de Leu 5 à Ser 14. Le feuillet β présente quant à lui un *twist* orienté vers la droite ainsi que chaque brin du feuillet. Les deux brins β se croisent au niveau des résidus Ile 22 et Glu 27. Le type de coude β n'a pu être déterminé par manque de données RMN et/ou une certaine flexibilité conformationnelle de cette partie de la molécule. Les protons méthyléniques ($H\alpha_1$, $H\alpha_2$) de Gly 23 n'ont en effet pas pu être attribués stéréospécifiquement. La distance la plus courte entre l'hélice et le feuillet se situe entre les résidus Gln 9 et Gly 19. Le peu d'espace disponible dans cette région ne permet la présence que de l'hydrogène pro-S d'une Gly, une chaîne latérale ne serait pas tolérée stériquement. La conservation de Gly à cette position se retrouve donc dans la séquence d'autres toxines de scorpion et défensines d'insecte (CORNET et coll., 1995) et de γ -thionines de plantes (BRUIX et coll., 1993). La position de cet acide aminé est d'ailleurs conservée avec celle des Cys selon le motif consensus suivant (BONTEMS et coll., 1991) valable pour la plupart des toxines de scorpion :

- Cys - (...) - Cys - aa - aa - aa - Cys - (...) - Gly - aa - Cys - (...) - Cys - aa - Cys - (...) -

Des exceptions à ce motif ont cependant été identifiées dans la noxiustoxine où un résidu Ala supplémentaire s'intercale dans le motif Gly - aa - Cys (DAUPLAIS et coll., 1995), dans la maurotoxine, toxine à 4 ponts disulfure où l'on trouve Ala à la place de Gly, dans le peptide PO1, (BLANC et coll., 1996) et dans le leuropeptide II qui présentent une Pro dans l'hélice et où Ala remplace Gly également (BUISINE et coll., 1997).

L'attribution des ponts disulfure de la scyllatoxine a été effectuée à l'aide d'une méthode statistique basée sur les données RMN (MARTINS et coll., 1995). Les ponts disulfure de la scyllatoxine relient les Cys suivantes : Cys 3 et Cys 21, Cys 8 et Cys 26, Cys 12 et Cys 28. Ceci est en accord avec les attributions des ponts disulfure, faites après hydrolyses chimique et

enzymatique, sur PO5-NH₂, l'analogue amidé d'une toxine du scorpion *Androctonus mauretanicus mauretanicus* et présentant 87% d'homologie avec la scyllatoxine (SABATIER et coll, 1993). Les ponts disulfure Cys 8 - Cys 26 et Cys 12 - Cys 28 relient une face de l'hélice avec le second brin du feuillet β . Le pont Cys 3 - Cys 21 maintient la partie N-terminale de la toxine sur le premier brin du feuillet.

De plus amples détails structuraux seront donnés lors de l'interprétation des données RMN et l'étude structurale de la scyllatoxine-DBF.

2.3.4.3. Relation structure / activité biologique

Les éléments essentiels intervenant dans l'activité biologique ont été déterminés grâce à plusieurs études. Les modifications chimiques faites par AUGUSTE et coll. (1992b) ont permis de montrer que les résidus Arg 6 et Arg 13 de la scyllatoxine, modifiés par action de la 1,2-cyclohexanedione, entraînent une perte de l'activité, elles sont donc essentielles pour la liaison au récepteur apamine/scyllatoxine et pour la contraction de *Taenia coli*. Ceci est à rapprocher de la présence de 2 Arg adjacentes dans l'apamine (Arg 13 et 14) qui ont également été montrées comme essentielles dans la liaison au récepteur (GRANIER et coll. 1978). La structure tridimensionnelle de la scyllatoxine montre en effet la proximité des deux Arg qui se situent sur le même côté de l'hélice (MARTINS et coll., 1995). Cependant leur disposition non adjacente expliquerait qu'elles interagissent moins bien avec le récepteur que dans le cas de l'apamine ou de PO5, qui présentent une meilleure affinité (MEUNIER et coll., 1993).

L'iodation de His 31 provoque une perte d'activité importante d'un facteur 40 pour la liaison au récepteur et un facteur 100 pour la contraction de *Taenia coli* (AUGUSTE et coll., 1992b). D'autre part, lorsque l'extrémité C-terminale porte une fonction acide carboxylique simple au lieu d'une fonction carboxamide, l'affinité est réduite d'un facteur 4 (AUGUSTE et coll., 1990). L'importance de la présence de His 31 est donc démontrée et l'on peut envisager qu'elle participe à l'interaction avec le récepteur étant donné qu'un certain nombre des structures générées par MARTINS et coll. (1995) présentent His 31 à proximité de l'extrémité C-terminale de l'hélice.

La modification des Lys par guanidination ne change pas significativement l'interaction avec le récepteur apamine/scyllatoxine du cerveau mais elle induit une baisse importante de l'activité contractile d'un facteur 70. Deux hypothèses sont données par les auteurs : (i) les modifications des Lys n'altéreraient pas l'interaction avec les sites de liaison présents dans le cerveau mais l'interaction avec ceux présents dans *Taenia coli* ; (ii) la liaison au récepteur ne serait pas altérée mais l'expression fonctionnelle serait affectée (AUGUSTE et coll., 1990).

Le résidu Asp 24, qui appartient au coude β n'a pas pu être modifié par estérification et l'hypothèse d'une liaison ionique avec Lys 25, rendant la chaîne latérale de Asp 24 non réactive, a été avancée (AUGUSTE et coll., 1992b). Quant à Glu 27, la modification de sa chaîne latérale ne provoque pas de modification pour la liaison aux récepteurs du cerveau mais, comme dans le cas des Lys, l'activité de contraction est affectée (facteur 30). Glu 27 pourrait ainsi être également impliqué dans l'étape fonctionnelle qui suit l'interaction de la toxine sur le récepteur et qui serait nécessaire au blocage des canaux K_{Ca} .

La conclusion de ces expériences de modifications chimiques repose sur l'importance déterminante des résidus Arg 6 et 13, résidus situés à la surface de l'hélice exposée au solvant, ainsi que His 31, pour la liaison aux canaux K_{Ca} . La partie du feuillet β avec les résidus Lys 20, 25, 30 et Glu 27 serait plus impliquée dans une étape postérieure à la liaison au récepteur et importante pour le blocage des canaux K_{Ca} .

Une autre approche consistant à synthétiser des analogues par remplacement de certains acides aminés, a permis de confirmer l'importance de la présence du résidu chargé positivement Arg 6. D'autre part la molécule chimère [M 22, K 24, R 27] scyllatoxine conserve une activité, ce qui montre que les résidus chargés négativement Asp 24 et Glu 27 ne semblent pas déterminants pour la liaison au récepteur (SABATIER et coll., 1994). Il est donc confirmé ici que Asp 24 n'est pas impliqué dans l'activité de la scyllatoxine, il n'est donc pas gênant de substituer les résidus Gly 23 et Asp 24 par le mime-DBF.

Les auteurs ont également mis en évidence que la substitution de Met 7 par Arg permet d'accroître l'affinité pour le récepteur d'un facteur 12. Cela suggère que le résidu Arg positivement chargé pourrait contribuer à une meilleure interaction avec le récepteur.

De ces expériences, il apparaît que la scyllatoxine se lierait au récepteur au niveau de l'hélice α , avec l'implication des résidus chargés Arg 6 et 13 ainsi que de His 31. Le potentiel électrostatique de la molécule a été calculé : la face exposée de l'hélice α est fortement positive et l'on peut envisager l'implication d'interactions électrostatiques dans la reconnaissance entre la toxine et le récepteur (INISAN et coll., 1995). L'expression fonctionnelle, blocage du canal K_{Ca} , se ferait quant à elle par la face du feuillet β avec l'intervention potentielle de la chaîne latérale des résidus Lys 20, 25, 30 et Glu 27.

L'activité biologique n'implique donc pas les résidus du coude β , ce qu'il fallait vérifier pour répondre aux contraintes posées sur le choix du modèle.

Quant au rôle des ponts disulfure, il semble que le pont reliant les Cys 3 et 21 n'est pas nécessaire à l'activité de la scyllatoxine pour les tests de compétition avec l'apamine iodée (SABATIER et coll., 1996). En effet, l'analogue de la scyllatoxine comportant deux résidus 2-aminobutyrate (Abu) en position 3 et 21, à la place des cystéines, présente, d'après les études menées par dichroïsme circulaire, les mêmes caractéristiques structurales que la scyllatoxine. Le maintien structural de la molécule étant assuré par les ponts 8-26 et 12-28, le pont 3-21 maintiendrait la partie N-terminale sur le feuillet. Cependant, pour ce qui est de l'analogue Abu 3,21, il ne faut peut être pas exclure qu'une éventuelle interaction hydrophobe entre les chaînes latérales des résidus aminobutyriques, remplaçant les cystéines 3 et 21, permette une certaine rigidification de la structure en mimant le pont disulfure.

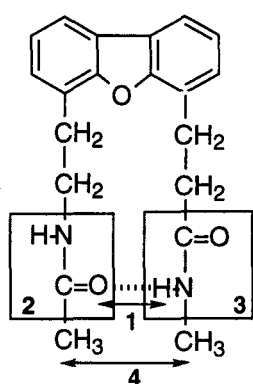
3. Conclusion

A la vue des éléments définis précédemment caractérisant la scyllatoxine tant au niveau structural que fonctionnel, avec également l'intérêt de ces molécules en ingénierie des protéines, nous disposons ici d'un modèle adéquat pour l'incorporation du mime-DBF.

Chapitre II : Incorporation du mime à structure dibenzofurane dans la scyllatoxine

1. Etude préliminaire par modélisation moléculaire

Avant d'entreprendre la synthèse, la compatibilité structurale à l'incorporation du mime dans la scyllatoxine a été vérifiée, suivant des critères géométriques et stériques. Le mime-DBF sous sa forme N-acétyl et C-carboxamide a été minimisé dans le champ de force CVFF et six conformations de basse énergie ont été retenues selon les critères suivants :



- la distance (1) entre l'oxygène du groupement N-acétyl et l'hydrogène porté par l'azote du groupement C-carboxamide (correspondant à la liaison hydrogène entre -CO de Ile 22 et -NH de Lys 25) doit être inférieure à 2,5 Å;
- l'angle entre les plans (2) et (3) définis par les fonctions CONH varie entre 80° et 180°;
- la distance (4) séparant les atomes de carbone de la fonction N-acétyl et C-carboxamide (correspondant à la distance séparant les C α de Ile 22 et Lys 25) varie entre 4 Å et 6 Å.

Le remplacement des résidus Gly 23 et Asp 24 par les différentes conformations du mime-DBF a montré que l'incorporation du mime semblait compatible avec la structure de la scyllatoxine selon des critères géométriques et stériques.

2. Synthèse de la scyllatoxine-DBF

Deux synthèses de la scyllatoxine-DBF ont été menées en parallèle. La différence entre les deux se situe au niveau de la protection des Cys. Dans la première synthèse, toutes les Cys étaient protégées avec le même groupe protecteur (trityle) et dans la seconde, les Cys étaient protégées de façon « orthogonale » : les Cys appartenant à un même pont sont protégées avec le même groupement. Et les trois groupements protecteurs employés sont acétamidométhyle, méthoxybenzyle, et trityle. Nous nous intéresserons à la synthèse non orthogonale (nommée synthèse de la scyllatoxine-DBF (Trt)), que nous comparerons ensuite à la synthèse orthogonale (scyllatoxine-DBF (ortho)).

Il a été mentionné précédemment que la stratégie la plus efficace pour la synthèse de la scyllatoxine est la stratégie Fmoc/*t*-butyle. C'est donc cette dernière que nous avons retenue pour entreprendre la synthèse manuelle de la scyllatoxine-DBF. Comme le montre le Schéma 2, le mime est incorporé tôt lors du déroulement de la synthèse, qui s'effectue classiquement du côté C-terminal vers le côté N-terminal. Nous avons donc envisagé un suivi de la synthèse à chaque étape et en particulier après l'incorporation du mime pour mettre en évidence les éventuelles difficultés de couplage dues à la présence du mime.

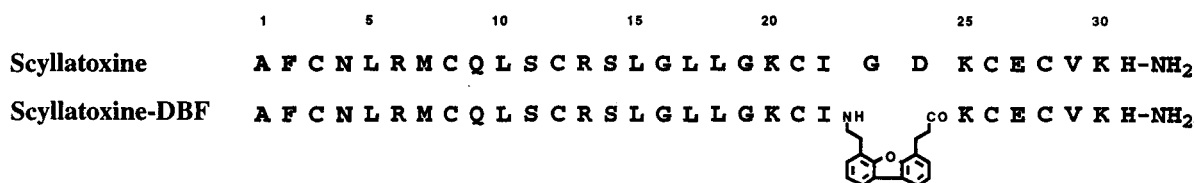


Schéma 2

2.1. Suivi de la synthèse

Le suivi de la synthèse de la scyllatoxine-DBF a été entrepris selon une approche qualitative par appréciation de l'efficacité de couplage par des tests colorimétriques classiques : le test à la ninhydrine ou test de Kaiser (SARIN et coll., 1981) et le test à l'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS) (HANCOCK et coll., 1976). Une approche quantitative a permis d'estimer la proportion d'incorporation des acides aminés à différents moments de la synthèse. Pour cela, des échantillons de résine sont prélevés régulièrement au cours de la synthèse. Puis ces échantillons sont soumis à une hydrolyse acide totale et l'analyse d'acides aminés permet de déterminer ensuite la composition en acides aminés présents au moment du prélèvement de l'échantillon. Et l'on peut établir ainsi, en soustrayant les valeurs obtenues au moment du prélèvement *i* à celles obtenues au prélèvement *i*-1, la proportion des acides aminés incorporés entre les deux prélèvements. Les résultats sont représentés sous la forme d'un graphique (Schéma 3) pour la synthèse de la scyllatoxine non modifiée (**A**) et la synthèse de la scyllatoxine-DBF (**B**).

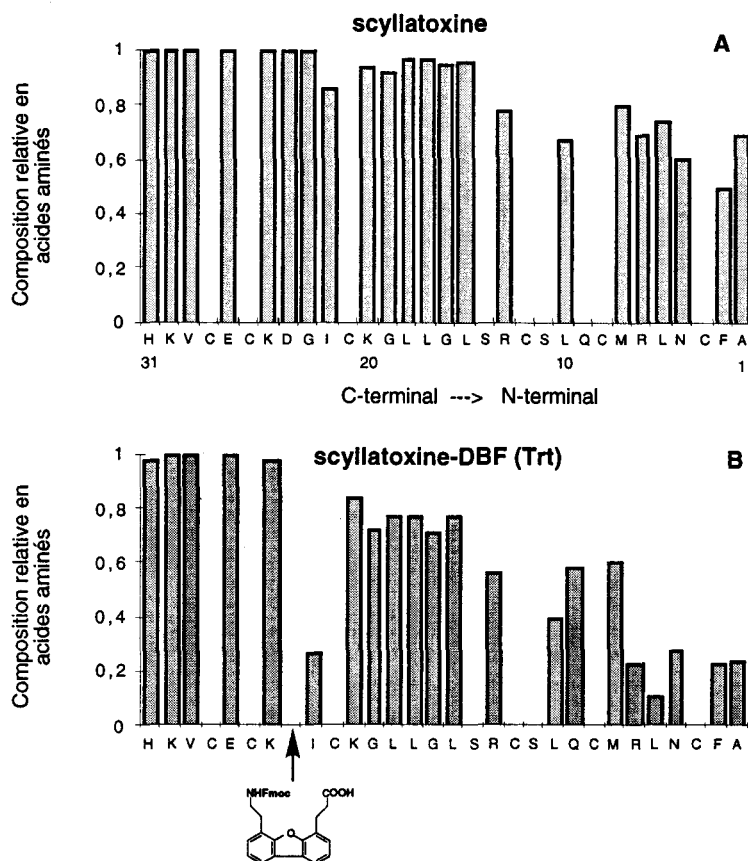


Schéma 3 : Profils de synthèse de la scyllatoxine (non modifiée) (A) et de la scyllatoxine-DBF avec le groupement Trt comme groupe protecteur des Cys (B).

N°	31	30	29	28	27	26	25	24,23	22	21	20	19	18	17	16
aa	H	K	V	C	E	C	K	DBF	I	C	K	G	L	L	G
c	a	2	2	2	2	2	3	3	3	2	3	2	3	3	3
		1 : H	1 : H	1 : H	1 : H	1 : H	1 : H	1 : H	1 : H	1 : H	1 : H	1 : H	1 : H	1 : H	1 : H
p	b	2 : H	2 : H	2 : H	2 : H	2 : H	2 : H	2 : P	2 : H	2 : H	2 : H	2 : H	2 : H	2 : H	2 : H
								3 : H	3 : P	3 : H		3 : H		3 : H	3 : H
l	a	3 : H	3 : H	3 : H	3 : H	3 : H	3 : H	3 : P	3 : H	3 : P	3 : B	3 : P			3 : P
		Δ ^c	Δ	Δ	Δ			4 : H	4 : P	4 : B					
g	b														
e	a	3	3	3	3	3	5	3	4	3	3	3	3	2	3
		1 : H	1 : H	1 : H	1 : H	1 : H	1 : H	1 : H	1 : H	1 : H	1 : H	1 : B	1 : B	1 : B	1 : B
p	b	2 : H	2 : H	2 : H	2 : H	2 : H	2 : H	2 : H	2 : P	2 : H	2 : B	2 : B	2 : B	2 : B	2 : B
		3 : H	3 : H	3 : H	3 : H	3 : H	3 : H	3 : H	3 : P	3 : H	3 : P	3 : B	3 : P		
l	a														
g	b														
e	a														

Tableau 1 : Protocole de couplage des acides aminés lors de la synthèse de la scyllatoxine-DBF. **a.** Nombre total de couplages; **b.** détail des couplages : le numéro de couplage est suivi de l'agent de couplage utilisé selon les abréviations suivantes H : HBTU/HOBt, B : BOP et P : PyBrop; **c.** Δ indique que le couplage et la déprotection ont été faits à 40°C.

Seuls les acides aminés stables à l'hydrolyse acide sont représentés. La valeur sous-estimée observée pour Ile 22 correspond à la difficulté de l'hydrolyse de la liaison peptidique entre les deux résidus hydrophobes que sont Ile 22 et le mime-DBF.

2.2. Difficultés de couplage

2.2.1. Résultats

La comparaison des deux synthèses, scyllatoxine et scyllatoxine-DBF met clairement en évidence que l'incorporation du mime DBF a des conséquences très importantes sur l'efficacité de couplage des acides aminés. Malgré un protocole de couplage optimisé, on observe une nette différence pour la proportion des chaînes portant la séquence complète : environ 60% pour la synthèse de la scyllatoxine (A) et 25% pour la scyllatoxine-DBF (B). Si l'on examine plus en détail les endroits où les difficultés sont importantes, on constate que c'est au niveau des mêmes acides aminés que pour la synthèse de la scyllatoxine mais de façon beaucoup plus prononcée dans le cas de la scyllatoxine-DBF. Les difficultés sont intervenues essentiellement à trois niveaux :

- après l'incorporation du mime. Il n'est pas possible de dire s'il s'agit d'un mauvais couplage de Ile 22, de Cys 21 ou de Lys 20 car le mime n'est pas identifiable après hydrolyse et analyse d'acides aminés, Ile 22 s'hydrolyse mal et le résidu Cys n'est pas stable à l'hydrolyse. D'après les tests colorimétriques, on ne constatait pas de difficultés particulières, mais la sensibilité des tests peut être remise en cause dans cette région. Trois couplages de sécurité ont cependant été effectués pour Ile 22 et Lys 20. D'autre part des difficultés de déprotection ont été observées. Plusieurs cycles de déprotection ont été nécessaires pour la déprotection de Gly 19 (4 traitements à la pipéridine), Leu 18 à Gly 16 et Ser 11 (3 traitements);

- dans la région de Arg 13, malgré une élévation de la température à 40°C de Leu 15 à Cys 12;

- dans la région de Met 7.

Différents types d'agent de couplage ont été utilisés lors de la synthèse de la scyllatoxine-DBF, contrairement à la synthèse de la scyllatoxine qui a été effectuée en double couplage utilisant HBTU/HOBt (FIELDS et coll., 1991). Le Tableau 1 indique le nombre de couplages effectués pour chaque acide aminé ainsi que le réactif utilisé pour chacun de ces couplages. La synthèse a débuté classiquement avec HBTU/HOBt. Le mime a été couplé trois fois, les deuxième et troisième couplages ayant été faits avec le PyBrop (COSTE et coll., 1990, 1991). Puis lorsque les difficultés sont apparues (tests colorimétriques encore légèrement

positifs après le deuxième couplage), la température a été augmentée à 40°C entre Leu 15 et Cys 12. La fin de la synthèse est apparue nettement plus difficile, en particulier à partir de Gln 9 où 5 couplages ont été nécessaires. L'efficacité de couplage a été optimisée par l'emploi d'autres agents couplant comme le Bop (CASTRO et coll, 1975) ou le PyBrop. Cela n'a cependant pas empêché la chute au niveau du couplage de Arg 6 sur Met 7.

Il est également apparu lors du suivi de la synthèse par les tests colorimétriques que les tests de Kaiser et TNBS présentaient la même sensibilité. Cette sensibilité diminue nettement en cours de synthèse, puisqu'ils n'ont pas décelé les chutes observées dans les rendements de couplage. L'étape d'acétylation ou *capping* a en effet toujours été faite après des tests négatifs.

2.2.2. Comparaison avec la synthèse de la scyllatoxine-DBF avec protection orthogonale des cystéines

L'autre synthèse de la scyllatoxine-DBF effectuée en parallèle, est celle où les Cys étaient protégées selon une stratégie orthogonale. Pour permettre la formation sélective de chaque pont disulfure, trois groupements présentant des conditions de déprotection différentes ont été retenus. Ils protègent les couples de Cys suivants : Cys 3 et Cys 21 avec le groupement Mob (*p*-méthoxybenzyle); Cys 8 et Cys 26 avec le groupement Acm (acétamidométhyle); Cys 12 et Cys 28 avec le groupement Trt (trityle). La synthèse dite « orthogonale » a été conduite exactement dans les mêmes conditions que la synthèse présentée précédemment où toutes les Cys étaient protégées par un groupement Trt. Il est intéressant de constater que le profil de synthèse représenté Schéma 4 montre que la synthèse s'est beaucoup mieux déroulée. En effet, à l'issue de la synthèse, environ la moitié des chaînes portaient la séquence complète et les chutes observées pour la synthèse non orthogonale sont nettement moins évidentes ici.

Cette synthèse n'a pas encore été exploitée. La formation sélective des ponts disulfure pourra aider à l'étude des intermédiaires intervenant dans l'étape de repliement oxydatif de la scyllatoxine-DBF.

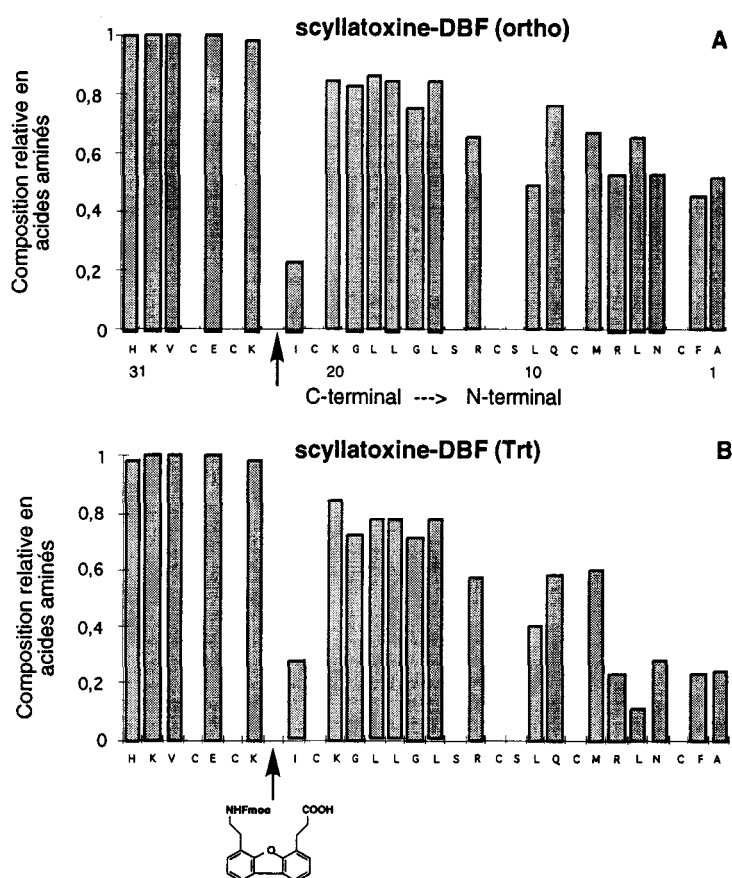


Schéma 4 : Profils de synthèse de la scyllatoxine-DBF avec protection orthogonale des Cys (A) et de la scyllatoxine-DBF avec le groupement Trt comme protection des Cys (B).

2.2.3. Hypothèses sur les difficultés de couplage

Les hypothèses envisagées pour expliquer les difficultés de couplage rencontrées sont de plusieurs ordres :

- interactions hydrophobes entre la partie aromatique du mime avec des chaînes latérales hydrophobes;
- interactions hydrophobes entre la partie aromatique du mime et les groupements protecteurs de certaines chaînes latérales : trityle, *t*-butyle;
- phénomène de *stacking* avec le polymère de la résine;
- établissement de structures secondaires : le mime impose un repliement de la chaîne polypeptidique en formation ce qui peut entraîner la formation d'un feuillet β .

Ces hypothèses peuvent contribuer à une baisse de l'accessibilité de la fonction amine réactive vis-à-vis de l'ester activé rendant ainsi le couplage plus difficile. Cela peut expliquer également la baisse de sensibilité observée pour les tests colorimétriques.

Ces hypothèses s'appuient sur des études menées afin de mieux comprendre les difficultés de couplage rencontrées lors de la synthèse de certaines séquences dites « difficiles ». Les difficultés de couplage peuvent être dues à l'occlusion stérique des chaînes peptidiques dans le polymère de la résine. Cela peut être dépendant de la séquence du peptide, de l'encombrement stérique de certains acides aminés, ou encore de la formation de liaisons hydrogène, ou des interactions intra- ou interchaînes. L'établissement de feuillet β *via* la formation de liaisons hydrogène, conduirait à une baisse de la solvataion, à une perte de la perméabilité aux réactifs et aux solvants et à un gonflement insuffisant de la résine (TAM et coll., 1995).

Pour ce qui est de la synthèse de la scyllatoxine-DBF, un autre point marquait la différence entre les deux synthèses, avec ou sans protection orthogonale des Cys : l'efficacité de couplage étaient nettement meilleure dans le cas de la synthèse orthogonale. Cela confirme le rôle non négligeable et même déterminant des protections employées. En effet, HYDE et coll. (1994) signalent que les groupes polaires, de type acétamidométhyle par exemple, minimisent d'avantage les problèmes d'agrégation entre les différentes chaînes peptidiques que les groupements apolaires de type trityle. Moins d'agrégation implique donc une meilleure solvataion de la résine et une accessibilité accrue des réactifs et des solvants aux fonctions réactives.

2.3. Coupure de la liaison peptide-résine et déprotection

A l'issue de la synthèse, le peptide de la scyllatoxine-DBF sous forme réduite est obtenu après coupure de la liaison peptide-résine par action de l'acide trifluoroacétique en présence de *scavengers* et de dibenzofurane, qui, comme mentionné dans l'Introduction Générale, prévient l'alkylation du mime.

2.4. Conclusion

La présence d'un groupement hydrophobe comme le mime-DBF favorise les interactions apolaires. De plus, en imposant une inversion de la direction de la chaîne il peut favoriser l'établissement d'un élément de structure secondaire de type feuillet β . Tous ces facteurs vont dans le sens d'un encombrement stérique plus important autour de la fonction amine réactive et à une baisse de la perméabilité de la résine vis-à-vis des solvants et des réactifs, d'où une baisse dans l'efficacité de couplage. Une étude par RMN-MAS (*Magic Angle Spinning*) permettrait peut être d'avoir une vision plus précise des interactions intervenant autour du mime DBF (DHALLUIN et coll., 1997).

Pour rompre ce type d'interaction, et en vue d'une optimisation de la synthèse, différentes solutions ont été proposées : travailler à une température plus élevée (TAM et coll., 1995), ajouter du TFE (YAMASHINO et coll., 1976), des agents chaotropiques (HAIN et coll., 1990 ; PUGH et coll., 1992), modifier la liaison peptidique par introduction sur l'azote de l'amide d'un groupement empêchant la formation de liaisons hydrogène (HYDE et coll., 1994), et l'emploi de solvants ou de mélanges de solvants permettant une meilleure solvation de la chaîne peptidique (NARITA et coll., 1988, 1989a,b). D'autre part, le choix des protections des chaînes latérales de certains acides aminés doit se faire judicieusement de manière à minimiser les interactions apolaires ou la formation de liaisons hydrogène conduisant à des phénomènes d'agrégation.

3. Formation des ponts disulfure et purification de la scyllatoxine-DBF

3.1. Introduction

Un des points critiques pour l'obtention des toxines synthétiques, ou d'une manière générale pour les protéines riches en cystéines, est la formation des ponts disulfure par l'oxydation des cystéines en cystines. Un nombre croissant de cystéines, présentes dans la séquence, augmente très rapidement le nombre de possibilités d'appariement : 15 possibilités pour 6 cystéines, 105 possibilités pour 8 cystéines. De ce fait, il est quelquefois nécessaire de mettre au point des conditions d'oxydation particulières pour obtenir la toxine avec un appariement correct des ponts disulfure. Certaines toxines comme la scyllatoxine (AUGUSTE et coll., 1990), la maurotoxine (KHARRAT et coll., 1996), la toxine ShK (PENNINGTON et coll., 1995) sont obtenues après le repliement oxydatif sans qu'il soit nécessaire d'ajouter un couple redox. D'autres sont oxydées en présence d'un couple rédox par exemple glutathion réduit/glutathion oxydé : ω -agatoxine IVA (NAJIB et coll., 1996), ω -conotoxine MVIIA (PRICE-CARTER et coll., 1996a). Dans certains cas, des co-solvants de type DMSO sont ajoutés au milieu d'oxydation : ω -conotoxine GVIA (FLINN et coll., 1995a), iberiotoxine (FLINN et coll., 1995b).

Notre but était ici, en premier lieu, d'obtenir le produit oxydé du peptide « scyllatoxine-DBF » issu de la synthèse non orthogonale de manière à entreprendre rapidement les études structurales. Nous nous sommes donc efforcés de trouver les meilleures conditions pour l'étape du repliement oxydatif. Nous verrons en second lieu, comment se traduit l'influence du mime-DBF sur cette étape. Seul sera présenté le peptide-DBF réduit, c'est-à-dire celui dont les Cys étaient toutes protégées par un groupement trityl et qui ont été déprotégées dans l'étape de clivage et de déprotection finale.



3.2. Résultats

3.2.1. Essais d'oxydation sur le peptide brut

Dans un premier temps, nous avons tenté l'oxydation du peptide-DBF sur le brut directement issu de l'étape de coupure et de déprotection simultanée au TFA. Le peptide, dissous dans une solution de guanidine 6 M et DTT, a ensuite été dessalé puis soumis à la réaction d'oxydation selon les conditions utilisées au laboratoire pour la scyllatoxine (tampon NH_4HCO_3 10 mM, pH 8, température ambiante). Le suivi de l'oxydation a été effectué par HPLC à différents temps de réaction. Très vite, nous avons constaté d'après les profils HPLC une grande tendance à l'agrégation. Les conditions de l'étape d'oxydation des Cys devaient donc être étudiées pour tâcher de s'affranchir de ce problème. Celles-ci sont résumées dans le Tableau 2.

N°	Peptide-SH repris dans	Tampon mM	pH	Conc. peptide	T	Couple redox (mM)
1	Gnd.HCl	NH_4HCO_3 0,01 M	8	10^{-4}	t.a.	
2	Gnd.HCl	Tris-HCl 0,2 M	8,5	10^{-4}	t.a.	cys/cys-cys (4/2 mM)
3a	TFA	Tris-HCl 0,2 M	8	$6 \cdot 10^{-5}$	t.a.	cys-cys/cys (4/2 mM)
3b		+ 18-c-6				
3c		microondes				
4	TFA	DMSO / TFA	8	$5 \cdot 10^{-5}$	t.a.	
5a	TFA	NH_4HCO_3 0,01 M	8	10^{-5}	4°C	
5b		+ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$				
6a*	TFA	NH_4HCO_3 0,33 M	8	10^{-5}	4°C	
6b*						GSH-GSSG (4/2 mM)

Tableau 2 : Résumé des conditions testées pour l'oxydation du peptide de la scyllatoxine-DBF. * indique que le peptide a été pré-purifié avant l'étape d'oxydation.

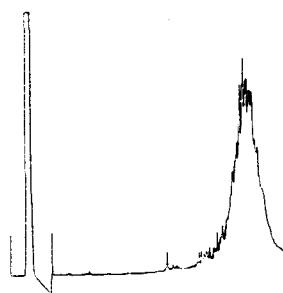
Les profils HPLC correspondant sont présentés Figure 3.

Les entrées **1** à **5c** correspondent à des essais où le peptide brut sans purification préalable est directement soumis à l'oxydation. Nous avons tenté d'introduire dans le milieu d'oxydation différents additifs :

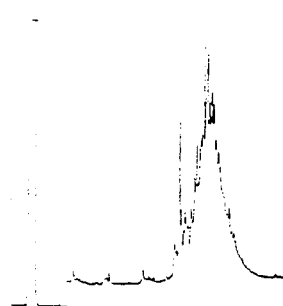
- éther couronne 18-c-6 (entrée **3b**). Son effet complexant pourrait aider à la dissociation des molécules (MASCAGNI et coll., 1987);
- $K_2Cr_2O_7$ pour tenter d'oxyder rapidement les Cys avant que le peptide ne s'agrège.

Le milieu d'oxydation a également été soumis à des expériences de type microondes (entrée **3c**) pour essayer de dissocier les agrégats.

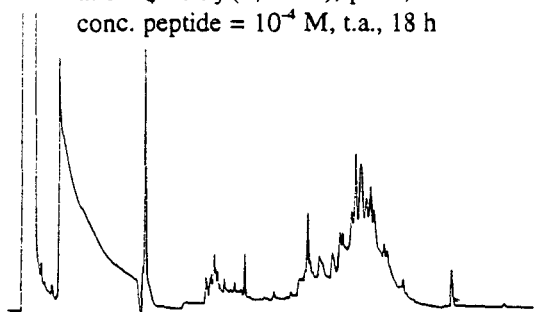
Une oxydation utilisant un mélange DMSO / TFA a également été effectuée. L'oxydation en présence de DMSO est préconisée dans le cas de peptides basiques et hydrophobes pour diminuer leur agrégation (TAM et coll., 1991).



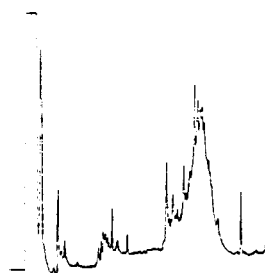
1. NH_4HCO_3 (0,01 M), pH 8,
conc. peptide = 10^{-4} M, t.a., 18 h



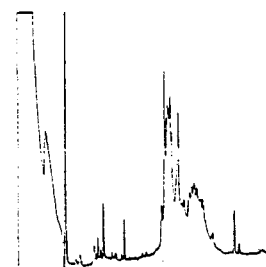
2. Tris-HCl (0,2 M), pH 8, 5, 18 h, conc.
peptide = 10^{-4} M, t.a., cys-cys/cys (4/2 mM)



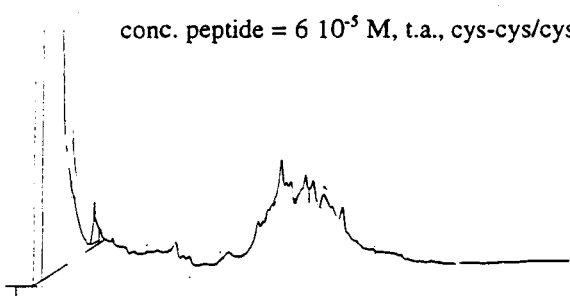
3a. Tris-HCl (0,2 M), pH 8, 18 h
conc. peptide = $6 \cdot 10^{-5}$ M, t.a., cys-cys/cys (4/2 mM)



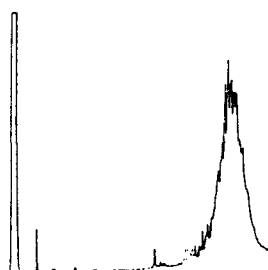
3b. idem 3a + 18-c-6



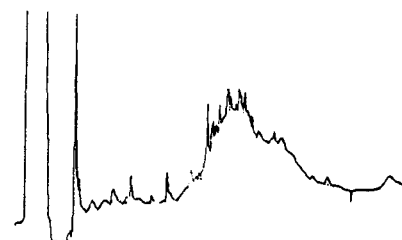
3c. idem + microondes
1 min à 60 W



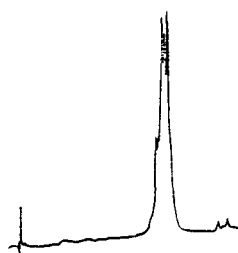
4. TFA 20% / DMSO (1/1),
conc peptide = $5 \cdot 10^{-5}$ M, t.a., 18 h



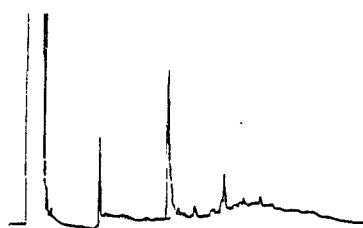
5a. NH_4HCO_3 (0,01 M), pH 8,
conc. peptide = 10^{-5} M, 4°C, 18 h



5b. idem 5a + $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$



6a*. NH_4HCO_3 (0,33 M), pH 8,
conc peptide = 10^{-5} M, 4°C, 1h



6b*. idem 6a + GSH-GSSG, 1h

Figure 3 : Profils HPLC correspondant aux différentes conditions testées pour l'étape d'oxydation du peptide scyllatoxine-DBF. Conditions HPLC : gradient 30-90% B (B = $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 6/4, 0,05% TFA) en 1h, colonne Nucleosil C18. * purification préalable du peptide réduit.

Ces expériences, analysées grâce aux profils HPLC (Figure 3), n'ont pas donné de résultats satisfaisants pour entreprendre l'oxydation à plus grande échelle. En effet le pic correspondant au peptide oxydé a pu être identifié mais il ne représente pas la proportion à laquelle on pouvait s'attendre c'est-à-dire 25%, d'après l'analyse d'acides aminés à la fin de la synthèse. Il semble donc que l'agrégation des peptides tronqués présents dans le brut de coupure entraînent une partie du peptide de la scyllatoxine-DBF empêchant l'étape de repliement oxydatif de se faire correctement. Il semblait donc logique de procéder à la purification du peptide réduit avant de retenter l'oxydation.

3.2.2. Oxydation du peptide pré-purifié

Le peptide sous forme réduite de la scyllatoxine-DBF a donc été purifié par HPLC préparative. D'autre part, pour optimiser les conditions de l'étape de repliement oxydatif, nous nous sommes placés dans les conditions suivantes :

- à basse température (4°C) pour minimiser les phénomènes d'agrégation (JAYAKUMAR et coll., 1995);
- en présence d'un couple redox glutathion réduit et oxydé (4/2 mM) pour favoriser le réarrangement des ponts disulfure vers le produit attendu;
- à faible concentration (10^{-5} M) pour limiter les réactions d'oxydation intermoléculaires.

Ces conditions nous ont permis d'obtenir le produit oxydé après 17 h de réaction. A l'issue de deux étapes de purification par HPLC le produit oxydé de la scyllatoxine-DBF (1,5 mg) a été obtenu avec un rendement global estimé de 0,3%. Le faible rendement observé est d'abord dû au fait que l'on ne disposait que de 25% de chaînes complètes dans le brut de coupure. De plus, nous nous sommes heurtés à des difficultés d'agrégation que l'on peut difficilement éliminer et qui proviennent de la présence de nombreux peptides tronqués contenant le mime-DBF de nature hydrophobe. Un autre problème a pu également intervenir. Il s'agit de la racémisation des Fmoc-Cys(Trt)-OH observées lors de la SPPS (KAISER et coll., 1996; SIEDLER et coll., 1996). Nous ne disposions pas de ces données à ce moment.

3.2.3. Etude de l'étape de repliement oxydatif

Afin de comparer l'étape de repliement oxydatif entre la scyllatoxine et la scyllatoxine-DBF, celles-ci, sous leur forme réduite, ont été soumises aux mêmes conditions d'oxydation (concentration en peptide 10^{-5} M, tampon NH_4HCO_3 0,33 M, pH 8, 4°C) en présence ou non du couple redox GSH/GSSG. Les profils HPLC de la figure 3 montrent que, dans le cas de la scyllatoxine-DBF, la présence d'un couple redox se révèle indispensable à l'obtention du produit oxydé, dans ces conditions d'expérience. Il semble donc que les mécanismes

intervenant dans le repliement de la scyllatoxine soient perturbés par la présence du mime-DBF. De part la nature rigide du mime, les phénomènes d'échange de ponts disulfure qui peuvent intervenir lors du repliement sont peut être gênés voir même empêchés. La présence d'agents, tels que le glutathion réduit et le glutathion oxydé, favorise les appariements entre cystéines et augmente la probabilité de formation des ponts natifs thermodynamiquement plus stables (CHATRENET et CHANG, 1993; CHANG, 1994; MORODER et coll., 1996, PRICE-CARTER et coll., 1996a,b).

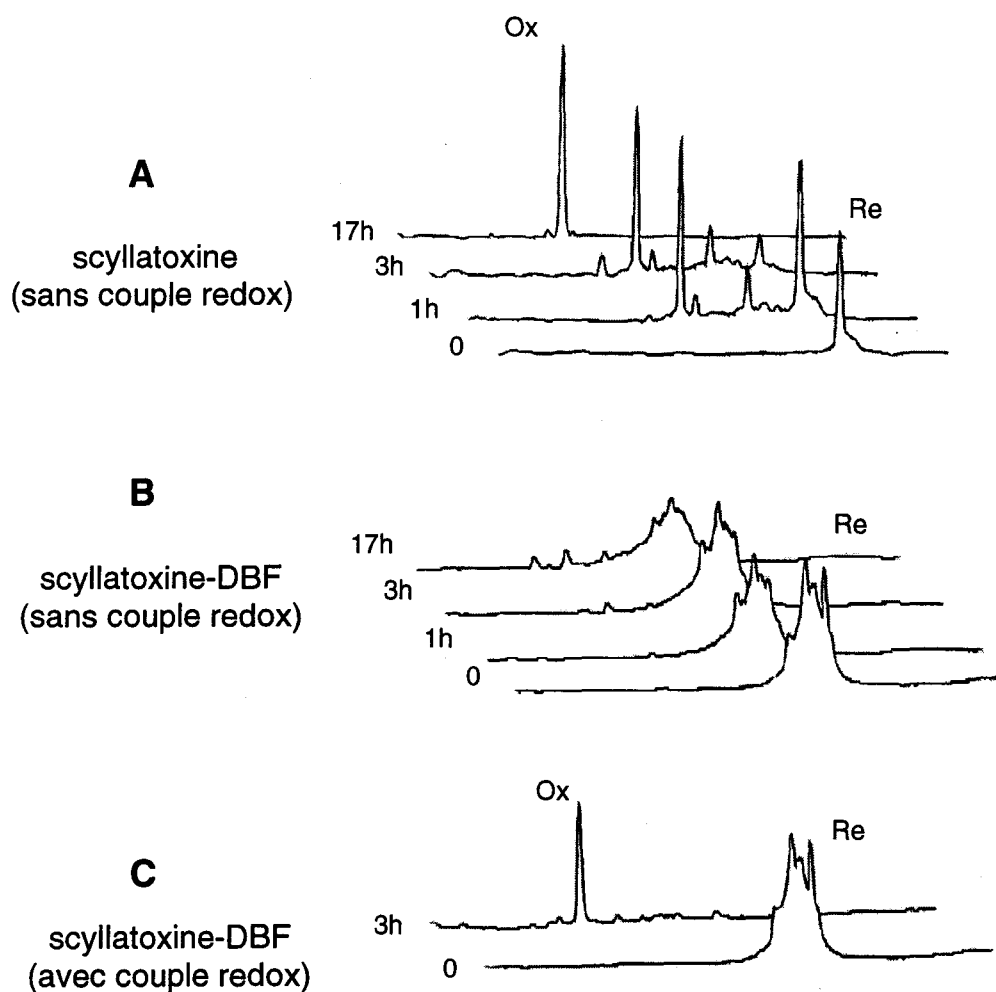


Figure 3 : Expériences comparatives d'oxydation entre scyllatoxine et scyllatoxine-DBF. 'Re' indique le produit réduit et 'Ox' le produit oxydé.

3.3. Conclusion

Lors de l'étape de repliement oxydatif qui consiste à former des ponts disulfure, nous avons été confrontés, en premier lieu, à des problèmes d'agrégation nécessitant une purification préalable du brut de coupure, avant de procéder à l'étape d'oxydation. Après les difficultés de synthèse observées précédemment, la nature hydrophobe du mime-DBF apparaît ici aussi

comme un inconvénient. Cependant, des conditions permettant l'obtention d'un produit oxydé ont pu être mises au point. Celles-ci diffèrent du protocole utilisé pour la scyllatoxine notamment au niveau de la présence d'un couple rédox indispensable à la formation du produit oxydé dans les conditions de l'expérience. Cela implique une influence réelle du mime sur les mécanismes de repliement : le mime, en imposant une rigidité conformationnelle à la chaîne peptidique, peut empêcher son réarrangement et l'orientation favorable des chaînes latérales des cystéines pour former les ponts disulfure. Il a récemment été proposé que l'existence de plusieurs conformations flexibles en feuillet β , est essentielle pour que la chaîne protéique puisse atteindre la conformation la plus favorable (DE ALBA et coll., 1997).

Disposant du produit oxydé, nous allons maintenant en étudier la structure pour la comparer à la structure de la scyllatoxine.

Chapitre III : Etude structurale de la scyllatoxine-DBF

1. Introduction

Deux méthodes physiques sont couramment utilisées pour la détermination de la structure tridimensionnelle d'une protéine : la radiocristallographie qui consiste à exploiter les données obtenues à partir de clichés de diffraction de rayons X sur des cristaux de protéines, et la résonance magnétique nucléaire (RMN) qui permet, quant à elle, une étude de la structure de la protéine en solution. La RMN est la méthode utilisée ici pour l'étude structurale de la scyllatoxine-DBF. Le principe général de la détermination d'une structure sera tout d'abord présenté, puis nous aborderons le cas précis de la scyllatoxine-DBF.

2. Principe général de la détermination de la structure tridimensionnelle d'une protéine par RMN

2.1. Introduction

La détermination d'une structure de protéine par RMN repose essentiellement sur l'exploitation de spectres ^1H en deux dimensions. On regarde ici les signaux d'un seul atome (H), on parle donc de RMN homonucléaire. Cela est valable pour des protéines de taille moyenne. En effet, pour les protéines de plus grande taille (au-delà de 70 à 100 résidus), il est nécessaire d'enrichir la protéine en ^{15}N et/ou ^{13}C suivant les cas (BAX, 1994; CLORE et coll., 1990) pour obtenir plus d'informations et pallier aux recouvrements de pics plus nombreux lorsque la taille de la protéine augmente.

Le principe de la détermination de la structure est présenté de manière simplifiée au Schéma 5. Avant tout, il est nécessaire de procéder à l'acquisition des spectres RMN 2D à l'aide de séquences classiques de type COSY, TOCSY et NOESY.

Remarque : Les abréviations suivantes sont utilisées pour désigner les différents protons : $\text{H}\alpha$ est le proton porté par le carbone α ; NH est le proton porté par l'azote de la fonction amide du squelette. Les protons des chaînes latérales sont désignés par $\text{H}\beta$, $\text{H}\gamma$, $\text{H}\delta$, $\text{H}\epsilon$ suivant les cas (représentation des chaînes latérales des acides aminés en annexe).

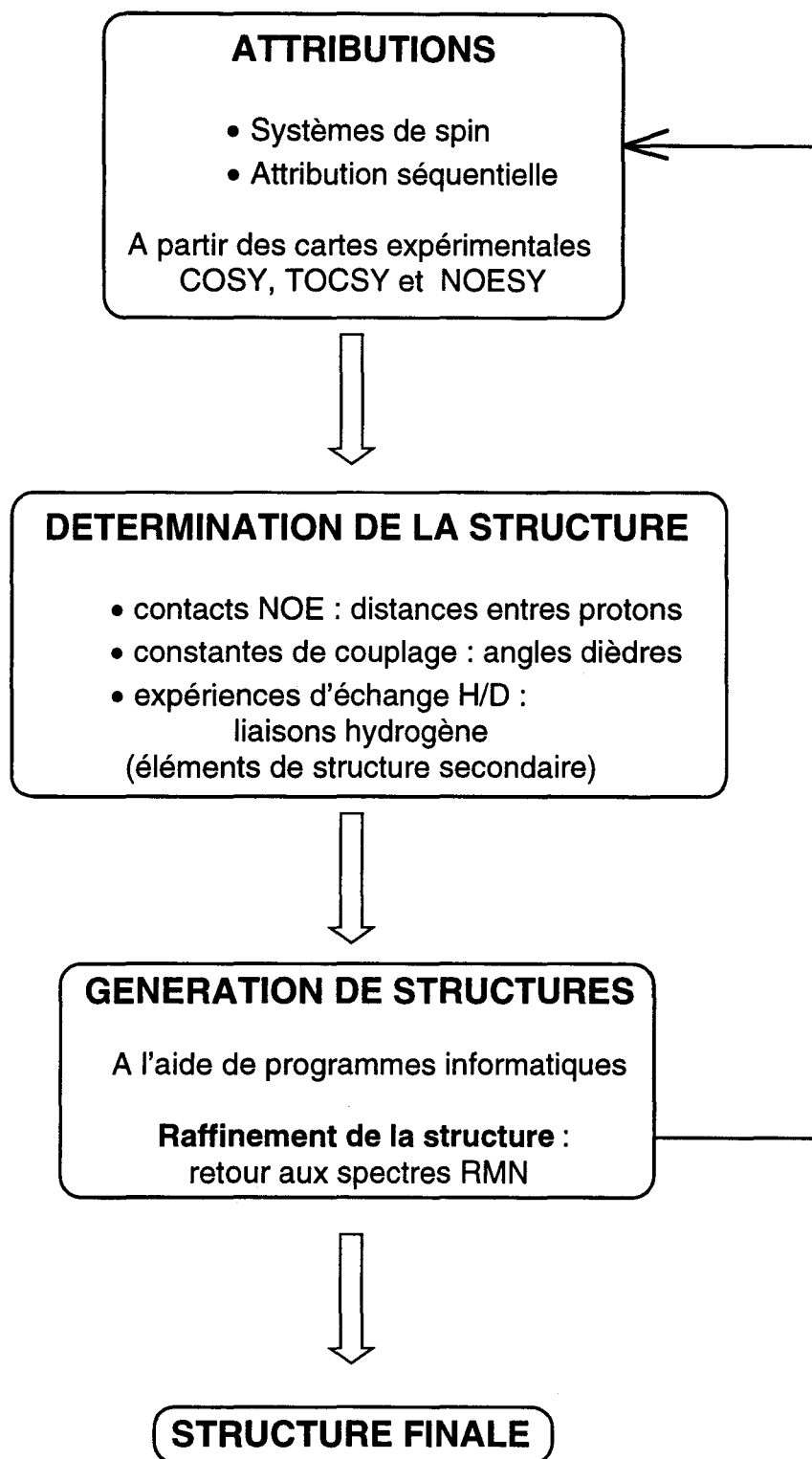


Schéma 5 : Principe de la détermination d'une structure de protéine par RMN

L'interprétation des spectres consiste ensuite à identifier le système de spin correspondant à chaque résidu (Schéma 6). Cela est rendu possible à partir de la séquence TOCSY, qui met en évidence le couplage scalaire existant entre le proton amide, le proton $C\alpha$ et les protons de la chaîne latérale d'un même système de spin (schéma 6 A) et de la séquence

COSY. Les déplacements chimiques des protons de chacun des 20 acides aminés, déterminés dans un térapeptide, ont été répertoriés par WÜTHRICH (1986) ce qui aide grandement à l'attribution des protons de chaque résidu.

L'étape suivante est l'attribution séquentielle, qui se fait grâce à l'interprétation des cartes NOESY. Le couplage dipolaire existant entre le proton $H\alpha$ du résidu i et le proton amide du résidu $i+1$ permet de passer d'un résidu au suivant (schéma 6 **B**). L'attribution séquentielle des systèmes de spin est ainsi effectuée, de proche en proche, jusqu'à l'attribution totale de la séquence protéique.

Il faut ensuite extraire des spectres toutes les informations nécessaires à l'établissement, dans un premier temps, des éléments de structure secondaire (hélice α , feuillet β , coude β). Par exemple, des contacts NOE forts de type NH_i-NH_{i+1} sont caractéristiques des hélices α , alors que des contacts NOE forts de type $H\alpha_i-NH_{i+1}$ sont caractéristiques des feuillets β ; les constantes de couplage $^3J_{NH-H\alpha}$ permettent de déterminer les angles dièdres ϕ et des expériences d'échange H/D indiquent la vitesse à laquelle un proton subit l'échange et l'on en déduit son éventuelle implication dans une liaison hydrogène.

En complétant ces données par des informations sur les contacts NOE inter-résidus à longue portée, impliquant donc des protons spatialement proches mais éloignés dans la séquence, on peut établir une liste de contraintes qui seront traitées par des programmes informatiques afin de générer des structures.

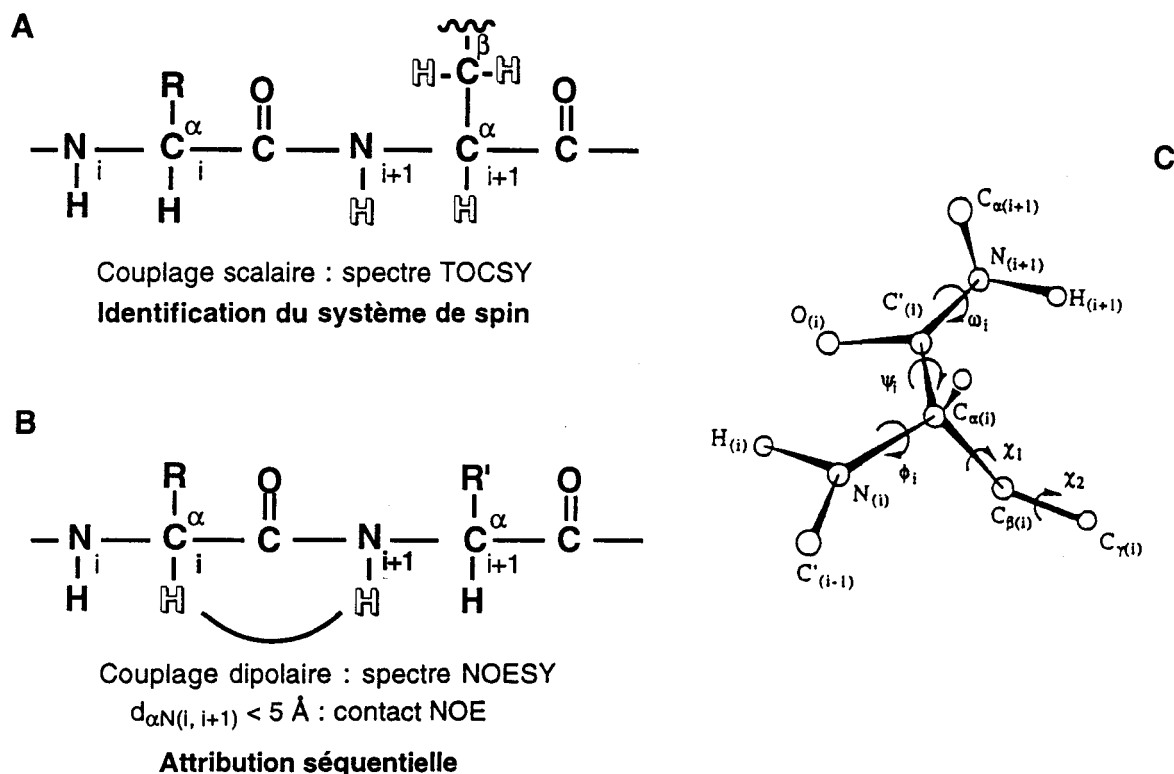


Schéma 6 : **A.** Le couplage scalaire entre le NH, le proton H_{α} et les protons de la chaîne latérale apparaît sur le spectre TOCSY et il permet l'identification de chaque système de spin. **B.** Le couplage dipolaire existant entre le H_{α} du résidu i et le NH du résidu $i+1$, normalement visible sur le spectre NOESY, permet l'attribution séquentielle des systèmes de spin. Un contact NOE est observable si le proton H_{α} du résidu i et le proton NH du résidu $i+1$ sont distants de moins de 5 \AA . **C.** Représentation en perspective d'un segment peptidique où les angles dièdres ϕ , ψ , ω et χ_i , rencontrés le long de la chaîne peptidique, sont indiqués (d'après CREIGHTON, 1993).

2.2. Attribution des systèmes de spin et attribution séquentielle

La première étape nécessaire à la détermination d'une structure est donc l'attribution de tous les systèmes de spin correspondant à chaque acide aminé puis leur attribution séquentielle. On se base pour cela sur la méthode mise au point par WÜTHRICH (1986). Les spectroscopies de corrélation (COSY et TOCSY) et la spectroscopie NOESY sont utilisées.

2.2.1. Les spectroscopies de corrélation

Les deux spectroscopies de corrélation généralement utilisées pour l'attribution des systèmes de spin sont les spectroscopies COSY (CORrelated SpectroscopY) et TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY).

2.2.1.1. La spectroscopie COSY

Comme mentionné précédemment, cette séquence RMN permet de mettre en évidence les couplages scalaires directs entre protons (ou spin) d'un même résidu. En effet le couplage spin-spin à travers la liaison peptidique n'est pas observable. D'autre part, seuls les spins reliés entre eux par des liaisons chimiques (trois au maximum) donneront des pics de corrélation COSY. Ce sont par exemple les NH-N α , H α -H β , etc. Le couplage scalaire, entre deux protons reliés par trois liaisons, se caractérise par une constante de couplage 3J fonction de l'angle dièdre correspondant, selon la relation de Karplus mentionnée plus tard.

Le spectre COSY est utilisé en particulier pour :

- identifier les protons des chaînes latérales d'un même résidu;
- déterminer les constantes de couplage de type :
 - $^3J_{NH-H\alpha}$ donnant accès à la valeur de l'angle dièdre ϕ (Schéma 6 A et C) qui est caractéristique pour un élément de structure secondaire donné;
 - $^3J_{\alpha\beta}$ utilisées pour l'attribution stéréospécifique des deux protons β . Cette constante de couplage donne accès à l'angle dièdre χ_1 (Schéma 6 A). χ_1 est l'angle dièdre défini autour de la liaison C α - C β . Il conditionne l'orientation de la chaîne latérale.

Remarque : Pour la scyllatoxine-DBF, nous avons utilisé une séquence DQF-COSY (Double Quantum Filtered COSY). Celle-ci possède l'avantage de présenter une meilleure résolution et permet d'éliminer les pics singulet provenant du solvant par exemple (HDO).

2.2.1.2. La spectroscopie TOCSY

Cette spectroscopie est également connue sous le nom de HOHAHA (HOmonuclear HARTmann-HAHn experiment). Elle permet la visualisation de couplages scalaires relayés (schéma 6 A) c'est-à-dire de NH vers H α , H β , etc, H α vers H β , H γ , etc. On peut ainsi identifier le système de spin complet de chacun des acides aminés de la séquence.

2.2.2. La spectroscopie NOESY

La spectroscopie NOESY permet de détecter des interactions dipolaires entre deux spins, pouvant être éloignés dans la séquence, mais proches dans l'espace. L'intensité de cette interaction (effet NOE) varie comme l'inverse de la puissance sixième de la distance moyenne entre les deux spins i et j . Les effets NOE sont classés en différents groupes :

- intra-résiduels : les protons i et j appartiennent au même résidu. Ces contacts (NH-H β , H α -H β , ...) aident à la détermination de la conformation de la chaîne latérale;
- inter-résiduels et séquentiels : les protons appartiennent à deux résidus adjacents. Ces contacts NOE sont utilisés au cours de l'attribution séquentielle. Ils sont aussi importants pour l'identification des structures secondaires comme nous le verrons dans le prochain paragraphe (Schéma 7);
- inter-résiduels :
 - NOE de moyenne portée. Les protons i et j sont séparés par moins de 5 résidus. Ces contacts sont importants dans la détermination d'éléments de structure secondaire comme les hélices α ou les coudes β .
 - NOE de longue portée. Les protons i et j sont alors séparés par plus de 5 résidus. Ces contacts « longue distance » sont des informations déterminantes pour rechercher les feuillets β mais surtout pour l'établissement de la structure tridimensionnelle de la protéine. En effet ces contacts permettent, à partir d'une chaîne dépliée, de la replier en accord avec les contacts observés.

L'intensité des effets NOE est estimée par intégration des pics ou *de visu*. Elle fournit une information sur la distance séparant les deux spins interagissant (d_{ij}) :

- NOE de forte intensité : $d_{ij} < 2,5 \text{ \AA}$
- NOE d'intensité moyenne : $2,5 \text{ \AA} < d_{ij} < 3,5 \text{ \AA}$
- NOE de faible intensité : $3,5 \text{ \AA} < d_{ij} < 5 \text{ \AA}$.

Au delà de 5 Å, les effets NOE ne sont plus détectables.

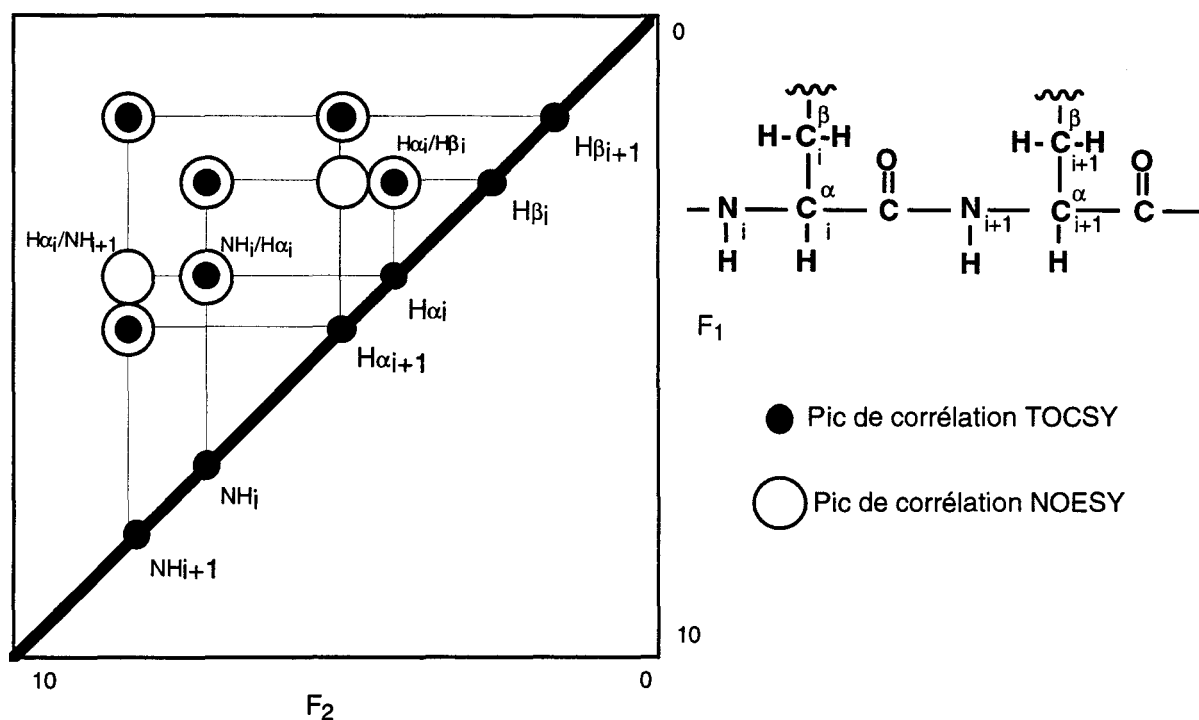


Schéma 7 : Schéma simplifié résumant le principe de l'attribution de chaque système de spin et de l'attribution séquentielle. Les spectres TOCSY et NOESY sont superposés. Le proton NH est corrélé scalairement avec H_{α_i} (pic de corrélation TOCSY NH/ H_{α_i} , le pic NOESY correspondant au couplage intra-résidu). H_{α_i} est lui-même couplé avec H_{β_i} (pic de corrélation TOCSY H_{α_i}/H_{β_i}), l'attribution de chaque système de spin se fait ainsi de suite. H_{α_i} est également corrélé par un couplage dipolaire avec NH_{i+1} (pic de corrélation NOESY H_{α_i}/NH_{i+1}) et ce couplage permet de passer du résidu i au résidu $i+1$, c'est la base de l'attribution séquentielle.

2.3. Identification des éléments de structure secondaire

L'identification des structures secondaires (hélice α , feuillet β , coude β) est établie à partir de différentes données et expériences.

2.3.1. A partir de distances proton-proton caractéristiques

Nous avons vu dans le paragraphe précédent l'existence de contacts NOE inter-résiduels séquentiels dans le cas des protons impliqués dans des structures secondaires. Les distances correspondant à ces contacts $d_{\alpha N(i,i+1)}$, $d_{NN(i,i+1)}$, $d_{\beta N(i,i+1)}$, sont directement dépendantes des angles ϕ et ψ comme l'indique la Figure 3.

Remarque : $d_{\alpha N(i,i+1)}$, $d_{NN(i,i+1)}$, $d_{\beta N(i,i+1)}$ désignent respectivement les distances entre les protons H_{α} du résidu i et NH du résidu $i+1$, NH de i et NH de $i+1$, H_{β} de i et NH de $i+1$.

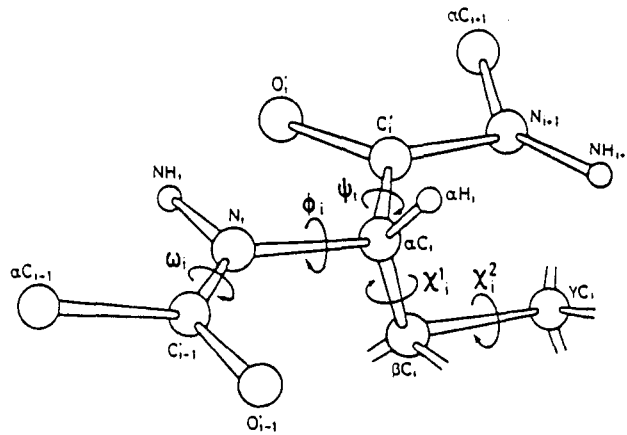


Figure 3 : Représentation d'un segment peptidique (d'après WÜTHRICH, 1986)

Les structures secondaires se caractérisent par des valeurs d'angle ϕ et ψ (centrées sur les valeurs indiquées) et définies pour chaque type d'élément :

- hélice α : $\phi = -57^\circ$ et $\psi = -47^\circ$ hélice 3_{10} : $\phi = -70^\circ$ et $\psi = -5^\circ$

Les hélices sont caractérisées par des distances séquentielles $d_{NN(i,i+1)}$ courtes ($\approx 2,6-2,8$ Å). Les deux types d'hélice se distinguent par des distances différentes entre protons inter-résiduels (voir en annexe le tableau résumant les contacts NOE dans les différents types de structure).

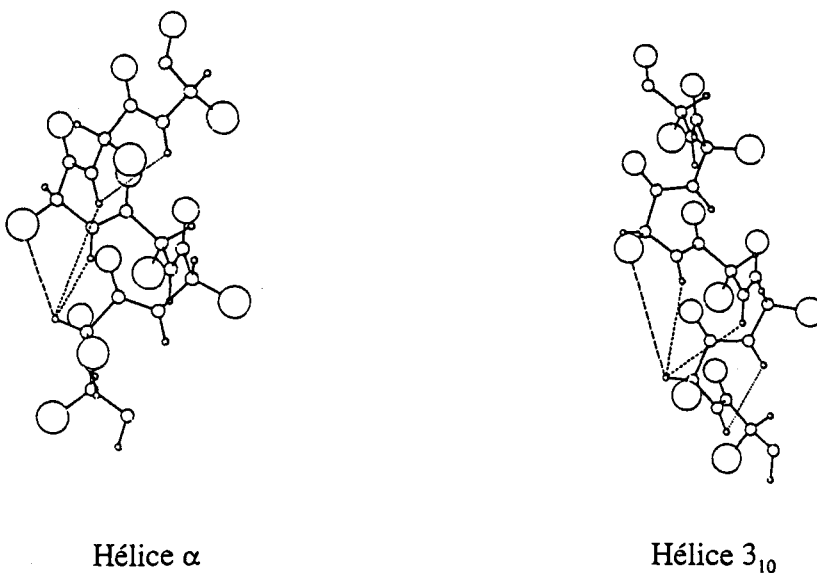


Figure 4 : Contacts NOE dans les hélices α et 3_{10} (d'après ROBERTS, 1993)

- feuillet β anti-parallèle : $\phi = -139^\circ$ et $\psi = +135^\circ$; parallèle : $\phi = -119^\circ$ et $\psi = +113^\circ$

Les feuillets β sont caractérisés par des contacts séquentiels forts $H\alpha(i)-NH(i+1)$, correspondant à une distance $d_{\alpha N} \approx 2,2 \text{ \AA}$. Rappelons que les feuillets β comportent un grand nombre de contacts longue distance.

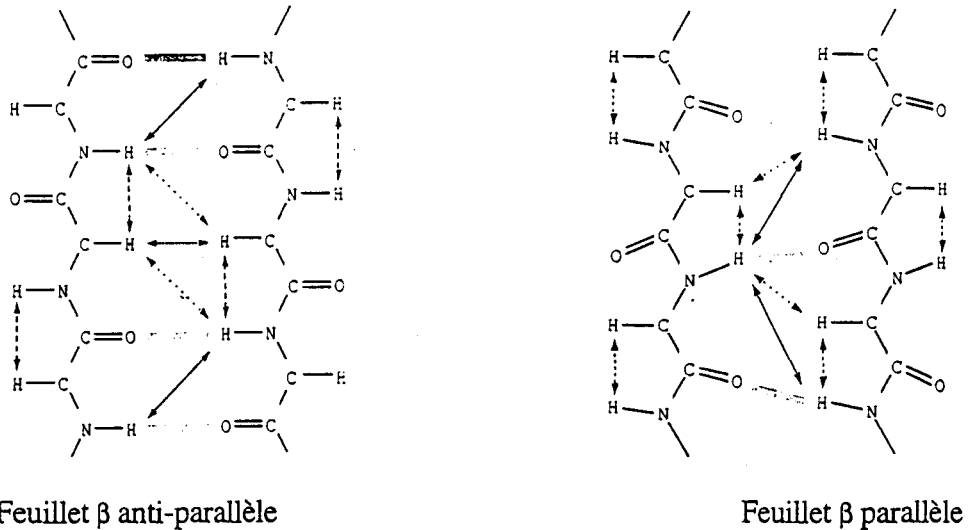


Figure 5 : Contacts NOE présents dans les feuillets (d'après ROBERTS, 1993)

- coude : ils présentent des contacts séquentiels à courte et moyenne distance ($d_{\alpha N(i,i+1)}$, $d_{NN(i,i+1)}$ et $d_{\alpha N(i,i+2)}$) comme les hélices.

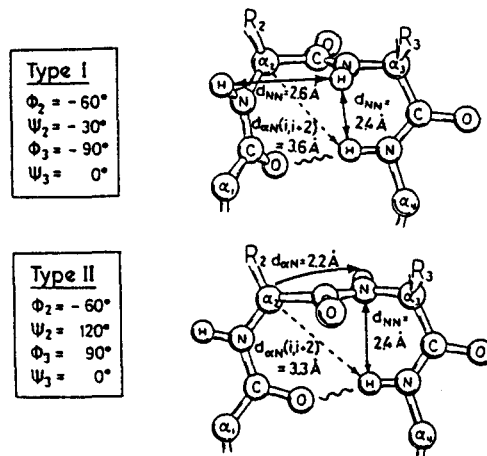


Figure 6 : Contacts NOE rencontrés dans les coudes (d'après WÜTHRICH, 1986)

2.3.2. A partir des constantes de couplage $^3J_{NH-H\alpha}$

Les constantes de couplage $^3J_{NH-H\alpha}$ sont reliées à l'angle ϕ par la relation de Karplus :

$$^3J_{NH-H\alpha} = 6,4 \cos^2(\phi - 60^\circ) - 1,4 \cos(\phi - 60^\circ) + 1,9$$

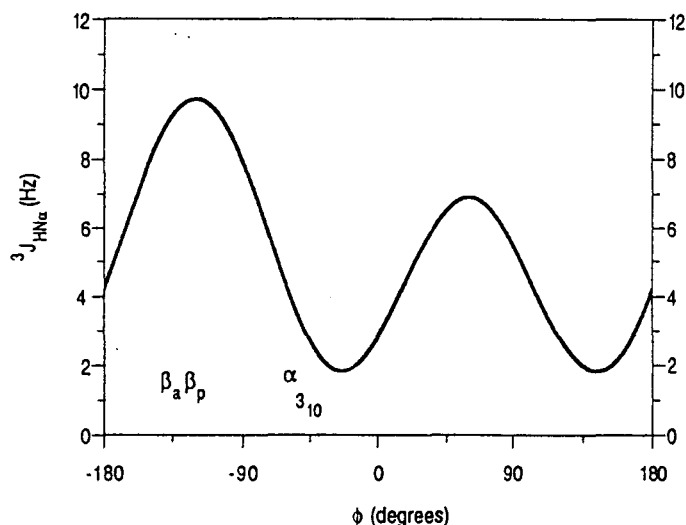


Figure 7 : Courbe de Karplus (d'après Roberts, 1993)

La détermination d'une valeur unique de ϕ n'est en fait possible que si $^3J_{NH-H\alpha} < 6$ Hz ou > 8 Hz.

Lorsque $^3J_{NH-H\alpha} < 6$ Hz, l'angle ϕ est compris entre -10° et -90° , caractéristique des hélices α .

Lorsque $^3J_{NH-H\alpha} > 8$ Hz, l'angle ϕ est compris entre -80° et -180° , caractéristique des feuillets β .

2.3.3. A partir des expériences d'échange H / D

Les structures secondaires sont stabilisées par la présence d'un grand nombre de liaisons hydrogène. Pour l'hélice α elles sont de type CO(i)-NH(i+4), dans l'hélice 3_{10} de type CO(i)-NH(i+3), et dans les feuillets β elles relient CO et NH de deux résidus se faisant face (figure 8).

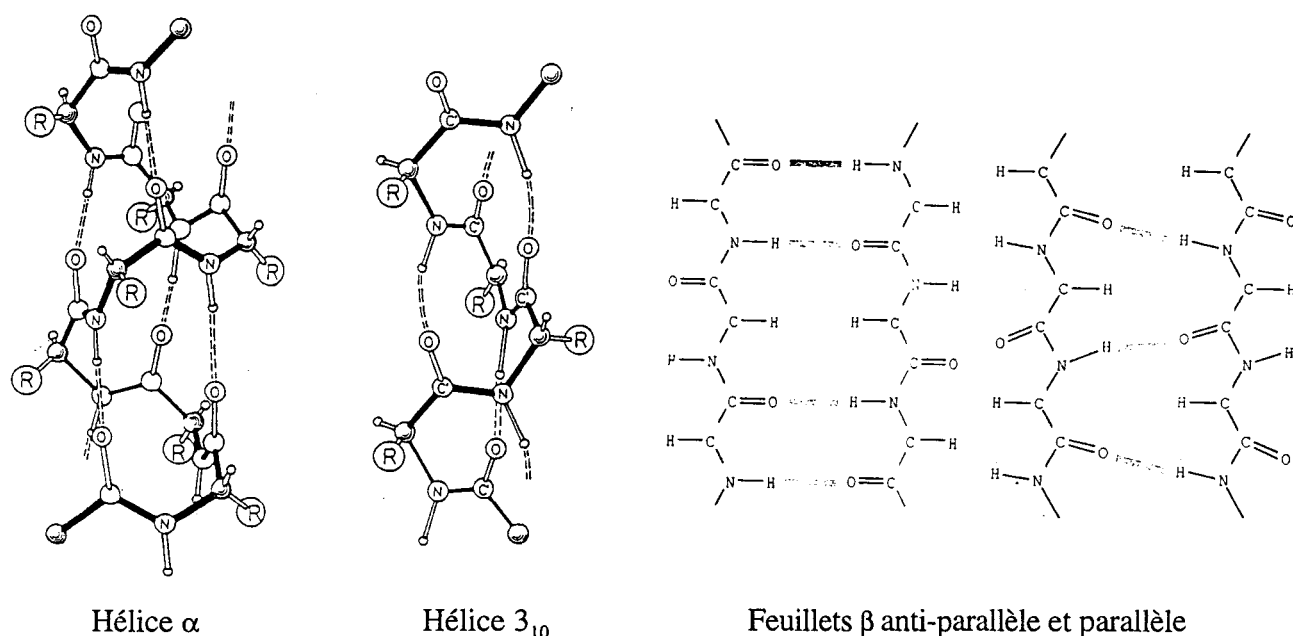


Figure 8 : Liaisons hydrogène dans les hélices α et 3_{10} et dans les feuillets β anti-parallèle et parallèle (d'après ROBERTS, 1993).

Les protons amides des résidus présents dans les structures secondaires sont généralement tous impliqués dans la formation de liaisons hydrogène à l'exception des 4 premiers résidus de l'hélice α (3 dans le cas de l'hélice 3_{10}), et 1 résidu sur 2 dans le cas des feuillets β . Les protons non impliqués dans une liaison hydrogène sont plus accessibles au solvant et vont donc subir un échange hydrogène / deutérium plus rapide en présence d'eau deutérée. La cinétique d'échange permet donc d'identifier les protons impliqués dans une liaison hydrogène présente dans un élément de structure secondaire. Cela permet de confirmer les résultats obtenus précédemment lors de l'étude des contacts NOE et des constantes de couplage.

2.3.4. Attribution stéréospécifique

L'attribution stéréospécifique des protons β et β' des chaînes latérales est possible si l'on détermine l'angle χ_1 (Schéma 6 A et C). Celui-ci suit également la loi de Karplus avec des paramètres adaptés :

$${}^3J_{H\alpha H\beta} = 9,5 \cos^2\chi_1 - 1,6 \cos\chi_1 + 1,8$$

$${}^3J_{H\alpha H\beta'} = 9,5 \cos^2(\chi_1 - 120^\circ) - 1,6 \cos(\chi_1 - 120^\circ) + 1,8$$

2.3.5. Conclusion

A partir de ces données, nous disposons donc d'une liste de contraintes sur les distances entre protons et sur les angles dièdres. Il s'agit maintenant d'exploiter ces données afin de générer, par modélisation moléculaire, des structures compatibles avec ces contraintes.

2.4. Modélisation moléculaire

La détermination de la structure d'une protéine par RMN nécessite l'utilisation des techniques de modélisation moléculaire qui va permettre de générer un ensemble de conformations correspondant à des *minima* d'énergie, et compatibles avec les données expérimentales. Pour cela différentes méthodes sont utilisées.

2.4.1. Géométrie des distances

Dans une première étape, la méthode de géométrie des distances (*distance geometry*) permet d'obtenir, à partir de la séquence de la protéine, de la liste des distances protons-protons (données RMN) et des distances dérivées de la structure covalente, des structures tridimensionnelles grossières. Lors de cette étape, chaque distance se voit imposer un intervalle de tolérance en imposant une limite inférieure (somme des rayons de van der Waals pour les atomes non liés) et une limite supérieure. Un tirage aléatoire est fait pour chaque distance dans l'intervalle de tolérance. Le nombre de tirages effectués est à l'origine du nombre de structures générées. A l'issue de cette étape, un certain nombre de structures générées sont compatibles avec les contraintes issues de la RMN mais elles ne les respectent que grossièrement. Il est donc nécessaire d'affiner les structures par une méthode de dynamique moléculaire sous contraintes.

2.4.2. Dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire sous contraintes permet de rechercher la région de l'espace conformationnel de la protéine compatible avec les données issues de la RMN et où l'énergie de la molécule est la plus basse. On utilise pour cela des méthodes de minimisation d'énergie et de recuit simulé, effectués à l'aide du logiciel XPLOR (BRÜNGER, 1992) et DISCOVER.

2.4.2.1. L'énergie

L'énergie potentielle d'une molécule est fonction des interactions atomiques. Elle est estimée comme la somme de termes empiriques entre atomes liés, qui assurent la cohésion de la structure (maintien des longueurs de liaison, des angles de valence, respect des barrières d'énergie de rotation) et de termes entre atomes non liés qui interdisent le recouvrement d'atomes et rendent compte des interactions électrostatiques :

* Potentiels entre atomes liés :

- potentiel de liaison : $E_l = \sum k_l(l-l_0)^2$
(où l : longueur de liaison, k : constante de force)
- potentiel d'angle de valence : $E_\theta = \sum k_\theta(\theta-\theta_0)^2$
(où θ : angle de valence et k : constante de force)
- potentiel d'angle dièdre : $E_\varphi = \sum k_\varphi(1+\cos(n\varphi))$
(où φ : angle dièdre et k : constante de force)
- potentiel d'angle dièdre impropre : $E_\omega = \sum k_\omega(\omega-\omega_0)^2$
(où ω : angle dièdre et k : constante de force)

* Potentiels entre atomes non liés :

- interactions de van der Waals : $E_{vdw} = \sum (A_{ij}/r_{ij}^{12}) - (B_{ij} / r_{ij}^6)$
(où A_{ij} et B_{ij} sont caractéristiques de chaque atome)
- interactions électrostatiques : $E_{el} = \sum (q_i q_j) / 4\pi\epsilon r_{ij}$
(où q_i et q_j : charges partielles sur les atomes i et j ,
 r_{ij} : distance entre atomes i et j , ϵ : perméabilité)

2.4.2.2. Les contraintes RMN

Les contraintes RMN sont prises en compte sous forme d'un terme énergétique supplémentaire, ajouté à l'expression de l'énergie potentielle, et qui s'exprime sous forme d'un potentiel harmonique. Les contraintes sont de deux types :

* Contraintes sur les distances proton-proton :

Soit l'intervalle de tolérance $[d_{inf}-d_{sup}]$ pour la distance entre deux protons et d la distance entre deux protons :

$$\begin{array}{ll} \text{si } d < d_{inf} & E_{NOE} = k_{NOE} (d_{inf}-d)^2 \\ \text{si } d > d_{sup} & E_{NOE} = k_{NOE} (d-d_{sup})^2 \\ \text{si } d_{inf} < d < d_{sup} & E_{NOE} = 0 \end{array}$$

* Contraintes sur les angles dièdres ϕ et χ_1 :

Elles s'expriment de la même façon. Soient l'intervalle $[\phi_{\text{inf}}, \phi_{\text{sup}}]$ et ϕ l'angle dièdre :

$$\begin{aligned} \text{si } \phi < \phi_{\text{inf}} & \quad E_{\text{dièdre}} = k_{\text{dièdre}} (\phi_{\text{inf}} - \phi)^2 \\ \text{si } \phi > \phi_{\text{sup}} & \quad E_{\text{dièdre}} = k_{\text{dièdre}} (\phi - \phi_{\text{sup}})^2 \\ \text{si } \phi_{\text{inf}} < \phi < \phi_{\text{sup}} & \quad E_{\text{dièdre}} = 0 \end{aligned}$$

Il est nécessaire de minimiser tous les termes provenant des contraintes RMN et des géométries covalentes pour générer une structure correcte.

2.4.2.3. Recuit simulé

Pour explorer au mieux l'espace conformationnel et franchir les barrières d'énergie, on utilise des procédures de dynamique moléculaire à haute température (NILGES et coll., 1988a; 1988b). Cela consiste à fournir au système une énergie virtuelle en augmentant la température jusqu'à 1000 K par exemple, puis laisser évoluer le système à la recherche de la conformation la plus favorable et refroidir lentement pour atteindre un puits de potentiel. Lors de cette expérience les constantes de force sont augmentées pour maintenir une bonne géométrie covalente.

La simplification de certains termes définissant l'énergie potentielle (suppression du terme électrostatique, réduction du terme d'interaction de van der Waals), peut aider les réarrangements et faciliter le repliement correct de la molécule.

2.4.3. Raffinement des structures

Pour affiner les structures obtenues par la méthode de géométrie des distances et dynamique moléculaire, on procède à une minimisation de l'énergie. Parmi les structures générées seules sont acceptées celles de basse énergie et présentant des violations raisonnables des contraintes NOE ($\leq 0,3 \text{ \AA}$) et géométrie de valence (angles dièdres ($\leq 5^\circ$) et longueurs de liaison ($\leq 0,05 \text{ \AA}$)). Le retour sur les cartes NOE expérimentales permet d'affiner l'estimation de l'intensité de certains contacts et ainsi de suite jusqu'à obtention d'un ensemble de structures satisfaisantes.

La comparaison des structures générées est effectuée par superposition atomique et calcul des rmsd (*root mean square deviation*, écarts quadratiques moyens), exprimés généralement en \AA .

3. Résultats - Détermination de la structure tridimensionnelle de la scyllatoxine-DBF

Pour déterminer la structure de la scyllatoxine-DBF, nous avons suivi, dans un premier temps, le principe exposé précédemment en exploitant les spectres ^1H en deux dimensions TOCSY, DQF-COSY et NOESY. Au fur et à mesure de la présentation des résultats nous ferons la comparaison des données entre la scyllatoxine et la scyllatoxine-DBF. Dans un second temps, nous verrons comment l'étape de modélisation moléculaire a été abordée en présence du mime-DBF.

3.1. Analyse des données RMN

3.1.1. Attribution

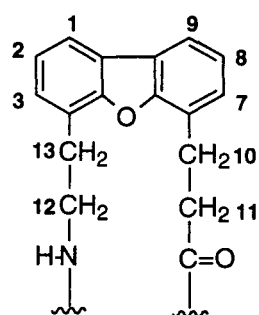
L'attribution des spectres a été réalisée suivant la méthode développée par Wüthrich (1986). La liste des déplacements chimiques est présentée dans le tableau 2.

Résidu	NH	H α	H β	Autres	3J (Hz) NH,H α
Ala 1		3,99	1,54		nd
Phe 2	8,43	4,69	3,15 ; 3,05		nd
Cys 3	8,29	4,36	2,80 ; 2,54		8,3
Asn 4	8,61	4,76	2,95 ; 2,74		9,2
Leu 5	8,69	3,94	1,76 ; 1,51	γ H 1,45; δ CH ₃ 0,90	5,5
Arg 6	8,20	4,09	1,92	γ CH ₂ 1,71; 1,60 ; δ CH ₂ 3,30; 3,20 ϵ NH 7,24	3,9
Met 7	7,81	4,27	2,15 ; 2,04	γ CH ₂ 2,70; 2,54	5,6
Cys 8	8,63	4,61	3,16 ; 2,73		nd
Gln 9	8,90	3,77	2,36 ; 1,97	γ CH ₂ 2,60; 2,36	5,5
Leu 10	8,03	4,07	1,88 ; 1,68	γ H 1,80; δ CH ₃ 0,90	4,7
Ser 11	8,38	4,26	4,04		5,7
Cys 12	8,24	4,47	2,40 ; 2,33		5,7
Arg 13	8,32	4,35	2,17 ; 2,06	γ CH ₂ 1,81; δ CH ₂ 3,23 ϵ NH 7,19	4,7
Ser 14	7,71	4,34	4,04		8,3
Leu 15	7,29	4,51	1,80 ; 1,75	γ H 1,80; δ CH ₃ 0,96; 0,85	9,2
Gly 16	8,12	4,15 ; 3,90			
Leu 17	7,50	4,74	1,46 ; 1,35	γ H 1,53; δ CH ₃ 0,75	10,1
Leu 18	8,57	4,53	1,52 ; 1,34	γ H 1,41; δ CH ₃ 0,82 ; 0,77	10,1
Gly 19	8,37	5,15 ; 3,02			
Lys 20	8,75	4,34	1,65 ; 1,55	γ CH ₂ 1,21; δ CH ₂ 1,54 ϵ CH ₂ 2,78	9,1
Cys 21	8,09	5,23	2,89 ; 2,69		10,0
Ile 22	8,82	4,07	1,04	γ CH ₂ 0,70; 0,44; γ CH ₃ 0,11 δ CH ₃ 0,31	10,9
Lys 25	7,77	4,43	0,96	γ CH ₂ 0,47; 0,10; δ CH ₂ 1,34 ϵ CH ₂ 2,63	9,2
Cys 26	8,28	4,98	2,95 ; 2,63		8,3
Glu 27	9,27	4,57	1,80 ; 1,57	γ CH ₂ 2,05	10,2
Cys 28	8,46	5,66	2,60 ; 2,94		10,0
Val 29	9,25	4,58	2,14	γ CH ₃ 0,77; 0,73	10,9
Lys 30	8,34	4,30	1,80 ; 1,67	γ CH ₂ 1,38; δ CH ₂ 1,67 ϵ CH ₂ 2,99	6,5
His 31	8,36	4,53	3,22 ; 3,12	2H 8,56; 4H 7,32	7,3

Tableau 2 : Déplacements chimiques de la scyllatoxine-DBF dans H₂O à 37°C, pH 4,9; constante de couplage 3J (Hz) (NH, H α), nd : non déterminé pour cause de recouvrement.

L'attribution des protons des chaînes latérales de Ile 22 et Lys 25 ont été déterminées à l'aide d'un spectre 1H - ^{13}C HSQC.

Déplacements chimiques des protons du mime-DBF dans la scyllatoxine-DBF



Position	NH	1	2	3	13	12
δ (ppm)	7,98	7,94	7,32	7,36	3,50 3,05	3,35 3,25

Position	9	8	7	10	11
δ (ppm)	7,94	7,32	7,19	3,57 3,05	3,55 3,05

Comparaison avec la scyllatoxine

Les déplacements chimiques de la scyllatoxine et de la scyllatoxine-DBF sont comparés au niveau des NH et des H α dans les graphes de la Figure 9.

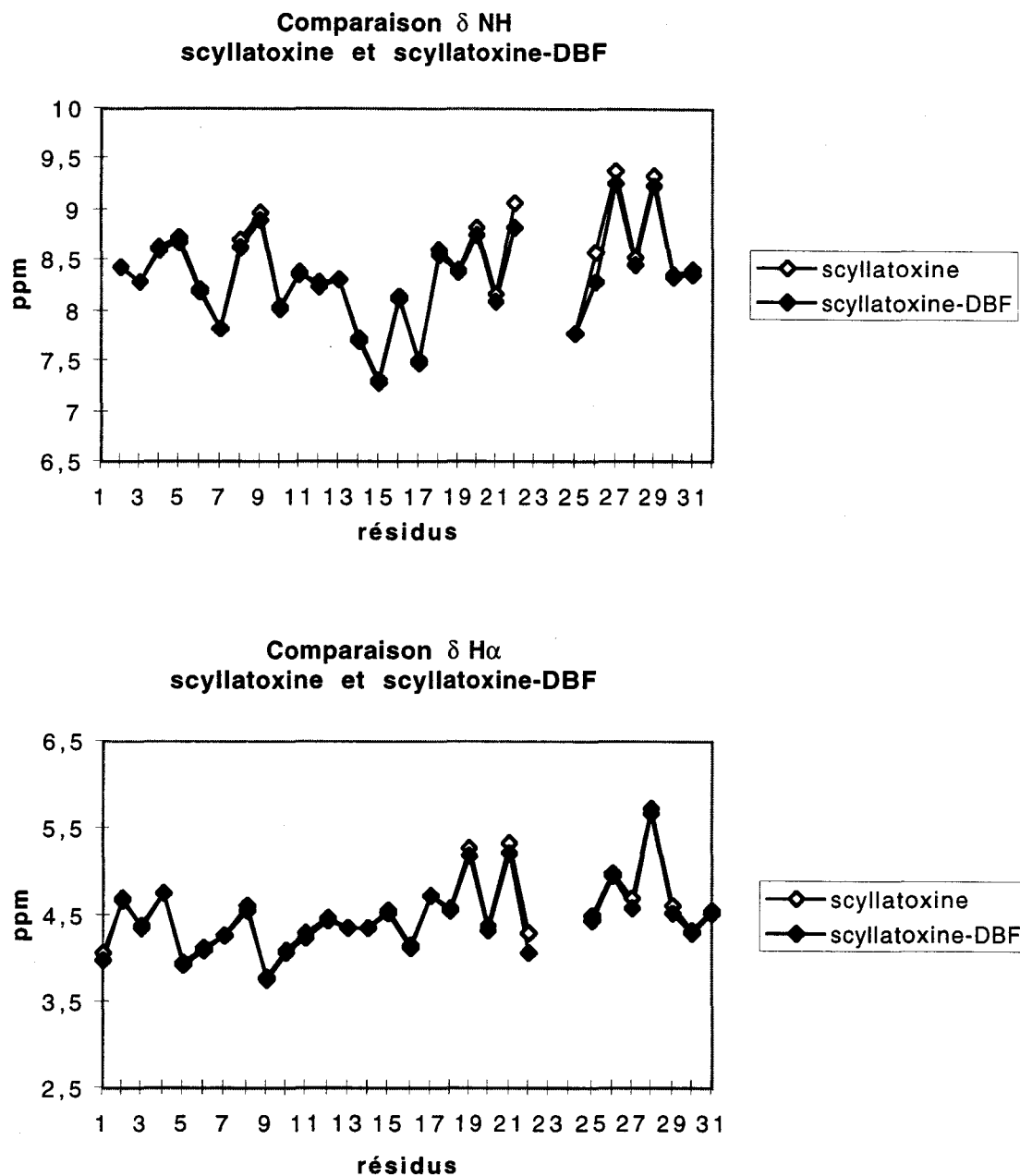


Figure 9 : Comparaison des déplacements chimiques pour les protons NH et H α de la scyllatoxine et de la scyllatoxine-DBF.

Ces graphes montrent que les déplacements chimiques des protons NH et H α de la scyllatoxine-DBF sont très proches de ceux de la scyllatoxine. Les déplacements chimiques étant très sensibles à l'environnement structural, la structure tridimensionnelle de la scyllatoxine-DBF doit selon toute vraisemblance être proche de celle de la scyllatoxine.

Seuls les protons dans l'environnement proche du mime marquent une différence : les protons des chaînes latérales de Ile 22 et Lys 25 sont déplacés vers les hauts champs en particulier les H β et γ CH $_3$ de Ile 22 et β , γ CH $_2$ de Lys 25 (Tableau 3).

	Ile 22					Lys 25					
	NH	H α	H β	γ CH $_3$	δ CH $_3$	NH	H α	H β	γ CH $_2$	δ CH $_2$	ϵ CH $_2$
scyllatoxine-DBF	8,82	4,07	1,04	0,11	0,31	7,77	4,43	0,96	0,10	1,34	2,63
scyllatoxine	9,06	4,31	1,81	0,86	0,76	7,77	4,50	1,82	0,47	1,67	3,00

Tableau 3 : Déplacements chimiques des protons des deux résidus adjacents au mime-DBF Ile 22 et Lys 25 pour la scyllatoxine (MARTINS et coll., 1990) et la scyllatoxine-DBF.

3.1.2. Eléments de structure secondaire

3.1.2.1. Le feuillet β

Lors de l'attribution séquentielle, on a pu constater la présence, dans la région C-terminale, de contacts NOE forts α N (i, i+1) caractéristiques d'un feuillet β (Figure 10). L'analyse des NOE longue distance le confirme et le Schéma 8 a pu être établi sur la base des données observées.

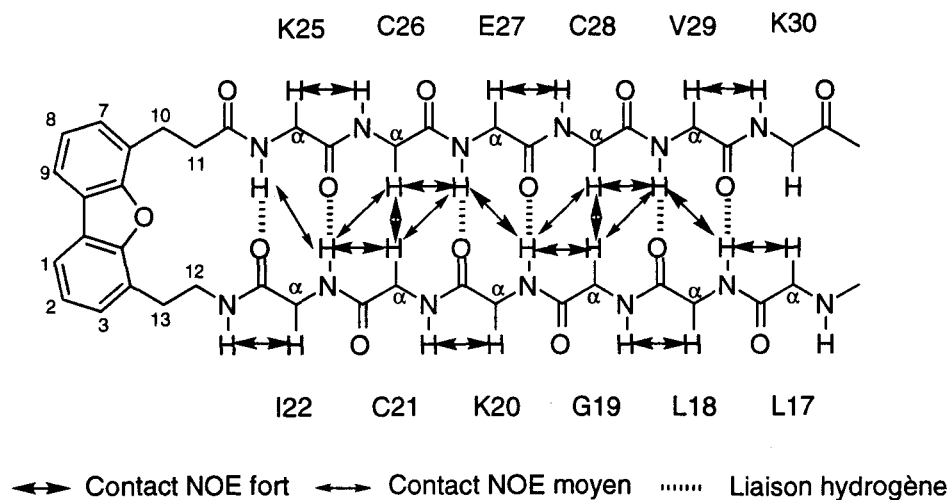


Schéma 8 : Feuillet β de la scyllatoxine-DBF. Les contacts NOE observés sont indiqués ainsi que les liaisons hydrogène.

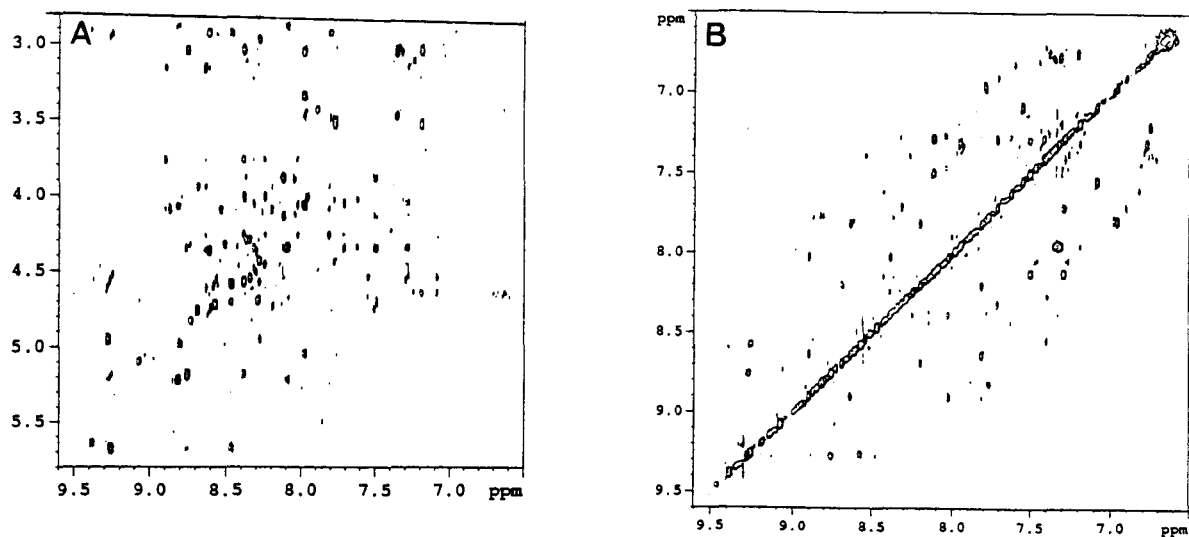


Figure 10 : **A.** Région de la carte NOESY faisant apparaître les contacts α N forts caractéristiques du feuillet β .
B. Région de la carte NOESY faisant apparaître les contacts NN forts caractéristiques de l'hélice α .

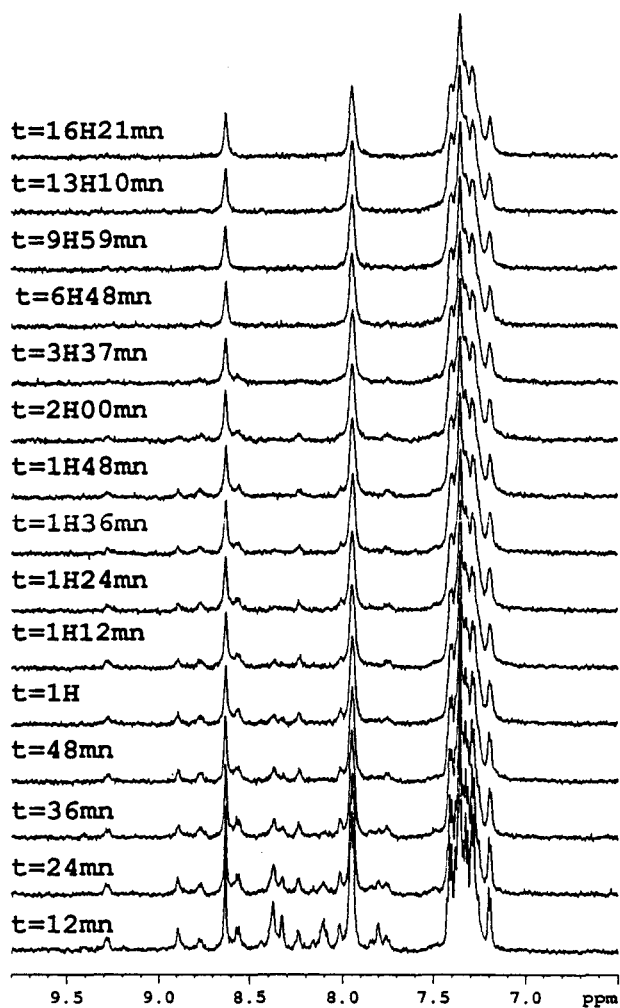


Figure 11 : Expérience d'échange H/D des protons amides.

D'autre part, l'expérience d'échange H/D (Figure 11) montre que les protons amides des résidus 18, 20, 22, 25, 27, 29 s'échangent lentement (Schéma 9) suggérant leur implication dans une liaison hydrogène.

Enfin, les constantes de couplage $^3\text{J}_{\text{NH}-\text{N}\alpha}$, estimées à partir du spectre DQF-COSY et observées dans cette région, sont élevées ($> 8,5$ Hz), ce qui est caractéristique d'une structure étendue.

Ces données nous permettent d'établir que le feuillet β s'étend de Leu 18 à Val 29, ce qui est comparable aux résultats obtenus par MARTINS et coll. (1995).

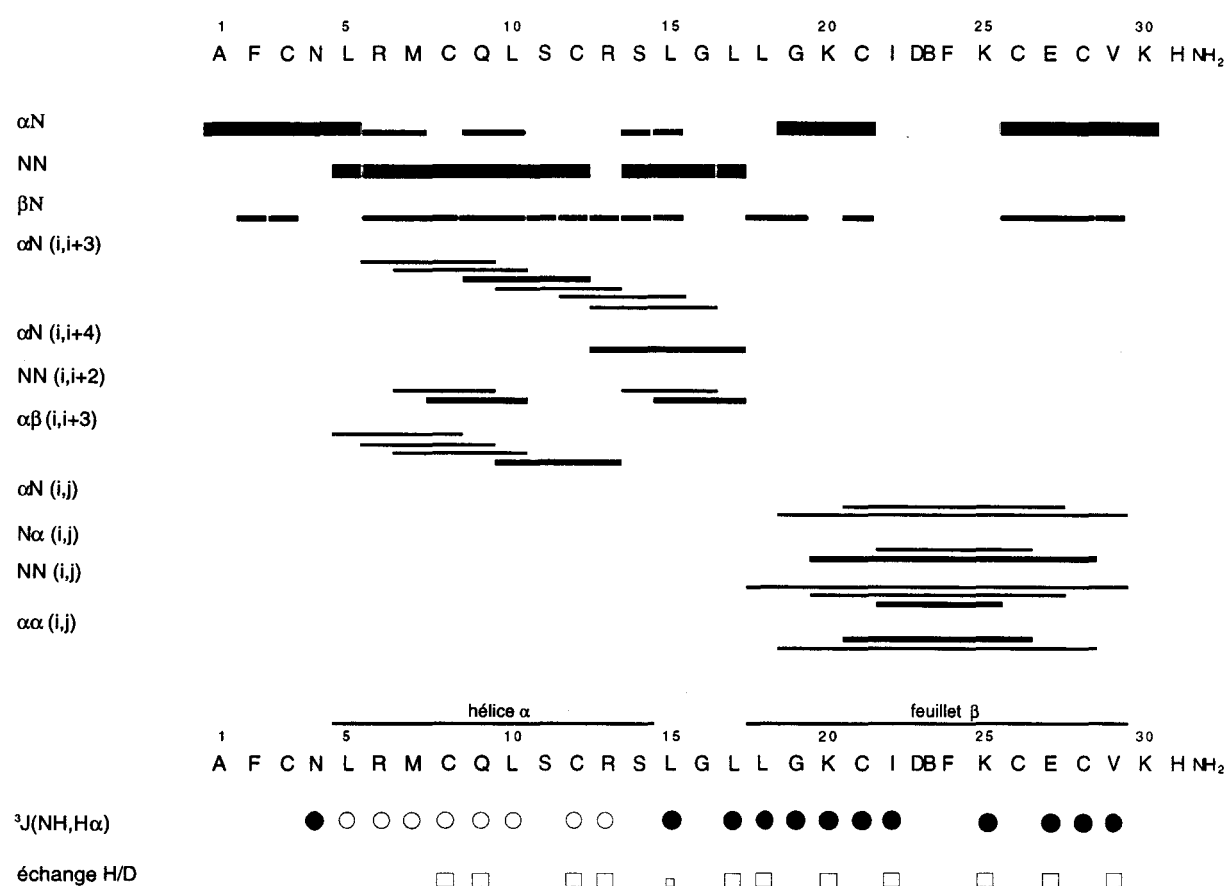


Schéma 9 : Résumé des contacts NOE présents dans la scyllatoxine-DBF. L'épaisseur des traits est proportionnelle à l'intensité de l'effet. Les constantes de couplage supérieures à 8,5 Hz sont indiquées par des ronds noirs, et celles inférieures à 6 Hz par des ronds blancs. Les protons s'échangeant lentement (présents après 16 h d'échange) sont représentés avec un rectangle, les grands rectangles indiquant une vitesse d'échange plus grande.

3.1.2.2. L'hélice α

Dans la partie N-terminale, des contacts NOE forts de type $NN(i, i+1)$ ont été observés. Des contacts $\alpha N(i, i+3)$ sont également présents et compatibles avec une structure en hélice α (Schéma 9).

L'expérience d'échange indique que les protons NH 9, 10, 12, 13 sont présents après 16 h d'échange ce qui suggère leur implication dans une liaison hydrogène. Dans les hélices α celles-ci s'établissent entre le CO du résidu i et le NH du résidu $i+4$ (Figure 8).

Les constantes de couplages $^3J_{NH-H\alpha}$ de faible valeur (< 6 Hz) de cette région sont en accord avec une structuration en hélice (Schéma 9).

D'après ces éléments nous pouvons conclure que l'hélice α s'étend de Leu 5 à Ser 14 ce qui est parfaitement compatible avec les résultats obtenus par MARTINS et coll (1995).

3.1.3. Contacts de structure tertiaire

Les contacts NOE longue distance permettent d'orienter les éléments de structure secondaire les uns par rapport aux autres pour établir la structure tridimensionnelle.

Une région importante dans la structure est celle où hélice α et feuillet β se croisent. A cet endroit, seul une Gly est tolérée pour des raisons d'encombrement stérique, et ceci est valable pour la plupart des toxines de scorpion à chaîne courte (voir paragraphe 2.3.4.2. de cette partie). La Gly 19 de la scyllatoxine-DBF produit effectivement des contacts NOE avec $H\alpha_9$ et $H\beta_{12}$ de l'hélice.

D'autre part, les mêmes ponts disulfure que la scyllatoxine sont retrouvés par la présence de contacts $H\beta-H\beta$ entre les deux demi-cystines de chaque pont (KLAUS et coll., 1993). La comparaison des déplacements chimiques pour les protons β et β' de chaque cystéine de la scyllatoxine et de la scyllatoxine-DBF est présentée Schéma 10. Les protons β des Cys proches du mime (Cys 21 et 26) apparaissent légèrement blindés laissant supposer une influence du mime-DBF sur ces résidus. Pour le pont 8-21, cette influence ne se transmet pratiquement pas au niveau de la Cys 8 appariée ce qui laisse penser que les différences observées pour les déplacements chimiques de la Cys 21 (et peut être de Cys 26) sont dues à l'influence magnétique du mime et non à un changement conformationnel du pont disulfure.

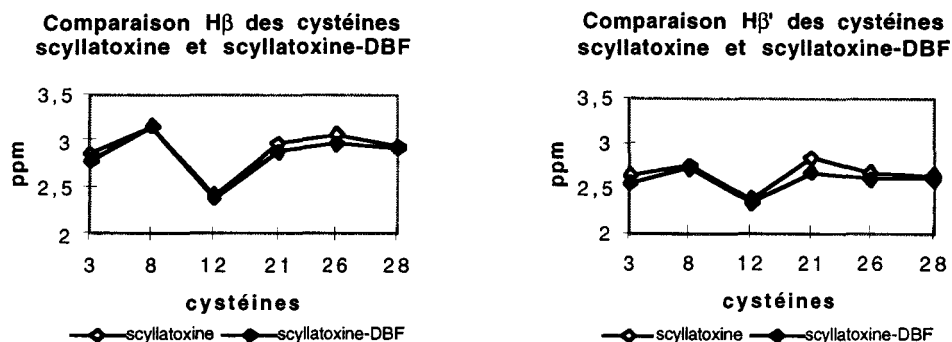


Schéma 10 : Comparaison des déplacements chimiques des protons β et β' de chaque cystéine de la scyllatoxine et de la scyllatoxine-DBF.

Les autres contacts NOE longue distance observés sont également répertoriés pour servir à la détermination de la structure.

3.2. Détermination de la structure par modélisation moléculaire

Le travail de modélisation moléculaire pour générer les structures de la scyllatoxine-DBF a été effectué au laboratoire en collaboration avec Eric BUISINE.

3.2.1. Stratégie

Le logiciel XPLOR (BRÜNGER, 1992) implanté au laboratoire et couramment utilisé pour la génération de structures de protéines, ne permet pas le traitement de fragments moléculaires non peptidiques. La génération de structures de la scyllatoxine-DBF s'est donc déroulée comme suit :

Remarque préalable : Dans un souci de clareté, nous désignerons par Scy* les structures de la scyllatoxine obtenues par MARTINS et coll. (1995), par Scy les structures générées à partir des contraintes de la scyllatoxine-DBF et par Scy-DBF les structures Scy dans lesquelles le mime DBF a été incorporé.

- 1 -• génération de structures de Scy à l'aide du logiciel XPLOR à partir des données RMN de la scyllatoxine-DBF;
 - optimisation des structures par DISCOVER (BIOSYM Technologies - MSI), avec le champ de forces CVFF. 25 structures finales de Scy sont obtenues;
- 2 -• insertion de conformations stables du mime-DBF;
 - raffinement énergétique sous contraintes des structures de Scy-DBF

1 - Génération de structures Scy à partir des données RMN de la scyllatoxine-DBF

Pour la raison évoquée précédemment, nous avons tout d'abord généré des structures Scy. Les données RMN utilisées pour l'établissement des contraintes concernent uniquement la partie protéique, c'est-à-dire sans le mime. L'analyse des spectres RMN de Scy-DBF a permis d'établir la liste de contraintes suivante:

- 201 contraintes NOE dont :
 - 53 intra-résiduelles;
 - 78 séquentielles;
 - 40 de moyenne distance;
 - 30 de longue distance;
- 18 contraintes de distances correspondant aux 9 liaisons hydrogène déterminées à partir de l'expérience d'échange H/D (concerne les distances N \cdots O et H \cdots O);
- 27 contraintes sur les angles dièdres dont :
 - 19 sur les angles ϕ (squelette);
 - 8 sur les angles χ_1 (chaînes latérales).

A partir de ces contraintes, 100 structures de Scy ont été générées. 48 ont été acceptées avec un seuil de violation de 0,3 Å pour les contraintes sur les distances. Les structures ont ensuite été optimisées par le module DISCOVER : courte dynamique à 1000 K puis refroidissement lent et minimisation d'énergie par mécanique moléculaire. Le champ de force utilisé est CVFF (*Consistent Valence Force Field*). Enfin, le logiciel PROCHECK a été utilisé pour contrôler la qualité des structures obtenues et sélectionner les 25 meilleures (énergies minimales et facteur de qualité « *G-factor* » supérieur à -0,5). Le tableau 4 donne d'une part les rmsd moyens des superpositions des squelettes (résidus 1-31 et 3-29) et d'autre part ceux obtenus lorsque tous les atomes lourds sont considérés (squelette + chaînes latérales). Les rmsd correspondent à la moyenne des rmsd caractérisant la superposition de toutes les paires possibles de conformation de Scy. Les superpositions moléculaires ont été effectuées à l'aide du module Insight II (logiciel BIOSYM-MSI).

résidus	superposition des atomes lourds du squelette	superposition de tous les atomes lourds
1-31	1,31 ± 0,90 Å	2,49 ± 1,01 Å
3-29	0,79 ± 0,48 Å	1,85 ± 0,68 Å

Tableau 4 : rmsd obtenus après génération et optimisation des structures Scy.

Les 25 structures finales de Scy obtenues à partir des données RMN de la scyllatoxine-DBF ont ensuite été comparées par superposition moléculaire à celles publiées par MARTINS et coll. (1995). Le Tableau 5 présente d'une part les rmsd moyens des superpositions des squelettes (résidus 1-31 et 3-29) et d'autre part ceux obtenus lorsque tous les atomes lourds sont pris en considération (squelette + chaînes latérales). Les rmsd correspondent à la moyenne des rmsd caractérisant la superposition de chacune des conformations de Scy générées lors de ce travail avec celles de MARTINS et coll. : Scy*. Ces dernières sont disponibles à la *Protein Data Bank* (fichier pdb 1scy).

résidus	superposition des atomes lourds du squelette
1-31	1,75 ± 0,78 Å
3-29	1,16 ± 0,50 Å

Tableau 5 : Valeurs moyennes et intervalles de fluctuation des rmsd des superpositions entre Scy et Scy*.

2 - Insertion des conformations de basse énergie du mime-DBF

2.1 - Recherche des conformations stables du mime

Au début du projet, nous avons vérifié la compatibilité du mime-DBF à une insertion dans la structure de la scyllatoxine. Le mime-DBF, pris sous la forme N-acétyl et C-carboxamide, avait alors été soumis à une analyse conformationnelle à partir de laquelle des conformations stables, respectant certains critères reflétant la géométrie du coude β de la protéine avait été sélectionnées (Schéma 11), puis superposées à la structure déterminée par MARTINS et coll. L'analyse conformationnelle a été effectuée à l'aide de DISCOVER (champ de forces CVFF). Sur les 324 conformations initiales du mime correspondant aux différents jeux d'angles possibles α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2 (Schéma 11 A, B) pouvant être adoptés par les deux chaînes du

mime et après optimisation par mécanique moléculaire, uniquement 6 conformations de basse énergie respectaient les critères géométriques du coude β établis à partir des structures Scy* (figure 10). Ces critères devaient refléter (Schéma 11 A, C) : la présence de la liaison hydrogène CO(i)-NH(i+3) du coude β de la protéine ($d_3 < 2,5 \text{ \AA}$); l'implication des résidus i (Ile 22) et $i+3$ (Lys 25) dans une structure en feuillet β ($d_4 : 4-6 \text{ \AA}$), la distance d_4 correspondant ici à l'écartement des $C\alpha$ des résidus Ile 22 et Lys 25. L'angle caractérisant l'orientation relative des fonctions peptidiques CO(22)-NH(23) et CO(24) et NH(25) a également fait partie des critères de sélection (80° à 180° dans Scy*).

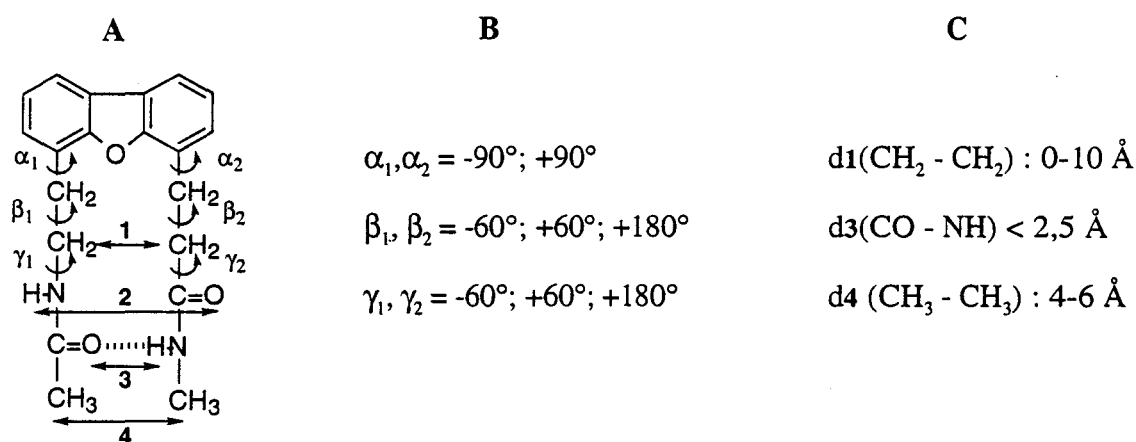


Schéma 11 : Analyse des valeurs permises sur les distances et les angles du mime-DBF

Il faut remarquer ici que les 6 conformations stables du mime-DBF (figure 12) sont en fait 3 paires d'énantiomères avec 2 conformations repliées et 4 conformations étendues.

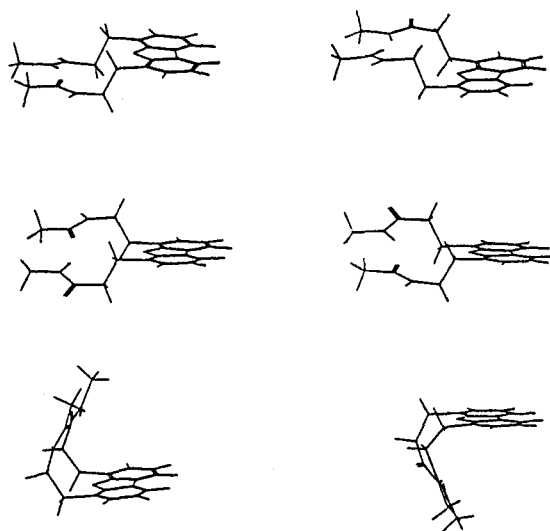


Figure 12 : représentation des 6 conformations stables du mime-DBF respectant les critères établis

2.2 - Insertion des conformations stables du mime-DBF dans les structures générées

Chaque conformation sélectionnée du mime-DBF a été superposée au niveau du coude β et selon le Schéma 12, aux 25 conformations Scy qui ont été générées ici. Par coupure et création des liaisons nécessaires au niveau de la partie mime et de la partie protéine, 6×25 conformations soit 150 conformations initiales ont ainsi été obtenues. Toutes les manipulations moléculaires ont été effectuées à l'aide du module Insight II du logiciel de modélisation moléculaire BIOSYM-MSI.

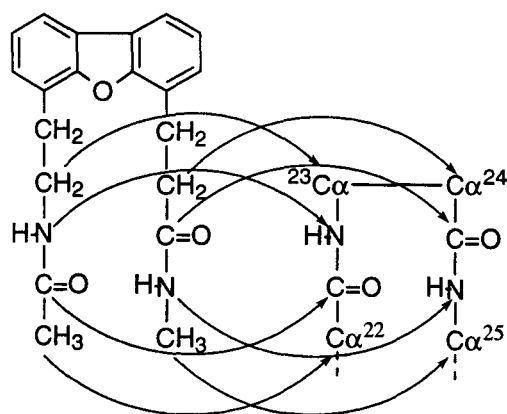


Schéma 12 : Représentation de la superposition du mime-DBF au niveau du coude β des structures Scy.

De ces 150 conformations, 30 ont été écartées après analyse visuelle, car elles présentaient des aberrations structurales (par exemple chaîne latérale de Lys 25 traversant l'unité tricyclique du mime). Parmi les 120 conformations restantes, 8 ont été enlevées car elles avaient une énergie trop élevée (supérieure à $E_{\min} + 90$ kcal). Les 112 conformations résultantes ont ensuite été soumises à une procédure de raffinement (recuit simulé) à l'aide de DISCOVER (champ de force CVFF) : courte dynamique moléculaire à 1000 K puis refroidissement lent et optimisation finale par mécanique moléculaire. Au cours de cette procédure, toutes les contraintes RMN de la scyllatoxine-DBF ont été prises en compte. Aux contraintes utilisées pour générer Scy, les 8 NOE intra-mime et 13 NOE mime-protéine ont été ajoutées. Une analyse rapide met clairement en évidence que les structures ainsi obtenues convergent toutes vers un même mode de repliement du mime sur la protéine. De plus, le rmsd moyen du mime obtenu en superposant les atomes lourds du mime dans les 112 conformations précédentes est de $0,09 \pm 0,12$ Å.

25 conformations Scy-DBF ont été obtenues pour représenter la structure de la scyllatoxine-DBF en solution (Figure 13).

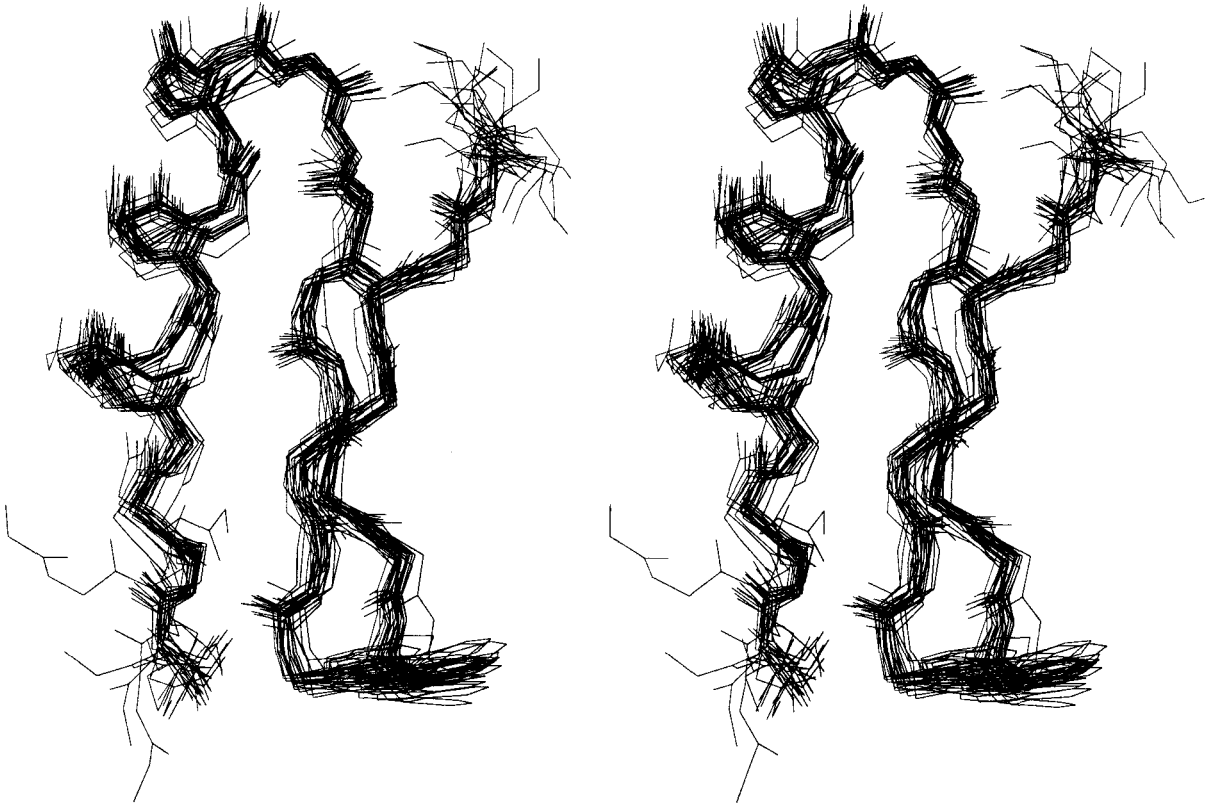


Figure 13 : Vue stéréo des 25 structures finales de la scyllatoxine-DBF.

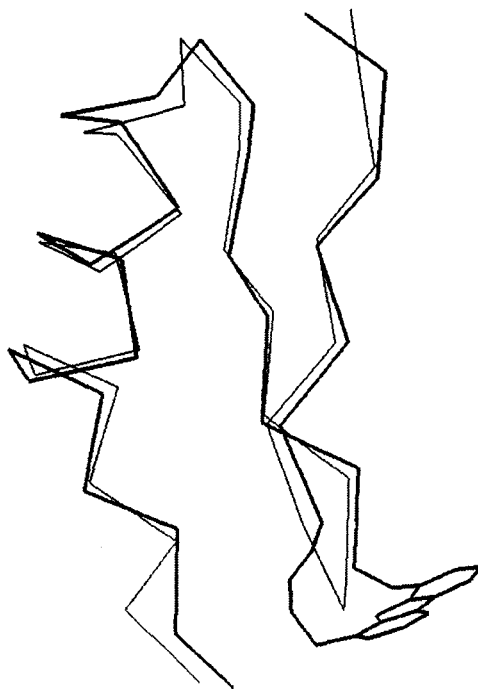


Figure 14 : Superposition de deux structures de la scyllatoxine et de la scyllatoxine-DBF

3.2.2. Résultats

3.2.2.1. Structure générale

Comme le montre les résultats précédents, la scyllatoxine-DBF adopte le même mode de repliement $\alpha\beta$ que la protéine non modifiée. De petites différences, comme par exemple la géométrie des ponts disulfure, sont toutefois observées. Cela est probablement dû au nombre moins important de contraintes NOE (317 pour la scyllatoxine contre 201 pour la partie protéine de la scyllatoxine-DBF). Cette différence s'explique plus vraisemblablement par la différence de concentration des échantillons (5 mM pour la scyllatoxine et 1 mM pour la scyllatoxine-DBF) que par une plus grande flexibilité de la scyllatoxine-DBF en solution.

La superposition de deux structures, scyllatoxine et scyllatoxine-DBF, est présentée Figure 14).

3.2.2.2. Etude de l'environnement du mime

L'analyse des données concernant l'environnement du mime-DBF se base sur deux types de résultats : les déplacements chimiques des résidus adjacents (Ile 22 et Lys 25), rappelés dans le tableau 6, et les contacts NOE observés entre le mime et les chaînes latérales de ces mêmes résidus. Les déplacements chimiques de Ile 22 et Lys 25 subissent clairement un déplacement vers les champs forts par rapport à ce qui est observé dans la scyllatoxine. Ce dernier fait et les contacts NOE mime-chaînes latérales, qui impliquent une proximité spatiale, vont dans le sens d'une interaction hydrophobe entre la partie aromatique (dibenzofurane) du mime et les chaînes latérales des résidus cités (figure 15).

	Ile 22					Lys 25					
	NH	H α	H β	γ CH ₃	δ CH ₃	NH	H α	H β	γ CH ₂	δ CH ₂	ϵ CH ₂
scyllatoxine-DBF	8,82	4,07	1,04	0,11	0,31	7,77	4,43	0,96	0,10	1,34	2,63
									0,47		
scyllatoxine	9,06	4,31	1,81	0,86	0,76	7,77	4,50	1,82	1,39	1,67	3,00

Tableau 6 : Déplacements chimiques comparés pour Ile 22 et Lys 25 entre la scyllatoxine et la scyllatoxine-DBF

L'effet du mime est particulièrement important au niveau de H β et γ CH₃ de Ile 22 et les protons méthyléniques β et γ de Lys 25. Les protons γ CH₂ de Lys 25 sont dédoublés alors qu'ils ne semblaient pas l'être dans la scyllatoxine ce qui peut indiquer une conformation relativement figée de la chaîne à cet endroit.

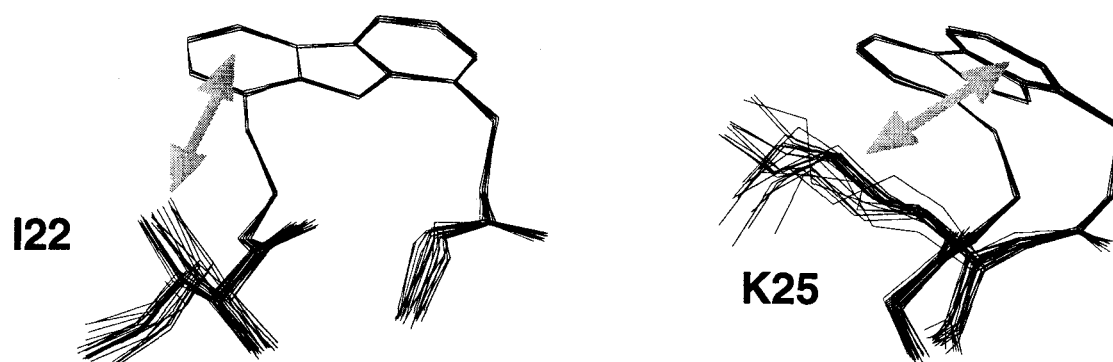


Figure 15 : Vues du mime-DBF avec les chaînes latérales de Ile 22 et Lys 25.

4. Conclusion de l'étude structurale

L'étude structurale de la scyllatoxine-DBF par RMN et modélisation moléculaire a montré une conservation de la structure. Dans l'environnement du mime-DBF, on a pu mettre en évidence la présence d'un complexe hydrophobe impliquant la partie dibenzofurane aromatique du mime et les chaînes latérales des résidus adjacents Ile 22 et Lys 25. Cela s'est traduit par des déplacements chimiques des protons des chaînes latérales de Ile 22 et Lys 25 déplacés vers les hauts champs et la présence de contacts NOE entre ces mêmes protons et les protons aromatiques du mime. L'implication de la présence de ce complexe hydrophobe sera discutée dans le Chapitre V de cette partie.

La scyllatoxine-DBF présente une structure tridimensionnelle conservée et il est maintenant important de voir comment cela se traduit au niveau de l'activité biologique.

5. Présence d'un produit secondaire

Un certain nombre de faits suggère la présence d'un produit secondaire minoritaire.

L'analyse fine des spectres RMN a mis en évidence la présence d'un produit secondaire minoritaire dont l'attribution partielle des NH et H α a pu être faite entre les résidus 6 et 30 par comparaison avec l'attribution précédente.

Une analyse par microséquence a été tentée mais le taux de recouvrement d'un cycle de séquence au suivant était trop important par rapport à la quantité de produit minoritaire.

Le spectre de masse en électrospray montre la présence d'un pic d'une masse $M(\text{scyllatoxine-DBF}) + 71$.

Le profil HPLC en phase inverse du produit final présente un très léger épaulement.

Ces arguments ne nous ont cependant pas permis de déterminer précisément quel était ce produit ni d'estimer sa proportion, faible de toute façon.

CHAPITRE IV : EVALUATION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DE LA SCYLLATOXINE-DBF

1. Introduction

Le travail d'évaluation fonctionnelle de la scyllatoxine-DBF a été effectué par Michel HUGUES à l'Université de Bordeaux. Deux tests ont été réalisés, ceux-ci étant classiquement utilisés pour caractériser l'activité de la scyllatoxine et de ses analogues. Le premier permet de tester l'activité biologique par la mesure de la contraction de *Taenia coli* de cobaye (AUGUSTE et coll., 1992b; 1990; HUGUES et coll., 1982a). Le second permet, quant à lui, une évaluation de l'activité pharmacologique par une expérience de compétition de fixation au niveau des sites récepteurs avec l'apamine ^{125}I sur des membranes microsomales de cerveau de rat (AUGUSTE et coll., 1992a et b; HUGUES, 1982a).

2. Résultats

Les résultats obtenus pour les tests de contraction de *Taenia coli*, et pour le test de compétition avec l'apamine ^{125}I sont présentés ci-après.

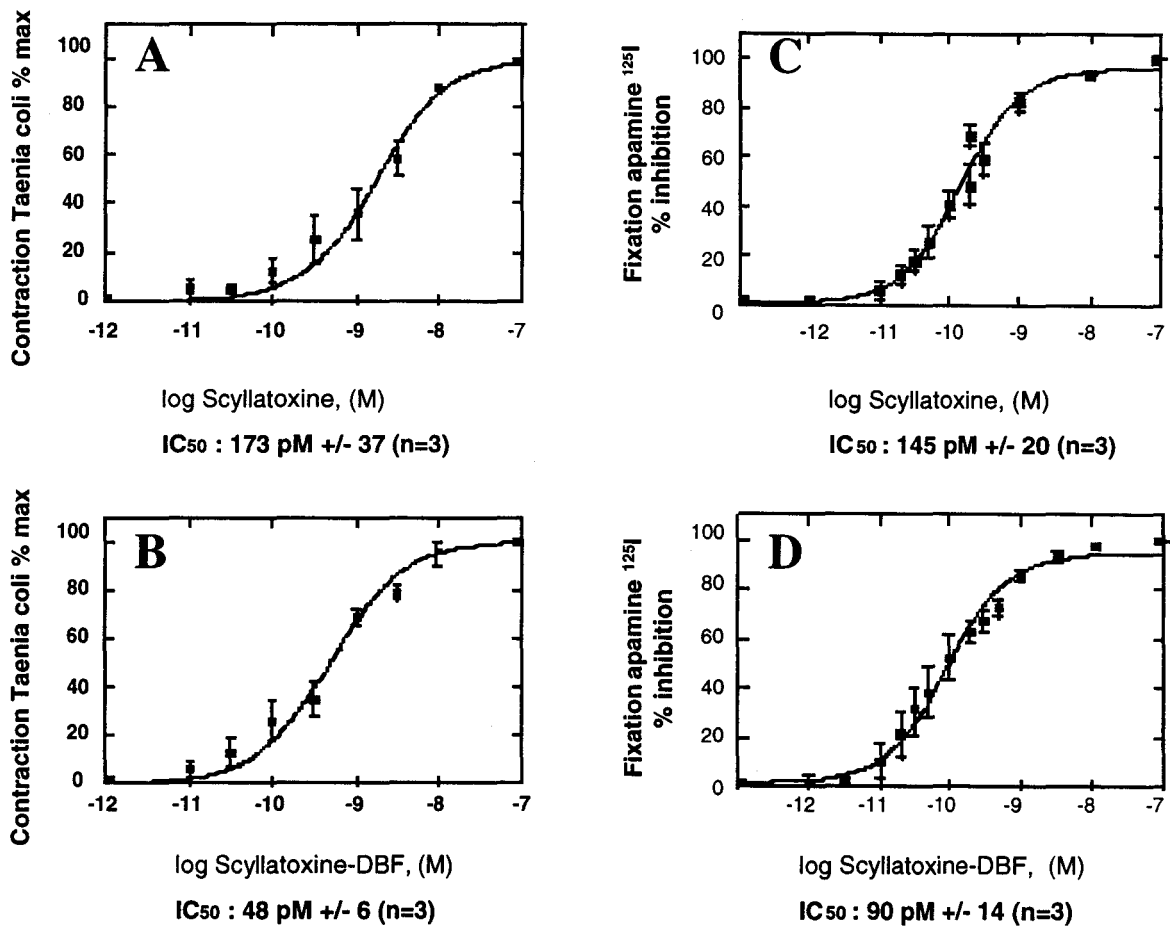


Figure 16 : A et B, Résultats obtenus pour le test de contraction de *Taenia coli*. C et D, résultats obtenus pour le test de compétition avec l'apamine ¹²⁵I. n est le nombre d'expériences.

2.1. Activité biologique - contraction de *Taenia coli* de cobaye

Les expériences de contraction de *Taenia coli* de cobaye font apparaître que la scyllatoxine-DBF présente la même activité que la scyllatoxine non modifiée. Les valeurs IC₅₀ sont respectivement pour la scyllatoxine et la scyllatoxine-DBF de 173 ± 37 pM (n = 3) et de 48 ± 6 pM (n=3).

2.2. Activité pharmacologique - compétition avec l'apamine ¹²⁵I

De la même façon que pour les expériences de contraction, les expériences de compétition avec l'apamine ¹²⁵I ne marquent pas de différence entre scyllatoxine et scyllatoxine-DBF et les valeurs IC₅₀ sont respectivement de 145 ± 20 pM (n = 3) et de 90 ± 14 pM (n = 3).

3. Conclusion de l'évaluation biologique

Ces expériences visant à évaluer l'activité biologique de la scyllatoxine-DBF confirment les conclusions tirées à l'issue de l'étude structurale à savoir une conservation de la structure de la toxine modifiée. L'incorporation du mime n'a donc pas entravé l'effet des éléments à l'origine de l'activité fonctionnelle (Arg 6 et Arg 13 et partie du feuillet). D'autre part, la présence du mime dans cette région de la scyllatoxine ne perturbe pas l'interaction avec le récepteur à l'origine des activités biologique et pharmacologique.

Les petites différences observées pour les IC_{50} dans les deux tests pourrait laisser présager une meilleure efficacité de la scyllatoxine-DBF par rapport à la scyllatoxine. On pourrait l'expliquer par une rigidité accrue de la molécule stabilisant la conformation liée au récepteur. Mais cette hypothèse est trop risquée car elle ne repose pas sur une différence significative (de l'ordre d'un facteur 10 au moins) pour les valeurs d' IC_{50} .

CHAPITRE V : DISCUSSION SUR L'INCORPORATION DU MIME-DBF DANS LA SCYLLATOXINE

En incorporant le mime-DBF dans la scyllatoxine, nous avons pu obtenir une molécule modifiée avec un élément non naturel dont la structure et l'activité biologique sont conservées. Nous avons cependant rencontré des difficultés au niveau de la synthèse et de l'étape de repliement oxydatif. Celles-ci sont essentiellement dues à la nature hydrophobe et rigide du mime qui, respectivement, favorise l'agrégation et réduit la flexibilité de la chaîne peptidique.

Si l'on se place au niveau de l'ingénierie des toxines, ces résultats confirment la capacité de cet « échafaudage moléculaire » de type $\alpha\beta$ stabilisé par des ponts disulfure, pour tolérer des éléments non natifs et même des éléments de structuration comme le mime-DBF. Cela prouve aussi que ce mime est compatible avec un environnement protéique.

Dans le cadre plus précis de l'environnement du mime-DBF dans la structure, il apparaît que la Lys 25 participe au complexe hydrophobe impliquant la partie aromatique du mime et Ile 22. D'après les études de KELLY (1994) il était difficile de prévoir le comportement de la Lys 25 puisque lorsque deux Lys sont présentes en position adjacente au mime, le feuillet β ne se forme pas. Le contexte général semble favoriser l'interaction de la partie hydrophobe de la chaîne latérale de la Lys avec le dibenzofurane. Il n'est cependant pas possible de déterminer si cette stabilisation est apportée par la simple interaction de Ile 22 avec le mime ou par la présence des ponts disulfure, ou une combinaison des deux.

Le mime-DBF s'intègre donc parfaitement dans la structure finale en remplaçant efficacement le coude β de la scyllatoxine. Cependant sa présence semble influencer de manière non négligeable les mécanismes intervenant dans l'étape de repliement oxydatif. L'exploitation de la synthèse de la scyllatoxine-DBF, où les Cys sont protégées de manière orthogonale, devrait permettre de fournir des informations concernant l'influence du mime sur le repliement en étudiant la structure des intermédiaires d'oxydation. La comparaison avec le repliement de la scyllatoxine permettra peut-être d'étudier l'implication du coude β dans les mécanismes de repliement.

PARTIE III

***INCORPORATION DU MIME DE COUDE β A
STRUCTURE DIBENZOFURANE DANS LE DOMAINE
B1 DE LA PROTEINE G DU STREPTOCOQUE***

PARTIE III

INCORPORATION DU MIME DE COUDE β A STRUCTURE DIBENZOFURANE DANS LE DOMAINE B1 DE LA PROTEINE G DU STREPTOCOQUE

Introduction

Un autre modèle de protéine a été retenu pour incorporer le mime-DBF. Il s'agit du domaine B1 de la protéine G (B1G) du Streptocoque. Celui-ci répond également aux critères énoncés dans le cahier des charges (Partie II, Chapitre I). Une question supplémentaire était également posée pour ce modèle : étudier l'influence du mime-DBF sur la stabilité de B1G-DBF. Cette étude s'inscrit dans le cadre du travail de thèse d'un autre étudiant au laboratoire.

Outre l'étude de la stabilité de B1G-DBF, l'incorporation du mime-DBF dans B1G revêtait une importance particulière au niveau structural. En effet, lors d'une étude préliminaire, le mime-DBF avait été incorporé dans la séquence correspondant au feuillet N-terminal de B1G (B1G₂₋₁₉) où aucune structuration en feuillet β n'avait été observée. Nous voulions donc voir quelle serait l'influence du mime-DBF sur la structuration de B1G entier et plus particulièrement au niveau du feuillet N-terminal. La comparaison des résultats obtenus dans les deux cas permettra d'obtenir des éléments d'information sur le rôle de l'environnement protéique dans la structuration du feuillet β .

Nous présenterons ici la synthèse de B1G-DBF, les résultats de l'étude structurale par RMN et l'évaluation fonctionnelle à l'aide de tests ELISA.

CHAPITRE I : CHOIX DU SECOND MODELE LE DOMAINE B1 DE LA PROTEINE G

1. La protéine G

1.1. Présentation

La protéine G se trouve à la surface des bactéries de type *Streptococcus* du groupe G, où elle est associée à la paroi cellulaire (BJÖRK et KRONVALL, 1984). Une de ses extrémités est enchassée dans le peptidoglycane de la paroi bactérienne alors que l'autre s'étend dans le milieu extracellulaire (SJÖBRING et coll., 1991). La protéine G a la capacité de se lier à des protéines majeures du sérum : les immunoglobulines G (IgG) de différentes espèces de mammifères (ÅKERSTRÖM et coll., 1986; OLSSON et coll., 1987; ÅKERSTRÖM et coll., 1985; BJÖRK et coll., 1987a) et à l'albumine (SJÖBRING et coll., 1989a; ÅKERSTRÖM et coll., 1987; BJÖRK et coll., 1987b). Elle est constituée de différents domaines et sa structure, obtenue par traduction de la séquence ADN du gène, est représentée Schéma 1. Les domaines associés à la liaison à l'albumine sont les domaines A1 et A2, et aux IgG les domaines B1 et B2 (FAHNESTOCK et coll., 1990).

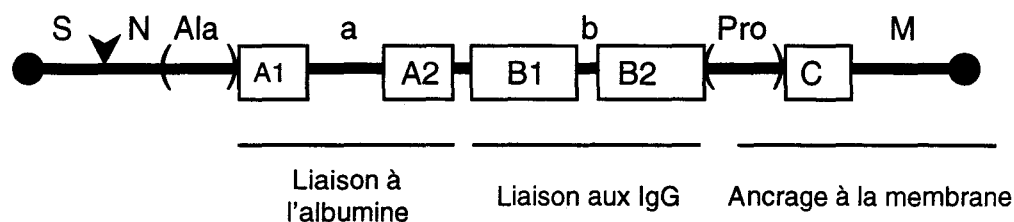


Schéma 1 : Représentation schématique de la protéine G (d'après FAHNESTOCK, 1990). S : séquence signal de sécrétion (résidus 1-33); N : séquence nécessaire à la sécrétion; Ala : séquence riche en Ala (60%); A1 (104-140) et A2 (179-215) : deux copies d'une séquence de 37 résidus (73% d'homologie) séparées par la séquence a (141-178); B1 (228-282) et B2 (298-352) : deux copies d'une séquence de 55 résidus (89% d'homologie) séparées par la séquence b (283-297). Pro : séquence riche en résidus Pro (353-385); C : cinq copies d'une séquence de 5 résidus (386-410); M : région C-terminale (411-448).

La protéine G a fait l'objet de nombreuses études pour son intérêt en immunologie grâce à sa haute affinité pour différents types d'IgG (STONE et coll., 1989; ELIASSON et coll., 1989; GOWARD et coll., 1990; SJÖBRING et coll., 1991; FRICK et coll., 1992). Au niveau fonctionnel, la fixation des IgG de l'hôte à la surface de la cellule bactérienne, *via* la protéine G, empêcherait la reconnaissance de la bactérie par le système immunitaire de l'hôte et ne serait donc plus considérée comme étrangère par l'organisme infecté (BJÖRK et ÅKERSTRÖM, 1990).

1.2. Les domaines de liaison aux IgG

Comme mentionné précédemment, la protéine G s'associe aux IgG au niveau des domaines B. Suivant les souches il en existe deux ou trois : B1, B2 et B3. Ces domaines possèdent 55 résidus, B1 et B2 sont différents par 6 acides aminés et B3 est une duplication de B2 (FAHNESTOCK et coll., 1990).

Les constantes d'association de protéines recombinantes présentant un, deux ou trois domaines B aux IgG ou aux fragments Fc ou Fab humains, ont été déterminées et sont présentées dans le tableau 1.

Nombre de domaines B ^a	$K_a (M^{-1}) \times 10^{-8}$				
	IgG	Fc	Fab	K(Fc)/K(IgG)	K(Fab)/K(Fc)
1	2,1 (2,1)	1,4 (1,4)	<0,09 (<0,09)	0,67	<0,06
2	26 (52)	17 (34)	6,5 (13)	0,65	0,38
3	280 (840)	60 (180)	33 (100)	0,21	0,56

Tableau 1 : Constantes d'association des domaines B pour IgG, Fc et Fab (d'après FAHNESTOCK et coll., 1990).

a. Les différents domaines B recombinants sont 1 : B1-Pro-C, 2 : B1B2-ProC et 3 B1B2B3-Pro-C. 1, 2 et 3 ont été produit dans *E. coli* par l'expression du gène GX 7809 pour 1 et 2 et du gène GX 7805 pour 3. Les constantes d'association ont été déterminées en mesurant la liaison de la protéine G couplée à la peroxydase avec respectivement des IgG ou des fragments Fc ou Fab humains (Figure 1). Les valeurs entre parenthèses expriment la constante d'association en litres.mol⁻¹ de protéine, les valeurs qui ne sont pas entre parenthèses indiquant la constante d'association moyenne par domaine.

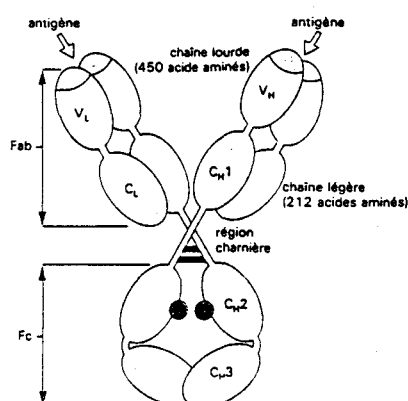


Figure 1 : Structure d'une IgG

A la vue des valeurs indiquées dans le tableau 1, on peut constater, pour la liaison aux IgG, un gain en affinité de l'ordre d'un facteur dix quand on passe de un à deux domaines et de même quand on passe de deux à trois domaines B. Cela indique un phénomène de coopérativité entre les domaines B (FAHNESTOCK et coll., 1990).

D'autre part, ERNTELL et coll. (1988) ont montré que les deux fragments Fc et Fab humains peuvent se lier à la protéine G mais sur deux sites différents, le site Fab étant vraisemblablement situé du côté N-terminal du domaine B1. Le tableau 1 indique que la protéine recombinante de structure B1B2-Pro-C lie les segments Fc et Fab avec une affinité du même ordre. Donc les deux sites semblent contenus dans les séquences B répétées. Cependant, une séquence contenant un seul domaine B, B1-Pro-C ou B2-Pro-C (non indiquée dans le Tableau 1), ne lie pas le fragment Fab ou trop faiblement par rapport au Fc pour que la liaison soit détectable. La liaison au Fab semble donc requérir une plus grande coopérativité entre les deux domaines B que ne le nécessite la liaison au Fc. ERNTELL et coll. (1988) émettent ainsi deux hypothèses :

- 1 - les sites de liaison au Fab impliqueraient des régions complémentaires dans chaque domaine B, alors que le site de liaison au Fc ne serait contenu que dans un seul domaine;
- 2 - le site de liaison au Fab pourrait inclure la séquence b (Schéma 1) qui n'est pas intacte dans chacun des domaines B isolés.

L'affinité du fragment Fc est dépendante du nombre de domaines B. Il en est de même pour l'affinité des IgG et elle croît d'un ordre de grandeur par domaine B supplémentaire. L'affinité est également dépendante de l'espèce dont les IgG sont issues, comme cela sera précisé dans le paragraphe 2.4.

2. Le domaine B1 de la protéine G (B1G)

2.1. Présentation

Le domaine B1, constitué de 55 résidus, se lie à la région Fc des IgG et à l' α 2-macroglobuline, inhibiteur de protéase du plasma humain (SJÖBRING et coll., 1989b).

B1G est une protéine de petite taille (55 résidus) et est dépourvu de ponts disulfure (Schéma 2). Malgré cela, la propriété remarquable de ce domaine est sa grande stabilité : thermique, d'une part, avec une température élevée de dénaturation (87°C à pH 5,4) (ALEXANDER et coll., 1992), et physico-chimique d'autre part, face à la dénaturation dans l'urée par exemple (GRONENBORN et coll., 1991). GRONENBORN et coll. indiquent que la dénaturation thermique est réversible et que la protéine conserve sa structure native même dans l'urée 8 M lors des expériences de migration sur gel d'électrophorèse avec gradient d'urée.

Les raisons de cette grande stabilité reposent sur un réseau intense de liaisons hydrogène et la présence d'un cœur hydrophobe que nous détaillerons dans le prochain paragraphe.

2.2. Synthèse

La synthèse de BIG a été effectuée au laboratoire selon une stratégie Boc/benzyle sur synthétiseur automatique. L'incorporation dans BIG d'acides aminés enrichis en ^{15}N , a nécessité l'optimisation du protocole de synthèse (BOUTILLON et coll., 1995) et nous avons utilisé celui-ci pour la synthèse de BIG-DBF.

2.3. Structure tridimensionnelle

La détermination des éléments de structure secondaire montre une forte implication des résidus de la protéine (près de 95%) dans les structures secondaires (Schéma 2) donnant lieu à un grand nombre de liaisons hydrogène.



Schéma 2 : Structures primaire et secondaire de BIG.

La structure tridimensionnelle de BIG a été déterminée par RMN par GRONENBORN et coll. (1991) et confirmée par radiocristallographie par GALLAGHER et coll. (1994). Elle comprend (Figure 2) :

- un feuillet β à 4 brins constitué de deux feuillets β antiparallèles impliquant :

- les brins $\beta 1$ (résidus 1 à 8) et $\beta 2$ (résidus 13 à 20);
- les brins $\beta 3$ (résidus 42 à 47) et $\beta 4$ (résidus 50 à 56);

- une hélice α (résidus 22 à 37), les 5 derniers résidus étant en conformation hélice 3_{10} , caractérisés par deux liaisons hydrogène $\text{CO}(i)\text{-NH}(i+3)$. L'hélice α et les brins $\beta 2$ et $\beta 3$ croisent le feuillet diagonalement avec un angle de 140° par rapport aux axes de $\beta 2$ et $\beta 3$.

D'autre part, les brins centraux $\beta 1$ et $\beta 4$ sont parallèles. Les brins $\beta 1$ et $\beta 2$ sont connectés par un coude β de type I (résidus 9 à 12) et les brins $\beta 3$ et $\beta 4$ par un tournant inhabituel de 6 résidus (résidus 46-51).

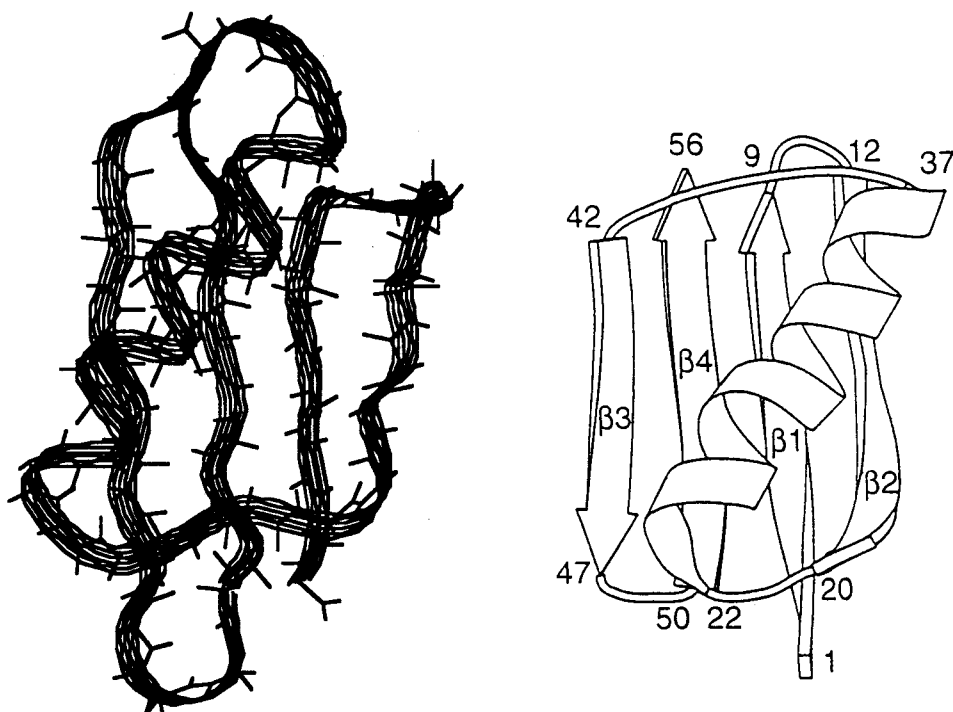


Figure 2 : Structure tridimensionnelle de B1G (d'après FRANK et coll., 1995).

L'intérieur de la molécule est très hydrophobe, comme nous le verrons plus loin, alors que l'extérieur est très hydrophile (avec Lys, Glu, Asp, Thr essentiellement), ce qui lui confère une énergie de solvatation très négative de l'ordre de $-55 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (GRONENBORN et coll., 1991). L'hélice α , qui est amphiphile, interagit étroitement par sa face hydrophobe avec le feuillet β et ceci grâce à des interactions hydrophobes entre des résidus aromatiques de l'hélice et du feuillet. Ceux-ci sont approximativement positionnés perpendiculairement les uns par rapport aux autres et interagissent de la façon suivante : Leu 5 avec Phe 30, Trp 43 et Phe 52; Leu 7 avec Trp 43 et Tyr 33; Leu 12 avec Val 39 et Trp 43.

La stabilité remarquable de B1G repose donc en grande partie sur une présence importante des éléments de structure secondaire impliquant un réseau dense de liaisons hydrogène. De plus, des résidus aromatiques forment un cœur hydrophobe participant à la stabilisation globale. GRONENBORN et coll. voient aussi dans ce motif structural, à savoir une topologie de type $-1, +3x, -1$ pour le feuillet β (SCHULTZ et SCHIRMER, 1979), une source de stabilisation. En effet, les brins N- et C-terminaux, au niveau desquels pourrait s'initier le dépliement, sont les brins centraux $\beta 1$ et $\beta 4$ du feuillet β , et le dépliement devrait *a priori* s'effectuer par rupture des liaisons hydrogène entre ces brins. Or, ceux-ci participent au réseau de liaisons hydrogène, mais aussi aux interactions hydrophobes avec des résidus de l'hélice. Les auteurs pensent donc que le dépliement se fait probablement de manière coopérative, impliquant simultanément les différentes parties de la molécule.

Il est intéressant de noter l'existence d'autres protéines présentant le même type de repliement que B1G. Un autre domaine de liaison aux IgG de la protéine G, le domaine B2 (schéma 1) diffère de B1G par la mutation de 6 résidus. Sa structure secondaire a été déterminée par ^1H RMN (ORBAN et coll., 1992) et sa structure tertiaire par radiocristallographie (ACHARI et coll., 1992). Le domaine B2 présente la même organisation structurale que B1G avec un léger déplacement de l'hélice par rapport au feuillet.

De façon plus surprenante, le domaine B1 de la protéine L (B1L) de *Peptostreptococcus magnus* (Figure 3), qui n'a pas d'homologie de séquence notable avec la protéine G (16%) adopte le même repliement (RAMIREZ-ALVARADO et coll., 1997). B1L se lie aux immunoglobulines L (BJÖRK, 1988).

L'ubiquitine (Figure 3), qui avec seulement 12% d'homologie de séquence avec B1G, présente également le même type de repliement avec en plus la présence d'un brin supplémentaire (KRAULIS, 1991). D'autre part, l'ubiquitine possède une fonction différente de celle des protéines précédemment mentionnées puisqu'elle intervient dans les mécanismes de dégradation des protéines.

Le motif de repliement de B1G peut donc être partagé avec des protéines possédant une autre fonction (exemple de l'ubiquitine). Il est difficile d'y reconnaître une évolution à partir d'un ancêtre commun mais plutôt de voir ce motif comme une unité de repliement énergétiquement favorable. D'autre part, la fonction de reconnaissance des IgG n'est pas seulement supportée par ce motif puisque la protéine A de *Staphylococcus aureus*, qui se lie également aux IgG (STONE et coll., 1989) possède un motif de repliement totalement différent en étant constitué de trois hélices (GOUDA et coll., 1992).

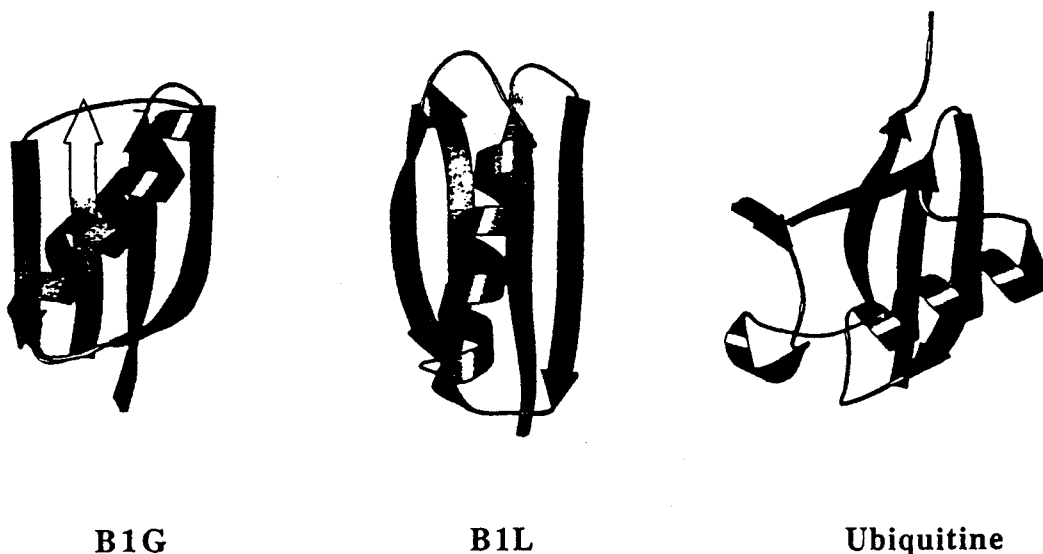


Figure 3 : Représentation en ruban de B1G, du domaine B1 de la protéine L (B1L) et de l'ubiquitine (d'après RAMIREZ-ALVARADO et coll., 1997).

2.4. Interaction avec les IgG

D'après les études menées par différents groupes, les domaines de liaison aux IgG de la protéine G se lient de façon optimale, suivant les espèces, avec le fragment Fc dans le cas par exemple des IgG humaines (SJÖBRING et coll., 1991), ou avec le fragment Fab dans le cas des IgG de souris (LIAN et coll., 1994). Dans les deux cas, des études par RMN et radiocristallographie ont été effectuées pour identifier les zones d'interaction sur B1G ou sur un autre domaine de liaison aux IgG (troisième domaine) de la protéine G (obtenu à partir d'un autre gène, sa séquence correspondant à celle du domaine B2 avec une extension N-terminale de 5 acides aminés (LIAN et coll., 1992)). Les zones d'interaction, au niveau du domaine de liaison aux IgG, avec le fragment Fc ou le fragment Fab sont différentes.

- Interaction avec le fragment Fc

L'étude a été menée par RMN à l'aide d'une spectroscopie de corrélation ^1H - ^{15}N (GRONENBORN et CLORE, 1993). Dans le cas du complexe B1G/Fc, les changements des déplacements chimiques de certains protons de B1G sont dus, soit à une interaction directe entre les deux protéines, soit à un changement conformationnel suite à la complexation. Cependant, un peptide de 11 résidus (résidus 35 à 45 de B1G) correspondant à la fin de l'hélice et au début du brin $\beta 3$, inhibe la fixation du fragment Fc (FRICKE et coll. 1992). La séquence de ce peptide se situe dans la zone de changement des déplacements chimiques observée (Figure 4 A). Le site majeur d'interaction se situerait donc au niveau de l'hélice α et du brin $\beta 3$.

Des expériences d'échange hydrogène/deutérium sur le domaine B2 de la protéine G, analogue à B1G (Schéma 1), libre et complexé avec une IgG humaine confirment cette zone d'interaction (ORBAN et coll., 1994).

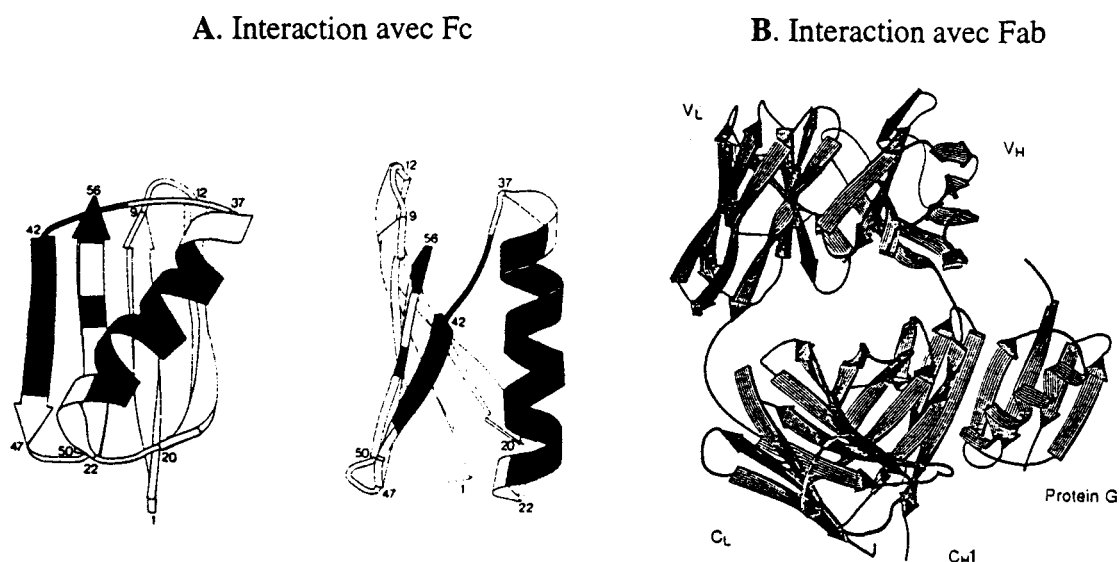


Figure 4 : **A.** Interaction de BIG avec le fragment Fc humain : les zones apparaissant en noir correspondent aux résidus dont les déplacements chimiques des protons NH subissent un changement dans le complexe par rapport au domaine libre (d'après GRONENBORN et CLORE, 1993). **B.** Structure cristalline du complexe formé entre le fragment Fab (IgG de souris) et le troisième domaine de la protéine G (d'après DERRICK et WIGLEY (1992b)).

- Interaction avec le fragment Fab

La structure cristalline d'un domaine B de la protéine G (troisième domaine) avec le fragment Fab d'une IgG de souris (figure 4 B) présente une interaction entre le brin $\beta 2$ (résidus 18 à 20) du domaine de la protéine G et le dernier brin β de CH1 (chaîne lourde de la partie constante de l'IgG (Figure 1). L'interaction s'établit par la formation d'un feuillet β antiparallèle. Un autre petit site d'interaction se situe du côté C-terminal de l'hélice α du domaine B et sur le premier brin β de CH1 (DERRICK et WIGLEY, 1992b).

Ces résultats ont été remis en cause selon l'argument d'interactions artéfactuelles entre le domaine de la protéine G et le fragment Fab. Ces interactions seraient liées à l'empilement des molécules dans le cristal (GRONENBORN et CLORE, 1993). Mais les études menées cette fois en RMN (corrélation ^1H - ^{15}N et ^1H - ^{13}C par LIAN et coll. (1994) confirment le site d'interaction initialement décrit. Les auteurs précisent par ailleurs que les résidus dont les déplacements chimiques des protons sont les plus affectés par la complexation, sont regroupés essentiellement en deux régions : (i) le coude entre les brins $\beta 1$ et $\beta 2$ et les deux-tiers du brin $\beta 2$ (Gly 14 à Thr 22 du troisième domaine de la protéine G) ainsi que Ile 12 et Glu 24; (ii) la boucle flexible suivant l'hélice (Asp 41 à Gly 43 et Asp 45) et les deux résidus Trp 48 et 58. Les résultats observés sont compatibles avec la structure cristalline obtenue et décrite précédemment.

Les domaines de liaison aux IgG de la protéine G semblent donc interagir par des sites différents avec les fragments Fc et Fab. Il faut cependant être attentif au fait que ces études ont été faites sur deux domaines de liaison aux IgG de la protéine G différents, bien qu'homologues, et avec des fragments Fc et Fab provenant respectivement d'immunoglobulines humaines ou de souris. La comparaison trouve peut être là ses limites.

2.5. B1G : un modèle d'étude

B1G qui ne possède pas de ponts disulfure ni de résidus Pro ou de groupes prosthétiques, sources de complications pour l'étude du repliement, est ainsi souvent décrit comme une protéine « prototype ». De nombreuses publications font état des études menées par des analyses thermodynamiques (ALEXANDER et coll., 1992a; ORBAN et coll., 1995) et cinétiques de son repliement (ALEXANDER et coll., 1992b; KUSZEWSKI et coll., 1994), mais également des études de la dénaturation (FRANK et coll., 1995), de la dynamique du squelette peptidique (BARCHI et coll., 1994) et de l'importance des interactions non locales intervenant dans le repliement (MINOR et KIM, 1994, 1996; SMITH et coll., 1994, 1995).

Au niveau structural, B1G a été utilisé pour mesurer la tendance des acides aminés à adopter une structure en feuillet β . Deux équipes différentes ont muté un acide aminé du feuillet β , en position centrale (Thr 53 dans le brin $\beta 4$; SMITH et coll., 1994) ou en position latérale du feuillet (Trp 43 du brin $\beta 3$, MINOR et KIM, 1994) avec les 19 autres acides aminés. La mesure de la stabilité de chaque protéine mutée a été déterminée par dénaturation thermique suivie en dichroïsme circulaire. Les auteurs en ont ainsi déduit, par le calcul de $\Delta\Delta G$, qui est la différence d'énergie libre entre l'acide aminé étudié et le résidu Ala pris comme référence, la tendance des acides aminés à former un feuillet β . Les résultats font apparaître dans les deux cas, d'une part, qu'il n'y a pas de corrélation apparente avec la liste de fréquence des acides aminés dans les feuillets β établie de manière statistique par CHOU et FASMAN (1974a,b). D'autre part, la gamme des $\Delta\Delta G$ est plus réduite dans le cas d'une substitution en position latérale. Cela suggère à MINOR et KIM (1994) que parmi les deux facteurs contribuant à la formation des feuillets β à savoir (i) la capacité intrinsèque à former une structure locale étendue en feuillet β et (ii) la capacité à interagir avec le feuillet β environnant dans le contexte de la structure tertiaire, le point (i) ne semble avoir qu'une influence mineure sur la propension des acides aminés à former des feuillets β . Le contexte de structure tertiaire semble déterminant. SMITH et REGAN (1995) ajoute à cela l'importance des interactions entre les chaînes latérales pour la stabilisation du feuillet β .

La démonstration de l'importance du contexte tertiaire sur le repliement des éléments de structure secondaire a été faite de manière remarquable par MINOR et KIM (1996) dans le modèle de B1G. Ils ont en effet conçu une séquence de 11 résidus (la séquence « caméléon ») qui se

structure en hélice α quand elle remplace la séquence de l'hélice native dans B1G et en feuillet β quand elle remplace la séquence du brin β 3.

La connaissance de la capacité des acides aminés de B1G à former un feuillet β a été exploitée pour la conception d'une séquence, dérivée de B1G, mais qui se replie en un motif structural constitué de 4 hélices α correspondant au repliement de la protéine Rop (DALAL, 1997). Les résidus de B1G correspondant à l'hélice α ont été maintenus et ceux possédant de hautes propensions à la formation de feuillet β ont été retirés. Les acides aminés supposés « clé » dans la séquence de la protéine Rop pour la formation des hélices α ont été insérés. Il en résulte une séquence, conservant 50% de la séquence originale de B1G mais adoptant effectivement un repliement en 4 hélices. Il est donc possible en manipulant les séquences de manière à tenir compte des interactions locales et non locales, de concevoir une protéine avec un repliement prédéfini.

Ces travaux mettent en évidence les progrès récents accomplis dans le domaine particulier de la compréhension des facteurs intervenant dans la formation et la stabilisation des feuillets β grâce au domaine plus général de l'ingénierie des protéines. L'incorporation du mime-DBF dans B1G s'inscrit dans ce sens pour tester l'influence du mime sur la structuration de B1G.

3. Conclusion

A la vue des éléments précédemment exposés, B1G se présente comme un bon modèle d'étude car malgré une taille relativement petite il comprend les principaux éléments de structure secondaire (feuillet β , hélice α , coude β). D'autre part, l'absence de résidus Cys et Pro évite respectivement le problème de la formation des ponts disulfure et de l'isomérisation cis-trans des résidus Pro. Enfin, sa grande stabilité en fait un bon modèle pour l'étude de ses propriétés physico-chimiques et pour tester l'influence de l'incorporation d'éléments non naturels sur le repliement de la protéine. B1G a fait, d'autre part, l'objet de nombreuses études visant à déterminer les facteurs intervenant dans la stabilité ou le repliement des éléments de structure secondaire et de la structure tertiaire. Incorporer le mime-DBF dans ce modèle devrait fournir des éléments d'information venant non seulement étayer les résultats déjà établis, mais également apporter de nouvelles informations dans le domaine de l'ingénierie des protéines.

CHAPITRE II : INCORPORATION DU MIMÉ-DBF DANS LE FRAGMENT N-TERMINAL DE B1G (B1G₂₋₁₉)

Comme il a été précisé dans l'introduction, l'incorporation du mime-DBF dans le fragment N-terminal de B1G a été réalisée au laboratoire et a fait l'objet d'une publication (MELNYK et coll., 1997) présentée à la fin de cette partie. Ce travail constituait une étude préliminaire en vue de l'incorporation du mime-DBF dans le domaine B1 entier.

Le fragment N-terminal comprend les résidus 2 à 19 de B1G (B1G₂₋₁₉) et le mime-DBF remplace les deux résidus centraux du coude β c'est-à-dire Lys 10 et Thr 11 (Schéma 3).

Nous présentons ici les résultats de l'étude structurale qui a été menée par dichroïsme circulaire et RMN.

1. Résultats de l'étude de B1G₂₋₁₉

Le peptide B1G₂₋₁₉ a été étudié par BLANCO et coll. (1994) en solution aqueuse et dans un mélange H₂O/TFE (70/30). Ces auteurs ont montré, par dichroïsme circulaire et RMN, que B1G₂₋₁₉ est globalement flexible et ne présente aucun signe de structuration en feuillet β dans H₂O. Cependant, après analyse des résultats des études de dichroïsme circulaire, et RMN (déplacements chimiques et NOE), l'ajout de TFE favoriserait le repliement de B1G₂₋₁₉ en feuillets β transitoires. Dans ce cas, le coude β est décalé d'un résidu : il s'étend des résidus 8 à 11 au lieu de 9 à 12 dans B1G.

2. Résultats de l'étude de B1G₂₋₁₉-DBF

2.1. Etude par dichroïsme circulaire

Afin d'étudier la structuration du peptide modifié B1G₂₋₁₉-DBF, une étude par dichroïsme circulaire a été réalisée et les spectres sont présentés à la Figure 5.

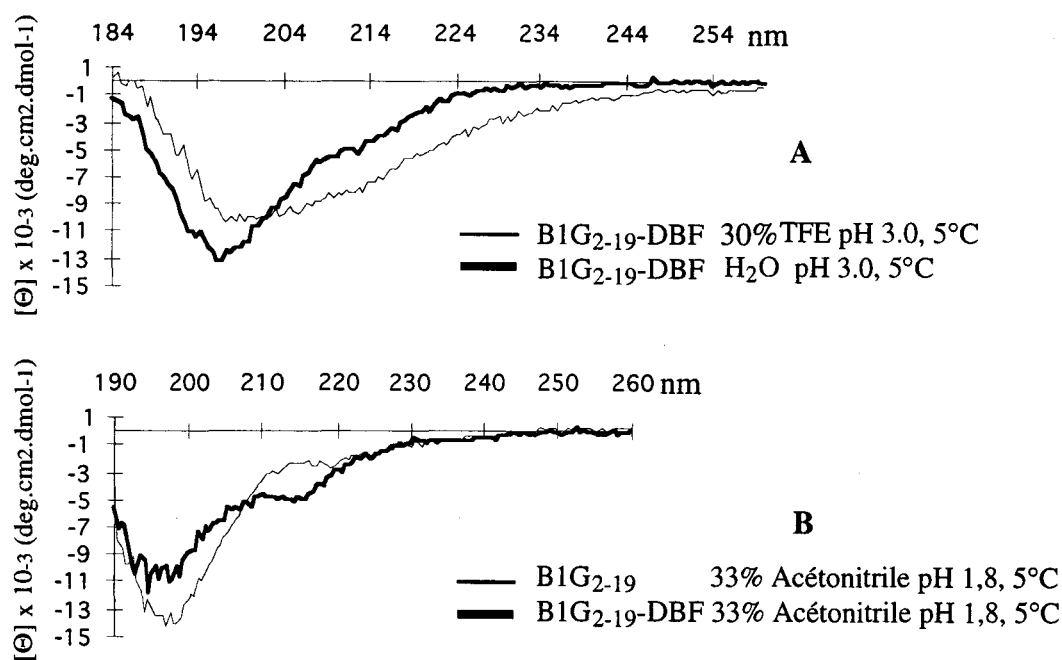


Figure 5 : Spectres de dichroïsme circulaire de B1G₂₋₁₉ et B1G₂₋₁₉-DBF (75 μM, 5°C).

D'après les premiers spectres réalisés dans H₂O à pH 3,0 et 5°C (Figure 5 A), le peptide B1G₂₋₁₉-DBF adopte essentiellement une conformation en pelote statistique. L'addition de TFE (30% final), conditions étudiées par BLANCO et coll., produit un changement dans le spectre mais le minimum caractéristique des feuillettes β et situé entre 210 et 220 nm n'apparaît pas.

L'étude menée parallèlement en RMN a décelé un problème d'agrégation pour B1G₂₋₁₉-DBF, contrairement au peptide B1G₂₋₁₉ qui reste monomérique. Or, lors de la purification de B1G₂₋₁₉-DBF par HPLC, le peptide était élué sous la forme d'un pic fin. Les conditions d'éluion (33% CH₃CN dans H₂O à pH 1,8) ont donc été utilisées pour poursuivre l'étude par dichroïsme circulaire. Dans ces conditions, le spectre de B1G₂₋₁₉-DBF présente un minimum à 215 nm contrairement à B1G₂₋₁₉ (Figure 5 B). Mais pour savoir si ce signal correspondait à une structuration en feuillet β, il était nécessaire de poursuivre l'étude par une analyse par RMN.

2.2. Etude structurale par RMN

L'analyse par RMN se base essentiellement sur la recherche de contacts NOE longue distance de type H_{αi}-H_{αj}, NH_i-NH_j, H_{αi}-NH_j, NH_i-H_{αj} ou entre protons de chaînes latérales, qui existeraient entre les deux brins d'un éventuel feuillet. Mais aucun contact de ce type n'a été observé. Il semble donc que le signal à 215 nm observé en dichroïsme circulaire pour B1G₂₋₁₉-DBF corresponde à une conformation étendue d'une partie des chaînes mais pas à une structuration en feuillet β. D'autre part, B1G₂₋₁₉-DBF ne semble pas monomérique si l'on se

base sur les expériences d'échange H/D qui montrent qu'après 15 h les protons amides de Lys 4 et Leu 7 ne sont pas totalement échangés.

Cependant, l'étude des contacts NOE dans l'environnement du mime-DBF révèle une interaction probablement transitoire entre le proton aromatique H3 et le méthyle de Leu 5 et/ou Leu 7 (Schéma 3). Les protons de la chaîne latérale de Leu 12 produisent également des contacts NOE forts avec H8, les protons δ de Leu 12 sont d'ailleurs fortement déplacés vers les champs forts. Ces observations sont compatibles avec une interaction hydrophobe entre Leu 12 et la partie aromatique du mime-DBF et l'on retrouve ici les observations faites par KELLY et coll. (1994) sur la formation d'un complexe hydrophobe entre la partie aromatique du mime et les chaînes latérales de résidus hydrophobes adjacents au mime.

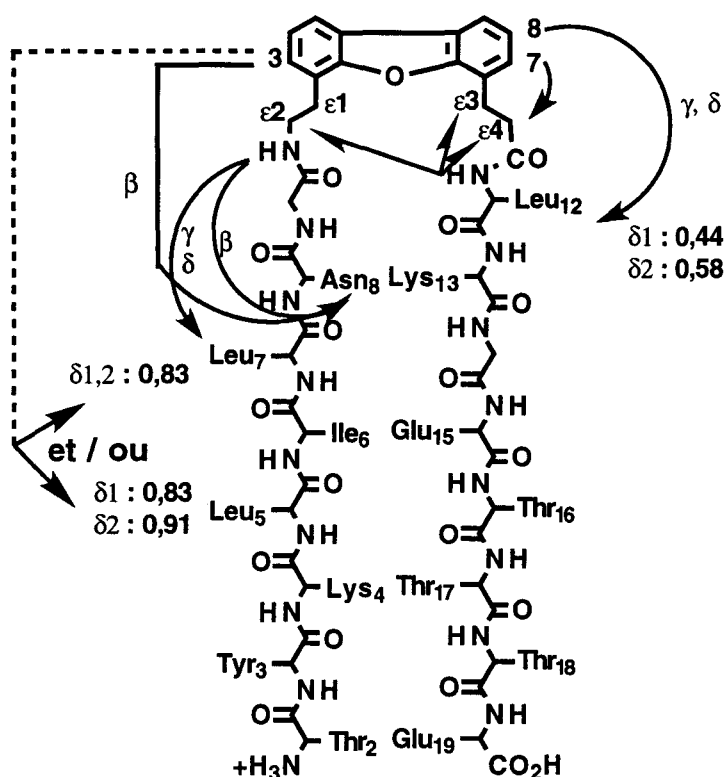


Schéma 3 : Représentation de BIG₂₋₁₉-DBF avec les contacts NOE observés entre le mime et les chaînes latérales de certains résidus.

3. Conclusion

En conclusion, le peptide BIG₂₋₁₉-DBF en solution n'est pas structuré en feuillet β . La présence de Gly 9, en position adjacente au mime, à la place d'un résidu hydrophobe nous éloigne des conditions requises par KELLY pour la formation d'un complexe hydrophobe, entre la partie aromatique dibenzofurane et les chaînes latérales hydrophobes, permettant la nucléation

en feuillet β . Au lieu de cela, le mime est en interaction avec Leu 7 et/ou Leu 5 ce qui est une situation défavorable pour la formation d'un feuillet β . Les conditions de KELLY sont en cela vérifiées.

Dans le contexte du domaine B1G entier, les résidus Leu 5 et Leu 7 sont enfouis dans le cœur hydrophobe de B1G (GRONENBORN et coll., 1991). Il sera donc intéressant de voir comment le mime se comportera et comment il sera toléré dans B1G.

CHAPITRE III : INCORPORATION DU MIME-DBF DANS B1G

1. Synthèse de B1G-DBF

1.1. Introduction

Nous avons adopté la numérotation utilisée par GRONENBORN et coll. (1991) mais nous n'avons pas incorporé à la séquence le résidu Met 1 qui provient du mode d'obtention du domaine B1 recombinant (Schéma 4). Le mime-DBF va remplacer les deux résidus centraux du coude β c'est-à-dire Lys 10 Thr 11.

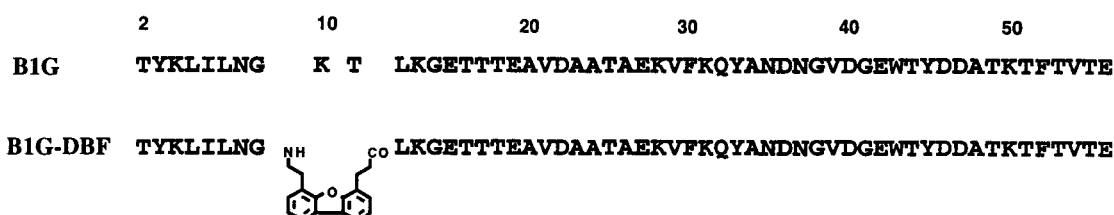


Schéma 4

1.2. Déroulement de la synthèse

Comme nous l'avons indiqué précédemment, le peptide B1G-DBF a été synthétisé selon une stratégie Boc/benzyle, en utilisant les agents de couplage HBTU/HOBt, selon un protocole optimisé (BOUTILLON et coll., 1995). La seule modification apportée est la suppression de l'étape de neutralisation entre la déprotection et le couplage. La neutralisation s'effectue ici *in situ* lorsque l'on introduit le mélange de couplage sur la résine portant le peptide en cours d'élongation.

La première partie de la synthèse (Glu 56 à Leu 12) a été réalisée sur un synthétiseur automatique. Des triples couplages ont été effectués à différentes étapes de la synthèse, déterminées comme critiques lors de synthèses précédentes. Juste avant l'incorporation du mime-DBF, au niveau de Leu 12, une analyse de la peptidyl-résine par analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale, a permis d'estimer qu'environ 62% des chaînes portaient la séquence complète. Cela était meilleur que la valeur observée à ce niveau (environ 50%) pour la synthèse précédemment mentionnée utilisant le même protocole de couplage mais avec une étape de neutralisation. L'explication de ce meilleur résultat repose probablement sur le fait que la résine est mieux gonflée quand elle n'a pas été neutralisée à l'issue de l'étape de déprotection au

TFA. L'accès à la fonction amine vis-à-vis des acides aminés activés serait donc facilité dans le cas de la neutralisation *in situ*.

Le couplage du mime-DBF a été effectué manuellement, la réaction de couplage ayant été répétée trois fois en HBTU/HOBt. La suite de la synthèse a été poursuivie manuellement. Les acides aminés ont été couplés deux fois avec HBTU/HOBt puis une troisième fois avec le BOP. Après incorporation du mime, la déprotection de la fonction amine a été réalisée systématiquement en présence de thioanisole et de dibenzofurane pour éviter une réaction d'alkylation par les cations *t*-butyles. Les étapes de couplage ont été suivies par le test de Kaiser. Le rendement cumulé à l'issue de la synthèse est estimé à 30%, ce qui est inférieur à ce qui était obtenu dans la synthèse de B1G non modifié (36%), et ce, malgré un triple couplage systématique après l'incorporation du mime. Cela montre donc une certaine influence du mime sur l'efficacité des couplages.

1.3. Clivage de la liaison peptide-résine et déprotection finale

L'étape de clivage et de déprotection finale a été effectuée par un traitement à l'acide fluorhydrique en présence des *scavengers* habituels et de dibenzofurane. Après coupure et précipitation dans l'éther, le peptide a été solubilisé, avec quelques difficultés, dans une solution de chlorure de guanidinium 6M pour minimiser la formation d'agrégats qui auraient pu empêcher un repliement correct de la protéine.

1.4. Conclusion

Malgré une taille plus importante, la synthèse de B1G a posé globalement moins de problèmes que la synthèse de la scyllatoxine-DBF, et ce, probablement parce que le coude β se situant côté N-terminal dans la séquence de B1G, le mime-DBF a été introduit à la fin de la synthèse. Ceci était différent pour la scyllatoxine où le coude β se situe côté C-terminal.

Cependant, il semble que, dans le cas de la synthèse de B1G-DBF, les couplages suivant l'incorporation du mime aient été plus difficiles que pour la partie correspondante dans B1G. Ils semblent avoir toutefois présenté moins de difficultés que lors de la synthèse de la scyllatoxine-DBF. La comparaison est cependant difficile, étant donné que les deux protéines modifiées ont été synthétisées selon deux stratégies différentes : la scyllatoxine-DBF en stratégie Fmoc et B1G-DBF en stratégie Boc. Mais cela peut justement expliquer cette différence. En effet, comme cela a été mentionné plus haut, l'étape de déprotection de la fonction amine nécessite, en stratégie Boc, un traitement avec une solution de TFA, ce qui a pour effet de gonfler considérablement la peptidyl-résine. L'efficacité des couplages peut ainsi être augmentée en rendant les fonctions amines plus accessibles aux réactifs.

2. Repliement et purification de B1G-DBF

Le brut de coupure en solution Gnd.HCl 6 M a été analysé par HPLC. Le profil présente un pic fin, dont la masse, mesurée par ES-MS, correspond à celle de B1G-DBF. Le pic se dégage d'un massif correspondant vraisemblablement à l'agrégation de peptides tronqués (Figure 6). A ce stade, la protéine semblait déjà repliée. La dialyse lente de cette solution contre H₂O n'a pas permis de modifier le profil HPLC. La purification s'est faite en plusieurs étapes : deux purifications successives par HPLC préparatives (colonnes CN et C18) puis une chromatographie par échange d'ions. 5 mg de produit pur ont été obtenus après déssalage ce qui correspond à un rendement global estimé à 0,7%.

On remarque ici, en comparaison avec l'étape de repliement oxydatif de la scyllatoxine-DBF, l'avantage de l'absence de pont disulfure, puisque la protéine se replie spontanément dès qu'elle est placée dans un milieu aqueux.

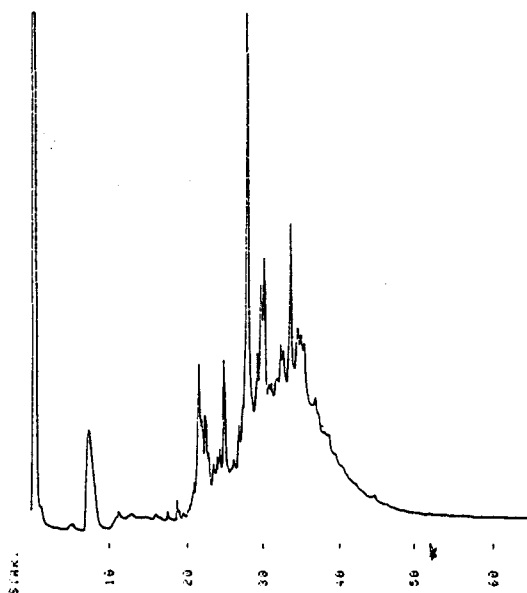


Figure 6 : Profil HPLC du peptide brut B1G-DBF. Colonne C18 Vydac, gradient : 0 à 100% B (B = CH₃CN/H₂O (8/2) 0,05% TFA), débit : 1 ml/min

3. Conclusion

Dans le cas de B1G-DBF, l'influence de la présence du mime-DBF est apparue à deux niveaux : au moment de la synthèse, avec des couplages plus difficiles, et de la purification, avec des problèmes d'agrégation.

L'hydrophobie du mime aurait pu se révéler être plus gênante pour le repliement de B1G-DBF, en perturbant les interactions hydrophobes qui interviennent dans les mécanismes de repliement. Nous avons cependant obtenu un produit qui se présente en HPLC sous la forme d'un pic fin, indiquant une structure *a priori* bien définie, qui a été étudiée par RMN.

CHAPITRE IV : ÉTUDE STRUCTURALE DE B1G-DBF

1. Introduction

Les résultats de l'étude structurale sur B1G-DBF réalisée au laboratoire ont été obtenus dans le cadre d'une collaboration avec Benoît ODAERT. L'étude a été faite par RMN et l'influence de la présence du mime-DBF sur la structure tridimensionnelle de la protéine modifiée est évaluée par comparaison avec la structure de B1G (GRONENBORN et coll., 1991).

2. Résultats de l'étude structurale

2.1. Comparaison des déplacements chimiques

Les déplacements chimiques des protons étant très sensibles à leur environnement spatial, ils ont constitué le premier critère d'étude de la structure de B1G-DBF pour mettre en évidence des différences structurales par rapport à B1G. La Figure 7 présente les différences, entre B1G et B1G-DBF, des déplacements chimiques des protons du squelette peptidique (figure 7 A) et des chaînes latérales (Figure 7 B). Il apparaît que les déplacements chimiques ne varient pas de plus de 0,1 ppm, ce qui indique une structure tridimensionnelle globalement conservée. On observe cependant des différences plus marquées pour les protons dans l'environnement proche du mime-DBF et dans la partie C-terminale, région spatialement proche du coude β dans B1G. Ces protons sont probablement influencés par les propriétés magnétiques spécifiques de la partie aromatique du mime.

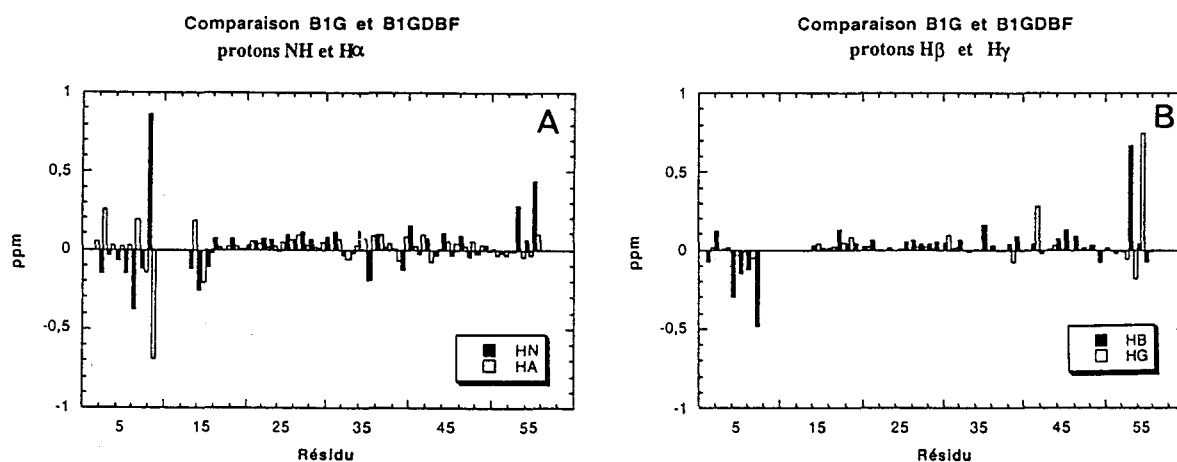


Figure 7 : Différences des déplacements chimiques observées au niveau des protons du squelette (NH et H α) (A) et des chaînes latérales (H β , H γ) (B) entre B1G (25°C, pH 4,2) et B1G-DBF (25°C, pH 3,3). Les valeurs manquantes correspondent aux résidus n'ayant pas pu être attribués (Leu 12 et Lys 13).

2.1. Etude des contacts NOE

L'étude des contacts NOE permet de reconstituer les éléments de structure secondaire et les contacts tertiaires existant entre eux. Le résumé des contacts NOE observés dans B1G-DBF est présenté au Schéma 5. On y retrouve les caractéristiques classiques des éléments de structure secondaire :

- contacts NOE forts de type $\alpha N(i, i+1)$ entre les résidus Thr 2 à Leu 7; Glu 15 à Ala 20; Val 39 à Asp 47; Thr 51 à Thr 55, séquence correspondant aux brins β dans B1G;
- contacts NOE de type $NN(i, i+1)$ entre les résidus Val 21 à Gly 38, et des contacts $\alpha\beta(i, i+3)$ de moyenne intensité et $\alpha N(i, i+3)$ de faible intensité. Ces contacts séquentiels et de moyenne portée caractérisent l'hélice α .

Ces éléments sont donc compatibles avec la présence des éléments de structure secondaire (hélice α et feuillet β) que l'on rencontre dans B1G.

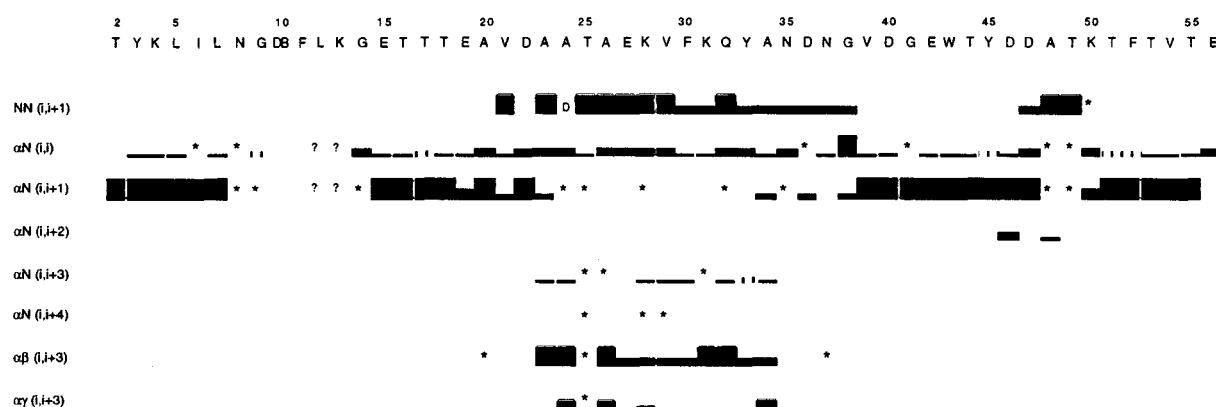


Schéma 5 : Résumé des contacts NOE observés pour B1G-DBF. L'épaisseur du trait est proportionnelle à l'intensité des contacts et les recouvrements sont indiqués par * et par D dans le cas de recouvrement avec la diagonale.

Une étude plus précise des contacts NOE présents dans la séquence correspondant au feuillet de B1G a permis de confirmer que cette région est structurée en feuillet β dans B1G-DBF (Schéma 6). En effet, on y observe par exemple des contacts $\alpha\alpha(i, j)$: $\alpha\alpha(47, 50)$, $\alpha\alpha(41, 56)$ pour les brins anti-parallèles β_3 et β_4 , des contacts $\alpha N(i, j)$: $\alpha N(51, 4)$ pour les brins parallèles β_4 et β_1 , et ce, en plus des contacts séquentiels $\alpha N(i, i+1)$ mentionnés avant.

Une autre caractéristique de B1G est l'existence d'un cœur hydrophobe qui implique les résidus suivants : Leu 5 avec Phe 30, Trp 43 et Phe 52; Leu 7 avec Trp 43 et Tyr 33; Leu 12 avec Val 39 et Trp 43. On retrouve dans B1G-DBF le même réseau de contacts NOE montrant que l'insertion du mime-DBF n'a apparemment pas influencé la structure du cœur hydrophobe.

Enfin, l'intégrité des liaisons hydrogène, autre facteur important intervenant dans la stabilité de B1G, a été vérifiée par une expérience d'échange H/D. Les protons subissant un échange lent sont indiqués au Schéma 6, et ce résultat est en accord avec ce qui avait été observé pour B1G.

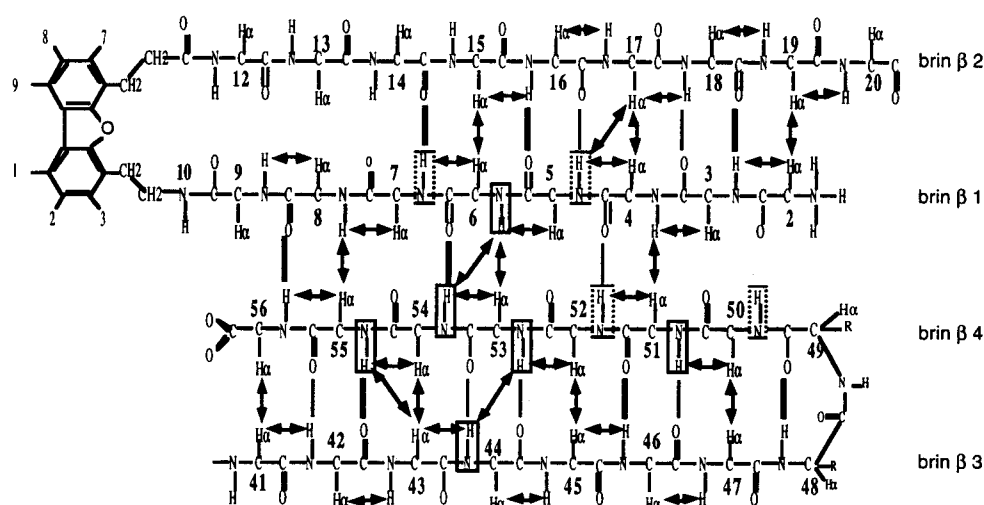


Schéma 6 : Représentation schématique des contacts NOE observés au niveau du feuillet β , indiqués par les flèches. Les protons amides encadrés par un trait plein correspondent aux protons s'échangeant moins rapidement lors de l'expérience d'échange H/D (observés après 37 h d'échange) que ceux encadrés par un trait pointillé.

Les différents points mentionnés précédemment font donc état d'une conservation globale de la structure de B1G-DBF par rapport à B1G.

Mais ce qui nous intéressait plus particulièrement ici était la structuration de la séquence correspondant au premier feuillet β dans B1G (résidus 2-19), sachant, comme on l'a vu dans le Chapitre II, que B1G₂₋₁₉-DBF ne se structure pas en feuillet β en solution. Pour cela, outre les contacts caractéristiques $\alpha N(i, i+1)$ observés dans cette région et compatibles avec une structure étendue, la présence de contacts $\alpha\alpha(i, j)$ et $\alpha N(i, j)$ détermine la structuration en feuillet β en montrant la proximité spatiale des deux brins. De tels contacts ont effectivement été observés et sont par exemple : $\alpha\alpha(2, 19)$, $\alpha\alpha(4, 17)$, $N\alpha(5, 17)$, $\alpha\alpha(6, 15)$ (Schéma 6). Des contacts de ce

type n'ont pas été observés à proximité du mime, l'existence d'un contact entre $\alpha 8$ et $\alpha 13$ ne pouvant pas être affirmée sans ambiguïté, à cause des largeurs de raie importantes à ce niveau. Il y a donc bien formation du feuillet β , correspondant à la séquence 2-19, même si les résidus proches du mime ne semblent pas participer à la structuration du feuillet.

L'absence de contacts NOE entre les deux brins du feuillet à proximité du mime (Asn 8-Gly 10 et Leu 12-Gly 15) ainsi que les largeurs de raies importantes vont dans le sens d'une flexibilité de la chaîne peptidique à ce niveau. Si l'on se réfère aux travaux de Kelly (présentés en Introduction Générale) la présence de résidus hydrophobes en position adjacente au mime permet la formation d'un complexe hydrophobe entre les chaînes latérales des résidus adjacents et la partie aromatique du mime, ce qui est nécessaire à l'établissement du feuillet β (KELLY et coll., 1994). Nous ne sommes pas ici dans les conditions favorables décrites par Kelly puisque le résidu Gly 9 n'a pas de caractère hydrophobe. Malgré la présence de Leu 12, le complexe hydrophobe ne semble pas se former d'où la flexibilité observée. Ce qui est remarquable ici est la formation du feuillet β malgré le manque de structuration locale autour du mime-DBF.

Avec les éléments dont nous disposons c'est-à-dire une conservation globale de la structure, un modèle pour B1G-DBF, présenté à la figure 8, est proposé.

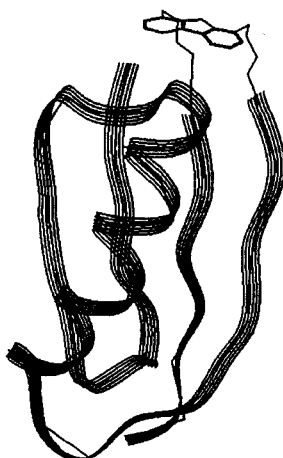


Figure 8 : Modèle de B1G-DBF obtenu après minimisation locale autour du mime-DBF.

3. Conclusion

La structure globale de B1G-DBF est conservée, le mime est donc toléré dans ce modèle. D'autre part, nous avons vu, dans le Chapitre II, que le peptide B1G-DBF₂₋₁₉, ne se structurait pas en feuillet. Or ici, le feuillet comprenant les brins $\beta 1$ et $\beta 2$ est présent dans B1G-DBF. Les résidus Leu 5 et Leu 7, qui interagissaient avec le mime-DBF dans B1G₂₋₁₉-DBF, sont dans B1G-DBF normalement impliqués dans le feuillet et n'interagissent pas avec le mime.

L'environnement protéique a donc fourni un ensemble de conditions favorables et suffisamment stabilisantes pour permettre la structuration des brins β_1 et β_2 en feuillet β . On voit donc là confirmé l'importance des interactions non locales et du contexte dans la formation des feuillets β . On rejoint en cela les travaux de MINOR et KIM (1994, 1996) qui, sur B1G, avaient montré que la formation des feuillets β étaient déterminée en grande partie par le contexte de structure tertiaire, plus que par des préférences intrinsèques des éléments de structures secondaires.

CHAPITRE V : ETUDE DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE

1. Principe du test ELISA

Lors de la synthèse de B1G un test fonctionnel, basé sur le principe des tests ELISA, a été mis au point au laboratoire pour mesurer la liaison aux IgG (BOUTILLON et coll., 1995). Il consiste à mesurer la capacité d'inhibition de la liaison d'IgG marquées à la peroxydase, à la protéine G recombinante fixée sur les plaques de microtitration, par les protéines testées. Nous avons repris le même test pour l'évaluation fonctionnelle de B1G-DBF, qui a été effectuée au laboratoire en collaboration avec Christophe BOUTILLON.

Au niveau expérimental, le test consiste dans un premier temps à fixer, dans les puits d'une plaque de microtitration, la protéine G recombinante (correspondant aux domaines B1 et B2). Les puits sont ensuite saturés par un tampon contenant de la caséine. En parallèle, des IgG de chèvre couplées à la peroxydase sont incubées avec différentes dilutions de chaque protéine à tester (B1G-DBF, B1G, protéine G recombinante et BSA (témoin négatif)) en présence de caséine. Les différentes solutions sont ensuite réparties dans les puits et incubées. Après lavage des puits, la fixation des IgG sur la protéine G est révélée par l'addition de dihydrochlorure d'*o*-phénylènediamine, substrat de la peroxydase. La mesure de l'absorbance à 492 nm permet de calculer la concentration en protéine testée nécessaire pour inhiber 50% de la fixation des IgG à la protéine G recombinante (IC_{50}).

2. Résultats

Les résultats sont présentés dans le tableau 2.

Protéines	IC_{50} (mol.l ⁻¹)
Protéine G recombinante (B1-B2)	$2,6 \cdot 10^{-8}$
B1G synthétique	$1,8 \cdot 10^{-6}$
B1G-DBF	$> 10^{-3}$
BSA	$> 10^{-3}$

Tableau 2 : Résultats des tests ELISA sur la protéine G recombinante comprenant les domaines B1-B2, B1G obtenu par synthèse chimique, B1G-DBF et la BSA (témoin négatif).

Aucune inhibition de la fixation des IgG sur la protéine G recombinante n'est observée dans le cas de B1G et de la BSA, alors que l'on observe une IC_{50} de $2,6 \cdot 10^{-8}$ mol.l⁻¹ et $1,8 \cdot 10^{-8}$ mol.l⁻¹ pour la protéine G recombinante et B1G respectivement.

Dans les conditions du test, B1G-DBF ne reconnaît donc pas les IgG.

* Nous pouvons émettre plusieurs hypothèses face à ce résultat :

- l'interaction de B1G avec les IgG de chèvre se ferait avec le fragment Fab de l'IgG et impliquant le brin $\beta 2$ de B1G-DBF comme indiqué dans le paragraphe 2.3. du Chapitre I. L'interaction B1G-DBF/Fab pourrait être déstabilisée par le manque de structuration autour du mime-DBF ce qui expliquerait la non reconnaissance.
- l'hydrophobie de B1G-DBF peut être à l'origine d'une mauvaise solubilisation de B1G-DBF dans la solution du test (titration faussée) ou d'une interaction avec la caséine par exemple qui est une protéine servant à interagir avec la paroi en plastique des puits;
- dénaturation de B1G-DBF dans les conditions du test : pH et température;

* Pour analyser ces hypothèses, nous pouvons envisager les possibilités suivantes :

- tester des IgG d'autres espèces pour lesquelles on sait quel fragment (Fc ou Fab) interagit avec B1G : c'est le fragment Fc pour les IgG humaines et le fragment Fab pour les IgG de souris. Cela permettrait de répondre au premier point;
- utiliser la technologie BIACORE, ce qui nous permettrait de nous affranchir des problèmes d'interaction avec la caséine, ou de solubilisation puisque des solutions très diluées sont utilisées;
- étudier la stabilité de B1G-DBF sur une large gamme de pH et de température par dichroïsme circulaire, pour étayer la troisième hypothèse.

3. Conclusion

En regard des tests effectués, on ne peut malheureusement pas tirer de conclusions certaines sur la non reconnaissance des IgG par B1G-DBF. Des expériences complémentaires doivent être faites pour en connaître la cause et déterminer si elle est d'ordre structural (flexibilité de la chaîne peptidique dans la région du mime-DBF) ou si elle est inhérente aux conditions du test.

CHAPITRE VI : DISCUSSION SUR L'INCORPORATION DU MIMÉ-DBF DANS B1G

En résumé, le peptide isolé correspondant au fragment N-terminal de B1G (B1G₂₋₁₉) ne se structure pas en feuillet β dans l'eau et le peptide modifié avec le mime-DBF (B1G₂₋₁₉-DBF) ne se structure pas non plus. Mais dans le contexte du domaine entier B1G-DBF, la séquence correspondant aux résidus 2-19 se replie en feuillet β avec cependant une certaine flexibilité autour du mime, due à l'absence d'un complexe hydrophobe entre la partie aromatique du mime et les chaînes latérales des résidus adjacents. Ceci est donc un exemple supplémentaire de l'importance du contexte dans le repliement et la structuration des protéines.

Si l'on se réfère aux travaux publiés sur B1G, on dispose d'un faisceau d'informations permettant de mieux comprendre son repliement.

Les études menées sur B1G sur la dynamique du squelette peptidique par corrélation ^1H - ^{15}N en RMN, ont pu mettre en évidence, malgré une rigidité globale de la molécule, des endroits de la séquence présentant une plus grande flexibilité (BARCHI et coll., 1994). Ces endroits sont essentiellement situés au niveau des tournants et des boucles, probablement dû au fait que les résidus correspondant sont peu impliqués dans des interactions avec d'autres résidus. D'autre part, les brins externes du feuillet (brins $\beta 2$ et $\beta 3$) et en particulier le brin $\beta 2$ sont plus mobiles que les brins internes. Les auteurs ont également observé, pour le brin $\beta 2$, un nombre significatif de résidus présentant des largeurs de raies importantes.

Les expériences d'échange H/D vont dans le même sens (ORBAN et coll., 1995). Elles confirment que le brin $\beta 2$ est le moins stable. Parmi les protons s'échangeant le moins rapidement, on trouve en particulier ceux des résidus des brins $\beta 3$ et $\beta 4$. Ce résultat, avec les calculs sur ΔG suggèrent la présence de structures résiduelles dans l'état déplié correspondant au feuillet des brins $\beta 3$ et $\beta 4$.

Les travaux de BLANCO et SERRANO apportent de plus des informations sur les éléments de structure secondaire isolés. Ils ont montré que le peptide correspondant au feuillet des brins $\beta 3$ et $\beta 4$ présente, en solution dans l'eau, environ 40% de structure en feuillet β d'après les résultats de dichroïsme circulaire et de RMN (BLANCO et coll., 1994b). Par contre, les peptides correspondant au feuillet des brins $\beta 1$ et $\beta 2$ et à l'hélice α se révèlent être essentiellement instructurés dans l'eau (BLANCO et SERRANO, 1995).

C'est dans une publication très récente que BLANCO et coll. (1997) font le point sur les hypothèses concernant les mécanismes de repliement de B1G. Ils proposent l'intervention d'un

collapse hydrophobe localisé au niveau de la partie N-terminale de l'hélice et du second feuillet β (brins $\beta 3$ et $\beta 4$) qui viendrait stabiliser la formation des éléments de structure secondaire de cette région. Le fait que les peptides isolés correspondant à la partie N-terminale de l'hélice (BLANCO et coll., 1997) et le feuillet C-terminal (brin $\beta 3$ et $\beta 4$) (BLANCO et coll., 1994b) se structurent dans une certaine proportion en solution, suggèrent qu'un collapse hydrophobe global de la protéine n'est pas nécessaire pour la formation des éléments de structures secondaires dans cette région. L'analyse des comportements des peptides isolés ne peut pas décrire le repliement de la protéine mais pour B1G, les résultats indiquent que la formation de certains éléments de structure secondaire peuvent intervenir avant le collapse global de la chaîne polypeptidique avec le seul concours d'interactions locales (BLANCO et coll., 1997). Les interactions non-locales peuvent permettre quant à elles la formation des éléments de structure secondaire restant et en particulier le feuillet N-terminal (brins $\beta 1$ et $\beta 2$).

C'est cet aspect qui apparaît dans les résultats de notre travail où un peptide essentiellement non structuré en solution (B1G₂₋₁₉-DBF) se structure en feuillet β sous l'influence du contexte tertiaire protéique et donc des interactions non locales. La formation de ce feuillet est donc plutôt due à l'importance des contacts tertiaires qu'à un rôle nucléateur du mime-DBF.

Une question majeure reste à étudier : la stabilité. Ces études permettront de déterminer dans quelle mesure le mime-DBF vient stabiliser la protéine et des études de dynamique moléculaire, accompagnées d'expérience de RMN et dichroïsme circulaire pourront fournir des informations quant à des différences possibles sur les mécanismes de repliement entre B1G et B1G-DBF.

CONCLUSION DE L'INCORPORATION DU MIME DE COUDE β A STRUCTURE DIBENZOFURANE DANS LES DEUX MODELES D'ETUDE

L'incorporation du mime-DBF a été réalisée dans deux modèles : la scyllatoxine et B1G qui sont deux protéines trouvant leur stabilité dans deux facteurs différents. La scyllatoxine est stabilisée par la présence de trois ponts disulfure et B1G par un cœur hydrophobe. La compatibilité du mime-DBF dans ces deux structures a été démontré puisque dans les deux cas la structure globale est conservée.

La synthèse des protéines modifiées avec le mime-DBF s'est révélée être difficile notamment à cause de l'hydrophobie du mime et sa nature rigide. Une approche de synthèse convergente permettrait peut être d'optimiser la synthèse des protéines modifiées en évitant le problème des couplages plus difficiles après l'incorporation du mime.

La purification et le repliement des protéines modifiées ont elles aussi été gênées par la nature hydrophobe du mime-DBF. En cela, le mime-DBF possède un désavantage et c'est un des points qui participent au fait qu'il ne constitue pas un mime idéal.

Le mime-DBF a été particulièrement bien décrit par KELLY et coll. dans des peptides. Les conditions requises pour la nucléation du feuillet β consistaient en la présence de résidus à chaîne latérale hydrophobe, en position adjacente au mime (positions i et $i+3$ du coude β), formant un complexe hydrophobe avec la partie aromatique du mime. Cette interaction vient aider à la formation de la première liaison hydrogène et l'établissement du feuillet β . Or, nous n'étions pas dans les conditions optimales de la nucléation du feuillet β dans chacun des deux modèles. En effet, la scyllatoxine possède, à part un résidu Ile en position i du coude, un résidu Lys dont on ne pouvait prévoir le comportement. Cependant, nous avons pu constater la formation d'un complexe hydrophobe entre les chaînes latérales de Ile 22 et Lys 25 et la partie aromatique du mime. Le contexte de la protéine, la stabilisation apportée par la présence des ponts disulfure et/ou la présence de Ile 22 ont permis la formation du feuillet β .

Dans le cas de B1G, les résidus en position i et $i+3$ étaient respectivement Gly 9 et Leu 12. Pour le peptide B1G_{2,19}-DBF, il est effectivement apparu que les conditions nécessaires à la formation du feuillet β n'étaient pas remplies puisque le peptide ne se structure pas en feuillet β . Il n'y a pas formation de complexe hydrophobe et *a priori* pas de liaison hydrogène entre le CO de Gly 9 et le NH de Leu 12. Les conditions requises par Kelly ne sont donc pas remplies pour permettre la nucléation du feuillet β . Or, il y a formation du feuillet β dans le contexte tertiaire de

la protéine. Cela montre de manière encore plus évidente l'importance du contexte protéique et des interactions non locales.

Il faut donc souligner ici que les règles et les conditions mises au point sur des peptides pour étudier et/ou permettre la structuration des feuillets β , ne reflètent pas le contexte plus complexe d'une protéine où des interactions tertiaires peuvent intervenir comme facteur stabilisant.

Du point de vue plus large de l'ingénierie des protéines, nous avons pu montrer que l'incorporation d'un élément non naturel fournit des informations importantes sur la faisabilité même de la synthèse chimique de protéines modifiées, mais également des éléments d'information sur le repliement.

PUBLICATION

*Incorporation of a β -turn mimic in the N-terminal fragment of the
B1 domain of streptococcal protein G*

Oleg MELNYK, Christophe BOUTILLON, Lynda DRAFFAN, Benoît ODAERT,
Fabienne JEAN, Guy Lippens et André TARTAR

Accepté pour publication dans *Letters in Peptide Science*.

Incorporation of a β -turn mimic in the N-terminal fragment of the B1 domain of streptococcal protein G.

Oleg Melnyk*, Christophe Boutillon*[#], Lynda Draffan*, Benoît Odaert*, Fabienne Jean*, Guy Lippens* and André Tartar*[#]

** Laboratoire de Chimie des Biomolécules associé au CNRS, URA 1309, Institut Pasteur de Lille / Institut de Biologie de Lille 1, rue du Professeur Calmette 59019 Lille, France.*

[#] Faculte de Pharmacie de Lille, 3 rue du Professeur Laguesse 59000 Lille, France.

SUMMARY

A dibenzofuran based β -turn mimic has been incorporated in the B1₂₋₂₉ fragment of the B1 domain of streptococcal protein G. This amino acid sequence adopts a β -hairpin structure in the complete B1 domain (B1₂₋₅₆). The modified peptide was studied by CD and NMR spectroscopy and its solution behaviour compared to the conformation adopted by the same sequence in the modified B1 domain.

Key words : β -turn mimic, B1 domain, protein engineering

INTRODUCTION

The recent progress made in the total synthesis of proteins allows the construction of new proteins including non peptidic moieties. The objectives of these studies are dual. First of all, these methodologies can be applied to the synthesis of macromolecules possessing an enhanced biological activity, an improved thermal or metabolic stability. Another more fundamental aspect we are interested in is the

possibility to better understand the rules controlling the 3D arrangement of these new molecular objects.

Recently, Kelly and coworkers published the synthesis of a β -turn mimic derived from dibenzofuran (DBF, Fig. 1)¹. From its insertion in several peptide models, the authors concluded a general rule for its capacity to induce a β -hairpin in aqueous solution: the amino acids adjacent to the mimic need to be hydrophobic like leucine or valine. The hydrophobic cluster formed when the side chains stack to the DBF moiety serves as a nucleation site for the antiparallel β -sheet. Our objective was to incorporate by chemical synthesis the DBF into small protein models in order to study the influence of the insertion on the 3D structure and on the biological activity. The small size of the protein models chosen assured the accessibility to peptide synthesis and NMR analysis. They contained also the major secondary structure elements and a solvent exposed β -turn. A last criterium was an easily detectable biological activity not involving the β -turn that can serve as a useful probe to test the integrity of the 3D structuration. The first model compatible with the above criteria was scyllatoxin, a 31 amino acid scorpion toxin stabilized by 3 disulfide bridges. Whereas the incorporation of the DBF led to a folded bioactive molecule² - proving the compatibility of the DBF with a protein fold - its influence on the stability of the molecule could not be easily determined due to the presence of the disulfide bridges. In order to investigate further the stability, a second model was chosen, the B1 domain of streptococcal protein G (B1₂₋₅₆). This 55 amino acid protein is devoid of disulfide bridges but highly stabilized by a compact hydrophobic core and an extensive hydrogen-bonding network³, and

consists of a central α -helix packed against a four stranded β -sheet fold. The known biological activity of B1₂₋₅₆ is the binding to IgG⁴. The folding pathway of this protein has been extensively studied by analysis of various isolated fragments in solution⁵, and the N-terminal fragment B1₂₋₁₉ was found to adopt a set of transient β -hairpin structures. We decided to incorporate the DBF in this fragment as a preliminary study for the modified protein.

MATERIALS AND METHODS

(DBF¹⁰⁻¹¹)B1₂₋₁₉ (Fig. 1) was synthesized using the Boc/benzyl strategy on 0.5 mmol of a N- α -t-Boc-L-glutamic acid γ -benzyl-ester-PAM resin (0.71 mmol/g). Side chain protecting groups were as follow : O-benzyl for threonine, γ -cyclohexyl ester for glutamic acid, N- ϵ -2-chloro-Z for lysine, β -trityl for asparagine, O-2-bromo-Z for tyrosine. The DBF was synthesized according to the published protocol¹ and replaced Lys₁₀ and Thr₁₁ in the B1₂₋₁₉. The DBF was coupled twice with 1.5 eq. of activated Boc-DBF using 2-(1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium (HBTU) and 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) in the presence of *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) (1.5 eq.: 1.5 eq.: 4.5 eq.) in NMP/DMF (5: 2) for 5h and in NMP/DMF/DMSO (3: 2: 2) for 12h respectively. After the DBF incorporation, the Boc deprotection steps were performed twice with TFA/CH₂Cl₂ (1: 1) containing thioanisole (1% by vol.) and dibenzofuran (2.5 eq.) to avoid the alkylation of the mimic. After HF cleavage and deprotection, (DBF¹⁰⁻¹¹)B1₂₋₁₉ was purified by RP-HPLC and identified by TOF-PDMS (m/z expected 2047.3; found 2047).

CD spectra were measured using 0.1-cm-pathlength quartz cell on a Jasco 710 spectropolarimeter calibrated using 0.06% (+)-10-camphorsulfonic acid (by mass) solution.

All NMR spectra were acquired on a Bruker DMX 600 MHz spectrometer. Chemical shifts were referenced relative to internal trimethylsilyl-2,2',3,3'-D-propionic acid sodium salt.

RESULTS

Previous results have shown that the native fragment B1₂₋₁₉ in H₂O/TFE (70: 30) at pH 3.0 and 5 ° C adopts a set of transient β -hairpin structures⁶. However, NMR studies of B1₂₋₁₉ revealed that the β -turn was shifted by one residue as compared to the native β -turn found in the protein. For (DBF¹⁰⁻¹¹)B1₂₋₁₉, the shape of the CD curve in water at pH 3.0 and 5 ° C was compatible with a peptide adopting essentially the random coil conformation (Fig. 2a). The addition of 30% of trifluoroethanol induced a significant change of the CD curve, but the minimum between 210 and 220 nm, characteristic of antiparallel β -sheets, was absent. More importantly, the aggregation behaviour of both peptides was clearly different. B1₂₋₁₉ was found to be monomeric at a concentration up to 5 mM in 30% TFE at 5 ° C and pH 3.0. On the contrary, the NMR spectra of the modified (DBF¹⁰⁻¹¹)B1₂₋₁₉ in the same conditions at 0.6 mM showed a poor linewidth, and after a few weeks, we observed a decrease of the signal intensity on the same sample. The aggregated state of the peptide was even more evident with the 5 mM sample for which precipitation occurred rapidly within a few hours.

As the (DBF¹⁰⁻¹¹)B1₂₋₁₉ peptide eluted as one sharp peak during the RP-HPLC purification, characteristic of a well-defined state, we decided to study its behavior in 33% aqueous acetonitrile at pH 1.8 and 5 ° C. The CD curve of (DBF¹⁰⁻¹¹)B1₂₋₁₉ showed a well-defined minimum at 215 nm (Fig. 2b). This minimum was not observed in the CD spectrum of the native B1₂₋₁₉ solubilized in the same conditions. The NMR samples of (DBF¹⁰⁻¹¹)B1₂₋₁₉ at 0.6 and 5 mM in 33% aqueous acetonitrile were stable and showed identical linewidths and chemical shifts. However, no backbone (H α -H α or NH-NH) or side chain-side chain interstrand contacts were observed in the NOESY spectra, indicating that the minimum at 215 nm obtained in the CD spectrum was not due to a β -sheet conformation but probably to some residues of the modified peptide adopting an extended conformation. Moreover, H/D exchange experiments showed that (DBF¹⁰⁻¹¹)B1₂₋₁₉ was most probably not monomeric in solution. Indeed, the backbone amides from Lys₄ to Leu₇ were still detected after 15 hours dissolution in D₂O/CD₃CN.

Despite the probable aggregation state of the peptide, some useful informations could be obtained from the analysis of the NOE connectivities (Fig. 1). We could detect NOE contacts between the aromatic proton H₃ and the side chain methyl groups of Leu₇ and/or Leu₅. The δ protons of Leu₇ and Leu₅ were not shielded relative to the same protons in the native peptide. These hydrophobic interactions were for this reason probably transient. On the other hand, the side chain of Leu₁₂ showed strong NOE contacts with H₈, and its δ protons were highly shielded. Both factors reflect an efficient hydrophobic contact. The conformation adopted by this part of the peptide is in good agreement with the model developed by Kelly and co-workers.

DISCUSSION AND CONCLUSION

For practical reasons of chemistry, most β -turn mimics have been evaluated upon their capacity to induce or to maintain the structure of small peptides rather than proteins as defined by a stable tertiary structure. In the case of DBF, these studies have led to define a stringent requirement for the nature of the flanking residues. From this point of view, the choice of the Gly₉ and Leu₁₂ residues flanking the mimic in the B1 domain of protein G was not optimal, and the replacement of the Gly by a hydrophobic amino acid would have been the method of choice in the framework of protein engineering. Our question, however, was to investigate whether the complete protein sequence would be able to overcome the flexibility of Gly. We therefore decided to maintain the Gly in the turn. As the isolated B1₂₋₁₉ N-terminal fragment in solution adopts a set of transient β -hairpin conformations, we first evaluated the influence of the DBF insertion in positions 10 and 11 of this peptide.

For (DBF¹⁰⁻¹¹)B1₂₋₁₉, the rules established by Kelly and coworkers proved to be valid. The absence of a hydrophobic amino acid in place of Gly₉ led to a hydrophobic stacking between the DBF aromatic moiety and the side chains of Leu₇ and/or Leu₅. The lack of interstrand connectivities confirmed that in this unfavorable context, the DBF has not led to the formation of a stable β -hairpin. Moreover, the dominant hydrophobic character of the aromatic moiety led to important problems of aggregation, even in the presence of co-solvents such as trifluoroethanol or acetonitrile.

Interestingly, upon insertion of the DBF in the same position but in the full length sequence B1₂₋₅₆, the results were radically different⁷. NMR data collected for this (DBF¹⁰⁻¹¹)B1₂₋₅₆ molecule agree well with a conserved 3D structure, except in the DBF containing region located between Asn₈ and Gly₁₄ where a lack of NOE connectivities and line broadening was observed, indicating an increased flexibility when compared to this turn region in the native B1₂₋₅₆ domain. It should be noted that for several proteins denatured in solution, native-like hydrophobic clusters have been observed which are probably involved in the early stages of the folding process⁸. The highly hydrophobic character of DBF and the non native clusters found in the (DBF¹⁰⁻¹¹)B1₂₋₁₉ might therefore well interfere with the early stages of the folding process of the protein. Nevertheless, (DBF¹⁰⁻¹¹)B1₂₋₅₆ adopted the correct fold, without major perturbation of the hydrophobic core of the protein and with the presence of the N-terminal β -hairpin. This latter observation was radically different from our results on the isolated (DBF¹⁰⁻¹¹)B1₂₋₁₉ where no such structuration was detected.

In a parallel study, the DBF replaced the two central residues of the turn (Gly₂₃ and Asp₂₄) in scyllatoxin, a 31 amino acid scorpion toxin stabilized by 3 disulfide bridges. In this environment, it formed a hydrophobic cluster with Ile₂₂ and Lys₂₅. This situation was not expected on the basis of the studies performed by Kelly *et al.* on heptapeptides. While the presence of a lysine adjacent to the DBF was not *a priori* a favorable case, the (DBF²³⁻²⁴)scyllatoxin still conserved the 3D fold of the native toxin.

CONCLUSION

In conclusion, the work described here shows that the structural influence of a β -turn mimic (DBF) can be different in small peptides and in proteins. In small peptides, a β -turn mimic needs to be compatible with the reversal of the peptide chain and more importantly, must contribute to the stability of the β -sheet conformation. In proteins, it should be possible to design β -turn mimics which are only geometrically and sterically compatible with the protein, the stability of the construction being mainly determined by the tertiary context⁹. The evaluation of β -turn mimics in small peptides therefore could lead to overestimate the criteria necessary for a good replacement of the native β -turn in the protein context. The study of the incorporation of DBF in our two models shows that proteins seem to be very tolerant to such modifications from the folding point of view.

REFERENCES

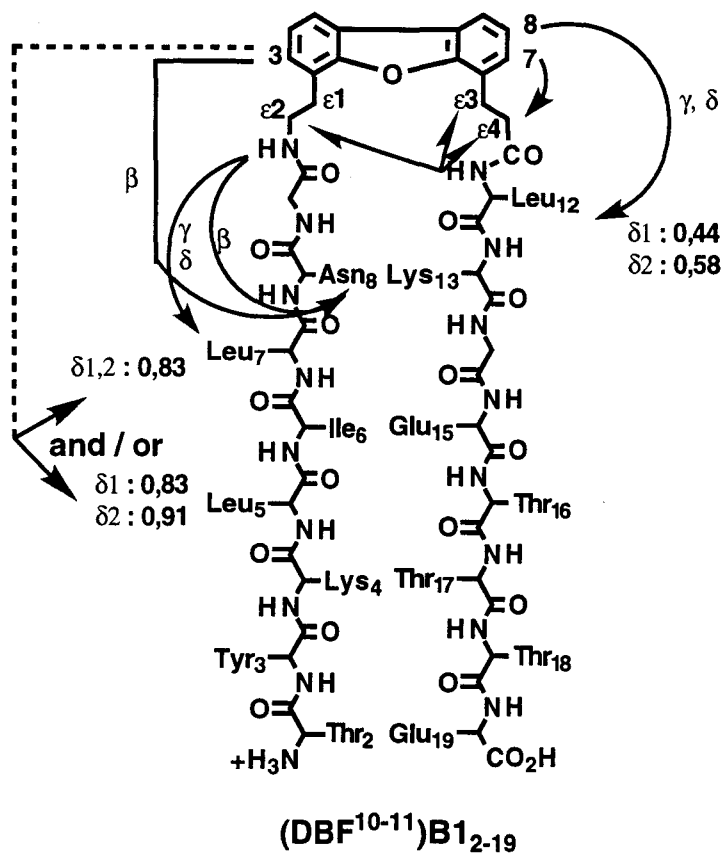
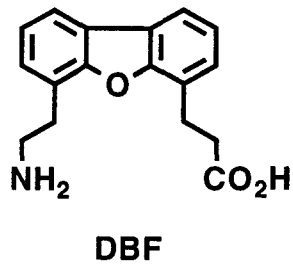
- ¹ Tsang, K.Y., Diaz, H., Graciani, N., Kelly, J.W. *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 3988.
- ² Jean, F., Buisine, E., Melnyk, O., Hugues, M., Drobecq, H., Lippens, G., Tartar, A. manuscript submitted.
- ³ Gronenborn, A.M., Filpula, D.R., Essig, N.Z., Achari, A., Whitlow, M., Wingfield, P.T., Clore, G.M. *Science* 253 (1991) 657.
- ⁴ Bjorck, L., Kronvall, G. *J. Immunol.* 133 (1984) 969.
- ⁵ Blanco, F.J., Serrano, L. *Eur. J. Biochem* 230 (1995) 634.
- ⁶ Blanco, F.J.; Jimenez, M.A.; Pineda, A.; Rico, M.; Santoro, J.; Nieto, J.L. *Biochemistry* 33 (1994) 6004.

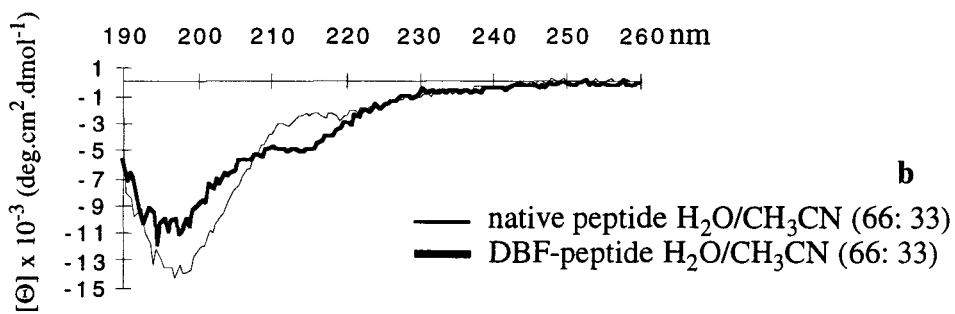
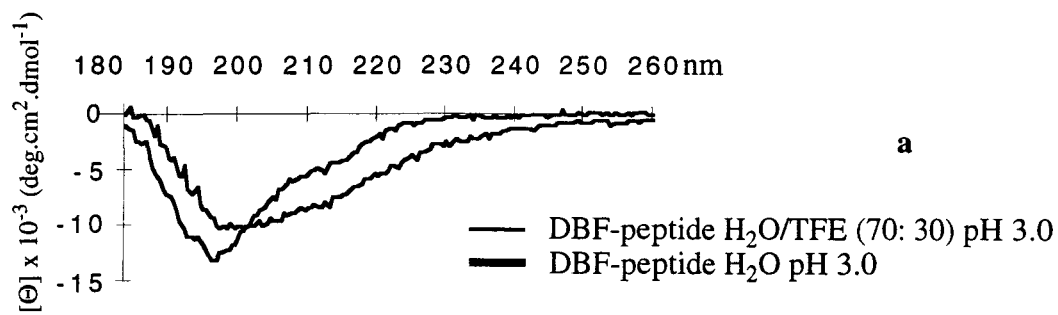
- ⁷ Odaert, B. *et al.* manuscript in preparation.
- ⁸ Neri, D., Billeter, M., Wider, G., Wüthrich, K. *Science* 257 (1992) 1559.
- ⁹ Minor, D.L., Kim, P.S. *Nature* 380 (1996) 730.

Figure captions

Fig. 1. DBF (4-(2-aminoethyl)-6-dibenzofuranpropionic acid, β -sheet nucleator designed by Kelly *et al.*¹) and (DBF¹⁰⁻¹¹)B1₂₋₁₉, an analog of B1₂₋₁₉ in which DBF replaces Lys₁₀ and Thr₁₁, with selected NOE connectivities and chemical shifts in ppm (peptide 5 mM in H₂O/CD₃CN (66: 33) at pH 1.8 and 5°C).

Fig. 2. CD spectra of B1₂₋₁₉ and (DBF¹⁰⁻¹¹)B1₂₋₁₉. The concentration was 75 μ M (5°C).





PARTIE IV

***COUPLAGE DE FRAGMENTS
AVEC UN NOUVEAU REACTIF DE COUPLAGE***

PARTIE IV

COUPLAGE DE FRAGMENTS AVEC UN NOUVEAU REACTIF DE COUPLAGE

Le travail présenté ici a été effectué dans le cadre d'un stage de trois mois dans le laboratoire dirigé par le Professeur Ramage à l'Université d'Edimbourg. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au couplage de fragments reposant sur le principe de la méthode « azide » avec l'utilisation d'un nouvel agent couplant, HOCT, mis au point au laboratoire.

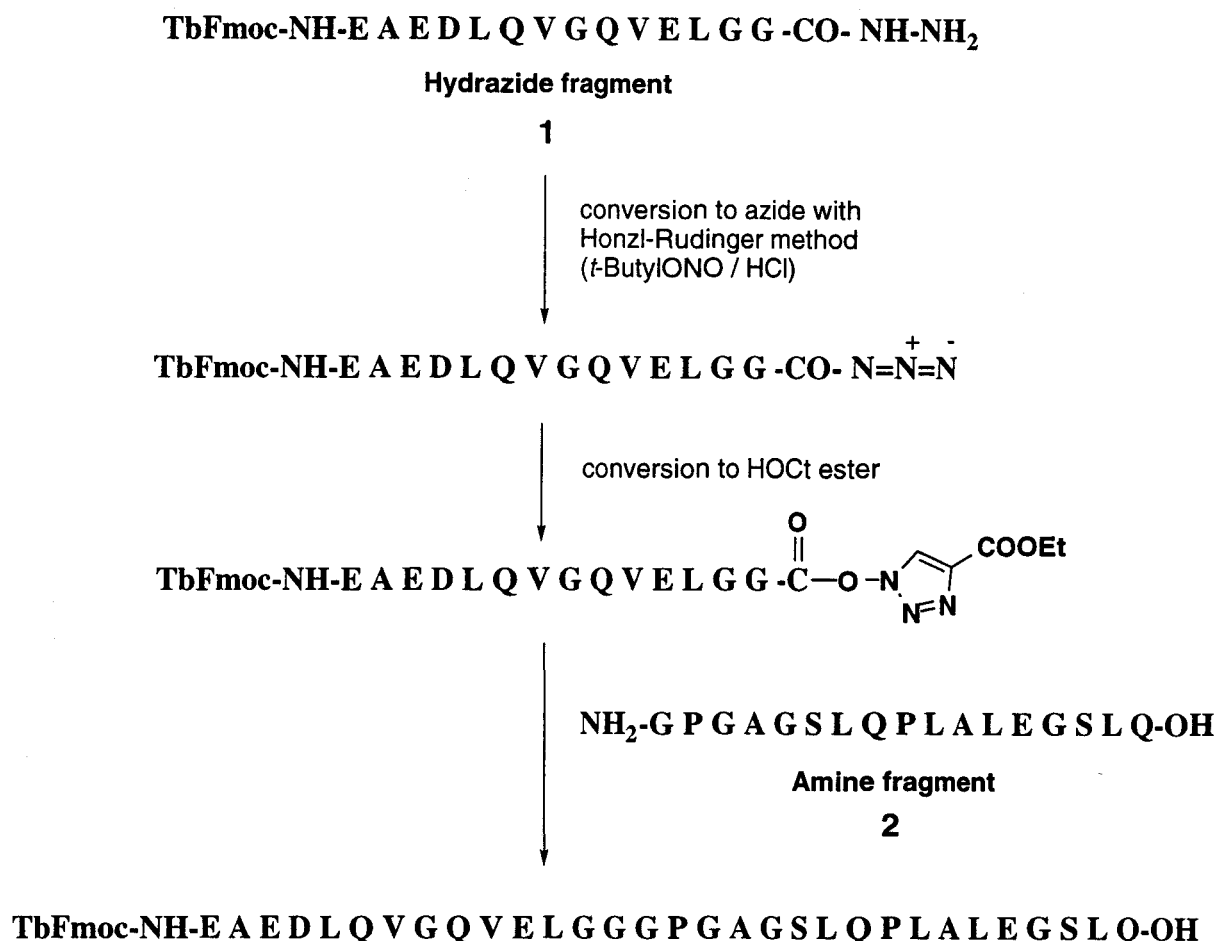
Dans un premier temps, nous verrons le principe de la méthode azide. Celle-ci nécessite l'utilisation d'un peptide portant une extrémité C-terminale hydrazide. Le peptide hydrazide a pu être préparé grâce à une résine, fonctionnalisée par un bras espaceur ou « linker » portant un groupement hydrazine. D'autre part, le nouvel agent couplant, HOCT, a prouvé son utilité dans le cadre de synthèses peptidiques linéaires. Il était ainsi intéressant de voir quel peut être son efficacité dans le cadre de couplages de fragments, réputés difficiles. Enfin, une technique de purification développée au laboratoire, basée sur l'utilisation d'un groupement analogue au groupement Fmoc, TbFmoc, sera présentée.

Introduction

One of the aspects developed in Professor Ramage Laboratory is to design new methodologies in order to synthesize large proteins (150 residues or more). The synthesis of large proteins may be envisaged with different strategies: stepwise solid phase method, or fragment coupling via an amide or a non-amide bond (chemical ligation). In any case, the use of the most efficient coupling agent is required. This led to the development of a new coupling agent, HOCT.

First of all, the principle of the azide method will be described. This method requires the use of a hydrazide derived peptide that is easily prepared from a resin, functionalised with a hydrazine linker. On the other hand, the novel coupling reagent HOCT has proven its efficiency for linear synthesis and it was interesting to see how it would improve the rate of fragment coupling, known to be slow. Finally, a purification technique based on the use of an analogue of the Fmoc group, Tbfmoc will be presented.

The aim was to test the efficiency of HOCT in the case of fragment coupling, using the well described azide method. The chosen target was the Human Proinsulin C-Peptide (positions 33-63 of proinsulin) (IGANO et al., 1981) and the envisaged coupling strategy is indicated Scheme 1.



Scheme 1

1. Fragment coupling

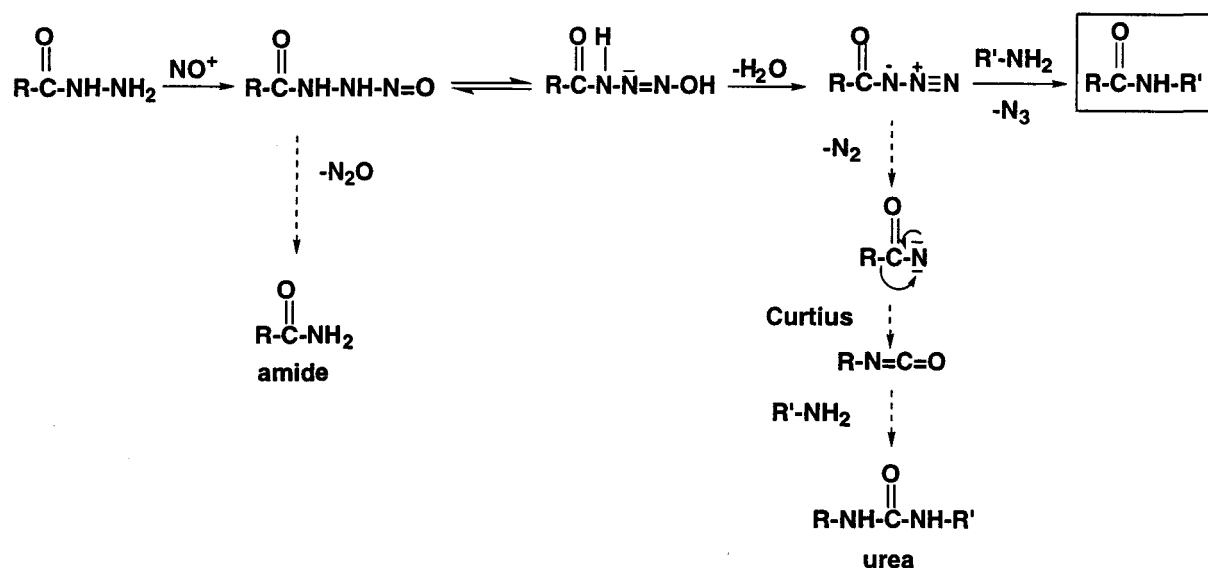
A major drawback of solid phase stepwise elongation is the decrease in coupling yield occurring during the synthesis especially when a large number of residues are to be coupled. To overcome this problem, fragment condensation was used and its main advantage lies in the convergent nature of this type of synthesis (LLOYD-WILLIAMS et al., 1993).

However, one limitation of the method can be the relative insolubility of the protected fragments to couple. That's why minimally protected fragments are now used. Only the most reactive functions like the strongly nucleophilic ϵNH_2 of Lys and $-\text{SH}$ of Cys must be protected. But this implicates a regioselective activation of the C-terminal carboxylic acid function. Different methods were employed for such an activation. One of them is the azide method, described in the next section.

Another problem which has to be mentioned is the possible racemisation of the C-terminal amino acid being activated. That's why, in most cases a Gly is chosen as the site of coupling and also to minimize steric interaction during coupling.

1.1. The azide method

Among the different methods utilizable for fragment coupling (LLOYD-WILLIAMS et al., 1993), the azide method was first introduced by Curtius at the beginning of the century, for the formation of peptide bond (CURTIUS, 1902). This method remains nevertheless widely used, essentially for the following reasons: the starting materials (hydrazide peptides) are easily prepared, low racemisation rate is observed and it requires minimum side chain protection as the C-terminal function is selectively activated. However, a drawback of the method is long reaction time implying the occurrence of side reactions. The main side reactions observed are amide formation during azide formation and Curtius rearrangement during azide coupling (Scheme 2). One way to avoid them is to use a more efficient coupling agent able to increase the rate of coupling. The new coupling agent tested here for fragment coupling is HOCT, presented in paragraph 2.



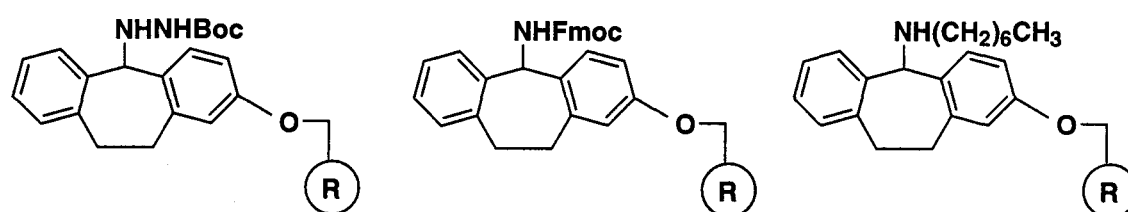
Scheme 2

The formation of azides requires acidic conditions like HCl in DMF or in the mixture DMF and isopropanol, or TFA in DMF. The azide is then formed rapidly upon addition of sodium nitrite or an organic nitrite such as *t*-butyl nitrite. The azides being unstable molecules, low temperatures are needed and they are not isolated, but reacted *in situ* immediately after their preparation.

The different parameters intervening in the formation of side products (amide formation) were studied in detail by HONZL-RUDINGER (1961). The authors indicated that the optimal results are obtained at low temperature, in homogeneous solution, at high acidity and with an organic nitrite (*t*-butyl nitrite). The method described by HONZL RUDINGER was used here.

1.2. The hydrazine linker

The preparation of hydrazide fragments, which can be transformed in azide by the azide method, is greatly facilitated by the use of the "hydrazine linker" (RAMAGE et al., 1993). Hydrazide peptides are directly obtained after the cleavage of the resin-peptide bond. The linker has been designed to be compatible with Fmoc/acid-labile side chain strategy. It is based on the dibenzocyclohepta-1,4-diene system and allows not only the preparation of hydrazide peptides but also diverse functionalisations as indicated Scheme 3.

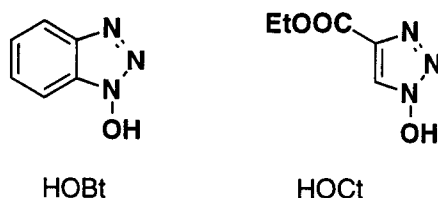


Scheme 3

The different linkers have proven their remarkable effectiveness by application to the synthesis of the corresponding C-terminal derivatized peptides (RAMAGE et al., 1993).

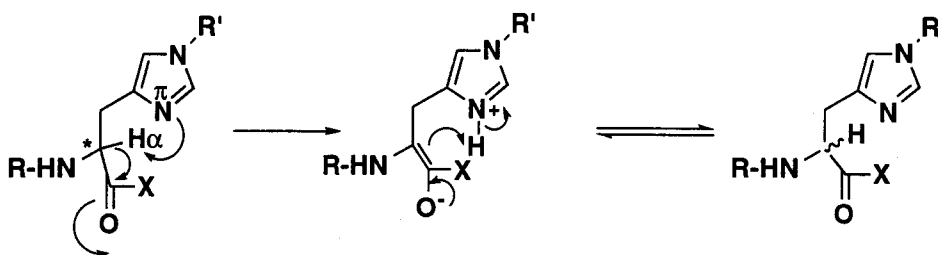
2. HOCT: a novel coupling reagent

The design of HOCT was based upon the HOBt system in order to further improve coupling efficiency without loss of chirality of the activated amino acid. Two main considerations were taken into account: steric effects should be minimised and the activated group should be a good leaving group namely be a stronger acid than HOBt. Investigations carried out within the laboratory led to the preparation of HOCT (1-hydroxy-4-ethoxycarbonyl-1,2,3-triazole) (Scheme 4).



Scheme 4

Racemisation studies indicated that no racemisation occurs on HOBT-activated amino acids except in the case of His, known to be problematic. The racemisation of His may be due, in addition to the oxazolone formation, to an abstraction of the α proton by the nitrogen of the imidazole group (Scheme 5).



Scheme 5

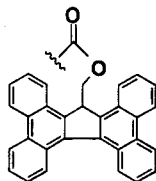
The racemisation problem of His was solved by using 2 eq. of HOBT. Indeed, due to its acidic nature ($pK_a=2.1$), HOBT protonates the π nitrogen of the imidazole group, thus preventing abstraction of the α proton.

HOBT/DIC has shown its efficiency: it appeared as good in single coupling procedure as HOBt/DIC double coupling. Moreover, its use for the stepwise synthesis of proteins allows the synthesis of a 146 residue protein (human leptin for example) by single coupling. Considering these very promising results, it was tempting to test HOBT efficiency on fragment coupling.

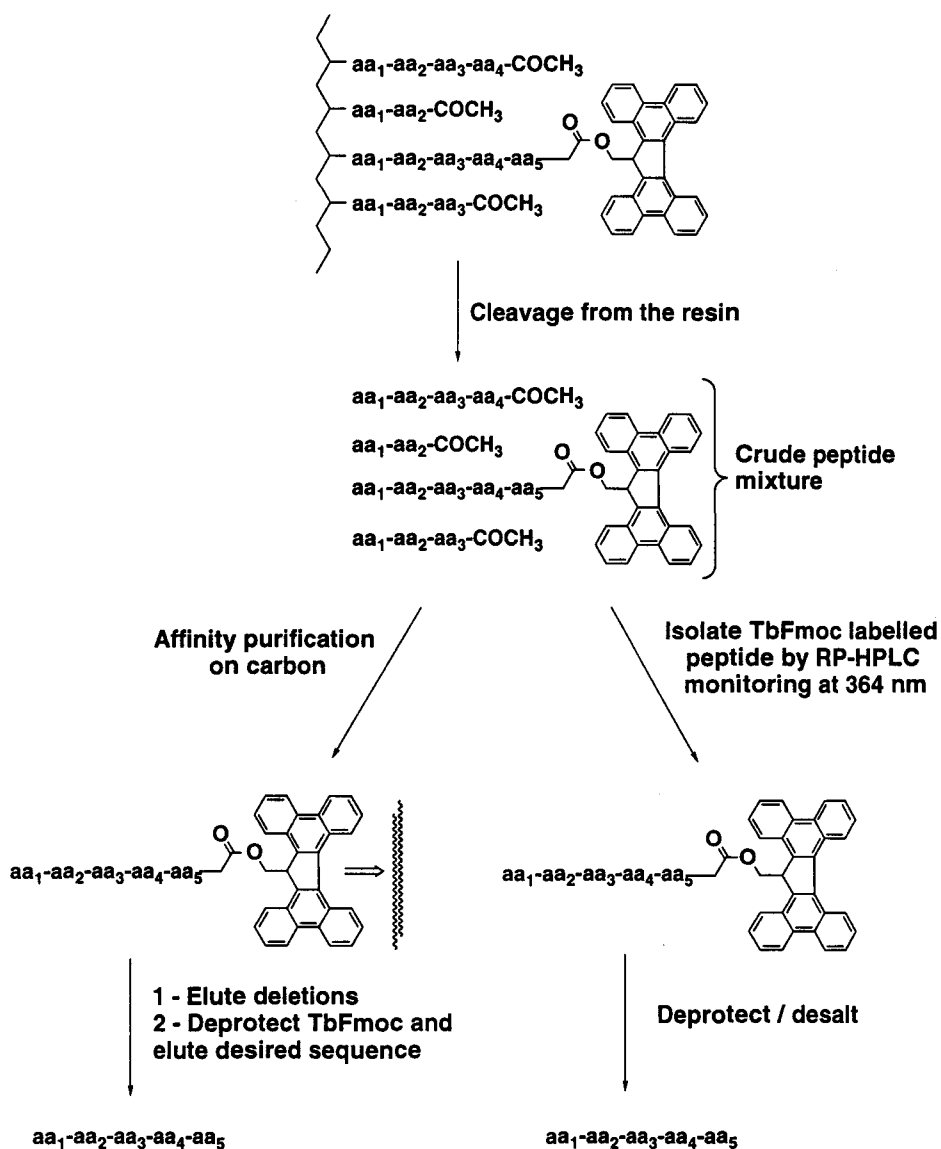
3. Use of Tbfmoc

One of the problems met in solid phase peptide synthesis is, as a consequence of non-quantitative yield, the presence, when a systematic acetylation of the unreacted amine is performed after the coupling step, of truncated fragments in the crude mixture after the final cleavage. This problem is especially important for the synthesis of large polypeptides. High resolution purification methods are thus needed to eliminate the undesired truncated peptides from the target molecule. Another approach was developed within the laboratory which consists

in using the high affinity of a Fmoc analogue for porous graphitised carbon (PGC). The TbFmoc group (tetrabenzo[a,c,g,i]fluorenyl-17-methyloxycarbonyl) was thus designed and synthesized (RAMAGE et al., 1992):



The interesting features of TbFmoc rely on the fact that it possesses the advantages of the Fmoc group (deprotected with piperidine), has an affinity for carbon rendering easier, *a priori*, the purification steps and an absorption coefficient (at 364 nm) allowing a specific purification or the monitoring of reactions with TbFmoc-protected fragments. These characteristics are summarised in Scheme 6.



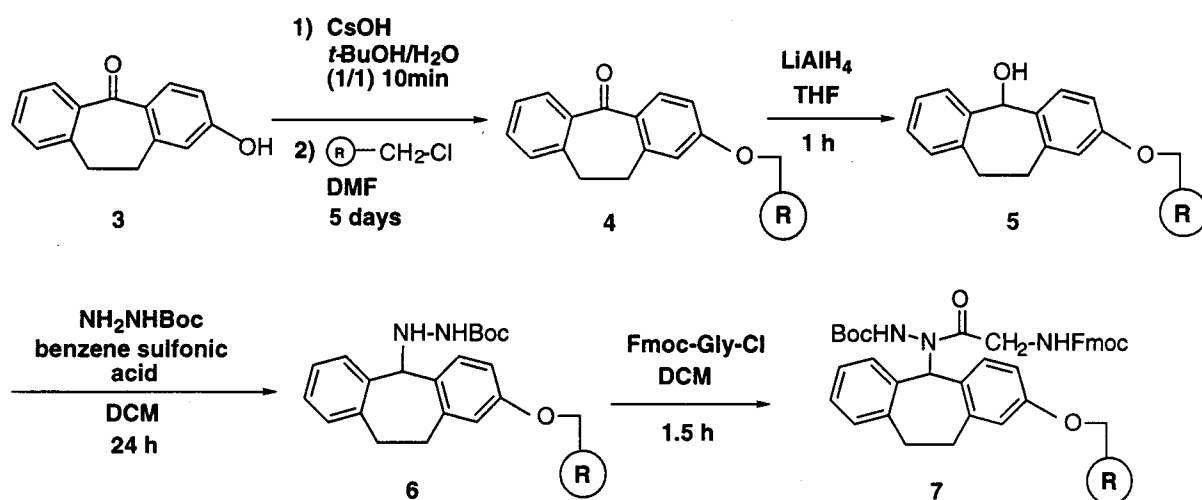
Scheme 6

TbFmoc is introduced on completion of the synthesis, replacing the N-terminal Fmoc group. The presence of TbFmoc labelled peptides allows an easy monitoring of the fragment coupling procedure. Indeed, the starting hydrazide fragment, its derivatives (activated species) and the coupling product can be seen at 364 nm during the monitoring of the reaction by RP-HPLC.

4. Results

4.1. Preparation of the hydrazine linker

We were here interested in the synthesis of hydrazide linker that would allow us to obtain a hydrazide fragment, subsequently transformed in azide for the coupling reaction. The synthesis of the hydrazine linker was performed according to Scheme 7.



Scheme 7

The monitoring of the different steps was made possible using different analyses. The loading of the linker on Merrifield resin was measured by chlorine analysis on **4**, the presence of the desired function $-\text{OH}$ (in the case of **5**) by IR analysis (KBr disc), and the hydrazide (in the case of **6**) by nitrogen analysis.

For the loading of the first amino acid (preparation of **7**), the glycine residue had to be coupled under its acyl chloride form. Indeed, the initial acylation is very slow due to the steric hindrance of the adjacent NH-Boc substituent. The Boc group is removed together with the other acid labile side chain protections during the final cleavage with TFA.

4.2. Preparation of the hydrazide fragment 1

The synthesis of the hydrazide fragment **1** (Scheme 1) was performed on an automatic synthesizer, using the resin functionalised with the hydrazine linker and HOt as coupling agent. Upon completion of the synthesis, the N-terminal Fmoc group was removed and replaced by TbFmoc group. The final cleavage and deprotection step was then carried out in TFA and the usual scavengers. As soon as the TbFmoc-protected hydrazide peptide was cleaved from the resin, the attempts to dissolve the peptide in different types of solvents (H₂O, CH₃CN, DCM, TFE, MeOH, Gnd.HCl, etc) were unsuccessful. Only DMF appeared to be the best solvent to dissolve the peptide after 1h30 sonicating, and the solution was almost clear. So it was decided to use the crude peptide for the fragment coupling reaction, hopefully the activated species could be more soluble. The TbFmoc-hydrazide peptide was nevertheless characterized by FAB MS.

4.3. Preparation of the amine fragment 2

The amine fragment was synthesized classically using the Fmoc/*t*-Butyl strategy on an automatic synthesizer. Single couplings were performed and HOt was used as the coupling agent. Upon completion of the synthesis, the peptide was cleaved from the resin and deprotected with aqueous TFA. The amine fragment was then purified by RP-HPLC.

4.4. Reaction of fragment coupling

All the experiments of fragment coupling were performed following the HONZL-RUDINGER method. The first experiment was carried out without HOt and served as a reference (experiment 1).

As mentioned above, the hydrazide peptide appeared very insoluble in the solvents commonly used, but was nevertheless dissolved in DMF after being sonicated for 1h30. The solution was then cooled to -20°C and acidified with HCl in dioxane. The azide was formed by addition of *t*-butyl nitrite at -15°C. After 10 min, HOt was added and 10 min later, the amine fragment (experiment 2).

In a third experiment, HOt and DIEA in equimolar quantity, were added together to the reaction mixture (experiment 3).

The fourth experiment allowed the reaction with HOCl for a longer time (20 min) before the addition of the amine fragment (experiment 4).

The monitoring of the reaction was performed by RP-HPLC at 214 nm and 364 nm owing to the presence of the TbFmoc group. RP-HPLC traces were recorded at different time: just before the introduction of the amine fragment, after 5 min, 1 h, 3 h, 17 h, 24 h, 48 h, 3 days, 4 days or 5 days. In all cases, the same type of profile was obtained (see RP-HPLC traces in the experimental section). We could observe a decrease of the first peak, corresponding to the first product eluted, and the apparition of a new peak having a signal at 364 nm indicating the presence of TbFmoc. These promising results were disappointing when the corresponding peaks were analysed by MALDI-TOF MS. Peak 1 was corresponding to the amine fragment but the peak 2 had the same molecular mass, despite the signal at 364 nm (indicating the presence of TbFmoc). Apparently, TbFmoc was cleaved during the MS experiment. The evolution observed on the RP-HPLC traces seemed to be actually due to the protection of the amine fragment by TbFmoc. This supposes the presence of TbFmoc-Cl or activated TbFmoc in the reaction medium. One hypothesis lies on the presence of TbFmoc-Cl "stacked" via strong hydrophobic interactions on the TbFmoc group attached to the hydrazide peptide. It might be envisaged that TbFmoc-Cl reacted with the hydrazide function, during the solubilization phase by sonicating for exemple, thus preventing the azide to be formed and the coupling to take place. The numerous washings of the resin, done after TbFmoc protection, were probably not sufficient to remove the excess of TbFmoc.

Another coupling reaction was carried out without HOCl (experiment 5) and surprisingly, a peak on the HPLC profile could be identified as the coupling product. But this peak was not labelled with TbFmoc (no signal at 364 nm). The MALDI-TOF mass spectrum clearly shows the mass (+23) corresponding to the Human Proinsulin C-Peptide (+Na). The only difference with experiment 1 was that the hydrazide fragment had been obtained from another cleavage so was may be less contaminated with TbFmoc-Cl. But the absence of TbFmoc remains mysterious as no excess of base was added compared to experiment 1.

Conclusion

It appears clearly that it is absolutely necessary to fully characterize the TbFmoc-protected hydrazide fragment, make sure of its purity, and find conditions to characterize it by RP-HPLC making it possible a precise monitoring. The success of the coupling reaction critically depends on it. Unfortunately, no conclusion can be established concerning the efficiency of HOCl on fragment coupling. But considering the difficulties encountered with TbFmoc, the use, in the first place, of a less hydrophobic protecting group (like Fmoc) would

allow easier working conditions to study the coupling reaction. It remains nevertheless very interesting to optimize the conditions, in the second place, with TbFmoc as it permits an easy monitoring and provides different means for purification. It would also be important to take into account other parameters like temperature, find the optimum pH: not too low because it would slow the coupling reaction and not too high to prevent Fmoc or TbFmoc deprotection.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Nous avons tout d'abord abordé, lors de ce travail de thèse, une nouvelle approche de la synthèse du mime de coude β à structure dibenzofurane. Celle-ci a été conçue dans le but d'obtenir des analogues en un nombre réduit d'étapes. Nous avons donc mis au point une séquence réactionnelle *one pot* permettant une dissymétrisation du dibenzofurane dès la première étape et impliquant des réactions de lithiation successives. Cela nous a donné l'occasion d'étudier la compétition entre deux groupements *ortho*-directeurs de métallation. L'optimisation des conditions réactionnelles a permis d'augmenter la régiosélectivité dans le sens désiré. Outre une fonctionnalisation des noyaux aromatiques, nous proposons des méthodes pour rendre le mime plus hydrophile.

L'incorporation de ce mime de coude β dans deux protéines, la scyllatoxine et le domaine B1 de la protéine G, a permis de montrer la faisabilité de l'incorporation d'un élément non naturel dans une protéine.

Des problèmes inhérents à la nature du mime ont été rencontrés lors des synthèses, du repliement et de la purification. Le caractère hydrophobe du mime donne lieu à un phénomène d'agrégation observé aux différentes étapes nécessaires à l'obtention de la protéine modifiée. D'autre part, sa rigidité a vraisemblablement été gênante lors de la synthèse en réduisant la mobilité de la chaîne peptidique en formation, pouvant ainsi rendre les fonctions amines moins accessibles. Il serait intéressant d'envisager une approche de synthèse convergente où le mime serait le lien entre les deux fragments à coupler, ce qui permettrait de s'affranchir des problèmes de couplage observés en synthèse récurrente.

Dans le cas de la scyllatoxine-DBF, comme dans celui de B1G-DBF, la structure tridimensionnelle globale est conservée par comparaison à la protéine non modifiée. Au niveau fonctionnel, l'activité biologique est conservée dans le cas de la scyllatoxine-DBF. Dans le cas de B1G-DBF, il n'y a pas eu de reconnaissance des IgG dans les conditions du test utilisé. Un autre type de test doit être réalisé pour nous permettre d'attribuer la cause de l'absence d'activité à la structure de B1G proprement dite ou à un autre facteur lié à l'hydrophobie du mime.

Ce mime de coude β requiert, d'après KELLY, des conditions particulières sur les acides aminés adjacents au mime pour permettre la nucléation d'un feuillet β . Les acides aminés en position adjacentes doivent en effet comporter une chaîne latérale hydrophobe. Or, nous n'étions pas dans des conditions favorables pour chacun des deux modèles puisque, dans la scyllatoxine, un des résidus adjacents est une Lys et il s'agit d'une Gly pour B1G. Le contexte protéique a donc joué un rôle déterminant pour permettre malgré tout la formation du feuillet β . La stabilisation apportée par le contexte protéique est de nature différente dans les deux cas. En effet, la structure de la scyllatoxine est stabilisée par la présence de trois ponts disulfure alors que dans le cas de B1G on attribue la stabilisation de la structure à l'existence d'un cœur hydrophobe et d'un réseau important de liaisons hydrogène. L'importance du contexte de structure tertiaire a pu être montré, en particulier dans le cas de B1G-DBF, car le peptide isolé correspondant au premier feuillet β de B1G et dans lequel le mime a été incorporé ne se structure pas en solution. Par contre, dans le contexte de la protéine entière, le feuillet se forme. On observe cependant une certaine flexibilité autour du mime, due au manque d'interaction entre la partie aromatique du mime et les chaînes latérales hydrophobes adjacentes, la glycine ne pouvant pas remplir ce rôle.

En ce qui concerne l'étape de repliement oxydatif de la scyllatoxine-DBF, un produit thermodynamique peut être obtenu à condition d'utiliser un couple redox (conditions de réversibilité). Or la scyllatoxine non modifiée se replie correctement même en l'absence d'un couple redox. Cela suggère donc que le mime interfère dans les mécanismes de repliement et de formation des ponts disulfure de la scyllatoxine-DBF. Il est difficile d'analyser le problème sous le même angle avec B1G et B1G-DBF, puisque tous deux se replient spontanément quand ils sont placés en solution aqueuse après déprotection et clivage de leur support solide.

A travers ces résultats, il apparaît que le mime-DBF comporte un certain nombre de désavantages dont il faudra tenir compte pour la conception de nouveaux mimes. Dans la mesure du possible, il faut conférer au mime un caractère plus hydrophile rendant les étapes de synthèse, de repliement et de purification plus faciles. D'autre part, nous avons pu constater que des conditions assez strictes établies pour la formation d'un feuillet β dans un contexte peptidique, ne sont pas nécessairement aussi sévères dans le contexte protéique où des interactions de type tertiaire interviennent. Il convient donc de prendre en compte le contexte dans lequel on entend travailler. Quelque soit le contexte étudié, il serait intéressant de disposer d'un mime dont le succès de l'incorporation ne soit pas dépendante de la séquence afin d'en généraliser l'utilisation.

Les perspectives d'utilisation de mimes conformationnels sont nombreuses et rejoignent en cela le développement croissant de l'ingénierie des protéines (RUBINGH, 1997). Dans le contexte de la problématique du repliement des protéines, l'incorporation d'éléments de

structuration peut apporter des éléments d'information importants pour une meilleure compréhension des mécanismes de repliement. Les applications dans le domaine thérapeutique sont également envisageables (KIEBER-EMMONS et coll., 1997). L'incorporation d'un élément non naturel peut permettre d'augmenter la résistance aux protéases endogènes, à la dénaturation thermique. Elle peut également conférer à la protéine modifiée une plus grande stabilité thermodynamique.

Pour se faire, une approche pluridisciplinaire est absolument nécessaire de manière à allier les apports complémentaires fournis par la chimie, la biochimie et les méthodes d'analyse structurale comme la radiocristallographie ou la RMN.

PARTIE EXPERIMENTALE

PARTIE EXPERIMENTALE DE LA PARTIE I

Synthèse du mime-DBF selon une nouvelle approche

1. Matériel et Méthodes

1.1. Solvants et réactifs

Les solvants anhydres sont obtenus par distillation en présence d'un agent desséchant :

- éther sur sodium/benzophénone
- DMF, TMEDA sur hydrure de calcium
- THF sur LiAlH_4

Toutes les réactions sensibles à l'eau sont conduites sous atmosphère d'argon.

Les réactifs de lithiation :

- Le *n*-BuLi est 1,6 M dans l'hexane.
- Le *s*-BuLi est 1,3 M dans un mélange cyclohexane / hexane (92/8).
- Le *t*-BuLi est 1,5 M dans du pentane.

1.2. Purification des produits:

Les chromatographies préparatives sur colonnes de silice sont effectuées sur gel de silice 60 (MACHERY-NAGEL), 0,04-0,063 mm / 230-400 mesh, à pression atmosphérique ou sous pression d'azote (chromatographie éclair (STILL et coll., 1978)).

1.3. Analyses

1.3.1. Les chromatographies sur couche mince de silice

Les chromatographies sur couche mince (CCM) sont réalisées sur des feuilles d'aluminium ALUGRAM SIL G/UV (MACHERY-NAGEL) enduites de gel de silice 60 avec indicateur de fluorescence, d'une épaisseur de 0,25 mm.

Les plaques sont révélées après élution par :

- la lumière ultraviolette (254 nm ou 365 nm)
- réaction avec KMnO_4 et éventuellement chauffées sur une plaque chauffante.

1.3.2. La résonance magnétique nucléaire

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ^1H (RMN ^1H) ont été réalisés sur un spectromètre Bruker DRX 300 (300 MHz), avec pour référence interne le résidu non deutéré du solvant utilisé (CHCl_3 : 7,26 ppm). Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm par rapport au TMS. Les différents signaux des spectres sont décrits avec (s) singulet, (d) doublet, (t) triplet, (dd) doublet de doublet, (m) massif.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ^{13}C (RMN ^{13}C) sont enregistrés sur le même appareil, à 75 MHz, en utilisant comme référence interne l'isotope ^{13}C du solvant utilisé (CDCl_3 : 77,7 ppm). La nature des différents carbones (primaire, secondaire, tertiaire ou quaternaire) est déterminée par des séquences de transfert de polarisation ^{13}C vers ^1H (séquences DEPT).

1.3.3. La spectrométrie de masse

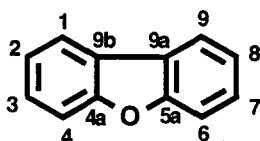
Les spectres de masse (SM) ont été effectués au Laboratoire de Spectrométrie de Masse (Université de Sciences et Technologies de Lille) par le Dr G. Ricart et sont mesurés sur un spectromètre NERMAG R 1010 H, en impact électronique (IE) ou couplé à une chromatographie en phase gaz (CG).

1.3.4. Les points de fusion

Les points de fusion ne sont pas corrigés et sont déterminés sur un appareil de fusion capillaire Büchi 530.

2. Dissymétrisation du dibenzofurane

Le dibenzofurane



RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) :

δ 8,00 (d, 2H, H₁, H₉, J₁₋₂=J₉₋₈=7,7 Hz); 7,63 (d, 2H, H₄, H₆, J₄₋₃=J₆₋₇=8,2 Hz); 7,51 (dd, 2H, H₃, H₇, J₃₋₄=J₇₋₈=8,2 Hz; J₃₋₂=J₇₋₈=7,3 Hz); 7,39 (dd, 2H, H₂, H₈, J₂₋₁=J₈₋₉=7,7 Hz; J₂₋₃=J₈₋₇=7,3 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) :

δ 156,6 (C_{4a}, C_{5a}); 127,57 (C₃, C₇); 124,7 (C_{9a}, C_{9b}); 123,1 (C₂, C₈); 121,1 (C₁, C₉); 112,1 (C₄, C₆).

2.1. Mono-lithiation du dibenzofurane**2.1.1. Essai avec *n*-BuLi**

100 mg (0,594 mmol) de dibenzofurane sont dissous dans 2,3 ml d'éther anhydre sous atmosphère inerte, à -78°C. 446 µl (0,713 mmol - 1,2 éq) de *n*-BuLi sont introduits goutte à goutte pendant 5 min. On laisse la température remonter jusqu'à 0°C et, après 1h45 de réaction, le milieu réactionnel, de couleur rouge brique, est hydrolysé avec 75 µl de D₂O (7 éq.). Après addition d'une solution tampon de KH₂PO₄ 20%, l'extraction est réalisée avec du dichlorométhane. La phase organique est filtrée sur Na₂SO₄, évaporée et le produit est séché. Un solide blanc (95 mg) est obtenu avec un rendement de 95%. L'analyse RMN ¹H montre que le dibenzofurane obtenu est mono-deutééré à 20%.

2.1.2. Essai avec *s*-BuLi

Après optimisation des paramètres durée de réaction et température, le protocole suivant a été retenu. 100 mg (0,594 mmol) de dibenzofurane sont dissous dans 2,3 ml d'éther anhydre, sous argon et à température ambiante. 548 µl (0,713 mmol - 1,2 éq.) de *s*-Buli sont ajoutés goutte à goutte pendant 5 min et la réaction est laissée sous agitation pendant 30 min. La solution est hydrolysée avec D₂O et traitée comme précédemment.

Température du fusion : 80-81°C (Litt.: 81-82 °C) (KEMP et coll., 1986a)

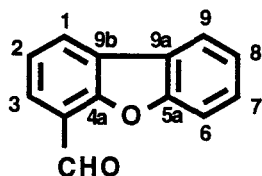
2.2. Préparation du 4-formyl-dibenzofurane

Le dérivé lithié est préparé comme indiqué dans le paragraphe précédent mais au lieu d'hydrolyser avec D₂O, 55 µl de DMF anhydre sont ajoutés pour former le dérivé α-N,N-diméthylaminoalcoxy. Le milieu réactionnel passe d'une couleur rouge brique à jaune pâle. Après 20 min de réaction à température ambiante, le milieu réactionnel est hydrolysé à 0°C avec un tampon KH₂PO₄ 20%. La phase organique est extraite avec du dichlorométhane, séchée sur

Na_2SO_4 et évaporée sous vide. Le formyl-dibenzofurane est ensuite purifié par chromatographie éclair sur colonne de silice en utilisant l'éluant suivant : cyclohexane 6 / dichlorométhane 4. L'évaporation des solvants fournit 74,4 mg (79%) de formyl-dibenzofurane.

Température de fusion : 85-86°C

R_f : 0,64 (dichlorométhane)



RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) :

δ 10,63 (d, 1H, CHO , $J_{\text{CHO}-2}=0,5$ Hz); 8,24 (dd, 1H, H_1 , $J_{1-2}=8,0$ Hz, $J_{1-3}=1,0$ Hz); 8,03 (ddd, 1H, H_9 , $J_{9-8}=8,0$ Hz, $J_{9-7}=1,4$ Hz, $J_{9-6}=0,7$ Hz); 8,00 (dd, 1H, H_3 , $J_{3-2}=8,0$ Hz, $J_{3-1}=1$ Hz); 7,73 (dt, 1H, H_6 , $J_{6-7}=8,0$ Hz, $J_{6-8}=J_{6-9}=0,7$ Hz); 7,57 (td, 1H, H_7 , $J_{7-6}=J_{7-8}=8,0$ Hz, $J_{7-9}=1,0$ Hz); 7,51 (td, 1H, H_2 , $J_{2-1}=J_{3-2}=8,0$ Hz, $J_{2-\text{CHO}}=0,5$ Hz); 7,45 (td, 1H, H_8 , $J_{8-7}=J_{8-9}=8,0$ Hz, $J_{8-6}=1,0$ Hz).

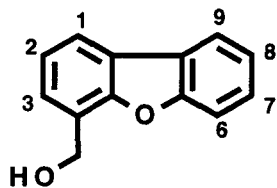
RMN ^{13}C (75 MHz), CDCl_3) :

δ 188,43 (CHO), 156,56 (C_{5a}); 155,85 (C_{4a}); 128,12 (C_3); 127,46 (C_7); 126,65 (C_9); 125,97 (C_6); 123,53 (C_2); 122,90 (C_8); 122,77 (C_{9a}); 121,22 (C_{9b}); 120,80 (C_1); 112,13 (C_4).

SM (IE) : m/z 196 (M^+ , 100%), 139 ($\text{M}-\text{CHO}-(\text{CO}+\text{H})$)

Alcool 14 : Produit secondaire formé suite à la réaction de Cannizzaro

Rendement : 9% quand l'hydrolyse est faite à t.a.



RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) :

δ 7,98 (d, H_1 , $J_{1-2}=7,63$); 7,92 (d, H_9 , $J_{9-8}=7,69$ Hz); 7,62 (d, H_4 , $J_{4-3}=8,17$ Hz); 7,51 (d, H_7 , $J_{7-8}=7,3$ Hz); 7,49 (t, H_3 , $J_{3-2}=J_{3-4}=6,82$ Hz); 7,38 (td, H_2 , $J_{2-1}=J_{2-3}=7,57$, $J_{2-4}=1,05$ Hz); 7,37 (t, H_8 , 7,56 Hz); 5,11 (s, 2H, CH_2OH)

SM (IE) m/z : 198 (M^+ , 100%), 181 ($\text{M}-\text{OH}$), 169 ($\text{M}-\text{CHO}$), 139 ($\text{M}-\text{CHO}-(\text{CO}+\text{H})$)

2.3. Optimisation de la lithiation de l'intermédiaire α -N,N-diméthylaminoalcoxy

2.3.1. Essai avec *s*-BuLi

Le dérivé α -N,N-diméthylaminoalcoxy est préparé comme décrit dans le paragraphe précédent mais au lieu de procéder à la réaction d'hydrolyse, l'intermédiaire subit une réaction de lithiation par addition au goutte à goutte de *s*-BuLi. L'optimisation de cette réaction a porté sur différents paramètres : durée de la réaction, température, nature et stoechiométrie de l'agent de lithiation, nature du solvant. Le milieu réactionnel est hydrolysé à 0°C, sous forte agitation, avec une addition rapide de D₂O (500 μ l - 50 éq.) suivie après 3 secondes de l'addition de tampon KH₂PO₄ 20%. La solution est ensuite traitée comme précédemment. Après purification par chromatographie éclair sur colonne de silice (éluant : cyclohexane 6/ dichlorométhane 4), le mélange de produits deutérés est analysé par RMN ¹H et SM IE afin d'en déterminer les différentes proportions.

2.3.2. Essai avec *t*-BuLi

Le même protocole que celui décrit dans le paragraphe précédent est utilisé. La deuxième lithiation est quant à elle réalisée avec 594 μ l (1,5 éq) de *t*-BuLi à -50°C et 2 expériences ont été réalisées où la deuxième réaction de lithiation est laissée respectivement 1,5 h et 3 h à -50°C. Après hydrolyse par D₂O, le milieu réactionnel est traité comme précédemment. Les rendements respectifs sont de 78 et 77%.

2.3.3. Essai avec ajout de cyclohexane

Un protocole identique à celui décrit dans le paragraphe 2.3.1. est utilisé mais lors des deux expériences tentées, 1,06 ml et 3,03 ml respectivement de cyclohexane anhydre sont introduits au milieu réactionnel avant l'addition de 914 μ l (2 éq.) de *s*-BuLi à 0°C pour réaliser la deuxième réaction de lithiation. Le traitement des réactions et la purification des produits se fait comme décrit précédemment. Les rendements respectifs sont de 60 et 63%.

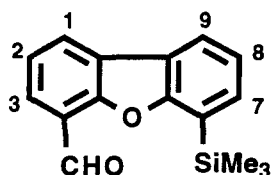
2.3.4. Silylation de l'intermédiaire α -N,N-diméthylaminoalcoxy

Le protocole décrit dans le paragraphe 2.3.1., avec 200 mg de dibenzofurane (1,188 mmol), est utilisé pour former l'intermédiaire α -N,N-diméthylaminoalcoxy, puis 215 mg (1,426 mmol - 1,2 éq) de TBDMSCl dissous dans de l'éther anhydre sont ajoutés au milieu réactionnel qui est laissé sous agitation à température ambiante pendant 17 h. Puis, 2 éq. *s*-BuLi

sont ajoutés à 0°C et la réaction est agitée pendant 30 min. Après hydrolyse, traitement de la réaction et purification, on obtient 153,1 mg (65%) de produit.

2.4. Piégeage par le chlorure de triméthylsilyle (TMS-Cl)

1,65 ml de *s*-BuLi sont ajoutés goutte à goutte à une solution de dibenzofurane (300 mg - 1,79 mmol) dissous dans 6,9 ml d'éther anhydre. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 30 min. 165 μ l (2,14 mmol) de DMF sont ajoutés et après 20 min de réaction, la température est descendue à 0°C pour la deuxième addition de *s*-BuLi (2,75 ml - 3,57 mmol). Après 30 min d'agitation, 907 μ l (7,14 mmol) de chlorure de triméthylsilyle fraîchement distillé sont ajoutés à 0°C. Deux temps de réaction ont été testés : **réaction 1** : 1h15 à 0°C puis 45 min à température ambiante et **réaction 2** : 17 h à température ambiante. La réaction est stoppée par addition de tampon KH_2PO_4 20% à 0°C et sous forte agitation. Après extraction avec du dichlorométhane, les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et évaporées sous vide. La purification par chromatographie sur colonne de silice (cyclohexane 3/ dichlorométhane 1) permet d'obtenir les différents produits. Pour chaque dérivé et pour les réactions 1 et 2 sont indiqués : d'une part, le rendement isolé (déterminé à partir du dibenzofurane), et d'autre part, le ratio de chaque composé obtenu par analyse du spectre RMN du brut réactionnel, où l'on intègre le signal du proton aldéhydique correspondant à chaque espèce.



Réaction 1 : rendement isolé: 25 %

ratio déterminé par RMN ^1H : 49 %

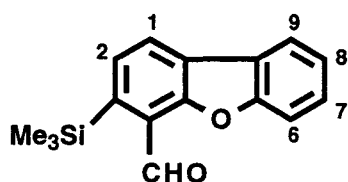
Réaction 2 : rendement isolé: 46 %

ratio déterminé par RMN ^1H : 72 %

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) :

δ 10,73 (d, 1H, CHO , $J_{\text{CHO}-2}=0,5$ Hz); 8,22 (dd, 1H, H_1 , $J_{1-2}=8,0$ Hz, $J_{1-3}=1$ Hz); 8,03 (dd, 1H, H_9 , $J_{9-8}=8$ Hz, $J_{9-7}=1,0$ Hz); 7,99 (dd, 1H, H_3 , $J_{3-2}=8,0$ Hz, $J_{3-1}=1,0$ Hz); 7,63 (dd, 1H, H_7 , $J_{7-8}=8,0$ Hz, $J_{7-9}=1,0$ Hz); 7,49 (td, 1H, H_2 , $J_{2-1}=J_{2-3}=8,0$ Hz, $J_{2-\text{CHO}}=0,5$ Hz); 7,44 (t, 1H, H_8 , $J_{8-7}=J_{8-9}=8,0$ Hz); 0,52 (s, 9H, SiMe_3).

SM (IE) : 268 (M^+), 253 ($\text{M}-\text{CH}_3$).



Réaction 1 : rendement isolé: 4 %

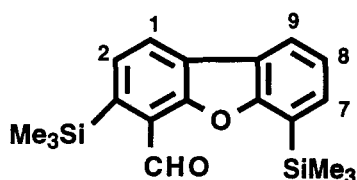
ratio déterminé par RMN ¹H : 9 %

Réaction 2 : rendement isolé: 4 %

ratio déterminé par RMN ¹H : 8 %

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) :

δ 10,91 (d, 1H, CHO, J_{CHO-2}=0,5 Hz); 8,16 (d, 1H, H₁, J₁₋₂=8,0 Hz); 8,01 (m, 1H, H₉); 7,69 (m, 2H, H₂ et H₆); 7,54 (td, 1H, H₇, J₇₋₆=J₇₋₈=8,0 Hz, J₇₋₉=1,0 Hz); 7,43 (td, 1H, H₈, J₈₋₇=J₈₋₉=8 Hz, J₈₋₆=1,0 Hz); 0,42 (s, 9H, SiMe₃).



Réaction 1 : rendement isolé: 2 %

ratio déterminé par RMN ¹H : 5 %

Réaction 2 : rendement isolé: 2 %

ratio déterminé par RMN ¹H : 4 %

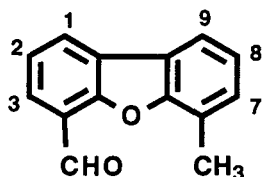
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) :

δ 10,95 (d, 1H, CHO, J_{CHO-2}=0,5 Hz); 8,16 (d, 1H, H₁, J=8,0 Hz); 8,03 (dd, 1H, H₉, J₉₋₈=8 Hz, J₉₋₇=1,0 Hz); 7,69 (dd, 1H, H₂, J₂₋₁=8 Hz J_{2-CHO}=0,5 Hz); 7,63 (dd, 1H, H₇, J₇₋₈=8 Hz, J₇₋₉=1,0 Hz); 7,43 (t, 1H, H₈, J₈₋₇=J₈₋₉=8,0 Hz); 0,51 (s, 9H, SiMe₃); 0,43 (s, 9H, SiMe₃).

SM (IE) : 340 (M⁺), 325 (M-CH₃).

2.5. Piégeage par l'iodure de méthyle

Cette réaction s'effectue dans les mêmes conditions que pour le piégeage avec le chlorure de triméthylsilyle en utilisant 445 μl (4 éq. - 7,144 mmol) d'iodure de méthyl distillé. A l'issue de la réaction, la purification sur colonne de silice utilisant le mélange de solvants toluène 6/ cyclohexane 4, permet d'obtenir les différents dérivés dont les proportions sont indiquées dans le tableau ci-après.



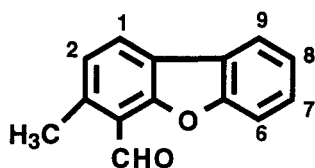
rendement isolé : 57 %

ratio déterminé par RMN ^1H : 79 %RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) :

δ 10,72 (d, 1H, CHO, $J_{\text{CHO}-2}=0,5$ Hz); 8,20 (dd, 1H, H_3 ou H_1 , $J=8,0$ Hz, $J=1,0$ Hz); 7,99 (dd, 1H, H_1 ou H_3 , $J=8,0$ Hz, $J=1,0$ Hz); 7,84 (m, 1H, H_7 ou H_9); 7,49 (td, 1H, H_2 , $J_{2-1}=J_{3-2}=8$ Hz, $J_{2-\text{CHO}}=0,5$ Hz); 7,37 (m, 1H, H_7 ou H_9); 7,34 (t, 1H, H_8 , $J_{8-9}=J_{8-7}=8,0$ Hz); 2,69 (d, 3H, Me, $J_{\text{Me}-7}=0,5$ Hz).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) :

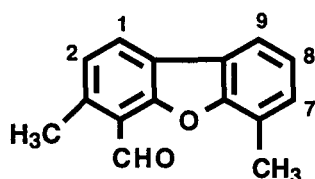
δ 188,66 (CHO); 132,82 (C_9 ou C_7), 127,18 (C_3 ou C_1), 126,86 (C_1 ou C_3), 123,91 (C_8), 123,22 (C_2), 118,58 (C_7), 15,65 (CH_3).

SM (IE) : 210 (M^+), 181 (M-CHO), 152 (181-(CO+H)).

rendement isolé : 7 %

ratio déterminé par RMN ^1H : 8 %RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) :

δ 10,95 (d, 1H, CHO, $J_{\text{CHO}-2}=0,5$ Hz); 8,05 (d, 1H, H_1 , $J_{1-2}=8,0$ Hz); 7,97 (ddd, 1H, H_9 , $J_{9-8}=8,0$ Hz, $J_{9-7}=1,4$ Hz, $J_{9-6}=0,7$ Hz); 7,68 (dt, 1H, H_6 , $J_{6-7}=8,0$ Hz, $J_{6-8}=J_{6-9}=0,7$ Hz); 7,52 (td, 1H, H_7 , $J_{7-8}=8,0$ Hz, $J_{7-9}=1,0$ Hz); 7,42 (td, 1H, H_8 , $J_{8-7}=J_{8-9}=8,0$ Hz, $J_{8-6}=1,0$ Hz); 7,26 (dd, 1H, H_2 -CHO=0,5 Hz); 2,85 (s, 3H, Me).

SM (IE) : 210 (M^+), 181 (M-CHO), 152 (181-(CO+H))

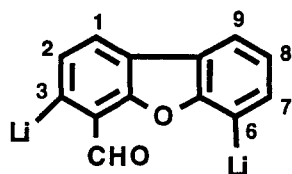
rendement isolé: 4 %

ratio déterminé par RMN ^1H : 4 %RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) :

δ 10,98 (d, 1H, CHO, $J_{\text{CHO}-2}=0,5$ Hz); 8,00 (d, 1H, H_1 , $J=8,0$ Hz); 7,77 (m, 1H, H_7 ou H_9); 7,31 (m, H_8 et H_7 ou H_9); 7,22 (dd, 1H, H_2 , $J_{2-1}=8,0$ Hz, $J_{2-\text{CHO}}=0,5$ Hz); 2,82 (s, 3H, Me); 2,65 (s, 3H, Me).

SM (IE) : 224 (M^+), 195 (M-CHO), 165 (M-CO)

2.6. Essai de formation du dérivé α -N,N-diméthylaminoalcoxy lithié en position 3 et 6.



2.6.1. Essai avec un excès de *s*-BuLi

Le protocole décrit dans le paragraphe 2.3.1. est utilisé mais on ajoute 1,83 ml (4 éq.) de *s*-BuLi lors de la deuxième réaction de lithiation. Deux expériences ont été réalisées où la réaction est laissée à température ambiante 30 min et 17 h respectivement. Les produits sont purifiés comme indiqué dans le paragraphe 2.3.1. et les rendements respectifs sont de 62 et 61 %.

2.6.2. Essai avec la tétraméthyléthylènediamine (TMEDA)

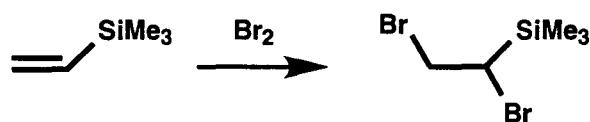
Le dérivé α -N,N-diméthylaminoalcoxy est formé comme décrit précédemment (§ 2.3.1.) et, avant l'addition de *s*-BuLi (548 μ l - 4 éq.), 359 μ l (2,38 mmol - 4 éq.) de TMEDA anhydre sont ajoutés au milieu réactionnel. Après 30 min de réaction à température ambiante la réaction est traitée comme indiqué précédemment.

Deux autres conditions ont été testées :

- 1) 1,5 éq. de *s*-BuLi et 1,5 éq. de TMEDA, à 0°C, pendant 30 min
- 2) 4 éq. de *s*-BuLi et 4 éq. de TMEDA, à température ambiante, pendant 17 h.

3. Synthèse du synthon silylé

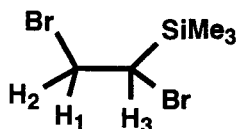
3.1. Bromation du vinyltriméthylsilane



10 ml (64,7 mmol) de vinyltriméthylsilane sont dilués dans 10 ml de dichlorométhane. 3,8 ml de Br₂ (1,2 éq) sont additionnés goutte à goutte à 0°C. Après 1h15 de réaction une coloration brune persistante indique l'excès de Br₂, l'addition est alors stoppée. Après évaporation sous vide, on obtient 18,0 g de produit analysé par RMN ¹H.

Rendement : 96%

Rf : 0,65 (cyclohexane) (révélation KMnO₄)



RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) :

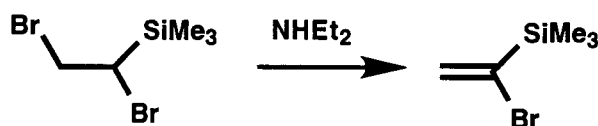
δ 3,97 (dd, 1H, H_1 ou H_2 , $J=10,5$ Hz, $J=4,5$ Hz); 3,70 (t, 1H, H_3 , $J=10,5$ Hz); 3,48 (dd, 1H, H_1 ou H_2 , $J=10,5$ Hz, $J=4,5$ Hz); 0,20 (s, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) :

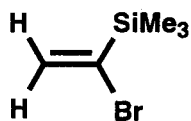
δ 43,12 (CH); 36,80 (CH_2), 2,01 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

SM (IE) m/z : 245 (M-15), 179 (M-Br), 152 ($(\text{CH}_3)_3\text{SiBr}$), 137 ($(\text{CH}_3)_2\text{SiBr}$), 73 ($(\text{CH}_3)_3\text{Si}$).

3.2. Synthèse du 1-bromo-vinyltriméthylsilane



Dans un ballon muni d'un chandelier et d'un piège à CaCl_2 , on ajoute au 1,2-dibromo 1-triméthylsilyl éthane (16,5 g - 64,1 mmol) 13,2 ml de diéthylamine (2 éq.) à température ambiante. L'avancement de la réaction est de 80% après 3 jours, 0,5 éq de diéthylamine sont alors ajoutés, et la température est montée à 55°C . L'analyse RMN ^1H montre que la réaction est terminée après 4 jours de réaction. Le milieu réactionnel très épais est filtré et le solide est lavé à l'éther. La diéthylamine est neutralisée par addition de HCl 10%, puis la phase organique est lavée avec du tampon KH_2PO_4 10% jusqu'à obtenir pH 7, filtrée sur Na_2SO_4 , et évaporée sous vide. Le produit obtenu est ensuite purifié par distillation ($T_{\text{éb}} = 26^\circ\text{C}$ à 15 mm Hg) pour donner 6,8 g (60%) d'un liquide incolore.



RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) :

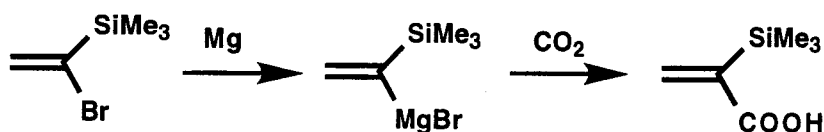
δ 6,30 (d, 1H, CH_1 , $J_{\text{H-H}}=1,8$ Hz); 6,22 (d, 1H, CH_2 , $J_{\text{H-H}}=1,8$ Hz); 0,22 (s, 9H $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) :

δ 138,36 (C-Br); 128,79 (CH_2); -1,75 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

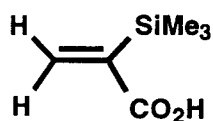
SM (IE): 178 (M^+); 163 (M-15); 139 ($\text{BrSi}(\text{CH}_3)_2$); 72 (SiMe_3).

3.3. Synthèse de l'acide α -triméthylsilyl acrylique (acide 2-triméthylsilyl prop 2-énoïque)



La première étape est la préparation du magnésien. 402 mg (6,56 mmol) de magnésium sont introduits dans un ballon placé sous atmosphère inerte et 4 ml de THF anhydre sont ajoutés. Le magnésium est activé par quelques cristaux d'iode. Le 1-bromo-vinyltriméthylsilane (1g - 5,6 mmol) est dissous dans 8 ml de THF anhydre puis additionné sur le magnésium au goutte à goutte en 15 min. Un léger échauffement refroidi par un bain d'eau est observé. Puis la solution est placée au reflux du THF pendant 2h. La deuxième étape est la carboxylation. La carboglace est lavée avec du THF anhydre afin d'éliminer le maximum d'eau. A -78°C le magnésien est additionné sur la carboglace. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 20 min à -20°C . Puis on laisse remonter la température à température ambiante. Lorsque la carboglace a disparu, l'hydrolyse se fait par addition de tampon KH_2PO_4 10%. Après extraction au dichlorométhane, la phase organique est filtrée sur Na_2SO_4 puis évaporée sous vide. L'acide α -triméthylsilyl acrylique est obtenu sous forme de cristaux incolores avec 86% de rendement ($m = 1,73$ g).

Rf : 0,71 (CH_2Cl_2 9 / Acétate d'éthyle 1) Révélation KMnO_4 .



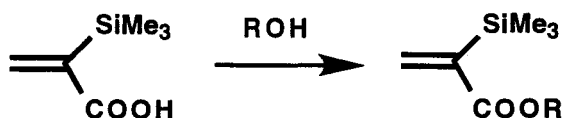
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) :

δ 6,92 (d, 1H, CH1, $J_{\text{H-H}}=2,8$ Hz); 6,16 (d, 1H, CH2, $J_{\text{H-H}}=2,8$ Hz); 0,22 (m, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$)

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) :

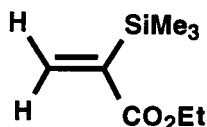
175,40 (CO_2H); 144,10 (C- CO_2H); 141,89 (CH_2); -1,13 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$)

3.4. Estérification de l'acide α -triméthylsilyl acrylique



3.4.1. Estérification avec l'éthanol

Un ballon bicol de 100 ml muni d'un soxhlet avec tamis moléculaire 4 Å est séché sous vide à l'aide d'un pistolet thermique et sous atmosphère d'argon, l'acide α -triméthylsilyl acrylique est dissous dans l'éthanol (30 ml) puis transféré dans le ballon. 88 mg de pTSA sont ajoutés. On place le milieu réactionnel au reflux de l'éthanol et après 2h20, la CCM n'indique pas la formation de l'ester. 2 ml de H_2SO_4 sont alors ajoutés et après 1h45 de réaction l'acide de départ a disparu. H_2SO_4 est neutralisé par addition de NaHCO_3 pour obtenir un pH proche de 7. Le produit est extrait avec de l'éther puis la phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et évaporée mais le produit est volatil.



RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ 5,58 (d, 1H, CH, $J_{\text{H-H}}=2,1$ Hz); 5,39 (d, 1H, CH, $J_{\text{H-H}}=2,1$ Hz); 4,22 (t, 3H, CH_3 , $J=5,0$ Hz); 2,75 (d, 2H, CH_2 , $J=5,0$ Hz); 0,13 (m, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

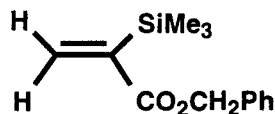
CG-SM: m/z 157 (M- CH_3); 127 (M-OEt); 113 (127- CH_3 +H); 73 ($(\text{CH}_3)_3\text{Si}$).

3.4.2. Estérification avec l'alcool benzylique

Dans un ballon de 50 ml sont placés 600 mg (4,17 mmol) d'acide α -triméthylsilyl acrylique, 945 mg (1,1 éq. - 4,58 mmol) de DCC et 50,9 mg (0,1 éq. - 0,42 mmol) de DMAP. Sous atmosphère inerte et à température ambiante, on ajoute 11 ml d'éther anhydre et 473 ml (1,1 éq. - 4,58 mmol) d'alcool benzylique distillé sous vide. Après 1h de réaction, la dicyclohexylurée est filtrée. Le filtrat est lavé avec le tampon KH_2PO_4 10%, puis l'extraction du produit est réalisée avec de l'éther de pétrole. Après séchage sur Na_2SO_4 , la phase organique est évaporée sous vide. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice utilisant comme éluant le mélange cyclohexane 7 / dichlorométhane 3. Le rendement est de 17% (162,6 mg) pour l'ester silylé et l'on obtient 15% (98,7 mg) de produit désilylé.

Rf : Ester silylé (2-60A) 0,71 (CH₂Cl₂)
 Ester désilylé (2-60B) 0,61 (CH₂Cl₂)

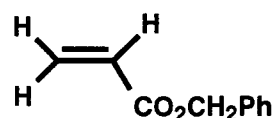
Ester silylé :



RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) :

δ 7,39 (m, 5H, ArH); 6,86 (d, 1H, H₁, J_{H-H}= 2,87 Hz); 6,07 (d, 1H, H₂, J_{H-H}= 2,87 Hz);
 5,22 (s, 2H, CH₂); 0,17 (m, 9H, Si(CH₃)₃).

Ester désilylé :



RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) :

δ 7,39 (m, 5H, ArH); 6,48 (d, 1H, H₁, J_{H1-H3}=16,0 Hz); 6,20 (dd, 1H, H₃, J_{H3-H1}=16,0 Hz,
 J_{H3-2}= 11,8 Hz); 5,89 (d, 1H, H₂, J_{H2-3}= 11,8 Hz); 5,24 (s, 2H, CH₂).

3.5. Réaction d'addition de l'ester vinylique silylé

L'intermédiaire α-N,N-diméthylaminoalcoxy **8** est formé comme décrit dans le paragraphe 2.3.1. à partir de 50 mg (0,298 mmol) de dibenzofurane recristallisé. Après addition de 457 μl (2 éq.) de *s*-BuLi, la réaction est laissée 30 min sous agitation à 0°C puis 155 mg (2,2 éq.) de l'ester vinylique silylé sont ajoutés. Le milieu réactionnel est d'abord laissé 30 min à 0°C puis 17 h à température ambiante. L'hydrolyse se fait à 0°C avec l'addition de tampon KH₂PO₄ 10%. Le produit est extrait avec du dichlorométhane et la phase organique est ensuite séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. La purification du produit est effectuée en deux étapes : une première chromatographie gravitationnelle sur colonne de silice (éluant : toluène 7 / cyclohexane 3) puis une chromatographie éclair sur colonne de silice (éluant : cyclohexane 92 / AcOEt 8). L'évaporation des solvants donne 37,5 mg (30% à partir du dibenzofurane) de produit sous forme d'une huile jaune.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : 10,69 (s, 1H, CHO); 8,20 (dd, 1H, H₁ ou H₃, J=8,0 Hz, J=1,0 Hz); 8,00 (dd, 1H, H₁ ou H₃, J=8,0 Hz, J=1,0 Hz); 7,84 (dd, 1H, H₇ ou H₉, J=7,6 Hz,

$J=1,4$ Hz); 7,49 (t, 1H, H_2 , $J=7,6$ Hz); 7,39-7,18 (M, H_7 ou H_9 , H_8 , 5ArH), 5,04 (s, 2H, CH_2Bn); 3,39 (m, 2H, CH_2); 2,73 (m, 1H, $CHSiMe_3$); 0,23 (m, 9H, $Si(CH_3)_3$).

PARTIE EXPÉRIMENTALE DES PARTIES II ET III

Incorporation du mime-DBF dans la scyllatoxine et B1G

SYNTHESE PEPTIDIQUE

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Matériel

Les agents de couplage

- HBTU: 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium hexafluorophosphate (Propeptide)
- HOBt: 1-Hydroxy-benzotriazole (Acros)
- BOP: Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium hexafluorophosphate (Propeptide)
- PyBrop: Bromo-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate (Novabiochem)

Les solvants et réactifs

- DMF (Carlo Erba) mis en contact d'oxyde d'alumine acide (Fluka) (environ 80 g pour 2,5 l), pendant environ 1 heure puis filtré et stocké sur tamis moléculaire 4 Å.
- 1-N-méthyl-2-pyrrolidone, dichlorométhane
- TFA, pipéridine, anhydride acétique, DIEA, (Aldrich)
- dibenzofurane (Acros) recristallisé dans de l'éthanol
- *scavengers* : thioanisole, *p*-crésol, éthanedithiol, phénol (Aldrich)
- glutathion réduit et oxydé (Aldrich)

1.2. Méthodes

1.2.1. Suivi des synthèses

1.2.1.1. Test de Kaiser

Un échantillon de résine est prélevé du réacteur, lavé à l'éthanol et deux gouttes de chacune des solutions suivantes sont ajoutées:

- Solution Phénol/Ethanol: 80 mg de phénol dans 20 ml d'éthanol
- Solution Ninhydrine/Ethanol : 500 mg de ninhydrine dans 10 ml d'éthanol
- Solution KCN/Pyridine : KCN 20 μ M dans la pyridine

Les tubes sont placés à 120°C pendant 5 min. Les fonctions α -NH₂ libres réagissent avec la ninhydrine pour donner un produit qui absorbe dans le visible (coloration bleue).

Test de Kaiser quantitatif :

Un échantillon de résine est prélevé, lavé à l'éthanol, séché et 10 mg de résine sèche sont placés dans un tube à hémolyse. On ajoute ensuite :

- 75 μ l de la solution Phénol/Ethanol
- 100 μ l de la solution Ninhydrine/Ethanol
- 75 μ l de la solution KCN/Pyridine

Après 7 min à 120°C, le nombre de micromoles de fonctions amines libres peut être déterminé en appliquant la formule suivante:

$$\frac{(\text{Abs}_{570 \text{ nm}}^{\text{éch.}} - \text{Abs}_{570 \text{ nm}}^{\text{blanc}}) \times \text{Fd (ml)} \times 10^6}{\epsilon_{570 \text{ nm}} \times \text{M (mg)}}$$

Où : Fd = facteur de dilution (5 ml) ; $\epsilon_{570 \text{ nm}} = 15000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; M = masse de résine (mg)

Et le pourcentage de couplage vaut :

$$1 - \left(\frac{[\text{amine}] (\mu\text{mole/g})}{\text{subst. initiale} (\mu\text{mole/g})} \right) \times 100$$

1.2.1.2. Test TNBS

Un échantillon de résine est prélevé, lavé avec de l'éthanol (2 fois) puis avec une solution de DIEA 10% dans le DMF (1 fois). Une goutte de TNBS (acide 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique) est ajoutée sur la résine, et on laisse agir pendant 1 min. La résine est lavée avec la solution de DIEA 10 % et les billes sont observées à l'aide d'une loupe. Le test est positif si les billes sont colorées en jaune orange ou rouge, et négatif si elles sont incolores.

1.2.2. Analyse et Purification des peptides

1.2.2.1. HPLC analytiques

Colonne: nucléosil ou Vydak 20 cm
C18, 300 Å, 7 µm, 0,46 × 25 cm

Eluants: tampon A : H₂O + 0,05% TFA
tampon B : CH₃CN/H₂O (6/4) + 0,05% TFA

Débit: 1 ml/min

Détection: 215 nm

Gradients d'élution suivant les analyses:

- 30% B à 90% B en 1 h (scyllatoxine-DBF)
- 0% B à 100% B en 40 min (B1G-DBF)

1.2.2.2. HPLC préparatives

Colonne: nucléosil C18, 100 Å, 5 µm, 1 × 50 cm
ou CN, 100 Å, 5 µm, 1 × 50 cm

Eluants: tampon A : H₂O + 0,05% TFA
tampon B : CH₃CN/H₂O (6/4) + 0,05% TFA

Débit: 2 ml/min

Détection: 280 nm

Gradients d'élution suivant les cas:

- 30% à 70% en 1 h (colonne C18 Nucléosil - purification de scyllatoxine-DBF)
- 30% B à 100% B en 90 min (colonne C18 Nucléosil - purification de B1G-DBF)
- 30% B à 100% B en 90 min (colonne CN -purification de B1G-DBF)

1.2.2.3. Chromatographie d'échange d'ions

a - Echange d'ions analytique

Colonne: AX 300 Aquapore, 7 µm, 4,6 × 100 mm

Eluants: tampon A': Bis-tris propane 20 mM
KCl 10 mM
Ajustement pH 6,5 avec HCl 1 M

tampon B': Bis-tris propane 20 mM
KCl 500 mM
Ajustement pH 6,5 avec HCl 1 M

Débit: 0,7 ml/min

Détection: 215 nm
Gradient: - équilibration 15 min à 0% B'
- 0% à 100% B' en 98 min

b - Echange d'ions préparative

Colonne: Gel Q Sépharose (Pharmacia), 16 × 145 mm
Eluants: tampon A': Bis-tris propane 20 mM
KCl 10 mM
Ajustement pH 6,5 avec HCl 1 M
tampon B': Bis-tris propane 20 mM
KCl 500 mM
Ajustement pH 6,5 avec HCl 1 M
Débit: 0,78 ml/min
Détection: 215 nm
Gradient: - équilibration 25 min à 0% B'
- 0% à 100% B' en 163 min

2. STRATEGIE FMOC - SYNTHÈSE DE SCYLLATOXINE-DBF

2.1. Matériel

La résine : Résine Rink Amide : résine 4-(2',4'-diméthoxyphényl-Fmoc-aminométhyl)-phénoxy (Novabiochem)
Charge : 0,47 mmole/g

Les acides aminés Fmoc protégés :

Fmoc-Arg(Pmc)-OH	Fmoc-Cys(Trt)-OH	Fmoc-Lys(Boc)-OH
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	Fmoc-Gln(Mtt)-OH	Fmoc-Ser(tBu)-OH
Fmoc-Cys(Acm)-OH	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	Fmoc-Thr(tBu)-OH
Fmoc-Cys(Mob)-OH	Fmoc-His(Trt)	

Abréviations : Pmc : 2,2,5,5,7,8-pentaméthylchroman-6-sulfonyle; *t*Bu : *tert*iobutyl; Acm : acétamidométhyl; Mob : *p*-méthoxybenzyle; Trt : trityle; Mtt : méthyltrityle; Boc : *tert*io-butyloxy carbonyle.

2.2. Protocole de synthèse de la scyllatoxine-DBF

La scyllatoxine modifiée avec le mime de coude β à structure dibenzofurane (scyllatoxine-DBF) a été synthétisée manuellement selon une stratégie Fmoc/*t*-Butyle et sur 0,5 mmole de résine.

Déprotection	DMF	2 × 2 min
	Pipéridine	2 × 12 min
	DMF	3 × 2 min
Couplage	acide aminé (4 éq.)	
	HOBt/HBTU (3,6 éq.)	30-60 min
	DIEA (8 éq.) dans DMF	
Lavage	DMF	3 × 2 min
Capping	CH ₂ Cl ₂	2 × 2 min
	DIEA 5% dans CH ₂ Cl ₂	2 × 2 min
	Ac ₂ O 10% dans CH ₂ Cl ₂	1 × 10 min
	CH ₂ Cl ₂	2 × 2 min

Suivant les difficultés de synthèse rencontrées, des couplages multiples ont été effectués utilisant les agents HOBt/HBTU ou BOP ou PyBrop :

N° aa	31	30	29	28	27	26	25	24,23	22	21	20	19	18	17	16
	H	K	V	C	E	C	K	DBF	I	C	K	G	L	L	G
c o u p l a g e	a	2	2	2	2	2	3	3	3	2	3	2	3	3	3
	b	1:H 2:H	1:H 2:H	1:H 2:H	1:H 2:H	1:H 2:H	1:H 2:H	1:H 2:H 3:H	1:H 2:P 3:P	1:H 2:H 3:H	1:H 2:H 3:H	1:H 2:H 3:H	1:H 2:H 3:H	1:H 2:H 3:H	1:H 2:H 3:H
N° aa	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
	L	S	R	C	S	L	Q	C	M	R	L	N	C	F	A
c o u p l a g e	a	3	3	3	3	3	5	3	4	3	3	3	3	2	3
	b	1:H 2:H 3:H Δ ^c	1:H 2:H 3:H Δ	1:H 2:H 3:H Δ	1:H 2:H 3:H Δ	1:H 2:H 3:H	1:H 2:H 3:H	1:H 2:H 3:H 4:H 5:B	1:H 2:H 3:P 4:P	1:H 2:P 3:H 4:P	1:H 2:H 3:P 4:B	1:B 2:B 3:B	1:B 2:B 3:P	1:B 2:B 3:P	1:B 2:B 3:P

Tableau 1 : Protocole de couplage des acides aminés lors de la synthèse de la scyllatoxine-DBF. **a.** Nombre total de couplages; **b.** détail des couplages : le numéro de couplage est suivi de l'agent de couplage utilisé selon les abréviations suivantes H : HBTU/HOBt, B : BOP et P : PyBrop; **c.** Δ indique que le couplage et la déprotection ont été faits à 40°C.

Remarque : Plusieurs cycles de déprotection ont été nécessaires pour la déprotection de Gly 19 (4 traitements à la pipéridine), Leu 18 à Gly 16 et Ser 11 (3 traitements).

- Couplage du mime-DBF(Fmoc)**
- 1er couplage : 1,3 éq. mime-DBF(Fmoc), 1,2 éq. HOBt/HBTU, 3,3 éq. DIEA, DMF - 1 h
 - 2ème couplage : 1,3 éq. mime-DBF(Fmoc), 1,3 éq. PyBrop, 3,3 éq. DIEA, DMF - 1h
 - 3ème couplage : idem 2ème couplage

Remarque : un problème de solubilité du mime-DBF(Fmoc) dans le mélange de couplage a été observé et résolu par l'addition de 0,7 éq. de DIEA.

2.3. Coupure de la liaison peptide-résine et déprotection des chaînes latérales

La coupure de la liaison peptide-résine et la déprotection simultanée des protections des chaînes latérales sont effectuées selon le protocole décrit par Applied Biosystems. Le mélange de coupure contient les *scavengers* classiquement utilisés et du dibenzofurane :

TFA	10 ml	éthanedithiol	0,25 ml
eau	0,5 ml	thioanisole	0,5 ml
phénol 750 mg		dibenzofurane	380 mg

Le mélange de coupure est ajouté à la résine et la réaction est laissée 3 h sous agitation à température ambiante. La résine est ensuite filtrée et le peptide est précipité dans l'éther, centrifugé à 2000 tr/min pendant 5 min et remis en suspension dans l'éther puis recentrifugé. Le peptide est ensuite dissous dans le chlorure de guanidinium 6 M contenant 100 mg de DTT, avant d'être purifié.

2.4. Repliement oxydatif de la scyllatoxine-DBF

A l'issue de la réaction de coupure de la liaison peptide/résine et déprotection simultanée des chaînes latérales, le peptide dont les 6 cystéines sont sous forme réduite, est pré-purifié par HPLC préparative sur colonne C18 Nucléosil (gradient : 30% B à 70% B en 1 h). Le peptide est ensuite lyophilisé et repris dans un volume minimum de TFA pour être oxydé dans les conditions d'oxydation suivantes :

- concentration en peptide : 10^{-5} M
- tampon NH_4HCO_3 0,33 M
- couple redox : glutathion réduit (GSH) 4 mM et glutathion oxydé (GSSG) 2 mM
- température 4°C

Le peptide dissous dans le TFA est ajouté goutte à goutte à la solution d'oxydation placée sous forte agitation. Après 17 h, la solution est acidifiée (pH=2) par addition de TFA puis filtrée sur filtre Millipore (22 μm) et appliquée sur une colonne préparative Nucléosil (débit de 5 ml/min). Le peptide oxydé est élué en utilisant le gradient 30% à 65% B en 1 h. Une purification supplémentaire est effectuée sur colonne CN avec le gradient : 20% à 50% B en 90 min. Le rendement final est de 0,3%. L'analyse du peptide final est faite par HPLC analytique, électrophorèse capillaire, analyse de la composition en acides aminés et spectrométrie de masse en mode électrospray.

3. STRATEGIE BOC - SYNTHÈSE DE B1G-DBF

3.1. Matériel

La résine : *t*-Boc-Glu(OBzl)OCH₂ phényl acétamidométhyl (PAM)
(Applied Biosystem)
Charge: 0,70 mmol/g

Les acides aminés Boc protégés :

Boc-Asn(Trt)-OH	Boc-Glu(OcHx)-OH	Boc-Thr(Bzl)-OH
Boc-Asp(OcHx)-OH	Boc-Lys(2ClZ)-OH	Boc-Trp(Formyl)-OH
Boc-Gln(Trt)-OH	Boc-Ser(Bzl)-OH	Boc-Tyr(2BrZ)-OH

Abréviations: Trt : trityle ; cHx : cyclohexyle ; 2ClZ : 2-chlorobenzoyloxycarbonyle ; 2BrZ : 2-bromobenzoyloxycarbonyle

3.2. Protocole de synthèse de B1G-DBF

La synthèse du domaine B1 de la protéine G modifié avec le mime de coude β à structure dibenzofurane (B1G-DBF) a été effectuée en deux parties. Avant l'incorporation du mime (Glu 56 à Leu 12) la synthèse est réalisée en automatique sur un synthétiseur ABI 430 (Applied Biosystem). L'incorporation du mime et la suite de la synthèse (Gly 9 à Thr 2) sont faites manuellement. La synthèse a été effectuée sur 0,25 mmole de résine.

3.2.1. Synthèse en automatique

La synthèse de B1G-DBF a été effectuée en automatique de Glu 56 à Leu 11, puis le mime-DBF a été incorporé manuellement ainsi que les acides aminés Gly 9 à Thr 2.

Appareil : synthétiseur ABI 430 (Applied Biosystem)

Programmes: - double couplage Neutralisation *in situ* avec capping
- couplage sur Glu et après Glu : pas de rinçage NMP pour éviter la formation de pyroglutamine

Déprotection :	TFA 30% / CH ₂ Cl ₂	3 min
	TFA 50% / CH ₂ Cl ₂	17 min

Couplage :	<ul style="list-style-type: none"> • acide aminé 4 éq. soit 1 mmol • HOBt / HBTU (0,45M) 3,6 éq soit 0,9 mmol • DIEA 8 éq. soit 2 mmol • NMP 33% dans DMF 	
-------------------	---	--

↳ Incubation pendant 9 min puis transfert sur résine - Couplage 30 min puis :

• DMSO (10% final) : puis suite du couplage pendant 16 min

Capping :	DIEA 5% / CH ₂ Cl ₂	3 × 2 min
	CH ₂ Cl ₂	2 × 2 min
	Ac ₂ O 10%/DIEA 5% / CH ₂ Cl ₂	1 × 2 min
	Ac ₂ O 10% / CH ₂ Cl ₂	1 × 4 min
	CH ₂ Cl ₂	3 × 2 min

3.2.2. Couplage du mime-DBF(Boc)

1^{er} couplage : 3 éq. mime-DBF(Boc), 2,7 éq. HOBt/HBTU, 9 éq. DIEA, DMF - 1h

2^{ème} couplage : 2 éq. mime-DBF(Boc), 1,8 éq. HOBt/HBTU, 6 éq. DIEA, DMF - 50 min

3^{ème} couplage : idem 2^{ème} couplage

3.2.3. Synthèse manuelle

Après l'incorporation du mime, la synthèse est effectuée manuellement selon le protocole décrit ci-après:

Déprotection	CH ₂ Cl ₂	2 × 2 min
	TFA 50% / CH ₂ Cl ₂ (+ dibenzofurane 3 éq. + thioanisole 1%)	1 × 2 min
	TFA 50% / CH ₂ Cl ₂ (+ dibenzofurane 3 éq.+ thioanisole 1%)	1 × 20 min
	CH ₂ Cl ₂	4 × 2 min

Couplage	<ul style="list-style-type: none"> • 1^{er} et 2^{ème} couplages : acide aminé (4 éq.) HOBt/HBTU (3,6 éq.) DIEA (14 éq.) dans DMF 	20-40 min
	<ul style="list-style-type: none"> • 3^{ème} couplage : BOP remplace HOBt/HBTU 	

Lavage	DMF	3 × 2 min
Capping	CH ₂ Cl ₂	2 × 2 min
	DIEA 5% / CH ₂ Cl ₂	2 × 2 min
	Ac ₂ O 10% / DIEA 5% / CH ₂ Cl ₂	1 × 10 min
	CH ₂ Cl ₂	2 × 2 min

3.3. Coupure de la liaison peptide-résine et déprotection des chaînes latérales

Le groupe formyle, protection permanente du tryptophane, est clivé par action de la pipéridine 10% dans le DMF pendant 1 h. L'opération est répétée une fois.

La coupure de la liaison peptide-résine et la déprotection simultanée des chaînes latérales sont effectuées dans un réacteur en téflon par réaction avec le mélange suivant (pour 1 g de peptidyl-résine):

HF anhydre	10 ml
<i>p</i> -crésol	0,75 g
<i>p</i> -thiocrésol	0,25 g
dibenzofurane	155 mg.

Après 90 min sous agitation à 0°C, l'acide fluorhydrique est évaporé puis le peptide est précipité dans de l'éther et centrifugé à 2000 tr/min pendant 5 min (opération recommencée deux fois). Le peptide est ensuite solubilisé dans 80 ml de chlorure de guanidinium 6 M dans une solution tampon de Na₂HPO₄ 0,1 M pH 5,7.

4.3. Purification de B1G-DBF

A l'issue de la réaction de coupure de la liaison peptide/résine et déprotection simultanée des chaînes latérales, le peptide est mis difficilement en solution dans 80 ml de chlorure de guanidinium 6 M tampon Na₂HPO₄ 0,1 M pH 5,7, puis est purifié en premier lieu par HPLC préparative sur colonne -CN (gradient: 0% à 50% B en 90 min). Un essai de dialyse lente contre H₂O (cellule Amicon, membrane YM1 - cutoff: 1 kd) a été tenté sur le peptide brut mais le profil du chromatogramme HPLC ne s'est pas simplifié. Une deuxième purification a été effectuée sur une colonne Nucleosil C18 (gradient: 40% à 100% B en 85 min).

Le peptide est purifié en dernier lieu sur gel d'échange d'ions (gel Q Sépharose) utilisant le

gradient suivant :	temps (min)	%B
	0	0
	25	0
	188,3	100
	203,3	100
	218,3	0

Les fractions contenant le peptide sont désalées par passage sur une colonne analytique C18.

Rendement final 0,7% sur les fractions pures (>95%) (+ une fraction avec une pureté d'environ 70%)

Le peptide est analysé par HPLC analytique, électrophorèse capillaire, analyse de la composition en acides aminés et spectrométrie de masse en mode électrospray.

CARACTERISATIONS PHYSICO-CHIMIQUES DES PEPTIDES

1. METHODES - GENERALITES

1.1. Electrophorèse capillaire

Les analyses par électrophorèse capillaire sont effectuées sur un appareil Applied Biosystems 270 A. Le tampon utilisé est un tampon citrate 20 mM pH 2,5. Les analyses sont menées à 30°C, 30 kV sur 10 min.

Les analyses en électrophorèse capillaire sont utilisées pour le screening des fractions issues des HPLC préparatives mais aussi pour l'analyse finale des produits. Elles constituent en effet un moyen d'analyse reposant sur un principe de séparation différent, suivant la charge, que celui utilisé pour la séparation par HPLC en phase inverse, où là c'est le caractère hydrophobe du peptide qui intervient.

Cette méthode d'analyse est donc très utile comme moyen complémentaire à l'analyse par HPLC en phase inverse et permet une analyse plus rigoureuse de la pureté du produit.

1.2. Analyse de la composition en acides aminés

La composition en acides aminés est déterminée après hydrolyse acide totale du peptide en tube scellé avec HCl 6 N et 20 µl de phénol à 5% dans H₂O, pendant 24 h à 110°C. L'analyse est effectuée sur un analyseur d'acides aminés Beckman modèle 6300.

Pour le suivi de la synthèse, les hydrolyses sur des échantillons de peptidyl-résine ont été effectuées avec acide propionique / acide chlorydrique (1/1) et 20 µl de phénol à 5% dans H₂O pendant 3 h à 140°C.

1.3. Spectrométrie de masse

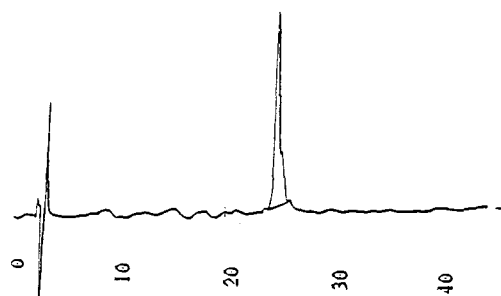
1.3.1. En mode électrospray

Les spectres de masse en mode électrospray ont été effectués dans le laboratoire de Spectrométrie de Masse de la faculté de Médecine de Lille, sur un spectromètre API simple-quadrupole (Perkin Elmer-Sciex).

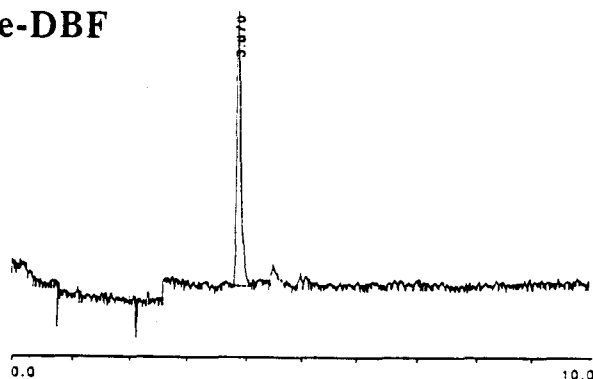
1.3.2. TOF - PDMS

Les spectres de masse TOF-PDMS sont réalisés au laboratoire sur un appareil BioIon. L'échantillon à analyser est adsorbé sur une matrice de nitrocellulose et introduit dans l'appareil.

2. Caractérisation de la scyllatoxine-DBF



Profil HPLC colonne C18
(30%-90% B en 1h)



Profil électrophorèse capillaire
(tampon citrate de sodium 20mM, pH 2,5)

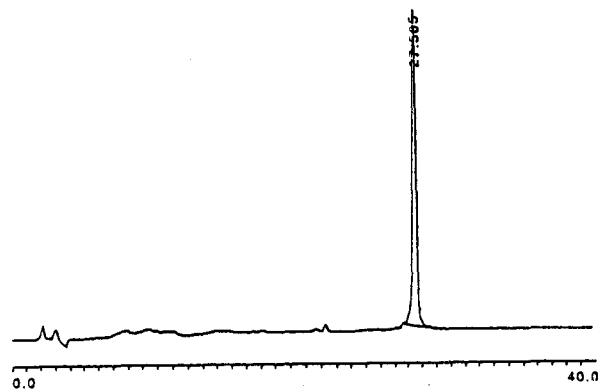
• analyse de la composition en acides aminés :

Asx(1) 1.0, Ser(2) 2.0, Glx(2) 2.4, Gly(2) 2.3, Ala(1) 1.1, Cys(6) 5.4, Val(1) 1.0, Met(1) 0.7, Ile(1) 0.7, Leu(5), 5.1, Phe(1) 0.9, His(1), 1.0, Lys(3) 3.0, Arg(2) 2.0.

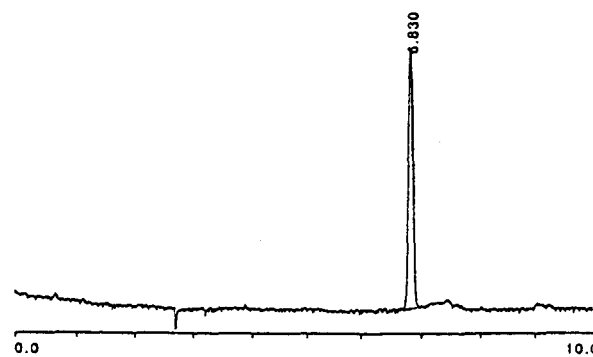
• spectrométrie de masse en mode électrospray :

Observé : $3517,7 \pm 0,3$ Da; calculé pour $C_{153}H_{244}N_{44}O_{37}S_7$ (moyenne isotopique) : 3517,0 Da

3. Caractérisation de B1G-DBF



Profil HPLC colonne C18
(0%-100 % B en 40 min)



Profil électrophorèse capillaire
(tampon citrate de sodium 20mM, pH 2,5)

• analyse de la composition en acides aminés

Asx(8) 8,9; Thr(10) 8,0; Glx(6) 8,0; Gly(4) 6,0; Ala(6) 6,0; Val(4) 4,0; Ile(1) 0,6; Leu(3) 2,8; Tyr(3) 3,6; Phe(2) 1,5; Lys(5) 5,1.

• spectrométrie de masse en mode électrospray

Observé : $6100,0 \pm 0,3$ Da; calculé pour $C_{275}H_{410}N_{64}O_{93}$ (moyenne isotopique) : 6100,7 Da

CARACTERISATION STRUCTURALE PAR RMN

1. Préparation des échantillons pour l'analyse RMN

1.1. Scyllatoxine-DBF

1,5 mg de peptide sont dissous dans 450 μl H_2O , 50 μl D_2O , 1 μl TMSP 50 mM.
Le pH est ajusté à 4,9.

1.2. B1G-DBF

3,7 mg de peptide sont dissous dans 450 μl H_2O , 50 μl D_2O , 1 μl TMSP 50 mM.
Le pH a été ajusté de manière à se rapprocher le plus de celui de l'étude du domaine B1 de la protéine G non modifié (pH=4,2), mais le peptide précipite quand le pH approche une valeur de 4. Le pH de l'étude est donc de 3,3.

2. Expériences RMN sur la scyllatoxine-DBF

Les analyses par RMN sont faites par Jean-Michel WIERUSZESKI au laboratoire sur un spectromètre Bruker DMX 600 (600 MHz) équipé d'une sonde triple noyau avec gradient Z.

Les spectres ont été enregistrés à 4°C et 37°C.

Les spectres DQF-COSY ont été acquis en mode phase-sensible par incrément de temps (TPPI) et en utilisant des gradients d'impulsion pour la sélection des cohérences. L'acquisition des spectres NOESY s'est faite avec la séquence de suppression d'eau WATERGATE (Piotto et coll., 1992) avec des temps de mélange de 50, 100 et 200 ms, et pour les spectres TOCSY avec la séquence WATERGATE flip-back (LIPPENS et coll., 1995) et avec des temps de mélange de 80 et 160 ms.

L'expérience d'échange H/D a été faite en dissolvant le peptide dans D_2O et en collectant un spectre 1D suivi d'un spectre TOCSY de 3h, répétés pendant une nuit.

CARACTERISATION FONCTIONNELLE

1. SCYLLATOXINE-DBF

L'évaluation fonctionnelle de la scyllatoxine-DBF, comparée avec la scyllatoxine a été effectuée par Michel HUGUES à l'Université de Bordeaux. Cette évaluation a consisté en deux tests : test de l'activité biologique par étude de la contraction de *taenia coli* de Cobbaye et de l'activité pharmacologique par des expériences de compétition avec l'apamine iodée.

1.1. Test biologique : contraction isométrique de *taenia coli*

Ce test a été réalisé conformément au protocole publié (AUGUSTE et coll., 1992; 1990; HUGUES et coll., 1982).

Un "échantillon" de *taenia coli* est placé, dans une chambre de mesure thermostatée, dans le tampon Mac Evens : (mM) 130 NaCl, 5,6 KCl, 2 CaCl₂, 0,24 MgCl₂, 11 glucose, 8 Hepes, pH 7,4 complété avec 0,15 µM d'atropine, 2 µM de guanethidine, et dans une atmosphère O₂/CO₂ 95/5. Le *taenia coli* est relaxé avec 3 µM d'épinéphrine et différentes concentrations en toxines sont testées.

1.2. Test pharmacologique : compétition avec l'apamine iodée

Ce test a été effectué selon le protocole publié (AUGUSTE et coll., 1992; 1992; HUGUES et coll., 1982).

2. B1G-DBF

L'évaluation fonctionnelle de B1G-DBF a été réalisée par un test ELISA.

- Incubation : dans chaque puits d'une plaque de microtitration sont incubés pendant la nuit 200 µl d'une solution à 1mg/ml de protéine G recombinante (domaine B1-B2, Pierce) dans un tampon 0,05 M de carbonate/bicarbonate de sodium pH9,6 à température ambiante.

- Saturation : après lavage avec une solution tampon de phosphate de sodium 0,01M pH 7,2 contenant NaCl 1,8% en masse, Tween 20 0,1% (v), la saturation s'effectue en ajoutant par puits 300 µl d'une solution tampon phosphate de sodium pH 7,2 contenant 1% en masse de caséine, NaCl 1,8% en masse. L'incubation dure 1h à température ambiante.

- Incubation IgG/protéines testées (B1G, B1G-DBF, Protéine G, BSA) : pendant la saturation, les IgG de chèvre couplées à la peroxydase (Diagnostic Pasteur) (diluées 1/19200 pour avoir une DO de 1 sans inhibiteur) sont incubées pendant 90 min à température ambiante dans une solution tampon phosphate de sodium pH 7,2 contenant 1% en masse de caséine, NaCl 1,8% en masse avec différentes dilutions de chaque protéine.

- Incubation de la solution IgG/protéine sur la protéine G : après deux lavages des puits de la plaque de microtitration, les différentes solutions IgG/protéines testées incubées préalablement, sont réparties dans chaque puits et mise en incubation pendant 2 h à température ambiante.

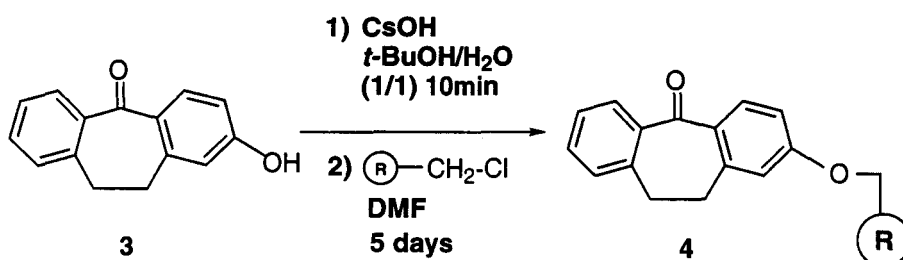
- Révélation : après quatre lavages, la fixation des IgG couplées à la peroxydase sur la protéine G recombinante est révélée avec 200 µl de dichlorure d'orthophénylènediamine (Sigma), 20 µl de H₂O₂ pendant 5 min dans le noir et à température ambiante. La réaction est stoppée par addition de 50 ml de H₂SO₄ 4 N. L'absorption est lue à 492 nm.

PARTIE EXPERIMENTALE DE LA PARTIE IV

Couplage de fragment avec HOCT

PREPARATION OF THE HYDRAZINE LINKER

1. Preparation of 2-copoly(styrene-1%-divinylbenzene methoxydibenzocycloheptadien-5-one

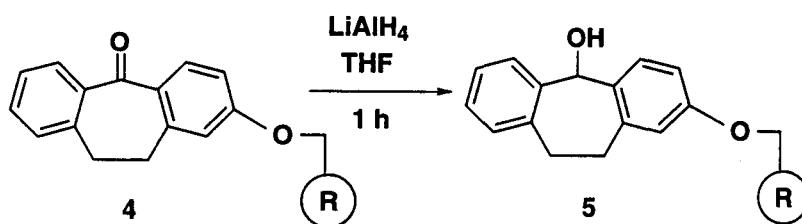


To a solution containing 2-hydroxydibenzocycloheptadien-5-one (1.16 g - 5.17 mmol) dissolved in *t*-Bu-OH / H₂O (1/1, 40 ml) was added caesium hydroxide (825.2 mg - 4.92 mmol). After stirring for 10 min, *t*-BuOH and H₂O were removed by lyophilisation. The salt was then dried by azeotropic distillation with pyridine (2×50 ml), and added in solution (dissolved in 20 ml distilled DMF) to the Merrifield Resin (chloromethylpolystyrene) (1.74 g - 0.8 mmol/g). The reaction mixture was then stirred mechanically for 5 days under nitrogen at 60°C. The resin was then washed with copious amount of solvents (DMF, DCM, dioxane, ether, isopropanol) and dried under vacuum (m = 2.25 g).

Cl analysis: 0% Cl found.

IR analysis (KBr disc): ν_{\max} (cm⁻¹): 3100-3000 (CH Arom.); 3000-2900 (CH₂); 1636 (C=O); 1590,1490 (C=C); 1448 (CH₂).

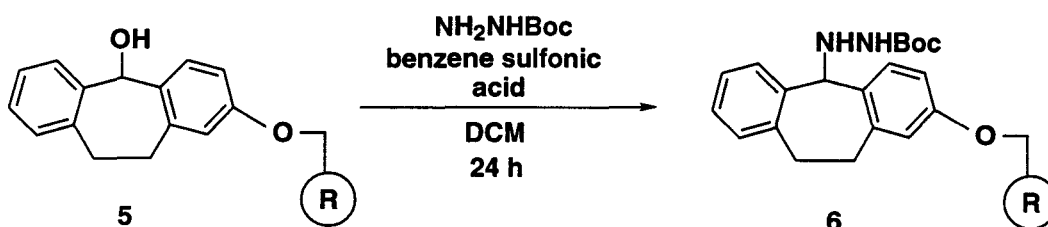
2. Preparation of 2-copoly(styrene-1%-divinylbenzene) methoxydibenzocycloheptadien-5-ol



To 2.23 g (0.62 mmol/g) of the previously prepared resin was added dried THF (60 ml) and LiAlH_4 (0.45 g - 20.66 mmol). The mixture was heated under reflux and argon atmosphere for 1 h and was then cooled down with an ice bath and MeOH was added. The resin was then filtered and washed with copious amount of solvents (DMF, H_2O , dioxane, ether, methanol). The resin was dried in vacuo ($m = 2.13 \text{ g}$).

IR analysis (KBr disc): ν_{max} (cm^{-1}): 3567, 3405 (OH); 3100-3000 (CH Arom); 2800-2980 (CH_2); 1598, 1490 ($\text{C}=\text{C}$); 1448 (CH_2)

3. Preparation of N-*t*-butyloxycarbonyl-N'-2-copoly(styrene-1%-divinylbenzene) methoxydibenzocycloheptadien-5-yl hydrazine



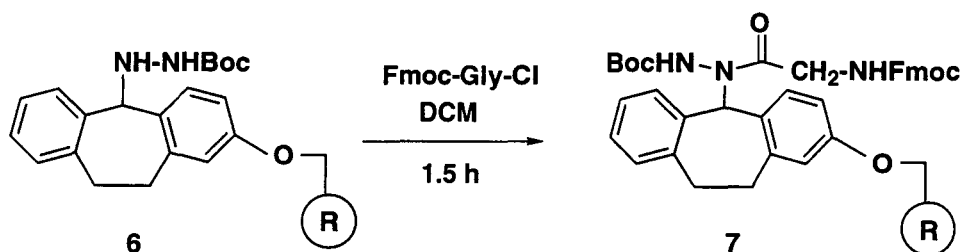
t-butylcarbazate (1.19 g - 9.74 mmol), benzene sulfonic acid (220.0 mg - 1.4 mmol) and freshly distilled (over CaH_2) DCM were added to the resin **5** (2.13 g - estim 1.13 mmol). The mixture was refluxed for 26 h under nitrogen. The resin was then washed with the different solvents (DCM, DMF, dioxane, ether, MeOH) and dried in vacuo ($m=2.31 \text{ g}$).

N analysis: 1.80% N; theoretical: 2.24%

Estimated resin functionality: 0.48 mmol/g.

IR analysis (KBr disc): ν_{max} (cm^{-1}): 3419 (NH); 3000-2800 (CH arom., CH_2); 1736 ($\text{C}=\text{O}$), 1600, 1494 ($\text{C}=\text{C}$).

4. Preparation of N-t-butyloxycarbonyl-N'(N α -9-fluorenylmethoxycarbonyl glycy)-N'-2-copoly(styrene-1%-divinylbenzene)methoxydibenzocycloheptadien-5-yl hydrazine



Fmoc-Gly-OH (1.29 g - 4.34 mmol) was dissolved, under nitrogen, in freshly distilled DCM (50 ml), SOCl_2 (3.2 ml - 43.5 mmol) and DMF (about 0.5 ml) were also added. The solution became clear after 25 min stirring at room temperature, but was stirred for 1 h. SOCl_2 and DCM were then removed by rotary evaporation and the resulting residue was washed twice with distilled DCM and then taken up in DCM and added to the hydrazide resin, preswollen in DCM (10 ml) and 1 ml distilled pyridine. The solution became red when the acyl chloride was added. The solution was stirred for 1.5 h at room temperature. The loading test performed after UV analysis of the Fmoc deprotection solution indicated a coupling yield of 66%.

Resin functionality: 0.37 mmol/g.

IR analysis (KBr disc): ν_{max} (cm^{-1}): 3417, 3276 (NH); 3058-2848 (CH, CH_2); 1740-1685 ($\text{C}=\text{O}$); 1600, 1502 ($\text{C}=\text{C}$).

SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS**1. Methods****1.1. General method for automatic solid phase peptide synthesis**

The syntheses of the peptides were performed on a 0.25 mmol scale using various derivatized resins, on an automatic synthesizer Applied Biosystems 430 A equipped with a UV detector (302 nm) allowing the monitoring of Fmoc deprotection and making it possible to calculate the efficiency of each coupling.

The order of events for the coupling of each amino acid is summarized below:

1. Capping : acetic acid (0.5 M in DMF/dioxane (1/1) 10 ml) and 0.125 M DIEA 10.2% HOBt, 10 min
2. Removal of Fmoc protection: 20% piperidin in DMF/dioxane (1/1) (3×9 ml : 6 min, 1.5 min and 1.5 min)
3. Washing: DMF/dioxane (1/1) (6×)
4. Activation: Fmoc-amino acid (1 mmol), HOt (1 mmol in DMF/dioxane 1/1, 10 ml), 20 min
5. Coupling: activated species transferred to reaction vessel, 30 min.
6. Washing: DMF/dioxane (1/1).

1.2. The Fmoc UV analysis

5 mg of resin were washed with solvents (DMF, DCM, dioxane, ether) and dried. The resin was then introduced in a 10 ml volumetric flask and a solution of 20% piperidine in DMF/dioxane (1/1) was added. After 10 min sonicating, the solution was filtered and transferred to the UV cell for UV analysis. The absorbance at 300 nm was measured and the loading could be calculated: $\text{Loading (mmol/g)} = \text{Abs (300nm)} \times 10 / \text{Weight of resin (mg)} \times 9$.

1.3. RP-HPLC

Analytical: C18 Aquapore column 300 Å, 7 µm, 0.46×20 cm
Flow rate 1ml/min

Detection 214 nm, 364 nm

Preparative: C18 Aquapore column 300 Å, 7 µm 1×50 cm

Flow rate 5 ml/min

Detection 230 nm

All runs were linear gradients of 0.1% aqueous TFA (buffer A) *versus* acetonitrile 0.1% TFA (buffer B).

2. Synthesis of the hydrazide fragment 1

TbFmoc-NH - E A E* D* L* Q* V G Q* V E L G G - NH-NH₂

The amino acids labelled with an asterix * were triple coupled.

The peptide was synthesized automatically using the resin (0.25 mmol) derivatized with the hydrazine linker and loaded with the first Gly residue.

Upon completion of the synthesis, the Fmoc group was removed by sonicating for 20 min with 20% piperidine in DMF. The resin was then washed and dried overnight in vacuo. For TbFmoc protection, the resin-bound peptide (777 mg) was sonicated for 3 h in the presence of TbFmoc-Cl (344 mg - 0.75 mmol), DIEA (43 µl - 0.25 mmol) and dioxane (3 ml). The resin was washed carefully with different solvents (dioxane, DCM, MeOH) and dried (m = 855 mg). The functionality of the TbFmoc-protected peptidyl-resin can be calculated after the same treatment as for the Fmoc UV analysis described previously:

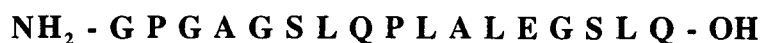
$$\text{Loading (mmol/g)} = 0.613 \times \text{Abs (366 nm)} / \text{mass of resin (mg)}$$

The loading found here was 0.20 mmol/g.

The peptide was then cleaved and deprotected in an solution containing: TFA / H₂O / ethanedithiol / thioanisole (85/5/5/5). After 1h45 stirring, the resin was removed by filtration and the peptide precipitated in cold ether. As the peptide appeared partially soluble in ether, the ethereal phases were centrifuged several times. The peptide was then dissolved in H₂O/acetonitrile (1/4) but the solution remained unclear, and lyophilized. As the TbFmoc-protected "hydrazide fragment" appeared insoluble in any solvent allowing its purification, the crude peptide was used for the reactions of fragment coupling.

FAB-MS (matrix: acetonitrile/thioglycerol): Cald: 1881.0, Obsd: 1881 (major peak) and 1055.

3. Synthesis of the amine fragment 2



The amine fragment **2** of Proinsulin C-Peptide was synthesized on a Wang resin (0.89 mmol/g). The first amino acid was loaded manually using the following procedure. 0.8 g of Wang resin was swollen in DMF (DMF added until slurry). About 0.2 eq. of DMAP was added before the addition of the amino acid. 1.74 g of Gln(Trt) (2.85 mmol - 4 eq) were dissolved in 8 ml of DMF and 223 μ l DIC were added (1.42 mmol - 2 eq.). The mixture was sonicated for 15 min. The activated amino acid was then added to the resin and sonicated for 2h50. The resin was then washed with DCM, DMF, ether and dried. The Fmoc UV analysis revealed a coupling yield of 52% and a loading of 0.36 mmol/g. The resin was then ready for the automatic synthesis.

Upon completion of the synthesis, the resin-bound peptide was stirred in an aqueous TFA solution containing the appropriate scavengers. The cleavage mixture was as follows: TFA / H₂O / anisole (90/5/5). After 3 h, the resin was removed by filtration, washed with TFA (2 \times 2 ml). The peptide was directly precipitated in cold ether, centrifuged, washed with ether, dissolved in H₂O/acetonitrile (3/1) and lyophilized. The crude peptide was purified by RP-HPLC on a C18 column using the following gradient: 5% - 40% B in 20 min.
MALDI-TOF : Cald 1595.8, Obsd 1596.3.

FRAGMENT COUPLING WITH THE AZIDE METHOD

Peptide hydrazide (18.8 mg - 10 μ mol) in DMF (1.5 ml) was sonicated for 1.5 h to dissolve the TbFmoc-protected hydrazide peptide, under an atmosphere of nitrogen. The solution was then cooled to -20°C and a solution of HCl in 1,4-dioxane (4 M, 26 μ mol) was added. The mixture was allowed to warm to -15°C and *t*-Butyl nitrite (15 μ mol) was added. After 10 min, HOt (2.4 mg - 15 μ mol) was added and 10 min later, the amine fragment (15.9 mg - 10 μ mol) in precooled DMF (1 ml), followed by DIEA (27 μ mol) at a rate of 5 μ mol every 15 min. The solution was stored at 0°C under stirring for maximum 5 days, before adding AcOH (1% v/v, 2.5 ml). DMF was evaporated in vacuo and water was added (3 ml).

Remark: considering the small volumes of DIEA and *t*-Butyl nitrite, diluted solutions in DMF were prepared prior to use.

The monitoring of the reaction was performed by RP-HPLC at 214 nm and 364 nm and the gradient was run from 10% to 90% B in 30 min. 5 μ l samples were taken from the reaction mixture at different time: just before the introduction of the amine fragment, after 5 min, 1 h, 3 h, 17 h, 24 h, 48 h, 3 days, 4 days, 5 days.

PURIFICATION

The different means offered by TbFmoc for purifying the products were attempted. As described Scheme 6 (Partie IV), one of the possibilities is to use the absorption of TbFmoc at 364 nm to identify easier the products on the RP-HPLC profile, and the other consists in using the affinity of TbFmoc for carbon.

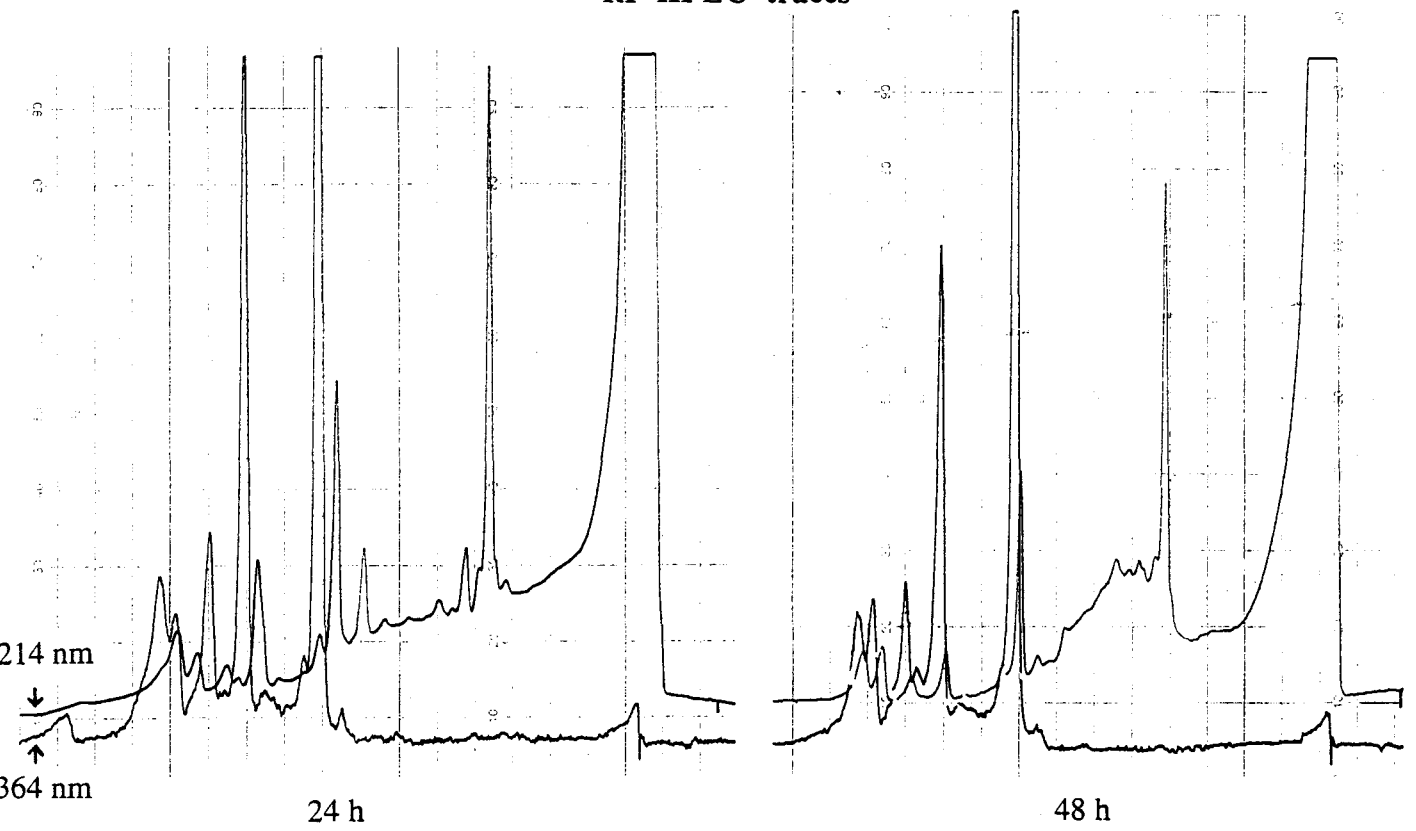
1. Purification by RP-HPLC

Purification of experiment 1 reaction mixture was attempted in that way by classical preparative RP-HPLC (gradient: 10% B to 70% B in 40 min). Unfortunately, a high pressure problem on the HPLC, may be due the precipitation of the product on the column, prevented a normal elution. Only 6.6 mg from the amine fragment **2** were finally eluted and 1.6 mg of a product identified lately, due to difficulties encountered to obtain interpretable mass spectrum, as being the TbFmoc-protected amine fragment.

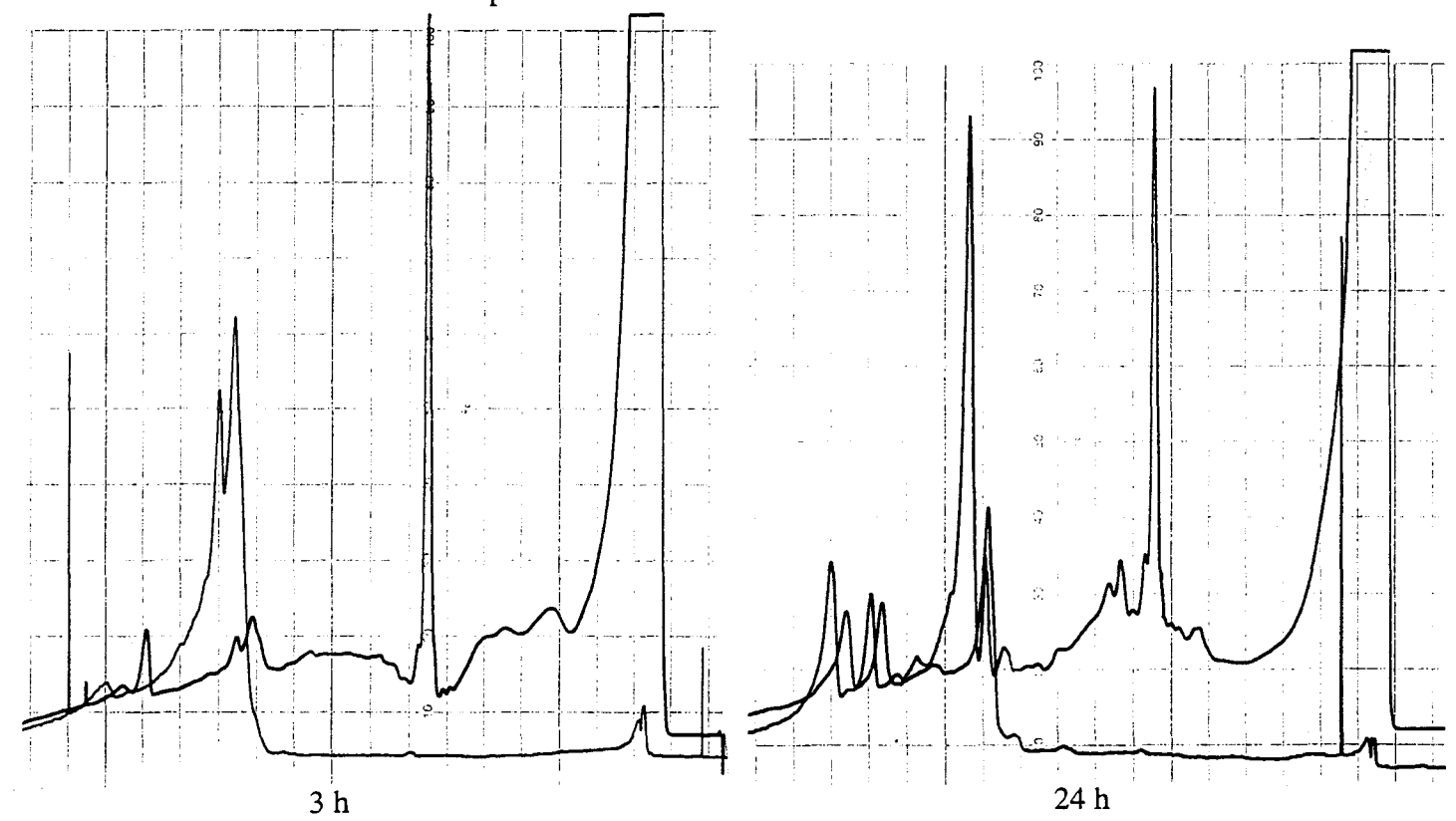
2. Affinity purification on carbon

The crude reaction mixture was dissolved in Guanidine.HCl / isopropanol (1/1) (15 ml) and sonicated for 30 min. 100 mg of PGC were added and the mixture was sonicated for 1 h. The adsorption of TbFmoc on PGC was monitored by RP-HPLC (gradient 10%B to 90%B in 30 min). The mixture was then centrifuged and the supernatant removed and collected as it contains the amine fragment. The PGC was then washed using Guanidine.HCl / isopropanol (1/1) (10 ml) and centrifuged again. The supernatants were combined and isopropanol was removed in vacuo. The cleavage of TbFmoc was performed with 20% piperidine in Guanidine.HCl / isopropanol (1/1) (10 ml). After centrifugation, the supernatants were collected and isopropanol was removed in vacuo. The pH of the solution was then altered to pH 6-7 before purification by preparative RP-HPLC.

RP-HPLC traces

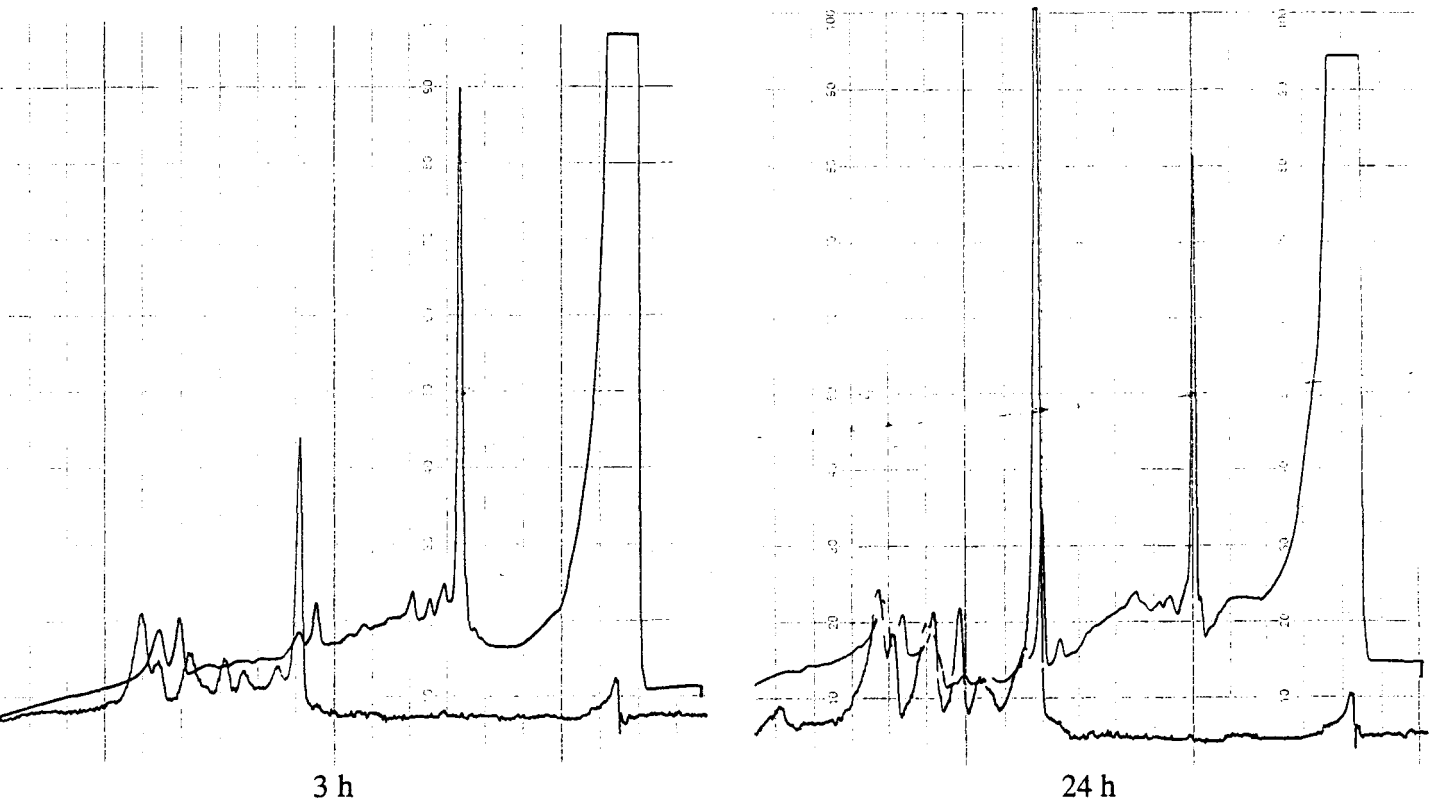


Experiment 1 : azide method without HOCl

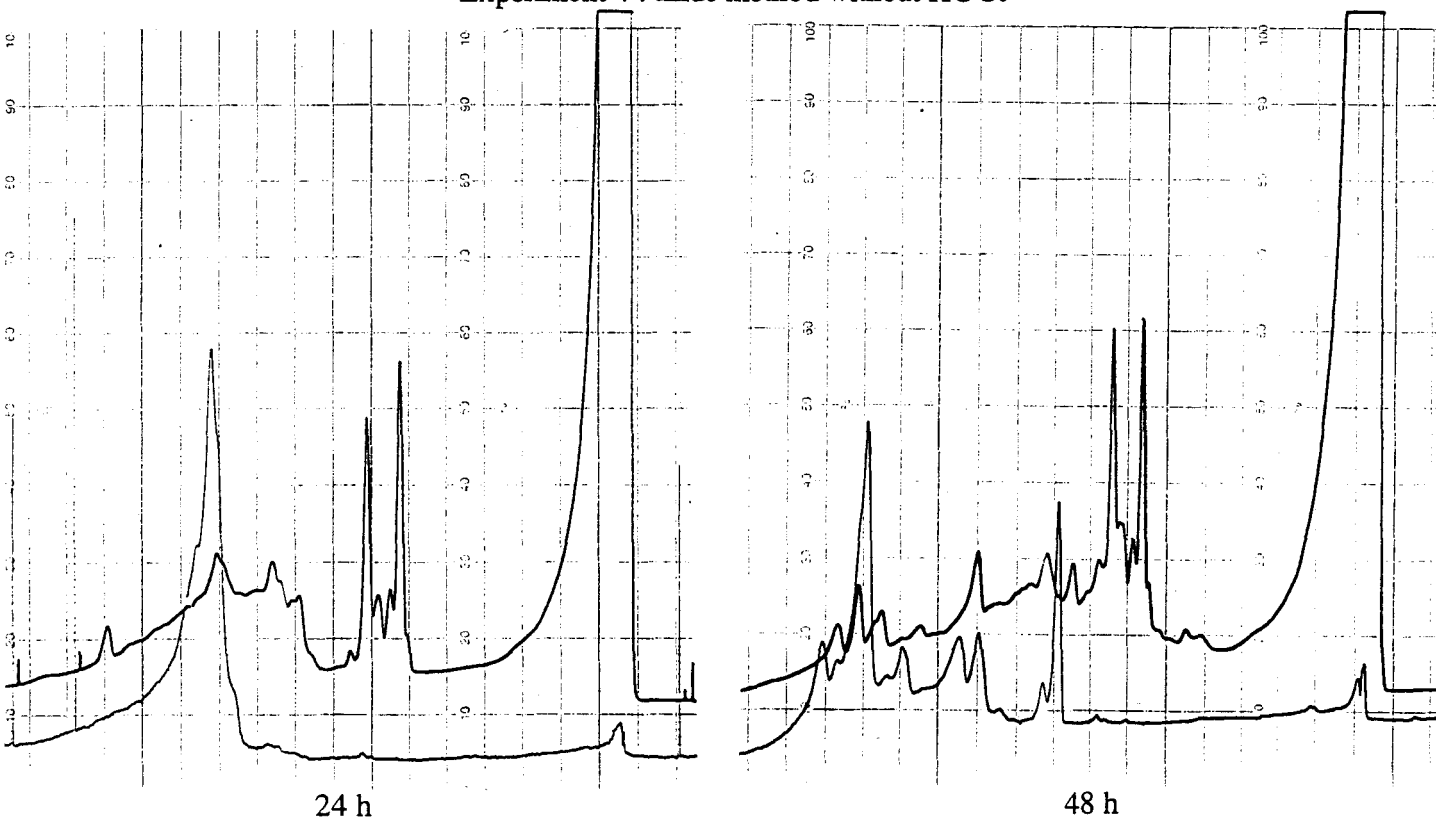


Experiment 2 : azide method with HOCl

RP-HPLC traces



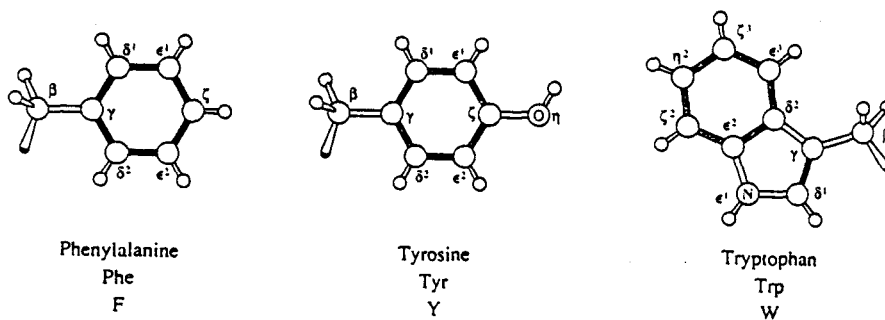
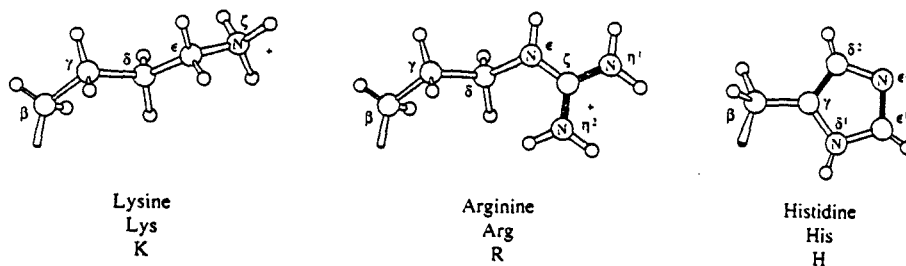
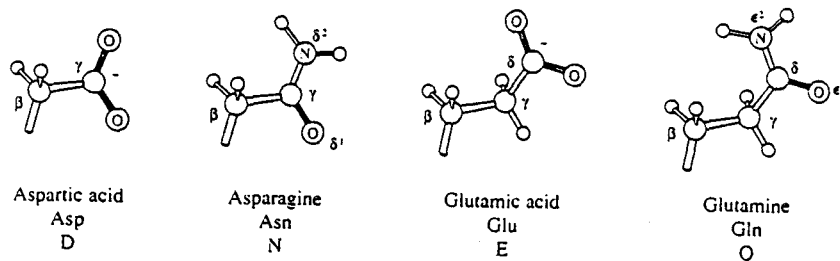
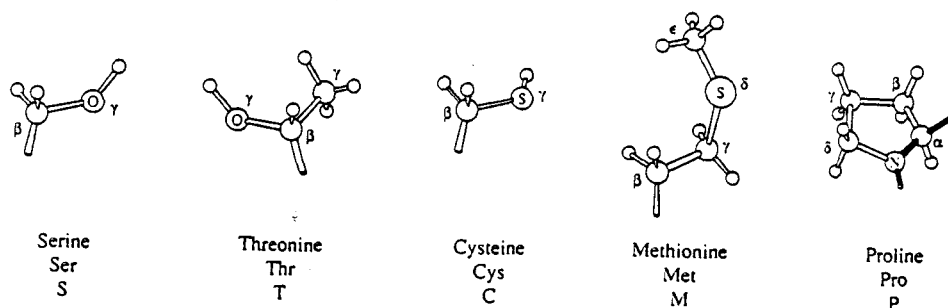
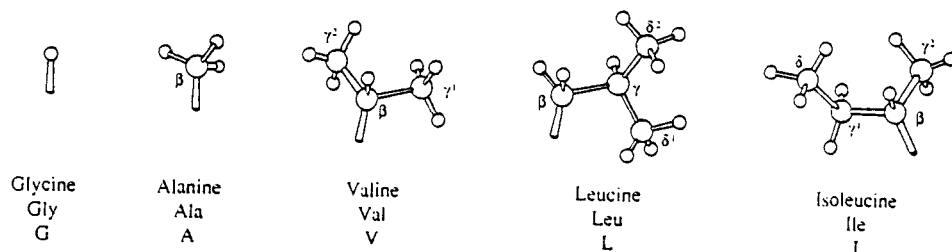
Experiment 4 : azide method without HOCT



Experiment 5 : azide method without HOCT

ANNEXES

Représentation des chaînes latérales des acides aminés (d'après CREIGHTON, 1993).



Contacts NOE caractéristiques
(d'après Wütrich, 1986)

	β, β_p	α -Helix	3_{10} -Helix	Turn I	Turn II	Turn I'	Turn II'	Half-Turn
$d_{\alpha N}(i, i+4)$		=====						
$d_{\alpha\beta}(i, i+3)$		=====	=====					
$d_{\alpha N}(i, i+3)$		=====	=====	-----		-----	-----	
$d_{NN}(i, i+2)$		=====	=====	-----	-----	-----	-----	
$d_{\alpha N}(i, i+2)$			=====	-----	-----	-----	-----	-----
d_{NN}	-----	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====
$d_{\alpha N}$	=====	-----	-----	-----	=====	-----	-----	=====
$^3J_{HN\alpha}$ (Hz)	9 9 9 9 9 9 1 2 3 4 5 6	4 4 4 4 4 4 4 1 2 3 4 5 6 7	4 4 4 4 4 4 1 2 3 4 5 6	4 9 1 2 3 4	4 5 1 2 3 4	7 5 1 2 3 4	7 9 1 2 3 4	4 9 1 2 3 4

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Achari, A., Hale, S. P., Howard, A. J., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Hardman, K. D., Whitlow, M. (1992) "1.67-Å X-ray structure of the B2 immunoglobulin-binding domain of streptococcal protein G and comparison to the NMR Structure of the B1 domain." *Biochemistry* **31**, 10449-10457.
- Åkerström, B., Brodin, T., Reis, K., Björk, L. (1985) "Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies." *J. Immunol.* **135**, 2589-2592.
- Åkerström, B., Björk, L. (1986) "A physicochemical study of protein G, a molecule with unique immunoglobulin G-binding properties." *J. Biol. Chem.* **261**(22), 10240-10247.
- Åkerström, B., Nielsen, E., Björk, L. (1987) "Definition of IgG- and Albumin-binding regions of streptococcal protein G." *J. Biol. Chem.* **262**(28), 13388-13391.
- Alexander, P., Fahnestock, S., Lee, T., Orban, O., (1992a) "Thermodynamic analysis of the folding of the streptococcal protein G IgG-binding domains B1 and B2: why small proteins tend to have high denaturation temperatures?" *Biochem.* **31**, 3597-3603.
- Alexander, P., J. Orban, Bryan, P. (1992b) "Kinetic analysis of folding and unfolding the 56 amino acid IgG-binding domain of streptococcal protein G." *Biochem.* **31**, 7243-7248.
- Arad, O., Houghten, R. A. (1990) "An evaluation of the advantages and effectiveness of picric acid monitoring during solid phase peptide synthesis." *Peptide Res.* **3**(1), 42-50.
- Ashe, A. J., Kampf, J. W., Savla, P. M. (1990) "Selective functionalization in the Bay region of polycyclic aromatic hydrocarbons via dilithiation." *J. Org. Chem* **55**, 5558-5559.
- Aubry, A., Mangeot, J.-P., Vidal, J., Collet, A., Zerkout, S., Marraud, M. (1994) "Crystal structure analysis of a β -turn mimic in hydrazino peptides." *Int. J. Peptide Protein Res.* **43**, 305-311.
- Auguste, P., Hugues, M., Gravé, B., Gesquière, J.-C., Maes, P., Tartar, A., Romey, G., Schweitz, H., Lazdunski, M. (1990) "Leurotoxin I (Scyllatoxin), a peptide ligand for Ca^{2+} -activated K^+ channels." *J. Biol. Chem.* **265**(8), 4753-4759.

- Auguste, P., Hugues, M., Borsotto, M., Thibault, J., Romey, G., Coppola, T., Lazdunski, M.** (1992a) "Characterization and partial purification from pheochromocytoma cells of an endogenous equivalent of scyllatoxin, a scorpion toxin which blocks small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels." *Brain Research* **599**, 230-236.
- Auguste, P., Hugues, M., Mourre, C., Moinier, D., Tartar, A., Lazdunski, M.** (1992b) "Scyllatoxin, a Blocker of Ca^{2+} -Activated Channels: Structure- Function Relationships and Brain Localisation of the Binding Sites." *Biochemistry* **31**, 648-654.
- Baca, M., Alewood, P. F., Kent, S. B. H.** (1993) "Structural engineering of the HIV-1 protease molecule with a β -turn of fixed geometry." *Protein Science* **2**, 1085-1091.
- Bach, A. C., Markwalder, J. A., Ripka, W. C.** (1991) "Synthesis and NMR conformational analysis of a β -turn mimic incorporated into gramicidin S." *Int. J. Peptide Protein Res.* **38**, 314-323.
- Balbach, J., Forge, V., Lau, W. S., van Nuland, N. A., Brew, K., Dobson, C. M.** (1996) "Protein folding monitored at individual residues during a two-dimensional NMR experiment." *Science* **274**, 1161-1162.
- Ball, J. B., Alewood, P. F.** (1990a) "Conformational constraints: nonpeptide β -turn mimics." *J. Molec. Recogn.* **3**(2), 55-64.
- Ball, J. B., Andrews, P. R., Alewood, P. F., Hugues, R. A.** (1990b) "A one-variable topographical descriptor for the β -turns of peptides and proteins." *FEBS Lett.* **273**(1,2), 15-18.
- Barchi, J. J., Grassberger, B., Gronenborn, A. M., Clore, G. M.** (1994) "Investigation of the backbone dynamics of the IgG-binding domain of streptococcal protein G by heteronuclear two-dimensional ^1H - ^{15}N nuclear magnetic resonance spectroscopy." *Protein Science* **3**, 15-21.
- Barret, A. G. M., Spilling, C. D.** (1988) "Transfer hydrogenation: a stereospecific method for the conversion of nitro alkanes into amines." *Tetrahedron Lett.* **29**(45), 5733-5734.
- Barsky, L., Gschwend, H. W., McKenna, J., Rodriguez, H. R.** (1976) "Ortho-lithiation. A regiospecific route to ortho-substituted aryl ketones." *J. Org. Chem.* **41**, 3651-3652.
- Bashford, D., Case, D. A., Choi, C., Gippert, G.P.** (1997) "A computational study of the role of solvation effects in reverse turn formation in the tetrapeptides APGD APGN." *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 4964-4971.
- Bauer, W., Schleyer, P. v. R.** (1989) "Mechanistic evidence for ortho-directed lithiations from one- and two-dimensional NMR spectroscopy and NMDO calculations." *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 7191-7198.
- Bax, A.** (1994) "Multidimensional nuclear magnetic resonance methos for protein studies." *Curr. Op. Struct. Biol.* **4**, 738-744.

- Beasley, J. R., Hecht, M. H.** (1997) "Protein design: the choice of *de novo* sequences." *J. Biol. Chem.* **272**(4), 2031-2034.
- Bergander, K., He, R., Chandrakumar, N., Eppersarald, O., Günther, H.** (1994) "The aggregation behavior of butyllithium, phenyllithium, and lithium diisopropylamide in dimethoxy- and diethoxymethane." *Tetrahedron* **50**, 5861-5868.
- Betz, S. F., Liebman, P. A., DeGrado, W. F.** (1997) "*De novo* design of native proteins: characterization of proteins intended to fold into antiparallel, Rop-like, four-helix bundles." *Biochemistry* **36**, 2450-2458.
- BIOSYM Technologies - MSI**, 968 Scranton Road, San Diego CA 92121, USA
- Björk, L., Kronvall, G.** (1984) "Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent." *J. Immunol.* **133**(2), 969-974.
- Björk, L., Blomberg, J.** (1987a) "Streptococcal protein G: a sensitive tool for detection of antibodies to human immunodeficiency virus proteins in western blot." *Eur. J. Clin. Microbiol.* **6**(4), 428-429.
- Björk, L., Kastern, W., Lindahl, G., Wideböck, K.** (1987b) "Streptococcal protein G, expressed by streptococci or by *Escherichia coli*, has separate binding sites for human albumin and IgG." *Molec. Immun.* **24**(10), 1113-1122.
- Björk, L.** (1988) "A novel bacterial cell wall protein with affinity for Ig L chains." *J. Immunol.* **140**, 1194-1197.
- Björk, L., Åkertröm B.** (1990) "Streptococcal protein G." *Bacterial immunoglobulin-binding Proteins, Vol.1, Chap. 9. Acad Press. Inc.*, 113-117.
- Blanc, E., Frémont, V., Sizun, P., Meunier, S., Van Rietschoten, J., Thevand, A., Bernassau, J.-M., Darbon, H.** (1996) "Solution structure of PO1, a natural scorpion peptide structurally analogous to scorpion toxins specific for apamin-sensitive potassium channel." *Proteins* **24**, 359-369.
- Blanco, F. J., Jiménez, M. A. Pienda, A., Rico, M., Santoro, J., Nieto, J. L.** (1994a) "NMR solution structure of the isolated fragment of the N-terminal fragment of protein-G B1 domain. Evidence of trifluoroethanol induced native-like β -hairpin formation." *Biochemistry* **33**, 6004-6014.
- Blanco, F. J., Rivas, G., Serrano, L.** (1994b) "A short linear peptide that folds into a native stable β -hairpin in aqueous solution." *Nature structural biology* **1**(9), 584-590.
- Blanco, F. J., Serrano, L.** (1995) "Folding of protein G B1 domain studied by the conformational characterization of fragments comprising its secondary structure elements." *Eur. J. Biochem* **230**, 634-649.

- Blanco, F. J., Ortiz, A. R., Serrano, L.** (1997) "Role of a nonnative interaction in the folding of the protein G B1 domain as inferred from the conformational analysis of the α -helix fragment." *Folding & Design* **2**, 123-133.
- Bontems, F., Roumestand, B. G. C., Gilquin, B., Ménez, A., Toma, F.** (1991) "Refined structure of charybdotoxin: common motifs in scorpion toxins and insect defensins." *Science* **254**, 1521-1523.
- Boutillon, C., Wintjens, R., Lippens, G., Drobecq, H., Tartar, A.** (1995) "Synthesis, three-dimensional structure, and specific ^{15}N labelling of the streptococcal protein G B1-domain." *Eur. J. Biochem.* **231**, 166-180.
- Brandmeier, V., Feigel, M.** (1989) "A macrocycle containing two biphenyl and two alanine subunits, synthesis and conformation in solution." *Tetrahedron* **45**, 1365-1376.
- Broadus, C. D.** (1970) "Homogeneous metalation of alkylbenzenes." *J. Org. Chem.* **35**(1), 10-15.
- Brown, A. R., Irving, S. I., Ramage, R.** (1993) "Affinity purification of synthetic peptides and proteins on porous graphitised carbon." *Tetrahedron Lett.* **34**(44), 7129-7132.
- Brown, A. R., Irving, S. L., Ramage, R., Raphy, G.** (1995) "(17-tetrabenzo(a,c,g,i)fluorenyl)methylchloroformate (TbFmocCl) a reagent for the rapid and efficient purification of synthetic peptides and proteins." *Tetrahedron* **51**(43), 11815-11830.
- Bruix, M., Jiménez, M. A., Santoro, J., Gonzalez, C., Colilla, F. J., Méndez, E., Rico, M.** (1993) "Solution structure of γ 1-H and γ 1-P thionins from barley and wheat endosperm determined by ^1H -NMR: a structural motif common to toxic arthropod proteins." *Biochemistry* **32**, 715-724.
- Brünger, A. T.** (1992) Version 3.1: "A system for cristallography and NMR". Yale University, New Haven, CT, USA.
- Bryson, J. W., Betz, S. F., Lu, H. S., Suich, D. J., Zhou, H. X., O'Neil, K. T., DeGrado, W. F.** (1995) "Protein design : a hierarchic approach." *Science* **270**, 935-941.
- Buisine, E., Wieruszkeski, J.-M., Lippens, G., Wouters, D., Tartar A.** (1997) "Characterization of a new family of toxin-like peptides from the venom of the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus*." *J. Peptide Res.* **49**, 545-555.
- Carpino, L. A., Han, G. Y.** (1970) "The 9-fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group." *J. Am. Chem. Soc.* **92**(19), 5748-5749.
- Carpino, L. A., Cohen, B. J., Stephens, K. E., Sadat-Aalae, Y., Tien, J.-H.** (1986) "(9-fluorenylmethoxy)carbonyl (fmoc) amino acid chlorides. Synthesis, characterization and application to the rapid synthesis of short peptide segments." *J. Am. Chem. Soc.* **51**, 3732-3734.

- Castle, N. A., Strong P. N. (1986) "Identification of two toxins from scorpion (*Leiurus quiquestriatus*) venom which block distinct classes of calcium-activated potassium channel." *FEBS Lett.* **209**(1), 117-121.
- Castro, B., J. R. Dormoy, Evin, G., Selve, C. (1975) "Réactifs de couplage peptidique IV (1) - L'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdiméthylamino phosphonium (B.O.P)." *Tetrahedron Lett.* **14**, 1219-1222.
- Caubère, C., Caubère, P., Ianelli, S. Nardelli, M., Jamart-Grégoire, B. (1994) "Aggregative activation and heterocyclic chemistry I complex bases promoted arynic cyclisation of imines or enamino ketones; Regiochemical synthesis of indoles." *Tetrahedron* **50**, 11903-11920.
- Chang, J.-Y. (1994) "Controlling the speed of hirudin folding." *Biochem. J.* **300**, 643-650.
- Chatrenet, B., Chang J.-Y. (1993) "The disulfide folding pathway of hirudin elucidated by stop/go folding experiment." *J. Biol. Chem.* **268**(28), 20988-20996.
- Chen, S., Chrusciel, A., Nakanashi, H., Raktabutr, A., Johnson, M., Sato, A., Weiner, D., Hoxie, J., Saragovi, H. U., Greene, M. I., Kahn, M. (1992) "Design and synthesis of a CD4 β -turn mimetic that inhibits human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120 binding and infection of human lymphocytes." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5872-5876.
- Chicchi, G. G., Gimenez-Gallego, G., Ber, E, Garcia, M. L., Winkquist, R. Cascieri, M. A. (1988) "Purification and characterization of a unique, potent inhibitor of apamin binding from *Leiurus quinquestriatus hebraeus* venom." *J. Biol. Chem.* **263**(31), 10192-10197.
- Choo, D. W., Schneider, J. P., Graciani, N. R., Kelly, J. W. (1996) "Nucleated antiparallel β -sheet that folds and undergoes self-assembly : a template promoted folding strategy toward controlled molecular architectures." *Macromolecules* **29**, 355-366.
- Chou, P. Y., Fasman, G. D. (1974a) "Conformational parameters for amino acids in helical, β -sheet, and random coil regions calculated from proteins." *Biochemistry* **13**(2), 211-221.
- Chou, P. Y., Fasman G. D. (1974b) "Prediction of protein conformation." *Biochemistry* **13**(2), 222-232.
- Chung, H.-H., Benson, D. R., Cornish, V. W., Schultz, P. G. (1993) "Probing the role of loop 2 in Ras function with unnatural amino acids." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10145-10149.
- Clore, G. M., A. Bax, Driscoll, P. C., Wingfield, P. T., Gronenborn, A. M. (1990) "Assignment of the side-chain ^1H and ^{13}C resonances of interleukin-1 β using double and triple resonance heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy." *Biochemistry* **29**, 8172-8184.
- Comins, D. L., Brown, J. D. (1984) "Ortho metalation directed by α -amino alkoxides." *J. Org. Chem.* **49**, 1078-1083.
- Comins, D. L., Killpack, M. O. (1987) "Lithiation of heterocycles directed by α -amino alkoxides." *J. Org. Chem* **52**, 104-109.

- Comins, D. L., Brown, J. D. (1989) "Ortho substitution of *m*-anisaldehyde via α -amino alkoxide directed lithiation." *J. Org. Chem.* **54**, 3730-3732.
- Comins, D. L. (1992) "The synthetic utility of α -amino alkoxides." *Synlett*, 615-625.
- Constantine, K. L., Mueller, L., Andersen, N. H., Tong, H., Wandler, C. F., Friedrichs, M. S., Bruccoleri, R. E. (1995) "Structural and dynamic properties of a β -hairpin-forming linear peptide. 1. Modeling using ensemble-averaged constraints." *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 10841-10854.
- Cornet, B., Bonmatin, J.-M., Hetru, C., Hoffmann, J. A., Ptak, M., Vovelle, F. (1995) "Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A." *Structure* **3**, 435-448.
- Coste, J., Dufour M.-N., et al. (1990) "Brop: a new reagent for coupling N-methylated amino acids." *Tetrahedron Lett.* **31**(5), 669-672.
- Coste, J., Frérot, E., Jouin, P. (1991) "Oxybenzotriazole free peptide coupling reagents for N-methylated amino acids." *Tetrahedron Lett.* **32**(17), 1967-1970.
- Coste, J., Campagne, J.-M. (1995) "A propos de l'estérification des acides carboxyliques par le BOP ou le PyBOP." *Tetrahedron Lett.* **36**, 4253-4256.
- Creighton, T. E. (1993) "Proteins, Structure and molecular properties." 2nd Edition. W. H. Freeman and Co.: New York.
- Creighton, T. E. (1997) "How important is the molten globule for correct protein folding?" *Trends Biochem. Sci.* **22**, 6-10.
- Curtius, T. Ber. *Dtsch. Chem. Ges.* (1902) **35**, 3226-3228.
- Dadlez, M., Kim, P. S. (1996) "Rapid formation of the native 14-38 disulfide bond in the early stages of BPTI folding." *Biochemistry* **35**, 16153-16164.
- Dauplais, M., Gilquin, B., Possani, L. D., Gurrola-Briones, G., Roumestand, C., Ménez, M. (1995) "Determination of the three-dimensional structure of noxiustoxin: analysis of structural differences with related short-chain scorpion toxins." *Biochem.* **34**, 16563-16573.
- de Alba, E., Jiménez, M. A., Rica, M., Nieto, J. L. (1996) "Conformational investigation of designed short linear peptides able to fold into β -hairpin structures in aqueous solution." *Folding and Design* **1**, 133-144.
- de Alba, E., Jiménez, M. A., Rico, M. (1997) "Turn residue sequence determines β -hairpin conformation in design peptides." *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 175-183.
- Derrick, J. P., Davies, G. J. Dauter, Z., Wilson, K. S., Wigley, D. B. (1992a) "Crystallization and preliminary X-ray analysis of the complex between a mouse Fab fragment and a single IgG-binding domain from streptococcal protein G." *J. Mol. Biol.* **227**, 1253-1254.

- Derrick, J. P., D. B. Wigley** (1992b) "Crystal structure of a streptococcal protein G domain bound to an Fab fragment." *Nature* **259**, 752-753.
- Desjarlais, J. R., Handel, T. M.** (1995) "New strategies in protein design." *Curr. Op. Biotech.* **6**, 460-466.
- Dhalluin, C., Boutillon, C., Tartar, A, Lippens, G.** (1997) "MAS NMR in solid-phase peptide synthesis." *J. Am. Chem. Soc.* , in press.
- Díaz, H., Kelly, J. W.** (1991) "The synthesis of dibenzofuran based diacids and amino acids designed to nucleate parallel and antiparallel β -sheet formation." *Tetrahedron Lett.* **32**, 5725-5728.
- Díaz, H., Espina, J. R., Kelly, J. W.** (1992) "A dibenzofuran-based amino acid designed to nucleate antiparallel β -sheet structure: evidence for intramolecular hydrogen-bond formation." *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 8316-8318.
- Díaz, H., Tsang, K. D., Choo, D., Kelly, J. W.** (1993) "The design of water soluble β -sheet structure based on a nucleation strategy." *Tetrahedron Lett.* **49**(17), 3533-3545.
- Díaz, H., Tsang, K. Y., Choo, D, Espina, J. R., Kelly, J. W.** (1993) "Design, synthesis, and partial characterization of water-soluble β -sheets stabilized by a dibenzofuran-based amino acid." *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 3790-3791.
- Dill, K. A.** (1990) "Dominant forces in protein folding." *Biochemistry* **29**(31), 7134-7155.
- Drakopoulou, E., Zinn-Justin, S., Guennegues, M., Gilquin, B., Ménez, A., Vita, C.** (1996) "Changing the structural context of a functional β -hairpin." *J. Biol. Chem.* **271**(20), 11979-11987.
- Eliasson, M., Andersson, R., Olsson, A., Wigzell, H., Uhlén, M.** (1989) "Differential IgG-binding characteristics of staphylococcal protein A, streptococcal protein G, and a chimeric protein AG." *J. Immunol.* **142**(2), 575-581.
- Ellman, J. A., Mendel, D., Schultz, P. G.** (1992) "Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins." *Science* **255**(10/01/92), 197-200.
- Erntell, M., Myhre, E. B. Sjöbring, U., Björk, L.** (1988) "Streptococcal protein G has affinity for both Fab- and Fc-fragment of human IgG." *Molec. Immun.* **25**(2), 121-126.
- Ewback, J. J., Creighton, T. E.** (1991) "The molten globule protein conformation probed by disulfide bonds." *Nature* **350**, 518-520.
- Fahnestock, S. R., Alexander, P., Filpula, D., Nagle, J.** (1990) "Structure and evolution of the streptococcal genes encoding proteing G." *Baterial immunoglobulin-binding Proteins"* , Vol 1, Chap. 11. *Acad. Press. Inc.*, 133-148.
- Fields, G. B., Noble R. L.** (1990) "Solid phase synthesis utilizing 9-fluorenyl-methoxycarbonyl amino acids." *Int. J. Peptide Protein Res.* **35**, 161-214.

- Fields, C. G., Lloyd, D. H., MacDonald, R. L., Otteson, K. M., Noble, R. L.** (1991) "HBTU activation for automated Fmoc solid-phase peptide synthesis." *Peptide Res.* **4**(2), 95-101.
- Flinn, J. P., Murphy, R., Boublik, J. H., Lew, M. J., Wright, C. E., Angus, J. A.** (1995a) "Synthesis and biological characterization of a series of analogs of ω -conotoxin GVIA." *J. Peptide Sci.* **1**, 379-384.
- Flinn, J. P., Murphy, R., Johns, B. R., Kunze, W. A. A., Angus, J. A.** (1995b) "Synthesis and biological characterization of a series of iberiotoxin analogues." *Int. J. Peptide Protein Res.* **45**, 320-325.
- Fraenkel, G., Henrichs, M., Hewitt, J. M., Su, B. M., Geckle, M. J.** (1980) "Dynamic behavior and aggregation of propyllithium from ^{13}C and ^6Li NMR at high field." *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 3345-3350.
- Frank, M. K., Glore, G. M., Gronenborn, A. M.** (1995) "Structural and dynamic characterization of the urea denatured state of the immunoglobulin binding domain of streptococcal protein G by multidimensional heteronuclear NMR spectroscopy." *Protein Science* **4**, 2605-2615.
- Fraser, R. R., Bresse, M., Mansour, T.** (1983) "Ortho lithiation of monosubstituted benzenes: a quantitative determination of pKa values in tetrahydrofuran." *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 7790-7791.
- Freidinger, R. M., Veber, D. F., Perlow, D. S., Brooks, J. R., Saperstein, R.** (1980) "Bioactive conformation of luteinizing hormone-releasing hormone: evidence from a conformationally constrained analog." *Science* **210**, 656-658.
- Frick, I.-M., Wikström, M., Forsén, S., Drakenberg, T., Gomi, H., Sjöbring, U., Björk, L.** (1992) "Convergent evolution among immunoglobulin G-binding bacterial proteins." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8532-8536.
- Friedrichs, M. S., T. R. Stouch, Bruccoleri, R. E., Mueller, L., Constantine, K. L.** (1995) "Structural and dynamic properties of a β -hairpin-forming linear peptide." *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 10855-10864.
- Frishman, D., Mewes, H. W.** (1997) "Protein structural classes in five complete genomes." *Nature Struct. Biol.* **4**(8), 626-628.
- Fuentes, A., Marinas, J. M., Sinisterra, J. V.** (1987) "Evidence d'un mécanisme de catalyse par transfert monoélectronique (ETC) pour la réaction de Cannizzaro, en phase hétérogène, en conditions sonochimiques." *Tetrahedron Lett.* **28**(26), 2947-2950.
- Fuji, K., Khanapure, S. P., Node, M., Kawabata, T., Itoh, A., Masaki, Y.** (1990) "Hard acid and soft nucleophile systems. Part 12. Regioselective functionalisation of 1,3-dienes through the Lewis acid mediated thienium cation Diels-Alder reaction." *Tetrahedron* **46**, 7393-7402.

- Gallagher, T., Alexander, P., Bryan, P., Gilliland, G. L.** (1994) "Two crystal structures of the B1 immunoglobulin-binding domain of streptococcal protein G and comparison with NMR." *Biochemistry* **33**, 4721-4729.
- Gardner, B., Nakanishi, H., Kahn, M.** (1993) "Conformationally constrained nonpeptide β -turn mimetics of enkephalin." *Tetrahedron* **49**(17), 3433-3448.
- Gardner, R. R., Liang, G.-B., Gellman, S. H.** (1995) "An achiral dipeptide mimetic that promotes β -hairpin formation." *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 3280-3281.
- Garret, J. B., Mullins, L. S., Raushel, F. M.** (1996) "Are turns required for the folding of ribonuclease T1?" *Protein science* **5**, 204-211.
- Genin, M. J., Ojala, W. H., Gleason, W. B., Johnson, R. L.** (1993) "Synthesis and crystal structure of a peptidomimetic containing the (*R*)-4,4-spiro lactam type-II β -turn mimic." *J. Org. Chem.* **58**, 2334-2337.
- Gilman, H., Avakian, S.** (1945) "Dibenzofuran. XXIII. Rearrangement of halogen compounds in amination by sodamide." *J. Am. Chem. Soc.* **67**, 349-351.
- Goh, J. W., Kelly, M. E. M., Pennefather, P. S., Chicchi, G. G., Cascieri, M. A., Garcia, M. L., Kaczorowski, G. J.** (1992) "Effect of charybdotoxin and leiurotoxin I on potassium currents in bullfrog sympathetic ganglion and hippocampal neurons." *Brain Res.* **591**, 165-170.
- Gossen, D., Gesquière, J.-C., Tastenoy, M., De Neef, P., Waelbroeck, M., Christophe, J.** (1991) "Characterization and regulation of the expression of scyllatoxin (Leurotoxin I) receptors in the human neuroblasta cell line NB-OK 1." *FEBS Lett.* **285**(2), 271-274.
- Gouda, H., Torigoe, H., Saito, A., Sato, M., Arata, Y., Shimada, I.** (1992) "Three-dimensional solution structure of the B domain of staphylococcal protein A: comparison of the solution and crystal structures." *Biochemistry* **31**, 9665-9672.
- Goward, C. R., Murphy, J. P., Atkinson, T., Barstow, D. A.** (1990) "Expression and purification of a truncated recombinant streptococcal protein G." *Biochem. J.* **267**, 171-177.
- Graciani, N. R., Tsang, K. Y., McCutchen, S. L., Kelly, J. W.** (1994) "Amino acids that specify structure through hydrophobic clustering and histidine-aromatic interactions lead to biologically active peptidomimetics." *Bioorg. Med. Chem.* **2**(9), 999-1006.
- Gramberg, D., Robinson, J. A.** (1994) "Design and synthesis of a *cis*-Gly-Pro, type-VI turn, dipeptide mimetic and its use in Fmoc-solid phase peptide synthesis." *Tetrahedron Lett.* **35**(6), 861-864.
- Granier, C., Pedroso Muller, E., van Rietschoten, J.** (1978) "Use of synthetic analogs for a study on the structure-activity relationship of apamin." *Eur. J. Biochem.* **82**, 293-299.

- Gronenborn, A. M., Filpula, D. R., Essig, N. Z., Achari, A., Whitlow, M., Wingfield, P. T., Clore, G. M.** (1991) "A novel, highly stable fold of the immunoglobulin binding domain of streptococcal protein G." *Science* **253**, 657-661.
- Gronenborn, A. M., Clore G. M.** (1993) "Identification of the contact surface of a streptococcal protein G domain complexed with a human Fc fragment." *J. Mol. Biol.* **233**, 331-335.
- Gronenborn, A. M., Frank, K., Clore, G. M.** (1996) "Core mutants of the immunoglobulin binding domain of the streptococcal protein G: stability and structural integrity." *FEBS Lett.* **398**, 312-316.
- Gros, P., Fort, Y., Queguiner, G., Caubère P.** (1995) "Aggregative activation and heterocyclic chemistry III. Unusual regioselective lithiation of 2-alkoxy-pyridines." *Tetrahedron Lett.* **36**, 4791-4794.
- Gschwend, H. W., Rodriguez, H. R.** (1979) "Heteroatom-facilitated lithiations." *Organic Reactions* **26**, 1.
- Haenel, M. W., Fieseler, H., Jakubik, D., Gabor, B., Goddard, R., Krüger, C.** (1993) "Bidentate phosphines of heteroarenes: 1,9-bis(diphenylphosphino)-dibenzothiophene and 4,6-bis(diphenylphosphino)dibenzothiophene." *Tetrahedron Lett.* **34**, 2107-2110.
- Haenel, M. W., Jakubik, D., Rothenberger, E., Schroth, G.** (1991) "Bidentate phosphine of heteroarenes: 4,6-bis(diphenylphosphino)dibenzofuran and 4,6-bis(diphenylphosphino)dibenzothiophene." *Chem. Ber.* **124**, 1705-1710.
- Hain et coll.** (1990) *Science*, **248**, 1544-1547.
- Hall, P. L., Gilchrist, J. H., Harrison, A. T., Fuller, D. J. Collum, D. B.** (1991) "Mixed aggregation of lithium enolates and lithium halides with lithium 2,2,6,6-tetramethyl piperidide (LiTMP)." *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 9575-9585.
- Hancock, W. S., Battersby, J. E.** (1976) "A new micro-test for the detection on incomplete coupling reactions in solid-phase peptide using 2,4,6-trinitrobenesulphonic acid." *Anal. Biochem.* **71**(1), 260-264.
- Haque, T. S., Little, J. C., Gellman, S. H.** (1996) "Stereochemical requirements for β -hairpin formation: model studies with four-residue peptides and depsipeptides." *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 6975-6985.
- Hassner, A., Alexanian, V.** (1978) "Direct room temperature esterification of carboxylic acids." *Tetrahedron Lett.* **46**, 4475-4478.
- Hecht, M. H., J. S. Richardson, Richardson, D. C., Ogden, R. C.** (1990) "De novo design, expression, and characterization of felix: a four-helix bundle protein of native-like sequence." *Science* **249**, 884-891.
- Hecht, M. H.** (1994) "De novo design of β -sheet proteins." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8729-8730.

- Hohsaka, T., Ashizuka, Y., Murakami, H., Sisido, M. (1996) "Incorporation of nonnatural amino acids into streptavidin through *in vitro* frame-shift suppression." *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 9778-9779.
- Hölzemann, G. (1993) "Peptide conformation mimetics." *Kontakte*, 55-63.
- Honzl, J., Rudinger, J. (1961) *Coll. Czech. Chem. Commun.* **26**, 2333.
- Hugues, M., Duval, D., Kitabgi, P., Lazdunski, M., Vincent, J.-P. (1982a) "Preparation of a pure monoiodo derivative of the bee venom neurotoxin apamin and its binding properties to rat brain membrane synaptosomes." *J. Biol. Chem.* **257**(6), 2762-2769.
- Hugues, M., Duval, D., Schmid, H., Kitabgi, P., Lazdunski, M., Vincent, J.-P. (1982b) "Specific binding and pharmacological interactions of apamin, the neurotoxin from bee venom, with guinea pig colon." *Life Sciences* **31**, 437-443.
- Hugues, M., Romey, G., Duval, D., Vincent, J.-P., Lazdunski, M. (1982c) "Apamin as a selective blocker of the calcium-dependant potassium channel in neuroblastoma cells: voltage-clamp and biochemical characterization of the toxin receptor." *Proc. Natl. Acad. sci. USA* **79**, 1308-1312.
- Hyde, C., Johnson, T., Owen, J. D., Quibell, M., Sheppard, R. C. (1994) "Some 'difficult sequences' made easy. A study of interchain association in solid-phase peptide synthesis." *Int. J. Peptide Protein Res.* **43**, 431-440.
- Igano, K., Minotani, Y., Yoshida, N., Kono, M., Inouye, K. (1981) "A synthesis of human proinsulin C-peptide." *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **54**, 3088-3094.
- Inisan, A. G., S. Meunier, Fedelli, O., Altbach, M., Fremont, V., Sabatier, J.-M., Thévan, A., Bernassau, J.-M., Cambillau, C., Darbon, H. (1995) "Structure-activity relationship study of a scorpion toxin with high affinity for apamin-sensitive potassium channels by means of the solution structure of analogues." *International Journal of Peptide Research* **45**, 441-450.
- Jakakumar, R., Jayanthi, C. Gomathy, L. (1995) "Peptide aggregates: a novel model system to study self-assembly of peptides." *Int. J. Peptide Protein Res.* **45**, 129-137.
- Kabalka, G. W., Guindi, L. H. M. (1990) "Selected reductions of conjugated nitroalkenes." *Tetrahedron* **46**, 7443-7457.
- Kahn, M., Devens, B. (1986) "The design and synthesis of nonpeptide mimic of an immunosuppressing peptide." *Tetrahedron Lett.* **27**(40), 4841-4844.
- Kahn, M., Chen, G. (1987) "Methodology for the synthesis of mimetics of peptide β -turns." *Tetrahedron lett.* **28**(15), 1623-1626.
- Kahn, M., Wilke, S. Chen, B., Fujita, K., Lee, Y.-H., Johnson, M. E. (1988a) "The design and synthesis of mimetics of peptide β -turns." *J. Molecular Recognition* **1**(2), 75-79.

- Kahn, M., Wilke, S. Chen, B., Fujita, K.** (1988b) "Nonpeptide mimetics of β -turns: a facile oxidative intramolecular cycloaddition of an azodicarbonyl system." *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 1638-1639.
- Kahn, M., Bertenshaw, S.** (1989) "The incorporation of β -turn prosthetic units into Merrifield solid phase peptide synthesis." *Tetrahedron Lett.* **30**(18), 2317-2320.
- Kahn, M.** (1993) "Nonpeptide β -turn mimetics of enkephalin." *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **3**(5), 835-840.
- Kahn, M.** (1993) "Peptide secondary structure mimetics: recent advances and future challenges." *Synlett* , 821-826.
- Kaiser, E., R. L. Colescott, Bossinger, C. D., Cook, P. I.** (1970) "Color test for free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides." *Anal. Biochem.* **34**, 595-598.
- Kaiser, T., Nicholson, G. J., Kohlbau, H.J., Voelter, W.** (1996) "Racemization studies of Fmoc-Cys(Trt)-OH during stepwise Fmoc-solid phase synthesis." *Tetrahedron Lett.* **37**(8), 1187-1190.
- Kawashima, M., Sato T., Fujisawa, T.** (1989) "A facile method for synthesis of three carbon-homologated carboxylic acid by regioselective ring-opening of β -propiolactones with organocopper reagents." *Tetrahedron* **45**, 403-412.
- Kieber-Emmons, T., Murali, R., Green, M. I.** (1997) "Therapeutic peptides, and peptidomimetics" *Curr. Op. Biotech.* **8**, 435-441.
- Kemp, D. S., Galakatos, N. G.** (1986a) "Peptide synthesis by prior thiol capture. 1. A convenient synthesis of 4-hydroxy-6-mercaptodibenzofuran and novel solid phase synthesis of peptide-derived 4-(acyloxy)-6-mercaptodibenzofurans." *J. Org. Chem.* **51**, 1821-1829.
- Kemp, D. S., Galakatos, N. G., Bowen, B., Tan, K.** (1986b) "Peptide synthesis by prior thiol capture. 2. Design of templates for intramolecular O,N-acyl transfer. 4,6-disubstituted dibenzofurans as optimal spacing elements." *J. Org. Chem.* **51**, 1829-1838.
- Kemp, D. S., Bowen, B. R., Muendel, C.C.** (1990) "Synthesis and conformational analysis of epindolidione-derived peptide models for β -sheet formation." *J. Org. Chem.* **55**, 4650-4657.
- Kemp, D. S., Li, Z. Q.** (1995a) "2-amino-2'-carboxydiphenylacetylenes as β -turn mimetics. Synthesis and conformational properties." *Tetrahedron Lett.* **36**(24), 4175-4178.
- Kemp, D. S., Li, Z. Q.** (1995b) "A short β -sheet containing proline nucleated by a 2,2'-substituted tolan β -turn mimetic." *Tetrahedron Letters* **36**(24), 4179-4180.
- Kharrat, R., Mabrouk, K., Crest, M., Darbon, H., Oughideni, R., Martin-Eauclaire, M.-F., Jacquet, G., El Ayeb, M., Van Rietschoten, J., Rochat, H., Sabatier, J.-M.** (1996) "Chemical synthesis and characterization of maurotoxin, a short scorpion toxin with four disulfide bridges that acts on K^+ channels." *Eur. J. Biochem.* **242**, 491-498.

- Kim, K., Dumas, J. P., Germamanas, J. P.** (1996) "Novel bicyclic lactams as XaaPro type VI β -turn mimics: design, synthesis, and evaluation." *J. Org. Chem.* **61**, 3138-3144.
- Klaus, W., Broger C., Gerber, P., Senn, H.** (1993) "Determination of the disulfide bonding pattern in proteins by local and global analysis of nuclear magnetic resonance data." *J. Mol. Biol.* **232**, 897-906.
- Kobayashi, N., Honda, S., Yoshii, H., Uedaira, H., Munekata, E.** (1995) "Complement assembly of two fragments of the streptococcal protein G B1 domain in aqueous solution." *FEBS Lett.* **366**, 99-103.
- Kraulis, P. J.** (1991) "Similarity of protein G and ubiquitin." *Science* **254**, 581-582.
- Krause, E., M. Beyermann, Fabian, H., Dathe, M., Rothmund, S., Bienert, M.** (1996) "Conformation of a water-soluble β -sheet model peptide. A circular dichroism and Fourier-transform infrared spectroscopic study of double D-amino acid replacements." *Int. J. Peptide Protein Res.* **48**, 559-568.
- Kumaran, G., Kulkarni G. H.** (1994) "Titanium(IV)chloride-triethylsilane mediated conversion of ω -nitrostyrenes to phenylacetohydroximoyl chlorides." *Tetrahedron Lett.* **35**, 9099-9100.
- Kuszewski, J., Clore, G. M., Gronenborn, A. M.** (1994) "Fast folding of a prototypic polypeptide: the immunoglobulin binding domain of streptococcal protein G." *Protein Science* **3**, 1945-1952.
- Kyle, D. J., Green, L. M., Blake, P. R., Smithwick, D., Summers, M. F.** (1992) "A novel β -turn mimic useful for mapping the unknown topology of peptide receptors." *Peptide Res.* **5**(4), 206-209.
- LaBrenz, S. R., Kelly, J. W.** (1995) "Peptidomimetic host that binds a peptide guest affording a β -sheet structure that subsequently self-assembles. A simple receptor mimic." *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 1655-1656.
- Langridge, D. C.** (1986) "9-(Fluorenylmethyl)oxy carbonyl (Fmoc) amino acid chlorides. Synthesis, characterization, and application to the rapid synthesis of short peptide segments." *J. Am. Chem. Soc.* **51**, 3732-3734.
- Lecoq, A., Boussard, G., Marraud, M., Aubry, A.** (1993) "Crystal state conformation of three azapeptides containing the azaproline residue, a β -turn regulator." *Biopolymers* **33**, 1051-1059.
- Lewis, P. N., Momany, F. A., Scheraga, H. A.** (1973) "Chain reversals in proteins." *Biochem. Biophys. Acta* **303**, 211-229.
- Lian, L.-Y., Derrick, J. P., Sutcliffe, M. J., Yang, J. C., Roberts, G. C. K.** (1992) "Determination of the solution structure of domains II and III of protein G from *Streptococcus* by ^1H Nuclear magnetic resonance." *J. Mol. Biol.* **228**, 1219-1234.
- Lian, L.-Y., Barsukov, I. L. Derrick, J. P., Roberts, G. C. K.** (1994) "Mapping the interactions between streptococcal protein G and the Fab fragment of IgG in solution." *Nat. Struct. Biol.* **1**(6), 355-357.

- Lippens, G., Najib, J., Wodak, C., Tartar, A.** (1995) "NMR sequential assignments and solution structure of chlorotoxin, a small scorpion toxin that blocks chloride channels." *Biochemistry* **34**, 13-21.
- Lippens, G., Dhalluin, C., Wieruszeski, J.-M.** (1995) "Use of water flip-back pulse in NOESY homonuclear experiment." *J. Biomol. NMR*. **5**, 327-331.
- Lloyd-Williams, P., Albericio, F., Giralt, E.** (1993) "Convergent solid-phase peptide synthesis" *Tetrahedron* **49**(48), 11065-11133.
- Maercker, A., Demuth, W.** (1973) "Mechanism of cleavage of diethylether by alkyllithium compounds: differing mechanisms of decomposition of α - and β -deuterated diethyl ether." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **12**, 75-76.
- Maercker, A.** (1987) "Ether cleavage with organo-alkali-metal compounds and alkali metals." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **26**, 972-989.
- Marshall, G. R.** (1993) "A hierarchical approach to peptidomimetic design." *Tetrahedron* **49**(17), 3547-3558.
- Martins, J. C., Zhang, W., Borremans, F. A. M.** (1990) "Solution conformation of leiurotoxin I (scyllatoxin) by ^1H nuclear magnetic resonance." *FEBS Lett.* **260**(2), 249-253.
- Martins, J. C., van de Ven, F. J. M, Tartar, A., Lazdunski, M., Borremans, F. A. M.** (1995) "Determination of the three-dimensional solution structure of scyllatoxin by ^1H Nuclear Magnetic Resonance." *J. Mol. Biol.* **253**, 590-603.
- Mascagni, P. et coll.** (1987) "The use of crown ether in peptide chemistry." *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, **3**, 323-327.
- McWilliams, K., Kelly, J. W.** (1996) "Synthesis and conformational preferences of a potential β -sheet nucleator based on the 9,9-dimethylxanthene skeleton." *J. Org. Chem.* **61**, 7408-7414.
- Melnyk, O., Boutillon, C., Draffan, L., Odaert, B., Jean, F., Lippens, G., Tartar, A.** (1997) "Incorporation of a β -turn mimic in the N-terminal fragment of the B1 domain of streptococcal protein G" accepté pour publication dans *Letters in Peptide Science*.
- Mendel, D., Ellman, J. A., Chang, Z., Veenstra, D. L., Kollman, P. A., Schultz, P. G.** (1992) "Probing protein stability with unnatural amino acids." *Science* **256**, 1798-1802.
- Ménez, A., Bontems, F., Roumestand, C., Gilquin, B., Toma, F.** (1992) "Structural basis for functional diversity of animal toxins." *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* **99B**(1/2), 83-103.
- Merrifield, R. B.** (1963) "The synthesis of a tetrapeptide." *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149-2154.

- Meunier, S., J.-M. Bernassau, Sabatier, J.-M., Martin-Eauclaire, M. -F., Van Rietschoten, J., Cambillau, C., Darbon, H. (1993) "Solution structure of PO5-NH₂, a scorpion toxin analog with high affinity for the apamin-sensitive potassium channel." *Biochemistry* **32**, 11969-11976.
- Milner-White, E. J., Poet, R. (1987) "Loops, bulges, turns and hairpins in proteins." *Trends Biochem. Sci.* **12**, 189-192.
- Minor, D. L., Kim, P. S. (1994a) "Context is a major determinant of β -sheet propensity." *Nature* **371**, 264-267.
- Minor, D. L., Kim, P. S. (1994b) "Measurement of the β -sheet-forming propensities of amino acids." *Nature* **367**, 660-663.
- Minor, D. L., Kim, P. S. (1996) "Context-dependant secondary structure formation of a design protein sequence." *Nature* **380**, 730-734.
- Moroder, L., Besse, D., Musiol, H. J., Rudolph-Böhner, S., Siedler, F. (1996) "Oxidative folding of cysteine-rich peptides vs regioselective cysteine pairing strategies." *Biopolymers (Peptide Science)* **40**, 207-234.
- Müller, G., Gurrath, M., Kurz, M., Kessler, H. (1993) " β VI turns in peptides and proteins: a model peptide mimicry." *Proteins: structure, function, and genetics* **15**, 235-241.
- Muñoz, V., Serrano, L. (1994a) "Elucidating the folding problem of α -helical peptides using empirical parameters." *Nature Struct. Biol.* **1**, 399-409.
- Muñoz, V., Serrano, L. (1994b) "Elucidating the folding problem of α -helical peptides using empirical parameters, II. Helix macrodipole effects and rational modification of the helical content of natural peptides." *J. Mol. Biol.* **245**, 275-296.
- Muñoz, V., Serrano, L. (1994c) "Elucidating the folding problem of α -helical peptides using empirical parameters III. Temperature and pH dependance." *J. Mol. Biol.* **245**, 297-308.
- Nagai, U., Sato, K., Nakamura, R., Kato, R. (1993) "Bicyclic turnes dipeptide (BTD) as a β -turn mimetic; its design, synthesis and incorporation into bioactive peptides." *Tetrahedron* **49**(17), 3577-3592.
- Najib, J., Letailleur, T., Gesquière, J.-C., Tartar, A. (1996) "Solid-phase synthesis of ω -agatoxin IVA, a P-type calcium channel blocker." *J. Peptide Sci.* **2**, 1-10.
- Nakanishi, H., R. A. Chrusciel, Shen, R., Bertenshaw, S., Johnson, M. E., Rydel, T. J., Tulinski, A., Kahn, M. (1992) "Peptide mimetics of the thrombin-bound structure of fibrinopeptide A." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1705-1709.
- Narita, M., Honda, S., Umeyama, H., Ogura, T. (1988) "Infrared spectroscopic conformational analysis of polystyrene resin-bound human proinsulin C-peptide fragments. β -sheet aggregation of peptide chains during solid-phase peptide synthesis." *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **61**, 1201-1206.

- Narita, M., Umeyama, H., Isokawa, S., Honda, S. (1989a) "The electron donor-acceptor interaction between mixed solvents and its influence on their β -sheet structure-disrupting potential." *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **62**, 780-785.
- Narita, M., Umeyama, H., Yoshida, Y. (1989b) "The easy disruption of the β -sheet structure of resin-bound human proinsulin C-peptide fragments by strong electron-donor solvents." *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **62**, 3582-3586.
- Neira, J. L., Fersht, A. R. (1996) "An NMR study on the β -hairpin region of barnase." *Folding and Design* **1**, 231-241.
- Nesloney, C. L., Kelly, J. W. (1996a) "Progress towards understanding β -sheet structure." *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **4**(6), 739-766.
- Nesloney, C. L., Kelly, J. W. (1996b) "Synthesis and hydrogen bonding capabilities of biphenyl-based amino acids designed to nucleate β -sheet structure." *J. Org Chem.* **61**, 3127-3137.
- Neugebauer, W., Kos, A. J., Schleyer, P. v. R. (1982) "Regioselektive dimetallierung von aromaten. Bequemer zugang zu 2,2'-disubstituierten biphenylderivaten." *J. Organomet. Chem.* **228**, 107-118.
- Neugebauer, W., Clark, T., Schleyer, P. v. R. (1983) "Zweitmetallierung von 1-lithionaphtalin und 9-lithioanthracen." *Chem. Ber* **116**, 3283-3292.
- Nilges, M., Clore, G. M., Gronenborn, A. M. (1988a) "Determination of three-dimensional structures of proteins from interproton distance data by hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing calculations." *FEBS Lett.* **229**, 317-324.
- Nilges, M., Clore, G. M., Gronenborn, A. M. (1988b) "Determination of three-dimensional structures of proteins from interproton distance data by dynamical simulated annealing from a random array of atoms." *FEBS Lett.* **229**, 317-324.
- Nowak, M. W., Kearney, P. C., Lester, H. A. (1995) "Nicotinic Receptor Binding Site Probed with Unnatural Amino Acid Incorporation in Intact Cells." *Science* **268**, 439-442.
- Nowick, J. S., Abdi, M., Bellamo, K. A., Love, J. A., Martinez, E. J., Norohna, G., Smith, E. S., Ziller, J. W. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 89-95.
- O'Neil, K. T., Hoess, R. H., Raleigh, D. P., DeGrado, W. F. (1995) "Thermodynamic genetics of the folding of the B1 immunoglobulin-binding domain from streptococcal protein G." *Proteins* **21**, 11-21.
- Olsson, A., Eliasson, M., Guss, B., Nilsson, B., Hellman, U., Lindberg, M., Uhlén, M. (1987) "Structure and evolution of the repetitive gene encoding streptococcal protein G." *Eur. J. Biochem.* **168**, 319-324.
- Orban, J., Alexander, P., Bryan, P. (1992) "Sequence-specific ^1H assignments and secondary structure of the streptococcal protein G B2-domain." *Biochemistry* **31**, 3604-3611.

- Orban, J., Alexander, P., Bryan, P.** (1994) "Hydrogen-deuterium exchange in the free and immunoglobulin G-bound protein G B-domain." *Biochemistry* **33**, 5702-5710.
- Orban, J., Alexander, P., Bryan, P., Khare, D.** (1995) "Assessment of stability differences in the protein G B1 and B2 domains from Hydrogen-deuterium exchange: comparison with calorimetric data." *Biochemistry* **34**, 15291-15300.
- Osterhout, J. J., T. Handel, Na, G., Toumadje, A., Long, R. C., Connolly, P. J., Hoch, J. C., Johnson, W. C., Live, D., DeGrado, W.** (1992) "Characterization of the structural properties of α_1 B, a peptide designed to form a four-helix bundle." *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 331-337.
- Ottolenghi, A., Fridkin, M. Zilkha, A.** (1963) "Synthesis and polymerisation of α -trimethylsilyl acrylic monomers." *Can. J. Chem.* **41**, 2977-2982.
- Pagel, M. D., Wemmer, D. E.** (1994) "Solution structure of a core peptide derived from scyllatoxin." *Proteins* **18**, 205-215.
- Parker, W., J. J. Stezowski** (1996) "The surface of β -sheet proteins contains amphiphilic regions which may provides clues about protein folding." *Proteins : Structure, Function, and Genetics* **25**, 253-260.
- Pease, J. H., Storrs, R. W., Wemmer, D.E.** (1990) "Folding and activity of hybrid sequence, disulfide-stabilized peptides." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 5643-5647.
- Pennington, M. W., Byrnes, M. E., Zaydenberg, I., Khaytin, I., De Chastonay, J., Krafte, D.S., Hill, R., Mahnir, V. M., Volberg, W.A., Gorczyca, W., Kem, W. R.** (1995) "Chemical synthesis and characterization of ShK toxin: apotent potassium channel inhibitor from sea anemone." *Int. J. Peptide Protein Res.* **46**, 354-358.
- Pessi, A., E. Bianchi, Cramer, A., Venturini, S., Tramontano, A., Sollazzo, M.** (1993) "A designed metal-binding protein with a novel fold." *Nature* **362**, 367-369.
- Pierret, B., Virelizier, H., Vita, C.** (1995) "Synthesis of a metal binding protein designed on the α/β scaffold of charybdotoxin." *Int. J. Peptide Protein Res.* **46**, 471-479.
- Piotto, M., Saudek, V., Sklenar, V.** (1992) "Gradient-tailored for single quantum NMR spectroscopy of aqueous solution." *J. Biomol. NMR* **2**, 661-665.
- Posner, G. H., Crouch, R. D.** (1990) "Nitrolefins in one-flask, tandem, A+B+C coupling reactions producing heterocycles." *Tetrahedron* **46**, 7509-7530.
- Predki, P. F., V. Agrawal, Brünger, A. T., Regan, L.** (1996) "Amino-acid substitutions in a surface turn modulate protein stability." *Nature Structural Biology* **3**(1), 54-58.
- Price-Carter, M., Gray, W. R., Goldenberg, D. P.** (1996a) "Folding of ω -conotoxins. 1. Efficient disulfide-coupled folding of mature sequences in vitro." *Biochem.* **35**, 15537-15546.

- Price-Carter, M., Gray, W. R. Goldenberg, D. P.** (1996b) "Folding of ω -conotoxins. 2. Influence of precursor sequences and protein disulfide isomerase." *Biochem.* **35**, 15547-15557.
- Pugh et coll.** (1992) *Int. J. Peptide and Protein Res.* **40**, 208-213.
- Ram, S., Ehrenkauf, R. E.** (1988) "Ammonium formate in organic synthesis: a versatile agent in catalytic hydrogen transfer reductions." *Synthesis* , 91-95.
- Ramage, R., Green, J., Blake, A. J.** (1991) "An acid labile arginine derivative for peptide synthesis N^G-2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl-L-arginine." *Tetrahedron* **47**(32), 6353-6370.
- Ramage, R., Raphy, G.** (1992) "Design of an affinity-based N^α-amino protecting group for peptide synthesis: tetrabenzo[a,c,g,i] fluorenyl-17-methyl urethanes (TbFmoc)." *Tetrahedron letters* **33**(3), 385-388.
- Ramage, R., Irving, S. L., McInnes, C.** (1993a) "Design of a versatile linker for solid phase peptide synthesis: synthesis of C-terminal primary/secondary amides and hydrazides" *Tetrahedron letters* **34**(41), 6599-6602.
- Ramage, R., Wahl, F. O.** (1993b) "4-(17-tetrabenzo(a,c,g,i)fluorenylmethyl)-4',4"-dimethoxytrityl chloride: a hydrophobic 5'-protecting group for the separation of synthetic oligonucleotides." *Tetrahedron Lett.* **34**(44), 7133-7136.
- Ramakrishnan, C., Srinivasan, N., Nataraj, D. V.** (1996) "Motifs and conformational analysis of amino acid residues adjoining β -turns in proteins." *Int. J. Peptide Protein Res.* **48**, 420-428.
- Ramírez-Alvarado, M., Blanco, F. J., Serrano, L.** (1996) "De novo design and structural analysis of a model β -hairpin peptide system." *Nature Struct. Biol.* **3**(7), 604-611.
- Ramírez-Alvarado, M., Serrano, L., Blanco, F. J.** (1997) "Conformational analysis of peptides corresponding to all the secondary structure elements of protein L B 1 domain: secondary structure propensities are not conserved in proteins with the same fold." *Protein Science* **6**, 162-174.
- Ramurthy, S., Lee, M. S., Nakanishi, H., Shen, R., Kahn, M.** (1994) "Peptidomimetic antagonists designed to inhibit the binding of CD4 to HIV GP120." *Bioorg. Med. Chem.* **2**(9), 1007-1013.
- Richardson, J. S.** (1981) "The anatomy and taxonomy of protein structure." *Adv. Protein Chem.* **34**, 167-339.
- Rizo, J., Gierasch, L.** (1992) "Constrained peptides : models of bioactive peptides and protein substructures." *Ann. Rev. Biochem.* **61**, 387-418.
- Rose, G. D., Gierash, L. M., Smith, J. A.** (1985) "Turns in peptides and proteins." *Adv. Protein Chem.* **37**, 1-109.
- Rubingh, D. N.** (1997) "Protein engineering from a bioindustrial point of view." *Curr. Op. Biotech.* **8**, 417-422.

- Sabatier, J.-M., Zerrouk, H., Mabrouk, K., Bensliman, A., Rochat, H., Martin-Eauclaire, M.-F., Van Rietschoten, J.** (1993) "PO5, a new Leiurotoxin I-like scorpion toxin: synthesis and structure-activity relationships of the α -amidated analog, a ligand of Ca^{2+} -activated K^+ channels with increased affinity." *Biochem.* **32**, 2763-2770.
- Sabatier, J.-M., Fremont, V., Mabrouk, K., Crest, M., Darbon, H., Rochat, H., Van Rietschoten, J., Martin-Eauclaire, M.-F.** (1994) "Leiurotoxin I, a scorpion toxin for Ca^{2+} -activated K^+ channels." *Int. J. Peptide Protein Res.* **43**, 486-495.
- Sabatier, J.-M., Lecomte, C., Mabrouk, K., Darbon, H., Oughideni, R., Canarelli, S., Rochat, H., Martin-Eauclaire, M.-F., Van Rietschoten, J.** (1996) "Synthesis and characterization of leiurotoxin I analogs lacking one disulfide bridge: evidence that disulfide pairing 3-21 is not required for full toxin activity." *Biochemistry* **35**, 10641-10647.
- Saragovi, H. U., D. Fitzpatrick, Raktabutr, A., Nakanishi, H., Kahn, M., Greene, M. I.** (1991) "Design and synthesis of a mimetic from an antibody complementary-determining region." *Science* **253**, 792-795.
- Sarin, V. K., Kent, S. B. H., Tam, J. P., Merrifield, R. B.** (1981) "Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction." *Anal. Biochem.* **117**, 147-157.
- Sato, K., Nagai, U.** (1986) "Synthesis and antibiotic activity of a gramicidin S analog containing bicyclic b-turn dipeptides." *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* , 1231-1234.
- Sauer, R. T.** (1996) "Protein folding from a combinatorial perspective." *Folding and design* **1**, 27-30.
- Schneider, J. P., Kelly, J. W.** (1995a) "Synthesis and efficacy of square planar copper complexes designed to nucleate β -sheet structure." *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 2533-2546.
- Schneider, J. P., Kelly, J. W.** (1995b) "Templates that induce α -helical, β -sheet, and loop conformations." *Chem. Rev.* **95**, 2169-2187.
- Schultz, G. E., Shirkner, R. H.** (1979) *Principle of protein structure* (Springler Verlag, New-York).
- Searle, M. S., Williams, D. H., Packman, L. C.** (1995) "A short linear peptide derived from the linear N-terminal sequence of ubiquitin folds into a water-stable non-native β -hairpin." *Nature Struct. Biol.* **2**(11), 999-1006.
- Service, R. F.** (1996) "Between the sheets : why do protein strands line up?" *Science* **274**, 34-35.
- Sibanda, B. L., Blundell, T. L., Thornton, J. M.** (1989) "Conformation of β -hairpins in protein structures. A systematic classification with applications to modelling by homology, electron density fitting and protein engineering." *J. Mol. Biol.* **206**, 759-777.
- Sieber, V., Moe, G. R.** (1996) "Interactions contributing to the formation of a β -hairpin-like structure in a small peptide." *Biochemistry* **35**, 181-188.

- Siedler, F., Weyher, E., Moroder, L. (1996) "Cysteine racemization in peptide synthesis: a new and easy detection method." *J. Peptide Sci.* **2**, 271-275.
- Sjöbring, U., Björk, L., Kastern, W. (1989a) "Protein G genes: structure and distribution of IgG-binding and albumin-binding domains." *Mol. Microbiol.* **3**(3), 319-327.
- Sjöbring, U., Trojnar, J., Grubb, A., Åkerström, B., Björk, L. (1989b) "Ig-G binding bacterial proteins also bind proteinase inhibitors." *I. Immunol.* **143**, 2948-2954.
- Sjöbring, U., Björk, L., Kastern, W. (1991) "Streptococcal protein G." *J. Biol. Chem.* **266**, 399-405.
- Slocum, D. W., Thompson, J., Friesen, C. (1995) "A predictive model for ceratin directed metalations, III; the ability of a methyl substituent to influence the directed metalation of anisole." *Tetrahedron Lett.* **36**(45), 8171-8174.
- Smith, C., Phillips, M., Miller, C. (1986) "Purification of charybdotoxin, a specific inhibitor of the high-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel." *J. Biol. Chem.* **261**, 14607-14613.
- Smith, C. K., Withka, J. M., Regan, L. (1994) "A thermodynamic scale for the β -sheet forming tendencies of the amino acids." *Biochemistry* **33**, 5510-5517.
- Smith, C. K., Regan, L. (1995) "Guidelines for protein design: the energetics of β -sheet side chain interactions." *Science* **270**, 980-982.
- Smith, C. K., Regan, L. (1997) "Construction and design of β -sheets." *Acc. Chem. Res.* **30**, 153-161.
- Snieckus, V. (1990a) "Directed *ortho*-metalation. Tertiary amide and *O*-carbamate directors in synthetic strategies for polysubstituted aromatics." *Chem. Rev.* **90**, 879-933.
- Snieckus, V. (1990b) "The directed *ortho* metalation reaction. Methodology, applications, synthetic links, and a non aromatic ramification." *Pure & Appl. Chem.* **62**, 2047-2056.
- Sommer, L. H., D. L. Bailey, Goldberg, G. M., Buck, C. E., Bye, T. S., Evans, F. J., Whitmore, F. C. (1954) "Vinylsilanes, chlorovinylsilanes and β -styryltriméthylsilane. Further studies on the α -silicon effect and β -elimination involving silicon." *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 1613-1618.
- Stanetty, P., Mihovilovic M. F. (1997) "Half-lives of organolithium reagents in common ethereal solvents." *J. Org. Chem.* **62**, 1514-1515.
- Still, W. C., Kahn, M., Mitra, A. (1978) "Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution." *J. Org. Chem.* **43**(14), 2929-2925.
- Stone, G. C., Sjöbring, U., Björk, L., Sjöquist, J., Barber, C. V., Nardella, F. A. (1989) "The Fc binding site for streptococcal protein G is the C γ 2-C γ 3 interface region of IgG and is related to the sites that bind staphylococcal protein A and human rheumatoid factors." *J. Immunol.* **143**(2), 565-570.

- Struthers, M. D., Cheng, R. P., Imperiali, B.** (1996) "Design of a monomeric 23-residue polypeptide with defined tertiary structure." *Science* **271**(21/01), 342-345.
- Su, T., Nakanishi, H., Xue, L., Chen, B., Tuladhar, S., Johnson, M. E., Kahn, M.** (1993) "Non peptide β -turn of enkephalin." *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **3**(5) 835-840.
- Tam, J. P., Wu, C.-R., Liu, W., Zhang, J.-W.** (1991) "Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxide. Scope and applications." *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 6657-6662.
- Tam, J. P., Lu Y.-A.** (1995) "Coupling difficulty associated with interchain clustering and phase transition in solid phase peptide synthesis." *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 12058-12063.
- Trost, B. M.** (1991) "Comprehensive organic chemistry." . B. M. Trost and I. Fleming. Oxford, Pergamon Press.
- Tsang, K. Y., Diaz, H., Graciani, N., Kelly, J. W.** (1994) "Hydrophobic cluster formation is necessary for dibenzofuran-based amino acids to function as β -sheet nucleators." *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 3988-4005.
- Tsutsumi, S., K. Kushiku, Kuwahara, T., Tokunaga, R., Furakawa, T.** (1995) "Iontropic mechanisms involved in postsynaptic inhibition by endothelins of ganglionic transmission in dog cardiac sympathetic ganglia." *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26**, 707-713.
- Tuchscherer, G., Mutter, M.** (1995) "Protein design as a challenge for peptide chemists." *Journal of Peptide Science* **1**, 3-10.
- van Eikema Hommes, N. J. R., von Ragué Schleyer, P.** (1994) "Mechanisms of aromatic lithiation. Influence of aggregation and directing groups." *Tetrahedron* **50**, 5903-5916.
- Venkatachalam, M.** (1968) "Stereochemical criteria for polypeptides and proteins: conformation of a system of three linked peptides units." *Biopolymers* **6**, 1425-1436.
- Viguera, A. R., F. J. Blanco, Serrano, L.** (1995) "The order of secondary structure elements does not determine the structure of a protein but does affect its folding kinetics." *J. Mol. Biol.* **247**, 670-681.
- Viguera, A. R., Jiménez, M. A., Rico, M., Serrano, L.** (1996) "Conformational analysis of peptides corresponding to β -hairpins and a β -sheet that represent the entire sequence of the α -spectrin SH3 domain." *J. Mol. Biol.* **255**, 507-521.
- Vita, C., Roumestand, C., Toma, F., Ménez, A.** (1995) "Scorpion toxins as natural scaffolds for protein engineering." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6404-6408.
- Vogel, Furniss, B. S., Hannaford A. J.** (1989) "Vogel's. Textbook of practice organic chemistry. 5th ed." . L. S. Technical. New York, John Wiley & Sons.

- Welsch, J. H., Zerbe, O., von Philipsborn, W., Robinson, J. A. (1992) " β -Turns induced in bradikinin by (S)- α -methylproline." *FEBS Lett.* **3**, 216-220.
- Wijkens, R., Kotten, E. M. v., Harrison, A. T., Fuller, D. J., Collum, D. B. (1995) "The formation of a mixed organolithium aggregate $\text{Li}_4\text{R}_2\text{nBu}_2$ during the heteroatom-assisted lithiation of 1,3-bis(dimethylaminomethyl)-2,4,6-trimethylbenzene ($\text{R}=2,6\text{-(CH}_2\text{NMe}_2)_2\text{-3,5-Me}_2\text{C}_6\text{HCH}_2$)." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **34**, 219-222.
- Wilmot, C. M., Thornton, J. M. (1988) "Analysis and prediction of the different types of β -turn in proteins." *J. Mol. Biol.* **203**, 221-232.
- Wilson, D. R., Finlay, B. B. (1997) "The 'Asx-Pro turn' as a local structural motif stabilized by alternative patterns of hydrogen bonds and a consensus-derived model of the sequence Asn-Pro-Asn." *Protein Engineering* **10**(5), 519-529.
- Winningham, M. J., Sogah, D. Y. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 11173-11174.
- Wintjens, R. T., Rooman, M. J., Wodak, S. (1994) "Identification of short turn motifs in proteins using sequence and structure fingerprints." *Israel J. Chem.* **34**, 257-269.
- Wüthrich, K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids* - Wiley, New York.
- Yamashiro, D., Blake, J., Li, C. H. (1976) "The use of trifluoroethanol for improved coupling in solid-phase peptide synthesis." *Tetrahedron Lett.* **18**, 1469-1472.
- Yan, Y., Erickson, B. W., Tropsha, A. (1995) "Free energy for folding and refolding of four types of β turns: simulation of the role of D/L chirality." *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 7592-7599.
- Ybe, J. A., Hecht, M. H. (1996) "Sequence replacements in the central β -turn of plastocyanin." *Protein Sci.* **5**, 814-824.
- Zerkout, S., Dupont, V., Aubry, A., Vidal, J., Collet, A., Vicherat, A., Marraud, M. (1994) "Turn induction by N-aminoproline." *Int. J. Peptide Protein Res.* **44**, 378-387.
- Zhou, H. X., Hoess, R. H., DeGrado, W. F. (1996) "*In vitro* evolution of thermodynamically stable turns." *Nature structural biology* **3**(5), 446-451.
- Zinn-Justin, S., Guenneugues, M., Drakopoulou, E., Gilquin, B., Vita, C., Ménez, A. (1996) "Transfer of a β -hairpin from the functional site of snake curare-mimetic toxins to the α/β scaffold of scorpion toxins: three-dimensional solution structure of the chimeric protein." *Biochemistry* **35**, 8535-8543.

