



HAL
open science

Nanotube de peptides : une approche chimique pour contrôler le diamètre

Stéphane A Roux

► **To cite this version:**

Stéphane A Roux. Nanotube de peptides : une approche chimique pour contrôler le diamètre. Chimie organique. Université Paris-Sud Orsay, 2008. Français. NNT : . tel-01558746

HAL Id: tel-01558746

<https://hal.science/tel-01558746>

Submitted on 9 Jul 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ORSAY
N° D'ORDRE :

<p>Université de Paris Sud U.F.R. Scientifique d'Orsay</p>
--

THÈSE de DOCTORAT

Présentée par :

Stéphane Roux

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI ORSAY
Spécialité Chimie Organique

***Nanotubes de peptides : une approche chimique
pour contrôler le diamètre***

Soutenue le 30 Septembre 2008 devant la commission d'examen :

Mme Dr. Reiko Oda
M. Dr. Gérard Chassaing
Mme Dr. Maité Paternostre
MM. Dr. Jean-Christophe Cintrat
Pr. Cyrille Kouklovsky
Dr. Bernard Rousseau

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Abréviations utilisées

AFM : *Atomic-Force Microscope*
ATG : Analyse Thermo-Gravimétrique
ATR-IR : *Attenuated Total Reflectance InfraRed spectroscopy*
Boc : *ter*-butyloxycarbonyl
CCD: *Coupled Charge Display*
CCVD: *Catalytic Chemical Vapour Deposition*
CNT: *Carbon NanoTube*
Cp*: 1,2,3,4,5-pentamethylcyclopenta-2,4-dien-1-ide
DCM: dichlorométhane
DC_{8,9}PC: Diacetylenicphosphocholine ou 1,2-bis(tricosa-10,12-diynoyl)-3-phosphocholine
DEDL: Détecteur Evaporatif à Diffusion de Lumière
DEE: diéthyl ether
DFT: *Density Functional Theory*
DIC: diisopropylecarbodiimide
DMF: diméthylformamide
DVB: divinylbenzène
EDX: *Energy Dispersive X-Ray analysis*
HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*
Fmoc: 9-fluorénylméthoxyloxycarbonyl
HOBt: hydroxybenzotriazole
HRMS: *High-Resolution Mass Spectrometry*
MBHA: méthylbenzyhydramine
NMP: N-méthylpyrrolidinone
MEB: Microscopie Electronique à Balayage
MET: Microscopie Electronique en Transmission
MeOH: méthanol
Ph: phényle
POM: pivaloyloxyméthyle
PPM: Partie Par Million
RMN: Résonance Magnétique Nucléaire
SAXS: *Small Angle X-Ray Scattering*
SB²SM: Service de Bioénergétique, Biologie Structurale et Mécanismes (CEA-Saclay)
SM: Spectrométrie de Masse
t-Bu: *ter*-Butyle
T.A.: Température Ambiante
TIS: triisopropylsilane
TFA: *trifluoroacetic acid*
TMV: *Tobacco Mosaic Virus*

Sommaire

Introduction Générale	10
------------------------------	----

1^{ère} partie : Rappels bibliographiques

Introduction	13
---------------------	----

I.1 Les nanotubes	14
--------------------------	----

I.1.1 Définition	14
-------------------------	----

I.1.2 Les nanotubes de carbone	14
---------------------------------------	----

I.1.3 Les nanotubes organiques	16
---------------------------------------	----

I.1.4 Mesures et dimensions	17
------------------------------------	----

I.1.4.1. Nanotubes de carbone	17
-------------------------------	----

I.1.4.2 Nanotubes organiques	18
------------------------------	----

I.1.5 Contrôle de la taille	19
------------------------------------	----

I.2 Les nanotubes de peptides	22
--------------------------------------	----

I.2.1 Nanotubes issus de protéines ou peptides naturels	22
--	----

I.2.2 Nanotubes de cyclopeptides d'alternance D et L	25
---	----

I.2.3 Nanotubes basés sur des peptides amphiphiles	28
---	----

I.2.4 Nanotubes formés de dipeptides hydrophobes	30
---	----

I.3. Auto-assemblage en nanotubes de peptides	33
--	----

I.3.1 Caractéristiques générales	33
---	----

I.3.2 Classification	33
-----------------------------	----

I.3.2 Interactions faibles	35
-----------------------------------	----

I.3.2.1 Liaisons hydrogène	35
----------------------------	----

I.3.2.2 Interactions ioniques	36
-------------------------------	----

I.3.2.3 Interactions aromatiques	37
----------------------------------	----

I.3.2.4 Effet hydrophobe	38
--------------------------	----

I.3.3 Questions énergétiques	39
I.4. Applications des nanotubes de peptides	41
I.4.1 Problème du positionnement	41
I.4.1.1 Mesure de position	41
I.4.1.2 Positionnement contrôlé de nanotubes de peptides	42
I.4.1.3 Dépôt macroscopique de nanotube	46
I.4.2 Applications en sciences de la vie	46
I.4.3 Applications en nanotechnologie	50
I.4.3.1 Nanocapteurs	50
I.4.3.2 Création de nanofils et de nanocanaux	53
I.5 Le lanréotide	58
I.5.1 Origine biologique et acromégalie	58
I.5.2 Gel de lanréotide	59
I.5.2.1 Diagramme de phase	60
I.5.2.2 Conformation du lanréotide	61
I.5.2.3 Des nanotubes monoparois et monodisperses	62
I.5.2.4 Importance des caractéristiques structurales	63
I.5.2.4.1 Auto-assemblage des séquences dérivées	64
I.5.2.4.2 Environnements des chaînes aromatiques	65
Conclusion	68

II^{ème} partie : Synthèse d'une bibliothèque de peptides en vue d'auto-assemblage

Introduction	71
II.1 Synthèse d'une bibliothèque de peptides	72
II.1.1 Synthèse	72
II.1.1.1 Préparation de la résine	73

II.1.1.2 Assemblage de la séquence peptidique_____	73
II.1.1.3 Cyclisation du peptide_____	74
II.1.1.4 Clivage_____	75
II.1.2 Purification_____	76
II.1.3 Bibliothèque de peptides_____	76
II.2 Echange d'ions_____	78
II.2.1 Chromatographie liquide haute performance (HPLC)_____	78
II.2.2 Résine échangeuse_____	79
II.2.3 Déprotonation/reprotonation des charges_____	79
II.2.4 Techniques de caractérisations_____	80
II.2.5 Résultats et discussion_____	80
II.3 Caractérisation des propriétés d'auto-assemblage des dérivés peptidiques_____	84
II.3.1 Mise en solution des peptides_____	84
II.3.2 Analyses spectroscopiques et microscopiques des structures formées_____	84
II.3.3 Analyses par diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS)_____	85
II.3.4 Résultats et discussion_____	86
II.3.4.1 Peptides s'auto-assemblant en nanotubes monodisperses_____	87
II.3.4.2 Peptides ne s'assemblant pas en nanotubes monodisperses_____	88
II.4 Etude de la formation de composés mixtes nanotubes de carbone-nanotubes de peptides_____	91
II.4.1 Expériences avec des nanotubes de carbones individuels_____	92
II.4.1.1 Microscopie électronique à transmission_____	93
II.4.1.2 Analyse thermo-gravimétrique_____	95
II.4.2 Expériences avec des tapis de nanotubes de carbone alignés_____	97
II.4.2.1 Séchage à l'air_____	98
II.4.2.2 Séchage sous vide_____	99
II.5 Synthèse d'acides aminés non naturels_____	103
II.5.1 Synthèse de la β-fluorénylalanine_____	103

II.5.2 Synthèse d'une tyrosine substituée	105
II.5.3 Synthèse d'un analogue de l'histidine	110
II.5.3.1 Synthèse des composés	110
II.5.3.2 Déprotections sélectives des acides aminés	112
II.5.3.3 Mécanismes réactionnels	113
II.5.3.3.1 Catalyse au cuivre	113
II.5.3.3.2 Catalyse au ruthénium	114
Conclusion	116
Conclusion générale et perspective	118
Références bibliographiques	120

III^{ème} partie : Partie expérimentale

II.1 Généralités	131
III.1.1 Produits chimiques	131
III.1.2 Équipements	131
III.2 Synthèse en phase solide	133
III.2.1 Procédure générale pour la synthèse de peptide	133
III.2.2 Purification	135
III.2.3 Échange d'ion	135
III.2.4 Caractérisation	135
III.3. Echange d'ions	145
III.3.1 HPLC	145
III.3.2 Échange d'ion sur résine	145
III.3.3 Procédure de déprotonation/reprotonation	145

III.3.4 Méthodes analytiques	146
III.4 Étude de la formation de composés mixtes nanotubes de carbone-nanotubes de peptides	146
III.4.1 Expériences avec des nanotubes de carbones individuels	146
III.4.2 Expériences avec des tapis de nanotubes de carbone alignés	147
III.5 Synthèse en phase liquide	148
III.5.1 Synthèse de la β -fluorénylalanine	148
III.5.2 Synthèse d'une tyrosine substituée	152
III.5.3 Synthèse d'un analogue de l'histidine	154

Introduction générale

La conférence de Richard Feynman intitulée « *There's plenty of room at the bottom* » et présentée à Caltech en 1959 a, pour la première fois, décrit le potentiel découlant de la manipulation de la matière à l'échelle moléculaire ou atomique. La possibilité d'écrire l'ensemble des livres mondiaux dans un volume équivalent à une trentaine de pages y était envisagée, comme la fabrication de micro-ordinateurs ou la réalisation d'opérations chirurgicales non-invasives.

Les techniques permettant de telles fabrications y étaient aussi envisagées. Ces techniques sont aujourd'hui appelées *top-down* puisqu'elles font appel pour la plupart à des procédés de réduction de modèles macroscopiques. Ce type de techniques, tel que la photolithographie, a accompagné le développement de l'électronique.

Cependant, le procédé inverse est aussi envisageable : des éléments plus petits peuvent être assemblés de façon à obtenir l'objet attendu. Ceci constitue le procédé de fabrication le plus courant à l'échelle macroscopique. Cette approche est baptisée *bottom-up*.

La manipulation de molécules ou d'atomes individuels est cependant complexe à mettre en œuvre, notamment dans le cadre d'applications industrielles. Toutefois les forces qui gouvernent ces échelles sont très différentes de celles dominant le monde macroscopique : la gravité est par exemple négligeable en comparaison des forces de surface. La conception de molécules en tirant parti peut permettre à l'objet de s'auto-assembler, sans intervention directe. Il s'agit d'une approche biomimétique puisque cette stratégie est largement utilisée par les organismes vivants.

Quel est l'intérêt d'utiliser cette approche *a priori* complexe à mettre en œuvre ? Tout d'abord l'économie, puisque seuls les constituants impliqués dans l'objet final sont utilisés. Par ailleurs, des structures tridimensionnelles sont difficilement concevables par une approche *top-down* mais sont accessibles par la stratégie *bottom-up* de même que des structures bi- et monodimensionnelles : cette voie est donc très versatile.

A l'échelle nanoscopique, non seulement les forces à considérer sont différentes, mais les propriétés des objets dépendent aussi largement de leur taille. Dans les circuits électroniques actuels, la dimension des fils, drains et isolants est strictement contrôlée sous peine d'obtenir des systèmes défectueux. Il est donc obligatoire, lors de la conception, de satisfaire deux contraintes : le réglage des dimensions optimales du système et une monodispersité de ses dimensions lors de la fabrication.

Dans le cas d'une approche *bottom-up* par auto-assemblage, ces deux contraintes représentent encore un défi. De part la complexité des interactions mises en œuvre, les dimensions d'objets complexes restent difficiles à contrôler. De plus, les proportions obtenues au sein d'un même lot ne sont pas toujours uniques mais peuvent démontrer une gamme de tailles plus ou moins larges.

L'adoption d'une telle stratégie pour la production industrielle de nano-objets est donc empêchée par ces limitations.

Première Partie :
Rappels bibliographiques

Introduction

L'approche basée sur des molécules capables d'auto-assemblage est extrêmement versatile puisqu'elle permet de fabriquer des objets présentant un grand nombre de formes à partir de précurseurs très différents.

Parmi la variété de formes permises, les structures tubulaires ont un grand intérêt pour plusieurs raisons : elles peuvent être utilisées pour le transport ou le stockage de liquide, pour la conduction d'électricité ou dans des applications nécessitant de larges rapports surface sur volume, comme la détection ou la transmission de signal.

D'un point de vue fondamental, ces structures complexes sont aussi intéressantes pour la compréhension des interactions qu'elles impliquent.

Par ailleurs, les nanotubes organiques bénéficient de la grande richesse de méthodologies développées en synthèse organique. Ceci autorise leur fonctionnalisation ainsi que le développement de monomères particuliers.

Ces monomères donnent une partie de leur spécificité aux structures obtenues : ainsi les peptides sont intrinsèquement biocompatibles puisque d'origine biologique. Ils permettent d'envisager un grand nombre d'interactions, étudiées par ailleurs dans les protéines.

Enfin, la problématique du dimensionnement reste d'un intérêt central, avec les deux aspects de dispersité et de contrôle.

Ainsi, cette partie théorique sera l'occasion d'un rapide survol des molécules permettant l'obtention de nanotubes. Les types d'assemblages possibles seront décrits, incluant la dispersité et le type de dimensions usuellement démontrés.

Un aperçu détaillé de nanotubes assemblés à partir de peptides sera donné: les mécanismes d'empilement seront décrits, précédant un chapitre consacré aux interactions impliquées dans ces assemblages.

Les applications déjà développées seront alors détaillées dans les domaines des sciences de la vie et de la technologie.

Finalement, une présentation du peptide lanréotide sera faite, incluant ses propriétés biologiques ainsi que ses capacités d'auto-assemblage.

I.1 Les nanotubes

I.1.1 Définition

Donner une définition exacte d'un nanotube est un exercice assez difficile puisqu'elle varie beaucoup selon les auteurs. Ainsi, Charles R. Martin définit un nanotube comme une structure tubulaire creuse, telle une paille⁽¹⁾. Ces tubes ont donc un espace intérieur conséquent à la différence des fibres (ou fibrilles) qui sont pleines et ne possèdent pas d'espace intérieur⁽²⁾. La question de la dimension est encore plus critique puisque si Martin leur donne un diamètre inférieur à 100 nm⁽¹⁾, concordant avec la définition d'une nanoparticule donnée par Bhushan dans le « handbook of nanotechnology »⁽³⁾, certaines structures présentent des gammes de tailles assez larges. Les assemblages de diphénylalanine, par exemple, présentant des diamètres allant de 80 à 300 nm⁽⁴⁾ et ne rentrent donc que partiellement dans ce critère de taille. Enfin, le rapport longueur sur diamètre est aussi une donnée importante puisqu'un tube de fort diamètre pour une longueur faible est plutôt défini comme un pore⁽⁵⁾.

Le critère de taille peut sembler restrictif puisqu'il est difficile de qualifier un tube de 150 nm de diamètre de microtubule. De plus, il est nécessaire de prendre en compte les systèmes possédant des gammes de tailles assez larges.

Ainsi, le qualificatif de « nanotube » décrira dans ce manuscrit une structure tubulaire creuse possédant un diamètre inférieur à 500 nm et un rapport longueur sur diamètre supérieur à 5.

I.1.2 Les nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone constituent le type de nanotube le plus connu, notamment du grand public. Si leur découverte a été rapportée pour la première fois en 1991 par Ijima⁽⁶⁾, il semble qu'ils aient été produits depuis longtemps. En effet, un brevet semble attester de leur formation en 1889^(7,8) et ces structures ont été retrouvées dans la lame d'un sabre arabe du 17^{ème} siècle⁽⁹⁾.

Un nanotube de carbone est composé d'atomes de carbone hybridés sp^2 organisés sous forme d'hexagones⁽³⁾. Ils peuvent être vus sous la forme d'une feuille de graphène enroulée sur elle-même (Fig. 1.1). Selon la forme d'enroulement, on les qualifie de « zigzag », d'« *armchair* » ou de chiraux.

Le tube est fermé à chaque extrémité par des structures théoriquement hémisphériques, similaires à des buckminster fullerènes (Fig. 1.2). Dans la pratique, les extrémités présentent souvent des formes biseautées ou trapézoïdales autorisées par la présence de cycles à cinq atomes. Pour être précis, ce type de tube doit d'ailleurs s'appeler un nanotube de carbone fullerène, puisqu'il est possible de fabriquer des nanotubes de carbone amorphe⁽¹⁾.

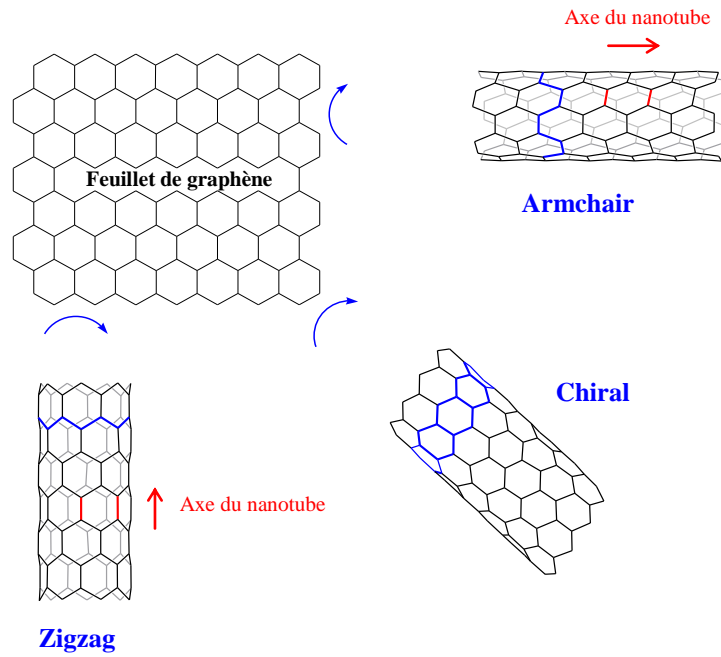


Fig. 1.1 Pliage de la feuille de carbone⁽¹⁰⁾.

Les nanotubes de carbone peuvent être monoparois ou multiparois, auquel cas il s'agit de nanotubes imbriqués les uns dans les autres à la manière de poupées russes (Fig. 1.3). Ces derniers sont d'une manipulation plus facile mais d'une caractérisation compliquée par la présence de feuilles de graphène d'enroulements différents au sein d'un même tube.

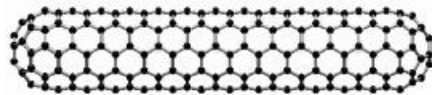


Fig. 1.2 Représentation d'un nanotube parfait.



Fig. 1.3 Représentation d'un nanotube multiparois⁽¹¹⁾.

Depuis leur première production « moderne » par arc électrique⁽⁶⁾, plusieurs autres procédés de fabrication ont été développés tels que la déposition en phase vapeur, ou l'ablation laser. Une méthode par four solaire a même été développée par une équipe française⁽³⁾.

I.1.3 Les nanotubes organiques

Des nanotubes ont été fabriqués à partir de pratiquement tous les grands types de molécules existantes, telles que des chaînes insaturées⁽¹²⁾, des amphiphiles⁽¹³⁾, des sucres⁽¹⁴⁾, des peptides⁽¹⁵⁾, des polymères⁽¹⁶⁾ ou encore des protéines⁽¹⁷⁾. De plus, des systèmes mixtes associant molécules aromatiques et polymères⁽¹⁸⁾ ou encore peptides et dendrimères⁽⁵⁾ ont aussi donné lieu à ce type d'assemblage.

Les nanotubes auto-assemblés à partir de molécules amphiphiles semblent les plus répandus et ont fait l'objet d'un grand nombre d'études. Ils constituent d'ailleurs le monomère des premiers nanotubes organiques rapportés (Fig. 1.4)⁽¹⁹⁾.

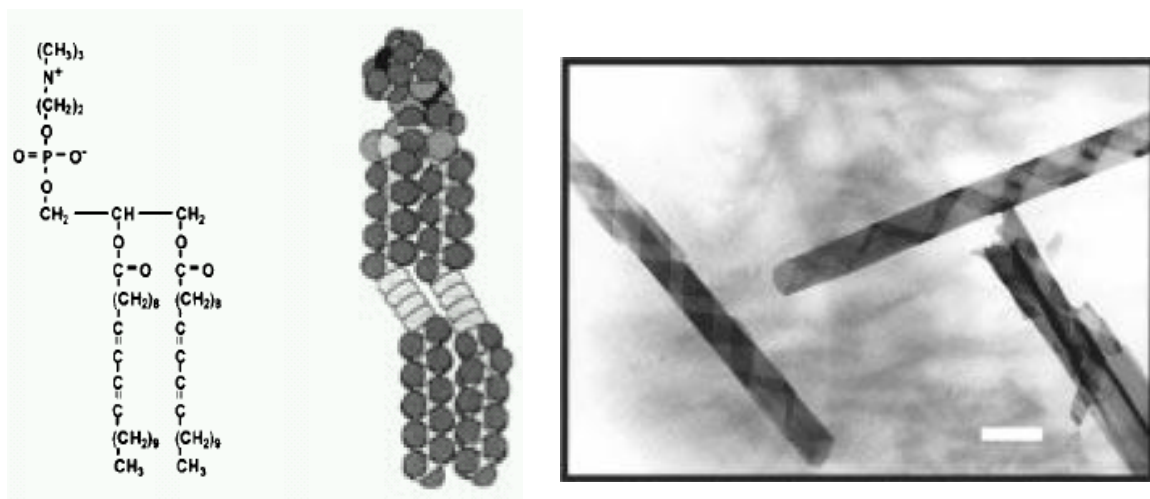


Fig. 1.4 Molécule de lipide (DC_{8,9}PC) s'auto-assemblant en nanotube (barre d'échelle = 1 μm)⁽²⁰⁾.

Malgré la grande diversité des molécules et des structures auto-assemblées en résultant, quelques essais de classification ont été réalisés.

Une première discrimination peut être faite selon le type de monomère, linéaire ou cyclique⁽²¹⁾. Ghadiri a proposé un classement plus rigoureux selon le type d'auto-assemblage : le tube peut être constitué de molécules hélicoïdales s'enroulant pour former un tube (Fig. 1.5.a), de molécules de forme cylindrique formant un assemblage supramoléculaire (Fig. 1.5.b) ; de macrocycles s'empilant pour former un tube continu (Fig. 1.5.c) ou de molécules en forme de secteurs s'assemblant en disques, pouvant s'empiler et former un nanotube (Fig. 1.5d)⁽²²⁾.

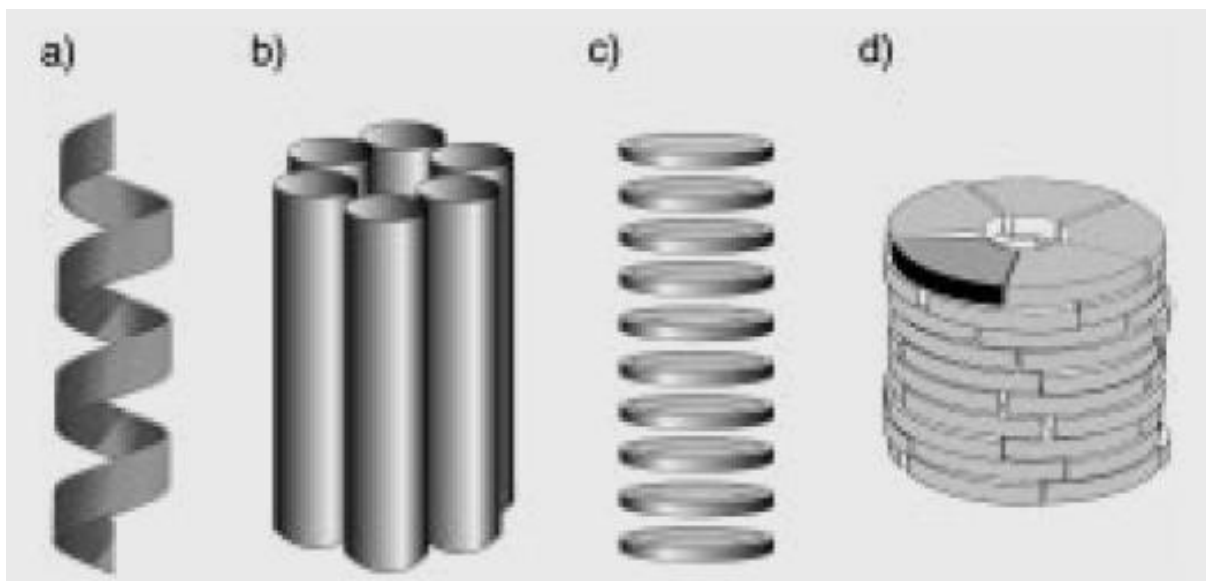


Fig. 1.5 Classification de nanotubes organiques selon le mode d'auto-association : (a) Chaînes hélicoïdales s'enroulant pour former un tube (b) Molécules de forme cylindrique formant un assemblage supramoléculaire (c) Macrocycles s'empilant pour former un tube continu (d) Molécules en forme de secteurs s'assemblant en disques pouvant s'empiler et former un tube⁽²²⁾.

Cette classification n'est cependant pas parfaite puisque les structures formées de molécules de forme cylindrique (Fig. 1.5.b) présentent le plus souvent des rapports longueur sur largeur inférieurs à 5⁽²³⁾. Selon la classification utilisée dans ce manuscrit, le terme « nanotube » ne peut donc être employé, les équipes qui travaillent sur ces objets les qualifiant plutôt de baril β . Un microtube a cependant été décrit sur ce modèle⁽²⁴⁾.

I.1.4 Mesures et dimensions

I.1.4.1. Nanotubes de carbone

Dans le cas de nanotubes inorganiques (nanotubes de carbone, de silice...), la microscopie électronique à transmission (MET) est une méthode de caractérisation largement utilisée. Elle est en effet très adaptée à ce type de structure et a permis la découverte des nanotubes de carbone⁽⁶⁾. Elle autorise une mesure directe des dimensions des objets sur la micrographie obtenue : ainsi les nanotubes de carbone monoparois⁽³⁾ ont des diamètres d'environ 1 nm, compris en général entre 0,6 et 2,5 nm, alors que les tubes multiparois atteignent des diamètres de 10 à 30 nm⁽²⁵⁾.

Cependant, les échantillons de nanotubes de carbone ne contiennent pas des tubes de taille unique mais plutôt une distribution de tailles (Fig. 1.6) dépendant des conditions de synthèse.

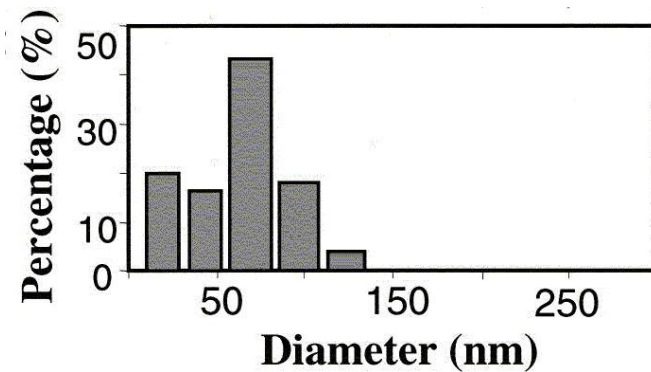


Fig. 1.6 Distribution de tailles pour des nanotubes de carbone synthétisés par pyrolyse d'un mélange Fer-phtalocyanine/phtalocyanine⁽²⁶⁾.

La mesure d'une distribution de diamètres comme indiquée sur la figure 1.6 par microscopie implique donc de mesurer le diamètre manuellement sur un grand nombre de tubes, et si possible sur plusieurs échantillons. Ceci explique que cette distribution ne soit pas toujours mesurée précisément et reste souvent indicatrice.

Enfin, la longueur des tubes est de plusieurs micromètres, le rapport longueur sur diamètre est donc d'au moins 1000, voire beaucoup plus⁽¹⁰⁾.

I.1.4.2 Nanotubes organiques

A la différence des nanotubes inorganiques, la mesure des dimensions de ces structures organiques est rendue difficile par leurs propriétés visco-élastiques et leur caractère dynamique. Ainsi, une mesure de dimension par microscopie électronique ne peut être véritablement fiable puisque les échantillons sont le plus souvent secs et recouverts d'un agent de contraste.

Les techniques fournissant les données les plus sûres seraient donc la diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS) ou la microscopie électronique sur cryofractures, plus difficiles à mettre en œuvre.

La diversité des nanotubes organiques implique une diversité des diamètres mesurés, cependant un certain type d'assemblage peut avoir tendance à donner une certaine gamme de diamètres. De même, la polydispersité des échantillons et la possibilité de régler le diamètre sont très liées au mode d'association.

Dans le cas d'un ruban hélicoïdal s'enroulant pour former un tube (Fig. 1.5.a), les diamètres obtenus sont plutôt de l'ordre de la dizaine de nm⁽²⁷⁾ avec une dispersité assez faible⁽²⁸⁾.

Un nanotube de type « disques empilés » (Fig. 1.5.c) voit son diamètre directement réglé par la taille du macrocycle. Les diamètres obtenus sont assez petits (~1 nm) mais très homodispersés⁽¹⁵⁾.

Enfin, un assemblage de type « secteur » pur est plutôt de l'ordre de quelques nanomètres avec une dispersité très faible^(29,30).

Les secteurs peuvent être constitués de molécules uniques, ce qui est plutôt fréquent pour les molécules amphiphiles⁽¹³⁾. Il est d'ailleurs possible de considérer ce type de tube comme une

classe à part compte tenu de leur spécificité : les molécules s'assemblent principalement par ségrégation entre leurs parties hydrophile et hydrophobe, de façon similaire à une micelle. Ces tubes peuvent présenter des diamètres assez importants, jusqu'à plusieurs centaines de nanomètres, mais avec une polydispersité souvent élevée^(31,32).

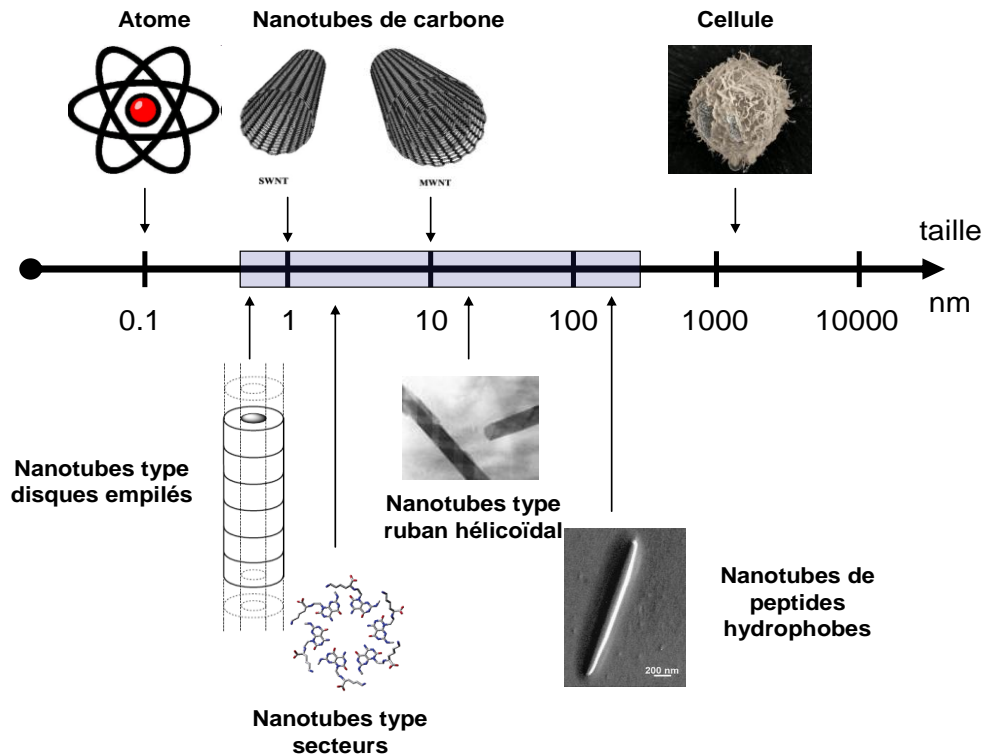


Fig. 1.7 Echelle de taille typique de quelques nanostructures.

I.1.5 Contrôle de la taille

Les propriétés d'objets nanoscopiques dépendent fortement de leurs dimensions. Il est donc critique de pouvoir contrôler les diamètres extérieurs et intérieurs, mais aussi la longueur des nanotubes organiques.

Le contrôle de la longueur peut se faire de façon grossière par les conditions d'auto-assemblage des structures, comme le solvant de cristallisation⁽³³⁾ ou la vitesse de refroidissement⁽³⁴⁾. Par ce procédé, des longueurs de quelques micromètres à quelques centaines de micromètres sont obtenues, néanmoins avec une grande polydispersité. Enfin, une méthodologie originale a été décrite permettant de couper des nanotubes d'amphiphiles en solution ou lyophilisés par agitation mécanique⁽³⁵⁾.

Le contrôle du diamètre est un point encore plus critique que le contrôle de la longueur, puisque toutes les applications dans le domaine de la nanoélectronique, de la détection ou de

la nanofluidique vont nécessiter l'obtention d'un diamètre voulu. Ce contrôle dépend étroitement du type d'assemblage des nanotubes considérés.

Les premiers nanotubes de lipides découverts⁽¹⁹⁾, de type « ruban hélicoïdal » (Fig. 1.4), ont fait l'objet d'intenses recherches théoriques visant à élucider l'origine de cet assemblage ainsi que les interactions mises en jeu^(20,36). Ces études avancent que le contrôle de la position du monomère au sein du ruban hélicoïdal permettrait de contrôler le diamètre du tube assemblé⁽¹³⁾ : l'obtention de microtubes de diamètre deux fois supérieur est ainsi réalisable par une petite modification de la partie polaire (phosphate changé en phosphonate)⁽³⁷⁾.

Un certain contrôle du diamètre peut être obtenu pour ces tubes par le changement de conditions d'assemblage ainsi que par la nature du contre-ion de la tête polaire du lipide^(38,39). Des diamètres moyens de 80 à 960 nm sont ainsi mesurés, avec une polydispersité assez importante.

Une autre stratégie intéressante est le mélange de deux types de lipides en différentes proportions, ce qui permet d'obtenir des diamètres de 50 à 120 nm, là encore avec une grande polydispersité⁽⁴⁰⁾. Cette approche est cependant intéressante de part son systématisme et le nombre de diamètres intermédiaires.

Les nanotubes organiques de type « disques empilés » présentent une grande monodispersité puisque le diamètre du tube est directement relié au diamètre du disque. Il suffit donc de modifier la taille du disque pour modifier le diamètre du nanotube résultant. Les peptidomimétiques cycliques de Ranganathan permettent d'avoir des diamètres monodispersés de 0,5 à 1 nm⁽⁴¹⁾. Les peptides cycliques de Ghadiri présentent des diamètres internes de 0,7 à 1,3 nm selon qu'il s'agit d'un octa-, deca- ou dodécacyclopeptide, le diamètre externe de l'ordre de 2 nm dépendant des chaînes latérales utilisées⁽⁴²⁾.

Dans le cas des nanotubes de type « secteur » où le secteur est le monomère, l'épaisseur de la paroi du tube est directement reliée à la longueur de la chaîne hydrophobe. Cela permet d'obtenir des diamètres internes de 17,7 à 22,2 nm avec un pas d'environ 1,5 nm pour deux méthylènes, là encore avec une polydispersité importante (Fig. 1.8)⁽⁴³⁾.

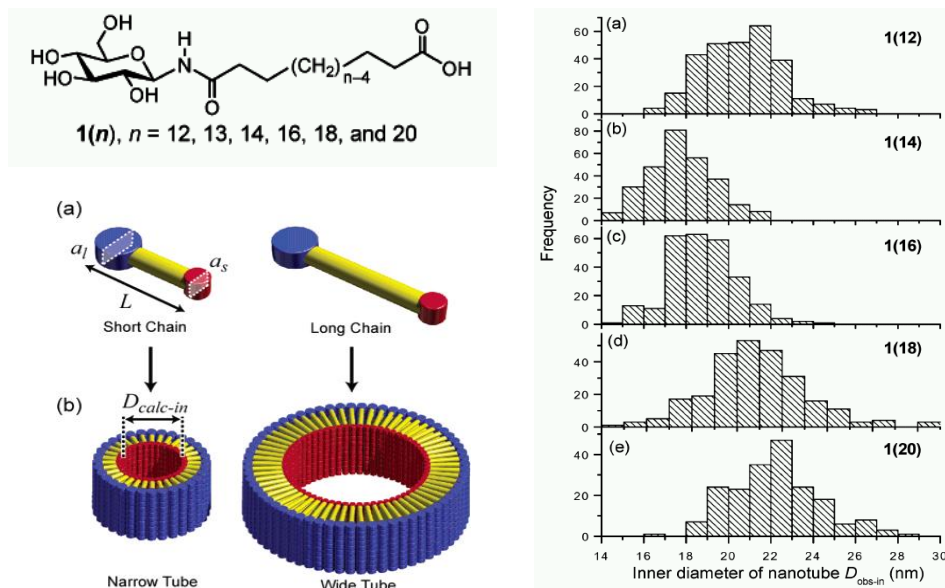


Fig. 1.8 En haut à gauche, molécule bolaamphiphile avec une chaîne hydrophobe de longueur variable. En bas à gauche, schéma de principe de variation du diamètre selon la longueur de la chaîne. À droite, diamètres internes de nanotubes obtenus selon la longueur de la chaîne hydrophobe⁽⁴³⁾.

En conclusion, la grande majorité des nanotubes organiques auto-organisés présentent des diamètres polydisperses pas ou peu modifiables. Seuls les nanotubes de type « disques empilés » autorisent le choix d'un diamètre homodisperse, toutefois sur une gamme étroite de tailles plutôt réduites.

Ce manque de contrôle, tant d'un point de vue de la dispersité que du choix du diamètre est très limitant pour le développement d'applications dans le domaine des nanotechnologies.

I.2 Les nanotubes de peptides

Parmi les nanotubes organiques, ceux formés de peptides et de protéines sont spécialement intéressants : ils profitent en effet de la grande richesse de leur matériaux de base, les acides aminés, qui peuvent présenter des caractéristiques chimiques très différentes tout en conservant leurs propriétés d'auto-assemblage. De plus, leur réactivité a été largement explorée par le passé, ce qui permet au chimiste de disposer d'une large variété d'acides aminés commerciaux ainsi que d'un grand nombre de méthodes de synthèse assez fiables. Par ailleurs, leurs assemblages tridimensionnels intéressent aussi les biochimistes qui y retrouvent les interactions existantes dans de nombreux processus biologiques, notamment ceux mis en jeu dans les maladies neurodégénératives⁽²¹⁾.

Des nanotubes de peptides sont accessibles à partir de protéines, dénaturées ou non, ou de séquences issues de ces protéines, de séquences cycliques, de peptides amphiphiles et de dipeptides hydrophobes ou aromatiques. Ils peuvent donc être facilement classifiés selon l'origine de leur monomère et bien sûr selon leur type d'assemblage. Pour chaque type de tubes est souligné leur caractère mono- ou polydisperse ainsi que la facilité à en changer le diamètre.

I.2.1 Nanotubes issus de protéines ou peptides naturels

Le premier nanotube de peptide décrit a sans doute été celui du virus mosaïque du tabac (TMV). Il s'agit d'un virus à ARN de la famille des Tobamovirus. Il infecte seulement les plantes et en particulier le tabac, donnant lieu à l'apparition de mosaïques vert clair-vert foncé sur les feuilles, ainsi que des cloques et des déformations⁽⁴⁴⁾.

La maladie a été décrite dès 1883 par Adolf Mayer, mais il fallut attendre 1935 pour que le virus lui-même soit cristallisé par Wendell Meredith Stanley. Au début des années 1950, des nanotubes dépourvus d'ARN ont été assemblés en milieu acide^(45,46).

Les monomères protéiques, tous identiques, ont un poids moléculaire de 17500 Da et possèdent une structure secondaire importante, avec 50 % des acides aminés impliqués dans une hélice et 10 % dans des structures β ⁽⁴⁷⁾. Les hélices en constituent le cœur hydrophobe ; elle sont situées entre 4,5 et 6,5 nm de rayon dans le virus naturel⁽⁴⁸⁾.

A pH neutre, ces monomères s'assemblent comme des secteurs pour donner des disques superposés. Ces disques, à pH légèrement basique, se transforment en hélices et la croissance du tube se fait par fusion avec d'autres hélices, mais aussi par addition de monomères (Fig. 2.1)⁽⁴⁹⁾. L'assemblage des protéines dans la capsid est donc de type « secteur-hélicoïdal » hybride entre un type « secteur » et un type « ruban hélicoïdal » (Fig. 1.5).

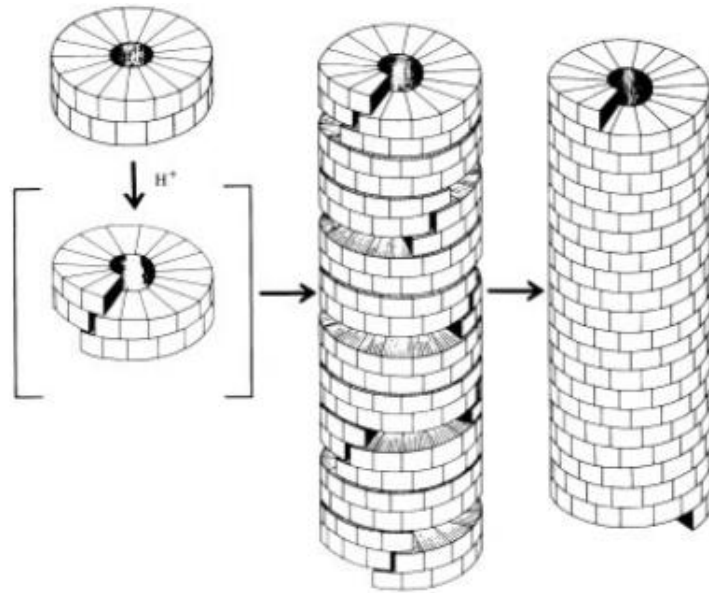


Fig. 2.1 Modèle d'assemblage du virus mosaïque du tabac⁽⁴⁹⁾. Un double disque se forme à pH = 7,5 et se transforme en hélice à pH= 5. Cette structure sert de base de nucléation pour l'assemblage en tube par incorporation de protéines mais aussi par fusion avec d'autres hélices.

Le virus se présente physiquement sous la forme de nanotubes de 18 nm de diamètre et de 300 nm de long. Les parois sont assez épaisses, puisque le creux central a seulement 4 nm de diamètre (Fig. 2.2)⁽⁴⁹⁾. Néanmoins, ce creux contient normalement une partie du code génétique du virus et la paroi intérieure a pu être fonctionnalisée⁽⁵⁰⁾ ; il s'agit donc bien d'un nanotube.

De part son origine biologique, ses dimensions sont rigoureusement monodisperses, au moins pour chaque sous-type de virus.

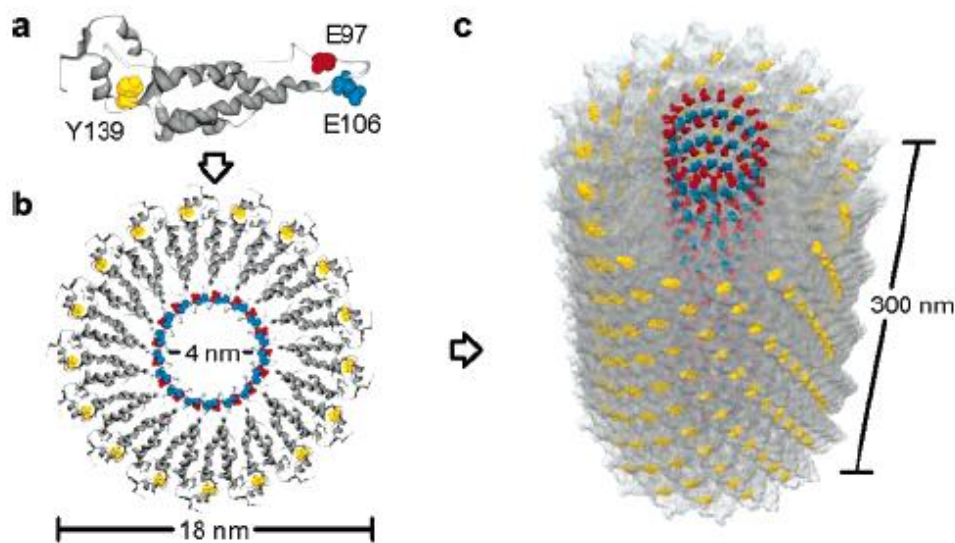


Fig. 2.2 Représentation du virus mosaïque du tabac⁽⁵⁰⁾. Les acides aminés marqués du monomère sont ceux utilisés pour la fonctionnalisation des surfaces intérieures et extérieures du virus.

L'avantage de ce nanotube est la facilité d'obtention du virus avec son ARN (le tube protéique est assez peu utilisé), la stabilité du virus en pH et en température et la grande monodispersité de ses dimensions. De plus, le virus est stable en milieu très dilué. Cependant aucune méthode simple n'existe pour contrôler son diamètre.

L'hydrolyse partielle de l' α -lactalbumin, une protéine hydrosoluble contenue dans le lait de nombreux mammifères, par une protéase issue de la bactérie *Bacillus licheniformis* permet également l'assemblage de nanotubes⁽¹⁷⁾. Ces derniers se forment à pH = 7,5 dans du tampon. Les propriétés mécaniques de ces structures ont été mesurées, ce qui a permis leur modélisation sous forme de tubes creux d'assemblages hélicoïdaux. Une dureté dans la moyenne des structures biologiques ainsi que des propriétés visco-élastiques intéressantes ont été démontrées.

La longueur typique est d'environ 5 μ m. La largeur du ruban est de 4,4 nm, la dimension du tube est de 21 nm de diamètre, avec un canal central de 8,7 nm, ces dimensions sont mesurées par AFM et sont polydisperses, cependant sur un intervalle assez étroit (Fig. 2.3).

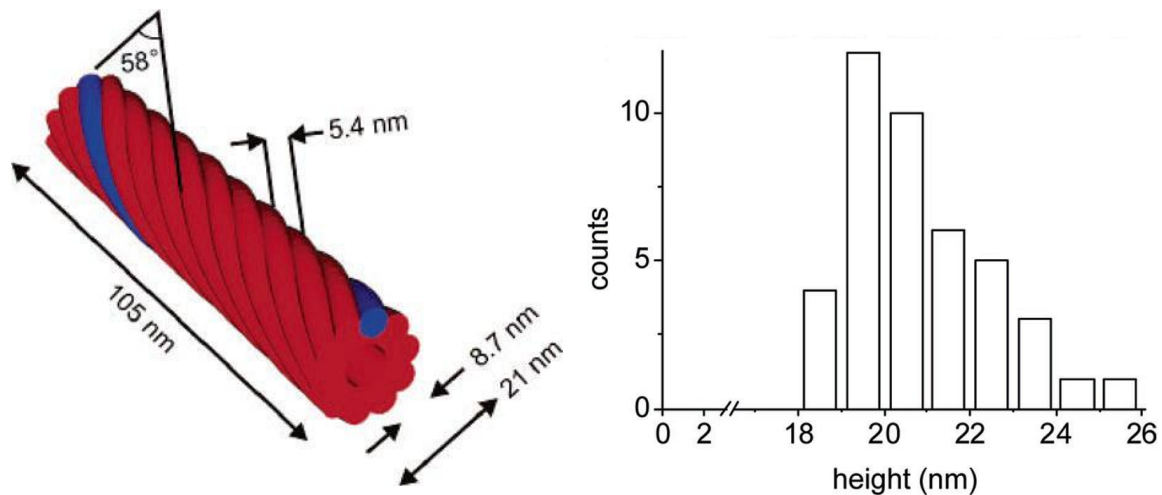


Fig. 2.3 Modèle de nanotube d' α -lactalbumin partiellement hydrolysée, et gamme de hauteurs mesurées en AFM. À gauche, la distance entre deux rubans est de 5,4 nm et le pas de l'hélice est de 105 nm⁽¹⁷⁾.

La découverte de ce type de tube est récente (2006) et beaucoup d'études restent à faire. Si ce nanotube est intéressant de part son origine, ses dimensions ne sont pas monodisperses et il n'est pas possible d'en changer le diamètre.

Enfin les nombreux travaux sur les peptides amyloïdes ont conduit à l'obtention de nanotubes par l'assemblage de séquences raccourcies.

La séquence A β (16-22) CH₃CO-KLVFFAE-NH₂ s'assemble en nanotubes dans un mélange eau-acétonitrile 6:4 contenant 0,1 % de TFA⁽²⁸⁾ et en fagots de tubes à faces carrées en présence d'ions sulfate⁽⁴⁴⁾. L'assemblage des tubes se fait par transformation d'une fibre initiale en un ruban hélicoïdal enroulé qui fusionne pour obtenir un tube. Ce tube est donc de type « ruban hélicoïdal ». Son diamètre est de 52 nm (mesuré par SAXS) et son épaisseur de

4 nm. La largeur de la face carrée des tubes en fagots est de 45 nm (Fig. 2.4). La mesure par SAXS laisse supposer une dispersité de taille faible.

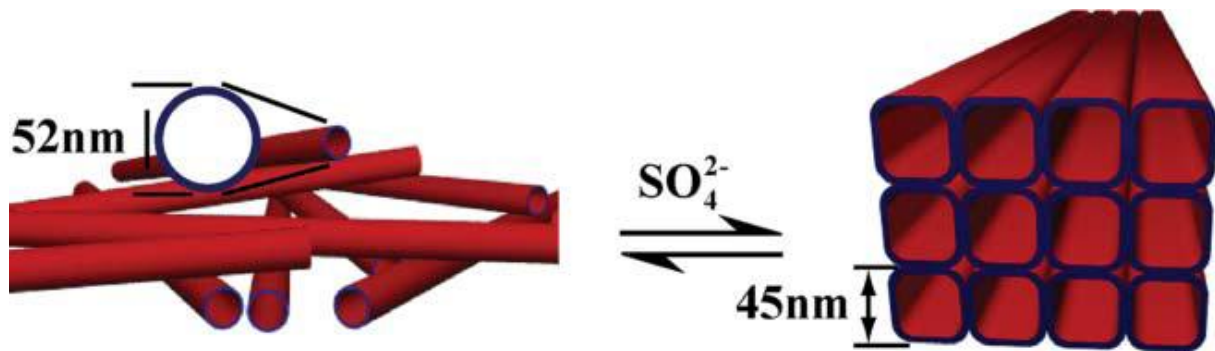


Fig. 2.4 Nanotubes de A β (16-22), transformables en fagots par ajout de sulfate⁽⁴⁴⁾.

De même, des séquences modifiées d'Amyline(20-29) ont conduit à l'observation de nanotubes d'environ 20 nm de diamètre, formés encore une fois par l'assemblage de rubans hélicoïdaux⁽⁵¹⁾.

En conclusion, des nanotubes peptidiques ont été observés à partir d'une capsid de virus, de protéines dénaturées et de peptides amyloïdes modifiés. Il est remarquable que tous les assemblages soient de type « ruban hélicoïdal » avec des diamètres monodisperses ou faiblement polydisperses de l'ordre de la dizaine de nanomètres. L'étude des peptides amyloïdes permettra sans doute l'identification de nouvelles séquences.

I.2.2 Nanotubes de cyclopeptides d'alternance D et L

La formation de ce type de tubes a été prédite dès 1974 par des calculs théoriques⁽⁵²⁾. Les premières tentatives se sont soldées par des échecs puisqu'aucun des hexapeptides cyclo[(D-Val-L-Val)₃] et cyclo[(D-Phe-L-Phe)₃] synthétisés n'a donné lieu à la formation de nanotubes, la RMN révélant des liaisons hydrogènes trop instables⁽⁵³⁾ et les rayons X une co-cristallisation du peptide cyclique avec huit molécules de TFA⁽⁵⁴⁾.

Ce n'est qu'en 1993 que l'équipe de Ghadiri a réussi la synthèse et l'assemblage d'octapeptides cyclo[(D-Ala-Glu-D-Ala-Gln)₂] en nanotubes dans l'eau (Fig. 2.5)⁽¹⁵⁾.

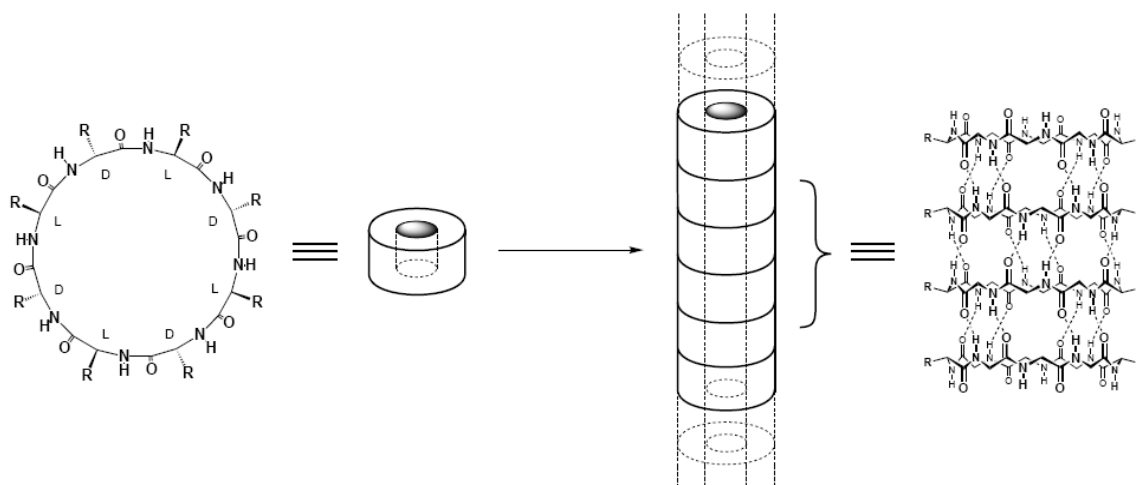


Fig. 2.5 Schéma théorique de l'assemblage des bagues⁽²²⁾.

Si la présence de chaînes latérales glutamine s'explique d'abord pour des raisons synthétiques⁽⁵⁵⁾, les résidus acides permettent en revanche de déclencher la formation de tubes par protonation : les acides carboxyliques sont déprotonés à pH neutre ou basique, ce qui solubilise le peptide et provoque des interactions répulsives entre monomères. À pH acide les groupements acide sont protonés, la solubilité dans l'eau diminue et ils deviennent de bons échangeurs de liaisons hydrogènes : l'auto-assemblage en feuillets β peut alors avoir lieu, selon le modèle « disques empilés ».

Une fois assemblés, les tubes se présentent sous la forme d'agrégats cristallins (Fig. 2.6)⁽¹⁵⁾. Ces agrégats présentent une grande stabilité, due notamment aux interactions tube-tube⁽⁵⁶⁾. La présence d'un nanotube isolé a été rapportée par une étude d'AFM⁽⁵⁷⁾, cependant la reproduction de cette expérience semble assez difficile.

Le diamètre intérieur est contrôlé par le nombre de résidus du peptide : huit acides aminés conduisent à un diamètre intérieur compris entre 7 et 8 Å et un diamètre extérieur de 1 à 2 nm. Des tubes de 13 Å de diamètre intérieur ont été obtenus grâce à un dodécapeptide cyclique de même nature cyclo[(Gln-D-Ala-Glu-D-Ala)₃]⁽⁴²⁾. Des diamètres inférieurs ont aussi été observés par une équipe différente⁽⁵⁷⁾. Le diamètre interne, homodisperse, est directement relié au diamètre de la séquence cyclique ; les valeurs données sont obtenues par le calcul. Le diamètre externe varie selon les chaînes latérales et est de l'ordre de quelques nanomètres.



Fig. 2.6 Agrégats de nanotubes peptidiques (a) Image TEM des agrégats (b) Image d'un agrégat unique gelé et hydraté. Les stries longilignes d'environ 25 Å sont dues au rassemblement des nanotubes⁽⁴²⁾.

Le concept de peptide cyclique capable d'empilement a ensuite été étendu à des β -peptides⁽⁵⁸⁾ et des peptidomimétiques comportant deux cycles aromatiques phényle, pyridyle⁽⁵⁹⁾ ou triazole⁽⁶⁰⁾ ou bien fermés par un pont disulfure⁽⁶¹⁾.

Ces derniers, cyclobisamides basés sur une cystine et pontés par une chaîne polyméthylène (Fig. 2.7)⁽⁴¹⁾, ont permis d'obtenir des diamètres internes de 0,5 à 1 nm, là encore monodisperses.

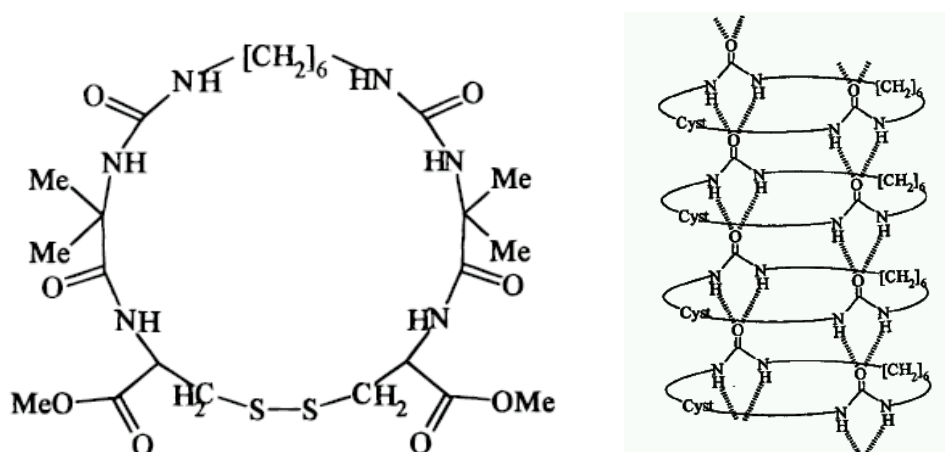


Fig. 2.7 Peptidomimétique cyclique et modèle d'assemblage⁽⁶¹⁾.

Les nanotubes de type « disques empilés » ont donc l'avantage de permettre le choix du diamètre tout en démontrant une grande monodispersité. Cependant, leur taille reste de l'ordre du nanomètre et ils sont presque toujours observés sous forme de fagots.

I.2.3 Nanotubes basés sur des peptides amphiphiles

Des séquences peptidiques amphiphiles ont été développées, avec un ou deux acides aminés chargés et six acides aminés hydrophobes. Les acides aminés chargés peuvent être l'acide aspartique⁽⁶²⁾, la lysine ou l'histidine⁽⁶³⁾. Les acides aminés hydrophobes peuvent être l'alanine, la valine ou la leucine. L'extrémité N-terminale ou C-terminale, selon le cas, est sous forme amide afin d'éviter les charges non souhaitées. Ces séquences ont une longueur d'environ 2 nm et sont très similaires à des phospholipides biologiques.

Ces peptides amphiphiles s'assemblent dans l'eau en un mélange de nanotubes et de vésicules. Ces structures apparaissent uniquement quand les peptides sont sous leur forme chargée, la neutralisation des charges conduisant à des structures amorphes. Les diamètres polydisperses sont compris entre 20 et 50 nm pour les peptides anioniques⁽⁶²⁾ et autour de 50 nm pour les peptides cationiques⁽⁶³⁾. De façon intéressante, les peptides anioniques forment aussi des structures en branches (Fig. 2.8). Un mécanisme incluant la formation d'une bague intermédiaire a été proposé ; une bicouche de peptide a été identifiée par diffusion de neutrons, les charges seraient dirigées vers l'extérieur de la paroi⁽⁶²⁾.

Ces nanotubes pourraient donc être apparentés à un type « secteur » bien que le mécanisme d'assemblage ne soit pas connu.

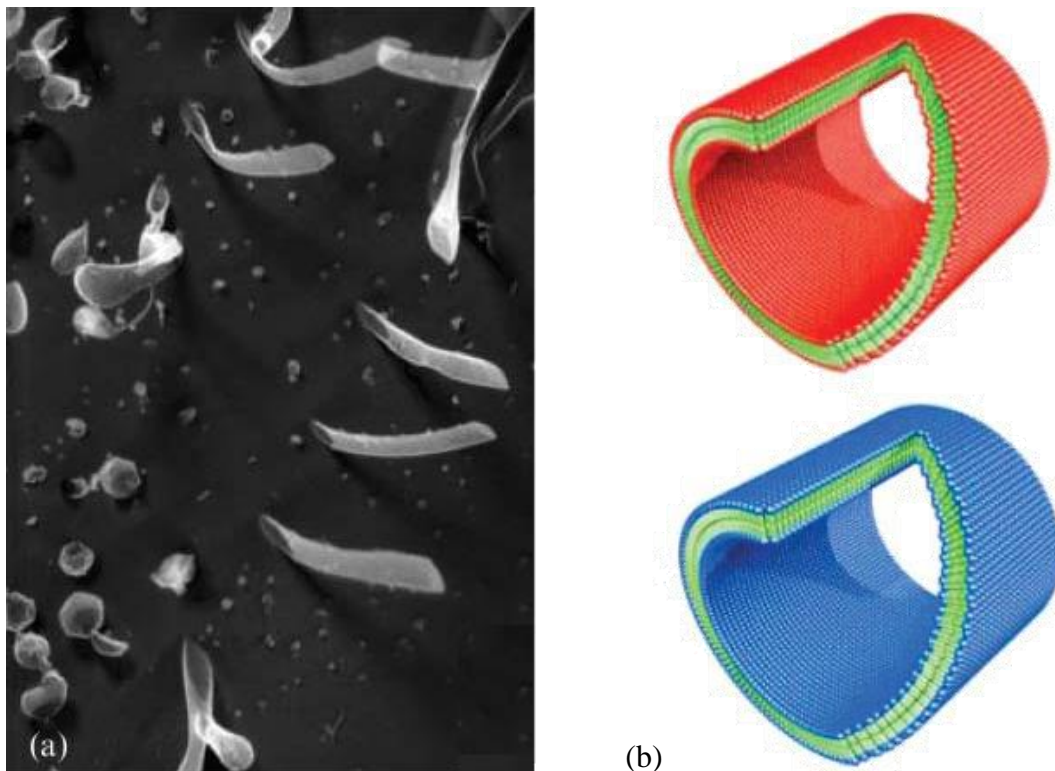


Fig. 2.8 Nanotubes de peptides amphiphiles (a) Micrographie électronique (b) Modèle de nanotubes ; en vert la chaîne hydrophobe, en rouge les charges négatives, en bleu les charges positives⁽⁶⁴⁾.

Des peptides bolaamphiphiles s'assemblent aussi en nanotubes. Un peptide bolaamphiphile est composé de deux extrémités polaires peptidiques et d'un cœur hydrophobe composé d'une chaîne alkyle.

Plusieurs composés de cette famille, tel que le bis(N- α -amido-glycineglycine)-1,7-heptane dicarboxylate (Fig. 2.9), ont été rapportés en 1998 comme formant des microtubes⁽⁶⁵⁾.

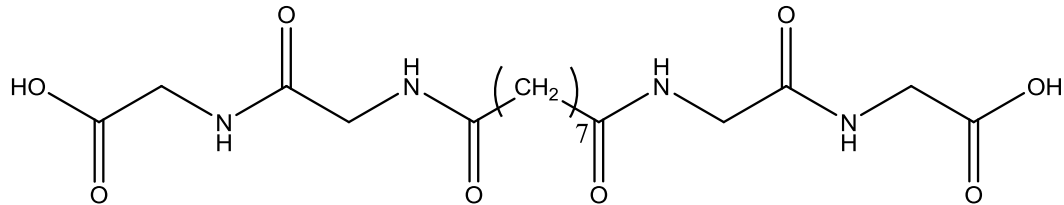


Fig. 2.9 Représentation du bis(N- α -amido-glycineglycine)-1,7-heptane⁽⁶⁵⁾.

Cette molécule s'assemble à pH = 8 sous forme de ruban et à pH = 4 sous forme de tubes présentant des diamètres de l'ordre du micron^(31,66). À pH légèrement basique, le monomère est capable de s'assembler sous forme de rubans grâce à des liaisons hydrogène entre les extrémités peptidiques et entre les fonctions acides terminales. Cependant la diminution du pH conduit à des liaisons hydrogène plus courtes induisant une torsion plus importante du ruban et donc sa fermeture en tube (Fig. 2.10)⁽³¹⁾. Cet assemblage est donc de type « ruban hélicoïdal ».

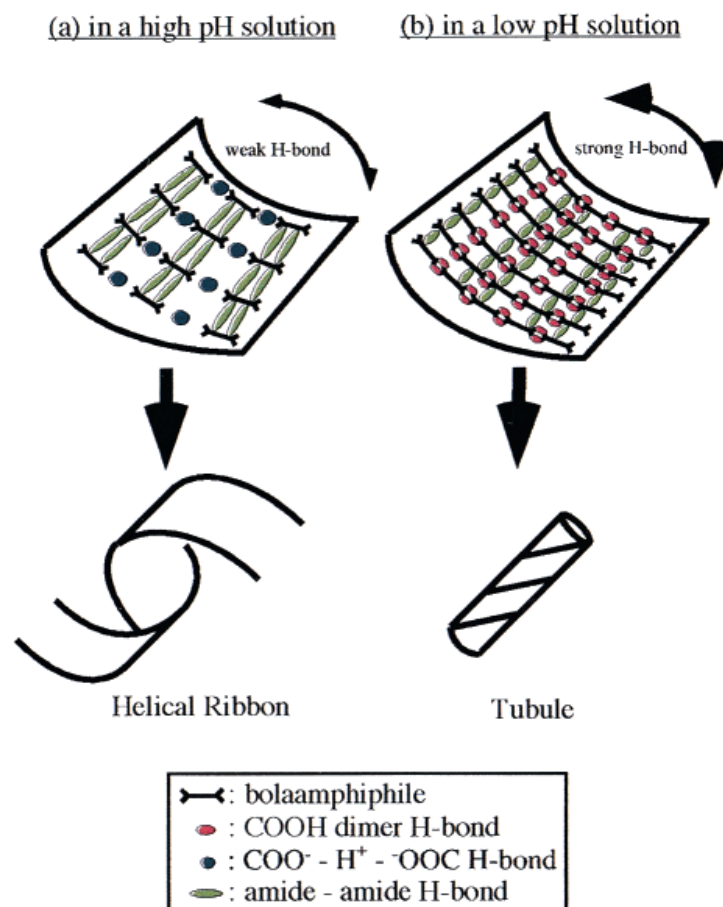


Fig. 2.10 Assemblage de peptides bolaamphiphiles en ruban ou nanotube selon le pH⁽⁶⁶⁾.

Les nanotubes formés semblent très longs et présentent une grande dispersité en diamètre. Ainsi, c'est seulement en 2001 que ces structures sont présentées comme des nanotubes avec des diamètres de 20 nm à 1 μ m mesurés par AFM⁽⁶⁷⁾.

Ces nanostructures peuvent exister de façon individuelle mais ne permettent ni le choix du diamètre ni l'obtention de dimensions monodisperses.

I.2.4 Nanotubes formés de dipeptides hydrophobes

En 2001 a été rapportée la cristallisation de dipeptides sous forme de nanotubes⁽⁶⁸⁾. L'assemblage repose sur l'effet hydrophobe, sur la complémentarité des charges entre extrémités N- et C-terminales et sur des liaisons hydrogène. On peut le qualifier d'assemblage type « secteur » puisqu'un tube vu « en coupe » présente de 4 à 6 acides aminés assemblés en disque. Les nanotubes obtenus par l'évaporation de solution aqueuse de L-Phe-L-Phe, de L-Leu-L-Leu, de L-Phe-L-Leu ou de L-Leu-L-Phe présentent des diamètres internes d'environ 1 nm et externes d'environ 2 nm.

Ces travaux ont connu plus de développements lorsqu'ils ont croisé ceux d'une équipe de biochimistes impliqués dans la recherche du plus petit motif amyloïde possible^(69,70).

Ces derniers ont alors obtenu des nanotubes individuels par cristallisation dans l'eau de diphénylalanine dissous dans de l'hexafluoropropanol⁽³²⁾ ou par refroidissement d'une solution de ce peptide chauffée à 80 °C.

Les auteurs se sont assez peu intéressés au mécanisme d'auto-assemblage ; ils ont toutefois suggéré que l'interaction entre cycles aromatiques pourrait fournir la contribution énergétique permettant l'assemblage, ainsi qu'imposer un ordre et une direction à un feuillet se repliant, stabilisé par des liaisons hydrogène. Selon le mode de fermeture, ce feuillet replié permet d'obtenir des nanotubes (Phe-Phe) ou des nanosphères (Cys-Phe-Phe ou Gly-Gly, Fig. 2.11).

Si la complémentarité de charges entre l'acide et l'amine libre pourrait jouer un rôle dans l'assemblage, l'obtention de nanotubes par la Boc-diphénylalanine ne possédant pas de charge positive pourrait relever d'un mécanisme différent. Il est intéressant de noter que la protection de l'amine par le groupement *ter*-butyloxycarbonyl (Boc-diphénylalanine) permet d'obtenir des tubes ou des sphères selon les conditions de cristallisation, alors qu'avec le groupement fluorénylméthylloxycarbonyl (Fmoc-diphénylalanine) le peptide ne s'assemble qu'en sphères⁽⁷¹⁾.

Ce type d'assemblage peut être qualifié de type « secteur » où les secteurs sont des monomères. Par ailleurs, les auteurs ont démontré qu'il s'agissait bien de nanotubes creux par dépôt d'argent⁽³²⁾ et par passage d'eau à l'intérieur⁽⁷²⁾, ce qui n'avait pu être démontré en microscopie (Fig. 2.12).

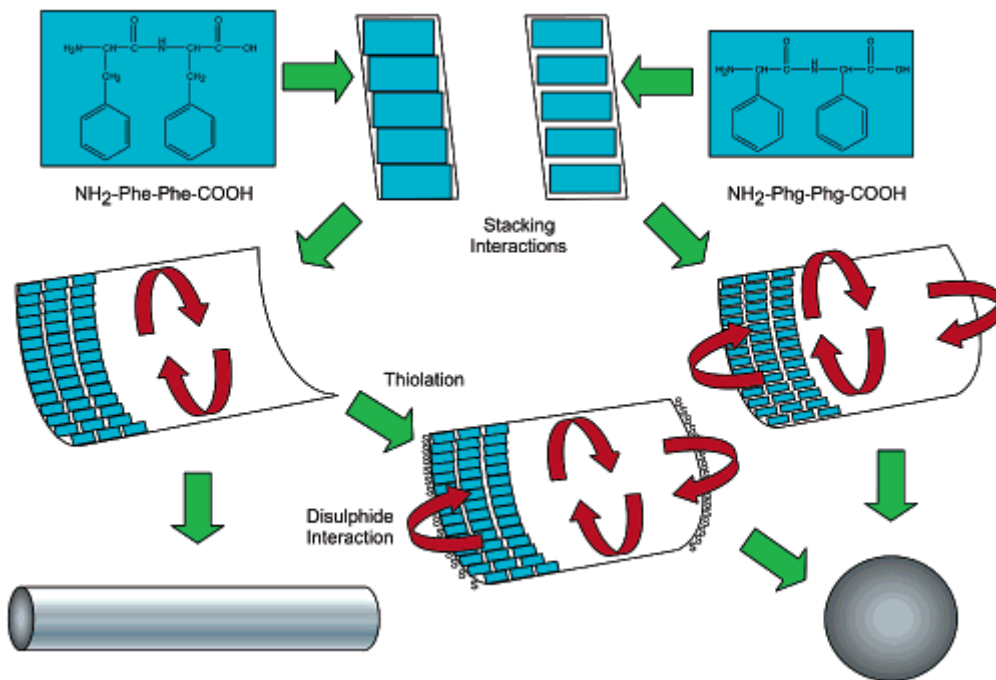


Fig. 2.11 Mécanisme d'assemblage proposé pour la diphenylalanine et la diphenylglycine⁽⁷³⁾.

Les qualités mécaniques des tubes ont été étudiées par AFM et un module de Young d'environ 19 GPa a été mesuré⁽⁴⁾ (27 GPa par une approche différente⁽⁷⁴⁾), ce qui en fait une des structures d'origine biologique les plus dures. En outre, les nanotubes supportent des températures de l'ordre de 90 °C et restent stables en solvants organiques⁽⁷⁵⁾.

Enfin, les dimensions mesurées vont de 50 à 100 nm en MEB et 80 à 300 nm en AFM. Ces structures sont donc fortement polydisperses et ont des longueurs de l'ordre du micromètre (Fig. 2.12)^(4,32). Des diamètres de 100 nm à 2 μm (MEB) et des longueurs allant jusqu'à 100 μm ont aussi été obtenus par une méthode de cristallisation différente (impliquant l'énantiomère D-Phe-D-Phe)⁽⁷⁶⁾.

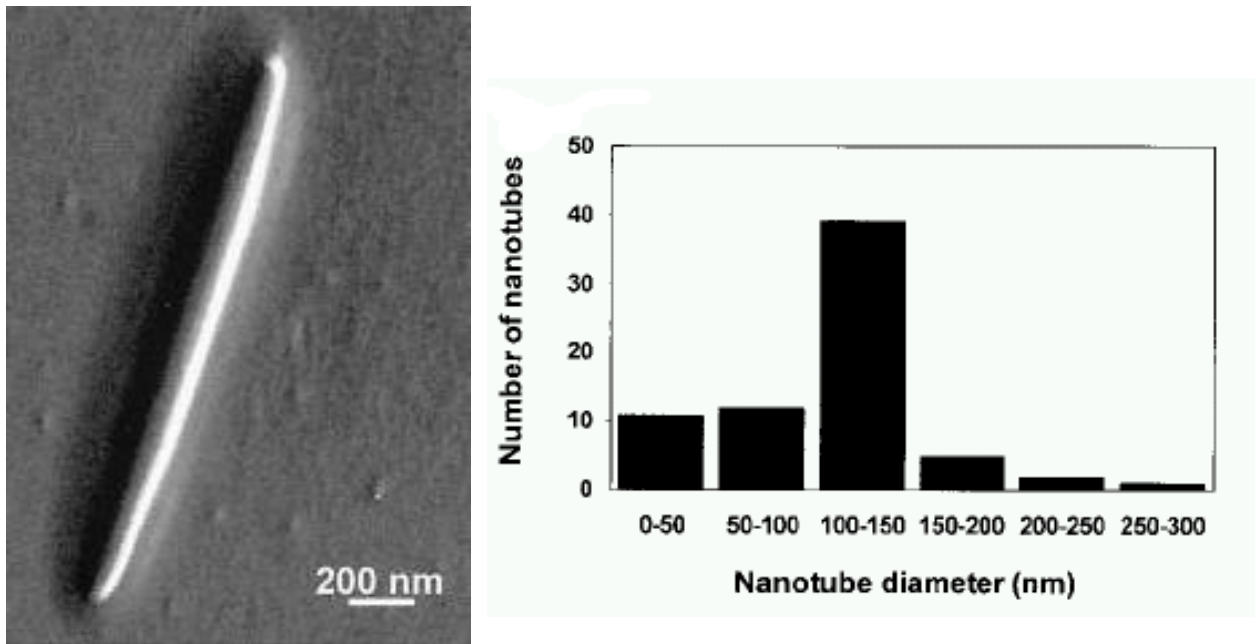


Fig. 2.12 Image de tube par MEB et gamme de diamètres mesurés⁽³²⁾.

Bien qu'il paraisse surprenant que le mécanisme d'auto-assemblage de ces nanotubes de dipeptides n'ait pas vraiment fait l'objet d'études poussées, leurs propriétés mécaniques en font des structures intéressantes pour des applications.

Des séquences peptidiques très différentes permettent donc l'obtention de nanotubes auto-assemblés. Ces derniers s'insèrent assez bien dans la classification proposée (nanotubes issus de rubans hélicoïdaux, de disques empilés ou de secteurs de disques, paragraphe 1.3) et présentent les caractéristiques liées à leurs assemblages.

Ainsi, seuls les peptides de type « disques empilés », basés sur des séquences peptidiques cycliques ou des peptidomimétiques, permettent à la fois d'obtenir des diamètres monodisperses et le choix de ces diamètres. Toutefois, la gamme de tailles accessibles est très limitée (jusqu'à 1,2 nm en diamètre interne, de l'ordre de 2-3 nm en diamètre externe) et ces tubes existent le plus souvent sous forme de fagots.

I.3. Auto-assemblage en nanotubes de peptides

L'auto-assemblage est le dénominateur commun des structures décrites dans les deux chapitres précédents. Le but de ce chapitre est donc de définir ce terme, en prenant en compte les interactions qu'il implique et les questions énergétiques qu'il soulève.

I.3.1 Caractéristiques générales

L'auto-assemblage peut se définir comme un procédé par lequel des composants, séparés ou liés, forment spontanément des agrégats ordonnés⁽⁷⁷⁾.

Ce procédé est largement présent dans la nature puisque responsable de l'association des deux brins de l'ADN ainsi que de la formation de la paroi de la cellule ou de complexes protéiques telle que l'hémoglobine^(78,79).

D'après Whitesides, un système moléculaire auto-assemblant est déterminé par cinq paramètres : ses composants, ses interactions, sa réversibilité, son environnement et son agitation⁽⁷⁷⁾.

Les composants sont des molécules ou des segments de macromolécules interagissant ensemble, de façon à évoluer d'un état désordonné à un état ordonné. Les interactions impliquées sont généralement faibles (voir plus loin) mais des liaisons covalentes réversibles sont aussi envisageables⁽⁸⁰⁾. La réversibilité de ces liaisons permet donc le placement adéquat des composants au sein du système, voire la correction « d'erreurs » telles qu'un assemblage non souhaité ou la présence d'impuretés. La force des interactions attractives maintenant le système assemblé doit donc être proche des forces tendant à le désassembler. L'environnement, c'est-à-dire le milieu dans lequel se déroule l'assemblage, est primordial puisque de lui dépendent les interactions intermoléculaires et donc l'équilibre entre forces attractives et forces répulsives. Enfin, la mobilité des composants est bien sûr indispensable et se trouve le plus souvent assurée par mouvement brownien.

Dans le cas de nanotubes de peptides, les composants sont donc des peptides ou des protéines, interagissant essentiellement grâce à des liaisons hydrogène, des attractions/répulsions de charges, du recouvrement aromatique ainsi que par effet hydrophobe, selon le type de tube. Le milieu de choix est l'eau et l'agitation peut être manuelle et/ou brownienne.

I.3.2 Classification

Au fur et à mesure que se développent des théories autour de l'auto-assemblage naissent des systèmes de classement. L'auto-assemblage est donc qualifié de moléculaire, biologique ou macromoléculaire⁽⁷⁷⁾ ; de statique ou dynamique⁽⁸¹⁾ et de commutatif ou non-commutatif⁽⁸²⁾.

La première classification se comprend aisément en termes de composés impliqués, les deux suivantes méritent néanmoins un certain approfondissement.

Ainsi, l'assemblage est dit statique si le système est un équilibre global ou local, et ne dissipe donc pas d'énergie. La formation de cristaux moléculaires appartient à cette catégorie, tout comme beaucoup de complexes protéiques. À l'opposé, un assemblage dynamique nécessite une dissipation d'énergie, ce qui arrive par exemple dans une cellule⁽⁷⁷⁾.

L'assemblage commutatif décrit un procédé dans lequel les étapes nécessaires à la formation d'une structure supramoléculaire peuvent être échangées. L'assemblage non-commutatif apparaît quand une séquence d'étapes donnée est nécessaire à la réalisation de la structure finale : une hiérarchie de structures intermédiaires est alors formée (Fig. 3.1)⁽²⁷⁾.

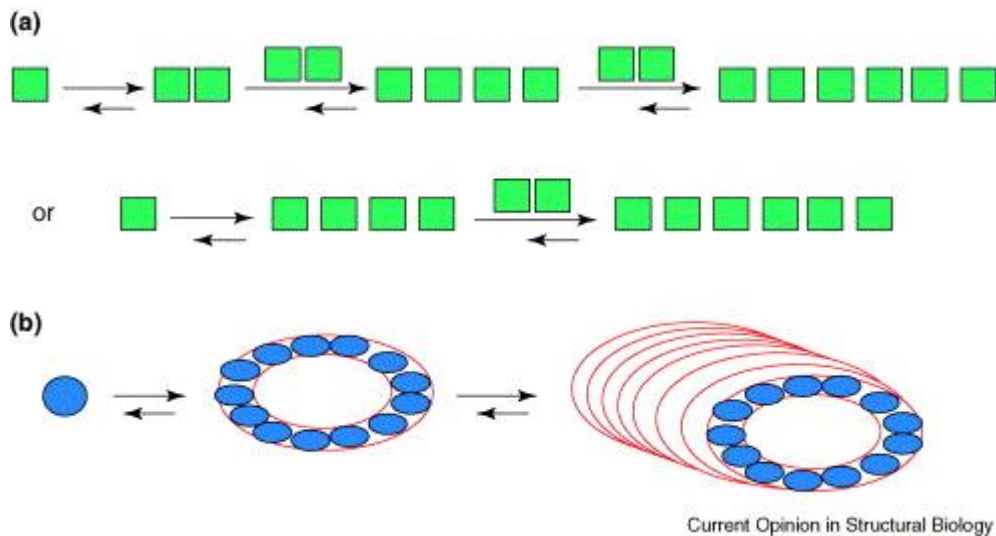


Fig. 3.1 (a) Auto-assemblage commutatif (b) auto-assemblage non-commutatif⁽²⁷⁾.

Ainsi, la première classification n'est pas si anodine puisque les assemblages biologiques sont souvent commutatifs, et parfois dynamiques. De plus, les assemblages macromoléculaires impliquent des interactions et des environnements assez différents.

Les peptides auto-assemblés sont des systèmes statiques : le tube est un minimum énergétique et ne nécessite pas de dissipation d'énergie pour maintenir son assemblage.

Le TMV, d'origine biologique, est de type non-commutatif, puisque la formation d'un agrégat primaire est nécessaire à l'assemblage du tube complet⁽⁴⁹⁾. De même, les nanotubes utilisant des peptides bolaamphiphiles ou des dipeptides aromatiques semblent nécessiter la formation d'un feuillet se repliant sur lui-même^(31,73). Cependant, les connaissances pour ces deux types de nanotubes sont pour le moins incomplètes.

Les nanotubes peptidiques de type « disques empilés » sont au contraire commutatifs, puisqu'il s'agit d'un « simple » empilement de séquences cycliques⁽¹⁵⁾.

I.3.2 Interactions faibles

Les interactions impliquées dans l'auto-assemblage de molécules en général et de peptides sous forme de nanotubes en particulier reposent donc sur des liaisons dites « faibles ». Cela signifie que les énergies de liaison sont comparables à l'énergie thermique ($\approx 0,6 \text{ kcal mol}^{-1}$ à 300 K)^(78,83).

Ceci constitue la spécificité des systèmes auto-assemblant ; il s'agit à la fois d'un avantage et d'un inconvénient. Un inconvénient, car ces systèmes sont très sensibles à l'environnement : ainsi les nanotubes type « disques empilés » ne sont pas stables en milieu basique et se désassemblent⁽¹⁵⁾. De plus, la plus grande difficulté à rationaliser les liaisons faibles rend ces assemblages non covalents moins prévisibles qu'une réaction chimique classique : le nanotube idéal, de dimensions bien définies et permettant une fonctionnalisation aisée, reste à venir⁽⁸⁴⁾. Enfin, la caractérisation de systèmes en équilibre peut s'avérer difficile.

Cette caractéristique constitue aussi un avantage, car la faiblesse de ces liaisons permet la correction d'erreurs et la recherche du système de plus faible énergie, grâce à leur réversibilité^(78,85). De plus, ces systèmes possèdent une grande faculté d'adaptation puisque leur minimum énergétique va évoluer avec l'environnement.

Ainsi, un dipeptide hydrophobe est capable de s'assembler en sphères ou en nanotubes selon les conditions⁽⁷¹⁾.

Il n'est donc pas surprenant de retrouver ces interactions faibles dans la plupart des processus biologiques, comme le repliement de protéines ou les interactions récepteurs-ligands⁽⁷⁷⁾.

Un nombre important de liaisons peuvent être définies comme liaisons faibles, cependant il semblerait que parmi celles-ci, les liaisons hydrogène ainsi que les interactions ioniques, aromatiques et l'effet hydrophobe sont les plus significatives.

I.3.2.1 Liaisons hydrogène

La géométrie optimale de cette interaction électrostatique se fait par un arrangement colinéaire des trois atomes impliqués (X-H---Y)⁽⁸⁶⁾. De plus, l'axe de la liaison X-H coïncide souvent avec l'axe imagé de la paire d'électron de Y. La force d'une liaison hydrogène est fortement influencée par le solvant et l'électronégativité des atomes X et Y. On peut donc classer ces liaisons en trois catégories selon leurs énergies : de 15 à 40 kcal mol^{-1} elles sont considérées comme très fortes, de 5 à 14 kcal mol^{-1} comme moyennes, et de 0 à 4 kcal mol^{-1} (les plus fréquentes) comme faibles. La distance entre deux hétéroatomes X et Y est de 2,2 à 3 Å, les liaisons les plus courtes étant les plus fortes.

À titre de comparaison, une liaison covalente entre les deux méthyles de l'éthane est de l'ordre de 80 kcal mol^{-1} , avec une longueur d'environ 1,54 Å.

L'avantage de cette liaison est qu'elle est directionnelle et complémentaire, puisqu'un donneur de liaison H interagit avec un accepteur. Elle a donc pu être largement utilisée pour concevoir des systèmes auto-assemblés simples⁽⁸⁷⁾.

Cependant, les systèmes basés uniquement sur celles-ci ont été assemblés dans des solvants aprotiques non-compétitifs, de part les faibles énergies mises en jeu. En effet, ces liaisons

entre deux partenaires artificiels ne sont pas suffisamment fortes pour vaincre les liaisons compétitives de solvants protiques en général et de l'eau en particulier⁽³⁾.

Cette liaison est naturellement très présente dans les peptides puisque la liaison peptidique -C(O)-N(H)- possède à la fois un donneur (N-H) et un accepteur (l'oxygène). Ces liaisons se retrouvent donc entre les séquences cycliques des nanotubes de type « disques empilés »⁽¹⁵⁾ ainsi qu'entre les glycines des monomères bolaamphiphiles⁽⁶⁶⁾, et sans doute entre les dipeptides hydrophobes (voir chapitre 2)⁽⁷³⁾.

Dans le cas de peptides bolaamphiphiles, elles semblent même être l'élément déclencheur de la formation de nanotubes, puisque les liaisons hydrogène résonnantes entre acides carboxyliques terminaux sélectionnent selon le pH l'assemblage en tubes ou en rubans⁽⁶⁶⁾.

I.3.2.2 Interactions ioniques

Il s'agit d'une interaction majoritairement électrostatique entre deux charges existant préalablement à l'interaction⁽⁸⁶⁾. Une paire d'ions existe donc quand un cation et anion sont assez proches pour que l'énergie associée à leur interaction soit supérieure à l'énergie thermique. Cette énergie peut être assez élevée puisque des valeurs de l'ordre de 100 kcal mol⁻¹ sont atteintes en phase gazeuse.

Selon la loi de Coulomb, la permittivité du solvant va être extrêmement importante :

$$E = \frac{q_1 q_2}{4\pi\epsilon\epsilon_0}$$

où E est l'énergie de liaison, q₁ et q₂ les deux charges impliquées, ε la permittivité du milieu et ε₀ la permittivité du vide.

Ainsi, ces paires d'ions vont être très importantes dans les solvants de faible permittivité telle que les solvants organiques (ε < 10) mais leur énergie va être très atténuée dans l'eau (ε = 78). L'interaction entre les ions méthylammonium et acétate possède une énergie d'environ 120 kcal mol⁻¹ en phase gazeuse mais inférieure à 2 kcal mol⁻¹ dans l'eau.

Dans le cas de nanotubes de diphenylalanine, le rôle joué par cette interaction semble peu clair ; cependant, dans le cas de nanotubes impliquant des séquences cycliques, les charges jouent un rôle important en autorisant ou non la solvation du peptide, et donc son auto-assemblage. Il ne s'agit donc pas là d'utiliser une paire d'ions comme liaison mais plutôt d'agir sur la solubilité de la séquence.

Ce type d'interaction semble donc plutôt conférer, ou pas, de la solubilité à un monomère ; il ne constitue pas une contribution importante aux interactions faibles dans l'eau. Des systèmes reposant sur des feuillet amyloïdes de charge complémentaire ont cependant donné lieu à des auto-assemblages⁽⁸⁸⁾.

I.3.2.3 Interactions aromatiques

Les interactions aromatiques sont en réalité de plusieurs types, dont l'interaction π -cation, π -polaire et π - π . Un cycle aromatique est en effet un composé riche en électrons, globalement apolaire mais incluant un moment quadripolaire permettant ces interactions⁽⁸⁶⁾.

Il peut donc interagir favorablement avec des cations, sans pour autant que l'on puisse parler de paires d'ions. De plus, le cation peut rester totalement solvaté, ce qui est favorable d'un point de vue énergétique. Cette interaction est donc moins sensible à la solvataion dans l'eau puisqu'une liaison entre un ion méthylammonium et un benzène possède une énergie d'environ 19 kcal mol⁻¹ en phase gazeuse et de 5 kcal mol⁻¹ en phase aqueuse, à comparer avec l'interaction méthylammonium - acétate décrite ci-dessus⁽⁸⁶⁾.

De la même façon, un cycle aromatique est capable d'interagir avec un dipôle, tel qu'une liaison hydrogène, avec toutefois une énergie assez faible, de l'ordre de quelques kcal mol⁻¹ en phase gazeuse.

Les électrons du cycle étant situés de part et d'autre de son plan, des charges partielles positives se trouvent dans ce plan⁽⁸⁹⁾. Le recouvrement direct d'aromatique ne serait pas favorable puisque les deux surfaces sont riches en électrons⁽⁸⁹⁾. Les conformations possibles seraient donc en forme de T ou décalées, afin de permettre une complémentarité maximale entre régions de potentiels électrostatiques positif et négatif (Fig. 3.3)⁽⁸⁶⁾. Des énergies de liaisons entre 1 et 2 kcal mol⁻¹ ont été calculées dans des protéines⁽⁹⁰⁾, la distance la plus favorable étant 5 et 4 Å pour les géométries «T» et «décalée» respectivement⁽⁹¹⁾. Cette dernière configuration est particulièrement courante dans le cas de polycycles, comme le naphthalène ou l'anthracène⁽⁸⁶⁾.

La sensibilité de cette interaction au solvant a été étudiée et les résultats montrent qu'elle est la plus favorable dans les solvants polaires⁽⁹²⁾ : passer de l'eau au disulfure de carbone décroît le gain d'énergie libre du système étudié de 9,4 kcal mol⁻¹ à 1,3 kcal mol⁻¹.

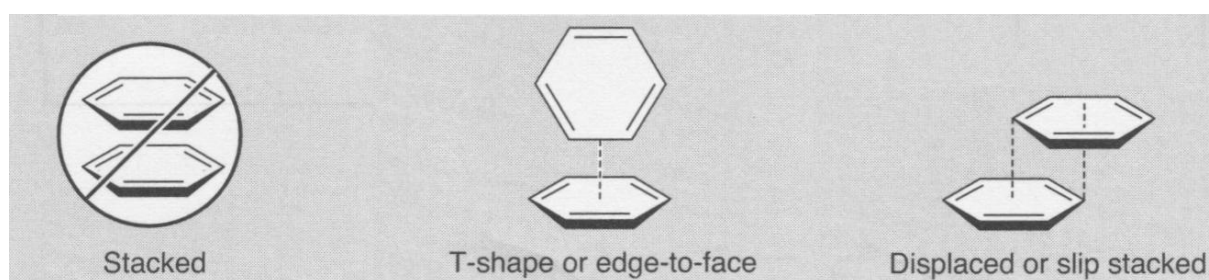


Fig. 3.3 Géométries possibles pour l'interaction π - π ⁽⁸⁶⁾.

De plus, un cycle aromatique pauvre en électrons peut interagir avec un cycle riche par transfert de charge, ce qui a pu être utilisé pour l'auto-assemblage de systèmes artificiels⁽⁹³⁾.

Les interactions aromatiques, bien que d'énergies assez faibles, sont donc très répandues dans la nature⁽⁹⁰⁾, puisqu'elles sont favorables dans l'eau et relativement directionnelles. Elles pourraient être à la base des assemblages de diphénylalanine⁽³²⁾, et ont aussi été utilisées dans le cas de disques empilés⁽⁹⁴⁾.

I.3.2.4 Effet hydrophobe

Il s'agit plutôt ici d'un manque d'interaction : les hydrocarbures sont aprotiques et apolaires, alors que l'eau est protique et très polaire. Ces deux composés ne peuvent donc pas interagir ensemble de façon à obtenir un milieu homogène.

L'eau, au voisinage de molécules lipophiles, aurait donc plutôt tendance à interagir avec elle-même, ce qui est enthalpiquement favorable mais entropiquement défavorable, puisque les molécules se retrouvent beaucoup plus organisées que dans le liquide pur. Ainsi, pour minimiser le manque d'interaction et donc réduire l'énergie totale du système, les molécules apolaires lipophiles ont tendance à s'agglomérer entre elles⁽⁹⁵⁾. L'effet hydrophobe serait donc plutôt gouverné par l'entropie et non par l'enthalpie comme les autres interactions.

Des mesures ont été réalisées afin de mesurer le coût énergétique de transfert de l'octanol vers l'eau, et des valeurs de $1,77 \text{ kcal mol}^{-1}$ ont été obtenues pour une chaîne *n*-propyle et de $3,59 \text{ kcal mol}^{-1}$ pour un groupement benzyle⁽⁹⁶⁾. Des mesures ont aussi été réalisées en terme de surface hydrophobe exposée à l'eau : des valeurs de l'ordre de $40 \text{ cal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ ont été rapportées, soit $1,2 \text{ kcal mol}^{-1}$ pour un méthylène⁽⁸⁶⁾. Dans le cas d'aromatiques, cet effet s'ajoute aux interactions purement aromatiques⁽⁸⁹⁾.

Cet effet se révèle donc assez fort et constitue un contributeur important de l'auto-assemblage biologique. Il a été depuis longtemps utilisé pour l'assemblage de micelles, mais aussi de fibres ou de nanotubes à base de molécules amphiphiles⁽⁹⁷⁾. À ce titre, il est présent dans les nanotubes de peptides bolaamphiphiles, de même que dans les assemblages de disques de peptides (leur protonation les rend insolubles) et sans doute également dans les tubes de diphenylalanine.

	Liaison covalente (éthane)	Liaison hydrogène	Interaction ionique (méthylammonium-acétate)	Interaction aromatique (benzène-benzène)	Effet hydrophobe
Origine de l'effet	Mise en commun d'électrons	Electrostatique	Electrostatique	Electrostatique + solvophile	Solvophile
Energie dans l'eau (kcal mol^{-1})	80	0 à 4 le plus souvent	< 2	1 à 2	1,2 par CH_2
Longueur de liaison (Å)	1,54	< 3 d'hétéroatome à hétéroatome	Théoriquement illimité, décroît avec la distance	4 ou 5 selon géométrie	Contact
Rôle de l'eau	Aucun, sauf liaisons hydrolysables	Défavorable (compétiteur)	Très défavorable (séparation des charges)	Favorable (effet hydrophobe)	Fondamental

Tableau 3.1 Caractéristiques typiques des interactions faibles présentes dans les nanotubes.

D'après ce bref aperçu, ces interactions méritent bien leur qualificatif de faibles tant les énergies évoquées sont petites par rapport à une liaison covalente.

Cette faiblesse est à la base de la richesse et de la spécificité des nano-objets auto-assemblés, et rend possible des structures tubulaires. L'effet hydrophobe détaillé en dernier soulève un point rarement étudié dans les publications concernant l'auto-assemblage : les questions énergétiques.

I.3.3 Questions énergétiques

L'assemblage de molécules en nanotubes se fait afin de réduire l'énergie libre G du système. La différence d'énergie libre est décrite par l'équation $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, les molécules étant en général prises dans leur état fondamental.

Cet assemblage est donc favorable si le gain d'enthalpie et/ou le gain d'entropie est significatif. Toutefois, intuitivement, un auto-assemblage se solde nécessairement par une perte de mouvement, notamment au niveau translationnel mais aussi rotationnel. Ce procédé serait donc gouverné par l'enthalpie, l'entropie étant une contrainte à réduire, par exemple par la création de monomères les plus rigides possibles⁽⁷⁸⁾.

Cette analyse rapide est illustrée par l'étude thermodynamique portant sur l'assemblage de nanotubes de type « disques empilés ». Les expériences ont été réalisées sur des séquences cycliques N-méthylées cyclo[(-Phe-D-N-MeAla)] de façon à permettre la formation d'un dimère par liaisons hydrogène (Fig. 3.4). Un ΔH° de $-11,0 \text{ kcal mol}^{-1}$ et un ΔS° de $-23,7 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ sont calculés à 298 K. Le paramètre d'enthalpie est concordant avec une contribution de chaque liaison H de 0,5 à 0,7 kcal mol^{-1} ⁽⁹⁸⁾.

Une étude similaire sur des cyclopeptides contenant des acides α - et γ -aminés conduit à $-8,1 \text{ kcal mol}^{-1}$ pour ΔH° et $-16,7 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ pour ΔS° , toujours à 298 K⁽⁹⁹⁾.

Il faut néanmoins considérer que ces valeurs ont été mesurées dans le chloroforme, un solvant non compétitif des liaisons hydrogène. De plus, les peptides monomères sont sans doute très solubles afin de permettre l'étude RMN : les conditions sont donc extrêmement différentes de l'auto-assemblage dans l'eau à pH acide précédemment décrit⁽¹⁵⁾.

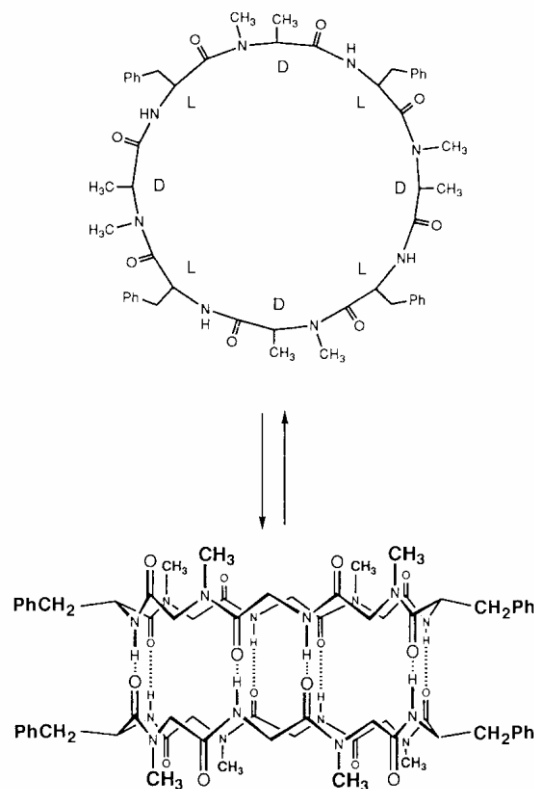


Fig. 3.4 Séquences cycliques N-méthylées assemblées sous forme de dimère⁽⁹⁸⁾.

L'effet hydrophobe joue sans doute un rôle significatif, puisque dans ce dernier cas les séquences contenant des acides aspartiques sont insolubles aux pH d'auto-assemblage ; l'effet entropique pourrait donc avoir une contribution positive.

De plus, dans le modèle considéré, un effet coopératif n'est pas à exclure : le gain d'énergie libre pourrait ainsi être supérieur à la somme des contributions des liaisons H. En effet, le coût entropique d'immobiliser le cyclopeptide est « payé » une seule fois, alors que toutes les contributions enthalpiques vont s'ajouter⁽⁸³⁾.

Enfin, l'évolution de la capacité calorifique et ses effets sur la différence d'énergie libre sont peut-être à considérer, ainsi que d'éventuels changements conformationnels du monomère afin de permettre l'assemblage⁽⁸⁶⁾.

Ainsi, la création *de novo* de systèmes moléculaires capables de s'assembler en nanotubes est un travail extrêmement complexe : la quasi totalité des assemblages décrits sont des découvertes fortuites. Ils exploitent la plupart du temps l'effet Gulliver⁽¹⁰⁰⁾, à la base de l'auto-assemblage, c'est-à-dire la multiplication des interactions.

De plus, l'effet hydrophobe joue un rôle extrêmement important dans l'assemblage de nanotubes de peptides bien qu'il ne soit pas toujours mentionné^(15,68).

Au niveau énergétique, il se pourrait que la différence d'entropie ne soit pas aussi défavorable qu'envisagée en première approche, du fait également d'une entropie résiduelle non négligeable des monomères dans le tube⁽⁸⁶⁾, ainsi que de l'entropie du tube lui-même, entité mobile et flexible dans la solution.

I.4. Applications des nanotubes de peptides

Les nanotubes de peptides ont fait l'objet d'un grand nombre d'applications. La problématique du positionnement spatial, centrale dans les nanotechnologies, a été abordée assez tôt. En effet, le développement d'applications, et encore plus d'applications industrielles, nécessite de pouvoir mesurer et contrôler la position et l'orientation de nano-objets, rarement directement manipulables. Les applications qui en découlent se situent naturellement dans les deux grands domaines que les nanotubes de peptides contribuent à relier : les sciences de la vie et les nanotechnologies.

I.4.1 Problème du positionnement

A la lumière des travaux déjà réalisés impliquant des nano-objets, il apparaît clairement que le positionnement des structures nanoscopiques est une problématique en tant que telle. Par exemple, un canal transmembranaire constitué par un nanotube (paragraphe 4.2) doit être plus ou moins perpendiculaire à la bicouche lipidique pour assurer le transport de molécules ; un nanofil doit de même être correctement positionné entre deux électrodes (paragraphe 4.3). Une étude spectroscopique a permis d'identifier la position de tubes au sein de membranes lipidiques alors que le positionnement de nanotubes a pu être réalisé par plusieurs méthodes. Enfin, une technique assez originale est utilisée pour déposer des nanotubes de façon macroscopique.

I.4.1.1 Mesure de position

Dans le cas de nanotubes de peptides type « disques empilés », la spectroscopie infrarouge à angle rasant peut fournir des mesures de position. En effet, ce type de tube est très cristallin et la position des liaisons peptidiques est fixe par rapport à l'axe du tube.

La déconvolution des bandes amides I et amides II en deux composantes chacune, parallèles et perpendiculaires permet donc d'obtenir la position du tube relativement au plan (Fig. 4.1)⁽¹⁰¹⁾. Ces analyses ont permis la mise au point du nanocapteur cité au paragraphe 4.3.1 : le nanotube est perpendiculaire à la surface d'or si la monocouche environnante est assemblée avant introduction des tubes, alors qu'elle est plutôt parallèle dans le cas contraire.

Cette technique est aussi utilisable, avec la spectroscopie infrarouge polarisée, pour déterminer la position des nanotubes dans une bicouche lipidique⁽¹⁰²⁾. L'angle entre les molécules de lipides et la surface a d'abord été mesuré à 28 ° en l'absence de nanotubes et 32 ° en leur présence, ce qui est conforme aux données de la littérature. Les nanotubes de peptides ont un angle de 38 °, soit 7 ° par rapport aux chaînes lipidiques. Ce résultat est là aussi assez proche de ceux obtenus avec la gramicidine A⁽¹⁰³⁾.

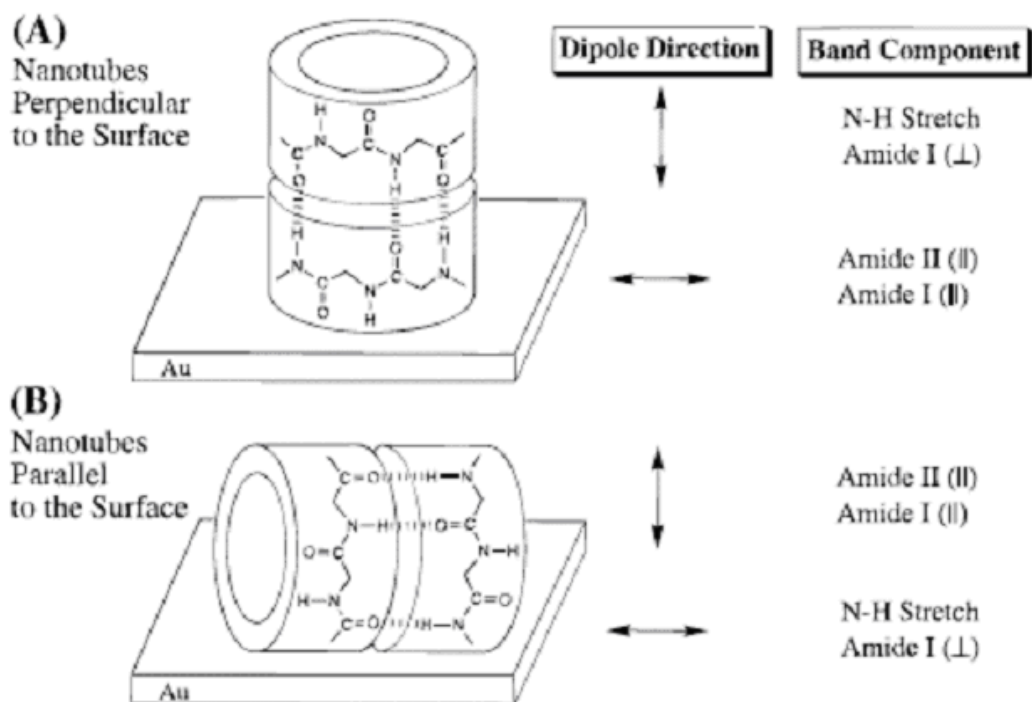


Fig. 4.1 Positions des moments dipolaires des liaisons peptidiques par rapport à la surface et bandes infrarouge correspondantes⁽¹⁰¹⁾.

I.4.1.2 Positionnement contrôlé de nanotubes de peptides

Le positionnement des nanotubes est réalisable par fonctionnalisation du tube autorisant une reconnaissance moléculaire par une surface ou une interaction avec un champ magnétique imposé.

Les nanotubes basés sur des peptides bolaamphiphiles sont recouverts de protéines de type avidine, liées de façon covalente⁽⁶⁷⁾. Ce nanotube peut alors être positionné de manière réversible sur une monocouche auto-assemblée fonctionnalisée avec des biotines (Fig. 4.2)⁽¹⁰⁴⁾.

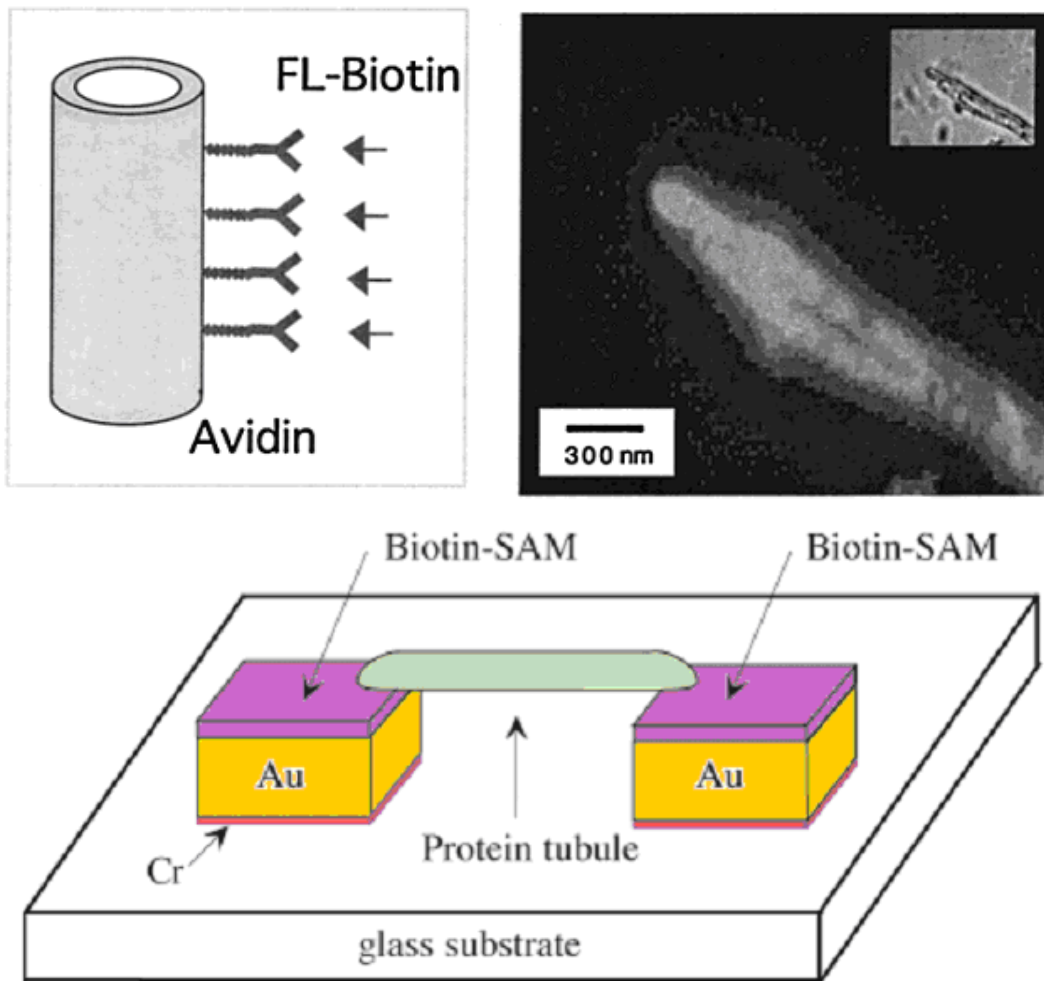


Fig. 4.2 Nanotube de peptides fonctionnalisés de façon covalente par des protéines avidine. En haut à gauche schéma de principe, en haut à droite vue en microscopie de fluorescence⁽⁶⁷⁾, en bas positionnement du tube sur une monocouche auto-assemblée comportant des biotines⁽¹⁰⁴⁾.

Cette technique n'est pas directement utilisable pour placer plusieurs nanotubes à plusieurs positions différentes de façon sélective. Une reconnaissance de type anti-corps/anti-gène permet de lever cet obstacle⁽¹⁰⁵⁾ : la fonctionnalisation d'un premier nanotube avec un anti-gène humain et d'un second avec un antigène de souris permet leur positionnement sélectif en croix dans un réseau de microbarres d'or. Les auteurs ont réalisé le placement des deux tubes de façon séquentielle mais indiquent qu'un placement en une étape est tout à fait envisageable (Fig. 4.3).

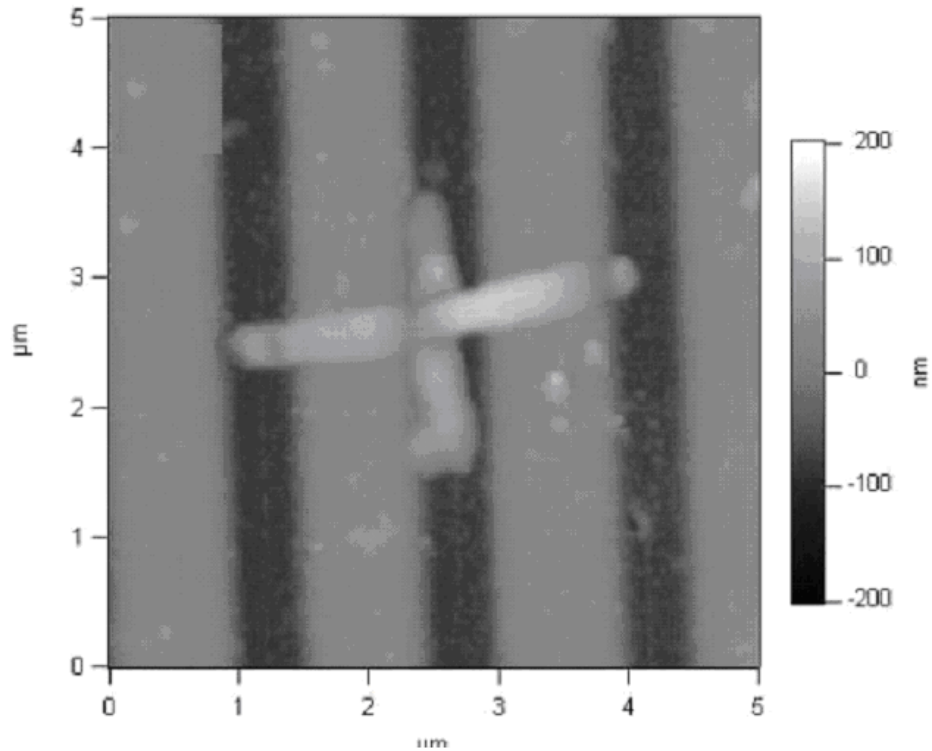


Fig. 4.3 Vue en AFM des deux nanotubes croisés (en blanc) dans un réseau de microbarres d'or (en gris)⁽¹⁰⁵⁾.

Un alignement perpendiculaire des nanotubes par rapport à une surface de verre siliconé est réalisé par évaporation rapide d'une solution de monomère dans l'hexafluoropropanol, seul solvant capable de solubiliser la diphénylalanine à température ambiante (Fig. 4.4)⁽¹⁰⁶⁾. L'auto-assemblage se produit donc perpendiculairement à la surface, sans doute à cause de la verticalité de l'évaporation du solvant. La présence d'une charge positive sur le monomère est nécessaire afin d'observer cet alignement.

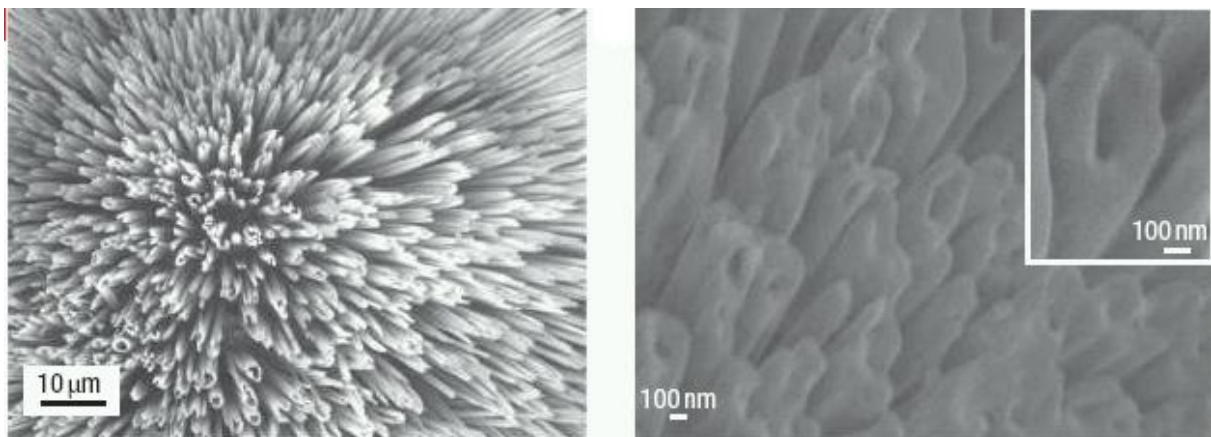


Fig. 4.4 Nanotubes de peptides alignés verticalement vus en MEB⁽¹⁰⁶⁾.

Un alignement horizontal a été réalisé mais nécessite une fonctionnalisation non-covalente. Les nanotubes de peptides sont assemblés en présence d'un ferrofluide contenant des nanoparticules de magnétite. Ces particules restent en surface des tubes et les rendent ainsi sensibles au champ magnétique. L'imposition d'un champ extérieur gouverne alors l'alignement des nanotubes magnétiques dans sa direction. (Fig. 4.5).

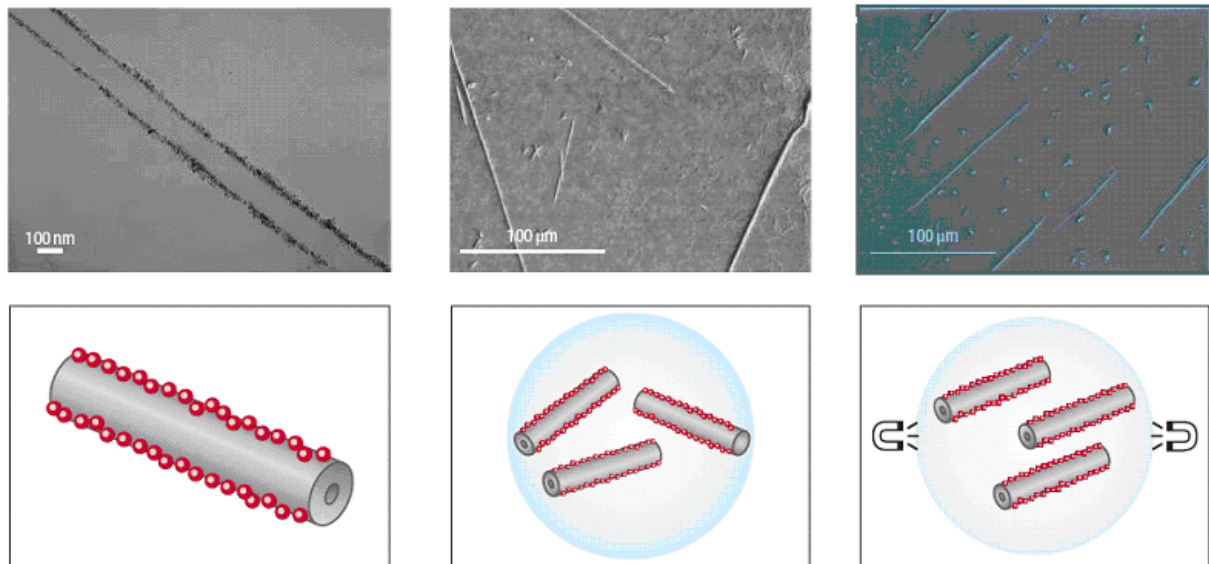


Fig. 4.5 Alignement horizontal de nanotubes de peptides. En haut images MEB, en bas schémas de principe. À gauche, nanotube de peptides rendu magnétique par des nanoparticules ; au centre, nanotubes magnétiques en l'absence de champ magnétique : à droite, nanotubes magnétiques en présence d'un champ magnétique extérieur⁽¹⁰⁶⁾.

Des stratégies très efficaces existent donc pour positionner les nanotubes de peptides. Elles impliquent le plus souvent la fonctionnalisation des nanotubes de façon covalente ou non-covalente, mis à part l'alignement vertical produit lors de l'auto-assemblage. Il est par contre possible d'émettre des doutes sur leur généralité puisque chaque technique semble spécifique à un type de tube et qu'aucun rapport ne fait état de la validation de l'une d'entre elles sur un nanotube de type différent.

I.4.1.3 Dépôt macroscopique de nanotubes

Le positionnement de nanotubes sur des surfaces macroscopiques constitue également un challenge. Une technique fort élégante implique des nanotubes de diphénylalanine et une imprimante⁽⁷¹⁾. Les nanotubes de peptides sont assemblés dans l'éthanol à faible concentration. Cette solution est ensuite placée dans la cartouche d'encre d'une imprimante commerciale (HP à jet d'encre) et une impression classique est réalisée sur une feuille plastique transparente (Fig. 4.6). Le contraste est assez faible mais plusieurs impressions successives permettent de déposer plusieurs couches. Les auteurs ont pu introduire des solutions de tubes à différentes concentrations dans les autres compartiments d'encre de façon à obtenir des contrastes différents. De plus, pour une même « encre », la résolution de l'imprimante permet de choisir la quantité de nanotubes déposée.

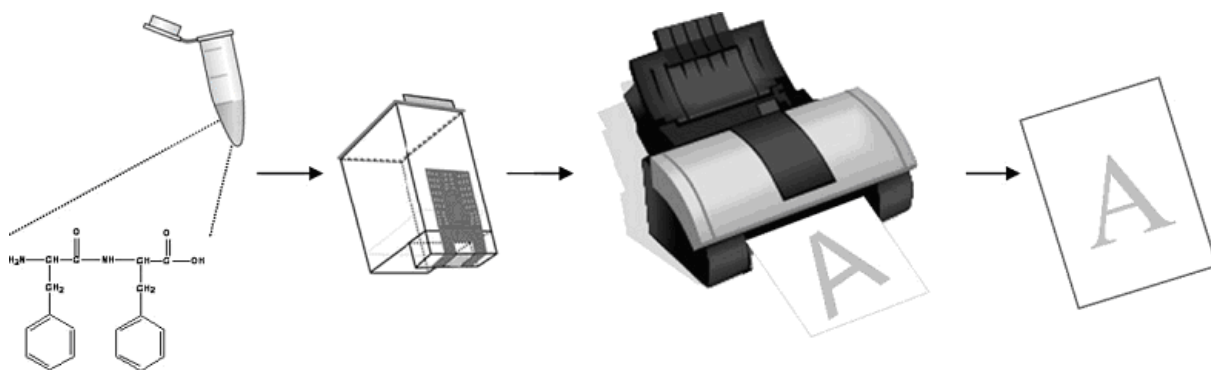


Fig. 4.6 Dépôt de nanotubes de peptides par une imprimante jet d'encre⁽⁷¹⁾.

I.4.2 Applications en sciences de la vie

La première application à base de nanotubes de peptides a été leur incorporation dans une membrane et leur utilisation en tant que canal ionique. Des nanotubes basés sur des séquences cycliques ont été ainsi assemblés dans des bicouches lipidiques. Aucune observation directe de ces structures n'a été décrite mais elles ont été mises en évidence par des expériences de transport d'ions à travers les membranes. Ces séquences, telle que cyclo[(Trp-D-Leu)₃-Gln-D-Leu], ont été conçues avec des chaînes latérales hydrophobes afin de faciliter leur assemblage dans des bicouches lipidiques (Fig. 4.7)⁽¹⁰⁷⁾.

Cette stratégie a été utilisée avec succès et des taux de transfert de 10^7 ions s^{-1} ont été mesurés pour le proton ; le sodium et le potassium étant aussi transportables⁽¹⁰⁷⁾. Un travail similaire a permis le transport de molécules de glucose (neutres)⁽¹⁰⁸⁾ ou d'acide glutamique (anioniques)⁽¹⁰⁹⁾.

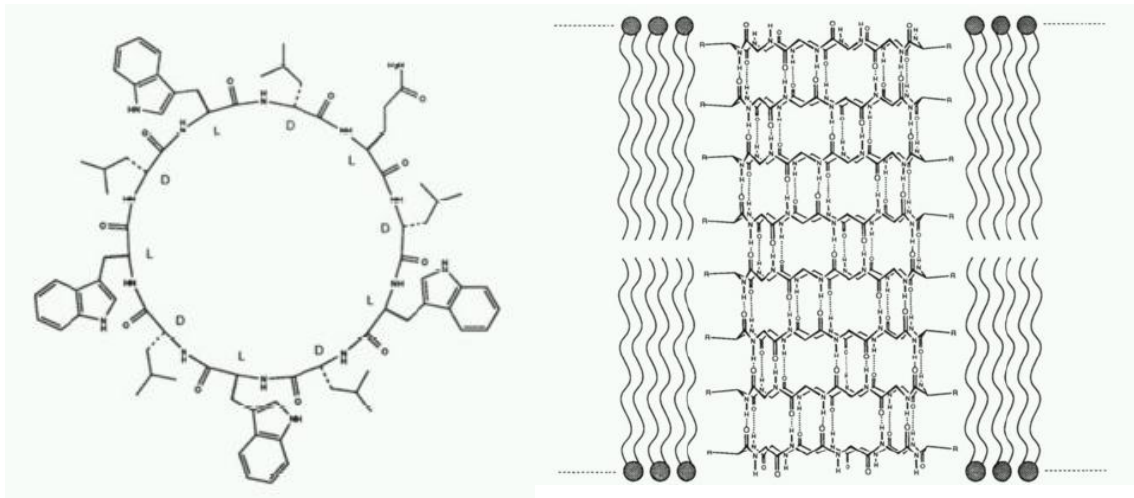


Fig. 4.7 Cyclopeptide cyclo[(Trp-D-Leu)₃-Gln-D-Leu] vu de dessus (à gauche) et assemblé dans une membrane lipidique (à droite)⁽¹⁰⁸⁾.

Les ions ou molécules ne sont toutefois pas transportés de façon continue : il semble que les nanotubes adoptent une conformation tantôt ouverte, tantôt fermée, sans doute par assemblage/désassemblage aléatoire dans la bicouche de lipides (Fig. 4.8). La durée de vie des canaux va de quelques millisecondes à une demi minute selon la membrane utilisée. Il est intéressant de noter que ni la gramicidine A ni les octapeptides utilisables pour le transport d'ions ne sont efficaces pour le transport de molécules plus importantes, ce qui suppose donc une sélection par le diamètre du tube et révèle l'utilité de l'ajuster finement⁽¹⁰⁹⁾.

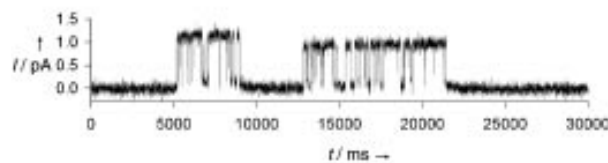


Fig. 4.8 Diagramme d'ouverture/fermeture des pores lors du passage d'acide glutamique dans 100 mM NaCl⁽¹⁰⁹⁾.

Ces canaux ioniques sont passifs, puisque le mouvement d'ions et de molécules se fait par gradient de concentration. Cependant, des tubes présentant des extrémités modifiées donnant lieu à un moment dipolaire ont été développés⁽¹¹⁰⁾.

L'échange d'ions et de molécules avec le milieu extérieur est vital pour les bactéries et ces travaux ont évolué vers des applications antibiotiques⁽¹¹¹⁾. Une bibliothèque d'hexa- et

d'octapeptides cycliques possédant des chaînes latérales hydrophobes (leucine, tryptophane...) et basiques (lysine, histidine...) a été réalisée.

Ces peptides donnent d'excellents résultats sur un certain nombre de bactéries Gram-positives telles que *Staphylococcus aureus* ou *Bacillus cereus* avec des concentrations d'inhibition minimum de l'ordre de la dizaine de microgrammes par litre.

Il est démontré que les peptides non cyclisés présentent une activité biologique très faible. Une étude toxicologique n'a, par ailleurs, révélé aucune toxicité ni sur les deux lignées de cellules de mammifères testées ni sur les souris étudiées.

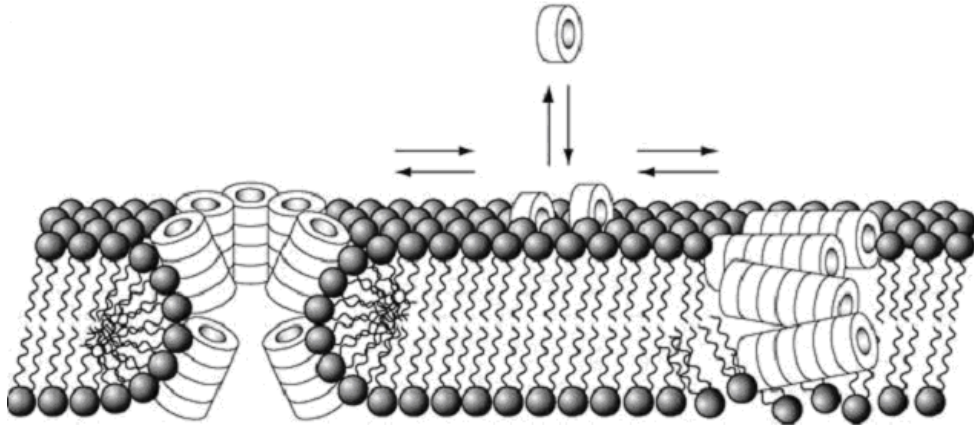


Fig. 4.9 Modes d'assemblages possibles de cyclopeptides dans une membrane lipidique⁽¹¹²⁾.

Enfin, des séquences peptidiques aux propriétés anti-virales ont été synthétisées⁽¹¹²⁾. Celles-ci ont été conçues pour empêcher les infections virales dépendant du pH. Si le mécanisme d'action n'est pas clairement défini, de bons résultats ont été obtenus avec un virus de la grippe : le suivi de l'infection réalisé avec un marqueur au soufre 35 a révélé que la présence de cyclopeptides à une concentration de 10 μM entraîne une diminution par 30 de la quantité de virus présents dans la cellule, par rapport à une cellule non protégée par le peptide.

L'assemblage de nanotubes dans la membrane de l'endosome diminuerait son pH interne, ce qui empêcherait son désassemblage et donc le relargage du virus dans la cellule (Fig. 4.10).

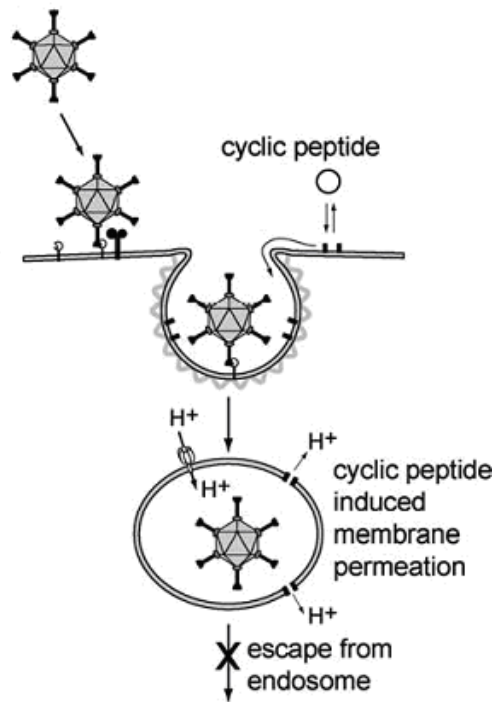


Fig. 4.10 Mécanisme d'action antivirale supposé de nanotubes « disques empilés »⁽¹¹²⁾.

Des nanotubes de peptides, basés sur des bolaamphiphiles, sont aussi utilisables en tant que supports pour des enzymes⁽¹¹³⁾. Une lipase modèle, issue de *Candida rugosa*, peut être encapsulée dans un nanotube de peptides en s'introduisant dans le canal central. Par augmentation de la concentration d'enzymes il est possible de saturer la surface interne du nanotube, les lipases s'accrochant alors aux parois extérieures. Loin de perdre leur activité, les lipases ainsi attachées ont, par comparaison aux enzymes libres, une activité supérieure de 33 % à température ambiante et de 70 % à 65 °C. Leur stabilité thermique est aussi augmentée avec une activité enzymatique constante de 20 à 65 °C (Fig. 4.11).

De façon intéressante, les auteurs précisent le diamètre du nanotube étudié (160 nm), ce qui est peu courant compte tenu de la polydispersité de ces structures.

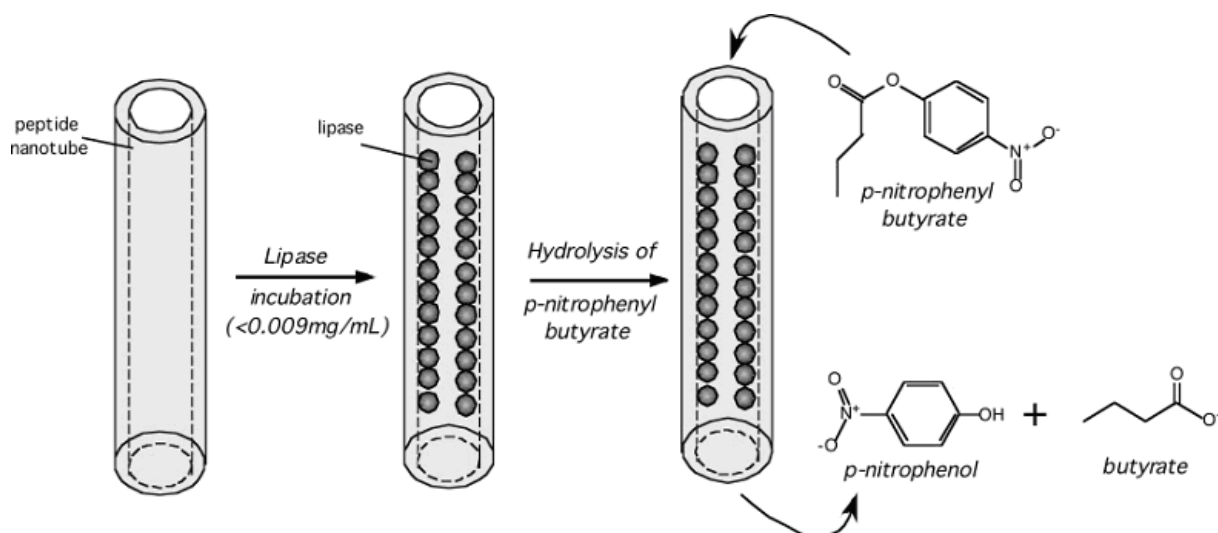


Fig. 4.11 Préparation et utilisation de lipases supportées dans un nanotube de peptides⁽¹¹³⁾.

Les applications dans le domaine des sciences de la vie utilisent donc la capacité des nanotubes à s'insérer dans des membranes lipidiques. Une sélection des molécules transportables à travers ces bicouches est réalisable par un contrôle fin du diamètre. De même le placement d'enzymes fonctionnelles dans le canal central d'un tube impose au tube d'avoir un diamètre adéquat.

I.4.3 Applications en nanotechnologie

I.4.3.1 Nanocapteurs

Les nanotubes de peptides, et notamment ceux de type « disques empilés », peuvent donc accepter des molécules étrangères et leur permettre de franchir une membrane hydrophobe. Utiliser de tels tubes pour détecter une molécule invitée est donc envisageable : à cette fin, un nanotube de peptides est immobilisé sur une monocouche lipidique auto-assemblée sur un substrat d'or (Fig. 4.12)⁽¹⁰¹⁾.

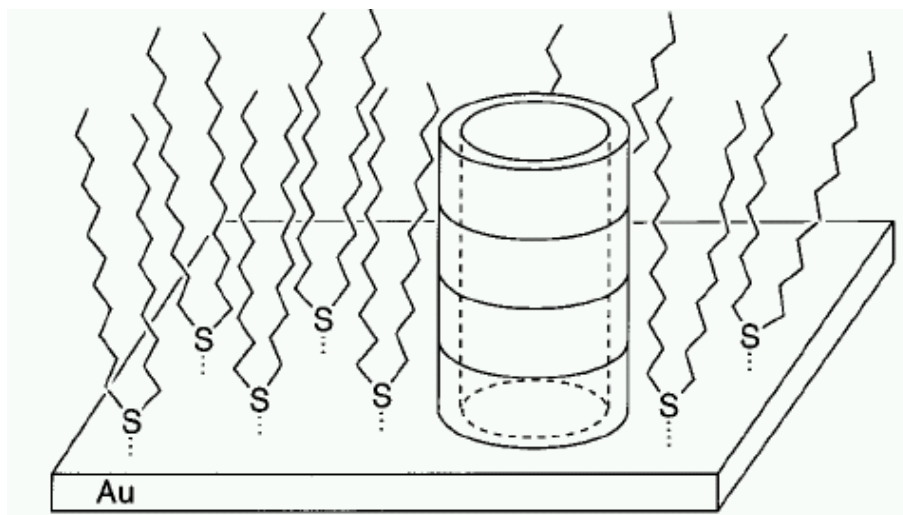


Fig. 4.12 Schéma de nanocapteur basé sur un nanotube de peptides⁽¹⁰¹⁾.

Une activité rédox apparaît pour les complexes $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ et $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, mais pas pour $[\text{Mo}(\text{CN})_8]^{4-}$, trop large pour pénétrer dans la cavité de 7,5 Å de diamètre. Cependant, l'intérêt de cette étude a plus été la réalisation du capteur que la mesure de ses performances.

Une autre étude a utilisé ce même type de tube afin de réaliser une électrode composite nanotube de peptides/anticorps⁽¹¹⁴⁾. Les nanotubes de peptides n'ont ici pas pour rôle de détecter, ce qui est fait par les anticorps, ni de transmettre le signal, ce qui est fait par l'électrode de verre recouverte d'une pâte de carbone. Ils sont plutôt utilisés pour faciliter le dépôt des anticorps (auxquels ils sont liés de façon covalente) à la surface de l'électrode, ce qui est difficile et coûteux par d'autres moyens. La détection d'*E. coli* est alors réalisée par cette électrode modifiée par oxydation-réduction de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (Fig. 4.13).

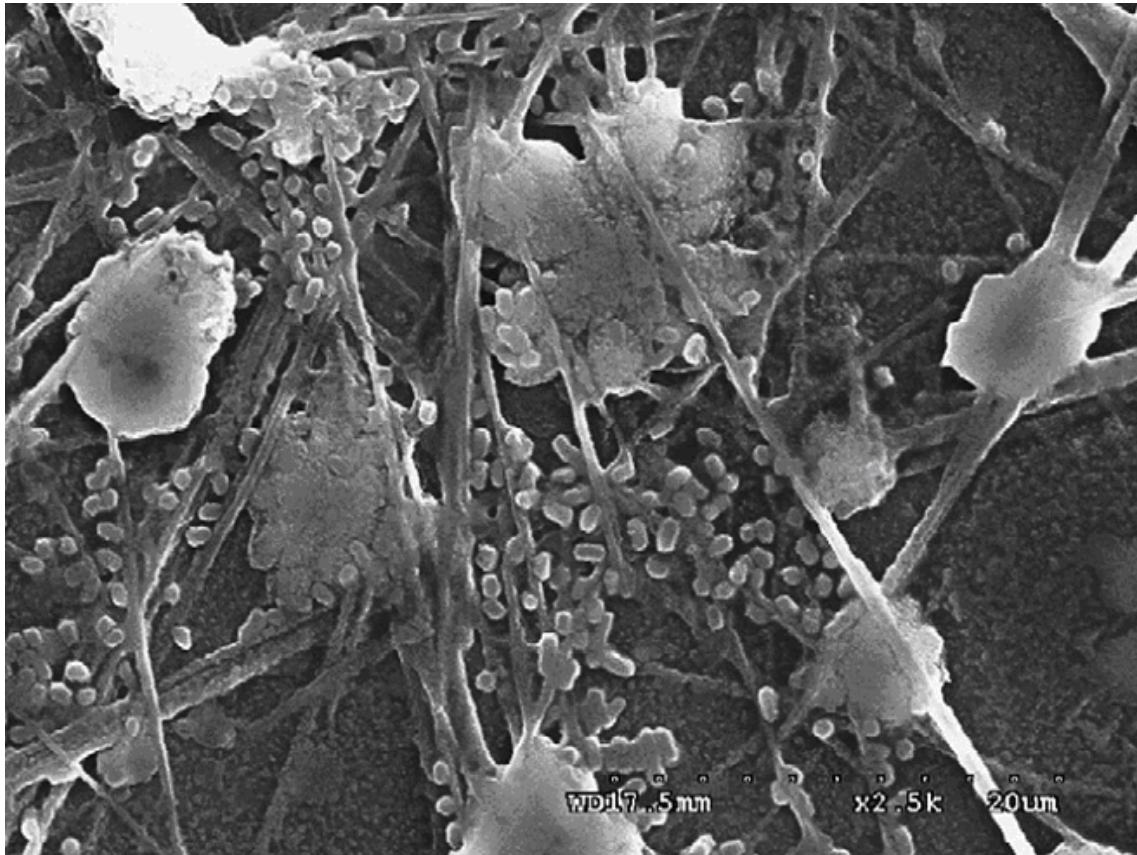


Fig. 4.13 Image MEB d'*E. coli* attachées à la surface de nanotubes de peptide par interactions anticorps-antigène⁽¹¹⁴⁾.

Enfin, un deuxième type de tube, basé sur des dipeptides aromatiques (diphénylalanine) a été employé pour recouvrir une électrode et faire des cycles d'oxydation-réduction de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Les auteurs rapportent une sensibilité quatre fois supérieure avec l'enrobage de nanotubes, en comparaison de l'électrode nue⁽¹¹⁵⁾. Les nanotubes sont donc ici utilisés pour augmenter les performances, sans doute grâce à une surface fonctionnelle plus importante.

Une nouvelle étape en vue d'une application commerciale a été franchie par la détection de peroxyde d'hydrogène et de NADPH⁽¹¹⁶⁾ en utilisant une électrode d'or couverte de nanotubes. Ceci autorise la détection de glucose et d'éthanol par liaison des nanotubes de peptides avec une enzyme de type glucose oxydase et par addition d'une déshydrogénase d'éthanol. La sensibilité est importante et un développement commercial est envisagé dans le cadre de la lutte contre le diabète.

I.4.3.2 Création de nanofils et de nanocanaux

Cette application a été développée avec la plupart des nanotubes de peptides.

Des virus mosaïques du tabac peuvent être recouverts de fer, de silice, de plomb, de cadmium⁽¹¹⁷⁾, de platine, d'or ou d'argent⁽¹¹⁸⁾, ou encore pour fabriquer des matériaux nanoporeux (Fig. 4.13)⁽¹¹⁹⁾. Les procédés utilisés sont assez simples et impliquent la co-cristallisation, l'hydrolyse oxydante et la condensation sol-gel⁽¹¹⁸⁾.

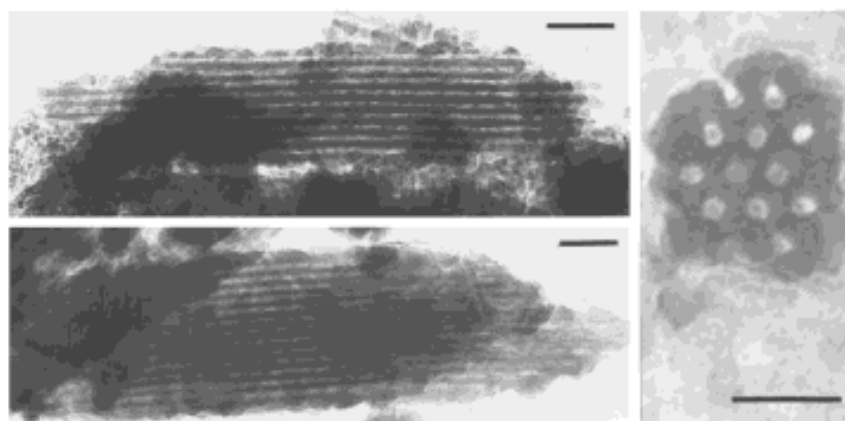


Fig. 4.13 Silice nanoporeuse réalisée par utilisation de TMV en gabarits. À gauche barre d'échelle 100 nm, à droite 50 nm⁽¹¹⁹⁾.

De même, les nanotubes de diphenylalanine peuvent être recouverts de platine⁽⁷⁶⁾ ou remplis d'argent⁽³²⁾. L'enrobage de wurtzite (ZnS) des nanotubes de peptides bolaamphiphiles a été réalisé après fonctionnalisation chimique⁽¹²⁰⁾. Enfin, une métallisation par du cuivre et du nickel est faisable en profitant des propriétés complexantes du monomère peptidique⁽³¹⁾.

La couche de métal est en général composée de nanoparticules plus ou moins liées (Fig. 4.14), ce qui n'est pas forcément un inconvénient. Les nanotubes basés sur des peptides bolaamphiphiles permettent apparemment d'obtenir les meilleurs résultats en terme de surface, à savoir une surface lisse et homogène (Fig. 4.15).

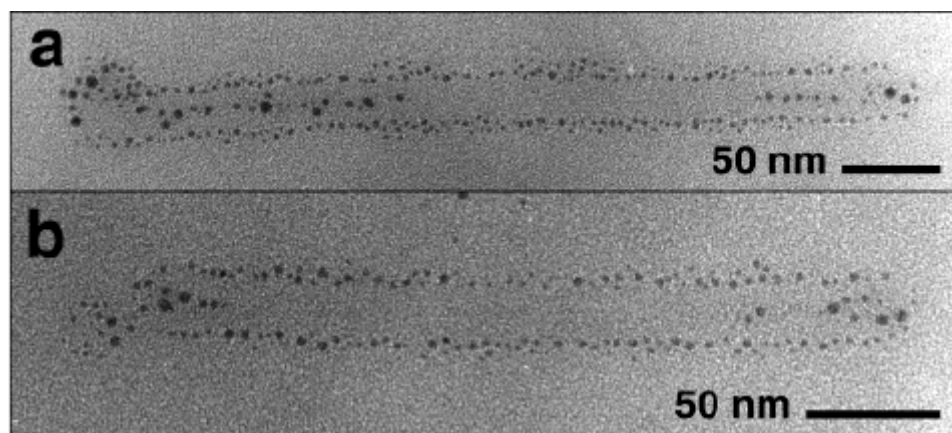


Fig. 4.14 Images de microscopie électronique à transmission d'une capsid de TMV fonctionnalisée par des nanoparticules d'argent sur les surfaces extérieures et intérieures⁽¹¹⁸⁾.

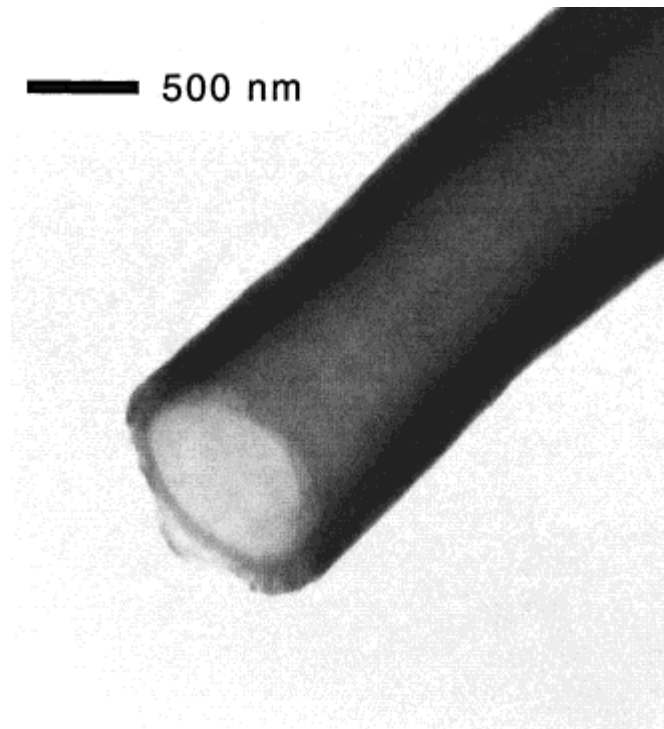


Fig. 4.15 Nanotube de peptides bolaamphiphiles recouvert de nickel vu en MEB⁽³¹⁾.

La faculté de recouvrir sélectivement, par exemple la surface intérieure par rapport à la surface extérieure, existe pour des nanotubes de diphénylalanine : leur mise en présence, à l'ébullition, avec une solution d'argent et d'acide citrique, permet de déposer du métal uniquement dans l'espace intérieur⁽³²⁾. Les propriétés électriques de ce nanofil d'argent ont été vérifiées et semblent tout à fait compatibles avec leur utilisation en nanoélectronique⁽¹²¹⁾.

La surface extérieure restant exploitable, l'addition d'un peptide Phe-Phe-Cys (diphénylalanine-cystéine) permet la liaison, grâce à la fonction thiol, de nanoparticules d'or. Ces particules servent alors de sites de nucléation pour la réduction d'or ionique (Fig. 4.16)⁽¹²²⁾. La nanostructure formée est donc un nanofil comportant une couche isolante (le nanotube de peptides) prise entre deux couches conductrices (d'argent à l'intérieur et d'or à l'extérieur) : on peut donc la qualifier de nanocable coaxial (Fig. 4.17).

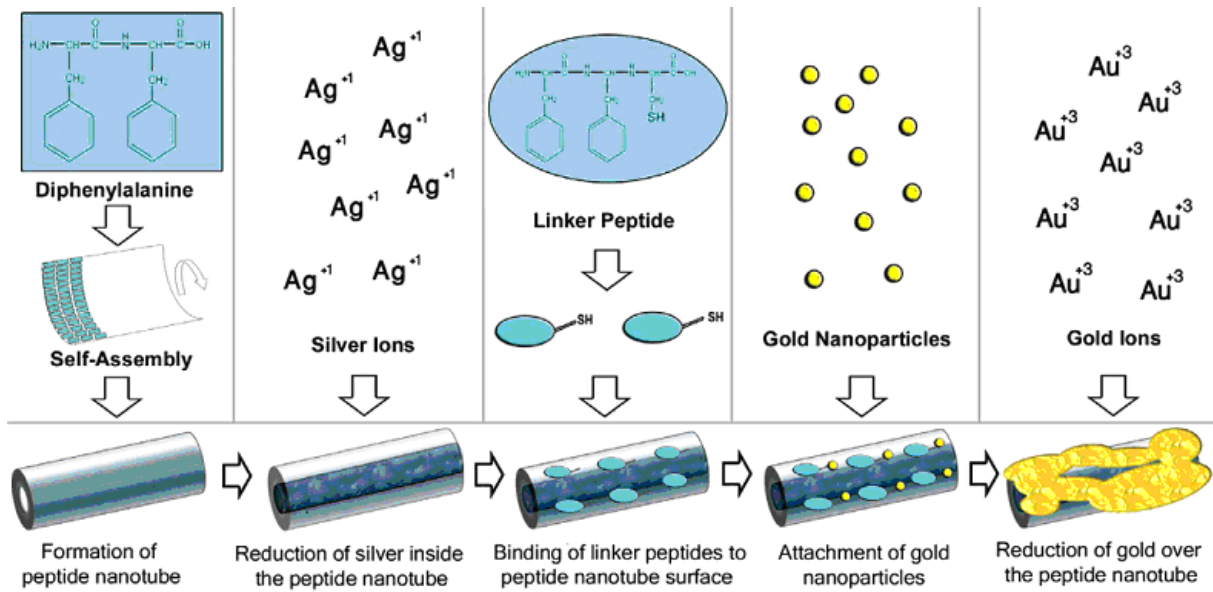


Fig. 4.16 Formation d'un nanofil coaxial : (de gauche à droite) assemblage de nanotubes de diphenylalanine, réduction d'argent à l'intérieur du tube, adsorption de peptides liants en surface du tube, attachement des nanoparticules d'or et réduction d'or ionique en surface du tube⁽¹²²⁾.

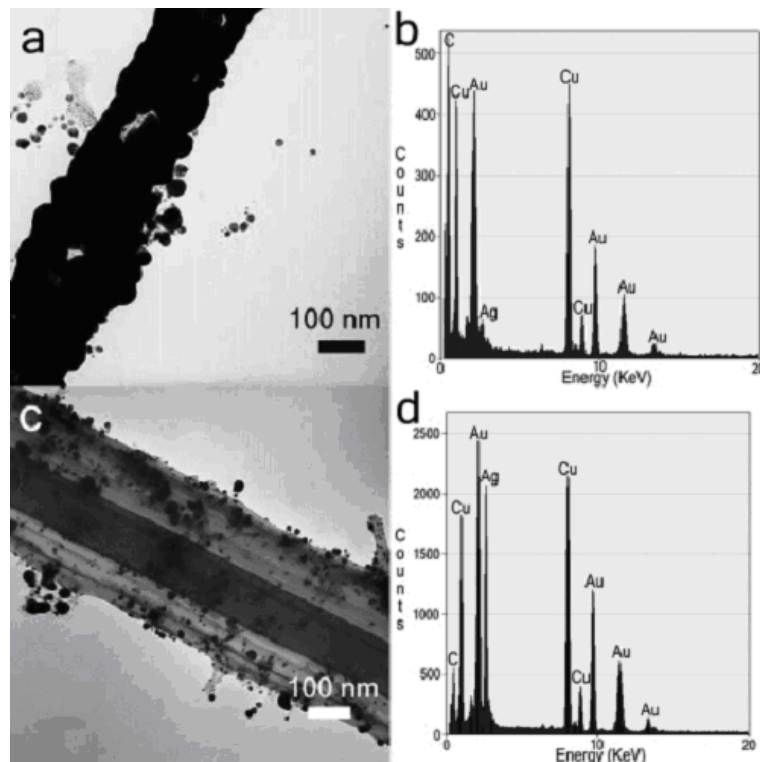


Fig. 4.17 Nanofil coaxial argent/or. (a) Nanotube recouvert d'or uniquement vu en MET (b) Analyse EDX du tube (c) Nanofil coaxial vu en MET (d) Analyse EDX du nanofil.⁽¹²²⁾

Les nanotubes de peptides sont donc utilisables pour l'obtention de nanofils. Toutefois, leur utilisation directe dans des méthodes de fabrication en microélectronique semble difficile compte tenu des conditions classiquement utilisées (plasma d'O₂, solvants et solutions basiques...).

Cette équipe a pu élaborer une méthode de photolithographie adaptée à la fragilité de ces structures par l'utilisation d'un développeur acide et d'une couche de masquage résistante au traitement plasma. Cela permet l'intégration de nanotubes de diphénylalanines entre deux électrodes Cr/Au ou encore l'utilisation du nanotube comme nanocanal (Fig. 4.18)⁽⁷²⁾. L'incorporation d'électrodes sous le nanocanal permet de contrôler le débit d'un liquide ionique. Enfin, la fragilité relative du tube permet une destruction aisée après le placement du nanotube rempli d'argent ou son utilisation comme gabarit sacrificiel pour réaliser des nanocanaux dans des résines polymères.

De façon révélatrice, les auteurs rapportent avoir été gênés par la grande taille des nanotubes. Ceci les a obligés à déposer des couches métalliques plus épaisses qu'habituellement.

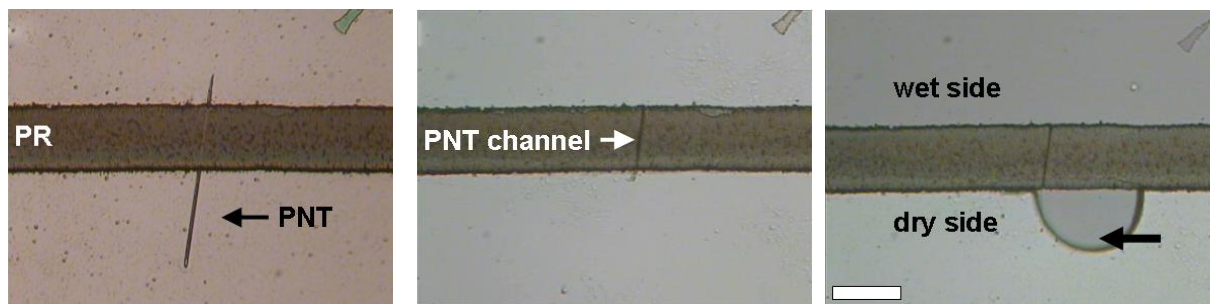


Fig. 4.18 Nanocanal traversant une membrane de polymère (PR). À gauche, polymère déposé sur le tube. Au centre, tube coupé par plasma d'oxygène. À droite, passage d'eau à travers le nanotube⁽⁷²⁾.

Le transport des charges électriques le long d'un nanotube de peptides, grâce à ses chaînes latérales, a aussi été étudié⁽¹²³⁾. Des nanotubes « disques empilés » sont assemblables à partir de cyclopeptides possédant des groupements acide naphthalenetetracarboxylique diimide (Fig. 4.19). Ces chaînes latérales permettent d'une part l'assemblage des tubes par réduction (et leur désassemblage par oxydation) mais aussi des transferts de charges entre les disques du nanotube. Les analyses de spectroscopie infrarouge révèlent une délocalisation de charges étendue⁽⁹⁴⁾.

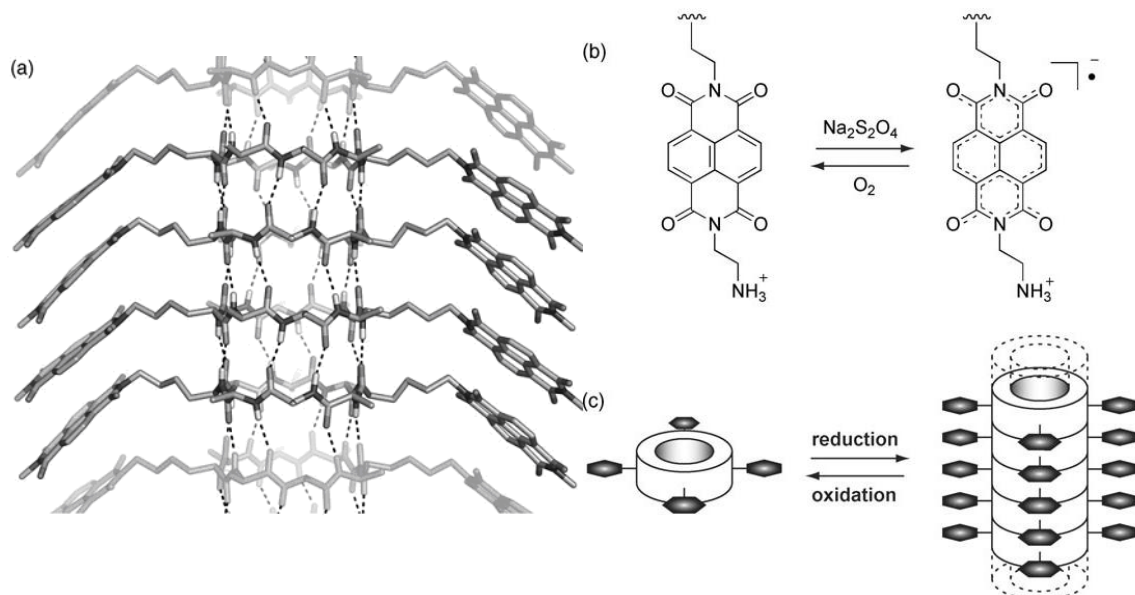


Fig. 4.19 Nanotubes de peptides « disques empilés » fonctionnalisés par des groupements naphthalènetetracarboxylique. (a) Modèle calculé d'un tube assemblé (b) Réduction réversible des chaînes latérales en radical anion correspondant (c) Schéma de l'assemblage de tubes déclenché par réduction⁽¹²³⁾.

Les nanotubes de peptides sont donc prometteurs en tant que supports pour la fabrication de nanofils ou pour servir de nanocanaux dans des applications nanofluidiques. Leur compatibilité avec certaines méthodes de fabrication *top-down* utilisées en électronique est assez prometteuse, le manque de contrôle sur le diamètre reste cependant un handicap.

Ce bref aperçu des applications développées à base de nanotubes de peptides permet de souligner l'importance primordiale de contrôler le diamètre : la taille des structures voyageant dans un canal transmembranaire, la quantité de courant passant dans un nanofil ou le débit de l'eau à travers un nanocanal sont autant de paramètres dépendant de cette dimension. Le développement industriel de telles applications imposera d'abord un meilleur contrôle de cette valeur.

I.5 Le lanréotide

Parmi les peptides s'assemblant en nanotubes, une séquence est particulière, de part son origine pharmaceutique et les spécificités de son assemblage. Il s'agit du lanréotide, un octapeptide d'origine synthétique de séquence H-D-Nal-cyclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂ (Fig. 5.1). Ce peptide, cyclique grâce au pont disulfure (Fig. 5.1 en vert), comporte deux dérivés non naturels (Fig. 5.1 en orange), le D-tryptophane et la naphthylalanine. Il comporte deux charges positives (Fig. 5.1 en bleu), ici neutralisées par deux contre-ions acétate et aucune charge négative de part la présence d'un amide à l'extrémité C-terminale de la séquence (Fig. 5.1 en rouge). Un aspect structural important de cette molécule est la ségrégation des acides aminés aromatiques et des acides aminés aliphatiques hydrophobes, ainsi que la position des charges de part et d'autre de la molécule.

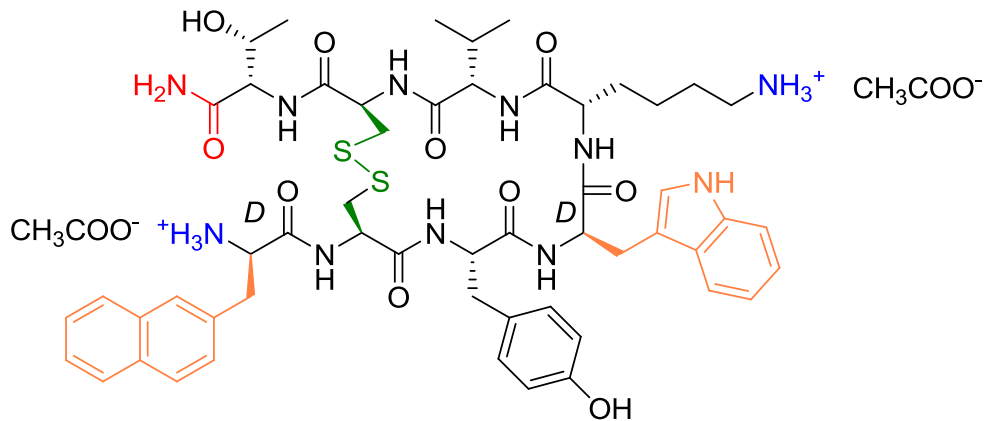


Fig. 5.1 : Sel d'acétate du lanréotide.

I.5.1 Origine biologique et acromégalie

Cette molécule est un analogue de la somatostatine, connue comme hormone inhibitrice de l'hormone de croissance.

La production excessive de l'hormone de croissance dans la glande hypophyse constitue une maladie appelée acromégalie. Elle est souvent engendrée par une tumeur bénigne.

Cette maladie se caractérise par une croissance excessive chez les patients, notamment au niveau des pieds et des mains, avec des déformations au niveau des membres et du visage (Fig. 5.2). Elle touche aussi un grand nombre de parties du corps dont le foie, la thyroïde et le cœur, avec des problèmes cardiaques chez 70 à 80 % des malades⁽¹²⁴⁾.

Une opération chirurgicale est souvent possible, éventuellement par trépanation. Dans le cas contraire, ou en complément, la prise de médicaments doit avoir lieu durant toute la vie du patient.

Un certain nombre de personnages célèbres ont été atteints de cette maladie, comme les acteurs Richard Kiel, Carel Struycken et Matthew McGrory. Une hypothèse impute également

cette maladie à Goliath, le géant philistin terrassé par David dans la Bible, avec une taille supposée de 2,80 m⁽¹²⁵⁾.



Fig. 5.2 À gauche, un acteur atteint d'acromégalie : Richard Kiel (au second plan) dans le film *Moonraker*. À droite main et pieds déformés par la maladie.

Le lanréotide est commercialisé par la société IPSEN-Beaufour sous le nom de « Somatuline ».

Il est disponible sous une forme thérapeutique autorisant une action long-terme baptisée « Somatuline Autogel ». Cette formulation se présente sous la forme d'un gel de peptide à 35 % en masse dans l'eau et permet, après injection sous-cutanée, un effet biologique pendant un mois⁽¹²⁶⁾.

I.5.2 Gel de lanréotide

Le gel formé par le lanréotide dans l'eau a été étudié par Maïté Paternostre, Franck Artzner et leurs équipes respectives. Le but de cette étude a été de déterminer les structures impliquées dans ce gel, d'en dresser le diagramme de phase et de déterminer les interactions à l'origine de ces assemblages par une approche spectroscopique et mutationnelle.

I.5.2.1 Diagramme de phase

Une étude très complète, incluant de la spectroscopie infrarouge et Raman, de la diffusion de rayons X aux petits angles, de la calorimétrie différentielle ainsi que de la microscopie, optique et électronique par cryo-fracture, a permis de dresser le diagramme de phase des assemblages de lanréotide dans l'eau (Fig. 5.3)⁽¹²⁷⁾.

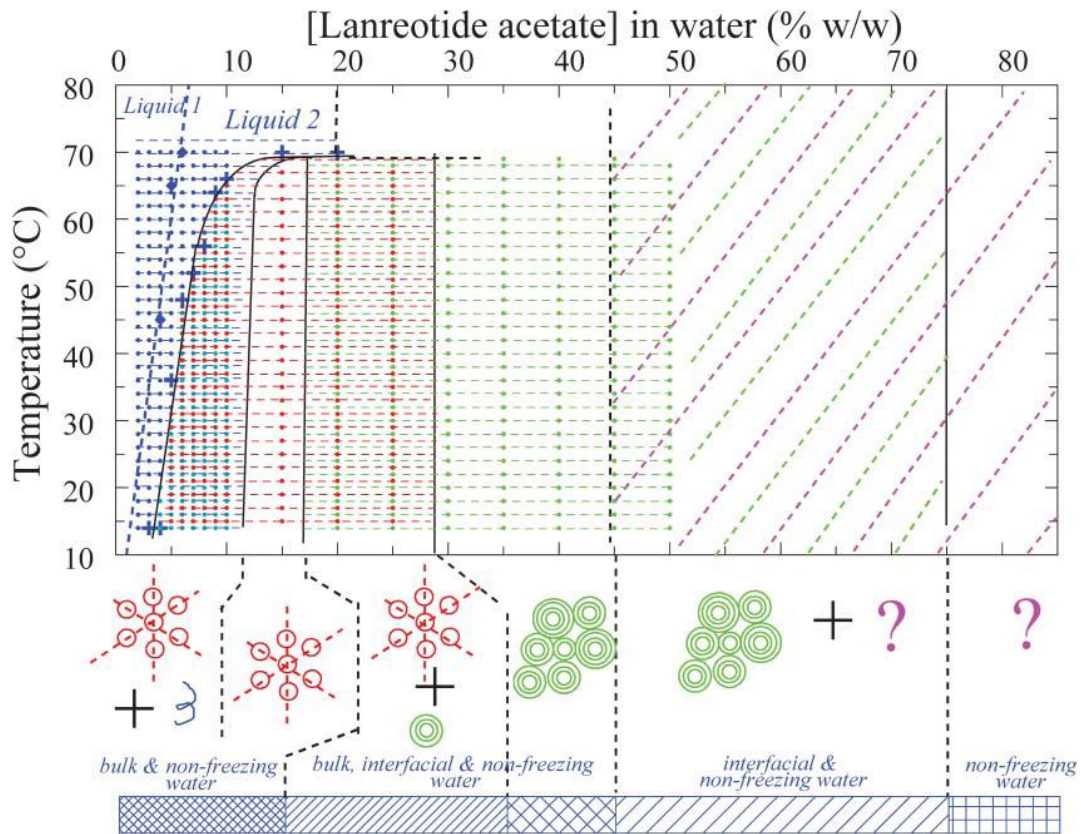


Fig. 5.3 Diagramme de phase du lanréotide acétate dans l'eau. Points bleus : liquide isotropique, points rouges : nanotubes, points verts : nanotubes emboîtés, signes plus : limite entre les liquides contenant et ne contenant pas d'agrégats. Les tirets violets indiquent des concentrations pour lesquelles aucune donnée n'est disponible. En bas du diagramme, représentation schématique des structures rencontrées. Tout en bas, les différents régimes d'eau selon la concentration de lanréotide⁽¹²⁷⁾.

Ce diagramme représente les structures rencontrées selon la concentration de lanréotide et la température. Il est illustré par des images de microscopie électronique par cryo-fracture ou cryo-gravure (Fig. 5.4).

A température fixée, par exemple à 20 °C, et à moins de 3 % en masse de peptide dans l'eau, aucune structure n'est visible, seuls des agrégats sont détectables par spectroscopie. De 3 à 18 % en masse, le lanréotide s'assemble en nanotubes monodisperses de diamètre 24,4 nm. Au-delà de 18 %, ces nanotubes monodisperses cohabitent avec des nanotubes emboîtés, apparaissant tels des asperges en microscopie électronique de cryo-fracture. À partir de 28 %

uniquement les nanotubes emboîtés sont décelables. À haute concentration des structures non déterminées apparaissent.

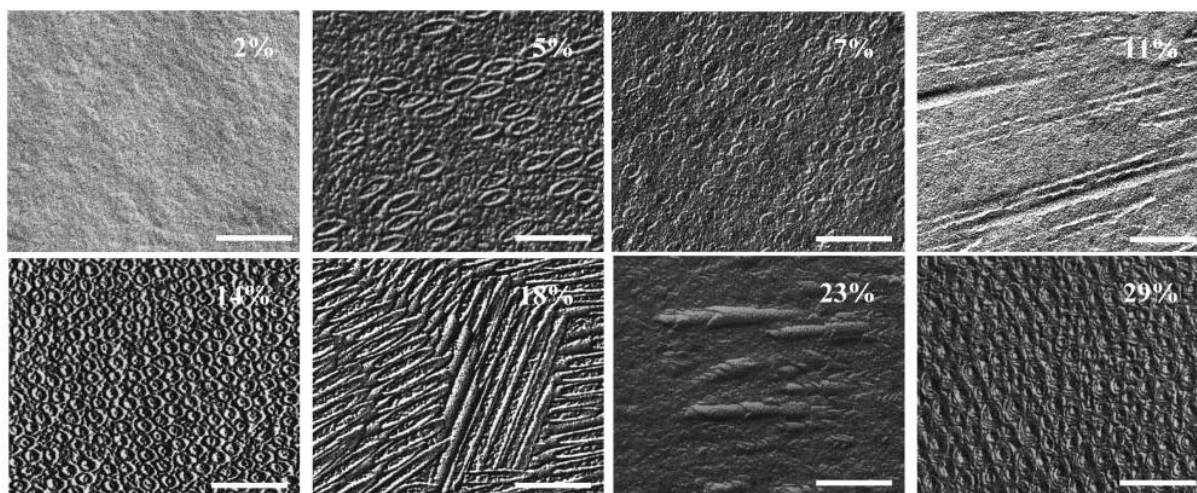


Fig. 5.4 Micrographies électroniques de structures de lanréotide acétate dans l'eau après cryo-fracture (2 %, 7 %, 11 %, 23 % en masse) et cryo-gravure (5 %, 14 %, 18 % et 29 % en masse). Toutes les barres d'échelles représentent 100 nm⁽¹²⁷⁾.

Le comportement de l'eau présente dans ce gel, aussi bien en cristallisation ou en fonte, est décrit grâce à une étude par calorimétrie différentielle à balayage. Cette étude met en évidence la présence de trois types d'eau : l'eau non liée (« *bulk* ») ayant des propriétés normales ; l'eau interfaciale, très liée aux molécules de lanréotide et fondant en dessous de 0 °C ; enfin l'eau ne gelant pas. Cette eau se situe entre les parois des nanotubes imbriqués.

Ainsi, cinq domaines présentant des comportements différents de l'eau impliquée dans le gel apparaissent, de façon corrélée aux structures supramoléculaires observées précédemment (Fig. 5.3).

I.5.2.2 Conformation du lanréotide

La conformation du lanréotide a été étudiée par spectroscopie vibrationnelle infrarouge et Raman⁽¹²⁸⁾.

La spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier permet l'étude de la bande amide I. Située entre 1600 et 1700 cm^{-1} , elle est attribuable aux carbonyles des liaisons amides. Ces derniers peuvent être impliqués dans des liaisons hydrogène correspondant à une structuration du peptide en solution. Ainsi, un signal à 1620 et 1685 cm^{-1} peut être attribué à une structuration en feuillettes β antiparallèles, 1670 cm^{-1} à un coude et 1635 cm^{-1} à des liaisons hydrogène aléatoires (Fig. 5.5)⁽¹²⁷⁾.

Connaissant le nombre de fonctions peptidiques, la déconvolution de cette bande d'absorption permet de connaître le nombre de fonctions carbonyle engagées par type de structuration : à

2 % en masse, soit le lanréotide seul en solution, trois carbonyles sont impliqués dans un feuillet β antiparallèle, un carbonyle dans un coude et quatre ne sont impliqués dans aucune structure. Cette analyse a été réalisée pour une large gamme de concentrations⁽¹²⁷⁾.

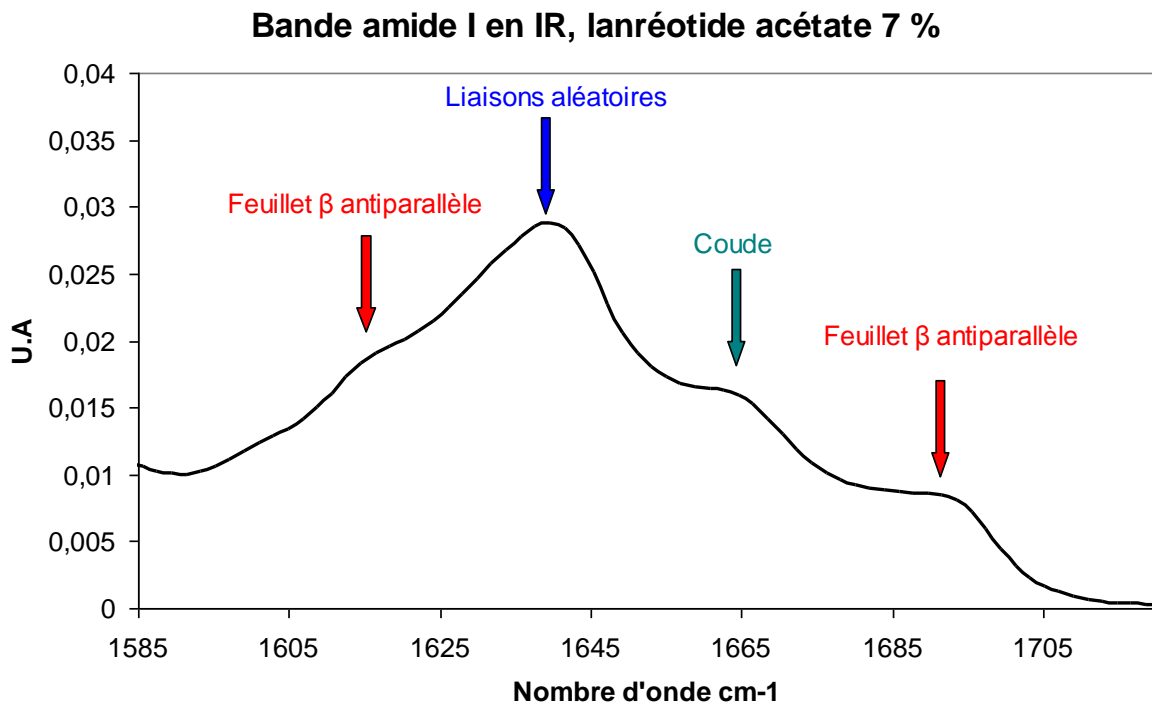


Fig. 5.5 Spectrométrie infrarouge : bande amide I du lanréotide (7 % en masse).

De plus, le pont disulfure est caractérisé en spectroscopie Raman par une vibration à 506 cm^{-1} , ce qui est caractéristique d'une conformation de type *gauche-gauche-gauche*⁽¹²⁸⁾.

Ces données suggèrent fortement une conformation planaire du lanréotide de type coude β (Fig. 5.1). Trois couples d'accepteurs/donneurs de liaisons hydrogène sont positionnés correctement pour former une fibre en feuillet β (Fig. 5.6.a).

I.5.2.3 Des nanotubes monoparois et monodisperses

L'échelle supramoléculaire des nanotubes monodisperses a été étudiée grâce à la diffraction de fibre et la diffusion de rayons X aux petits angles⁽¹²⁸⁾.

Quatre ordres hiérarchiques sont mis en évidence (Fig. 5.6) :

- Par recouvrement entre les zones aliphatiques de deux peptides (effet hydrophobe) et les zones aromatiques (interactions π - π), le monomère lanréotide est assemblé sous forme de dimères. Son positionnement « face-à-face » permet de minimiser les forces répulsives entre les charges positives (Fig. 5.6.a). Deux molécules de lanréotide forment donc l'épaisseur de la paroi du tube.
- Des liaisons hydrogène intermoléculaires stabilisent l'assemblage des dimères sous forme de filaments hélicoïdaux (Fig. 5.6.b).

- L'effet hydrophobe stabilise les interactions latérales des filaments entre eux. Le tube peut donc être considéré comme constitué de filaments de dimères (Fig. 5.6.c).
- Les nanotubes monodisperses, de 3 à 28 % de lanréotide en masse, sont organisés spatialement avec une maille hexagonale (Fig. 5.6.d).

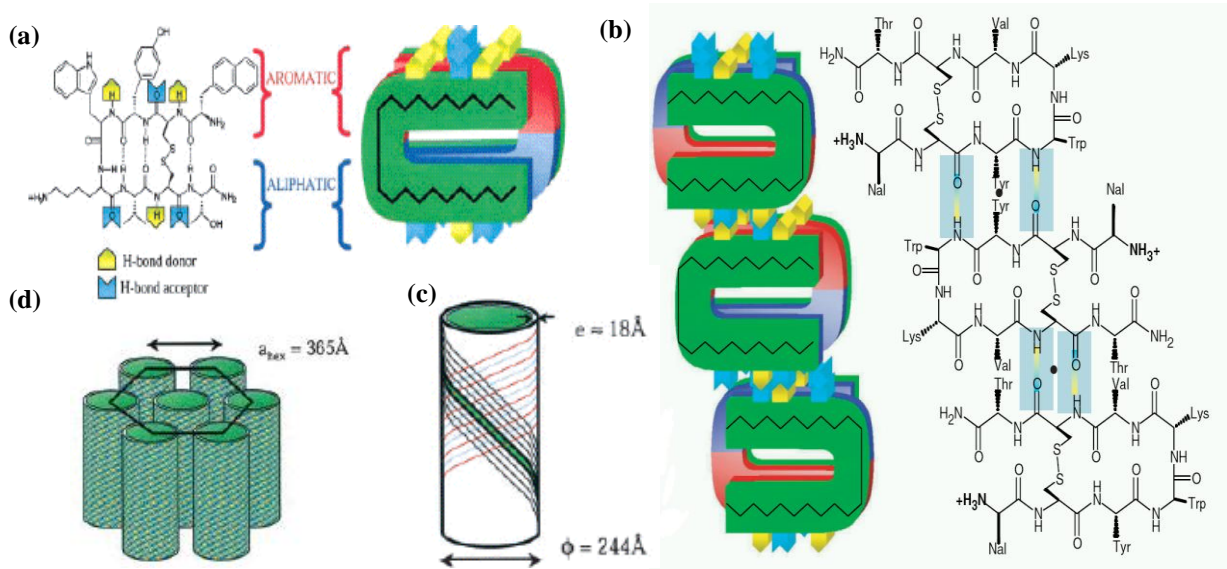


Fig. 5.6 Ordres hiérarchiques des nanotubes de lanréotide. (a) Dimère de lanréotide (b) Filaments assemblés par liaisons H (c) Nanotube constitué de filaments (d) Réseau hexagonal de nanotubes⁽¹²⁸⁾.

Les dimensions de ces tubes sont de 1,8 nm pour l'épaisseur d'une paroi, 24,4 nm pour le diamètre et 36,5 nm pour le paramètre de maille. La longueur est difficile à mesurer, à cause du faible diamètre du tube qui rend délicat le suivi d'un nanotube individuel. Toutefois, elle serait de l'ordre de plusieurs centaines de micromètres.

Le mécanisme d'auto-assemblage de ces nanotubes fait encore l'objet de recherches au sein des équipes de Maïté Paternostre et Franck Artzner.

I.5.2.4 Importance des caractéristiques structurales

L'importance des dérivés aromatiques et de la conformation du peptide pour l'auto-assemblage a été étudiée par deux stratégies complémentaires : la première utilise les spectroscopies Raman et de fluorescence, la seconde une approche par mutations dirigées.

L'environnement local des chaînes latérales est sondé dans le cas du lanréotide, en solution et assemblé en nanotubes, mais aussi pour une bibliothèque de dérivés présentant des

mutations⁽¹²⁹⁾. Ces dérivés fournissent aussi des données concernant l'importance des caractéristiques structurales du lanréotide⁽¹²⁷⁾.

Les séquences peptidiques dérivées sont les suivantes :

- D-Trp-D-Phe : H-D-Nal-cyclo[Cys-Tyr-**D-Phe**-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂
- D-Nal-D-Phe : H-**D-Phe**-cyclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂
- D-Nal-D-Ala : H-**D-Ala**-cyclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂
- Tyr-Phe : H-D-Nal-cyclo[Cys-**Phe**-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂
- Cys-Ala: H-D-Nal-cyclo[**Ala**-Tyr-D-Trp-Lys-Val-**Ala**]-Thr-NH₂
- Lys-D-Lys: H-D-Nal-cyclo[Cys-Tyr-D-Trp-**D-Lys**-Val-Cys]-Thr-NH₂

Le lanréotide étant de séquence: H-D-Nal-cyclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂

Il a aussi été étudié sous sa forme non cyclisée après traitement avec du β-mercaptoéthanol :

- Lan-β-m : H-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂

I.5.2.4.1 Auto-assemblage des séquences dérivées

Les peptides dérivés ont fait l'objet d'une étude visant à déterminer leurs propriétés d'auto-assemblage. Cette étude est proche de celle déjà effectuée sur le lanréotide, sans la réalisation d'un diagramme de phase complet⁽¹³⁰⁾.

Les deux séquences linéaires Lan-β-m et Cys-Ala s'assemblent en nanotubes polydisperses (5 % en masse) de diamètres supérieurs au lanréotide (100 et 200 nm en moyenne respectivement), en coexistence avec des rubans hélicoïdaux dans le cas de Lan-β-m. Les spectroscopies vibrationnelles Raman et infrarouge indiquent une conformation plane de la séquence dans l'assemblage, avec la disparition du pont disulfure (disparition du signal à 509 cm⁻¹) et sept carbonyles impliqués dans un feuillet β anti-parallèle.

Le peptide Lys-D-Lys, présentant également une conformation différente du lanréotide, s'auto-assemble en fibres à une concentration de 10 % en masse. La conformation du pont disulfure est sauvegardée et l'infrarouge indique une structuration lente incluant feuillet-β, coude et liaisons hydrogène aléatoires.

Les dérivés D-Nal-D-Phe et Tyr-Phe, deux des mutants aromatiques, sont solubles dans l'eau jusqu'à une concentration de 15 % en masse. La diffusion de rayons X indique de petits agrégats, alors qu'aucune structuration claire des carbonyles n'est détectable et que la conformation du pont disulfure est préservée. La microscopie électronique de cryo-fracture permet l'observation d'agrégats sphériques pour D-Nal-D-Phe alors qu'aucune structure n'est visible pour Tyr-Phe. Les agrégats formés par ce peptide pourraient être de très petite taille.

Enfin, la dernière séquence D-Trp-D-Phe s'assemble en nanotube avec un empilement très similaire à celui du lanréotide. Le diamètre obtenu de 17,6 nm est monodisperse.

Ces dérivés ont donc permis de mettre en évidence l'importance des chaînes latérales de la séquence peptidique pour sauvegarder ses propriétés d'auto-assemblage (Fig. 5.7).

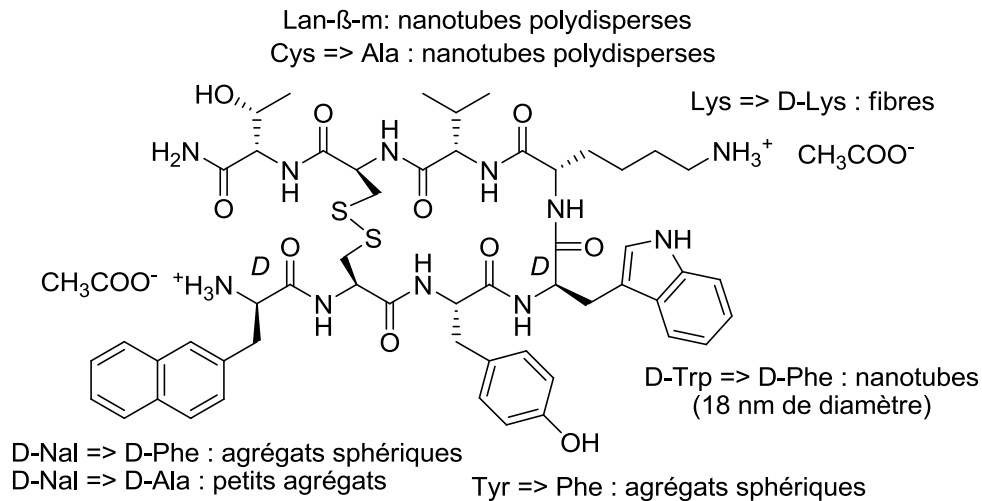


Fig. 5.7 Dérivés synthétisés et auto-assemblage éventuel⁽¹²⁹⁾.

I.5.2.4.2 Environnements des chaînes aromatiques

- Naphthalène

Pour les dérivés D-Trp-D-Phe et Cys-Ala, un décalage de la vibration Raman correspondant au cycle naphthyle est visible durant l'assemblage des nanostructures correspondantes. Ce décalage ne peut cependant pas être attribué à un changement de polarité de l'environnement puisque le signal Raman de ce cycle n'y est pas sensible⁽¹²⁹⁾.

La désymétrisation de cette bande d'absorption peut être utilisée pour évaluer la proportion de peptides non assemblés dans l'échantillon.

La fluorescence du naphthalène n'est visible que pour le dérivé D-Trp-D-Phe avec un rendement quantique très faible. Aucune interaction intermoléculaire entre naphthalènes n'est observable au sein des nanotubes assemblés de ce dérivé.

- Tyrosine

L'étude du doublet d'absorption Raman de la tyrosine a révélé un comportement inhabituel : à des concentrations correspondant à des assemblages, un des signaux du doublet est dédoublé. Cela pourrait être attribué à une hétérogénéité de l'environnement de la tyrosine au sein des nanotubes ainsi que des fibres de Lys-D-Lys ou bien à des interactions intermoléculaires inhabituelles.

- Tryptophane

La fonction NH du tryptophane présente un signal Raman très sensible à l'environnement et se trouve liée à une molécule d'eau après assemblage en tubes. Le maximum de fluorescence de ce cycle correspond à un environnement hydrophile.

L'étude de la dépolarisation du signal de fluorescence semble indiquer un transfert de fluorescence entre cycles tryptophane de peptides appartenant à des filaments voisins. Le décalage du signal Raman lors de l'auto-assemblage suggère une interaction faible avec une molécule d'eau.

Caractéristique structurale	Peptide en solution		Peptide auto-assemblé	
	Résultat expérimental	Attribution/interprétation	Résultat expérimental	Attribution/interprétation
Pont disulfure	Signal Raman à 505 cm ⁻¹	Conformation gauche-gauche-gauche	Pas de changement	
Naphthalène	Pas de fluorescence ou très faible pour D-Trp-D-Phe. Raman 1385 cm ⁻¹	Transfert de fluorescence	Décalage du signal Raman à 1382 cm ⁻¹ , non dépendant du milieu	Interaction intermoléculaire
Tyrosine	En Raman, doublet de Fermi à 830 et 850 cm ⁻¹ Rapport d'aire proche de 1,25	Accepteur et donneur de liaison H	Dédoublé d'un des signaux Raman	Environnement hétérogène et/ou interactions inhabituelles
Tryptophane	Fluorescence normale Signal Raman à 880 cm ⁻¹	Etat non lié à l'eau	Décalage du signal Raman à 877 cm ⁻¹	Etat faiblement lié à l'eau

Tableau 5.1 Récapitulatif des résultats expérimentaux pour les dérivés s'assemblant en tubes.

Cette étude confirme l'importance des paramètres étudiés. En effet, si la conformation en épingle à cheveux n'est pas nécessaire à l'auto-assemblage, le mode d'empilement est très différent et conduit à des rubans ou des nanotubes polydisperses.

Les chaînes latérales aromatiques participent toutes à l'assemblage: à l'intérieur du filament, les deux tyrosines de chaque dimère seraient en interaction. Entre filaments voisins, des recouvrements tyrosine-tyrosine, tyrosine-naphthalène et tryptophane-tryptophane pourraient avoir lieu.

Enfin, la stéréochimie de la lysine est aussi importante : elle pourrait interagir avec le tryptophane du filament voisin.

Un grand nombre d'informations est ainsi stocké au niveau moléculaire dans la séquence peptidique courte du lanréotide, lui permettant de s'assembler en une structure tubulaire hautement organisée de diamètre monodisperse.

Si la manipulation de ces informations semble être une tâche assez complexe, le quatrième acide aminé, soit le tryptophane, semble extrêmement intéressant dans le cadre d'une approche chimique. En effet, la spectroscopie indique que ce cycle pointe à l'extérieur de la paroi du tube, alors que l'étude par mutations indique qu'il pourrait contrôler le nombre de filaments assemblés et donc le diamètre du nanotube.

En plus de son activité biologique d'analogue de la somatostatine, permettant de guérir une maladie rare et très handicapante, cette molécule est donc, grâce à ses propriétés d'auto-assemblage, un outil très prometteur dans le cadre d'une approche *bottom-up* au sein des nanotechnologies.

Conclusion

Cette partie théorique a permis de constater la richesse des structures décrites dans la littérature, à la fois d'un point de vue mécanistique et d'un point de vue structurale.

Les nanotubes organiques peuvent ainsi être auto-assemblés à partir de molécules cycliques ou linéaires, aromatiques ou saturées, amphiphiles ou hydrophobes.

Parmi ces structures, les nanotubes de peptides sont spécialement intéressants grâce à leur biocompatibilité intrinsèque.

Certains types de nanotubes de peptides ont été largement étudiés et développés, et leur processus d'auto-assemblage, ainsi que les interactions qu'ils impliquent, sont dès lors mieux connus.

Une gamme remarquable d'applications a été développée à partir de ces structures, telles que des canaux transmembranaires, des nanofils et des nanoconduits.

Ces applications soulignent l'importance de maîtriser la taille de ces nano-objets et spécialement leur diamètre. Parmi les nanotubes de peptides, seuls ceux formés de séquences cycliques autorisent la maîtrise du diamètre et la monodispersité de cette dimension. Ce contrôle est toutefois possible sur une gamme étroite, de 0,5 à 1,3 nm en diamètre interne.

Parmi les nanotubes organiques, deux systèmes autorisent une gamme de diamètres étendue: il s'agit d'un mélange de lipides permettant d'obtenir, selon les proportions, des diamètres de 50 à 120 nm, et de molécules présentant deux têtes polaires de tailles différentes s'assemblant en tubes de diamètres internes compris entre 17,7 et 22,2 nm. Ces deux types de nanotubes souffrent cependant d'une polydispersité importante.

Ainsi, aucun système ne semble pouvoir respecter la double contrainte d'une gamme de diamètres importante et d'une monodispersité rigoureuse.

Le lanréotide, un peptide s'auto-assemblant en nanotubes de diamètres monodisperses, pourrait permettre d'aborder cette problématique. Les études précédentes indiquent en effet qu'un acide aminé de cette séquence pourrait maîtriser cette dimension.

Deuxième partie :
Synthèse d'une bibliothèque de peptides en vue
d'auto-assemblage

Introduction

La synthèse d'un analogue du lanréotide présentant une mutation sur la quatrième position de la séquence a conduit à l'assemblage de nanotubes monodisperses de diamètre inférieur.

Cette mutation concerne l'échange d'un cycle indole par un cycle phényle. La synthèse de dérivés présentant des cycles de différentes tailles à cette position pourrait donc permettre l'obtention de nanotubes de diamètres variés et monodisperses.

Ces nanotubes incluent un grand nombre d'interactions établies dans les protéines et peuvent être utilisés comme modèles pour l'étude de ces dernières. La synthèse d'analogues présentant des cycles fluorescents ou des atomes lourds permettrait d'obtenir de nouvelles données structurales et mécanistiques concernant ces effets.

Ce projet implique donc la création d'une bibliothèque de peptides, réalisée avec la collaboration d'une chercheuse post-doctorante, Mèlinda Ligeti. Ces peptides, avant caractérisation, doivent faire l'objet d'une étape d'échange d'ions afin de les obtenir dans le sel d'acétate désiré. Pour cela, trois stratégies vont être évaluées avec l'aide de Nicolas Fay, chercheur post-doctorant dans l'équipe de Maïté Paternostre.

C'est avec ce dernier, et sous la direction de Maïté Paternostre, que les propriétés d'auto-assemblage des analogues sont caractérisées, ainsi qu'avec l'équipe de Franck Artzner à Rennes. Des techniques de spectroscopie infrarouge, de microscopie électronique et de diffusion de rayons X aux petits angles seront requises.

Dans le but d'assembler des nanotubes de peptides en présence de nanotubes de carbone, des expériences incluant ces deux types de nanostructures sont envisagées avec des caractérisations par analyse thermo-gravimétrique et microscopie électronique.

Ces études nécessitent en outre la synthèse d'acides aminés non naturels. François Besselièvre a obtenu la N-Fmoc-fluorénylalanine durant son stage de Master. La synthèse d'une tyrosine fonctionnalisée sur le groupement hydroxyle par le 2-(2-méthoxyéthoxy)-éthoxy a également été réalisée. Enfin, l'obtention d'acides aminés β -triazolalanine, analogues de l'histidine, implique une étude méthodologique permettant de développer une approche plus rapide.

II.1. Synthèse d'une bibliothèque de peptides

L'étude des propriétés d'auto-assemblage et de l'activité pharmacologique des différents peptides nécessite au moins 200 mg de matériel pur sous forme acétate afin d'être concordant avec les études précédentes réalisées sur le lanréotide.

La procédure utilisée comporte la synthèse en elle-même de la molécule, une étape de purification ainsi qu'une étape d'échange d'ions afin d'obtenir le peptide sous la forme du sel désiré.

II.1.1 Synthèse

La bibliothèque de peptides a été synthétisée sur support solide en série Fmoc. Cela signifie que la séquence est assemblée sur une résine polymère à l'aide d'acides aminés protégés sur leur partie amine par un groupement 9-fluorénylméthoxycarbonyl (Fmoc), clivable en milieu basique. Les chaînes latérales seront donc protégées orthogonalement par des groupements *ter*-butyl (*t*-Bu) ou *ter*-butyloxycarbonyl (Boc), clivables en milieu acide.

La résine choisie est une Rink Amide MBHA basée sur un copolymère de polystyrène et de divinyle benzène. Le bras espaceur est un 4-(2',4'-diméthoxyphényl-fluorénylméthoxycarbonyl-aminométhyl)-phénoxyacétamido-norleucyl-(4-méthyl)-benzhydramine (Fig. 1.1). Cette résine se présente sous la forme de billes assez fragiles : l'agitation se fait donc par mouvement du récipient, plutôt que par agitation mécanique directe. Le récipient cylindrique est équipé d'un filtre afin d'autoriser une filtration rapide du milieu réactionnel (Fig. 1.2).

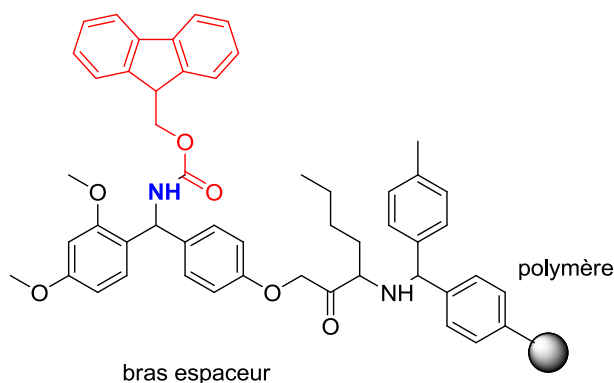


Fig. 1.1 Résine utilisée : Rink Amide MBHA.

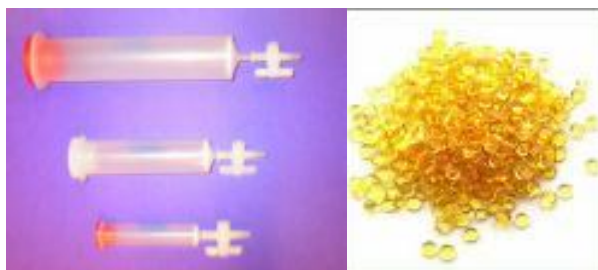


Fig. 1.2 À gauche, récipients utilisés pour travailler sur les billes de résine, à droite.

Le procédé de synthèse comporte quatre étapes critiques :

- La préparation de la résine
- L'assemblage de la séquence peptidique sur cette résine
- La cyclisation du peptide
- Le clivage du peptide de la résine

II.1.1.1 Préparation de la résine

La résine doit d'abord être « gonflée » afin de permettre l'accès aux sites réactifs (en bleu sur la figure 1.1) : le solvant va pénétrer à l'intérieur des billes entre les chaînes polymères de façon à les écarter les unes des autres. Ceci se fait par agitation de la résine dans le solvant de travail, la N-méthylpyrrolidinone (NMP), pendant une demi-heure. La résine agit comme une éponge et gagne beaucoup en volume (Fig. 1.4, première étape).

Afin d'utiliser la résine, le groupement protecteur Fmoc (en rouge sur la figure 1.1) du bras espaceur doit être clivé. On utilise une amine secondaire, la pipéridine, en solution dans la NMP. La formation de l'adduit pipéridine-dibenzofulvène peut être suivi par UV à 290 nm. La résine est alors prête pour l'opération suivante.

II.1.1.2 Assemblage de la séquence peptidique

Les acides aminés sont couplés les uns aux autres dans l'ordre souhaité au moyen d'une réaction de couplage. Le solvant reste la NMP, les réactifs utilisés sont l'hydroxybenzotriazole (HOBt) et le diisopropylecarbodiimide (DIC). La technique du double couplage est utilisée : le mélange réactionnel est filtré quand la réaction est environ à 50 % d'avancement, et des réactifs frais sont réintroduits, afin d'optimiser la vitesse de réaction et la pureté du produit final. La deuxième étape consiste à déprotéger le nouvel acide aminé introduit, afin de permettre un nouveau couplage. La pipéridine dans la NMP est encore utilisée. Entre ces réactions, la résine doit être lavée afin d'éliminer toute trace des sous produits de réaction (Fig. 1.4, deuxième étape).

Cette étape d'assemblage consiste donc en deux réactions : la réaction de couplage d'acides aminés et la réaction de déprotection du groupement Fmoc, à réaliser itérativement jusqu'à achèvement de la séquence peptidique.

II.1.1.3 Cyclisation du peptide

Une fois la séquence assemblée, le peptide doit être cyclisé par formation du pont disulfure (Fig. 1.4, troisième étape). Cette étape est réalisée sur la résine par un équivalent d'iode dissout dans la NMP. L'excès d'iode doit être retiré rapidement par lavage. Le mécanisme proposé passe par l'attaque d'un soufre sur l'iode. Le groupement trityle est alors éliminé de l'intermédiaire iodosulfonium pour donner l'intermédiaire neutre. Le produit final est alors formé par réaction de cet intermédiaire avec l'autre cystéine, sous sa forme protégée ou hypoiodothioite (R-S-I) (Fig. 1.3)⁽¹³¹⁾.

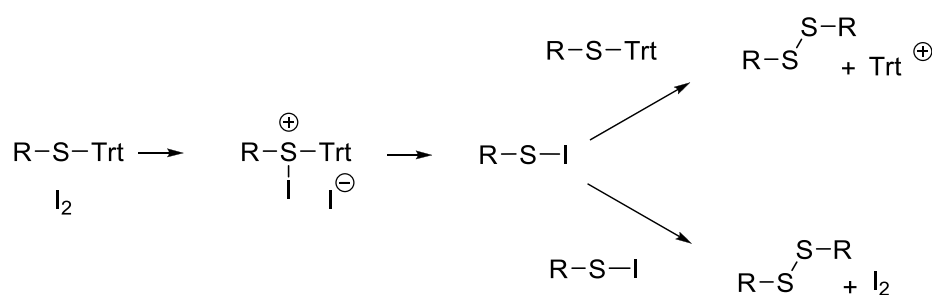


Fig. 1.3 Mécanisme supposé de formation du pont disulfure⁽¹³¹⁾.

II.1.1.4 Clivage

Dernière étape de la synthèse sur support solide, le clivage consiste tout d'abord en la préparation de la résine de façon à éliminer toute trace de solvant. Celle-ci est donc soumise à des lavages avec des solvants de températures d'ébullition décroissantes, comme méthanol, dichlorométhane puis éther diéthylique. Le volume de la résine décroît de façon importante et les dernières traces d'éther sont éliminées en plaçant la résine sous vide pendant plusieurs heures.

La résine peut être alors traitée par le mélange de clivage composé de 95 % d'acide trifluoroacétique (TFA), 3 % de triisopropylsilane (TIS) et 2 % d'eau.

Ces deux derniers réactifs servent à capter les cations formés par la déprotection des chaînes latérales (*ter*-butyle) de façon à éviter toute réaction parasite sur le peptide.

La résine est agitée dans un récipient en verre pendant 4 h à température ambiante. Cette fois-ci l'agitation se fait par barreau aimanté, plus sûre et plus pratique. La résine n'est pas récupérée après cette opération.

Le peptide se retrouve donc en phase liquide en solution dans le TFA. La lyophilisation dans de l'eau permet d'éliminer la plus grande partie de l'acide résiduel.

Après cette étape, le peptide se présente sous forme de sel de trifluoroacétate.

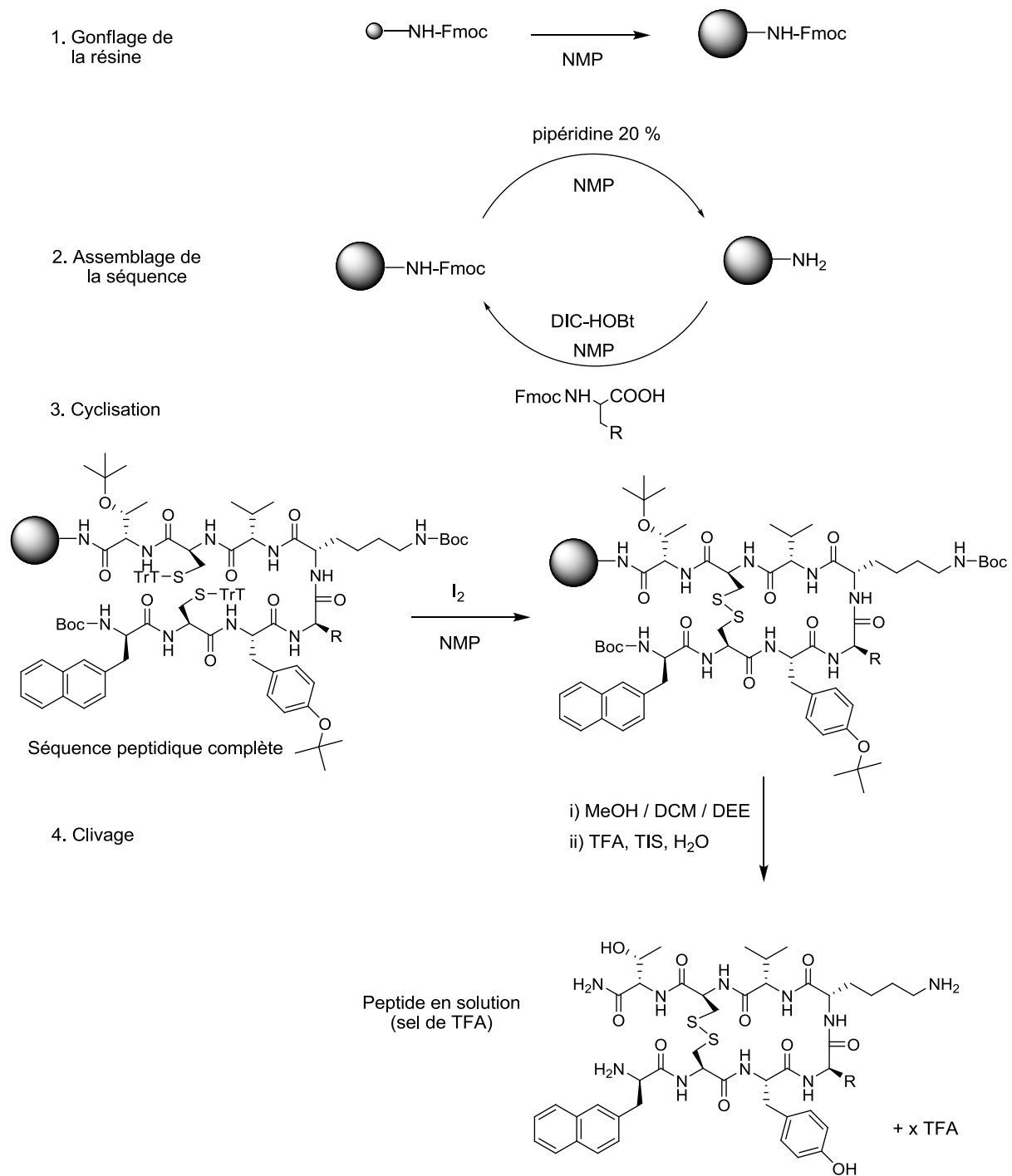


Fig. 1.4 Résumé de la synthèse de peptides.

II.1.2 Purification

La purification est réalisée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) préparative. La phase stationnaire est dite « inverse » car greffée avec des chaînes alkyles C₁₈. La phase mobile est constituée d'un mélange fixé (isocratique) d'eau et d'acétonitrile avec 0,1 % de TFA ou 1 % d'acide formique servant à neutraliser les silanols non greffés résiduels pouvant exister sur la phase stationnaire.

Si la synthèse s'est bien déroulée, le produit brut est plutôt pur, compte tenu du nombre d'étapes réalisées. Le contaminant principal est le TFA, et en chromatographie la pureté UV peut être supérieure à 95 %. Néanmoins, les conditions optimales de solubilité doivent être recherchées afin d'introduire une solution de peptide la plus concentrée possible à chaque injection et donc de réduire le temps de purification.

Le peptide pur est alors récupéré dans de grandes quantités de solvant à évaporer avant de procéder à une lyophilisation. Le peptide se présente en général sous forme de sel de trifluoroacétate devant être échangé par un acétate avant analyse physico-chimique. Cet échange d'ion a fait l'objet d'une analyse approfondie publiée dans le *Journal of Peptide Science* et est détaillé dans le chapitre suivante⁽¹³²⁾.

II.1.3 Bibliothèque de peptides

Les peptides synthétisés présentent tous une modification sur le quatrième acide aminé, un tryptophane pour le lanréotide. Seuls des acides aminés de configuration D ont été introduits à cette position, puisqu'il semble que cette configuration soit nécessaire à l'auto-assemblage⁽¹³⁰⁾. Ces composés proviennent essentiellement du commerce, à l'exception du Fmoc-β-(2-fluorènyl)-D-Alanine, synthétisé par François Besselièvre au laboratoire.

Le choix de ces acides aminés a été effectué dans le but de mesurer les effets de plusieurs paramètres sur l'organisation supramoléculaire du peptide, tel que la présence d'un cycle aromatique, sa taille, sa richesse électronique ainsi que la nature et la position des substituants.

Vingt-deux molécules ont été obtenues avec l'aide de Mèlinda Ligeti, auxquelles peuvent être ajoutés le lanréotide lui-même (**14**) ainsi que le dérivé portant une phénylalanine (**10**) synthétisés tout deux par IPSEN lors des études précédentes (Fig. 1.5).

Les rendements vont de 30 à 50 % pour la procédure totale et dépendent surtout de la purification.

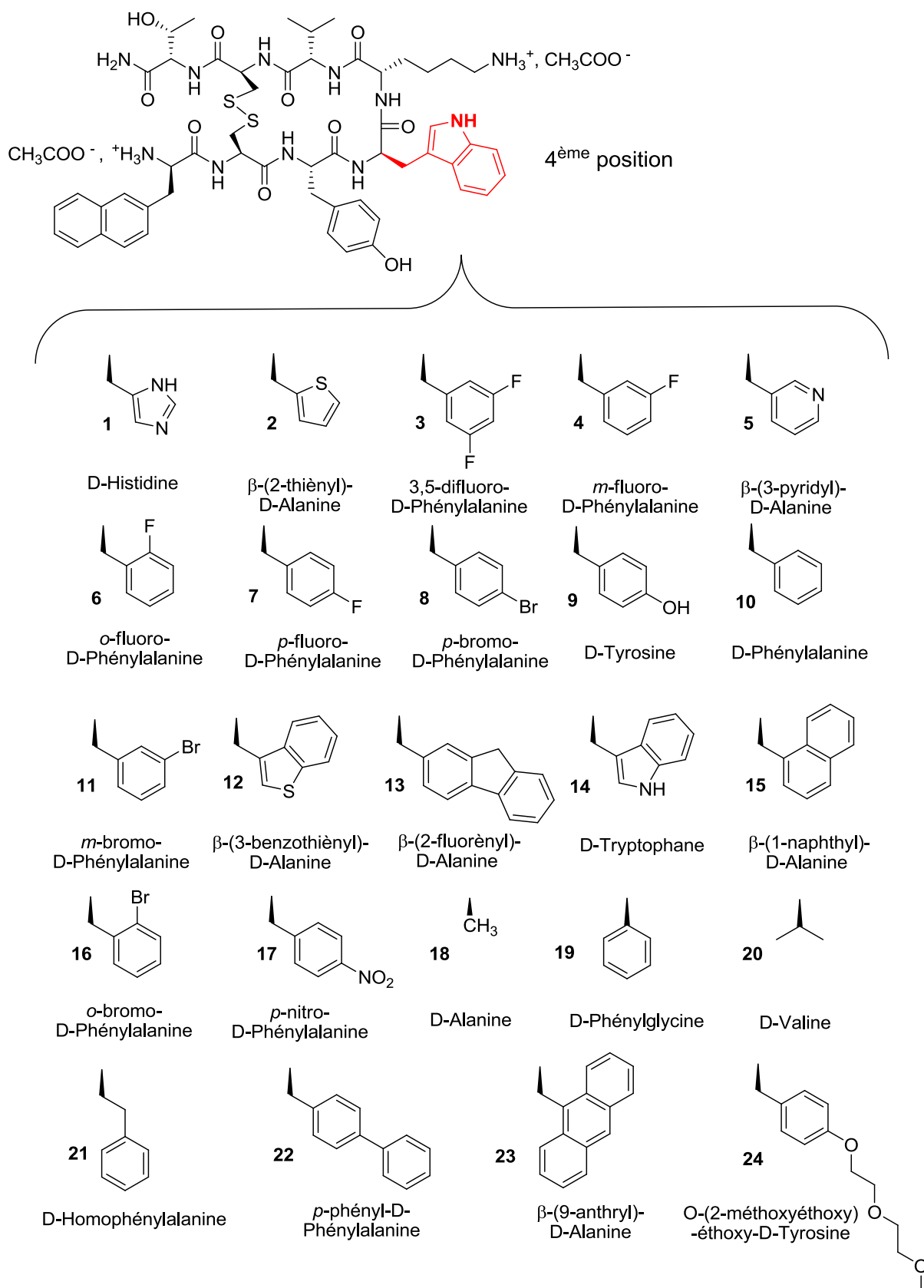


Fig. 1.5 : Liste des dérivés synthétisés.

II.2 Échange d'ions

Les peptides bruts cationiques sont obtenus sous forme de trifluoroacétate, puis purifiés en HPLC phase inverse, avec une phase mobile contenant du TFA ou de l'acide formique selon l'appareil utilisé.

Dans le cas d'une purification en TFA, il s'avère que le TFA en excès reste très lié au peptide malgré une température d'ébullition relativement faible (72,4 °C)⁽¹³³⁾. Dans le cas d'une purification en acide formique, l'échange trifluoroacétate/formiate n'a pas lieu ou de façon non significative.

La présence de TFA est considérée comme gênante. En effet, il a été prouvé qu'il peut modifier le comportement d'un peptide⁽¹³⁴⁾, sa conformation⁽¹³⁰⁾ ou encore affecter les études d'activités biologiques *in vivo*⁽¹³⁰⁾. Enfin, sa présence empêche la caractérisation physico-chimique par spectroscopie infrarouge des assemblages supramoléculaires puisque son signal se superpose à la bande amide I riche en informations sur la conformation du peptide⁽⁹⁴⁾.

Les études précédentes réalisées sur le lanréotide ont utilisé la forme commerciale de cette molécule en sel d'acétate, il était donc important d'obtenir des analogues possédant les mêmes contre-ions afin d'obtenir des résultats comparables.

La TFA en excès (hors contre-ions) peut être retiré par lyophilisation, l'échange du trifluoroacétate par un autre contre ion peut se faire par dilution dans un acide plus fort⁽¹³⁵⁾. Néanmoins, aucune procédure simple n'était décrite pour échanger un trifluoroacétate de peptide en acétate.

Nous avons donc testé trois procédures sur du trifluoroacétate de lanréotide : une HPLC en milieu acide acétique, une résine échangeuse d'ions et une technique de déprotonation et reprotonation des charges du peptide.

II.2.1 Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Les peptides bruts synthétisés en phase solide contiennent peu d'impuretés. Ils doivent cependant être purifiés avant leur utilisation dans des tests d'auto-assemblage ou d'activité biologique. En effet, les processus de reconnaissance impliqués sont complexes et peuvent se révéler sensibles à des contaminations.

Cette étape est réalisée dans notre synthèse par HPLC préparative en phase inverse, particulièrement efficace pour séparer des composés de formules très proches tels qu'un peptide et ses séquences délétères.

Cependant, le greffage de la phase inverse par les chaînes carbonées n'est pas total et des groupements silanol subsistent en surface. Ces groupements, quoique de pKa assez élevés (9,8 pour Si(OH)₄⁽¹³⁶⁾), peuvent être déprotonnés par des solutés basiques, ou interagir par liaison hydrogène. De plus, la neutralisation de charges sur les solutés est nécessaire pour permettre

leur résolution. Ainsi, le pH de la phase aqueuse est contrôlé par ajout d'acide, le TFA donnant de très bons résultats⁽¹³⁷⁾.

Compte tenu de la séparation des charges en solution et des nombreuses interactions existantes lors de l'élution, il est possible qu'un échange d'ions soit réalisable. Ainsi le trifluoroacétate de lanréotide a un temps de rétention de 7,75 min sur notre colonne avec un éluant eau-acétonitrile-acide acétique 80:20:1 %. À un débit de 20 ml min⁻¹, le peptide élué va donc être en présence de 196 équivalents d'acide acétique, ce qui peut être suffisant pour déplacer l'équilibre a priori défavorable en faveur de l'acide acétique (pKa = 4,8 contre environ 0 pour le TFA).

II.2.2 Résine échangeuse

Un second type de chromatographie utilisable pour purifier les peptides est la chromatographie ionique. Celle-ci sépare des composés ioniques selon leur affinité pour une phase ionique. La phase stationnaire, appelée résine échangeuse, doit être adaptée à la nature des charges à séparer. On distingue donc les résines échangeuses de cations, portant donc des groupements anioniques comme des sulfates, des résines échangeuses d'anions, dont la surface peut être recouverte de fonctions ammonium quaternaire. De même, chaque résine peut être échangeuse d'ions forts ou d'ions faibles selon le caractère de l'ion à échanger. Enfin, le dernier paramètre à prendre en compte avant de choisir une résine est son degré de polymérisation croisée. Dans le cas d'une résine à base de polystyrène, très utilisée, un pourcentage de divinylbenzène (DVB) va être introduit afin de joindre les chaînes polymères linéaires entre elles et de conférer une certaine rigidité à la résine. La taille des pores de la résine va décroître avec le degré de polymérisation croisée ; ce dernier doit donc être choisi avec soin afin d'éviter tout effet d'exclusion stérique.

Cependant, la résine échangeuse peut aussi être utilisée en paquet (*batch*) pour extraire un ion d'une solution, et c'est la procédure choisie pour tenter d'échanger le trifluoroacétate de nos peptides. La résine utilisée est de type échangeuse d'anions forts très réticulée (8 % de DVB), à base d'ammonium quaternaire et portant les contre-ions acétate désirés.

II.2.3 Déprotonation-reprotonation des charges

Cette technique a été étudiée par Nicolas Fay, travaillant au Service de Bioénergétique, Biologie Structurale et Mécanismes (SB²SM) du CEA Saclay. Le lanréotide ainsi que tous les dérivés synthétisés sont des peptides courts portant uniquement deux charges positives à pH neutre. Ces charges peuvent être facilement neutralisées par ajout d'une solution de base, ce qui a pour effet de rendre le peptide insoluble.

Le précipité peut donc être séparé de la solution contenant les ions trifluoroacétate par filtration, dialyse ou centrifugation. Le peptide insoluble peut alors être redissout dans une solution d'acide contenant le contre-ion approprié. Dans notre cas nous avons choisi l'acide

acétique dilué, ainsi que la centrifugation comme technique de séparation, à cause de sa rapidité et des rendements importants qu'elle permet d'obtenir.

II.2.4 Techniques de caractérisation

Les paramètres importants pour le suivi de cet échange sont : la quantité de TFA, la quantité d'acétate, ainsi que le taux de récupération du peptide. L'intégrité des peptides après échange est aussi vérifiée. Les deux premiers paramètres sont, pour des raisons de simplicité, exprimés en rapport molaire trifluoroacétate/peptide et acétate/peptide.

Les techniques choisies pour suivre l'évolution de ces paramètres sont la RMN du fluor pour le rapport trifluoroacétate/peptide et du proton pour le rapport acétate/peptide. Ces deux techniques sont rendues quantitatives par ajout d'un étalon interne, le trifluoroéthanol pour le fluor et l'acide dichloroacétique pour le proton. Le choix de cet acide s'explique par son unique signal à 6 ppm dans l'eau lourde, zone dépourvue d'autres signaux dans le cas du lanréotide. Ces techniques ont l'avantage de donner des résultats facilement quantifiables par intégration de la surface des pics correspondants aux molécules étudiées et présentent une sensibilité satisfaisante.

L'échange du contre-ion trifluoroacétate des dérivés peptidiques devant permettre l'analyse infrarouge des assemblages supramoléculaires, l'ATR-IR a aussi été choisie pour corroborer les résultats de la RMN. Nicolas Fay a observé les deux bandes d'absorption du trifluoroacétate situées à 1147 et 1202 cm^{-1} .

L'intégrité des peptides a été contrôlée par HPLC-MS ainsi que par RMN du proton. Aucune dégradation n'a été observée.

II.2.5 Résultats et discussion

La RMN du fluor, réalisée avec du trifluoroéthanol comme étalon interne, a révélé une forte proportion de trifluoroacétate dans l'échantillon issu de l'HPLC, une teneur très faible pour celui traité par une résine échangeuse et une absence quasi-totale pour la technique de déprotonation/reprotonation. (Fig. 2.1)

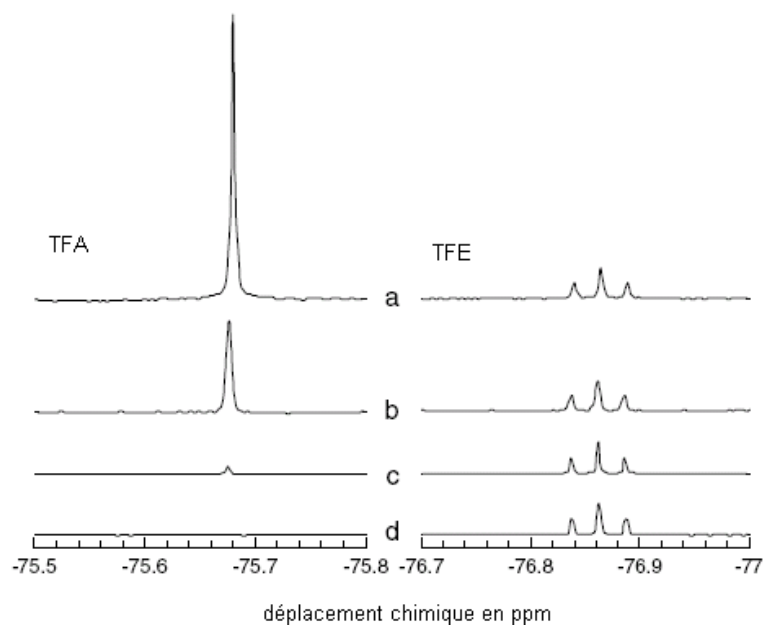


Fig. 2.1 Analyse en RMN du fluor du TFA/trifluoroacétate de lanréotide (a) Trifluoroacétate de lanréotide (b) Après purification HPLC en présence d'acide acétique (c) Après échange d'ions sur résine et (d) Après déprotonation/reprotonation⁽¹³²⁾.

Après calcul, on observe une réduction supérieure à un facteur 30 pour l'échange sur résine échangeuse et 100 pour la déprotonation-reprotonation. Les rapports suivis sont reportés dans le tableau 2.1.

Technique d'échange utilisée	Rapport molaire trifluoroacétate/peptide	Rapport molaire acétate/peptide	Taux de récupération du peptide (%)
Peptide initial	4,5:1	0	
HPLC	1,6:1	4:1	~ 80
Résine échangeuse	0,14:1	5,3:1	> 95
Déprotonation/reprotonation	< 0,05:1	2:1	> 95

Tableau 2.1 : Résultats des analyses des peptides après les techniques étudiées

Ces expériences nous ont permis de démontrer que l'HPLC ne permet qu'un échange partiel du trifluoroacétate par un contre-ion acétate dans les conditions étudiées. En effet, l'acide acétique n'est pas assez acide pour reprotoner le trifluoroacétate qui reste donc lié au peptide⁽¹³³⁾. Un échange partiel a cependant lieu compte tenu de la proportion importante d'acide acétique utilisé pour l'élution.

La résine échangeuse ainsi que la déprotonation/reprotonation permet la réalisation d'un échange de contre-ions quasi-total dans notre cas. Cependant, la résine échangeuse conduit à un léger excès d'acétate qui peut se révéler gênant et devra dans ce cas être éliminé par dialyse. Enfin, le taux de récupération du peptide, supérieur à 95 % dans les deux cas, est excellent : ces procédures d'échange ne nuisent que très faiblement au rendement global de la synthèse peptidique.

Ces deux techniques sont complémentaires puisque la résine échangeuse impose de travailler en milieu modérément acide (pH = 3), alors que la déprotonation/reprotonation soumet le peptide à un milieu basique (pH = 12). Dans un cadre plus général, l'une ou l'autre de ces techniques peut être choisie pour réaliser l'élimination du TFA. Toutefois, pour de petites quantités de peptides (dizaines de microgramme), la résine échangeuse pourrait être plus adaptée.

De plus, le choix du contre-ion est possible, puisque la résine échangeuse peut être préparée avec un anion au choix. De même, l'acide utilisé pour la reprotonation des charges dans la seconde technique permet le choix du contre-ion du peptide. Cette dernière technique pourrait donc être plus adaptée pour des recherches impliquant un grand nombre de contre-ions.

Cette étude a donc permis de démontrer que l'HPLC n'est pas une technique convenable pour l'échange d'ions de nos dérivés peptidiques cationiques. Elle révèle cependant l'efficacité d'une résine échangeuse d'ions ainsi que la neutralisation des charges pour accomplir le remplacement des contre-ions trifluoroacétate par des contre-ions acétate.

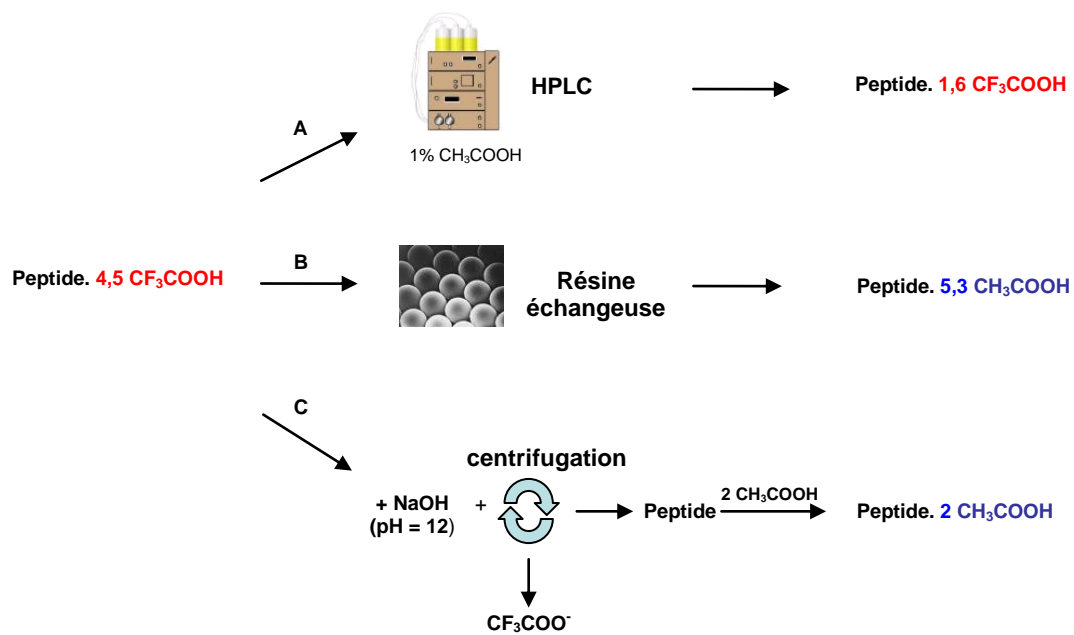


Fig. 2.2 Résumé de l'étude (a) Expérience d'échange en HPLC (b) Expérience d'échange par résine échangeuse c) Expérience d'échange par déprotonation des charges puis reprotonation.

Dans le cadre de la synthèse de dérivés du lanréotide, la procédure impliquant la résine échangeuse est utilisée.

II.3 Caractérisation des propriétés d'auto-assemblage des dérivés peptidiques

Après les étapes de synthèse, de purification et d'échange d'ions, les peptides obtenus font l'objet d'une étude de leurs propriétés d'auto-assemblage. Ce travail est réalisé avec Nicolas Fay et Maïté Paternostre du CEA Saclay, ainsi qu'avec l'équipe de Frank Artzner du CNRS à Rennes.

La procédure utilisée est la suivante :

- 1 Mise en solution des peptides et analyse macroscopique
- 2 Analyses spectroscopiques et microscopiques des structures formées.
- 3 Analyses par diffraction de rayons X aux petits angles (SAXS)

La procédure est menée à terme pour l'intégralité des dérivés.

II.3.1 Mise en solution des peptides

La première étape de la caractérisation des dérivés est la réalisation d'une gamme de concentrations de 3 à 15 % en masse de peptide dans l'eau. Une gélification de la solution indique la présence de structures auto-assemblées qui peuvent être des nanotubes mais aussi des fibres ou d'autres structures auto-organisées. Toutefois, des structures en faibles quantités ne modifient pas l'aspect de la solution.

II.3.2 Analyses spectroscopiques et microscopiques des structures formées

Cette étape a pour but de vérifier la présence de structures auto-assemblées, de caractériser leur auto-assemblage et de les visualiser par microscopie.

La spectroscopie infrarouge permet d'élucider l'empilement, puisque la bande amide I révèle le nombre de fonctions carbonyle impliquées dans chaque type de structure secondaire (cf première partie, chapitre 5). La technique par réflexion totale atténuée (ATR-FTIR) utilise un cristal sur lequel est déposé l'échantillon, solide ou liquide. La lumière infrarouge est guidée à travers ce cristal selon un angle lui permettant de se réfléchir à la surface en contact avec l'échantillon.

Cette technique est non destructive et autorise l'étude de solutions, de gels ou de colloïdes; seules les structures se trouvant sur la surface du cristal sont analysées.

Les structures assemblées sont ensuite visualisées par microscopie électronique par transmission (MET). Cette technique très puissante a été développée pour des applications matériaux et permet des grossissements supérieurs à 500 000 fois. L'échantillon est soumis à un faisceau d'électrons. La visualisation du faisceau transmis se fait soit par un écran photoluminescent, soit par une caméra CCD. Le contraste est obtenu par absorption des électrons ou par leur diffraction dans un réseau cristallin. Toutefois, les échantillons

biologiques composés d'atomes légers interagissent assez peu avec les électrons et l'intérieur du microscope doit être placé sous vide poussé, ce qui interdit l'introduction de liquide. La préparation d'une grille de microscopie à partir d'un échantillon liquide est réalisée de la manière suivante :

Le peptide en solution est d'abord déposé sur la grille fabriquée en cuivre et recouverte d'un film de carbone. Après dépôt du matériel, l'excès de liquide est éliminé. De la même façon, la solution de colorant, dans notre cas de l'acétate d'uranyle, est déposée sur la grille, l'excès est éliminé et la grille est séchée à l'air libre. Elle peut alors être introduite dans le microscope (Fig. 3.1).

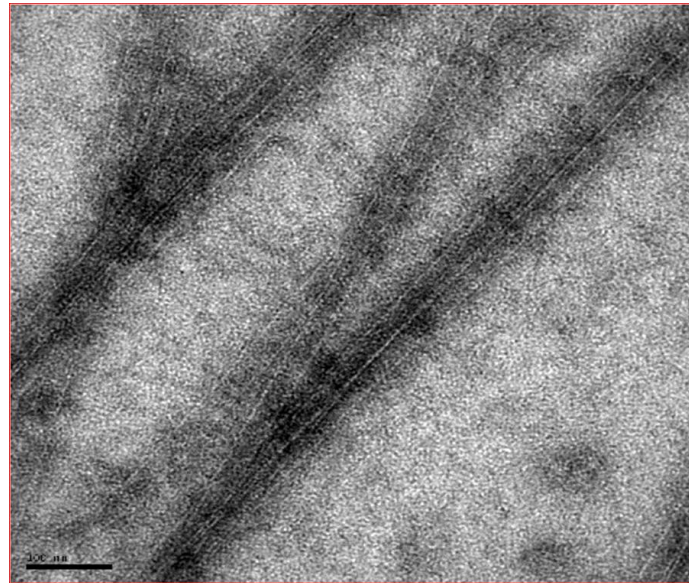


Fig. 3.1 Micrographie électronique de nanotubes de lanréotides colorés par de l'acétate d'uranyle (image par Maïté Paternostre).

Les micrographies permettent de visualiser les structures présentes ainsi que d'obtenir une mesure approximative de leurs dimensions. Il est néanmoins impossible d'en tirer des conclusions définitives sur la taille ou la morphologie de ces structures, puisque les objets sont souvent déformés par le séchage et la coloration. De plus, les artefacts sont fréquents, et il est prudent de vérifier des résultats inattendus par une nouvelle grille.

II.3.3 Analyses par diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS)

C'est cette dernière analyse qui va permettre la mesure précise de la taille des objets étudiés. Les échantillons, liquides ou gels, sont introduits dans un capillaire et soumis à un flux monochromatique de rayons X. Le motif de diffusion est exprimé sous forme de courbes : l'intensité du rayon diffracté est l'ordonnée et le vecteur de diffusion $q = 4\pi \cdot \sin(\theta) / \lambda$ l'abscisse (Fig. 3.2).

Les résultats obtenus doivent faire l'objet d'une corrélation avec un modèle théorique proche des structures attendues. Dans notre cas, les motifs obtenus présentent un fort degré de corrélation avec le modèle « colonne creuse infinie »⁽¹²⁸⁾, ce qui permet d'en extraire les informations sur l'épaisseur et le diamètre des nanotubes.

Cette technique est tout à fait adaptée à l'étude de nos objets biphasiques, en fait des cristaux liquides. Elle permet des mesures précises des distances caractéristiques mais ne permet pas d'être sûr de la morphologie, puisque plusieurs modèles sont théoriquement corrélables.

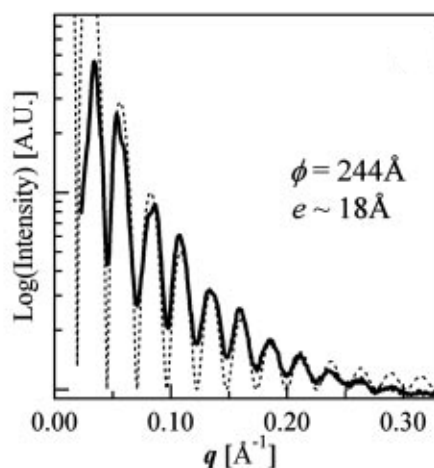


Fig. 3.2. Courbe de SAXS du lanréotide. En pointillé, courbe théorique pour un modèle « colonne creuse infinie »⁽¹²⁸⁾.

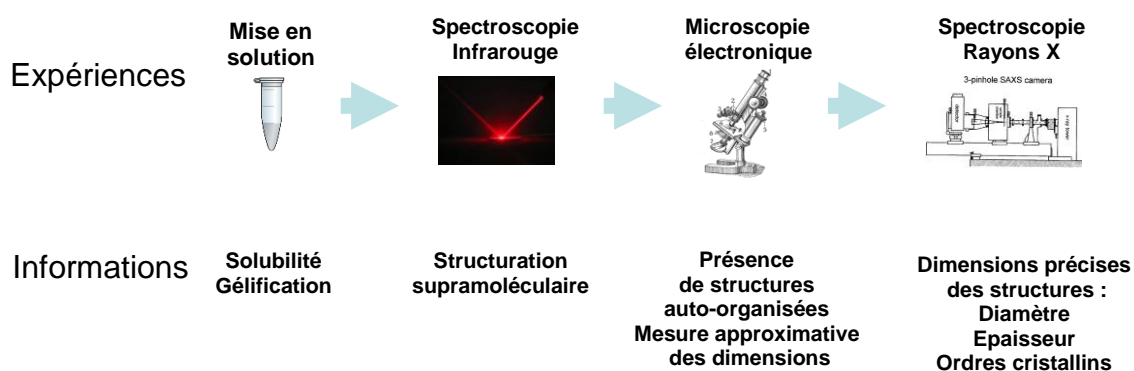


Fig. 3.3 Résumé des expériences de caractérisation.

II.3.4 Résultats et discussion

Sur les vingt-deux molécules synthétisées, certaines permettent d'obtenir des nanotubes monodisperses, alors que d'autres s'assemblent en fibres ou nanotubes polydisperses. Enfin, quelques unes sont solubles, ou au contraire insolubles.

II.3.4.1 Peptides s'auto-assemblant en nanotubes monodisperses

Les dérivés s'auto-assemblant en nanotubes de peptides sont au nombre de quinze, y compris le lanréotide et le dérivé phenylalanine, synthétisés par IPSEN (Fig. 3.5). Les chaînes latérales en position 4, c'est-à-dire à la place du tryptophane, sont toujours des cycles aromatiques, substitués ou non.

Ces cycles, constitués de cinq atomes (**1** et **2**) jusqu'au bicyclic à dix atomes (**15**), peuvent être hétéro-aromatiques (**4** et **12**) ou non, et peuvent être substitués en différentes positions par des groupements halogènes (**5**, **6**, **7**, **8...**), ou hydroxyles (**9**), sans changement du mode d'empilement. Une gamme de diamètres de 10 à 35 nm est obtenue (Fig. 3.6).

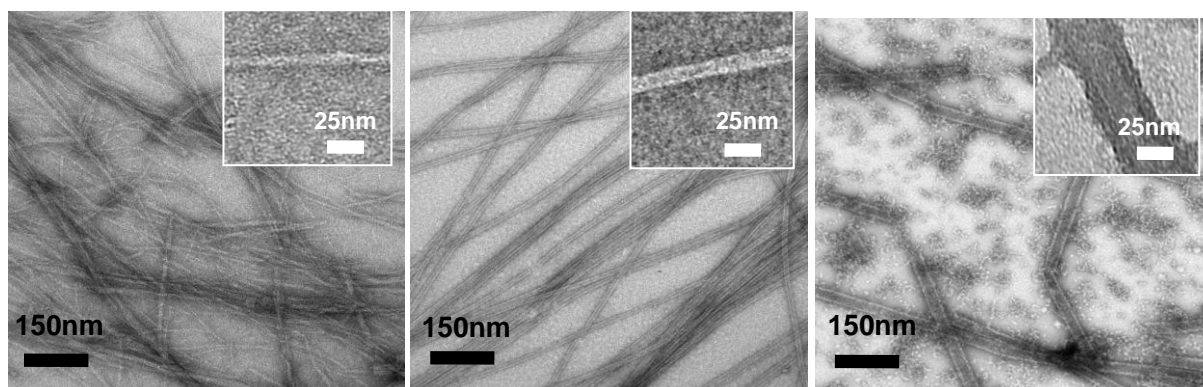


Figure 3.5 Micrographies électroniques de nanotubes assemblés à partir de trois dérivés différents. À gauche, 4-histidine **1** ($d = 9,8$ nm), au centre 4-thiénylalanine **2** ($d = 11,4$ nm), et à droite, 4-naphthylalanine **15** ($d = 35,4$ nm) (images par Nicolas Fay).

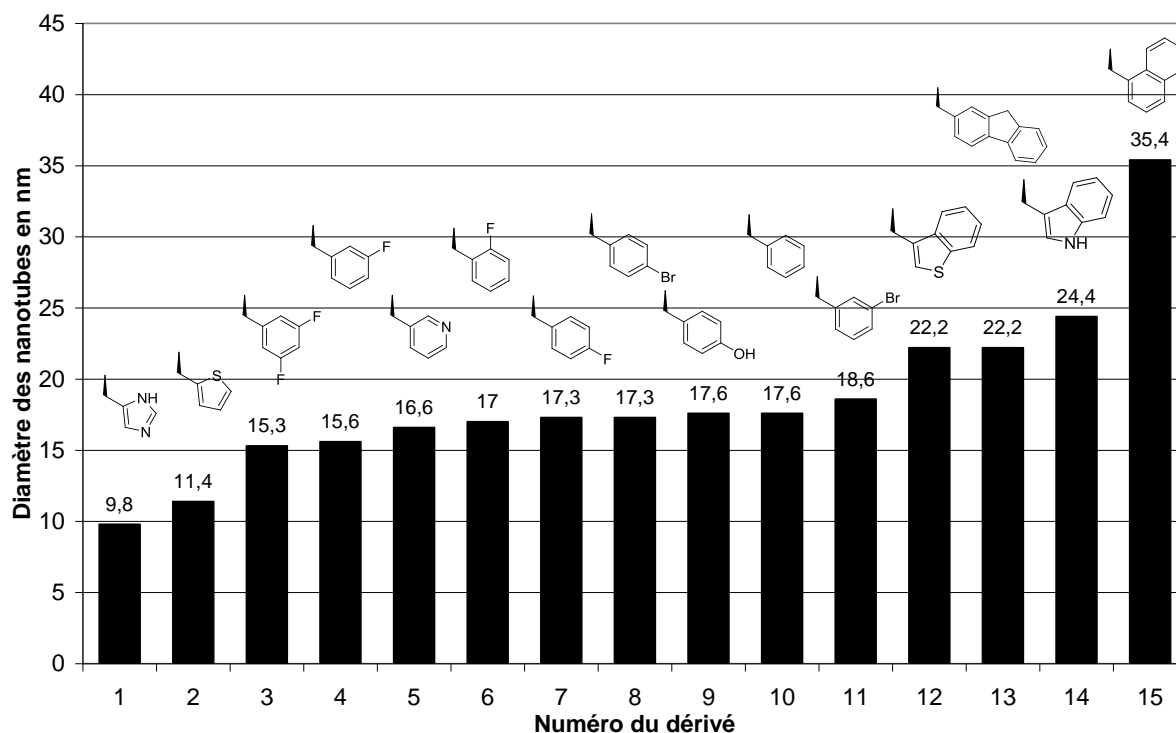


Fig. 3.6 Peptides s'assemblent en nanotubes de peptides monodisperses (diamètres obtenus par SAXS)

II.3.4.2 Peptides ne s'assemblant pas en nanotubes monodisperses

Huit dérivés synthétisés ne s'assemblent pas en nanotubes monodisperses (Fig. 3.7). Le dérivé **16** portant une chaîne *meta*-bromophénylalanine s'assemble en nanotubes de diamètres polydisperses. Les dérivés **17** à **19** ayant respectivement une *para*-nitrophénylalanine, une alanine et une phénylglycine en position 4, permettent d'obtenir des fibres auto-assemblées.

Les dérivés dont le tryptophane est remplacé par une valine **20** et une homophénylalanine **21** sont solubles aux concentrations étudiées. Enfin, les dérivés **22** et **23** sont des dérivés à polycycle et sont insolubles (3 à 15 %). Le dérivé **24** 4-O-(2-(2-méthoxyéthoxy)éthoxy)-D-tyrosine est en cours de caractérisation au laboratoire.

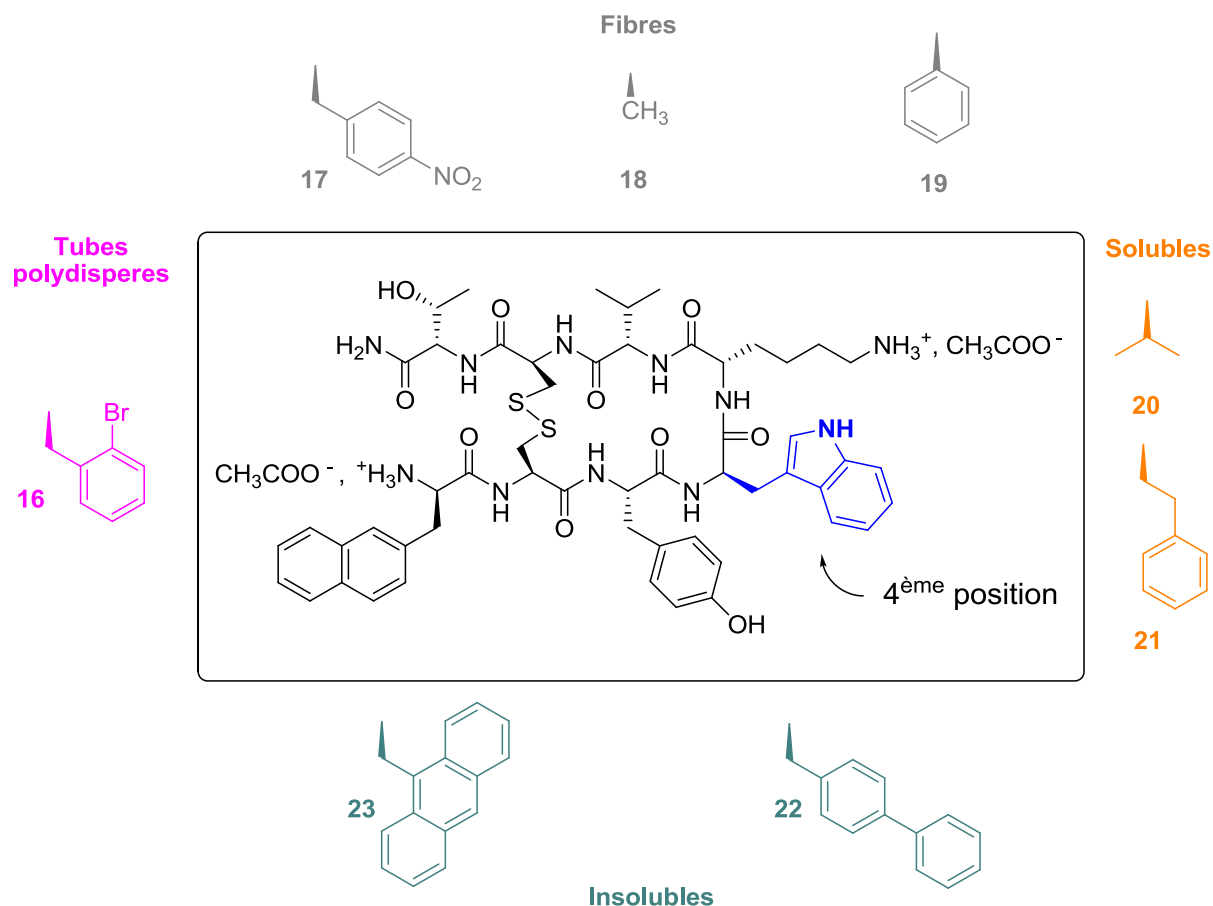


Fig. 3.7 Dérivés ne s'assemblant pas en nanotubes monodisperses.

L'approche chimique réalisée permet donc de contrôler le diamètre des nanotubes auto-assemblés. Ce système est sans précédent de part la large gamme de diamètres obtenue (10 à 35 nm) et la monodispersité stricte de cette dimension. De plus, un grand nombre de tailles intermédiaires a été démontré. Ces résultats constituent donc une avancée importante par rapport aux précédentes études concernant les nanotubes organiques (voir première partie).

A la lumière de ces résultats, les observations qui peuvent être faites sont les suivantes :

- La chaîne latérale introduite en quatrième position doit être de type aromatique, et de type alanine, c'est-à-dire avec un seul méthylène entre le squelette peptidique et le cycle aromatique.
- La taille du cycle règle l'ordre de grandeur du diamètre : un petit cycle donne toujours un petit diamètre alors qu'un polycycle de taille supérieure donne toujours un grand diamètre.
- La nature et la position des substituants semblent pouvoir régler le diamètre plus finement : passer d'un fluor (7) à un hydroxyle (9) permet de gagner 0,3 nm, passer

d'un substituant en position *ortho* (**6**) à un substituant en position *para* (**7**) 0,3 nm encore, dans le cas du fluor. Les deux effets semblent se combiner dans le cas du brome où l'augmentation de diamètre entre la position *para* (**8**) et *meta* (**11**) est de 1,3 nm.

- la balance hydrophile/hydrophobe du peptide est une propriété clé afin de conserver l'auto-assemblage : les chaînes polycycles aromatiques très hydrophobes conduisent à des dérivés non solubles dans l'eau (**22-23**).

Des cycles pauvres en électrons tels que l'imidazole (peptide **1**) et la pyridine (**5**) permettent l'obtention de diamètres inférieurs à leurs équivalents plus riches tels que le thiényl (**2**) et le phényle (**10**) respectivement. On peut donc supposer que la richesse électronique du cycle a un effet significatif sur le diamètre obtenu. Cependant, cette hypothèse doit être vérifiée par des expériences permettant d'éviter la présence de groupes donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogène sur le cycle.

Si l'espace occupé dans l'assemblage par le tryptophane semble pouvoir accueillir des cycles importants, la formation de nanotubes pourrait être empêchée par une géométrie inadéquate du cycle, ainsi que par une trop grande hydrophobicité du dérivé. Il est donc possible que des diamètres de tubes supérieurs puissent être obtenus par des polycycles substitués de géométrie adaptée.

Les recherches se poursuivent concernant l'exploitation de ces résultats d'un point de vue structural et mécanistique.

II.4 Etude de la formation de composés mixtes nanotubes de carbone-nanotubes de peptides

La problématique du positionnement spatiale représente également un problème important des nanotechnologies, puisque les structures utilisées ne sont pas toujours directement manipulables. Cette problématique est étudiée également pour des structures inorganiques. Ainsi, l'équipe de Martine Mayne-L'Hermitte de la Direction des Sciences de la Matière du CEA Saclay étudie la croissance de nanotubes de carbone multiparois, alignés par une méthode de déposition chimique catalytique en phase vapeur (CCVD)⁽¹³⁸⁾. Le but de ce projet commun a été d'étudier l'auto-association de lanréotide et de dérivés en présence de nanotubes de carbone afin de réaliser de nouveaux matériaux fortement organisés. Le montage expérimental de la synthèse de ces nanotubes de carbone alignés est composé d'un générateur d'aérosol, d'un réacteur en quartz placé dans un four et d'un système de récupération des gaz d'échappement (Fig. 4.1)⁽¹³⁹⁾.

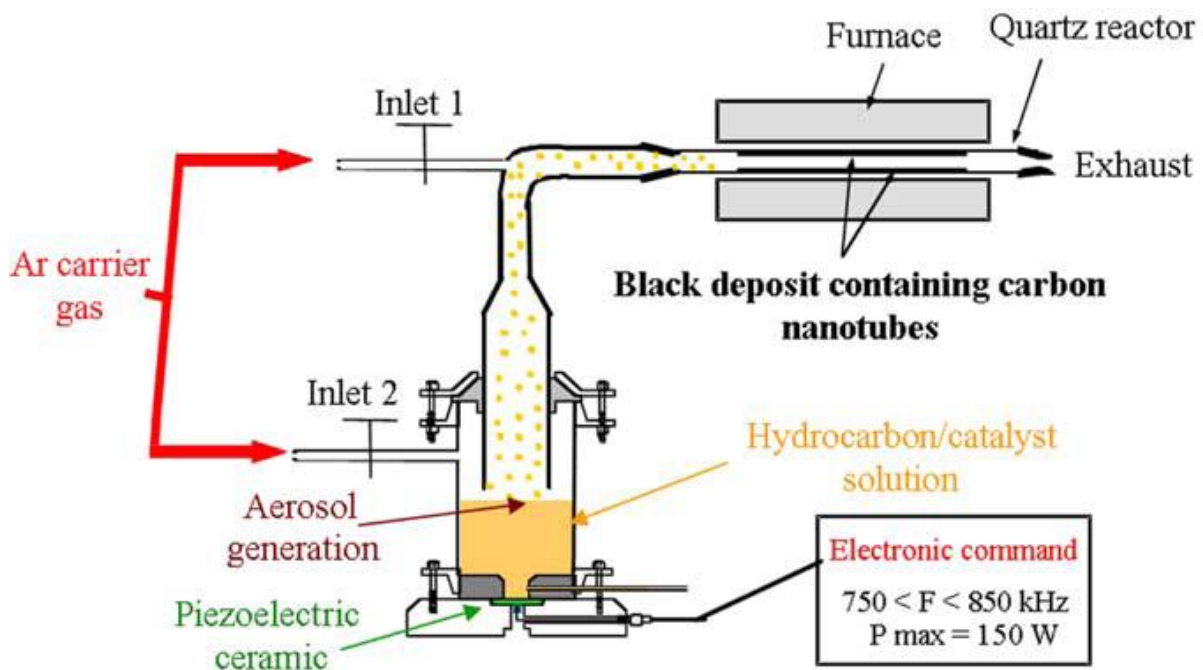


Fig. 4.1 Schéma de principe du réacteur de CCVD⁽¹³⁹⁾.

La solution mère composée d'une source de carbone tels que le toluène ou le cyclohexane, ainsi qu'une source de catalyseur comme le ferrocène, va être transformée en aérosol grâce à un bain à ultra-sons relié à une arrivée d'argon. Cet aérosol est alors transporté jusqu'au réacteur, un tube de quartz placé dans le four. Le four présente un gradient de température et la pyrolyse intervient en son milieu, entre 800 et 850 °C. À la fin de la synthèse, le chauffage est stoppé et, après refroidissement, le réacteur cylindrique est retiré. Les tapis de nanotubes de carbone alignés peuvent alors être récupérés (Fig. 4.2).

Malgré un aspect assez dense, le tapis de nanotubes de carbone présente des espaces significatifs entre chaque tube, de l'ordre de leur diamètre (25 nm)⁽¹⁴⁰⁾. Ainsi l'auto-assemblage ou l'introduction de tubes de peptides pourrait donner naissance à un matériau original fortement organisé.

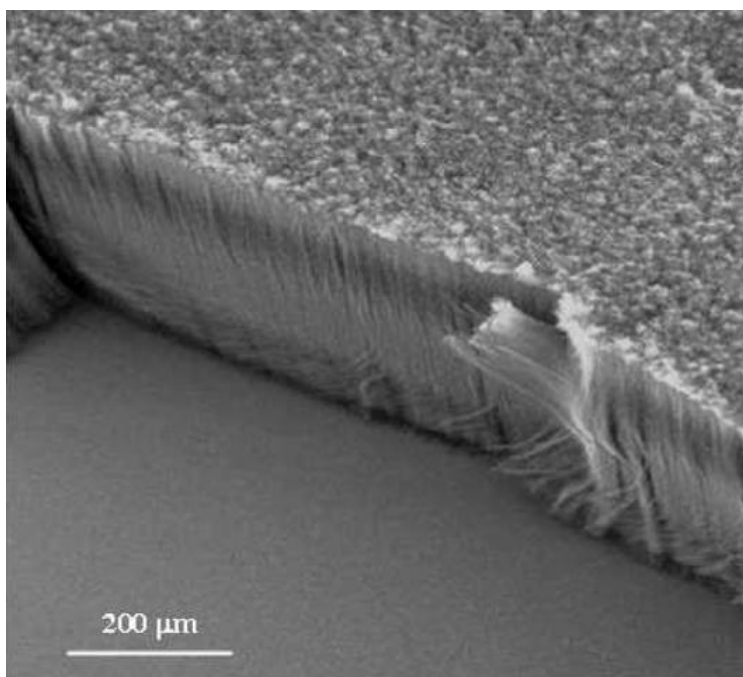


Fig. 4.2 Image MEB d'un tapis de nanotubes de carbone alignés⁽¹⁴⁰⁾.

II.4.1 Expériences avec des nanotubes de carbones individuels

La première étape a été d'étudier d'éventuelles interactions du lanréotide et de dérivés synthétisés au cours de cette thèse avec les nanotubes de carbone.

Une première expérience a consisté en l'introduction de nanotubes de carbone multiparois commerciaux (diamètre moyen 25 nm) dans des solutions de lanréotide **14** (formant des nanotubes), de 4-phénylglycine **19** (s'auto-assemblant en fibre) et de 4-anthryl **23** (insoluble dans l'eau).

Après passage de quelques minutes dans un bain à ultrasons, les trois peptides ont permis l'obtention de suspensions stables de nanotubes de carbone.



Fig. 4.3 Nanotubes de carbone dans l'eau après sonication. À gauche sans lanréotide, à droite avec lanréotide, après 24h.

Afin d'étudier le complexe entre le lanréotide et les nanotubes de carbone, il est nécessaire de séparer ces structures de la solution. Cela peut se faire par filtration sur une membrane Millipore de faible porosité, ou alors par dialyse en utilisant des boudins de masse de coupure très grande, retenant uniquement les nanotubes.

Après cette opération de séparation, il est possible de remettre en suspension les nanotubes de carbone par ajout d'eau et sonication. Le lanréotide adsorbé en surface n'est donc pas éliminé par l'opération de séparation.

Les poudres de nanotubes de carbone peuvent alors être caractérisées après lyophilisation. Deux techniques ont été utilisées : la microscopie électronique à transmission (MET) afin d'essayer de caractériser la surface, et l'analyse thermo-gravimétrique (ATG) afin de tenter de quantifier la proportion de lanréotide adsorbé sur les nanotubes.

II.4.1.1 Microscopie électronique à transmission

L'échantillon de nanotubes de carbone préalablement préparé peut être mis en suspension dans un petit volume d'eau et déposé sur la grille de microscopie de la même façon qu'un gel de peptide, ou bien être déposé directement sous forme solide. Les grilles de microscopie utilisées ici sont recouvertes d'un film de carbone troué afin d'avoir une résolution maximum sur les objets passant au-dessus des trous.

La coloration négative, comme pratiquée pour les nanotubes de peptides n'est pas nécessaire à l'observation des nanotubes de carbone, puisque ceux-ci interagissent suffisamment avec le faisceau d'électrons. Dans le cas présent les échantillons sont composés de peptides et de nanotubes de carbone : chaque échantillon est donc déposé sur une grille colorée et sur une grille non colorée.

Sur un échantillon de nanotubes de carbone multiparois, il est possible d'apercevoir les feuillets de carbone ainsi que de petites pollutions provenant de la manipulation de l'échantillon ou bien de la grille elle-même (Fig. 4.4).

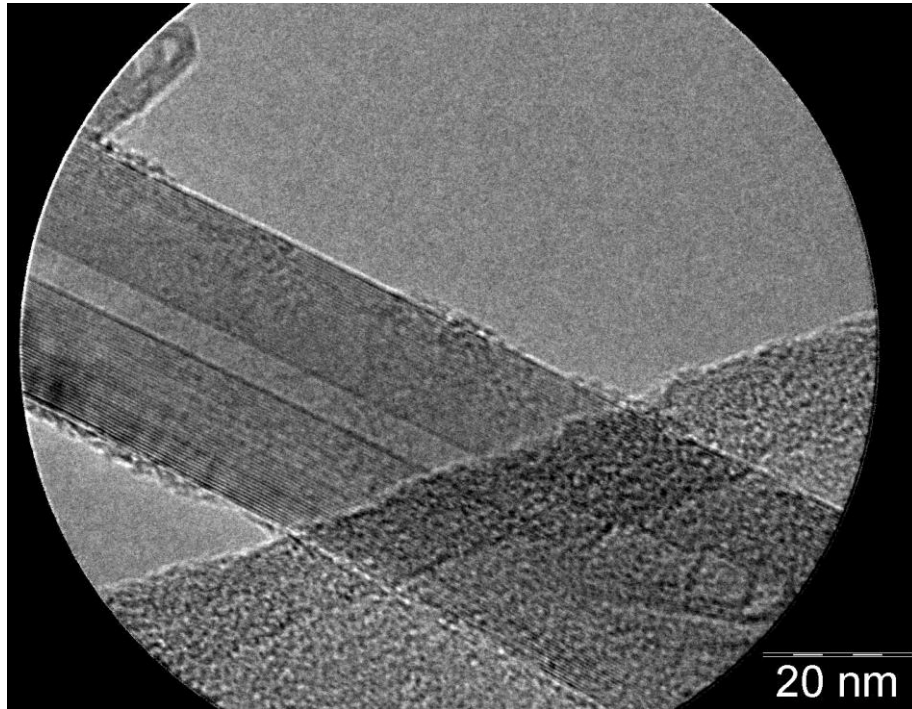


Fig. 4.4 Nanotube de carbone seul en MET sur grille à trous, sans coloration.

Sur la figure 4.4, la partie sombre de l'image est le film de carbone, la partie plus claire est le trou. Les nanotubes de carbone se repèrent aisément grâce à leur canal central, vide de matière. Il est intéressant de noter les déformations à l'extrémité du nanotube, à droite de l'image.

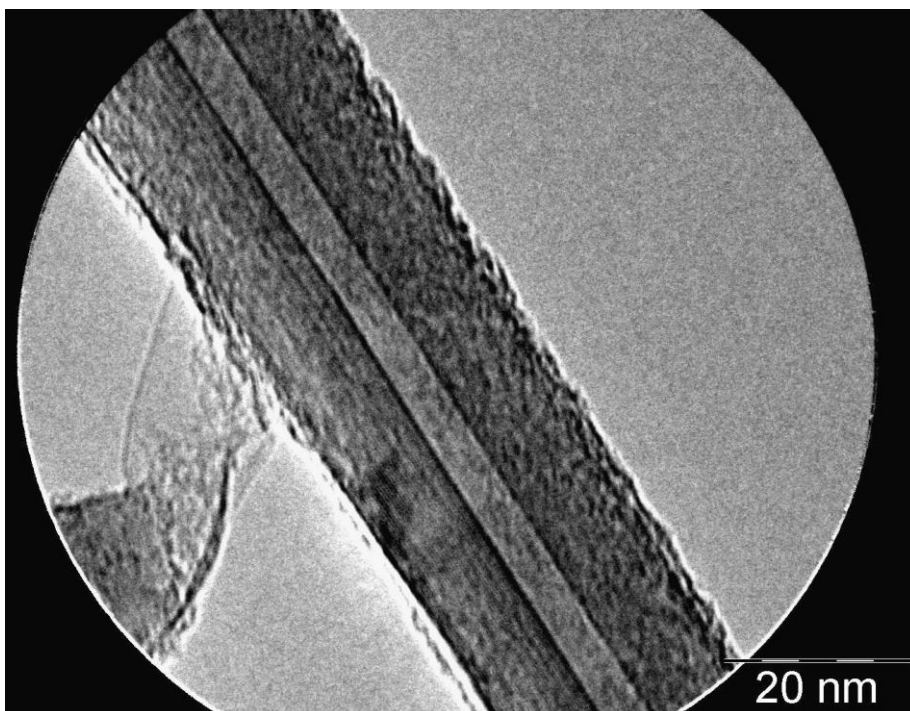


Fig. 4.5 Nanotube de carbone avec du lanrétotide après lavage, sans coloration (MET).

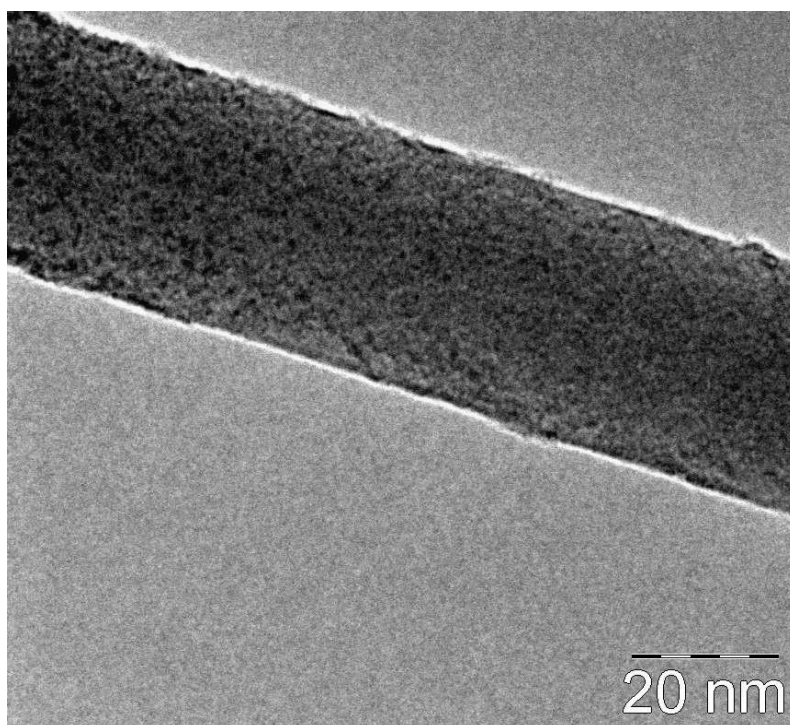


Fig. 4.6 Nanotube de carbone sans lanréotide après filtration, sans coloration (MET).

L'examen d'un échantillon de nanotubes, préparé avec du lanréotide et filtré par la méthode décrite précédemment, révèle une surface modifiée avec ce qui pourrait être une couche de matière amorphe autour du nanotube (Fig. 4.5). Cependant, aucune différence apparente n'est visible avec un échantillon de nanotubes sans lanréotide préparé dans les mêmes conditions (Fig. 4.6).

Cette expérience ne permet donc pas de vérifier la présence de lanréotide à la surface des tubes.

II.4.1.2 Analyse thermo-gravimétrique

L'échantillon est introduit sous forme sèche dans un creuset en alumine suspendu à une balance de précision. Le creuset est placé dans un four alimenté en oxygène permettant des montées de température contrôlées. Un cycle montée en température-plateau-refroidissement est réalisé sur chaque échantillon, tout en suivant la masse du creuset. Toutes les analyses ATG ont été réalisées avec le même programme : 10 °C min^{-1} jusqu'à 1000 °C , 10 min à 1000 °C puis refroidissement jusqu'à T.A. à 10 °C min^{-1} .

Ainsi une courbe fraction de masse de l'échantillon en fonction de la température peut être réalisée (Fig. 4.7).

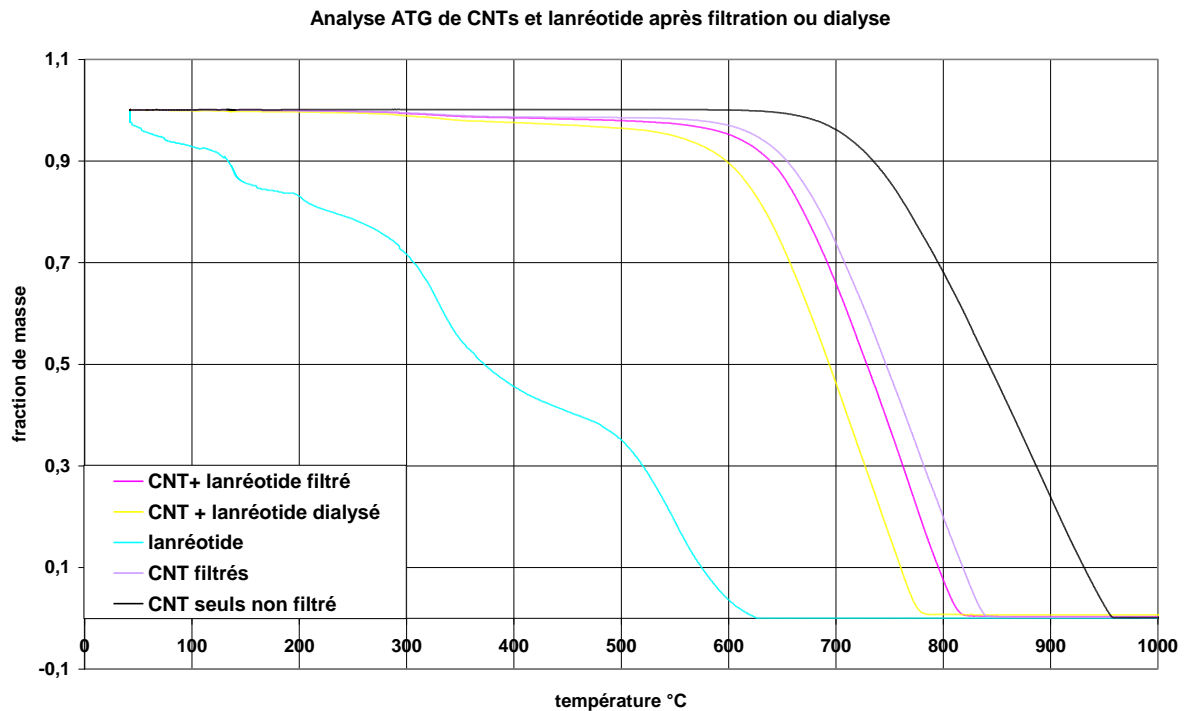


Fig. 4.7 Analyses thermo-gravimétriques : fraction de masse en fonction de la température.

Les échantillons analysés ont été les suivants : lanréotide seul (bleu), nanotubes de carbone seuls (noir), nanotubes de carbone seuls filtrés (violet), nanotubes de carbone avec lanréotide après filtration (rose) et dialyse (jaune).

Le lanréotide (bleu) est consommé jusqu'à environ 630 °C, avec trois pertes de masse importantes. Les nanotubes de carbone seuls (noir) sont stables jusqu'à une température d'environ 650 °C puis se consomment progressivement jusqu'à environ 960 °C. Les échantillons de nanotubes filtrés, nanotubes avec lanréotide filtrés et nanotubes avec lanréotide dialysés présentent des profils assez similaires. Ceci est en accord avec les observations microscopiques qui révèlent des surfaces de tubes d'aspect similaire pour les trois échantillons.

Ainsi, ces échantillons subissent une perte de masse de l'ordre de la dizaine de pourcent avant dégradation des nanotubes. Ceux-ci se consomment jusqu'à des températures de l'ordre de 830 °C, ce qui est très inférieur à la température atteinte par les nanotubes de carbone natifs. Il est possible que la combustion des molécules liées à leur surface produise des défauts dans la structure des tubes et donc une sensibilité plus grande lors de la montée en température.

Ces analyses révèlent donc un taux de fonctionnalisation d'environ 2 ou 3 % ce qui est conforme aux taux rapportés dans la littérature pour des tensio-actifs⁽¹⁴¹⁾.

De plus, cette analyse semble confirmer la pollution des nanotubes natifs lors de la filtration, sans doute par du matériau détaché du filtre lors de la récupération par sonication des nanotubes.

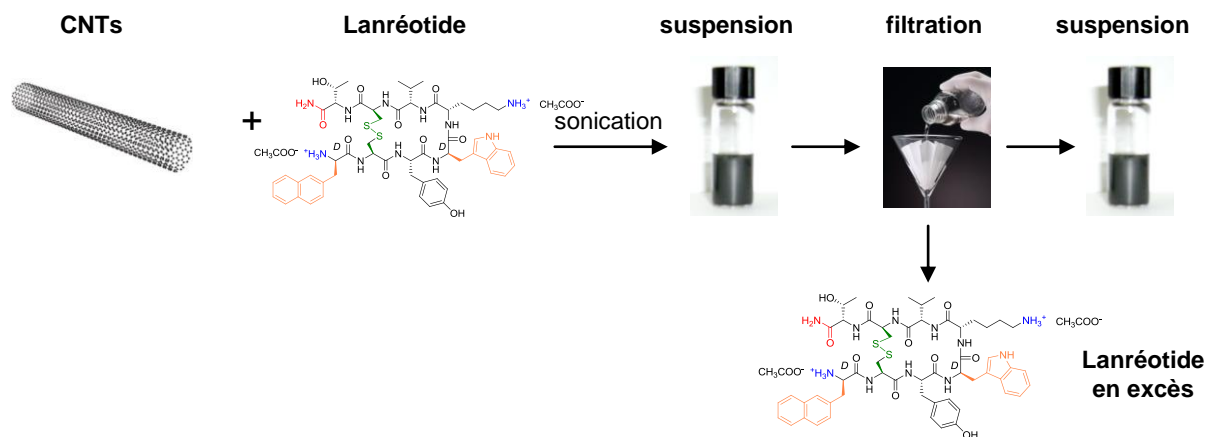


Fig. 4.8 Résumé des expériences impliquant le lanréotide et les nanotubes de carbone.

II.4.2 Expériences avec des tapis de nanotubes de carbone alignés

Les analyses précédentes ayant démontré des interactions favorables, il est alors envisageable de travailler directement sur les tapis de nanotubes de carbone alignés.

Six tapis, soit trois jeux de deux tapis sont utilisés. Un tapis va constituer la référence et n'est pas mis en contact avec le lanréotide. Le second est soumis à la solution de peptide.

L'expérience suivante est réalisée:

- Mise sous vide (pompe à palette)
- Introduction d'une solution de lanréotide diluée et dégazée (bain ultra-sons) ou d'eau dégazée pour la référence
- Dégazage sous vide quelques minutes
- Repos
- Séchage

Chaque jeu de tapis a subi un séchage différent, respectivement :

- Séchage à l'air libre après séparation de la solution
- Séchage sous vide, sans séparation
- Lyophilisation (solution et tapis gelés à l'azote liquide et sublimée sous vide)

En effet, le séchage de ces objets a une importance particulière parce qu'il est très perturbant pour l'alignement des tubes.

Les deux tapis ayant subi la lyophilisation se sont craquelés et détachés de leur support en quartz. Macroscopiquement, sur les deux jeux restants, les tapis référence n'ayant pas été au contact de la solution de lanréotide semblent les plus intacts. Parmi les deux tapis soumis au lanréotide, le séchage à l'air semble montrer le meilleur aspect.

Deux types d'analyses ont été effectuées : la microscopie électronique à balayage (MEB) permettant de contrôler l'aspect du tapis. Une vue de dessus et une vue de côté sont présentées, avec à gauche le tapis référence, sans lanréotide, et à droite le tapis soumis à la solution de peptide.

Le second type d'analyse, réalisé avec le même appareillage, est l'analyse dispersive en énergie de rayons X (EDX). Elle permet de visualiser une image reconstituée à partir de signaux de chaque élément chimique. Les éléments de poids moléculaire important permettent d'obtenir le meilleur rapport signal sur bruit de fond.

Deux éléments servent de référence interne, le carbone et le fer. Le carbone permet de vérifier la fiabilité de l'analyse : l'image obtenue doit être uniforme. Le fer est utilisé en catalyseur lors de la synthèse du tapis ; des études précédentes ont montré une concentration importante en surface du tapis⁽¹⁴⁰⁾. Le peptide est suivi par la présence du soufre, élément lourd et caractéristique de la molécule.

II.4.2.1 Séchage à l'air

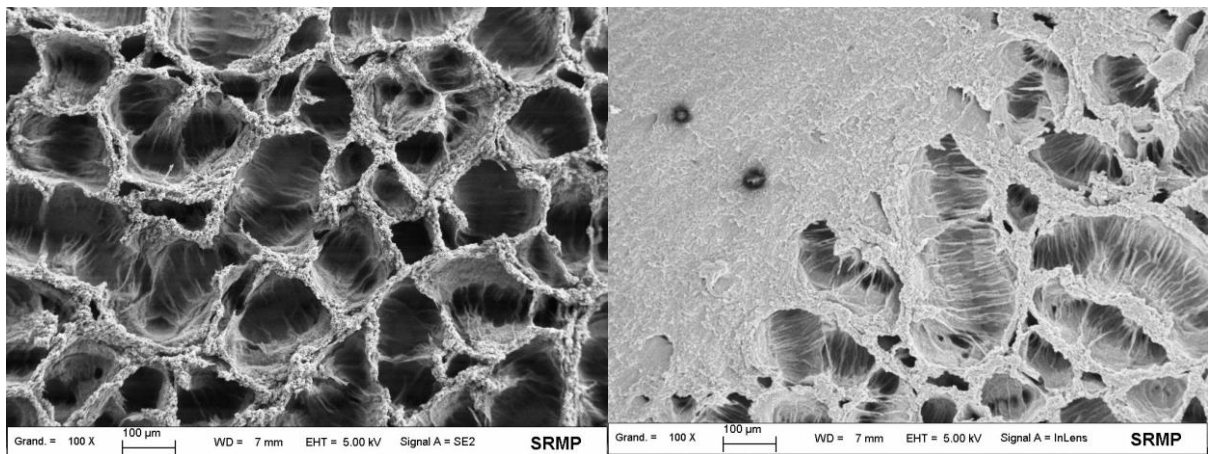


Fig. 4.9 Tapis de nanotubes de carbone séchés à l'air en MEB, vus de dessus. À gauche les nanotubes seuls, à droite le tapis soumis au lanréotide.

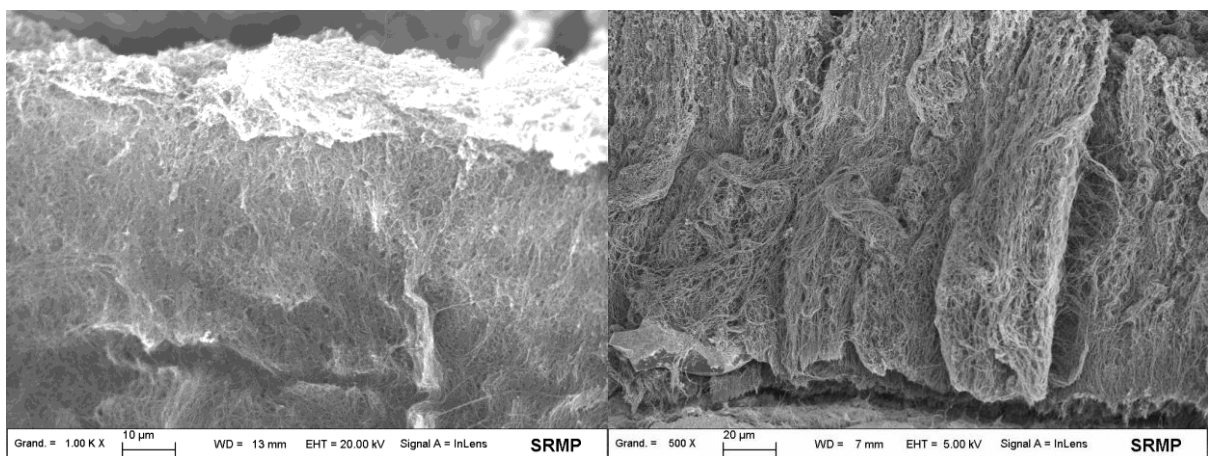


Fig. 4.10 Tapis de nanotubes de carbone séchés à l'air en MEB, vus de profil. À gauche les nanotubes seuls, à droite les nanotubes soumis au lanréotide.

Les images MEB montrent des tapis parsemés de cratères (Fig. 4.9), mais dont les nanotubes sont encore assez bien alignés vus de côté (Fig. 4.10). De plus, sur la micrographie du tapis soumis au lanréotide, vu de dessus (Fig. 4.9 à droite), une zone étonnamment homogène semble être formée de nanotubes couchés (coin supérieur gauche).

Une analyse élémentaire EDX est réalisée sur le profil du tapis (Fig. 4.11). Le signal de carbone devrait apparaître uniformément sur toute l'image rouge. Les conditions ne sont donc pas optimales puisque le centre de l'image est très sombre. Autre élément de référence, le fer est très présent dans le haut de l'image, ce qui est en accord avec les résultats déjà publiés⁽¹⁴⁰⁾.

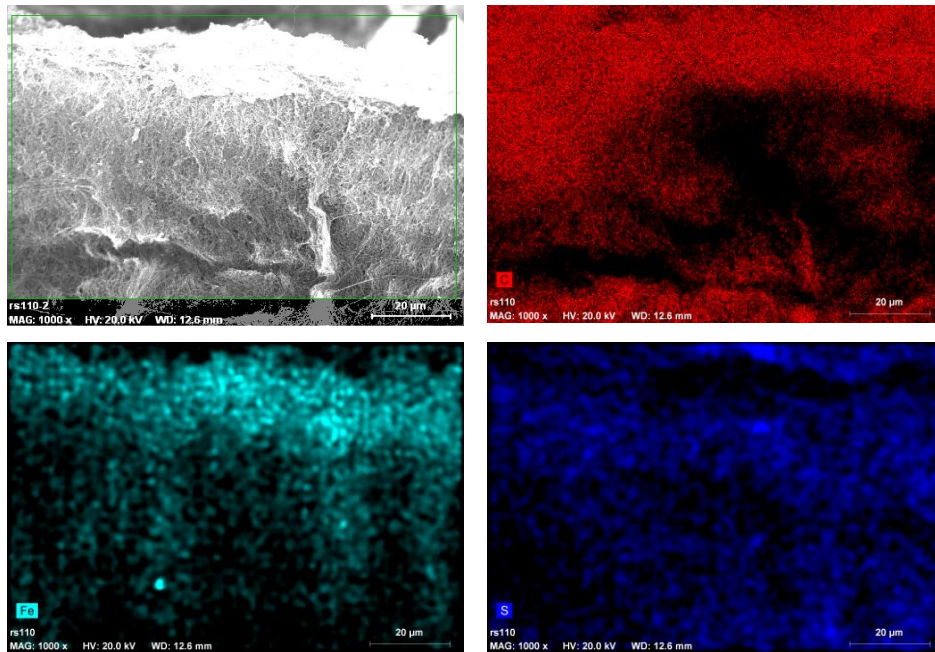


Figure 4.11 Analyse EDX. En haut à gauche image MEB de la zone analysée.
 Image rouge : image reconstituée à partir du signal du carbone.
 Image bleu vert : image reconstituée à partir du signal du fer.
 Image bleu foncé : image reconstituée à partir du signal du soufre.

L'essentiel du signal du soufre, marqueur du peptide, est dû au bruit de fond : seuls les agrégats sont significatifs. Le lanréotide se trouve donc majoritairement sous forme de petits agrégats, une partie étant sans doute dispersée en trop petites quantités pour être détectable.

II.4.2.2 Séchage sous vide

Les images de MEB montrent un profil très différent en comparaison du séchage à l'air (Fig. 4.12 et 4.13), avec en plus une différence très marquée entre le tapis référence et le tapis soumis au lanréotide. Ce dernier a perdu en effet une grande partie de sa couverture de nanotubes (non montrée) et une couche de matière assez épaisse recouvre la partie restante du tapis (Fig. 4.12 à droite). Le tapis référence présente un profil assez différent du tapis

référence pour le séchage à l'air, avec des sillons en plus de cratères disposés de façon moins homogène.

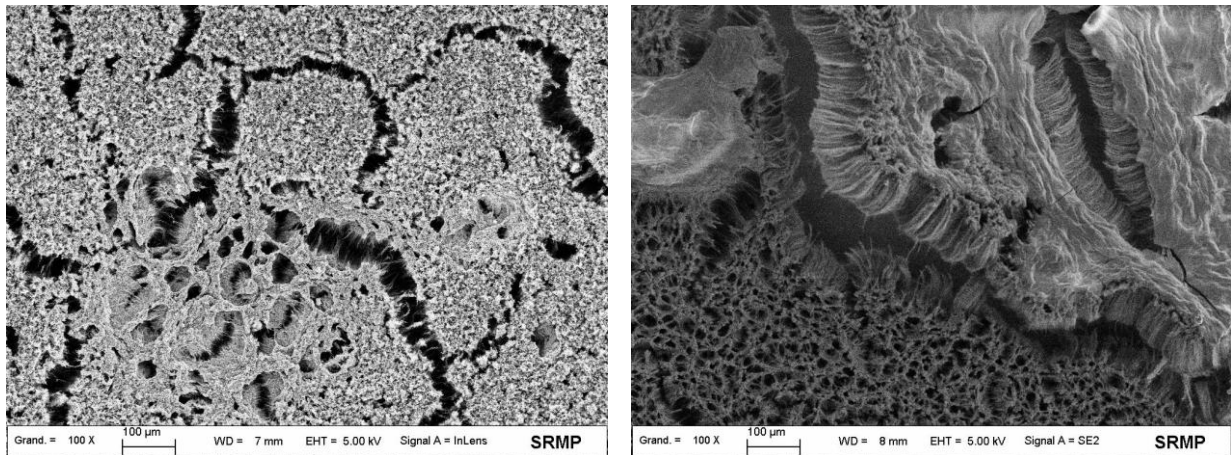


Fig. 4.12 Tapis de nanotubes de carbone séchés sous vide en MEB, vus de profil. À gauche les nanotubes alignés seuls, à droite les nanotubes alignés après traitement avec du lanréotide.

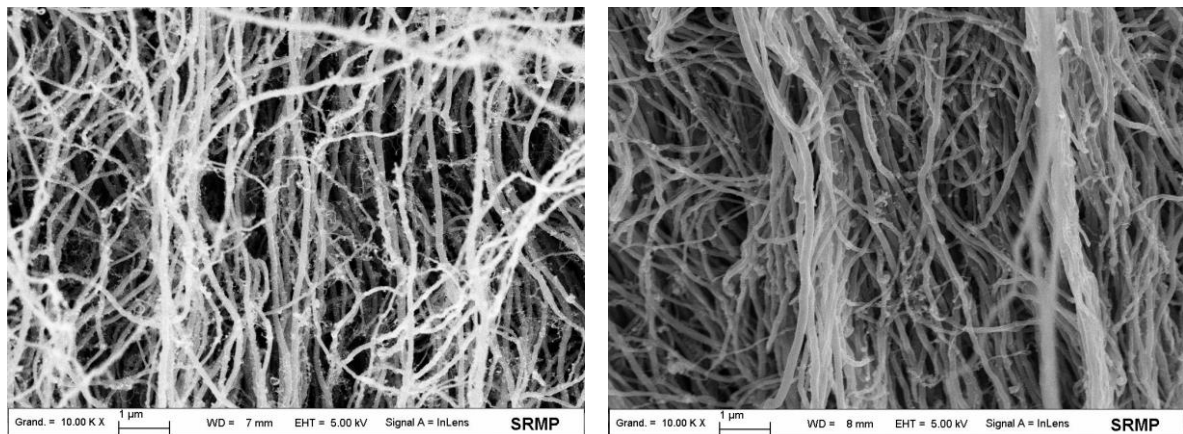


Fig. 4.13 Tapis de nanotubes de carbone séchés sous vide en MEB, vus de dessus. À gauche les nanotubes alignés seuls, à droite les nanotubes alignés après traitement avec du lanréotide.

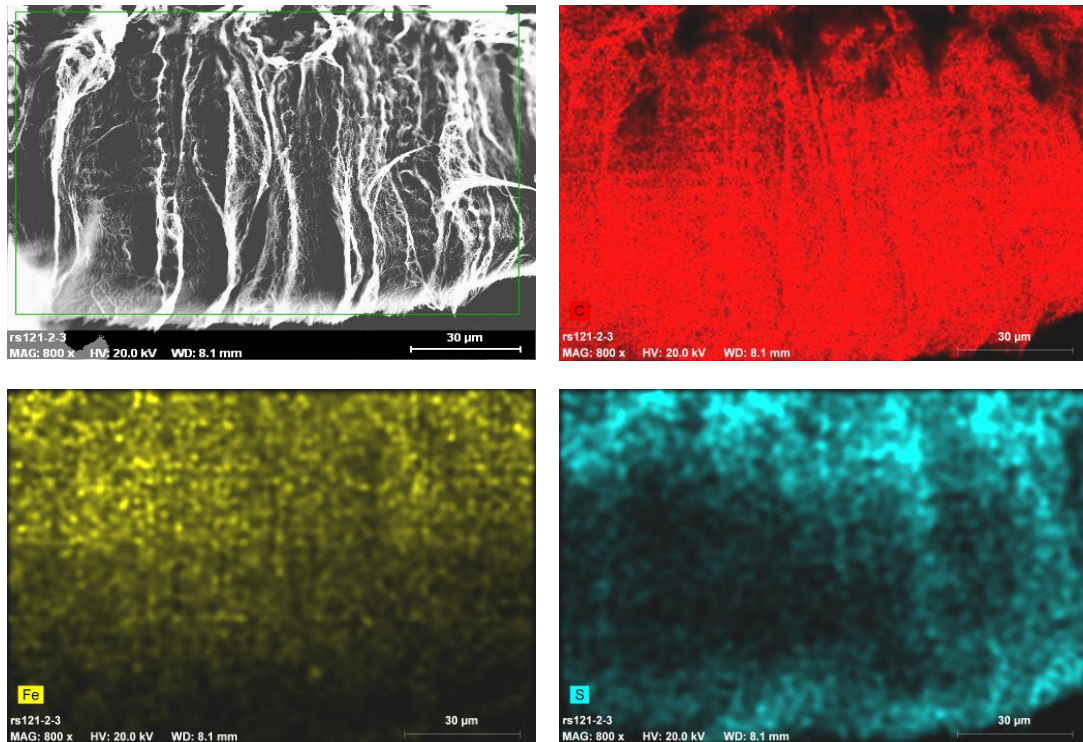


Fig. 4.14 Analyse EDX du tapis séché sous vide.
 En haut à gauche image MEB de la zone analysée
 Image rouge : image reconstituée à partir du signal du carbone
 Image jaune : image reconstituée à partir du signal du fer
 Image bleu : image reconstituée à partir du signal du soufre.

Dans l'analyse élémentaire du tapis séché sous vide (Fig. 4.14), le signal du carbone est très homogène. Ceci indique des conditions d'expérience supérieures à l'analyse précédente (Fig. 4.11). Le signal du fer est aussi satisfaisant avec un dégradé de haut en bas. Le signal du soufre semble indiquer que le peptide s'est beaucoup déposé au dessus du tapis, ce qui est normal de part le séchage effectué sans séparation du peptide non lié. À part quelques agrégats, il semble avoir assez peu pénétré le tapis de nanotubes.

Le lanréotide est donc capable de promouvoir la mise en suspension de nanotubes de carbone multi-feuillets dans l'eau. Ceci démontre une interaction favorable entre cette molécule et les nanotubes, courante pour des molécules amphiphiles. Cependant, la visualisation des molécules adsorbées en microscopie est difficile à mettre en oeuvre et aucune organisation n'a pu être démontrée.

Les analyses concernant les nanotapis confirment tout d'abord le caractère extrêmement sensible du séchage lors de l'introduction de tapis de nanotubes de carbone dans l'eau ; la lyophilisation est donc à exclure, le séchage à l'air apparait le plus recommandé. Le lanréotide a semble-t-il pénétré assez peu dans les tapis et semble plutôt se présenter sous forme d'agrégats. Cette expérience ne permet donc pas d'assembler des nanotubes de peptides au

sein de tapis de nanotubes de carbone. Une autre voie à explorer pourrait être l'introduction au sein des tapis de nanotubes de peptides déjà formés.

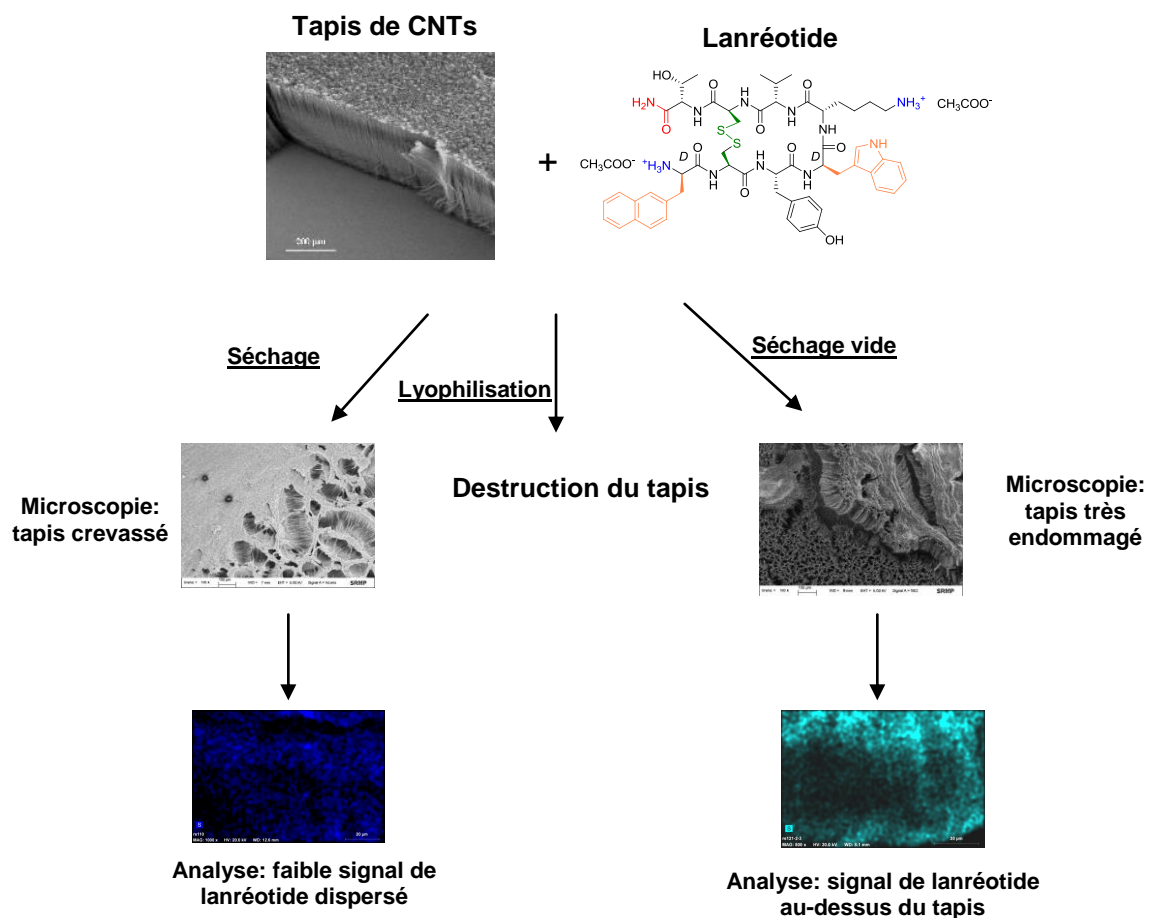


Fig. 4.15 Résumé des expériences impliquant tapis de nanotubes de carbone et le lanréotide.

II.5 Synthèse d'acides aminés non naturels

La bibliothèque de peptides décrite dans le chapitre 1 a été synthétisée afin d'obtenir des nanotubes de diamètres différents, ainsi que pour mieux cerner les paramètres guidant l'auto-assemblage. L'incorporation en quatrième position d'un acide aminé comportant un polycycle aromatique est donc doublement désirable : un diamètre supérieur peut être espéré dans le cas d'un assemblage en tubes et la fluorescence de ce cycle peut apporter de nouvelles informations sur les interactions mises en jeu. Dans cette optique, une chaîne latérale portant un cycle fluorényle est particulièrement intéressante.

De façon plus prospective, un acide aminé portant un bras espaceur peut permettre d'étudier la capacité de l'assemblage à supporter le greffage d'une molécule d'intérêt, et donc la formation de nanotubes fonctionnalisés.

Enfin, la richesse électronique du cycle est aussi un paramètre à envisager. Pour étudier son impact sur l'auto-assemblage, un hétéroatome pourrait être incorporé au sein d'un cycle aromatique. Un acide aminé portant un cycle triazole, analogue de l'histidine est donc envisageable.

Ces projets nécessitent la synthèse de nouveaux acides aminés non naturels et non disponibles commercialement.

II.5.1 Synthèse de la β -fluorénylalanine

Cette synthèse a été conduite par François Besselièvre dans le cadre de son stage de Master au sein du laboratoire⁽¹⁴²⁾. Le schéma réactionnel utilise une réaction de Horner-Wadsworth-Emmons pour coupler le cycle fluorène à l'acide aminé, suivi d'une réduction énantiosélective grâce à un catalyseur chiral à base de Rhodium.

L'ester phosphonique commercial **25** est mis en réaction avec l'aldéhyde portant le dérivé fluorescent recherché pour obtenir le déshydroaminoacide **26** (Schéma 5.1)⁽¹⁴³⁾.

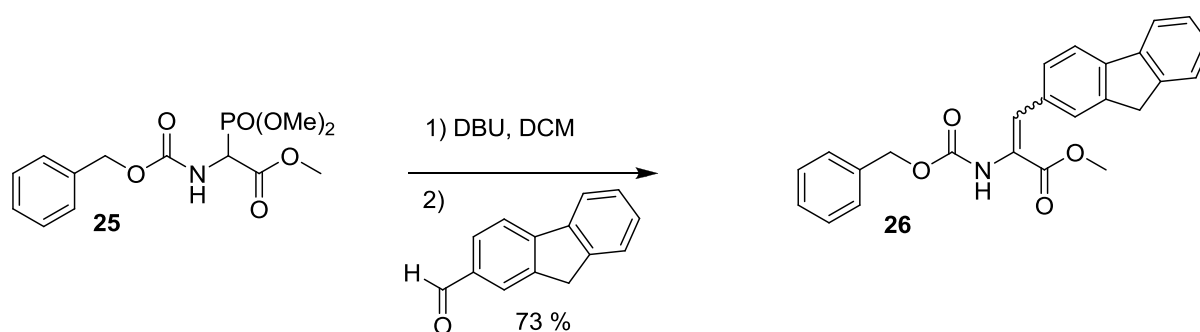


Schéma 5.1 Obtention du déshydroaminoacide **26** par une réaction de Horner-Wadsworth-Emmons.

Cette réaction est réalisée avec un rendement de 73 % ; un mélange d'isomères Z/E 95:5 est obtenu. L'isomère majoritaire dont la configuration n'a pas été déterminée est réduit par de l'hydrogène sous 50 bars en présence du catalyseur ((-)-1,2-Bis-((2R, 5R)-2,5-(R,R)-Et-diéthylphosphalano)benzène(cylcooctadiène)) rhodium (I) tétrafluoroborate, aussi appelé (R,R)-Et-DUPHOS-Rh, connu pour conduire aux acides aminés de configuration R (Schéma 5.2)⁽¹⁴⁴⁾.

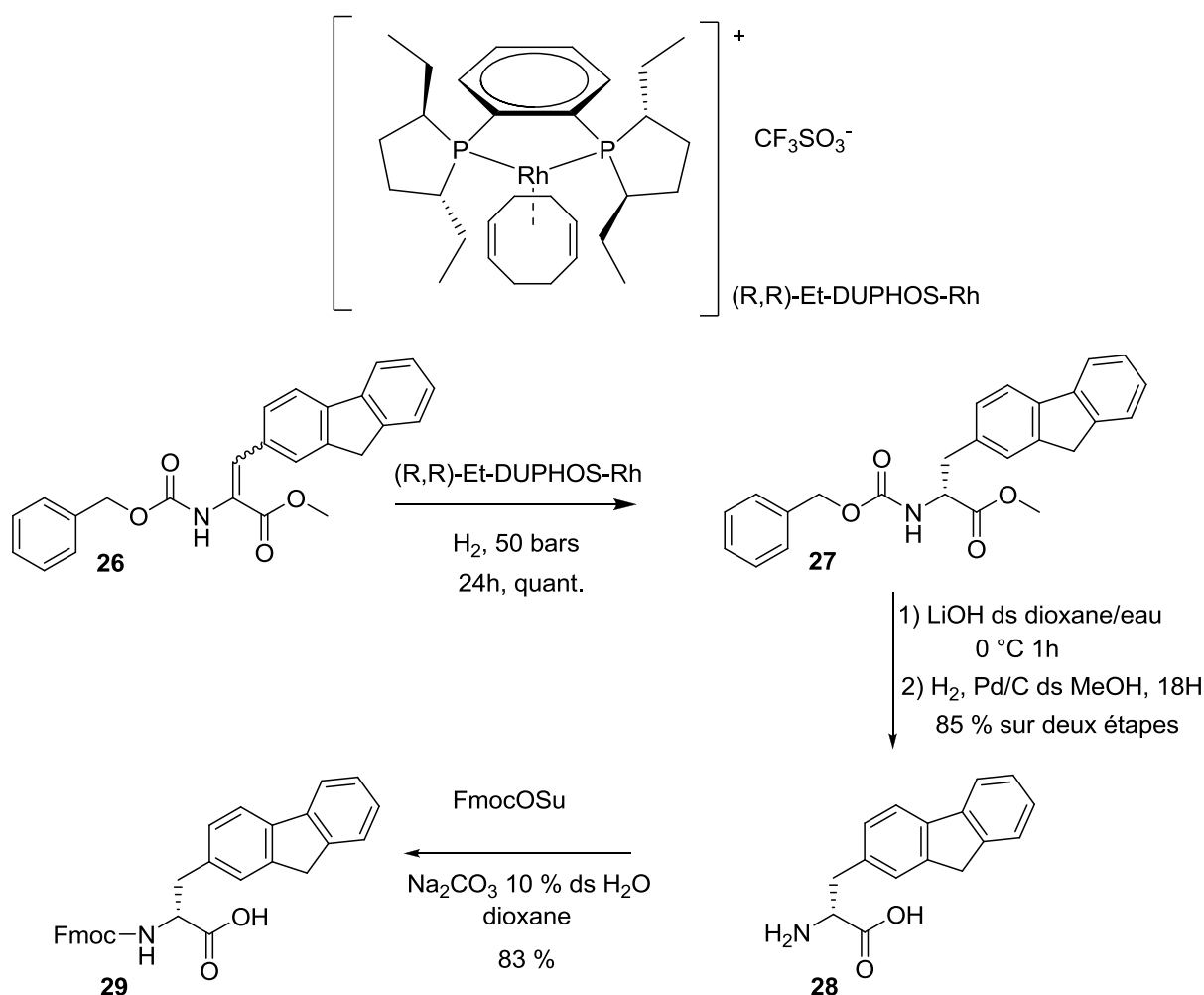


Schéma 5.2 Réduction asymétrique au Rhodium pour obtenir l'acide aminé fluorénylalanine **27**, suivi d'un échange de groupes protecteurs pour obtenir l'acide aminé Fmoc protégé **29**.

L'acide aminé **27** est obtenu avec un rendement quantitatif. Il est ensuite déprotégé par saponification et une hydrogénation sur charbon palladié, pour un rendement de 85 % sur ces deux étapes (Schéma 5.2). Afin de pouvoir l'utiliser en synthèse peptidique, l'acide aminé libre **28** est protégé par un groupement Fmoc dans une dernière étape avec un rendement de 83 %.

La N-Fmoc- β -fluorényl-D-alanine **29** est donc obtenue en 5 étapes avec un rendement global de 52 %. Son excès énantiomérique est de 93 % mesuré par HPLC en phase chirale⁽¹⁴²⁾. Cet acide aminé a été utilisé pour la synthèse du peptide correspondant **13** (Partie I, chapitres 1 et 3).

II.5.2 Synthèse d'une tyrosine substituée

Les nanotubes de peptides pourraient être fonctionnalisés par des molécules d'intérêt, telles que des molécules fluorescentes bioactives ou chélatrices de métaux. Le gel de lanréotide est en effet capable, après injection sous-cutanée, de délivrer à long terme le monomère médicament (Partie I, chapitre 5). Cette propriété pourrait ouvrir la voie à de nouvelles applications, grâce à la fonctionnalisation des nanotubes. Pour cela, un point d'ancrage et un bras espaceur doivent être déterminés afin que le peptide final conserve ses propriétés d'auto-assemblage.

Le choix du point d'ancrage s'est porté sur l'acide aminé tyrosine, qui, en position 4 de la séquence peptidique, permet d'obtenir des nanotubes de 17,6 nm. Son groupement hydroxyle ne semble pas requis pour sauvegarder l'empilement, puisque le dérivé phénylalanine permet lui aussi l'obtention de nanotubes. De plus, ce groupement permet une fonctionnalisation chimique aisée, par liaison éther, ester, ou autre. Enfin, des études préalables ont démontré que dans le cas du lanréotide le tryptophane en position 4 pointait vers l'extérieur de la paroi des tubes⁽¹²⁹⁾. Le bras espaceur a aussi son importance puisqu'il doit respecter la balance hydrophile/hydrophobe du peptide : un bras de type « alcane » pourrait causer l'insolubilité du dérivé.

Le choix du bras s'est porté sur un 2-(2-méthoxyéthoxy)-éthoxy afin de tester, dans un premier temps, uniquement le peptide avec son bras en conditions d'auto-association. L'acide aminé visé par cette synthèse sera donc la N-Fmoc-4-(2-(2-méthoxyéthoxy)éthoxy)-D-tyrosine (**30**).

La rétrosynthèse envisagée est la suivante : le composé voulu **30** est synthétisé par déprotection du groupement *ter*-butyle protégeant l'acide (molécule **31**). Cette molécule est elle-même issue de la fonctionnalisation de la tyrosine bi-protégée **32**, provenant de la protection de la H-D-Tyr-OtBu commerciale (Schéma 5.3).

La première étape, consistant en la protection par le groupement fluorénylméthoxycarbone de la tyrosine-OtBu, est réalisée avec un rendement de 86 % par Fmoc-OSu et la base de Hunig (diisopropyléthylamine) dans le dichlorométhane pour obtenir la tyrosine **32**.

Cependant, l'étape suivante consistant en la fonctionnalisation de la chaîne latérale par le 2-(2-méthoxyéthoxy)-éthoxy ne fonctionne pas, malgré la variété des conditions essayées (molécule **31**). Ainsi une alkylation classique par une base faible ne donne pas de réaction ou bien clive le groupement Fmoc. Par ailleurs, la réaction de Mitsunobu n'a pas lieu, aucun changement n'étant détectable dans le milieu réactionnel après, par exemple, six jours à reflux dans le dichlorométhane (Schéma 5.4).

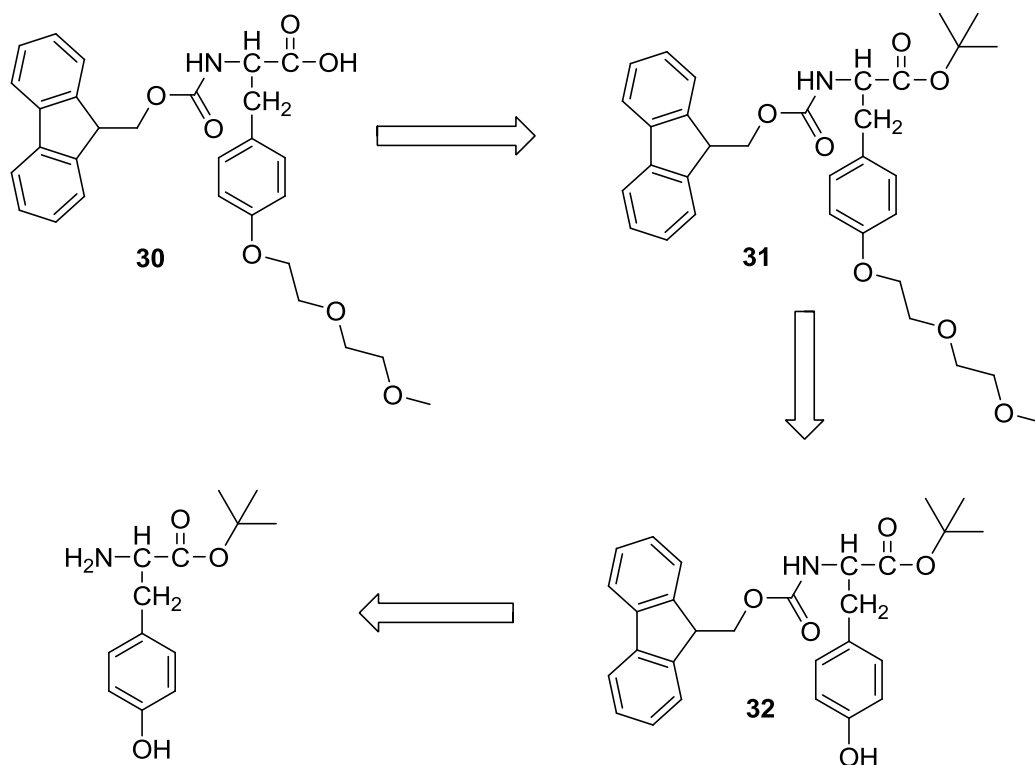


Schéma 5.3 Rétrosynthèse permettant d'obtenir la tyrosine fonctionnalisée **30**.

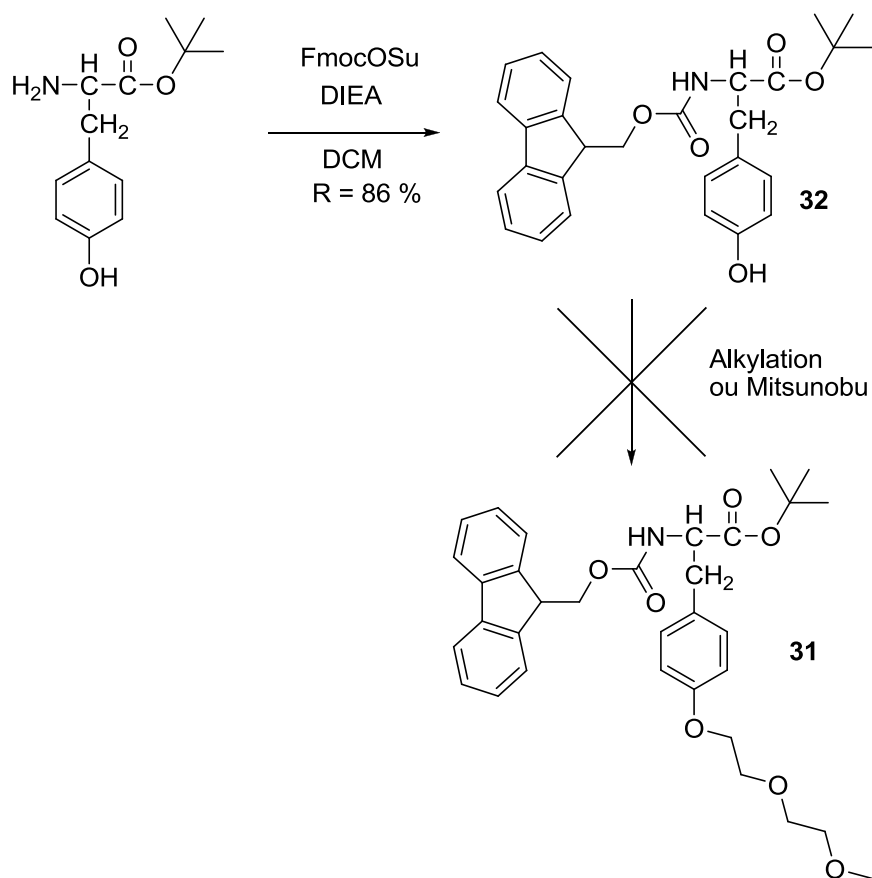


Schéma 5.4 Schéma réactionnel de la première rétrosynthèse.

La deuxième rétrosynthèse envisagée est la suivante : la protection par le groupement Fmoc est effectuée en deuxième étape, après la fonctionnalisation de la tyrosine non protégée par une méthode de fonctionnalisation sélective (Schéma 5.5).

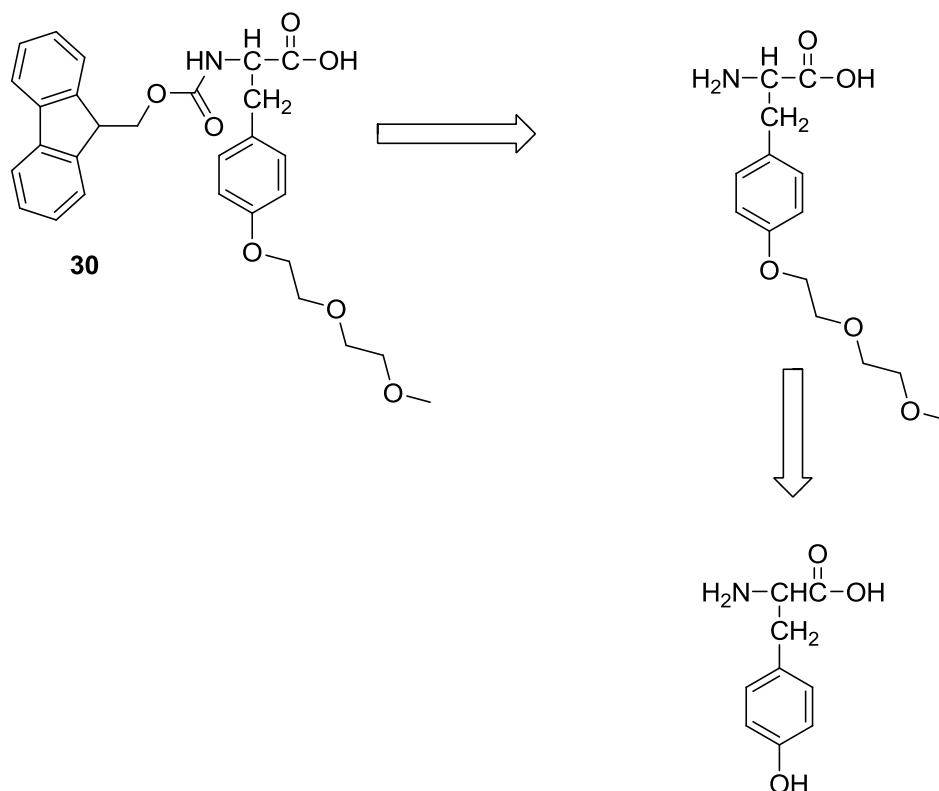


Schéma 5.5 Deuxième rétrosynthèse envisagée pour obtenir la tyrosine fonctionnalisée **30**.

Cependant, cette rétrosynthèse est rapidement abandonnée puisqu'aucun des modes opératoires de fonctionnalisation sélective ne donne satisfaction. Ces méthodes développées dans les années 60 font intervenir un complexe de cuivre^(145,146) ou un additif comme le DMSO⁽¹⁴⁷⁾. L'analyse du milieu réactionnel montre sur tous les essais plusieurs composés alkylés, avec parfois une légère prédominance de l'un d'entre eux. Ces méthodes ne sont donc pas utilisables dans notre cas.

La troisième rétrosynthèse envisagée est la suivante : la molécule désirée est issue du remplacement du groupement Boc par un groupement Fmoc (2 étapes), sur l'acide aminé **34** alkylé dans une première étape (Schéma 5.6).

Cette étape est en réalité la succession de deux réactions, puisque la réaction d'alkylation forme aussi l'ester : celui-ci doit donc être saponifié dans un deuxième temps⁽¹⁴⁸⁾. Il ne s'agit pas vraiment de deux réactions *one pot* puisque le milieu doit être extrait et évaporé avant la saponification. L'alkylation se fait par le bromure de 2-(2-méthoxyéthoxy)-éthoxy et le K₂CO₃ dans un mélange DMF/H₂O à chaud. La saponification est faite dans le dioxane avec

un excès de soude. Après traitement, le produit brut est purifié sur une colonne de silice afin d'obtenir le produit attendu **33** avec un rendement de 68 % (Schéma 5.7)

Ce produit peut alors être déprotégé par l'acide chlorhydrique dans l'acétate d'éthyle, ce qui est fait avec un rendement de 80 % pour obtenir l'acide aminé libre **34**⁽¹⁴⁹⁾. La dernière étape consiste en la protection de l'acide aminé par un groupement Fmoc, réalisée par le succinate de fluorènyle avec du carbonate de sodium dans un mélange eau/acétone⁽¹⁵⁰⁾. Cette dernière étape est réalisée avec un rendement de 65 %, soit un rendement global de 35 % sur quatre étapes.

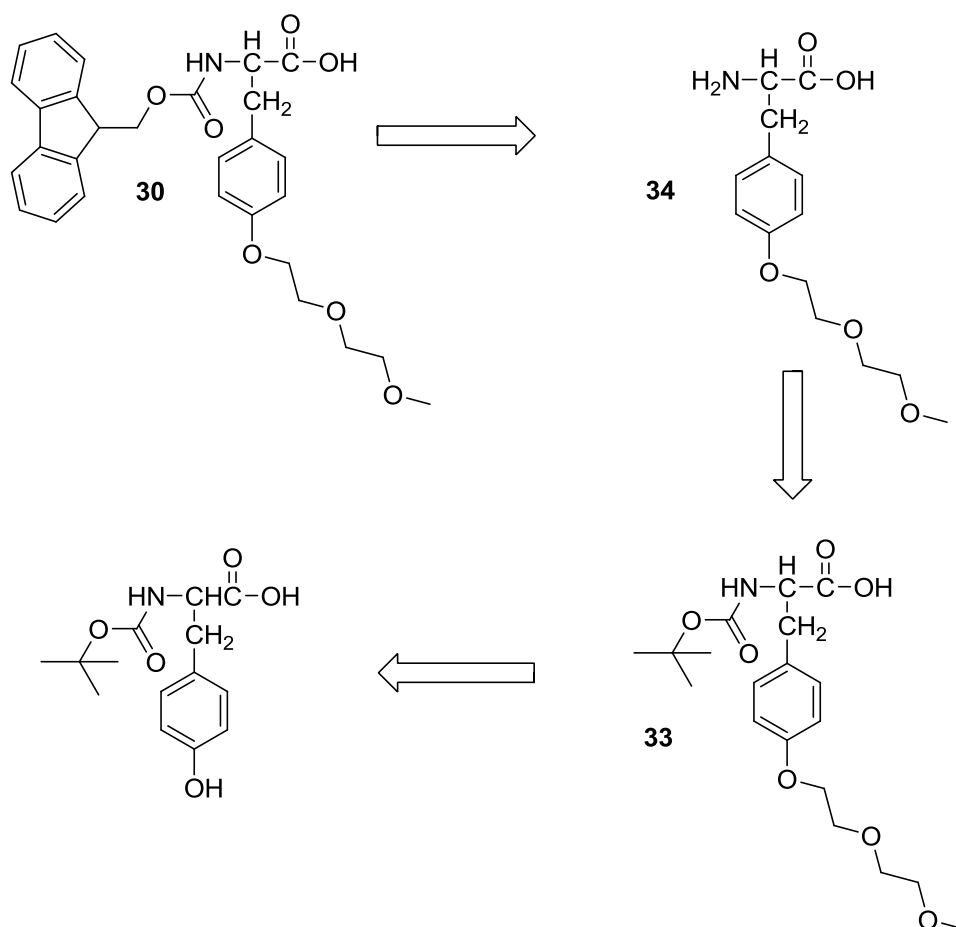


Schéma 5.6 Troisième rétrosynthèse envisagée pour obtenir la tyrosine fonctionnalisée **30**.

La pureté énantiomérique est contrôlée par HPLC en phase chirale, puisque c'est bien le composé D qui est désiré en vue d'une synthèse peptidique. On obtient un excès énantiomérique de 94 %, ce qui est satisfaisant.

Cette voie de synthèse a donc permis l'obtention de la Fmoc-D-tyrosine alkylée avec un bras 2-(2-méthoxyéthoxy)-éthoxy, ce qui, après son incorporation en position 4 d'un dérivé du lanréotide, permettra de valider l'utilisation de cette approche pour le greffage de molécules d'intérêt à la surface des nanotubes de peptides.

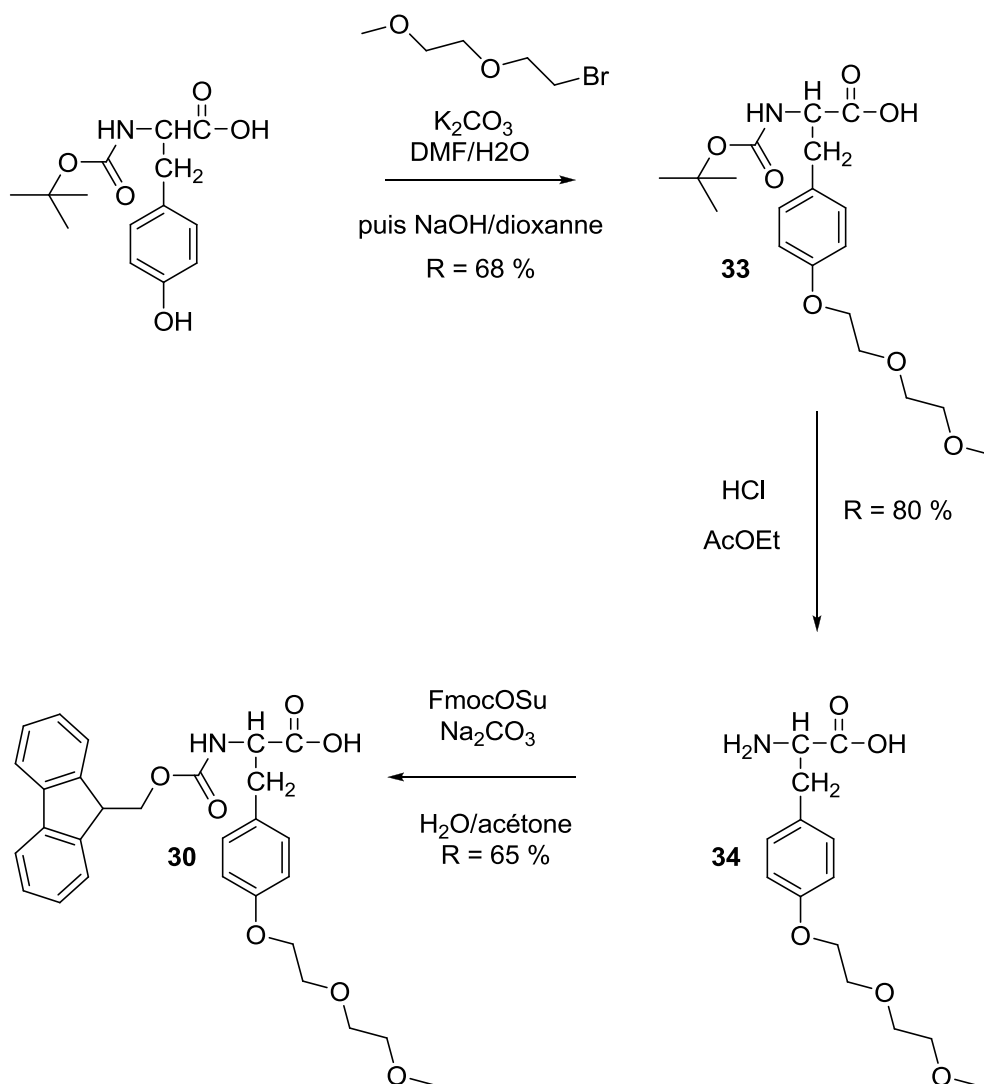


Schéma 5.7 Synthèse de la Fmoc-tyrosine fonctionnalisée **30**.

Cet acide aminé a été placé en position 4 dans une séquence peptidique analogue du lanréotide (données non montrées). Cependant l'étude de ses propriétés n'a pas encore été réalisée à ce jour.

II.5.3 Synthèse d'un analogue de l'histidine

L'acide aminé β -triazolalanine (Fig. 5.1) est décrit dans la littérature en 7 étapes⁽¹⁵¹⁾.

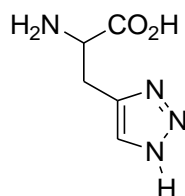


Figure 5.1 Acide aminé β -triazolalanine.

La littérature rapporte qu'il est possible d'obtenir des cycles triazole par la cyclisation [3+2] dite « de Huisgen » de façon très douce⁽¹⁵²⁾. Cette réaction catalysée au cuivre, permet d'obtenir un seul des deux régioisomères possibles : il s'agit d'une réaction phare du concept de chimie « click » développé par Sharpless⁽¹⁵³⁾. L'autre isomère peut être obtenu sélectivement par un catalyseur au ruthénium⁽¹⁵⁴⁾. Cette dernière réaction se fait en milieu aprotique et, dans le cas d'acides aminés, l'ester doit être utilisé pour ne pas détruire le catalyseur.

A partir de la propargylglycine et selon le catalyseur utilisé, il doit donc être possible de synthétiser les deux régioisomères de la β -triazolalanine protégée (Schéma 5.10). De plus, dans le cadre de la synthèse peptidique il est nécessaire de choisir des groupes protecteurs clivables sélectivement.

II.5.3.1 Synthèse des composés

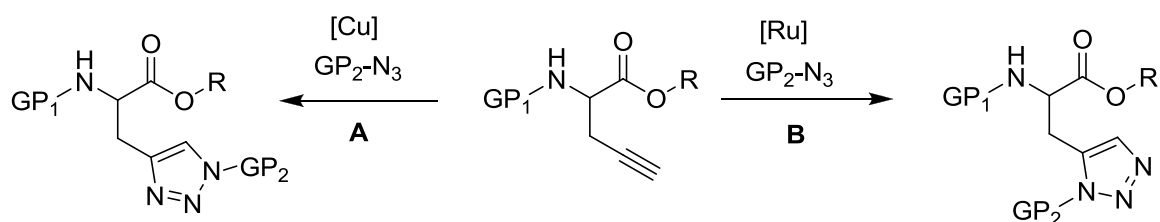


Schéma 5.8 Obtention des deux régioisomères de l'acide aminé β -triazolalanine

Les conditions A sont Cu(OAc)₂, ascorbate de sodium dans un mélange *ter*-butanol/eau. Les conditions B sont en milieu anhydre, Cp^{*}RuCl(PPh₃)₂ dans le toluène et chauffage au reflux. Avec Mèlinda Ligeti, onze composés ont été obtenus (Tableau 5.1).

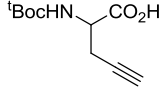
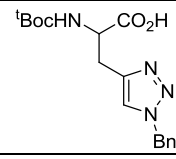
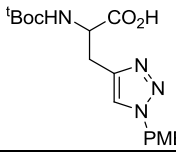
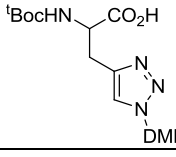
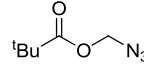
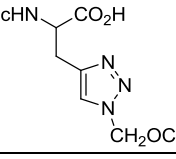
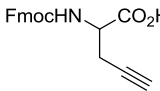
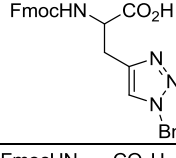
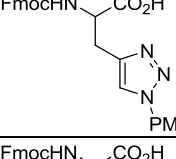
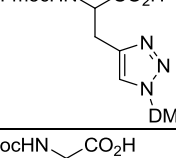
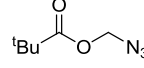
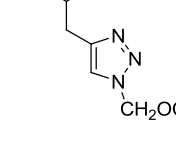
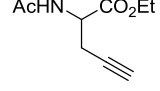
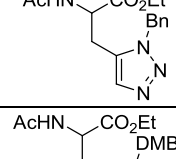
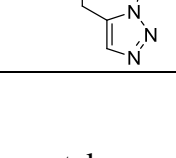
N°	Produit de départ	azoture	conditions	produit	R (%)
35		Bn-N ₃	A		60
36		PMB-N ₃	A		40
37		DMB-N ₃	A		15
38			A		73
39		Bn-N ₃	A		70
40		PMB-N ₃	A		40
41		DMB-N ₃	A		30
42			A		57
43		Bn-N ₃	B		84
44		DMB-N ₃	B		44

Tableau 5.1 : Composés obtenus par cyclisation de Huisgen par catalyse au cuivre (A) ou au ruthénium (B).

Les rendements vont de 15 % (composé **37**) à plus de 80 % (composé **43**).

La méthode A, catalysée par le cuivre, est utilisée sur la propargylglycine protégée sur l'amine par un groupement Boc (composés **35** à **38**) ou Fmoc (composés **39** à **42**), à chaque fois sous sa forme acide libre.

Le groupement protecteur de la chaîne latérale est selon la molécule : un benzyle (**30** et **34**), un *para*-méthoxybenzyle (**36** et **40**), un di-méthoxybenzyle (**37** et **41**) ou un pivaloyloxyméthyle (POM, **38** et **42**)

La méthode B est utilisée avec l'ester éthylique de la *N*-acétylpropargylglycine. Les azotures étudiés sont de benzyle (**43**) ou de diméthoxybenzyle (**44**).

II.5.3.2 Déprotections sélectives des acides aminés

La déprotection par hydrogénation des composés benzyle (**40**), *para*-méthoxybenzyle (**41**) et diméthoxybenzyle (**42**) s'est révélée problématique. Seule l'utilisation de 35 bars de pression d'hydrogène permet d'obtenir l'acide aminé portant le cycle triazole libre. Cependant, ce type de conditions n'est pas utilisable avec les acides aminés Fmoc protégés, puisque ce groupement est très sensible à l'hydrogénolyse. De même, l'utilisation de conditions oxydantes telles que CAN n'a pas été couronnée de succès.

L'utilisation du groupement pivaloyloxyméthyle⁽¹⁵⁵⁾ a été récemment introduit par Sharpless pour ce type de cycle⁽¹⁵⁶⁾. Ce groupement s'est révélé facilement clivable par la soude 1M dans le méthanol, avec un rendement de 61 % (**45**). Les groupements Boc et Fmoc sont déprotégés sélectivement par HCl dans l'acétate d'éthyle et la pipéridine dans le DMF respectivement, avec des rendements de 44 et 53 % pour obtenir l'acide aminé libre **46** (Schéma 5.9). Si ces réactions sont assez rapides et permettent d'obtenir des produits bruts plutôt propres, la purification des acides aminés libres peut se révéler un peu problématique et se fait préférentiellement par chromatographie sur phase inverse ou trituration.

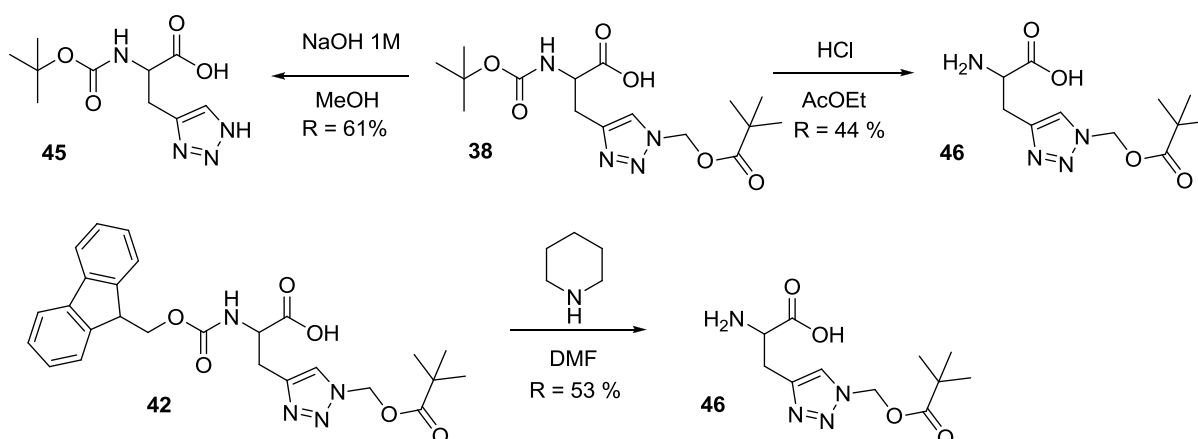


Schéma 5.9 Déprotections réalisées à partir des acides aminés POM-protégés **38** et **42**.

Ce travail constitue donc une méthode optimisée pour obtenir des acides aminés β -triazole analogues de l'histidine. De plus, l'acide aminé protégé orthogonalement Fmoc/Pom **42** devrait pouvoir être utilisé en synthèse peptidique. En plus de l'étude d'auto-assemblage, il pourrait être intéressant pour ses propriétés biologiques, puisque il s'agit d'un analogue de l'histidine qui possède des propriétés anti-oxydantes^(157,158).

II.5.3.3 Mécanismes réactionnels

II.5.3.3.1 Catalyse au cuivre

Le mécanisme réactionnel de la cyclisation de Huisgen catalysée au cuivre a été étudié par l'équipe de Sharpless, tout d'abord par calcul de type DFT (*Density Functional Theory*)⁽¹⁵⁹⁾, mettant en évidence plusieurs intermédiaires réactionnels originaux. Une étude cinétique est venue compléter ces calculs, montrant une cinétique d'ordre 2 pour le cuivre, ce qui peut être expliqué par un mécanisme à deux centres⁽¹⁶⁰⁾.

L'espèce catalytique Cu^{I} est formée par réduction de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ par l'ascorbate de sodium. Cette espèce, selon les auteurs, se dimérise pour former l'espèce réactive (Schéma 5.10).

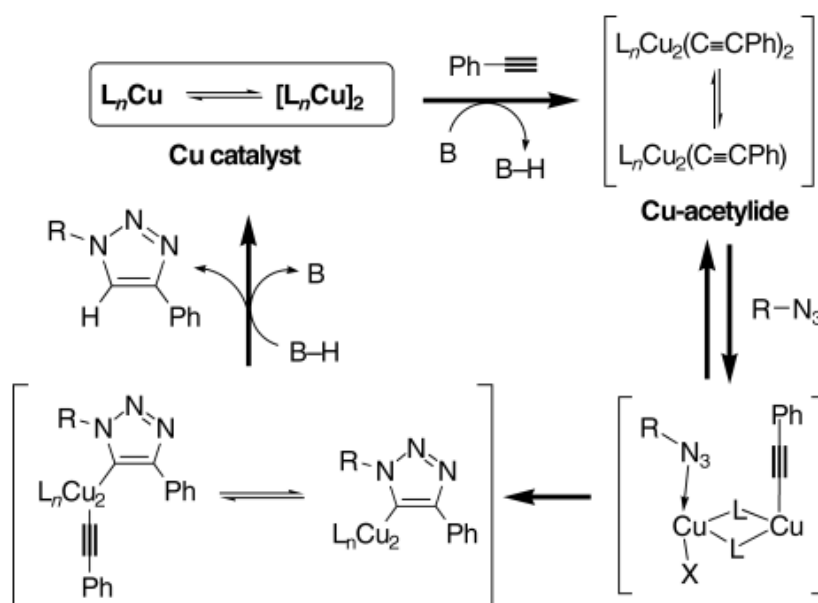


Schéma 5.10 Mécanisme de la cyclisation de Huisgen catalysée par le cuivre, tel que proposé dans la littérature⁽¹⁶⁰⁾.

Une espèce organométallique (*Cu-acetylide*, cuprate d'acétylure) est alors formée par insertion du cuivre sur un ou deux acétylénique(s), déplaçant un des ligands. L'intermédiaire

possédant un atome de cuivre libre peut alors complexer une molécule d'azoture afin de réaliser la cyclisation [3+2]. Le catalyseur est ensuite régénéré par protéolyse. Ce mécanisme est soutenu d'une part par les études cinétiques de l'équipe mais aussi par les calculs théoriques qui ont permis d'exclure la réaction directe de l'azoture sur l'organométallique cuivre-alcyne.

II.5.3.3.2 Catalyse au ruthénium

Ce mécanisme a été beaucoup moins étudié, cependant des auteurs ont en proposé un⁽¹⁵⁴⁾ (Schéma 5.11). Ils s'appuient sur le fait que la formation d'une espèce organométallique Ru-acétylène est peu probable, puisque les alcynes internes sont également réactifs. Une première complexation de l'azoture au métal est donc avancée, suivi de l'alcyne. L'espèce intermédiaire serait alors un ruthenacycle (Schéma 5.11 ; A ou B, A étant plus probable), qui subit une élimination réductrice permettant la régénération du catalyseur et la formation du produit attendu.

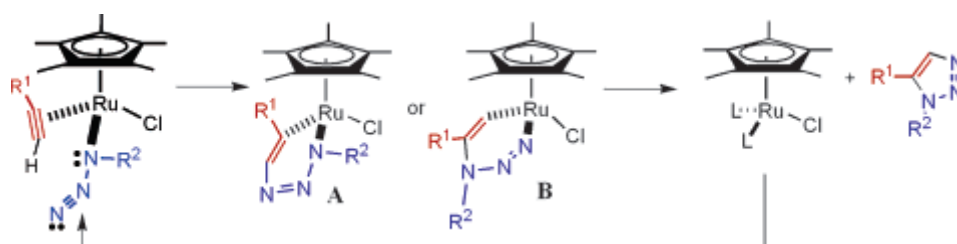


Schéma 5.11 Mécanisme supposé de la cyclisation de Huisgen catalysé par le Ruthénium, tel que proposé dans la littérature⁽¹⁵⁴⁾.

Ainsi la différence de régiosélectivité pourrait venir de la place du métal par rapport à la triple liaison.

En conclusion, trois synthèses d'acides aminés ont été réalisées (Tableau 5.2).

Deux d'entre elles ont fourni des acides aminés utilisés en synthèse peptidique. La première a fait appel à une réduction énantiosélective et la seconde au pool chiral afin d'obtenir un excès énantiomérique élevé de 93 et 94 % respectivement.

La dernière synthèse est une étude méthodologique débouchant sur une méthode optimisée pour l'obtention d'acides aminés β -triazole protégés de façon orthogonale. L'utilisation de ce type d'acides aminés au sein d'une séquence peptidique est possible mais nécessitera une synthèse à partir de la propargylglycine énantio pure.

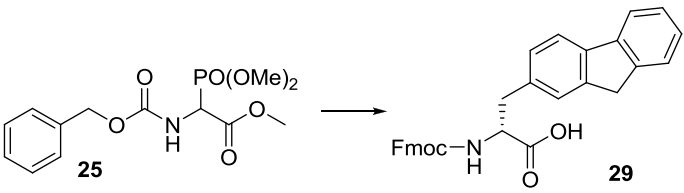
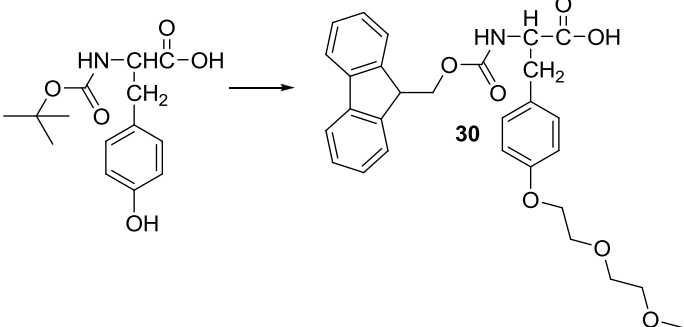
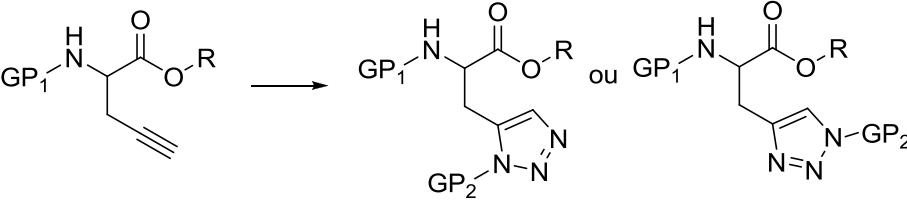
Synthèse	Étapes Rendements	Utilité
 <p>25 → 29</p>	5 étapes R = 52 % ee = 93 %	Synthèse du dérivé peptidique correspondant
 <p>→ 30</p>	4 étapes R = 35 % ee = 94 %	Synthèse du dérivé peptidique correspondant
 <p>GP₁ → GP₁ ou GP₁-GP₂</p>	1 étape 11 exemples R de 15 à 84 %	Nouvelles méthodologies pour la synthèse de dérivés d'histidine

Tableau 5.2 : Résumé des synthèses effectuées.

Conclusion

Une bibliothèque de vingt-quatre peptides analogues du lanréotide a été élaborée durant ce travail doctoral.

Une étude méthodologique a été nécessaire pour réaliser leur échange d'un sel de trifluoroacétate à un sel d'acétate : trois méthodes ont été évaluées et deux ont été validées. Un article concernant cette étude a été publié dans le *Journal of Peptide Science*. Cet article méthodologique démontre l'inefficacité de l'HPLC à réaliser un échange total dans les conditions étudiées. De plus, nous avons montré par la RMN et la spectroscopie infrarouge les performances d'une résine échangeuse d'ions et de la méthodologie de déprotonation-reprotonation des charges.

La caractérisation des propriétés d'auto-association des peptides issus de la bibliothèque a démontrée, pour certains d'entre-eux, un assemblage en nanotubes de diamètres monodisperses, de 10 à 35 nm. Il s'agit à notre connaissance du premier système permettant l'obtention de nanotubes organiques auto-assemblés de diamètres à la fois variables et monodisperses à être rapporté. Ces peptides sont encore en cours d'étude et fourniront sans doute de nouvelles informations concernant le mode d'assemblage de ces nanotubes. Ils font actuellement l'objet d'une demande de brevet.

L'étude d'assemblages mixtes nanotubes de peptides-nanotubes de carbone a permis d'établir une interaction positive entre le lanréotide, deux dérivés et les nanotubes de carbone multi-parois. De nouvelles expériences doivent être réalisées pour tenter d'obtenir de nouveaux matériaux hautement organisés.

Deux acides aminés non naturels ont été synthétisés pour cette étude : la β -fluorényl-D-alanine et l'éther de 2-(2-méthoxyéthoxy)-éthoxy de la D-tyrosine. Ces deux molécules ont été utilisées dans la synthèse des dérivés peptidiques correspondants.

Enfin, différentes β -triazolalanine protégées, analogues de l'histidine, ont également été synthétisées. Les stratégies utilisées sont tout à fait concurrentielles par rapport à la synthèse en sept étapes précédemment décrite : à partir de la propargylglycine protégée, le cycle triazole est obtenu par cyclisation de Huisgen en une étape grâce à une catalyse au cuivre ou au ruthénium selon le régioisomère désiré. L'obtention d'un acide aminé protégé orthogonalement Fmoc/Pom rend possible une utilisation en synthèse peptidique. Un article sur ce travail a été soumis pour publication.

Conclusion générale et perspective

L'approche chimique développée pour obtenir des nanotubes peptidiques satisfait donc en grande partie aux deux contraintes du dimensionnement des nano-objets : elle permet le choix du diamètre parmi une large gamme et cette dimension est monodisperse. Ces résultats sont obtenus pour la première fois à notre connaissance dans le domaine des nanotubes auto-assemblés.

De plus, les analogues synthétisés pourraient conduire à des développements dans les domaines médical, fondamental et technologique.

Dans le domaine médical, leurs propriétés de gélification pourraient être mises à profit pour développer de nouvelles applications. À cet effet, un peptide portant une chaîne diéthylène glycole a été synthétisé : ses capacités d'auto-assemblage seront évaluées afin d'évaluer l'effet de cette substitution.

Dans le domaine fondamental, ces assemblages utilisent un grand nombre d'interactions présentes dans les protéines : ils peuvent être considérés comme un modèle pour obtenir des informations concernant ces interactions ainsi que pour mesurer l'importance relative des caractéristiques structurales de la molécule. Une molécule fluorescente pourrait être greffée au bras espaceur du peptide synthétisé afin d'obtenir de nouvelles informations.

Dans le domaine technologique, l'utilisation du lanréotide en « gabarit » pour la synthèse de nanotubes de silice a déjà été réalisée par l'équipe de Franck Artzner. Un contrôle du diamètre de ces structures grâce aux dérivés synthétisés est envisageable. De plus, une fonctionnalisation adéquate pourrait ajouter de nouvelles propriétés aux nanotubes de peptides ou de silice telles qu'une capacité de positionnement ou la complexation de métaux afin d'obtenir des nanotubes métalliques.

Enfin, de nouveaux paramètres pourraient être modifiés sur la séquence peptidique. Certains d'entre eux ont déjà conduit à la synthèse de dérivés originaux et font l'objet de recherches au sein des laboratoires de Maïté Paternostre et Franck Artzner.

Références bibliographiques

- (1) Martin, C. R.; Kohli, P. *The emerging field of nanotube biotechnology*. Nature Review Drug Discovery **2003**, 2 (1), 29-37.
- (2) Hartgerink, J. D.; Beniash, E.; Stupp, S. I. *Self-Assembly and Mineralization of Peptide-Amphiphile Nanofibers*. Science **2001**, 294 (5547), 1684-1688.
- (3) Bhushan, B. *Springer Handbook of Nanotechnology*, **2007**.
- (4) Kol, N.; Adler-Abramovich, L.; Barlam, D., *et al.* *Self-Assembled Peptide Nanotubes Are Uniquely Rigid Bioinspired Supramolecular Structures*. Nano Letters **2005**, 5 (7), 1343-1346.
- (5) Percec, V.; Dulcey, A. E.; Balagurusamy, V. S. K., *et al.* *Self-assembly of amphiphilic dendritic dipeptides into helical pores*. Nature **2004**, 430 (7001), 764-768.
- (6) Iijima, S. *Helical microtubules of graphitic carbon*. Nature **1991**, 354 (6348), 56-58.
- (7) Hughes, T. V.; Chambers, C. R. US Patent 405,480, **1889**.
- (8) Monthieux, M.; Kuznetsov, V. L. *Who should be given the credit for the discovery of carbon nanotubes?* Carbon **2006**, 44 (9), 1621-1623.
- (9) Reibold, M.; Paufler, P.; Levin, A. A., *et al.* *Materials: Carbon nanotubes in an ancient Damascus sabre*. Nature **2006**, 444 (7117), 286.
- (10) Ménard, C., Université Paris XI, Orsay, 2005.
- (11) www.nanotechnologies.qc.ca, **2005**.
- (12) Moore, J. S. *Shape-Persistent Molecular Architectures of Nanoscale Dimension*. Account of Chemical Research **1997**, 30 (10), 402-413.
- (13) Shimizu, T.; Masuda, M.; Minamikawa, H. *Supramolecular Nanotube Architectures Based on Amphiphilic Molecules*. Chemical Reviews **2005**, 105 (4), 1401-1444.
- (14) Harada, A.; Li, J.; Kamachi, M. *Synthesis of a tubular polymer from threaded cyclodextrins*. Nature **1993**, 364 (6437), 516-518.
- (15) Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Milligan, R. A., *et al.* *Self-assembling organic nanotubes based on a cyclic peptide architecture*. Nature **1993**, 366 324-327.
- (16) Qiao, J.; Zhang, X.; Meng, X., *et al.* *Morphology-controllable preparation of 1D poly(vinyl pyrrolidone) nanostructured arrays*. Nanotechnology **2005** (4), 433.
- (17) Graveland-Bikker, J. F.; Schaap, I. A. T.; Schmidt, C. F., *et al.* *Structural and Mechanical Study of a Self-Assembling Protein Nanotube*. Nano Letters **2006**, 6 (4), 616-621.
- (18) Couet, J.; Biesalski, M. *Conjugating self-assembling rigid rings to flexible polymer coils for the design of organic nanotubes*. Soft Matter **2006**, 2 (12), 1005-1014.
- (19) Yager, P.; Schoen, P. E. *Formation of Tubules by a Polymerizable Surfactant*. Molecular Crystals and Liquid Crystals **1984**, 106 (3-4), 371-381.
- (20) Spector, M. S.; Selinger, J. V.; Singh, A., *et al.* *Controlling the Morphology of Chiral Lipid Tubules*. Langmuir **1998**, 14 (13), 3493-3500.
- (21) Gao, X. Y.; Matsui, H. *Peptide-based nanotubes and their applications in bionanotechnology*. Advanced Materials **2005**, 17 (17), 2037-2050.
- (22) Bong, D. T.; Clark, T. D.; Granja, J. R., *et al.* *Self-Assembling Organic Nanotubes*. Angewandte Chemie International Edition **2001**, 40 988-1011.
- (23) Matile, S. *En route to supramolecular functional plasticity: artificial [small beta]-barrels, the barrel-stave motif, and related approaches*. Chemical Society Reviews **2001**, 30 (3), 158-167.

- (24) Leclair, S.; Baillargeon, P.; Skouta, R., *et al.* *Micrometer-sized hexagonal tubes self-assembled by a cyclic peptide in a liquid crystal.* *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43* (3), 349-353.
- (25) Rao, C. N. R.; Govindaraj, A. *Nanotubes and Nanowires*: Cambridge, **2005**.
- (26) Harutyunyan, A. R.; Chen, G.; Eklund, P. C. *Self-assembled growth of single-walled carbon nanotubes by pyrolysis of metalorganic precursor.* *Applied Physics Letters* **2003**, *82* (26), 4794-4796.
- (27) Rajagopal, K.; Schneider, J. P. *Self-assembling peptides and proteins for nanotechnological applications.* *Current Opinion in Structural Biology* **2004**, *14* (4), 480-486.
- (28) Lu, K.; Jacob, J.; Thiyagarajan, P., *et al.* *Exploiting Amyloid Fibril Lamination for Nanotube Self-Assembly.* *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (21), 6391-6393.
- (29) Raez, J.; Morales, J. G.; Fenniri, H. *Long-Range Flow-Induced Alignment of Self-Assembled Rosette Nanotubes on Si/SiO₂ and Poly(Methyl Methacrylate)-Coated Si/SiO₂.* *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (50), 16298-16299.
- (30) Dalgarno, S. J.; Cave, G. W. V.; Atwood, J. L. *Toward the Isolation of Functional Organic Nanotubes 13.* *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45* (4), 570-574.
- (31) Matsui, H.; Pan, S.; Gologan, B., *et al.* *Bolaamphiphiles Nanotube-Templated Metallized Wires.* *Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104* 9576-9579.
- (32) Reches, M.; Gazit, E. *Casting Metal Nanowires Within Discrete Self-Assembled Peptide Nanotubes.* *Science* **2003**, *300* 625-627.
- (33) Georger, J. H.; Singh, A.; Price, R. R., *et al.* *Helical and tubular microstructures formed by polymerizable phosphatidylcholines.* *Journal of the American Chemical Society* **1987**, *109* (20), 6169-6175.
- (34) Thomas, B. N.; Safinya, C. R.; Plano, R. J., *et al.* *Lipid Tubule Self-Assembly: Length Dependence on Cooling Rate Through a First-Order Phase Transition.* *Science* **1995**, *267* (5204), 1635-1638.
- (35) Yang, B.; Kamiya, S.; Yui, H., *et al.* *Effective Shortening in Length of Glycolipid Nanotubes with High Axial Ratios.* *Chemistry Letters* **2003**, *32* (12), 1146-1147.
- (36) Selinger, J. V.; MacKintosh, F. C.; Schnur, J. M. *Theory of cylindrical tubules and helical ribbons of chiral lipid membranes.* *Physical Review E* **1996**, *53* (4), 3804-3818.
- (37) Thomas, B. N.; Corcoran, R. C.; Cotant, C. L., *et al.* *Phosphonate Lipid Tubules. 1.* *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120* (47), 12178-12186.
- (38) Markowitz, M.; Singh, A. *Self-assembling properties of 1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphohydroxyethanol: a headgroup-modified diacetylenic phospholipid.* *Langmuir* **1991**, *7* (1), 16-18.
- (39) Markowitz, M. A.; Schnur, J. M.; Singh, A. *The influence of the polar headgroups of acidic diacetylenic phospholipids on tubule formation, microstructure morphology and Langmuir film behavior.* *Chemistry and Physics of Lipids* **1992**, *62* (2), 193-204.
- (40) Singh, A.; Wong, E. M.; Schnur, J. M. *Toward the Rational Control of Nanoscale Structures Using Chiral Self-Assembly: Diacetylenic Phosphocholines.* *Langmuir* **2003**, *19* (5), 1888-1898.
- (41) Ranganathan, D.; Haridas, V.; Sundari, C. S., *et al.* *Design, Synthesis, Crystal Structure, and Host-Guest Properties of Polymethylene-Bridged Cystine-Based Cyclobisamides: A Facile Entry into Hydrogen-Bonded Peptide Nanotubes.* *Journal of Organic Chemistry* **1999**, *64* (25), 9230-9240.

- (42) Khazanovich, N.; Granja, J. R.; McRee, D. E., *et al.* *Nanoscale Tubular Ensembles with Specified Internal Diameters. Design of a Self-Assembled Nanotube with a 13-Å Pore.* *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116* 6011-6012.
- (43) Masuda, M.; Shimizu, T. *Lipid Nanotubes and Microtubes: Experimental Evidence for Unsymmetrical Monolayer Membrane Formation from Unsymmetrical Bolaamphiphiles.* *Langmuir* **2004**, *20* (14), 5969-5977.
- (44) Lu, K.; Liang, G.; Metha, A. K., *et al.* *Macroscale assembly of peptide nanotubes.* *Chemical Communications* **2007** (26), 2729-2731.
- (45) Commoner, B.; Yamada, M.; Rodenberg, S. D., *et al.* *The Proteins Synthesized in Tissue Infected with Tobacco Mosaic Virus.* *Science* **1953**, *118* (3071), 529-534.
- (46) Fraenkelconrat, H.; Williams, R. C. *Reconstitution of Active Tobacco Mosaic Virus from Its Inactive Protein and Nucleic Acid Components.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **1955**, *41* (10), 690-698.
- (47) Namba, K.; Pattanayek, R.; Stubbs, G. *Visualization of Protein-Nucleic Acid Interactions in a Virus; Refined Structure of Intact Tobacco Mosaic Virus at 2,9 Å Resolution by X-Ray Fiber Diffraction.* *Journal of Molecular Biology* **1989**, *208* 307-325.
- (48) Namba, K.; Stubbs, G. *Structure of tobacco mosaic virus at 3.6 Å resolution: implications for assembly.* *Science* **1986**, *231* (4744), 1401-1406.
- (49) Butler, P. J. G. *Self-assembly of tobacco mosaic virus: the role of an intermediate aggregate in generating both specificity and speed.* *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **1999**, *354* (537-550).
- (50) Schlick, T. L.; Ding, Z.; Kovacs, E. W., *et al.* *Dual-Surface Modification of the Tobacco Mosaic Virus.* *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *127* 3718-3723.
- (51) Elgersma, R. C.; Meijneke, T.; Posthuma, G., *et al.* *Self-Assembly of Amylin(20-29) Amide-Bond Derivatives into Helical Ribbons and Peptide Nanotubes rather than Fibrils.* *Chemistry - A European Journal* **2006**, *12* (14), 3714-3725.
- (52) DeSantis, P.; Moretti, S.; Rizzo, R. *Conformational Analysis of Regular Enantiomeric Sequences.* *Macromolecules* **1974**, *7* (1), 52-58.
- (53) Tomasic, L.; Lorenzi, G. P. *Some Cyclic Oligopeptides with S_{2n} Symmetry.* *Helvetica Chimica Acta* **1987**, *70* 1012-1016.
- (54) Pavone, V.; Benedetti, E.; DiBlasio, B., *et al.* *Regularly Alternating L,D-Peptides. III. Hexacyclic Peptides from Valine or Phenylalanine.* *Biopolymers* **1989**, *28* 215-223.
- (55) Rovero, P.; Quartara, L.; Fabbri, G. *Synthesis of cyclic peptides on solid support.* *Tetrahedron Letters* **1991**, *32* (23), 2639-2642.
- (56) Hartgerink, J. D.; Granja, J. R.; Milligan, R. A., *et al.* *Self-Assembling Peptide Nanotubes.* *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118* (1), 43-50.
- (57) Nakanishi, T.; Okamoto, H.; Nagai, Y., *et al.* *Synthesis and atomic force microscopic observations of the single-peptide nanotubes and their micro-order assemblies.* *Physical Review B* **2002**, *66* 165417.
- (58) Gauthier, D.; Baillargeon, P.; Drouin, M., *et al.* *Self-Assembly of Cyclic Peptides into Nanotubes and Then into Highly Anisotropic Crystalline Materials 13.* *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40* (24), 4635-4638.
- (59) Ranganathan, D.; Haridas, V.; Gilardi, R., *et al.* *Self-Assembling Aromatic-Bridged Serine-Based Cyclodepsipeptides (Serinophanes): A Demonstration of Tubular Structures Formed through Aromatic π/π Interactions.* *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120* (42), 10793-10800.
- (60) Horne, W. S.; Stout, C. D.; Ghadiri, M. R. *A Heterocyclic Peptide nanotube.* *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (31), 9372-9372.

- (61) Ranganathan, D.; Lakshmi, C.; Karle, I. L. *Hydrogen-Bonded Self-Assembled Peptide Nanotubes from Cystine-Based Macrocyclic Bisureas*. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121* (26), 6103-6107.
- (62) Vauthey, S.; Santoso, S.; Gong, H., *et al.* *Molecular self-assembly of surfactant-like peptides to form nanotubes and nanovesicles*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **2002**, *99* (8), 5355-5360.
- (63) von Maltzahn, G.; Vauthey, S.; Santoso, S., *et al.* *Positively Charged Surfactant-like Peptides Self-assemble into Nanostructures*. *Langmuir* **2003**, *19* (10), 4332-4337.
- (64) Zhao, X.; Zhang, S. *Molecular designer self-assembling peptides*. *Chemical Society Reviews* **2006**, *35* (11), 1105-1110.
- (65) Kogiso, M.; Ohnishi, S.; Yase, K., *et al.* *Dicarboxylic Oligopeptide Bolaamphiphiles: Proton-Triggered Self-Assembly of Microtubes with Loose Solid Surface*. *Langmuir* **1998**, *14* 4978-4986.
- (66) Matsui, H.; Gologan, B. *Crystalline Glycylglycine Bolaamphiphile Tubules and Their pH-Sensitive Structural Transformation*. *Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104* (15), 3383-3386.
- (67) Douberly, G. E.; Pan, S.; Walters, D., *et al.* *Fabrication of Protein Tubules: Immobilization of Proteins on Peptide Tubules*. *Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105* (32), 7612-7618.
- (68) Görbitz, C. H. *Nanotube Formation by Hydrophobic Dipeptides*. *Chemistry - A European Journal* **2001**, *7* (23), 5153-5159.
- (69) Azriel, R.; Gazit, E. *Analysis of the Minimal-forming Fragment of the Islet Amyloid Polypeptide*. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276* (36), 34156-34161.
- (70) Reches, M.; Porat, Y.; Gazit, E. *Amyloid Fibril Formation by Pentapeptide and Tetrapeptide Fragments of Human Calcitonin*. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277* (38), 35475-35480.
- (71) Adler-Abramovich, L.; Gazit, E. *Controlled patterning of peptide nanotubes and nanospheres using inkjet printing technology*. *Journal of Peptide Science* **2008**, *14* (2), 217-223.
- (72) Sopher, N. B.; Abrams, Z. R.; Reches, M., *et al.* *Integrating peptide nanotubes in micro-fabrication processes*. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2007** (11), 2360.
- (73) Reches, M.; Gazit, E. *Formation of Closed-Cage Nanostructures by Self-Assembly of Aromatic Dipeptides*. *Nano Letters* **2004**, *4* (4), 581-585.
- (74) Niu, L.; Chen, X.; Allen, S., *et al.* *Using the Bending Beam Model to Estimate the Elasticity of Diphenylalanine Nanotubes*. *Langmuir* **2007**, *23* (14), 7443-7446.
- (75) Adler-Abramovich, L.; Reches, M.; Sedman, V. L., *et al.* *Thermal and Chemical Stability of Diphenylalanine Peptide Nanotubes: Implications for Nanotechnological Applications*. *Langmuir* **2006**, *22* (3), 1313-1320.
- (76) Song, Y. J.; Challa, S. R.; Medforth, C. J., *et al.* *Synthesis of peptide-nanotube platinum-nanoparticle composites*. *Chemical Communications* **2004** (9), 1044-1045.
- (77) Whitesides, G. M.; Boncheva, M. *Supramolecular Chemistry And Self-assembly Special Feature: Beyond molecules: Self-assembly of mesoscopic and macroscopic components*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **2002**, *99* (8), 4769-4774.
- (78) Whitesides, G.; Mathias, J.; Seto, C. *Molecular self-assembly and nanochemistry: a chemical strategy for the synthesis of nanostructures*. *Science* **1991**, *254* (5036), 1312-1319.
- (79) Douglas Philip; Stoddart, J. F. *Self-Assembly in Natural and Unnatural Systems*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35* (11), 1154-1196.

- (80) Lehn, J.-M. *Dynamers: dynamic molecular and supramolecular polymers*. Progress in Polymer Science Plenary Lectures **2005**, 30 (8-9), 814-831.
- (81) Whitesides, G. M.; Grzybowski, B. *Self-Assembly at All Scales*. Science **2002**, 295 (5564), 2418-2421.
- (82) Lehn, J.-M. *Supramolecular Chemistry And Self-assembly Special Feature: Toward complex matter: Supramolecular chemistry and self-organization*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **2002**, 99 (8), 4763-4768.
- (83) Williams, D. H.; Westwell, M. S. *Aspects of weak interactions*. Chemical Society Reviews **1998**, 27 (1), 57-63.
- (84) Shimizu, T. *Self-assembled organic nanotubes: Toward attoliter chemistry*. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry **2008**, 46 (8), 2601-2611.
- (85) Lawrence, D. S.; Jiang, T.; Levett, M. *Self-Assembling Supramolecular Complexes*. Chemical Reviews **1995**, 95 (6), 2229-2260.
- (86) Anslyn, E. V.; Dougherty, D. A. *Modern Physical Organic Chemistry*; University Science Books: Sausalito, CA, **2006**.
- (87) Sherrington, D. C.; Taskinen, K. A. *Self-assembly in synthetic macromolecular systems via multiple hydrogen bonding interactions*. Chemical Society Reviews **2001**, 30 (2), 83-93.
- (88) Holmes, T. C.; Sonsoles, d. L.; Xing, S., *et al.* *Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **2000**, 97 (12), 6728-6733.
- (89) Hunter, C. A.; Lawson, K. R.; Perkins, J., *et al.* *Aromatic interactions*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2 **2001** (5), 651-669.
- (90) Burley, S. K.; Petsko, G. A. *Aromatic-Aromatic Interaction - a Mechanism of Protein-Structure Stabilization*. Science **1985**, 229 (4708), 23-28.
- (91) Tsuzuki, S.; Honda, K.; Uchamaru, T., *et al.* *Origin of Attraction and Directionality of the pi-pi Interaction: Model Chemistry Calculations of Benzene Dimer Interaction*. Journal of the American Chemical Society **2002**, 124 (1), 104-112.
- (92) Smithrud, D. B.; Diederich, F. *Strength of molecular complexation of apolar solutes in water and in organic solvents is predictable by linear free energy relationships: a general model for solvation effects on apolar binding*. Journal of the American Chemical Society **1990**, 112 (1), 339-343.
- (93) Scott Lokey, R.; Iverson, B. L. *Synthetic molecules that fold into a pleated secondary structure in solution*. Nature **1995**, 375 (6529), 303-305.
- (94) Nurit Ashkenasy, W. S. H., M. Reza Ghadiri, *Design of Self-Assembling Peptide Nanotubes with Delocalized Electronic States* **13**. Small **2006**, 2 (1), 99-102.
- (95) Widom, B.; Bhimalapuram, P.; Koga, K. *The hydrophobic effect*. Physical Chemistry Chemical Physics **2003**, 5 (15), 3085-3093.
- (96) Leo, A.; Hansch, C.; Elkins, D. *Partition coefficients and their uses*. Chemical Review **1971**, 71 (6), 525-616.
- (97) Pratt, L. R.; Pohorille, A. *Hydrophobic Effects and Modeling of Biophysical Aqueous Solution Interfaces*. Chemical Reviews **2002**, 102 (8), 2671-2692.
- (98) Ghadiri, M. R.; Kobayashi, K.; Granja, J. R., *et al.* *The Structural and Thermodynamic Basis for the Formation of Self-Assembled Peptide Nanotubes*. Angewandte Chemie International Edition **1995**, 34 (1), 93-95.
- (99) Amorin, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *New Cyclic Peptide Assemblies with Hydrophobic Cavities: The Structural and Thermodynamic Basis of a New Class of Peptide Nanotubes*. Journal of the American Chemical Society **2003**, 125 (10), 2844-2845.

- (100) Rehm, T.; Schmuck, C. *How to achieve self-assembly in polar solvents based on specific interactions? Some general guidelines*. Chemical Communications **2008** (7), 801-813.
- (101) Motesharei, K.; Ghadiri, M. R. *Diffusion-Limited Size-Selective Ion Sensing Based on SAM-supported Peptide Nanotubes*. Journal of the American Chemical Society **1997**, *119* (46), 11306-11312.
- (102) Kim, H. S.; Hartgerink, J. D.; Ghadiri, M. R. *Oriented Self Assembly of Cyclic Peptide Nanotubes in Lipid Membranes*. Journal of the American Chemical Society **1998**, *120* (18), 4417-4424.
- (103) Nabedryk, E.; Gingold, M. P.; Breton, J. *Orientation of gramicidin A transmembrane channel. Infrared dichroism study of gramicidin in vesicles*. Biophysical Journal **1982**, *38* (3), 243-249.
- (104) Matsui, H.; Porrata, P.; Douberly, G. E. *Protein Tubule Immobilization on Self-Assembled Monolayers on Au Substrates*. Nano Letters **2001**, *1* (9), 461-464.
- (105) Yang, L.; Nuraje, N.; Bai, H., *et al.* *Crossbar assembly of antibody-functionalized peptide nanotubes via biomimetic molecular recognition*. Journal of Peptide Science **2008**, *14* (2), 203-209.
- (106) Reches, M.; Gazit, E. *Controlled patterning of aligned self-assembled peptide nanotubes*. Nature Nanotechnology **2006**, *1* (3), 195-200.
- (107) Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Buehler, J. R. *Artificial transmembrane ion channels from self-assembling peptide nanotubes*. Nature **1994**, *369* 301-304.
- (108) Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. *Channel-Mediated Transport of Glucose across Lipid Bilayers*. Journal of the American Chemical Society **1994**, *116* (23), 10785-10786.
- (109) Sanchez-Quesada, J.; Kim, H. S.; Ghadiri, M. R. *A Synthetic Pore-Mediated Transmembrane Transport of Glutamic Acid*. Angewandte Chemie International Edition **2001**, *40* (13), 2503-2506.
- (110) Sanchez-Ouesada, J.; Isler, M. P.; Ghadiri, M. R. *Modulating ion channel properties of transmembrane peptide nanotubes through heteromeric supramolecular assemblies*. Journal of the American Chemical Society **2002**, *124* (34), 10004-10005.
- (111) Fernandez-Lopez, S.; Kim, H.-S.; Choi, E. C., *et al.* *Antibacterial agents based on the cyclic D,L- α -peptide architecture*. Nature **2001**, *412* 452-455.
- (112) Horne, W. S.; Wiethoff, C. M.; Cui, C., *et al.* *Antiviral cyclic d,l-[alpha]-peptides: Targeting a general biochemical pathway in virus infections*. Bioorganic & Medicinal Chemistry - Symposium-in-Print: Chemistry and Biology of Natural Products - Tetrahedron Prize for Creativity in Organic Chemistry 2004: K. Nakanishi **2005**, *13* (17), 5145-5153.
- (113) Yu, L. T.; Banerjee, I. A.; Gao, X. Y., *et al.* *Fabrication and application of enzyme-incorporated peptide nanotubes*. Bioconjugate Chemistry **2005**, *16* (6), 1484-1487.
- (114) Cho, E. C.; Choi, J.-W.; Lee, M., *et al.* *Fabrication of an electrochemical immunosensor with self-assembled peptide nanotubes*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **2008**, *313-314* 95-99.
- (115) Yemini, M.; Reches, M.; Rishpon, J., *et al.* *Novel electrochemical biosensing platform using self-assembled peptide nanotubes*. Nano Letters **2005**, *5* (1), 183-186.
- (116) Yemini, M.; Reches, M.; Gazit, E., *et al.* *Peptide nanotube-modified electrodes for enzyme-biosensor applications*. Analytical Chemistry **2005**, *77* (16), 5155-5159.
- (117) Shenton, W.; Douglas, T.; Young, M., *et al.* *Inorganic-Organic Nanotubes Composites from Template Mineralization of Tobacco Mosaic Virus*. Advanced Materials **1999**, *11* (3), 253-256.
- (118) Dujardin, E.; Peet, C.; Stubbs, G., *et al.* *Organization of Metallic Nanoparticles Using Tobacco Mosaic Virus Templates*. Nano Letters **2003**, *3* (3), 413-417.

- (119) Fowler, C. E.; Shenton, W.; Stubbs, G., *et al.* *Tobacco Mosaic Virus Liquid Crystals as Templates for the Interior Design of Silica Mesophases and Nanoparticles*. *Advanced Materials* **2001**, *13* (16), 1266-1269.
- (120) Banerjee, I. A.; Yu, L.; Matsui, H. *Room-Temperature Wurtzite ZnS Nanocrystal Growth on Zn Finger-like Peptide Nanotubes by Controlling Their Unfolding Peptide Structures*. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (46), 16002-16003.
- (121) Kalifa, I.; Reches, M.; Sopher, N., *et al.* 2005; 1509-1512 Vol. 1502.
- (122) Carny, O.; Shalev, D. E.; Gazit, E. *Fabrication of coaxial metal nanocables using a self-assembled peptide nanotube scaffold*. *Nano Letters* **2006**, *6* (8), 1594-1597.
- (123) Horne, W. S.; Ashkenasy, N.; Ghadiri, M. R. *Modulating Charge Transfer through Cyclic-alpha-Peptide Self-Assembly*. *Chemistry - A European Journal* **2005**, *11* (4), 1137-1144.
- (124) *L'acromégalie*, *Maladies Rares Info Services* **2007**.
- (125) Berginer, V. M. *Neurological aspects of the David-Goliath battle: restriction in the giant's visual field*. *Israel Medical Association Journal* **2000**, *2* (9), 725-727.
- (126) Cherif-Cheikh, R. WO1998/024504, **1998**.
- (127) Valéry, C.; Artzner, F.; Robert, B., *et al.* *Self-Association Process of a Peptide in Solution: From {beta}-Sheet Filaments to Large Embedded Nanotubes*. *Biophysical Journal* **2004**, *86* (4), 2484-2501.
- (128) Valéry, C.; Paternostre, M.; Robert, B., *et al.* *Biomimetic organization: Octapeptide self assembly into nanotubes of viral capsid-like dimension*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **2003**, *100* (18), 10258-10262.
- (129) Pandit, A.; Fay, N.; Bordes, L., *et al.* *Self-assembly of the octapeptide lanreotide and lanreotide-based derivatives: the role of the aromatic residues*. *Journal of Peptide Science* **2008**, *14* (1), 66-75.
- (130) Valéry, C.; Pouget, E.; Pandit, A., *et al.* *Molecular Origin of the Self-Assembly of Lanreotide into Nanotubes: A Mutational Approach*. *Biophysical Journal* **2008**, *94* (5), 1782-1795.
- (131) Kamber, B.; Hartmann, A.; Eisler, K., *et al.* *The Synthesis of Cystine Peptides by Iodine Oxidation of S-Trityl-Cysteine and S-Acetamidomethyl-Cysteine Peptides*. *Helvetica Chimica Acta* **1980**, *63* (4), 899-915.
- (132) Roux, S.; Zékri, E.; Rousseau, B., *et al.* *Elimination and exchange of trifluoroacetate counter-ion from cationic peptides: a critical evaluation of different approaches*. *Journal of Peptide Science* **2008**, *14* (3), 354-359.
- (133) Sani, M.-A.; Loudet, C.; Gröbner, G., *et al.* *Pro-apoptotic bax-alpha1 synthesis and evidence for beta-sheet to alpha-helix conformational change as triggered by negatively charged lipid membranes*. *Journal of Peptide Science* **2007**, *13* (2), 100-106.
- (134) Shen, C. L.; Fitzgerald, M. C.; Murphy, R. M. *Effect of Acid Predissolution on Fibril Size and Fibril Flexibility of Synthetic Beta-Amyloid Peptide*. *Biophysical Journal* **1994**, *67* (3), 1238-1246.
- (135) Andrushchenko, V. V.; Vogel, H. J.; Prenner, E. J. *Optimization of the hydrochloric acid concentration used for trifluoroacetate removal from synthetic peptides*. *Journal of Peptide Science* **2007**, *13* (1), 37-43.
- (136) Zhu, X.; Uchikoshi, T.; Suzuki, T. S., *et al.* *Effect of Polyethylenimine on Hydrolysis and Dispersion Properties of Aqueous Si₃N₄ Suspensions*. *Journal of the American Ceramic Society* **2007**, *90* (3), 797-804.
- (137) *Ion-Pairing Comparison Study*, *Michrom* **2000**.

- (138) Pinault, M.; Pichot, V.; Khodja, H., *et al.* Evidence of Sequential Lift in Growth of Aligned Multiwalled Carbon Nanotube Multilayers. *Nano Letters* **2005**, 5 (12), 2394-2398.
- (139) Pinault, M.; Mayne-L'Hermite, M.; Reynaud, C., *et al.* Growth of multiwalled carbon nanotubes during the initial stages of aerosol-assisted CCVD. *Carbon* **2005**, 43 (14), 2968-2976.
- (140) Pinault, M.; Mayne-L'Hermite, M.; Reynaud, C., *et al.* Carbon nanotubes produced by aerosol pyrolysis: growth mechanisms and post-annealing effects. *Diamond and Related Materials* **2004**, 13 (4-8), 1266-1269.
- (141) O'Connell, M. J.; Bachilo, S. M.; Huffman, C. B., *et al.* Band Gap Fluorescence from Individual Single-Walled Carbon Nanotubes. *Science* **2002**, 297 (5581), 593-596.
- (142) Besselièvre, F.; CEA Saclay-Université Paris 5, **2006**.
- (143) Barco, A.; Benetti, S.; Pollini, G. P., *et al.* A new, elegant route to a key intermediate for the synthesis of 9(0)-methanoprostacyclin. *Journal of Organic Chemistry* **1980**, 45 (23), 4776-4778.
- (144) Wang, W.; Xiong, C.; Zhang, J., *et al.* Practical, asymmetric synthesis of aromatic-substituted bulky and hydrophobic tryptophan and phenylalanine derivatives. *Tetrahedron* **2002**, 58 (15), 3101-3110.
- (145) R. L. Huguenin, R. A. B. 27. Synthèse de la (N-méthyl-Tyr)²-oxytocine. *Helvetica Chimica Acta* **1961** (44), 213.
- (146) Wünsch, E.; Fries, G.; Zwick, A. Darstellung und peptidsynthetische Verwendung von O-benzyl-L-tyrosin. *Chemische Berichte* **1958** (91), 542.
- (147) Solar, S. L.; Schumaker, R. Selective O-Alkylation of Tyrosine. *Journal of Organic Chemistry* **1966**, 31 (6), 1996-&.
- (148) Kitamura, S.; Fukushi, H.; Miyawaki, T., *et al.* Novel Non-Peptide GPIIb/IIIa Antagonists: Synthesis and Biological Activities of 2-[4-[2-(4-Amidinobenzoylamino)-2-(substituted)acetyl]-3-(2-methoxy-2-oxoethyl)-2-oxopiperazinyl]acetic Acids. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2001**, 49 (3), 258-267.
- (149) Stahl, G. L.; Walter, R.; Smith, C. W. General procedure for the synthesis of mono-N-acetylated 1,6-diaminohexanes. *Journal of Organic Chemistry* **1978**, 43 (11), 2285-2286.
- (150) Paquet, A. Introduction of 9-fluorenylmethoxycarbonyl, trichloroethoxycarbonyl, and benzyloxycarbonyl amine protecting groups into -O-unprotected hydroxyamino acids using succinimidyl carbonates. *Canadian Journal of Chemistry* **1982**, 60 976.
- (151) Ikeda, Y.; Kawahara, S.; Taki, M., *et al.* Synthesis of a novel histidine analogue and its efficient incorporation into a protein in vivo. *Protein Engineering* **2003**, 16 (9), 699-706.
- (152) Kuijpers, B.; Dijkmans, G.; Groothuys, S., *et al.* Copper(I)-Mediated Synthesis of Trisubstituted 1,2,3-Triazoles. *Synlett* **2005** (20), 3059-3062.
- (153) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions*. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, 40 (11), 2004-2021.
- (154) Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P., *et al.* Ruthenium-Catalyzed Cycloaddition of Alkynes and Organic Azides. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127 (46), 15998-15999.
- (155) Rasmussen, M.; Leonard, N. J. Synthesis of 3-(2'-deoxy-D-erythro-pentofuranosyl)adenine. Application of a new protecting group, pivaloyloxymethyl(Pom). *Journal of the American Chemical Society* **1967**, 89 (21), 5439-5445.

- (156) Loren, J.; Krasiski, A.; Fokin, V., *et al.* *NH-1,2,3-Triazoles from Azidomethyl Pivalate and Carbamates: Base-Labile N-Protecting Groups*. *Synlett* **2005** (18), 2847-2850.
- (157) Kim, N. H.; Kang, J. H. *Protective effects of histidine dipeptides on the modification of neurofilament-L by the cytochrome c/hydrogen peroxide system*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **2007**, *40* (1), 125-129.
- (158) Brik, A.; Alexandratos, J.; Lin, Y.-C., *et al.* *1,2,3-Triazole as a Peptide Surrogate in the Rapid Synthesis of HIV-1 Protease Inhibitors*. *ChemBioChem* **2005**, *6* (7), 1167-1169.
- (159) Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R., *et al.* *Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates*. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (1), 210-216.
- (160) Rodionov, V. O.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. *Mechanism of the ligand-free Cu-I-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction*. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44* (15), 2210-2215.

III^{ème} partie : Partie expérimentale

III.1 Généralités

III.1.1 Produits chimiques

Les acides aminés sont achetés chez Bachem (Weil am Rhein, Allemagne), Fluka (Buchs, Suisse), Acros Organics (Geel, Belgique) et NeomPS (Strasbourg, France). Les autres produits chimiques proviennent de Aldrich (St Louis, Etats-Unis) et de Fluka.

La résine de synthèse peptidique est obtenue chez Novabiochem, division de Merck Bioscience (Schwalbach, Allemagne). La résine échangeuse d'ions provient des laboratoires Bio-Rad (Hercules, Etats-Unis).

L'eau utilisée est doublement désionisée par un système échangeur Milli-Q Plus de Millipore (Billerica, Etats-Unis). Les solvants pour les synthèses et pour les purifications sont achetés chez Aldrich et VWR (West Chester, Etats-Unis) et, sauf mention contraire, sont utilisés sans purification.

III.1.2 Equipements

- **HPLC-MS**

Le système est de marque Waters (2525) avec dégazeur en ligne et système d'injection automatisé (2767). L'élution consiste en un gradient d'eau et d'acétonitrile, avec 0,1 % d'acide formique pendant 25 min, de 95 % d'eau à 100 % d'acétonitrile, suivi de 5 min de 100 % acétonitrile. La détection des espèces éluées se fait par une barrette de diodes (2996), un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) et un spectromètre de masse (voir ci-après). La colonne est de type phase inverse, greffée C₁₈, modèle X-Bridge 100 x 4.6 mm avec une taille de particules de 3,5 µm et une taille de pores de 13,5 nm. Le débit est réglé à 1 ml min⁻¹ et le volume d'injection à 20 µl.

Le spectromètre de masse est un Micromass ZQ de marque Waters. L'ionisation se fait par électrospray, avec une température de la source de 120 °C et une tension de cône de 20 V. L'échantillon est introduit de façon continue à 0,3 ml min⁻¹. L'analyseur est de type quadripôle (modèle ZQ2000). Les spectres sont enregistrés à l'aide du logiciel Mass Lynx 4.0 dans le domaine de m/z 100-1000 pour les molécules organiques et 100-2000 pour les peptides.

- **HPLC-préparative**

Deux systèmes sont utilisés pour la purification de peptides. Le système précédemment décrit équipé d'une colonne type phase inverse, greffée C₁₈, modèle X-Bridge 150 x 19 mm avec une taille de particules de 5 µm et une taille de pores de 13,5 nm. Le débit est de 17 ml min⁻¹.

Le deuxième système est un Waters 2545 similaire au précédent, non équipé d'un spectromètre de masse. La colonne est une Thermo Hypurity, de type phase inverse (greffée C₁₈) de taille 21,2 × 250 mm. L'élution est effectuée par un mélange d'eau et d'acétonitrile avec 0,1 % de TFA à un débit de 20 ml min⁻¹.

Les deux systèmes de HPLC préparative sont utilisés en mode isocratique après détermination des conditions optimales.

- **Analyses RMN**

Les analyses par résonance magnétique nucléaire sont réalisées sur un spectromètre Bruker Advance 400 Ultrashield. Les fréquences d'analyse sont de 400 MHz pour le proton, 376,4 MHz pour le fluor 19 et 100 MHz pour le carbone 13.

Les spectres de RMN du fluor sont enregistrés avec une séquence d'une seule impulsion de 90 ° et de durée 19,5 μs. La taille de fenêtre est de 7,5 kHz, le temps de relaxation de 2 s et le temps d'acquisition de 0,87 s. Seize balayages sont réalisés à chaque analyse.

Les spectres sont enregistrés à température ambiante, les déplacements chimiques sont exprimés en ppm et les constantes de couplage en Hz. La multiplicité est donnée de la façon suivante : s = singulet, ls = large singulet, d = doublet, ld = large doublet, dd = doublet de doublets, ddd = doublet de doublets dédoublés, t = triplet, lt = large triplet, q = quadruplet, qd = quadruplet dédoublé, m = multiplet, M = massif.

- **Analyses HRMS**

Les mesures de masse exacte ont été effectuées sur un spectromètre de masse à temps de vol (LCT de Micromass[®], UK), muni d'une source electrospray (source Z-spray) en mode positif. La référence externe permettant la mesure de masse exacte est introduite simultanément de l'échantillon et de façon continue (configuration LocksprayTM). Celle ici utilisée est la Leucine Enképhaline qui donne un ion [M+Na]⁺ à m/z = 578,2591.

La résolution de cet appareil est de 6500 et les résultats sont donnés avec un écart par rapport à la masse théorique inférieur à 5 mDa.

L'appareil est piloté par le logiciel Masslynx 4.0[®]

L'échantillon solubilisé dans l'eau est injecté dans un flux 50% eau-50% méthanol via une HPLC munie d'un passeur automatique d'échantillons (Alliance 2795 de Waters[®], UK) à un débit de 200 μl min⁻¹.

Le volume d'injection est de 10 μl.

La tension du capillaire est de 2800 V.

La tension de cône est de 40 V.

La température de la source est de 120 °C.

La température de désolvatation est de 250 °C.

Le débit du gaz de désolvatation (azote) est de 500 l h⁻¹.

Le débit du gaz de cône (azote) est de 20 l h⁻¹.

TDC Stop : 100 mV

- **Spectrométrie IR**

Les spectres infrarouges des peptides sont enregistrés par réflexion totale atténuée et par transformée de Fourier. L'appareil est un Bruker IFS 66 équipé d'un module 45°N Znse ATR, purgé en continu avec de l'azote. 10 μ L de solution sont déposés sur le cristal et trente balayages sont moyennés à une résolution de 4 cm^{-1} .

Le signal de l'eau est soustrait du spectre brut grâce au logiciel OPUS 4.2.

- **Lyophilisateur**

Le lyophilisateur utilisé est un Christ Alpha 2-4 LD plus connecté à une pompe à palette permettant d'atteindre des vides d'environ 15 μ bar. Les échantillons aqueux sont solidifiés dans l'azote liquide avant d'être connectés à cet appareil.

- **Microscopie**

MET : Microscope Phillips CM-20 opérant à 200 kV.

MEB : Léo-Gémini, *field emission gun* (canon à émission de champ).

- **Centrifugeuse**

Eppendorf Centrifuge 5804.

- **Bains ultra-sons**

Branson 5210 et Prolabo Elma D-78224.

III.2 Synthèse sur phase solide

III.2.1 Procédure générale pour la synthèse de peptides

La synthèse comporte 4 étapes principales :

- **Mouillage de la résine :**

La résine Rink Amide MBHA est introduite dans une seringue munie d'un verre fritté, d'un robinet à une extrémité et d'un bouchon à l'autre. Cette synthèse est remplie avec de la NMP et le mélange est mis sous agitation douce pendant 1 h. Le solvant est ensuite éliminé par filtration.

- Couplage des acides aminés

Cette étape consiste en une déprotection du groupement protecteur Fmoc et au couplage de l'acide aminé suivant. Entre chaque étape, on procède à trois lavages de la résine par la NMP (10 ml/g de résine).

- Déprotection

La déprotection est réalisée en trois traitements par de la pipéridine dans la NMP (20 % v/v), 5 ml/g de résine suivis par trois lavages à la NMP (10 ml/g de résine). Afin de suivre la réaction, 5 µl du filtrat correspondant au premier traitement, puis 10 µl des deux suivants, ainsi que le premier lavage, soit 4 échantillons, sont introduits dans 2 ml de pipéridine avant mesure de l'absorbance UV à 290 nm.

- Couplage

L'acide aminé (2 eq.) est introduit avec le HOBt (2,2 eq.) et le DIC (2,2 eq.) dans la NMP (5 ml/g de résine) dans un tube à essai et agité quelques minutes. Il est ensuite mis en présence de la résine dans la seringue. Le mélange réactionnel est agité pendant 1 h 30 puis filtré. L'acide aminé et les réactifs de couplage frais (2 eq.) sont à nouveau introduits et le milieu est de nouveau agité pendant 1 h 30.

Afin de suivre la réaction, quelques billes de résine sont prélevées et introduites dans un petit tube en verre, dans lequel est ajouté une goutte de ninhydrine en solution à 5 % dans l'éthanol (m/v), une goutte de phénol à 80 % dans l'éthanol (m/v) et une goutte de KCN 0,001 M dans la pyridine. Le tube est légèrement agité et chauffé à 120 °C pendant 5 min. Une coloration bleue indique la présence de groupements amine, c'est-à-dire une réaction non-terminée.

- Formation du pont disulfure

Le pont disulfure est formé en trois traitements par du diiode 1 eq dans la NMP (5 ml/g de résine) pendant respectivement 2 min, 3 min et 5 min. La résine est ensuite lavée 5 fois par du DCM et 5 fois par de la NMP afin d'éliminer l'excès d'iode retenu dans la résine (10 ml/g de résine). Le succès des lavages est visible à la couleur de la résine, qui de marron doit redevenir jaune pâle.

- Clivage

La résine doit être préparée au clivage par deux lavages à la NMP, deux lavages au méthanol, deux lavages au dichlorométhane et deux lavages à l'éther diéthylique (10 ml par gramme de résine). La résine est ensuite mise sous vide pendant une journée.

Le clivage se fait dans un ballon en verre muni d'un agitateur magnétique. Le mélange réactionnel est formé de TFA (10 ml/g de résine) ainsi que de TIS et de l'eau (3 % et 2 % v/v). La réaction est agitée 4 h à température ambiante.

Le milieu est ensuite filtré sur verre fritté et le solide lavé deux fois par le TFA. Le filtrat est ensuite évaporé pour obtenir un liquide blanc très épais. Celui-ci est dissous dans un mélange eau-acétonitrile 1:1 afin d'être lyophilisé.

III.2.2 Purification

Après lyophilisation, le peptide brut contient encore un excès de TFA. Il est analysé par HPLC-MS afin d'évaluer approximativement la pureté et la présence de sous produits.

Le peptide doit être dissous dans un mélange eau-acétonitrile pour être injecté en HPLC préparative. Une étude de solubilité est d'abord réalisée sur une petite quantité. Elle permet d'établir le pourcentage d'acétonitrile optimal et la quantité maximale de peptide. Un pourcentage d'acétonitrile le plus faible possible avec une concentration de peptide très élevée et une solution résultante limpide constituent des conditions idéales.

A titre d'exemple, la solubilité du dérivé 4-*para*-fluorophénylalanine **7** a été établie à 49 g l⁻¹ dans une solution eau-acétonitrile 58:42.

Après purification, les fractions contenant le peptide purifié sont rassemblées et évaporées sous vide.

III.2.3 Échange d'ions

Le peptide est dissous dans l'eau et échangé selon la procédure décrite au paragraphe 3.2. Il est ensuite lyophilisé.

III.2.4 Caractérisation

La caractérisation des dérivés peptidiques synthétisés est réalisée par trois techniques : la HPLC, la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) et la RMN du proton.

- [H-D-2-Nal¹-cyclo(Cys²-Tyr³-**D-His**⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂]
• 2 CH₃COOH (**1**)

HPLC t_r = 6,3 min

¹H RMN (400 Mhz, D₂O): δ 0,90 (d, *J* = 6,6, 3H); 0,94 (d, *J* = 6,6, 3H); 1,02-1,14 (M, 2H); 1,17 (d, *J* = 6,6, 3H); 1,51-1,64 (M, 3H); 1,83-1,90 (m, 1H); 1,91 (s, 6H); 2,10-2,18 (m, 1H); 2,53 (dd, *J* = 14,6, *J* = 4,4, 1H); 2,60 (dd, *J* = 14,8, *J* = 9,5, 1H); 2,70 (dd, *J* = 14,6, *J* = 4,4, 1H); 2,75 (dd, *J* = 14,4, *J* = 4,2, 1H); 2,84-2,94 (M, 5H); 2,99 (dd, *J* = 15,2, *J* = 7,2, 1H); 3,36 (dd, *J* = 13,9, *J* = 8,6, 1H); 3,46 (dd, *J* = 13,8, *J* = 5,7, 1H); 4,04 (d, *J* = 9,7, 1H); 4,13-4,23 (M, 2H); 4,26-4,32 (M, 2H); 4,40 (dd, *J* = 8,7, *J* = 5,9, 1H); 4,55 (t, *J* = 7,7, 1H); 4,86 (dd,

$J = 9,6, J = 4,4, 1\text{H}$); 4,92 (dd, $J = 10,4, J = 4,6, 1\text{H}$); 6,74 (d, $J = 8,6, 2\text{H}$); 7,01 (d, $J = 1,3, 1\text{H}$); 7,04 (d, $J = 8,6, 2\text{H}$); 7,46 (dd, $J = 8,5, J = 1,7, 1\text{H}$); 7,52 (ddd, $J = 6,7, J = 4,4, J = 1,6, 1\text{H}$); 7,53 (ddd, $J = 6,7, J = 4,4, J = 1,6, 1\text{H}$); 7,80 (s, 1H); 7,93-7,93 (M, 3H); 8,29 (d, $J = 1,1; 1\text{H}$).

HRMS (H_2O) $m/z = 1047,4507 [\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. 1047,4545) $\text{C}_{49} \text{H}_{66} \text{N}_{12} \text{O}_{10} \text{S}_2$

- $[\text{H-D-2-Nal}^1\text{-cyclo}(\text{Cys}^2\text{-Tyr}^3\text{-D-}\beta\text{-}(2\text{-thiènyl})\text{-Ala}^4\text{-Lys}^5\text{-Val}^6\text{-Cys}^7)\text{-Thr}^8\text{-NH}_2]$
• 2 CH_3COOH (2)

HPLC $t_r = 9,7$ min

^1H RMN (400 Mhz, D_2O) : δ 0,76-0,88 (m, 1H); 0,92 (d, $J = 6,6, 3\text{H}$); 0,95 (d, $J = 6,6, 3\text{H}$); 1,19 (d, $J = 6,4, 3\text{H}$); 1,40-1,54 (M, 3H); 1,76-1,88 (m, 1H); 1,93 (s, 6H); 2,14-2,26 (m, 1H); 2,41 (dd, $J = 14,8, J = 3,8, 1\text{H}$); 2,63 (dd, $J = 15,4, J = 9,7, 1\text{H}$); 2,68 (dd, $J = 15,0, J = 3,6, 1\text{H}$); 2,74-2,82 (m, 1H); 2,83-2,95 (M, 4H); 3,10 (d, $J = 8,0, 1\text{H}$); 3,37 (dd, $J = 13,6, J = 8,6, 1\text{H}$); 3,47 (dd, $J = 13,8, J = 5,6, 1\text{H}$); 4,02 (d, $J = 9,7, 1\text{H}$); 4,07 (dd, $J = 10,8, J = 3,5, 1\text{H}$); 4,21 (qd, $J = 10,4, J = 6,4, 1\text{H}$); 4,28 (t, $J = 8,1, 1\text{H}$); 4,31 (d, $J = 4,0, 1\text{H}$); 4,42 (dd, $J = 8,6, J = 6,2, 1\text{H}$); 4,62 (t, $J = 7,4, 1\text{H}$); 4,89 (dd, $J = 10,5, J = 3,6, 1\text{H}$); 4,93 (dd, $J = 10,5, J = 3,6, 1\text{H}$); 6,82 (M, 3H); 6,98 (M, 2H); 7,11 (d, $J = 8,4, 2\text{H}$); 7,31 (d, $J = 5,1, 1\text{H}$); 7,47 (d, $J = 8,2, 1\text{H}$); 7,54 (dd, $J = 9,5, J = 3,3, 1\text{H}$); 7,55 (dd, $J = 9,5, J = 3,3, 1\text{H}$); 7,8 (s, 1H); 7,82-7,88 (M, 3H).

HRMS (H_2O) $m/z = 1063,4230 [\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. 1063,4204) $\text{C}_{50} \text{H}_{67} \text{N}_{10} \text{O}_{10} \text{S}_3$

- $[\text{H-D-2-Nal}^1\text{-cyclo}(\text{Cys}^2\text{-Tyr}^3\text{-D-}\beta\text{-}3,5\text{-difluoro-Phe}^4\text{-Lys}^5\text{-Val}^6\text{-Cys}^7)\text{-Thr}^8\text{-NH}_2]$ • 2 CH_3COOH (3)

HPLC $t_r = 8,8$ min

^1H RMN (400 Mhz, D_2O) : δ 0,75-0,85 (m, 1H); 0,92 (d, $J = 6,6, 3\text{H}$); 0,96 (d, $J = 6,6, 3\text{H}$); 1,20 (d, $J = 6,6, 3\text{H}$); 1,40-1,55 (M, 3H); 1,77-1,87 (m, 1H); 1,90 (s, 6H); 2,20 (dd, $J = 13,2, J = 6,6, 1\text{H}$); 2,49 (dd, $J = 14,8, J = 4,0, 1\text{H}$); 2,62 (dd, $J = 14,7, J = 9,8, 1\text{H}$); 2,70 (dd, $J = 14,7, J = 3,8, 1\text{H}$); 2,79 (dd, $J = 14,7, J = 11,4, 1\text{H}$); 2,81-2,95 (M, 6H); 3,34 (dd, $J = 13,6, J = 9,0, 1\text{H}$); 3,45 (dd, $J = 13,6, J = 5,8, 1\text{H}$); 4,01 (d, $J = 9,9, 1\text{H}$); 4,06 (dd, $J = 10,8, J = 3,6, 1\text{H}$); 4,20-4,28 (M, 2H); 4,33 (d, $J = 3,8, 1\text{H}$); 4,35 (dd, $J = 8,8, J = 6,0, 1\text{H}$); 4,61 (d, $J = 7,7, 1\text{H}$); 4,89 (dd, $J = 9,8, J = 4,1, 1\text{H}$); 4,92 (dd, $J = 11,3, J = 3,6, 1\text{H}$); 6,75-6,84 (M, 4H); 6,86-6,92 (m, 1H); 7,09 (d, $J = 8,6, 2\text{H}$); 7,48 (dd, $J = 8,2, J = 1,1, 1\text{H}$); 7,52-7,59 (M, 2H); 7,80 (s, 1H); 7,85-7,95 (M, 3H).

HRMS (H_2O) $m/z = 1093,4406 [\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. 1093,4451) $\text{C}_{52} \text{H}_{67} \text{N}_{10} \text{O}_{10} \text{F}_2 \text{S}_2$

- [H-D-2-Nal¹-cyclo(Cys²-Tyr³-**D-m-fluoro-Phe**⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂]
• 2 CH₃COOH (4)

HPLC t_r = 8,1 min

¹H RMN (400 MHz, D₂O) : δ 0,60-0,72 (m, 1H); 0,74-0,88 (m, 1H); 0,92 (d, J = 6,7, 3H); 0,95 (d, J = 6,4, 3H); 1,20 (d, J = 6,7, 3H); 1,34-1,51 (M, 3H); 1,72-1,82 (m, 1H); 1,90 (s, 1H); 2,15-2,24 (m, 1H); 2,47 (dd, J = 14,7, J = 3,9, 1H); 2,61 (dd, J = 14,8, J = 9,8, 1H); 2,70 (dd, J = 14,5, J = 3,6, 1H); 2,74-2,84 (M, 4H); 2,86-2,94 (M, 3H); 3,32 (dd, J = 13,8, J = 8,8, 1H); 3,44 (dd, J = 13,7, J = 5,7, 1H); 4,00 (d, J = 9,9, 1H); 4,01 (d, J = 10,8, 1H); 4,23 (dd, J = 6,4, J = 3,8, 1H); 4,25 (dd, J = 10,4, J = 6,4, 1H); 4,32-4,36 (M, 2H); 4,61 (dd, J = 7,1, J = 7,9, 1H); 4,88 (dd, J = 10,0, J = 3,9, 1H); 4,91 (dd, J = 11,5, J = 3,5, 1H); 6,82 (d, J = 8,5, 2H); 6,93 (ld, J = 9,7, 1H); 6,98 (d, J = 7,7, 1H); 7,01-7,08 (m, 1H); 7,10 (d, J = 8,5, 2H); 7,35 (dd, J = 14,7, J = 7,9, 1H); 7,47 (dd, J = 8,6, J = 1,3, 1H); 7,52-7,57 (M, 2H); 7,80 (ls, 1H); 7,86-7,89 (m, 1H); 7,90-7,94 (M, 2H).

HRMS (H₂O + ACN) m/z = 1075,4492 [M+H]⁺ (calc, 1075,4545) C₅₂ H₆₈ F N₁₀ O₁₀ S₂

- [H-D-2-Nal¹-cyclo(Cys²-Tyr³-**D-β-(3-pyridyl)-Ala**⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂]
• 2 CH₃COOH (5)

HPLC t_r = 6,8 min

¹H RMN (400 Mhz, D₂O) : δ 0,56-0,58 (m, 1H); 0,72-0,84 (m, 1H); 0,91 (d, J = 6,7, 3H); 0,84 (d, J = 6,6, 3H); 1,18 (d, J = 6,4, 3H); 1,34-1,52 (M, 3H); 1,72-1,82 (m, 1H); 1,96 (s, 6H); 2,12-2,24 (m, 1H); 2,50 (dd, J = 14,8, J = 3,8, 1H); 2,64 (dd, J = 14,7, J = 9,9, 1H); 2,68 (dd, J = 14,6, J = 3,7, 1H); 2,74-3,00 (M, 7H); 3,37 (dd, J = 13,8, J = 8,8, 1H); 3,47 (dd, J = 13,9, J = 5,8, 1H); 3,98-4,40 (M, 2H); 4,20 (dd, J = 6,4, J = 3,8, 1H); 4,27 (dd, J = 9,9, J = 6,7, 1H); 4,30 (d, J = 4,0, 1H); 4,42 (dd, J = 8,6, J = 6,0, 1H); 4,61 (t, J = 7,5, 1H); 4,91 (dd, J = 7,7, J = 3,8, 1H); 4,93 (dd, J = 9,1, J = 3,7, 1H); 6,78 (d, J = 8,6, 2H); 7,08 (d, J = 8,4, 2H); 7,44-7,50 (M, 2H); 7,54 (dd, J = 9,5, J = 3,3, 1H); 7,54 (dd, J = 9,5, J = 3,3, 1H); 7,72 (d, J = 8,0, 1H); 7,80 (s, 1H); 7,82-7,94 (M, 3H); 8,29 (d, J = 1,6, 1H); 8,45 (dd, J = 4,9, J = 1,0, 1H).

HRMS (H₂O) m/z = 1080,4418 [M+Na]⁺ (calc, 1080,4412) C₅₁ H₆₇ N₁₁ O₁₀ S₂

- [H-D-2-Nal¹-cyclo(Cys²-Tyr³-**D-o-fluoro-Phe**⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂]
• 2 CH₃COOH (6)

HPLC = 8,1 min

^1H RMN (400 MHz, D_2O) : δ 0,58-0,70 (m, 1H); 0,74-0,86 (m, 1H); 0,91 (d, $J = 6,6$, 3H); 0,94 (d, $J = 6,7$, 3H); 1,19 (d, $J = 6,4$, 3H); 1,33-1,51 (M, 4H); 1,70-1,80 (m, 1H); 1,97 (s, 6H); 2,12-2,25 (m, 1H); 2,47 (ld, $J = 13,3$, 1H); 2,61 (dd, $J = 14,6$, $J = 9,3$, 1H); 2,64-2,86 (M, 4H); 2,86-2,96 (M, 3H); 3,31-3,41 (m, 1H); 3,42-3,52 (m, 1H); 3,99 (d, $J = 10,0$, 2H); 4,18-4,22 (m, 1H); 4,28 (dd, $J = 10,3$, $J = 6,1$, 1H); 4,31 (d, $J = 4,3$, 1H); 4,42 (ls, 1H); 4,62 (dd, $J = 7,5$, $J = 7,0$, 1H); 4,83-4,93 (M, 2H); 6,82 (d, $J = 7,9$, 2H); 7,06-7,18 (M, 5H); 7,28-7,36 (m, 1H); 7,48 (ld, $J = 7,3$, 1H); 7,56 (ls, 2H); 7,80 (ls, 1H); 7,84-7,98 (M, 3H).

HRMS (H_2O) $m/z = 1075,4514$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc, 1075,4545) $\text{C}_{52} \text{H}_{68} \text{N}_{10} \text{O}_{10} \text{S}_2$

- $[\text{H-D-2-Nal}^1\text{-cyclo}(\text{Cys}^2\text{-Tyr}^3\text{-D-}p\text{-fluoro-Phe}^4\text{-Lys}^5\text{-Val}^6\text{-Cys}^7\text{)-Thr}^8\text{-NH}_2]$
 - 2 CH_3COOH (7)

HPLC $t_r = 8,7$ min

^1H RMN (400 Mhz, D_2O) : δ 0,50-0,62 (m, 1H); 0,72-0,84 (m, 1H); 0,91 (d, $J = 6,8$, 3H); 0,93 (d, $J = 6,6$, 3H); 1,18 (d, $J = 6,4$, 3H); 1,30-1,50 (M, 4H); 1,70-1,80 (m, 1H); 2,02 (s, 6H); 2,14-2,26 (m, 1H); 2,47 (dd, $J = 15,0$, $J = 3,8$, 1H); 2,63 (dd, $J = 14,8$, $J = 9,9$, 1H); 2,68 (dd, $J = 14,8$, $J = 3,4$, 1H); 2,74-2,98 (M, 6H); 3,37 (dd, $J = 13,8$, $J = 8,8$, 1H); 3,48 (dd, $J = 13,7$, $J = 6,0$, 1H); 3,92-4,02 (M, 2H); 4,18-4,24 (M, 2H); 4,30 (d, $J = 3,8$, 1H); 4,43 (dd, $J = 8,7$, $J = 5,9$, 1H); 4,62 (t, $J = 7,5$, 1H); 4,88-4,96 (M, 2H); 6,81 (d, $J = 8,4$, 2H); 7,04-7,18 (M, 6H); 7,47 (dd, $J = 8,5$, $J = 1,5$, 1H); 7,54 (dd, $J = 9,7$, $J = 3,4$, 1H); 7,54 (dd, $J = 9,6$, $J = 3,4$, 1H); 7,80 (s, 1H); 7,84-7,96 (M, 3H).

HRMS (H_2O) $m/z = 1097,4332$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calc. 1097,4365) $\text{C}_{52} \text{H}_{67} \text{F Na N}_{10} \text{O}_{10} \text{S}_2$

- $[\text{H-D-2-Nal}^1\text{-cyclo}(\text{Cys}^2\text{-Tyr}^3\text{-D-}p\text{-bromo-Phe}^4\text{-Lys}^5\text{-Val}^6\text{-Cys}^7\text{)-Thr}^8\text{-NH}_2]$
 - 2 CH_3COOH (8)

HPLC $t_r = 9,5$ min

^1H RMN (400 Mhz, D_2O) : δ 0,50-0,62 (m, 1H); 0,70-0,82 (m, 1H); 0,91 (d, $J = 6,8$, 3H); 0,99 (d, $J = 6,6$, 3H); 1,18 (d, $J = 6,6$, 3H); 1,30-1,42 (m, 1H); 1,42-1,52 (m, 2H); 1,70-1,80 (m, 1H); 1,96 (s, 6H); 2,12-2,28 (m, 1H); 2,47 (dd, $J = 14,8$, $J = 3,6$, 1H); 2,63 (dd, $J = 14,6$, $J = 9,8$, 1H); 2,68 (dd, $J = 14,7$, $J = 3,7$, 1H); 2,80-2,82 (M, 2H); 2,84-2,96 (M, 4H); 3,36 (dd, $J = 13,7$, $J = 8,7$, 1H); 3,48 (dd, $J = 13,5$, $J = 6,2$, 1H); 3,95 (dd, $J = 11,1$, $J = 3,5$, 1H); 3,98 (d, $J = 10,0$, 1H); 4,18-4,24 (M, 2H); 4,30 (d, $J = 3,8$, 1H); 4,42 (dd, $J = 8,6$, $J = 6,0$, 1H);

4,62 (t, $J = 7,1$, 1H); 4,88-4,94 (M, 2H); 6,82 (d, $J = 8,6$, 2H); 7,07 (d, $J = 8,4$, 2H); 7,10 (d, $J = 8,6$, 2H); 7,48-7,52 (M, 3H); 7,53 (dd, $J = 9,5$, $J = 3,3$, 1H); 7,55 (dd, $J = 9,5$, $J = 3,7$, 1H); 7,80 (s, 1H); 7,84-7,94 (M, 3H).

HRMS (H₂O) $m/z = 1157,3549$ et $1159,3585$ [M+Na]⁺ (calc. 1157,3564 et 1159,3544)
C₅₂ H₆₇ Br Na N₁₀ O₁₀ S₂

- [H-D-2-Nal¹-cyclo(Cys²-Tyr³-**D-Tyr**⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂]
• 2 CH₃COOH (**9**)

HPLC $t_r = 7,7$ min

¹H RMN (400 Mhz, D₂O): δ 0,50-0,64 (m, 1H); 0,66-0,80 (m, 1H); 0,91 (d, $J = 6,6$, 3H); 0,93 (d, $J = 6,6$, 3H); 1,20 (d, $J = 6,4$, 3H); 1,28-1,48 (M, 3H); 1,66-1,78 (m, 1H); 1,89 (s, 6H); 2,12-2,24 (m, 1H); 2,41 (dd, $J = 14,8$, $J = 3,7$, 1H); 2,55 (dd, $J = 14,8$, $J = 9,5$, 1H); 2,64-2,96 (M, 7H); 3,20 (dd, $J = 13,4$, $J = 9,1$, 1H); 3,33 (dd, $J = 13,2$, $J = 5,7$, 1H); 3,92 (dd, $J = 11,0$, $J = 3,2$, 1H); 3,97 (d, $J = 9,7$, 1H); 4,10-4,20 (M, 2H); 4,24 (qd, $J = 10,5$, $J = 6,4$, 1H); 4,32 (d, $J = 3,8$, 1H); 4,60 (t, $J = 7,3$, 1H); 6,80 (t, $J = 8,3$, 4H); 7,02 (d, $J = 8,2$, 2H); 7,09 (d, $J = 8,4$, 2H); 7,43 (d, $J = 8,4$, 1H); 7,48-7,56 (M, 2H); 7,73 (s, 1H); 7,80-7,92 (M, 4H).

HRMS (H₂O) $m/z = 1073,4578$ [M+H]⁺ (calc. 1073,4589) C₅₂ H₆₉ N₁₀ O₁₁ S₂

- [H-D-2-Nal¹-cyclo(Cys²-Tyr³-**D-m-bromo-Phe**⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂]
• 2 CH₃COOH (**11**)

HPLC $t_r = 9,0$ min

¹H RMN (400 Mhz, D₂O): δ 0,52-0,68 (m, 1H); 0,76-0,90 (m, 1H); 0,92 (d, $J = 6,8$, 3H); 0,95 (d, $J = 6,6$, 3H); 1,21 (d, $J = 6,4$, 3H); 1,30-1,54 (M, 3H); 1,70-1,82 (m, 1H); 1,93 (s, 6H); 2,12-2,27 (m, 1H); 2,48 (dd, $J = 14,8$, $J = 3,7$, 1H); 2,63 (dd, $J = 14,8$, $J = 9,7$, 1H); 2,70 (dd, $J = 14,5$, $J = 3,5$, 1H); 2,74-2,99 (M, 7H); 2,28 (dd, $J = 14,0$, $J = 9,1$, 1H); 3,49 (dd, $J = 13,7$, $J = 5,7$, 1H); 3,95-4,05 (M, 2H); 4,19-4,27 (M, 2H); 4,32 (d, $J = 3,8$, 1H); 4,43 (dd, $J = 8,7$, $J = 5,7$, 1H); 4,63 (dd, $J = 7,7$, $J = 7,2$, 1H); 4,87-4,95 (m, 1H); 6,83 (d, $J = 8,1$, 2H); 7,11 (d, $J = 8,4$, 2H); 7,16 (d, $J = 7,5$, 1H); 7,27 (t, $J = 7,8$, 1H); 7,36 (s, 1H); 7,48 (s, 1H); 7,50 (s, 1H); 7,53-7,60 (M, 2H); 7,81 (s, 1H); 7,86-7,96 (M, 3H).

HRMS (H₂O) $m/z = 1135,3741$ et $1137,3704$ [M+H]⁺ (calc. 1135,3745 and 1137,3724)
C₅₂ H₆₈ Br N₁₀ O₁₀ S₂

- [H-D-2-Nal¹-cyclo(Cys²-Tyr³-D-β-(3-benzothiényl)-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂] • 2 CH₃COOH (**12**)

HPLC t_r = 9,8 min

¹H RMN (400 Mhz, D₂O) : δ 0,28-0,40 (m, 1H); 0,42-0,54 (m, 1H); 0,90 (d, J = 6,6, 3H); 0,92 (d, J = 6,6, 3H); 1,20 (d, J = 6,4, 3H); 1,28-1,34 (m, 1H); 1,48-1,62 (m, 1H); 1,90 (s, 6H); 1,90-2,20 (m, 1H); 2,44 (dd, J = 14,6, J = 4,2, 1H); 2,57 (dd, J = 14,8, J = 9,3, 1H); 2,65-2,82 (M, 4H); 2,92 (d, J = 7,4, 2H); 3,06 (dd, J = 13,9, J = 5,5, 1H); 3,12-3,22 (m, 1H); 3,29 (dd, J = 13,3, J = 9,5, 1H); 3,43 (dd, J = 13,5, J = 5,5, 1H); 3,81 (dd, J = 10,3, J = 3,7, 1H); 4,24 (dd, J = 6,4, J = 4,1, 1H); 4,26-4,38 (M, 3H); 4,64 (t, J = 7,5, 2H); 6,84 (d, J = 8,2, 2H); 7,12 (d, J = 8,2, 2H); 7,31 (s, 1H); 7,38-7,50 (M, 3H); 7,54 (dd, J = 9,4, J = 3,8, 1H); 7,55 (dd, J = 9,4, J = 3,8, 1H); 7,71 (d, J = 7,7, 1H); 7,78 (s, 1H); 7,85-7,90 (m, 1H); 7,90-7,95 (M, 2H); 7,98 (d, J = 7,5, 1H).

HRMS (H₂O) m/z = 1113,4368 [M+H]⁺ (calc. 1113,4360) C₅₄H₆₉N₁₀O₁₀S₃

- [H-D-2-Nal¹-cyclo(Cys²-Tyr³-D-β-(2-fluorényl)-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂] • 2 CH₃COOH (**13**)

HPLC t_r = 9,8 min

¹H RMN (400 Mhz, D₂O) : δ 0,08-0,20 (m, 1H); 0,32-0,44 (m, 1H); 0,88 (d, J = 6,7, 3H); 0,91 (d, J = 6,6, 3H); 0,96 (t, J = 7,8, 2H); 1,17 (d, J = 6,4, 3H); 1,48-1,60 (m, 1H); 1,96 (s, 6H); 1,80-2,08 (M, 2H); 2,10-2,20 (m, 1H); 2,45 (dd, J = 14,7, J = 3,7, 1H); 2,61 (dd, J = 14,8, J = 9,7, 1H); 2,68 (dd, J = 14,8, J = 3,7, 1H); 2,76 (d, J = 11,0, 1H); 2,81 (dd, J = 11,9, J = 9,2, 1H); 2,88-3,00 (M, 3H); 3,35 (dd, J = 13,7, J = 8,8, 1H); 3,46 (dd, J = 13,7, J = 5,8, 1H); 3,80 (dd, J = 11,0, J = 3,2, 1H); 3,88 (s, 2H); 3,92 (d, J = 9,8, 1H); 4,19 (dd, J = 6,5, J = 3,7, 1H); 4,21 (dd, J = 11,8, J = 5,4, 1H); 4,29 (d, J = 3,8, 1H); 4,41 (dd, J = 8,8, J = 5,8, 1H); 4,63 (t, J = 7,5, 1H); 4,86 (dd, J = 11,7, J = 5,8, 1H); 4,90 (dd, J = 11,7, J = 5,8, 1H); 6,81 (d, J = 8,6, 2H); 7,11 (d, J = 8,6, 2H); 7,17 (d, J = 8,0, 1H); 7,43 (d, J = 1,0, 1H); 7,7 (dd, J = 7,4, J = 1,1, 1H); 7,40-7,48 (M, 2H); 7,52 (dd, J = 9,9, J = 3,5, 1H); 7,52 (dd, J = 9,9, J = 3,1, 1H); 7,62 (d, J = 7,3, 1H); 7,78 (s, 1H); 7,79 (d, J = 7,8, 1H); 7,82-7,92 (M, 4H).

HRMS (H₂O) m/z = 1167,4774 [M+Na]⁺ (calc. 1167,4772) C₅₉H₇₂NaN₁₀O₁₀S₂

- [H-D-2-Nal¹-cyclo(Cys²-Tyr³-**D-β**-(1-naphthyl)-Ala⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂]
• 2 CH₃COOH (**15**)

HPLC t_r = 8,9 min

¹H RMN (400 Mhz, D₂O): δ -0,10-0,04 (m, 1H); 0,22-0,34 (m, 1H); 0,87 (d, *J* = 4,6, 3H); 0,89 (d, *J* = 4,6, 3H); 0,98-1,10 (m, 1H); 1,18 (d, *J* = 6,4, 3H); 1,20-1,30 (m, 1H); 1,40-1,52 (m, 1H); 1,95 (s, 6H); 2,06-2,18 (m, 1H); 2,42 (dd, *J* = 14,9, *J* = 3,9, 1H); 2,57 (dd, *J* = 14,9, *J* = 8,8, 1H); 2,64 (t, *J* = 8,0, 2H); 2,72 (dd, *J* = 14,8, *J* = 4,8, 1H); 2,78 (dd, *J* = 10,8, *J* = 4,8, 1H); 2,89 (dd, *J* = 13,3, *J* = 8,3, 1H); 2,89 (dd, *J* = 13,6, *J* = 6,8, 1H); 3,26 (d, *J* = 8,4, 2H); 3,34 (dd, *J* = 13,4, *J* = 9,0, 1H); 3,48 (dd, *J* = 13,7, *J* = 6,0, 1H); 3,68 (dd, *J* = 10,8, *J* = 3,7, 1H); 3,90 (d, *J* = 9,7, 1H); 4,21 (ddd, *J* = 12,7, *J* = 6,4, *J* = 4,0, 1H); 4,29 (d, *J* = 3,8, 1H); 4,31 (t, *J* = 8,6, 1H); 4,42 (dd, *J* = 8,7, *J* = 5,8, 1H); 4,66 (dd, *J* = 8,5, *J* = 6,8, 1H); 4,82-4,87 (m, 1H); 6,86 (d, *J* = 8,6, 2H); 7,14 (d, *J* = 8,6, 2H); 7,28 (d, *J* = 7,3, 1H); 7,45 (t, *J* = 7,7, 1H); 7,46 (d, *J* = 9,7, 1H); 7,53 (dd, *J* = 6,4, *J* = 3,5, 1H); 7,54 (dd, *J* = 6,4, *J* = 3,5, 1H); 7,57-7,65 (M, 2H); 7,78 (s, 1H); 7,84-7,97 (M, 6H).

HRMS (H₂O) m/z = 1129,4578 [M+Na]⁺ (calc. 1129,4516) C₅₆ H₇₀ Na N₁₀ O₁₀ S₂

- [H-D-2-Nal¹-cyclo(Cys²-Tyr³-**D-*o*-bromo-Phe**⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂]
• 2 CH₃COOH (**16**)

HPLC t_r = 9,3 min

¹H RMN (400 Mhz, D₂O): δ 0,52-0,68 (m, 1H); 0,76-0,90 (m, 1H); 0,92 (d, *J* = 6,8, 3H); 0,95 (d, *J* = 6,6, 3H); 1,21 (d, *J* = 6,4, 3H); 1,30-1,54 (M, 3H); 1,70-1,82 (m, 1H); 1,93 (s, 6H); 2,12-2,27 (m, 1H); 2,48 (dd, *J* = 14,8, *J* = 3,7, 1H); 2,63 (dd, *J* = 14,8, *J* = 9,7, 1H); 2,70 (dd, *J* = 14,5, *J* = 3,5, 1H); 2,74-2,99 (M, 7H); 2,28 (dd, *J* = 14,0, *J* = 9,1, 1H); 3,49 (dd, *J* = 13,7, *J* = 5,7, 1H); 3,95-4,05 (M, 2H); 4,19-4,27 (M, 2H); 4,32 (d, *J* = 3,8, 1H); 4,43 (dd, *J* = 8,7, *J* = 5,7, 1H); 4,63 (dd, *J* = 7,7, *J* = 7,2, 1H); 4,87-4,95 (m, 1H); 6,83 (d, *J* = 8,1, 2H); 7,11 (d, *J* = 8,4, 2H); 7,16 (d, *J* = 7,5, 1H); 7,27 (t, *J* = 7,8, 1H); 7,36 (s, 1H); 7,48 (s, 1H); 7,50 (s, 1H); 7,53-7,60 (M, 2H); 7,81 (s, 1H); 7,86-7,96 (M, 3H).

HRMS (H₂O) m/z = 1135,3749 et 1137,3723 [M+H]⁺ (calc. 1135,3745 et 1137,3724)
C₅₂ H₆₈ Br N₁₀ O₁₀ S₂

- [H-D-2-Nal¹-cyclo(Cys²-Tyr³-**D-*p*-nitro-Phe**⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂]
• 2 CH₃COOH (**17**)

HPLC t_r = 9,6 min

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,64-0,76 (m, 1H); 0,78-0,90 (m, 1H); 0,91 (d, J = 6,7, 3H); 0,94 (d, J = 6,6, 3H); 1,19 (d, J = 6,5, 3H); 1,35-1,47 (M, 3H); 1,72-1,82 (m, 1H); 1,89 (s, 6H); 2,11- 2,21 (m, 1H); 2,47 (dd, J = 14,6 , J = 4,0, 1H); 2,59 (dd, J = 14,7 , J = 9,8, 1H); 2,69 (dd, J = 14,7, J = 3,9, 1H); 2,72-2,81 (M, 3H); 2,84 (d, J = 8,0, 2H); 2,94 (d, J = 2,9, 1H); 3,00 (s, 1H); 3,30 (dd, J = 13,6 , J = 9,0, 1H); 3,42 (dd, J = 13,7 , J = 5,7, 1H); 3,99 (M, 2H); 4,21 (dd, J = 6,6 , J = 4,0, 1H); 4,26-4,34 (M, 3H); 4,59 (t, J = 7,6, 1H); 4,82-4,92 (M, 3H); 6,75 (d, J = 8,5, 2H); 7,05 (d, J = 8,5, 2H); 7,35 (d, J = 8,7, 2H); 7,46 (dd, J = 8,6, J = 1,2, 1H); 7,50-7,56 (M, 2H); 7,78 (ls, 1H); 7,84-7,88 (m, 1H); 7,88-7,94 (M, 2H).

HRMS (H₂O) m/z = 1102,4476 [M+H]⁺ (calc. 1102,4490) C₅₂ H₆₈ N₁₁ O₁₂ S₂

- [H-D-2-Nal¹-cyclo(Cys²-Tyr³- **D-Ala**⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂]
• 2 CH₃COOH (**18**)

HPLC t_r = 9,8 min

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,93 (d, J = 6,6, 3H); 0,96 (d, J = 6,6, 3H); 1,18 (d, J = 7,8, 3H); 1,20 (d, J = 6,6, 3H); 1,34-1,44 (M, 2H); 1,60-1,68 (M, 2H); 1,68-1,80 (M, 2H); 1,90 (s, 6H); 1,92-2,20 (m, 1H); 2,12-2,22 (m, 1H); 2,45 (dd, J = 14,6, J = 4,9, 1H); 2,55 (dd, J = 14,7, J = 8,7, 1H); 2,74 (d, J = 1,3, 1H); 2,76 (s, 1H); 2,90-3,00 (M, 4H); 3,3 (dd, J = 13,5, J = 9,1, 1H); 3,44 (dd, J = 13,7, J = 5,6, 1H); 4,04 (d, J = 9,5, 1H); 4,07 (d, J = 7,3, 1H); 4,2 (dd, J = 9,9, J = 4,1, 1H); 4,24 (dd, J = 6,5, J = 3,9, 1H); 4,28-4,32 (m, 1H); 4,33 (d, J = 4,0, 1H); 4,55 (dd, J = 7,8, J = 7,3, 1H); 4,82-4,88 (m, 1H); 6,82 (d, J = 8,6, 2H); 7,11 (d, J = 8,6, 2H); 7,47 (dd, J = 8,5, J = 1,7, 1H); 7,54 (ddd, J = 5,7, J = 4,7, J = 2,0, 1H); 7,55 (ddd, J = 5,7, J = 4,7, J = 2,0, 1H); 7,79 (d, J = 0,9, 1H); 7,86-7,96 (M, 3H).

HRMS (H₂O) m/z = 1003,4161 [M+Na]⁺ (calc. 1003,4146) C₄₆ H₆₄ Na N₁₀ O₁₀ S₂

- [H-D-2-Nal¹-cyclo(Cys²-Tyr³- **D-phényl-Gly**⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂]
• 2 CH₃COOH (**19**)

HPLC t_r = 8,9 min

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,93 (d, *J* = 7,0, 3H); 0,96 (d, *J* = 6,8, 3H); 1,10-1,20 (M, 2H); 1,20 (d, *J* = 6,4, 3H); 1,47 (q, *J* = 7,8, 2H); 1,61-1,72 (m, 1H); 1,82-1,92 (m, 1H); 1,97 (s, 6H); 2,12-2,20 (m, 1H); 2,40 (t, *J* = 8,3, 1H); 2,48 (d, *J* = 6,5, 2H); 2,68-2,89 (M, 6H); 2,95 (dd, *J* = 13,3, *J* = 6,0, 1H); 3,31 (dd, *J* = 13,0, *J* = 9,1, 1H); 3,42-3,51 (m, 1H); 4,11 (d, *J* = 8,4, 1H); 4,14 (dd, *J* = 10,0, *J* = 4,2, 1H); 4,39 (dd, *J* = 9,1, *J* = 6,0, 1H); 4,60 (dd, *J* = 9,2, *J* = 6,5, 1H); 4,66 (t, *J* = 6,6, 1H); 4,70-4,78 (M, 2H); 6,69 (d, *J* = 8,1, 2H); 7,03 (d, *J* = 8,4, 2H); 7,15 (d, *J* = 6,4, 2H); 7,32-7,42 (M, 3H); 7,46 (dd, *J* = 8,7, *J* = 0,5, 1H); 7,52-7,60 (M, 2H); 7,78 (ls, 1H); 7,88-7,98 (M, 3H).

HRMS (H₂O) *m/z* = 1065,4276 [M+Na]⁺ (calc. 1065,4303) C₅₁ H₆₆ Na N₁₀ O₁₀ S₂

- [H-D-2-Nal¹-cyclo(Cys²-Tyr³-**D-Valine**⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂]
• 2 CH₃COOH (**20**)

HPLC *t_r* = 10,7 min

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,73 (d, *J* = 6,6, 3H); 0,80 (d, *J* = 6,8, 3H); 0,93 (d, *J* = 6,8, 3H); 0,98 (d, *J* = 6,6, 3H); 1,19 (d, *J* = 6,6, 3H); 1,30-1,50 (M, 2H); 1,58-1,82 (M, 4H); 1,60-2,08 (M, 4H); 1,92 (s, 6H); 1,96-2,06 (m, 1H); 2,14-2,24 (m, 1H); 2,51 (dd, *J* = 14,8, *J* = 3,8, 1H); 2,62 (dd, *J* = 14,8, *J* = 10,0, 1H); 2,69 (dd, *J* = 14,5, *J* = 3,5, 1H); 2,79 (dd, *J* = 14,9, *J* = 11,2, 1H); 2,88-3,00 (M, 3H); 3,37 (dd, *J* = 13,9, *J* = 8,6, 1H); 3,57 (dd, *J* = 13,9, *J* = 5,8, 1H); 3,60 (d, *J* = 9,7, 1H); 4,05 (d, *J* = 9,7, 1H); 4,21 (dd, *J* = 6,3, *J* = 3,9, 1H); 4,25 (dd, *J* = 10,7, *J* = 3,7, 1H); 4,30 (d, *J* = 3,8, 1H); 4,42 (dd, *J* = 8,6, *J* = 5,8, 1H); 4,61 (dd, *J* = 8,4, *J* = 6,9, 1H); 4,95 (dd, *J* = 9,3, *J* = 3,6, 1H); 4,96 (dd, *J* = 11,8, *J* = 2,9, 1H); 6,81 (d, *J* = 8,6, 2H); 7,12 (d, *J* = 8,4, 2H); 7,47 (dd, *J* = 8,4, *J* = 1,5, 1H); 7,54 (dd, *J* = 10,2, *J* = 3,8, 1H); 7,55 (dd, *J* = 10,2, *J* = 3,8, 1H); 7,80 (s, 1H); 7,84-7,94 (M, 3H).

HRMS (H₂O) *m/z* = 1009,4627 [M+H]⁺ (calc. 1009,4640) C₄₈ H₆₉ N₁₀ O₁₀ S₂

- [H-D-2-Nal¹-cyclo(Cys²-Tyr³-**D-Homophénylalanine**⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂]
• 2 CH₃COOH (**21**)

HPLC *t_r* = 8,87 min

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,89 (d, *J* = 6,7, 3H); 0,92 (d, *J* = 6,7, 3H); 1,17 (d, *J* = 6,4, 3H); 1,26-1,36 (M, 2H); 1,54-1,68 (M, 3H); 1,76-1,84 (M, 2H); 1,86-1,92 (m, 1H); 2,08-2,18 (m, 1H); 1,94 (s, 6H); 2,27 (ddd, *J* = 14,0, *J* = 7,9, *J* = 5,9, 1H); 2,36 (ddd, *J* = 14,2, *J* = 6,4, *J* = 5,6, 1H); 2,48 (dd, *J* = 14,7, *J* = 4,8, 1H); 2,56 (dd, *J* = 14,8, *J* = 8,8, 1H); 2,72 (d, *J* = 3,7, 1H); 2,74 (s, 1H); 2,84-2,82 (M, 3H); 2,96 (dd, *J* = 13,4, *J* = 5,9, 1H); 3,34 (dd, *J* = 13,8, *J* = 8,9, 1H); 3,47 (*J* = 13,7, *J* = 5,8, 1H); 3,88 (dd, *J* = 8,5, *J* = 6,3, 1H); 4,02 (d, *J* = 9,5, 1H); 4,14 (dd, *J* = 9,9, *J* = 4,3, 1H); 4,21 (dd, *J* = 6,5, *J* = 3,9, 1H); 4,30 (d, *J* = 3,9, 1H); 4,40 (dd, *J* = 8,9, *J* = 6,0, 1H); 4,61 (dd, *J* = 9,9, *J* = 6,1, 1H); 4,80-4,88 (M, 2H); 6,82 (d, *J* = 8,6, 2H);

7,03 (dd, $J = 6,9$, $J = 1,4$, 1H); 7,14 (d, $J = 8,6$, 2H); 7,22-7,28 (m, 1H); 7,28-7,34 (M, 2H); 7,45 (dd, $J = 8,5$, $J = 1,7$, 1H); 7,52 (ddd, $J = 6,9$, $J = 5,1$, $J = 2,0$, 1H); 7,53 (ddd, $J = 6,9$, $J = 5,1$, $J = 2,0$, 1H), 7,78 (s, 1H); 7,86-7,93 (M, 3H).

HRMS (H₂O) $m/z = 1129,4609$ [M+H]⁺ (calc. 1093,4616) C₅₃ H₇₀ Na N₁₀ O₁₀ S₂

- [H-D-2-Nal¹-cyclo(Cys²-Tyr³-**D-*p*-phényl-Phe⁴**-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂]
• 2 CH₃COOH (**22**)

HPLC $t_r = 9,9$ min

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,51-0,62 (m, 1H); 0,62-0,72 (m, 1H); 0,90 (d, $J = 6,6$, 3H); 0,93 (d, $J = 6,6$, 3H); 1,20 (d, $J = 6,3$, 3H); 1,23-1,28 (m, 1H); 1,28-1,36 (m, 1H); 1,62-1,73 (m, 1H); 1,89 (s, 6H); 2,12-2,24 (m, 1H); 2,35-2,46 (M, 3H); 2,54 (dd, $J = 14,6$, $J = 9,5$, 1H); 2,67-2,82 (M, 2H); 2,82-2,98 (M, 4H); 3,20 (dd, $J = 13,3$, $J = 9,2$, 1H); 3,36 (dd, $J = 13,4$, $J = 5,6$, 1H); 3,91 (dd, $J = 10,9$, $J = 3,4$, 1H); 3,96 (d, $J = 9,8$, 1H); 4,15 (dd, $J = 8,2$, $J = 6,2$, 1H); 4,20-4,30 (M, 2H); 4,32 (d, $J = 3,9$, 1H); 4,31 (dd, $J = 7,7$, $J = 7,2$, 1H); 4,84-4,90 (M, 2H); 6,81 (d, $J = 6,8$, 2H); 7,09 (d, $J = 8,4$, 2H); 7,25 (d, $J = 7,9$, 2H); 7,41-7,46 (M, 2H); 7,48-7,58 (M, 4H); 7,66 (d, $J = 8,0$, 2H); 7,71 (d, $J = 7,4$, 2H); 7,75 (ls, 1H); 7,83-7,87 (m, 1H); 7,87-7,92 (M, 2H).

HRMS (H₂O) $m/z = 1133,5002$ [M+H]⁺ (calc. 1133,4953) C₅₈ H₇₃ N₁₀ O₁₀ S₂

- [H-D-2-Nal¹-cyclo(Cys²-Tyr³-**D- β -(9-anthracènyl)-Ala⁴**-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂]
• 2 CH₃COOH (**23**)

HPLC $t_r = 10,1$ min

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ -0,68- -0,58 (m, 1H); -0,36- -0,24 (m, 1H); 0,68-0,72 (m, 1H); 0,83 (d, $J = 4,6$, 3H); 0,84 (d, $J = 4,7$, 0,92-1,04 (M, 2H); 1,06-1,12 (m, 1H); 1,18 (d, $J = 6,4$, 3H); 2,0 (s, 6H); 2,0-2,08 (m, 1H); 2,4 (dd, $J = 14,7$, $J = 4,3$, 1H); 2,44-2,54 (M, 3H); 2,78 (d, $J = 7,8$, 2H); 2,90 (dd, $J = 13,2$, $J = 9,6$, 1H); 3,01 (dd, $J = 13,3$, $J = 6,2$, 1H); 3,26 (dd, $J = 10,4$, $J = 4,2$, 1H); 3,30-3,36 (m, 1H); 3,38-3,52 (M, 2H); 3,84 (d, $J = 9,3$, 1H); 3,89 (d, $J = 13,5$, 1H); 4,20-4,30 (M, 2H); 4,32 (d, $J = 3,8$, 1H); 4,42 (dd, $J = 9,1$, $J = 5,8$, 1H); 4,66-4,76 (m, 2H); 6,97 (d, $J = 8,6$, 2H); 7,23 (d, $J = 8,4$, 2H); 7,44 (d, $J = 8,6$, 1H); 7,48-7,60 (M, 5H); 7,75 (s, 1H); 7,82-7,94 (M, 5H); 8,05 (d, $J = 8,0$, 2H); 8,4 (s, 1H).

HRMS (H₂O) $m/z = 1157,4919$ [M+H]⁺ (calc. 1157,4953) C₆₀ H₇₃ N₁₀ O₁₀ S₂

- H-D-2-Nal¹-cyclo(Cys²-Tyr³-D-(O-2-(2-méthoxyéthoxy)éthoxy)-Phe⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷)-Thr⁸-NH₂] • 2 CH₃COOH (24)

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 0,64-0,76 (m, 1H); 0,76-0,88 (m, 1H); 0,93 (d, *J* = 6,9, 3H); 0,96 (d, *J* = 6,9, 3H); 1,23 (d, *J* = 6,3, 3H); 1,35-1,52 (M, 2H); 1,72-1,82 (m, 1H); 1,91 (s, 6H); 2,13-2,24 (m, 1H); 2,43 (dd, *J* = 14,6, *J* = 4,8, 1H); 2,54 (dd, *J* = 14,5, *J* = 9,3, 1H); 2,70-2,95 (M, 4H); 3,19 (dd, *J* = 13,1, *J* = 9,6, 1H); 3,36 (s, 3H); 3,60 (t, *J* = 3,4, 1H); 3,61 (t, *J* = 4,4, 1H); 3,71 (t, *J* = 4,4, 1H); 3,72 (t, *J* = 3,4, 1H); 3,84-3,89 (M, 2H); 3,99 (d, *J* = 10,8, 1H); 4,00 (d, *J* = 4,01, 1H); 4,07-4,14 (m, 1H); 4,16-4,20 (M, 2H); 4,23-4,30 (M, 2H); 4,35 (d, *J* = 3,9, 1H); 4,60 (dd, *J* = 7,6, *J* = 6,8, 1H); 4,83-4,88 (M, 2H); 6,82 (d, *J* = 8,4, 2H); 6,96 (d, *J* = 8,6, 2H); 7,07 (d, *J* = 8,4, 2H); 7,13 (d, *J* = 8,6, 2H); 7,46 (dd, *J* = 8,5, *J* = 1,3, 1H); 7,51-7,56 (M, 2H); 7,76 (ls, 1H); 7,85-7,94 (M, 3H).

III.3 Échange d'ions

III.3.1 HPLC

Le système utilisé est le Waters 2545 décrit précédemment.

Une solution de 10 mg de lanréotide en sel d'acétate est injecté dans 400 µl d'eau et 100 µl d'acétonitrile. Les composés sont élués pendant 7,75 min à 20 ml min⁻¹ par un mélange isocratique eau-acétonitrile-acide acétique 80:20:1 %. Les fractions obtenues sont concentrées sous vide jusqu'à un volume d'environ 30 ml avant lyophilisation.

III.3.2 Échange d'ions sur résine

L'échange est réalisé sur une résine de type échangeuse d'anions forts AG1-X8 de Biorad. 245 mg de cette résine sont d'abord lavés par trois fois 10 ml d'acide acétique 1,6 N puis par trois fois 10 ml d'acide acétique 0,16 M. 20 mg de peptide en sel de TFA sont alors introduits dans 4 ml d'eau et le récipient est agité de manière rotative pendant 1 h. Le liquide est alors filtré et la résine lavée par deux fois 1 ml d'eau distillée. Les fractions sont rassemblées puis lyophilisées.

III.3.3 Procédure de déprotonation/reprotonation

Le lanréotide sous forme de sel de TFA est dissous dans l'eau à une concentration de 15 mg ml⁻¹ à 4 °C. Une solution de soude à 100 mM est ajoutée lentement jusqu'à pH = 11. Dans ces conditions, les deux groupements ammonium du peptide sont sous forme neutre et la

molécule précipite. La suspension est réfrigérée à 4 °C puis centrifugée à la même température, 5 min à 2500 G. Le surnageant contenant le trifluoroacétate de sodium est prélevé et le culot suspendu dans six volumes d'eau. La centrifugation est alors effectuée une seconde fois, puis le culot est à nouveau suspendu dans quelques millilitres d'eau pour être lyophilisé. La poudre de peptide neutre peut alors être dissoute dans une solution contenant deux équivalents d'acide acétique, afin d'obtenir un rapport peptide/acétate de deux exactement.

III.3.4 Méthodes analytiques

Les sels de peptides sont dissous dans D₂O (400 µl).

L'échantillon pour le RMN du proton est préparé par pesée précise des peptides et introduction de 20 mg d'une solution d'acide dichloroacétique préalablement préparée ($c = 65,6 \mu\text{mol g}^{-1}$) comme étalon interne. La teneur en peptide peut alors être déterminée par comparaison entre les aires du singulet de l'étalon à 6 ppm et de l'un des doublets de la tyrosine à environ 6,7 ppm. Le « rendement » en peptide est déterminé par comparaison entre la teneur en peptide avant et après l'expérience d'échange.

Pour la RMN du fluor, le trifluoroéthanol (TFE) est introduit en quantité connue. Le TFA présente un signal singulet à - 75,7 ppm, le TFE présente un signal triplet à - 76,8 ppm. Le rapport peptide/TFA peut donc être déterminé à partir du rapport des aires des deux signaux.

III.4 Etude de la formation de composés mixtes nanotubes de carbone-nanotubes de peptides

III.4.1 Expériences avec des nanotubes de carbone individuels

Une masse de nanotubes de carbone multifeuillets de marque N-Tech (25 nm de diamètre en moyenne) est introduite avec une masse équivalente de peptide dans l'eau à une concentration d'environ 1 mg ml⁻¹. Les tubes sont mis en suspension par sonication au bain à ultra-sons pendant 5 min.

- Centrifugation

La centrifugation permet d'éliminer le carbone amorphe et turbostatique (environ 30 % de l'échantillon). Les conditions sont 5 min à 5000 G. Le surnageant contient le peptide et des nanotubes en petites quantités. Le culot contient l'essentiel des nanotubes ainsi que le carbone indésirable.

- Filtration

Elle permet d'éliminer le lanréotide en excès, c'est-à-dire non lié aux nanotubes. Elle se fait sur un filtre Millipore HVLP 0,45 nm, sous vide. Deux rinçages sont réalisés avec quelques ml d'eau. Le gâteau n'est pas directement récupérable : le filtre est introduit dans de l'eau distillée et soumis à des ultra-sons de faible puissance (bain sonicant). La suspension est alors concentrée.

- Dialyse

Il s'agit d'une deuxième méthode d'élimination du lanréotide en excès. Le boudin est un Spectrum de masse de coupure 25000 Da. 5 à 10 ml de solution sont introduits dans le boudin ; celui-ci est fermé par deux pinces puis introduit dans 3 l d'eau distillée sous agitation douce. Le volume d'eau distillée est changé deux fois au cours des 24 h de dialyse. Le boudin est alors ouvert et la suspension récupérée.

- Analyse thermo-gravimétrique

Environ 10 mg de nanotubes secs sont introduits dans le creuset en alumine. Toutes les analyses ATG ont été réalisées avec le même programme : 10 °C min⁻¹ jusqu'à 1000 °C, 10 min à 1000 °C puis refroidissement jusqu'à T.A. à 10 °C min⁻¹.

- Microscopie

Pour le MET, les grilles de microscopie sont en cuivre, Agar 200 Mesh avec film de carbone de 50 nm, ou 400 Mesh avec film de carbone troué. Environ 5 µl d'échantillon sont déposés sous forme liquide et la grille est laissée au repos pendant 1 min afin de permettre au matériel de décanter. L'excès de liquide est alors retiré par capillarité grâce à un bout de papier filtre. En cas de coloration, 5 µl d'une solution d'acétate d'uranyle à 2 % sont déposés de la même façon. La grille est laissée à l'air pendant au moins 20 min.

III.4.2 Expériences avec des tapis de nanotubes de carbone alignés

7,5 mg de lanréotide sont dissous dans 2 ml d'eau. La solution est dégazée au bain à ultra-sons.

Le tapis de nanotubes de carbone (1 cm² environ) est placé dans un pilulier et mis sous vide. La solution précédemment préparée est alors injectée dans le milieu et laissée quelques minutes.

- Séchage vide

Le milieu est laissé sous vide jusqu'à évaporation complète de la solution.

- Séchage air

Le milieu est laissé au repos pendant 1 h 30, robinet de vide fermé. Le pilulier est alors ouvert, le tapis retiré et laissé à l'air libre pendant une journée.

- Lyophilisation

Le milieu est laissé au repos pendant 1 h 30, robinet de vide fermé. Le pilulier est alors ouvert et la solution est solidifiée par de l'azote liquide. Le récipient est alors connecté au lyophilisateur.

Ces expériences sont réalisées à l'identique en l'absence de lanréotide afin d'obtenir des tapis témoins.

Pour les analyses MEB, aucune préparation préalable n'est effectuée.

III.5 Synthèse en phase liquide

III.5.1 Synthèse de la β -fluorénylalanine

- 2-(benzyloxycarbonylamino)-3-(9H-fluorène-2-yl)acrylate de méthyle **26**

À une solution à 0 °C de l'ester phosphonique **25** (2 g, 6,04 mmol, 1 eq) dans du dichlorométhane (60 ml) est ajouté du DBU (1,35 ml, 1,5 eq). Après 5 min d'agitation, l'aldéhyde de fluorényle (1,17 mg, 6,04 mmol, 1 eq) est ajouté. Le mélange est laissé 2 h à 0 °C sous agitation, puis le bain de glace est retiré, autorisant la température à remonter à T.A. La réaction est laissée sous agitation pendant 2 h.

Au milieu réactionnel sont ajoutés 40 mL de dichlorométhane et après lavage par HCl 0,5 M, la phase organique est séchée par du sulfate de sodium, filtré puis évaporée. Une trituration est effectuée grâce à de l'éther diéthylique froid. Le surnageant est récupéré et l'opération est réalisée plusieurs fois. Le solide obtenu est purifié sur gel de silice (éluant : Hexane-AcOEt 75:25) pour obtenir 1,75 g de produit pur (configuration indéterminée) R = 74 %. L'autre isomère est aussi récupéré. Le rapport des deux isomères est de 95/5. Les données spectrales de l'isomère majoritaire sont décrites ci-dessous.

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) : δ 3,84 (M, 2H, fluorène + 3H méthyle); 5,13 (s, 2H, benzyle); 7,25-7,40 (M, 7H), 7,45 (s, 1H); 7,55 (d, $J = 7,6$, 2H); 7,72 (M, 2H), 7,79 (d, $J = 7,6$, 1H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3): δ 36,95; 52,76; 67,63; 120,04; 120,44; 123,36; 125,22; 127,04; 127,52; 128,38, 128,59; 129,17; 132,16; 132,73; 136,07; 141,04; 143,31; 143,52; 144,0; 166,02.

MS (ESI) : m/z 400,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$

IR: λ . (cm^{-1}): 3262, 3034, 2951 (CH alkyle), 1725 (CO), 1699. 1509, 1234, 730.

Point de fusion : 109 °C

- (*R*)-2-(benzyloxycarbonylamino)-3-(9H-fluorène-2-yl)propanoate de méthyle **27**

Dans un réacteur métallique fermé, le catalyseur asymétrique au rhodium (35 mg, 2 % mol) est ajouté à une solution de **26** (1 g, 2,51 mmol) dans le MeOH (150 ml). Le milieu est purgé de son air et mis sous atmosphère d'hydrogène (50 bars) et sous agitation.

24 h plus tard, après mise à l'air, le milieu est filtré sur célite puis concentré pour donner quantitativement le produit de réduction.

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) : δ 3,15 (dd, $J = 14,0$, $J = 6,4$, 1H); 3,22 (dd, $J = 14,0$, $J = 6,0$, 1H); 3,73 (s, 3H méthyle); 3,85 (s, 2H fluorène); 4,70 (m, 1H); 5,07 (d, $J = 12,4$, 1H benzyle); 5,12 (d, $J = 12,4$, 1H, benzyle); 5,25 (1H, NH); 7,11 (d., $J = 7,6$, 1H); 7,27-7,38 (M, 8H); 7,53 (d, $J = 7,6$, 2H); 7,58 (d, $J = 7,8$, 1H); 7,75 (d, $J = 7,6$, 1H).

^{13}C -RMN (CDCl_3): δ 36,74; 38,38; 52,27; 54,95; 66,91; 119,76; 119,85; 124,96; 125,87; 126,64; 126,70; 127,79; 128,04; 128,11; 128,45; 134,14; 136,17; 140,74; 141,27; 143,12; 143,64; 155,58; 172,01.

MS (ESI) m/z : 402,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$

IR: λ . (cm^{-1}): 3347, 3025. 2949 (CH alkyle), 1741 (CO), 1689, 1523, 1256, 1024, 740

Point de fusion : 125 °C

Excès énantiomérique déterminé par HPLC en phase chirale : 93,4 %

- Acide (R)-2-(benzyloxycarbonylamino)-3-(9H-fluorèn-2-yl)propanoïque **28'**

À une solution de **27** (800 mg, 1,99 mmol) dans du dioxane (35 ml) à 0 °C est ajoutée une solution de LiOH 96 mg dans de l'eau (15 ml). La réaction est suivie par CCM (hexane-AcOEt 1:1 ; l'acide formé ne migre pas). La réaction est terminée au bout d'une heure. Le milieu est acidifié par HCl 2 M et le produit est extrait par de l'acétate d'éthyle. Le produit est récupéré de manière quantitative (735 mg) après séchage par du sulfate de sodium, filtration, évaporation sous vide et cristallisation dans l'éther.

^1H -RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 2,90 (dd, $J = 14,0$, $J = 9,6$, 1H); 3,20 (dd, $J = 13,6$, $J = 4,8$, 1H); 3,71 (s, 2H, fluorène); 4,40 (dd, $J = 9,6$, $J = 4,8$, 1H); 4,87 (d, $J = 12,6$, 1H benzyle); 4,96 (d, $J = 12,6$, 1H, benzyle); 7,12 (M, 6H); 7,18 (t, $J = 7,6$, 1H); 7,26 (t, $J = 7,6$, 1H); 7,32 (s, 1H); 7,43 (d, $J = 7,6$, 1H); 7,60 (d, $J = 7,6$, 1H); 7,68 (d, $J = 7,8$, 1H).

^{13}C -RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 36,17; 36,60; 55,68; 65,14; 119,59; 119,71; 125,01; 125,77; 126,43; 126,63; 127,40; 127,59; 127,70; 128,45; 128,15; 136,57; 136,89; 139,39; 140,90; 142,82; 142,88; 155,92; 173,27.

MS (ESI) m/z : 388 $[\text{M}+\text{H}]^+$

IR: λ . (cm^{-1}): 3333; 3035; 2902 (CH alkyle); 1724 (CO); 1705; 1689; 1531; 1245; 1062; 734.

Point de fusion: 141 °C

- Acide (R)-2-amino-3-(9H-fluorèn-2-yl)propanoïque **28**

À une solution de **28'** (650 mg, 1,68 mmol) dans du méthanol (80 mL) est ajouté du Pd/C (65 mg). Le milieu est purgé par de l'azote puis par de l'hydrogène. La réaction est laissée 6 h sous agitation vigoureuse : un précipité apparaît. Le milieu est filtré : un mélange du produit voulu et de Pd/C est récupéré avant solubilisation dans un mélange dioxane-eau (1:1) puis acidification par HCl 2 M de façon à dissoudre l'acide aminé. Cette solution est filtrée, le dioxane est évaporé sous vide puis la phase aqueuse est neutralisée par ajout de NaOH 2 M. Après évaporation, la poudre blanche obtenue est lavée par de l'eau de façon à enlever les sels en excès. 500 mg de l'acide aminé sont récupérés. Le rendement est de 85 %.

MS (ESI) m/z : 254 $[\text{M}+\text{H}]^+$

IR: λ . (cm^{-1}): 3425; 3019; 2960 (CH alkyle); 1567; 1402; 1316; 737.

Point de fusion : 225 °C

UV λ . (nm): 206 (abs = 0,868), 267 (abs = 0,446), 303 (abs = 0,203)

Fluorescence : (excitation à 267 nm) maximum à 312 nm.

Excès énantiomérique déterminé par HPLC chirale : 93,4 %.

- Acide (R)-2-(((9H-fluorèn-9-yl)méthoxy)carbonylamino)-amino-3-(9H-fluorèn-2-yl)propanoïque **29**

À une solution de l'acide **28** (560 mg, 2,21 mmol, 1 eq.) dans un mélange dioxane (50 mL)-carbonate de sodium à 10 % dans l'eau (30 ml) est ajoutée goutte à goutte une solution de FmocOSu (820 mg, 2,43 mmol, 1,1 eq) dans 20 ml de dioxane. La disparition de FmocOSu est suivie par CCM éluant hexane-AcOEt (1:1). La réaction est agitée pendant 3 h. Le mélange réactionnel est extrait par de l'acétate d'éthyle et la phase organique est récupérée et évaporée. Le solide obtenu est cristallisé dans AcOEt avant filtration. 860 mg de produit attendu sont récupérés. R = 82%.

$^1\text{H-RMN}$ ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 3,00 (dd, $J = 13,2, J = 5,8$, 1H); 3,13 (dd, $J = 13,2, J = 4,9$, 1H); 3,76 (s, 2H, fluorène); 3,81 (dd, $J = 6,4, J = 4,8$, 1H), 4,12 (dd, $J = 9,8, J = 6,4$, 1H, CH β Fmoc); 4,19 (t, $J = 6,4$, 1H, Fmoc); 4,30 (dd, $J = 9,8, J = 6,4$, 1H, CH' β Fmoc); 6,35 (s, 1H, NH); 7,12 (d, $J = 7,6$, 1H); 7,20-7,40 (M, 7H); 7,53 (d, $J = 7,4$, 1H); 7,62 (t, $J = 7,2$, 2H); 7,67 (d, $J = 7,8$, 1H); 7,81 (d, $J = 7,6$, 1H); 7,7 (d, $J = 7,6$, 2H)..

MS (ESI) m/z : 476,0 [M+H] $^+$

IR: λ . (cm^{-1}): 3382. 3051; 2958 (CH alkyle); 1678; 1605; 1528. 1411; 1254 ; 1037; 735.

III.5.2 Synthèse d'une tyrosine substituée

- N-*ter*butyloxycarbonyl-4-(2-(2-méthoxyéthoxy)éthoxy)-D-tyrosine **33**

100 mg (0,35 mmol) de Boc-D-tyrosine-OH ainsi que 155 mg (1,12 mmol, 3,1 eq) de K₂CO₃ sont introduits dans 1 ml de DMF et 100 µl de H₂O. A 0 °C, 180 µl (1,43 mmol, 4,1 eq) de 1-bromo-2-(2-méthoxyéthoxy)éthane sont introduits et la réaction est mise à chauffer à 50 °C pendant 7 h.

Le milieu réactionnel est alors dissous dans l'acétate d'éthyle et de l'acide chlorhydrique dilué est ajouté afin d'amener le pH de la phase aqueuse à 2. La phase organique est lavée avec de l'acide chlorhydrique dilué puis séchée sur du sulfate de magnésium.

Après évaporation, on recueille 218,9 mg de solide amorphe.

Ce solide est dissous dans 2 ml de soude 1 M et 2 ml de dioxane et laissé sous agitation 1 h 30.

Le pH est ajusté à 2 avec de l'acide chlorhydrique dilué, puis le produit est extrait par l'acétate d'éthyle. On recueille 137,7 mg de produit brut.

La purification est réalisée par colonne de silice avec un éluant acétate d'éthyle-cyclohexane-acide acétique 60:40:1 %.

Après évaporation on recueille 94,6 mg de produit pur, soit un rendement de 68 %.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 1,41 (s, 9H, *t*Bu); 3,01 (dd, *J* = 13,7, *J* = 5,7, 1H, CHβ); 3,11 (dd, *J* = 13,7, *J* = 4,8, 1H, CHβ); 3,39 (s, 3H, OCH₃); 3,55-3,60 (M, 2H, CH₂ éthoxy); 3,69-3,74 (M, 2H, CH₂ éthoxy); 3,81-3,87 (M, 2H, CH₂ éthoxy); 4,07-4,16 (M, 2H, CH₂ éthoxy); 4,50-4,59 (m, 1H CHα); 4,97 (d, *J* = 7,7, 1H, NH); 6,84 (d, *J* = 8,3, 2H, CH Ar); 7,07 (d, *J* = 8,3, 2H, CH Ar).

MS (ESI) *m/z* : 384,2 [M+H]⁺

- 4-(2-(2-méthoxyéthoxy)éthoxy)-D-tyrosine **34**

1,89 g de N-*ter*-butyloxycarbonyl-4-(2-(2-méthoxyéthoxy)éthoxy)-D-tyrosine sont introduits dans 26 ml de HCl 35 % et 74 ml d'acétate d'éthyle. La réaction est laissée 3 h sous agitation. Après évaporation, le solide est trituré trois fois par de l'éther diéthylique pour obtenir 1,12 g de solide blanc, soit un rendement de 66 %.

RMN ¹H ((CD₃)₂SO): δ 3,04 (d, *J* = 6,3, 2H, CHHβ); 3,23 (s, 3H, OCH₃); 3,41-3,46 (M, 2H, CH₂ éthoxy); 3,53-3,59 (M, 2H, CH₂ éthoxy); 3,68-3,73 (M, 2H, CH₂ éthoxy); 4,01-4,06 (m, 2H, CH₂ éthoxy); 4,09-4,12 (m, 1H CHα); 6,89 (d, *J* = 8,8, 1H, CH Ar); 7,16 (d, *J* = 8,8, 1H, CH Ar).

RMN ¹³C (CD₃SO) : δ 34,84 (Cβ); 53,17 (Cα); 58,11 (CH₃O); 67,16 (CH₂ éthoxy); 68,97 (CH₂ éthoxy); 68,77 (CH₂ éthoxy); 71,34 (CH₂ éthoxy); 114,57 (C *meta* Ar); 126,61 (C *ortho* ar); 130,65 (CH₂-C Ar); 157,84 (O-C Ar); 170,30 (CO).

MS (ESI) *m/z* : 284, 1 [M+H]⁺

- N-fluorènylméthoxycarbonyl-4-(2-(2-méthoxyéthoxy)éthoxy)-D-tyrosine **30**

812 mg (2,87 mmol) de 4-(2-(2-méthoxyéthoxy)éthoxy)-D-tyrosine **34** sont introduits dans 4 ml d'eau distillée et 4 ml d'acétone. On y ajoute 300 mg (2,83 mmol, 0,98 eq) de Na₂CO₃ et 954,6 mg (2,83 mmol, 0,98 eq) de FmocOSu. La suspension blanche est agitée 5 h 30 à T.A.

L'acétone est alors évaporée, le pH du milieu est ajusté à 2 par de l'acide chlorhydrique 1 M et le produit est extrait par l'acétate d'éthyle (30 ml). Les phases organiques sont rassemblées, lavées par une solution de NaCl saturée puis séchées sur MgSO₄ anhydre.

Après évaporation, on obtient 1,5 g de produit brut.

Ce produit est purifié sur 120 g environ de silice, avec un éluant dichlorométhane-méthanol-acide acétique 98:2:5 %, pour obtenir 939 mg de solide blanc, soit un rendement de 65 %.

RMN ¹H (CDCl₃) : δ 3,05 (dd, *J* = 14,0, *J* = 5,7, 1H, CH_β); 3,13 (dd, *J* = 14,0, *J* = 5,4, 1H, CH'_β); 3,38 (s, 3H, OCH₃); 3,55-3,59 (M, 2H, CH₂ éthoxy); 3,67-3,72 (M, 2H, CH₂ éthoxy); 3,80-3,85 (M, 2H, CH₂ éthoxy); 4,04-4,10 (M, 2H, CH₂ éthoxy); 4,20 (t, *J* = 6,8, 1H, CH); 4,34 (dd, *J* = 10,8, *J* = 6,8, 1H, CH_β Fmoc); 4,44 (dd, *J* = 10,8, *J* = 6,8, 1H, CH'_β Fmoc); 4,63 (dd, *J* = 14,0, *J* = 5,7, 1H, CH_α); 5,30 (s, 1H, NH); 6,81 (d, *J* = 8,1, 2H, CH ar.); 7,03 (d, *J* = 8,1, 2H, CH Ar.); 7,30 (t, *J* = 7,4, 2H, fluorényle); 7,40 (t, *J* = 7,4, 2H, fluorényle); 7,56 (t, *J* = 5,8, 2H, fluorényle); 7,76 (d, *J* = 7,4, fluorényle).

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ 36,89 (CH₂β); 47,08 (CH Fmoc); 54,66 (CH_α); 58,96 (CH₃O); 66,96 (CH₂ Fmoc); 67,22 (CH₂ éthoxy); 69,68 (CH₂ éthoxy); 70,55 (CH₂ éthoxy); 71,83 (CH₂ éthoxy); 114,65 (C *meta* Phe.); 119,92 (CH fluorényle); 125,01 (CH fluorényle); 127,02 (C *ortho* ar); 127,67 (CH fluorényle); 127,77 (CH fluorényle); 130,34 (CH₂-C Phe.); 141,24 (C fluorényle); 143,64 (C fluorényle); 155,70 (CO Fmoc); 157,84 (O-C ar.); 170,30 (CO).

MS (ESI) *m/z* : 506,0 [M+H]⁺

III.5.3 Synthèse d'un analogue de l'histidine

- Méthode A : synthèse de Boc- β -(1-benzyl)-1,2,3-triazol-4-yl)-Ala-OH **35**

107 mg (0,5 mmol) de *N*-Boc-propargylglycine sont introduits dans un ballon de 100 ml avec 15 ml de ^tBuOH et 70 mg (0,5 mmol, 1 eq) d'azoture de benzyle. 10 mg (0,05 mmol, 0,01 eq) de Cu(OAc)₂.xH₂O dissous dans 3 ml d'eau et 20 mg (0,1 mmol, 0,02 eq) d'ascorbate de sodium dans 2 ml d'eau sont encore ajoutés. Le milieu réactionnel est agité une nuit à T.A. puis le ^tBuOH est évaporé et le pH de la solution résultante ajusté à 2 grâce à du HCl 1N. L'acide aminé est alors extrait par trois fois par 40 ml d'acétate d'éthyle et les fractions organiques, rassemblées, sont lavées avec une solution saturée de NaCl et séchées sur MgSO₄ anhydre. Après filtration, le solvant est évaporé sous vide et le produit brut est redissous dans l'acétate d'éthyle. Après cristallisation dans le cyclohexane et filtration on obtient 104,3 mg de Boc- β -(1-benzyl)-1,2,3-triazol-4-yl)-Ala-OH **35** attendu, pour un rendement de 60 %.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃): δ 1,27 (s, 9H, ^tBu); 3,15 (ls, 2H, C _{β} HH'); 4,32 (ls, 1H, C _{α} H); 5,32 (d, *J* = 15,0, 1H, CH-Bzl); 5,38 (d, 1H, *J* = 15,0, CH'-Bzl); 5,97 (ls, 1H, HNC _{α}); 7,13-7,19 (M, 2H, Bzl); 7,23-7,28 (M, 3H, Bzl); 7,32 (ls, 1H, CH triazole).

MS (ESI) *m/z* : 469,1 (M+H)⁺

Les conditions de purification pour les autres dérivés sont comme suit :

- Boc- β -(1-(4-méthoxybenzyl)-1,2,3-triazol-4-yl)-DL-Ala-OH **36** est purifié par chromatographie flash avec une élution isocratique consistant en DCM-MeOH-acide acétique 90:10:1 %. Les fractions sont rassemblées, évaporées et dissoutes dans le chloroforme avant cristallisation dans le *n*-hexane.

¹H RMN (CDCl₃): δ 1,42 (s, 9H, ^tBu); 3,15-3,25 (M, 2H, C _{β} H) 3,29-3,39 (M, 2H, C _{β} H'); 3,81 (s, 3H, *p*-méthoxy); 4,49 (ls, 1H, C _{α} H); 5,43 (s, 2H, CH₂-Bzl); 5,73 (ls, 1H, HNC _{α}); 6,90 (d, *J* = 8,4, 2H, Bzl); 7,22 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, Bzl); 7,31 (ls, 1H, CH triazole).

MS (ESI) *m/z* : 377,1 (M+H)⁺

- Boc- β -(1-(3,5-diméthoxybenzyl)-1,2,3-triazol-4-yl)-DL-Ala-OH **37** est obtenu sous la forme d'une huile incolore, sans cristallisation.

¹H RMN (CD₃OD): δ 1,36 (s, 9H, ^tBu); 3,05 (dd, *J* = 14,9, *J* = 4,5, 1H, C _{β} H) 3,25 (dd, *J* = 14,9, *J* = 8,9, 1H, C _{β} H'); 3,74 (s, 6H, *m,m*-diméthoxy); 4,37 (dd, *J* = 8,9, *J* = 4,5, 1H, C _{α} H); 5,48 (s, 2H, CH₂-Bzl); 6,43 (ls, 3H, Bzl); 7,73 (s, 1H, CH triazole).

MS (ESI) *m/z* : 407,1 (M+H)⁺

• Boc-β-(1-pivaloyloxyméthyl)-1,2,3-triazol-4-yl)-DL-Ala-OH **38** est purifié par chromatographie flash avec une élution isocratique consistant en DCM-MeOH-acide acétique 96:4:5 %.

¹H RMN ((CD₃)₂SO): δ 1,11 (s, 9H, ^tBu); 1,45 (s, 9H, ^tBu); 2,94 (dd, 1H, *J* = 14,5, *J* = 9,7, C_βH); 3,09 (dd, 1H, *J* = 14,5, *J* = 4,1, C_βH); 4,10-4,19 (m, 1H, C_αH), 5,59 (s, 1H, C_αNH); 6,27 (s, 2H, CH₂ POM); 7,08 (d, 1H, *J* = 7,9, NH); 7,94 (s, 1H, CH triazole).

¹³C RMN ((CD₃)₂SO): δ 26,87; 27,44; 28,53; 38,60; 53,80; 70,27; 78,52; 124,45; 144,14; 155,76; 173,52; 176,84.

MS (ESI) *m/z* : 371,7 (M+H)⁺

IR (pastille de KBr): 3386; 3151; 2981; 2938; 2576; 1747; 1716; 1517 cm⁻¹

• Fmoc-β-((1-benzyl)-1,2,3-triazol-4-yl)-DL-Ala-OH **39** est dissous dans l'acétate d'éthyle et cristallisé dans le pentane.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃): δ 3,36 (dd, *J* = 14,8, *J* = 5,4, 1H, C_βH); 3,42 (dd, *J* = 14,8, *J* = 3,8, 1H, C_βH'); 4,16 (t, *J* = 6,6, 1H, CH Fmoc); 4,30-4,41 (m, 1H, C_αH); 4,57-4,66 (m, 1H, C_αH); 5,37 (d, *J* = 14,9, 1H, CH₂-Bzl); 5,51 (d, *J* = 14,9, 1H); 5,93 (d, *J* = 5,6, 1H, HNC_α); 7,12-7,20 (M, 2H, Ar); 7,23 (ls, 1H, CH triazole); 7,27-7,33 (M, 5H, Ar); 7,34-7,44 (M, 3H, Ar); 7,55 (d, *J* = 7,3, 2H, Bzl); 7,74 (t, *J* = 8,2, 2H, Bzl).

¹³C RMN (CDCl₃): δ 27,51; 47,10; 53,25; 54,35; 66,78; 119,93; 123,18; 125,10; 127,06; 127,69; 127,92; 128,80; 129,08; 134,03; 141,19; 142,33; 143,67; 155,72; 172,55.

• Fmoc-β-(1-(4-méthoxybenzyl)-1,2,3-triazol-4-yl)-DL-Ala-OH **40** est dissous dans le chloroforme et cristallisé dans le *n*-hexane.

¹H RMN (CDCl₃): δ 3,28 (dd, *J* = 14,8, *J* = 6,7, 1H, C_βH); 3,40 (ld, *J* = 14,8, 1H, C_βH'); 3,74 (s, 3H, *p*-méthoxy); 4,19 (t, *J* = 6,9, 1H, H-9 Fmoc); 4,37 (d, *J* = 6,9, 2H, CH₂ Fmoc); 4,59 (ls, 1H, C_αH); 5,35 (d, *J* = 14,8, 1H, CH-Bzl); 5,46 (d, *J* = 14,8, 1H, CH-Bzl); 5,95 (d, *J* = 5,4, 1H, HNC_α); 6,84 (d, *J* = 8,2, 2H, Ar); 7,16 (d, *J* = 8,6, 2H, CH Ar); 7,21 (s, 1H, CH triazol); 7,28-7,34 (M, 2H, CH Ar); 7,37-7,43 (M, 2H, Ar); 7,55-7,61 (M, 2H, CH Ar); 7,74-7,80 (M, 2H, CH Ar).

MS (ESI) *m/z* : 499,1 (M+H)⁺

• Fmoc-β-(1-(3,5-diméthoxybenzyl)-1,2,3-triazol-4-yl)-DL-Ala-OH **41** est dissous dans l'acétate d'éthyle et cristallisé dans le cyclohexane.

¹H RMN (CD₃CN): δ 3,10 (dd, *J* = 14,9, *J* = 7,6, 1H, C_βH); 3,20 (dd, *J* = 14,9, *J* = 4,7, 1H, C_βH'); 3,70 (ls, 6H, *m,m*-diméthoxy); 4,20 (t, *J* = 7,1, 1H, H-9 Fmoc); 4,30 (d, *J* = 7,1, 2H, CH₂ Fmoc); 4,41-4,46 (m, 1H, C_αH); 5,40 (s, 2H, CH₂-Bzl); 6,38 (ls, 3H, Bzl); 7,32 (t, *J* = 7,5, 2H, fluorényle); 7,42 (dd, *J* = 7,5, *J* = 7,1, 2H, fluorényle); 7,58-7,64 (M, 3H, fluorényle + CH triazole); 7,83 (d, *J* = 7,5, 2H, fluorényle).

MS (ESI) *m/z* : 529,2 (M+H)⁺

• Fmoc-β-(1-pivaloyloxyméthyl)-1,2,3-triazol-4-yl)-DL-Ala-OH **42** est purifié par chromatographie flash en utilisant une élution isocratique consistant en DCM-MeOH-acide acétique 97:3:5 %.

¹H RMN ((CD₃)₂SO): δ 1,07 (s, 9H, ^tBu); 3,00 (dd, 1H, *J* = 14,5, *J* = 9,6, C_βH); 3,15 (dd, 1H, *J* = 14,5, *J* = 4,6, C_βH'); 3,30 (s, 1H, CH Fmoc); 4,10-4,30 (M, 3H, C_αH + CH₂ Fmoc); 6,26 (s, 2H, CH₂ POM); 7,31 (t, *J* = 7,6, 2H, fluorènyle); 7,41 (t, 2H, *J* = 7,4, fluorènyle); 7,67 (lt, 2H, *J* = 6,2, fluorènyle); 7,88 (d, 1H, *J* = 7,6, fluorènyle); 7,96 (s, 1H, CH triazole).

¹³C RMN ((CD₃)₂SO): δ 26,72; 27,47; 38,73; 47,05; 53,18; 67,06; 69,81; 119,93; 124,57; 124,89; 125,08; 127,07; 127,68; 141,20; 141,21; 142,66; 143,64; 143,73; 155,89; 172,75; 177,65.

MS (ESI) *m/z* : 493,1 (M+H)⁺

IR (pastille de KBr): 3411; 3129; 2966; 1738; 1725; 1529 cm⁻¹

• Méthode B : synthèse de Ac-(1-(3,5-diméthoxybenzyl)-1,2,3-triazol-5-yl)-DL-Ala-OEt **44**

Dans un ballon bicol de 50 ml est introduit 10 ml de toluène. Ce solvant est alors dégazé par trois cycles de congélation sous vide-fusion sous azote. 100 mg (0,54 mmol) de N-acétylpropargylglycine sont alors ajoutés avec 145 mg (1,09 mmol, 2 eq) d'azoture de benzyle. Le mélange est dégazé. 21,7 mg (27,3 μmol, 0,05 eq) de catalyseur au ruthénium Cp*RuCl(PPh₃)₂ est introduit et le mélange est dégazé une dernière fois. La réaction est agitée pendant 15 h à 80 °C sous azote. Le mélange réactionnel est alors évaporé pour obtenir 205,9 mg de produit brut. Ce solide est dissous dans l'acétonitrile, puis filtré. Le filtrat est ensuite purifié par HPLC préparative en utilisant un gradient composé d'eau, d'acétonitrile et d'acide formique. On récupère 97,12 mg d'une huile visqueuse. R = 84 %.

¹H RMN (CDCl₃): δ 1,22 (t, *J* = 7,2, 3H, CH₃ éthyle); 1,96 (s, 3H, acétyle); 3,10 (dd, *J* = 15,8, *J* = 5,9, 1H, C_βH); 3,16 (dd, *J* = 15,8, *J* = 6,2, 1H, C_βH'); 4,12-4,24 (M, 2H, CH₂ ethyl); 4,73 (ddd, *J* = 7,1, *J* = 6,2, *J* = 5,9, 1H, HC_α), 5,46 (d, *J* = 16,0, 1H, CH-Bzl); 5,60 (d, *J* = 16,0, 1H, CH'-Bzl); 6,38 (d, *J* = 7,1, 1H, NH); 7,12-7,20 (M, 2H, Bzl); 7,30-7,38 (M, 3H, Bzl); 7,43 (s, 1H, CH triazole).

¹³C RMN (CDCl₃): δ 14,00; 22,95; 25,72; 51,28; 51,65; 51,18; 127,15; 128,37; 128,97; 132,20; 133,36; 134,70; 170,05; 170,51.

MS (ESI) *m/z* : 317,2 (M+H)⁺

Le composé Ac-(1-(3,5-benzyl)-1,2,3-triazol-5-yl)-DL-Ala-OEt **43** est obtenu par la même procédure.

¹H RMN (CDCl₃): δ 1,21 (t, *J* = 7,1, 3H, CH₃ éthyle); 1,96 (s, 3H, acétyle); 3,08 (dd, *J* = 15,8, *J* = 5,5, 1H, C_βH); 3,15 (dd, *J* = 15,8 Hz, *J* = 6,4 Hz, 1H, C_βH'); 3,71 (s, 6H, *m,m*-diméthoxy); 4,13 (qd, *J* = 9,6, *J* = 7,1, 1H, CH éthyle); 4,18 (qd, *J* = 9,6, *J* = 7,1, 1H, CH éthyle); 4,73 (ddd, *J* = 7,1, *J* = 6,4, *J* = 5,5, 1H, C_αH), 5,38 (d, *J* = 15,6, 1H, CH-Bzl); 5,51 (d, *J* = 15,6, 1H, CH-Bzl); 6,27 (d, *J* = 2,1, 2H, Bzl); 6,35 (t, *J* = 2,1, 1H, Bzl); 6,59 (d, *J* = 7,1, 1H, NH); 7,41 (s, 1H, CH triazole).

MS (ESI) *m/z* : 377,1 (M+H)⁺

- Déprotection sélective du groupe POM permettant l'obtention de Boc-β-(1,2,3-triazol-4-yl)-DL-Ala-OH **45**

150 mg (0,4 mmol) de Boc-triazolyl(*N*³-pivaloyloxyméthyl)-Ala-OH **38** sont ajoutés à 2,1 ml de méthanol et à 2,5 ml (2,5 mmol, 6,2 eq) de NaOH 1 M. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant une journée à T.A, puis le milieu est acidifié à pH = 3 et extrait avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées et séchées avec du MgSO₄ anhydre. Après évaporation on obtient 92,6 mg de solide amorphe. R = 61 %.

¹H RMN (CD₃OD): δ 1,37 (s, 9H, ^tBu); 3,06 (dd, 1H, *J* = 14,9, *J* = 8,7, C_βH); 3,24 (dd, 1H, *J* = 14,9, *J* = 4,6, C_βH); 4,38 (dd, *J* = 8,7, *J* = 4,6, C_αH), 7,57 (s, 1H, CH triazole).

¹³C RMN ((CD₃)₂SO): δ 26,72; 28,15; 53,39; 78,19; 131,5; 142,8; 155,30; 173,08.

MS (ESI) *m/z* : 257,1

IR (pastille de KBr): 3159, 3981, 2602, 2360, 1694, 1520 cm⁻¹.

- Déprotection sélective du groupe BOC permettant l'obtention de H-β-(1-(pivaloyloxyméthyl)-1,2,3-triazol-4-yl)-DL-Ala-OH **46**

2,2 ml (25 mmol, 9 eq) de HCl 35 % sont introduits avec 100 mg (0,27 mmol) de Boc-triazolyl(*N*³-pivaloyloxyméthyl)-Ala-OH **38** dans 7,8 ml d'acétate d'éthyle. Le milieu d'abord biphasique devient rapidement homogène, sous agitation à T.A. Après 3 h le milieu réactionnel est dilué dans l'eau est lavé trois fois par du dichlorométhane (20 ml). La phase aqueuse est alors lyophilisée pour obtenir 94 mg d'un solide jaune odorant.

Ce solide est purifié par HPLC préparative pour obtenir 32,2 mg de solide blanc. R = 44 %.

¹H RMN (D₂O): δ 1,26 (s, 9H, ^tBu); 3,30 (dd, 1H, *J* = 15,8, *J* = 6,8, C_βH); 3,36 (dd, 1H, *J* = 15,8, *J* = 5,2, C_βH); 4,06 (dd, 1H, *J* = 6,8, *J* = 5,2, C_αH); 6,33 (s, 2H, CH₂ POM); 8,06 (s, 1H, CH triazole).

¹³C RMN (D₂O): δ 25,81; 26,16; 38,41; 54,16; 71,22; 125,42; 142,14; 172,91; 179,74.

MS (ESI) *m/z* : 271,1 (M+H)⁺

IR (pastille de KBr): 3142; 3044; 2969; 2591; 2088; 1740; 1617; 1586 cm⁻¹.

- Déprotection sélective du groupe Fmoc permettant l'obtention de H-β-triazolyl(*N*³-pivaloyloxyméthyl)-DL-Ala-OH **46'**

99 mg (0,2 mmol) de Fmoc-triazolyl(*N*³-pivaloyloxyméthyl)-Ala-OH **42** sont introduits dans 5 ml de DMF avec 13,5 μL (0,22 mol, 1,1 eq) de pipéridine. Le mélange est agité à T.A. pendant 3 h 45 puis évaporé pour obtenir un solide blanc. Ce produit brut est alors trituré avec de l'éther diéthylique afin d'éliminer l'adduit dibenzofulvène-pipéridine. Après séchage, on obtient 29,3 mg de solide pur. R = 53 %.

