



HAL
open science

Synthèse et auto-organisation de lipopeptides organocatalytiques bio-inspirés : influence de l'agrégation sur leur activité hydrolytique

Marie Bélières

► **To cite this version:**

Marie Bélières. Synthèse et auto-organisation de lipopeptides organocatalytiques bio-inspirés : influence de l'agrégation sur leur activité hydrolytique. Chimie organique. Université Toulouse 3 Paul Sabatier, 2015. Français. NNT : . tel-02901858

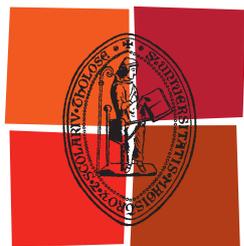
HAL Id: tel-02901858

<https://hal.science/tel-02901858>

Submitted on 17 Jul 2020

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.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Marie BELIERES

Le lundi 28 septembre 2015

Titre :

Synthèse et auto-organisation de lipopeptides organocatalytiques bio-inspirés : influence de l'agrégation sur leur activité hydrolytique

ED SDM : Chimie, Biologie, Santé - CO 042

Unité de recherche :

Laboratoire des IMRCP UMR 5623

Directeur(s) de Thèse :

Dr. Christophe DEJUGNAT
Prof. Nadia CHOUINI-LALANNE

Rapporteurs :

Dr. Valérie BERL
Dr. Reiko ODA

Autre(s) membre(s) du jury :

Prof. Paul-Louis FABRE (Président)
Dr. Thierry DOUKI (Examineur)
Dr. Claire KANONY-TRUC (Examineur)
Dr. Sergii RUDIUK (Examineur)

Remerciements

Ces trois années de thèse tout juste derrière moi, je tenais évidemment à remercier un certain nombre de personnes ayant participé au bon déroulement de mon projet de recherche et/ou à toute autre activité extra-professionnelle.

Je souhaitais avant tout adresser mes remerciements les plus sincères à l'ensemble de mon jury. J'ai beaucoup apprécié leur curiosité à l'égard de mon sujet de thèse et la discussion à laquelle cela a conduit le jour de ma soutenance. J'ai pris plaisir à échanger avec vous, chose qui me paraissait quasi impossible pendant la phase de préparation, due au stress généré à cette occasion! Je voulais plus particulièrement remercier le président de ce jury, le professeur Paul-Louis Fabre. La décontraction qu'il affichait ce jour-là (partagée par l'ensemble du jury d'ailleurs), tout en assurant le bon déroulement de la soutenance, a certainement contribué à m'ôter un peu de stress et à profiter davantage du moment.

Ensuite, il m'est indispensable de remercier mes deux directeurs de thèse, Christophe Déjournat et Nadia Chouini-Lalanne. L'émotion et la timidité n'aidant pas à exprimer tout cela par oral (cf. soutenance !!), j'espère par ces quelques mots traduire toute la reconnaissance et le respect que je leur porte. Il m'aurait en effet été difficile d'avoir meilleur encadrement. Si l'on met évidemment de côté tout l'aspect scientifique dont j'ai bénéficié, ce double encadrement m'aura également permis d'apprécier et de profiter de leur personnalité et de leurs qualités humaines qui ont sans aucun doute beaucoup apporté à notre collaboration. Ma thèse aurait certainement été différente si je ne m'étais pas sentie aussi soutenue, mise en confiance et en valeur. Je pourrais m'étendre sur les nombreuses choses que j'ai apprécié chez vous, j'ai peur d'en faire trop et que ça ne semble alors plus du tout sincère donc je vous dis simplement un très grand MERCI !

Je souhaite également adresser mes remerciements à tous les services communs de spectroscopie et de chromatographie que j'ai fréquemment sollicités pendant mes travaux. Mes remerciements vont également au CMEAB, centre dans lequel j'ai pu découvrir et utilisé la microscopie électronique à transmission, ainsi qu'au LLB et plus précisément à Jacques Jestin, pour la formation à la diffusion de neutrons aux petits angles et les analyses qu'il m'a été permis de réaliser.

Je tiens évidemment à remercier l'ensemble des membres des IMRCP, permanents et non-permanents avec qui j'ai pu échanger aussi bien scientifiquement que « extra-professionnellement ».

Parmi eux, je souhaite en particulier remercier Camille, avec qui j'aurai partagé cette expérience dès le premier jour et pas mal d'autres choses par la suite... ! Merci aussi à mes trois premières collègues de bureau, Julie, Jessie et Bea : les six mois passés ensemble ainsi que les vidéos concoctées pour ma soutenance resteront évidemment mémorables. Je pense également à Hanh et Paty avec qui j'ai tissé de précieux liens d'amitié, et qui je l'espère perdureront malgré la distance. Et enfin, merci à Claire, Jérémy, Guillaume, Florence et Ophélie pour leur bonne humeur, leurs encouragements et leur soutien pendant ces trois ans.

Je finirai par remercier mes amis et ma famille : tous ceux qui se sont déplacés pour le grand jour, ceux qui ont tenté de s'intéresser et de comprendre mon sujet, ceux qui ont partagé l'aventure doctorale dans d'autres villes (avec qui je partage aujourd'hui les célébrations), ainsi que tous ceux qui m'auront invité à penser à autre chose ! Un merci tout particulier à ma sœur Pauline, que j'ai sollicité à de nombreuses reprises lors de mes moments de panique et qui a toujours répondu présent. Evidemment ce n'est pas la seule, mais je voulais profiter de l'occasion pour la remercier pour tout ce qu'elle a fait pour moi au cours de ces années.

Merci encore, j'ai bénéficié de votre part à tous de la confiance et du soutien dont j'avais besoin pour mener au mieux ces trois ans de travail.

SOMMAIRE

Introduction générale _____ 1

CHAPITRE I : Mise au point bibliographique sur la conception d'organocatalyseurs bio-inspirés _____ 4

I. Introduction _____ 6

I. 1. La catalyse enzymatique _____ 6

I. 2. Emergence de l'organocatalyse et du biomimétisme _____ 9

II. La conception de systèmes « hôtes » _____ 10

II. 1. Utilisation de macrocycles comme hôtes catalytiques _____ 10

II. 1. 1. Les cyclodextrines _____ 10

II. 1. 2. Les cucurbiturils _____ 13

II. 1. 3. Autres exemples de macrocycles hôtes _____ 14

II. 2. Emploi de polymères à empreintes moléculaires _____ 16

III. Les séquences peptidiques comme outils catalytiques _____ 19

III. 1. Présentation des acides aminés _____ 19

III. 2. Utilisation d'acides aminés et de courtes séquences peptidiques en catalyse _____ 20

III. 2. 1. Les acides aminés simples _____ 21

III. 2. 2. Les dipeptides _____ 24

III. 2. 3. Les dipeptides cycliques _____ 25

III. 3. Développement d'oligopeptides catalytiques _____ 26

III. 3. 1. Les homo-oligopeptides _____ 27

III. 3. 2. Les oligopeptides multi-composants _____ 28

IV. Les lipopeptides : une alternative simplifiée pour apporter l'hydrophobie à des séquences peptidiques catalytiques _____ 31

IV. 1. Définition des systèmes _____ 31

IV. 2. Intérêt des systèmes moléculaires organisés _____ 32

IV. 3. Origine et propriétés des lipopeptides _____ 34

IV. 2. 1. Lipopeptides issus des microorganismes _____ 34

IV. 2. 2. Lipopeptides synthétiques aux propriétés d'auto-assemblage _____ 35

IV. 4. Lipopeptides comme organocatalyseurs _____ 37

V. Conclusion _____ 39

VI. Références _____ 41

CHAPITRE II : Synthèse et caractérisation des lipopeptides	46
I. Introduction	48
II. Synthèse peptidique	51
II. 1. Définition du couplage peptidique	51
II. 2. Choix des conditions de couplage	53
II. 3. Synthèse des lipopeptides C-ter	53
II. 4. Synthèse des lipopeptides N-ter	57
II. 5. Synthèse de lipopeptides catanioniques	60
III. Etude des propriétés d'auto-organisation des lipopeptides	62
IV. 1. Caractérisation des lipopeptides à l'état solide	62
IV. 2. Détermination des concentrations d'agrégation critiques	64
IV. 3. Détermination des structures par microscopie électronique	71
IV. 4. Techniques de diffusion	73
IV. Conclusion	78
V. Références	79
CHAPITRE III : Etude de l'activité catalytique des lipopeptides sur l'hydrolyse d'esters en milieu aqueux	81
I. Introduction	84
II. Etude de l'activité catalytique des lipopeptides sur l'hydrolyse du pNPA	87
II. 1. Etudes préliminaires	87
II. 2. Comparaison de l'efficacité catalytique des différents lipopeptides	88
II. 3. Influence des groupes fonctionnels et des charges sur la catalyse	99
II. 4. Hypothèses de mécanisme	102
II. 5. Etude de l'existence d'une contribution interfaciale	106
III. Extension à d'autres esters modèles	109
IV. Conclusion	112
V. Références	114

CHAPITRE IV : Etude de l'activité catalytique des lipopeptides sur l'hydrolyse d'esters en milieu aqueux _____ 117

I. Introduction _____ 119

II. Etude des interactions lipopeptides-ADN _____ 121

II. 1. Suivi du phénomène d'intercalation du bromure d'éthidium _____ 124

II. 2. Etude des interactions dans le petit sillon du double brin d'ADN _____ 129

II. 3. Suivi de l'auto-organisation des lipopeptides en présence d'ADN _____ 133

III. Etude des propriétés hydrolytiques des lipopeptides sur l'ADN _____ 136

III. 1. Mise en évidence du clivage de l'ADN et influence de la longueur de la chaîne carbonée _____ 138

III. 2. Influence de la nature de la tête polaire sur le clivage de l'ADN _____ 141

III. 3. Etude du clivage de l'ADN en présence d'un catanionique _____ 143

III. 4. Variation du rapport lipopeptide/ADN _____ 144

IV. Conclusion _____ 147

V. Références _____ 149

Conclusion générale _____ 152

Partie expérimentale _____ 155

I. Techniques analytiques _____ 158

II. Techniques physico-chimiques _____ 159

II. 1. Tensiométrie _____ 159

II. 2. Fluorimétrie _____ 159

II. 3. Diffusion dynamique de la lumière _____ 159

II. 4. Diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA) _____ 160

II. 5. Microscopie électronique à transmission _____ 160

III. Suivi d'hydrolyse d'ester _____ 160

IV. Interactions ADN-lipopeptides _____ 161

V. Hydrolyse de l'ADN _____ 161

VI. Synthèse peptidique _____ 162

VI. 1.	<i>Synthèse des lipopeptides C_mGlyGlyGlyOH</i>	168
VI. 2.	<i>Synthèse des lipopeptides H-HisGlyGlyC_m</i>	170
VI. 3.	<i>Synthèse des lipopeptides H-GlyGlyGly-C_m</i>	175
VI. 4.	<i>Synthèse des lipopeptides catanioniques</i>	178

Annexes

 181

Introduction générale

Dans une démarche de développement durable, douze principes de chimie verte tendant à minimiser l'impact des procédés de synthèse sur l'environnement et la santé ont vu le jour au début des années 1990. Ces recommandations encourageaient notamment à poursuivre le développement de systèmes catalytiques originaux tels que les complexes métalliques, des composés organiques ou encore les enzymes. Ces dernières constituent des outils catalytiques naturels extrêmement efficaces. Cependant, leur stabilité parfois limitée (température, pH...) et leur coût généralement élevé, ont conduit au développement de nouveaux outils pour pallier ces contraintes. Serait-il possible alors de concevoir des systèmes dont l'efficacité catalytique s'approcherait d'une activité enzymatique?

Le biomimétisme constitue une des approches permettant de répondre à cette question. Le but est d'emprunter aux enzymes les caractéristiques à l'origine de leur efficacité catalytique et de les intégrer dans de nouvelles structures plus stables. Les enzymes sont définies par de longs enchaînements d'acides aminés, qui se structurent pour générer des sites de confinement hydrophobes au sein desquels la catalyse se produit. L'orientation et la réactivité des acides aminés dans ces sites actifs garantissent en outre une activité catalytique maximale. Ainsi, la conception d'outils catalytiques synthétiques bio-inspirés a conduit au développement de catalyseurs porteurs de motifs peptidiques d'une part, et à divers systèmes supramoléculaires d'autre part, qui s'attacheront à recréer des zones de confinement hydrophobes. Une dernière option consiste à mettre en œuvre des systèmes qui intègrent les deux conditions précédentes dans la définition de leur structure, en faveur de modèles biomimétiques potentiellement plus actifs.

Notre travail s'est inscrit dans cette démarche puisqu'il a consisté à mettre au point une série de composés amphiphiles à base d'acides aminés, nommés lipopeptides. Au-delà de la présence de motifs peptidiques, les propriétés amphiphiles de ces lipopeptides vont induire la formation de systèmes organisés, à l'origine de zones de confinement hydrophobes. Il s'agira alors d'évaluer si les contributions hydrophobes associées à la présence d'acides aminés seront à l'origine de catalyseurs plus performants.

Le premier chapitre constituera tout d'abord une mise au point bibliographique sur la conception d'organocatalyseurs, issue d'une approche bio-inspirée, illustrant ainsi la diversité des outils mis en œuvre pour mimer l'activité enzymatique. Cela nous permettra de discerner certains prérequis à la mise au point de « mimes » d'enzymes efficaces tout en tenant compte des limitations rencontrées.

Le chapitre 2 sera ensuite consacré à la conception de lipopeptides comme systèmes catalytiques potentiels. La synthèse sera orientée de façon à disposer de lipopeptides aux structures variées, en jouant sur les parties hydrophobes et polaires. Dans un second temps, il s'agira d'étudier les propriétés d'auto-organisation et la morphologie des agrégats formés afin d'identifier s'ils sont en

mesure de générer des environnements hydrophobes qui pourraient participer à la catalyse.

Le chapitre 3 portera quant à lui sur l'étude des propriétés catalytiques des lipopeptides *via* l'hydrolyse de fonctions ester. Un ester modèle sera choisi pour mesurer le potentiel catalytique de nos systèmes. Nous chercherons notamment à évaluer l'influence de la structure moléculaire (chaîne hydrophobe, acides aminés) et de l'organisation supramoléculaire sur l'efficacité catalytique.

Pour finir, le chapitre 4 aura pour objectif d'étendre l'étude des propriétés hydrolytiques des lipopeptides à un substrat d'intérêt biologique : l'ADN. Pour cela, nous nous interrogerons tout d'abord sur les interactions existant entre l'ADN et nos structures amphiphiles pour évaluer par la suite si les lipopeptides sont capables d'hydrolyser un ADN duplex. Là encore, nous nous pencherons sur le rôle du caractère hydrophobe des lipopeptides et sur la nature des acides aminés vis-à-vis du clivage de l'ADN.

CHAPITRE I

**Mise au point bibliographique sur la
conception d'organocatalyseurs bio-
inspirés**

SOMMAIRE

I. Introduction	6
I. 1. <i>La catalyse enzymatique</i>	6
I. 2. <i>Emergence de l'organocatalyse et du biomimétisme</i>	9
II. La conception de systèmes « hôtes »	9
II. 1. <i>Utilisation de macrocycles comme hôtes catalytiques</i>	10
II. 1. 1. Les cyclodextrines	10
II. 1. 2. Les cucurbiturils	13
II. 1. 3. Autres exemples de macrocycles hôtes	14
II. 2. <i>Emploi de polymères à empreintes moléculaires</i>	16
III. Les séquences peptidiques comme outils catalytiques	19
III. 1. <i>Présentation des acides aminés</i>	19
III. 2. <i>Utilisation d'acides aminés et de courtes séquences peptidiques en catalyse</i>	20
III. 2. 1. Les acides aminés simples	21
III. 2. 2. Les dipeptides	24
III. 2. 3. Les dipeptides cycliques	25
III. 3. <i>Développement d'oligopeptides catalytiques</i>	26
III. 3. 1. Les homo-oligopeptides	27
III. 3. 2. Les oligopeptides multi-composants	28
IV. Les lipopeptides : une alternative simplifiée pour apporter l'hydrophobie à des séquences peptidiques catalytiques	31
IV. 1. <i>Définition des systèmes</i>	31
IV. 2. <i>Intérêt des systèmes moléculaires organisés</i>	32
IV. 3. <i>Origine et propriétés des lipopeptides</i>	34
IV. 2. 1. Lipopeptides issus des microorganismes	34
IV. 2. 2. Lipopeptides synthétiques aux propriétés d'auto-assemblage	35
IV. 4. <i>Lipopeptides comme organocatalyseurs</i>	37
V. Conclusion	39
VI. Références	41

I. Introduction

Depuis la fin des années 1990, l'émergence du concept de « chimie verte » introduit par Anastas et Warner a laissé place à une nouvelle approche de la chimie et des protocoles de synthèse.¹ En effet, face à des enjeux énergétiques et environnementaux majeurs au niveau planétaire, la chimie doit construire son avenir sur une démarche de développement durable.

Pour cela, douze principes à respecter ont été définis et diffusés auprès des professionnels de la recherche et de l'industrie. Ainsi, la chimie doit évoluer vers des activités plus sûres et plus respectueuses de l'environnement. Des réactions en milieu aqueux plutôt qu'en présence de solvants seront alors privilégiées, tout comme l'utilisation de ressources renouvelables et de catalyseurs mais aussi l'économie d'atomes ou encore une attention particulière à limiter les accidents, explosions ou émissions de produits toxiques.

Depuis plus d'un siècle, et de manière plus active grâce à la parution de ces douze principes, l'utilisation de procédés et réactions catalytiques est ainsi devenue omniprésente dans la conception de nouvelles voies de synthèse.²

I. 1. *La catalyse enzymatique*

Parmi les différentes stratégies développées à ce jour, c'est l'utilisation des enzymes qui conduit aux systèmes catalytiques les plus compétitifs. Ces protéines, longs enchaînements de séquences peptidiques structurés, sont omniprésentes dans les processus catalytiques qui opèrent dans les milieux naturels et régissent de nombreux mécanismes vitaux. Pour expliquer de telles performances, plusieurs théories, dont le concept de système « clé-serrure » de Fischer³ puis d'ajustement induit,⁴ ont été proposées pour illustrer le mode d'action des enzymes. Selon ces principes, les enzymes (E) sont capables d'accueillir et de se lier *via* leur site actif à un nombre restreint de substrats (S), grâce à la structure particulière qu'elles adoptent, pour former un complexe enzyme-substrat (ES) (Figure I.1). De plus, la théorie d'ajustement induit suggère qu'une fois le substrat lié, l'enzyme adapte ensuite la structure de sa cavité (EP) de manière à favoriser la formation et la stabilisation d'un état de transition ET_{enz} (Figure I.2). Cet effet stabilisant diminue alors la barrière énergétique à franchir pour transformer le substrat en produits (P_1) et (P_2). Pour atteindre son état de transition ET_{enz} , l'énergie ΔG_{ETenz} à fournir au complexe enzyme-substrat est moins importante que celle nécessaire pour atteindre l'état de transition ET du substrat en l'absence de catalyseur.

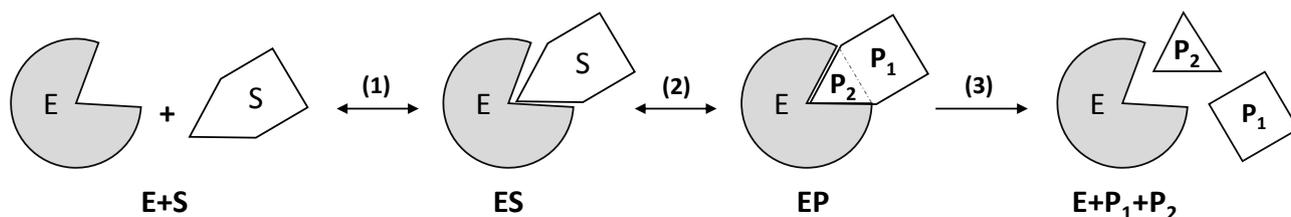


Figure I.1 : Schéma simplifié de la réactivité enzyme-substrat. (1) Formation du complexe ES (2) Ajustement induit du site actif de l'enzyme par rapport au substrat. (3) Libération des produits de réaction P₁ et P₂

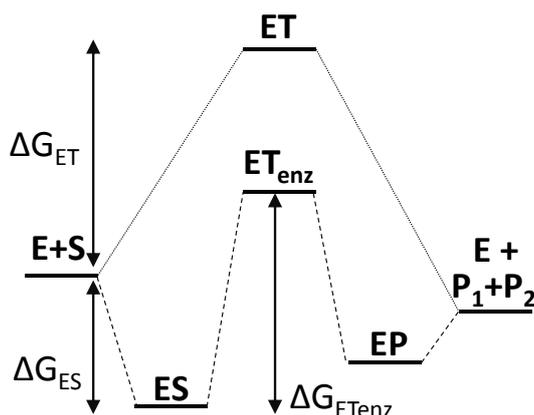


Figure I.2 : Représentation des niveaux d'énergie en fonction des coordonnées de réactions : mise en évidence de l'abaissement énergétique de l'état de transition d'une réaction enzymatique (ET_{enz}) comparé à la même réaction réalisée en l'absence de catalyseur (ET)

Ces hypothèses illustrent la spécificité d'action des enzymes. Plusieurs substrats sont capables de créer des interactions avec les sites catalytiques enzymatiques. Cependant, l'hypothèse émise par Koshland⁴ consiste à dire que l'enzyme n'en reconnaît que certains en adaptant sa cavité en fonction de la nature et de la structure des substrats. Cela est dû notamment à la présence d'acides aminés spécifiques au sein des sites actifs qui accueillent et stabilisent les substrats à modifier, grâce à des interactions faibles (principalement des liaisons hydrogène). De ce fait, selon la conformation adoptée par le site actif en présence du substrat, l'enzyme sera très réactive vis-à-vis du substrat invité ou totalement inhibée si ce substrat se lie à elle mais n'induit pas la mise en place d'une conformation « active » du catalyseur biologique. Cela souligne donc l'importance de la compatibilité de structure entre enzymes et substrats et explique par ailleurs la grande sélectivité des enzymes.

Dans un second temps, la cavité enzymatique est souvent décrite comme une « poche hydrophobe » qui favorise l'accueil des substrats, en général tout aussi hydrophobes. Un phénomène de concentration locale en réactifs est ainsi observé au sein de ces sites hydrophobes. Celui-ci favorise alors la réaction et participe par conséquent à l'amélioration des vitesses des processus enzymatiques.

Enfin, les enzymes sont constituées d'un enchaînement covalent d'acides aminés. Ces motifs créent également entre eux des liaisons faibles qui sont responsables de la structure tertiaire des enzymes, cette structure étant elle-même génératrice de sites catalytiques hydrophobes. Le positionnement spécifique de certains acides aminés constitue par ailleurs un apport organocatalytique (*via* les fonctions acides, basiques ou nucléophiles de certains) qui va agir de manière complémentaire à la présence de la cavité hydrophobe. La triade catalytique sérine-histidine-acide aspartique des protéases suit par exemple un mécanisme d'action qui inclut une attaque nucléophile de la sérine.⁵

Cet effet synergique entre l'hydrophobie du site actif, générée par l'enchaînement peptidique, et la participation chimique de certains acides aminés permet aux enzymes d'accélérer de manière considérable un grand nombre de réactions. Leurs propriétés catalytiques incomparables ont donc logiquement été exploitées dans l'industrie et appliquées à des activités aussi variées que l'industrie pharmaceutique, les cosmétiques, le blanchiment du papier ou encore l'industrie agro-alimentaire.^{6,7}

Il existe cependant quelques limitations non négligeables à l'utilisation des enzymes en synthèse organique. Outre leur coût parfois très élevé, il peut y avoir d'éventuelles contraintes de stabilité. En effet, les enzymes expriment généralement leur complète activité catalytique pour un pH optimal : la phosphatase alcaline possède par exemple un pH optimal de 9,1 tandis qu'elle perd partiellement son activité à pH neutre.⁸ Leurs propriétés dépendent également de la température. L'augmentation de la température est ainsi responsable d'une meilleure activité de la catalase, jusqu'à une température optimale de 51°C, au-delà de laquelle l'enzyme est désactivée, voire dénaturée.⁹ Enfin, les enzymes sont des catalyseurs très spécifiques de substrats et de réactions donnés.

Pour étendre leur domaine d'application à une gamme de substrats et/ou de réactions plus grande tout en augmentant leur stabilité vis-à-vis des conditions de réaction, plusieurs alternatives ont été envisagées dont l'immobilisation sur support solide des enzymes ou la mutation contrôlée ou aléatoire d'ADN.¹⁰⁻¹² Par exemple, la mutation au sein du site actif enzymatique d'une oxydase peut générer une inversion de la stéréochimie de la réaction catalysée et permettre l'obtention de produits de réaction de configuration (R) dans le cas de l'enzyme naturelle ou (S) après mutation ; tandis que l'immobilisation d'enzyme sur support polymérique thermoplastique améliore la conservation des systèmes enzymatiques et de leur activité catalytique pour atteindre une stabilité sur au moins un an.

Il existe également diverses stratégies biomimétiques pour venir pallier les limitations potentielles liées à l'utilisation des enzymes en catalyse.

I. 2. Emergence de l'organocatalyse et du biomimétisme

Depuis la fin des années 1990, un intérêt manifeste pour l'organocatalyse a pu être observé, notamment en analysant le nombre d'articles scientifiques parus à ce sujet.¹³ Cela se justifie en partie par le fait qu'un organocatalyseur est un outil en général peu coûteux et peu sensible aux stimuli externes, par rapport à certains complexes métalliques. De plus, il est possible de concevoir des systèmes catalytiques respectueux de l'environnement et de la santé en employant par exemple des acides gras, des sucres ou des acides aminés.

Dans ce vaste domaine qu'est l'organocatalyse, une approche consiste à s'inspirer des processus enzymatiques et des connaissances sur leur mode de fonctionnement pour concevoir de nouveaux systèmes catalytiques performants : on parle de biomimétisme.¹⁴ L'objectif est d'obtenir des composés à haute activité catalytique, qui pourront également présenter une certaine sélectivité vis-à-vis du substrat, de la réaction ou des produits. Il est par ailleurs souhaitable d'élaborer des structures plus stables et moins coûteuses que les enzymes qui puissent également être recyclées. Plusieurs stratégies peuvent ainsi être envisagées pour la conception de systèmes organocatalytiques bio-inspirés.

- Une première approche consiste à développer des cavités dites systèmes « hôtes » analogues aux sites enzymatiques hydrophobes, afin d'adapter la forme de la cavité aux substrats à accueillir et/ou de recréer le confinement permettant d'accroître la réactivité.
- Parallèlement, une autre thématique de recherche vise à concevoir des oligopeptides dans le but d'apporter une organocatalyse performante liée à l'intervention de plusieurs acides aminés sur un même substrat et à leur combinaison adéquate.
- Enfin, pour des systèmes encore plus performants, il peut également être envisagé d'associer les deux aspects en apportant la catalyse chimique (des acides aminés), à laquelle viendrait s'ajouter la contribution d'une zone hydrophobe qui orienterait les substrats dans un positionnement plus favorable à l'intervention des acides aminés constituant les sites réactifs.

II. La conception de systèmes « hôtes »

Une première approche du biomimétisme est donc de concevoir des systèmes qui vont chercher à mimer l'environnement confiné des sites catalytiques enzymatiques. L'objectif est de

travailler avec des composés « hôtes » capables d'accueillir un ou plusieurs substrats « invités » dans leurs cavités hydrophobes. Cela a pour premier avantage d'augmenter la concentration locale en réactifs dans ces sites hydrophobes, mais aussi de favoriser l'obtention et la stabilisation d'un état de transition. Egalement, cela permet d'induire une conformation qui favorisera la formation majoritaire de certains énantiomères dans le cas de réactions générant des produits optiquement actifs. Ces paramètres sont autant de propriétés qui peuvent être apportées aux systèmes « hôtes » lors de leur conception. Cet aspect du biomimétisme étant grandement étudié,¹⁵ ci-après est présentée une liste non exhaustive d'enzymes artificielles basées sur la présence de cavités hydrophobes.

II. 1. Utilisation de macrocycles comme hôtes catalytiques

L'utilisation de macrocycles s'inscrit dans le domaine de la chimie supramoléculaire pour concevoir de nouveaux catalyseurs bio-inspirés. Ces macrocycles jouent sur le confinement qu'apportent de telles structures ainsi que sur la réactivité accrue que cet effet de concentration induit. Plusieurs structures de macrocycles ayant démontré des propriétés catalytiques intéressantes sont présentées par la suite.

II. 1. 1. Les cyclodextrines

Les cyclodextrines sont parmi les premiers systèmes hôtes à avoir été envisagés pour reproduire les sites hydrophobes des enzymes.^{16,17} Ce sont des oligomères cycliques de D-glucose, dont les plus connus et les plus utilisés commercialement sont les α , β et γ -cyclodextrines correspondant respectivement aux formes hexamères, heptamères et octamères (Figure I.3).

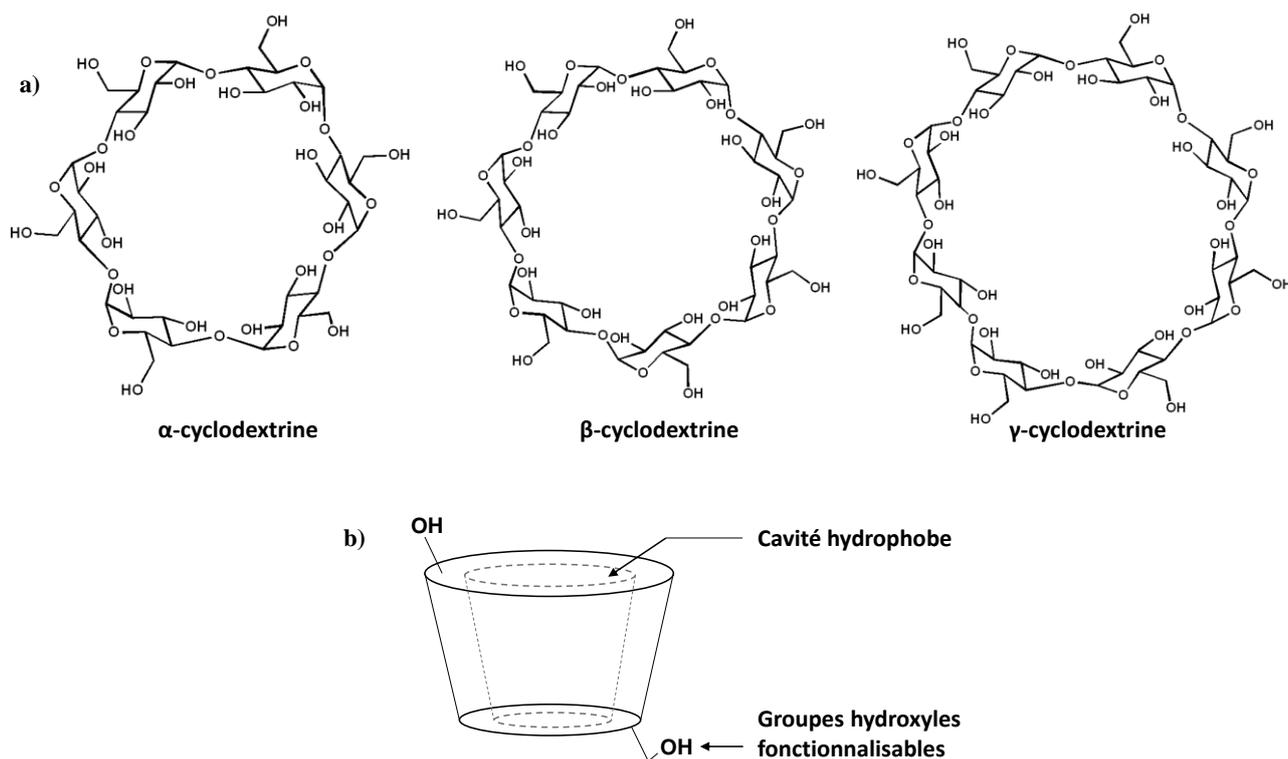


Figure I.3 : Présentation générale des cyclodextrines. a) Structures des trois macrocycles les plus communs (hexa-, hepta- et octaamylose). b) Géométrie adoptée par les oligosaccharides de type cyclodextrines.

Leur structure cyclique leur confère une géométrie de cône tronqué doté, au centre, d'une cavité hydrophobe. De ce fait, les cyclodextrines peuvent accueillir des substrats hydrophobes en leur cœur, de taille relativement réduite mais variable selon la grandeur du cycle utilisé (diamètre interne de 6 à 10 Å). En contrepartie, la présence de groupes hydroxyles générant un environnement plutôt hydrophile en périphérie des cyclodextrines permet généralement leur utilisation en milieu aqueux. Ces propriétés leur ont dans un premier temps valu une utilisation comme vecteurs de principes actifs^{18,19} ainsi que d'agents de dépollution, notamment pour l'extraction d'hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAPs).^{20,21}

Grâce à leur cavité hydrophobe, les cyclodextrines fournissent également un microenvironnement favorable à la réalisation de réactions organiques, où la catalyse peut opérer par liaisons non-covalentes. Ainsi, plus que l'extraction d'HAPs, Chaudhuri *et al.* ont mis en évidence la capacité de la méthyl- β -cyclodextrine (Me- β -CD) à catalyser une réaction de Diels-Alder qui convertit quantitativement un dérivé de l'antracène en un adduit moins toxique en 24 h (Figure I.4).²² La même réaction menée en l'absence de cyclodextrine ne permet en comparaison que 65 % de conversion.

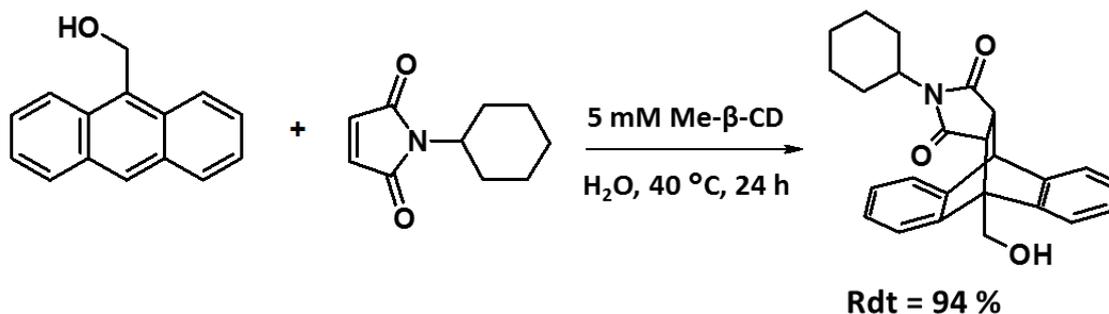


Figure I.4 : Réaction de Diels-Alder entre le 9-anthracényl méthanol et le N-cyclohexylmaléimide en présence de méthyl-β-cyclodextrine²²

L'efficacité du macrocycle est justifiée d'une part par les interactions hydrophobes entre sa cavité et la partie hydrophobe N-substituée du maléimide ; et d'autre part grâce aux interactions stabilisantes qui se créent entre les groupements hydroxyles de la cyclodextrine et les fonctions carbonyles du maléimide.

Pour rendre les systèmes plus performants, la fonctionnalisation de certains groupements hydroxyles peut alors introduire et/ou rapprocher des fonctions réactives vis-à-vis du substrat localisé dans le cœur hydrophobe.²³ Néanmoins, l'incorporation de nouveaux groupes fonctionnels ne produit pas toujours la réactivité escomptée. Par exemple, Breslow et Chung²⁴ ont cherché à modifier la β-cyclodextrine en introduisant des groupements imidazoles par analogie avec l'histidine de la triade catalytique de la chymotrypsine, qui contient également une sérine et un acide aspartique.²⁵ La présence de l'imidazole, combinée aux fonctions hydroxyles et carboxylates, n'apporte pas d'effet catalytique sur l'hydrolyse de l'acétate de m-tert-butylphényle. Au contraire, celle-ci est quatre fois plus lente qu'en présence de β-cyclodextrine non fonctionnalisée.²⁴ Il a été supposé que l'introduction de ces motifs avait tendance à bloquer l'accès du substrat à la cavité hydrophobe, ralentissant ainsi les vitesses de réaction.

Par ailleurs, la cyclodextrine est un outil catalytique qui peut interagir avec des substrats de taille modeste. En effet, selon la taille de sa cavité, la cyclodextrine n'est pas en mesure d'accueillir certains réactifs en son cœur. C'est ce qu'ont notamment observé Breslow et ses collaborateurs en étudiant la réaction de Diels-Alder entre le cyclopentadiène et l'acrylonitrile en milieu aqueux. Alors que la β-cyclodextrine accélère la réaction de près d'un facteur 10, la même transformation est en revanche ralentie si elle est réalisée en présence d'α-cyclodextrine car si le cyclopentadiène se lie au

macrocycle, ce dernier ne dispose plus d'un espace suffisant pour accueillir l'acrylonitrile.²⁶

Les cyclodextrines constituent ainsi des systèmes hôtes capables de catalyser différents types de réaction en accueillant des substrats de taille modeste dans leur cavité hydrophobe.

II. 1. 2. Les cucurbiturils

Ces macrocycles sont des oligomères de glycoluriles (5 à 8 motifs généralement) reliés entre eux par des ponts méthylènes (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Leur cœur hydrophobe permet là encore d'accueillir de petites molécules hydrophobes et de les stabiliser par interactions faibles entre le macrocycle et les substrats.

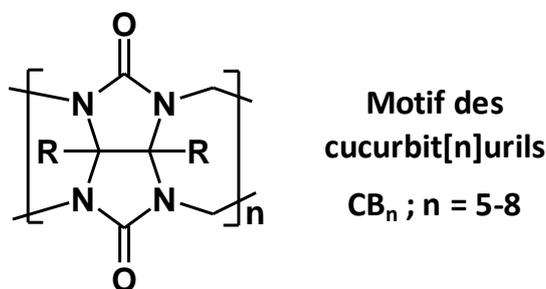


Figure I.5: Structure du motif glycolurile des macrocycles cucurbit[n]urils

L'activité catalytique des cucurbiturils a été étudiée par différents groupes de recherche sur les dernières décennies.²⁷⁻³² La capacité des macrocycles à se lier à un ou plusieurs réactifs simultanément tout en favorisant une orientation spécifique de ces substrats a ainsi été mise en évidence, en particulier sur des réactions de cyclisation (réaction de Diels-Alder, photodimérisation).

La forte capacité de liaison entre les cucurbiturils (dans cet exemple le CB7, à 7 motifs glycolurile) et certains substrats a notamment permis d'augmenter la vitesse d'hydrolyse de la benzaldoxime de près de 285 fois par rapport à une réaction en l'absence de macrocycle, grâce à une stabilisation du substrat par les fonctions carbonyles du macrocycle, permettant ainsi l'intervention des molécules d'eau (Figure I.6).

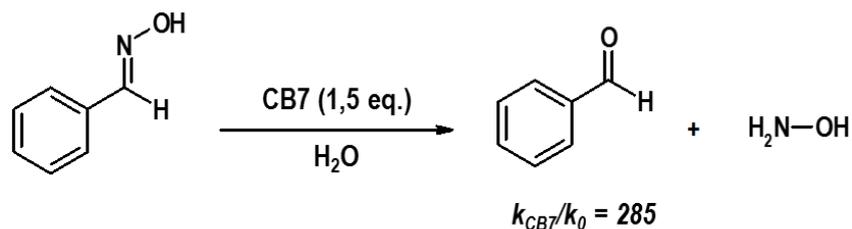


Figure I.6 : Hydrolyse de la benzaldoxime catalysée par le cucurbit[7]uril (CB7)

Cette force de liaison peut également être responsable d'une rétention du produit de réaction au sein de la cavité, provoquant ainsi une inhibition de l'activité du cucurbituril par le produit.³⁰ Si les cucurbiturils sont à ce jour moins référencés que les cyclodextrines, alors que ces deux structures fournissent un environnement hydrophobe favorable aux espèces organiques réactives, c'est probablement à cause de leur faible solubilité en milieu aqueux.³² Cette faible solubilité a également été constatée en présence de divers solvants organiques. Bien qu'elle reste modulable en jouant sur la fonctionnalisation du monomère,^{33,34} il est à ce jour privilégié de développer des systèmes « hôtes » solubles dans l'eau pour maintenir des propriétés catalytiques, tout en s'inscrivant dans une démarche de chimie verte.

II. 1. 3. Autres exemples de macrocycles hôtes

Le développement de macrocycles en tant que cavités hydrophobes servant d'outils catalytiques est une thématique de plus en plus développée. Outre les cyclodextrines et les cucurbiturils, de nombreuses autres structures peuvent être pensées pour l'accueil et la transformation de substrats.³⁵⁻³⁷

Rebek et ses collaborateurs se sont notamment intéressés à l'étude de cavitands, macrocycles dont le motif résorcinarène est tout aussi modulable et fonctionnalisable que les macrocycles présentés précédemment.³⁸ Ce tétramère a démontré des propriétés catalytiques remarquables sur une large gamme de réactions. Ainsi, Rebek *et al.* ont entre autres démontré l'efficacité de trois cavitands distincts, que ce soit sur une cycloaddition,³⁹ sur l'hydrolyse d'un carbonate⁴⁰ ou encore sur une substitution aromatique dont la vitesse de réaction s'est révélée 400 fois plus grande que lorsque la réaction est menée sans cavitand (Figure I.7).⁴¹

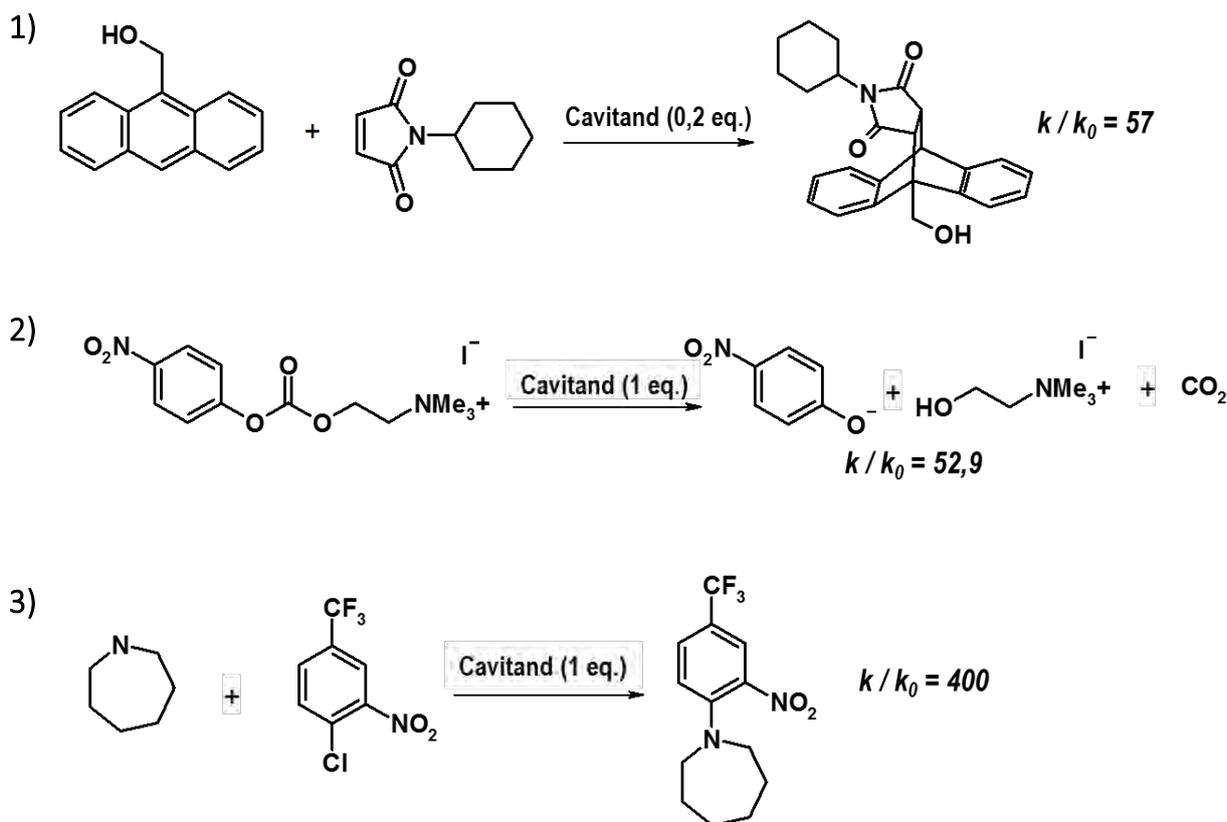


Figure I.7 : Illustration de l'activité catalytique des cavitands sur les réactions de cyclo-addition 1), d'hydrolyse 2) et de substitution aromatique 3). k/k_0 représente l'accélération apportée par le système (constante de vitesse k) par rapport à la réaction menée en l'absence de cavitan (k_0)

Les structures de macrocycles présentées précédemment ont démontré des propriétés catalytiques intéressantes sur diverses réactions. Certains macrocycles peuvent cependant être difficiles à obtenir, notamment lors des étapes de fonctionnalisation.⁴²⁻⁴⁴ De plus, la taille modeste des zones hydrophobes (environ 10 Å de diamètre) limite l'utilisation de ces systèmes à des substrats de petites dimensions. Enfin, malgré l'ajout de fonctions réactives à ces cœurs hydrophobes, leur positionnement dans la cavité est difficilement modulable puisqu'il dépend de la localisation des groupements fonctionnalisables du macrocycle. Or, l'efficacité d'une enzyme est due notamment à la complémentarité de structure qui existe entre sa poche hydrophobe et le substrat qu'elle accueille, ou avec l'état de transition ou l'intermédiaire réactionnel qu'elle stabilise. Il peut alors être envisagé de concevoir des systèmes organocatalytiques moins rigides qui permettront un positionnement du catalyseur plus flexible, ajustable par rapport au substrat. Une autre approche consiste à conserver cette rigidité tout en plaçant les motifs catalytiques, lors de la synthèse de ces mimes d'enzymes, de manière à recréer une cavité qui soit davantage complémentaire aux substrats à modifier.

Cette dernière option est l'approche qui a été suivie en vue du développement de polymères à

empreintes moléculaires.

II. 2. Emploi de polymères à empreintes moléculaires

La conception de polymères à empreintes moléculaires vient apporter davantage qu'un environnement hydrophobe analogue aux enzymes. Dans la synthèse de ce type de polymères, un intérêt particulier est accordé à recréer des cavités complémentaires, en termes de structure, aux substrats à accueillir et à modifier.⁴⁵ Ces systèmes sont en général plutôt rigides, ce qui garantit l'existence et le maintien de cette poche d'accueil en solution.

Les polymères à empreintes moléculaires (abrévés MIP de l'anglais Molecularly Imprinted Polymers) sont préparés à partir d'un gabarit (ou empreinte) qui va permettre l'insertion de cavités ou motifs spécifiques de l'empreinte choisie.⁴⁶ La (co)polymérisation de monomères, qui ont au préalable été fonctionnalisés, conduit ensuite à l'obtention d'un système réticulé autour de l'empreinte. Cette dernière est finalement éliminée pour obtenir le système catalytique désiré (Figure I.8). Les groupements introduits sur les monomères peuvent à la fois former des interactions stabilisantes avec le substrat « invité » ou être réactifs vis-à-vis de celui-ci.⁴⁷

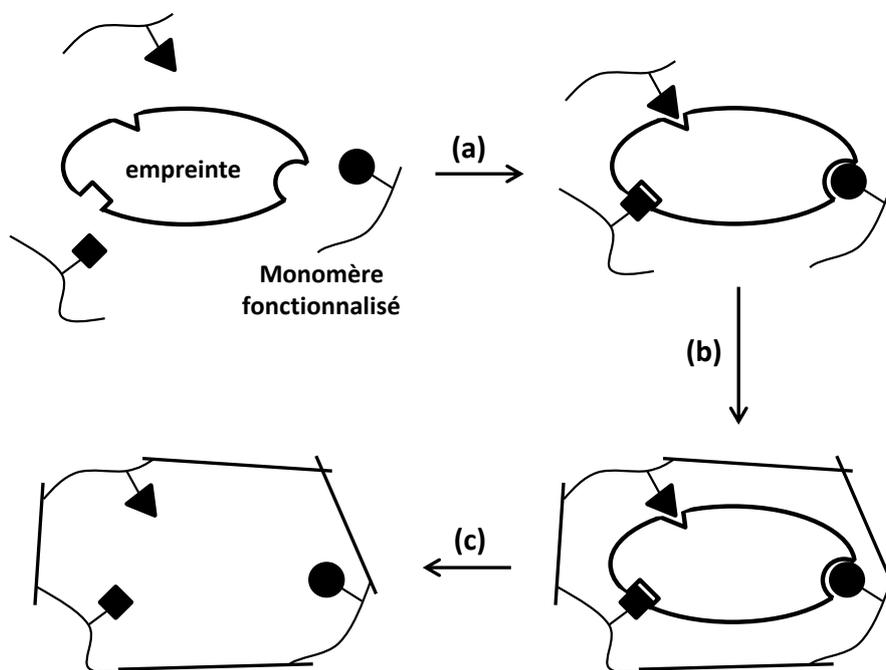


Figure I.8 : Schéma du principe de synthèse des MIPs.¹⁵ (a) Approche et liaison covalente ou non-covalente entre empreinte et monomères. (b) polymérisation des monomères autour de l'empreinte. (c) Elimination de l'empreinte.

Pour le choix de l'empreinte moléculaire, il est en général préféré de concevoir un gabarit

complémentaire à l'état de transition plutôt qu'au substrat, puisque selon le principe développé par Pauling, c'est la stabilisation de ce dernier qui semble grandement contribuer à l'activité catalytique incomparable des enzymes.⁴⁸ L'utilisation de molécules analogues aux états de transition pour l'élaboration de mimes d'enzymes est une stratégie utilisée à la fois pour obtenir des MIPs mais aussi des anticorps catalytiques.⁴⁹ Seuls les MIPs seront ici évoqués puisque les anticorps n'entrent pas dans la catégorie des organocatalyseurs mais davantage dans celle des outils de reconnaissance biologiques.

Un premier exemple décrit la conception d'un polymère à empreinte moléculaire capable de catalyser la réaction de déhydrofluorination de la 4-fluoro-4-(*p*-nitrophenyl)-butan-2-one.⁵⁰ Shea et Beach se sont notamment intéressés au positionnement stratégique de deux fonctions amines dans le site actif du polymère, pour permettre d'une part l'accueil du substrat par liaison non covalente entre l'amine et la fonction carbonyle et d'autre part pour orienter « l'hydrogène partant » vers la seconde amine qui sert de base à la réaction (Figure I.9). La réaction a ainsi pu être accélérée d'un facteur 13 dans le benzène mais l'effet catalytique du MIP chute lorsque la déhydrofluorination est menée en solvants plus polaires comme l'acétonitrile ou l'éthanol.

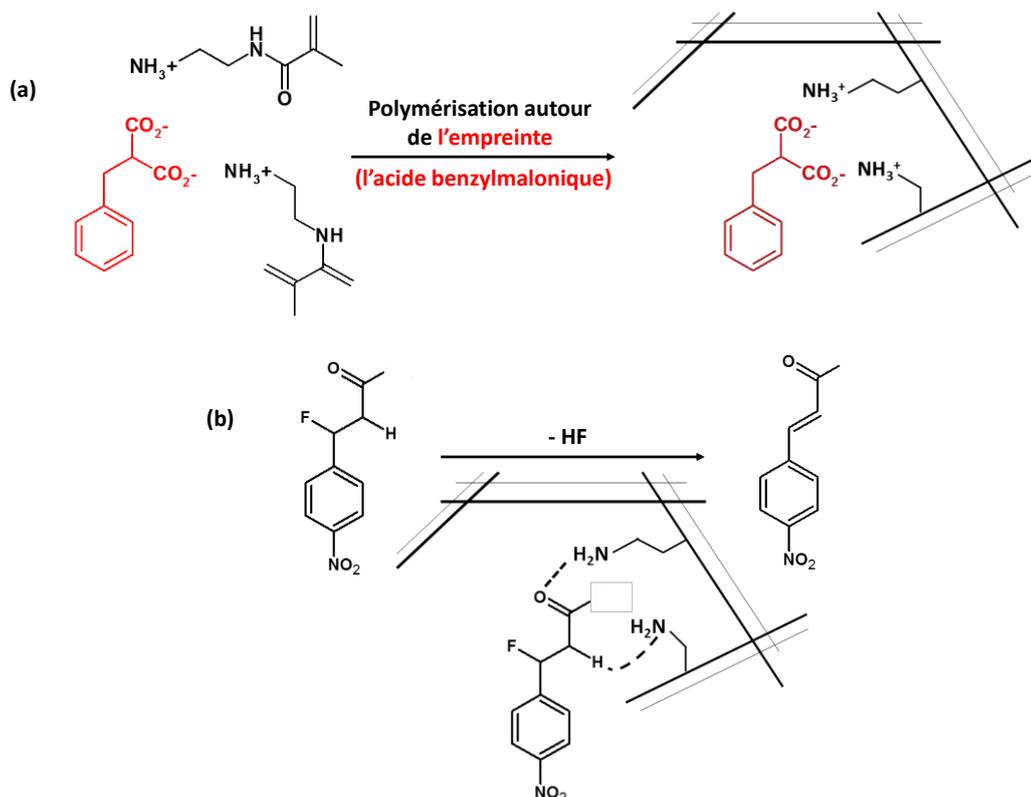


Figure I.9 : (a) Illustration de la préparation du MIP fonctionnalisé par des groupes ammonium. (b) Utilisation du MIP pour la réaction de déhydrofluorination.⁵⁰

La polarité du solvant est un paramètre très influent sur les interactions entre la cavité du polymère et les substrats accueillis.⁵¹ L'exploitation de ces catalyseurs dans l'eau représente donc un défi tout particulier, qui peut venir altérer les interactions faibles (liaison hydrogène) responsables de la fixation du substrat dans la cavité. Néanmoins, dans une approche plus respectueuse de l'environnement, la conception de systèmes compatibles à une utilisation en milieu aqueux est privilégiée.

Une des illustrations notables en la matière est la mise au point par Emgenbroich et Wulff d'un MIP capable de mimer l'activité d'une estérase, en choisissant un monoester phosphonique comme empreinte analogue à l'état de transition de la réaction d'hydrolyse de différents substrats.⁵² L'utilisation d'un tel catalyseur a permis d'augmenter d'un facteur 325 la vitesse d'hydrolyse d'un ester de phényle par rapport à la même réaction menée uniquement en présence du tampon.

Il existe à ce jour de nombreux exemples de catalyse basée sur l'utilisation de polymères à empreinte moléculaire.^{47,53} Le principal atout qui ressort de ces divers travaux reste la grande sélectivité que les MIPs sont capables de conférer aux réactions qu'ils catalysent. Une réflexion poussée sur la conception de modèles d'états de transition et d'empreintes sur-mesure pour l'accueil de substrat est à l'origine de telles performances.

La synthèse du réseau polymérique tridimensionnel peut cependant s'avérer délicate dans sa mise en œuvre par rapport à d'autres systèmes organiques catalytiques de masse molaire plus faible. Dans une démarche qui cherche à favoriser l'organocatalyse, nous nous intéresserons par la suite à des molécules de plus petites tailles et moins délicates à concevoir. A cela s'ajoute l'optimisation peu évidente des empreintes par rapport aux substrats à accueillir et à altérer. En effet, bien qu'il soit préférable d'obtenir des polymères suffisamment rigides pour garantir la conservation de la géométrie des cavités créées par les empreintes modèles, il serait intéressant de pouvoir utiliser des systèmes plus flexibles et plus dynamiques capables de modifier leur structure au contact de substrats, pour atteindre idéalement de meilleures réactivités ou sélectivités. Ainsi, l'analogie avec les processus enzymatiques et la théorie d'ajustement induit incitent à développer des systèmes catalytiques capables de moduler leur interface par rapport aux réactifs qu'ils accueillent.

III. Les séquences peptidiques comme outils catalytiques

S'il s'avère difficile de mimer la cavité hydrophobe des sites actifs enzymatiques, une seconde approche du biomimétisme consiste à utiliser les acides aminés qui les constituent comme organocatalyseurs, qu'ils soient exploités sous forme naturelle, modifiés chimiquement ou assemblés en un oligopeptide.

III. 1. Présentation des acides aminés

Les enzymes sont définies par une séquence peptidique relativement longue d'acides aminés (d'une centaine à plusieurs milliers de motifs en général).^{54,55} Les acides aminés sont généralement représentés sous forme zwitterionique, présentant d'une part un ammonium et d'autre part une fonction carboxylate. Les enzymes peuvent contenir jusqu'à 20 acides aminés différents dans leur enchaînement, qui se distinguent les uns des autres par la nature de leur chaîne latérale R (Figure I.10).

Les combinaisons peptidiques sont donc quasi infinies, ce qui justifie la grande diversité d'enzymes naturelles, assurant la catalyse de réactions chimiques tout aussi variées. Si tous les acides aminés composant la séquence peptidique contribuent à la structure tertiaire finale des enzymes, seulement quelques motifs participent quant à eux à l'activité catalytique au sein du site actif, en stabilisant en général le substrat par interactions faibles au sein d'une triade peptidique. De plus, les zones hydrophobes propices à l'accueil de substrats intègrent en général certains motifs dits actifs comme la sérine, acide aminé nucléophile au sein des hydrolases,⁵ ou le tryptophane agissant comme chromophore des photolyases.⁵⁶ La capacité de ces quelques motifs à garantir la catalyse laisse à penser que de courtes séquences peptidiques pourraient se révéler de très bons catalyseurs. C'est pourquoi l'utilisation d'acides aminés seuls ou assemblés en une chaîne peptidique relativement courte a peu à peu émergé dans le domaine de l'organocatalyse.

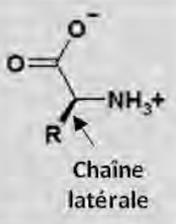
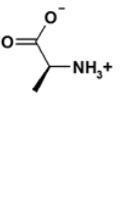
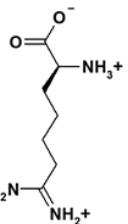
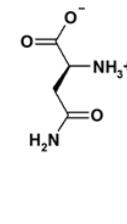
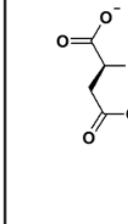
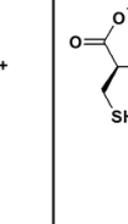
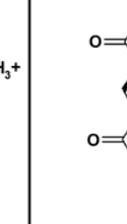
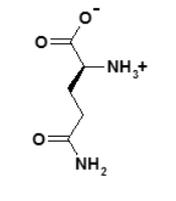
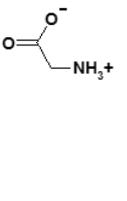
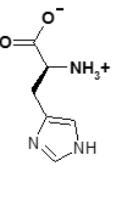
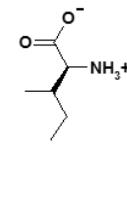
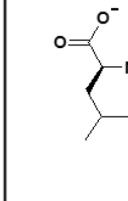
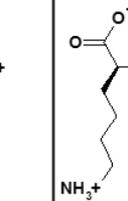
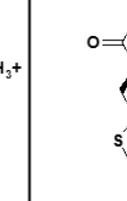
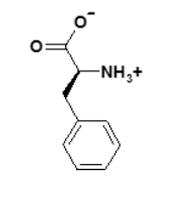
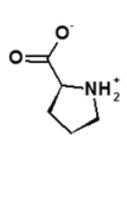
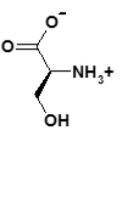
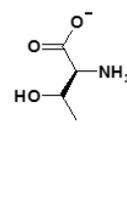
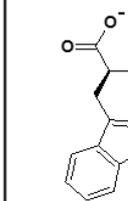
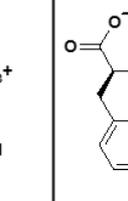
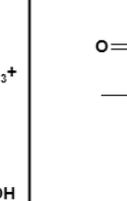
Structure commune	L-Alanine (Ala)	L-Arginine (Arg)	L-Asparagine (Asn)	L-Acide aspartique (Asp)	L-Cystéine (Cys)	L-Acide glutamique (Glu)
 <p>Chaîne latérale</p>						
L-Glutamine (Gln)	Glycine (Gly)	L-Histidine (His)	L-Isoleucine (Ile)	L-Leucine (Leu)	L-Lysine (Lys)	L-Méthionine (Met)
						
L-Phénylalanine (Phe)	L-Proline (Pro)	L-Sérine (Ser)	L-Thréonine (Thr)	L-Tryptophane (Trp)	L-Tyrosine (Tyr)	L-Valine (Val)
						

Figure I.10 : Structures des 20 acides aminés naturels

III. 2. Utilisation d'acides aminés et de courtes séquences peptidiques en catalyse

La diversité des chaînes latérales des acides aminés offre au chimiste de potentiels outils catalytiques à la réactivité variée, selon les peptides utilisés. Ainsi, la charge, la polarité, l'aromaticité, l'hydrophobie et la chiralité des acides aminés sont autant de paramètres qui vont pouvoir intervenir sur la réactivité des peptides et gouverner les affinités entre substrats et organocatalyseurs. Les exemples présentés par la suite illustrent essentiellement la très grande stéréosélectivité que l'on retrouve chez les enzymes, c'est-à-dire que c'est essentiellement le caractère chiral des acides aminés qui est à ce jour exploité pour la catalyse de réactions asymétriques.

III. 2. 1. Les acides aminés simples

La plus courte séquence peptidique envisageable en catalyse correspond à l'utilisation d'un seul acide aminé. Les premiers travaux remarquables faisant usage d'un acide aminé en catalyse remontent aux années 1970 et ont alors été publiés par Hajos et Parrish d'une part,⁵⁷ et Wiechert et ses collaborateurs d'autre part dans le cas d'une céto-lisation.⁵⁸ L'adaptation des conditions opératoires permet d'orienter la cyclisation intramoléculaire vers la formation quantitative du dérivé céto ou alors vers l'obtention privilégiée d'une dicétone, intermédiaire de synthèse d'un stéroïde (Figure I.11).

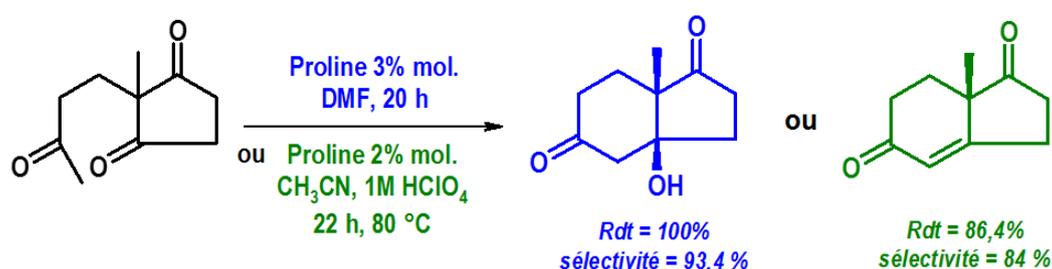
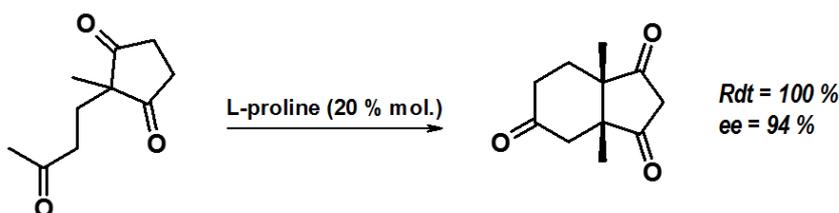


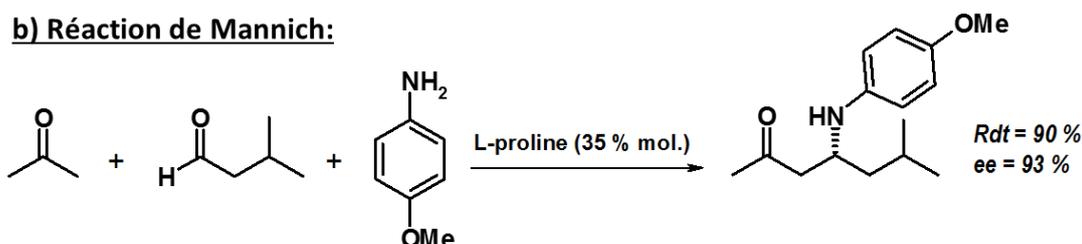
Figure I.11 : Catalyse d'une cyclisation asymétrique par la proline. Adaptation des conditions de réaction en fonction de la sélectivité souhaitée

Depuis cette découverte, les céto-lisations ou aldolisations ont été développées à une plus large gamme de substrats. L'activité catalytique de la L-proline a également pu être exploitée sur plusieurs autres réactions asymétriques, notamment vis-à-vis des réactions de Mannich et de Michael (Figure I.12).⁵⁹⁻⁶¹ Elle a notamment permis la réalisation de la réaction de Mannich en une seule étape, en mettant en présence cétone, amine et aldéhyde, et a conduit à l'obtention d'excellents rendements et excès énantiomériques (ee). Ces exemples sont illustrés à la Figure I.12.

a) Annélation de Robinson intramoléculaire:



b) Réaction de Mannich:



c) Addition de Michael

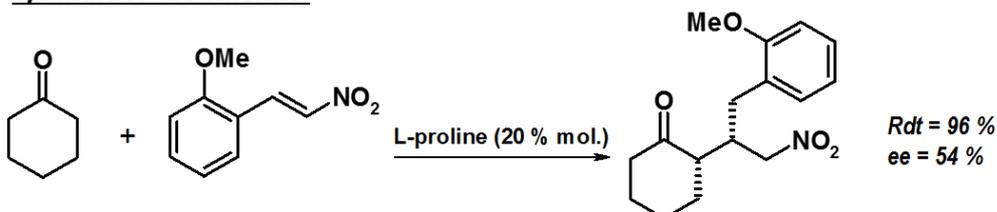


Figure I.12 : Exemples de réactions asymétriques catalysées par la L-proline. a) Annélation de Robinson.⁵⁷ b) Réaction de Mannich.⁶⁰ c) Addition de Michael.⁶¹

La particularité de la proline, comparée aux 19 autres acides aminés naturels, consiste dans la présence d'une fonction amine secondaire, due au motif pyrrolidine. Ce dernier apporte un caractère nucléophile plus prononcé à l'amine de la proline par rapport aux autres structures, et donc une meilleure réactivité expliquant qu'à ce jour, ce soit l'acide aminé le plus étudié en organocatalyse asymétrique.

Néanmoins, Córdova et ses collaborateurs ont publié en 2005 et 2006 plusieurs travaux révélant la capacité d'acides aminés dits primaires (valine, alanine et isoleucine par exemple) à catalyser efficacement des réactions d'aldolisation asymétriques, notamment entre le *p*-nitrobenzaldéhyde et des cétones cycliques (Figure I.13).⁶²⁻⁶⁴

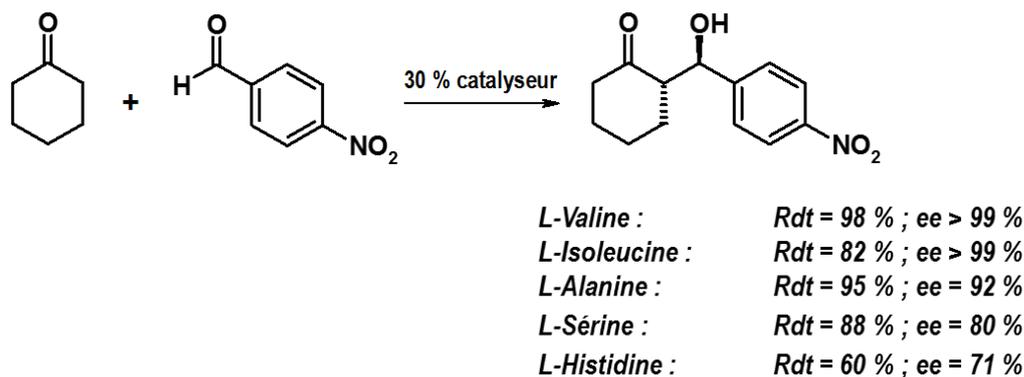


Figure I.13 : Aldolisation asymétrique catalysée par différents acides aminés naturels.

Outre l'aldolisation, on retrouve ponctuellement d'autres applications des acides aminés en organocatalyse. Ainsi, la lysine s'est avéré l'acide aminé le plus efficace pour la condensation de Knoevenagel avec un rendement de 93 %⁶⁵ (Figure I.14 a)), tandis que l'histidine et l'aspartate ont démontré de bonnes propriétés organocatalytiques sur la réaction de cyanosilylation (Figure I.14 b)).^{66,67} Par ailleurs, la thréonine s'est révélée être un catalyseur asymétrique efficace sur l'hydroxyméthylation de plusieurs cyclohexanones, permettant ainsi d'atteindre jusqu'à 74 % de rendement et des excès énantiomériques supérieurs à 90 % dans les meilleurs cas (Figure I.14 c)).⁶⁸

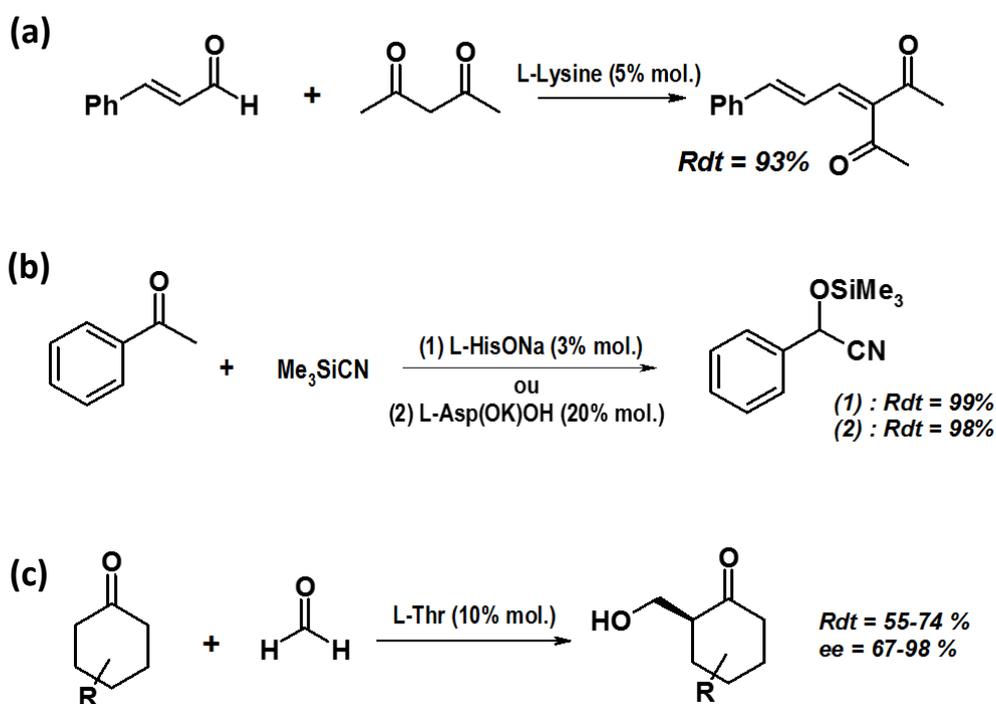


Figure I.14 : Illustration de réactions catalysées par des acides aminés. (a) Condensation de Knoevenagel en présence de L-Lysine. (b) Cyanosilylation catalysée par des sels d'histidine ou d'aspartate. (c) Hydroxyméthylation catalysée par la L-thréonine.

Des molécules analogues aux acides aminés ont également été développées pour évaluer leur potentiel catalytique.⁶⁹ En effet, si l'acide aminé simple semble posséder des propriétés catalytiques qui peuvent s'avérer restreintes en fonction de la structure du substrat présenté, la fonctionnalisation et la recherche de composés ayant une structure similaire aux acides aminés peuvent constituer des alternatives intéressantes pour atteindre la réactivité voulue. Les travaux de MacMillan au cours des années 2000 rapportent ainsi l'utilisation d'organocatalyseurs inspirés de la structure des prolines pour accélérer une réaction de Diels-Alder (Figure I.15).⁷⁰

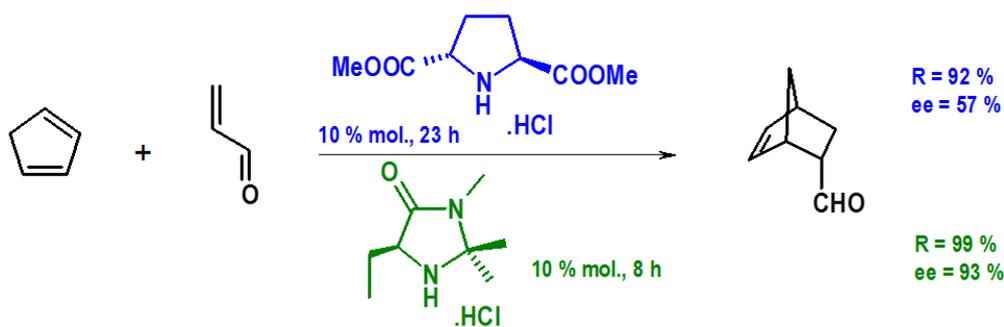


Figure I.15 : Réaction de Diels-Alder, accélérée par les catalyseurs de MacMillan.

Néanmoins, pour exploiter au maximum les ressources renouvelables et rester en accord avec la composition chimique des enzymes, il a été préféré par la suite de mettre en avant l'utilisation de polypeptides puisqu'il est possible de bénéficier directement d'acides aminés naturels énantiomériquement purs.

III. 2. 2. Les dipeptides

Les dipeptides restent des molécules organiques de très petite taille mais peuvent apporter une réactivité ou une interaction complémentaire à un acide aminé simple.

On retrouve ici logiquement le développement de dipeptides à base de proline, conçus pour améliorer les propriétés de cette dernière vis-à-vis de réactions d'aldolisation asymétriques.⁷¹ Deux travaux récemment publiés présentent ainsi l'amélioration des rendements et excès énantiomériques en présence du dérivé ester de méthyle du L-prolyl-L-tryptophane⁷² (Figure I.16 (1)) et de l'ester de tert-butyl de la L-prolyl-glycine⁷³ (Figure I.16 (2)).

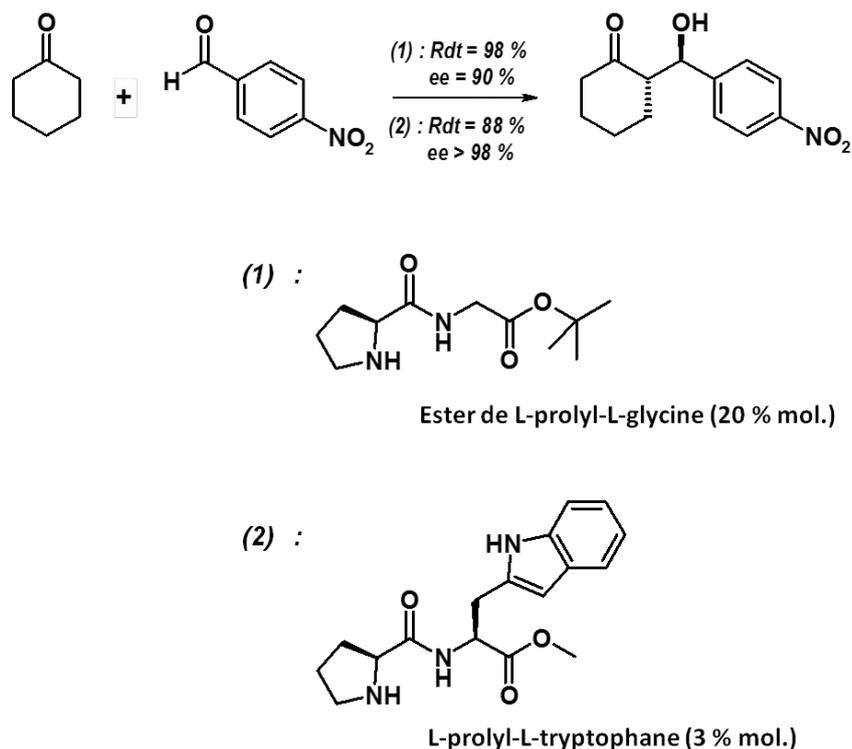


Figure I.16 : Aldolisation entre la cyclohexanone et le *p*-nitrobenzaldéhyde catalysée par des dipeptides à base de proline

Par ailleurs, dans une approche davantage bio-inspirée des sites catalytiques enzymatiques, des études ont été menées sur les propriétés hydrolytiques du dipeptide sérine-histidine (Ser-His).^{74,75} En effet, sérine et histidine sont connues pour fonctionner ensemble au sein des sites actifs de diverses enzymes.⁷⁶⁻⁷⁸ Dans les travaux publiés par Li et ses collaborateurs, le dipeptide Ser-His s'est révélé l'oligopeptide le plus efficace vis-à-vis de l'hydrolyse de l'acétate de *p*-nitrophényle (*p*NPA) et du clivage de l'ADN, montrant ainsi que de courtes séquences sont capables d'hydrolyser des structures aussi complexes que l'ADN duplex.

III. 2. 3. Les dipeptides cycliques

Les dipeptides cycliques ont été testés comme une alternative plus rigide aux séquences présentées précédemment. Cette rigidité peut alors renforcer le caractère énantiosélectif dans les réactions asymétriques. La cyclo(L-phénylalaninyl-L-histidine) est sans doute le dipeptide cyclique le plus étudié, après que Jackson *et al.* aient démontré son meilleur potentiel catalytique par rapport à d'autres dipeptides cycliques sur une réaction asymétrique d'hydrocyanation.⁷⁹ Ainsi, l'addition asymétrique du cyanure d'hydrogène sur le benzaldéhyde dans le toluène en présence de seulement

2 % molaire de cyclo(L-phénylalananyl-L-histidine) permet l'obtention de la cyanhydrine correspondante, avec un rendement et un excès énantiomérique tous deux de 97 % (Figure I.17).⁸⁰

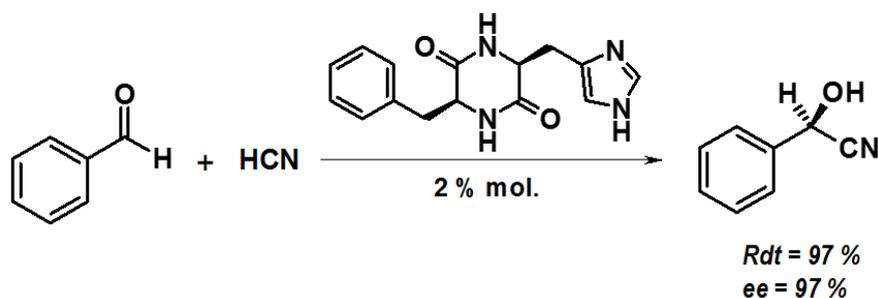


Figure I.17 : Hydrocyanation asymétrique catalysée par le dipeptide cyclique cyclo[L-Phe-L-His].

L'emploi des acides aminés et dipeptides en tant que catalyseurs constitue néanmoins un domaine restreint de l'organocatalyse. Bien que ces petites molécules aient démontré leur efficacité, notamment en catalyse asymétrique, les temps de réaction restent relativement longs et les applications sont pour l'instant limitées (elles concernent essentiellement les aldolisations et réactions de Mannich). De plus, l'idée qu'une version très miniaturisée des enzymes puisse recouvrer les mêmes propriétés catalytiques fait face à un certain scepticisme.⁸¹ En effet, l'organisation tridimensionnelle des enzymes en solution est un élément clé de la sélectivité et de l'efficacité qu'elles confèrent, en favorisant les interactions et la réactivité vis-à-vis des substrats. L'absence d'interfaces et/ou de cavités hydrophobes pour d'aussi courtes séquences pourraient alors justifier le potentiel limité de ces systèmes.

C'est donc assez logiquement qu'une optimisation à travers le développement de séquences peptidiques plus longues a été entreprise, pour travailler avec des structures aux géométries plus complexes, de manière à apporter une contribution spatiale tout en conservant un enchaînement relativement court comparé aux systèmes enzymatiques.

III. 3. Développement d'oligopeptides catalytiques

L'enchaînement de quelques acides aminés peut en effet suffire à créer des structures complexes comme des hélices- α ou des feuillets β .^{82,83} Ces géométries peuvent alors favoriser l'approche et/ou le confinement d'un substrat. En outre, un positionnement stratégique et spécifique de certains acides aminés au sein de ces courtes séquences peptidiques peut suffire à optimiser la réactivité de ces quelques motifs vis-à-vis d'un substrat donné.

III. 3. 1. Les homo-oligopeptides

La synthèse des homo-oligopeptides est relativement simple à mettre en œuvre et consiste en la polymérisation d'un unique acide aminé activé, en présence d'une quantité précise d'initiateur. L'époxydation de la chalcone en milieu triphasique illustre l'utilisation d'homo-oligopeptides comme organocatalyseurs. Cette réaction asymétrique, connue sous le nom d'époxydation Juliá-Colonna, a dans un premier temps été menée en présence de différents homo-oligopeptides et les poly-L-alanines et poly-L-leucines ont été identifiées comme les catalyseurs les plus efficaces, conduisant également aux excès énantiomériques les plus importants (Figure I.18).^{84,85} Ces travaux décrivent également les conformations en hélices α ou feuilletts β prises par ces différents polypeptides. Si l'impact de la différence de conformation α ou β n'a pas pu être mise en évidence au cours de ces travaux, il a tout de même été constaté que l'absence de conformation d'un dipeptide Ala-Ala substitué résultait en de très faibles rendements et excès énantiomériques et que les conformations α adoptées par les homo-oligopeptides étaient dans la plupart des cas gages d'une bonne stéréosélectivité.⁸⁴ L'organisation spatiale des oligopeptides apparaît donc capitale dans l'activité catalytique dispensée.

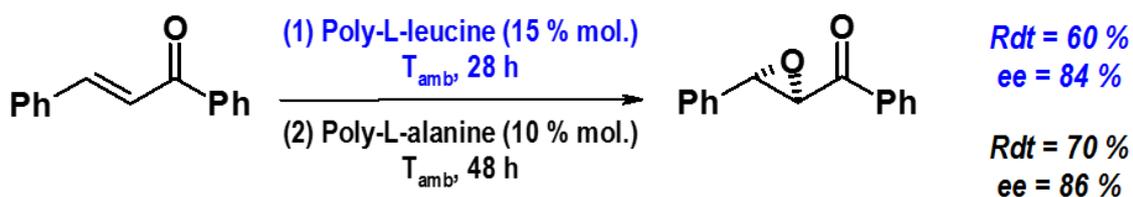


Figure I.18 : Epoxydation de la chalcone en présence de poly-L-leucine (1)⁸⁴ et de poly-alanine (2)⁸⁵

La poly-L-leucine, catalyseur efficace de la réaction de Juliá-Colonna, est néanmoins insoluble dans l'eau et dans de nombreux solvants. L'époxydation est donc menée en milieu triphasique, où le catalyseur à l'état solide se trouve en présence d'une phase aqueuse et d'une phase organique (Figure I.18 (1)). Pour améliorer ce système, Geller *et al.* ont mis au point de nouvelles conditions en introduisant un agent de transfert de phase (bromure de tétrabutylammonium) pour notamment améliorer la vitesse de réaction et obtenir une conversion supérieure à 99 % en 1h30 de réaction, contre seulement 2 % en l'absence de l'agent de transfert de phase.⁸⁶ Il a alors été supposé que l'utilisation de ce second adjuvant permettait de rapprocher le peroxyde d'hydrogène des substrats contenus dans la phase organique.

L'époxydation de Juliá-Colonna vient effectivement illustrer le potentiel catalytique des

oligopeptides vis-à-vis de réactions asymétriques. Pour parfaire ces premiers résultats très positifs sur l'époxydation de la chalcone et étendre les applications à d'autres substrats ou d'autres réactions, il apparaît nécessaire de faire varier le système catalytique proposé. L'amélioration de l'organocatalyse conférée par les oligopeptides peut ainsi être réalisée en introduisant des acides aminés de nature différente.

Une grande variété d'oligopeptides catalytiques peut alors être conçue, en bénéficiant d'un large choix et d'une disponibilité certaine parmi les 20 acides aminés naturels. Ces séquences semblent par ailleurs plus représentatives d'un site actif enzymatique que les homo-oligopeptides car c'est aussi la diversité des acides aminés utilisés qui pourra permettre une réactivité concertée entre ces derniers. La variété des chaînes latérales sera également en mesure de créer d'autres interactions faibles, responsables des conformations prises par les oligopeptides. Celles-ci pourront alors potentiellement contribuer à la création de zones hydrophobes analogues aux sites enzymatiques.

III. 3. 2. Les oligopeptides multi-composants

Les oligopeptides aux motifs variés peuvent être obtenus par synthèse peptidique en phase solide ou en solution.⁸⁷ Suite à la protection des chaînes latérales et à l'activation éventuelle des acides aminés, le couplage peptidique conduit à la formation d'une liaison amide et à l'allongement de la séquence. L'ajout consécutif de différents acides aminés *via* plusieurs étapes de couplage et de déprotection permet l'obtention de l'oligopeptide désiré. Les exemples rapportés dans la littérature concernent majoritairement l'utilisation d'oligopeptides comme organocatalyseurs appliqués à des réactions asymétriques.

Tout d'abord, l'amélioration apportée par Nagano *et al.* sur le système catalytique appliqué à la réaction d'époxydation de la chalcone peut être mentionnée.⁸⁸ Ainsi, en incorporant un acide aminé disubstitué dans la séquence de la poly-L-leucine, le nonamère peptidique obtenu permet la conversion de 99 % de la chalcone et l'obtention du produit de la réaction avec un excès énantiomérique de 98 % en 24 h, en présence de seulement 5 % molaire de catalyseur (Figure I.19). De plus, cette modification dans la composition de l'oligopeptide a permis d'élargir la gamme de substrat à oxyder tout en conservant d'excellents excès énantiomériques (> 95%) pour des rendements compris entre 43 et 99 %.

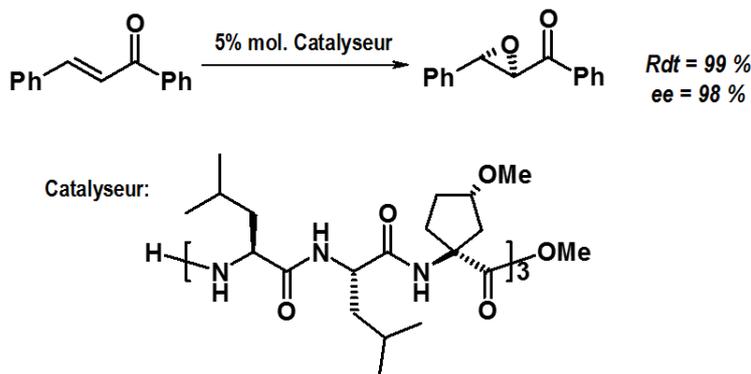


Figure I.19 : Epoxydation stéréosélective de la chalcone en présence d'un oligopeptide synthétique à 9 motifs.

Miller a par ailleurs décrit différentes stratégies pour développer des catalyseurs à base d'acides aminés, alternant motifs naturels et peptides modifiés chimiquement.⁸⁹ En utilisant la chimie combinatoire, il a ainsi optimisé l'oligopeptide responsable de la catalyse du dédoublement cinétique du 1,2-*trans*-acétamidocyclohexanol avec un système à huit motifs et une structure secondaire assimilée à une forme d'épingle à cheveux (Figure I.20). Miller concède néanmoins que, malgré le nombre de structures testées, il est difficile d'établir des relations entre la composition des catalyseurs et la sélectivité obtenue. L'absence actuelle de règles reliant structure et propriétés catalytiques des oligopeptides ouvre alors ce champ de recherche à un nombre quasi infini de nouvelles structures à concevoir et à tester.

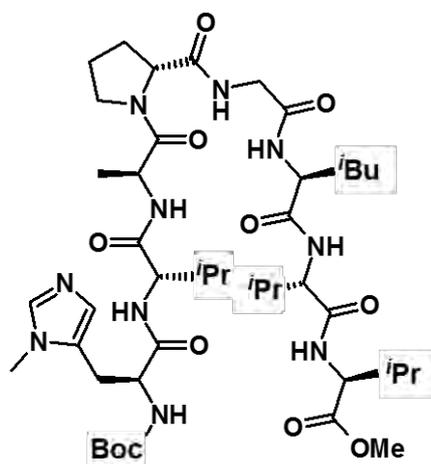


Figure I.20 : Octapeptide de Miller induisant le meilleur facteur de sélectivité vis-à-vis du dédoublement cinétique du 1,2-*trans*-acétamidocyclohexanol

Enfin, une autre réaction de dédoublement cinétique a été choisie pour évaluer le potentiel catalytique d'oligopeptides synthétiques conçus par l'équipe de Shreiner (Figure I.21).⁹⁰ Ces travaux visent à concevoir un oligopeptide hydrophobe contenant un motif relativement encombrant au centre et des acides aminés plutôt flexibles aux extrémités, pour espérer recréer une « poche » favorable à la réaction.

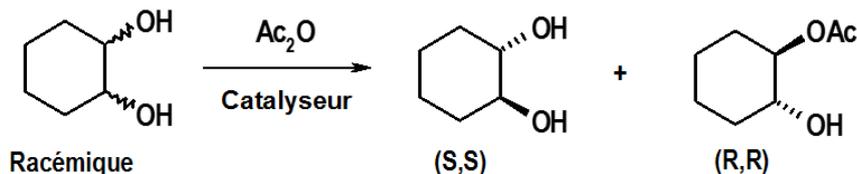


Figure I.21 : Réaction de dédoublement cinétique du cyclohexane-1,2-diol par acétylation stéréosélective.

L'oligopeptide Boc-D-(π -Me)-His-^AGly-D-Cha-D-Phe-OMe (Figure I.22, « Cha » correspondant à un motif peptidique avec R (chaîne latérale) = CH₂-C₆H₁₁) a démontré les meilleures propriétés catalytiques et de sélectivité. De plus, une étude de dynamique moléculaire a permis de mettre en évidence la conformation particulière prise par l'oligopeptide en présence du substrat. L'espaceur adamantane (ou tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]décane) noté ^AGly retient ainsi les acides aminés dans une orientation analogue à une « poche », qui permet à la fois la reconnaissance et la stéréosélectivité du catalyseur vis-à-vis du substrat.

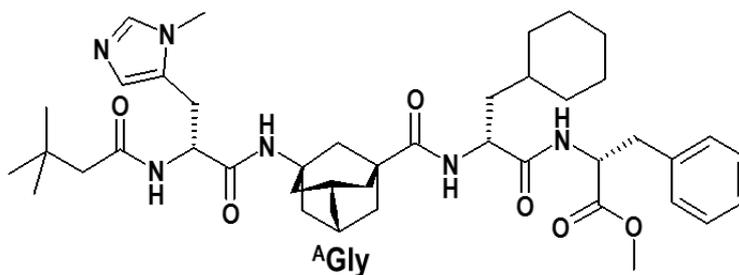


Figure I.22 : Oligopeptide Boc-D-(π -Me)-His-^AGly-D-Cha-D-Phe-OMe pour le dédoublement cinétique du *trans*-cyclohexane-1,2-diol

Il est donc possible de concevoir des structures peptidiques de taille modeste qui suffisent à créer une structure secondaire ou une orientation favorable aux interactions entre les acides aminés qui les constituent et les substrats mis en présence. Pour cela, il paraît nécessaire de privilégier l'incorporation de quelques acides aminés hydrophobes, voire d'introduire un motif synthétique pour contribuer à l'orientation du peptide.

Les oligopeptides ont l'avantage d'être des systèmes catalytiques très modulables : les propriétés de réactivité et de sélectivité peuvent être ajustées en modifiant un ou plusieurs motifs de la séquence peptidique. En considérant le nombre d'acides aminés disponibles, il est possible de concevoir une gamme d'oligopeptides d'une diversité quasi infinie pour un domaine d'applications très étendu.⁹¹ Néanmoins, les séquences d'acides aminés peuvent être relativement complexes à

synthétiser selon leur longueur ou la nature des acides aminés introduits.

Ainsi, pour réduire la séquence peptidique tout en conservant le caractère hydrophobe et les structures secondaires présentés dans les exemples précédents, une autre approche sera développée dans la dernière partie de ce chapitre bibliographique. Elle consiste à apporter un caractère amphiphile à de courts enchaînements peptidiques pour induire de nouvelles propriétés, tant en terme d'organisation dans l'espace qu'en terme de réactivité.

IV. Les lipopeptides : une alternative simplifiée pour apporter l'hydrophobie à des séquences peptidiques catalytiques

Une grande diversité de structures hydrophobes peut être proposée pour obtenir des catalyseurs bifonctionnels, en y greffant des motifs peptidiques. Les macrocycles tels que les cyclodextrines peuvent par exemple contenir des groupes fonctionnels issus des acides aminés.^{92,93} Néanmoins, la fonctionnalisation délicate de telles structures a précédemment été évoquée tout comme les difficultés à concevoir de longues séquences peptidiques. De plus, pour la plupart, les exemples cités se sont avérés être des catalyseurs performants lorsqu'ils étaient employés dans des solvants organiques, souvent toxiques (toluène, tétrachlorométhane...).

Pour apporter confinement et/ou hydrophobie d'une part et réactivité chimique d'autre part, une approche consiste à greffer une partie lipophile à une séquence d'acides aminés relativement courte. Ainsi, le parti pris d'utiliser essentiellement des ressources renouvelables (acides aminés et acides gras) pour la conception de ces systèmes permet de rester en accord avec la démarche bio-inspirée respectueuse de l'environnement.

IV. 1. Définition des systèmes

Un lipopeptide est un composé dont la structure se divise en une partie lipophile constituée en général d'une chaîne grasse et d'une séquence peptidique qui compose la tête polaire de la molécule (Figure I.23).

Comme pour les oligopeptides, la modulation des systèmes est totale. Il est possible à la fois d'intervenir sur la chaîne carbonée avec des longueurs variables ou la présence d'insaturations par exemple, tandis que la séquence peptidique pourra bénéficier de la diversité des acides aminés

naturels pour être modifiée et adaptée selon l'application voulue.

De plus, la combinaison de parties hydrophiles et hydrophobes confère par définition à ces systèmes un caractère amphiphile, synonyme de propriétés d'auto-organisation. Une fois en solution, les lipopeptides sont alors capables de former différents types d'agrégats, au-delà d'une certaine concentration (Figure I.23). La concentration à partir de laquelle les lipopeptides s'auto-assemblent est caractéristique de chaque amphiphile et correspond à sa concentration d'agrégation critique. (CAC). Par analogie avec les enzymes, les agrégats en milieu aqueux se caractérisent par un cœur hydrophobe, à l'abri d'un éventuel contact avec les molécules d'eau, et une surface hydrophile garantissant la solubilité du système dans l'eau.

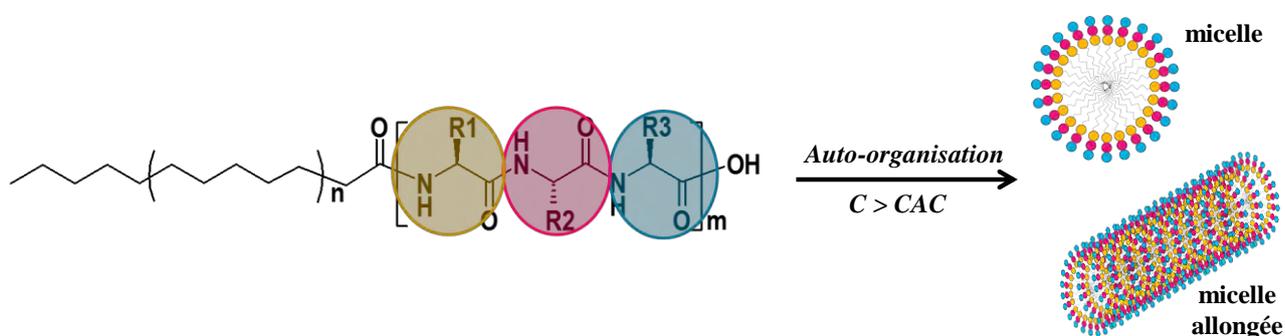


Figure I.23 : Exemple de structure d'un lipopeptide. R1, R2 et R3 désignent les chaînes latérales des acides aminés. Ses propriétés amphiphiles sont illustrées ici par la formation de micelles ou micelles allongées (agrégats pris à titre d'exemples)

IV. 2. Intérêt des systèmes moléculaires organisés

Les propriétés d'auto-organisation des lipopeptides induisent la formation d'agrégats de différentes natures parmi lesquelles on retrouve les micelles, les vésicules ou encore les fibres.^{94,95} Ces systèmes organisés vont alors générer des zones hydrophobes qui vont potentiellement contribuer au confinement des substrats mis en présence.

L'utilisation de milieux organisés pour la catalyse a déjà été rapportée. En effet, les micelles sont considérées comme des nanoréacteurs qui possèdent en leur cœur un environnement hydrophobe vers lequel vont être dirigés les différents substrats à modifier. On retrouve donc, par analogie avec les enzymes, un effet de confinement des réactifs qui peut être à l'origine de l'amélioration des vitesses de réaction.

Des travaux récents décrivent par exemple les excellentes propriétés catalytiques du tensioactif commercial Triton-X-100 sur la synthèse de dérivés 1,4-dihydropyridine (Figure I.24).⁹⁶

Les rendements obtenus approchent les 100 % pour divers substrats en seulement 2h30 et à température ambiante, tandis que la même réaction menée simplement en milieu aqueux n'a montré aucun avancement après 24 h. Les réactifs mis en présence étant tous trois hydrophobes, ils se dirigent en milieu micellaire dans le cœur hydrophobe des agrégats et l'effet de confinement créé justifie alors la réactivité observée. La structure du Triton X-100 ne contribue pas en revanche à une intervention chimique vis-à-vis des substrats, qui serait alors synonyme d'organocatalyse. Il s'agit ici d'une catalyse supramoléculaire.

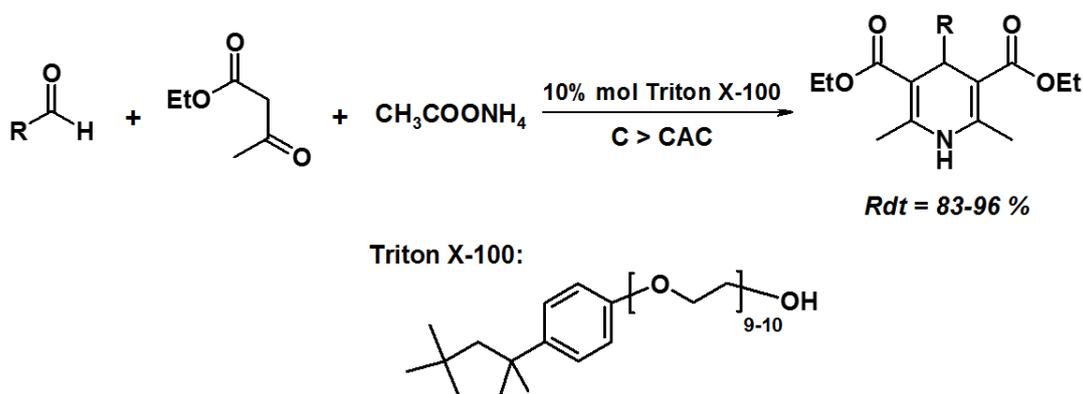


Figure I.24 : Synthèse "one-pot" de dérivés de la 1,4-dihydropyridine en présence de micelles de Triton X-100

Dans un deuxième temps, les systèmes organisés peuvent également être employés pour améliorer les performances de catalyseurs dispersés en solution, en renforçant notamment les interactions hydrophobes entre substrats et catalyseurs. Peng et ses collaborateurs ont ainsi rapporté l'incorporation d'histidine au sein de micelles de dodécylsulfate de sodium pour catalyser différentes réactions d'aldolisation.⁹⁷ En effet, l'aldolisation entre l'acétone et le *p*-nitrobenzaldéhyde, réalisée en présence de micelles de dodécylsulfate de sodium uniquement ou d'histidine seule en milieu aqueux, conduit respectivement à des rendements de 4 % et 53 % en 6 jours, tandis que la combinaison des deux permet de raccourcir le temps de réaction à 48 h pour un rendement de 87 %. L'application de ce système a été étendue avec succès à une plus grande gamme de substrats. En revanche, les excès énantiomériques obtenus restent plutôt modestes, la valeur maximale atteinte étant de 53 %.

Cet exemple vient illustrer l'intérêt d'une catalyse en milieu confiné mais aussi l'influence liée à l'apport organocatalytique des acides aminés. C'est donc assez naturellement qu'il a par la suite été envisagé de combiner ces deux aspects pour concevoir des systèmes organisés dotés de propriétés organocatalytiques intrinsèques. Le développement des lipopeptides s'inscrit dans cette démarche et met en avant, plus que tous les systèmes étudiés précédemment, la volonté de contribuer à une chimie plus verte par l'utilisation de ressources renouvelables d'une part et par l'étude de leurs propriétés en

milieu aqueux d'autre part.

IV. 3. Origine et propriétés des lipopeptides

IV. 2. 1. Lipopeptides issus des microorganismes

Certains lipopeptides sont produits naturellement, sécrétés par différents types de microorganismes.

La surfactine peut être obtenue à partir de différentes souches de la bactérie *Bacillus subtilis*.⁹⁸ Ce lipopeptide contient un cycle à 7 acides aminés auquel est greffée une chaîne grasse. La surfactine est connue pour son très grand pouvoir tensioactif qui en fait l'un des meilleurs détergents naturels (Figure I.25). Ses propriétés d'auto-organisation ont été mises en évidence et c'est sa faculté à former des micelles (ou agrégats plus complexes selon l'environnement) qui confère à la surfactine à la fois son pouvoir détergent et sa capacité à pénétrer les membranes hydrophobes.^{99,100} Son activité antivirale ou antibactérienne a également été remarquée mais une seule application en catalyse aurait à notre connaissance été rapportée dans la littérature, illustrant alors la formation d'hydrates de gaz naturels, catalysée par des tensioactifs naturels dont la surfactine.¹⁰¹ Les modifications chimiques entreprises pour développer des dérivés de la surfactine visent à ce jour majoritairement à améliorer les propriétés tensioactives ou à poursuivre l'étude de son activité antivirale.¹⁰²

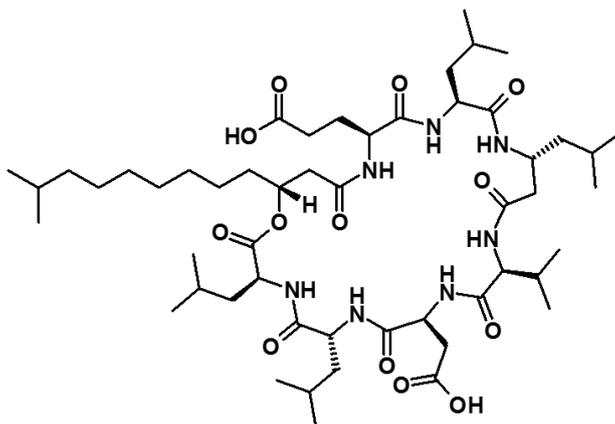


Figure I.25 : Structure chimique de la surfactine

La daptomycine est un autre lipopeptide récemment découvert pour ses propriétés antibiotiques qui est obtenue par fermentation de la bactérie *Streptomyces roseosporus*. Sa structure comprend un cycle à 10 acides aminés, lequel est relié à une chaîne carbonée par une séquence tripeptidique (Figure I.26). Les propriétés de la daptomycine résident essentiellement en sa capacité

à pénétrer les membranes de certaines bactéries, ce qui en fait un traitement de choix face à certaines infections.¹⁰³ En revanche, il semblerait d'après nos connaissances que ce lipopeptide n'ait pas été publié à ce jour pour d'éventuelles propriétés catalytiques. Ce sont ses propriétés amphiphiles et sa capacité de perméation qui font de la daptomycine et de ses analogues des antibiotiques efficaces.

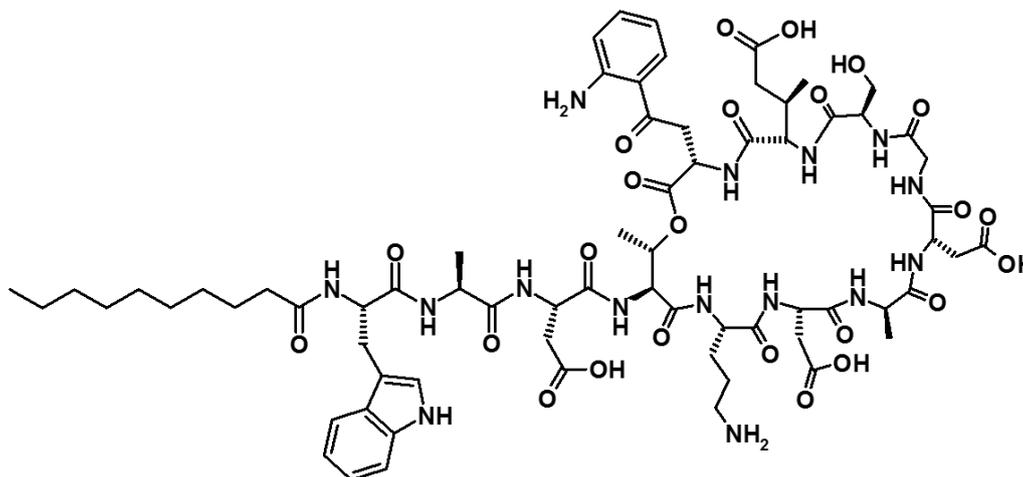


Figure I.26 : Structure chimique de la daptomycine

Ces deux lipopeptides naturels font partie des quelques structures amphiphiles issues de microorganismes rapportées dans la littérature. Ainsi, le développement de composés synthétiques aux propriétés d'auto-assemblage s'avère de toute évidence nécessaire pour obtenir des analogues structuraux à ces systèmes naturels ou des lipopeptides de composition foncièrement différente.

IV. 2. 2. Lipopeptides synthétiques aux propriétés d'auto-assemblage

Lohani et ses collaborateurs ont d'ailleurs procédé à la synthèse totale de la daptomycine et de structures analogues par synthèse peptidique en phase solide.¹⁰⁴ Ses éventuelles propriétés d'auto-organisation n'ont pas été rapportées à ce jour. Or, le développement de lipopeptides synthétiques pour une utilisation en catalyse bifonctionnelle, c'est-à-dire qui fait intervenir à la fois les acides aminés et un effet hydrophobe ou interfacial, nécessite avant tout la mise en œuvre de structures aux propriétés d'auto-organisation.

Plusieurs revues récentes répertorient les nouvelles structures lipopeptidiques conçues, ainsi que leur capacité d'auto-organisation.^{94,95,105} Les structures des lipopeptides conçus par les équipes de Stupp ont par exemple davantage tendance à former des micelles ou des réseaux fibreux, pour lesquels la taille et la géométrie cylindrique ou plate des fibres peuvent être modulées en fonction de

la composition en acides aminés de leur tête polaire.^{106,107} Grâce à leur faculté à former différents types d'agrégats en solution, les lipopeptides ont déjà pu être appliqués à de nombreux usages, essentiellement pour l'encapsulation et la vectorisation de composés hydrophobes ou pour la conception de biomatériaux.

Leur utilisation pour l'encapsulation de molécules hydrophobes a donc été rapportée. Le cœur hydrophobe de fibres obtenues par l'auto-organisation de lipopeptides est capable d'accueillir une molécule hydrophobe polycyclique, la camptothécine, inhibiteur enzymatique dont certains dérivés sont appliqués dans les traitements contre le cancer. Des analyses en microscopie électronique ont par ailleurs permis de constater que le réseau fibreux était suffisamment robuste et conservait une certaine organisation après le processus d'encapsulation (Figure I.27).¹⁰⁸

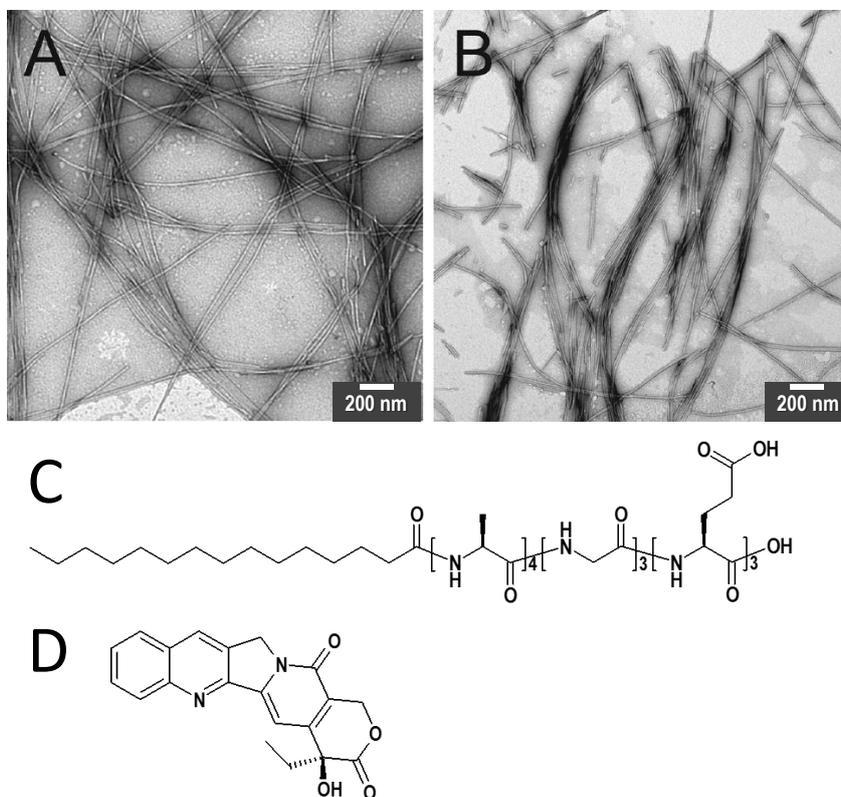


Figure I.27 : Fibres formées par le lipopeptide C₁₅Ala₄Gly₃Glu₃ seul en solution tampon PBS (A) ou après encapsulation de la camptothécine (B). C: structure de C₁₅Ala₄Gly₃Glu₃. D: Structure chimique de la camptothécine.

Adapted with permission from *ACS Nano* **2011**, 5 (11), 9113–9121. Copyright 2011 American Chemical Society

Les assemblages de lipopeptides trouvent aussi leurs applications dans les biomatériaux. Il a notamment été rapporté la création de réseaux fibreux comme analogues structuraux du collagène pour la minéralisation osseuse.¹⁰⁹ En effet, un solide réseau de fibres renforcé par des ponts disulfures intermoléculaires a pu conduire à la croissance d'hydroxyapatite le long de ces nanofibres.

Les propriétés d'auto-organisation des lipopeptides et la robustesse des structures conçues

offrent des environnements hydrophobes et surtout des interfaces très variées. Ces paramètres sont bien évidemment importants dans la création de zones de confinement pour la catalyse. Le second aspect à étudier concerne la participation chimique des acides aminés les constituant, parallèlement aux modifications structurales qu'ils induisent.

IV. 4. Lipopeptides comme organocatalyseurs

Il existe à ce jour très peu d'exemples dans la littérature qui illustrent l'utilisation de lipopeptides en organocatalyse. Ces structures ont pour le moment davantage été développées pour leurs propriétés amphiphiles et l'exploitation de la géométrie des agrégats formés.

Un des premiers travaux qui illustre à la fois les propriétés d'auto-organisation des lipopeptides mais également leur influence en catalyse a été publié par Guler et Stupp.¹⁰⁷ Ils ont entrepris la synthèse de deux séquences peptidiques distinctes, se terminant par deux histidines, auxquelles ils ont greffé une chaîne carbonée en C16 (Figure I.28).

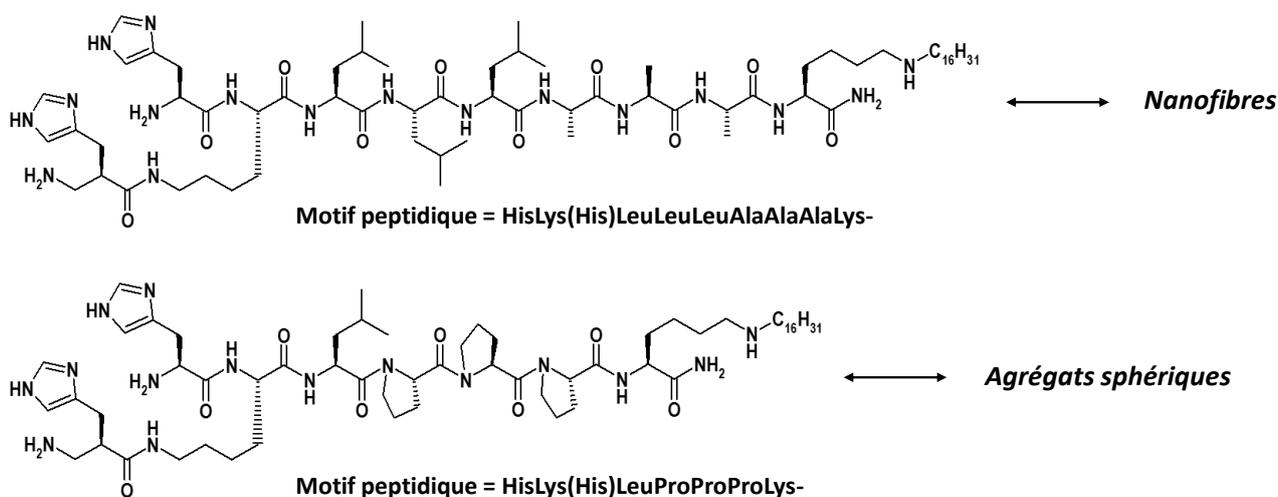


Figure I.28 : Structure des lipopeptides catalyseurs de l'hydrolyse du 2,4-nitrophénylacétate

L'étude de leur auto-organisation a permis d'observer que le premier lipopeptide, constitué essentiellement d'alanines et de leucines, avait tendance à former un réseau fibreux ; tandis que la seconde structure, contenant plusieurs motifs proline, s'organisait en solution pour former des agrégats plutôt sphériques. Ces géométries ont par la suite été testées comme catalyseurs de la réaction d'hydrolyse du 2,4-dinitrophénylacétate (Figure I.29).

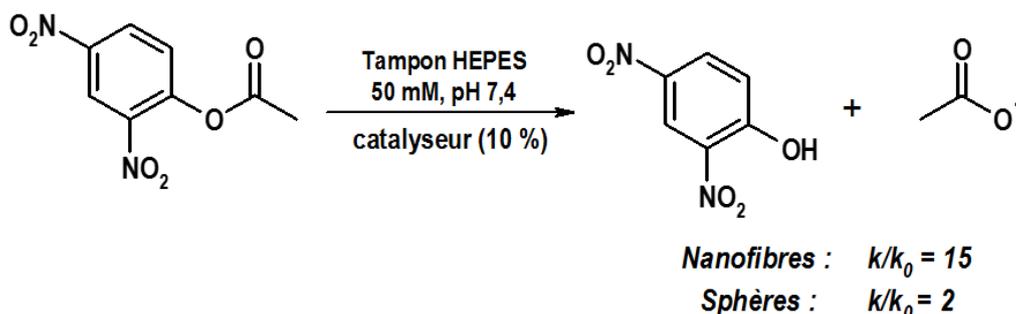


Figure I.29 : Hydrolyse du 2,4-nitrophénylacétate en milieu aqueux. Evaluation des rapports de vitesse k/k_0 des hydrolyses en présence des deux structures organisées par rapport à l'hydrolyse en l'absence de catalyseur (k_0).

Il a alors été constaté que la présence de fibres permettait une hydrolyse bien plus rapide qu'en présence de systèmes sphériques, supposant que la haute densité de sites réactifs (histidines entre autres) du réseau fibreux contribuait à améliorer grandement les propriétés catalytiques du lipopeptide.

Ces résultats offrent de nombreuses perspectives dans la modification du système amphiphile et dans ses applications potentielles. Une chaîne peptidique relativement courte et modulable à façon, à laquelle est accrochée une chaîne grasse de longueur tout aussi variable, peut suffire à concevoir des géométries variées qui se retrouvent également dotées de propriétés catalytiques.

Par ailleurs, les équipes de Miravet et Escuder ont exploité les propriétés d'auto-organisation d'un lipopeptide à base de proline pour concevoir un organogel aux propriétés organocatalytiques.¹¹⁰ Ainsi, la présence de la proline induit une excellente stéréosélectivité (> 90%) vis-à-vis de la réaction d'aldolisation entre le *p*-nitrobenzaldehyde et la cyclohexanone (Figure I.30). Par ailleurs, l'hydrogel formé par les dérivés à base de proline peut être recyclé et réemployé trois fois de suite en conservant la même efficacité. Le gel est simplement cassé mécaniquement et lavé avec du toluène avant d'être fondu puis refroidi pour recouvrer son organisation et ses capacités catalytiques. Cet exemple souligne ainsi l'intérêt d'utiliser des systèmes organisés en catalyse pour faciliter le protocole de recyclage.

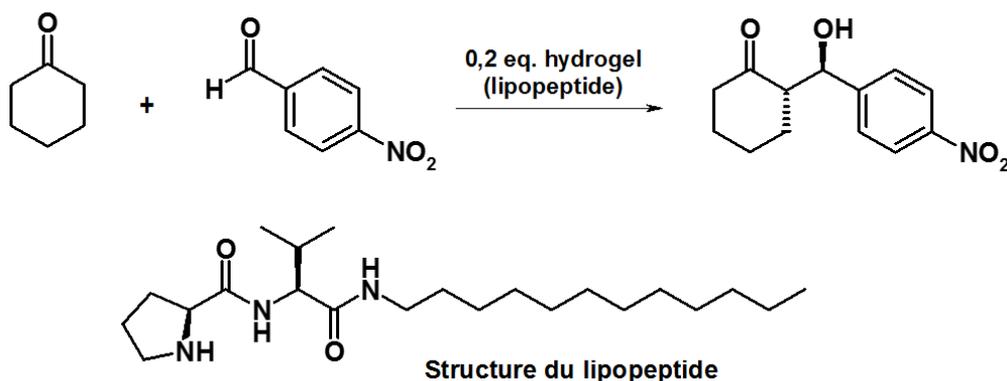


Figure I.30 : Réaction d'aldolisation entre le *p*-nitrobenzaldéhyde et la cyclohexanone en présence du lipopeptide à base de proline

Ces systèmes sont des outils très simplifiés des structures enzymatiques mais semblent pourvus de la bifonctionnalité que l'on cherche à mimer : des acides aminés à la fois source de catalyse chimique mais aussi engagés dans des liaisons faibles, aux côtés des interactions hydrophobes entre chaînes grasses, pour la formation d'agrégats.

V. Conclusion

Cette mise au point bibliographique sur la conception d'organocatalyseurs bio-inspirés a présenté une liste non exhaustive de structures envisageables pour mimer au plus près les structures enzymatiques. Dans un premier temps, il a été souligné la difficulté de créer des mimes d'enzymes, tant dans la complexité de synthèse des structures envisagées qu'au niveau des résultats obtenus en catalyse. Par ailleurs, l'approche biomimétique des catalyseurs enzymatiques induit fortement la création de cavités hydrophobes. Si de nombreuses structures macrocycliques ou polymériques sont à disposition pour générer ces zones de confinement, leur manipulation est généralement associée à celle de solvants organiques.

La stratégie finalement mise en valeur dans ce premier chapitre consiste à s'approcher au plus près des modèles enzymatiques. Il s'agit alors d'introduire hydrophobie et acides aminés dans des structures simples et adaptables aux milieux aqueux qu'on appelle lipopeptides. Puisque les enzymes sont capables de décupler des vitesses de réactions qui ont lieu naturellement dans l'eau, il semble important de développer des systèmes organisés en milieu aqueux et de bénéficier des nombreux avantages de cet élément naturel (disponibilité, polarité, absence de toxicité...).

L'objectif du travail qui suit consiste ainsi à concevoir dans un premier temps une nouvelle gamme de lipopeptides et d'en étudier les propriétés d'auto-organisation. Ces lipopeptides seront par la suite utilisés comme catalyseurs de réactions d'hydrolyse. L'influence de la composition des lipopeptides et de leur auto-organisation potentielle sur les propriétés hydrolytiques sera alors évaluée. Cela permettra d'identifier les contributions essentielles de nos systèmes à la catalyse afin de s'orienter par la suite vers la conception d'outils plus performants.

VI. Références

- (1) Anastas, P. T.; Warner, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Oxford University Press, 1998.
- (2) Armor, J. N. *Catal. Today* **2011**, *163* (1), 3–9.
- (3) Lichtenthaler, F. W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33* (23-24), 2364–2374.
- (4) Koshland, D. E. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33* (23-24), 2375–2378.
- (5) Ekici, Ö. D.; Paetzel, M.; Dalbey, R. E. *Protein Sci.* **2008**, *17* (12), 2023–2037.
- (6) Choi, J.-M.; Han, S.-S.; Kim, H.-S. *Biotechnol. Adv.* **2015**. DOI : 10.1016/j.biotechadv.2015.02.014
- (7) Van Beilen, J. B.; Li, Z. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13* (4), 338–344.
- (8) Ross, M. H.; Ely, J. O.; Archer, J. G. *J. Biol. Chem.* **1951**, *192* (2), 561–568.
- (9) Sizer, I. W. *J. Biol. Chem.* **1944**, *154*, 461–473.
- (10) Belzil, A.; Parent, C. *Biochem. Cell Biol.* **2003**, *83* (1), 70–77.
- (11) Tao, H.; Cornish, V. W. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6* (6), 858–864.
- (12) Bornscheuer, U. T.; Pohl, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5* (2), 137–143.
- (13) MacMillan, D. W. C. *Nature* **2008**, *455* (7211), 304–308.
- (14) Marchetti, L.; Levine, M. *ACS Catal.* **2011**, *1* (9), 1090–1118.
- (15) Yin, Y.; Dong, Z.; Luo, Q.; Liu, J. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37* (11), 1476–1509.
- (16) Breslow, R.; Campbell, P. *Bioorganic Chem.* **1971**, *1*, 140–156.
- (17) Breslow, R.; Kohn, H.; Siegel, B. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17* (20), 1645–1646.
- (18) Bellanger, N.; Perly, B. *J. Mol. Struct.* **1992**, *273*, 215–226.
- (19) Loftsson, T.; Duchêne, D. *Int. J. Pharm.* **2007**, *329* (1-2), 1–11.
- (20) Fetzer, J. C. Process for purifying waste water streams by inclusion complexation of polynuclear aromatic hydrocarbons. US005190663A, 1993.
- (21) Fenyvesi, É.; Szemán, J.; Szejtli, J. *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1996**, *25* (1-3), 229–232.
- (22) Chaudhuri, S.; Phelan, T.; Levine, M. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56* (13), 1619–1623.
- (23) Breslow, R.; Dong, S. D. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (5), 1997–2011.
- (24) Breslow, R.; Chung, S. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30* (33), 4353–4356.
- (25) Steitz, T. A.; Henderson, R.; Blow, D. M. *J. Mol. Biol.* **1969**, *46*, 337–348.
- (26) Rideout, D. C.; Breslow, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102* (26), 7816–7817.
- (27) Mock, W. L.; Irra, T. A.; Wepsiec, J. P.; Adhya, M. *J. Org. Chem.* **1989**, *54* (22), 5302–5308.

- (28) Tuncel, D.; Steinke, J. H. G. *Chem. Commun.* **1999**, 16, 1509–1510.
- (29) Lei, L.; Luo, L.; Wu, X.-L.; Liao, G.-H.; Wu, L.-Z.; Tung, C.-H. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49 (9), 1502–1505.
- (30) Klöck, C.; Dsouza, R. N.; Nau, W. M. *Org. Lett.* **2009**, 11 (12), 2595–2598.
- (31) Hang, C.; Fang-fang, Z.; Jian-xin, Z.; Xi, Z.; Zhu, T.; Sai-feng, X.; Qian-jiang, Z. *Catal. Commun.* **2009**, 11 (3), 167–170.
- (32) Pemberton, B. C.; Raghunathan, R.; Volla, S.; Sivaguru, J. *Chem. Eur. J.* **2012**, 18 (39), 12178–12190.
- (33) Zhao, J.; Kim, H.-J.; Oh, J.; Kim, S.-Y.; Lee, J. W.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Kim, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40 (22), 4233–4235.
- (34) Jon, S. Y.; Selvapalam, N.; Oh, D. H.; Kang, J.-K.; Kim, S.-Y.; Jeon, Y. J.; Lee, J. W.; Kim, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125 (34), 10186–10187.
- (35) Lehn, J.-M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27 (1), 89–112.
- (36) Cram, D. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27 (8), 1009–1020.
- (37) Kaanumalle, L. S.; Ramamurthy, V. *Chem. Commun.* **2007**, No. 10, 1062–1064.
- (38) Purse, B. W.; Rebek Jr., J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102 (31), 10777–10782.
- (39) Hooley, R. J.; Rebek Jr., J. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5 (22), 3631–3636.
- (40) Richeter, S.; Rebek Jr., J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (50), 16280–16281.
- (41) Butterfield, S. M.; Rebek Jr., J. *Chem. Commun.* **2007**, No. 16, 1605–1607.
- (42) Irwin, J. L.; Sherburn, M. S. *J. Org. Chem.* **2000**, 65 (2), 602–605.
- (43) Lee, J. W.; Samal, S.; Selvapalam, N.; Kim, H.-J.; Kim, K. *Acc. Chem. Res.* **2003**, 36 (8), 621–630.
- (44) Kim, K.; Selvapalam, N.; Ko, Y. H.; Park, K. M.; Kim, D.; Kim, J. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36 (2), 267–279.
- (45) Marty, J. D.; Mauzac, M. In *Microlithography · Molecular Imprinting*; Advances in Polymer Science; Springer Berlin Heidelberg, 2005; pp 1–35.
- (46) Wulff, G.; Liu, J. *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45 (2), 239–247.
- (47) Wulff, G. *Chem. Rev.* **2002**, 102 (1), 1–27.
- (48) Pauling, L. *Nature* **1948**, 161 (4097), 707–709.
- (49) Mader, M. M.; Bartlett, P. A. *Chem. Rev.* **1997**, 97 (5), 1281–1301.
- (50) Beach, J. V.; Shea, K. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116 (1), 379–380.
- (51) Piletska, E. V.; Romero-Guerra, M.; Guerreiro, A. R.; Karim, K.; Turner, A. P. F.; Piletsky, S. A. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 542 (1), 47–51.

- (52) Emgenbroich, M.; Wulff, G. *Chem. - Eur. J.* **2003**, *9* (17), 4106–4117.
- (53) Alexander, C.; Davidson, L.; Hayes, W. *Tetrahedron* **2003**, *59* (12), 2025–2057.
- (54) Chen, L. H.; Kenyon, G. L.; Curtin, F.; Harayama, S.; Bembenek, M. E.; Hajipour, G.; Whitman, C. P. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (25), 17716–17721.
- (55) Srere, P. A. *Trends Biochem. Sci.* **1984**, *9* (9), 387–390.
- (56) Kim, S. T.; Li, Y. F.; Sancar, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89* (3), 900–904.
- (57) Hajos, Z. G.; Parrish, D. R. *J. Org. Chem.* **1974**, *39* (12), 1615–1621.
- (58) Eder, U.; Sauer, G.; Wiechert, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1971**, *10* (7), 496–497.
- (59) List, B. *Tetrahedron* **2002**, *58* (28), 5573–5590.
- (60) List, B.; Pojarliev, P.; Biller, W. T.; Martin, H. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (5), 827–833.
- (61) Choudary, B. M.; Rajasekhar, C. V.; Gopi Krishna, G.; Rajender Reddy, K. *Synth. Commun.* **2007**, *37* (1), 91–98.
- (62) Córdova, A.; Zou, W.; Ibrahim, I.; Reyes, E.; Engqvist, M.; Liao, W.-W. *Chem. Commun.* **2005**, No. 28, 3586–3588.
- (63) Córdova, A.; Zou, W.; Dziedzic, P.; Ibrahim, I.; Reyes, E.; Xu, Y. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12* (20), 5383–5397.
- (64) Bassan, A.; Zou, W.; Reyes, E.; Himo, F.; Córdova, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (43), 7028–7032.
- (65) He, Y.-H.; Hu, Y.; Guan, Z. *Synth. Commun.* **2011**, *41* (11), 1617–1628.
- (66) George, S. C.; Kim, S. S.; Rajagopal, G. *Appl. Organometal. Chem.* **2007**, *21* (9), 798–803.
- (67) George, S. C.; Kim, S. S.; Kim, H. S. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2007**, *28* (12), 2431–2434.
- (68) Chen, A.; Xu, J.; Chiang, W.; Chai, C. L. L. *Tetrahedron* **2010**, *66* (7), 1489–1495.
- (69) Tang, Z.; Yang, Z.-H.; Chen, X.-H.; Cun, L.-F.; Mi, A.-Q.; Jiang, Y.-Z.; Gong, L.-Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (25), 9285–9289.
- (70) Ahrendt, K. A.; Borths, C. J.; MacMillan, D. W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (17), 4243–4244.
- (71) Mase, N.; Nakai, Y.; Ohara, N.; Yoda, H.; Takabe, K.; Tanaka, F.; Barbas, C. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (3), 734–735.
- (72) Hernández, J. G.; Juaristi, E. *Tetrahedron* **2011**, *67* (36), 6953–6959.
- (73) Triandafillidi, I.; Bisticha, A.; Voutyritsa, E.; Galiatsatou, G.; Kokotos, C. G. *Tetrahedron* **2015**, *71* (6), 932–940.
- (74) Li, Y.; Zhao, Y.; Hatfield, S.; Wan, R.; Zhu, Q.; Li, X.; McMills, M.; Ma, Y.; Li, J.; Brown, K. L.; others. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8* (12), 2675–2680.

- (75) Zhu, X.-F.; Fan, M.; Wang, X.-B.; Guo, B.-B.; Liu, C.-J.; Ye, Y.; Zhao, Y.-F. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2010**, *16* (4), 297–300.
- (76) Maylié, M. F.; Charles, M.; Desnuelle, P. *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *276* (1), 162–175.
- (77) Brady, L.; Brzozowski, A. M.; Derewenda, Z. S.; Dodson, E.; Dodson, G.; Tolley, S.; Turkenburg, J. P.; Christiansen, L.; Hüge-Jensen, B.; Norskov, L.; Thim, L.; Menge, U. *Nature* **1990**, *343*, 767–770.
- (78) Sussman, J. L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I. *Science* **1991**, *253* (5022), 872–879.
- (79) Jackson, W. R.; Jayatilake, G. S.; Matthews, B. R.; Wilshire, C. *Aust. J. Chem.* **1988**, *41*, 203–213.
- (80) Tanaka, K.; Mori, A.; Inoue, S. *J. Org. Chem.* **1990**, *55* (1), 181–185.
- (81) Matthews, B. W.; Craik, C. S.; Neurath, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91* (10), 4103–4105.
- (82) Zhang, S.; Rich, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94* (1), 23–28.
- (83) Xiong, H.; Buckwalter, B. L.; Shieh, H.-M.; Hecht, M. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92* (14), 6349–6353.
- (84) Colonna, S.; Molinari, H.; Banfi, S. *Tetrahedron* **1983**, *39* (9), 1635–1641.
- (85) Juliá, S.; Masana, J.; Vega, J. C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, *19* (11), 929–931.
- (86) Geller, T.; Gerlach, A.; Krüger, C. M.; Militzer, H.-C. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45* (26), 5065–5067.
- (87) Benoiton, N. L. *Chemistry of peptide synthesis*; Taylor & Francis: Boca Raton, 2006.
- (88) Nagano, M.; Doi, M.; Kurihara, M.; Suemune, H.; Tanaka, M. *Org. Lett.* **2010**, *12* (15), 3564–3566.
- (89) Miller, S. J. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37* (8), 601–610.
- (90) Müller, C. E.; Zell, D.; Hrdina, R.; Wende, R. C.; Wanka, L.; Schuler, S. M. M.; Schreiner, P. R. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (17), 8465–8484.
- (91) Davie, E. A. C.; Mennen, S. M.; Xu, Y.; Miller, S. J. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (12), 5759–5812.
- (92) Hong, S.; Liu, M.; Shuai, Y.; Wang, Z.; Shi, L.; Deng, W. *J. Inclusion Phenom. Macrocycl. Chem.* **2014**, *80* (3-4), 443–448.
- (93) Ikeda, H.; Kojin, R.; Yoon, C.-J.; Ikeda, T.; Toda, F. *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1989**, *7* (1), 117–124.
- (94) Mandal, D.; Nasrolahi Shirazi, A.; Parang, K. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (22), 3544–3564.
- (95) Dehsorkhi, A.; Castelletto, V.; Hamley, I. W. *J. Pept. Sci.* **2014**, *20* (7), 453–467.

- (96) Ghosh, P. P.; Mukherjee, P.; Das, A. R. *RSC Adv.* **2013**, 3 (22), 8220–8226.
- (97) Peng, Y.-Y.; Peng, S.-J.; Ding, Q.-P.; Wang, Q.; Cheng, J.-P. *Chin. J. Chem.* **2007**, 25 (3), 356–363.
- (98) Ullrich, C.; Kluge, B.; Palacz, Z.; Vater, J. *Biochemistry (Mosc.)* **1991**, 30 (26), 6503–6508.
- (99) Zou, A.; Liu, J.; Garamus, V. M.; Yang, Y.; Willumeit, R.; Mu, B. *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114 (8), 2712–2718.
- (100) Déjugnat, C.; Diat, O.; Zemb, T. *ChemPhysChem* **2011**, 12 (11), 2138–2144.
- (101) Rogers, R. E.; Kothapalli, C.; Lee, M. S.; Woolsey, J. R. *Can. J. Chem. Eng.* **2003**, 81 (5), 973–980.
- (102) Shao, C.; Liu, L.; Gang, H.; Yang, S.; Mu, B. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, 16 (1), 1855–1872.
- (103) Raja, A.; LaBonte, J.; Lebbos, J.; Kirkpatrick, P. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, 2, 943–944.
- (104) Lohani, C. R.; Taylor, R.; Palmer, M.; Taylor, S. D. *Org. Lett.* **2015**, 17 (3), 748–751.
- (105) Hamley, I. W. *Soft Matter* **2011**, 7 (9), 4122–4138.
- (106) Cui, H.; Webber, M. J.; Stupp, S. I. *Biopolymers* **2010**, 94 (1), 1–18.
- (107) Guler, M. O.; Stupp, S. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (40), 12082–12083.
- (108) Soukasene, S.; Toft, D. J.; Moyer, T. J.; Lu, H.; Lee, H.-K.; Standley, S. M.; Cryns, V. L.; Stupp, S. I. *ACS Nano* **2011**, 5 (11), 9113–9121.
- (109) Hartgerink, J. D.; Beniash, E.; Stupp, S. I. *Science* **2001**, 294, 1684–1688.
- (110) Rodríguez-Llansola, F.; Miravet, J. F.; Escuder, B. *Chem. Commun.* **2009**, No. 47, 7303–7305.

CHAPITRE II
Synthèse et caractérisation des
lipopeptides

SOMMAIRE

I. Introduction	50
II. Synthèse peptidique	53
II. 1. Définition du couplage peptidique	53
II. 2. Choix des conditions de couplage	55
II. 3. Synthèse des lipopeptides C-ter	55
II. 4. Synthèse des lipopeptides N-ter	59
II. 5. Synthèse de lipopeptides catanioniques	62
III. Etude des propriétés d'auto-organisation des lipopeptides	64
IV. 1. Caractérisation des lipopeptides à l'état solide	64
IV. 2. Détermination des concentrations d'agrégation critiques	66
IV. 3. Détermination des structures par microscopie électronique	73
IV. 4. Techniques de diffusion	75
IV. Conclusion	80
V. Références	81

I. Introduction

Les lipopeptides sont définis comme des composés amphiphiles à base d'acides aminés hydrophiles d'une part et d'une chaîne lipophile d'autre part. L'étude bibliographique a souligné la capacité de telles structures à former des agrégats aux géométries variées en solution, générant ainsi des zones hydrophobes et des interfaces fonctionnalisées. Ainsi, la présence dans ces structures de plusieurs acides aminés, motifs constitutifs des sites catalytiques enzymatiques, permet d'envisager l'utilisation de ces composés amphiphiles en catalyse. Ainsi, les lipopeptides pourraient s'inscrire comme des systèmes biomimétiques potentiels, à la fois dotés de motifs analogues à ceux qui composent les séquences enzymatiques et également susceptibles de générer des zones de confinement hydrophobes favorables à la catalyse. Il a donc été choisi par la suite de s'appuyer sur ces concepts pour mettre au point de nouveaux systèmes catalytiques bio-inspirés.

Le chapitre 2 présente la synthèse de lipopeptides originaux ainsi que leur caractérisation physico-chimique, permettant d'évaluer leur potentiel à générer des environnements hydrophobes en milieu aqueux.

Les structures amphiphiles choisies pour la conception de ces lipopeptides sont dotées d'une triade d'acides aminés sur laquelle une chaîne grasse aura été greffée. Le choix d'un tripeptide pour constituer la tête polaire a été motivé par la volonté de travailler avec un système modulable, tout en gardant une séquence relativement courte qui permettra une mise en œuvre plus aisée. Quant à la nature de ces acides aminés, elle dépend directement de l'activité catalytique qu'il a été décidé de conférer aux systèmes conçus.

Notre étude s'est portée sur la catalyse de réactions d'hydrolyse. En effet, celles-ci interviennent dans de nombreux processus biologiques, que ce soit dans la digestion des protéines par les protéases, dans le métabolisme des esters et lipides impliquant des lipases, ou encore dans la dégradation de phosphoesters. Ce dernier mécanisme est notamment présent dans la régulation du phosphate inorganique, dans l'hydrolyse de l'ATP et des acides nucléiques.¹⁻³ Ainsi, le contrôle de cette réaction pourrait présenter un intérêt majeur dans divers domaines tels que l'inhibition d'enzyme,⁴ la biologie moléculaire ou le génie génétique. Par une approche bio-inspirée, l'étude des sites actifs de quelques hydrolases a permis d'identifier quel motif peptidique était susceptible de participer à la catalyse de réactions d'hydrolyse. La détermination par rayons X de la structure du site catalytique de l'acétylcholinestérase a ainsi mis en évidence la présence d'une triade catalytique à base d'acide

glutamique, de sérine et d'histidine.⁵ D'autre part, la modification chimique d'une histidine au sein de la séquence peptidique d'une nucléase entraînant une nette diminution de l'activité catalytique de cette enzyme, a révélé le rôle majeur joué par l'histidine sur l'activité de ces enzymes.⁶

Ainsi, la conception des lipopeptides potentiellement catalytiques a été orientée vers des structures à base d'histidine. Notre démarche a également consisté à faire le choix d'un système simple (tripeptide et chaîne grasse) afin de pouvoir en étudier toutes les caractéristiques. Le but est dans un premier temps de valider le concept de lipopeptides organocatalytiques, puis d'identifier les premières contributions positives à la catalyse au sein de ces systèmes, afin d'en affiner la structure et la réactivité.

Pour les premières structures synthétisées, l'histidine a été positionnée à l'extrémité des lipopeptides et reliée à la partie hydrophobe *via* deux glycines. La glycine est l'acide aminé de structure la plus simple puisqu'elle est dépourvue de chaîne latérale ; elle nous permet ici d'allonger la séquence peptidique sans introduire de nouvelles fonctions réactives qui pourraient d'une part compliquer les étapes de synthèse et de purification, et d'autre part participer à la catalyse. Ainsi, dans ces structures, la contribution de l'histidine sera plus facile à mettre en évidence. En parallèle, des structures dites témoins et dont la tête polaire est constituée de trois glycines (motif triglycine) ont également été synthétisées. Ces molécules, ne possédant pas d'histidine, sont supposées être dépourvues d'activité organocatalytique spécifique, tout en conservant néanmoins leurs propriétés d'auto-organisation.⁷

Selon le groupe fonctionnel par lequel la chaîne grasse vient se greffer, des lipopeptides dits « N-ter » ou « C-ter » seront obtenus. Ainsi les structures N-ter porteront la queue hydrophobe sur leur partie C-terminale, laissant libre la fonction amine terminale (**Erreur ! source du renvoi introuvable.** 1. A). De façon symétrique, les structures C-ter garderont leur fonction carboxylique C-terminale libre, la chaîne étant greffée cette fois sur le motif amine (Figure II-1.B). Cela permettra d'évaluer la contribution des fonctions terminales ammonium ou carboxylate laissées libres sur les propriétés d'auto-organisation et de catalyse. De plus, le caractère hydrophobe de ces composés sera également modulé en jouant sur la longueur de la chaîne grasse, en considérant des chaînes de huit à douze atomes de carbone.

Deux autres structures C-ter ont également été envisagées : l'une dont la fonction carboxylique de l'histidine terminale a été bloquée par un ester de méthyle, qui pourra mettre en évidence le rôle du carboxylate associé à l'histidine, la seconde possédant une sérine à côté de l'histidine au lieu de la glycine centrale. De nombreuses hydrolases comme les protéases ou lipases contiennent en effet très souvent cet acide aminé dans leur site actif.⁸

Enfin, deux lipopeptides catanioniques ont été obtenus par échange de proton entre une structure N-ter à dix atomes de carbone et deux composés C-ter différents *via* une simple réaction acido-basique (Figure II-1. C).⁹ Ces structures analogues aux composés bicaténaires (deux chaînes grasses reliées à une tête polaire) ont été conçues dans l'optique d'obtenir des géométries d'agrégats différentes des lipopeptides C-terminal ou N-terminal dits monocaténaires.

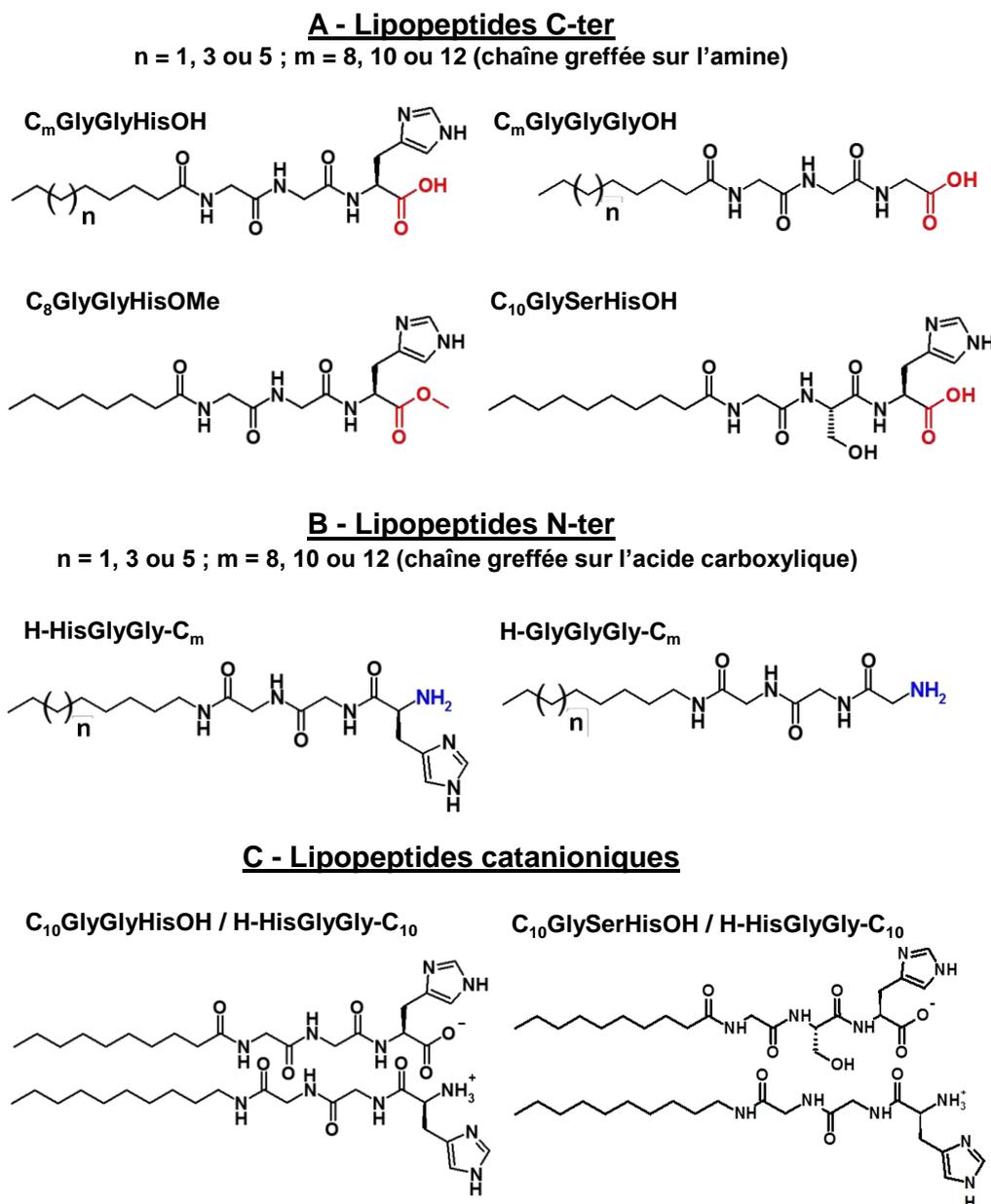


Figure II-1 : Structures générales des lipopeptides conçus

Par la suite, les propriétés amphiphiles des lipopeptides seront évaluées. Il s'agira d'une part de mettre en évidence l'auto-organisation des lipopeptides par tensiométrie et fluorimétrie

en déterminant leur concentration d'agrégation critique. Dans un second temps, nous utiliserons des techniques complémentaires de microscopie et de diffusion pour avoir accès à la nature et à la taille des agrégats formés.

II. Synthèse peptidique

II. 1. *Définition du couplage peptidique*

La synthèse des lipopeptides a notamment fait intervenir le couplage peptidique en solution. Celui-ci a été préféré au couplage en phase solide pour réaliser des synthèses à l'échelle du gramme, tandis que la synthèse en phase solide est plus adaptée à la synthèse de séquences plus longues (constituées de plus de cinq acides aminés). Les acides aminés possèdent par nature au moins deux groupes fonctionnels et potentiellement réactifs, à la fois un groupe carboxyle et une fonction amine, ainsi qu'une chaîne latérale R qui diffère pour chaque résidu. La procédure de couplage peptidique consiste en la formation d'une liaison amide entre deux acides aminés, l'un intervenant *via* son amine sur le groupe carboxyle du second. Il est alors indispensable de protéger les fonctions restantes pour éviter des réactions secondaires entre acides aminés. En fonction de la nature des acides aminés et de la réactivité de leur chaîne latérale, les fonctions de cette dernière seront elles aussi bloquées pour empêcher toute réaction parasite. Les étapes de protection et déprotection des acides aminés font partie des principales préoccupations en synthèse peptidique. De nombreux groupes protecteurs ont ainsi été développés, d'une part sur les fonctions N-terminales et C-terminales, et d'autre part, des groupes plus spécifiques de la nature de chaque acide aminé ont vu le jour pour masquer temporairement leurs fonctions latérales.¹⁰

La réaction nucléophile qui entraîne la formation d'une liaison amide n'est pas spontanée et nécessite l'activation de la fonction carboxyle par un groupe électroattracteur noté X (Figure II-2). C'est un groupement qui peut être de nature variable : la littérature rapporte l'utilisation d'halogénures d'acyles,¹¹ d'esters¹² ou d'anhydrides¹³ comme espèces activées intervenant dans la synthèse peptidique.

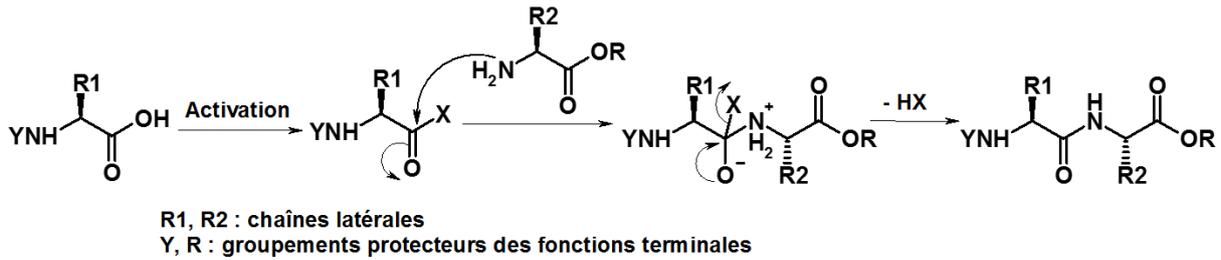


Figure II-2 : Schéma du processus d'activation de la fonction carboxyle d'un acide aminé

Néanmoins, l'étape d'activation nécessaire au couplage peptidique provoque généralement une racémisation partielle de la chaîne latérale (Figure II-3).¹⁴ Suite à une attaque basique, il y a soit déprotonation et passage par un dérivé énolate de l'acide aminé, soit formation d'un oxazolone, ces mécanismes conduisant tous deux à un mélange racémique.

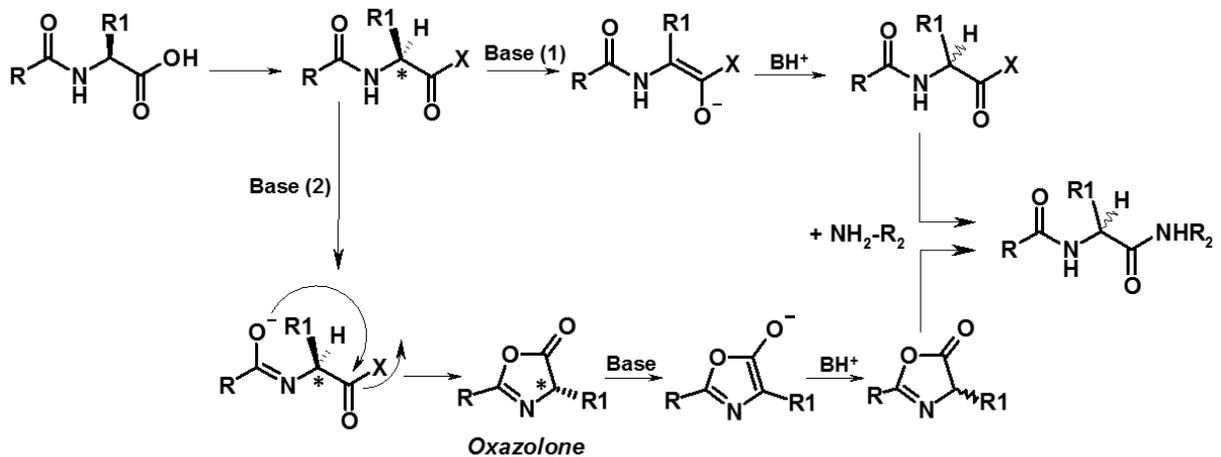


Figure II-3 : Mécanismes illustrant la perte de chiralité (*) des peptides par énolisation directe (1) ou via la formation d'une oxazolone (2)

Pour garantir l'activation sans provoquer de perte de configuration, les agents de couplage apportant l'activation sont associés à un second adjuvant. Ainsi au cours des dernières décennies, plusieurs combinaisons ont été proposées comme protocole de synthèse peptidique pour assurer rendement et chiralité.¹⁴ L'utilisation de carbodiimides couplés à l'hydroxybenzotriazole (HOBT) est le protocole le plus fréquemment rencontré mais d'autres agents de couplage comme certains sels de phosphonium ou d'uronium utilisés sans second adjuvant peuvent également être employés.

II. 2. Choix des conditions de couplage

La stratégie de couplage retenue consiste en l'utilisation du diisopropylcarbodiimide (DIC) auquel s'ajoute l'adjuvant Oxymapure® (acétate de 2-cyano-2-(hydroxyimino) éthyle, noté par la suite Oxyma). Les carbodiimides font partie des agents de couplage les plus répandus en synthèse peptidique et l'Oxyma contribue nettement à la diminution du degré de racémisation des peptides formés, tout en garantissant une grande efficacité de couplage.¹⁵ Cela en fait une très sérieuse alternative aux dérivés benzotriazoles, amplement utilisés mais dont les propriétés explosives récemment publiées remettent en cause son utilisation pour de la synthèse « en routine ».¹⁶

La Figure II-4 illustre les réactions successives qui assurent un couplage peptidique efficace avec un degré de racémisation minimal.

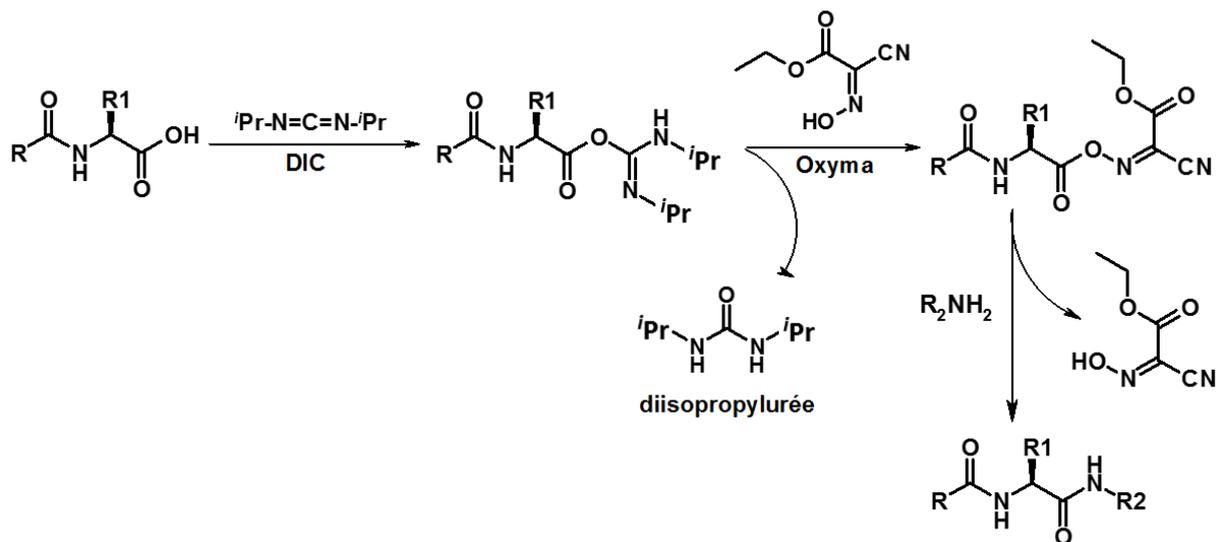


Figure II-4 : Mécanisme de formation d'une liaison peptidique dans les conditions de couplage DIC/Oxyma

En ce qui concerne le solvant, nous avons choisi de remplacer le diméthylformamide (DMF) le plus fréquemment utilisé en synthèse peptidique, par du dichlorométhane, légèrement moins toxique.

II. 3. Synthèse des lipopeptides C-ter

- Lipopeptides $C_mGlyGlyHisOH$ (C_{8h} et C_{12h})

La première étape consiste en une acylation de Schotten-Baumann en milieu aqueux

alcalin permettant ainsi de greffer la partie hydrophobe du futur amphiphile sur la fonction amine N-terminale, déprotonée en milieu basique (Figure II-5).

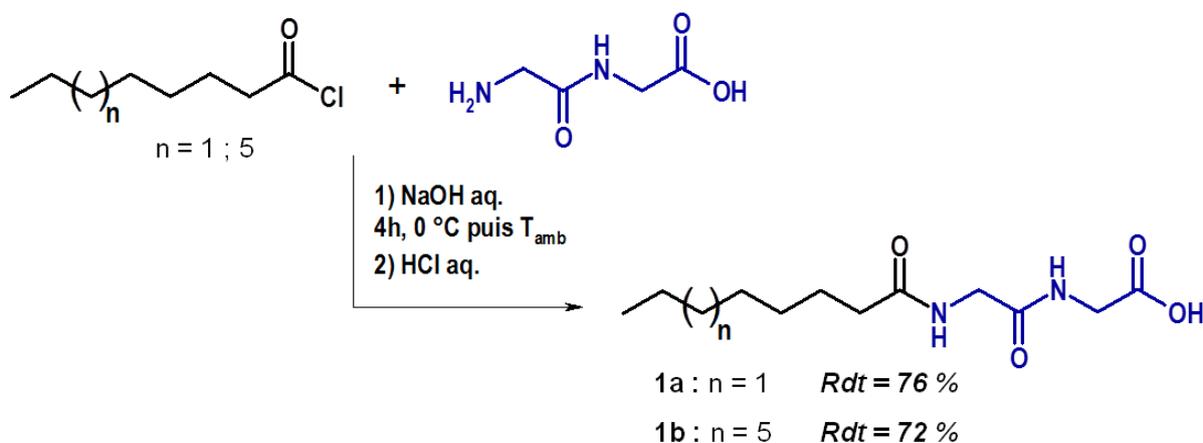


Figure II-5 : Acylation de Schotten-Baumann entre les chlorure d'alkanoyle et la diglycine

Afin de pallier son hydrolyse en milieu alcalin et d'obtenir de bons rendements, le chlorure d'acyle est introduit en excès (2 eq.) et la réaction est initiée à 0°C. Ces conditions de réaction permettent alors d'obtenir des rendements supérieurs à 70 %.

La suite du protocole consiste à introduire l'histidine à l'extrémité de la tête polaire (Figure II-6). La réactivité de sa fonction amine est assurée par l'ajout d'une base, la diisopropyléthylamine (DIEA). Pour éviter toute réaction secondaire, l'histidine est introduite sous une forme doublement protégée : elle est méthylée sur sa fonction carboxyle, pour éviter une polymérisation des motifs histidine. Elle porte également un trityle en position N^τ de l'imidazole, site nucléophile susceptible de réagir en milieu basique de manière compétitive sur l'ester activé de l'acylglycylglycine.

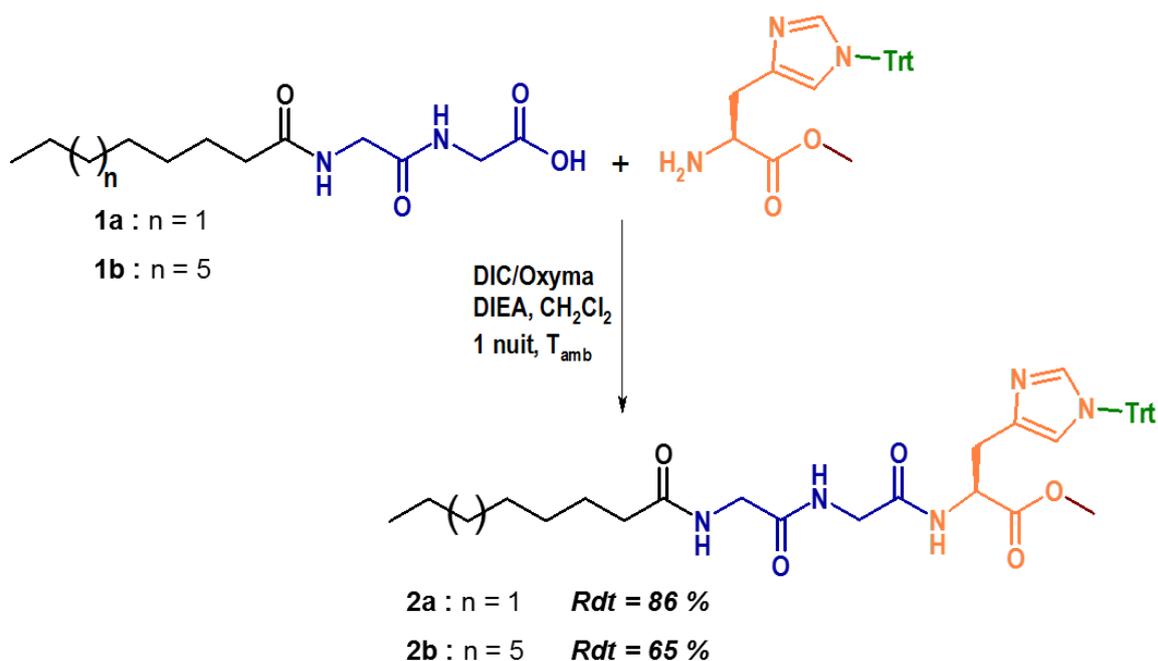


Figure II-6 : Couplage peptidique de l'histidine protégée sur les acylglycylglycines

Deux étapes successives de déprotection sont enfin nécessaires pour obtenir les lipopeptides désirés. La première consiste en la déprotection du trityle par l'acide trifluoroacétique (TFA) en présence de deux piègeurs : le triisopropylsilane (TIS) et l'eau (Figure II-7). Ces conditions de réaction permettent l'inhibition rapide de la réactivité du carbocation triphénylméthyle formé lors de la déprotection.

La seconde déprotection est une saponification qui permet d'hydrolyser la fonction ester de l'histidine pour obtenir la terminaison carboxyle. L'hydroxyde de lithium utilisé dans du tétrahydrofurane (THF) permet une hydrolyse efficace avec une racémisation minimale (Figure II-7).¹⁷

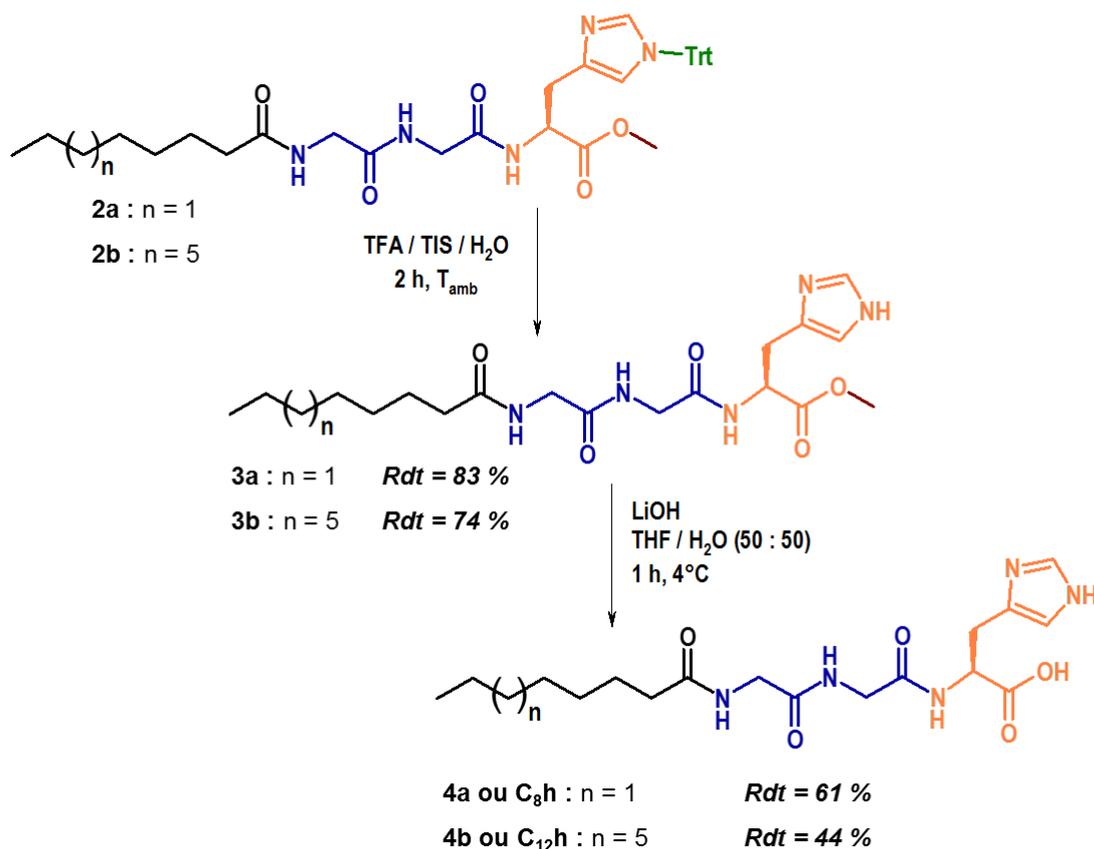


Figure II-7 : Déprotections successives du trityl (Trt) et du méthyle (Me) de l'histidine

- **Lipopeptides C_mGlyGlyGlyOH (C_{8g}, C_{10g}, C_{12g})**

La synthèse des lipopeptides à trois glycines a été obtenue en une seule étape, de nouveau par une réaction de Schotten-Baumann^{18,19} entre un chlorure d'acyle et la triglycine commerciale et utilisés par la suite comme contrôles vis-à-vis des molécules possédant une histidine (Figure II-8).

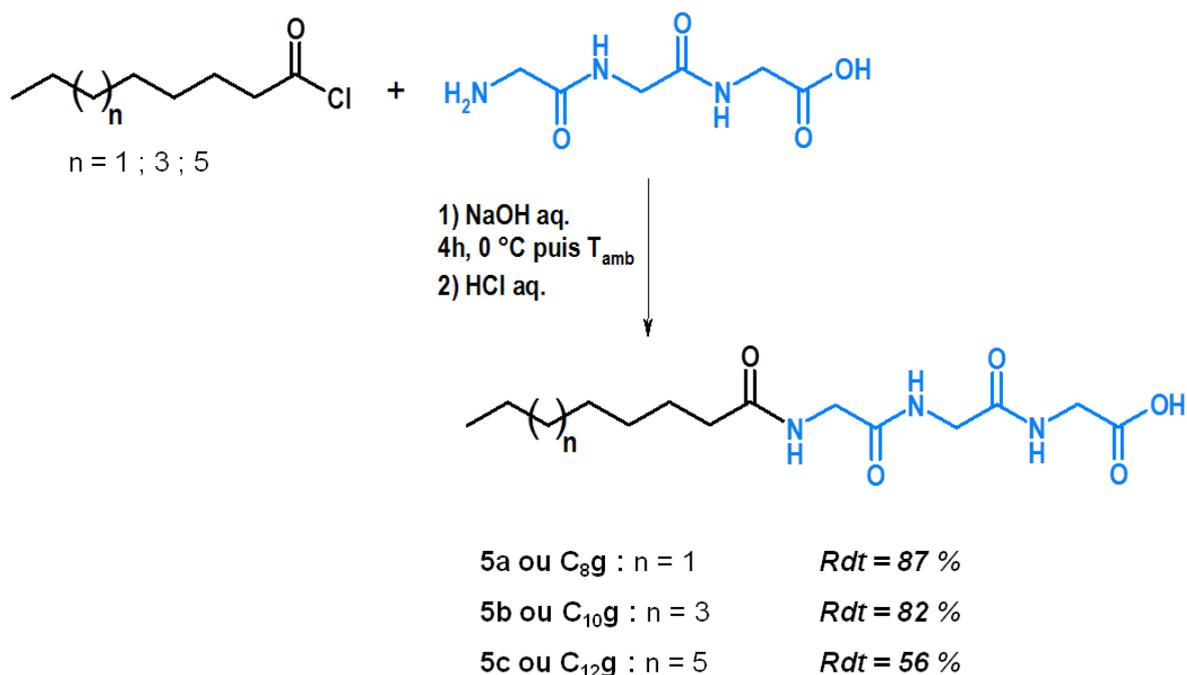


Figure II-8 : Acylation de Schotten-Baumann pour la synthèse des lipopeptides à motif triglycine

Ces derniers composés viennent compléter la série des lipopeptides C-ter. Les différents lipopeptides ont été obtenus avec des rendements plutôt élevés, grâce, généralement, à des purifications efficaces par recristallisation. Par ailleurs, une structure obtenue commercialement et contenant le tripeptide GlySerHis vient compléter cette série. Il s'agit du composé C₁₀GlySerHisOH (**C₁₀sh**), qui introduit dans sa séquence peptidique un second acide aminé (la sérine) intervenant dans les sites actifs des hydrolases.⁸

II. 4. Synthèse des lipopeptides N-ter

- Lipopeptides H-HisGlyGly-C_m (**N₈h**, **N₁₂h**)

La synthèse des lipopeptides N-ter consiste en deux étapes de couplage peptidique, suivies à chaque fois d'une déprotection des groupes fonctionnels tert-butoxycarbonyles (Boc) utilisés pour inhiber la réactivité de certaines amines.

Au cours du premier couplage en présence de DIC et d'Oxyma, une alkylamine à longue chaîne réagit sur la diglycine protégée en position N-terminale (Boc-Gly-Gly-OH), pour conduire aux dérivés 6a et 6b, obtenus avec de très bons rendements.

La déprotection des groupements Boc est ensuite rapidement obtenue en additionnant du TFA dans le dichlorométhane pour obtenir les deux alkylglycylglycines correspondantes (Figure II-9).

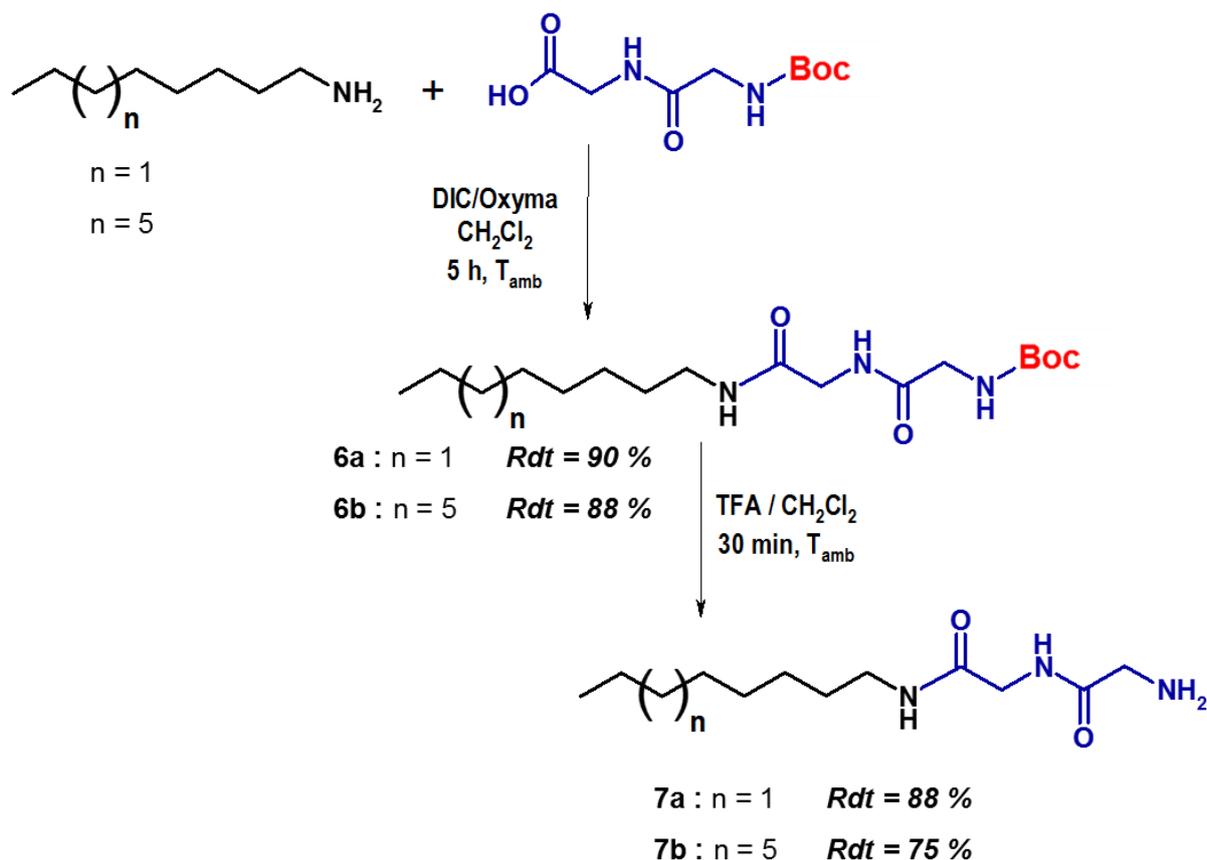


Figure II-9 : Couplage peptidique de Boc-Gly-Gly-OH et déprotection des groupements Boc portés par les alkylglycylglycines

L'histidine est alors introduite sur ces composés comme dernier acide aminé de la tête polaire du lipopeptide. Le composé utilisé contient deux groupes Boc positionnés sur la fonction amine et l'azote en position N^r de l'imidazole pour inhiber la réactivité de ces sites nucléophiles. D'autre part, la partie C-terminale a également été modifiée : le N-hydroxysuccinimide a été utilisé comme activateur de la fonction carboxylique. L'ester étant déjà activé, l'ajout d'agents de couplage n'est plus nécessaire ; seule la DIEA est introduite dans le milieu pour s'assurer que les composés **7a** et **7b** soient sous forme amine et non ammonium, garantissant ainsi leur activité nucléophile. Une seconde déprotection en présence d'acide trifluoroacétique permet d'obtenir les lipopeptides N-ter finaux **N_{8h}** et **N_{12h}** (Figure II-10).

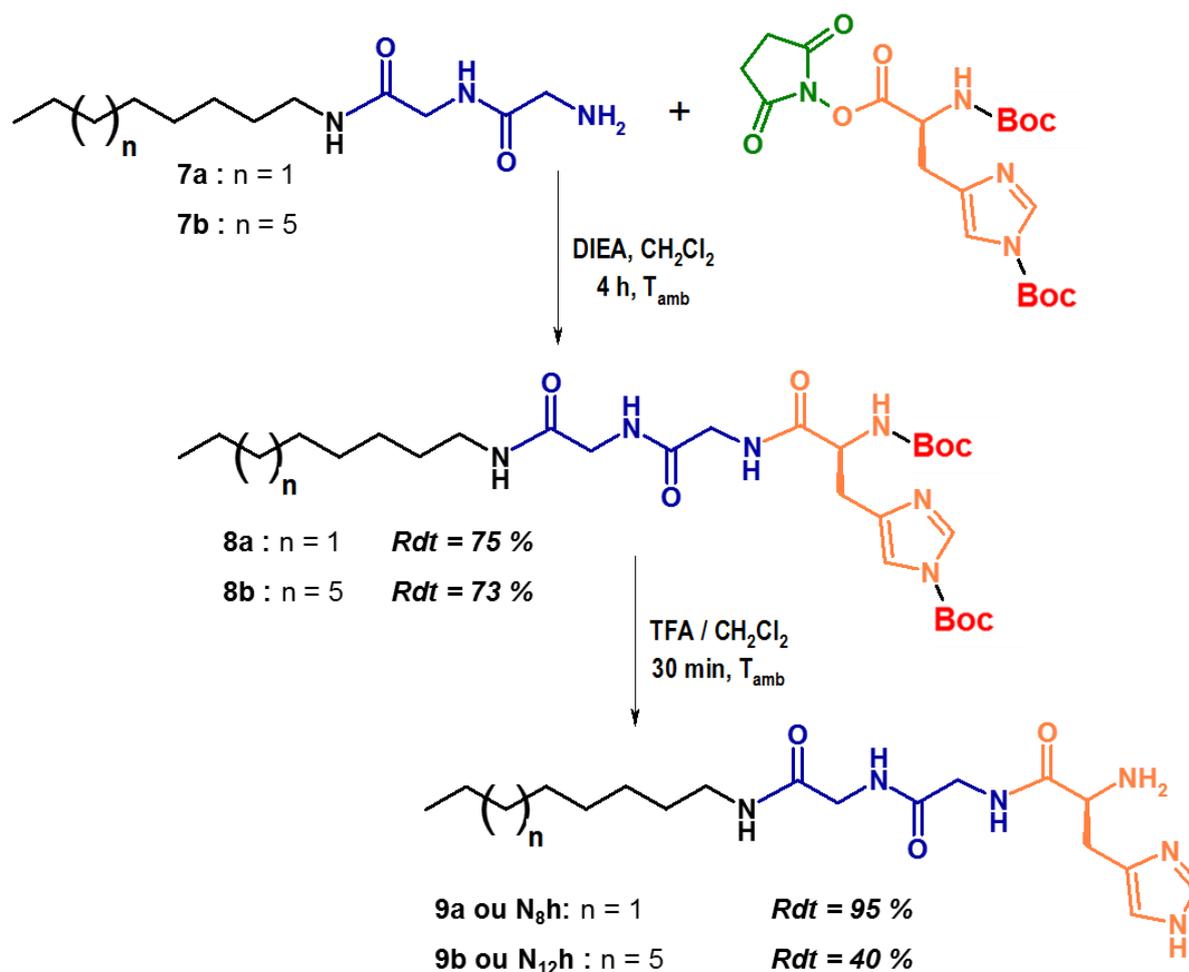


Figure II-10 : Couplage de l'histidine activée sur les alkylglycylglycines et déprotection des groupements Boc

Une purification par chromatographie liquide préparative est finalement réalisée pour obtenir les composés N_8h (sous forme de sel de TFA) et $N_{12}h$.

- **Lipopeptides H-GlyGlyGly- C_m (N_8g , N_{10g} , N_{12g})**

De la même manière, les lipopeptides N-ter témoins sont élaborés par couplage des alkylamines sur la triglycine protégée. Trois longueurs de chaîne différentes ont été utilisées pour obtenir des parties hydrophobes à 8, 10 ou 12 carbones. Dans un second temps, le même protocole de déprotection des groupements tert-butoxycarbonyles est appliqué pour obtenir les lipopeptides « témoins » N_8g , N_{10g} et N_{12g} (Figure II-11 Erreur ! Source du renvoi introuvable.).

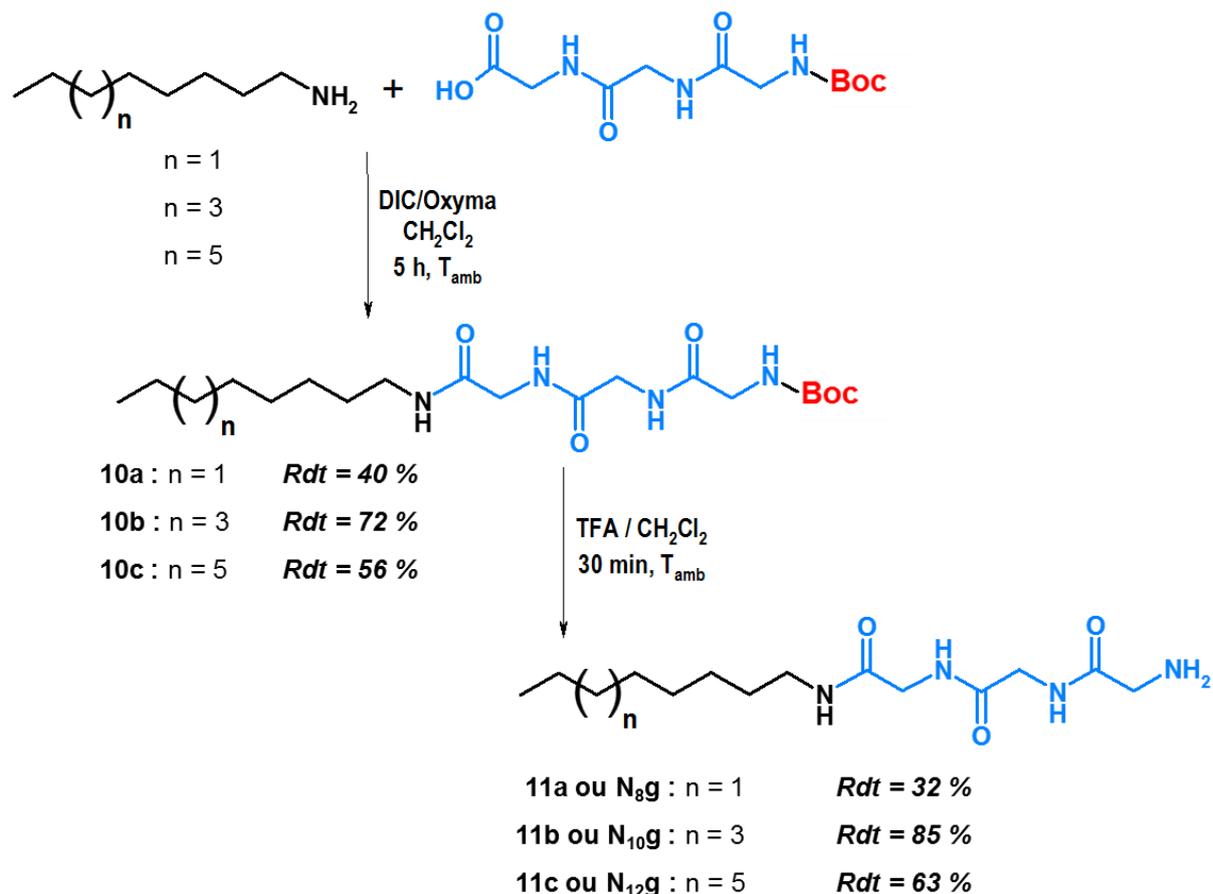


Figure II-11 : Couplage peptidique de la triglycine protégée sur les acylamines à longue chaîne et déprotection des groupements Boc

Cette nouvelle série de lipopeptides vient compléter les structures C-terminales présentées en II.3. Ainsi, pour des structures similaires, des lipopeptides anioniques seront étudiés avec les composés C-ter se terminant par une fonction carboxylate, et ce en parallèle des lipopeptides cationiques N-ter dont la structure se termine par une fonction ammonium. Cette différence de charges pourrait être à l'origine de propriétés d'auto-organisation et de réactivité différentes.

II. 5. Synthèse de lipopeptides catanioniques

Pour compléter cette série de lipopeptides et bénéficier de processus d'agrégation potentiellement différents, il a également été envisagé de concevoir des lipopeptides catanioniques. Les composés catanioniques sont des molécules analogues aux tensioactifs bicaténaires pour lesquels les propriétés tensioactives et les capacités d'auto-organisation sont généralement plus favorables par rapport à une structure dite classique (une chaîne carbonée et

une tête polaire).²⁰ Ils permettent de disposer d'une structure à deux chaînes grasses non pas en incorporant un espacement rigide entre les deux têtes polaires mais en associant deux tensioactifs par liaisons faibles.

Nous avons entrepris la synthèse de deux lipopeptides catanioniques en C10, structures intermédiaires entre des lipopeptides en C8 très solubles et peu solubles en C12 en milieu aqueux (Figure II-12). Le lipopeptide cationique H-HisGlyGly-C₁₀ (**N_{10h}**) a donc été mis en présence des lipopeptides anioniques C₁₀GlyGlyHisOH (**C_{10h}**) ou C₁₀GlySerHisOH (**C_{10sh}**) dans l'eau. Les lipopeptides peuvent alors s'associer par simple échange de proton.⁹ Après 4h de réaction acido-basique dans l'eau, les produits **C_{10h}N_{10h}** et **C_{10sh}N_{10h}** sont facilement récupérés par lyophilisation.

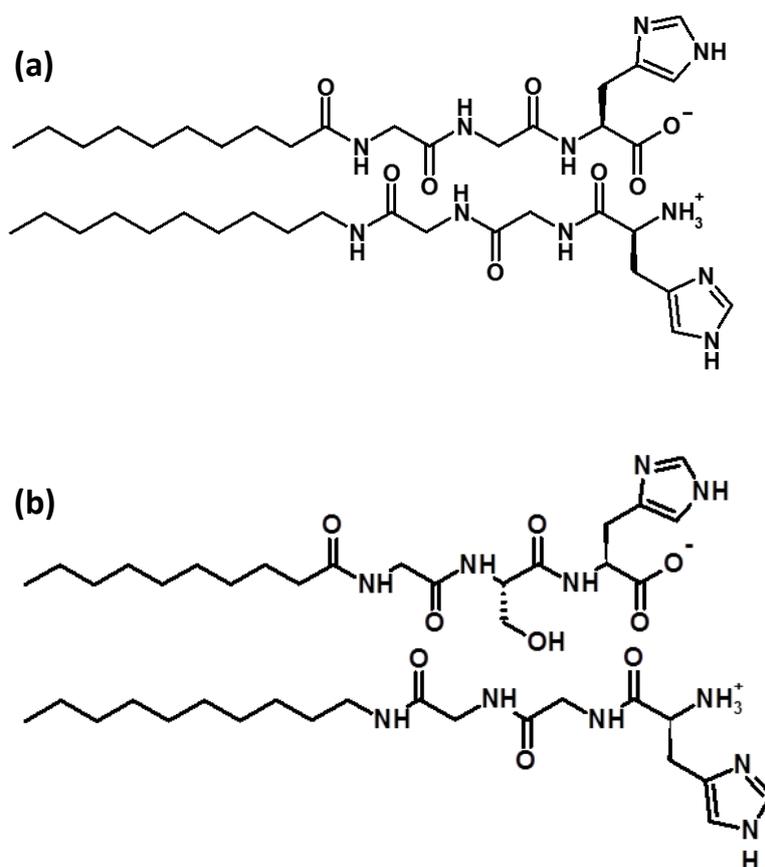


Figure II-12 : Structure des lipopeptides obtenus par échange de proton. (a) C₁₀GlyGlyHisOH/H-HisGlyGlyC₁₀ (**C_{10h}N_{10h}**) et (a) C₁₀GlySerHisOH/H-HisGlyGlyC₁₀ (**C_{10sh}N_{10h}**)

Les synthèses présentées précédemment fournissent donc un éventail assez large de lipopeptides dont on a fait varier soit la tête polaire, soit la queue hydrophobe. Ces structures ont alors été caractérisées par les techniques spectrales usuelles (RMN, infra-rouge, spectrométrie de masse, HPLC analytique) afin de confirmer à la fois l'identité et la pureté des lipopeptides conçus.

Très peu de structures semblables à ces systèmes ont été décrites dans la littérature. Parmi elles, plusieurs brevets illustrent la capacité de lipopeptides similaires à former des hydrogels ou décrivent leur incorporation dans des formulations de soins capillaires.²¹⁻²³ Ces quelques exemples mettent en évidence le potentiel d'auto-organisation de telles structures ainsi que leur biocompatibilité.

Par la suite, l'étude des propriétés physico-chimiques des lipopeptides synthétisés est donc présentée afin d'évaluer leur potentiel d'auto-organisation.

III. Etude des propriétés d'auto-organisation des lipopeptides

Les lipopeptides, de par leur structure, appartiennent à la famille des amphiphiles. Ce caractère amphiphile, apporté par la présence d'une chaîne grasse dite hydrophobe et d'une tête polaire de nature hydrophile que représente la triade peptidique, leur confère des propriétés particulières. Ces composés sont ainsi susceptibles de s'auto-organiser à l'état solide ou en solution, sous forme d'agrégats plus ou moins organisés. Cette association est favorisée par des interactions faibles de différentes natures qui interviennent entre les molécules de tensioactif. Parmi elles, les interactions hydrophobes entre chaînes grasses, les interactions électrostatiques et autres liaisons hydrogène participent grandement à la formation de systèmes organisés. A celles-ci peuvent s'ajouter des interactions spécifiques entre chaîne latérale des différents acides aminés.^{24,25} De nombreux outils sont à disposition pour étudier le caractère amphiphile et l'organisation de tels systèmes.

IV. 1. Caractérisation des lipopeptides à l'état solide

Dans un premier temps, l'étude de l'auto-organisation des lipopeptides a été réalisée à l'état solide. En effet, la spectroscopie infra-rouge peut donner accès à des informations sur la structure secondaire des peptides. Ainsi, en analysant la position des bandes amides I-II entre 1700 et 1200 cm^{-1} , il est possible de déterminer par exemple si les lipopeptides ont tendance à former des hélices α ou des feuillets β .^{26,27} Le Tableau II-1 présente les bandes amides I et II des différents lipopeptides.

Tableau II-1 : Attribution des bandes amide pour les différents lipopeptides

Lipopeptide	Amide I (cm ⁻¹)	Amide II (cm ⁻¹)
C₈h (C ₈ -GGH-OH)	1647	1550
C₁₀h (C ₁₀ -GGH-OH)	1647	1545
C₁₂h (C ₁₂ -GGH-OH)	1645	1544
C₈g (C ₈ -GGG-OH)	1651 et 1637	1553
C₁₀g (C ₁₀ -GGG-OH)	1651	1554
C₁₂g (C ₁₂ -GGG-OH)	1652	1553
C₈hme (C ₈ -GGH-OMe)	1650	1551
C₁₀sh (C ₁₀ -GSH-OH)	1641	1542
N₈h (H-HGG-C ₈)	1662	1543
N₁₀h (H-HGG-C ₁₀)	1665	1549
N₁₂h (H-HGG-C ₁₂)	1647	1543
N₈g (H-GGG-C ₈)	1651	1553
N₁₀g (H-GGG-C ₁₀)	1652	1554
N₁₂g (H-GGG-C ₁₂)	1651	1554
C₁₀hN₁₀h	1665	1549
C₁₀shN₁₀h	1649	1544

Pour la plupart des lipopeptides, la bande amide I se situe entre 1645 et 1652 cm⁻¹ tandis que la bande amide II a pu être observée entre 1544 et 1554 cm⁻¹. D'après la littérature, ces valeurs suggèrent que les séquences peptidiques analysées s'auto-organisent de manière plutôt aléatoire et peuvent éventuellement adopter une conformation de pelote aléatoire.^{26,27} Il s'agirait d'une répartition statistique des monomères au sein de l'assemblage supramoléculaire au lieu d'une organisation plus ordonnée. Par rapport aux séquences peptidiques relativement courtes envisagées pour nos systèmes, il semble cohérent que ces lipopeptides ne forment pas de structures plus complexes.

Néanmoins, les deux bandes amide I observées pour **C₈g** laissent suggérer une conformation en feuillets β tandis que la bande I des lipopeptides **N₈h**, **N₁₀h** et le catanionique **C₁₀hN₁₀h** se situent au-delà de 1660 cm⁻¹, ce qui pourrait supposer la présence de tours de type β (Figure II-13).

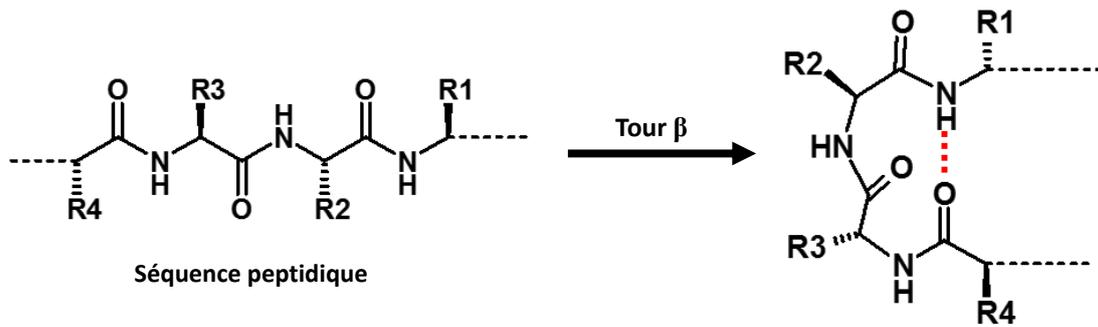


Figure II-13 : Illustration d'un tour de type β , généré par la présence d'une liaison hydrogène (pointillés rouges) entre l'amine d'un acide aminé et la fonction carboxyle d'un autre acide aminé adjacent.

Suite à cette caractérisation des lipopeptides à l'état solide, l'étude du comportement de ces amphiphiles en solution a été entreprise afin d'étudier leurs propriétés d'auto-organisation. Ces informations seront ensuite déterminantes pour discuter des essais catalytiques.

IV. 2. Détermination des concentrations d'agrégation critiques

La solubilisation des lipopeptides en tampon HEPES (50 mM, pH = 7) conduit généralement à l'obtention de solutions aqueuses opalescentes, allant de milieux légèrement troubles à des solutions plus opaques. Cette observation est déjà une première indication sur l'auto-organisation des lipopeptides : il semblerait que ces derniers aient tendance à former des objets relativement gros (sans doute > 100 nm) puisqu'habituellement, les milieux micellaires restent plutôt limpides. En solution aqueuse, la tensiométrie et la fluorimétrie sont deux techniques fréquemment utilisées pour mettre en évidence l'auto-organisation des lipopeptides.²⁸ Elles permettent de déterminer la concentration d'agrégation critique (CAC) de ces composés, définie comme la concentration à partir de laquelle les phénomènes d'agrégation prennent place.

D'une part, la tensiométrie mesure la tension de surface de solutions de lipopeptides préparées à différentes concentrations. Les lipopeptides étant des composés amphiphiles, ils viennent se localiser à l'interface air-eau des solutions de lipopeptides et chaque addition de lipopeptide est responsable de l'abaissement de la tension de surface. Lorsque la surface est saturée en lipopeptides, sa tension superficielle ne varie plus et la concentration qui marque ce début de plateau correspond à la CAC du composé (Figure II-14).

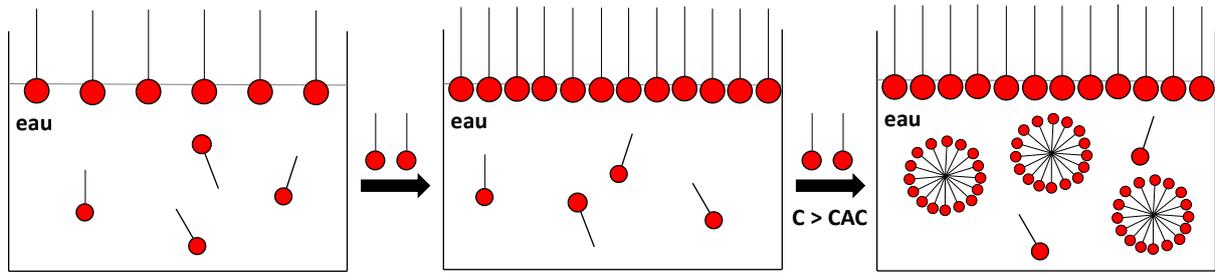


Figure II-14 : Illustration du phénomène de saturation à la surface du liquide et formation des agrégats

A titre d'exemple, la Figure II-15 présente les courbes obtenues en tensiométrie pour les lipopeptides C-ter.

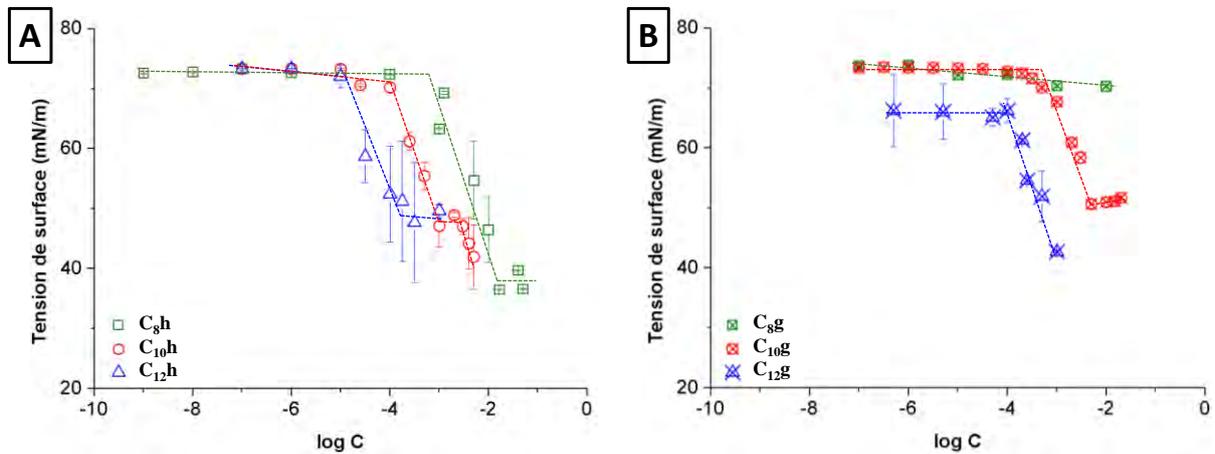


Figure II-15 : Variation de la tension de surface en fonction de la concentration en lipopeptides C_{8h} à C_{12h} (A) et C_{8g} à C_{12g} (B)

D'autre part, les CACs ont également été déterminées par fluorimétrie du pyrène. En effet, les propriétés de fluorescence du pyrène varient selon son environnement. Ainsi, son spectre d'émission de fluorescence est différent si le pyrène est dispersé en milieu aqueux ou dans un environnement organique (Figure II-16). Cette différence est mise en évidence en mesurant notamment le rapport des pics I_1/I_3 (I_1 mesurée à 371 nm et I_3 à 382 nm).²⁹ Ainsi, pour des solutions de lipopeptides dispersés à l'état monomère, l'environnement aqueux du pyrène conduit à une valeur moyenne du rapport I_1/I_3 égale à 2. Lorsque le lipopeptide atteint sa CAC, le pyrène a tendance à se localiser dans les zones hydrophobes créées par les agrégats formés. Ce changement d'environnement entraîne une variation du rapport de fluorescence qui chute vers des valeurs I_1/I_3 comprises entre 1,2 et 1,4. La CAC est alors déterminée en traçant l'évolution des rapports I_1/I_3 en fonction de la concentration en lipopeptides, comme le point d'inflexion de la modélisation de type Boltzmann (cf annexe).²⁹

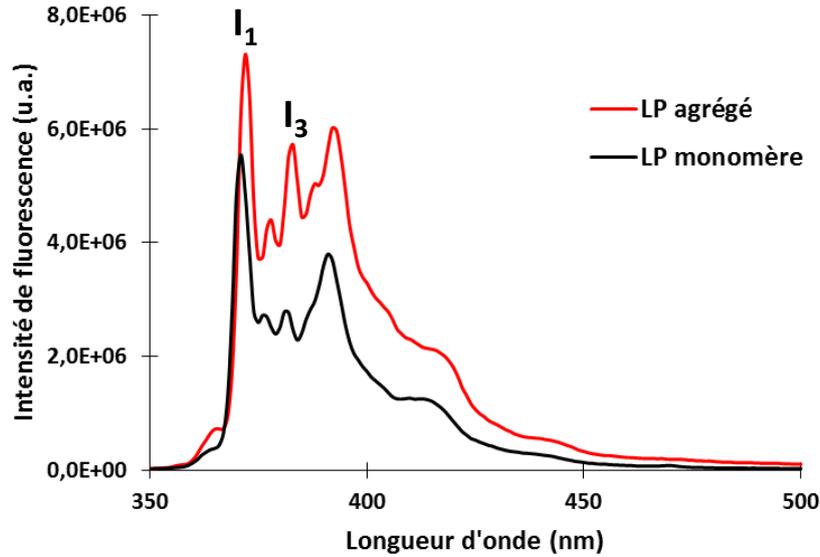


Figure II-16 : Spectres d'émission de fluorescence du pyrène en présence de lipopeptides (LP) à l'état monomère (en noir) ou à l'état agrégé (en rouge). $\lambda_{excitation} = 337 \text{ nm}$

La Figure II-17 illustre les courbes obtenues par fluorimétrie du pyrène dans le cas des lipopeptides N-ter et catanioniques. Les deux techniques ont été réalisées en parallèle pour la plupart des lipopeptides, donnant des valeurs de CAC du même ordre de grandeur et montrant ainsi la bonne concordance entre les deux méthodes. Une valeur moyenne de CAC a donc été calculée à partir des deux techniques de détermination.

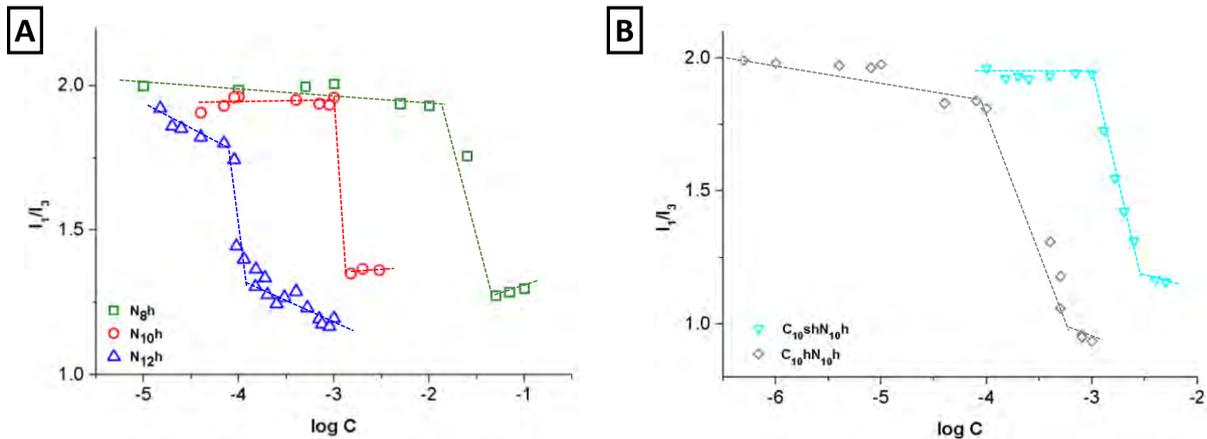


Figure II-17 : Variation du rapport I_1/I_3 (relatif au spectre d'émission du pyrène) en fonction de la concentration en lipopeptides N_8h à $N_{12}h$ (A) ou de $C_{10}hN_{10}h$ et $C_{10}shN_{10}h$ (B)

- Détermination de la CAC des lipopeptides C-ter

Le Tableau II-2 rassemble les résultats obtenus par tensiométrie et fluorimétrie pour les structures C-terminales.

Tableau II-2 : Concentrations d'agrégation critiques (CACs) des lipopeptides C-ter déterminées par tensiométrie et fluorimétrie

Lipopeptide	CAC (mM) par tensiométrie	CAC (mM) Par fluorimétrie	CAC moyenne (mM)	γ_{CAC} (mN/m)
C₈h (C ₈ -GGH-OH)	10,0 ± 1,2	16,3 ± 1,5	13 ± 4	38 ± 2
C₁₀h (C ₁₀ -GGH-OH)	1,3 ± 0,3	0,75 ± 0,05	1,0 ± 0,5	45 ± 2
C₁₂h (C ₁₂ -GGH-OH)	0,25 ± 0,05	0,33 ± 0,08	0,3 ± 0,1	49 ± 2
C₈g (C ₈ -GGG-OH)	Pas de CAC ^(a)	Pas de CAC ^(a)	Pas de CAC	-
C₁₀g (C ₁₀ -GGG-OH)	5,0 ± 0,6	5,4 ± 0,4	5 ± 1	51 ± 2
C₁₂g (C ₁₂ -GGG-OH)	1,0 ± 0,3	0,85 ± 0,05	0,9 ± 0,3	43 ± 2
C₈hme (C ₈ -GGH-OMe)	Pas de CAC ^(a)	Pas de CAC ^(a)	Pas de CAC	-
C₁₀sh (C ₁₀ -GSH-OH)	0,10 ± 0,03 et 2,0 ± 0,7 ^(b)	4,0 ± 0,2	3 ± 1	39 ± 2

(a) Aucune CAC n'a été détectée en augmentant les concentrations des solutions jusqu'à atteindre la limite de solubilité

(b) Deux « CACs » ont été observées ; à la première, la tension de surface ne décroît que jusqu'à 53 mN.m⁻¹, ce qui semble signifier que la transition correspondrait à une pré-organisation (oligomérisation) plutôt qu'à une réelle formation d'agrégats

Les premières observations soulignent que ces lipopeptides ne sont pas des agents de surface dits très « actifs », c'est-à-dire que leur tension de surface ne varie que de 72 à environ 40 mN.m⁻¹ (Figure II-15), contrairement à d'autres bons tensioactifs pouvant abaisser la tension de surface jusqu'à 20 mN/m.³⁰

Par ailleurs, comme dans le cas de tensioactifs classiques, l'augmentation de la partie hydrophobe conduit à une diminution de la CAC des lipopeptides, le phénomène d'agrégation étant favorisé par des interactions de nature hydrophobe.³⁰ Par ailleurs, la substitution de l'histidine par la glycine est responsable d'une valeur de CAC quatre fois plus importante, ce qui souligne le rôle favorable de l'histidine dans l'auto-organisation des structures C-terminales. Cela pourrait s'expliquer soit par des interactions stabilisantes de type π -stacking entre les cycles imidazoles, soit par une compensation de charges qui diminuerait la répulsion électrostatique entre les têtes polaires, en supposant qu'on a un carboxylate chargé négativement à l'extrémité des lipopeptides, en partie compensé par certains imidazoles chargés positivement à pH 7.

En ce qui concerne le composé méthylé **C₈hme**, la présence de la fonction ester (non chargée) réduit de manière considérable la solubilité du composé et celui-ci précipite avant qu'une valeur de CAC ne soit mesurée. Enfin, en remplaçant la glycine centrale de la triade par une sérine, une augmentation de la CAC d'un facteur 3 par rapport à son équivalent **C₁₀h** est

observée. Une gêne stérique apportée par la chaîne latérale de la sérine pourrait être responsable de cette organisation à plus hautes concentrations. **C_{10sh}** semble tout de même former des pré-agrégats à très faible concentration. En effet, une première « CAC » a pu être détectée par tensiométrie à 0,1 mM, synonyme d'une oligomérisation potentielle favorisée par la fonction alcool *via* des liaisons hydrogènes entre lipopeptides. Cette pré-organisation n'a en revanche pas été observée en fluorimétrie. Ceci renforce l'hypothèse d'un état intermédiaire, potentiellement constitué d'oligomères hydratés, intervenant au préalable d'une auto-organisation plus nette et plus facilement discernable. Des hydrogels ont par ailleurs facilement été obtenus avec **C_{10sh}**, confortant l'idée d'un réseau composé de liaisons hydrogènes à plus hautes concentrations.³¹

- Détermination de la CAC des lipopeptides N-ter et catanioniques

Les résultats de tensiométrie et de fluorimétrie des structures N-ter et catanioniques sont regroupés dans le Tableau II-3.

Tableau II-3 : Concentrations d'agrégation critiques (CACs) des lipopeptides N-ter et catanioniques déterminées par tensiométrie et fluorimétrie

Lipopeptide	CAC (mM) par tensiométrie	CAC (mM) par fluorimétrie	CAC moyenne (mM)	γ_{CAC} (mN/m)
N_{8h} (H-HGG-C ₈)	non mesurée	16 ± 5	16 ± 5	-
N_{10h} (H-HGG-C ₁₀)	0,7 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,1 ± 0,4	37 ± 2
N_{12h} (H-HGG-C ₁₂)	non mesurée	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02	-
N_{8g} (H-GGG-C ₈)	1,8 ± 0,6 ^(b)	4,7 ± 0,5	3,2 ± 2,0	55 ± 2
N_{10g} (H-GGG-C ₁₀)	0,4 ± 0,1 ^(b)	Pas de CAC ^(a)	Pas de CAC	52 ± 2
N_{12g} (H-GGG-C ₁₂)	1 ± 0,3 ^(b)	Pas de CAC ^(a)	Pas de CAC	52 ± 2
C_{10hN_{10h}}	0,50 ± 0,05	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	42 ± 2
C_{10shN_{10h}}	non mesurée	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1	-

(a) Aucune CAC n'a été détectée en augmentant les concentrations des solutions jusqu'à atteindre la limite de solubilité

(b) Comme pour **C_{10sh}**, la tension de surface ne s'abaisse qu'autour des 55 mN.m⁻¹, valeur probablement liée à un phénomène de pré-organisation

En étudiant à nouveau l'effet de la longueur de la chaîne grasse, il apparaît qu'une augmentation de la partie hydrophobe de **N_{8h}** à **N_{12h}** conduit à une nette diminution des valeurs de CAC. Chaque ajout de deux groupes méthylène entraîne en effet une baisse d'un facteur 10 de la CAC.

Il est par ailleurs observé que les lipopeptides **N8h**, **N10h** et **N12h** sont de meilleurs agents de surface que leurs analogues de la série C-terminale, avec des tensions de surfaces abaissées à environ 30 mN.m⁻¹ (Tableau II-3). En revanche, les lipopeptides **N8g** à **N12g** se sont révélés de très faibles agents de surface, avec une tension de surface s'abaissant seulement autour des 52-55 mN.m⁻¹. Aucune formation d'agrégats n'a par ailleurs pu être mise en évidence. Comme pour la série C-terminale, cela indique que la séquence triglycine intervient de manière beaucoup moins favorable sur l'agrégation que la triade contenant l'histidine.

Enfin, le lipopeptide catanionique **C10hN10h** s'organise en solution à des concentrations plus faibles que celles observées pour les lipopeptides « parents », respectivement **C10h** et **N10h**. C'est un comportement relativement cohérent puisque l'agrégation est favorisée à la fois par les phénomènes de compensation de charge et d'interactions hydrophobes entre les chaînes carbonées. De même, le catanionique **C10shN10h** a une CAC plus faible que son lipopeptide « parent » C-ter, et quasiment égale à celle du **N10h** qui le constitue. Il s'organise en revanche à une concentration un peu plus haute que **C10hN10h**, ce qui pourrait s'expliquer par la gêne stérique apportée par la chaîne latérale de la sérine ou encore par sa tendance à la formation d'oligomères hydratés, deux phénomènes qui retarderaient alors l'auto-organisation du lipopeptide.

D'après ces observations, il semble que la charge et la présence de l'histidine ont une influence sur les propriétés d'auto-organisation des lipopeptides. Nous avons donc décidé de mesurer leur pKa.

- Détermination des pKa des lipopeptides

La détermination des pKa de certains lipopeptides a été réalisée par titrages acido-basiques et en utilisant la méthode de la dérivée seconde pour l'exploitation des données,^{32,33} afin de mettre en évidence le rôle des interactions électrostatiques sur l'auto-assemblage (Figure II-18).

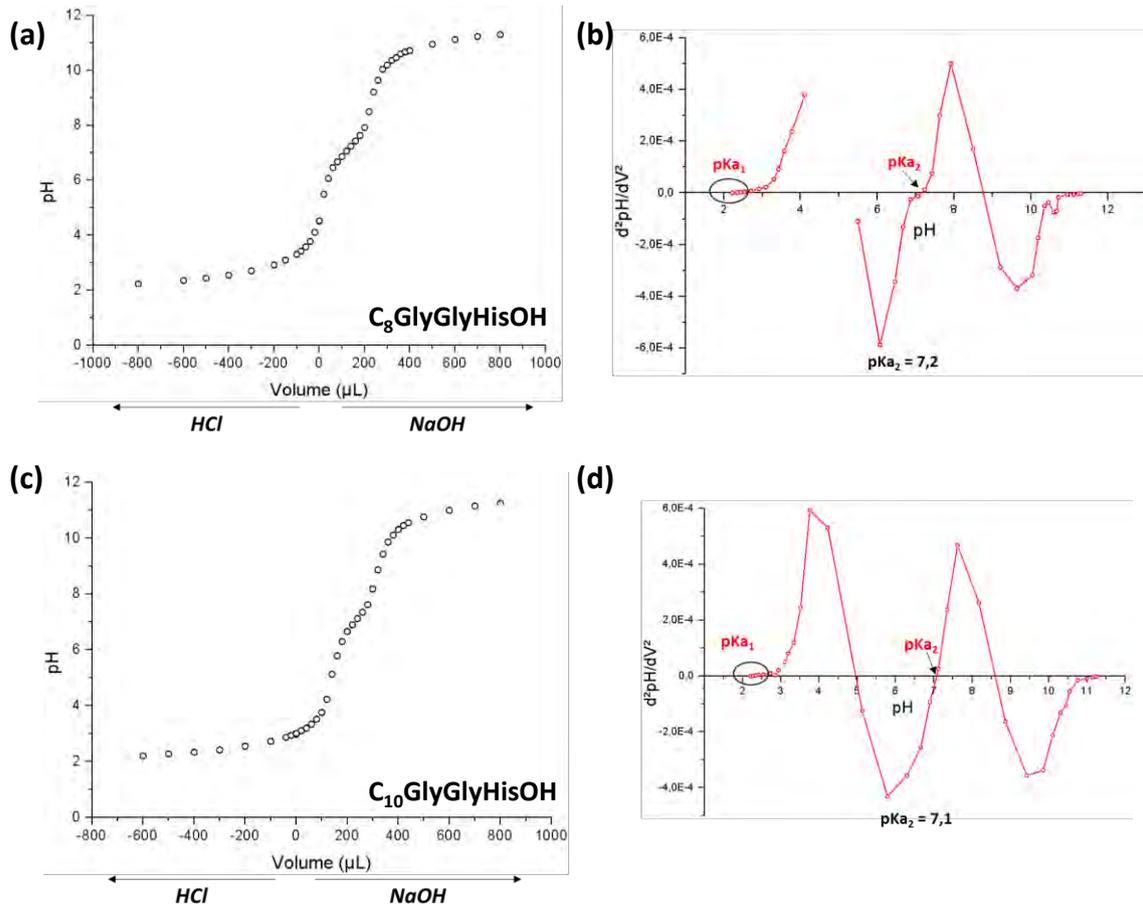


Figure II-18 : Détermination du pKa de l'imidazole sur les lipopeptides C₈h et C₁₀h. (a) et (c) : Courbes de titrage pH-métrique. (b) et (d) : Evolution de la dérivée seconde en fonction du pH

A pH = 7, les fonctions carboxylate terminales sont totalement déprotonées. Les valeurs de pKa des fonctions imidazole ont quant à elles été déterminées à $7,1 \pm 0,1$ pour **C₈h** et **C₁₀h**, ce qui indique que la moitié des imidazoles est protonée à pH = 7 (Figure II-18). Ces charges positives pourraient donc en partie compenser les répulsions entre terminaisons carboxylate et ainsi favoriser l'agrégation. De plus, les mesures de pKa étant réalisées à 2 mM (**C₈h** est à l'état monomère tandis que **C₁₀h** est agrégé), il n'apparaît pas d'influence majeure de l'agrégation sur les valeurs de pKa. Cela pourrait suggérer que l'imidazole n'est pas impliqué directement dans le processus d'agrégation.

La détermination des pKa a également été réalisée sur deux lipopeptides N-ter, **N₈h** et **N₁₀h** (Figure II-19).

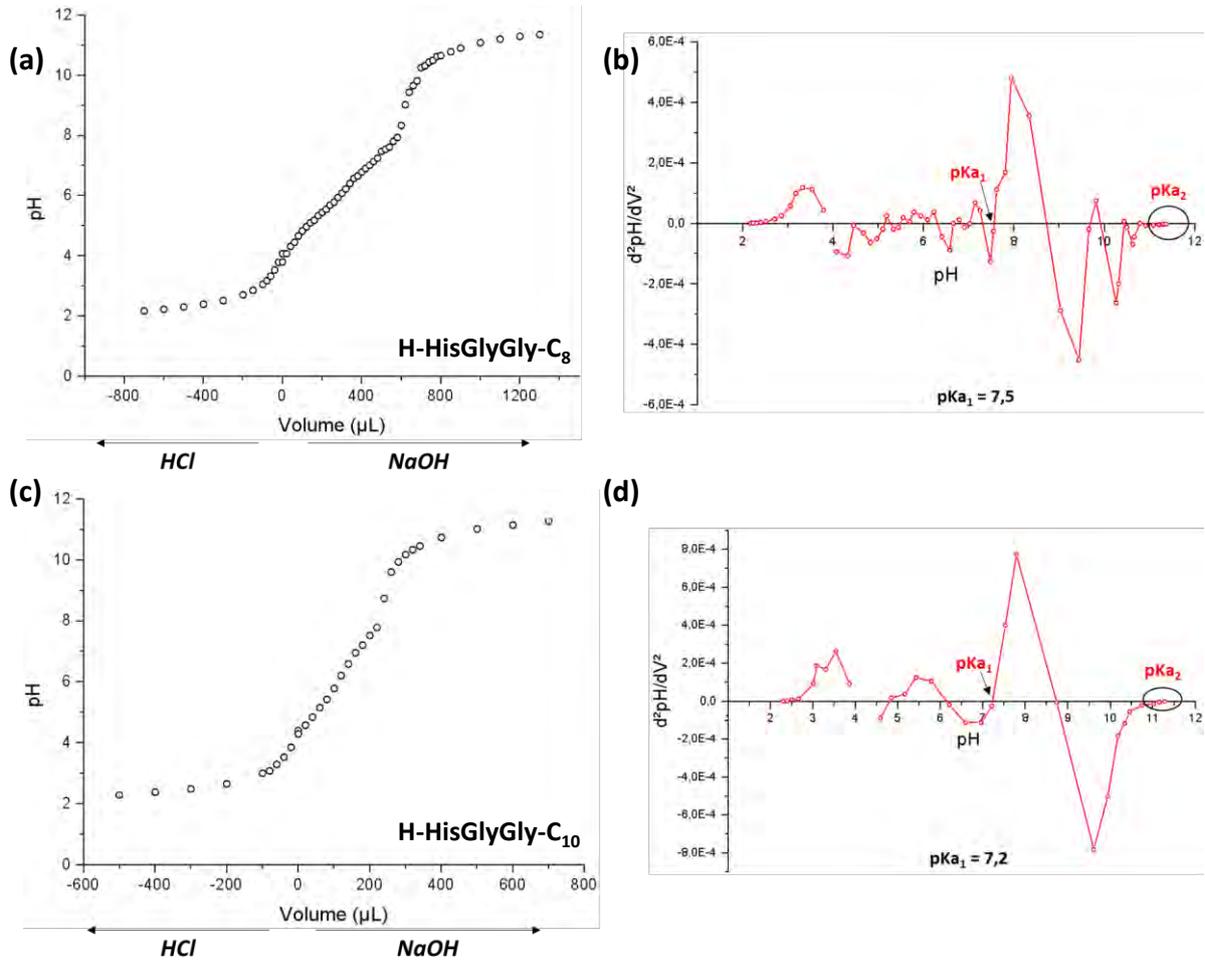


Figure II-19 : Détermination du pKa de l'imidazole sur les lipopeptides **N_{8h}** et **N_{10h}**. (a) et (c) : Courbes de titrage pH-métrique. (b) et (d) : Evolution de la dérivée seconde en fonction du pH.

Le pKa de la fonction imidazole de **N_{8h}** a été mesuré à 7,5 à l'état monomère tandis qu'en présence de **N_{10h}** agrégé, la valeur du pKa est plus faible et vaut 7,2. Cela laisse suggérer que l'environnement de l'imidazole est partiellement modifié par le phénomène d'agrégation.

IV. 3. Détermination des structures par microscopie électronique

Les mesures de tension de surface et de fluorescence du pyrène ont permis de vérifier que les lipopeptides formaient des agrégats en solution aqueuse. Il s'agit à présent de caractériser le type d'agrégats formés. Pour cela, les solutions de lipopeptides ont été préparées à des concentrations supérieures à leur CAC et analysées par microscopie électronique à transmission, en présence d'un agent de contraste (acétate d'uranyle ou phosphotungstate de sodium).

Il a été observé que **N_{8h}** formait des agrégats sphériques un peu « chevelus » de 200 à

300 nm de diamètre (Figure II-20.A). Parallèlement, les autres lipopeptides observés ont plutôt tendance à s'organiser en réseaux fibrillaires plus ou moins complexes. Par exemple, **N_{10h}** forme des structures en collier de perles avec des objets sphériques (50 à 100 nm de diamètre) répartis le long des fibres d'un diamètre moyen de 35 ± 5 nm (Figure II-20.B).

Avec **C_{10h}** et **C_{10sh}N_{10h}**, des fibres torsadées sont observées, dont les diamètres moyens valent respectivement 35 ± 5 et 25 ± 5 nm tandis que les pas d'hélice ont été estimés à 200 et 450 nm environ (Figure II-20.C et F). **C_{10sh}** et le catanionique **C_{10h}N_{10h}** produisent quant à eux des réseaux fibreux qui semblent inclure quelques objets plus ou moins sphériques (Figure II-20.D et E) et pour lesquels des diamètres d'environ 35 ± 5 et 25 ± 5 nm respectivement ont été mesurés.

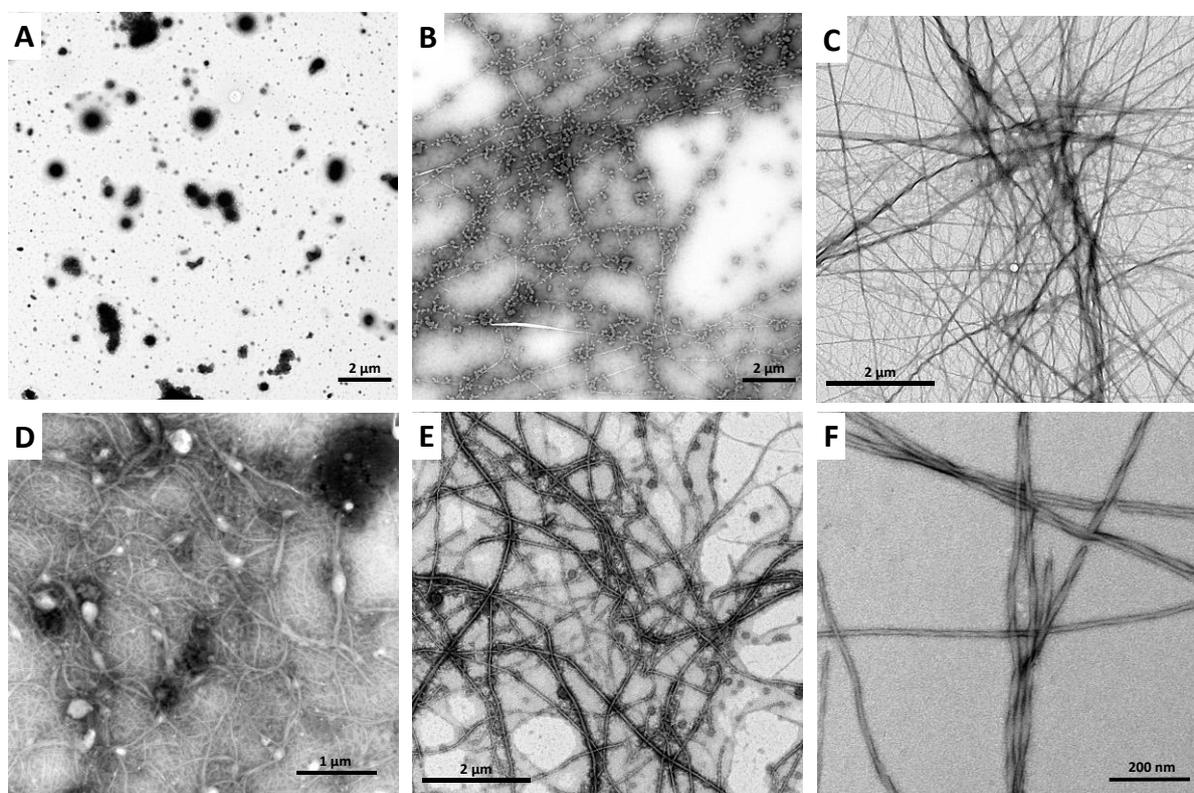


Figure II-20 : Micrographies en transmission électronique illustrant les agrégats formés par les lipopeptides **N_{8h}** (20 mM ; A), **N_{10h}** (3mM ; B), **C_{10h}** (3mM ; C), **C_{10sh}** (3mM ; D) et les catanioniques **C_{10h}N_{10h}** (1 mM ; E) et **C_{10sh}N_{10h}** (5 mM ; F).

Ces observations sont globalement en accord avec l'aspect visuel des solutions de lipopeptides, décrites comme opalescentes voire parfois laiteuse au-delà de la CAC, certaines conduisant même à la formation d'hydrogels. Par ailleurs, la diversité des objets observés indique que l'agrégation dépend fortement à la fois de la séquence peptidique et de la longueur de la chaîne. Cette propriété est intéressante puisqu'elle souligne la capacité de moduler la

nature des assemblages supramoléculaires en jouant subtilement sur la structure chimique des lipopeptides. Cela pourra s'avérer d'un intérêt tout particulier lorsque le rôle de l'interface sur les propriétés catalytiques de ces systèmes sera étudié.

IV. 4. Techniques de diffusion

Pour compléter les observations faites en microscopie électronique, deux techniques de diffusion ont été utilisées.

- Diffusion dynamique de la lumière

Tout d'abord, des mesures en diffusion dynamique de la lumière (DDL) ont été réalisées pour estimer la taille des agrégats formés par les lipopeptides au-delà de leurs CACs. Cette technique, basée sur le suivi du mouvement brownien de nanoobjets en solution, mesure les variations de l'intensité diffusée par cet échantillon grâce à une différence d'indice optique entre les particules et le solvant. Une fonction d'auto-corrélation (corrélogramme) donne alors accès, par un traitement mathématique, à la mesure du coefficient de diffusion et au rayon hydrodynamique des systèmes étudiés (distribution de taille en intensité). La principale limitation de la DDL réside dans la mesure de l'intensité diffusée, qui est proportionnelle à d^6 (avec d diamètre de l'objet analysé), provoquant ainsi la saturation du signal en présence de très gros objets.

Peu de composés ont permis d'obtenir des résultats exploitables par cette technique. Pour la plupart des composés en effet, des phénomènes de précipitation ou de formation de gel ont été rencontrés pour des concentrations choisies juste au-dessus de leur CAC. Les signaux de DDL mettaient alors en évidence la présence d'objets de l'ordre du micron. En conséquence, cette technique n'étant pas adaptée à des objets de si grande dimension, il n'a pas été possible dans plusieurs cas de préparer des échantillons suffisamment concentrés qui permettent des analyses fiables et pertinentes en DDL.

Les diamètres hydrodynamiques ont tout de même pu être déterminés par diffusion dynamique de la lumière pour trois composés. Ils ont été mesurés pour des concentrations légèrement supérieures aux CACs (les solutions devenant troubles au-delà), et ainsi déterminés pour **C₈h** entre 300 et 500 nm, entre 250 et 350 nm pour **C₁₀h** et autour de 200 nm pour **N₈h** (Figure II-21).

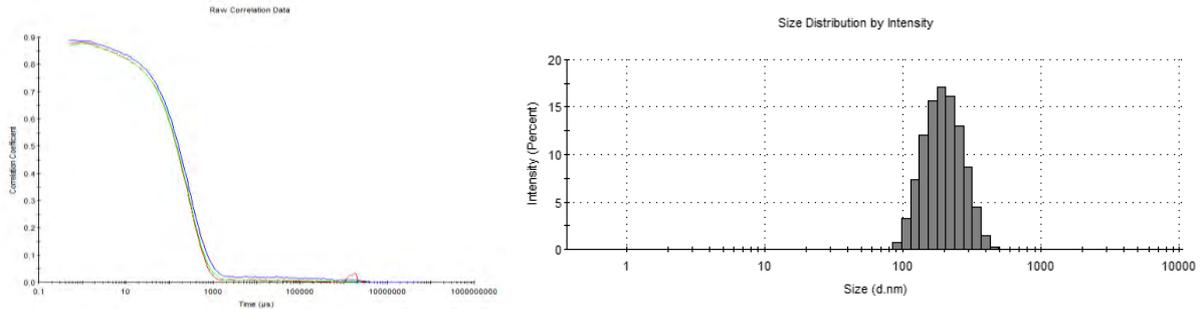


Figure II-21 : Histogramme décrivant la distribution de taille pour les agrégats formés par Nsh en fonction de l'intensité et son corrélogramme associé sur trois mesures

Ces valeurs ne peuvent pas correspondre à des micelles mais pourraient en revanche s'appliquer à de plus gros agrégats, typiquement des vésicules ou des fibres, comme observés en microscopie électronique.

- **Diffusion de neutrons aux petits angles**

En complément, des expériences en diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA) ont été menées sur les lipopeptides synthétisés pour apporter davantage de caractéristiques sur ces agrégats. Le contraste à l'origine du phénomène de diffusion est la densité de longueur de diffusion, notée b , qui traduit le potentiel d'interaction entre neutrons et noyaux atomiques. Ce potentiel dépend de la nature et du type d'isotopes. Ainsi, entre l'hydrogène et le deutérium, on constate un comportement totalement différent vis-à-vis des neutrons et la préparation des systèmes amphiphiles, composés entre autres d'atomes d'hydrogène, dans des solvants deutérés, permettra alors de bénéficier de ce contraste pour estimer la taille de nos objets. Le profil de l'intensité diffusée en fonction de l'angle de diffusion θ (ou du vecteur de diffusion \vec{Q}) renseigne alors sur la géométrie des systèmes. Il est d'une part possible d'obtenir des informations sur la taille des objets *via* la détermination d'un rayon de giration R_g pour les faibles valeurs de Q . Il est également possible d'avoir accès aux caractéristiques géométriques de ces objets (sphère pleine ou creuse, bâtonnet, épaisseur de bicouche etc...) en mesurant la pente des courbes.²⁸

L'intensité du signal $I(Q)$ a été corrigée de la contribution du solvant et autres contributions incohérentes pour finalement obtenir des valeurs normalisées, en unités absolues. Les signaux obtenus grâce à la DNPA sont rapportés en Figure II-22.

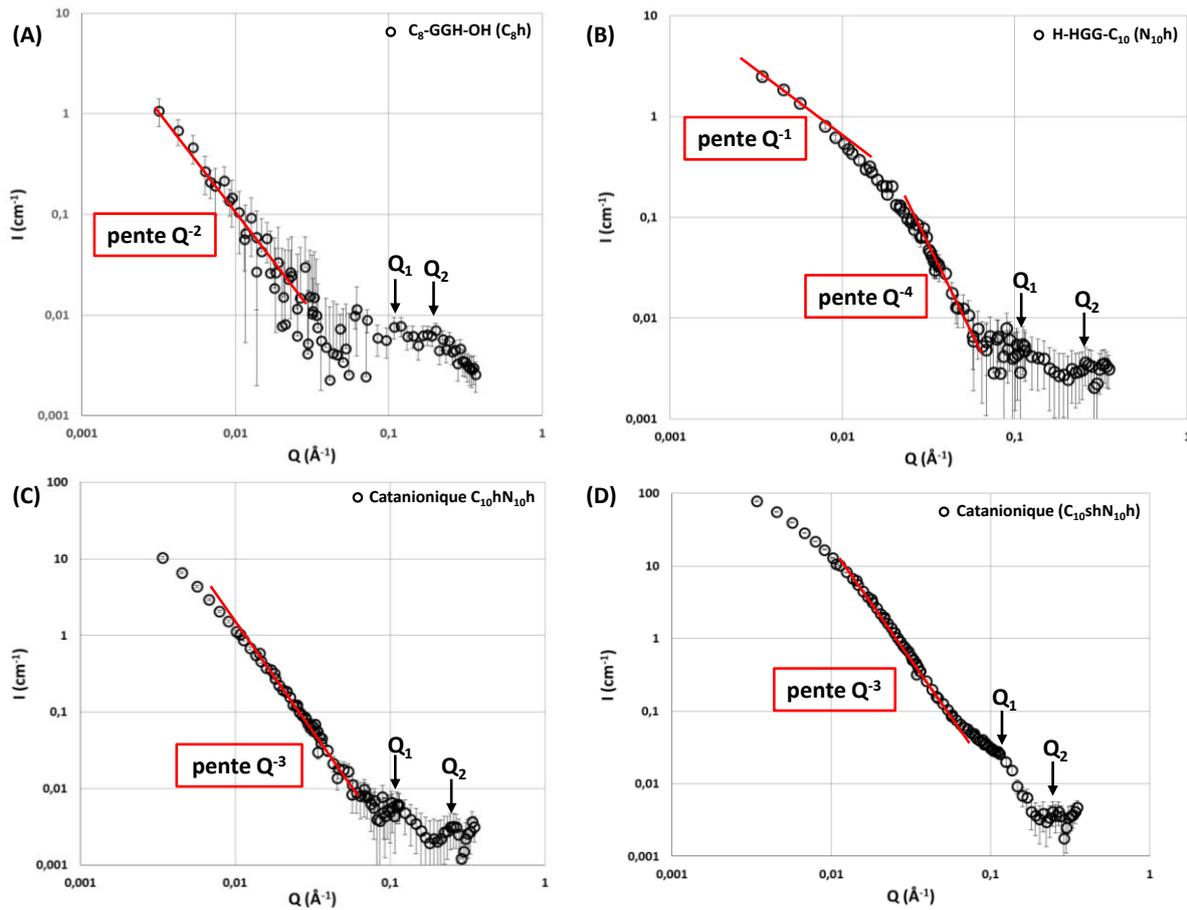


Figure II-22 : Signaux expérimentaux obtenus par DNPA pour les lipopeptides **C₈h** à 20 mM (A), **N₁₀h** à 2 mM (B), **C₁₀hN₁₀h** à 1 mM (C) et **C₁₀shN₁₀h** à 1 mM (D) en tampon phosphate à pH = 7 et à 25 °C (en solvant D₂O)

Il peut tout d'abord être observé que les profils de diffusion correspondent à des objets relativement gros puisque le régime de Guinier (pente en Q^0 aux plus petits Q) n'est pas visible. Il a alors pu être déduit que les rayons de gyration R_g de ces agrégats étaient limités par le fait que $1/R_g < 3.10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$, soit $R_g > 350 \text{ \AA}$, dimension trop importante pour considérer des agrégats de type micellaire. Cependant, une première analyse de la variation de $I(Q)$ a été réalisée. En effet, la détermination de la pente des courbes dans le régime intermédiaire peut nous donner accès à la forme des objets étudiés.

Pour le lipopeptide **C₈h**, une décroissance de l'intensité selon une pente en Q^{-2} est observée pour des valeurs de Q faibles. Ceci pourrait suggérer la présence de structures bidimensionnelles ou de vésicules.³⁴

Dans le cas du lipopeptide **N₁₀h**, si les pentes semblent caractéristiques d'une évolution en Q^{-4} de l'intensité aux moyens angles ($0,015 < Q < 0,060 \text{ \AA}^{-1}$), il apparaît une seconde pente en Q^{-1} caractéristique de la présence de bâtonnets. Ceci appuie l'existence de fibres observées en microscopie électronique (Figure II-20 (B)).

Enfin, les deux lipopeptides catanioniques suivent une décroissance aux petits angles

en Q^{-3} , caractéristiques de géométries aux interfaces non définies, ce qui pourrait correspondre aux fibres enchevêtrées observées au MET (Figure II-20 (E) et (F)).

Par ailleurs, les quatre profils présentent une première bosse de corrélation centrée à $Q_1 = 0,12 \text{ \AA}^{-1}$, correspondant à une distance caractéristique du système $d = 2\pi/Q_1 = 55 \text{ \AA}$ ainsi qu'une seconde bosse détectée pour $Q_2 = 0,27 \text{ \AA}^{-1}$, correspondant à une distance $d = 2\pi/Q_2 = 23 \text{ \AA}$. La distance de 23 \AA pourrait correspondre à la taille d'une molécule de lipopeptide tandis que la valeur de 55 \AA pourrait caractériser le diamètre de la section d'une fibre. Cependant, la microscopie électronique décrit des réseaux fibreux pour lesquels le diamètre des fibres a été mesuré entre 25 et 35 nm. Il a alors été supposé que le réseau de fibres observé en microscopie électronique correspondait à l'association de plusieurs petites fibres dont la section mesure environ 5,5 nm de diamètre (Figure II-23).

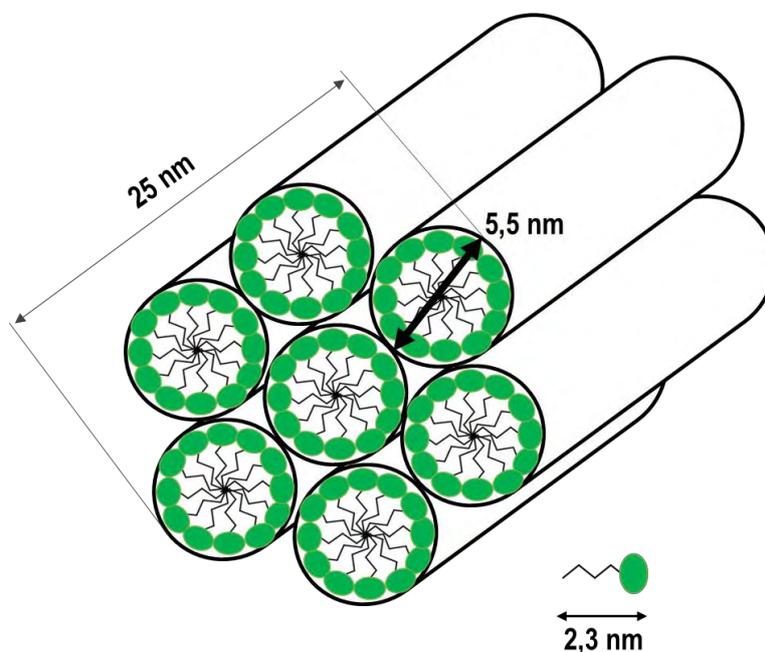


Figure II-23 : Illustration de l'auto-organisation de nanofibres de N_{10h} (diamètre 5,2 nm) en un réseau plus épais (fibres de plusieurs dizaines de nm).

Ce phénomène d'assemblage de fibres en un système plus épais a également été décrit dans la littérature pour un lipopeptide à base de valine et d'acide glutamique. Celui-ci a tendance à former des nanofibres enroulées à faible concentration qui s'organisent en agrégats plats de plus grande dimension (« nanoceintures ») en milieu plus concentré.³⁵

Une étude de stabilité a également pu être réalisée sur un échantillon conservé un an à température ambiante et à l'abri de la lumière. Son analyse par DNPA est présentée en Figure II-24.

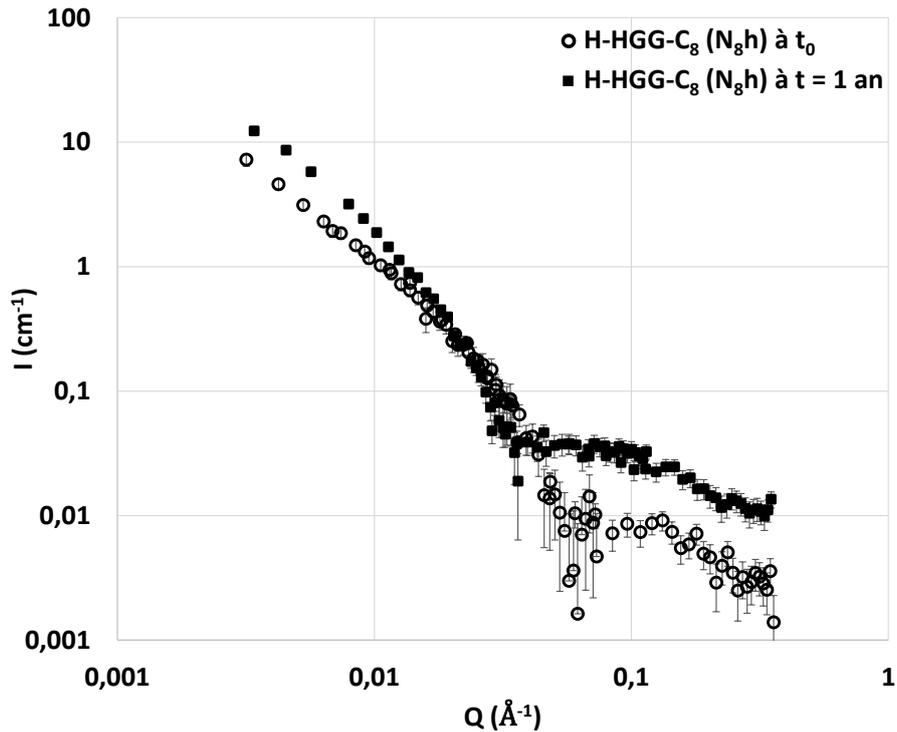


Figure II-24 : Signaux expérimentaux obtenus par DNPA sur un échantillon de H-HGG-C₈ (50 mM). Comparaison des profils pour une même solution analysée à un an d'intervalle.

Malgré une superposition imparfaite des deux signaux, on note que les valeurs d'intensité aux petits et moyens Q décroissent selon une pente en Q^{-2} puis Q^{-4} dans les deux cas. Ces informations laissent donc penser que le lipopeptide H-HGG-C₈ a conservé sa géométrie bidimensionnelle voire sphérique (Q^{-4}) au fil du temps : ce système organisé est stable dans le temps.³⁴ Ces observations sont par ailleurs cohérentes avec les clichés d'objets globulaires formés par **N₈h** obtenus en MET.

Les mesures réalisées sur les lipopeptides les moins hydrophobes **C₈h** et **N₈h** (chaînes carbonées les plus courtes) corroborent l'hypothèse de la formation de systèmes globulaires stables sur plusieurs jours avant l'analyse par DNPA. Il est alors intéressant de constater que des lipopeptides à peine plus hydrophobes (**C₁₀h** et **N₁₀h**) s'organisent pour leur part en structures fibrillaires plutôt qu'en objets globulaires. On pourrait y voir un parallèle avec le mécanisme qui décrit la formation de fibres amyloïdes, pour lequel de petits agrégats sont tout d'abord formés pour progressivement évoluer avec le temps vers des structures fibrillaires plus conséquentes.³⁶

IV. Conclusion

Cette partie présente la synthèse contrôlée de lipopeptides donnant accès à une large série de structures composées d'une chaîne alkyle greffée à une triade d'acides aminés, soit par la partie C-terminale ou N-terminale de cette séquence. La variation de la longueur de chaîne ainsi que la composition de la séquence peptidique a permis d'évaluer la contribution de ces paramètres sur les propriétés d'auto-organisation des lipopeptides obtenus.

La détermination des concentrations d'agrégation critiques a notamment montré que la plupart des composés synthétisés s'auto-organisent en milieu aqueux. La contribution de la chaîne hydrophobe et de l'histidine dans les processus d'agrégation a par ailleurs été mise en évidence. Ainsi, les lipopeptides à courte chaîne (8 atomes de carbone) ont tendance à s'organiser pour des concentrations au-delà de 10 mM quand leurs équivalents à douze carbones possèdent des CACs de l'ordre de 0,1 mM. Enfin, les composés dont la tête polaire est constituée d'une triglycine (et donc dépourvue d'histidine) s'organisent peu ou pas du tout dans l'eau.

Lorsque l'auto-organisation des systèmes a pu être détectée, des mesures de diffusion (de lumière et de neutrons) ainsi que de la microscopie électronique ont été réalisées pour caractériser les agrégats formés. Les résultats ont montré que ces structures avaient plutôt tendance à former des objets assez gros (par opposition aux micelles), allant d'agrégats globulaires à des structures fibrillaires.

De manière générale, cette étude montre qu'il est possible d'ajuster les propriétés physico-chimiques des lipopeptides en intervenant sur leur structure chimique et en la contrôlant. Il pourra par la suite également être envisagé de modifier les géométries des agrégats lipopeptidiques en jouant sur l'environnement local. Des variations de pH ou de température ainsi que la présence de contre-ions chiraux peuvent en effet influencer l'organisation des systèmes amphiphiles.³⁷ Ce sont donc des paramètres supplémentaires qu'il pourrait être intéressant de tester dans de prochaines études pour avoir accès à de nouvelles géométries et propriétés.

Après la conception des lipopeptides et la mise en évidence de leurs propriétés d'auto-organisation, le prochain chapitre sera consacré à l'étude de leurs propriétés catalytiques sur l'hydrolyse d'esters. L'influence de l'agrégation sur la catalyse sera alors évaluée.

V. Références

- (1) Eun, H.-M. *Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology*; San Diego: Academic Press, 1996.
- (2) Roche, J. *Experientia* **1946**, 2 (9), 325–336.
- (3) Jansson, M.; Olsson, H.; Pettersson, K. In *Phosphorus in Freshwater Ecosystems*; Springer, 1988; 157–175.
- (4) De Munter, S.; Köhn, M.; Bollen, M. *ACS Chem. Biol.* **2013**, 8 (1), 36–45.
- (5) Sussman, J. L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I. *Science* **1991**, 253 (5022), 872–879.
- (6) Gite, S.; Reddy, G.; Shankar, V. *Biochem. J.* **1992**, 288, 571–575.
- (7) Kogiso, M.; Zhou, Y.; Shimizu, T. *Adv. Mater.* **2007**, 19 (2), 242–246.
- (8) Brady, L.; Brzozowski, A. M.; Derewenda, Z. S.; Dodson, E.; Dodson, G.; Tolley, S.; Turkenburg, J. P.; Christiansen, L.; Huge-Jensen, B.; Norskov, L.; Thim, L.; Menge, U. *Nature* **1990**, 343 (6260), 767–770.
- (9) Blanzat, M.; Perez, E.; Rico-Lattes, I.; Prome, D.; Prome, J. C.; Lattes, A. *Langmuir* **1999**, 15 (19), 6163–6169.
- (10) Isidro-Llobet, A.; Alvarez, M.; Albericio, F. *Chem. Rev.* **2009**, 109 (6), 2455–2504.
- (11) Carpino, L. A.; El-Faham, A. A. Synthesis and use of amino acid fluorides as peptide coupling reagents. US 6534627B1, 2003.
- (12) Carpino, L. A.; El-Faham, A. *Tetrahedron* **1999**, 55, 6813–6830.
- (13) Amitrano, R.; Koch, P.; Neuber, M.; Neumann, D.; Petrovic, P.; Roos, M.; Vedder, C. In *Peptides for Youth: The Proceedings of the 20th American Peptide Symposium*; Valle, S. D., Escher, E., Lubell, W. D., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2009; Vol. 611, pp 193–194.
- (14) El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Rev.* **2011**, 111 (11), 6557–6602.
- (15) Subirós-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15 (37), 9394–9403.
- (16) Wehrstedt, K. D.; Wandrey, P. A.; Heitkamp, D. *J. Hazard. Mater.* **2005**, 126 (1-3), 1–7.
- (17) Cantel, S.; Desgranges, S.; Martinez, J.; Fehrentz, J.-A. *J. Peptide Sci.* **2004**, 10 (6), 326–328.
- (18) Sonntag, N. O. V. *Chem. Rev.* **1953**, 52 (2), 237–416.
- (19) Tsuchiya, M.; Yoshida, H.; Ogata, T.; Inokawa, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1969**, 42 (6),

- 1756–1757.
- (20) Rodehüser, L.; Chaumette, H.; Meyers, A.; Rogalska, E.; Gérardin, C.; Selve, C. *Amino Acids* **2000**, *18* (1), 89–100.
- (21) Miyachi, N.; Iwama, T.; Gotoh, M.; Maruyama, T.; Koda, D. Lipid tripeptide-based hydrogelator and hydrogel. EP 2180027, July 2013.
- (22) Miyamoto, M.; Miyachi, N.; Iwama, T. Novel Lipid Dipeptide and Gel. EP2319894A1, 2011.
- (23) Kronholm, K. G.; Schwen, R. J.; Sine, M. R.; Warren, R.; Wawrzyniak, C. J. His-Gly-Gly peptide and derivatives thereof for hair growth. US 5252559, 1993.
- (24) Mandal, D.; Nasrolahi Shirazi, A.; Parang, K. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (22), 3544–3564.
- (25) Miravet, J. F.; Escuder, B.; Segarra-Maset, M. D.; Tena-Solsona, M.; Hamley, I. W.; Dehsorkhi, A.; Castelletto, V. *Soft Matter* **2013**, *9* (13), 3558.
- (26) Barth, A. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1767* (9), 1073–1101.
- (27) Goormaghtigh, E.; Ruyschaert, J.-M.; Raussens, V. *Biophys. J.* **2006**, *90* (8), 2946–2957.
- (28) Gerova, M.; Rodrigues, F.; Lamère, J.-F.; Dobrev, A.; Fery-Forgues, S. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *319* (2), 526–533.
- (29) Aguiar, J.; Carpena, P.; Molina-Bolívar, J. A.; Carnero Ruiz, C. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *258* (1), 116–122.
- (30) Rosen, M. J. *Surfactants and Interfacial Phenomena*, 3rd ed.; John Wiley & Sons, Inc, 2004.
- (31) Estroff, L. A.; Hamilton, A. D. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (3), 1201–1217.
- (32) Agrawal, S.; Khan, F. *Chem. Sci. Trans.* **2013**, *2* (3), 847–852.
- (33) Qiang, Z.; Adams, C. *Water Research* **2004**, *38* (12), 2874–2890.
- (34) Nallet, F. *J. Phys. IV* **1999**, *09* (PR1), 95–107.
- (35) Cui, H.; Muraoka, T.; Cheetham, A. G.; Stupp, S. I. *Nano Lett.* **2009**, *9* (3), 945–951.
- (36) Lee, C. F. *Phys. Rev. E* **2009**, *80* (3), 031922, 1–5.
- (37) Brizard, A.; Aimé, C.; Labrot, T.; Huc, I.; Berthier, D.; Artzner, F.; Desbat, B.; Oda, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (12), 3754–3762.

CHAPITRE III
Etude de l'activité catalytique des
lipopeptides sur l'hydrolyse d'esters
en milieu aqueux

Sommaire

I. Introduction	86
II. Etude de l'activité catalytique des lipopeptides sur l'hydrolyse du pNPA	89
<i>II. 1. Etudes préliminaires</i>	89
<i>II. 2. Comparaison de l'efficacité catalytique des différents lipopeptides</i>	90
<i>II. 3. Influence des groupes fonctionnels et des charges sur la catalyse</i>	101
<i>II. 4. Hypothèses de mécanisme</i>	104
<i>II. 5. Etude de l'existence d'une contribution interfaciale</i>	108
III. Extension à d'autres esters modèles	111
IV. Conclusion	114
V. Références	116

I. Introduction

La conception des lipopeptides présentés dans le chapitre 2 a été guidée par l'application que l'on souhaitait conférer à ces systèmes. Dans une approche biomimétique, ce nouveau chapitre consiste alors à utiliser nos lipopeptides à base d'histidine comme catalyseurs de réactions d'hydrolyse, cet acide aminé se retrouvant dans de nombreux sites actifs d'hydrolases comme la chymotrypsine.^{1,2} Ce choix s'est notamment justifié par l'omniprésence de ces réactions dans de nombreux processus biologiques.³⁻⁵ Par ailleurs, la caractérisation des composés synthétisés a mis en évidence leur capacité d'auto-organisation. Ainsi, les interfaces et zones hydrophobes créées par les réseaux fibreux obtenus sont également pressenties pour influencer sur les propriétés catalytiques de nos systèmes. En effet, les interactions faibles entre acides aminés qui gouvernent la formation des structures supramoléculaires étudiées pourraient présenter des similitudes avec le processus de repliement des peptides, et par conséquent générer une conformation propice à la catalyse, comme chez les enzymes.

La réalisation des essais permettant d'évaluer le potentiel catalytique des lipopeptides conçus s'est voulue progressive. Dans un premier temps, il s'agissait d'étudier l'hydrolyse d'un ester modèle pour établir les conditions favorables à l'étude catalytique. Pour cela, notre choix s'est porté sur l'hydrolyse de l'acétate de *p*-nitrophényle (*p*NPA). Cet ester est généralement employé pour évaluer l'activité hydrolytique car il est facile de suivre l'avancement de la réaction.^{6,7} En effet, le produit formé pendant l'hydrolyse du *p*NPA absorbe dans le domaine UV-visible, et particulièrement l'ion *p*-nitrophénolate (*p*NP) vers 400 nm tandis que le *p*-nitrophénol absorbe dans l'UV vers 300 nm (Figure III-1). Le pKa de ce couple acido-basique étant égal à 7,15 à 25°C,⁸ un équilibre entre les deux espèces existe lorsque l'hydrolyse est menée dans des conditions à pH neutre.

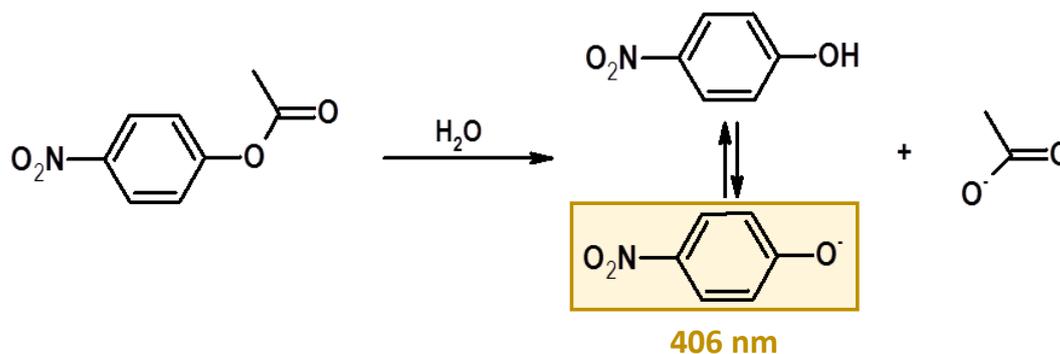


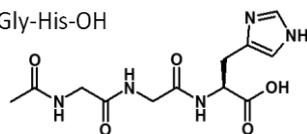
Figure III-1 : Hydrolyse de l'acétate de *p*-nitrophényle ; illustration des formes phénol et phénolate obtenues

Un tampon HEPES (l'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthanesulfonique) à pH 7 a été choisi pour mener les essais d'hydrolyse de l'acétate de *p*-nitrophényle en présence des lipopeptides. Il s'agit ici de conserver les paramètres qui ont servi à la caractérisation physico-chimique des lipopeptides pour exploiter le potentiel catalytique des agrégats mis en évidence. L'HEPES a été préféré à un tampon phosphate (employé communément pour la préparation de solutions tampon à pH 7) pour éviter un équilibre entre les phosphates et le *p*-nitrophénol qui pourrait favoriser l'estérification de ce dernier en *p*-nitrophénylphosphate.⁹

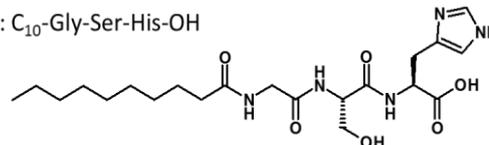
L'activité catalytique des lipopeptides ainsi déterminée sera comparée à l'influence du tampon seul mais aussi de l'histidine, système modèle fréquemment utilisé dans la littérature comme référence catalytique.¹⁰ Enfin, le pourcentage de catalyseur retenu pour cette étude est de 10 %, pourcentage moyen classiquement utilisé dans la littérature en organocatalyse à base d'oligopeptides.^{11,12} Les concentrations finalement choisies pour l'étude ont été dictées à la fois par les propriétés d'auto-organisation des lipopeptides et par la limite de solubilité de l'acétate de *p*-nitrophényle. Au niveau des lipopeptides, deux limitations principales se sont présentées à nous. D'une part, les lipopeptides greffés d'une chaîne alkyle à 12 carbones s'avèrent très peu solubles au-delà de leur CAC et forment rapidement des solutions très troubles, ce qui rendrait délicat un suivi en UV-visible. D'autre part, les lipopeptides portant une chaîne grasse à 8 atomes de carbone présentent des CACs très hautes (de l'ordre de 10 mM), ce qui nécessiterait l'utilisation de solutions de *p*NPA à 0,1 M dans le cas de l'étude des systèmes agrégés. De ce fait, ces solutions de *p*NPA conduiraient elles aussi à la manipulation de suspensions troubles compte tenu de la faible solubilité de ce substrat en milieux aqueux.¹⁰ Ainsi, il a finalement été décidé de se concentrer sur l'étude des lipopeptides en C₁₀, ces derniers disposant de propriétés d'auto-organisation et d'états d'agrégations à 2 mM tandis que le *p*NPA reste suffisamment soluble à 20 mM en tampon HEPES. Parallèlement, deux lipopeptides constitués d'une chaîne à 8 carbones seront tout de même étudiés comme références de l'état monomère, puisqu'ils présentent des CACs bien supérieures à 2 mM, tandis que l'évaluation de l'activité catalytique des triades peptidiques sera réalisée en considérant les composés Ac-GlyGlyHis-OH (**C_{2h}**) et H-HisGlyGly-NHMe (**N_{1h}**) (Figure III-2).

Lipopeptides C-ter :

C₂h : Ac-Gly-Gly-His-OH

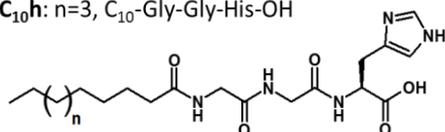


C₁₀sh: C₁₀-Gly-Ser-His-OH

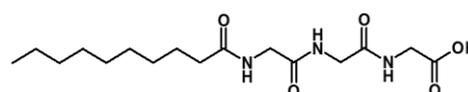


C₈h: n=1, C₈-Gly-Gly-His-OH

C₁₀h: n=3, C₁₀-Gly-Gly-His-OH

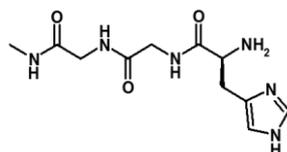


C₁₀g: C₁₀-Gly-Gly-Gly-OH



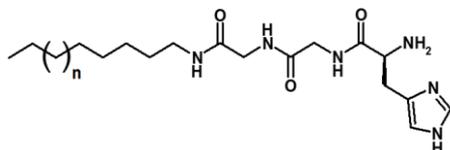
Lipopeptides N-ter :

N₁h : H-His-Gly-Gly-NHMe

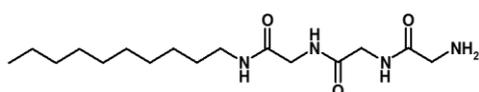


N₈h: n=1, H-His-Gly-Gly-C₈

N₁₀h: n=3, H-His-Gly-Gly-C₁₀



N₁₀g: H-Gly-Gly-Gly-C₁₀



Catanionique:

C₁₀hN₁₀h: C₁₀-Gly-Gly-His-OH/H-His-Gly-Gly-C₁₀

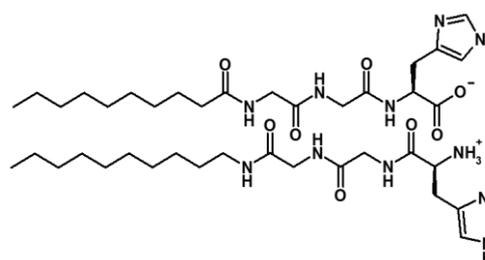


Figure III-2 : Présentation des lipopeptides testés en catalyse

La comparaison de l'activité de ces triades par rapport à celle des lipopeptides en C8 permettra d'évaluer le rôle de la partie hydrophobe des lipopeptides, indépendamment du processus d'auto-organisation.

Pour pallier les limites de solubilité du substrat dans l'eau, le *p*NPA sera solubilisé dans l'acétonitrile. Les proportions de solvant introduit dans la solution aqueuse de lipopeptides seront inférieures à 2 % volumique afin de ne pas interférer avec l'agrégation des systèmes.

Enfin, le suivi par spectrophotométrie UV-visible de la formation du *p*-nitrophénolate (*p*NP) a rendu possible la détermination du pourcentage de conversion de l'acétate de *p*-

nitrophényle, en mesurant l'absorbance à 406 nm puis après détermination du coefficient d'extinction molaire du *p*-nitrophénol en tampon HEPES à pH 7 ($\epsilon_{pNP} = 7772 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ à 406 nm) par la formule « conversion = Absorbance / ($\epsilon_{pNP} \times [pNPA]_0$) » (Figure III-3).

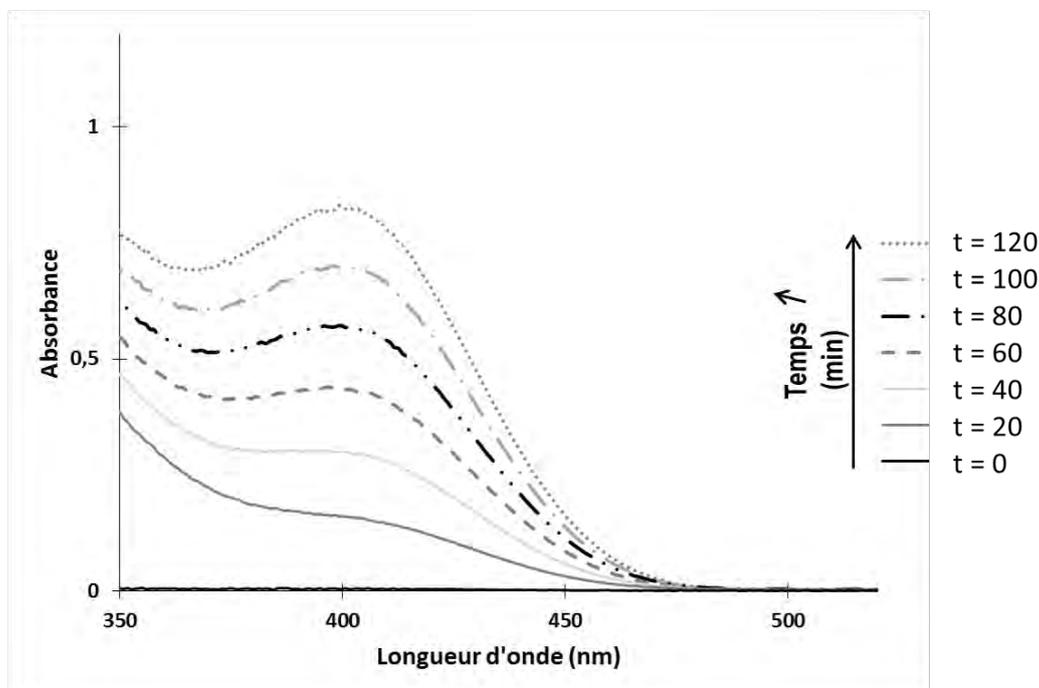


Figure III-3 : Evolution de l'absorbance à 406 nm en fonction du temps associée à la formation du *p*-nitrophénolate en tampon HEPES, lors de l'hydrolyse du *p*NPA

Ces conditions mises en place, la comparaison de l'activité catalytique des lipopeptides vis-à-vis de l'hydrolyse du *p*NPA a ainsi pu être menée. Plusieurs essais ont été réalisés pour chaque composé et ce pendant deux heures, afin de distinguer les différences de réactivité entre les lipopeptides tandis qu'une conversion totale est assurée après 4 jours d'hydrolyse.

II. Etude de l'activité catalytique des lipopeptides sur l'hydrolyse du *p*NPA

II. 1. *Etudes préliminaires*

Dans un premier temps, il s'est agi de vérifier le potentiel catalytique de l'histidine (His) utilisée comme catalyseur référence. Après l'ajout de *p*NPA (concentration initiale de 20 mM dans le mélange) sur la solution aqueuse d'histidine (10 % molaire soit $[\text{His}] = 2 \text{ mM}$),

l'absorbance à 406 nm est mesurée toutes les 5 minutes après dilution, et ce pendant 2 heures, afin de calculer le pourcentage d'hydrolyse du *p*NPA. Une croissance linéaire de l'absorbance en fonction du temps est observée. Après deux heures de réaction, la conversion est calculée à 6 % pour une vitesse initiale de réaction égale à $v_{0,\text{His}} = 106.10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Pour comparaison, en l'absence de catalyseur, l'hydrolyse du *p*NPA en solution HEPES 50 mM conduit à une conversion de seulement 0,5 % pour une vitesse initiale $v_{0,\text{Hepes}} = 7.10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Les valeurs obtenues en présence d'histidine sont nettement supérieures à celles de l'essai « contrôle » en tampon seul, ce qui justifie son choix comme catalyseur référence.

Par ailleurs, une analyse cinétique des conditions d'hydrolyse en tampon HEPES à différents pH et concentrations a permis de mettre en évidence que la réaction est d'ordre 1 par rapport au substrat et qu'elle est soumise à une catalyse acido-basique générale, essentiellement gouvernée par la forme basique de l'HEPES (reportée en annexe). Cette analyse implique que tout acide ou base faible introduit dans le milieu réactionnel est en mesure de participer à la catalyse de la réaction d'hydrolyse du *p*NPA.

II. 2. Comparaison de l'efficacité catalytique des différents lipopeptides

Par la suite, nous avons appliqué le même protocole aux différents lipopeptides présentés précédemment (Figure III-4).

Série des lipopeptides à base de triglycine

Les résultats obtenus montrent que C₁₀GlyGlyGly-OH (**N_{10g}**) et H-GlyGlyGly-C₁₀ (**C_{10g}**), lipopeptides sous forme monomère, ne présentent aucune activité catalytique notable, confirmant ainsi l'importance de l'histidine dans les propriétés organocatalytiques des lipopeptides (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Ainsi, l'ajout d'acides ou de bases faibles (l'ammonium pour **N_{10g}** et la fonction carboxylate pour **C_{10g}**) à 2 mM n'est pas suffisant pour améliorer l'activité catalytique apportée par le tampon seul à 50 mM. De plus, aucune catalyse supramoléculaire n'a pu être observée ici car les concentrations en lipopeptides utilisées étaient légèrement inférieures aux CACs des deux lipopeptides à base de triglycine (absence d'agrégats).

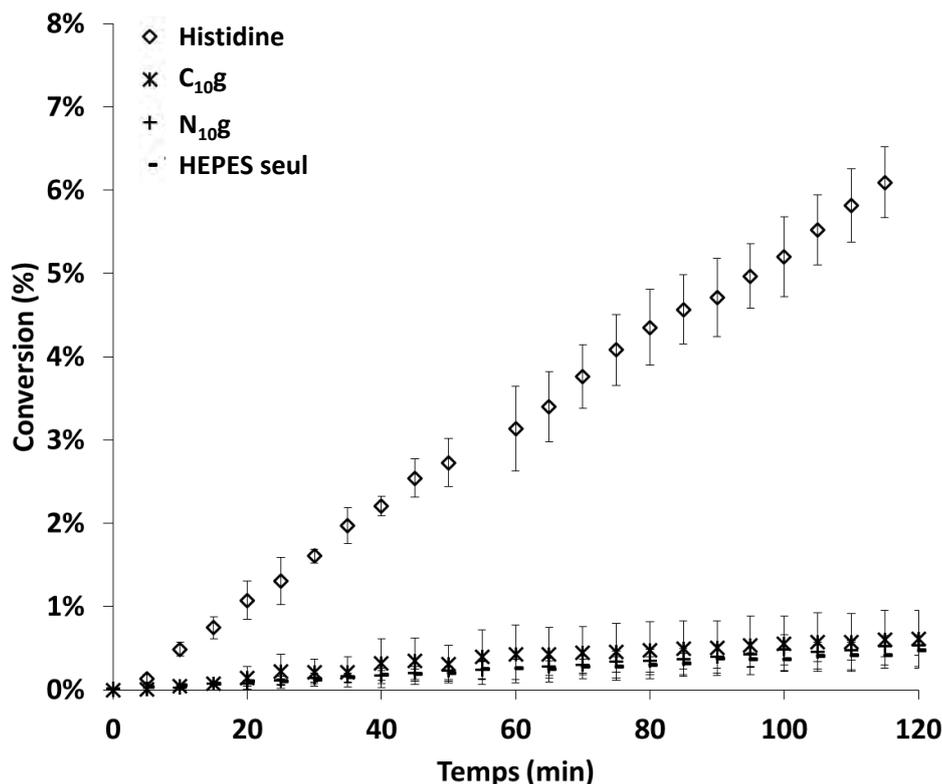


Figure III-4 : Hydrolyse du *p*NPA ($[pNPA]_0 = 20$ mM): Mise en évidence de l'activité catalytique de l'histidine (10 %) par rapport au tampon HEPES et aux lipopeptides à base de triglycine.

En revanche, le suivi de l'hydrolyse du *p*NPA en présence de lipopeptides à base d'histidine, que ce soit en position C-terminale, N-terminale ou intégrée deux fois dans les structures catanioniques, a conduit à des résultats nettement différents.

- Série des lipopeptides N-ter

En ce qui concerne la série des lipopeptides cationiques N-ter à base d'histidine (Figure III-5) on peut tout d'abord observer que tous les profils d'hydrolyse du *p*NPA en fonction du temps sont linéaires. D'autre part, le lipopeptide **Nsh** (état monomère) s'est révélé deux fois plus efficace vis-à-vis de l'hydrolyse du *p*NPA que son homologue dont la chaîne carbonée a été réduite à un groupe méthyle uniquement (**Nlh**). Ces résultats montrent que l'introduction d'un caractère hydrophobe *via* la chaîne grasse greffée contribue à promouvoir l'activité hydrolytique. Cela laisse suggérer que la chaîne alkyle interagit de manière positive avec le substrat qui est relativement hydrophobe lui aussi, permettant sans doute un rapprochement avec le motif catalytique histidine, responsable alors d'une amélioration des propriétés catalytiques.

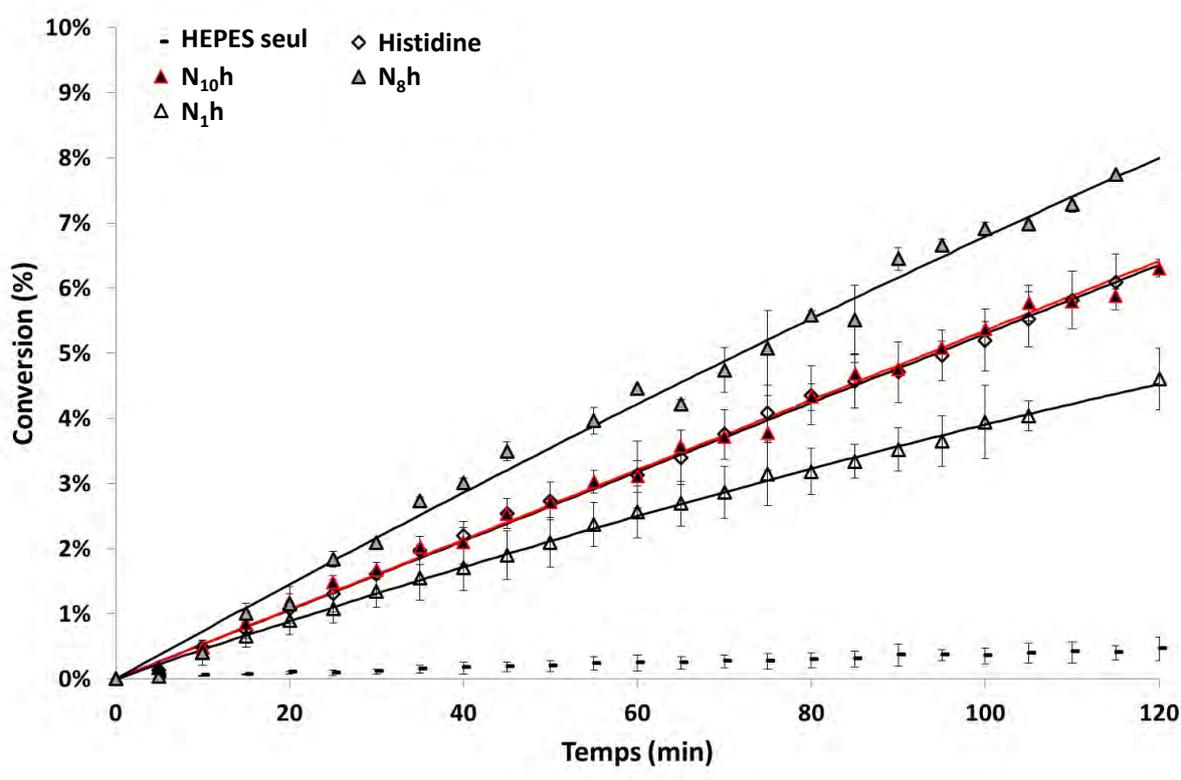


Figure III-5 : Hydrolyse du *p*NPA ($[p\text{NPA}]_0 = 20 \text{ mM}$) en présence des lipopeptides N-ter (10 %). Les systèmes agrégés sont représentés en rouge.

Ensuite, la comparaison entre le **N_{8h}** (à l'état monomère à 2 mM) et le lipopeptide **N_{10h}** (auto-organisé dans ces mêmes conditions) met en évidence une légère diminution de l'activité hydrolytique en présence d'agrégats, pour recouvrer une hydrolyse de la même efficacité que l'histidine seule. Il reste néanmoins plus efficace que la triade de référence **N_{1h}**. Ainsi, il apparaît que les lipopeptides sont plus efficaces à l'état monomère qu'à l'état agrégé. Cela peut sembler surprenant puisqu'il a été rapporté que des systèmes organisés tels que des micelles pouvaient être considérés comme des nanoréacteurs, faisant bénéficier d'un cœur hydrophobe propice au confinement des espèces pour améliorer les propriétés catalytiques du catalyseur.¹³ Dans notre cas, le lipopeptide forme un réseau fibreux à 2 mM (cf résultats de microscopie électronique, Chapitre 2), agrégat moins dynamique que la micelle, qui a déjà été rapporté à la fois comme système promoteur de la catalyse mais aussi comme système organisé moins favorable à l'activité catalytique.^{14,15} L'activité catalytique supérieure de **N_{8h}** par rapport à la triade de référence **N_{1h}**, suggérant une affinité certaine du substrat pour les chaînes hydrophobes des lipopeptides, laisse supposer que le *p*NPA puisse être retenu dans le cœur hydrophobe des objets formés. Cela empêcherait alors soit son accès aux sites catalytiques nucléophiles, soit la libération des produits de réaction qui restent eux aussi partiellement

localisés dans les agrégats. Une autre hypothèse consisterait à dire que certains motifs d'histidine sont engagés dans des interactions faibles responsables du phénomène d'agrégation et que le nombre de sites catalytiques disponibles pour l'hydrolyse est plus faible qu'à l'état monomère.^{16,17}

Pour accéder à de plus amples informations sur les phénomènes qui opèrent au niveau de la structure du lipopeptide organisé, nous avons comparé les résultats obtenus après l'analyse d'essais réalisés en diffusion de neutrons aux petits angles, pour le composé **N10h** seul à 2 mM ou après hydrolyse du *p*NPA (réaction menée pendant deux jours pour s'assurer une conversion maximale). Les résultats sont présentés en Figure III-6.

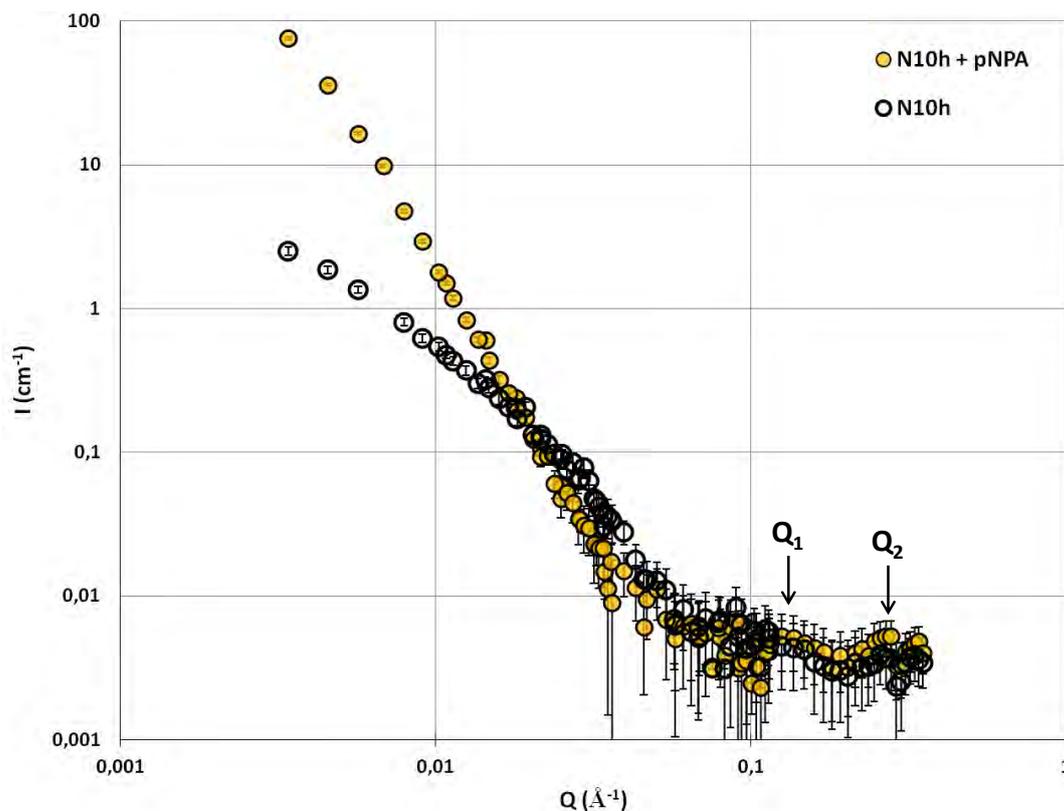


Figure III-6 : Signaux expérimentaux en DNPA $I(q)$ pour le lipopeptide **N10h** seul ou après hydrolyse du *p*NPA

Les données obtenues en DNPA pour **N10h** et analysées précédemment (Chapitre 2) ont confirmé l'existence de fibres grâce notamment aux décroissances en Q^{-1} et Q^{-4} aux moyens et grands angles caractéristiques de bâtonnets. Parallèlement, lorsque **N10h** a été analysé dans les conditions d'hydrolyse (« **N10h** + *p*NPA »), la pente en Q^{-4} continue jusqu'aux plus petits Q . Les données obtenues aux petits Q permettent en général d'obtenir des informations sur la taille des agrégats. Cette différence d'intensité diffusée ainsi constatée entre les deux profils suggère que le lipopeptide seul en solution forme des agrégats de plus petite taille que lorsqu'il a participé à l'hydrolyse du *p*NPA. Cela corroborerait l'hypothèse de rétention des composés au

sein des agrégats, qui auraient tendance à faire « gonfler » le réseau des nanofibres de lipopeptides. Ce phénomène a déjà été mis en évidence par des analyses en diffusion de neutrons aux petits angles sur des micelles de dodécylsulfate de sodium gonflées suite à l'incorporation de nanotubes de carbone.¹⁸ Par ailleurs, il semblerait que les profils soient similaires aux grands angles. Les deux pics de corrélation à $Q_1 = 0,12 \text{ \AA}^{-1}$ et $Q_2 = 0,27 \text{ \AA}^{-1}$ reliés à des distances caractéristiques de 52 \AA et 23 \AA sont conservés après l'hydrolyse du *p*NPA, ce qui semble indiquer que les nanofibres individuelles conservent leur structure.

- Série des lipopeptides C-ter

En ce qui concerne l'influence des lipopeptides C-ter sur l'hydrolyse du *p*NPA, certaines différences notables ont été constatées par rapport aux profils obtenus avec les lipopeptides N-ter (Figure III-7).

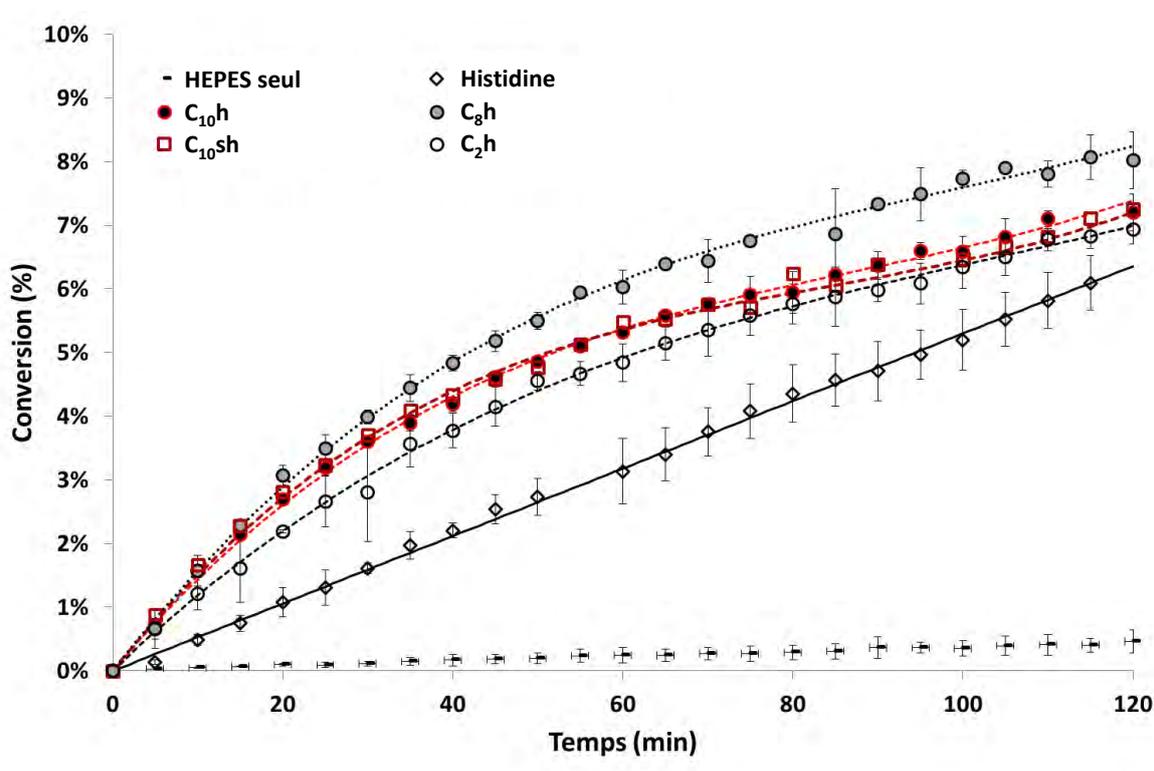


Figure III-7 : Hydrolyse du *p*NPA ($[pNPA]_0 = 20 \text{ mM}$) en présence des lipopeptides C-ter (10 %). Les systèmes agrégés sont représentés en rouge.

Tout d'abord, les profils d'hydrolyse observés ne sont plus linéaires, ce qui laisse suggérer un mécanisme d'action différent de celui qui opère en présence des lipopeptides N-ter. En effet, après un début d'hydrolyse très efficace associé à des vitesses initiales deux à trois fois plus grandes que celles correspondant aux composés N-ter, la réaction est ensuite nettement ralentie pour atteindre après deux heures d'hydrolyse une conversion finalement similaire à celle

obtenue pour les catalyseurs N-ter. Cependant, l'activité catalytique observée pour chaque lipopeptide est supérieure à celle de l'histidine seule quand, au contraire, les lipopeptides N-ter **N1h** et **N10h** démontraient une activité respectivement inférieure ou égale à ce même acide aminé.

Ainsi, les lipopeptides C-ter semblent initialement plus efficaces que leurs analogues N-ter mais subiraient rapidement un phénomène de saturation comme il est possible de l'observer pour les processus enzymatiques. Ce cas est notamment mis en évidence pour l'hydrolyse du *p*NPA en présence de chymotrypsine pour catalyser la réaction (Figure III-8).^{19,20}

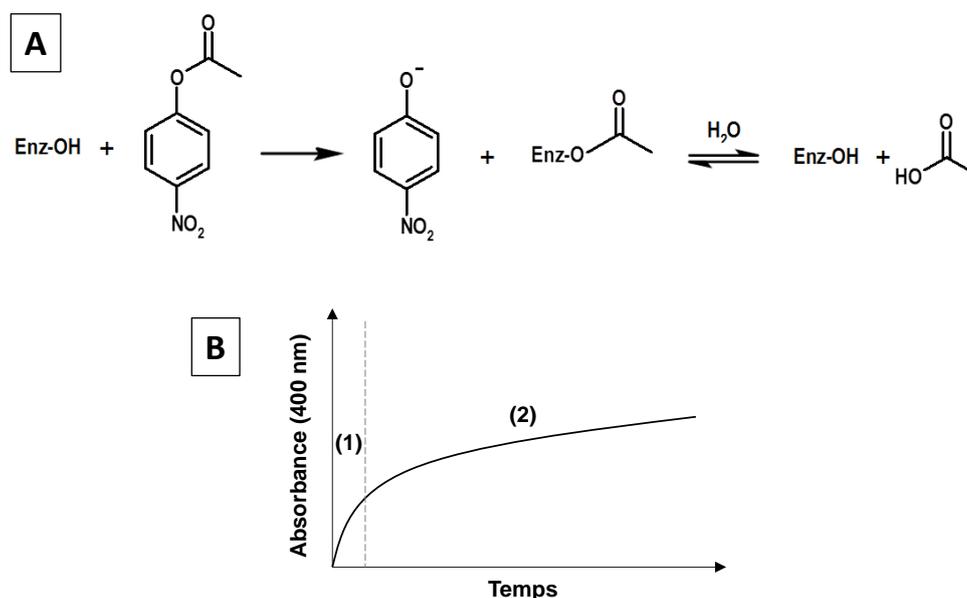


Figure III-8 : Illustration de l'hydrolyse du *p*NPA en présence de la chymotrypsine. A: Formation du *p*-nitrophénolate (*p*NP) et acétylation de l'enzyme (1). Hydrolyse de l'intermédiaire acétylé et récupération du catalyseur (2). B: Evolution non linéaire de l'absorbance associée au *p*NP, due au phénomène de saturation.

Il est décrit qu'après une hydrolyse très rapide en début de réaction, l'activité catalytique est ensuite réduite, ce qui atténue nettement la pente de la courbe décrivant la conversion du *p*NPA au cours du temps. Ces travaux soulignent alors que si l'accélération initiale est due à une libération rapide et considérable de *p*-nitrophénolate (1), le second produit de la réaction, l'acétate, reste en revanche lié de manière covalente aux sites catalytiques de l'enzyme (2). L'hydrolyse de l'acétate représente alors l'étape limitante de la réaction et la formation de *p*-nitrophénolate est finalement dictée par la capacité et la rapidité de la chymotrypsine à libérer l'acétate.

Les profils obtenus avec les lipopeptides C-ter présentent des similitudes avec la description faite pour la chymotrypsine. Il a donc été suggéré qu'un phénomène de saturation pouvait opérer, et que celui-ci pourrait être lié à la présence de l'acétate lié de manière covalente

au site catalytique de nos lipopeptides, le cycle imidazole de l'histidine.

Par ailleurs, l'agrégation du catalyseur conduit, comme dans le cas des lipopeptides **N8h** et **N10h**, à une diminution de son activité hydrolytique. En effet, le lipopeptide **C8h** à l'état monomère s'est révélé le catalyseur le plus efficace vis-à-vis de l'hydrolyse du *p*NPA, tandis que la forme agrégée **C10h** redescendait à une activité catalytique seulement légèrement supérieure à celle de la triade de référence **C2h**. Cela suggère comme pour les lipopeptides N-ter que le substrat hydrophobe reste potentiellement localisé dans les chaînes grasses des lipopeptides assemblés, ce qui le rend moins disponible pour subir l'hydrolyse via les sites nucléophiles de la tête polaire. En effet, si le substrat est localisé au cœur de l'agrégat fibreux formé par le catalyseur, l'organocatalyseur constitué par l'histidine du lipopeptide et présent à la périphérie des agrégats n'est plus situé dans le voisinage du substrat qu'il doit hydrolyser, ce qui diminue sa réactivité par rapport à **C8h**. Des expériences en diffusion de neutrons aux petits angles ont également été menées pour vérifier la conservation du système agrégé, qui justifierait ce raisonnement (Figure III-9). Les signaux sont superposables, ce qui semble mettre en évidence la robustesse des agrégats formés par **C10h** : ceux-ci ne sont pas déformés ou détruits suite à la mise en présence du substrat et des produits d'hydrolyse.

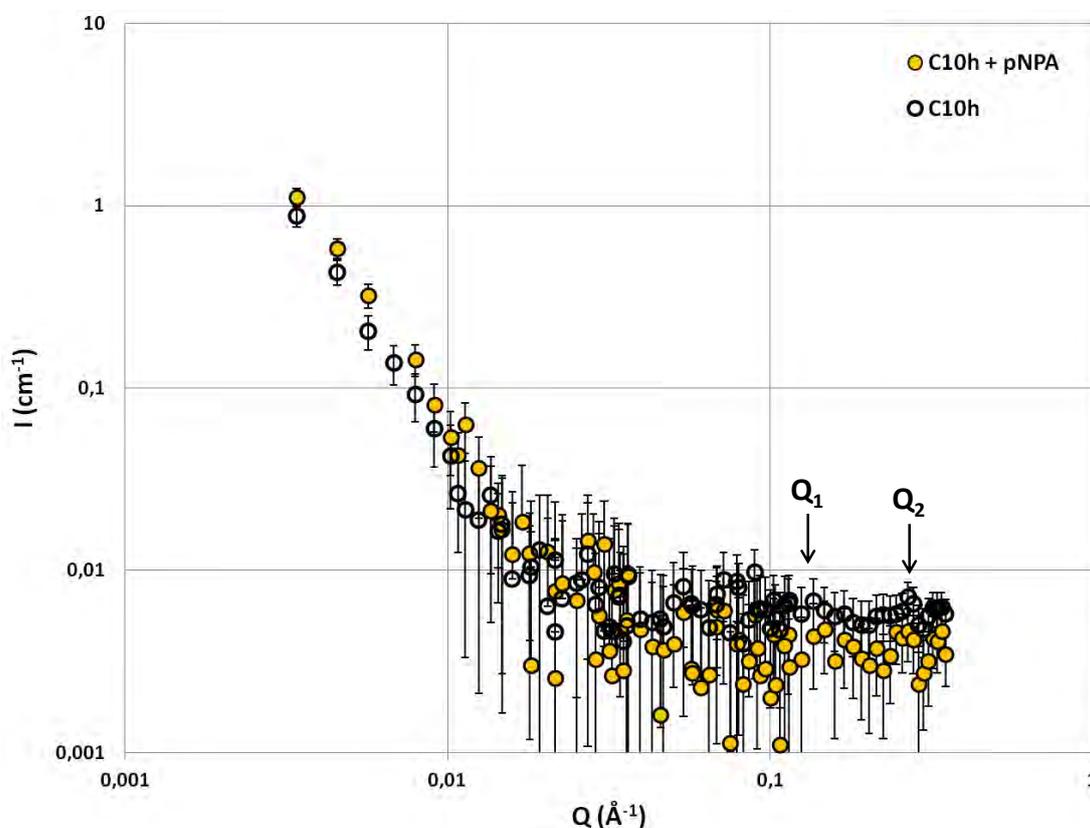


Figure III-9: Signaux expérimentaux obtenus par DNPA pour le lipopeptide $C_{10}GlyGlyHisOH$ (C_{10h}) à 2 mM seul ou dans les conditions d'hydrolyse ($[pNPA]_0 = 20$ mM).

Le signal des données obtenues en diffusion de neutrons est globalement très faible mais il semblerait que le phénomène de « gonflement » constaté avec le lipopeptide **N₁₀h** n'apparaisse pas avec son analogue C-terminal. Il pourrait alors être supposé que la réaction aurait plutôt lieu à l'interface pour les fibres de lipopeptides **C₁₀h** tandis que le substrat aurait davantage tendance à pénétrer les fibres de **N₁₀h** (Figure III-10).

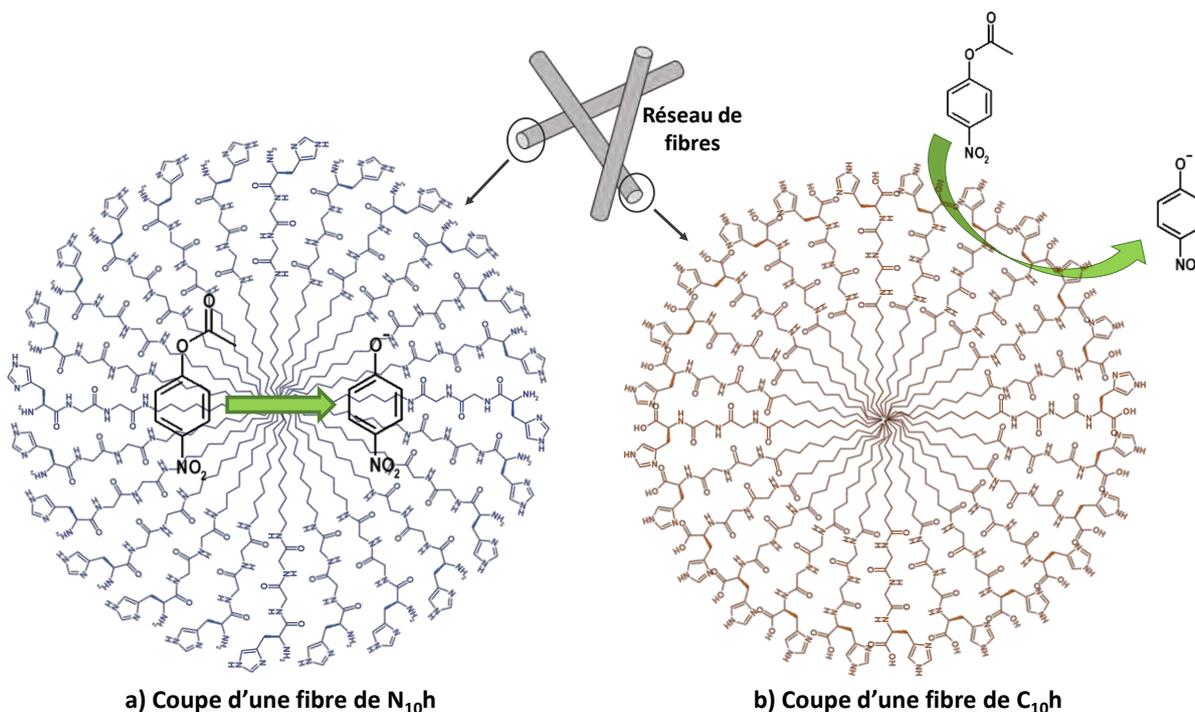


Figure III-10 : Schéma hypothétique de l'apport interfacial sur l'hydrolyse du pNPA. a) Catalyse au sein des fibres de **N₁₀h** et b) Phénomène interfacial en présence de **C₁₀h**.

- Lipopeptide à sérine

L'introduction d'un motif sérine adjacent à l'histidine pour former le lipopeptide **C₁₀sh** ne permet pas a priori de contribuer à une amélioration de la catalyse, les profils d'hydrolyse de **C₁₀h** et **C₁₀sh** étant relativement similaires (Figure III-7). Cela semble indiquer que le positionnement de la sérine n'est pas optimal pour contribuer, comme dans certains sites actifs d'hydrolase,²¹ à une participation concertée de ces deux acides aminés. Cela peut aussi s'expliquer par l'absence d'un troisième acide aminé (souvent l'aspartate, doté d'un carboxylate comme fonction latérale) pour compléter la triade catalytique et améliorer les propriétés catalytiques. Néanmoins, il semblerait que la présence du carboxylate de l'histidine en bout de chaîne puisse jouer ce rôle. Simplement, l'enchaînement des trois peptides positionnés côte à côte ne semble pas privilégier la catalyse ; il faudrait, comme dans les sites actifs enzymatiques, considérer une certaine distance voire une certaine configuration entre les motifs pour que

chacun puisse jouer au mieux son rôle et accompagner l'hydrolyse du substrat. Cela rejoint les travaux de Breslow relatifs à la conception d'une cyclodextrine à base de la triade Asp-Ser-His. L'incorporation du tripeptide n'avait pas permis d'améliorer les propriétés hydrolytiques du macrocycle mais au contraire de restreindre l'accès des substrats au système « hôte », freinant ainsi la réaction.²²

- Lipopeptide catanionique

Le dérivé catanionique **C_{10h}N_{10h}** formé d'une part du lipopeptide C₁₀GlyGlyHisOH (**C_{10h}**) et de son équivalent cationique Nter H-HisGlyGlyC₁₀ (**N_{10h}**) a également été mis en présence du *p*NPA pour étudier son activité catalytique. Pour travailler avec les mêmes quantités de motif histidine que celles employées pour l'étude des lipopeptides monocaténares, nous nous sommes placés à 1 mM en lipopeptide catanionique. Ce changement de concentration garantit toujours la présence d'agrégats puisque la CAC du catanionique a été mesurée à 0,5 mM (Chapitre 2). L'activité hydrolytique du catanionique a été mesurée comme étant la moyenne exacte des activités des lipopeptides **C_{10h}** et **N_{10h}** (Figure III-11).

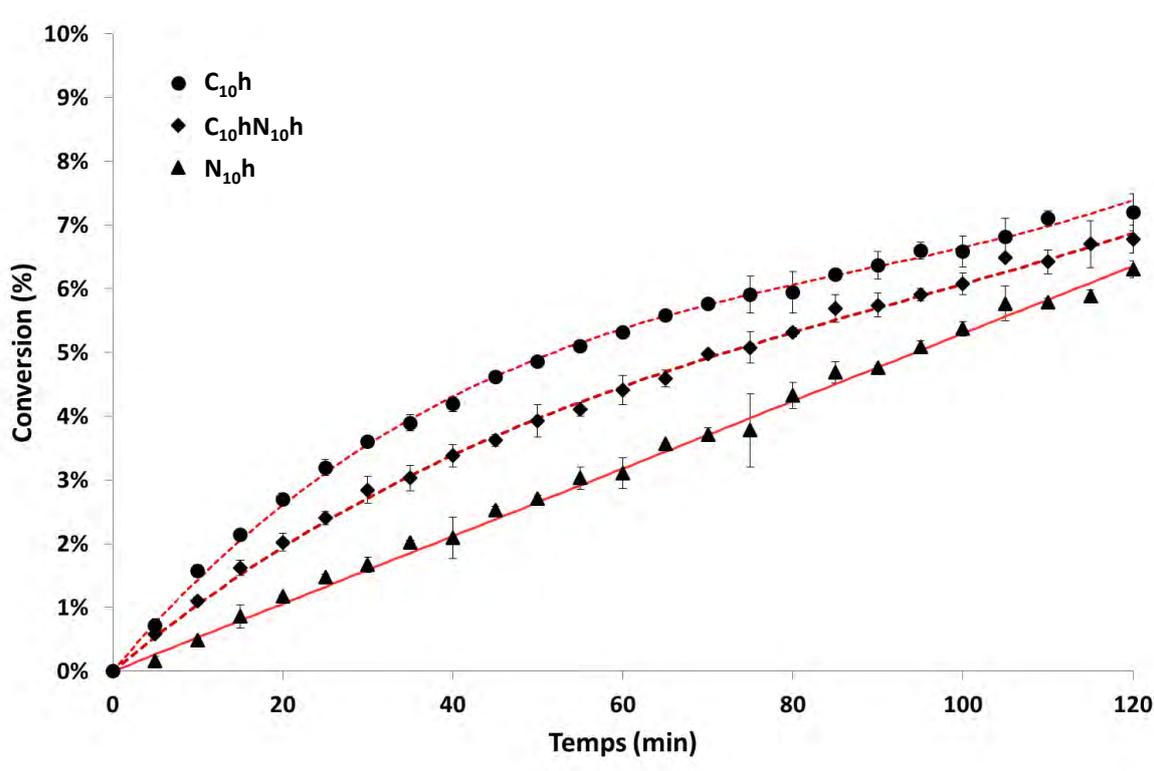


Figure III-11 : Hydrolyse du *p*NPA ($[pNPA]_0 = 20$ mM) en présence du lipopeptide catanionique **C_{10h}N_{10h}** et des deux composés le constituant (**C_{10h}** et **N_{10h}**)

Bien qu'un effet synergique ait été observé au niveau du processus d'agrégation avec une CAC plus basse, il semblerait qu'en catalyse, le catanionique agisse simplement comme une

combinaison de ses deux composants agissant de manière isolée. Tout bien considéré, les agrégats formés par le catanionique **C_{10h}N_{10h}** restent assez similaires à ceux obtenus avec les lipopeptides **C_{10h}** et **N_{10h}**. Au niveau supramoléculaire, la combinaison de ces derniers n'apporte alors aucune fonctionnalité supplémentaire qui aurait justifié un phénomène interfacial différent, garant d'une meilleure catalyse.

- **Comparaison générale des différents lipopeptides**

L'ensemble des résultats permettant la comparaison des différents catalyseurs est présenté dans le Tableau III-1.

Tableau III-1 : Vitesses initiales d'hydrolyse et conversion après 2 heures du *p*NPA à 20 mM en présence des différents catalyseurs (2 mM) en tampon HEPES

Catalyseur	v_0 (10^{-7} mol.L ⁻¹ .min ⁻¹)	Conversion après 2h (%)
Sans	8	0.5
Histidine	106	6.4
C_{10g}	16	0.6
N_{10g}	9	0.5
N_{1h}	91	4.5
N_{8h}	148	8.0
N_{10h}	107	6.4
C_{2h}	255	7.0
C_{8h}	343	8.2
C_{10h}	315	7.4
C_{10sh}	334	7.2
C_{10h}N_{10h}	224	6.9

D'un point de vue global, ces résultats soulignent d'une part l'importance de l'histidine dans la structure des lipopeptides pour apporter l'activité hydrolytique voulue, sans laquelle les avancements et les vitesses initiales avoisinent les valeurs obtenues en l'absence de catalyseur.

D'autre part, l'ajout d'une chaîne grasse à la triade peptidique a un rôle positif sur la catalyse. Ceci a été attribué à une meilleure affinité du substrat relativement hydrophobe avec les lipopeptides **C_{8h}** et **N_{8h}**. Par ailleurs, si les agrégats de lipopeptides sont suffisamment robustes pour conserver leur état d'agrégation au cours de l'hydrolyse, ils démontrent en revanche des propriétés catalytiques inférieures à celles des lipopeptides à l'état monomère, que ce soit pour les structures C-terminales ou N-terminales. Il a été supposé que cette

différence soit liée à une trop forte affinité des agrégats avec les réactifs ou produits de la réaction, ce qui retiendrait ces molécules au cœur des systèmes organisés et empêcherait l'accueil de davantage de substrats pour subir l'hydrolyse et entretenir la réaction. Une seconde hypothèse attribue cette diminution d'activité à un nombre restreint de sites catalytiques disponibles dans le cas des agrégats de lipopeptides, certains pouvant être engagés dans des interactions faibles responsables de l'auto-organisation. Par ailleurs, les profils non linéaires obtenus avec les lipopeptides C-ter ont laissé suggérer une saturation des sites nucléophiles réactifs au sein des lipopeptides, peut être liée à une libération retardée de l'acétate comme précisé précédemment.

Enfin, pour chaque longueur de chaîne, il est intéressant de constater que les lipopeptides C-ter ont des vitesses initiales nettement supérieures à celles de leurs homologues N-ter. Cela laisse supposer qu'il y a au sein de la structure C-ter un ou plusieurs éléments qui favorisent la catalyse. La microscopie électronique ayant permis d'observer des réseaux fibreux pour **C10h** et **N10h**, il est donc plus probable que la différence soit liée à une différence de structure chimique plutôt qu'à l'influence de l'agrégation. Ainsi, il serait plus favorable de disposer d'un cycle imidazole en alpha d'un carboxylate plutôt que d'un ammonium. Cela pourrait s'expliquer, comme suggéré plus tôt, par l'analogie avec les sites actifs enzymatiques qui contiennent chez certaines hydrolases la triade catalytique sérine-histidine-aspartate. Le carboxylate pourrait alors s'inscrire dans un mécanisme concerté aux côtés de l'histidine *via* différentes liaisons faibles pour améliorer les propriétés basiques et/ou nucléophiles de l'imidazole, alors que l'ammonium des lipopeptides N-ter ne peut apporter ces interactions faibles (Figure III-12).^{23,24}

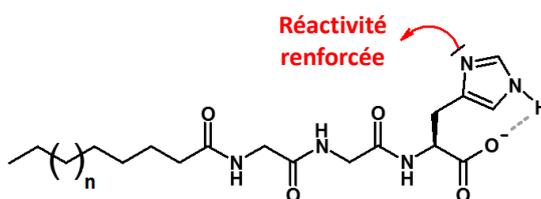


Figure III-12 : Schéma de l'influence du carboxylate des lipopeptides Cter sur la réactivité (nucléophile et/ou basique) de l'azote N⁷ de l'imidazole.

Pour vérifier ces premières hypothèses et obtenir des informations supplémentaires sur les différentes contributions à la catalyse des lipopeptides, il a par la suite été entrepris d'étudier l'influence de certaines fonctions chimiques de manière isolée sur l'hydrolyse du *p*NPA.

II. 3. Influence des groupes fonctionnels et des charges sur la catalyse

Ainsi il a déjà été suggéré qu'un ammonium en alpha de l'imidazole de l'histidine était un système catalytique moins performant que si l'histidine bénéficie d'une fonction carboxylate dans son voisinage. Pour confirmer cette théorie mais aussi étendre cette analyse à la contribution des charges, des fonctions ou encore d'un agrégat, chaque espèce isolée a été préparée à 2 mM en solution dans l'HEPES à 50 mM et mise en présence de 20 mM de *p*NPA (Figure III-13).

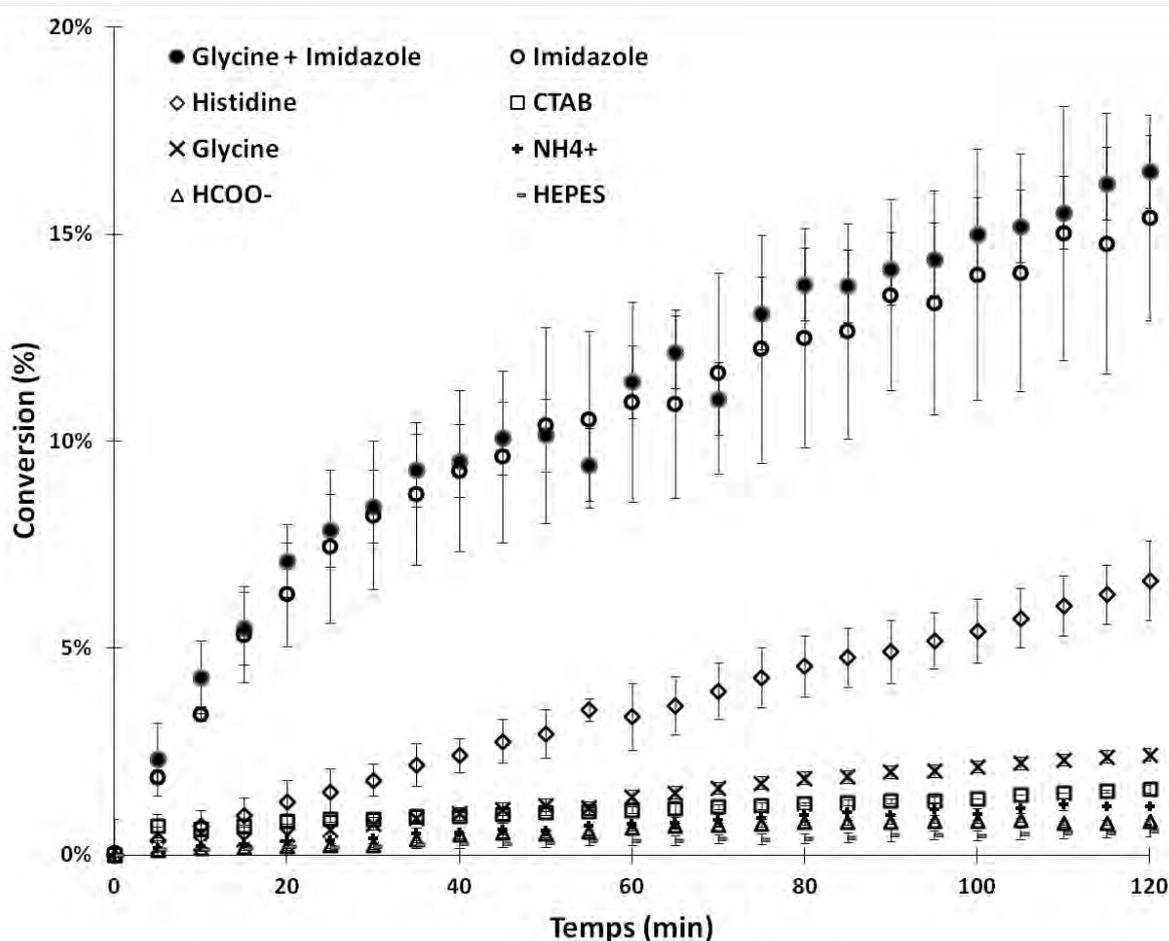


Figure III-13 : Hydrolyse du *p*NPA ($[pNPA]_0 = 20$ mM) en présence des groupes fonctionnels

- Influence des fonctions terminales seules

L'hydrolyse du *p*NPA a été suivie en introduisant du chlorure d'ammonium ou de l'acide formique à pH 7 dans l'HEPES, pour évaluer l'influence des fonctions terminales des lipopeptides N-ter et C-ter respectivement. Les points représentant l'hydrolyse du *p*NPA en présence des ions formiate en solution sont quasiment superposables à ceux du tampon seul, ce

qui montre qu'ils n'ont pas d'influence significative sur la catalyse. Les points associés à l'hydrolyse en présence des ions ammonium sont très légèrement au-dessus ; néanmoins, le pourcentage d'hydrolyse reste très bas et l'on ne peut dégager un quelconque impact de la présence de sels d'ammonium seuls en solution sur la réaction.

Ensuite, la même réaction a été menée en présence de glycine, d'une part pour confirmer une nouvelle fois que celle-ci n'est pas responsable de la catalyse chimique au sein de nos lipopeptides, mais surtout pour évaluer l'influence des groupements ammonium et carboxylate dans le même voisinage. La glycine, mise en solution avec le *p*NPA pendant 2 h, entraîne seulement 2 % de conversion de substrat, ce qui met une nouvelle fois en évidence l'intérêt de l'histidine sur la catalyse et l'absence d'une éventuelle activité concertée entre ammoniums et carboxylates.

- Influence de l'imidazole

L'imidazole, dont la structure consiste en un unique cycle diazole que l'on retrouve dans la chaîne latérale de l'histidine, a été évalué comme le catalyseur présentant la meilleure activité catalytique vis-à-vis de l'hydrolyse du *p*NPA. Par rapport à l'histidine seule en solution, on passe de 6,4 à environ 15 % de conversion en deux heures d'hydrolyse. Cela suggère que la proximité simultanée des fonctions ammonium et carboxylate diminue le potentiel hydrolytique du cycle imidazole. Le substrat et/ou les produits de réaction pourraient de ce fait être engagés dans des interactions faibles stabilisantes avec les différentes fonctions de l'histidine (imidazole, ammonium et carboxylate). Le site hydrolytique constitué par le diazole serait alors mobilisé dans ces interactions, obtenant ainsi des duplex lipopeptide-substrat ou lipopeptide-produit stables, et rendant l'imidazole moins disponible à la catalyse. Les observations précédentes ayant mis en évidence l'activité catalytique supérieure des lipopeptides C-ter par rapport aux N-ter, il semblerait que l'ammonium terminal des composés N-ter soit davantage impliqué dans la formation d'un « duplex » aux côtés de l'imidazole que leurs analogues C-ter. Les interactions susceptibles d'intervenir entre les lipopeptides N-ter et le substrat sont présentées en Figure III-14 (l'association des fonctions imidazole et carboxylate est présentée en Figure III-12).

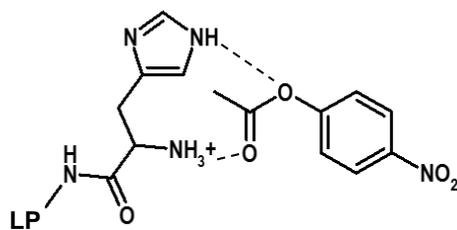


Figure III-14 : Proposition d'interactions faibles stabilisantes menant à la formation d'un duplex entre le *p*NPA et les fonctions terminales des lipopeptides N-ter

Cette inhibition partielle provoquée par la proximité des fonctions terminales est confirmée par un essai d'hydrolyse du *p*NPA réalisée en présence d'imidazole et de glycine, tous deux à 10 % molaire. Les fonctions qui composent l'histidine sont donc ainsi introduites mais de manière dissociée. Les résultats obtenus ont mis en évidence que les groupements ammonium et carboxylate n'ont pas d'influence sur l'activité hydrolytique de l'imidazole : celui-ci conserve les mêmes propriétés que s'il était seul en solution. La glycine, relativement diluée en solution, ne semble pas se retrouver dans le voisinage de l'imidazole pour participer à la formation d'un duplex stable avec le cycle diazole.

- Influence de l'interface

Enfin, parallèlement à l'influence des fonctions chimiques constituant les lipopeptides, l'existence d'une catalyse interfaciale a voulu être vérifiée. Pour cela, nous avons utilisé le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB), tensioactif commercial qui forme des micelles pour une concentration supérieure à 1 mM.²⁵ La Figure III-13 présente les résultats obtenus lorsque l'hydrolyse du *p*NPA est réalisée en présence de micelles de CTAB. Il apparaît alors que ces agrégats n'ont pas d'influence significative sur l'hydrolyse du substrat. L'effet de confinement généré par de tels agrégats,¹³ s'il a lieu ici, ne suffit pas à accélérer l'hydrolyse du *p*NPA, ce qui justifie une fois de plus la nécessité d'introduire un motif imidazole au sein des systèmes catalytiques.

- Bilan des contributions locales

Pour résumer l'étude des différents groupements présentés ici, il apparaît clairement que l'activité hydrolytique conférée par nos systèmes est due au cycle imidazole. Par ailleurs, les fonctions terminales des lipopeptides semblent freiner l'hydrolyse du *p*NPA. C'est essentiellement le cas des catalyseurs contenant un ammonium dans le voisinage de l'imidazole. Une hypothèse a ainsi été faite sur de potentielles interactions stabilisantes entre le substrat

d'une part, et l'imidazole et l'ammonium d'autre part, qui justifierait l'activité réduite des différents catalyseurs comparés à l'imidazole seul. Enfin, l'introduction de micelles de CTAB n'a pas entraîné une accélération de l'hydrolyse du *p*NPA. Cela laisse supposer que la fonction de nanoréacteur apporté par ce tensioactif ne suffit pas à la catalyse et renforce l'idée d'utiliser des systèmes bifonctionnels, c'est-à-dire aptes à l'auto-organisation mais incluant également l'histidine dans leur structure.

Par la suite et pour aller un peu plus loin dans la compréhension du rôle des lipopeptides sur la catalyse, une étude sur le(s) mécanisme(s) d'hydrolyse qui surviennent en leur présence a été engagée.

II. 4. Hypothèses de mécanisme

L'importance de l'histidine (ou de l'imidazole) sur la catalyse ayant été précédemment soulignée, il a par la suite été question de s'intéresser aux mécanismes qui régissent l'activité catalytique de tels composés. L'hydrolyse du *p*NPA en présence d'imidazole est connue pour suivre essentiellement deux mécanismes distincts. Il existe d'une part une hydrolyse *via* un mécanisme acido-basique et d'autre part une participation nucléophile.²⁶

Ainsi, l'imidazole contenu dans les lipopeptides (LP) peut agir comme une base qui viendrait capter un proton au sein d'une molécule d'eau, rendant celle-ci plus nucléophile et donc plus réactive vis-à-vis de la fonction ester du *p*NPA (Figure III-15, Voie A). Un mécanisme intramoléculaire opère alors pour libérer les deux produits de la réaction.

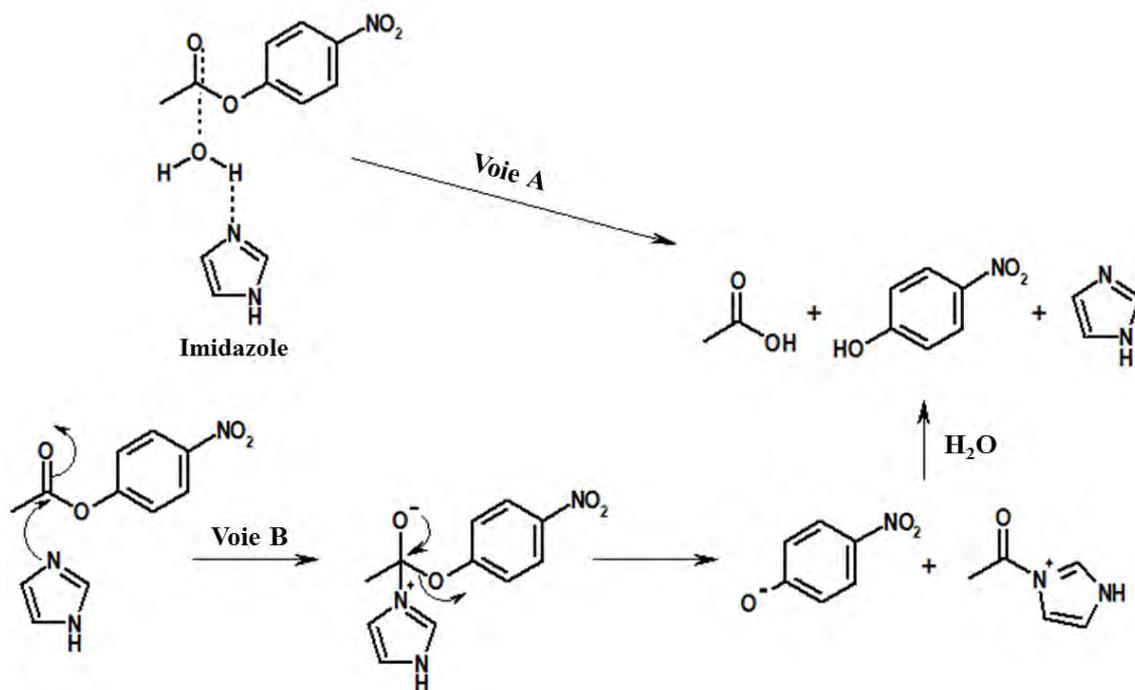


Figure III-15 : Hydrolyse du *p*NPA par catalyse basique (voie A) ou nucléophile (Voie B) de l'imidazole

Par ailleurs, l'imidazole peut également dispenser une catalyse nucléophile (Figure III-15 Voie B). En effet, l'azote tertiaire peut participer directement à l'hydrolyse du *p*NPA en venant réagir sur la fonction ester pour former d'une part le *p*-nitrophénolate et d'autre part l'acétylimidazole. Une seconde étape est nécessaire pour hydrolyser cet intermédiaire et récupérer le catalyseur intact. Cette étape limitante peut être responsable de la saturation des sites nucléophiles catalytiques.

Il est possible de suivre la formation de l'acétylimidazole en mesurant l'absorbance à 245 nm par spectrophotométrie UV-visible.^{27,28} Les conditions opératoires précédemment choisies ($[p\text{NPA}]_0 = 20 \text{ mM}$, $[\text{LP}] = 2 \text{ mM}$) rendent impossible le suivi des variations d'absorbance à 245 nm due à la formation de l'intermédiaire réactionnel. En effet, le *p*NPA introduit initialement absorbe à 273 nm et son signal en ultra-violet interfère avec la lecture de l'absorbance à 245 nm dû à la forte concentration du milieu. Le suivi de formation de l'acétylimidazole a donc été réalisé avec des quantités bien plus faibles de substrat. De plus, cette étude a été initiée uniquement avec les lipopeptides **C10h** et **N10h**. De ce fait, il a été choisi de conserver une concentration de 2 mM en tampon HEPES afin de les maintenir dans leur état d'agrégation.

L'hydrolyse du *p*NPA (avec $[p\text{NPA}]_0 = 0,1 \text{ mM}$) a donc été suivie d'une part à 406 nm pour vérifier la formation du *p*-nitrophénolate (*p*-NP) et d'autre part à 245 nm pour observer si l'imidazole contenu dans nos lipopeptides est acétylé (Figure III-16et Figure III-17).

- Etude du lipopeptide C_{10h}

Il est une nouvelle fois observé que le lipopeptide C-ter est meilleur catalyseur que son analogue N-ter puisqu'après deux heures de réaction, les absorbances relatives à la formation du *p*-NP sont mesurées à environ 0,46 et 0,28 respectivement, correspondant à des taux de conversion de 64,3 % et 38,6 %. De plus, le profil de l'hydrolyse en présence du lipopeptide N-ter (Figure III-17) est globalement linéaire tandis que l'évolution associée au lipopeptide C-ter suit une courbe dont la pente diminue au cours du temps (Figure III-16).

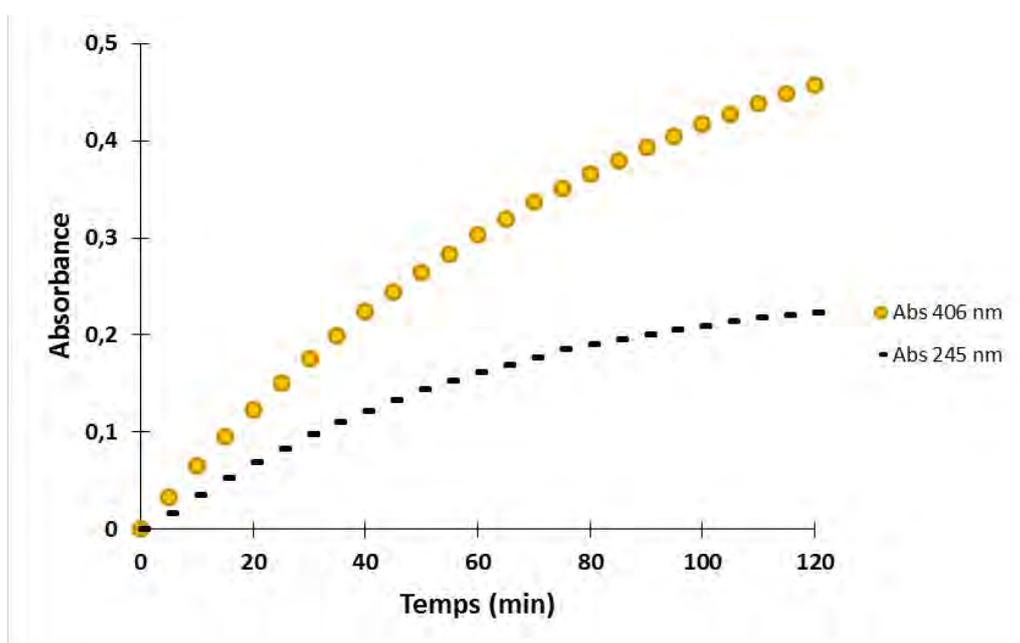


Figure III-16 : Evolution temporelle de l'absorbance à 245 et 406 nm pour respectivement la formation de l'acétylimidazole et du *p*-nitrophénol en présence de C_{10h}.

Parallèlement, on a donc observé à 245 nm s'il y avait formation de l'acétylimidazole et si celui-ci pouvait expliquer les profils d'hydrolyse obtenus. L'absorbance mesurée à 245 nm a été corrigée par la contribution du pic de *p*NPA, qui absorbe à 273 nm mais a également une absorbance non nulle à 245 nm. Dans le cas du lipopeptide C_{10h}, il y a formation progressive de l'acétylimidazole (pointillés noirs) entre l'histidine de C_{10h} et l'acétate issu de l'hydrolyse du *p*NPA. Il semblerait qu'au bout de 2 heures, une valeur plateau d'absorbance soit atteinte vers 0,2. Cela pourrait signifier qu'un maximum d'acétylimidazole a été formé mais que celui-ci ne subit pas d'hydrolyse dans un second temps, étape qui permettrait de récupérer le catalyseur. Cela expliquerait alors la formation ralentie du *p*NP, illustrée par une diminution de pente au cours du temps.

- Etude du lipopeptide N_{10h}

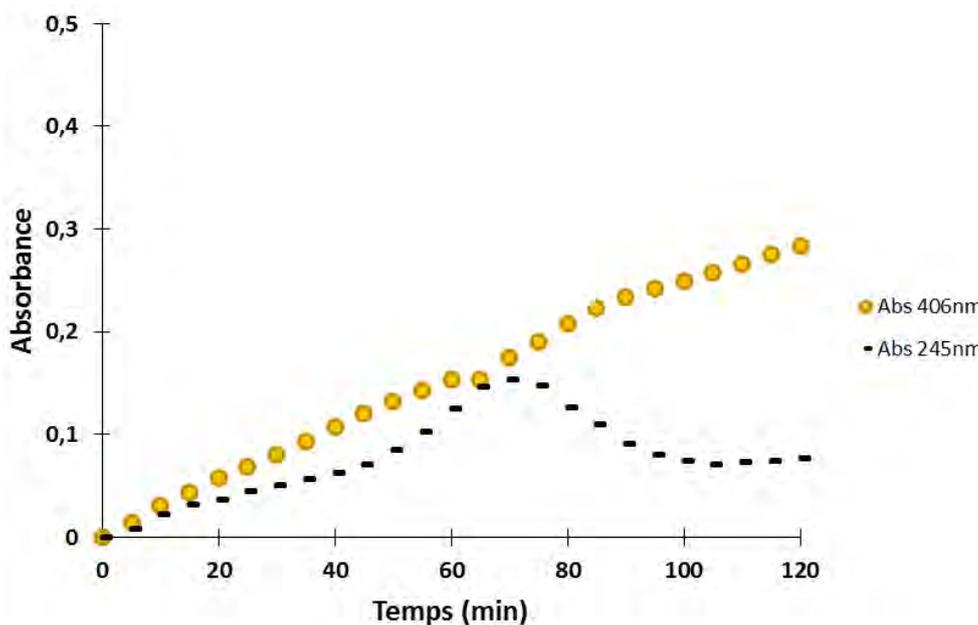


Figure III-17 : Evolution temporelle de l'absorbance à 245 et 406 nm pour respectivement la formation de l'acétylimidazole et du *p*-nitrophénol en présence de N_{10h}.

En ce qui concerne le lipopeptide N-ter (Figure III-17), le suivi de l'absorbance à 245 nm présente une allure très différente. Le signal augmente pour atteindre un maximum d'absorbance à 0,15 après 70 minutes d'hydrolyse puis diminue vers de plus faibles valeurs. Ce maximum traduirait alors la conversion maximale en acétylimidazole, qui semble bien plus lente que pour l'imidazole seul, qui atteint son maximum de forme acétylée en quelques minutes.²⁸ Dans un second temps, il y a hydrolyse de cet intermédiaire. L'évolution de l'absorbance du *p*NP au cours du temps ne semble pas perturbée par ce phénomène d'acétylation puisque le profil reste linéaire au cours du temps. Il est possible que l'acylation de l'histidine soit suffisamment lente pour ne pas nuire aux propriétés catalytiques du catalyseur en saturant son site actif. De plus, l'étape de désacétylation du catalyseur semble opérer assez rapidement pour libérer les sites imidazoles engagés dans les intermédiaires acétylés. D'autre part, l'acétylation de N_{10h} ne semble pas influencer sur le profil de formation du *p*NP. Cette observation pourrait suggérer que le lipopeptide N-ter intervienne sur l'hydrolyse du *p*NPA par un second processus, complémentaire au mécanisme nucléophile qui pourrait justifier que l'hydrolyse se poursuit sans modifier le profil de formation du *p*NP.

Pour résumer, les deux structures de lipopeptides (C-ter et N-ter) présenteraient une catalyse nucléophile vis-à-vis de l'hydrolyse du *p*NPA. Le lipopeptide C-ter semble par ailleurs se lier un peu plus rapidement à l'acétate que le N-ter. Néanmoins, l'acétylimidazole formé

n'est a priori pas hydrolysé par la suite, ce qui justifierait le ralentissement de la catalyse par les lipopeptides C-ter. D'un autre côté, l'hydrolyse en présence du lipopeptide N-ter est plus lente mais il se peut que les vitesses de réaction d'acétylation et de désacétylation soient telles qu'elles évitent le phénomène de saturation des sites catalytiques. Enfin, ce mécanisme nucléophile n'est sans doute pas le seul à opérer dans ce milieu réactionnel, notamment en présence du lipopeptide N-ter. En effet, nous avons montré initialement que l'hydrolyse du *p*NPA en tampon HEPES subissait une catalyse générale acido-basique. Ainsi, l'imidazole des lipopeptides doit également être partiellement engagé dans une catalyse basique mais aucun essai n'a encore pu être mené pour mettre en évidence cette hypothèse (étude des vitesses initiales pour des solutions de lipopeptides à différents pH par exemple).

II. 5. Etude de l'existence d'une contribution interfaciale

Pour mettre en évidence l'influence de l'interface sur la catalyse, il a été choisi de faire varier la quantité de lipopeptides pour une même concentration en substrat ($[pNPA]_0 = 0,1 \text{ mM}$). Ces essais ont été réalisés sur les lipopeptides **C_{10h}** et **N_{10h}**, pour lesquels les phénomènes d'auto-organisation ont été mis en évidence pour une concentration supérieure à 1 mM.

Il est important de noter ici que le catalyseur est introduit en excès. Les rapports $[LP]/[pNPA]$ sont totalement différents des premiers résultats où les proportions de catalyseur étaient fixées à 10 % molaire. Dans les nouveaux essais, les rapports peuvent varier de 1 à 30, pour une gamme de concentrations comprises entre 0,1 et 3 mM.

La caractérisation physico-chimique de ces lipopeptides a mis en évidence leur propension à former des réseaux fibreux robustes. Néanmoins, une étude est nécessaire pour évaluer quelles proportions de catalyseur par rapport au substrat sont nécessaires pour garantir la meilleure catalyse. Si l'on s'attend à observer un phénomène d'organocatalyse pur, les vitesses initiales d'hydrolyse sont censées croître avec la concentration en lipopeptides jusqu'à atteindre une vitesse maximale, la loi de vitesse pouvant s'écrire comme $v = k \cdot [\text{catalyseur}]$ (avec k regroupant la constante de vitesse et les éventuelles contributions des concentrations en réactifs). En revanche, si la présence d'agrégats influe sur la catalyse, on peut s'attendre à un changement soudain dans les paramètres cinétiques à partir d'une certaine concentration, caractéristique des phénomènes d'auto-organisation qui ont lieu.²⁹ Les vitesses initiales d'hydrolyse pour chaque concentration en lipopeptides sont reportées sur la Figure III-18.

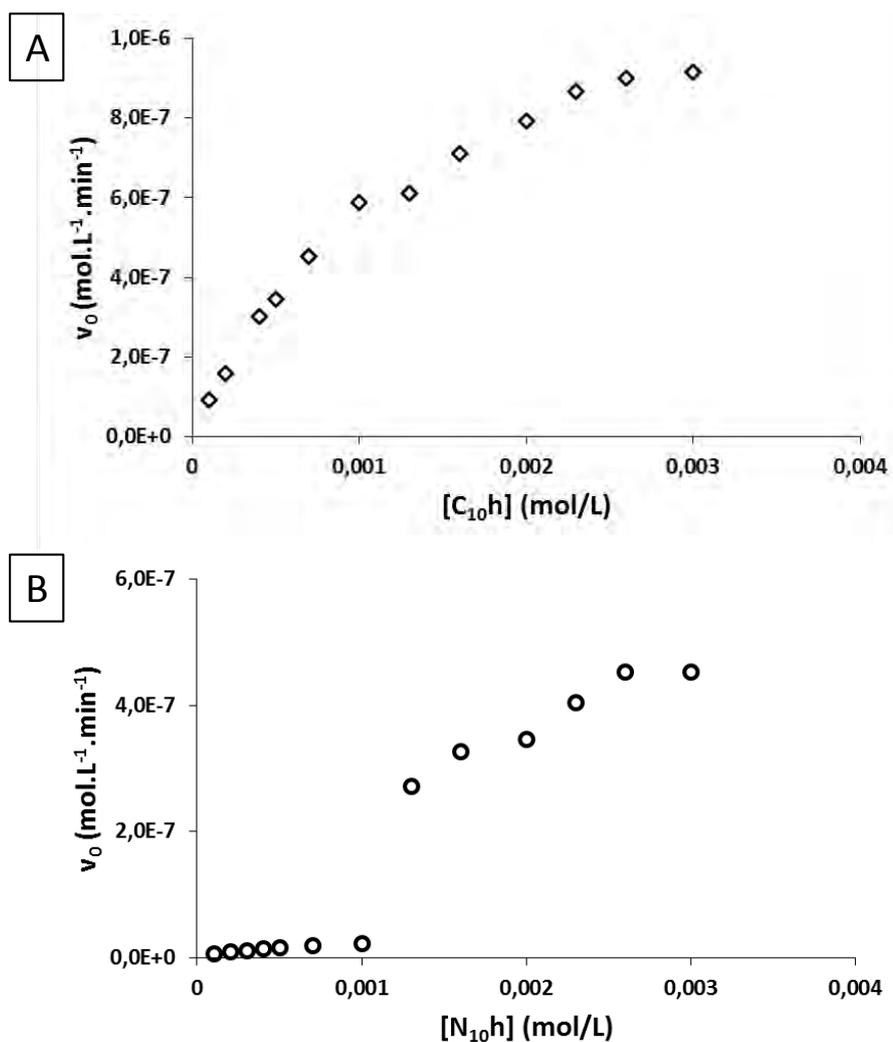


Figure III-18 : Etude de la variation des vitesses initiales d'hydrolyse en fonction de la concentration en lipopeptides C_{10}h (A) et N_{10}h (B)

Le profil obtenu en présence du lipopeptide C_{10}h introduit en excès correspond à une catalyse chimique classique, sans doute nucléophile, pour laquelle la vitesse initiale croît lorsqu'on augmente la concentration en catalyseurs (Figure III-18.A).³⁰ Cette vitesse s'atténue par la suite car le catalyseur est introduit en de telles proportions qu'il n'y a plus suffisamment d'ester disponible pour l'hydrolyse, ce dernier étant déjà monopolisé par d'autres molécules de catalyseurs.

En revanche, le profil obtenu avec le lipopeptide N_{10}h est nettement différent (Figure III-18.B). Les vitesses d'hydrolyse sont très faibles pour des concentrations en lipopeptides comprises entre 0,1 et 1 mM. Au-delà de cette concentration, une nette augmentation de la vitesse initiale d'hydrolyse du $p\text{NPA}$ est observée pour finalement atteindre une sorte de valeur plateau. Cette concentration est sensiblement égale à la CAC du lipopeptide. Dans les conditions où N_{10}h est introduit en excès ($[\text{N}_{10}\text{h}]/[p\text{NPA}]$ compris entre 1 et 30), il apparaît que

le lipopeptide améliore considérablement ses propriétés hydrolytiques lorsqu'il se trouve à l'état agrégé. Ces agrégats doivent alors faire bénéficier au substrat de leur cœur hydrophobe. Le lipopeptide **C_{10h}** semble en revanche participer à la catalyse essentiellement par une interaction chimique (intervention nucléophile de l'imidazole) et son état d'agrégation ne semble pas influencer sur l'efficacité de l'hydrolyse. On rejoint alors l'hypothèse faite plus tôt, au sujet d'une hydrolyse à l'interface dans le cas des lipopeptides **C_{10h}** et au cœur des fibres pour le lipopeptides **N_{10h}** (Figure III-10).

Pour conclure et résumer les différentes études précédentes, il apparaît que, pour une longueur de chaîne donnée, les lipopeptides C-ter à base d'histidine sont de meilleurs catalyseurs que les structures N-terminales. Il a été suggéré que l'ammonium terminal de ces derniers participait avec l'imidazole à des interactions faibles stabilisantes qui freineraient alors l'hydrolyse du *p*NPA. D'autre part, un suivi par spectrophotométrie UV à 245 nm a permis de mettre en évidence la formation d'un composé intermédiaire, caractéristique d'une catalyse nucléophile. La réactivité supérieure des lipopeptides C-ter a également souligné la présence éventuelle d'un phénomène de saturation : l'imidazole introduit dans la structure de ces catalyseurs formerait une liaison covalente avec le substrat qui serait par la suite lentement hydrolysé. Enfin, il a été constaté que les lipopeptides étaient meilleurs catalyseurs à l'état monomère que sous forme d'agrégats.

Néanmoins, pour une faible concentration en substrats (0,1 mM), une influence de l'auto-organisation a été constatée pour le lipopeptides **N_{10h}**. Les vitesses initiales se sont trouvées décuplées lorsque le lipopeptide passait de sa forme monomère à un état d'agrégation, soulignant alors que le substrat doit bénéficier dans ces conditions du phénomène de confinement et de concentration des réactifs au sein du cœur hydrophobe des fibres obtenues. Ces conditions correspondent davantage à une catalyse supramoléculaire, avec un excès de catalyseur, comparées aux proportions usuelles en organocatalyse (jusqu'à 20 à 30 % en moyenne). Les proportions pourraient cependant être davantage variées pour essayer à la fois de satisfaire des quantités organocatalytiques (30 % de catalyseur par exemple) et de bénéficier du cœur hydrophobe des systèmes auto-organisés. En effet, l'utilisation de nanofibres à base d'histidine reste prometteuse puisque les interactions faibles, entre acides aminés d'une part et zones plus hydrophobes d'autre part, qui régissent l'auto-organisation peuvent s'apparenter aux interactions peptidiques responsables du repliement des protéines. Ces similitudes de conformations entre enzymes et nanofibres à base de peptides amphiphiles illustrent une nouvelle étape vers une approche biomimétique. Cet aspect a d'ailleurs été récemment étudié

sur l'hydrolyse du *p*NPA avec des systèmes peptidiques plus complexes à mettre en œuvre.^{31,32} Les fibres à base d'histidine obtenues ont démontré leur potentiel catalytique vis-à-vis de l'hydrolyse de l'ester.

III. Extension à d'autres esters modèles

Le phénomène interfacial qui semble avoir lieu lors de l'hydrolyse du *p*NPA en présence du lipopeptide **N10h** mais non décelé avec **C10h** nous a conduit à poursuivre les essais catalytiques afin d'étudier si cette tendance s'applique à d'autres substrats plus hydrophobes. Il a donc été entrepris de suivre et de comparer l'hydrolyse de l'acétate de *p*-nitrophényle (*p*NPA) à l'octanoate de *p*-nitrophényle (*p*NPO) et au benzoate de *p*-nitrophényle (*p*NPB) (Figure III-19).

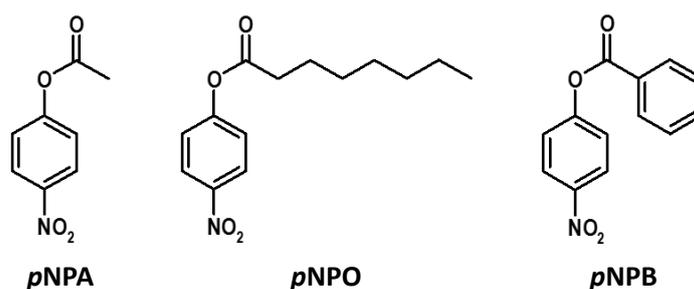


Figure III-19 : Structures des substrats étudiés

Les structures des esters étudiés indiquent nettement leur caractère hydrophobe. D'un point de vue expérimental, le *p*NPO est un liquide soluble dans l'acétonitrile, ce qui permet d'adapter le protocole des études précédentes à ce substrat. En revanche, la solubilité du *p*NPB dans l'acétonitrile est relativement faible. Ainsi, pour conserver néanmoins les conditions opératoires des essais précédents, il a été choisi de se placer à une concentration finale en ester de 0,05 mM, tandis que les lipopeptides **N10h** et **C10h** étaient maintenus dans leurs conditions d'agrégation à 2 mM.

- Etude de l'activité du lipopeptide C10h

Dans un premier temps, l'hydrolyse des trois esters en présence de **C10h** présente des résultats très différents selon les substrats mis au contact des fibres de lipopeptide (Figure III-20).

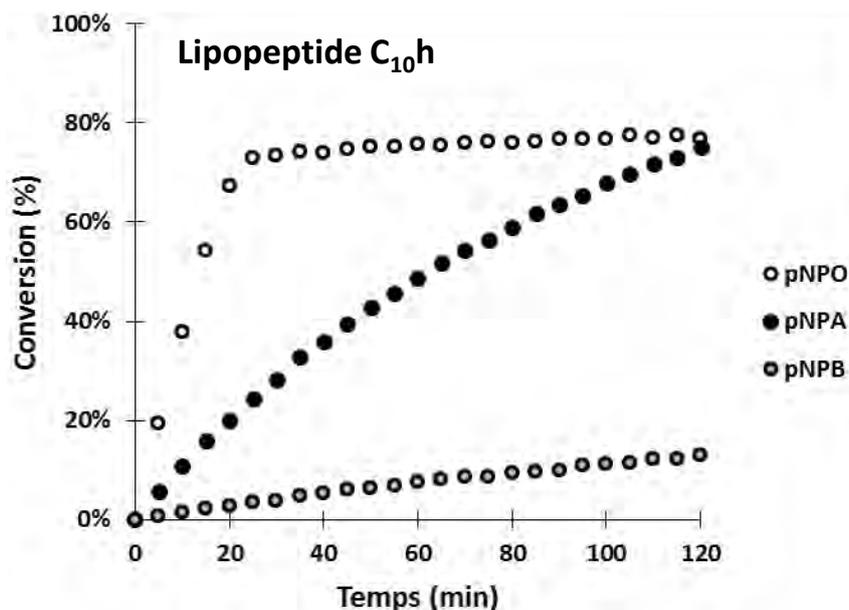


Figure III-20 : Hydrolyse des différents esters ($C_0 = 0,05$ mM) en présence du lipopeptide C_{10h} à 2 mM en tampon HEPES 50 mM

Après deux heures de réaction, le lipopeptide a permis la conversion de la même quantité de *pNPA* et *pNPO* (76 %), seulement les profils d'hydrolyse sont sensiblement différents. En effet, l'hydrolyse du *pNPA* est non linéaire mais la rupture de pente est relativement faible tandis qu'on constate pour l'hydrolyse du *pNPO* une hydrolyse initiale très brusque qui permet d'atteindre les 76 % de conversion en seulement 20 minutes. Au-delà, la conversion du *pNPO* ne semble plus évoluer.

Ces différences de profils pourraient s'expliquer par une différence de réactivité du lipopeptide en fonction des esters. Il est possible que la formation du complexe octylimidazole ainsi que son hydrolyse ultérieure soient des étapes plus rapides et plus favorables que dans le cas du *pNPA*. De plus, le *pNPO* étant relativement hydrophobe, il viendrait préférentiellement se localiser dans les zones hydrophobes de C_{10h} et subir une hydrolyse plus efficace en milieu confiné. En revanche, la chaîne carbonée de l'octanoate produit pourrait présenter une forte affinité pour les chaînes du lipopeptide qui constituent le cœur hydrophobe des fibres. Cette occupation du cœur des fibres par les chaînes octyles empêcherait alors l'incorporation des 25 % de substrat qu'il reste à hydrolyser. Pour comparaison, le *pNPA* est un ester moins hydrophobe et sa solubilité partielle en milieu aqueux¹⁰ l'incite à se partager entre les zones hydrophobes des systèmes organisés et le milieu aqueux. De ce fait, il ne bénéficie pas du rôle de nanoréacteurs que peuvent prendre les fibres de C_{10h} . Enfin, en ce qui concerne le *pNPB*, l'hydrolyse est bien moins efficace avec 13 % de conversion après deux heures de réaction. Il peut là encore s'agir d'une différence de réactivité : la formation du benzylimidazole serait beaucoup moins favorable, ce qui limiterait l'avancement de la réaction. Parallèlement, il est

possible que ce substrat soit trop hydrophobe ou de trop grande taille (à cause de ses deux cycles aromatiques plus rigides) pour être localisé en quantité considérable dans les zones les plus hydrophobes des agrégats. Ainsi, son hydrolyse est peu améliorée par le phénomène de confinement généré par les systèmes organisés et son hydrolyse en solution aqueuse reste très limitée car le substrat reste essentiellement en dispersion dans l'eau.

- **Etude de l'activité du lipopeptide N₁₀h**

Dans un second temps, la même comparaison a été réalisée en présence du lipopeptide N₁₀h (Figure III-21).

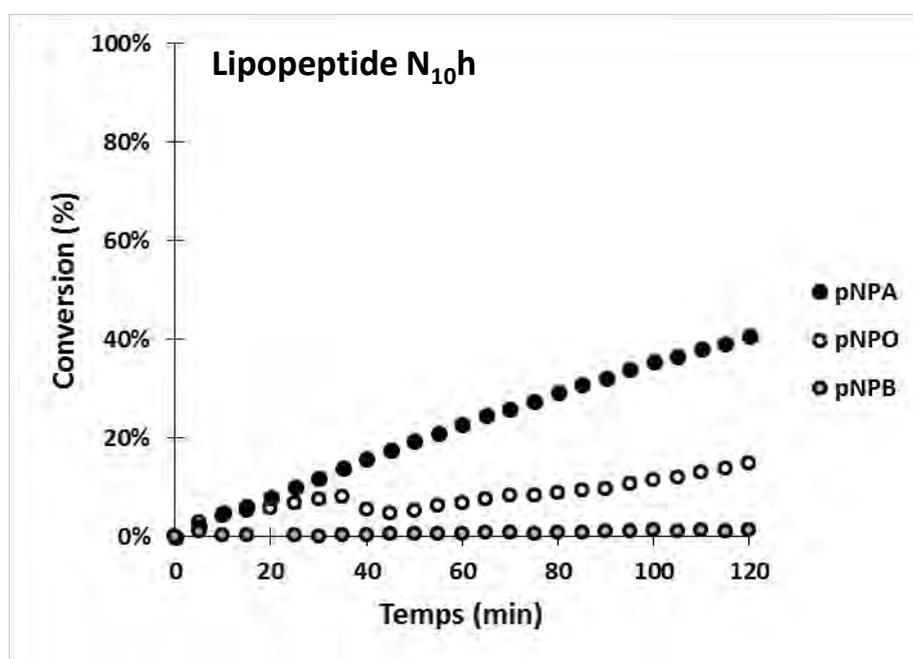


Figure III-21 : Hydrolyse des différents esters ($C_0 = 0,05$ mM) en présence du lipopeptide N₁₀h à 2 mM en tampon HEPES 50 mM

Le premier constat par rapport aux résultats obtenus consiste à dire que l'activité hydrolytique des agrégats de N₁₀h est nettement plus faible que celle de C₁₀h. D'une part, aucune conversion significative du pNPB n'est observée, ceci laissant à penser qu'il n'est pas incorporé dans les agrégats formés par N₁₀h, contrairement au pNPA. Par ailleurs, l'hydrolyse du pNPA et du pNPO est également fortement réduite puisqu'après deux heures de réaction, les taux de conversion obtenus valent respectivement 41 % et 15 %, contre 76 % obtenus précédemment en présence de C₁₀h. Ces deux substrats ne bénéficient pas de la même activité hydrolytique que celle apportée par le lipopeptide C-ter. Or il s'agit dans les deux cas de réseaux fibreux, ce qui laisse à penser que la géométrie des agrégats et les phénomènes de surface ne peuvent suffire à expliquer là encore une telle différence. Il est en revanche possible que la

charge du lipopeptide joue un rôle sur l'incorporation des substrats au sein des systèmes organisés et/ou sur leur activité catalytique, comme cela a précédemment été rapporté pour des systèmes micellaires neutres de Triton X100, meilleurs catalyseurs que les micelles cationiques de CTAB ou anioniques de SDS.³³

Ces résultats soulignent une nouvelle fois la meilleure réactivité des structures C-terminales des lipopeptides.

IV. Conclusion

Pour conclure, ce troisième chapitre a mis en évidence les propriétés hydrolytiques des lipopeptides à base d'histidine. La chaîne alkyle de ces composés joue un rôle positif sur la catalyse de la réaction d'hydrolyse du *p*NPA, probablement due à des interactions hydrophobes avec le substrat qui rendent plus favorable l'approche du substrat vers le site catalytique que constitue l'histidine. Par ailleurs, lorsque l'on augmentait le caractère hydrophobe des lipopeptides (de 8 à 10 carbones), conduisant à leur auto-organisation, il a été observé une catalyse moins efficace que pour un même lipopeptide à l'état monomère. Ce résultat est peut être lié à une trop grande affinité entre le cœur hydrophobe de nos catalyseurs et les réactifs ou produits de la réaction d'hydrolyse. Par ailleurs, les structures C-terminales des lipopeptides se sont révélées les composés les plus efficaces pour catalyser l'hydrolyse du *p*NPA. Cela a été associé au rôle des fonctions terminales des lipopeptides C-ter et N-ter. En effet, si la fonction carboxylate des composés C-ter pourrait contribuer à améliorer la réactivité du site basique et nucléophile de l'histidine, l'ammonium des lipopeptides N-ter est en revanche incapable d'accroître cette réactivité et pourrait même s'engager dans des interactions stabilisantes avec le substrat sans garantir son hydrolyse. Enfin, en ce qui concerne les lipopeptides auto-organisés, une variation des concentrations en catalyseur a mis en évidence la nette amélioration des propriétés catalytiques de **N_{10h}** au-dessus de sa CAC, suggérant une réactivité localisée au sein des agrégats pour **N_{10h}** tandis que dans le cas de **C_{10h}**, on assisterait à une réactivité chimique sans doute à la surface de l'agrégat.

Par la suite, plusieurs pistes visant à améliorer les propriétés catalytiques de nos systèmes pourraient être envisagées. Tout d'abord, l'introduction d'acides aminés différents qui viendraient compléter l'action de l'histidine semble bénéfique, notamment pour espérer raccourcir les temps de réaction. Il est alors possible à la fois de modifier la séquence peptidique des lipopeptides, ou d'associer ceux déjà conçus en formant aisément un catanionique avec de

nouvelles molécules portant quelques acides aminés que l'on retrouve dans les sites actifs d'hydrolases. Une seconde voie d'amélioration consisterait à faire varier la nature des interfaces des lipopeptides. Nous avons pour le moment pu observer l'activité catalytique de réseaux fibreux, il serait pertinent de pouvoir tester d'autres géométries d'agrégats pour évaluer et comparer leur potentiel catalytique à celui des fibres. Cet aspect est là encore plutôt accessible puisqu'on peut espérer faire varier la nature des agrégats formés par les lipopeptides déjà synthétisés en les mettant en présence de différents contre-ions, dont on connaît la capacité à influencer sur les interfaces créées. Aussi, la capacité de certains lipopeptides (**N_{10h}** et **C_{10sh}** notamment) à former des gels incite à évaluer ces agrégats denses et très structurés en tant que catalyseur, des travaux sur un dérivé amphiphile à base de proline ayant déjà souligné le potentiel catalytique de telles architectures.^{34,35}

Par ailleurs, nous avons cherché à évaluer les propriétés catalytiques des lipopeptides sur l'hydrolyse d'esters de phosphate. Des essais préliminaires sur l'hydrolyse du *p*-nitrophénylphosphate ont mis en évidence des cinétiques d'hydrolyse extrêmement lentes. Cela est cohérent avec la littérature qui rapporte la mise en œuvre de conditions de réaction plus drastiques pour étudier l'hydrolyse des esters de phosphate, en travaillant notamment à des températures bien plus hautes.^{36,37} Cependant, il a déjà été rapporté qu'un simple dipeptide était capable d'hydrolyser le *p*NPA et l'ADN.³⁸ Ces résultats nous ont conduits à étendre notre étude à ce substrat d'intérêt biologique, en supposant que la plus grande complexité, la densité de charges et la configuration particulière prise par un tel substrat feront place à des interactions et une réactivité sans doute différentes des esters modèles.

V. Références

- (1) Brenner, C. *Biochemistry* **2002**, *41* (29), 9003–9014.
- (2) Sussman, J. L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I. *Science* **1991**, *253* (5022), 872–879.
- (3) Eun, H.-M. *Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology*; San Diego: Academic Press, 1996.
- (4) Roche, J. *Experientia* **1946**, *2* (9), 325–336.
- (5) Jansson, M.; Olsson, H.; Pettersson, K. In *Phosphorus in Freshwater Ecosystems*; Springer, 1988; pp 157–175.
- (6) Head, M. B.; Mistry, K. S.; Ridings, B. J.; Smith, C. A.; Parker, M. J. *J. Chem. Educ.* **1995**, *72* (2), 184–186.
- (7) Anderson, J.; Byrne, T.; Woelfel, K. J.; Meany, J. E.; Spyridis, G. T.; Pocker, Y. *J. Chem. Educ.* **1994**, *71* (8), 715–718.
- (8) Goren, H. J.; Fridkin, M. *Eur. J. Biochem.* **1974**, *41* (2), 263–272.
- (9) Fridkin, M.; Goren, H. J. *Eur. J. Biochem.* **1974**, *41* (2), 273–283.
- (10) Head, M. B.; Mistry, K. S.; Ridings, B. J.; Smith, C. A.; Parker, M. J. *J. Chem. Educ.* **1995**, *72* (2), 184.
- (11) Xu, L.-W.; Lu, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (12), 2047–2053.
- (12) Mase, N.; Barbas, III, C. F. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (18), 4043–4050.
- (13) Dwars, T.; Paetzold, E.; Oehme, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (44), 7174–7199.
- (14) Miao, X.; Cao, W.; Zheng, W.; Wang, J.; Zhang, X.; Gao, J.; Yang, C.; Kong, D.; Xu, H.; Wang, L.; Yang, Z. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (30), 7781–7785.
- (15) Guler, M. O.; Stupp, S. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (40), 12082–12083.
- (16) Liao, S.-M.; Du, Q.-S.; Meng, J.-Z.; Pang, Z.-W.; Huang, R.-B. *Chem. Cent. J.* **2013**, *7*, 44, 1–12.
- (17) Moyer, T. J.; Finbloom, J. A.; Chen, F.; Toft, D. J.; Cryns, V. L.; Stupp, S. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (42), 14746–14752.
- (18) Silvera-Batista, C. A.; Ziegler, K. J. *Langmuir* **2011**, *27* (18), 11372–11380.
- (19) Bender, M. L.; Kézdy, F. J.; Wedler, F. C. *J. Chem. Educ.* **1967**, *44* (2), 84–88.
- (20) Gutfreund, H.; Sturtevant, J. M. *Biochem. J.* **1956**, *63* (4), 656–661.
- (21) Li, J.-J.; Bugg, T. D. H. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5* (3), 507–513.
- (22) Breslow, R.; Dong, S. D. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (5), 1997–2011.
- (23) Polgár, L. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62* (19-20), 2161–2172.

- (24) Tsuchiya, T.; Suzuki, T.; Yamada, T.; Shimada, H.; Masuda, T.; Ohta, H.; Takamiya, K.-I. *Plant Cell Physiol.* **2003**, *44* (1), 96–101.
- (25) Okuda, H.; Imae, T.; Ikeda, S. *Colloids Surf.* **1987**, *27* (1–3), 187–200.
- (26) Lombardo, A. *J. Chem. Educ.* **1982**, *59* (10), 887–888.
- (27) Kodaka, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1983**, *56* (12), 3857–3858.
- (28) Bender, M. L.; Turnquest, B. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79* (7), 1652–1655.
- (29) Zhil'tsova, E. P.; Gimranova, R. F.; Lukashenko, S. S.; Pashirova, T. N.; Kharlampidi, K. E.; Zakharova, L. Y. *Kinet. Catal.* **2013**, *54* (5), 552–558.
- (30) Mayr, H.; Lakhdar, S.; Maji, B.; Ofial, A. R. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 1458–1478.
- (31) Zhang, C.; Xue, X.; Luo, Q.; Li, Y.; Yang, K.; Zhuang, X.; Jiang, Y.; Zhang, J.; Liu, J.; Zou, G.; Liang, X.-J. *ACS Nano* **2014**, *8* (11), 11715–11723.
- (32) Huang, Z.; Guan, S.; Wang, Y.; Shi, G.; Cao, L.; Gao, Y.; Dong, Z.; Xu, J.; Luo, Q.; Liu, J. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1* (17), 2297–2304.
- (33) Ghosh, P. P.; Mukherjee, P.; Das, A. R. *RSC Adv.* **2013**, *3* (22), 8220–8226.
- (34) Rodríguez-Llansola, F.; Miravet, J. F.; Escuder, B. *Chem. Commun.* **2009**, No. 47, 7303–7305.
- (35) Díaz-Oltra, S.; Berdugo, C.; Miravet, J. F.; Escuder, B. *New J. Chem.* **2015**, *39* (5), 3785–3791.
- (36) Hopkins Jr, H. P.; Mather, J. H. *J. Chem. Educ.* **1972**, *49* (2), 126–127.
- (37) Miller, J. F.; Cory, J. G. *J. Chem. Educ.* **1971**, *48* (7), 475–475.
- (38) Li, Y.; Zhao, Y.; Hatfield, S.; Wan, R.; Zhu, Q.; Li, X.; McMills, M.; Ma, Y.; Li, J.; Brown, K. L.; others. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8* (12), 2675–2680.

CHAPITRE IV

Etude des interactions lipopeptides- ADN et de leur rôle sur l'hydrolyse de l'ADN

SOMMAIRE

I. Introduction	122
II. Etude des interactions lipopeptides-ADN	124
II. 1. <i>Suivi du phénomène d'intercalation du bromure d'éthidium</i>	127
II. 2. <i>Etude des interactions dans le petit sillon du double brin d'ADN</i>	132
II. 3. <i>Suivi de l'auto-organisation des lipopeptides en présence d'ADN</i>	136
III. Etude des propriétés hydrolytiques des lipopeptides sur l'ADN	139
III. 1. <i>Mise en évidence du clivage de l'ADN et influence de la longueur de la chaîne carbonée</i>	141
III. 2. <i>Influence de la nature de la tête polaire sur le clivage de l'ADN</i>	144
III. 3. <i>Etude du clivage de l'ADN en présence d'un catanionique</i>	146
III. 4. <i>Variation du rapport lipopeptide/ADN</i>	147
IV. Conclusion	150
V. Références	152

I. Introduction

L'ADN, acide désoxyribonucléique, est un assemblage supramoléculaire de deux brins constitués de séquences de nucléotides complémentaires et formant une double hélice. Cette structure de double hélice a été déterminée pour la première fois par Watson et Crick.¹ Chaque nucléotide est constitué d'une des quatre bases azotées (adénine, cytosine, guanine, thymine) liée à un cycle désoxyribose puis à un groupement phosphate. L'enchaînement des nucléotides est ensuite réalisé par liaison covalente entre le pentose d'un premier nucléotide et les phosphates d'un second, tandis que l'assemblage des deux brins en hélice se produit grâce aux liaisons hydrogène entre les bases complémentaires et aux interactions de type π -stacking (Figure IV-1 a)).

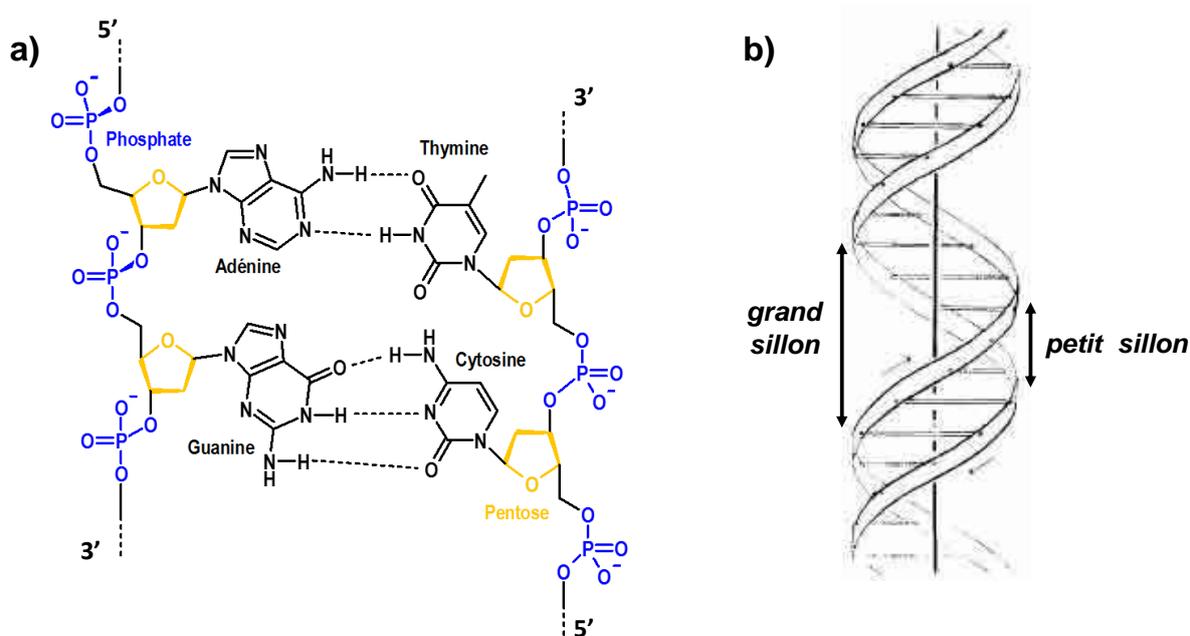


Figure IV-1 : Structure de l'ADN. a) Présentation des différents nucléotides qui composent l'ADN et illustration des liaisons faibles (---) entre les paires de bases complémentaires formant la double hélice. b) Structure de la double hélice publiée par Watson et Crick.

Le squelette sucre-phosphate est à l'extérieur de la double hélice et les bases se projettent vers l'intérieur, faisant ainsi apparaître un petit et un grand sillon (Figure IV-1 b)). Ce polyélectrolyte anionique, support de l'information génétique, représente un défi en matière de manipulation et d'altération, dû à sa complexité et à l'information génétique qu'il fournit. Ainsi, parmi les domaines de recherche associés à l'utilisation des acides nucléiques, le génie génétique a sollicité d'une part le développement de systèmes moléculaires capables de mimer

l'activité des enzymes présentes dans l'environnement de l'ADN comme les ligases ou nucléases.² D'autre part, la manipulation de l'information génétique requiert la conception d'outils de purification³ et de vectorisation⁴ pour conduire un ADN intact jusqu'aux séquences à modifier ou à réguler.

Le développement de tensioactifs cationiques pour interagir avec l'ADN a démontré de plus en plus d'intérêt ces dernières décennies. En effet, l'ADN étant un polyélectrolyte anionique, celui-ci a la capacité d'interagir avec différentes espèces cationiques parmi lesquelles se retrouvent les amphiphiles cationiques. Ces derniers présentent une affinité certaine avec l'ADN grâce à des interactions hydrophobes et électrostatiques.^{5,6} Il y a alors d'une part déplacement des ions sodium entourant l'ADN grâce à l'intervention de la tête polaire cationique et d'autre part interactions hydrophobes entre les chaînes alkyles du composé amphiphile conduisant à la formation de complexes entre l'ADN et le tensioactif.⁷⁻¹⁰ Les nombreuses études publiées ces dernières années ont essentiellement contribué à décrire les interactions entre l'ADN et des tensioactifs commerciaux comme les sels d'alkylammonium. Elles consistaient alors à montrer l'influence de l'ajout de tensioactifs cationiques sur la compaction de l'ADN induite soit par un phénomène d'agrégation des tensioactifs sur l'ADN, soit uniquement par auto-organisation des amphiphiles. Au-delà de ces études d'interactions, les tensioactifs cationiques ont été développés en vectorisation comme alternatives aux vecteurs viraux. Bien que très efficaces, l'emploi de vecteurs viraux est parfois limité par de potentielles préoccupations de sécurité biologique et une capacité restreinte à délivrer des quantités importantes de matériel génétique.^{11,12} C'est pourquoi des vecteurs non-viraux sont désormais conçus en tant qu'agents de transfection plus sûrs et moins coûteux. Récemment, des tensioactifs cationiques et plus particulièrement des lipopeptides se sont avérés de bons candidats en tant qu'outils non-viraux pour la vectorisation. Pour exemple, il a notamment été mis au point par Tarwadi et ses collaborateurs une série de lipopeptides à base d'histidine et de lysine démontrant une efficacité de transfection similaire aux agents disponibles commercialement.¹³ L'histidine favorise alors le processus de libération de l'ADN grâce à ses propriétés légèrement basiques et à un changement de pH du milieu.

En ce qui concerne notre étude, les lipopeptides à base d'histidine ont plutôt mis en évidence les propriétés organocatalytiques de l'histidine vis-à-vis de réactions d'hydrolyse. Par ailleurs, il a été rapporté qu'un simple dipeptide sérine-histidine était capable d'hydrolyser efficacement les liaisons ester ainsi que les liaisons phosphodiester de l'ADN.¹⁴ Ce quatrième chapitre vise alors dans un premier temps à étudier les interactions entre nos lipopeptides (essentiellement cationiques) et l'ADN puis dans un second temps à poursuivre l'étude de

l'activité catalytique des lipopeptides appliquée au clivage de l'ADN, en s'inscrivant alors dans le développement de nouveaux systèmes, mimes de nucléases. Ce type d'étude pourrait alors s'avérer nécessaire lorsque des vecteurs à base d'histidine sont conçus, afin de maintenir la stabilité de l'ADN lors du processus de transfection.

II. Etude des interactions lipopeptides-ADN

L'étude des interactions entre les tensioactifs cationiques et l'ADN ont à ce jour essentiellement concerné des amphiphiles commerciaux de type alkylammonium. Il s'agit donc ici d'apporter un aperçu nouveau sur les interactions que l'ADN peut partager avec une nouvelle gamme de composés cationiques que constituent nos lipopeptides. Ces derniers sont présentés en Figure IV-2.

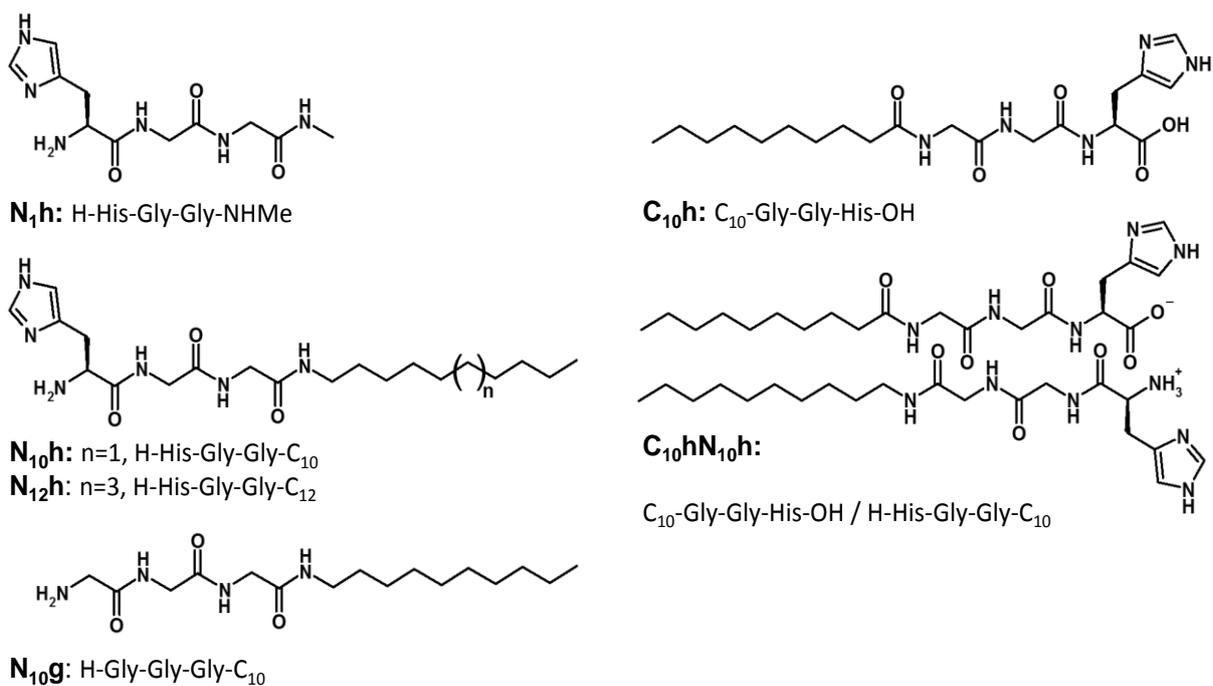


Figure IV-2 : Structures des lipopeptides sélectionnés pour l'étude des interactions tensioactif-ADN

Ainsi, il a essentiellement été choisi des lipopeptides N-ter dotés de fonctions amines, précurseur d'ammonium, pour assurer les interactions avec le polyélectrolyte négatif, mais également un lipopeptide C-ter, le **C₁₀h**, chargé partiellement négativement car la fonction carboxylique à pH 7 est totalement déprotonée alors que l'imidazole (pKa = 7,2) reste seulement partiellement chargée positivement. Ce composé servira de contrôle. Enfin, le

catanionique **C_{10h}N_{10h}** a également été étudié pour évaluer l'ajout d'une contribution hydrophobe ainsi que d'une histidine supplémentaire sur les processus d'association. Pour mener les études d'interaction entre ADN et amphiphiles cationiques, il est également primordial de se fixer une concentration en ADN, correspondant à celle choisie par la suite pour l'étude des propriétés hydrolytiques des lipopeptides. En effet, selon la concentration en ADN, les mécanismes d'interactions entre les tensioactifs cationiques et le double brin ne sont pas de même nature.

Des travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire ont notamment permis de mettre en évidence expérimentalement une distinction dans les mécanismes d'interaction ADN-tensioactif en fonction de la concentration en ADN.¹⁵ Ainsi, pour des concentrations en acide nucléique relativement faibles, la complexation ne dépend pas de la concentration en ADN (Figure IV-3, région I). Dans cette région, l'ADN est simplement responsable de l'agrégation des tensioactifs, celle-ci se produisant à une certaine concentration dite concentration d'agrégation critique de tensioactif sur l'ADN (CAC_{TA}^{ADN}), généralement plus faible que la concentration d'agrégation critique du tensioactif en l'absence d'acide nucléique. Cela correspond alors, dans le cas du CTAB par exemple, à une formation « précoce » de micelles de tensioactif cationique au contact du polyélectrolyte négatif, induite essentiellement par des interactions hydrophobes.

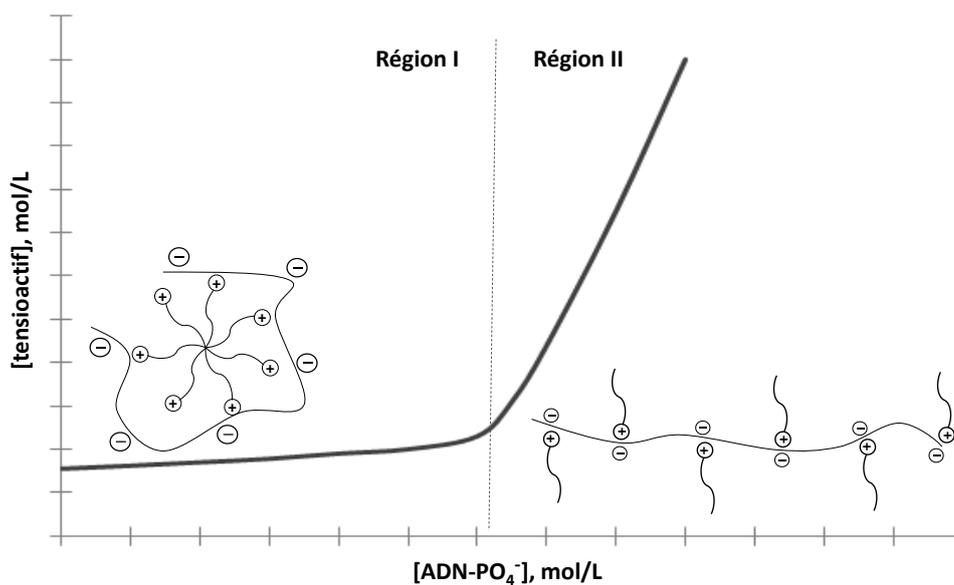


Figure IV-3 : Diagramme des phénomènes de complexation entre ADN et tensioactifs cationiques

D'autre part, la complexation pour de plus grandes concentrations en ADN suit un processus de neutralisation de charges (Figure IV-3, région II). En effet, si la concentration en

acide nucléique excède la CAC_{TA}^{ADN} , la formation de micelles est défavorisée car les tensioactifs cationiques sont monopolisés par la neutralisation de l'excès de phosphates sur l'ADN. La complexation a alors lieu lorsque tout le phosphate est neutralisé. Elle dépend donc à la fois de la concentration en ADN et des charges présentes sur les molécules de tensioactifs.

Il a précédemment été rapporté que de courtes séquences peptidiques comme le dipeptide sérine-histidine présentaient des propriétés hydrolytiques vis-à-vis de l'ADN.¹⁴ Ainsi, nous avons choisi de travailler à la même concentration à savoir 60 μ M en liaisons phosphodiester ([ADN-PO₄⁻]), afin d'étudier les interactions potentielles entre l'acide nucléique et nos lipopeptides et évaluer les capacités hydrolytiques de nos systèmes catalytiques. L'ADN duplex utilisé pour toute cette étude est un ADN circulaire plasmidique, le pBR322.

- **Caractérisation des interactions ADN-LP**

Des mesures de fluorescence ont par la suite été menées *via* l'utilisation de sondes spécifiques pour localiser et caractériser les interactions qui ont lieu. La **Erreur ! Source du envoi introuvable.** illustre les zones occupées par les sondes de fluorescence. Ainsi, le bromure d'éthidium (BET) a été choisi pour suivre le phénomène d'intercalation entre les paires de base de l'ADN. Par la suite, un composé Hoechst a été utilisé pour mettre en évidence d'éventuels changements dans le petit sillon de l'ADN tandis que l'emploi du pyrène visait à évaluer la capacité des lipopeptides à former des agrégats en présence d'acide nucléique, cette dernière technique permettant alors d'identifier dans quelle région du diagramme se situe notre étude.

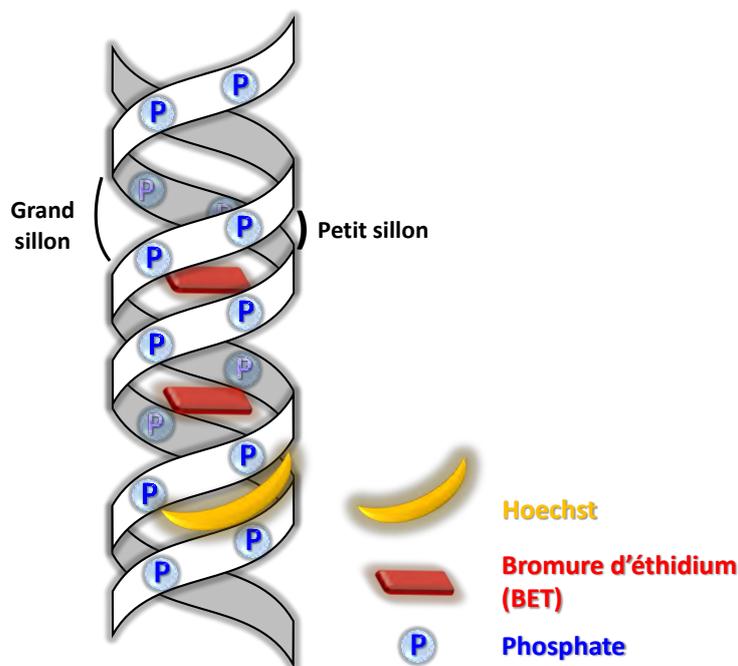


Figure IV-4 : Représentation schématique du double brin d'ADN et du positionnement des sondes de fluorescence dans le petit sillon (Hoechst) ou intercalés entre les paires de bases de l'ADN (BET).

II. 1. Suivi du phénomène d'intercalation du bromure d'éthidium

Le bromure d'éthidium (BET) est un composé polycyclique plan capable de s'insérer entre les paires de bases de l'ADN (Figure IV-5).¹⁶ Cette faculté induit une nette augmentation de son rendement quantique de fluorescence,¹⁷ ce qui justifie son emploi comme sonde des phénomènes d'intercalation. L'ajout d'amphiphiles cationiques sur des solutions d'ADN mis au préalable en présence de BET est connu pour induire des changements structuraux au sein du double brin d'ADN.^{7,18,19} En effet, la compensation de charge apportée par les tensioactifs cationiques grâce aux interactions qu'ils forment avec l'ADN entraîne une diminution des répulsions électrostatiques entre les phosphates, générant alors une légère contraction du double brin. Cette altération est par la suite responsable d'une libération partielle du BET intercalé dans l'ADN,²⁰ celle-ci conduisant à une diminution de l'intensité de fluorescence du BET en milieu aqueux.¹⁷

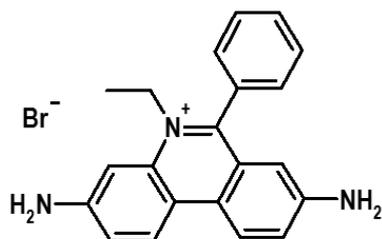


Figure IV-5 : Structure du bromure d'éthidium (BET)

L'étude des interactions entre l'ADN et nos lipopeptides a ensuite été menée de la façon suivante. Tout d'abord, la mesure de l'intensité de fluorescence (I_0) d'une solution initiale d'ADN en présence de BET conduit à un important signal de fluorescence qui coïncide avec l'intercalation du BET entre les paires de base de l'ADN. Par la suite, lorsqu'une diminution de la fluorescence du BET était observée en fonction des ajouts de lipopeptides ($I_n < I_0$), il en était déduit que le complexe ADN-BET était altéré par la présence du lipopeptide et que ce dernier entraînait en interaction avec l'ADN. Au-delà d'une certaine concentration en lipopeptides, aucune variation d'intensité de fluorescence supplémentaire n'est constatée, ce qui laisse suggérer qu'il n'est pas possible de déplacer davantage de BET et que la capacité d'association entre l'ADN et le lipopeptide a atteint ses limites. L'intensité de fluorescence des solutions d'ADN-BET, après normalisation par le signal initial I_0 , est alors tracée en fonction des concentrations en lipopeptides introduits. L'illustration du traitement des données est présentée en Figure IV-6.

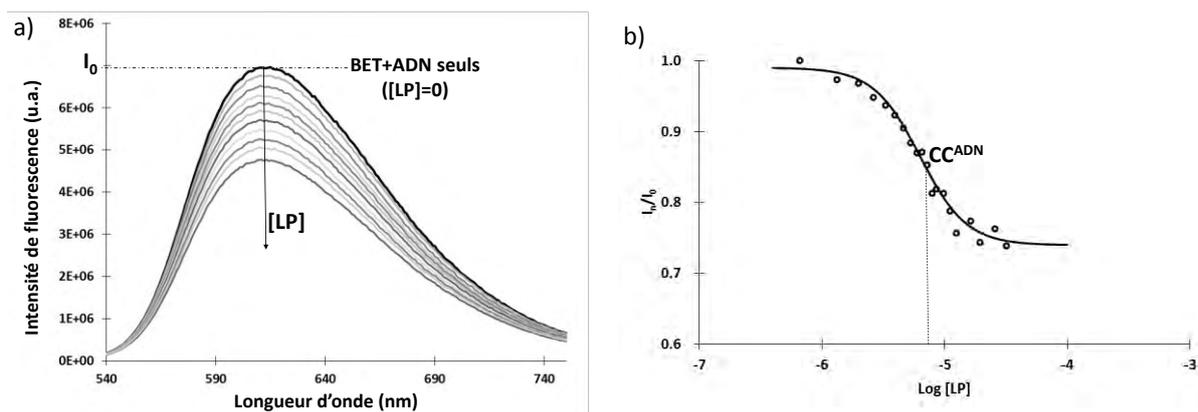


Figure IV-6 : Etude des interactions entre l'ADN et $N_{12}h$ (pour exemple) par fluorescence du BET ($\lambda_{excitation} = 530$ nm). a) Spectres d'émission de fluorescence du BET illustrant la diminution de l'intensité de fluorescence suite aux ajouts de lipopeptides. b) Détermination de la CC^{ADN} à partir des variations d'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en lipopeptides

Un profil sigmoïdal est observé et l'ajustement *via* une fonction de Boltzmann permet la détermination d'une concentration de complexation CC^{ADN} , correspondant au point d'inflexion de la courbe de tendance²¹ et définie comme la concentration pour laquelle il y a complexation entre l'acide nucléique et les lipopeptides. Des profils similaires (Figure IV-7) ont été obtenus pour **N_{10h}** (A), **C_{10h}** (C) et **C_{10h}N_{10h}** (D).

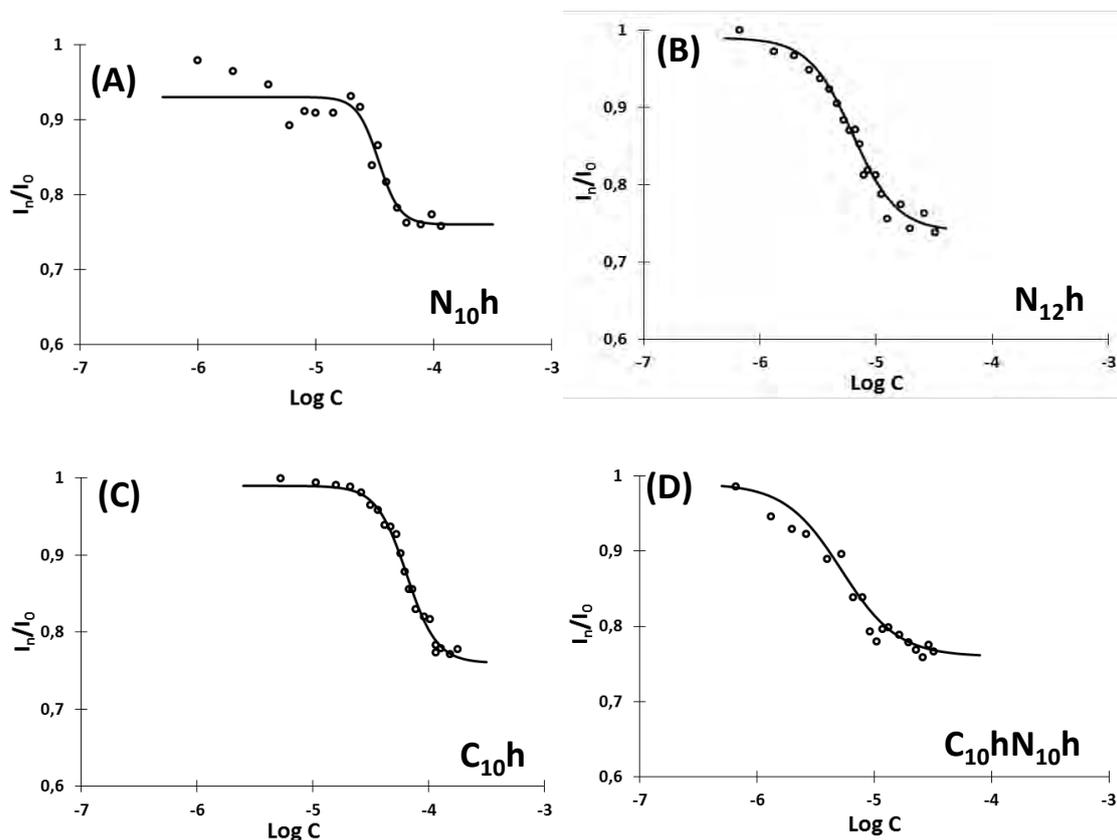


Figure IV-7 : Etude des interactions entre ADN ($[ADN-PO_4] = 60 \mu M$) et lipopeptides **N_{10h}**, **N_{12h}**, **C_{10h}**, et **C_{10h}N_{10h}** par mesures de fluorescence du BET en fonction de la concentration en lipopeptides.

En revanche, aucun changement significatif n'a pu être observé dans l'intensité de fluorescence du BET en présence des lipopeptides **N_{1h}** et **N_{10g}** (Figure IV-8), et pour lesquels aucune concentration de complexation n'a pu être déterminée.

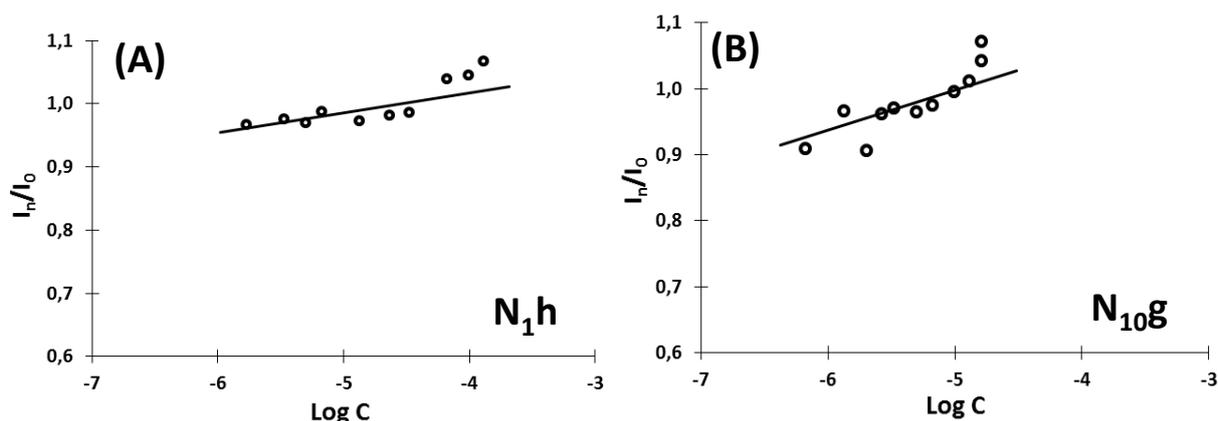


Figure IV-8 : Etude des interactions entre l'ADN ($[\text{ADN-PO}_4^-] = 60 \mu\text{M}$) et les lipopeptides **N_{1h}** et **N_{10g}** par mesures de fluorescence du BET en fonction de la concentration en lipopeptides.

Les valeurs des concentrations de complexation entre les différents lipopeptides et l'ADN sont reportées dans le Tableau IV-1.

Tableau IV-1 : Concentrations de complexation CC^{ADN} et rapports des concentrations LP/ADN à la CC^{ADN} pour chaque lipopeptide

Lipopeptides	CC^{ADN} (μM) ^{(a),(b)}	Ratio LP/ADN ^(c)
N_{1h}	Pas de CC^{ADN}	-
N_{10h}	34 ± 4	0,57
N_{12h}	$6,3 \pm 0,8$	0,11
N_{10g}	Pas de CC^{ADN}	-
C_{10h}	65 ± 6	1,08
C_{10h}N_{10h}	$5,3 \pm 0,7$	0,09

(a) Les interactions ADN-lipopeptides sont étudiées dans un tampon Britton-Robinson 40 mM, pH 7

(b) Déterminées comme le point d'inflexion d'une courbe de tendance de type Boltzmann

(c) Rapport calculé à la concentration de complexation du lipopeptide, pour $[\text{ADN-PO}_4^-] = 60 \mu\text{M}$

- Variation de la longueur de chaîne

Une première comparaison peut être faite entre les lipopeptides cationiques **N_{1h}**, **N_{10h}** et **N_{12h}**. Alors qu'aucune CC^{ADN} n'a pu être observée pour la triade **N_{1h}** dans la gamme de concentration étudiée, nous pouvons en revanche remarquer que pour la même tête polaire, l'augmentation de la longueur de la chaîne grasse des lipopeptides de 10 à 12 carbones provoque une nette diminution de la concentration de complexation, passant ainsi de 34 à 6,3 μM respectivement. Cette tendance suggère que la partie hydrophobe des lipopeptides contribue de manière significative aux interactions avec l'ADN et donc à la contraction du double brin. Parallèlement, les valeurs des rapports de concentration pour lesquels la CC^{ADN} est atteinte peuvent être discutées.

Pour **N_{10h}**, la complexation a lieu pour un rapport lipopeptide/ADN d'environ 0,5. Or, si l'on considère que **N_{10h}** est doublement chargé positivement *via* sa fonction ammonium et son histidine, un rapport de 0,5 serait synonyme de la neutralisation complète des phosphates de l'ADN. Le pKa de l'imidazole du lipopeptide **N_{10h}** a été précédemment mesuré à 7,2. L'histidine est donc supposée être présente en solution sous sa forme protonée et déprotonée. Cependant, il est possible que le changement d'environnement induit par la présence de l'acide nucléique soit responsable d'une légère modification des propriétés acido-basiques et que l'on soit effectivement en présence d'un lipopeptide doublement chargé. Dans le cas de **N_{12h}**, la complexation avec l'ADN a lieu pour un rapport de 0,11. Cela laisse suggérer qu'en plus des interactions électrostatiques qui gouvernent la neutralisation, la présence des chaînes lipophiles contribue à la stabilisation du complexe et nécessite par conséquent une quantité moins importante de lipopeptides.

- **Nature de la partie hydrophile**

Par ailleurs, l'influence de la tête polaire sur le processus d'interaction avec l'ADN a également été examinée pour une même longueur de chaîne. D'une part, la comparaison entre **N_{10h}** et **N_{10g}** semble mettre en évidence l'importance de l'histidine dans les interactions avec l'ADN. En effet, la triglycine qui constitue la tête polaire de **N_{10g}** ne semble pas être engagée dans des interactions suffisamment robustes avec l'ADN pour provoquer le déplacement du BET en dehors des paires de bases alors que cette exclusion a été observée en présence de **N_{10h}**. Il est donc vraisemblable que l'histidine vienne renforcer les interactions avec l'acide nucléique grâce à une compensation de charge partielle, et éventuellement des liaisons de type π -stacking ou des interactions en forme de T.²²⁻²⁵ En effet, les cycles des histidines peuvent interagir soit face à face (π -stacking), soit créer des liaisons hydrogène en se positionnant perpendiculairement l'un par rapport à l'autre (en forme de T).

D'autre part, la charge globale de la tête polaire des lipopeptides peut également être comparée, notamment entre **C_{10h}** et **N_{10h}**. Une concentration de complexation de 65 μ M a été déterminée dans le cas de **C_{10h}**, qui est alors quasiment deux fois plus grande que celle du dérivé N-ter. Cette différence peut s'expliquer par un phénomène de répulsion entre les fonctions carboxylate du lipopeptide et les nombreux groupements phosphates de l'acide nucléique. Par ailleurs, en terme de ratio de concentration, il y a globalement un lipopeptide **C_{10h}** par liaison phosphodiester (LP/ADN = 1,08), ce qui laisse suggérer que c'est par l'histidine de chaque amphiphile peptidique que **C_{10h}** assure sa complexation avec l'ADN *via*

un processus de neutralisation électrostatique.

Enfin, l'étude de la complexation du composé catanionique **C_{10h}N_{10h}** sur l'ADN a conduit à une CC^{ADN} de 5,3 μ M. Ce composé est donc celui qui s'associe le plus facilement avec le double brin, ce qui est cohérent avec les contributions des parties hydrophobes et de l'histidine, à chaque fois doublées par rapport aux lipopeptides monocaténares présentés précédemment.

Il peut également être remarqué que la diminution de l'intensité de fluorescence reste modeste et n'excède pas les 25 % ($I_n/I_0 \geq 0,75$), quel que soit le lipopeptide utilisé. Cela confirme l'hypothèse suivie pour cette étude d'exclusion du BET suggérant que les conditions opératoires situent l'étude dans la région II du diagramme ADN-tensioactif (Figure IV-3), à savoir la zone dans laquelle la complexation est dictée par le processus de neutralisation. La compensation de charge locale, responsable de ce mécanisme, induit sans doute une contraction modérée du double brin d'ADN et non une altération majeure du double brin qui aurait pu conduire à davantage de BET déplacé, comme cela a été rapporté dans le cas des alkylammoniums, pour de plus faibles concentration en ADN.¹⁸

Les mesures de fluorescence du BET intercalé dans l'ADN en présence de lipopeptides ont ainsi mis en évidence la complexation de l'acide nucléique avec **N_{10h}**, **N_{12h}**, **C_{10h}** et **C_{10h}N_{10h}**. Ces quatre lipopeptides ont tous pour point commun de contenir à la fois une histidine et une chaîne grasse dans leur structure, contrairement au lipopeptide **N_{10g}** dépourvu d'histidine et **N_{1h}** sans chaîne. Ces résultats soulignent l'importance d'incorporer ces deux critères dans la conception de nos lipopeptides pour garantir la complexation avec l'ADN. Ces observations sont cohérentes avec les données de la littérature, qui soulignent l'importance d'une chaîne hydrophobe^{18,20} et qui rapportent la complexation d'un lipopeptide à base d'histidine avec l'ADN.¹³

II. 2. Etude des interactions dans le petit sillon du double brin d'ADN

Le composé Hoechst 33342 est un dérivé bis-benzimide en forme de croissant capable de se lier au petit sillon du double brin d'ADN, ce qui augmente considérablement son intensité de fluorescence (Figure IV-9). Les composés Hoechst sont d'ailleurs utilisés comme des sondes de fluorescence pour colorer l'ADN dans les cellules.²⁶⁻²⁸

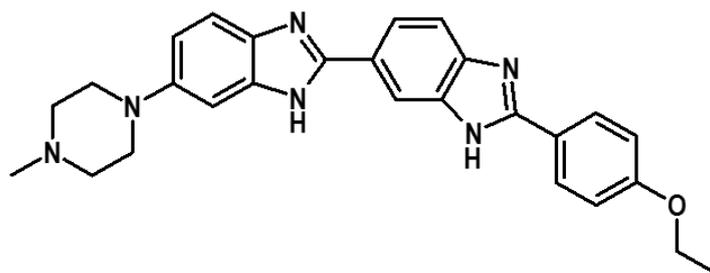


Figure IV-9 : Structure du composé Hoechst 33342

Une altération des interactions Hoechst-ADN au sein du petit sillon pourra alors être détectée, comme dans le cas du BET, par une modification des propriétés de fluorescence. Deux phénomènes peuvent alors induire un changement de fluorescence. Il peut s'agir d'une part d'une interaction compétitive d'un lipopeptide dans le petit sillon qui déplacerait le dérivé bis-benzimidazole en dehors du double-brin, ce déplacement étant alors associé à un changement du maximum d'émission de fluorescence de 465 nm à 510 nm ($\lambda_{\text{excitation}} = 355 \text{ nm}$). D'autre part, une altération au sein de la structure de l'ADN, qui perturberait les interactions du Hoechst dans le petit sillon, pourrait conduire à une diminution de l'intensité de fluorescence. Le suivi de la complexation entre l'acide nucléique et le composé Hoechst a alors été réalisé de façon analogue au traitement des données de fluorescence des complexes ADN-BET. Après acquisition des spectres d'émission de fluorescence des échantillons ADN-Hoechst en présence de lipopeptides, l'intensité de fluorescence au maximum d'émission (465 nm) après normalisation est tracée en fonction de la concentration en lipopeptides.

- Etude des complexes ADN-Hoechst en présence de N_{1h} et N_{10g}

Dans un premier temps, il a été choisi de suivre la complexation entre l'ADN et le composé Hoechst 33342 en fonction des lipopeptides N_{1h} et N_{10g} (Figure IV-10). Ces derniers n'ayant pu démontrer de complexation avec l'ADN en présence de BET, il a été suggéré que ces composés pouvaient se lier à l'ADN au sein du petit sillon sans provoquer de changement majeur dans la structure de l'ADN.

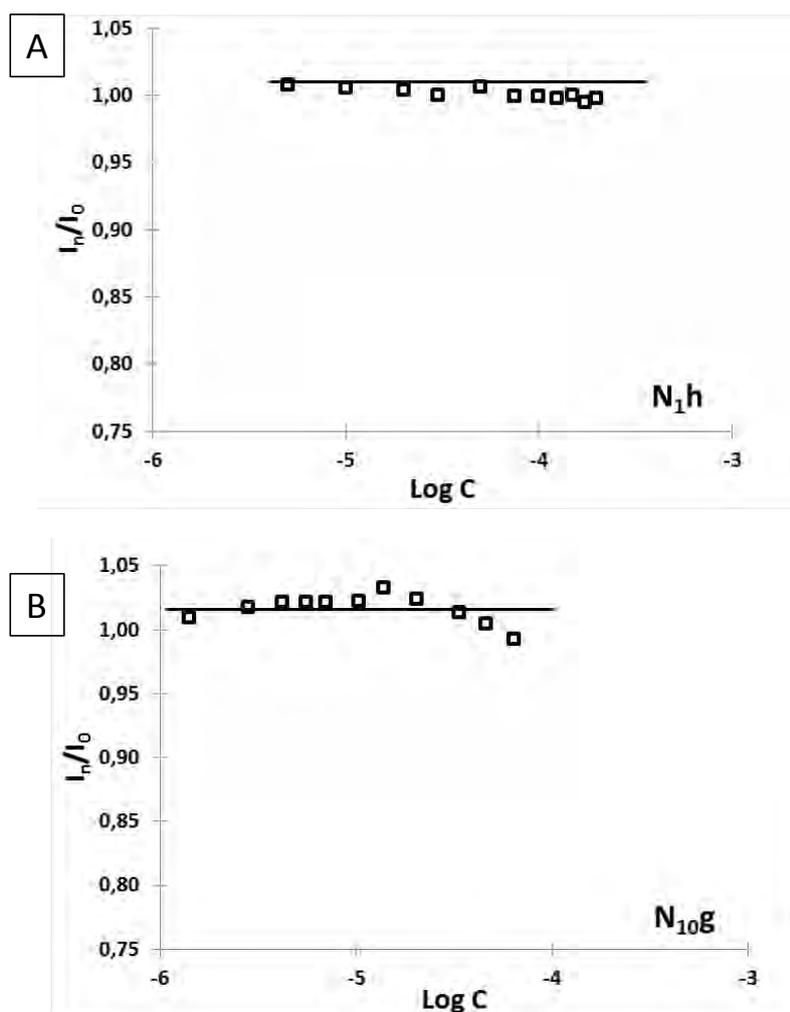


Figure IV-10 : Etude des interactions ADN-Hoechst ($[\text{ADN-PO}_4^-] = 60 \mu\text{M}$): évolution de l'intensité de fluorescence du Hoechst au sein du petit sillon en fonction de la concentration en **N_{1h}** et **N_{10g}**

Les courbes représentant la variation d'intensité de fluorescence des complexes ADN-Hoechst en fonction de la concentration en **N_{1h}** et **N_{10g}** correspondent à des profils linéaires et horizontaux. Ainsi, l'ajout de quantités croissantes de ces deux lipopeptides n'a pas entraîné de changement significatif dans la fluorescence du composé Hoechst, synonyme d'une absence d'altération des interactions du petit sillon avec le dérivé bis-benzimide. Ainsi, les composés **N_{1h}** et **N_{10g}** ne semblent pas présenter d'interactions suffisantes avec l'ADN pour perturber l'environnement du petit sillon et les liaisons qu'il forme avec le Hoechst 33342, ni pour altérer le phénomène d'intercalation du BET entre les paires de bases du double brin comme cela a été décrit précédemment. Ces observations sont valables dans la gamme de concentrations testées, limitées par le protocole d'étude choisi. Il se peut cependant que ces composés s'associent avec l'ADN pour des concentrations supérieures en lipopeptides.

- **Etude des complexes ADN-Hoechst en présence de N_{10h}**

La fluorescence du Hoechst au sein du petit sillon de l'ADN a ensuite été étudiée en présence du lipopeptide N_{10h} pour vérifier si la contraction du double brin, mise en évidence avec le BET et induite par la complexation avec les lipopeptides, pouvait également provoquer une altération du petit sillon (Figure IV-11). Une légère diminution du signal de fluorescence (environ 10 %) a pu être observée en fonction de la concentration en N_{10h} mais aucun déplacement du maximum de fluorescence n'a en revanche été constaté. Ces résultats laissent suggérer que l'environnement du Hoechst est perturbé par la présence des lipopeptides mais qu'il n'est pas sujet à une dissociation totale avec le petit sillon.

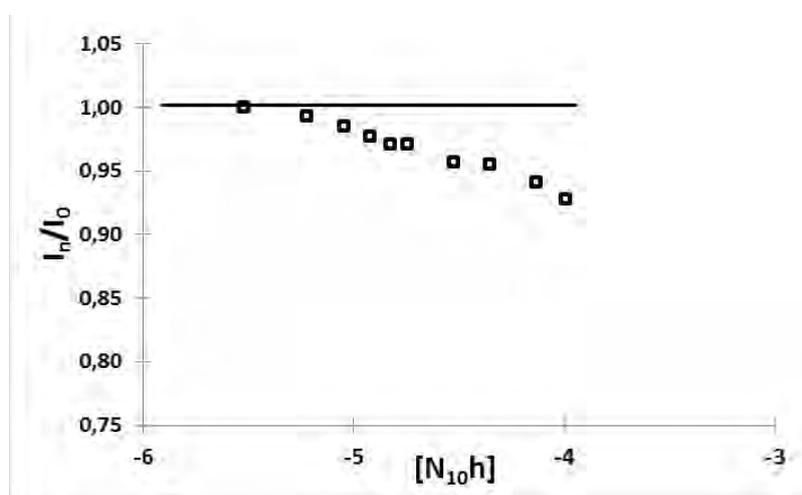


Figure IV-11 : Etude des interactions ADN-Hoechst ([ADN-PO₄⁻] = 60 μM) : évolution de l'intensité de fluorescence du Hoechst au sein du petit sillon en fonction de la concentration en N_{10h}

Ces observations corroborent l'hypothèse d'une interaction modérée entre les lipopeptides et l'ADN. La légère contraction du double brin résultant de ces interactions est responsable des changements observés dans la fluorescence du BET et du Hoechst 33342. Ces résultats confirment également que la complexation observée est définie par un phénomène de neutralisation des charges le long du double brin. En effet, les hautes concentrations en ADN utilisées et la contraction modeste observée justifieraient que l'on n'observe pas de changements plus drastiques dans la structure de l'ADN car la compensation de charge induite par les lipopeptides n'est pas responsable d'altérations majeures du double brin.

Ces interactions semblent donc plus faibles que les phénomènes rapportés dans la littérature avec d'autres amphiphiles cationiques, ceux-ci étant par ailleurs accompagnés de la formation de micelles,²⁹ favorisées par les interactions avec l'ADN, laissant penser que les

domaines d'études généralement choisis dans la littérature correspondent à la région I d'agrégation tandis que nous nous situerions dans la région II.

Dans le but d'appuyer davantage cette hypothèse et de compléter la caractérisation des interactions entre lipopeptides et ADN, il a été choisi d'étudier ces mêmes solutions de complexes ADN-lipopeptides en présence d'une sonde capable de suivre les processus d'auto-organisation des lipopeptides.

II. 3. Suivi de l'auto-organisation des lipopeptides en présence d'ADN

L'agrégation des lipopeptides en milieu aqueux a été mise en évidence précédemment dans le chapitre 2. Il s'agit à présent de déterminer si cette capacité d'auto-organisation pourrait être favorisée par la présence d'ADN dans le milieu d'étude. Par opposition à l'utilisation du BET et du composé Hoechst qui visait à suivre des changements structuraux du point de vue de l'ADN, l'utilisation du pyrène sonde en revanche les processus d'agrégation du côté des lipopeptides.

Ce polycyclique aromatique a d'ailleurs été précédemment utilisé pour déterminer la concentration d'agrégation critique des lipopeptides (chapitre 2). Nous avons donc mesuré l'intensité de fluorescence du pyrène, après excitation à 337 nm, en présence d'ADN et de diverses concentrations en lipopeptides puis retracé l'évolution du rapport d'intensité I_1/I_3 (I_1 mesuré à 371 nm et I_3 à 382 nm) en fonction de la concentration en lipopeptides, puisqu'une variation nette de ce rapport est observé lorsqu'il y a auto-organisation des systèmes, avec une valeur d'intensité à 382 nm qui augmente et donc un rapport I_1/I_3 qui diminue.³⁰

Le suivi de l'agrégation en présence d'ADN a alors été mené sur le lipopeptide **N10h**. Ainsi, dans un milieu initialement constitué d'ADN et de pyrène, les ajouts successifs de **N10h** suivis d'une acquisition du spectre d'émission du pyrène ont permis d'évaluer les variations du rapport I_1/I_3 en fonction des concentrations en lipopeptide. Les résultats obtenus décrivent un profil plutôt constant de l'évolution du rapport I_1/I_3 en fonction des concentrations en **N10h**, la valeur du rapport étant caractéristique d'un environnement aqueux autour des molécules de pyrène (Figure IV-12).

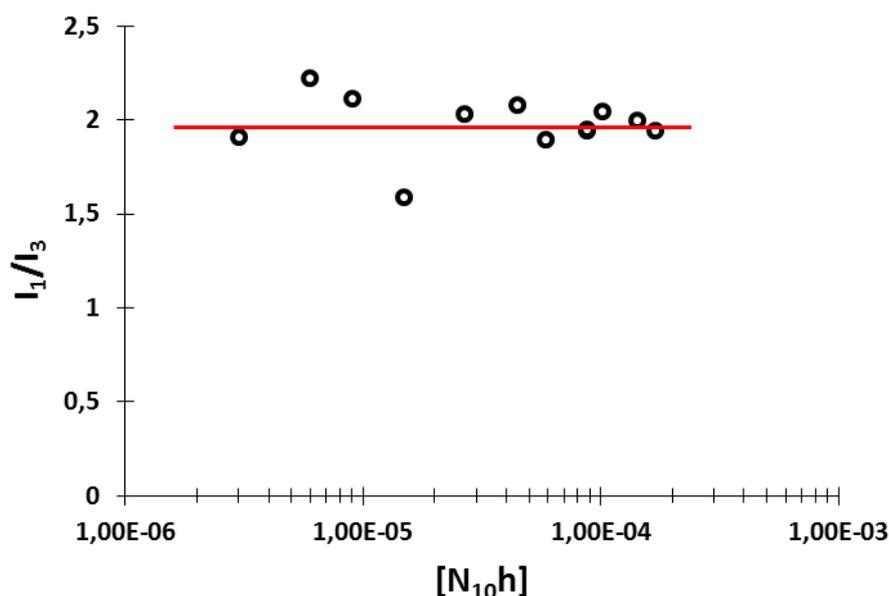


Figure IV-12 : Evolution du rapport des intensités de fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} = 337 \text{ nm}$) du pyrène à 371 nm (I_1) et 382 nm (I_3) en fonction de la concentration en \mathbf{N}_{10h} . ($[\text{ADN-PO}_4^-] = 60 \mu\text{M}$)

Cela signifie que le pyrène n'a pas changé d'environnement et n'a pas migré vers d'éventuelles zones hydrophobes qu'auraient formées les agrégats. Il n'y a donc a priori pas eu auto-organisation du lipopeptide en présence de l'acide nucléique ; les interactions entre l'ADN et \mathbf{N}_{10h} ne semblent pas favoriser l'agrégation de ce dernier.

Le suivi de la fluorescence du pyrène a également été réalisé en présence d'ADN et du lipopeptide \mathbf{N}_{12h} . En effet, ce dernier s'associe avec l'ADN pour un rapport $[\text{LP}]/[\text{ADN-PO}_4^-]$ égal à 0,11, laissant suggérer une forte contribution hydrophobe en plus des interactions électrostatiques entre la tête polaire et les phosphates. L'existence d'un phénomène d'auto-organisation a donc été envisagée et vérifiée par fluorimétrie du pyrène. La Figure IV-13 présente les spectres d'émission de fluorescence du pyrène, lorsque celui-ci est uniquement en présence d'ADN (environnement aqueux) ou avec une concentration supérieure à la concentration de complexation de \mathbf{N}_{12h} ($\text{CC}^{\text{ADN}} = 6,3 \mu\text{M} < [\mathbf{N}_{12h}] = 0,1 \text{ mM}$). Les profils d'émission de fluorescence du pyrène sont similaires, en présence ou en l'absence de complexes ADN- \mathbf{N}_{12h} . Une augmentation de l'intensité I_3 du pic à 382 nm, qui aurait été synonyme d'auto-organisation, n'est pas observée. Il a donc été déduit qu'il n'y avait pas formation d'agrégats de \mathbf{N}_{12h} dans l'environnement de l'ADN.

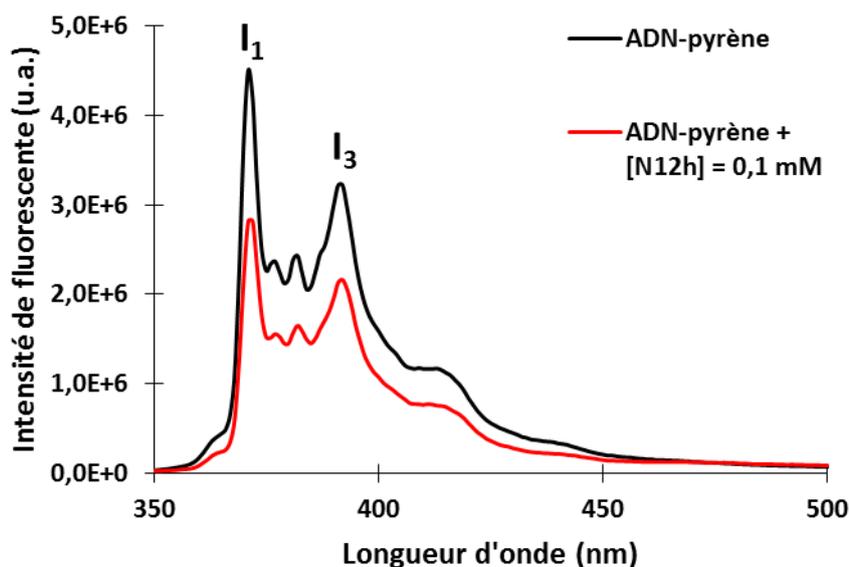


Figure IV-13 : Spectres d'émission du pyrène en présence d'ADN seul (en noir) ou de complexes ADN-N_{12h} (en rouge). ([ADN-PO₄]⁻ = 60 μM)

Cela appuie de nouveau l'hypothèse selon laquelle les lipopeptides seraient plutôt mis à contribution du processus de neutralisation des phosphates le long de l'ADN, ce qui justifierait que l'on n'observe pas d'auto-organisation précoce induite par la présence de l'acide nucléique mais que cette auto-organisation serait même plutôt « retardée » par l'investissement des lipopeptides dans la compensation de charges. De ce fait, les affirmations faites pour les lipopeptides N_{10h} et N_{12h} suite aux mesures de fluorescence en présence du Hoechst 33342 et du pyrène sont a priori applicables aux lipopeptides C_{10h} et N_{10h}C_{10h} qui ont démontré des capacités similaires à complexer l'ADN et à induire sa contraction partielle, issus des études avec le BET.

Pour conclure, nous avons utilisé différentes sondes de fluorescence afin de suivre les phénomènes de complexation entre l'ADN et les lipopeptides ainsi que l'agrégation de ces derniers. Ces études ont alors permis de mettre en évidence que les lipopeptides à base d'histidine et contenant une chaîne grasse étaient capables de se complexer à l'ADN et d'induire une contraction modérée du double brin. Par ailleurs, l'absence d'agrégats constatée par le suivi de fluorescence du pyrène nous a permis de conclure sur le type d'interactions qui régissait la complexation entre l'acide nucléique et les lipopeptides. Pour les concentrations en ADN utilisées, c'est le processus de neutralisation qui est responsable du phénomène de complexation.

Après avoir étudié l'influence du caractère amphiphile des lipopeptides cationiques, nous avons cherché par la suite à mettre en évidence les propriétés hydrolytiques de ces composés, comme cela a été rapporté dans le chapitre précédent pour des esters modèles.

III. Etude des propriétés hydrolytiques des lipopeptides sur l'ADN

La capacité de séquences peptidiques très courtes à hydrolyser l'ADN a récemment été rapportée.^{14,31} Ainsi, Li et ses collaborateurs ont notamment étudié l'activité hydrolytique de différents oligopeptides, essentiellement des dipeptides et des triades, mettant en évidence l'importance de la nature et de la position de certains acides aminés (parmi lesquels l'histidine) dans la séquence peptidique. En revanche, si l'activité catalytique de certains composés amphiphiles à base d'acides aminés a été étudiée vis-à-vis de l'hydrolyse d'esters modèles,^{32,33} aucune étude concernant l'hydrolyse d'un ADN duplex par un lipopeptide n'a cependant été rapporté à notre connaissance. Si de « simples » triades peptidiques sont capables de rompre les liaisons phosphoester de l'ADN, nous avons cherché par la suite à évaluer ce qu'apporterait la présence d'une chaîne hydrophobe sur les propriétés hydrolytiques.

L'étude des interactions entre l'ADN et les lipopeptides a déjà permis de mettre en évidence que la présence d'une chaîne hydrophobe pour une même triade peptidique conduisait à la complexation de l'ADN pour **N_{10h}** et **N_{12h}**, tandis qu'aucune association n'était décelable lorsque l'ADN était mis en présence de la triade méthylée **N_{1h}**. La suite de cette étude a donc eu pour objectif de mettre en évidence l'activité hydrolytique de nos composés et de comparer leur efficacité en fonction de la partie hydrophobe greffée, qui garantit un rapprochement avec le substrat, et de la nature des têtes polaires.

Pour étudier l'activité hydrolytique de nos lipopeptides vis-à-vis de l'ADN, le plasmide pBR322 a de nouveau été utilisé à une concentration de 60 μM en liaisons phosphodiester dans un tampon Britton-Robinson (40 mM, pH = 7). Le clivage de l'ADN a été mis en évidence par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure IV-14). Cette technique permet en effet de distinguer la forme circulaire superenroulée du pBR322 (forme I) par rapport à la forme circulaire relaxée (forme II, issue de l'hydrolyse) grâce à une différence de migration électrophorétique.

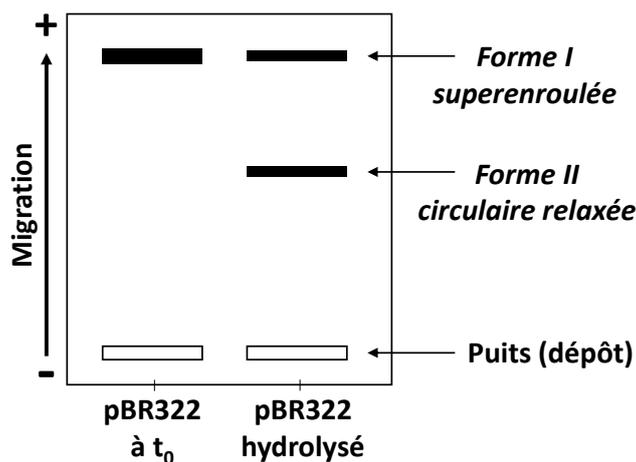


Figure IV-14 : Schéma de migration électrophorétique du pBR322 intact (t_0) et après hydrolyse. Mise en évidence de la forme circulaire relaxée obtenue après hydrolyse, de migration électrophorétique moindre par rapport à la forme superenroulée.

Une fois l'hydrolyse révélée, une quantification par photodensitométrie était effectuée pour déterminer la quantité d'ADN hydrolysé. Finalement, pour chaque essai, l'incubation du plasmide seul en tampon Britton-Robinson a été effectuée comme contrôle par rapport aux résultats obtenus avec les lipopeptides. Ainsi, la quantité d'ADN hydrolysé au cours des essais « ADN seul » a systématiquement été déduite de la quantité totale de forme circulaire relaxée déterminée en présence des lipopeptides (nommés pour l'exemple LP1, LP2), afin de mettre uniquement en évidence la contribution des lipopeptides sur le clivage du double brin (Figure IV-15).

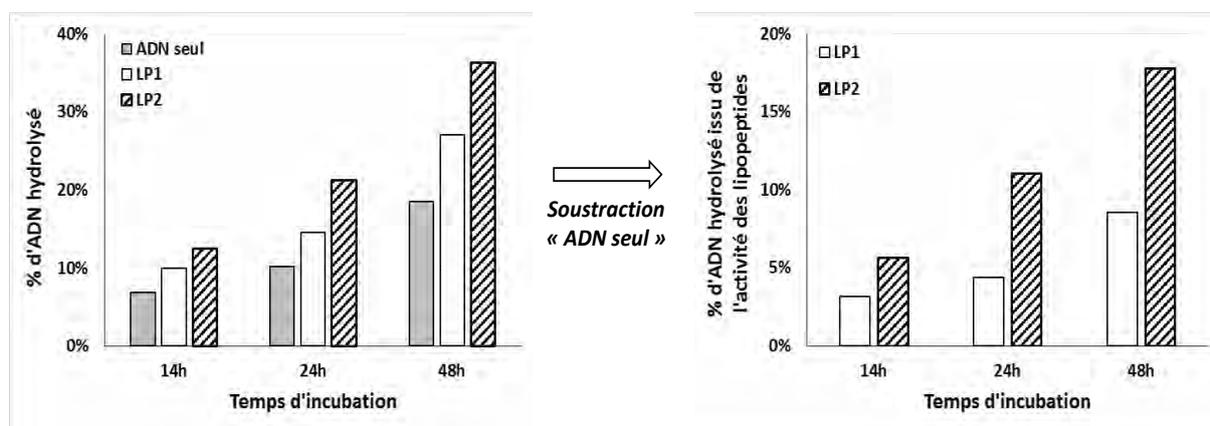


Figure IV-15 : Illustration du traitement des données d'hydrolyse après quantification du pourcentage d'ADN hydrolysé

III. 1. Mise en évidence du clivage de l'ADN et influence de la longueur de la chaîne carbonée

Suite à l'étude des interactions entre l'ADN et les lipopeptides révélant la complexation des lipopeptides à base d'histidine avec l'ADN, nous avons cherché dans un premier temps à évaluer l'influence de cette complexation sur les capacités de nos systèmes à hydrolyser l'ADN. Ainsi, l'activité hydrolytique du lipopeptide **N₁₀h** et de la triade **N₁h** a été comparée, le premier ayant démontré sa capacité à s'associer avec l'ADN tandis qu'aucun phénomène de complexation n'a pu être observé dans le cas du second composé.

Nous avons donc fixé la concentration en catalyseur par rapport à la concentration de complexation de **N₁₀h** (CC^{ADN} mesurée à 34 μ M), en se plaçant au-dessus de cette valeur pour finalement suivre l'hydrolyse du plasmide à 60 μ M en présence de 0,18 mM de **N₁₀h** ou **N₁h** à différents temps d'incubation. La Figure IV-16 illustre les résultats obtenus après migration par électrophorèse sur gel d'agarose, pour lesquels on distingue la forme circulaire superenroulée I et l'apparition de la forme hydrolysée dite circulaire relaxée II.

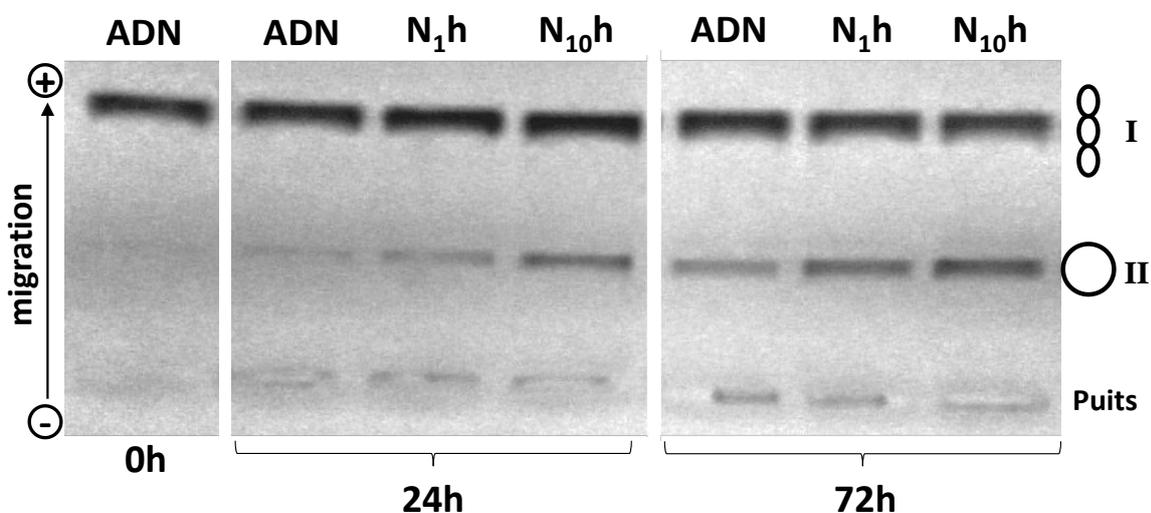


Figure IV-16 : Evaluation du clivage de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose. L'hydrolyse de la forme superenroulée I est détectée par différence de migration avec la forme circulaire relaxée de l'ADN clivé II.
 $[ADN-PO_4] = 60 \mu M$, $[LP] = 0,18 mM$

La quantification de la quantité d'ADN hydrolysé par photodensitométrie a par la suite été réalisée et la Figure IV-17 présente le pourcentage d'ADN hydrolysé issu uniquement de la contribution des lipopeptides, après différence avec la fraction d'ADN hydrolysé en tampon seul.

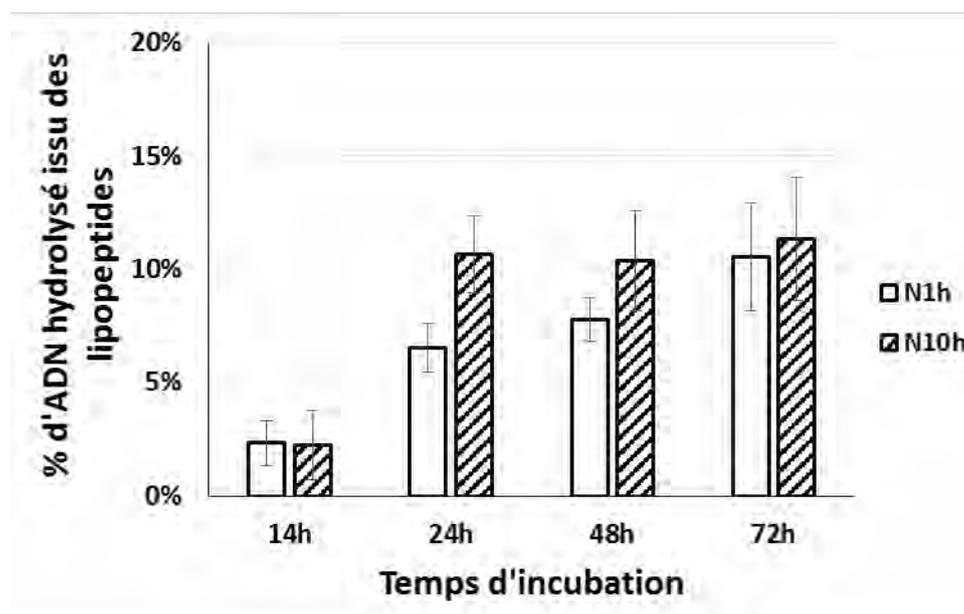


Figure IV-17 : Evolution de la fraction d'ADN hydrolysé par la présence des composés **N1h** et **N10h** à 0,18 mM pour différents temps d'incubation (moyenne de 3 essais). $[\text{ADN-PO}_4^-] = 60 \mu\text{M}$

Tout d'abord, les résultats présentés montrent que les deux composés ont une activité hydrolytique vis-à-vis de l'ADN puisque dès 14 heures d'incubation, le pourcentage d'ADN sous forme circulaire relaxée issu seulement de l'activité des lipopeptides est non nul et la différence par rapport à l'hydrolyse de l'ADN en l'absence de lipopeptide atteint même 11 % après 72 heures d'incubation en présence de **N10h**. Par ailleurs, la quantité d'ADN hydrolysé augmente plus rapidement en présence de **N10h** que de **N1h**. Ainsi, il est nécessaire d'attendre 72 heures de réaction en présence de **N1h** pour atteindre une activité hydrolytique similaire à celle de **N10h**. Il a été supposé que cette différence de réactivité pouvait être liée au phénomène de complexation de l'ADN dans le cas de **N10h**. De ce fait, ce dernier réagit plus rapidement que **N1h** grâce à son association avec l'ADN, observée précédemment par mesures de fluorescence du BET. **N10h** bénéficie alors d'interactions à la fois électrostatiques et hydrophobes avec l'ADN qui induisent une réactivité initiale plus importante que pour **N1h**. Après 72 heures d'incubation, les deux composés présentent en revanche la même activité hydrolytique.

Pour poursuivre l'étude de l'influence de l'hydrophobie sur la catalyse du clivage de l'ADN, il a été décidé de raccourcir le temps d'incubation à 48 heures afin de mieux mettre en évidence les différences d'efficacité hydrolytique. Nous avons alors étendu l'évaluation des propriétés hydrolytiques à **N12h**. En raison de la solubilité limitée de ce dernier, la concentration en lipopeptides a été réduite à 60 μM , concentration supérieure aux concentrations de complexation CC^{ADN} respectives de **N10h** et **N12h**, ce qui assure la complexation entre ces

derniers et l'ADN. La proportion d'ADN hydrolysé par la présence de **N_{1h}**, **N_{10h}** et **N_{12h}** a été déterminée après 48 heures d'incubation et les valeurs obtenues sont présentées dans le Tableau IV-2.

Tableau IV-2 : Mesure de l'hydrolyse de l'ADN en fonction de la nature hydrophobe des lipopeptides après 48 heures d'incubation (moyenne de 3 essais). [LP] = 60 μ M, [ADN-PO₄⁻] = 60 μ M.

Lipopeptides	% ADN hydrolysé
N_{1h}	4,5 \pm 1,6
N_{10h}	8,3 \pm 1,4
N_{12h}	10,9 \pm 2,4

La contribution positive de la chaîne grasse greffée à la triade H-HisGlyGly sur l'hydrolyse de l'ADN est toujours observée dans ces conditions d'incubation (60 μ M aussi bien en liaison phosphodiester qu'en lipopeptides). L'hydrolyse de l'ADN semble nettement corrélée à la longueur de la chaîne carbonée des lipopeptides, l'efficacité hydrolytique étant accrue pour des lipopeptides à chaîne grasse de plus en plus longue. Ces résultats confirment la contribution positive des interactions hydrophobes dans le processus de complexation entre ADN et lipopeptides. De plus, il peut également être observé que la concentration en catalyseur influe évidemment sur les performances catalytiques des lipopeptides. En effet, les résultats obtenus à 60 μ M en **N_{1h}** ou **N_{10h}** après 48 heures sont comparables aux valeurs obtenues en 24 heures pour des concentrations trois fois plus grandes (Tableau IV-2, Figure IV-17). Ainsi, ces observations montrent que pour une tête polaire donnée, il est possible de jouer soit sur la longueur de chaîne soit sur la concentration en lipopeptides pour apporter l'activité hydrolytique désirée. Les lipopeptides à chaîne hydrophobe relativement longue seront alors les outils catalytiques les plus efficaces et les plus intéressants car leur complexation avec l'ADN pour des concentrations relativement faibles garantit une activité similaire à celle des lipopeptides moins hydrophobes introduits dans des proportions plus importantes.

L'influence de la partie hydrophobe des lipopeptides apparaissant comme un paramètre clé pour moduler l'activité des lipopeptides, nous étudions par la suite la contribution de la partie polaire de nos amphiphiles.

III. 2. Influence de la nature de la tête polaire sur le clivage de l'ADN

Afin d'éliminer l'influence de l'hydrophobie, la longueur de chaîne des différents lipopeptides étudiés est fixée à 10 atomes de carbone.

Nous présentons par la suite l'effet de la composition de la tête polaire (**N_{10h}** par rapport à **N_{10g}**) ainsi que l'influence des fonctions terminales des lipopeptides N-ter (**N_{10h}**) et C-ter (**C_{10h}**), pour lesquels la chaîne décyle est greffée d'un côté ou de l'autre de la triade à base d'histidine. Les conditions d'incubation choisies pour comparer la nature des têtes polaires correspondent à un temps de réaction de 48 heures et des concentrations en pBR322 de 60 μM en liaisons phosphodiester et de 0,18 mM en lipopeptides. Dans ces conditions, **C_{10h}** et **N_{10h}** se complexent à l'ADN, les CC^{ADN} étant respectivement égales à 65 et 34 μM , tandis qu'aucune complexation n'avait été détectée en présence de **N_{10g}**. La quantification de l'activité hydrolytique apportée par ces trois lipopeptides est présentée dans le Tableau IV-3.

Tableau IV-3 : Mesure de l'hydrolyse de l'ADN en fonction de la tête polaire des lipopeptides après 48 heures d'incubation (moyenne de 3 essais). $[\text{LP}] = 0,18 \text{ mM}$, $[\text{ADN-PO}_4^-] = 60 \mu\text{M}$.

Lipopeptides	% ADN hydrolysé
N_{10h}	10,4 \pm 2,0
N_{10g}	5,2 \pm 3,0
C_{10h}	2,8 \pm 2,0

Les trois lipopeptides présentent une activité hydrolytique vis-à-vis de l'ADN qui suit l'ordre suivant : **N_{10h}** > **N_{10g}** > **C_{10h}**. La comparaison entre les lipopeptides **N_{10h}** et **C_{10h}** peut tout d'abord être discutée. Pour une même proportion de catalyseur, l'activité hydrolytique décroît considérablement lorsque le lipopeptide a pour fonction terminale un carboxylate plutôt qu'un ammonium (chutant de 10,4 à 2,8 %). Les lipopeptides présentent pourtant tous deux le motif organocatalytique apporté par l'histidine dans leur structure. En effet, les propriétés catalytiques de l'imidazole ont précédemment été mises en évidence vis-à-vis de l'hydrolyse d'esters modèles (Chapitre 3). Celui-ci est capable de contribuer à la catalyse des réactions d'hydrolyse par un mécanisme nucléophile ou acido-basique,³⁴ tandis que l'histidine présente dans les sites d'hydrolase est généralement engagée dans un processus acido-basique.³⁵ Les lipopeptides présents ici en tant que nucléases synthétiques peuvent donc intervenir soit par attaque nucléophile de l'imidazole, soit par l'activation de molécules d'eau ou d'ions

hydroxydes plus réactifs vis-à-vis des fonctions à hydrolyser, ou enfin en favorisant l'adoption d'une conformation privilégiée qui permet une meilleure disponibilité des zones de clivages et/ou une libération plus aisée des groupes hydrolysés.³⁶

La perte d'activité constatée entre **N10h** et **C10h** peut être associée aux interactions électrostatiques intervenant entre l'ADN et les fonctions terminales de ces deux lipopeptides. La présence de la fonction carboxylate sur le lipopeptide C-ter induit une répulsion électrostatique relativement forte avec l'ADN, polyélectrolyte anionique. Ainsi, ce sont les cycles imidazoles protonés qui participent à la complexation entre **C10h** et l'ADN, l'histidine des lipopeptides engagés dans le phénomène de complexation devenant alors indisponible pour participer à l'un des mécanismes hydrolytiques énoncés précédemment. Cependant, puisque les lipopeptides sont introduits à une concentration trois fois supérieure à celle de l'ADN, il est considéré que si la complexation nécessite un équivalent de **C10h** par phosphate neutralisé, il reste un excès de lipopeptide qui pourrait alors participer à la catalyse. L'activité hydrolytique réduite observée pour **C10h** pourrait alors s'expliquer par les répulsions électrostatiques qui existent entre l'ADN et les carboxylates. Ainsi, le cycle imidazole pourrait se retrouver trop loin des zones de clivage à cause de la répulsion électrostatique globale, justifiant alors la faible activité catalytique mesurée.

Pour comparaison, la fonction ammonium du lipopeptide **N10h** favorise les interactions avec l'ADN par compensation de charge. L'imidazole des histidines est donc moins engagé dans les processus de complexation et davantage disponible pour participer à l'hydrolyse de l'ADN. De plus, il est possible que la complexation entre l'ADN et **N10h** par les fonctions ammonium permette un rapprochement de l'histidine dans l'environnement des zones de clivage de l'ADN.

Par ailleurs, la comparaison des lipopeptides **N10h** et **N10g** a mis en évidence l'influence de la présence de l'histidine dans la triade peptidique par rapport à la triglycine de **N10g**. La proportion d'ADN hydrolysé par la présence de **N10g** s'est avérée deux fois moins importante qu'en présence du lipopeptide **N10h** à base d'histidine. Cela confirme donc le choix d'introduire cet acide aminé dans la structure des lipopeptides pour améliorer leurs propriétés hydrolytiques vis-à-vis de l'ADN, comme cela avait déjà été observé pour l'hydrolyse d'esters. Pourtant, même en l'absence d'histidine, la contribution de **N10g** à l'hydrolyse de l'ADN est non nulle (5,2 %), suggérant qu'un autre mécanisme indépendant de la présence de l'histidine est responsable du clivage de l'acide nucléique. D'une part, il se peut que la fonction ammonium terminale de **N10g** soit responsable d'interactions électrostatiques avec les phosphates de l'ADN qui n'ont certes pas induit de changements structuraux observables par fluorimétrie du BET,

mais qui pourraient être responsables d'une orientation favorable du double brin, ce qui améliorerait sa réactivité. D'autre part, des études récentes ont mis en évidence le rôle des fonctions amides sur les interactions peptides-ADN.^{37,38} Cela laisse suggérer que les différentes liaisons amide accessibles de **N10g** pourraient également contribuer à des interactions qui permettent à l'ADN d'adopter une configuration plus favorable à son hydrolyse.

Ainsi, les observations précédentes ont mis en évidence qu'au-delà de la contribution hydrophobe des lipopeptides qui améliore leurs capacités d'interaction et d'hydrolyse, la nature de la tête polaire dicte également les propriétés hydrolytiques de nos amphiphiles. Si l'importance de l'histidine dans les structures de nos hydrolases synthétiques a de nouveau été soulignée, la charge des triades peptidiques a également été évaluée comme un paramètre clé. En effet, les lipopeptides cationiques, même dépourvus d'histidine dans le cas de **N10g**, se sont révélés de meilleurs catalyseurs du clivage de l'ADN comparés à **C10h** dont la fonction carboxylate aurait tendance à générer des répulsions électrostatiques responsables de l'éloignement de l'histidine par rapport aux zones de clivage.

III. 3. Etude du clivage de l'ADN en présence d'un catanionique

Les essais précédents ont mis en évidence, entre autres, le rôle de la chaîne alkyle des lipopeptides ainsi que la contribution de l'histidine sur une amélioration des propriétés hydrolytiques de nos catalyseurs. Le lipopeptide catanionique **C10hN10h**, doté de deux chaînes grasses et de deux histidines, a précédemment montré sa capacité à interagir avec l'ADN pour de plus faibles concentrations en lipopeptides que ses analogues monocaténares. Par la suite, le clivage de l'ADN a donc été mené en présence du catanionique à 30 μM , concentration supérieure à sa CC^{ADN} (5,3 μM) et comparé aux résultats obtenus avec **N10h** à 0,18 mM ($C \approx 6 \times \text{CC}^{\text{ADN}}$ pour les deux lipopeptides). Après 48 heures d'incubation, l'activité hydrolytique du catanionique est similaire à celle du lipopeptide **N10h** (Tableau IV-4). Ces résultats laissent suggérer que la meilleure affinité de **C10hN10h** vis-à-vis de l'ADN lui confère des propriétés hydrolytiques intéressantes pour de plus faibles proportions catalytiques. Cependant, la quantification de l'ADN hydrolysé en présence du catanionique présente une incertitude relativement importante qui devra être corrigée par des essais supplémentaires pour confirmer cette tendance.

Tableau IV-4 : Comparaison de l'activité hydrolytique du catanionique **C_{10h}N_{10h}** par rapport à **N_{10h}** vis-à-vis du clivage de l'ADN après 48 heures d'incubation (moyenne de 3 essais). [LP] = 6 x CC_{ADN} (30 μM pour **N_{10h}**, 5 μM pour **C_{10h}N_{10h}**), [ADN-PO₄⁻] = 60 μM.

Lipopeptides	% ADN hydrolysé
N_{10h}	10,4 ± 2,0
C_{10h}N_{10h}	10,7 ± 5,0

Ainsi, l'activité hydrolytique des lipopeptides sera d'autant plus grande qu'ils posséderont au moins un motif histidine dans leur structure et surtout une partie hydrophobe suffisamment importante, permettant ainsi une complexation avec l'ADN plus favorable. Les interactions électrostatiques et hydrophobes accrues par la présence de ces deux paramètres permettent par ailleurs de travailler à des concentrations plus faibles en lipopeptides, ce qui est évidemment intéressant d'un point de vue catalytique.

III. 4. Variation du rapport lipopeptide/ADN

Après avoir observé l'activité hydrolytique de tous les lipopeptides utilisés dans cette étude, nous avons considéré l'influence du rapport $R = [LP]/[ADN-PO_4^-]$ sur le pourcentage d'ADN hydrolysé. Pour cela, nous avons utilisé le lipopeptide **N_{10h}** à cinq concentrations différentes et ce pour une concentration constante en ADN, toujours fixée à 60 μM en liaisons phosphodiester (Tableau IV-5). Les concentrations choisies sont pour la plupart supérieures à la concentration de complexation puisqu'il a été observé précédemment que la complexation favorisait l'activité hydrolytique des lipopeptides sur l'ADN.

Tableau IV-5 : Présentation des concentrations en **N_{10h}** testées et des rapports [LP]/[ADN-PO₄⁻] correspondants

[N_{10h}]	20 μM	CC^{ADN} =	60 μM	0,18 mM	0,60 mM	1,8 mM
		34 μM				
[LP]/[ADN-PO₄⁻]	0,33	R = 0,5	1	3	10	30

Les résultats obtenus après 48 heures d'incubation du plasmide en présence de différentes proportions de lipopeptide **N_{10h}** sont présentés sur la Figure IV-18. Le clivage de l'ADN dû à l'activité des lipopeptides est tracé en fonction du rapport des concentrations en lipopeptides sur la concentration d'ADN.

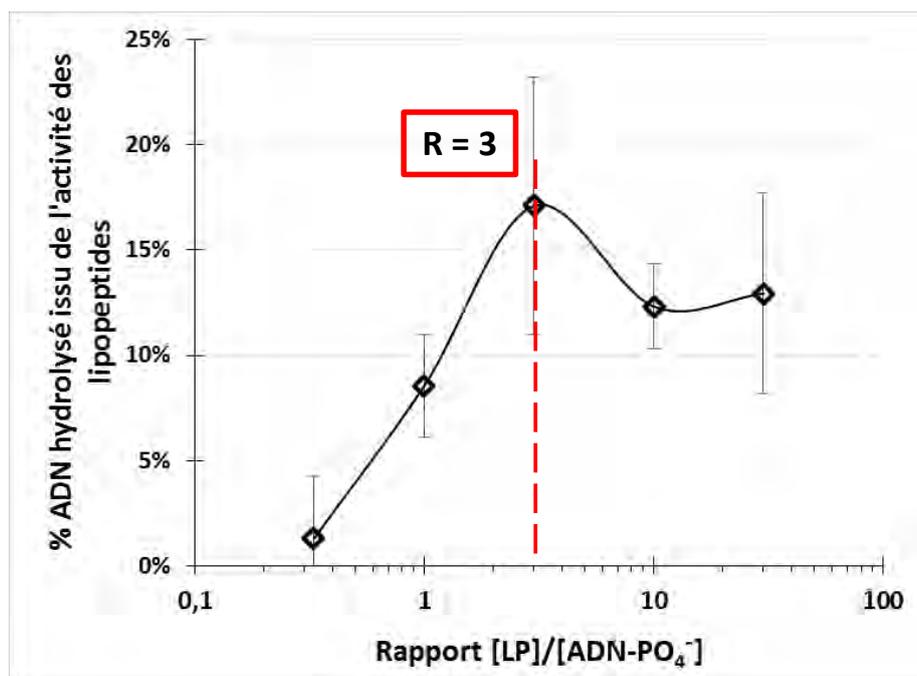


Figure IV-18 : Evolution de l'activité hydrolytique de **N_{10h}** en fonction du rapport [LP]/[ADN-PO₄⁻]

Tout d'abord, il peut être observé que pour une concentration inférieure à la CC^{ADN} de **N_{10h}** (correspondant à un rapport de 0,33), l'activité hydrolytique du lipopeptide est quasiment nulle. Cela confirme l'intérêt d'exploiter le phénomène de complexation entre l'ADN et les lipopeptides pour favoriser le rapprochement du catalyseur dans l'environnement du double brin et améliorer ainsi l'hydrolyse.

Par la suite, l'activité catalytique en fonction de la concentration en lipopeptide augmente pour atteindre un maximum à un rapport $[LP]/[ADN-PO_4^-] = 3$ puis redescend à une valeur « plateau » d'environ 13 % pour les rapports les plus élevés. Il semblerait que trois motifs imidazole soient nécessaires pour garantir un clivage plus efficace. Pour comparaison, les travaux rapportés dans la littérature mettent en évidence l'intervention de deux histidines : un premier motif est responsable de la réactivité basique ou nucléophile vis-à-vis du substrat tandis que le second assiste, grâce à sa forme protonée, le départ du composé hydrolysé (Figure IV-19). Ce mécanisme a été proposé pour illustrer à la fois le mode d'action des nucléases vis-à-vis de l'ADN,³⁹ ainsi que celui d'hydrolases synthétiques appliquées à l'hydrolyse de phosphodiesteres modèles.^{40,41}

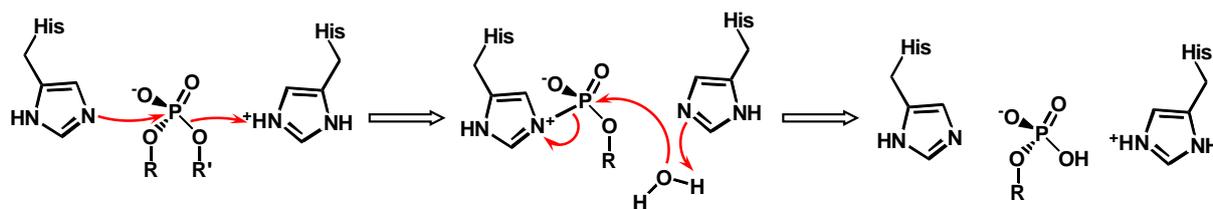


Figure IV-19 : Mécanisme d'hydrolyse des liaisons phosphodiester assistée par deux histidines.

La complexation du lipopeptide **N10h** avec l'ADN ayant lieu pour un rapport $[LP]/[ADN-PO_4^-] = 0,6$, il subsiste un peu plus de deux équivalents de lipopeptides en excès dans l'environnement de l'ADN. Par ailleurs, le pKa de l'imidazole de **N10h** a été mesuré à 7,2. A pH 7, les lipopeptides sont donc présents en solution à la fois sous forme basique et sous forme protonée et seraient donc en mesure de s'organiser et de s'orienter le long du double brin pour accomplir l'hydrolyse des liaisons phosphodiester en assurant les deux rôles exigés par le mécanisme présenté en **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** (les uns contribuant à l'attaque nucléophile tandis que les autres assisteraient le départ du groupement hydrolysé).

Enfin, au-delà de ce rapport de concentration ($R = 3$), l'activité hydrolytique du lipopeptide n'augmente plus car deux histidines semblent suffire à un clivage efficace de l'ADN. La légère diminution d'ailleurs observée pourrait suggérer que l'ajout de davantage de lipopeptide pourrait initier une pré-organisation des amphiphiles entre eux en monopolisant des monomères qui étaient précédemment engagés dans la catalyse du clivage de l'ADN.

IV. Conclusion

Ce quatrième chapitre a tout d'abord permis de mettre en évidence la capacité des lipopeptides à interagir avec l'ADN. Au-delà d'une certaine concentration de complexation en lipopeptides (CC^{ADN}), la fluorimétrie du BET a mis en évidence la formation de complexes entre les composés amphiphiles et l'ADN par des interactions de type électrostatique et hydrophobe. Il a ainsi été observé que les lipopeptides cationiques greffés d'une partie hydrophobe importante et contenant au moins une histidine dans leur structure montraient les meilleures capacités d'association vis-à-vis de l'ADN. Ainsi, la formation d'un complexe entre ces lipopeptides plus hydrophobes et l'ADN nécessitait des concentrations plus faibles en amphiphiles, notamment pour les lipopeptides **N_{12h}** et **C_{10h}N_{10h}**. Par ailleurs, il a été déduit que dans les conditions d'étude choisies, la complexation entre nos lipopeptides et l'ADN duplex suivait un processus de neutralisation.

Dans un second temps, les capacités hydrolytiques des lipopeptides ont été évaluées sur le clivage de l'ADN. Tous les lipopeptides ont démontré une activité hydrolytique vis-à-vis de l'ADN, celle-ci étant favorisée lorsque les complexes ADN-lipopeptides étaient formés, grâce au rapprochement induit entre le substrat biologique et le catalyseur. De plus, pour une même structure, il a été observé que les lipopeptides les plus hydrophobes étaient les plus réactifs et permettaient de travailler à des concentrations plus faibles en catalyseur pour une efficacité similaire à celle de lipopeptides à plus courtes chaînes grasses en solutions plus concentrées. La composition de la tête polaire a également démontré des différences de réactivité. Si la présence de l'histidine était favorable à l'hydrolyse du double-brin, les fonctions ammonium situées à l'extrémité des lipopeptides N-ter semblaient garantir une meilleure disposition du site catalytique apporté par l'histidine tandis que la présence des carboxylates terminaux sur **C_{10h}** réduisait nettement les propriétés hydrolytiques, sans doute à cause de phénomènes de répulsion électrostatique.

Enfin, une variation des quantités de lipopeptides **N_{10h}** introduites pour hydrolyser l'ADN a mis en évidence un rapport optimal $[N_{10h}]/[ADN-PO_4^-]$ égal à 3, pour lequel l'activité hydrolytique de **N_{10h}** était la plus importante. Ce résultat a alors permis d'émettre une hypothèse de mécanisme qui impliquerait deux histidines dans le processus d'hydrolyse de l'ADN.

L'étude des propriétés hydrolytiques des lipopeptides et la recherche des conditions optimales de clivage pourront par la suite être étendues à tous les amphiphiles présentés pour cette étude, notamment les composés les plus hydrophobes pour lesquels des capacités hydrolytiques sont attendues pour de faibles concentrations. Par ailleurs, le catanionique à base d'histidine et de sérine sera intéressant à étudier pour évaluer la pertinence de l'analogie avec les sites actifs d'hydrolases, sur les capacités hydrolytiques. Enfin, d'autres structures de lipopeptides à base d'histidine pourront être envisagées pour améliorer les propriétés catalytiques de nos composés, en les rendant par exemple plus hydrophobes de manière à réduire les concentrations utilisées. Une autre stratégie inspirée de la littérature⁴² consisterait à concevoir des systèmes bolaformes (constitués d'histidine aux deux extrémités, reliées par une chaîne grasse) en forme de pince à épiler qui viendraient « pincer » l'ADN, favorisant ainsi la complexation mais également un positionnement différent des deux histidines. Enfin, si ces propriétés hydrolytiques peuvent s'avérer intéressantes dans l'optique de concevoir des mimes de nucléases, elles seront en revanche à surveiller lorsque les lipopeptides seront utilisés comme agents de transfection, notamment si leur structure contient des motifs histidine.

V. Références

- (1) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
- (2) Rittié, L.; Perbal, B. *J. Cell Commun. Signal.* **2008**, *2* (1-2), 25–45.
- (3) Ataci, N.; Correia, I.; Arisan, I.; Marcos, J. C. *Polym. Adv. Technol.* **2009**, *20* (3), 151–155.
- (4) Patra, T.; Ghosh, S.; Dey, J. *J. Colloid Interface Sci.* **2014**, *436*, 138–145.
- (5) Liu, Q.; Li, J.; Tao, W.; Zhu, Y.; Yao, S. *Bioelectrochemistry* **2007**, *70* (2), 301–307.
- (6) Schiessel, H.; Correa-Rodríguez, M. D.; Rudiuk, S.; Baigl, D.; Yoshikawa, K. *Soft Matter* **2012**, *8* (36), 9406–9411.
- (7) Dias, R. S.; Pais, A. A. C. C.; Miguel, M. G.; Lindman, B. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2004**, *250* (1-3), 115–131.
- (8) Dias, R. S.; Lindman, B.; Miguel, M. G. *Progr. Colloid Polym. Sci* **2001**, *118*, 163–167.
- (9) Zhu, D.-M.; Evans, R. K. *Langmuir* **2006**, *22* (8), 3735–3743.
- (10) Matulis, D.; Rouzina, I.; Bloomfield, V. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (25), 7331–7342.
- (11) Kim, T. K.; Eberwine, J. H. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397* (8), 3173–3178.
- (12) Lundstrom, K.; Boulikas, T. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2003**, *2* (5), 471–485.
- (13) Tarwadi; Jazayeri, J. A.; Pranker, R. J.; Pouton, C. W. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19* (4), 940–950.
- (14) Li, Y.; Zhao, Y.; Hatfield, S.; Wan, R.; Zhu, Q.; Li, X.; McMills, M.; Ma, Y.; Li, J.; Brown, K. L.; He, C.; Liu, F.; Chen, X. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8* (12), 2675–2680.
- (15) Rudiuk, S. Complexation entre l'ADN et des tensioactifs cationiques : études physico-chimiques et photobiologiques. PhD, Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2009.
- (16) Waring, M. J. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13* (1), 269–282.
- (17) LePecq, J.-B.; Paoletti, C. *J. Mol. Biol.* **1967**, *27*, 87–106.
- (18) Rudiuk, S.; Franceschi-Messant, S.; Chouini-Lalanne, N.; Perez, E.; Rico-Lattes, I. *Langmuir* **2008**, *24* (16), 8452–8457.
- (19) Izumrudov, V. A.; Zhiryakova, M. V.; Goulko, A. A. *Langmuir* **2002**, *18* (26), 10348–10356.
- (20) Bhattacharya, S.; Mandal, S. S. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1323* (1), 29–44.

- (21) Aguiar, J.; Carpena, P.; Molina-Bolívar, J. A.; Carnero Ruiz, C. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, 258 (1), 116–122.
- (22) Rutledge, L. R.; Churchill, C. D. M.; Wetmore, S. D. *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114 (9), 3355–3367.
- (23) Wilson, K. A.; Kellie, J. L.; Wetmore, S. D. *Nucleic Acids Res.* **2014**, 42 (10), 6726–6741.
- (24) Leavens, F. M. V.; Churchill, C. D. M.; Wang, S.; Wetmore, S. D. *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115 (37), 10990–11003.
- (25) Churchill, C. D. M.; Wetmore, S. D. *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113 (49), 16046–16058.
- (26) Petersen, T. W.; Ibrahim, S. F.; Diercks, A. H.; van den Engh, G. *Cytometry* **2004**, 60A (2), 173–181.
- (27) Goodell, M. A.; Brose, K.; Paradis, G.; Conner, A. S.; Mulligan, R. C. *J. Exp. Med.* **1996**, 183 (4), 1797–1806.
- (28) Latt, S. A.; Stetten, G. *J. Histochem. Cytochem.* **1976**, 24, 24–33.
- (29) Li, Y.; Zhang, X.; Li, Y.; Li, C.; Guo, X. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2014**, 443, 224–232.
- (30) Dominguez, A.; Fernandez, A.; Gonzalez, N.; Iglesias, E.; Montenegro, L. *J. Chem. Educ.* **1997**, 74 (10), 1227–1231.
- (31) Ma, Y.; Chen, X.; Sun, M.; Wan, R.; Zhu, C.; Li, Y.; Zhao, Y. *Amino Acids* **2008**, 35 (2), 251–256.
- (32) Huang, Z.; Guan, S.; Wang, Y.; Shi, G.; Cao, L.; Gao, Y.; Dong, Z.; Xu, J.; Luo, Q.; Liu, J. *J. Mater. Chem. B* **2013**, 1 (17), 2297–2304.
- (33) Zhang, C.; Xue, X.; Luo, Q.; Li, Y.; Yang, K.; Zhuang, X.; Jiang, Y.; Zhang, J.; Liu, J.; Zou, G.; Liang, X.-J. *ACS Nano* **2014**, 8 (11), 11715–11723.
- (34) Lombardo, A. *J. Chem. Educ.* **1982**, 59 (10), 887–888.
- (35) Rabin, B. R. *J. Clin. Pathol. Suppl. Clin Path* **1970**, 4, 1–7.
- (36) Gowda, K. R. S.; Mathew, B. B.; Sudhamani, C. N.; Naik, H. S. B. *Biomed. Biotechnol.* **2014**, 2 (1), 1–9.
- (37) Gopal, V.; Xavier, J.; Kamal, M. Z.; Govindarajan, S.; Takafuji, M.; Soga, S.; Ueno, T.; Ihara, H.; Rao, N. M. *Bioconjug. Chem.* **2011**, 22 (11), 2244–2254.
- (38) Santhiya, D.; Dias, R. S.; Shome, A.; Das, P. K.; Miguel, M. G.; Lindman, B.; Maiti, S. *Langmuir* **2009**, 25 (24), 13770–13775.
- (39) Sasnauskas, G.; Zakrys, L.; Zaremba, M.; Cosstick, R.; Gaynor, J. W.; Halford, S. E.; Siksnys, V. *Nucleic Acids Res.* **2010**, 38 (7), 2399–2410.

- (40) Breslow, R.; Schmuck, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (28), 6601–6605.
- (41) Orth, E. S.; Brandão, T. A. S.; Souza, B. S.; Pliego, J. R.; Vaz, B. G.; Eberlin, M. N.; Kirby, A. J.; Nome, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (24), 8513–8523.
- (42) Kuchelmeister, H. Y.; Karczewski, S.; Gutschmidt, A.; Knauer, S.; Schmuck, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (52), 14016–14020.

Conclusion générale

L'objectif de ce travail a consisté à mettre au point de nouveaux outils pour la catalyse, selon une approche biomimétique, puis à étudier leurs propriétés catalytiques. Pour cela, il a été choisi de concevoir des systèmes amphiphiles à base d'acides aminés, qui, en apportant à la fois une hydrophobie locale et des motifs peptidiques, présenteraient des analogies structurales avec les sites enzymatiques.

Dans un premier temps, une série de lipopeptides a été conçue, pour laquelle nous avons fait varier la longueur de la chaîne hydrophobe et la composition de la tête polaire. Le rôle de ces différences structurales a alors été étudié sur les propriétés d'auto-organisation des lipopeptides. D'une part, il a été observé que l'augmentation de la partie hydrophobe et la présence de l'histidine favorisaient les processus d'auto-organisation. D'autre part, l'étude de la géométrie des agrégats formés par les lipopeptides a révélé qu'il s'agissait principalement d'objets globulaires et de fibres, suggérant alors l'existence de zones de confinement hydrophobes au sein de nos systèmes peptidiques.

Par la suite, le suivi de l'hydrolyse d'un ester modèle en présence des lipopeptides a mis en évidence les propriétés catalytiques de plusieurs composés. Si la présence de l'histidine s'est avérée indispensable pour démontrer une activité hydrolytique vis-à-vis de l'acétate de *p*-nitrophényle, une contribution positive à la catalyse des chaînes hydrophobes a également été observée. En revanche, la présence de zones de confinement hydrophobes a entraîné une diminution de l'activité catalytique, justifiée par une saturation des sites de réactivité. La mise en évidence d'un mécanisme nucléophile a alors suggéré que les catalyseurs étaient engagés dans des liaisons covalentes avec le substrat et que l'étape nécessaire à leur récupération représentait une étape limitante de la réaction. Dans le cas des lipopeptides agrégés, il semblerait également que les réactifs et produits de la réaction restent localisés dans l'environnement des agrégats et saturent peu à peu les sites catalytiques.

Enfin, les lipopeptides ont démontré qu'ils étaient capables de cliver un ADN duplex. Cette activité hydrolytique s'est avérée exacerbée par la présence à la fois de chaînes hydrophobes et de l'histidine, garantissant en outre le rapprochement du catalyseur avec l'ADN. Un rapport optimal entre la concentration en lipopeptides et la quantité de liaisons phosphodiester semble également avoir été mis en évidence. Ainsi, pour une concentration en **N_{10h}** trois fois supérieure à l'ADN, ce lipopeptide engendrait la meilleure efficacité de clivage de l'ADN. Ce résultat nous a conduits à émettre l'hypothèse d'un mécanisme mettant en jeu deux histidines dans le processus d'hydrolyse.

L'ensemble de ces résultats offre de très nombreuses perspectives :

- De nouvelles structures pourront être envisagées afin d'enrichir la diversité des agrégats et des zones hydrophobes déjà conçus. Pour cela, des changements dans la séquence peptidique ou dans la partie hydrophobe pourront être réalisés, tandis que de nouveaux modèles comme les structures bolaformes (deux têtes polaires reliées par une partie hydrophobe) pourront être considérées. Une autre approche consisterait également à étudier les lipopeptides déjà obtenus en présence d'ions chiraux, ces derniers étant capables d'induire la formation d'agrégats aux géométries variées. Par ailleurs, pour améliorer les propriétés catalytiques de ces composés, le positionnement de l'histidine pourra être réexaminé, afin de l'éloigner des fonctions terminales (ammonium et carboxylate) qui semblaient freiner la catalyse. Une autre option consisterait à protéger ces fonctions terminales tout en conservant de bonnes propriétés amphiphiles et de solubilité dans l'eau.
- L'étude catalytique des lipopeptides pourra également être poursuivie, dans le but de comprendre les mécanismes qui gouvernent l'activité de ces catalyseurs, que ce soit pour l'hydrolyse d'esters modèles ou sur le clivage de l'ADN. Il s'agirait de faire varier divers paramètres comme le pH, les proportions de substrats et de catalyseur ou la géométrie des agrégats, afin de déterminer par ailleurs les conditions optimales pour l'utilisation de chaque lipopeptide en catalyse.
- Nous pouvons aussi envisager d'étendre la capacité des lipopeptides à complexer l'ADN à d'autres applications. La conception de mimes de photolyase, enzyme capable de réparer les dommages photo-induits sur l'ADN duplex, fait partie de ces nouvelles possibilités d'étude. Le tripeptide lysine-tryptophane-lysine étant connu pour reconnaître et réparer certains dommages photo-induits, il serait intéressant d'évaluer l'influence de la présence d'une chaîne grasse sur ces propriétés de reconnaissance et de réparation.

Partie expérimentale

SOMMAIRE

I. Techniques analytiques	162
II. Techniques physico-chimiques	163
II. 1. Tensiométrie	163
II. 2. Fluorimétrie	163
II. 3. Diffusion dynamique de la lumière	163
II. 4. Diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA)	164
II. 5. Microscopie électronique à transmission	164
III. Suivi d'hydrolyse d'ester	164
IV. Interactions ADN-lipoptides	165
V. Hydrolyse de l'ADN	165
VI. Synthèse peptidique	166
VI. 1. Synthèse des lipoptides $C_m\text{GlyGlyGlyOH}$	172
VI. 2. Synthèse des lipoptides $H\text{-HisGlyGlyC}_m$	174
VI. 3. Synthèse des lipoptides $H\text{-GlyGlyGly-C}_m$	179
VI. 4. Synthèse des lipoptides catanioniques	182

I. Techniques analytiques

Les analyses RMN ont été réalisées grâce à un appareil Bruker Avance 300 Ultra-Shield avec une fréquence de précession de 300 MHz pour le proton et 75 MHz pour le carbone ou en utilisant un appareil Bruker Avance 500 Ultra-Shield aux fréquences de précession de 500 MHz pour le proton et 125 MHz pour le carbone.

Les spectres infra-rouge ont été enregistrés sur un spectromètre Thermo Nicolet Nexus à transformée de Fourier.

Les spectres de masse ont été effectués en ionisation par électronébulisation (ESI-MS) sur un spectromètre Waters Q-TOF Premier ou par bombardement par atome rapide (FAB-MS) sur un spectromètre NERMAG R10-10, fonctionnant en mode positif ou négatif. Les analyses de haute résolution (masse exacte) ont par ailleurs été réalisées sur un spectromètre Xevo™ G2 QTOF (Waters).

Les points de fusion ont été mesurés sur un banc Kofler de Wagner&Munz, après calibration de l'appareil par l'intermédiaire de standards analytiques.

Les expériences de chromatographie préparative de haute performance ont été menées sur un chromatographe Autopurif de Waters pour la purification de H-His-Gly-Gly-C₈ (colonne C₁₈ 150x30 mm / éluant: H₂O/CH₃CN 80:20, 30 mL.min⁻¹ / détection: DEDL (détecteur évaporatif à diffusion de lumière)).

La pureté des lipopeptides a été vérifiée par chromatographie liquide ultra-performante, en utilisant un système UPLC Acquity de chez Waters (colonne C₁₈ 50x2.1 mm, 1,7 μm / éluant: H₂O-TFA/CH₃CN-TFA 80:20, 0,7 mL.min⁻¹ / détection: DEDL et UV).

II. Techniques physico-chimiques

II. 1. *Tensiométrie*

Les mesures de tension de surface ont été réalisées grâce à un tensiomètre Krüss EasyDyne et en utilisant la méthode de la lame de Wilhelmy. Les solutions ont été préparées par simple dissolution des lipopeptides en tampon HEPES (50 mM, pH = 7, 25 °C). A partir de ces solutions mères, des dilutions ont alors été effectuées pour couvrir toute une gamme de concentrations sur plusieurs décades. Pour chaque expérience, trois séries de dix lectures sont effectuées et moyennées. De plus, les valeurs de CAC rapportées proviennent de la moyenne de plusieurs réalisations indépendantes.

II. 2. *Fluorimétrie*

Les spectres corrigés de fluorescence ont été obtenus avec un spectrofluorimètre Photon Technology International (PTI) Quanta Master 1. Les mesures ont été enregistrées à 25 °C dans des cellules en quartz thermorégulées. Une longueur d'onde d'excitation du pyrène de 337 nm a été appliquée et le spectre d'émission a été enregistré entre 350 et 500 nm. Le rapport de fluorescence du pyrène I_1/I_3 est alors calculé en fonction des intensités relatives des bandes d'émission à $I_1 = 371$ nm et $I_3 = 382$ nm. Comme pour les mesures en tensiométrie, les lipopeptides ont été préparés en tampon HEPES. Pour chaque composé, une solution mère a été tout d'abord préparée, contenant 1 % v/v d'une solution de pyrène à 10^{-4} M dans le méthanol pour une concentration finale en pyrène dans la solution de 10^{-6} M. On procède, pour la préparation de solutions moins concentrées, à des dilutions successives avec du tampon HEPES contenant déjà du pyrène à 10^{-6} M.

II. 3. *Diffusion dynamique de la lumière*

Des expériences de diffusion dynamique de la lumière ont été conduites à 25 °C en utilisant un Zetasizer NanoZS de chez Malvern, pourvu d'un laser de 4mW helium-néon (longueur d'onde : 633 nm) et récupérant le signal en mode rétrodiffusion à 173°. Toutes les mesures sont réalisées en cuves thermostatées, en précisant la viscosité du solvant et répétées trois fois. Les valeurs moyennes de la taille des agrégats en solution obtenues grâce aux profils de distribution de l'intensité diffusée ont été moyennées sur ces trois essais.

II. 4. Diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA)

Les mesures en DNPA ont été réalisées au laboratoire Léon Brillouin (CEA Saclay) sur le spectromètre PACE. Les données brutes ont été enregistrées à différentes longueurs d'onde de neutron (12 et 6 Å) et pour différentes distances échantillon-détecteur (5 m et 1 m), permettant ainsi de couvrir la gamme entière des q ($3 \cdot 10^{-3}$ à $0,4 \text{ \AA}^{-1}$). La combinaison des données et leurs corrections par rapport à la transmission, au solvant et à la réponse du détecteur ont permis, après normalisation par un échantillon d' H_2O de 1 mm, d'obtenir les intensités diffusées en unités absolues (cm^{-1}).

II. 5. Microscopie électronique à transmission

La morphologie des agrégats a été observée par microscopie électronique à transmission (MET), à l'aide d'un microscope Hitachi HT7700 à 120 kV. La préparation des échantillons consiste à placer une goutte de solution de lipopeptides sur une grille de cuivre recouverte d'une membrane de Formvar et de carbone, puis de procéder à la coloration négative avec du phosphotungstate de sodium à 1% (w/v) ou de l'acétate d'uranyle à 2% (w/v). Ces expériences ont été réalisées sur le site du Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie (CMEAB) appartenant à l'Institut Fédératif de Recherche Bio-médicale de Toulouse à la Faculté de Médecine de Rangueil.

III. Suivi d'hydrolyse d'ester

Pour chaque essai en catalyse, 15 mL de solution de catalyseur à 2 mM ont tout d'abord été préparés en tampon HEPES 50 mM (pH = 7) et maintenus à 25 °C ($\pm 1 \text{ °C}$) sous agitation. La réaction d'hydrolyse est déclenchée par l'ajout de 250 μL d'une solution de *p*NPA à 1,2 M dans l'acétonitrile (*p*NPA n'étant pas assez soluble dans l'eau) au milieu précédent. Ainsi, la concentration initiale du *p*NPA au sein du milieu réactionnel était ajustée à 20 mM tandis que la quantité d'acétonitrile restait négligeable (< 2 %). L'évolution de la réaction est suivie par spectrophotométrie UV-visible à 406 nm en reportant l'absorbance de l'ion *p*NP formé au cours de l'hydrolyse du *p*NPA. Toutes les 5 minutes, des aliquots sont prélevés et dilués au moins par 10 avant chaque mesure d'absorbance par un spectrophotomètre Specord 600 de chez Analytik Jena.

IV. Interactions ADN-lipoptides

Les spectres corrigés de fluorescence ont été obtenus avec un spectrofluorimètre Photon Technology International (PTI) Quanta Master 1. Les mesures ont été réalisées à 25 °C en cuves en quartz thermorégulées.

IV. 1. Fluorimétrie du BET

Pour le suivi de déplacement du BET, une longueur d'onde d'excitation de 530 nm a été appliquée et le spectre d'émission a été enregistré entre 540 et 750 nm. Les solutions d'ADN ont été préparées à 60 µM (en liaison phosphodiester) en tampon Britton-Robinson (pH = 7) et mises directement en présence du BET dans la cuve de fluorescence, pour un rapport 1 :1 de BET par paire de bases d'ADN. Les solutions de lipoptides sont alors ajoutées progressivement dans la cuve de fluorimétrie jusqu'à ce que l'intensité de fluorescence décroisse pour atteindre un plateau. Les échantillons ont été mesurés 15 minutes après chaque ajout, laissant l'équilibre se produire entre le complexe ADN-BET et le lipopeptide. Le ratio des intensités de fluorescence entre les échantillons contenant les lipoptides et l'échantillon initial (seulement constitué de BET et d'ADN) a ensuite été tracé en fonction de la concentration en lipoptides.

IV. 2. Fluorimétrie du Hoechst 33342

Pour l'étude du comportement du petit sillon de l'ADN, le Hoechst 33342 a été utilisé comme sonde de fluorescence et un protocole similaire à celui du BET a été suivi. Par analogie, la solution de BET est remplacée par une concentration finale de 5 µM et le spectre d'émission est enregistré entre 370 et 600 nm après excitation à 355 nm.

V. Hydrolyse de l'ADN

Les échantillons sont préparés en microtubes en mélangeant 10 µL d'ADN à $2,4 \cdot 10^{-4}$ M en liaisons phosphodiesters, 10 µL de solutions de lipoptides et 20 µL de tampon Britton-Robinson (pH 7). Les milieux réactionnels sont ensuite incubés à 37 °C pour 14, 24, 48 ou 72 h. Ensuite, une solution d'héparine à 10 % massique en tampon Britton-Robinson est ajoutée à chaque microtube pour garantir la dissociation des complexes lipoptides-ADN. Enfin, les

échantillons sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 % dans du tampon Tris borate (pH 7,2). L'activité hydrolytique est alors quantifiée par photodensitométrie (via le logiciel ImageJ), en mesurant le rapport de l'intensité de la forme hydrolysée de l'ADN (circulaire relaxée) sur la somme des intensités des formes superenroulée et circulaire relaxée. Toutes les expériences ont été répétées au moins trois fois.

VI. Synthèse peptidique

VI. 1. Synthèse des lipopeptides $C_m\text{GlyGlyHisOH}$

Synthèse des acylglycylglycines par réaction de Schotten-Baumann

Un équivalent de diglycine (5 mmol) est dissout dans 6 mL de solution aqueuse de NaOH 1 M et l'ensemble est mis à refroidir dans un bain de glace. Les solutions de chlorure d'alcanoyle (10 mmol) et de NaOH 1 M (12 mmol) sont ajoutées simultanément au milieu précédent sous agitation. Le mélange se réchauffe jusqu'à température ambiante et est maintenu sous agitation pendant 4 h, jusqu'à la formation d'une suspension blanche. Une solution d'acide chlorhydrique 1 M est ensuite ajoutée jusqu'à atteindre une valeur de pH égale à 1 et observer une précipitation massive. Le solide blanc est ensuite filtré sous vide, lavé à l'eau froide puis à l'acétone et recristallisé (acétate d'éthyle / méthanol 3:1) pour le dérivé octyl ou lavé avec de l'éther de pétrole dans le cas du dérivé dodécyl.

C₈-Gly-Gly-OH (1a) :

Rendement : 76 %

RMN ¹H (1 M NaOD dans D₂O) δ: 0,83 (t, ³J_{HH} = 6,9 Hz, 3 H, CH₃), 1,26 (m, 8 H, CH₂ chaîne), 1,57 (m, 2 H, ^βCH₂ chaîne), 2,30 (t, ³J_{HH} = 7,2 Hz, 2 H, ^αCH₂ chaîne), 3,74 (s, 2 H, CH₂ glycine), 3,91 (s, 2 H, CH₂ glycine).

RMN ¹³C J-Mod (1 M NaOD dans D₂O) δ: 13,6 (CH₃), 22,2-35,8 (CH₂ chaîne), 43,2 (CH₂ glycine), 44,7 (CH₂ glycine), 171,3 (C=O amide), 176,6 (C=O amide), 177,0 (C=O acide).

FTIR (cm⁻¹) v: 1640 (C=O, amide), 1699 (C=O amide), 1726 (C=O acide), 2848-2953 (C-H chaîne), 3082 (N-H), 3308 (O-H).

ESI-MS (mode positif) m/z : 259,17 [M+H]⁺, 281,15 [M+Na]⁺, 539,30 [2M+Na]⁺.

ESI-MS (mode négatif) m/z : 257,15 [M-H]⁻, 515,31 [2M-H]⁻.

HRMS calc. pour C₁₂H₂₃N₂O₄: 259,1658, exp. 259,1659 (+0,4 ppm).

Point de fusion: 180-182 °C (EtOAc/MeOH).

C₁₂-Gly-Gly-OH (1b) :**Rendement:** 72 %**RMN ¹H (CD₃OD) δ:** 0,90 (m, 3 H, CH₃), 1,29 (m, 16 H, CH₂ chaîne), 1,63 (m, 2 H, ^βCH₂ chaîne), 2,27 (m, 2 H, ^αCH₂ chaîne), 3,90 (m, 4 H, CH₂ glycines).**RMN ¹³C *J-Mod* (CD₃OD) δ:** 14,5 (CH₃), 23,8-37,0 (CH₂ chaîne), 41,9 (CH₂ glycine), 43,4 (CH₂ glycine), 172,2 (C=O amide), 173,1 (C=O amide), 176,9 (C=O acide).**FTIR (cm⁻¹) v:** 1642 (C=O, amide), 1699 (C=O amide), 1726 (C=O acide), 2850-2957 (C-H chaîne), 3082-3317 (N-H).**ESI-MS (mode positif) m/z :** 315,23 [M+H]⁺, 337,21 [M+Na]⁺.**ESI-MS (mode négatif) m/z:** 313,21 [M-H]⁻.**HRMS** calc. pour C₁₆H₃₁N₂O₄: 315,2284, exp. 315,2278 (-1,9 ppm).**HRMS** calc. pour C₁₆H₂₉N₂O₄: 313,2127, exp. 313,2131 (+1,9 ppm).**Point de fusion:** 182-183 °C (éther de pétrole).**Synthèse des N^α-acylglycylglycyl-N^τ-trityl-L-histidines de méthyle**

Un équivalent d'acylglycylglycine C_n-Gly-Gly-OH (2,5 mmol) est introduit dans un ballon contenant 2 eq d'Oxyma (5 mmol) et 25 mL de dichlorométhane à température ambiante. L'ajout de diisopropyléthylamine (1,25 mmol) conduit à une suspension jaune. Le diisopropylcarbodiimide (5 mmol) est alors introduit et le milieu est maintenu sous agitation pour un temps d'activation de 10 min. Une solution de H-His(1-Trt)-OMe,HCl (5 mmol) et de diisopropyléthylamine (5 mmol) dans 25 mL de dichlorométhane est ensuite ajoutée au milieu précédent. La solution obtenue devient alors plus limpide et est mise sous agitation sur une nuit à température ambiante, jusqu'à l'obtention d'une solution orange. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le solide orange est dissous dans 25 mL EtOAc et cette phase organique est lavée successivement avec une solution aqueuse d'acide acétique à 5 %, puis plusieurs fois avec 25 mL de solution saturée de NaHCO₃ (jusqu'à ce que la solution aqueuse devienne incolore), et enfin deux fois avec 25 mL de saumure. La phase organique est alors séchée sur Na₂SO₄, puis évaporée à sec sous pression réduite. Le solide résultant est lavé à chaud avec 100 mL de méthyl tert-butyl éther (MTBE). Le composé désiré est enfin obtenu après filtration sous forme d'une poudre jaune clair.

C₈-Gly-Gly-His(1-Trt)-OMe (2a) :**Rendement:** 86 %

RMN ¹H (CD₃OD) δ: 0,90 (t, ³J_{HH} = 6,9 Hz, 3 H, CH₃ chaîne), 1,31 (m, 8 H, CH₂ chaîne), 1,63 (m, 2 H, ^βCH₂ chaîne), 2,25 (m, 2 H, ^αCH₂ chaîne), 3,00 (m, 2H, CH₂ histidine), 3,65 (s, 3H, O-CH₃), 3,85 (m, 4 H, CH₂ glycines), 4,69 (m, 1H, CH histidine), 6,77 (s, 1 H, =CH imidazole), 7,16 (m, 6 H, 5 =CH trityl et 1 =CH imidazole), 7,38 (m, 10 H, =CH trityl).

RMN ¹³C *J-Mod* (CD₃OD) δ: 14,5 (CH₃ chaîne), 23,8-32,9 (CH₂ chaîne et CH₂ histidine), 36,9 (^αCH₂ chaîne), 43,2 (CH₂ glycine), 43,8 (CH₂ glycine), 52,8 (O-CH₃), 54,1 (CH histidine), 76,9 (C_q trityl), 121,3 (=CH imidazole), 129,4 (=CH trityl), 130,9 (=CH trityl), 137,3 (C_q histidine), 139,6 (=CH imidazole), 143,6 (C_q trityl), 171,2 (C=O amide), 172,1 (C=O amide), 173,1 (C=O amide), 176,9 (C=O ester).

FTIR (cm⁻¹) v: 1627 (C=O, amide), 1686 (C=O amide), 1743 (C=O ester), 2848-2925 (C-H chaîne), 3060 (=C-H trityl), 3290 (N-H).

ESI-MS (mode positif) m/z : 652,35 [M+H]⁺, 675,33 [M+Na]⁺.

ESI-MS (mode négatif) m/z: 650,33 [M-H]⁻.

HRMS calc. pour C₃₈H₄₆N₅O₅: 652,3499, exp, 652,3500 (+0,2 ppm).

Point de fusion: 101-103 °C (MTBE).

C₁₂-Gly-Gly-His(1-Trt)-OMe (2b) :**Rendement :** 65 %

RMN ¹H (CD₃OD) δ: 0,89 (t, ³J_{HH} = 6,9 Hz, 3 H, CH₃ chaîne), 1,28 (m, 16 H, CH₂ chaîne), 1,59 (m, 2 H, ^βCH₂ chaîne), 2,23 (m, 2 H, ^αCH₂ chaîne), 3,00 (m, 2H, CH₂ histidine), 3,64 (s, 3H, O-CH₃), 3,83 (m, 4 H, CH₂ glycines), 4,68 (m, 1H, CH histidine), 6,75 (m, 1 H, =CH imidazole), 7,14 (m, 6 H, 5 =CH trityl et 1 =CH imidazole), 7,37 (m, 10 H, =CH trityl).

RMN ¹³C *J-Mod* (CD₃OD) δ: 14,5 (CH₃ chaîne), 23,8-33,1 (CH₂ chaîne et CH₂ histidine), 36,9 (^αCH₂ chaîne), 43,2 (CH₂ glycine), 43,8 (CH₂ glycine), 52,8 (O-CH₃), 54,2 (CH histidine), 76,9 (C_q trityl), 121,3 (=CH imidazole), 129,3 (=CH trityl), 130,9 (=CH trityl), 137,3 (C_q histidine), 139,6 (=CH imidazole), 143,7 (C_q trityl), 171,3 (C=O amide), 172,1 (C=O amide), 173,1 (C=O amide), 176,9 (C=O ester).

FTIR (cm⁻¹) v: 1631 (C=O, amide), 1670 (C=O amide), 1744 (C=O ester), 2856-2963 (C-H chaîne), 3065-3325 (N-H).

ESI-MS (mode positif) m/z: 708,41 [M+H]⁺.

HRMS calc. pour $C_{42}H_{54}N_5O_5$: 708,4125, exp. 708,4124 (-0,1 ppm).

Point de fusion: 117-118°C (MTBE).

Synthèse des N^α-acylglycylglycyl-L-histidines de métyle – Déprotection du trityle en présence de TFA et de deux piègeurs (TIS et H₂O)

Sur le C_n-Gly-Gly-His(1-Trt)-OMe (2 mmol) sont ajoutés 17 mL d'une solution de 85:10:5 TFA/TIS/H₂O. Le solide se dissout avant qu'un nouveau précipité ne se forme. Le milieu est agité pendant 2 h à 25 °C puis évaporé à sec sous pression réduite. Le solide obtenu est alors dissous dans 50 mL d'acétate d'éthyle et la phase organique est lavée plusieurs fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (100 mL) jusqu'à ce que le pH de la solution atteigne 9. Pendant ces lavages, un précipité blanc se forme et est ensuite filtré et lavé à l'acétate d'éthyle. Une recristallisation dans un mélange dichlorométhane/méthanol permet finalement d'obtenir le composé désiré.

C₈-Gly-Gly-His-OMe (3a) :

Rendement : 83 %

RMN ¹H (CD₃OD) δ: 0,90 (t, ³J_{HH} = 6,9 Hz, 3 H, CH₃ chaîne), 1,31 (m, 8 H, CH₂ chaîne), 1,62 (m, 2 H, ^βCH₂ chaîne), 2,27 (t, ³J_{HH} = 7,5 Hz, 2 H, ^αCH₂ chaîne), 3,09 (m, 2H, CH₂ histidine), 3,70 (1s, 3H, O-CH₃), 3,87 (m, 4 H, CH₂ glycines), 4,66 (m, 1H, CH histidine), 6,88 (s, 1 H, =CH imidazole), 7,58 (s, 1 H, =CH imidazole).

RMN ¹³C J-Mod (CD₃OD) δ: 14,5 (CH₃ chaîne), 23,7-32,9 (CH₂ chaîne et CH₂ histidine), 36,9 (^αCH₂ chaîne), 43,3 (CH₂ glycine), 43,8 (CH₂ glycine), 52,8 (O-CH₃), 54,2 (CH histidine), 136,4 (=CH imidazole), 171,5 (C=O amide), 172,4 (C=O amide), 173,2 (C=O amide), 177,1 (C=O ester).

FTIR (cm⁻¹) v: 1650 (C=O, amide), 1733 (C=O ester), 2851-2927 (C-H chaîne), 3078-3310 (N-H).

ESI-MS (mode positif) m/z : 410,24 [M+H]⁺, 432,25 [M+Na]⁺.

ESI-MS (mode négatif) m/z: 408,2 [M-H]⁻.

HRMS calc. pour $C_{19}H_{32}N_5O_5$: 410,2403, exp. 410,2417 (+3,4 ppm).

Point de fusion: 200-202 °C (DCM/MeOH).

C₁₂-Gly-Gly-His-OMe (3b) :**Rendement :** 74 %

RMN ¹H (CD₃OD) δ: 0,90 (t, ³J_{HH} = 6,9 Hz, 3 H, CH₃ chaîne), 1,29 (m, 16 H, CH₂ chaîne), 1,62 (m, 2 H, ^βCH₂ chaîne), 2,27 (t, ³J_{HH} = 7,7 Hz, 2 H, ^αCH₂ chaîne), 3,09 (m, 2H, CH₂ histidine), 3,35 et 3,70 (2s, 3H, O-CH₃), 3,87 (m, 4 H, CH₂ glycines), 4,66 (m, 1H, CH histidine), 6,88 (s, 1 H, =CH imidazole), 7,58 (s, 1 H, =CH imidazole).

RMN ¹³C J-Mod (CD₃OD) δ: 14,3 (CH₃ chaîne), 23,6-33,0 (CH₂ chaîne et CH₂ histidine), 36,9 (^αCH₂ chaîne), 43,6 (CH₂ glycine), 44,2 (CH₂ glycine), 52,9 (O-CH₃), 53,0 (CH histidine), 118,9 (=CH imidazole), 130,8 (C_q imidazole), 171,9 (C=O amide), 172,0 (C=O amide), 173,0 (C=O amide), 177,9 (C=O ester).

FTIR (cm⁻¹) v: 1650 (C=O, amide), 1734 (C=O ester), 2851-2955 (C-H chaîne), 3075-3320 (N-H).

ESI-MS (mode positif, CD₃OD/TFA) m/z: 469,32 [M(3D)+H]⁺, 937,64 [2M(3D)+H]⁺.

ESI-MS (mode négatif, CD₃OD/TFA) m/z: 581,30 [M(3D)+TFA-H]⁻, 1049,61 [2M(3D)+TFA-H]⁻.

HRMS calc. pour C₂₃H₃₇D₃N₅O₅: 469,3218, exp. 469,3215 (-0,6 ppm).

HRMS calc. pour C₂₅H₃₆D₃F₃N₅O₇: 581,2990, exp. 581,2991 (+0,2 ppm).

Point de fusion: 173-174 °C (EtOAc).

Synthèse des N^α-acylglycylglycyl-L-histidines par saponification

C_n-Gly-Gly-His-OMe (2 mmol) est introduit dans un ballon et une solution de LiOH (3 mmol) dans 20 mL de 1:1 THF/H₂O est ajoutée à 4 °C (bain de glace). La suspension est agitée pendant une heure à 4 °C et laissée remonter à température ambiante. Une solution de H₂SO₄ 1 M est ensuite rajoutée jusqu'à obtenir une valeur de pH de 3. La suspension est diluée dans 30 mL de H₂O et 50 mL de méthyl tert-butyl éther sont ajoutés. Après agitation, le solide blanc formé est ensuite récupéré par filtration sous pression réduite et rincé à l'acétonitrile. Le composé C_{8h} étant trop soluble dans l'eau, il a été préféré une purification par dessalage sur colonne SPE (Chromabond® HR-X/6 ml/500 mg de chez Macherey-Nagel).

C₈-Gly-Gly-His-OH (4a ou C_{8h}):**Rendement :** 61 %

RMN ¹H (1 M NaOD dans D₂O) δ: 0,85 (t, ³J_{HH} = 6,9 Hz, 3 H, CH₃ chaîne), 1,28 (m, 8 H,

CH₂ chaîne), 1,60 (m, 2 H, ^βCH₂ chaîne), 2,33 (t, ³J_{HH} = 7,5 Hz, 2 H, ^αCH₂ chaîne), 3,22 (m, 2H, CH₂ histidine), 3,94 (m, 4 H, CH₂ glycines), 4,55 (m, 1H, CH histidine), 7,27 (s, 1 H, =CH imidazole), 8,60 (s, 1 H, =CH imidazole).

RMN ¹³C *J-Mod* (1 M NaOD dans D₂O) δ: 13,5 (CH₃ chaîne), 21,9-30,9 (CH₂ chaîne et CH₂ histidine), 35,5 (^αCH₂ chaîne), 42,4 (CH₂ glycine), 42,5 (CH₂ glycine), 53,6 (CH histidine), 116,8 (=CH imidazole), 129,4 (Cq imidazole), 170,7 (C=O amide), 172,3 (C=O amide), 175,6 (C=O amide), 178,2 (C=O acide).

FTIR (cm⁻¹) v: 1646 (C=O, amide), 2854-2955 (C-H chaîne), 3143-3296 (N-H).

ESI-MS (mode positif) m/z : 396,22 [M+H]⁺.

ESI-MS (mode négatif) m/z: 394,2 [M-H]⁻.

HRMS calc. pour C₁₈H₃₀N₅O₅: 396,2247, exp. 396,2250 (+0,8 ppm).

Point de fusion: 133-135 °C (CH₃CN).

C₁₀-Gly-Gly-His-OH (C_{10h}) :

RMN ¹H (CD₃OD) δ: 0,90 (t, ³J_{HH} = 6,9 Hz, 3 H, CH₃ chaîne), 1,28 (m, 12 H, CH₂ chaîne), 1,62 (m, 2 H, ^βCH₂ chaîne), 2,29 (t, ³J_{HH} = 7,7 Hz, 2 H, ^αCH₂ chaîne), 3,27 (m, 2H, CH₂ histidine), 3,85 (m, 4 H, CH₂ glycines), 4,72 (m, 1H, CH histidine), 7,34 (s, 1 H, =CH imidazole), 8,77 (s, 1 H, =CH imidazole).

RMN ¹³C *J-Mod* (CD₃OD) δ: 14,5 (CH₃ chaîne), 23,8-33,1 (CH₂ chaîne et CH₂ histidine), 36,8 (^αCH₂ chaîne), 43,6 (CH₂ glycine), 44,0 (CH₂ glycine), 52,9 (CH histidine), 118,7 (=CH imidazole), 131,2 (Cq imidazole), 171,7 (C=O amide), 172,8 (C=O amide), 173,2 (C=O amide), 177,4 (C=O acide).

FTIR (cm⁻¹) v: 1647 (C=O, amide), 2852-2955 (C-H chaîne), 3150-3298 (N-H).

ESI-MS (mode positif) m/z : 424,26 [M+H]⁺, 446,24 [M+Na]⁺.

ESI-MS (mode négatif) m/z: 422,2 [M-H]⁻.

HRMS calc. pour C₂₀H₃₄N₅O₅: 424,2560, exp. 424,2556 (- 0,9 ppm).

Point de fusion: 105-106°C.

C₁₂-Gly-Gly-His-OH (4b ou C_{12h}) :

Rendement: 44 %

RMN ¹H (CD₃OD) δ: 0,90 (t, ³J_{HH} = 6,9 Hz, 3 H, CH₃ chaîne), 1,29 (m, 16 H, CH₂ chaîne), 1,62 (m, 2 H, ^βCH₂ chaîne), 2,29 (t, ³J_{HH} = 7,5 Hz, 2 H, ^αCH₂ chaîne), 3,21 (m, 2H, CH₂ histidine), 3,85 (m, 4 H, CH₂ glycines), 4,54 (m, 1H, CH histidine), 7,25 (s, 1 H, =CH imidazole), 8,59 (s, 1 H, =CH imidazole).

RMN ^{13}C *J-Mod* ($\text{CD}_3\text{OD}+\text{TFA}$) δ : 14,5 (CH_3 chaîne), 23,7-33,0 (CH_2 chaîne et CH_2 histidine), 36,9 ($^{\alpha}\text{CH}_2$ chaîne), 43,7 (CH_2 glycine), 44,2 (CH_2 glycine), 53,0 (CH histidine), 118,8 ($=\text{CH}$ imidazole), 131,0 (C_q imidazole), 172,0 ($\text{C}=\text{O}$ amide), 173,1 ($\text{C}=\text{O}$ amide), 173,3 ($\text{C}=\text{O}$ amide), 177,9 ($\text{C}=\text{O}$ acide).

FTIR (cm^{-1}) ν : 1645 ($\text{C}=\text{O}$, amide), 1711 ($\text{C}=\text{O}$ acide), 2851-2953 ($\text{C}-\text{H}$ chaîne), 3138-3306 ($\text{N}-\text{H}$).

ESI-MS (mode positif) m/z : 452,29 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

ESI-MS (mode négatif) m/z : 450,27 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

HRMS calc. pour $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{N}_5\text{O}_5$: 452,2873, exp.: 452,2869 (-0,9 ppm).

HRMS calc. pour $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}_5$: 450,2717, exp.: 450,2717 (0 ppm).

Point de fusion: 165-166 $^{\circ}\text{C}$ (CH_3CN).

VI. 1. Synthèse des lipopeptides $\text{C}_m\text{GlyGlyGlyOH}$

Synthèse des N^{α} -acylglycylglycylglycines par réaction de Schotten-Baumann

Un équivalent de triglycine (5 mmol) est dissous dans 6 mL d'une solution aqueuse de NaOH 1 M et cette solution est mise à refroidir dans un bain de glace. Les solutions de chlorure d'alcanoyle (10 mmol) et de NaOH 1 M (12 mmol) sont ajoutées simultanément au milieu sous agitation. La température du mélange est laissée remonter à température ambiante puis le milieu est maintenu sous agitation 4 h jusqu'à formation d'une suspension blanche. Une solution aqueuse d'HCl à 1 M est ensuite ajoutée jusqu'à descendre à une valeur de pH de 1 et qu'un précipité massif se forme. Le solide blanc est alors filtré sous vide, lavé à l'eau froide puis à l'acétone et récupéré sans purification ultérieure.

$\text{C}_8\text{-Gly-Gly-Gly-OH}$ (5a ou C_{8g}) :

Rendement : 87 %

RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 0,86 (m, 3 H, CH_3 chaîne), 1,24 (m, 8 H, CH_2 chaîne), 1,48 (m, 2 H, βCH_2 chaîne), 2,12 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,5$ Hz, 2 H, $^{\alpha}\text{CH}_2$ chaîne), 3,71 (m, 6 H, CH_2 glycines), 8,06 (m, 3 H, NH).

RMN ^{13}C *J-Mod* (1 M NaOD dans D_2O) δ : 13,4 (CH_3 chaîne), 21,9-35,7 (CH_2 chaîne), 43,1 (CH_2 glycine), 43,2 (CH_2 glycine), 44,7 (CH_2 glycine), 171,2 ($\text{C}=\text{O}$ amide), 172,3 ($\text{C}=\text{O}$ amide), 176,5 ($\text{C}=\text{O}$ amide), 178,2 ($\text{C}=\text{O}$ acide).

FTIR (cm^{-1}) ν : 1637 ($\text{C}=\text{O}$, amide), 1651 ($\text{C}=\text{O}$, amide), 1705 ($\text{C}=\text{O}$, acide), 2849-2955 ($\text{C}-\text{H}$

chaîne), 3085-3291 (N-H).

ESI-MS (mode positif) m/z : 316.19 [M+H]⁺, 338.17 [M+Na]⁺.

ESI-MS (mode négatif) m/z: 314,2 [M-H]⁻.

HRMS calc. pour C₁₄H₂₆N₃O₅: 316,1872, exp. 316,1871 (-0,3 ppm).

Point de fusion: 233-234 °C (acétone).

C₁₀-Gly-Gly-Gly-OH (5b ou C_{10g}) :

Rendement : 82 %

RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 0,85 (t, ³J_{HH} = 6 Hz 3 H, CH₃ chaîne), 1,24 (m, 10 H, CH₂ chaîne), 1,48 (m, 2 H, ^βCH₂ chaîne), 2,12 (t, ³J_{HH} = 7,4 Hz, 2 H, ^αCH₂ chaîne), 3,71 (m, 6 H, CH₂ glycines), 8,11 (m, 3 H, NH).

RMN ¹³C J-Mod (DMSO-d₆) δ: 13,9 (CH₃ chaîne), 22,0-35,1 (CH₂ chaîne), 40,5 (CH₂ glycine), 41,7 (CH₂ glycine), 42,0 (CH₂ glycine), 169,1 (C=O amide), 169,3 (C=O amide), 171,0 (C=O amide), 172,6 (C=O acide).

FTIR (cm⁻¹) v: 1651 (C=O, amide), 1705 (C=O, acide), 2850-2955 (C-H chaîne), 3085-3292 (N-H).

ESI-MS (mode négatif) m/z: 342,20 [M-H]⁻, 685,41 [2M-H]⁻.

HRMS calc. pour C₁₆H₂₈N₃O₅: 342,2029, exp. 342,2026 (-0,9 ppm).

Point de fusion: 229-230°C (acétone).

C₁₂-Gly-Gly-Gly-OH (5c ou C_{12g}) :

Rendement : 56 %

RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 0,85 (t, ³J_{HH} = 6,6 Hz 3 H, CH₃ chaîne), 1,24 (m, 10 H, CH₂ chaîne), 1,48 (m, 2 H, ^βCH₂ chaîne), 2,12 (t, ³J_{HH} = 7,5 Hz, 2 H, ^αCH₂ chaîne), 3,33 (br s, OH) 3,74 (m, 6 H, CH₂ glycines), 8,10 (m, 3 H, NH).

RMN ¹³C J-Mod (DMSO-d₆) δ: 14,0 (CH₃ chaîne), 22,1-35,2 (CH₂ chaîne), 40,5 (CH₂ glycine), 41,7 (CH₂ glycine), 42,1 (CH₂ glycine), 169,2 (C=O amide), 169,4 (C=O amide), 171,0 (C=O amide), 172,8 (C=O acide).

FTIR (cm⁻¹) v: 1639 (C=O, amide), 1652 (C=O, amide), 1705 (C=O, acide), 2850-2956 (C-H chaîne), 3087-3292 (N-H).

FAB-MS (mode positif) m/z: 372 [M+H]⁺, 394 [M+Na]⁺

ESI-MS (mode négatif) m/z: 370,23 [M-H]⁻.

HRMS calc. pour C₁₈H₃₂N₃O₅: 370,2342, exp. 370,2331 (-3,0 ppm)

Point de fusion: 230-231°C (acétone).

VI. 2. Synthèse des lipopeptides H-HisGlyGlyCm

Synthèse des N-alkyl-(Boc)-glycyl-glycine amides

La diglycine protégée (5,5 mmol) est introduite à température ambiante dans un ballon contenant l'Oxyma (7,5 mmol) et 20 mL de dichlorométhane. Le diisopropylcarbodiimide (7,5 mmol) est ajouté et le milieu est maintenu sous agitation pour un temps d'activation de 10 min. L'alkylamine (5 mmol) est alors rajoutée au mélange précédent. La solution obtenue devient alors plus limpide et est mise sous agitation pendant 5 h à température ambiante, jusqu'à l'obtention d'une solution orange. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le solide orange est dissous dans 50 mL d'acétate d'éthyle et cette phase organique est lavée successivement avec 50 mL d'une solution aqueuse d'acide acétique à 5 %, puis plusieurs fois avec 50 mL de solution saturée de NaHCO₃ (jusqu'à ce que la solution aqueuse devienne incolore), et enfin deux fois avec 50 mL de saumure. La phase organique est alors séchée sur Na₂SO₄, puis évaporée à sec sous pression réduite. Le solide résultant est lavé à température ambiante avec 100 mL d'éther de pétrole. Le composé désiré est enfin obtenu après filtration sous forme d'une poudre légèrement orange.

Boc-Gly-Gly-C₈ (6a) :

Rendement: 90 %

RMN ¹H (CD₃OD) δ: 0,90 (t, ³J_{HH} = 6,9 Hz 3 H, CH₃ chaîne), 1,31 (m, 10 H, CH₂ chaîne), 1,46 (m, 9 H, CH₃ Boc), 1,52 (m, 2 H, ^βCH₂ chaîne), 3,19 (t, ³J_{HH} = 7,2 Hz, 2 H, ^αCH₂ chaîne), 3,71 (s, 2 H, CH₂ glycine), 3,83 (s, 2 H, CH₂ glycine).

RMN ¹³C J-Mod (CD₃OD) δ: 14,5 (CH₃ chaîne), 23,8-40,5 (CH₂ chaîne), 43,5 (CH₂ glycine), 45,1 (CH₂ glycine), 81,0 (C_q ^tBu), 158,8 (C=O carbamate), 171,5 (C=O amide), 173,2 (C=O amide).

FTIR (cm⁻¹) v: 1654 (C=O, amide), 1686 (C=O, amide), 2852-2967 (C-H chaîne), 3089-3339 (N-H).

ESI-MS (mode positif) m/z: 366,2 [M+Na]⁺.

HRMS calc. pour C₁₇H₃₄N₃O₄: 344,2549, exp. 344,2539 (-2,9 ppm).

Point de fusion: 71-72 °C (éther de pétrole).

Boc-Gly-Gly-C₁₂ (6b) :

Rendement : 88 %.

RMN ^1H (CD_3OD) δ : 0,90 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,9$ Hz 3 H, CH_3 chaîne), 1,31 (m, 10 H, CH_2 chaîne), 1,46 (m, 9 H, CH_3 Boc), 1,52 (m, 2 H, $^{\beta}\text{CH}_2$ chaîne), 3,19 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,2$ Hz, 2 H, $^{\alpha}\text{CH}_2$ chaîne), 3,71 (s, 2 H, CH_2 glycine), 3,83 (s, 2 H, CH_2 glycine).

RMN ^{13}C *J-Mod* CD_3OD) δ : 14,5 (CH_3 chaîne), 23,7-40,5 (CH_2 chaîne), 43,4 (CH_2 glycine), 45,1 (CH_2 glycine), 81,1 (C_q ^tBu), 158,8 (C=O carbamate), 171,5 (C=O amide), 173,3 (C=O amide).

FTIR (cm^{-1}) ν : 1645 (C=O, amide), 2851-2953 (C-H chaîne), 3096-3300 (N-H).

ESI-MS (mode positif) m/z : 422,30 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 821,61 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

HRMS calc. pour $\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_4\text{Na}$: 422,2995, exp. 422,2987 (-1,9 ppm).

Point de fusion: 96-97°C (éther de pétrole).

Synthèse des N-alkyl-glycyl-glycine amides

La diglycine acylée et protégée Boc-Gly-Gly- C_n (4,5 mmol) est dissoute dans 10 mL d'un mélange équimolaire de TFA/DCM. Le mélange est agité pendant 30 min à température ambiante puis évaporé à sec sous pression réduite. Une solution saturée de NaHCO_3 est ajoutée sur le solide obtenu jusqu'à atteindre un pH de 8. L'ajout d'acétate d'éthyle (40 mL) provoque la formation d'un précipité. Le solide est alors filtré et rincé deux fois à l'acétate d'éthyle, pour donner un composé beige.

H-Gly-Gly- C_8 (7a) :

Rendement : 88 %

RMN ^1H (CD_3OD) δ : 0,90 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,9$ Hz 3 H, CH_3 chaîne), 1,31 (m, 10 H, CH_2 chaîne), 1,50 (m, 2 H, $^{\beta}\text{CH}_2$ chaîne), 3,19 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,2$ Hz, 2 H, $^{\alpha}\text{CH}_2$ chaîne), 3,32 (s, 2 H, CH_2 glycine), 3,86 (s, 2 H, CH_2 glycine).

RMN ^{13}C *J-Mod* (CD_3OD) δ : 14,4 (CH_3 chaîne), 23,7-40,6 (CH_2 chaîne), 41,6 (CH_2 glycine), 43,3 (CH_2 glycine), 168,0 (C=O amide), 171,0 (C=O amide).

FTIR (cm^{-1}) ν : 1654 (C=O, amide), 1685 (C=O, amide), 2850-2961 (C-H chaîne), 3087-3360 (N-H).

ESI-MS (mode positif) m/z : 244,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 266,2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

HRMS calc. pour $\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_2$: 244,2025, exp. 244,2027 (+0,8 ppm).

Point de fusion: 140-141°C (EtOAc).

H-Gly-Gly-C₁₂ (7b) :**Rendement:** 75 %**RMN ¹H (CD₃OD) δ:** 0,90 (t, ³J_{HH} = 6,9 Hz 3 H, CH₃ chaîne), 1,31 (m, 10 H, CH₂ chaîne), 1,50 (m, 2 H, ^βCH₂ chaîne), 3,19 (t, ³J_{HH} = 7,2 Hz, 2 H, ^αCH₂ chaîne), 3,32 (s, 2 H, CH₂ glycine), 3,86 (s, 2 H, CH₂ glycine).**RMN ¹³C *J-Mod* (CD₃OD) δ:** 14,5 (CH₃ chaîne), 23,8-40,5 (CH₂ chaîne), 43,4 (CH₂ glycine), 45,1 (CH₂ glycine), 171,5 (C=O amide), 175,8 (C=O amide).**FTIR (cm⁻¹) v:** 1642 (C=O, amide), 1680 (C=O, amide), 2849-2956 (C-H chaîne), 3095-3368 (N-H).**ESI-MS (mode positif) m/z:** 300,27 [M+H]⁺, 338,22 [M+Na]⁺.**HRMS calc. pour C₁₆H₃₄N₃O₂:** 300,2651, exp. 300,2654 (+1,0 ppm).**Point de fusion:** 143-144°C (EtOAc).**Synthèse des N-alkyl-(Boc)-histidyl-(Boc)-glycyl-glycine amides**

La diglycine acylée H-Gly-Gly-C_n (3 mmol) est introduite à température ambiante dans un ballon contenant au préalable Boc-His(1-Boc)-OSu (6 mmol) dans 20 mL de dichlorométhane. L'ajout de diisopropyléthylamine (9 mmol) mène à l'obtention d'une suspension jaune qui est agitée pendant 4 h à température ambiante, conduisant à une solution orange. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le solide orange est redissous dans 20 mL de dichlorométhane et cette phase organique est lavée trois fois avec 20 mL d'une solution saturée de NaHCO₃ et deux fois avec de l'eau. La phase organique est ensuite séchée sur Na₂SO₄, puis évaporée à sec sous pression réduite. Le composé désiré est finalement obtenu après recristallisation dans l'acétate d'éthyle (pour le dérivé octyle) ou après lavage à l'éther de pétrole (cas du dérivé dodécyle).

Boc-His(1-Boc)-Gly-Gly-C₈ (8a):**Rendement :** 75 %**RMN ¹H (CD₃OD) δ:** 0,89 (t, ³J_{HH} = 6,3 Hz 3 H, CH₃ chaîne), 1,29 (m, 10 H, CH₂ chaîne), 1,41 (m, 9 H, CH₃ Boc N-terminal), 1,51 (m, 2 H, ^βCH₂ chaîne), 1,62 (m, 9 H, CH₃ Boc imidazole), 2,99 (m, 2H, CH₂ histidine), 3,19 (t, ³J_{HH} = 7,5 Hz, 2 H, ^αCH₂ chaîne), 3,87 (m, 4 H, CH₂ glycines), 4,30 (m, 1 H, CH histidine), 7,34 (s, 1H, =CH imidazole), 8,12 (s, 1H, =CH imidazole).**RMN ¹³C *J-Mod* (CD₃OD) δ:** 14,5 (CH₃ chaîne), 23,8-40,6 (CH₂ chaîne), 43,4 (CH₂ glycine),

44,3 (CH₂ glycine), 55,9 (CH histidine), 81,0 (C_q ^tBu N-terminal), 87,2 (C_q ^tBu imidazole), 116,6 (=CH imidazole), 139,7 (C=O carbamate imidazole), 148,1 (C=O carbamate N-terminal), 171,4 (C=O amide), 172,2 (C=O amide), 175,3 (C=O amide).

FTIR (cm⁻¹) v: 1659 (C=O, amide), 1753 (C=O carbamate), 2856-2972 (C-H chaîne), 3082-3306 (N-H).

ESI-MS (mode positif) m/z: 581,4 [M+H]⁺, 603,3 [M+Na]⁺.

ESI-MS (mode négatif) m/z: 579,4 [M-H]⁻.

HRMS calc. pour C₂₈H₄₉N₆O₇: 581,3663, exp. 581,3663 (+1,9 ppm)

Point de fusion: 100-101°C (AcOEt).

Boc-His(1-Boc)-Gly-Gly-C₁₂ (8b) :

Rendement: 73 %

RMN ¹H (CD₃OD) (Des impuretés dues à la présence de BocHis(1-Boc)OSu ou BocHis(1-Boc)OH sont détectables sur le spectre) δ: 0,90 (m, 3 H, CH₃ chaîne), 1,28 (m, 10 H, CH₂ chaîne), 1,41 (m, 9 H, CH₃ Boc N-terminal), 1,51 (m, 2 H, ^βCH₂ chaîne), 1,62 (m, 9 H, CH₃ Boc imidazole), 3,02 (m, 2H, CH₂ histidine), 3,19 (m, 2 H, ^αCH₂ chaîne), 3,87 (m, 4 H, CH₂ glycines), 4,30 (m, 1 H, CH histidine), 7,34 (s, 1H, =CH imidazole), 8,12 (s, 1H, =CH imidazole).

RMN ¹³C *J-Mod* (CD₃OD) δ: 14,5 (CH₃ chaîne), 23,8-40,6 (CH₂ chaîne), 43,4 (CH₂ glycine), 44,3 (CH₂ glycine), 55,9 (CH histidine), 81,1 (C_q ^tBu N-terminal), 87,2 (C_q ^tBu imidazole), 116,6 (=CH imidazole), 139,7 (C=O carbamate imidazole), 148,1 (C=O carbamate N-terminal), 171,5 (C=O amide), 172,2 (C=O amide), 175,3 (C=O amide).

FTIR (cm⁻¹) v: 1660 (C=O, amide), 1696 (C=O, amide), 1753 (C=O, carbamate), 2853-2979 (C-H chaîne), 3082-3307 (N-H).

ESI-MS (mode positif) m/z: 637,43 [M+H]⁺.

HRMS calc. pour C₃₂H₅₇N₆O₇: 637,4289, exp. 637,4286 (-0,5 ppm).

Point de fusion: 94-95°C (éther de pétrole).

Synthèse des N-alkyl-histidyl-glycyl-glycine amides

Comme pour la déprotection de Boc-Gly-Gly-C_n, la déprotection des deux amines est obtenue en utilisant du TFA dans le dichlorométhane. Le produit final est récupéré après purification par chromatographie préparative haute performance (colonne C18 150 x 30 mm, éluant eau/CH₃CN 80:20, détection en UV à 220 nm).

H-His-Gly-Gly-C₈ (9a ou N_{8h}) :**Rendement :** 95 %

RMN ¹H (CD₃OD) δ: 0,85 (t, ³J_{HH} = 7,2 Hz, 3 H, CH₃ chaîne), 1,26 (m, 10 H, CH₂ chaîne), 1,49 (m, 2 H, ^βCH₂ chaîne), 3,20 (t, ³J_{HH} = 6,9 Hz, 2 H, ^αCH₂ chaîne), 3,44 (d, ³J_{HH} = 6,3 Hz, 2 H, CH histidine), 3,92 (s, 2 H, CH₂ glycine), 4,06 (m, 2 H, CH₂ glycine), 4,39 (t, ³J_{HH} = 6,3 Hz, 1 H, CH histidine), 7,47 (s, 1H, =CH imidazole), 8,70 (s, 1H, =CH imidazole).

RMN ¹³C *J-Mod* (CD₃OD) δ: 14,5 (CH₃ chaîne), 23,7-40,6 (CH₂ chaîne), 43,2 (CH₂ glycine), 43,5 (CH₂ glycine), 53,2 (CH histidine), 120,2 (=CH imidazole), 127,8 (C_q imidazole) 169,5 (C=O amide), 171,1 (C=O amide), 172,4 (C=O amide).

FTIR (cm⁻¹) v: 1662 (C=O, amide), 2644-2929 (C-H chaîne), 3086-3290 (N-H).

ESI-MS (mode positif) m/z: 381,26 [M+H]⁺, 403,24 [M+Na]⁺.

HRMS calc. pour C₁₈H₃₃N₆O₃: 381,2614, exp. 381,2603 (-2,9 ppm).

Point de fusion: 90-91°C (CH₃CN/eau).

H-His-Gly-Gly-C₁₀ (N_{10h}) :

RMN ¹H (CD₃OD) δ: 0,82 (t, ³J_{HH} = 6,3 Hz, 3 H, CH₃ chaîne), 1,22 (m, 14 H, CH₂ chaîne), 1,47 (m, 2 H, ^βCH₂ chaîne), 3,17 (t, ³J_{HH} = 7,2 Hz, 2 H, ^αCH₂ chaîne), 3,45 (d, ³J_{HH} = 6,6 Hz, 2 H, CH histidine), 4,00 (m, 4 H, CH₂ glycines), 4,42 (t, ³J_{HH} = 6,3 Hz, 1 H, CH histidine), 7,49 (s, 1H, =CH imidazole), 8,73 (s, 1H, =CH imidazole).

RMN ¹³C *J-Mod* (D₂O) δ: 13,6 (CH₃ chaîne), 22,3-39,5 (CH₂ chaîne), 42,2 (CH₂ glycine), 42,5 (CH₂ glycine), 52,0 (CH histidine), 118,8 (=CH imidazole), 125,6 (C_q imidazole), 168,7 (C=O amide), 170,4 (C=O amide), 171,2 (C=O amide).

FTIR (cm⁻¹) v: 1666 (C=O, amide), 2643-2928 (C-H chaîne), 3088-3272 (N-H).

ESI-MS (mode positif) m/z: 409,29 [M+H]⁺, 431,28 [M+Na]⁺.

HRMS calc. pour C₂₀H₃₇N₆O₃: 409,2927, exp. 409,2935 (+2,0 ppm)

Point de fusion: 112-113°C.

H-His-Gly-Gly-C₁₂ (9a ou N_{12h}) :**Rendement :** 40 %

RMN ¹H (CD₃OD) δ: 0,90 (t, ³J_{HH} = 6,3 Hz, 3 H, CH₃ chaîne), 1,29 (m, 14 H, CH₂ chaîne), 1,50 (m, 2 H, ^βCH₂ chaîne), 2,97 (t, ³J_{HH} = 6 Hz, 2 H, ^αCH₂ chaîne), 3,19 (t, ³J_{HH} = 7,2 Hz, 2 H, CH₂ histidine), 3,61 (t, ³J_{HH} = 6,0 Hz, 1 H, CH histidine), 3,88 (s, 4 H, CH₂ glycines), 6,61 (s, 1H, =CH imidazole), 7,59 (s, 1H, =CH imidazole).

RMN ¹³C *J-Mod* (CD₃OD) δ: 14,5 (CH₃ chaîne), 23,8-40,5 (CH₂ chaîne), 43,5 (CH₂ glycine),

44,1 (CH₂ glycine), 56,0 (CH histidine), 136,6 (=CH imidazole), 171,2 (C=O amide), 172,5 (C=O amide), 178,1 (C=O amide).

FTIR (cm⁻¹) v: 1648 (C=O, amide), 2849-2956 (C-H chaîne), 3082-3302 (N-H).

ESI-MS (mode positif) m/z: 437,32 [M+H]⁺, 459,30 [M+Na]⁺.

HRMS calc, pour C₂₂H₄₁N₆O₃: 437,3240, exp, 437,3231 (-2,1 ppm).

Point de fusion: 141-142°C.

VI. 3. Synthèse des lipopeptides H-GlyGlyGly-C_m

Synthèse des N-alkyl-(Boc)-glycyl-glycyl-glycine amides

La triglycine protégée (4,4 mmol) est introduite à température ambiante dans un ballon contenant au préalable l'Oxyma (6 mmol) et 20 mL de dichlorométhane. Le diisopropylcarbodiimide (6 mmol) est ajouté et le milieu est maintenu sous agitation pour un temps d'activation de 10 min. L'alkylamine (4 mmol) est ensuite rajoutée au mélange précédent. La solution obtenue devient alors plus limpide et est mise sous agitation pendant 5 h à température ambiante, jusqu'à l'obtention d'une solution orange. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le solide orange est dissous dans 50 mL d'acétate d'éthyle et cette phase organique est lavée successivement avec 25 mL d'une solution aqueuse d'acide acétique à 5 %, puis plusieurs fois avec 25 mL de solution saturée de NaHCO₃ (jusqu'à ce que la solution aqueuse devienne incolore), et enfin deux fois avec 25 mL de saumure. La phase organique est ensuite séchée sur Na₂SO₄, puis évaporée à sec sous pression réduite. Pendant ces lavages, un précipité beige se forme. Il est filtré et rincé à l'acétate d'éthyle.

Boc-Gly-Gly-Gly-C₈ (10a) :

Rendement : 40 %

RMN ¹H (CD₃OD) δ: 0,90 (t, ³J_{HH} = 6,9 Hz 3 H, CH₃ chaîne), 1,31 (m, 10 H, CH₂ chaîne), 1,45 (m, 9 H, CH₃ Boc), 1,51 (m, 2 H, ^βCH₂ chaîne), 3,19 (t, ³J_{HH} = 7,2 Hz, 2 H, ^αCH₂ chaîne), 3,74 (s, 2 H, CH₂ glycine), 3,84 (s, 2 H, CH₂ glycine), 3,89 (s, 2 H, CH₂ glycine).

RMN ¹³C J-Mod (CD₃OD) δ: 14,5 (CH₃ chaîne), 23,8-40,6 (CH₂ chaîne), 28,8 (CH₃ Boc), 43,5 (CH₂ glycine), 43,9 (CH₂ glycine), 45,0 (CH₂ glycine), 81,0 (C_q ^tBu Boc), 159,9 (C=O Boc), 171,3 (C=O amide), 172,2 (C=O amide), 173,7 (C=O amide).

FTIR (cm⁻¹) v: 1635 (C=O, amide), 1666 (C=O, amide), 1707 (C=O carbamate), 2869-2968 (C-H chaîne), 3103-3339 (N-H).

ESI-MS (mode positif) m/z: 423,26 [M+Na]⁺,

HRMS calc, pour C₁₉H₃₆N₃O₄Na: 423,2583, exp, 423,2573 (-2,4 ppm).

Point de fusion: 159-160 °C (EtOAc).

Boc-Gly-Gly-Gly-C₁₀ (10b) :

Rendement : 72 %

RMN ¹H (CD₃OD) δ: 0,90 (t, ³J_{HH} = 6,9 Hz 3 H, CH₃ chaîne), 1,30 (m, 14 H, CH₂ chaîne), 1,45 (m, 9 H, CH₃ Boc), 1,51 (m, 2 H, ^βCH₂ chaîne), 3,18 (t, ³J_{HH} = 7,2 Hz, 2 H, ^αCH₂ chaîne), 3,74 (s, 2 H, CH₂ glycine), 3,84 (s, 2 H, CH₂ glycine), 3,89 (s, 2 H, CH₂ glycine).

RMN ¹³C J-Mod (CD₃OD) δ: 15,3 (CH₃ chaîne), 23,7-40,1 (CH₂ chaîne), 29,5 (CH₃ Boc), 43,5 (CH₂ glycine), 43,8 (CH₂ glycine), 44,9 (CH₂ glycine), 80,0 (C_q ^tBu Boc), 157,6 (C=O Boc), 170,2 (C=O amide), 170,9 (C=O amide), 171,9 (C=O amide).

FTIR (cm⁻¹) v: 1635 (C=O, amide), 1671 (C=O, amide), 1708 (C=O carbamate), 2852-2921 (C-H chaîne), 3089-3331 (N-H).

ESI-MS (mode positif) m/z: 451,29 [M+Na]⁺, 879,59 [2M+Na]⁺.

HRMS calc. for C₂₁H₄₀N₄O₅Na: 451,2896, exp. 451,2891 (-1,1 ppm).

Point de fusion: 177-178 °C (EtOAc).

Boc-Gly-Gly-Gly-C₁₂ (10c) :

Rendement : 56 %

RMN ¹H (CD₃OD) δ: 0,90 (t, ³J_{HH} = 6,9 Hz 3 H, CH₃ chaîne), 1,29 (m, 18 H, CH₂ chaîne), 1,45 (m, 9 H, CH₃ Boc), 1,51 (m, 2 H, ^βCH₂ chaîne), 3,19 (t, ³J_{HH} = 7,2 Hz, 2 H, ^αCH₂ chaîne), 3,74 (s, 2 H, CH₂ glycine), 3,84 (s, 2 H, CH₂ glycine), 3,89 (s, 2 H, CH₂ glycine).

RMN ¹³C J-Mod (CD₃OD) δ: 14,5 (CH₃ chaîne), 23,6-40,6 (CH₂ chaîne), 28,8 (CH₃ Boc), 43,5 (CH₂ glycine), 43,9 (CH₂ glycine), 45,0 (CH₂ glycine), 81,0 (C_q ^tBu Boc), 158,8 (C=O Boc), 171,4 (C=O amide), 172,2 (C=O amide), 173,7 (C=O amide).

FTIR (cm⁻¹) v: 1651 (C=O, amide), 1686 (C=O, amide), 2850-2955 (C-H chaîne), 3089-3293 (N-H).

ESI-MS (mode positif) m/z: 457,34 [M+H]⁺, 479,32 [M+Na]⁺, 935,65 [2M+Na]⁺,

HRMS calc. pour C₂₃H₄₅N₄O₅: 457,3390, exp. 457,3391 (+0,2 ppm).

Point de fusion: 168-169 °C (EtOAc).

Synthèse des N-alkyl-glycyl-glycyl-glycine amides

La triglycine acylée et protégée Boc-Gly-Gly-Gly-C_n (3,5 mmol) est dissoute dans 20 mL d'un mélange équimolaire de TFA/DCM. Le milieu est agité à température ambiante pendant 30 minutes puis évaporé à sec sous pression réduite. Une solution saturée de NaHCO₃ est ajoutée sur le solide obtenu jusqu'à atteindre un pH de 8 et un précipité massif se forme. Le solide jaune est alors filtré sous vide, rincé à l'eau puis à l'acétone. Le produit final est obtenu après recristallisation dans un mélange méthanol/eau (1:3).

H-Gly-Gly-Gly-C₈ (11a ou N_{8g}) :

Rendement : 32 %

RMN ¹H (CD₃OD) δ: 0,89 (t, ³J_{HH} = 6,9 Hz 3 H, CH₃ chaîne), 1,30 (m, 10 H, CH₂ chaîne), 1,50 (m, 2 H, ^βCH₂ chaîne), 3,18 (t, ³J_{HH} = 7,2 Hz, 2 H, ^αCH₂ chaîne), 3,76 (s, 2 H, CH₂ glycine), 3,85 (s, 2 H, CH₂ glycine), 3,97 (s, 2 H, CH₂ glycine).

RMN ¹³C J-Mod (CD₃OD) δ: 14,3 (CH₃ chaîne), 23,6-40,5 (CH₂ chaîne), 41,5 (CH₂ glycine), 43,3 (CH₂ glycine), 43,4 (CH₂ glycine), 168,2 (C=O amide), 171,2 (C=O amide), 171,7 (C=O amide).

FTIR (cm⁻¹) v: 1651 (C=O, amide), 2848-2955 (C-H chaîne), 3087-3368 (N-H).

ESI-MS (mode positif) m/z: 301,2 [M+H]⁺, 323,2 [M+Na]⁺.

HRMS calc. pour C₁₄H₂₉N₄O₃: 301,2240, exp. 301,2239 (-0,3 ppm).

Point de fusion: 201-202 °C (MeOH/H₂O).

H-Gly-Gly-Gly-C₁₀ (11b ou N_{10g}) :

Rendement : 85 %

RMN ¹H (CD₃OD) δ: 0,90 (t, ³J_{HH} = 7,2 Hz 3 H, CH₃ chaîne), 1,30 (m, 14 H, CH₂ chaîne), 1,51 (m, 2 H, ^βCH₂ chaîne), 3,19 (t, ³J_{HH} = 7,2 Hz, 2 H, ^αCH₂ chaîne), 3,75 (s, 2 H, CH₂ glycine), 3,85 (s, 2 H, CH₂ glycine), 3,98 (s, 2 H, CH₂ glycine).

RMN ¹³C J-Mod (CD₃OD) δ: 14,5 (CH₃ chaîne), 23,8-40,6 (CH₂ chaîne), 41,6 (CH₂ glycine), 43,4 (CH₂ glycine), 43,5 (CH₂ glycine), 168,3 (C=O amide), 171,3 (C=O amide), 171,8 (C=O amide).

FTIR (cm⁻¹) v: 1652 (C=O, amide), 2849-2959 (C-H chaîne), 3086-3366 (N-H),

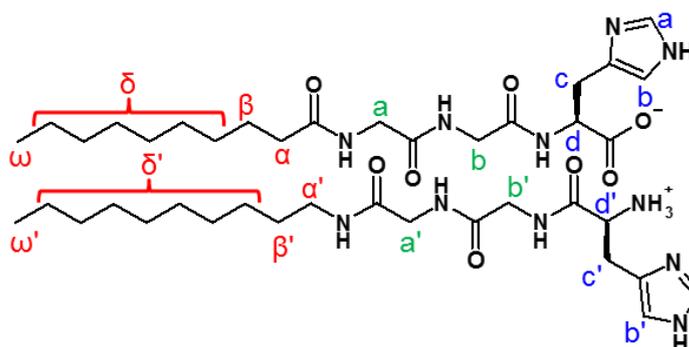
ESI-MS (mode positif) m/z: 329,25 [M+H]⁺.

HRMS calc. pour C₁₆H₃₃N₄O₃: 329,2553, exp. 329,2552 (-0,3 ppm).

Point de fusion: 204-205 °C (MeOH/H₂O).

H-Gly-Gly-Gly-C₁₂ (11c ou N_{12g}) :**Rendement :** 63 %**RMN ¹H (CD₃OD) δ:** 0,89 (t, ³J_{HH} = 6,9 Hz 3 H, CH₃ chaîne), 1,28 (m, 18 H, CH₂ chaîne), 1,52 (m, 2 H, ^βCH₂ chaîne), 3,19 (t, ³J_{HH} = 7,2 Hz, 2 H, ^αCH₂ chaîne), 3,75 (s, 2 H, CH₂ glycine), 3,85 (s, 2 H, CH₂ glycine), 3,98 (s, 2 H, CH₂ glycine).**RMN ¹³C *J-Mod* (CD₃OD) δ:** 24,0 (CH₃ chaîne), 32,3-41,5 (CH₂ chaîne), 50,2 (CH₂ glycine), 52,0 (CH₂ glycine), 52,1 (CH₂ glycine), 176,6 (C=O amide), 179,1 (C=O amide), 179,4 (C=O amide).**FTIR (cm⁻¹) v:** 1651 (C=O, amide), 2850-2956 (C-H chaîne), 3093-3369 (N-H).**ESI-MS (mode positif) m/z:** 357,29 [M+H]⁺, 380,27 [M+Na]⁺, 714,57 [2M+H]⁺.**HRMS calc, pour C₁₈H₃₇N₄O₃:** 357,2866, exp, 357,2857 (-2,5 ppm).**Melting point:** 202-203 °C (MeOH/H₂O).**VI. 4. Synthèse des lipopeptides catanioniques**

Les dérivés catanioniques **C_{10h}N_{10h}/C_{10sh}N_{10h}** sont préparés par réaction acido-basique entre C₁₀-Gly-Gly-His-OH (C_{10h}, 0,12 mmol) ou C₁₀-Gly-Ser-His-OH (C_{10sh}) et H-His-Gly-Gly-C₁₀ (N_{10h}, 0,12 mmol) dispersés dans 60 mL d'eau. Après 2 h d'agitation à température ambiante, une solution homogène est obtenue. L'élimination de l'eau par lyophilisation permet l'obtention du catanionique sous forme d'une poudre blanche.

C₁₀-Gly-Gly-His-OH / H-His-Gly-Gly-C₁₀ (C_{10h}N_{10h}) :**RMN ¹H (D₂O + CD₃OD) δ:** 0,85 (m, 6 H, CH₃ chaîne), 1,25 (m, 26 H, CH₂ chaîne), 1,49-1,59 (m, 4 H, ^βCH₂ chaîne), 2,31 (m, 2 H, ^αCH₂ chaîne), 3,19 (m, 3 H, ^{α'}CH₂ chaîne + CH₂ histidine c), 3,45 (m, 2 H, CH₂ histidine c'), 3,99 (m, 8 H, CH₂ glycines), 4,37 (t, ³J_{HH} = 6,3 Hz 1 H, CH histidine d'), 4,63 (m, 1 H, CH histidine d), 7,29 (s, 1H, =CH imidazole), 7,49 (s, 1H, =CH imidazole), 8,62 (s, 1H, =CH imidazole), 8,73 (s, 1H, =CH imidazole).**RMN ¹³C *J-Mod* (CD₃OD) δ:** 13,3 (CH₃ chaîne), 22,1-39,4 (CH₂ chaîne), 42,2 (CH₂ glycine),

42,5 (CH₂ glycine), 51,9 (CH histidine), 52,7 (CH histidine), 117,0 (=CH imidazole), 118,7 (=CH imidazole), 125,6 (C_q imidazole), 129,2 (C_q imidazole), 168,5 (C=O amide), 170,52 (C=O amide), 170,72 (C=O amide), 171,2 (C=O amide), 172,1 (C=O amide), 174,1 (C=O amide), 177,8 (C=O carboxylate).

FTIR (cm⁻¹) v: 1664-1665 (C=O, amide), 2854-2925 (C-H chaîne), 3084-3296 (N-H).

Point de fusion: 111-112 °C (H₂O).

C₁₀-Gly-Ser-His-OH / H-His-Gly-Gly-C₁₀ (C_{10sh}N_{10h}) :

RMN ¹H (CD₃OD) δ: 0,90 (m, 6 H, CH₃ chaînes), 1,29 (m, 26 H, CH₂ chaînes), 1,51 (m, 2H, ^βCH₂ chaîne N_{10h}), 1,63 (m, 2 H, ^βCH₂ chaîne C_{10sh}), 2,28 (t, ³J_{HH} = 7,5 Hz, 2 H, ^αCH₂ chaîne C_{10sh}), 3,19 (m, 3 H, ^αCH₂ chaîne N_{10h} + 1H issu d'un CH₂ histidine), 3,37 (m, 3 H, CH₂ histidine + 1H issu d'un CH₂ histidine), 3,69-3,89 (m, 7 H, CH₂ sérine + CH histidine + 2*CH₂ glycines), 4,19-4,38 (m, 3 H, CH sérine + CH₂ glycine), 4,72 (m, 1 H, CH histidine), 7,35 (s, 1H, =CH imidazole), 7,39 (s, 1H, =CH imidazole), 8,58 (s, 1H, =CH imidazole), 8,76 (s, 1H, =CH imidazole).

RMN ¹³C *J-Mod* (CD₃OD) δ: 14,5 (CH₃ chaînes), 23,8-40,6 (CH₂ chaînes + CH₂ histidine), 43,2 (CH₂ glycine), 43,5 (CH₂ glycine), 43,7 (CH₂ glycine), 53,4 (CH histidine), 56,9 (CH histidine), 62,7 (CH₂ serine), 65,2 (CH₂ serine), 71,4 (CH sérine), 73,2 (CH sérine), 118,7 (=CH imidazole), 119,8 (=CH imidazole), 128,7 (C_q imidazole), 131,1 (C_q imidazole), 169,7 (C=O amide), 171,1 (C=O amide), 172,0 (C=O amide), 172,3 (C=O amide), 173,2 (C=O amide), 177,2 (C=O carboxylate).

FTIR (cm⁻¹) v: 1649 (C=O, amide), 2855-2926 (C-H chaîne), 3101-3286 (N-H).

Point de fusion: 120-121 °C (H₂O)

Annexes

1. Equation de Boltzmann

La détermination des concentrations d'agrégation critiques (CAC) a été réalisée à partir des courbes retraçant l'évolution du rapport de fluorescence du pyrène I_1/I_3 en fonction de la concentration en lipopeptides. La formation des agrégats est alors marquée par une diminution nette de ce rapport de fluorescence. Les courbes ont alors été ajustées grâce à l'équation de Boltzmann suivante :

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\left[\frac{x-x_0}{dx}\right]}} + A_2$$

où y correspond au rapport I_1/I_3 , x est associé à la concentration en lipopeptides ($x = \log c$), et A_1 et A_2 représentent les limites supérieures et inférieures de la sigmoïde obtenue.

D'après Aguiar *et al.* [J. Aguiar, P. Carpena, J. A. Molina-Bolivar, C. Carnero Ruiz, *J. Coll. Int. Sci.* **2003**, 258, 116-122], les CACs correspondent alors aux valeurs x_0 .

A titre d'exemple, la détermination de la CAC de **N₈h** est présentée en Figure A-31.

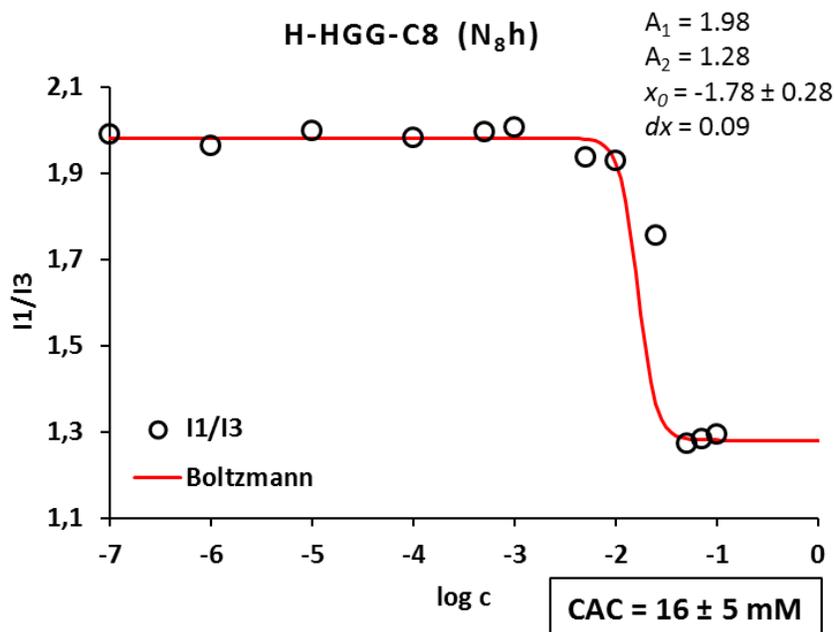


Figure A-31: Evolution du rapport des intensités de fluorescence du pyrène en fonction de la concentration en **N₈h**. Détermination de la CAC en utilisant la sigmoïde de Boltzmann

La sigmoïde de Boltzmann a par ailleurs été utilisé pour la détermination des

concentrations de complexation (CC^{ADN}) entre l'ADN et les lipopeptides, en suivant la fluorescence du BET intercalé entre les paires de bases de l'ADN. Les résultats obtenus en présence de N12h sont présentés à titre d'exemple en Figure A-32.

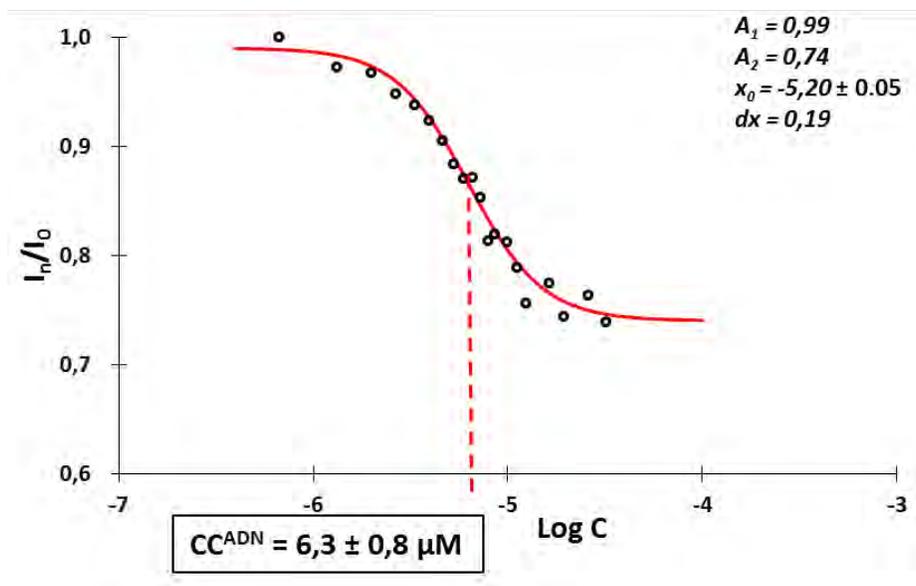
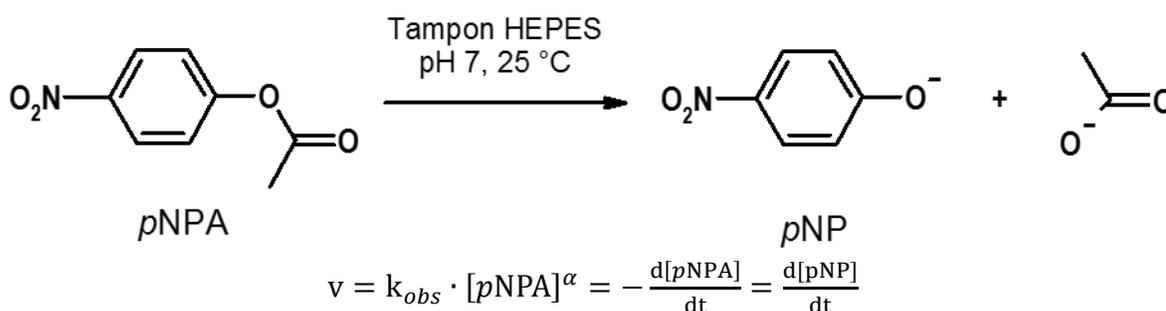


Figure A-32 : Suivi de la fluorescence du BET en fonction de la concentration en N12h. Détermination de la CC^{ADN} par la sigmoïde de Boltzmann

2. Détermination du mécanisme d'hydrolyse en solution tampon



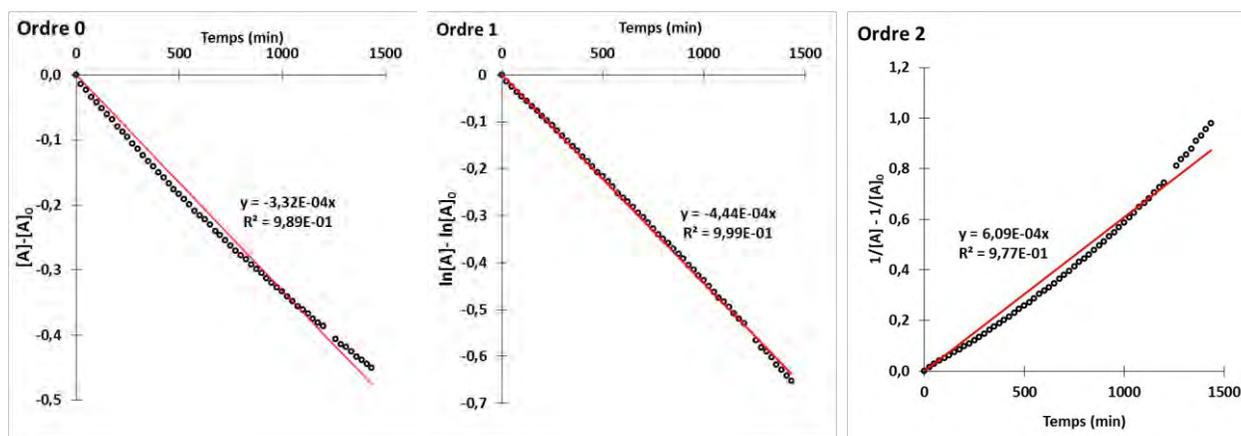
- Détermination de l'ordre α par rapport au pNPA

Si $\alpha = 0$, alors : $[pNPA] = [pNPA]_0 - k_{obs} \cdot t$

Si $\alpha = 1$ alors : $\ln([pNPA]) = \ln([pNPA]_0) - k_{obs} \cdot t$

Si $\alpha = 2$ alors : $1/[pNPA] = 1/[pNPA]_0 + k_{obs} \cdot t$

Nous avons alors mesuré la disparition du pNPA en mesurant l'absorbance à $\lambda_{max} = 273$ nm par spectrophotométrie UV-visible.



Nous obtenons alors le meilleur coefficient de corrélation pour $\alpha = 1$, ce qui est cohérent avec les données de la littérature.

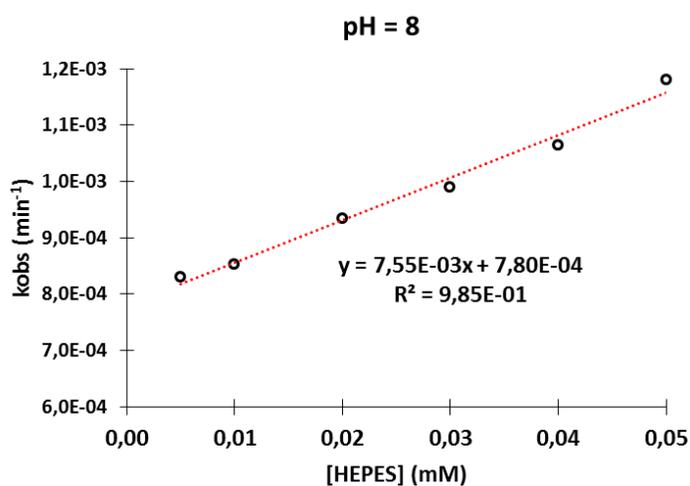
Ainsi, $v = k_{obs} \cdot [pNPA]$ avec $k_{obs} = 4,44 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1} = 7,4 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$

- Mise en évidence de la catalyse acido-basique

Dans le cas le plus général : $k_{\text{obs}} = k_0 + k_{\text{H}^+}[\text{H}^+] + k_{\text{OH}^-}[\text{OH}^-] + k_{\text{HA}}[\text{HA}] + k_{\text{A}^-}[\text{A}^-]$ avec HA et A^- correspondant à tous les acides et bases conjugués (dans notre cas, seulement les espèces présentes dans le tampon).

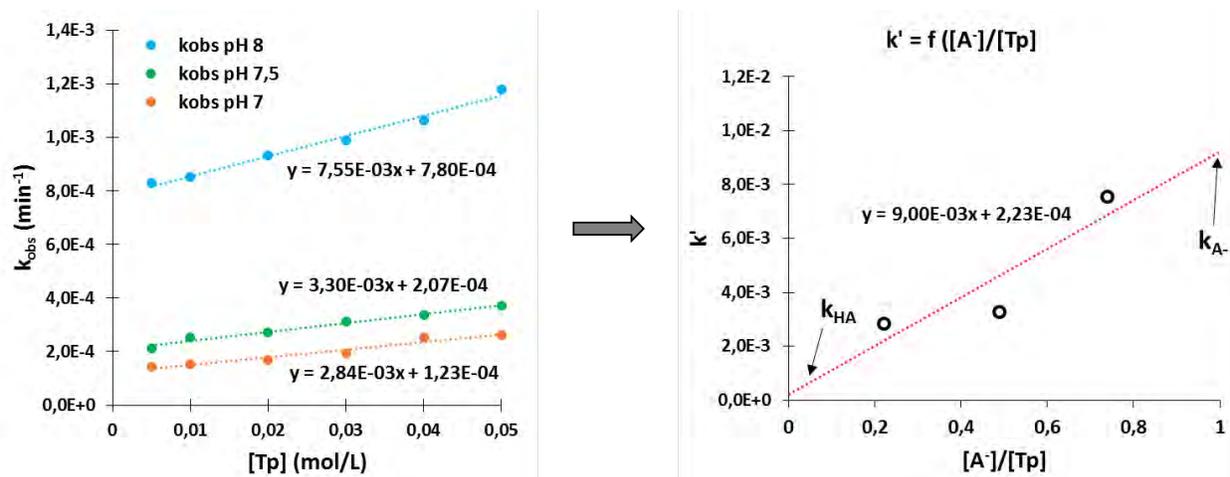
A pH constant: $[\text{H}^+]$ et $[\text{OH}^-]$ restent constants, tout comme le rapport $[\text{HA}]/[\text{A}^-]$. Au contraire, $[\text{HA}]$ et $[\text{A}^-]$ dépendent de la concentration totale du tampon $C_{\text{Tp}} = [\text{HA}] + [\text{A}^-]$.

Si k_{obs} ne varie pas en fonction de la concentration du tampon, alors $k_{\text{HA}} = k_{\text{A}^-} = 0$ et la catalyse est spécifique ; sinon, la catalyse est dite générale.



k_{obs} variant en fonction de la concentration du tampon, nous sommes donc en présence d'une **catalyse générale**.

La détermination de k_{HA} et k_{A^-} peut ensuite être réalisée en faisant varier la concentration du tampon à différents pH.



Les résultats obtenus révèlent alors une catalyse générale acide et basique, avec $k_{A^-} = 9.20 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ et $k_{HA} = 0.22 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$.

Il y a donc deux catalyses simultanées mais la base faible du tampon semble plus efficace que sa forme acide faible.

CrossMark
click for updatesCite this: *RSC Adv.*, 2015, 5, 35830

Synthesis, self-assembly, and catalytic activity of histidine-based structured lipopeptides for hydrolysis reactions in water†

M. Bélières, N. Chouini-Lalanne and C. Déjugnat*

A new series of lipopeptides was designed to study their organocatalytic properties towards ester hydrolysis and the role of their self-assembled structures in catalysis. Synthesis of the catalysts was achieved by grafting fatty chains on tripeptides either at the C-terminal position or at the N-terminal extremity, affording amphiphilic character and self-assembling properties. Insertion of a histidine in the peptide sequence was chosen to bring about organocatalytic activity. Self-organization was evidenced first by the determination of critical aggregation concentrations and then by characterizing the aggregates formed by performing scattering techniques and microscopy. Variation of the structures (peptide sequence, hydrophobic character) led to the formation of various aggregates, from globular objects to fibers. All derivatives containing histidine presented a catalytic activity for the hydrolysis reaction of *p*-nitrophenyl acetate in aqueous solution. The influence of the self-organization on the catalysis was evidenced by showing different behaviors observed between the monomers and aggregates.

Received 13th February 2015

Accepted 13th April 2015

DOI: 10.1039/c5ra02853a

www.rsc.org/advances

Introduction

While organometallic catalysts and enzymes have been dominating the field of catalysis for a long time, organocatalysis appears as an alternative approach with a fast growing interest. Organocatalysts are metal-free small organic molecules which are usually stable, nontoxic, not expensive, easily accessible, and recyclable.^{1–5} Among them are amino acids and peptides (inspired from natural enzymatic catalytic sites),^{6–10} which are most of the time used in organic solvents while water might be involved and play a major role in some mechanisms.¹¹ Another type of catalysis can also be observed in aqueous medium: an interfacial catalysis can be brought thanks to the ability of self-assembled aggregates (mostly micelles, but also vesicles formed by amphiphiles) to increase reactions rates.^{12–19}

In this context, we have chosen to combine organocatalysis and interfacial catalysis by considering the use of self-assembled amphiphilic lipopeptides as catalysts in water (supramolecular enzyme mimics).²⁰ Thanks to the combination of various weak interactions (electrostatics, H-bonding, hydrophobic effect, *etc.*), lipopeptides and surfactant-like peptides have remarkable aggregation properties that lead to the

formation of various self-organized systems.^{21–28} Moreover these aggregates could present an organocatalytic activity, for example in the case of an aldol reaction catalyzed by a proline-based, gel-forming peptide.^{29,30} In addition, the supramolecular organization can affect the catalytic properties,^{31–33} showing that there might be an interplay between aggregation and catalysis.

In the present study, we have chosen to focus on hydrolysis as this reaction plays a major role in many biological processes such as digestion of proteins by proteases, metabolism of esters and lipids involving lipases, or degradation of phosphoesters (regulation of inorganic phosphate, hydrolysis of ATP or nucleic acids, *etc.*). Moreover the control of this model reaction could find applications in various fields such as enzyme inhibition,³⁴ molecular biology, or genetic engineering. In a bio-inspired approach, looking at the active sites in hydrolases reveals that histidine plays a major role in the catalytic activity of the enzymes.³⁵ Therefore we have considered histidine-based lipopeptides as potential self-assembled organocatalysts for hydrolysis reactions in water. Indeed hydrolysis catalyzed by histidine-related compounds is widely documented in the case of simple esters,^{36–42} phosphoesters,^{43–52} or even DNA.^{53,54} As a first step we initiated this study considering the widely used ester (*p*-nitrophenyl acetate) as model substrate.

In a first part we describe the design and the synthesis of a series of potentially catalytic amphiphilic lipopeptides. The tripeptide sequences contain a histidine at the terminal position to provide catalytic activity or they are based on triglycine to afford non-reactive control derivatives. Moreover the modulation of the alkyl chain allows control over the self-assembling properties. In a second part we present the self-assembling

Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique (IMRCP), UMR 5623, Université Paul Sabatier, Bât 2R1, 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex, France. E-mail: dejugnat@chimie.ups-tlse.fr

† Electronic supplementary information (ESI) available: The structural characterization of the lipopeptides, their NMR and FTIR spectra, the tensiometry and pyrene fluorescence measurements, and the determination of hydrolysis in buffer alone. See DOI: 10.1039/c5ra02853a

properties of the lipopeptides, including determination of critical aggregation concentrations and characterization of the aggregates by microscopy and scattering techniques. In the third and final Section, we present the catalytic activity of the lipopeptides on the hydrolysis of the model ester *p*-nitrophenyl acetate. The aim is to evidence the respective contributions of organocatalysis (due to the presence of histidine) and interfacial catalysis (due to self-assembly).

Results and discussion

Design and synthesis of lipopeptides

The amphiphilic structures we have considered are generally composed of a tripeptide linked to a fatty hydrocarbon chain. The choice of a triad as the polar head group was motivated by the wish to later get access to more functional structures by the incorporation of different amino acids, while keeping a short sequence remaining easy to handle. As a starting point we have decided to use histidine at the extremity of the surfactants, using two simple glycines as linkers between histidine and the fatty chain. Few similar structures have already been described in patented studies on gel formation and on hair growth formulations, showing the potential self-assembling and biocompatible properties of this kind of derivatives.^{55–57} As controls, lipopeptides based on triglycine were also synthesized. These molecules do not contain histidine and are supposed to have no organocatalytic activity while keeping self-assembling properties.⁵⁸ Depending on the grafting side, N-terminal or C-terminal peptides were obtained. In addition, the hydrophobicity of the surfactants has been modulated by varying the alkyl chain length from octyl to dodecyl. Moreover two other C-terminal structures were considered: the first one contained a terminal histidine but the carboxylic function was blocked as a methyl ester; the other one contained also a terminal histidine but a serine was included instead of the central glycine of the triad. Indeed this amino acid is frequently present in catalytic triads of numerous hydrolytic enzymes such as proteases, lipases, *etc.*⁵⁹ Finally a catanionic peptide was obtained by proton exchange between a C-terminal peptide and its N-terminal analogue *via* a simple acid–base reaction.⁶⁰

The lipopeptides were obtained in good yields by classical solution synthesis based on Boc strategy and DIC/OxymaPure® activation.⁶¹ This choice allowed us to produce the peptides in a greener way than conventional methods, reducing notably the use of toxic solvents (such as DMF) or potentially explosive reagents (such as HOBT). This approach lies in the field of Green Chemistry which has emerged as a powerful tool to reduce human imprint on environment and to develop safer processes.^{62–64} Among its twelve principles are the molecular economy, the use of natural resources and safe solvents (water), and catalysis. These notions are here combined by considering organocatalysis in aqueous solutions and based on natural renewable substances. General protocols are reported in the experimental part while full spectroscopic analysis can be found in the ESI.† The structures of the lipopeptides are reported in Fig. 1.

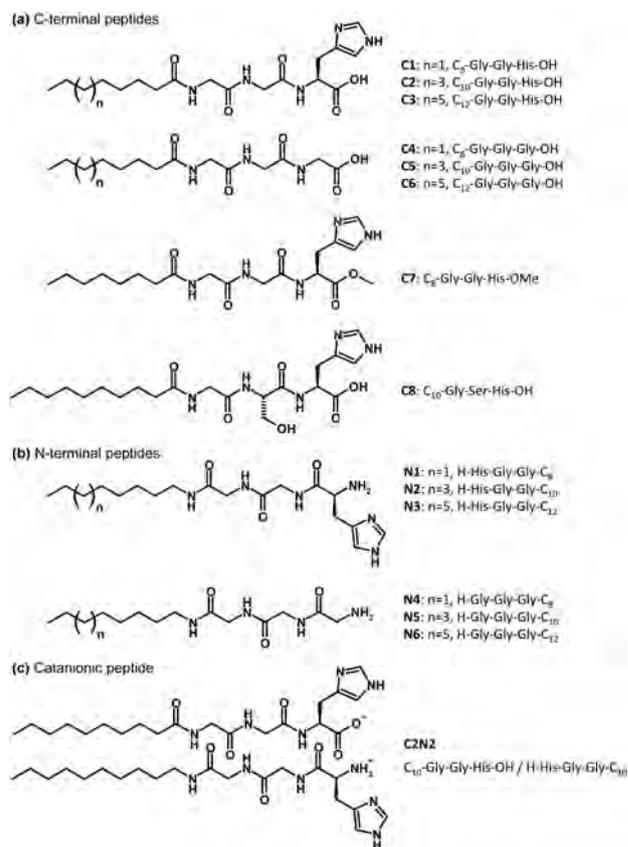


Fig. 1 Structures of the lipopeptides studied: (a) C-terminal peptides, (b) N-terminal peptides, and (c) catanionic peptide.

Physico-chemical properties and self-assembly

Lipopeptides are intrinsically amphiphilic and such molecules can self-assemble in a large variety of more or less ordered structures at the solid state or in aqueous solutions. Upon self-organization, the structures obtained can vary from what predicted for classical surfactants because of the additional specific structuration of peptides *via* H-bonding and other weak interactions between the lateral chains of the amino acids.^{23,28}

At the solid state, FT-IR spectroscopy can bring information on the secondary structures of the peptides by analyzing the amide I–III bands positions in the range 1700–1200 cm^{-1} .^{65,66} For all lipopeptides, the amide I band lied at 1645–1652 cm^{-1} while the amide II band was observed at 1544–1554 cm^{-1} (full spectra are reported in the ESI†). This suggests that the peptide sequences adopt a random or random coil conformation,^{65,66} which is not surprising regarding the shortness of the sequences.

Dissolution of the lipopeptides in aqueous buffered solutions (50 mM HEPES buffer, pH = 7) generally produced opalescent fluids, ranging from slightly cloudy/bluish to strongly opaque solutions. This already shows that the lipopeptides self-assembled in quite large aggregates (>100 nm) because usually micellar solutions remain limpid.

In aqueous solutions, surface tension measurements were performed as a function of the lipopeptides' concentrations to

determine the critical aggregation concentrations (CACs). Generally upon increasing concentration, surface tension decreases then reaches a plateau at a threshold concentration value that corresponds to the CAC.⁶⁷ As an illustrative example, measurements performed for lipopeptides C1 to C6 are shown in Fig. 2 (full measurements are reported in the ESI†).

Another complementary technique based on pyrene fluorescence was also used to determine the CACs,^{68,69} especially for lipopeptides presenting high CACs. Both techniques (tensiometry and pyrene fluorescence) were performed in parallel on most of the lipopeptides, giving CAC values of the same order, and showing that they were in rather good agreement (full results can be found in the ESI†). From these two techniques, averaged CACs were obtained; the accuracy was at best 20%. Full results are reported in Table 1.

In parallel, dynamic light scattering (DLS) was used to estimate the size of the aggregates formed by the lipopeptides above their CACs. However, only few peptides gave valuable results using this technique. The hydrodynamic diameters, measured just above the CACs (solutions became turbid upon slight increase of the concentrations) were 300–500 nm for C1,

250–350 nm for C2, and 200 nm for N1. These sizes cannot correspond to micelles and they could rather refer to larger aggregates, such as vesicles, pieces of membranes, fibers, *etc.* Besides these three lipopeptides, limited solubilities prevented accurate DLS measurements. In fact for most of the peptides, precipitation (or gel formation) occurred at concentrations just above the CACs values. So in those cases it was not possible to prepare samples being concentrated enough to allow relevant DLS analysis.

In the C-terminal series (C1 to C6) we observed that the peptides were weakly surface active (surface tensions only decreased from 72 to about 40 mN m⁻¹). As in the case of classical surfactants, increasing the alkyl chain length led to a decrease of the CACs due to favored hydrophobic interactions.⁶⁷ Moreover, replacing histidine by glycine led to a global four-time increase of the CACs, meaning that the presence of histidine in the C-terminal lipopeptides favored the self-assembly. This could be explained either by stabilizing π -stacking interactions between imidazole rings, or by a global charge compensation decreasing electrostatic repulsions between polar head groups (assuming that negatively charged carboxylates stand at the extremity of the molecules, while some imidazole rings are positively charged at pH = 7). pK_a determinations were realized for some lipopeptides at 2 mM by acid–base titrations and by analysis based on second-derivative plots (see ESI†) to evidence the role of electrostatic interactions. At pH = 7, C-terminal functions are fully deprotonated and exist as carboxylates. pK_a values of the imidazole rings were found to be 7.1 ± 0.1 for C1 and C2 indicating that half of the rings became protonated. Therefore these positive charges could partially compensate the repulsions between carboxylates and favor aggregation. Moreover aggregation had no significant influence on the pK_a values (at 2 mM C1 exists as monomers while C2 is aggregated). This could suggest that the imidazole rings were not directly implied in the aggregation process.

In the case of C7, the presence of an ester function (not charged) dramatically reduced the solubility and the peptide precipitated before any CAC could be measured. Finally replacement of the central glycine by a serine (compound C8) increased the CAC by a factor of 3 as compared to C2. This might be due to unfavorable steric hindrance, even though C8 seems to form pre-aggregates at very low concentration. Indeed a first “CAC” could be detected by tensiometry at 0.1 mM, indicating that the alcohol function in C8 first favors a kind of oligomerization, probably thanks to the formation of H-bonds between the lipopeptides. This pre-organization was not observed with fluorescence measurements, reinforcing the hypothesis that there is an intermediate state, possibly made of hydrated oligomers, before a more significant self-assembly occurs. Moreover hydrogels were easily obtained from solutions of C8, supporting the idea of H-bond networks at higher concentrations.⁷⁰

In the N-terminal series we observed that the peptides N1 to N3 were more surface active than their analogs of the C-terminal series (surface tensions decreased from 72 to about 30 mN m⁻¹). Regarding the effect of the alkyl chain length, increasing the hydrocarbon part from N1 to N3 led to a strong

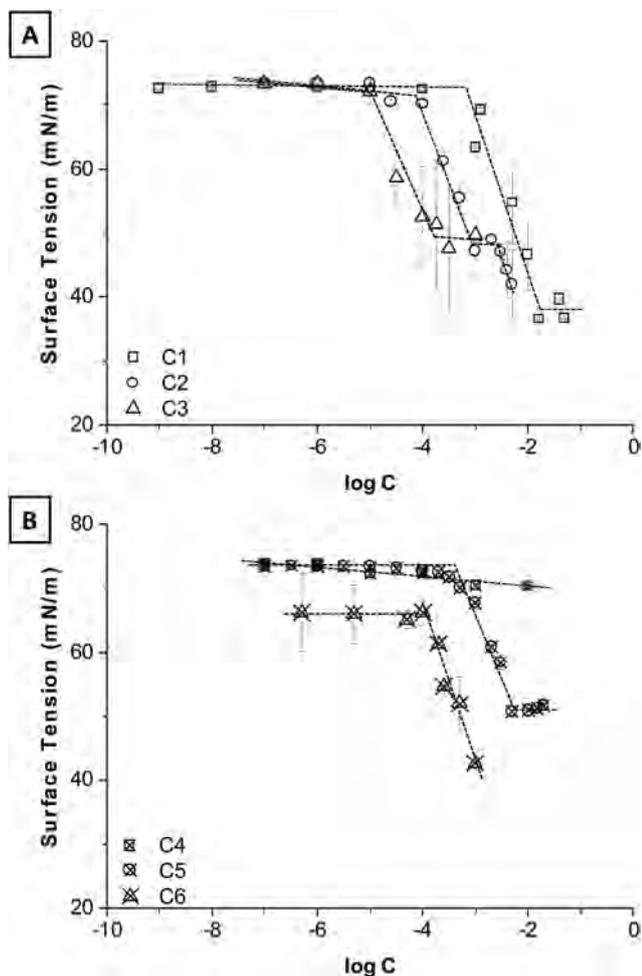


Fig. 2 Variation of the surface tension as a function of the concentration for lipopeptides C1 to C3 (A) and C4 to C6 (B).

Table 1 Critical aggregation concentrations (CACs) of the lipopeptides determined from tensiometry and fluorimetry

Lipopeptide	CAC (mM) from tensiometry	CAC (mM) from fluorimetry	Average CAC (mM)	γ_{CAC} (mN m ⁻¹)
C1 (C ₈ -GGH-OH)	10 ± 2	16.3 ± 3.3	13 ± 4	38 ± 2
C2 (C ₁₀ -GGH-OH)	1.3 ± 0.3	0.75 ± 0.15	1.0 ± 0.5	45 ± 2
C3 (C ₁₂ -GGH-OH)	0.25 ± 0.05	0.33 ± 0.08	0.3 ± 0.1	49 ± 2
C4 (C ₈ -GGG-OH)	No CAC ^a	No CAC ^a	No CAC	—
C5 (C ₁₀ -GGG-OH)	5 ± 1	5.4 ± 1.1	5 ± 1	51 ± 2
C6 (C ₁₂ -GGG-OH)	1.0 ± 0.3	0.85 ± 0.17	0.9 ± 0.3	43 ± 2
C7 (C ₈ -GGH-OMe)	No CAC ^a	No CAC ^a	No CAC	—
C8 (C ₁₀ -GSH-OH)	0.10 ± 0.03 and 2 ± 1 ^b	4.0 ± 0.8	3 ± 1	39 ± 2
N1 (H-HGG-C ₈)	Not measured	16 ± 5	16 ± 5	—
N2 (H-HGG-C ₁₀)	0.7 ± 0.1	1.4 ± 0.3	1.1 ± 0.4	37 ± 2
N3 (H-HGG-C ₁₂)	Not measured	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.02	—
N4 (H-GGG-C ₈)	1.8 ± 0.6 ^c	4.7 ± 0.9	3.2 ± 1.5	55 ± 2
N5 (H-GGG-C ₁₀)	0.4 ± 0.1 ^c	No CAC ^a	No CAC	52 ± 2
N6 (H-GGG-C ₁₂)	1.0 ± 0.3 ^c	No CAC ^a	No CAC	52 ± 2
C2N2	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	42 ± 2

^a No CAC was detected upon increasing concentrations till the solubility limit. ^b Two “CACs” were observed; at the first one, the surface tension only dropped to 53 mN m⁻¹ meaning that this transition might refer to a pre-organization (oligomerization) rather than to a true formation of aggregates. ^c As in the case of C8, the surface tension only decreased to about 55 mN m⁻¹ referring probably to a pre-organization.

decrease of the CAC values, which were divided by a factor of 10 for each addition of two methylene groups in the chain. In contrast, peptides N4 to N6 were very weakly surface active (surface tensions only dropped to about 52–55 mN m⁻¹) and no clear aggregate formation could be evidenced. Like in the case of the C-terminal series, this indicates that the triglycine sequence is much less efficient in promoting aggregation than in the case of a histidine-containing triad.

Finally the cationic lipopeptide C2N2 self-assembled at concentrations lower than what observed for its parent lipopeptides C2 and N2. This is a typical behavior, the aggregation being favored both by charge compensation and hydrophobic interactions between the fatty chains.

In order to visualize the aggregates formed by the lipopeptides, transmission electron microscopy (TEM) was performed on aqueous solutions above the CACs. While N1 clearly formed “hairy” spherical aggregates whose diameters corresponded to DLS data (Fig. 3A), other lipopeptides readily self-assembled in more or less complex fibrillar aggregates. For example, N2 produced pearl necklace structures with spherical objects (50–100 nm in diameter) distributed along the fibers (Fig. 3B). With C2, twisted fibers were observed (Fig. 3C) while C2N2 produced networks of fibers including few smaller roughly spherical objects (Fig. 3D).

These observations are globally consistent with the visual appearance of the lipopeptides solutions which were opalescent or even milky above the CACs, some of them even leading to the formation of hydrogels. Moreover, the variety of the objects formed shows that the aggregation is very dependent both on the peptidic sequence and on the alkyl chain lengths. This property is very important and allows modulating supramolecular aggregates by a fine tuning of the lipopeptides' chemical structure, which could be of special interest when studying the role played by interfaces and dynamics on the catalytic properties of these systems.

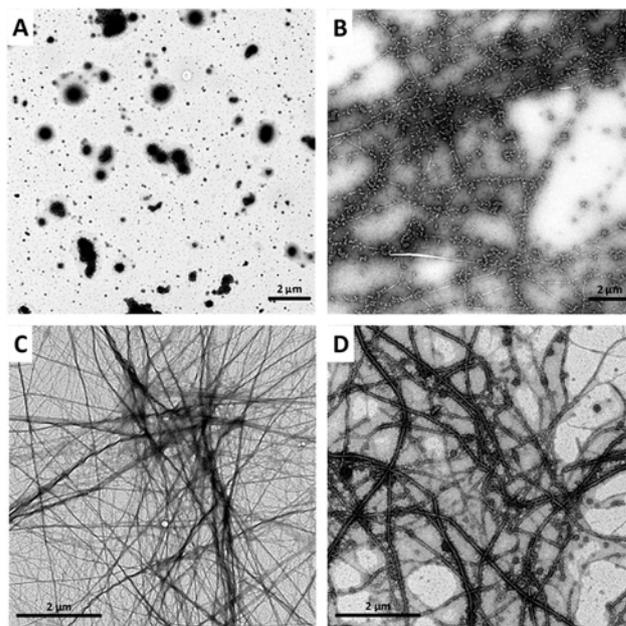


Fig. 3 Transmission electron micrographs showing the aggregates formed by lipopeptides N1 (A), N2 (B), C2 (C), and the cationic derivative C2N2 (D).

Finally, preliminary small-angle neutron scattering experiments (SANS) were conducted on peptides C1 and N1 to get more insights on the structural characteristics of the aggregates (only these samples were measured, because the concentrations of the other peptides were too low – due to weak solubility – to allow accurate measurements). The intensity of the signal $I(Q)$ was corrected for the contribution of the solvent and for the incoherent scattering, and it was finally normalized to obtain values in absolute units. SANS patterns are reported in Fig. 4.

First, we observe that the scattering profiles correspond to relatively large objects since the Guinier regime is not visible even at the lowest Q values ($3 \times 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$). We deduce that the gyration radii R_g of the aggregates are limited by $1/R_g < 3 \times 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$ leading to $R_g > 350 \text{ \AA}$, a size which is too high for micellar aggregates. Then it appears that both lipopeptides presented similar SANS profiles, indicating that the same kinds of objects are present in solution. At low Q values, we observe a variation of the intensity following a Q^{-2} decrease, which suggests the presence of sheet-like structures or vesicles (the membrane thickness remaining very small compared to the sphere radius).⁷¹ This is consistent with the observation of globular hairy aggregates formed by N1 and imaged by TEM. Moreover, both patterns presented a Bragg peak centered at $Q_0 = 0.12 \text{ \AA}^{-1}$ corresponding to an inter-lamellar distance d (or bilayer spacing) of $d = 2\pi/Q_0 = 52 \text{ \AA}$. These preliminary measurements conducted on the shortest (and less hydrophobic) lipopeptides N1 and C1 are then consistent with the formation of globular systems which remained stable for several days before SANS analysis. It is interesting to note that even slightly more hydrophobic peptides self-organize into fibrillar structures rather than globules. We can assume that the fibers might represent the most stable and final aggregates formed by the lipopeptides after the initial transient formation of globular objects. This could be related to the mechanism described for the formation of amyloid fibers, in which small aggregates are first originally formed before their gradual transformation into larger fibrillar structures upon aging.^{72,73}

Catalytic activity on model ester hydrolysis: kinetics experiments

Description of the system used. We have shown in the previous paragraph that the lipopeptides are able to self-assemble in aqueous solutions leading to various structures. In this Section we aim at evidencing whenever these peptides could act as catalysts for hydrolysis reactions, and what could be the influence of self-organization on such a catalysis. As a first

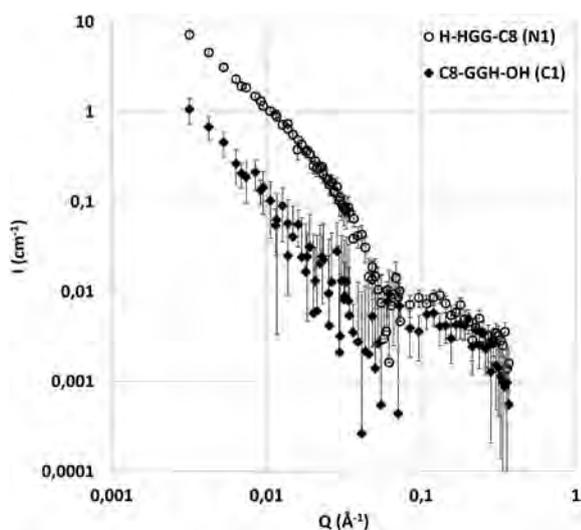


Fig. 4 Experimental SANS signals $I(Q)$ for lipopeptides N1 (16 mM) and C1 (20 mM) in phosphate buffer at pH = 7 and at 25 °C (solvent was D_2O).

step we have considered the ester *p*-nitrophenylacetate (*p*NPA) as a model substrate. Indeed the hydrolysis of *p*NPA is easily monitored by UV-Vis spectroscopy thanks to the formation of the highly colored product *p*-nitrophenolate (*p*NP, yellow).⁷⁴ Hydrolysis experiments were carried out in the same conditions as for the characterization of lipopeptides' self-assembly (buffered solutions, pH = 7). Thus the extinction coefficient of *p*NP was determined in HEPES buffer at pH = 7. A global value of $7772 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 406 nm was determined in solution for both co-existing phenolate ion and *p*-nitrophenol ($pK_a = 7.15$), while phenolate remained the only absorbing specie at this wavelength. The hydrolysis reaction is shown in Fig. 5.

Often considered in the literature as a reference, histidine was chosen as a model catalyst.³⁷ Moreover we have chosen to maintain the amount of catalysts at 10%, which remains a reasonable (or even low) ratio in various peptide-based organocatalysis studies.^{38,75–77} The first experiment was to check the catalytic activity of histidine. Starting with an initial *p*NPA concentration $[pNPA]_0 = 20 \text{ mM}$, we could observe a linear increase of the absorbance at 406 nm as a function of time, related to the formation of *p*NP. In the presence of 10% histidine ($[\text{His}] = 2 \text{ mM}$), the conversion was 6% after 2 h with an initial rate of $\nu_{0,\text{His}} = 106 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$. These values were much higher than for the control experiment, in the absence of catalyst (buffer alone: conversion = 0.5%, $\nu_{0,\text{buffer}} = 7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) and this justified the choice of histidine as a reference catalyst. Then we have studied the catalytic activity of our compounds towards *p*NPA hydrolysis, and compared the results with those obtained with histidine and control triads, namely Ac-GGH-OH and H-HGG-NHMe bearing only one methyl group as alkyl chain, on the C-terminal and N-terminal positions, respectively. In all cases, the ratio $[\text{catalyst}]/[pNPA]$ was kept constant and equal to 10%. The choice of the catalysts concentrations was driven by the self-organization properties of the lipopeptides as well as by the solubility of *p*NPA. Regarding the choice of the concentration to study the hydrolysis in the aggregated state, two limitations occurred. On one hand, lipopeptides bearing C_{12} alkyl chains were only scarcely soluble above the CAC and formed very turbid solutions even at 1 mM, making difficult the UV-Vis monitoring due to light scattering. On the other hand, lipopeptides bearing C_8 alkyl chains and presenting very high CACs would have required working with up to 0.1 M *p*NPA solutions which would have also led to turbid suspensions due to the limited solubility of the substrate in water. Therefore we decided to focus on lipopeptides bearing C_{10} alkyl chains, because all of them presented aggregated states at 2 mM and *p*NPA was soluble enough

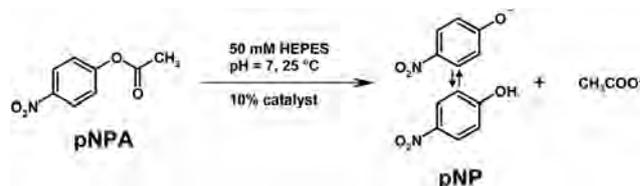


Fig. 5 Hydrolysis reaction of *p*NPA in aqueous solution containing 10% catalyst, and leading to the formation of *p*NP and acetate.

in HEPES buffer at 20 mM. In parallel, analogous lipopeptides bearing C₈ alkyl chains were considered to study the monomeric states, because all of them presented CACs values much higher than 2 mM.

Results. *p*NPA conversion was measured as a function of time for 2 h by monitoring the appearance of *p*NP, as calculated by: $\text{conversion} = (\text{absorbance}/\epsilon_{pNP})/[pNPA]_0$. Full results are reported in Fig. 6. In addition, the initial rates of the reactions and the conversion ratios after 2 h are reported in the Table 2.

In the absence of peptidic catalysts (buffer alone, Fig. 6A), the hydrolysis reaction was very slow and the kinetics profile was linear, as stated above. Analysis of kinetic parameters is

reported in the ESI.† It shows that the reaction is of first order with respect to the substrate and that hydrolysis undergoes a general acid–base catalysis mainly mediated by the basic form of HEPES. It implies that any weak acids or weak bases that would be added to the medium could also act as catalysts.

Using triglycine-based lipopeptides as catalysts (either C5 or N5) led to results close to those obtained with the buffer alone (Fig. 6A). These experiments show that C5 and N5 do not present any apparent catalytic activity, and support first the idea that the presence of histidine in the peptidic sequence is a prerequisite to confer such an organocatalytic property. The introduction of weak acids or bases (ammonium for N5, carboxylate for C5) is not sufficient to enhance the global buffer catalytic activity. Moreover supramolecular catalysis is not evidenced here because the concentrations of the lipopeptides were below their respective CACs.

Using lipopeptides containing histidine either at the C-terminal position (C1 and C2) or at the N-terminal position (N1 and N2), or in the cationic combination C2N2 led to different results. For each compound the catalytic activity was evidenced and found to be equal or superior to that of simple histidine.

In the N-terminal series, N1 (monomeric state) was found to be about twice more efficient as the reference triad H-HGG-NHMe containing a simple methyl group as alkyl chain and which presented a linear profile of hydrolysis (Fig. 6A). This shows that the addition of a hydrophobic character to the catalyst, thanks to the presence of the alkyl chain, promotes the catalytic activity towards hydrolysis. It suggests that the hydrophobic fatty chain interacts in a positive way with the quite hydrophobic substrate *p*NPA, making it closer to the histidine-containing catalytic group and enhancing therefore the hydrolysis efficiency. Then, moving from N1 (monomeric state) to N2 (aggregated state) led to a slight decrease of the organocatalytic efficiency which then reached the level observed with single histidine. The hydrolysis profile of N2 was also linear and lied between those of N1 and the reference triad. Therefore in this series, the aggregates appear as less efficient catalysts than the monomers. This observation could be at a first look quite surprising because aggregates such as micelles usually exhibit enhanced catalytic activity thanks to the formation of a dynamic interfacial zone where the reactants are in closer contact compared to the bulk. In our case we have shown that the substrate *p*NPA seems to have a pronounced affinity with the hydrophobic alkyl chains; moreover the aggregates formed by N2 are not micelles but rather much less dynamic fiber-like objects. Therefore it looks like the substrate is retained in the hydrophobic region of the aggregates and could not access the hydrolytic nucleophiles as easily as in the case of N1. This phenomenon has recently been reported for redox-controllable self-assembling peptides for which catalytic activity in the hydrolysis of ester was much higher in the case of dynamic micelles rather than for fibers.⁷⁸ This protecting effect could be of special interest for example in the formulation of active esters that should be slowly released in a controlled way. We show here that a fine tuning of the structures of the catalytic lipopeptides allows the control of the aggregation and makes

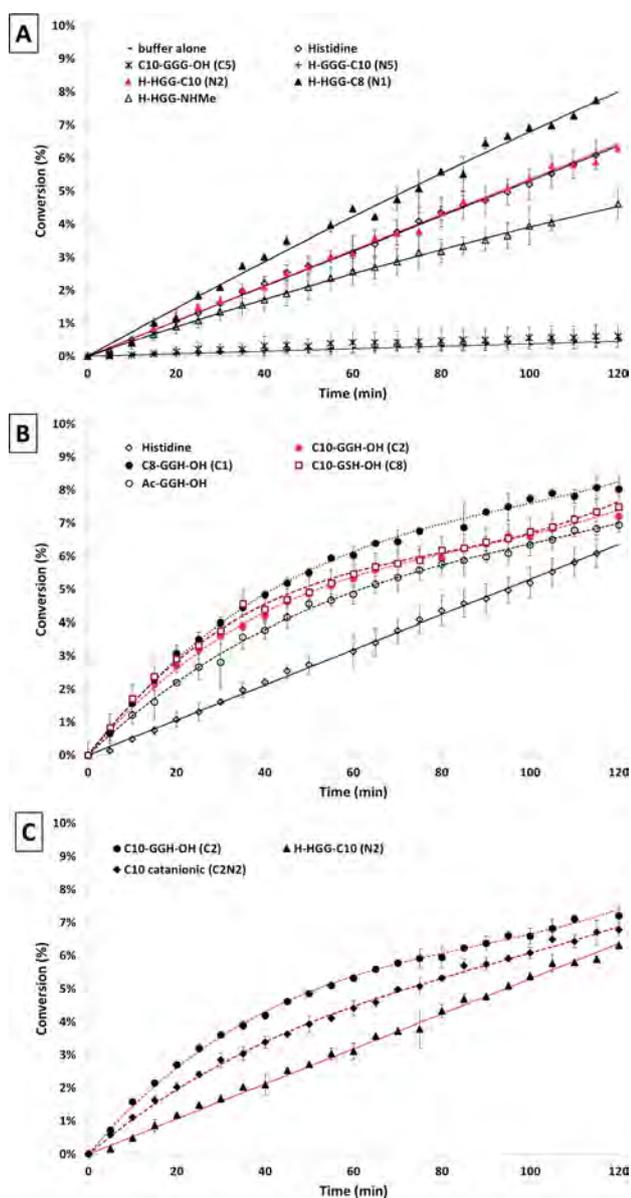


Fig. 6 Evolution of *p*NPA conversion into *p*NP as a function of time, in the presence of 10% catalysts (HEPES buffer, pH = 7, 25 °C). (A) N-terminal peptides, triglycine-based controls, histidine, and buffer alone. (B) C-terminal peptides and histidine. (C) Catanionic lipopeptide C2N2 and the parent lipopeptides C2 and N2. Lines and dashed lines are drawn as eye guides. Red curves refer to aggregated systems.

Table 2 Initial rates of the hydrolysis reaction of pNPA ($[pNPA]_0 = 0.02$ mol L⁻¹) in the presence of different catalysts (10% mol) in 50 mM HEPES buffer (pH = 7, 25 °C), and the corresponding conversion ratio after 2 h

Catalyst	Aggregation state	ν_0 (10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ min ⁻¹)	Conversion at 2 h (%)
No catalyst	—	7 ± 3	0.5 ± 0.2
Histidine	Monomers	106 ± 8	6.4 ± 0.5
C ₁₀ -GGG-OH (C5)	Monomers	10 ± 2	0.6 ± 0.4
H-GGG-C ₁₀ (N5)	Monomers	9 ± 4	0.5 ± 0.2
C ₁₀ -GGH-OH (C2)	Aggregates	314 ± 19	7.4 ± 0.3
C ₈ -GGH-OH (C1)	Monomers	311 ± 4	8.2 ± 0.5
Ac-GGH-OH	Monomers	242 ± 50	6.9 ± 0.3
C ₁₀ -GSH-OH (C8)	Aggregates	343 ± 44	7.5 ± 0.4
H-HGG-C ₁₀ (N2)	Aggregates	124 ± 3	6.4 ± 0.2
H-HGG-C ₈ (N1)	Monomers	173 ± 4	8.0 ± 0.1
H-HGG-NHMe	Monomers	91 ± 21	4.5 ± 0.5
C ₁₀ catanionic (C2N2)	Aggregates	220 ± 12	6.9 ± 0.3

possible the direction of the catalysis efficiency towards either an enhanced activity (active monomers) or a reduced one (protective aggregates).

In the C-terminal series (Fig. 6B), some differences appeared compared to the N-terminal series. First the hydrolytic profiles were not linear anymore, suggesting different and/or more complex mechanisms. After an initial burst with initial rates being 2–3 times higher than for corresponding N-terminal catalysts, the hydrolysis slowed down significantly so that the conversion ratios after 2 h reactions were similar to that observed with N-terminal catalysts. The C-terminal lipopeptides appear initially to be more efficient catalysts that rapidly seem to get partially saturated, as in the case of enzymatic catalysis. Like in the case of N1 and N2, aggregation of the catalyst decreased the apparent catalytic activity: the lipopeptide C1 (monomeric state) was the most efficient catalyst, whereas the catalytic activity was reduced for C2 (aggregated state), which dropped to a level just above the one of the reference triad Ac-GGH-OH. Again this evidences the subtle balance that should be managed regarding the hydrophobic part of the catalysts, either to produce active, non-aggregated species or rather protective, aggregated objects. Still in the C-terminal series, the introduction of a serine in the middle of the peptidic sequence (comparing C2 and C8) did not change significantly the catalytic activity. This shows that the potential supporting role played by serine in the hydrolysis mechanism has to be relayed by another catalytic amino acid (such as aspartic acid) as evidenced in many catalytic triads of hydrolases.⁷⁹

In the case of the catanionic derivative C2N2 (Fig. 6C), the catalytic activity was found to be exactly the average of activities independently observed with C2 and N2 respectively. Although a synergistic effect had been evidenced in the aggregation behavior (lower CAC), here the system simply behaves as a simple combination of the isolated components. In fact we have shown that the aggregates formed by C2N2 are not radically different from the aggregates formed by C2 or N2. This means that, from a supramolecular point of view, combining C2 and N2 did not bring any

additional feature that could have promoted the interfacial catalysis. Therefore, from a molecular point of view, the catanionic association is equivalent to the simple combination of the chemical moieties implied in the organocatalytic process.

Conclusions

In this paper we have presented the synthesis of surface active, histidine-based lipopeptides as well as their aggregation properties and their catalytic activity for hydrolysis reactions. The controlled synthesis of the catalysts gave access to a series of various compounds bearing an alkyl chain grafted to a tripeptide sequence, either at the C-terminal position or at the N-terminal position. The peptide sequences potentially included histidine to bring organocatalytic properties. In addition, the control of the chain length allowed the tuning of the hydrophobicity of the lipopeptides with a view to vary their supramolecular properties. Determination of the critical aggregation concentrations showed that the synthesized derivatives could self-assemble in water. Indeed the catalysts formed aggregates in aqueous solution, which were characterized by scattering experiments (light, neutrons) and electron microscopy. The large, non-dynamic aggregates ranged from globular objects (for the most hydrophilic compounds) to fibrillar structures. These assemblies were then tested as catalysts for the hydrolysis of a model substrate (*para*-nitrophenyl acetate) and the catalytic activity was compared to the one observed with control derivatives or non-aggregated lipopeptides. The main results of these preliminary catalysis experiments are: (i) histidine should be included in the peptide sequence to get catalytic activity; (ii) different mechanisms are evidenced regarding the use of C-terminal or N-terminal peptides; (iii) lipopeptides are more efficient catalysts as monomers than in aggregates showing that a subtle balance of the hydrophobic part could be used to orientate towards activated hydrolysis or rather protection of the substrate.

Globally these results show that the control of the catalyst's chemical structure allows the tuning of the self-assembling properties, which themselves could guide the catalytic activities. Further experiments are under progress to explicit the different mechanisms implied in these reactions (especially between the C- and N-terminal series) and to determine the quantitative contributions of the different tunable parameters (charges, position of histidine, hydrophobic interactions, *etc.*). In addition the hydrolytic activity of these new self-assembling organocatalysts will be extended to other substrates of interest, like biologically active esters, phosphate esters, and even bio-macromolecules such as DNA.

Experimental part

Materials and synthesis

Lipopeptides C2, C8, and N2 were obtained from Genscript (Hong Kong) while the other molecules were synthesized by classical solution synthesis based on Boc strategy and DIC/OxymaPure® activation (see below). H-Gly-Gly-OH, Boc-Gly-Gly-OH, H-His(1-Trt)-OMe, HCl, and Boc-His(1-Boc)-OSu were

obtained from Bachem and H-Gly-Gly-Gly-OH from Abcr. Octanoyl chloride, decanoyl chloride, dodecanoyl chloride, octylamine, and dodecylamine were purchased from Sigma-Aldrich (France) and decylamine from Abcr. Triisopropylsilane (TIS), Oxyma and diisopropylcarbodiimide (DIC) were obtained from Sigma-Aldrich while diisopropylethylamine (DIEA) and trifluoroacetic acid (TFA) were from Abcr and VWR respectively. *tert*-Butyl methyl ether (TBME) was provided by Alfa Aesar and dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EtOAc), methanol (MeOH) were from Sigma-Aldrich. Other compounds included acetic acid (AcOH) from Sigma-Aldrich, sodium chloride (NaCl) from Abcr, sodium hydrogencarbonate (NaHCO₃) and anhydrous sodium sulfate (Na₂SO₄) from Carlo Erba Reagents. Water used in all experiments was produced by a two-stage Milli-Q filtration system from Millipore and had a resistivity higher than 18.2 MΩ cm.

Except for C2, C8, and N2, the lipopeptides were synthesized in solution using Boc strategy and DIC/Oxyma® activation.

Lipopeptides C1 and C3 were synthesized according to the following general sequence depicted in Fig. 7.

C_n-Gly-Gly-OH. Acylated diglycines were obtained by a Schotten–Baumann reaction in water. Diglycine (5 mmol) was dissolved in 6 mL of 1 M aqueous NaOH and this solution was cooled with an ice bath. Under stirring were added simultaneously to this solution the alkanoyl chloride (10 mmol) and a 1 M aqueous NaOH solution (12 mmol). The mixture was then let to warm up to room temperature and stirred for 4 h leading to the formation of a white suspension. 1 M aqueous HCl was then added until the pH decreased to 1 and a massive precipitate was formed. The white solid was then filtered under vacuum, washed with cold water then acetone, and recrystallized (ethyl acetate/methanol, 3 : 1) in the case of the octyl derivative, or washed with petroleum ether in the case of the dodecyl derivative.

C_n-Gly-Gly-His(1-Trt)-OMe. Acylated diglycine C_n-Gly-Gly-OH (2.5 mmol) was placed in a flask containing Oxyma (5 mmol) and 25 mL DCM at room temperature. Addition of DIEA (1.25 mmol) led to a yellow suspension. DIC (5 mmol) was added and the mixture was maintained under stirring for an activation time of 10 min. Then a solution of H-His(1-Trt)-OMe, HCl (5 mmol) and DIEA (5 mmol) in 25 mL DCM was added to the previous mixture. The resulting solution became more limpid

and was stirred for 16 h at room temperature, leading to an orange solution. After removing the solvent under reduced pressure, the orange solid was dissolved in 25 mL EtOAc and this organic phase was washed successively with 25 mL of 5% aqueous AcOH, several times with 25 mL saturated aqueous solution of NaHCO₃ (until the aqueous phase remained colorless), and finally twice with 25 mL brine. The organic phase was dried over Na₂SO₄, then evaporated to dryness under reduced pressure. The resulting solid was washed with 100 mL TBME under heating. Filtration afforded the title compound as a pale yellow powder.

C_n-Gly-Gly-His-OMe. Deprotection of the trityl group was achieved using TFA in the presence of TIS and H₂O as scavengers. To C_n-Gly-Gly-His(1-Trt)-OMe (2 mmol) was added 17 mL of a 85 : 10 : 5 TFA/TIS/H₂O solution. The solid dissolved before a new precipitate formed. The mixture was stirred at 25 °C for 2 h then evaporated to dryness under reduced pressure. The resulting solid was dissolved in EtOAc (50 mL) and the organic phase was washed several times with aqueous saturated NaHCO₃ (100 mL) solution until the pH of the aqueous phase reached 9. During these washes, a white precipitate formed which was filtered and washed with EtOAc. Recrystallization from DCM/MeOH afforded the targeted compound.

C_n-Gly-Gly-His-OH. Cleavage of the methyl group was achieved by saponification. In a flask was placed C_n-Gly-Gly-His-OMe (2 mmol) and a solution of LiOH (3 mmol) in 20 mL of 1 : 1 THF/H₂O was added at 4 °C (ice bath). The suspension was stirred for 1 h at 4 °C and it was let to warm up to room temperature. Then 1 M H₂SO₄ was added until the pH value reached 3. The suspension was diluted with 30 mL H₂O and 50 mL TBME were added. After stirring, the white solid formed was collected by filtration under reduced pressure and rinsed with acetonitrile. The peptide C1 was too soluble in water and it was rather purified by desalting on a SPE column (Chromabond® HR-X/6 mL/500 mg from Macherey-Nagel).

Lipopeptides C4, C5 and C6 were synthesized according to the following general scheme (Fig. 8).

C_n-Gly-Gly-Gly-OH. Acylated triglycines were obtained by a Schotten–Baumann reaction in water. Triglycine (5 mmol) was dissolved in 6 mL of 1 M aqueous NaOH and this solution was cooled with an ice bath. Under stirring were added simultaneously to this solution the alkanoyl chloride (10 mmol) and a 1 M aqueous NaOH solution (12 mmol). The mixture was then let to warm up to room temperature and stirred for 4 h leading to the formation of a white suspension. 1 M aqueous HCl was then added until the pH decreased to 1 and a massive precipitate was formed. The white solid was then filtered under vacuum, washed with cold water then acetone and collected without further purification.

Lipopeptides N1 and N3 were synthesized according to the following general sequence depicted in Fig. 9.

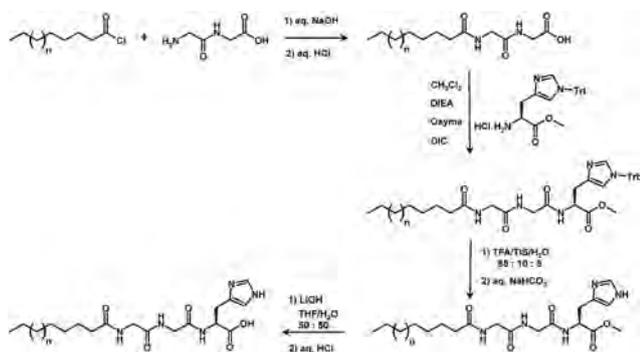


Fig. 7 General synthetic pathway for the preparation of lipopeptides C1 and C3.

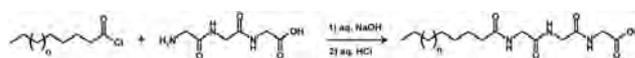


Fig. 8 Synthesis of lipopeptides C4–C6 by Schotten–Baumann acylation of triglycine.

Boc-Gly-Gly- C_n . Protected diglycine (5.5 mmol) was placed in a flask containing Oxyma (7.5 mmol) and 20 mL of DCM at room temperature. DIC (7.5 mmol) was added and the mixture was maintained under stirring for an activation time of 10 min. The alkylamine (5 mmol) was then added to the previous mixture. The resulting solution became more limpid and was stirred for 5 h at room temperature, leading to an orange solution.

After removing the solvent under reduced pressure, the orange solid was dissolved in 50 mL EtOAc and this organic phase was washed successively with 50 mL of 5% aqueous AcOH, several times with 50 mL saturated aqueous solution of NaHCO_3 (until the aqueous phase remained colorless), and finally three times with 50 mL brine. The organic phase was dried over Na_2SO_4 , then evaporated to dryness under reduced pressure. The resulting solid was washed with 100 mL petroleum ether at room temperature. Filtration afforded the title compound as a slight orange powder.

H-Gly-Gly- C_n . Protected acylated diglycine Boc-Gly-Gly- C_n (4.5 mmol) was dissolved in 10 mL of 50 : 50 TFA/DCM. The mixture was stirred at room temperature for 30 minutes then evaporated to dryness under reduced pressure. To the resulting solid was added aqueous saturated NaHCO_3 until the pH reached 8. Addition of 40 mL EtOAc (40 mL) induced the formation of a precipitate. The solid was filtered and washed twice with EtOAc, affording a beige compound.

Boc-His(1-Boc)-Gly-Gly- C_n . *N*-acylated diglycine H-Gly-Gly- C_n (3 mmol) was placed in a flask containing Boc-His(1-Boc)-OSu (6 mmol) and 20 mL DCM at room temperature. Addition of DIEA (9 mmol) led to a yellow suspension that was stirred for 4 h at room temperature, leading to an orange solution. After removing the solvent under reduced pressure, the orange solid was dissolved in 20 mL DCM and this organic phase was washed three times with 20 mL saturated aqueous solution of NaHCO_3 , and twice with 20 mL water. The organic phase was dried over Na_2SO_4 , then evaporated to dryness under reduced pressure. The targeted compound was obtained after recrystallization from EtOAc (octyl derivative) or after washing with petroleum ether (dodecyl derivative).

H-His-Gly-Gly- C_n . Deprotection of the two amine groups was achieved using TFA in DCM as for the deprotection of Boc-Gly-Gly- C_n . The final product was collected after preparative high-performance liquid chromatography.

Lipopeptides N4, N5 and N6 were synthesized according to the following general scheme (Fig. 10).

Boc-Gly-Gly-Gly- C_n . Protected triglycine (4.4 mmol) was placed in a flask containing Oxyma (6 mmol) and 20 mL of DCM at room temperature. DIC (6 mmol) was added and the mixture was maintained under stirring for an activation time of 10 min. Then alkylamine (4 mmol) was added to the previous mixture. The resulting solution became more limpid and was stirred for 5 h at room temperature, leading to an orange solution. After removing the solvent under reduced pressure, the orange solid was dissolved in 50 mL EtOAc and this organic phase was washed successively with 25 mL of 5% aqueous AcOH, several times with 25 mL saturated aqueous solution of NaHCO_3 (until the aqueous phase remained colorless), and finally twice with 25 mL brine. The organic phase was dried over Na_2SO_4 , then evaporated to dryness under reduced pressure. During these washes, a beige precipitate formed which was filtered and washed with EtOAc.

H-Gly-Gly-Gly- C_n . Protected acylated triglycine Boc-Gly-Gly-Gly- C_n (3.5 mmol) was dissolved in 20 mL of 50 : 50 TFA/DCM. The mixture was stirred at room temperature for 30 minutes then evaporated to dryness under reduced pressure. To the resulting solid was added aqueous saturated NaHCO_3 until the pH increased to 8 and a massive precipitate formed. The yellow solid was then filtered under vacuum, washed with water then acetone. Recrystallization from methanol/water (1 : 3) afforded a white compound.

C2N2. The catanionic derivative C2N2 was prepared by acid-base reaction between C_{10} -Gly-Gly-His-OH (C2, 0.12 mmol) and H-His-Gly-Gly- C_{10} (N2, 0.12 mmol) dispersed in 60 mL water. After stirring for 2 h at room temperature, a homogeneous solution was obtained. Removal of water by freeze-drying afforded the catanionic derivative as a white powder.

Full spectroscopic characterizations and complementary analysis are reported in the ESI.†

General methods

CAC determination by surface tension measurements.

Surface tension measurements were performed with a Krüss EasyDyne tensiometer using the Wilhelmy plate method. Solutions of lipopeptides were prepared by simple dissolution of the surfactants in HEPES buffer (50 mM, pH = 7, 25 °C). These

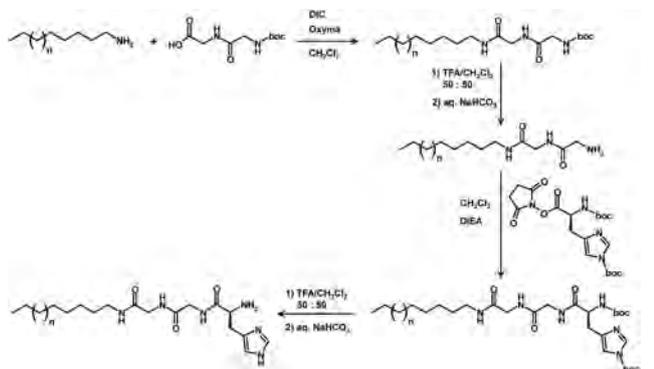


Fig. 9 General synthetic pathway for the preparation of lipopeptides N1 and N3.

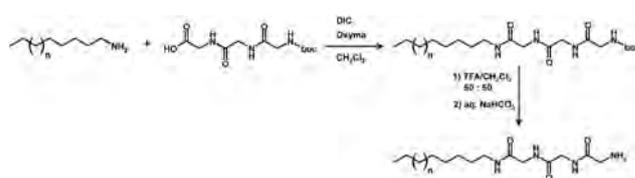


Fig. 10 Two-step synthesis of lipopeptides N4–N6 from protected triglycine.

stock solutions were diluted with buffer to allow covering the concentration range over few decades. For each experiment, three sets of ten readings were performed and averaged. Moreover the CAC values reported come from the averaging of several independent experiments.

CAC determination by the pyrene fluorescence method. Corrected steady state fluorescence spectra were recorded with a Photon Technology International (PTI) Quanta Master 1 spectrofluorimeter. Measurements were conducted at 25 °C in temperature-controlled quartz cells. The excitation wavelength was 337 nm and the emission spectra were recorded from 350 to 500 nm. The I_1/I_3 pyrene fluorescence ratio was calculated from the relative intensities of the emission bands at $I_1 = 371$ nm and $I_3 = 381$ nm. As for tensiometry measurements, series of lipopeptides solutions at different concentrations in HEPES buffer were prepared. For each series, a stock solution was first prepared containing a 1% v/v 10^{-4} M pyrene solution in methanol so that the final pyrene concentration was 10^{-6} M. Then subsequent dilutions were realized using a HEPES buffer already containing pyrene at 10^{-6} M.

Determination of the size of the aggregates by DLS. Dynamic Light Scattering (DLS) experiments were conducted at 25 °C using a ZEN 3600 Zetasizer NanoZS from Malvern, operating in backscattered mode at 173° with a 4 mW helium–neon laser (wavelength: 633 nm), with the samples placed in a thermostatted quartz cell. All measurements were carried out with regard to solvent viscosity and they were realized as triplicates. The mean sizes values obtained in the intensity distribution profiles were averaged.

Determination of the size and shape of the aggregates by SANS. Small Angle Neutron Scattering (SANS) experiments were carried out at the LLB neutron reactor facility (Leon Brillouin Laboratory at Saclay, France) at the PACE beamline. Raw data were recorded at different neutron wavelengths (13 and 6 Å) and different sample-to-detector distances (5 m and 1 m) to allow covering the entire Q -range (3×10^{-3} to 0.4 \AA^{-1}). Data were then combined and finally corrected for transmission, solvent, and detector response and further normalized by 1 mm H₂O sample to get intensities in absolute units (cm^{-1}).

Imaging of the aggregates by TEM. The morphologies of the aggregates were evaluated by transmission electron microscopy (TEM) using a Hitachi HT7700 microscope operating at 120 kV. Specimen preparation was realized by placing a drop of the sample solution on a copper grid followed by negative staining with a 1% (w/v) sodium phosphotungstate or a 2% (w/v) uranyl acetate solution. Experiments were realized at the “Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie” (CMEAB) platform from the Biomedical Federative Research Institute at the Rangueil Faculty of Medicine (Toulouse University).

pK_a determination. Potentiometric titrations were carried out using a pH probe connected to a Model 310 pH-meter (Hanna Instruments), calibrated with standard buffers (pH = 4.01 and pH = 7.01) from Hanna Instruments. Titration were performed at 25 ± 1 °C in aqueous solutions containing 0.1 M potassium chloride. Lipopeptides were prepared at 2 mM and titrated with aliquots of 0.02 M NaOH or 0.02 M HCl. Second-derivative method was chosen for pK_a determination.

Kinetics experiments

For each catalysis experiment, 15 mL of a 2 mM catalyst solution was first prepared in aqueous 50 mM HEPES buffer (pH = 7) and maintained at 25 °C (± 1 °C) under stirring. The hydrolysis reaction was then initiated by adding to the catalyst 250 μL of a 1.2 M *p*NPA solution in acetonitrile (*p*NPA was not soluble enough in water). Therefore the initial concentration of *p*NPA was 20 mM in the reaction flask while the amount of acetonitrile remained negligible (<2%). The reaction course was monitored spectrophotometrically at 406 nm by recording the absorbance of the *p*NP ion formed upon *p*NPA hydrolysis. Every 5 minutes, aliquots were taken and diluted at least 10 times before absorbance measurements using a Specord 600 spectrophotometer from Analytik Jena.

Acknowledgements

Dr J. Jestin is gratefully acknowledged for assistance as local contact at the LLB facility in Saclay. D. Goudouneche is thanked for assistance in TEM experiments (staining, imaging) at the CMEAB facility in Toulouse. M. Bélières thanks the French Ministry for National Education, Higher Education, and Research for funding.

Notes and references

- 1 S. Bertelsen and K. A. Jorgensen, Organocatalysis-after the gold rush, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**(8), 2178–2189.
- 2 C. Grondal, M. Jeanty and D. Enders, Organocatalytic cascade reactions as a new tool in total synthesis, *Nat. Chem.*, 2010, **2**(3), 167–178.
- 3 E. Marques-Lopez, R. P. Herrera and M. Christmann, Asymmetric organocatalysis in total synthesis – a trial by fire, *Nat. Prod. Rep.*, 2010, **27**(8), 1138–1167.
- 4 A. Moyano, N. El-Hamdouni and A. Atlamsani, Asymmetric Organocatalytic Rearrangement Reactions, *Chem.–Eur. J.*, 2010, **16**(18), 5260–5273.
- 5 C. Zhong and X. D. Shi, When Organocatalysis Meets Transition-Metal Catalysis, *Eur. J. Org. Chem.*, 2010, **16**, 2999–3025.
- 6 E. A. C. Davie, S. M. Mennen, Y. Xu and S. J. Miller, Asymmetric catalysis mediated by synthetic peptides, *Chem. Rev.*, 2007, **107**(12), 5759–5812.
- 7 E. R. Jarvo and S. J. Miller, Amino acids and peptides as asymmetric organocatalysts, *Tetrahedron*, 2002, **58**(13), 2481–2495.
- 8 S. J. Miller, In search of peptide-based catalysts for asymmetric organic synthesis, *Acc. Chem. Res.*, 2004, **37**(8), 601–610.
- 9 M. Raynal, P. Ballester, A. Vidal-Ferran and P. W. N. M. van Leeuwen, Supramolecular catalysis. Part 2: artificial enzyme mimics, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**(5), 1734–1787.
- 10 M. S. Taylor and E. N. Jacobsen, Asymmetric catalysis by chiral hydrogen-bond donors, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, **45**(10), 1520–1543.

- 11 N. Mase and C. F. Barbas, In water, on water, and by water: mimicking nature's aldolases with organocatalysis and water, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**(18), 4043–4050.
- 12 N. J. Buurma, Kinetic medium effects on organic reactions in aqueous colloidal solutions, in *Advances in Physical Organic Chemistry*, ed. J. P. Richard, Academic Press Ltd-Elsevier Science Ltd, London, 2009, vol. 43, pp. 1–37.
- 13 T. Dwars, E. Paetzold and G. Oehme, Reactions in micellar systems, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, **44**(44), 7174–7199.
- 14 K. Holmberg, Organic reactions in microemulsions, *Eur. J. Org. Chem.*, 2007, **5**, 731–742.
- 15 M. G. M. Jongejan, J. E. Klijin and J. Engberts, Vesicular catalysis of the decarboxylation of 6-nitrobenzisoxazole-3-carboxylate. The effects of sugars, long-tailed sugars, cholesterol and alcohol additives, *J. Phys. Org. Chem.*, 2006, **19**(4), 249–256.
- 16 J. E. Klijin and J. Engberts, Vesicular catalysis of an S(N)2 reaction: toward understanding the influence of glycolipids on reactions proceeding at the interface of biological membranes, *Langmuir*, 2005, **21**(22), 9809–9817.
- 17 J. F. Rathman, Micellar catalysis, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 1996, **1**(4), 514–518.
- 18 L. S. Romsted and C. Bravo-Diaz, Modeling chemical reactivity in emulsions, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2013, **18**(1), 3–14.
- 19 L. S. Romsted, C. A. Bunton and J. H. Yao, Micellar catalysis, a useful misnomer, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 1997, **2**(6), 622–628.
- 20 Z. Y. Dong, Y. G. Wang, Y. Z. Yin and J. G. Liu, Supramolecular enzyme mimics by self-assembly, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2011, **16**(6), 451–458.
- 21 A. Dehsorkhi, V. Castelletto and I. W. Hamley, Self-assembling amphiphilic peptides, *J. Pept. Sci.*, 2014, **20**(7), 453–467.
- 22 C. Dejumat, O. Diat and T. Zemb, Surfactin Self-Assembles into Direct and Reverse Aggregates in Equilibrium and Performs Selective Metal Cation Extraction, *ChemPhysChem*, 2011, **12**(11), 2138–2144.
- 23 C. Dejumat and T. Zemb, Supramolecular assemblies formed by self-assembling peptides, *Surfactant Sci. Ser.*, 2011, **152**, 39–78.
- 24 D. Mandal, A. N. Shirazi and K. Parang, Self-assembly of peptides to nanostructures, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**(22), 3544–3561.
- 25 J. F. Miravet, B. Escuder, M. D. Segarra-Maset, M. Tena-Solsona, I. W. Hamley, A. Dehsorkhi and V. Castelletto, Self-assembly of a peptide amphiphile: transition from nanotape fibrils to micelles, *Soft Matter*, 2013, **9**(13), 3558–3564.
- 26 C. K. Tang, F. Qiu and X. J. Zhao, Molecular Design and Applications of Self-Assembling Surfactant-Like Peptides, *J. Nanomater.*, 2013, 469261.
- 27 H. Tsutsumi and H. Mihara, Soft materials based on designed self-assembling peptides: from design to application, *Mol. BioSyst.*, 2013, **9**(4), 609–617.
- 28 S. G. Zhang, Lipid-Like Self-Assembling Peptides, *Acc. Chem. Res.*, 2012, **45**(12), 2142–2150.
- 29 B. Escuder, F. Rodriguez-Llansola and J. F. Miravet, Supramolecular gels as active media for organic reactions and catalysis, *New J. Chem.*, 2010, **34**(6), 1044–1054.
- 30 F. Rodriguez-Llansola, J. F. Miravet and B. Escuder, A supramolecular hydrogel as a reusable heterogeneous catalyst for the direct aldol reaction, *Chem. Commun.*, 2009, 7303–7305.
- 31 C. Berdugo, J. F. Miravet and B. Escuder, Substrate selective catalytic molecular hydrogels: the role of the hydrophobic effect, *Chem. Commun.*, 2013, **49**(90), 10608–10610.
- 32 F. Rodriguez-Llansola, B. Escuder, I. W. Hamley, W. Hayes and J. F. Miravet, Structural and morphological studies of the dipeptide based L-Pro-L-Val organocatalytic gels and their rheological behaviour, *Soft Matter*, 2012, **8**(34), 8865–8872.
- 33 F. Rodriguez-Llansola, J. F. Miravet and B. Escuder, Supramolecular Catalysis with Extended Aggregates and Gels: Inversion of Stereoselectivity Caused by Self-Assembly, *Chem.-Eur. J.*, 2010, **16**(28), 8480–8486.
- 34 S. De Munter, M. Kohn and M. Bollen, Challenges and Opportunities in the Development of Protein Phosphatase-Directed Therapeutics, *ACS Chem. Biol.*, 2013, **8**(1), 36–45.
- 35 C. Brenner, Hint, Fhit, and GalT: function, structure, evolution, and mechanism of three branches of the histidine triad superfamily of nucleotide hydrolases and transferases, *Biochemistry*, 2002, **41**(29), 9003–9014.
- 36 J. Anderson, T. Byrne, K. J. Woelfel, J. E. Meany, G. T. Spyridis and Y. Pocker, The Hydrolysis of *P*-Nitrophenyl Acetate – a Versatile Reaction to Study Enzyme-Kinetics, *J. Chem. Educ.*, 1994, **71**(8), 715–718.
- 37 M. B. Head, K. S. Mistry, B. J. Ridings and C. A. Smith, Nucleophilic and Enzymatic Catalysis of *P*-Nitrophenylacetate Hydrolysis, *J. Chem. Educ.*, 1995, **72**(2), 184–186.
- 38 Z. P. Huang, S. W. Guan, Y. G. Wang, G. Shi, L. Cao, Y. Z. Gao, Z. Y. Dong, J. Y. Xu, Q. Luo and J. Q. Liu, Self-assembly of amphiphilic peptides into bio-functionalized nanotubes: a novel hydrolase model, *J. Mater. Chem. B*, 2013, **1**(17), 2297–2304.
- 39 W. H. Hung, C. C. Hu and C. Y. Liu, Hydrolysis catalyzed with a resin containing histidine groups, *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 1996, **106**(1–2), 67–73.
- 40 A. Lombardo, Kinetics of Imidazole Catalyzed Ester Hydrolysis – Use of Buffer Dilutions to Determine Spontaneous Rate, Catalyzed Rate, and Reaction Order, *J. Chem. Educ.*, 1982, **59**(10), 887–888.
- 41 A. J. Nicoll and R. K. Allemann, Nucleophilic and general acid catalysis at physiological pH by a designed miniature esterase, *Org. Biomol. Chem.*, 2004, **2**(15), 2175–2180.
- 42 K. Ohkubo, H. Ogata and K. Yamaki, Stereoselective Esterolysis of Dipeptide-type Amino-Acid Esters with Dipeptide-type and Tri-Peptide-type L-Histidine Derivatives in the Solution of a Chiral Cationic Surfactant, *J. Mol. Catal.*, 1984, **26**(1), 1–5.
- 43 J. S. Barton, A Comprehensive Enzyme Kinetic Exercise for Biochemistry, *J. Chem. Educ.*, 2011, **88**(9), 1336–1339.

- 44 P. Comba, L. R. Gahan, G. R. Hanson, V. Mereacre, C. J. Noble, A. K. Powell, I. Prisecaru, G. Schenk and M. Zajackowski-Fischer, Monoesterase Activity of a Purple Acid Phosphatase Mimic with a Cyclam Platform, *Chem.-Eur. J.*, 2012, **18**(6), 1700–1710.
- 45 J. R. Hiscock, M. R. Sambrook, P. B. Cranwell, P. Watts, J. C. Vincent, D. J. Xuereb, N. J. Wells, R. Raja and P. A. Gale, Tripodal molecules for the promotion of phosphoester hydrolysis, *Chem. Commun.*, 2014, **50**(47), 6217–6220.
- 46 N. J. V. Lindgren, L. Geiger, J. Razkin, C. Schmuck and L. Baltzer, Downsizing of Enzymes by Chemical Methods: Arginine Mimics with Low $pK_{(a)}$ Values Increase the Rates of Hydrolysis of RNA Model Compounds, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**(36), 6722–6725.
- 47 Y. Liu, X.-G. Meng, J.-M. Li and X.-H. Li, Hydrolysis of phosphodiester catalyzed by metallomicelles with histidine residue: kinetics and mechanism, *Colloids Surf., A*, 2013, **436**, 839–845.
- 48 M. Merschky and C. Schmuck, Synthesis and kinetic studies of a low-molecular weight organocatalyst for phosphate hydrolysis in water, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**(23), 4895–4903.
- 49 O. Moe and R. Cornelius, Enzyme-Kinetics, *J. Chem. Educ.*, 1988, **65**(2), 137–141.
- 50 J. Razkin, J. Lindgren, H. Nilsson and L. Baltzer, Enhanced complexity and catalytic efficiency in the hydrolysis of phosphate diesters by rationally designed helix-loop-helix motifs, *ChemBioChem*, 2008, **9**(12), 1975–1984.
- 51 C. Schmuck and J. Dudaczek, Screening of a combinatorial library reveals peptide-based catalysts for phosphoester cleavage in water, *Org. Lett.*, 2007, **9**(26), 5389–5392.
- 52 C. Schmuck, U. Michels and J. Dudaczek, Hydrolytic activity of histidine-containing octapeptides in water identified by quantitative screening of a combinatorial library, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**(21), 4362–4368.
- 53 Y. S. Li, Y. Zhao, S. Hatfield, R. Wan, Q. Zhu, X. Li, M. McMills, Y. Ma, J. Li, K. L. Brown, C. He, F. Liu and X. Chen, Dipeptide seryl-histidine and related oligopeptides cleave DNA, protein, and a carboxyl ester, *Bioorg. Med. Chem.*, 2000, **8**(12), 2675–2680.
- 54 Y. Ma, X. Chen, M. Sun, R. Wan, C. Zhu, Y. Li and Y. Zhao, DNA cleavage function of seryl-histidine dipeptide and its application, *Amino Acids*, 2008, **35**(2), 251–256.
- 55 K. G. Kronholm, R. J. Schwen, M. R. Sine, R. Warren and C. J. Wawrzyniak, Preparation and formulation of histidylglycylglycine and derivatives for stimulation of hair growth, *US Pat.*, US 5252559 A, Procter and Gamble Co., USA, 1993.
- 56 N. Miyaji, T. Iwama, M. Gotoh, T. Maruyama and D. Kohda, Novel lipid-tripeptide based hydrogel-forming agent, and hydrogel, WO 2009005152 A1, Nissan Chemical Industries, Ltd., Kyushu University, Japan, 2009.
- 57 M. Miyamoto, N. Miyachi and T. Iwama, *Novel lipid dipeptide and gel prepared therefrom*, EP 2319894 A1, Nissan Chemical Industries, Ltd., Japan, 2010.
- 58 M. Kogiso, Y. Zhou and T. Shimizu, Instant Preparation of Self-Assembled Metal-Complexed Lipid Nanotubes that Act as Templates to Produce Metal-Oxide Nanotubes, *Adv. Mater.*, 2007, **19**(2), 242–246.
- 59 L. Brady, A. M. Brzozowski, Z. S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J. P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Huge-Jensen, L. Norskov, L. Thim and U. Menge, A Serine Protease Triad Forms the Catalytic Center of a Triacylglycerol Lipase, *Nature*, 1990, **343**(6260), 767–770.
- 60 M. Blanzat, E. Perez, I. Rico-Lattes, D. Prome, J. C. Prome and A. Lattes, New cationic glycolipids. 1. Synthesis, characterization, and biological activity of double-chain and gemini cationic analogues of galactosylceramide (gal beta(1)cer), *Langmuir*, 1999, **15**(19), 6163–6169.
- 61 R. Subiros-Funosas, R. Prohens, R. Barbas, A. El-Faham and F. Albericio, Oxyma: An Efficient Additive for Peptide Synthesis to Replace the Benzotriazole-Based HOBt and HOAt with a Lower Risk of Explosion (1), *Chem.-Eur. J.*, 2009, **15**(37), 9394–9403.
- 62 P. Anastas and N. Eghbali, Green Chemistry: Principles and Practice, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**(1), 301–312.
- 63 R. A. Sheldon, Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**(4), 1437–1451.
- 64 M. O. Simon and C. J. Li, Green chemistry oriented organic synthesis in water, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**(4), 1415–1427.
- 65 A. Barth, Infrared spectroscopy of proteins, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, 2007, **1767**(9), 1073–1101.
- 66 E. Goormaghtigh, J. M. Ruyschaert and V. Raussens, Evaluation of the information content in infrared spectra for protein secondary structure determination, *Biophys. J.*, 2006, **90**(8), 2946–2957.
- 67 M. J. Rosen and J. T. Kunjappu, *Surfactants and Interfacial Phenomena*, Wiley, 4th edn, 2012, p. 616.
- 68 J. Aguiar, P. Carpena, J. A. Molina-Bolivar and C. C. Ruiz, On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1 : 3 ratio method, *J. Colloid Interface Sci.*, 2003, **258**(1), 116–122.
- 69 M. Gerova, F. Rodrigues, J. F. Lamère, A. Dobrev and S. Fery-Forgues, Self-assembly properties of some chiral *N*-palmitoyl amino acid surfactants in aqueous solution, *J. Colloid Interface Sci.*, 2008, **319**(2), 526–533.
- 70 L. A. Estroff and A. D. Hamilton, Water gelation by small organic molecules, *Chem. Rev.*, 2004, **104**(3), 1201–1217.
- 71 F. Nallet, From intensity to structure of physical chemistry of disperse media, *J. Phys. IV*, 1999, **9**(P1), 95–107.
- 72 M. A. Etienne, N. J. Edwin, J. P. Aucoin, P. S. Russo, R. L. McCarley and R. P. Hammer, Beta-amyloid protein aggregation, *Methods Mol. Biol.*, 2007, **386**, 203–225.
- 73 C. F. Lee, Self-assembly of protein amyloids: a competition between amorphous and ordered aggregation, *Phys. Rev. E: Stat., Nonlinear, Soft Matter Phys.*, 2009, **80**(3), 031922.
- 74 A. I. Biggs, A spectrophotometric determination of the dissociation constants of *p*-nitrophenol and papaverine, *Trans. Faraday Soc.*, 1954, **50**, 800–802.
- 75 K. Akagawa, M. Sugiyama and K. Kudo, Asymmetric Michael addition of boronic acids to a $[\gamma]$ -hydroxy- $[\text{small } \alpha]$, $[\text{small } \beta]$ -unsaturated aldehyde catalyzed by resin-supported peptide, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**(25), 4839–4843.

- 76 M. L. Clarke and J. A. Fuentes, Self-Assembly of Organocatalysts: Fine-Tuning Organocatalytic Reactions, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2007, **46**(6), 930–933.
- 77 S. Mayer and B. List, Asymmetric Counteranion-Directed Catalysis, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, **45**(25), 4193–4195.
- 78 X. Miao, W. Cao, W. Zheng, J. Wang, X. Zhang, J. Gao, C. Yang, D. Kong, H. Xu, L. Wang and Z. Yang, Switchable Catalytic Activity: Selenium-Containing Peptides with Redox-Controllable Self-Assembly Properties, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013, **52**(30), 7781–7785.
- 79 Y. Trudelle, Synthesis, conformation and reactivity towards *p*-nitrophenyl acetate of polypeptides incorporating aspartic acid, serine and histidine, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1982, **19**(5), 528–535.

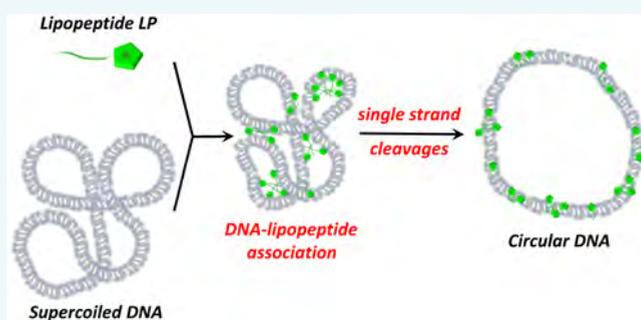
Histidine-Based Lipopeptides Enhance Cleavage of Nucleic Acids: Interactions with DNA and Hydrolytic Properties

M. Bélières,[†] C. Déjugnat,[†] and N. Chouini-Lalanne^{*,†}

[†]Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique (IMRCP), UMR 5623 (CNRS/Université Paul Sabatier), Toulouse 31062, France

S Supporting Information

ABSTRACT: Interaction studies and cleavage activity experiments were carried out between plasmid DNA and a series of histidine-based lipopeptides. Specific fluorescent probes (ethidium bromide, Hoechst 33342, and pyrene) were used to monitor intercalation, minor groove binding, and self-assembly of lipopeptides, respectively. Association between DNA and lipopeptides was thus evidenced, highlighting the importance of both histidine and hydrophobic tail in the interaction process. DNA cleavage in the presence of lipopeptides was then detected by gel electrophoresis and quantified, showing the importance of histidine and the involvement of its side-chain imidazole in the hydrolysis mechanism. These systems could then be developed as synthetic nucleases while raising concern of introducing histidine in the design of lipopeptide-based transfection vectors.



INTRODUCTION

DNA is an anionic polyelectrolyte which can interact with various cationic species like cationic surfactants. Indeed the interactions of cationic surfactants with DNA have been a matter of prime concern for decades.^{1–5} Cationic amphiphiles are able to interact with DNA thanks to hydrophobic and electrostatic interactions.^{6,7} On one hand, the contribution of the cationic head groups allows displacement of sodium cations surrounding DNA, while on the other hand, hydrophobic interactions occur between alkyl tails of surfactants. These two cooperative interactions lead to the formation of complexes between DNA and surfactants.^{8–11} The numerous studies reported in the past years were mainly focused on commercial surfactants like alkylammonium salts. They aimed at showing the influence of cationic surfactants on DNA compaction, induced either by the aggregation of surfactants with DNA or only by the self-assembly of surfactants.

This topic has gained more and more interest because of its involvement either for plasmid purification¹² or in gene therapy processes.¹³ Indeed, gene delivery has been developed to modify or regulate gene sequences and to treat various diseases. Viral vectors are very reliable in transfection but they are limited by potential biosafety concerns and restricted ability to deliver large amounts of DNA.^{14,15} Various nonviral vectors have then been developed as safer and cheaper tools.¹⁶ Recently, cationic surfactants^{17–19} and especially lipopeptides^{20,21} have turned out to be good candidates as nonviral vectors, for gene delivery. In particular, Tarwadi et al. designed a series of lipopeptide transfection agents that showed good transfection efficiency compared to commercially available

agents.²⁰ They were composed of lysine and histidine moieties linked to an alkyl tail. Especially weakly basic histidine residues were involved in the release process by pH switch. Histidine, as a proton relay, can also present organocatalytic properties. Indeed in previous work, we designed and characterized a series of original lipopeptides presenting hydrolytic activities.²² We have considered amphiphilic structures composed of tripeptides linked to fatty hydrocarbon chains. Inspired by the catalytic triad of hydrolases,²³ we also chose to incorporate histidine moieties in those compounds. Therefore, the polar heads contained histidine and two glycines used as linkers. Depending on the grafting side, N-terminal or C-terminal peptides were synthesized. These histidine-containing surfactants revealed significant catalytic activity in ester hydrolysis, which depended on their self-organization.²² Consequently, the incorporation of histidine in lipopeptide design for gene therapy processes might raise an issue. Could histidine be responsible for partial cleavage of the carried DNA during gene delivery?

In the current study the lipopeptides are presented as new investigative tools, first to get more insights in the interactions between DNA and lipopeptides, and then for further studying of their hydrolytic activity on DNA. Focusing on DNA–surfactant interactions, we mainly used N-terminal peptides due to their cationic nature. Chain length was modulated to study the role of hydrophobicity on DNA–lipopeptide association. A triglycine-based lipopeptide was also tested as a control

Received: October 7, 2015

Revised: November 13, 2015

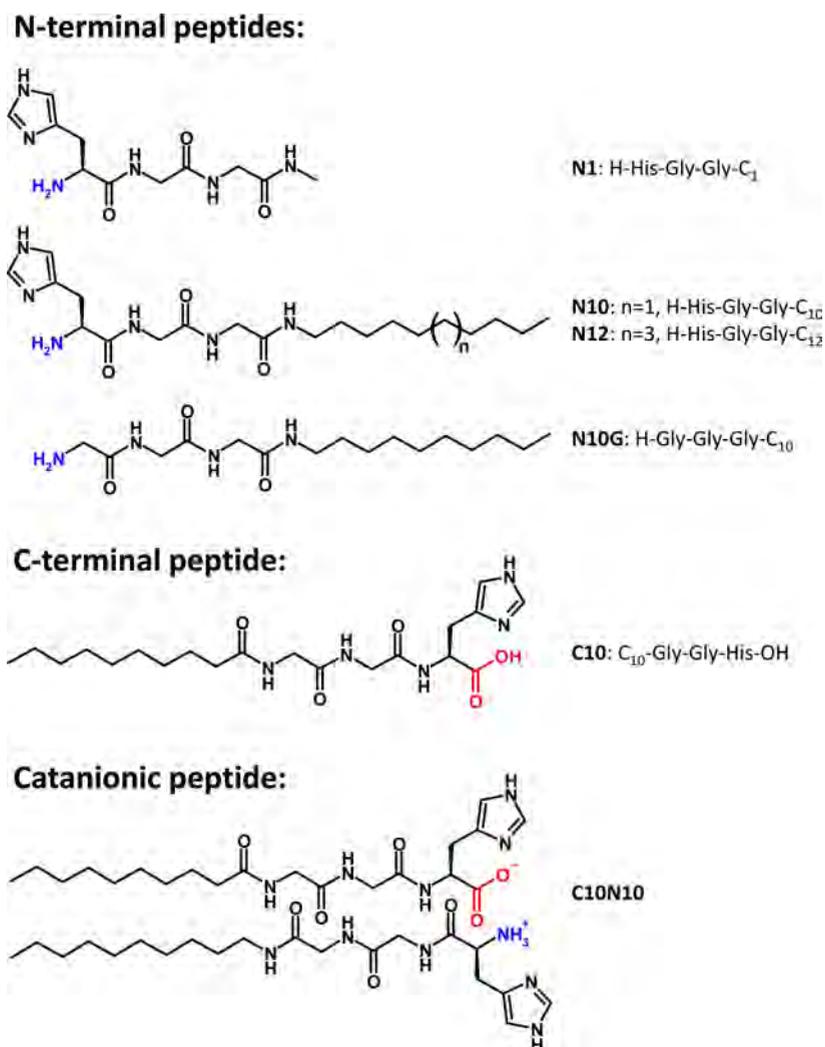


Figure 1. Structures of the lipopeptides studied.

(compared to histidine-based compounds), as well as a C-terminal peptide to tune electrostatic contributions. Finally a cationic peptide resulting from the combination of a cationic N-terminal peptide and an anionic C-terminal peptide was also considered. These structures are presented in Figure 1.

In a first part, fluorescence measurements have been carried out involving different specific probes to monitor and to characterize DNA binding with lipopeptides. In a second part we present the hydrolytic activity of these lipopeptides toward DNA. Cleavage of DNA was detected by electrophoresis analysis and then quantitatively evaluated.

RESULTS AND DISCUSSION

Supercoiled plasmid pBR322 (4.4 kbp) was chosen as model DNA²⁴ for all studies including lipopeptides/DNA interactions and further hydrolysis experiments.

DNA–Lipopeptide Interactions. In order to monitor changes in DNA conformation upon interaction with lipopeptides, fluorescence measurements were performed using specific probes. Ethidium bromide was chosen as intercalating agent for probing intercalation phenomena between base pairs. Then a Hoechst compound (Hoechst 33342) was used as a tool to evidence changes in minor groove binding. Finally, we

investigated potential self-assembly of lipopeptides induced by DNA with pyrene fluorescence measurements.

Ethidium Bromide Exclusion Assays. Ethidium bromide (EB) is a probe known as DNA intercalating agent. Indeed, the ethidium ion is a planar compound capable of insertion between DNA base pairs,²⁵ which largely increases its fluorescence quantum yield.²⁶ As it has been reported,^{9,24,27} the addition of cationic surfactant to premixed EB-DNA solutions leads to structural changes in DNA. Indeed charge compensation resulting from DNA/surfactant associations induces the decrease of repulsive interactions between negatively charged phosphate moieties of DNA. This implies a slight contraction of the duplex implying partial release of intercalated EB.²⁸ Then, the partial exclusion of ethidium bromide into the aqueous environment leads to a decrease of its fluorescence intensity.²⁶

When measuring fluorescence of an EB-DNA solution, we observed a significant initial intensity (I_0), which is consistent with EB intercalation between the DNA base pairs. When the addition of increasing amounts of lipopeptides (LP) in the EB-DNA solution led to a reduction of EB fluorescence signals ($I_n < I_0$) we conclude that LP-DNA associations occurred. This is shown in Figure 2a in the case of lipopeptide N12 (H-His-Gly-Gly-C₁₂) as an illustrative example. (Full results are reported in the Supporting Information, Figures S1–S6.)

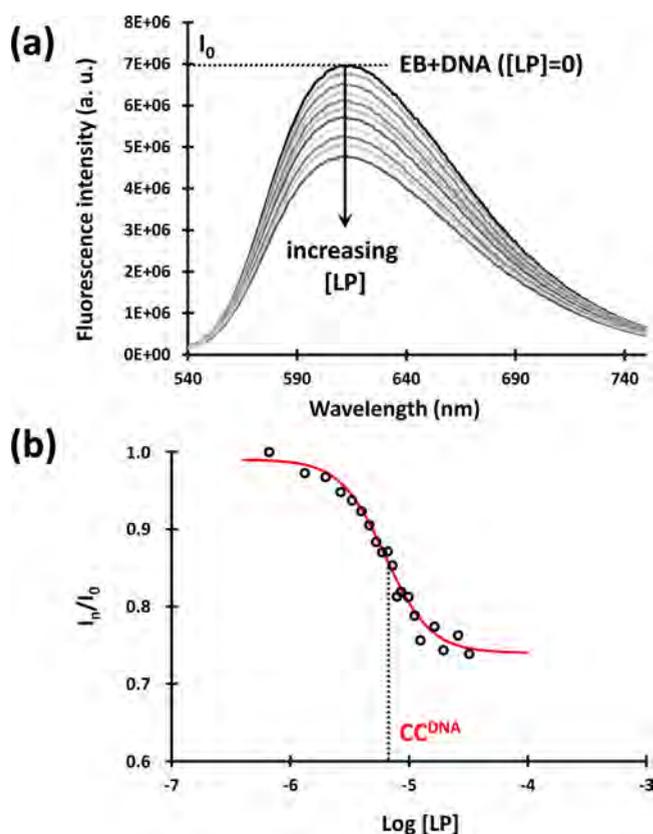


Figure 2. DNA-binding studies with lipopeptide N12 from EB fluorescence measurements (excitation wavelength was 530 nm). (a) Evolution of EB fluorescence spectra showing the decrease of fluorescence intensity upon increasing [LP] (concentration of lipopeptide N12). (b) Determination of the CC^{DNA} from the variation of normalized EB fluorescence intensity I_n/I_0 against lipopeptide concentration.

Above a certain concentration of added lipopeptides, the fluorescence intensity of the samples did not vary anymore and reached a plateau. This suggested that there was no more displacement of EB from DNA and that association with lipopeptides reached a limit. It may be noticed that the decrease in ethidium bromide fluorescence did not exceed 25%, whatever the lipopeptide. Because we used quite a high concentration of DNA ($[\text{DNA-PO}_4^-] = 60 \mu\text{M}$), we suggested that the gradual addition of lipopeptides led to local neutralization of phosphates on the double strand. This charge compensation was consequently responsible for a moderate contraction of DNA but did not induce major alterations in DNA conformation which would have displaced more EB, like in the case of alkylammonium surfactants.²⁴

The normalized fluorescence intensity (I_n/I_0) of the EB-DNA solution was then plotted as a function of lipopeptide concentration (Figure 2b) and a sigmoidal profile was observed for N12. Using Boltzmann fitting, we determined the contraction concentration, so-called CC^{DNA} , corresponding to the inflection point of the sigmoidal curve.²⁹ Similar profiles were obtained for lipopeptides N10 (H-His-Gly-Gly- C_{10}), C10 (C_{10} -Gly-Gly-His-OH), and C10N10 (catanionic association), while we noted no significant changes in EB fluorescence upon addition of N1 (H-His-Gly-Gly- C_1) or N10G (H-Gly-Gly-Gly- C_{10}), for which no CC^{DNA} could be determined. The obtained values are reported in Table 1 together with the corresponding

$[\text{LP}]/[\text{DNA-PO}_4^-]$ ratio at CC^{DNA} (with respect to phosphodiester groups).

Table 1. Contraction Concentrations of Lipopeptides with DNA (CC^{DNA}) and the Corresponding Molar Ratios between Lipopeptides and DNA at These Concentrations

Lipopeptide	CC^{DNA} (μM) ^{a,b}	$[\text{LP}]/[\text{DNA-PO}_4^-]$ at $CC^{\text{DNA-c}}$
N1	no CC^{DNA}	-
N10	34 ± 4	0.57 ± 0.07
N12	6.3 ± 0.8	0.11 ± 0.02
N10G	no CC^{DNA}	-
C10	65 ± 6	1.08 ± 0.10
C10N10	5.3 ± 0.7	0.09 ± 0.01

^aDNA-lipopeptide interactions were studied in a 40 mM Britton-Robinson buffer at pH = 7. ^bDetermined as the inflection point from Boltzmann adjustments of the sigmoidal curves. ^cCalculated at $[\text{LP}] = CC^{\text{DNA}}$ and $[\text{DNA-PO}_4^-] = 60 \mu\text{M}$

At first, a comparison can be made between the cationic lipopeptides N1, N10, and N12 (same polar head). While no CC^{DNA} could be determined for N1, we noted that increasing the tail length from 10 to 12 carbons induced a strong decrease of the contraction concentration, respectively, from $34 \mu\text{M}$ to $6.3 \mu\text{M}$. This shows that the lipophilic part of the lipopeptides plays a significant and positive role in the interactions with DNA and consequently in its contraction. Therefore, hydrophobic interactions promote the association between DNA and the lipopeptides. Moreover, regarding the $[\text{LP}]/[\text{DNA-PO}_4^-]$ ratios at CC^{DNA} , we also observed a decrease from 0.57 to 0.11 when replacing N10 by N12. In these lipopeptides, the pK_a of the imidazole moiety has been determined²² to be 7.2 meaning that the global charges of the free peptides are close to +1.5 at pH = 7 (terminal amine groups get fully protonated at neutral pH). Then, if we only consider electrostatic neutralization, this should lead to a theoretical $[\text{LP}]/[\text{DNA-PO}_4^-]$ ratio of 0.66 which is higher than what is observed. This confirms, especially for N12, that additional hydrophobic interactions promote LP-DNA associations.

Then the influence of the polar headgroup has also been studied for a same tail length by comparing N10, N10G, and C10. First, setting N10 against N10G seemed to evidence the importance of histidine in the interactions with DNA. Indeed, although the global charge of N10G is +1, the triglycine polar head did not appear to trigger a sufficient interaction with DNA to induce EB exclusion, whereas the histidine-containing N10 did. Histidine might therefore reinforce the interactions with DNA, not only thanks to additional charge compensation (imidazole is partially cationic), but also probably via further π -stacking, and/or T-shaped interactions between imidazole and the DNA nucleobases.^{30–33} Then, the global charge of the polar head could also be discussed, comparing N10 and C10. A CC^{DNA} of $65 \mu\text{M}$ was found for the C-terminal lipopeptide, which was about twice the value obtained for the N-terminal compound. Thus, DNA interacts less with C10 than with N10, which is not surprising considering electrostatic repulsions caused by the negatively charged carboxylate groups in C10. What is more interesting is the fact that C10 still associates with DNA although its global charge is slightly negative (−0.5). This shows that the presence of imidazole brought by histidine is more important than the global charge of the peptide to promote the LP-DNA interaction, as evidenced by comparing C10 (globally anionic and interacting) and N10G (cationic, but

not interacting). Moreover, the $[LP]/[DNA-PO_4^-]$ ratio was found to be close to 1 in the case of **C10**. Again this indicates the involvement of both the positively charged imidazole ring and the alkyl chain in the interaction process. Finally the cationic derivative **C10N10** is the lipopeptide which interacts the most easily with DNA, presenting the lowest CC^{DNA} ($5.3 \mu M$). This is coherent with the previous hypotheses since this compound bears two histidines and two alkyl chains promoting association with DNA. The global charge of **C10N10** is +1 (ammonium and carboxylate neutralize while each imidazole brings +0.5) and, like for other interacting peptides, the observed $[LP]/[DNA-PO_4^-]$ ratio is well below the expected value (1 for **C10N10**).

In conclusion, EB exclusion experiments evidenced association phenomena of DNA with **N10**, **N12**, **C10**, and **C10N10**. These lipopeptides all contain histidines and hydrophobic tails in their structures, in contrast to the histidine-free **N10G** and the tail-less **N1**. These observations underline the importance of incorporating both criteria in the design of lipopeptides to ensure association with DNA, which seems to be driven more by the presence of imidazole and hydrophobic interactions rather than by simple electrostatic interactions.

Groove Binding Interaction Experiments. Hoechst 33342 is mainly used as a fluorescent dye to stain DNA in cells.^{34–36} Thanks to its crescent-shaped bis-benzimide structure, it is able to bind the minor groove of the double-stranded DNA, and this greatly increases its fluorescence intensity. Alteration of Hoechst-DNA minor groove binding can then be detected if a decrease of fluorescence is observed. This could occur for example if a competitive lipopeptide-DNA minor groove binding takes place, resulting in a displacement of the fluorescent probe. Moreover, if Hoechst 33342 were completely displaced out of the minor groove, its maximum fluorescence emission would be monitored at 510 nm instead of 465 nm. Titrations of Hoechst-DNA complexes were first carried out with **N1** and **N10G**. As displacement of intercalated EB was not evidenced for these two peptides, we performed these measurements in order to observe if an alteration occurred in the minor groove. Plotting the fluorescence intensity variation of DNA-Hoechst complex against **N1** or **N10G** concentration led to barely horizontal profiles close to 0% (Figure 3). The addition of increasing amounts of these two lipopeptides did not result in a significant change of the Hoechst fluorescence, meaning that the probe was not

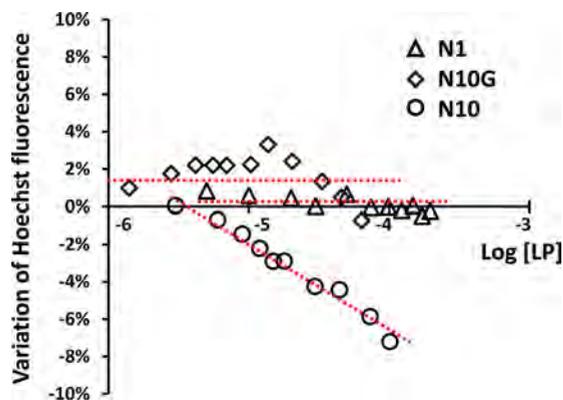


Figure 3. Fluorescence intensity variation of Hoechst-DNA complex as a function of increasing amounts of added lipopeptides **N1** (triangles), **N10G** (diamonds), and **N10** (circles).

displaced by those compounds. Therefore, **N1** and **N10G** do not seem to disrupt the minor groove binding of double-stranded DNA with the Hoechst compound, or the intercalation of ethidium bromide with base pairs, as mentioned above. The Hoechst-DNA fluorescence was also followed against additions of **N10** (Figure 3) to see if the compaction of DNA monitored thanks to EB probing also induced an alteration in the minor groove.

A slight and continuous decrease of fluorescence (about 10%) was observed when adding increasing amounts of **N10**, but no displacement of maximal fluorescence occurred. These results may reflect a slight alteration of Hoechst environment but not its complete disassociation from the minor groove. This latter result corroborates the proposed hypothesis of a moderate interaction between the lipopeptides and DNA, inducing a slight contraction of DNA, which is responsible for fluorescence changes either for ethidium bromide or for Hoechst 33342. Both results are schematically represented in Figure 4.

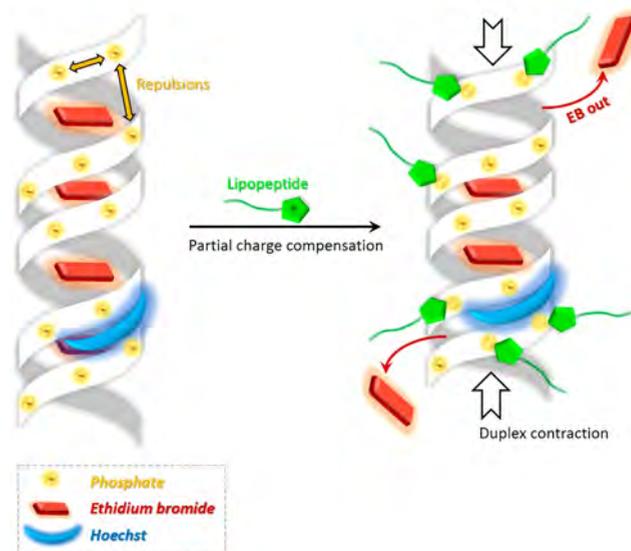


Figure 4. Scheme representing DNA structural changes induced by lipopeptides upon partial charge compensation: location of the surfactants and influence on the fluorescent probes (EB partially displaced, Hoechst not displaced).

We have shown that a moderate but significant association occurred between DNA and some lipopeptides, even if these interactions seem weaker than those reported with trialkylammonium surfactants. For these latter, the association even favors the formation of micellar self-assembled aggregates.³⁷ In our previous study²² we reported that the present lipopeptides may self-organize in aqueous solutions. The question here is to determine whether this self-organization could be induced upon interaction with DNA as for other cationic surfactants. In contrast to EB and Hoechst, which probed the structural changes from the DNA viewpoint, we then chose to use another probe to evaluate the changes from the lipopeptides' side. Therefore, we performed further fluorescence measurements with pyrene to monitor the variations of micropolarity environment induced by the interactions between lipopeptides and DNA and to detect if self-assembly occurred in our experimental conditions.

Micropolarity Assays. Pyrene is a polycyclic aromatic compound often used as a fluorescence probe to measure critical micellar concentrations (CMC) of surfactants.^{29,38} Between 350 and 410 nm, the fluorescence spectrum of pyrene presents several fine peaks; among them the so-called peak 1 at 371 nm and peak 3 at 382 nm are of special interest. They are used to study the local micropolarity that can be followed by the variation of the I_1/I_3 ratio as a function of external parameters (for example, the surfactant concentration in micellization studies). Thus, at low concentration of surfactants (below the CMC), pyrene senses the aqueous environment, inducing a quite high I_1/I_3 ratio. When self-assembly occurs (above the CMC), the probe tends to displace from polar to apolar environment as it preferentially locates in the hydrophobic environment created by the surfactant organization. This change of environment induces a change in its fluorescence spectrum profile, especially where the I_1/I_3 ratio decreases significantly. Self-assembly can thus be monitored and CMC determined when plotting I_1/I_3 against concentration of surfactant.^{29,39} In our study, we aimed at monitoring aggregation of the lipopeptide N10 in the presence of DNA. Therefore, in a DNA-pyrene medium, additions of N10 were performed up to $[LP] = 180 \mu\text{M}$ ($[LP]/[\text{DNA-PO}_4^-] = 3$, about six times the CC^{DNA}), followed by the acquisition of fluorescence spectra. As a result, fluorescence profiles of pyrene were roughly constant when varying N10 concentration and the I_1/I_3 ratio remained characteristic of an aqueous environment, meaning that no change in hydrophobic environment was perceptible by pyrene. This would suggest that the DNA–lipopeptide interactions which occur in the medium do not lead to a self-assembly of the lipopeptides induced by DNA.

In conclusion, there is a significant interaction between DNA and the lipopeptides because some of them are able to displace intercalated EB and disturb minor groove environment. In those cases the associations are promoted by the presence of histidine and alkyl chains. Nevertheless, these interactions remain limited since only a partial contraction of DNA occurred. Moreover, pyrene experiments revealed that DNA–lipopeptide interactions did not seem to favor an early self-assembly of surfactant molecules, as reported for other cationic surfactants.

DNA Cleavage. The ability of short peptides to cleave DNA has been reported recently.^{40,41} Li et al. have studied the hydrolytic activity of various oligopeptides, mainly dipeptides and triads. They have evidenced that the nature and the position of the amino acids in the peptide sequence (especially histidine) were essential regarding its efficiency for DNA cleavage. In contrast, as far as we know, hydrolysis of DNA has never been studied in the case of lipopeptides and especially the potential role of a hydrophobic chain in these catalytic processes has not been evidenced. For this purpose the DNA cleavage activity has then been investigated with the lipopeptides presented before.

Incubation of circular plasmid DNA (pBR322) with lipopeptides was performed in 40 mM Britton-Robinson (B-R) buffer, at a final concentration of $[\text{DNA-PO}_4^-] = 60 \mu\text{M}$. After a defined incubation time, cleavage activity was revealed by agarose gel electrophoresis. Indeed, this method allows us to distinguish circular supercoiled DNA from the relaxed circular form (the hydrolyzed one) by both their charge and their size. A quantitative analysis was thereafter carried out by photodensitometry in order to determine the amount of hydrolyzed DNA. As a control, pBR322 was incubated without lipopeptide

in B-R buffer. The part of cleaved DNA in these conditions (absence of lipopeptide) was then systematically subtracted from the amount of cleaved DNA obtained in the presence of lipopeptides. Therefore, in the following, the results refer to the *additional hydrolysis* which is only due to the activity of lipopeptides.

Cleavage Activity and Effect of Hydrophobic Contribution. First, we chose to study the activity of the triad N1 as well as the influence of a grafted alkyl chain on DNA cleavage using the lipopeptide N10. According to the above-described DNA–lipopeptide interaction study, we chose to use a concentration of lipopeptide above the CC^{DNA} , in order to ensure proximity between the catalyst and the substrate DNA. Since no CC^{DNA} could be measured for N1, we fixed the lipopeptide concentrations well above the CC^{DNA} of N10 (measured at $34 \mu\text{M}$, Table 1). Consequently, pBR322 was incubated at $60 \mu\text{M}$ (relative to phosphodiester bonds) in the presence of 180 μM lipopeptides, in B-R buffer at 37°C . Experiments were performed at diverse incubation times to monitor the hydrolytic activity over time. Electrophoresis on agarose gel revealed DNA cleavage (as shown in Figure 5) and photodensitometry analysis allowed us to quantify the amount of cleaved DNA. The hydrolytic activities of N1 and N10 over time are plotted in Figure 6.

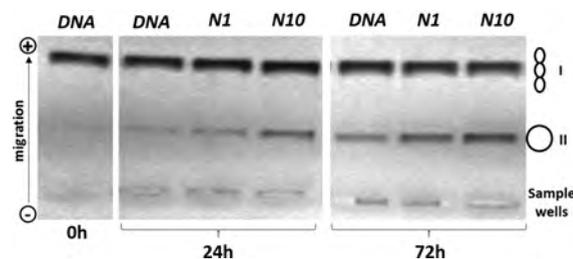


Figure 5. DNA cleavage in the presence of N1 and N10 visualized by agarose gel electrophoresis, as a function of the incubation time. Hydrolysis of supercoiled pBR322 (I) was detected thanks to a difference of migration with the relaxed circular form (II) corresponding to cleaved DNA.

The results obtained show that both the triad N1 and the lipopeptide N10 present hydrolytic activity. Moreover, the amount of cleaved DNA increased faster for N10 than for N1. In comparison, an incubation time of 72 h is required for N1 to

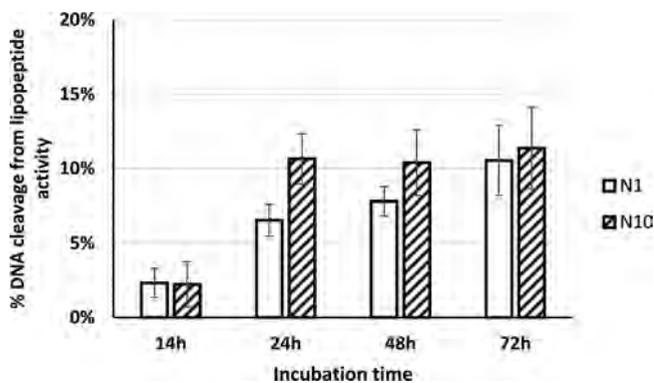


Figure 6. Evolution of additional cleaved DNA over time in the presence of lipopeptides N1 or N10 at $180 \mu\text{M}$, $[\text{DNA-PO}_4^-] = 60 \mu\text{M}$. Photodensitometry on 3 agarose gel experiments afforded the average amount of hydrolyzed plasmid.

reach a cleavage activity similar to **N10**. It can be assumed that **N10** acts faster than **N1** thanks to its evidenced interaction with DNA, suggesting early cooperative, not only electrostatic but also hydrophobic, interactions. Indeed, after a 72 h incubation, **N1** and **N10** present similar catalytic efficiency. Therefore, further experiments have been stopped after a 48 h incubation (instead of 72 h), in order to clearly distinguish the differences in catalytic activities.

The influence of the hydrophobic tail length was further investigated, extending the study to **N12**. Due to limited solubility of **N12**, we had to reduce the lipopeptide concentration to 60 μM (still above the CC^{DNA}). The amount of DNA cleavage due to the presence of the peptides **N1**, **N10**, and **N12** was then measured (48 h incubation) and the results are reported in Table 2. The positive contribution of the alkyl

Table 2. Evaluation of DNA Cleavage upon Hydrophobic Part after 48 h Incubation^a

Lipopeptide	% DNA cleavage
N1	4.5 \pm 1.6
N10	8.3 \pm 1.4
N12	10.9 \pm 2.4

^aLipopeptides **N1**, **N10**, and **N12** were at 60 μM and $[\text{DNA-PO}_4^-] = 60 \mu\text{M}$.

chain grafted to the triad discussed previously is still observable from these new results. DNA cleavage is clearly related to the chain length: the more hydrophobic peptide, the more effective. This confirms the positive contribution of hydrophobic interactions in the LP-DNA association. In addition, it can be noted that the catalyst concentration obviously has an influence on DNA cleavage. Indeed the results obtained for **N1** and **N10** at 60 μM for 48 h are roughly comparable to those obtained at 180 μM for 24 h. Therefore, it shows that for a given headgroup, it is possible to tune either the tail length or the concentration to get a targeted DNA cleavage. Therefore, concerning these histidine-containing peptides, the hydrophobic tail length is a key parameter which modulates cleavage efficiency.

Influence of the Polar Head. The role of the structure of the lipopeptides' hydrophilic part on DNA cleavage was then studied. The hydrophobic contribution coming from the alkyl chain was fixed (decyl tail). Here we show the effects of the tail grafting side (**N10** vs **C10**) or the tripeptide composition (**N10** vs **N10G**). The incubation time was 48 h and the concentrations of the lipopeptides were 180 μM , while $[\text{DNA-PO}_4^-]$ was kept at 60 μM . In these conditions, **C10** and **N10** clearly interact with DNA ($\text{CC}^{\text{DNA}} = 65$ and 34 μM , respectively) contrary to **N10G**, for which no CC^{DNA} could be determined. The quantification of DNA cleavage for these three lipopeptides is reported in Table 3. From these results we observe that the three lipopeptides presented a hydrolytic activity following the series **N10** > **N10G** > **C10**.

A first comparison can be made between the N-terminal lipopeptide **N10** and its C-terminal analogue **C10**. The cleavage activity decreased drastically, changing from ammonium to carboxylate terminal function (falling from 10.4% to 2.8%, respectively), although they both possess an organocatalytic imidazole ring coming from their histidines. In phosphodiester hydrolysis, histidine can generally act as catalyst via either nucleophilic or acid-base mechanisms, while in enzymatic systems, it is mainly involved in acid-base pathways.^{42,43} The

Table 3. Variation of DNA Cleavage Depending on the Structures of the Polar Heads of Lipopeptides **N10, **N10G**, and **C10**^a**

Lipopeptide	% DNA cleavage
N10	10.4 \pm 2.0
N10G	5.2 \pm 3.0
C10	2.8 \pm 2.0

^aIncubation time was 48 h, lipopeptide concentration was 180 μM , and $[\text{DNA-PO}_4^-] = 60 \mu\text{M}$.

drop of activity from **N10** to **C10** can be related to the electrostatic interactions that occur between DNA and the charged extremities of the two lipopeptides. Indeed the electrostatic repulsion between DNA phosphate groups and the carboxylates of **C10** may induce a less favorable position of the histidine moiety in the DNA environment. The imidazole ring would then be pushed too far away from the DNA cleavable areas because of these repulsions, significantly reducing its hydrolytic properties. At the same time, the ammonium extremity of **N10** can bring the histidine closer to the phosphates thanks to charge compensation, and therefore favors hydrolytic activity.

By comparison of the tripeptide sequences **N10G** and **N10** (both N-terminal), the percentage of DNA cleavage in the presence of **N10G** was twice as low as that for the histidine-based lipopeptide **N10**. This confirms first the choice of introducing histidine in such synthetic hydrolases to enhance DNA cleavage, as already observed for ester hydrolysis.²² However, even in the absence of histidine, **N10G** still presented a non-null hydrolytic activity on DNA. This might result from weaker interactions than those involved in the case of **N10**, as we could not detect any CC^{DNA} for **N10G**. On one hand, we can assume that electrostatic interactions between terminal ammonium and phosphates favor a certain conformation of DNA which is favorable to hydrolytic process. Moreover, recent studies have evidenced the role of amide linkers on peptide/DNA binding,^{44,45} suggesting that several accessible amide functions in the structure of **N10G** might also help at positioning DNA in an orientation that would favor hydrolysis. Indeed DNA cleavage has already been reported in the case of peptidic⁴⁶ and nonpeptidic⁴⁷ hydrophobic amides.

To sum up, charge contribution is essential in cleavage efficiency. For lipopeptides containing histidine moiety, electrostatic repulsions induced by carboxylate groups of **C10** seem to decrease the hydrolytic activity of histidine, which is believed to be taken away from cleavable areas. In the meantime, the histidine-free and positively charged lipopeptide **N10G** might contribute to DNA hydrolysis thanks to more accessible amide functions.

DNA Cleavage Using a Catanionic Lipopeptide. We have shown the positive role of both the alkyl chain length and the presence of histidine on the hydrolytic activity of the lipopeptides. The catanionic peptide **C10N10**, which bears two alkyl chains and two histidines, has been shown to interact with DNA at very low concentrations. Therefore, cleavage studies have been realized with this compound at 30 μM and compared with **N10** at 180 μM (so that the concentrations of both peptides are about 6 times their respective CC^{DNA} s). After a 48 h incubation time, we observed similar activity in DNA cleavage between the catanionic and **N10** (10.7 \pm 5.0% for **C10N10** vs 10.4 \pm 2.0% for **N10**, respectively). These results show that the strong affinity of **C10N10** toward DNA brings

good hydrolytic properties even at low catalyst ratios ($[LP]/[DNA-PO_4^-] = 0.5$ and 3 for **C10N10** and **N10**, respectively).

Variation of the Lipopeptide/DNA Ratio. After study of the hydrolytic activity of all lipopeptides toward DNA, we have focused on varying the ratio $R = [LP]/[DNA-PO_4^-]$ and its effect on DNA hydrolysis efficiency. We have chosen to use peptide **N10** at various concentrations ranging from $20 \mu\text{M}$ to 1.8 mM , while keeping constant the DNA concentration $[DNA-PO_4^-] = 60 \mu\text{M}$. This corresponded to R values ranging from 0.33 to 30 (for **N10**, at $CC^{\text{DNA}} = 34 \mu\text{M}$ the value of R is about 0.6). After a 48 h incubation, the additional amount of cleaved DNA was then determined as a function of the ratio R (Figure 7).

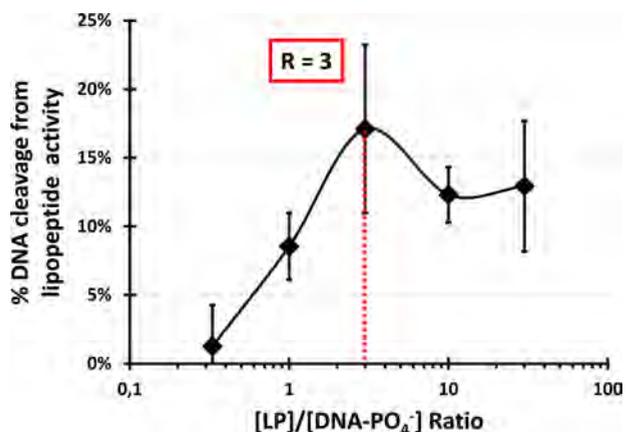


Figure 7. Evolution of the hydrolytic activity of **N10** as a function of the ratio between the lipopeptide and DNA.

Most of the concentrations of **N10** have been chosen higher than the CC^{DNA} value because we have shown that the association between DNA and the lipopeptide favored the hydrolytic activity. Effectively below CC^{DNA} ($R = 0.6$) the increased hydrolytic activity remained very low. This confirms the importance of lipopeptide/DNA association to make the catalyst close to the substrate and then promote hydrolysis. Indeed upon increasing the peptide concentration, the hydrolytic activity increased and reached a maximum at $R = 3$ (17% additional hydrolysis). Then the DNA cleavage decreased and stabilized at a plateau (13%) for higher ratio values. Therefore, from these results it seems that three imidazoles are globally involved when the hydrolytic activity is getting optimal ($R = 3$). Knowing that $R = 0.6$ at CC^{DNA} , a bit more than two imidazoles remain and are supposed to not be engaged in the association with DNA, but rather participating to the hydrolytic process. Moreover, as the pK_a of imidazole has been measured at 7.2 in **N10**, half of them are protonated in our experimental conditions. Therefore, we assume that the mechanism of phosphodiester hydrolysis could be described by the action of two imidazoles, one in the basic form (as

nucleophile) and the other in the protonated form (as proton donor). The possible mechanism of phosphodiester hydrolysis is presented in Figure 8. Such a situation, where a covalent adduct is transitionally formed, has already been reported to describe the action of nucleases toward DNA⁴⁸ or the action of synthetic hydrolases in the hydrolysis of model phosphodiester.^{49,50}

When the $[LP]/[DNA-PO_4^-]$ ratio increased over $R = 3$, the hydrolytic activity of the lipopeptide did not increase because two histidines should be sufficient to ensure efficient DNA cleavage. Moreover the slight decrease observed in hydrolysis efficiency upon further addition of catalysts might suggest that the lipopeptides become mobilized in other processes. For example, the formation of preaggregates could occur upon increasing much lipopeptide concentration (in the case of **N10**, the critical aggregation concentration has been measured to be about 1.1 mM).²²

CONCLUSIONS

In this paper we have presented interaction studies between DNA and histidine-based lipopeptides. Using specific fluorescent probes, we were able to monitor the lipopeptide association with DNA. In fact, we showed that the presence of histidine coupled with a hydrophobic tail in the lipopeptide structure induced significant interactions between duplex and surfactants. Especially the involvement of imidazole was shown as it promoted such associations. Slight contraction of DNA was suggested as EB was partially removed from base pairs and Hoechst environment seemed to be altered. In the meantime, pyrene fluorescence experiments did not reveal self-assembly of the lipopeptides under the conditions used. Therefore, we assumed that the lipopeptides took part in compensation charge only locally and that DNA did not favor early self-organization. In a second part we focused on cleavage properties of these lipopeptides when associating with DNA. Histidine-based lipopeptides revealed significant hydrolytic activity upon plasmid DNA. This activity seemed adjustable upon hydrophobic contribution since a longer alkyl tail in the lipopeptide design induced larger and faster cleavage of DNA. Moreover the presence of histidine seemed to have a greater influence on hydrolysis rather than the global charge of the peptide. Indeed two side-chain imidazoles appeared to be involved in the hydrolysis mechanism of the phosphodiester moiety on both their charged and uncharged forms. In the end, these results show that special attention should be paid regarding the use of histidine-based peptides and surfactants for transfection processes.^{20,51–54} In addition to its pH switchable property, the incorporation of histidine moieties in potential vectors may become problematic due to its hydrolytic activity toward DNA. On the other hand, cleavage activities evidenced for all lipopeptides on DNA could lead us to consider them as potential synthetic tools in biotechnologies, acting as synthetic models of endonucleases.

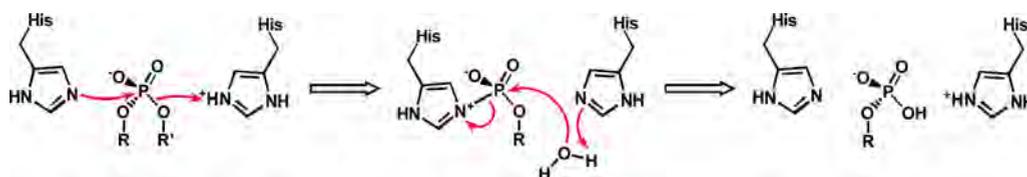


Figure 8. Proposed mechanism for the hydrolysis reaction of a phosphodiester junction in DNA, involving two histidines from lipopeptides.

■ EXPERIMENTAL SECTION

Materials. Lipopeptides N1 and N10 were obtained from Genscript USA Inc., while the other molecules were synthesized by classical solution synthesis based on Boc strategy and DIC/OxymaPure activation as described in our previous report (there can be found the complete characterizations of the lipopeptides).²¹ Double-stranded closed circular medium copy plasmid pBr322 (4361 base pairs) was purchased from Fischer Scientific. The DNA was stored in 10 mM Tris-HCl buffer and 1 mM EDTA (pH = 7.6) at $[\text{DNA-PO}_4^-] = 1.5 \times 10^{-3}$ M. Heparin sodium salt was purchased from Alfa Aesar. Boric acid, Hoechst 33342, and agarose were obtained from Sigma-Aldrich, while EDTA and pyrene were from Acros Organics and Tris from Fisher Scientific. Ethidium bromide (EB) was purchased as a 10 mg/mL aqueous solution from Pharmacia Biotech PLUSONE. Water used in all experiments was produced by a two-stage Milli-Q filtration system from Millipore and had a resistivity higher than 18.2 M Ω -cm.

Fluorescence Measurements. Corrected steady state fluorescence spectra were recorded with a Photon Technology International (PTI) Quanta Master 1 spectrofluorimeter. Measurements were conducted at 25 °C in temperature-controlled quartz cells. For EB exclusion essays, the excitation wavelength was 530 nm and the emission spectra were recorded from 540 to 750 nm. The DNA solutions were prepared at 60 μM (phosphate diester units) in Britton-Robinson buffer (pH = 7) and they were directly mixed with EB in the fluorescence cell, in order to get one EB anion per DNA base pair. Lipopeptide solutions were added step by step in the fluorescence cell until the decrease of fluorescence intensity reached a plateau. Samples were measured 15 min after each addition, leaving time for equilibrium between DNA-EB and the lipopeptides to occur. The ratio of fluorescence intensities between lipopeptide-containing samples and the initial sample (only filled with DNA and BET) was then plotted against lipopeptide concentration. Similar protocol was performed when Hoechst-DNA titration and micropolarity were studied, respectively, replacing EB by Hoechst 33343 at 5 μM or adding pyrene in methanol instead, at a concentration of 1 μM .²¹ The excitation wavelength for the Hoechst compound was 355 nm and acquisition of the emission spectra was performed between 370 and 600 nm. Finally, for micropolarity study, the excitation was done at 332 nm and the emission spectra were recorded between 350 and 500 nm.

DNA Cleavage. Samples were prepared in microtubes by mixing 10 μL of 2.4×10^{-4} M phosphodiester units in DNA: $[\text{PO}_4^-]$, 10 μL of lipopeptides solution at different concentrations, and 20 μL of Britton-Robinson buffer. The mixtures were incubated at 37 °C for various times. In this way, samples were collected after 14, 24, 48, or 72 h incubation. Then, 10 μL of a 10% (w/v) heparin salt solution in Britton-Robinson buffer was added to each tube to dissociate the DNA-lipopeptide complexes. The samples were finally analyzed by electrophoresis on a 0.8% agarose gel in Tris borate buffer. Cleavage of DNA was evaluated by measuring the percentage of the circular form of DNA using photodensitometry (*ImageJ* software). All experiments were carried out at least three times.

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00542.

Full results of DNA binding studies as illustrated in Figure 2. (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: lalanne@chimie.ups-tlse.fr. Phone: +33 (0) 561556274, Fax: +33 (0)561558155.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

M. Bélières thanks the French Ministry for National Education, Higher Education, and Research for funding.

■ REFERENCES

- (1) Hayakawa, K., Santerre, J. P., and Kwak, J. C. T. (1983) The binding of cationic surfactants by DNA. *Biophys. Chem.* 17, 175–181.
- (2) Melnikov, S. M., Sergeev, V. G., and Yoshikawa, K. (1995) Transition of double-stranded DNA chains between random coil and compact globule states induced by cooperative binding of cationic surfactant. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 9951–9956.
- (3) Melnikov, S. M., Sergeev, V. G., and Yoshikawa, K. (1995) Discrete coil-globule transition of large DNA induced by cationic surfactant. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 2401–2408.
- (4) Melnikov, S. M., Sergeev, V. G., Yoshikawa, K., Takahashi, H., and Hatta, I. (1997) Cooperativity or phase transition? Unfolding transition of DNA cationic surfactant complex. *J. Chem. Phys.* 107, 6917–6924.
- (5) Estevez-Torres, A., and Baigl, D. (2011) DNA compaction: fundamentals and applications. *Soft Matter* 7, 6746–6756.
- (6) Liu, Q., Li, J., Tao, W. Y., Zhu, Y. D., and Yao, S. Z. (2007) Comparative study on the interaction of DNA with three different kinds of surfactants and the formation of multilayer films. *Bioelectrochemistry* 70, 301–307.
- (7) Schiessel, H., Correa-Rodriguez, M. D., Rudiuk, S., Baigl, D., and Yoshikawa, K. (2012) Theory of DNA-cationic micelle complexation. *Soft Matter* 8, 9406–9411.
- (8) Dias, R. S., Lindman, B., and Miguel, M. G. (2001) Interactions between DNA and surfactants, in *Trends in Colloid and Interface Science Xv* (Koutsoukos, P. G., Ed.) pp 163–167, Springer-Verlag Berlin, Berlin.
- (9) Dias, R. S., Pais, A., Miguel, M. G., and Lindman, B. (2004) DNA and surfactants in bulk and at interfaces. *Colloids Surf, A* 250, 115–131.
- (10) Matulis, D., Rouzina, I., and Bloomfield, V. A. (2002) Thermodynamics of cationic lipid binding to DNA and DNA condensation: Roles of electrostatics and hydrophobicity. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 7331–7342.
- (11) Zhu, D. M., and Evans, R. K. (2006) Molecular mechanism and thermodynamics study of plasmid DNA and cationic surfactants interactions. *Langmuir* 22, 3735–3743.
- (12) Ataci, N., Correia, I., Arisan, I., and Marcos, J. C. (2009) Selective precipitation of plasmid with a water-soluble cationic surfactant. *Polym. Adv. Technol.* 20, 151–155.
- (13) Patra, T., Ghosh, S., and Dey, J. (2014) Cationic vesicles of a carnitine-derived single-tailed surfactant: Physicochemical characterization and evaluation of in vitro gene transfection efficiency. *J. Colloid Interface Sci.* 436, 138–145.
- (14) Kim, T. K., and Eberwine, J. H. (2010) Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 3173–3178.

- (15) Lundstrom, K., and Boulikas, T. (2003) Viral and non-viral vectors in gene therapy: Technology development and clinical trials. *Technol. Cancer Res. Treat.* 2, 471–485.
- (16) Gascon, A. R., del Pozo-Rodriguez, A., and Solinis, M. A. (2013) in *Gene Therapy - Tools and Potential Applications* (Molina, F. M.) pp 3–33, InTech, Rijeka, Croatia.
- (17) Xu, L., Feng, L., Hao, J. C., and Dong, S. L. (2015) Controlling the Capture and Release of DNA with a Dual-Responsive Cationic Surfactant. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7, 8876–8885.
- (18) Misiak, P., Wilk, K. A., Kral, T., Wozniak, E., Pruchnik, H., Frackowiak, R., Hof, M., and Rozycka-Roszak, B. (2013) New gluconamide-type cationic surfactants: Interactions with DNA and lipid membranes. *Biophys. Chem.* 180, 44–54.
- (19) Guo, X., Yu, F., Ran, X., Song, X., Ding, J., and Wang, Y. (2014) Vesicle formation between single-chained cationic surfactant and plasmid DNA and its application in cell transfection. *Colloid Polym. Sci.* 292, 3103–3111.
- (20) Tarwadi, Jazayeri, J. A., Pranker, R. J., and Pouton, C. W. (2008) Preparation and in vitro evaluation of novel lipopeptide transfection agents for efficient gene delivery. *Bioconjugate Chem.* 19, 940–950.
- (21) Wang, K. W., Yan, X. H., Cui, Y., He, Q., and Li, J. B. (2007) Synthesis and in vitro behavior of multivalent cationic lipopeptide for DNA delivery and release in HeLa cells. *Bioconjugate Chem.* 18, 1735–1738.
- (22) Belieres, M., Chouini-Lalanne, N., and Dejumat, C. (2015) Synthesis, self-assembly, and catalytic activity of histidine-based structured lipopeptides for hydrolysis reactions in water. *RSC Adv.* 5, 35830–35842.
- (23) Brenner, C. (2002) Hint, Fhit, and GalT: Function, structure, evolution, and mechanism of three branches of the histidine triad superfamily of nucleotide hydrolases and transferases. *Biochemistry* 41, 9003–9014.
- (24) Rudiuk, S., Franceschi-Messant, S., Chouini-Lalanne, N., Perez, E., and Rico-Lattes, I. (2008) Modulation of photo-oxidative DNA damage by cationic surfactant complexation. *Langmuir* 24, 8452–8457.
- (25) Waring, M. J. (1965) Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J. Mol. Biol.* 13, 269–82.
- (26) LePecq, J. B., and Paoletti, C. (1967) A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. Physical-chemical characterization. *J. Mol. Biol.* 27, 87–106.
- (27) Izumrudov, V. A., Zhiryakova, M. V., and Goulko, A. A. (2002) Ethidium bromide as a promising probe for studying DNA interaction with cationic amphiphiles and stability of the resulting complexes. *Langmuir* 18, 10348–10356.
- (28) Bhattacharya, S., and Mandal, S. S. (1997) Interaction of surfactants with DNA. Role of hydrophobicity and surface charge on intercalation and DNA melting. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1323, 29–44.
- (29) Aguiar, J., Carpena, P., Molina-Bolivar, J. A., and Ruiz, C. C. (2003) On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method. *J. Colloid Interface Sci.* 258, 116–122.
- (30) Churchill, C. D. M., and Wetmore, S. D. (2009) Noncovalent Interactions Involving Histidine: The Effect of Charge on pi-pi Stacking and T-Shaped Interactions with the DNA Nucleobases. *J. Phys. Chem. B* 113, 16046–16058.
- (31) Leavens, F. M. V., Churchill, C. D. M., Wang, S. Y., and Wetmore, S. D. (2011) Evaluating How Discrete Water Molecules Affect Protein DNA pi-pi and pi(+)-pi Stacking and T-Shaped Interactions: The Case of Histidine-Adenine Dimers. *J. Phys. Chem. B* 115, 10990–11003.
- (32) Rutledge, L. R., Churchill, C. D. M., and Wetmore, S. D. (2010) A Preliminary Investigation of the Additivity of pi-pi or pi(+)-pi Stacking and T-Shaped Interactions between Natural or Damaged DNA Nucleobases and Histidine. *J. Phys. Chem. B* 114, 3355–3367.
- (33) Wilson, K. A., Kellie, J. L., and Wetmore, S. D. (2014) DNA-protein pi-interactions in nature: abundance, structure, composition and strength of contacts between aromatic amino acids and DNA nucleobases or deoxyribose sugar. *Nucleic Acids Res.* 42, 6726–6741.
- (34) Petersen, T. W., Ibrahim, S. F., Diercks, A. H., and van den Eng, G. (2004) Chromatic shifts in the fluorescence emitted by murine thymocytes stained with Hoechst 33342. *Cytometry* 60A, 173–181.
- (35) Goodell, M. A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A. S., and Mulligan, R. C. (1996) Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med.* 183, 1797–1806.
- (36) Latt, S. A., and Stetten, G. (1976) Spectral studies on 33258-HOECHST and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic-acid synthesis. *J. Histochem. Cytochem.* 24, 24–33.
- (37) Li, Y., Zhang, X., Li, Y., Li, C., and Guo, X. (2014) Micellization of glucose-based surfactants with different counter ions and their interaction with DNA. *Colloids Surf, A* 443, 224–232.
- (38) Dominguez, A., Fernandez, A., Gonzalez, N., Iglesias, E., and Montenegro, L. (1997) Determination of critical micelle concentration of some surfactants by three techniques. *J. Chem. Educ.* 74, 1227–1231.
- (39) Gerova, M., Rodrigues, F., Lamere, J. F., Dobrev, A., and Fery-Forgues, S. (2008) Self-assembly properties of some chiral N-palmitoyl amino acid surfactants in aqueous solution. *J. Colloid Interface Sci.* 319, 526–533.
- (40) Li, Y. S., Zhao, Y. F., Hatfield, S., Wan, R., Zhu, Q., Li, X. H., McMills, M., Ma, Y., Li, J., Brown, K. L., et al. (2000) Dipeptide seryl-histidine and related oligopeptides cleave DNA, protein, and a carboxyl ester. *Bioorg. Med. Chem.* 8, 2675–2680.
- (41) Ma, Y., Chen, X., Sun, M., Wan, R., Zhu, C., Li, Y., and Zhao, Y. (2008) DNA cleavage function of seryl-histidine dipeptide and its application. *Amino Acids* 35, 251–256.
- (42) Rabin, B. R. (1970) The mechanism of enzyme action. *J. Clin. Pathol.* 4, 1–7.
- (43) Gowda K.R., S., Mathew, B. B., Sudhamani, C. N., and Naik, H. S. B. (2014) Mechanism of DNA Binding and Cleavage. *Biomed. Biotechnol.* 2, 1–9.
- (44) Gopal, V., Xavier, J., Kamal, M. Z., Govindarajan, S., Takafuji, M., Soga, S., Ueno, T., Ihara, H., and Rao, N. M. (2011) Synthesis and Transfection Efficiency of Cationic Oligopeptide Lipids: Role of Linker. *Bioconjugate Chem.* 22, 2244–2254.
- (45) Santhiya, D., Dias, R. S., Shome, A., Das, P. K., Miguel, M. G., Lindman, B., and Maiti, S. (2009) Role of Linker Groups between Hydrophilic and Hydrophobic Moieties of Cationic Surfactants on Oligonucleotide-Surfactant Interactions. *Langmuir* 25, 13770–13775.
- (46) Gulevich, A. V., Koroleva, L. S., Morozova, O. V., Bakhvalova, V. N., Silnikov, V. N., and Nenajdenko, V. G. (2011) Multicomponent synthesis of artificial nucleases and their RNase and DNase activity. *Beilstein J. Org. Chem.* 7, 1135–1140.
- (47) Basak, A., Mandal, S., Das, A. K., and Bertolasi, V. (2002) Benzene fused monocyclic enediynyl amides: Synthesis, reactivity and DNA-cleavage activity in comparison to the corresponding sulfonamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12, 873–877.
- (48) Sasnauskas, G., Zakrys, L., Zaremba, M., Cosstick, R., Gaynor, J. W., Halford, S. E., and Siksnys, V. (2010) A novel mechanism for the scission of double-stranded DNA: BfI cuts both 3'-5' and 5'-3' strands by rotating a single active site. *Nucleic Acids Res.* 38, 2399–2410.
- (49) Breslow, R., and Schmuck, C. (1996) Goodness of fit in complexes between substrates and ribonuclease mimics: Effects on binding, catalytic rate constants, and regiochemistry. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 6601–6605.
- (50) Orth, E. S., Brandao, T. A. S., Souza, B. S., Pliego, J. R., Vaz, B. G., Eberlin, M. N., Kirby, A. J., and Nome, F. (2010) Intramolecular Catalysis of Phosphodiester Hydrolysis by Two Imidazoles. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 8513–8523.
- (51) Kichler, A., Leborgne, C., März, J., Danos, O., and Bechinger, B. (2003) Histidine-rich amphipathic peptide antibiotics promote efficient delivery of DNA into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1564–1568.

(52) Kichler, A., Mason, A. J., and Bechinger, B. (2006) Cationic amphipathic histidine-rich peptides for gene delivery. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1758, 301–307.

(53) Leng, Q., and Mixson, A. J. (2005) Modified branched peptides with a histidine-rich tail enhance in vitro gene transfection. *Nucleic Acids Res.* 33, e40.

(54) Mason, A. J., Leborgne, C., Moulay, G., Martinez, A., Danos, O., Bechinger, B., and Kichler, A. (2007) Optimising histidine rich peptides for efficient DNA delivery in the presence of serum. *J. Controlled Release* 118, 95–104.

Synthesis and self-assembly of bio-inspired organocatalytic lipopeptides: influence of the aggregation on their hydrolytic activity

Enzymes are proteins with remarkable catalytic properties but their stability and availability may sometimes become a limitation to their use. This is why simpler, cheaper and more tunable catalytic systems are developed in the meantime. Therefore, a biomimetic approach consists in designing organocatalysts based on enzymes' structure and mechanism.

Chapter I is a bibliographic review about the design of bio-inspired organocatalysts, essentially based on the incorporation of hydrophobic cavities and the introduction of amino acids into their structures.

Then, chapter II presents the synthesis of amphiphilic lipopeptides as biomimetic catalysts and their self-assembly properties. These compounds contain a lipophilic tail and a tripeptidic sequence generally consisting of glycine and histidine moieties. They are obtained thanks to Schotten-Baumann reaction and solution-phase peptide synthesis. The amphiphilic properties of the lipopeptides induce their self-assembly in aqueous media. This was evidenced afterwards by tensiometry and fluorimetry, while scattering technics (light, neutrons) and electronic microscopy observations gave information about the size and geometry of the obtained aggregates. Lipopeptides can form globular objects in the case of the shortest hydrophobic tails while fibrillar networks were observed for more hydrophobic compounds.

In a third part, the catalytic activity of the lipopeptides was studied regarding the hydrolysis of a model ester. In this way, the hydrolysis of p-nitrophenyl acetate in aqueous media was monitored by UV-vis at 406 nm. Variation of the structures (peptidic sequence, hydrophobic length) evidenced the positive contribution of histidine regarding catalysis. The influence of the self-organization was also studied and different behaviors were observed depending on monomer or aggregated state: lipopeptides seemed to be better catalysts as monomer than aggregates. It showed that an adapted tuning of the hydrophobic properties of the lipopeptides leads to a controlled catalytic activity.

Hydrolytic properties of the lipopeptides were further extended to DNA cleavage. Chapter IV presents the study of the catalytic activity of these different lipopeptides regarding DNA cleavage. First, specific fluorescent probes (ethidium bromide, Hoechst 33342 and pyrene) were used to study the interactions between the lipopeptides and DNA and to follow respectively intercalation, minor groove binding and self-assembly of the lipopeptides. Association between DNA and lipopeptides was evidenced as well as the role played by histidine and the hydrophobic part during the interaction process. Then, the hydrolysis of DNA in the presence of lipopeptides was revealed by gel electrophoresis and quantified using photodensitometry. Histidine-based lipopeptides showed a significant hydrolytic activity regarding plasmid DNA while a positive contribution of hydrophobicity was also evidenced.

Key-words : Lipopeptides, self-assembly, catalysis, hydrolysis.

Synthèse et auto-organisation de lipopeptides organocatalytiques bio-inspirés : influence de l'agrégation sur leur activité hydrolytique

Directeurs de thèse : Christophe DEJUGNAT et Nadia CHOUINI-LALANNE

Les enzymes sont des protéines aux propriétés catalytiques exceptionnelles mais leur disponibilité et stabilité parfois limitées incitent à développer par ailleurs des systèmes catalytiques plus simples, moins coûteux et plus modulables. Une approche biomimétique consiste ainsi à concevoir des systèmes organocatalytiques en se basant sur la structure des enzymes et sur leur mode d'action.

Le chapitre I est une mise au point bibliographique sur la conception de catalyseurs bio-inspirés essentiellement basée sur la création de cavités hydrophobes et sur l'introduction d'acides aminés dans les structures.

Le chapitre II présente ensuite la synthèse de lipopeptides amphiphiles comme catalyseurs biomimétiques ainsi que leurs propriétés d'auto-assemblage. Ces molécules sont constituées d'une part d'une chaîne lipophile et d'autre part d'une séquence tripeptidique contenant généralement les motifs glycine et histidine. Ils sont obtenus par réaction de Schotten-Baumann et par couplage peptidique en solution. Le caractère amphiphile des lipopeptides induit leur auto-assemblage en milieu aqueux. Ceci a été mis en évidence dans un second temps par tensiométrie et fluorimétrie tandis que des mesures de diffusion des rayonnements (lumière, neutrons) et des observations par microscopie électronique ont pu apporter des informations sur la taille et la géométrie des agrégats formés. Les lipopeptides forment des objets globulaires dans le cas des chaînes hydrophobes les plus courtes tandis qu'on observe des réseaux de fibres pour les composés plus hydrophobes.

Dans une troisième partie, l'activité catalytique des lipopeptides a été évaluée vis-à-vis de l'hydrolyse d'un ester modèle. Ainsi, l'hydrolyse du p-nitrophénylacétate en milieu aqueux a été suivie par spectrophotométrie UV-visible. La variation des structures utilisées en catalyse (séquence peptidique, longueur de chaîne) a notamment permis de mettre en évidence le rôle positif de l'histidine sur la catalyse. L'influence de l'auto-organisation a également été étudiée et une différence de comportements entre monomères et agrégats a été observée : les lipopeptides sont de meilleurs catalyseurs en tant que monomères que sous forme d'agrégats. Cela montre qu'un ajustement adéquat des propriétés hydrophobes des lipopeptides mène à une activité catalytique contrôlée vis-à-vis de l'hydrolyse d'esters.

Les propriétés hydrolytiques des lipopeptides ont ensuite été étendues au clivage d'un ADN. Le chapitre IV présente ainsi l'étude de l'activité catalytique de ces différents lipopeptides vis-à-vis du clivage d'un ADN plasmidique. Dans un premier temps, des sondes de fluorescence spécifiques (bromure d'éthidium, Hoechst 33342 et pyrène) ont été utilisées pour étudier les interactions entre les lipopeptides et l'ADN et pour suivre respectivement les phénomènes d'intercalation, de liaison dans le petit sillon ou d'auto-organisation des lipopeptides. Une association entre ADN et lipopeptides a ainsi pu être observée et l'intervention de l'histidine et de la chaîne hydrophobe dans ces processus d'interaction a notamment été mise en évidence. Enfin, l'hydrolyse de l'ADN en présence des lipopeptides a été révélée par électrophorèse sur gel d'agarose puis quantifiée par photodensitométrie. Les lipopeptides à base d'histidine ont révélé une activité hydrolytique significative vis-à-vis du plasmide et le rôle positif de l'hydrophobie des composés a également été constaté.

Mots-clés : Lipopeptides, auto-organisation, catalyse, hydrolyse.

*Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique, UMR 5623
Université Paul Sabatier, Bât 2R1, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse*