

## HMCH 395 Peptides et Oligonucléotides Partie Peptide, Gilles Subra

Durée totale 60 minutes. Tous les documents sont autorisés.  
Les réponses aux questions doivent être très succinctes (2ou 3 lignes maximum)

Les temporines Sh sont une famille de peptides identifiés sur la peau des grenouilles *Pelophylax saharica* (Figure 1) qui présentent des propriétés antibactériennes sur des souches multi résistantes grâce à un mécanisme d'action particulier. Leur structure secondaire en hélice alpha (Figure 3) s'organise au voisinage de la membrane des microorganismes et de forme un 'tube' amphipathique présentant une face hydrophobe (avec des chaînes latérales hydrophobes) et une face hydrophile (avec des chaînes latérales chargées ou hydrophiles), chargée positivement. L'accumulation de ces peptides hélicoïdaux sur la membrane bactérienne conduit à la formation de pores qui entraînent la mort de la bactérie (Figure 2).



Figure 1.

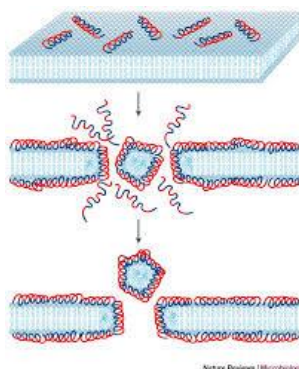


Figure 2.

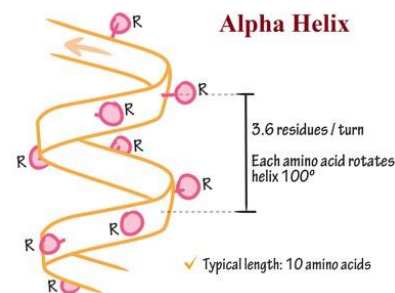


Figure 3.

Votre laboratoire travaille sur un analogue de cette famille, le peptide (A) de séquence



- 1- Vous devez préparer 2 grammes de (A) purifié. Votre rendement de purification est de 10% environ. Vous disposez de résine chargée à 0.5 mmol/g.  
De quelle quantité de résine avez-vous besoin ?  
Indiquez l'équipement et les consommables principaux nécessaires à la purification de ce peptide.
- 2- Vous utilisez 3 équivalents d'acide aminé pour le greffage du premier acide aminé sur la résine. Donnez le tableau d'engagement comme sur votre cahier de labo, avec les réactifs nécessaires, les quantités et toutes les informations utiles pour publier votre travail.
- 3- Décrivez, par un schéma à barres, les premières étapes de la synthèse sur support solide de ce peptide jusqu'à l'introduction du 4<sup>e</sup> acide aminé puis donnez les conditions de clivage

## Master Ingénierie des biomolécules

Année 2020-2021

5 Novembre 2020

- 4- Afin d'augmenter la biodisponibilité de ce peptide, une cyclisation tête-queue (Nter-Cter) est envisagée pour obtenir le peptide (B) cyclo[LSGIVRMLGKLY]. Sans écrire le schéma de synthèse complet, expliquez votre stratégie pour y parvenir.
- 5- Proposez un autre analogue de (A) résistant aux protéases, et aussi actif sur les bactéries que (A).
- 6- On souhaite synthétiser un analogue (C) du peptide (A) possédant un pont lactame entre les résidus 8 et 12 (leucine et méthionine dans le cas du peptide A). Sans réécrire le schéma de synthèse complet, expliquez les points clés différenciant de la synthèse du peptide (C) en détaillant notamment votre stratégie pour installer le pont sur support solide.
- 7- Le peptide (C) s'avère être plus actif que (A) sur les bactéries. Proposez une explication
- 8- L'analyse LC/MS (ES+) en phase inverse du brut de synthèse après clivage de (A) au TFA pur, révèle 4 pics à des temps de rétention différents. Le pic possédant le temps de rétention le plus faible est sans doute le peptide attendu car son rapport m/z correspond.

Calculez le rapport m/z que vous attendez pour l'ion monochargé et pour l'ion dichargé du peptide (A).

- 9- Les trois autres pics chromatographiques sont associés à des rapports m/z de +56, de -156 et de -100 uma. Proposez une identité à ces produits secondaires et expliquez pourquoi leur temps de rétention est plus élevé que le peptide attendu.
- 10- Vous souhaitez préparer un polymère antibactérien pour des applications topiques sur des plaies infectées. Pour cela, vous vous proposez de greffer un analogue de la temporine (A) sur du chitosane déacétylé. *NB : le chitosane est un oligosaccharide naturel extrait de la chitine (carapace) des crustacés et insectes.*

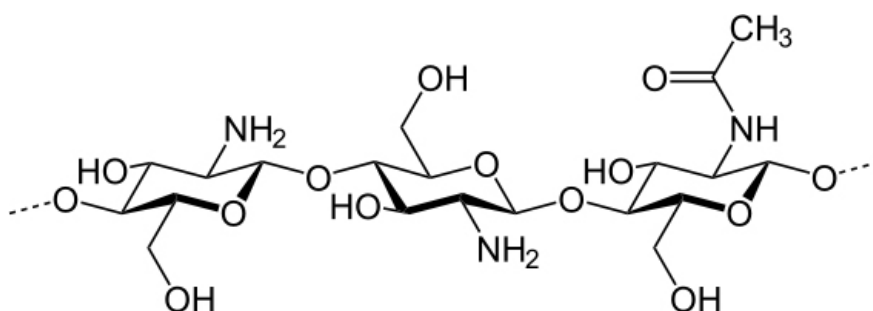


Figure 4. Chitosane partiellement déacétylé.

Afin de conjuguer une temporine au polymère, vos collègues polyméristes vous proposent d'utiliser une stratégie classique en utilisant l'analogue (A') totalement déprotégé et bien soluble dans l'eau.



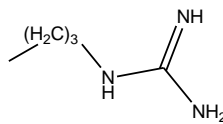
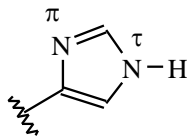
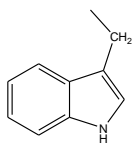
Ils proposent de conjuguer le peptide (A') au Chitosane partiellement déacétylé en mettant (A') en présence d'un équivalent de diisopropylcarbodiimine et d'un équivalent de N-hydroxysuccinimide, puis de couler cette solution sur le chitosane en solution.

**Master Ingénierie des biomolécules**  
**Année 2020-2021**  
**5 Novembre 2020**

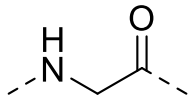
Expliquez pourquoi cette stratégie n'est pas satisfaisante pour un expert des peptides comme vous.

- 11- Proposez une alternative à cette stratégie maladroite, pour préparer un conjugué chitosane-temporine bien contrôlé, en indiquant les modifications chimiques que vous proposez (i) sur le chitosane et (ii) sur un analogue du peptide (A) qui devra être totalement déprotégé pour des raisons de solubilité.

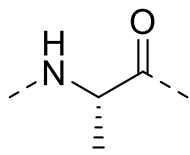
**Master Ingénierie des biomolécules**  
**Année 2020-2021**  
**5 Novembre 2020**

Chaîne latérale de l'acide aminé	Protection (abréviation)	Conditions de déprotection
<b>Arg</b> 	NO <sub>2</sub> Tos Mtr Pbf	H <sub>2</sub> /Pd/C ou HF HF TFA, 4-6 heures TFA, 30 min.
<b>Asp / Glu</b> (CH <sub>2</sub> ) <sub>1</sub> ou 2-CO <sub>2</sub> H	OMe, OEt OBzl OtBu OcHx OAll	NaOH H <sub>2</sub> /Pd/C ou NaOH ou acide fort TFA HF Pd(Ph <sub>3</sub> P) <sub>4</sub> /PhSiH <sub>3</sub>
<b>Asn / Gln</b> (CH <sub>2</sub> ) <sub>1</sub> ou 2-CO-NH <sub>2</sub>	Trt Xan	TFA TFA
<b>Cys</b> CH <sub>2</sub> -SH	AcM Mob Trt	I <sub>2</sub> HF/0 °C TFA/scavengers
<b>His</b> 	Trt (NH□) Bum (NH□) Bom (NH□)	TFA TFA H <sub>2</sub> /Pd/C
<b>Lys</b> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	Boc Alloc Z (ou ClZ) Fmoc	TFA Pd(Ph <sub>3</sub> P) <sub>4</sub> /PhSiH <sub>3</sub> HF DEA ou Pip
<b>Ser/Thr/Tyr</b> CH <sub>2</sub> -OH/CH(CH <sub>3</sub> )-OH/ CH <sub>2</sub> -Ph-OH <b>(Tyr seulement)</b>	tBu Bzl Dcb ou Z(2Br)	TFA H <sub>2</sub> /Pd/C ou HF HF
<b>Trp</b> 	Boc For (CHO)	TFA Pip ou NH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>

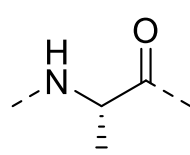
**Master Ingénierie des biomolécules**  
**Année 2020-2021**  
**5 Novembre 2020**



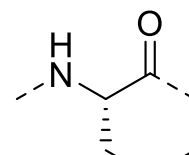
G, Gly,57



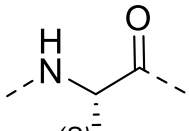
A, Ala,71



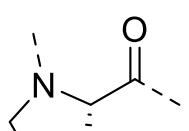
V, Val,99



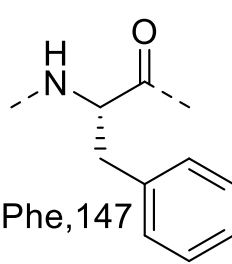
L, Leu,113



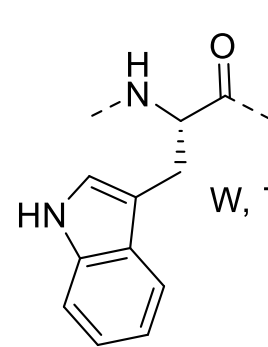
I, Ile,113



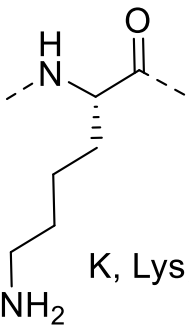
P, Pro,97



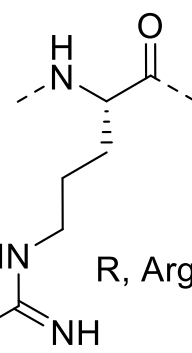
F, Phe,147



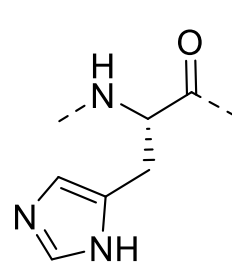
W, Trp,186



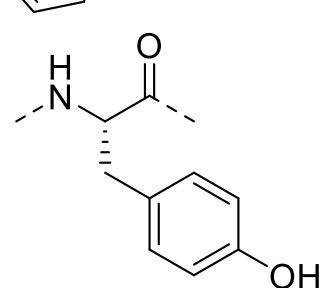
K, Lys,128



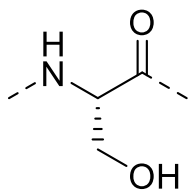
R, Arg,156



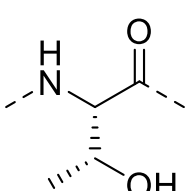
H, His,137



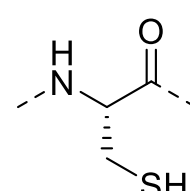
Y, Tyr,163



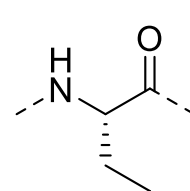
S, Ser,87



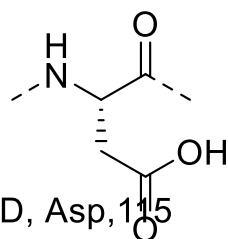
T, Thr,101



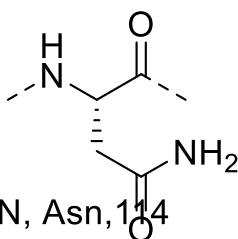
C, Cys,103



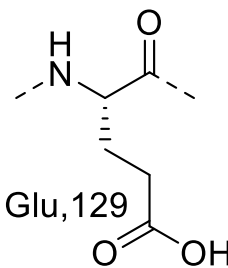
M, Met,131



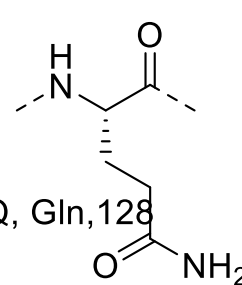
D, Asp,115



N, Asn,114



E, Glu,129



Q, Gln,128