



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCEM

MEMOIRE

Présenté à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

MASTER EN CHIMIE

Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Par :

Melle. Sefrou Chaimaa Ghizlène
Melle. Beloucif Ikram Karima

Sur le thème

Synthèse d'un Nouveau Matériau Peptidique pour Application en Hydrogel

Soutenu publiquement le 04 juin 2023 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mme. Mahboub Radia	Professeur	Université de Tlemcen	Présidente
Mme. Drici Wassila	Professeur	Université de Tlemcen	Examinatrice
Mr. Ziani-Cherif Chewki	Professeur	Université de Tlemcen	Encadrant

Dédicace

A l'aide de Dieu tout puissant, qui trace le chemin de ma vie j'ai pu arriver à réaliser ce modeste travail que je dédie à tous ceux qui me sont chers,

A l'homme qui a marqué ma vie mon père MOHAMED EL AMINE

Ce travail est dédié à mon père, parti trop tôt. Aucun mot ou dédicace ne s'aurait véritablement exprimer l'amour éternel que je ressens pour cet homme qui a tant sacrifié afin de m'offrir une vie meilleure. Je lui suis infiniment reconnaissante pour ses encouragements, et son soutien inébranlable depuis mon enfance, pour l'éducation qu'il m'a prodiguée et ses précieux conseils. Sa présence me manque terriblement, mais même après cette tragédie, son héritage d'amour continue à me combler. Puissions-nous, avec l'aide de Dieu le tout puissant, être réunis dans son vaste paradis. Je t'aime profondément.

A la femme la plus chère à mon cœur, ma mère FAIZA

Aucun mot ne saurait suffire pour exprimer ma gratitude pour tout ce que tu as fait et continues de faire pour moi. Je dédie ce travail pour toi ma source d'inspiration et surtout de force. Ta présence à mes côtés me permet de continuer et de suivre le bon chemin. Tes sacrifices et ton amour inconditionnel ont façonné la personne que je suis devenue aujourd'hui. Puisse Dieu, le tout puissant, t'accorder santé, bonheur et longue vie. Je t'aime maman

A mes chères sœurs : Zeyneb et Wafaa

A mon cher frère : Ahmed Yassine

J'exprime ma profonde gratitude à mon binôme et meilleure amie IKRAM, en lui souhaitant le meilleur pour l'avenir et en la félicitant pour cette réussite

Chaimaa ghizlène

Je dédie ce mémoire à:

*À ma merveilleuse mère **Fatima Zahra**, pilier de ma vie et de ma réussite. Tes sacrifices, ton amour inconditionnel et ta sagesse ont été mes plus grands atouts, je t'aime infiniment*

*À mon père **Yahya**, modèle de force et de persévérance. Cette réussite est aussi la tienne, je t'aime infiniment*

*À mes frères adorés **Abdellah** et **Mohammed ali**, complices de mes joies et de mes défis*

*À ma binôme **Ghizlene**, Complice de chaque instant et de tous les moments de ce projet, votre présence et votre intelligence ont façonné notre chemin vers le succès. Merci d'avoir partagé cette aventure et surtout pour cette amitié précieuse*

*À mon fiancé **Charaf eddine**, mon meilleur ami et la personne agréable qu'il était et qu'il restera pour moi*

*À la famille **beloucif** et **benaïssa***

À tous mes amies et collègues le long de mes études

Ikram Karima

Remerciements

Cette présente thèse a été réalisée au sein de laboratoire de catalyse et synthèse en chimie organique (LCSCO) à l'Université d'Abou-Bakr Belkaid Tlemcen.

*Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements pour Mr. **ZIANI-CHERIF Chewki**, professeur à l'université Abou-Bakr Belkaid Tlemcen, qui nous a fait l'honneur d'être notre directeur de thèse. Son expertise dans le domaine a été déterminante dans les orientations prises dans ce travail. Nous tenons à le remercier pour sa grande disponibilité, pour son soutien, son aide dans les difficultés de cette thèse, et aussi surtout pour ses qualités humaines.*

*Nous remercions Mme. **MAHBOUB Radia**, Professeur à l'université Abou-Bakr Belkaid Tlemecn, pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury de ce travail.*

*Nous exprimons nos remerciements les plus sincères à Mme. **DRICI Wassila**, Professeur à l'université Abou-Bakr Belkaid Tlemecn, de lire et examiner ce mémoire.*

*Nous remercions aussi Mme **MOKRI Fatima**, ingénieure du laboratoire LCSCO, ainsi que tous les membres pour leur gentillesse.*

Résumé

Le BINOL est une molécule intéressante à divers niveaux. De par son atropoisomérisme, il est très sollicité en synthèse organique comme catalyseur chiral pour réaliser diverses réactions stéréo-contrôlées. Nous avons vu en cette molécule un potentiel d'utilisation comme plateforme chirale sur laquelle on grefferait des peptides de nature et tailles diverses, créant ainsi de nouveaux matériaux peptidiques pour application comme hydrogel.

Ce travail modeste représente la synthèse de BINOL en mode achiral, et tentative de synthèse en mode chiral, induit par la présence du (+)-tartrate de diéthyle. Par la suite, la synthèse de peptides supportés sur le BINOL est décrite. Les résultats sont discutés en faveur d'une amélioration de la stratégie de synthèse de nouveaux hydrogels peptidiques à base de BINOL.

Abstract

BINOL is an interesting molecule on various levels. Due to its atropisomerism, it is highly sought after in organic synthesis as a chiral catalyst for performing various stereocontrolled reactions. We recognized the potential of this molecule as a chiral platform onto which peptides of different natures and sizes could be grafted, thereby creating new peptide-based materials for applications such as hydrogels.

This modest work describes the synthesis of BINOL in an achiral mode, as well as attempts to synthesize it in a chiral mode using (+)-diethyl tartrate. Subsequently, the synthesis of peptides supported on BINOL is described. The results are discussed in support of an improved synthesis strategy for new peptide hydrogels based on BINOL.

ملخص

BINOL جزيء مثير للاهتمام على مستويات مختلفة. بسبب الأيزوميرية atropisomeris، هناك طلب كبير عليه في التخليق العضوي كمحفز كيرالي لإجراء تفاعلات مختلفة يتم التحكم فيها بواسطة الصوت الجسم. لقد رأينا في هذا الجزيء إمكانية استخدامه كمنصة لولبية نطمع عليها البيبتيدات ذات الطبيعة والأحجام المختلفة، وبالتالي نخلق مواد بيبتيدية جديدة للتطبيق مثل الهلاميات المائية. يمثل هذا العمل المتواضع تخليق BINOL في الوضع achiral، ومحاولة التوليف في الوضع اللولبي، الناجم عن وجود ثنائي إيثيل (+) - طرطرات. بعد ذلك، يتم وصف تخليق البيبتيدات المدعومة من BINOL. تمت مناقشة النتائج لصالح تحسين استراتيجية تخليق الهلاميات المائية البيبتيدية الجديدة على أساس BINOL.

Table des matières

Introduction Générale :	10
Problématique :	2
But et Objectif du Travail :	2
Partie Bibliographique :	3
I- Le BINOL	3
II- Synthèse de dipeptides supportés sur du BINOL chiral	5
<i>II-1- Etude dans le cadre du traitement de la maladie d'Alzheimer :</i>	5
<i>II-2- Application comme hydrogels :</i>	6
<i>II-3- Auto-assemblage de l'hydrogel peptidique :</i>	7
<i>II-4- Amélioration des biomatériaux peptidiques en bio-fabrication :</i>	8
Méthodologie conçue et plan de travail :	9
Objectif 01	9
Objectif 02 :	9
Résultats et discussion	11
1. Introduction :	12
2. Synthèse du BINOL :	12
Protocole N°01 :	12
Protocole N°02 :	16
Protocole N°03 :	16
Mécanisme 02 :	18
3. Résolution racémique du BINOL :	18
BINOL synthétisé avec du (+)-tartrate de diéthyle:	18
Explication d'hypothèse :	18
Pouvoir rotatoire spécifique :	20
Pouvoir rotatoire spécifique du BINOL simple :	20
Pouvoir rotatoire spécifique du BINOL synthétisé en présence du (+)-tartrate de diéthyle :	20
4. Synthèse d'un dipeptide sur le BINOL chiral :	21
Synthèse du premier couplage d'un acide aminé (Boc-Ile-OH):	22
Mécanisme de couplage par HBTU :	22
CONCLUSION GENERALE	25
Partie Expérimentale	26
I. Généralités :	27
II. Protocole et mode opératoire :	28
1. Synthèse de BINOL (1,1'-Bis(2-naphthol)) :	28
2. Résolution racémique du BINOL :	28
3. Pouvoir rotatoire spécifique :	29
4. Synthèse de dipeptide sur le BINOL chiral :	29
REFERENCES:	31

Table des figures

Figure 1: L'atropoisomérisme du BINOL. La séquence a – b – c donne un R à gauche, et un S à droite, selon la règle de Cahn-Ingold -Prelog.	3
Figure 2 : Synthèse du BINAM et NOBIN par induction asymétrique du BINOL.	5
Figure 3: Dessins animés de dimères d'Aβ en feuillets β illustrant les différences entre les dimères covalents et non covalents. (A) Dimère Aβ covalent généré par une liaison disulfure intermoléculaire. (B) Dimère Aβ non covalent contenant deux monomères Aβ stabilisés par liaisons disulfures intramoléculaires. Les liaisons disulfures sont représentées par des traits orange Réf [8].....	6
Figure 4: Les peptides conçus et étudiés dans le cas de la croissance et régénération des ostéoblastes.	7
Figure 5: les trois octapeptides ioniques complémentaires ainsi que le jaune naphтол et le jaune Martius Réf [11].	8
Figure 6: "La voie de biofabrication avec des matériaux à base de peptides implique la découverte de peptides auto-assemblés qui forment des hydrogels aux propriétés mimétiques de l'ECM" Réf [12].	8
Figure 7: mécanisme de la réaction du BINOL en utilisant le CuCl ₂	12
Figure 8 : spectre proton RMN du produit obtenu par le protocole N°01.....	13
<i>Figure 9 :</i> spectre RMN proton du 2-naphтол.	13
Figure 10 : spectre RMN du BINOL dans la littérature [15].	14
Figure 11 : spectres RMN proton pour les différentes tentatives du protocole N°01.	15
Figure 12 : spectre RMN du deuxième lot de 2-naphтол.	16
Figure 13 : spectre RMN proton du BINOL pur protocole N°03.....	17
Figure 14 : résultat IR du BINOL.	17
Figure 15 : Modèle de prédiction d'orientation d'un naphтол par rapport à l'autre.....	19
Figure 16 : résultat RMN proton du BINOL synthétisé en présence du tartrate.	19
Figure 17 : spectre RMN de la détermination de l'excès énantiomérique [19].....	21
Figure 18 : Structure du HBTU.....	22
Figure 19 : résultats RMN du BINOL couplé avec le Boc-Ile-OH.	23
Figure 20 : représentation 2D et 3D du S-BINOL.	24

Table des schémas

Schéma 1 : Synthèse asymétrique du BINOL en utilisant le (+)-amphétamine comme inducteur de chiralité.Schéma 1 : Synthèse asymétrique du BINOL en utilisant le (+)-amphétamine comme inducteur de chiralité.	4
Schéma 2	4
Schéma 3: Voie conçue pour la résolution du BINOL.	9
Schéma 4 : Voie conçue pour la synthèse de dimères supportés sur le BINOL.	10
Schéma 5 : mécanisme impliqué dans la synthèse du BINOL avec le FeCl ₃ .6H ₂ O.	18
Schéma 6 : schéma représentant la réaction du couplage du Boc-Ile-OH avec le BINOL.	22
Schéma 7 : Mécanisme de couplage par le HBTU.....	23

Table des tableaux

Tableau 1 : résultat du pouvoir rotatoire spécifique du BINOL simple.....	20
--	----

Abréviations

2D : *Bidimensionnelle*

3D : *tridimensionnelle*

AA : *Acide aminé*

Arg : *Arginine*

Asp : *Aspartique*

BINAM : *2,2'-diamine-1,1'-binaphtyle*

BINOL : *1,1'-bi-2-naphtol*

Boc : *Tert-butoxycarbonyle., Tert-butoxycarbonyle*

Br : *Brome*

CCM : *chromatographie sur couche mince*

CDCl₃ : *chloroforme deutéré*

CH₃ (Me) : *Méthyle*

cm : *Centimètre*

COMU : *1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)diméthylamino-morpholino-carbenium hexafluorophosphate*

Cu : *Cuivre*

CuCl₂ : *Chlorure de cuivre*

dm : *Décimètre*

DMF : *N,N-diméthylformamide*

ESI : *Ionisation electrospray*

Fe²⁺ : *Ion ferreux*

Fe³⁺ : *Ion ferrique*

FeCl₃ : *Chlorure de fer (III)*

FTIR : *Infra-rouge à transformée de fourier*

g : *Gramme*

Gly : *Glycine*

H : *Hydrogène, Hydrogène*

H₂O : *monoxyde de dihydrogène*

HATU : *hexafluorophosphate de (diméthylamino)-N,N-diméthyl(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yloxy)méthaniminium*

HBTU : *2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium hexafluorophosphate*

HCTU : *O-(1H-6-Chlorobenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium hexafluorophosphate*

His : *Histidine*

Ile : *Isoleucine*

IR : *Infra-rouge*

K₃Fe-(CN)₆ : *Ferricyanure de potassium*

Leu : *Leucine*

Lys : *Lysine*

MALDI : *Ionisation par désorption laser assistée par matrice*
Mn(acac)₃ : *Magnanese (III) acetylacetonate*
MY : *Martius yellow*
NH : *Amine secondaire*
NH₂ : *Amine primaire*
NH₃ : *Ammoniac*
NO : *Dioxyde d'azote*
NOBIN : *2-amino-2'-hydroxy-1,1'-binaphtyle*
NY : *Naphtol yellow*
O : *Oxygène*
O₂ : *Dioxygène*
OH : *Hydroxyle*
P : *Phosphore*
pH : *Potentiel hydrogène*
Ph : *phényle*
Pro : *Proline*
RMN : *Résonance magnétique nucléaire*
Ser : *Sérine*
SO₃ : *Trioxyde de soufre*
TBTU : *2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium tetrafluoroborate*
TEA : *Triéthyle amine*
THF : *Tétrahydrofurane*
Thr : *Thréonie*
TiCl₄ : *tétrachlorure de titane*
UV : *Ultra-violet*
Val : *Valine*

Introduction Générale :

Les avancements récents dans le domaine de la biologie moléculaire et dans la chimie thérapeutique ont ouvert accès à de nouvelles voies de traitement de plusieurs maladies en utilisant de nouveaux types de médicaments de types protéiniques ou peptidiques. Les hydrogels synthétiques offrent des moyens effectifs et pratiques d'administration de ces médicaments. Ce sont des réseaux tridimensionnels hydrophiles, capables d'imbiber de grandes quantités d'eau ou de fluides biologiques, et donc ressemblent, à un degré assez large, à des tissus biologiques. Ils doivent donc rester insolubles, motivés par leurs réticulations chimiques (points de liaison, jonctions) ou physiques tels que des enchevêtrements et des cristallites [1].

Les hydrogels doivent être synthétisés en respectant un certain nombre de stimuli physiologiques présents dans le corps, tels que le pH, la force ionique, et la température.

Ainsi, il n'y a rien de mieux que les acides aminés ou les peptides comme matière de base pour synthétiser ce nouveau type de matériaux.

Les acides aminés sont des molécules importantes voir indispensables ; elles font partie de toute espèce vivante et constituent une variété de peptides qui sont les principaux composés de notre sujet, en plus du BINOL.

Les peptides ont une importance marquante dans la vie quotidienne ; ils font partie des principales familles de macronutriments indispensables à l'organisme.

- Ils jouent un rôle structurel au niveau musculaire ou cutané.
- Ils interviennent également dans de nombreux processus tels que la réponse immunitaire réponse (anticorps).
- Ils sont impliqués dans le transport de l'oxygène dans l'organisme (hémoglobine).
- Ils sont impliqués dans la digestion (enzymes digestives).
- Etc...

Leurs applications ne s'arrêtent pas seulement au domaine médical, mais aussi dans la dermatologie et la cosmétologie [2].

Vu que la réponse thérapeutique implique très souvent la notion de spécificité, la chiralité devient une propriété importante dans notre contexte de travail. Elle est définie brièvement par la présence d'un ou plusieurs carbones asymétriques. Une molécule est dite chirale lorsqu'elle n'est pas superposable à son image dans un miroir.

Cette définition répond bien justement aux composés que nous visons à synthétiser. En plus de la chiralité exhibée par les différents acides aminés, le BINOL est une molécule chirale qui pourrait jouer un rôle prépondérant non-seulement en termes de chiralité finale, mais aussi répondre à certain nombre de stimuli cités ci-dessus.

Dans ce travail modeste, nous nous intéressons à la synthèse de nouveaux types d'hydrogels à considérer ultérieurement dans le domaine de la formulation. Ces nouveaux types sont caractérisés par deux facteurs importants, à savoir :

1/ La présence d'un BINOL comme support de base, ce qui devrait conférer une chiralité, une flexibilité de la molécule finale, mais aussi une motion contrôlée.

2/ la présence de peptides liés au BINOL pour répondre aux critères cités ci-dessus, et en l'occurrence la conception d'un hydrogel adéquat.

Problématique :

L'avancement continu de la recherche au cours du temps est notable, et a continuellement ouvert l'horizon aux divers progrès faits dans le domaine de la technologie, mais surtout dans le domaine de la médecine.

A cet effet, beaucoup de maladies anciennement considérées comme incurables sont devenues facilement traitables, grâce aux progrès faits dans le domaine de la recherche scientifique.

Ainsi, l'évolution de la médecine dans ces 03 dernières décennies par exemple a été possible entre autres grâce à la thérapie génique, ainsi que les nouvelles méthodes de formulation, à savoir les micro- et les nano-particules qui permettent d'améliorer la biodisponibilité. Les micelles et les hydrogels représentent aussi de nouveaux outils importants pour la formulation qui permettra de meilleures biodisponibilités de médicaments. Il en ressort ainsi l'évidence accrue de la recherche continue dans ce domaine, ce qui permettra l'utilisation de beaucoup de médicaments qui ont prouvés leur efficacité in-vitro mais qui restent jusqu'à ce jour inutilisables à cause de leur très mauvaise biodisponibilité.

But et Objectif du Travail :

Le présent travail s'inscrit dans le contexte d'un programme plus large initié récemment par Prof. Ziani-Cherif Chewki, et qui a pour but de développer de nouveaux types d'hydrogels à des fins de formulations pharmaceutiques nouvelles.

Ainsi, notre objectif est de synthétiser un dimère peptidique qui sera supporté sur un BINOL, une molécule chirale qui exhibe une propriété mécanique particulièrement utile : le fait que les deux cycles naphthaléniques du BINOL puissent produire une torsion notable, ce qui devrait conférer un mouvement mécanique inédit de toute la molécule. De ce fait, la synthèse du BINOL suivie de sa résolution racémique pour obtenir un BINOL chiral sera notre premier objectif. Notre second objectif sera la synthèse d'un dimère peptidique, voir trimère, supporté sur le BINOL chiral. Ces synthèses devront être conclues par des études d'analyse spectroscopiques et autres.

Partie Bibliographique :

Comme mentionné précédemment, nous nous intéresserons à deux objectifs, à savoir la synthèse et résolution racémique du BINOL, puis la synthèse d'un dimère peptidique supporté sur le BINOL. De ce fait, nous introduirons dans un premier temps le BINOL, ainsi que quelques aspects y afférents de synthèse et d'application. Nous introduirons par la suite quelques études réalisées sur des peptides afin de démontrer leur importance.

I- Le BINOL.

Le BINOL ou encore le 1,1'-bi-2-naphtol, est une molécule qui a pris beaucoup d'importance en synthèse asymétrique grâce à sa chiralité [3]. C'est une molécule qui comporte deux cycles naphthaléniques liés par une liaison covalente, chacun portant une fonction alcool en alpha par rapport à la jonction. Il est intéressant de noter que cette jonction entre les deux naphtyles donne lieu à deux isomères, à savoir le (R)-BINOL, et le (S)-BINOL (Figure 1). Il en résulte de cela la notion d'atropisomérisme ou atropoisomérisme.

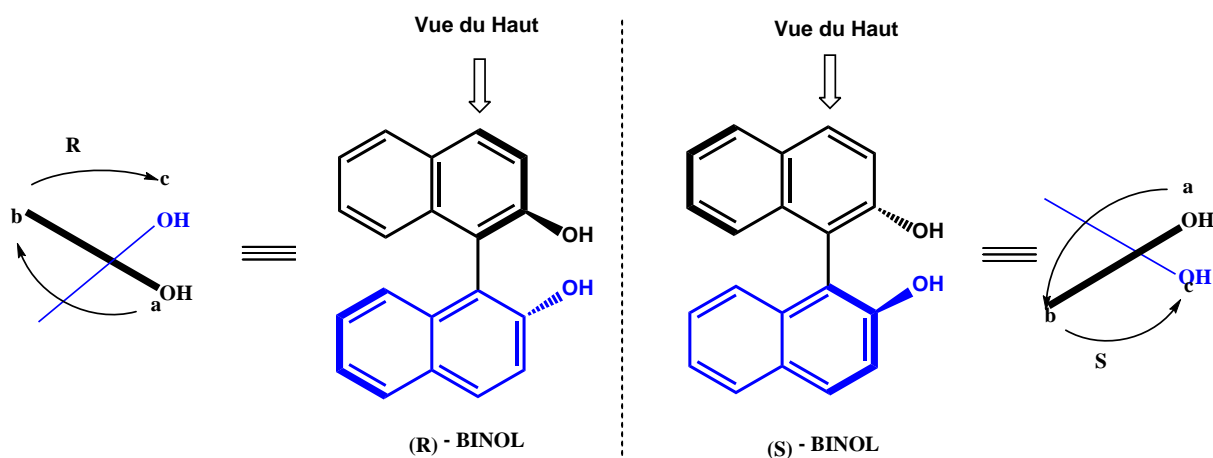


Figure 1: L'atropoisomérisme du BINOL. La séquence a – b – c donne un R à gauche, et un S à droite, selon la règle de Cahn-Ingold -Prelog.

Différentes méthodes de synthèse du BINOL en série racémique et en série chirale ont été rapportées dans la littérature.

En série racémique, le BINOL a été obtenu par oxydation du 2-naphtol en utilisant un métal comme catalyseur. Divers catalyseurs ont été utilisés, tel que le FeCl_3 , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $\text{Mn}(\text{acac})_3$ (acac = acetylacétone), Cu-amine complexes, ou encore le TiCl_4 , pour amener à bien la réaction avec des rendements élevés.

Pour obtenir un bon rendement en BINOL, une quantité légèrement supérieure à la quantité stoechiométrique en catalyseur est requise, sauf si l'on utilise en plus une irradiation ultrasonique en présence aussi d'oxygène. Dans ce cas, la quantité en catalyseur pourrait-être catalytique.

En série chirale, le BINOL chiral a été synthétisé par couplage oxydatif asymétrique du 2-naphtol en présence de CuCl_2 . Le ligand chiral utilisé pour produire la chiralité est l'amphétamine. Ainsi, le (S)-BINOL est obtenu en utilisant la (S)-(+)-amphétamine [4].

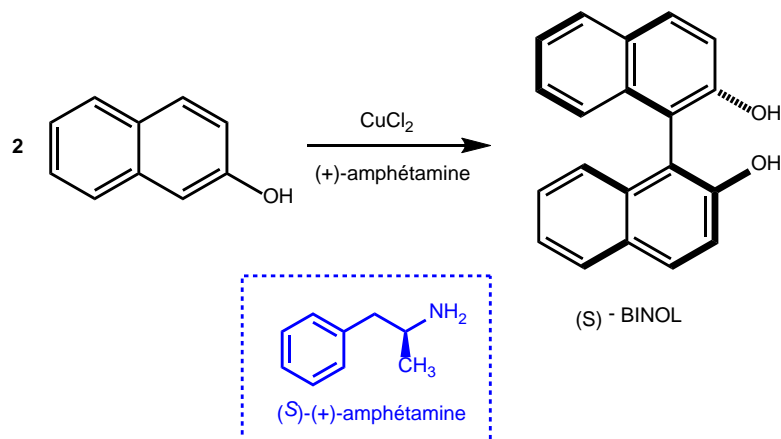


Schéma 1 : Synthèse asymétrique du BINOL en utilisant le (+)-amphétamine comme inducteur de chiralité. Schéma 1 : Synthèse asymétrique du BINOL en utilisant le (+)-amphétamine comme inducteur de chiralité.

Gavin Coombs, dans un travail récent et intéressant [5], a rapporté l'utilisation d'un térapeptide comme catalyseur pour créer l'atropoisomérisme entre un 2-naphtol et une quinone substituée [Schéma 2].

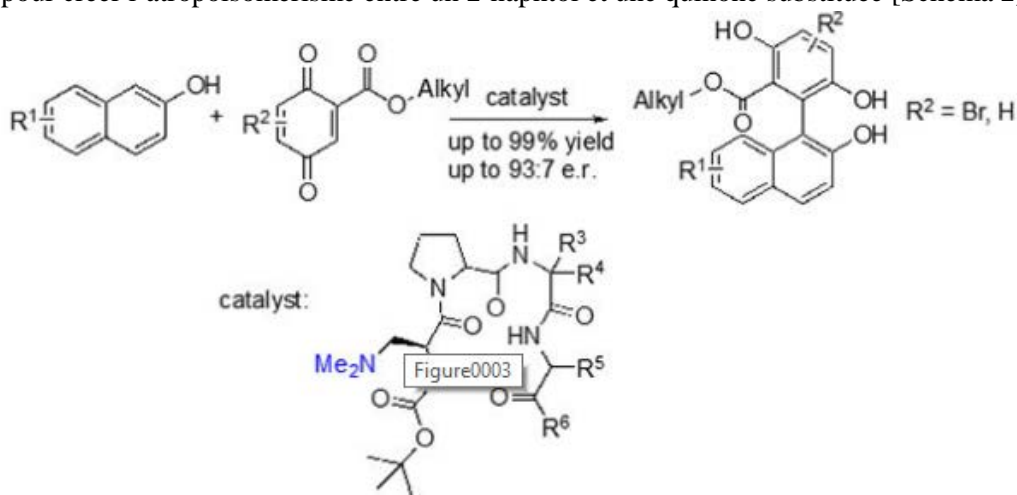


Schéma 2

Il est à noter que dans ce cas, le térapeptide n'était pas lié directement au Naphtol par liaison covalente. Aussi, la réaction s'est faite entre un naphtol et une quinone, contrairement à notre cas qui serait le couplage oxydatif entre deux naphtols.

Dans un autre travail récent rapporté par Shouyi Cen *et al*, les auteurs ont utilisé le (R)-BINOL pour synthétiser le (R)-BINAM et le (R)-NOBIN en version purement chirale [6]. Il est à noter que le BINAM et le NOBIN sont des similaires du BINOL, la différence étant présente dans les fonctions [Figure 2].

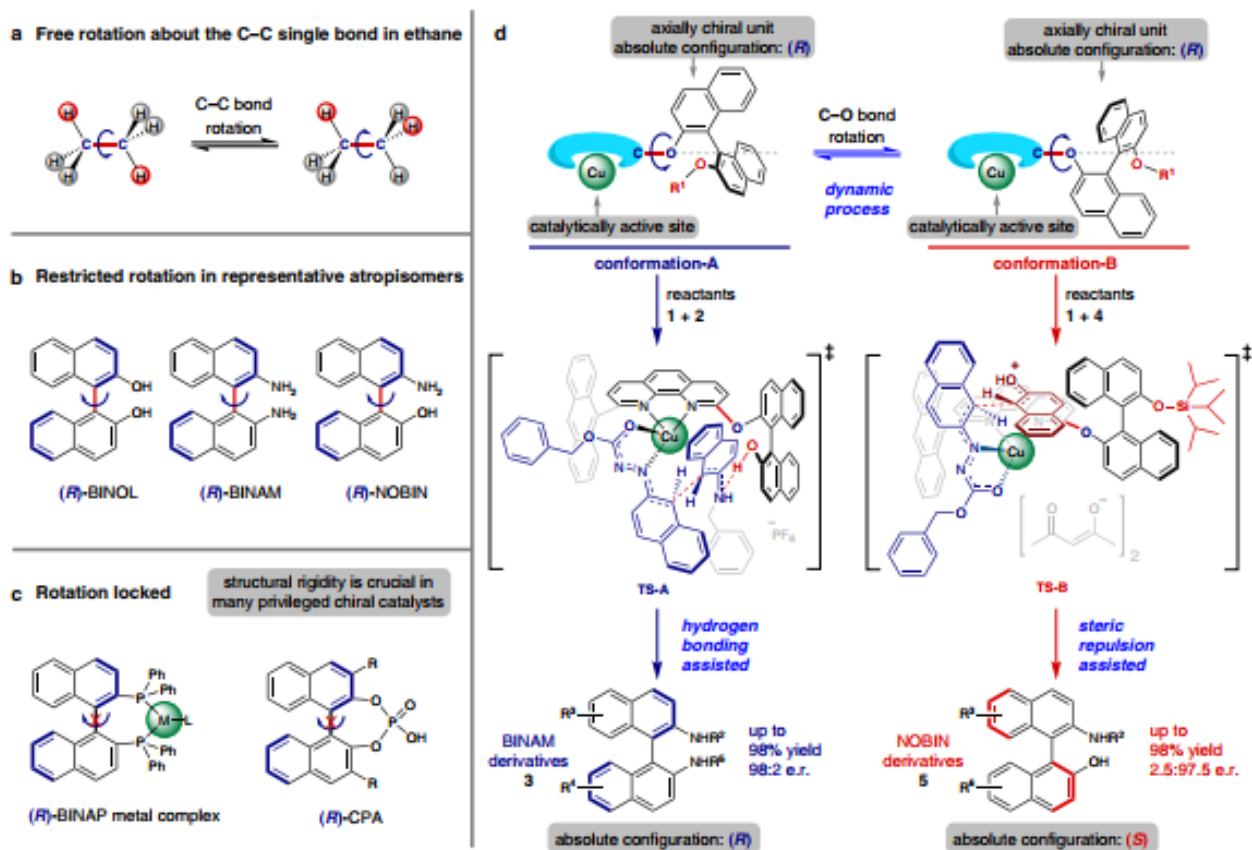


Figure 2 : Synthèse du BINAM et NOBIN par induction asymétrique du BINOL.

Il est à noter qu'aucun travail passé ne fait référence à l'utilisation d'un acide aminé chiral ou peptide pour séparer un mélange racémique du BINOL. Nous nous intéressons donc à cet aspect, et nous restons convaincus que ce serait une bonne idée. Notre approche sera basée dans un premier temps sur l'utilisation du diethyltartrate chirale comme inducteur de chiralité, et nous essayerons de reproduire les résultats obtenus avec la proline. Dans un second temps, nous tenterons de lier un acide aminé chiral de manière covalente au BINOL puis de tenter la séparation des diastéréoisomères obtenus. En espérant des résultats positifs, nous continuerons vers la synthèse de di-peptides supportés sur le BINOL chiral, envers le développement de nouveaux types d'hydrogels, ce qui est discuté dans la section suivante.

II- Synthèse de dipeptides supportés sur du BINOL chiral.

La synthèse et étude de structure de peptides et protéines s'est révélée récemment être munie d'une importance croissante dans divers domaines. En effet, ce type de molécules peut avoir des applications dans le domaine de la médecine et thérapie, cosmétologie, génie du tissu vivant, catalyse, comme biosenseurs, etc... L'application de ce type de molécules ne peut se faire sans des études préalables de leurs structures bis- et tridimensionnelles. Dans ce qui suit, nous décrivons quelques études rapportées dans la littérature qui sont en relation étroite avec les applications citées ci-dessus.

II-1- Etude dans le cadre du traitement de la maladie d'Alzheimer :

Histologiquement parlant, la maladie d'Alzheimer se démarque par la formation d'un enchevêtrement fibrillaire d'un certain nombre de peptides connus sous le nom de amyloïdes beta A β . Ces peptides sont de diverses longueurs et formes.

Diverses études des structures de ces amyloïdes ont montré qu'ils étaient sous forme dimériques, et que souvent, ce sont les plus petits en taille qui sont les plus toxiques [7]. Mieux encore, il a été montré que les

dimères pouvaient être de nature covalente, comme ils pouvaient être de nature non-covalente (Figure 3) [8]. Cependant, ces derniers sont plus pertinents sur le plan biologique que les dimères covalents.

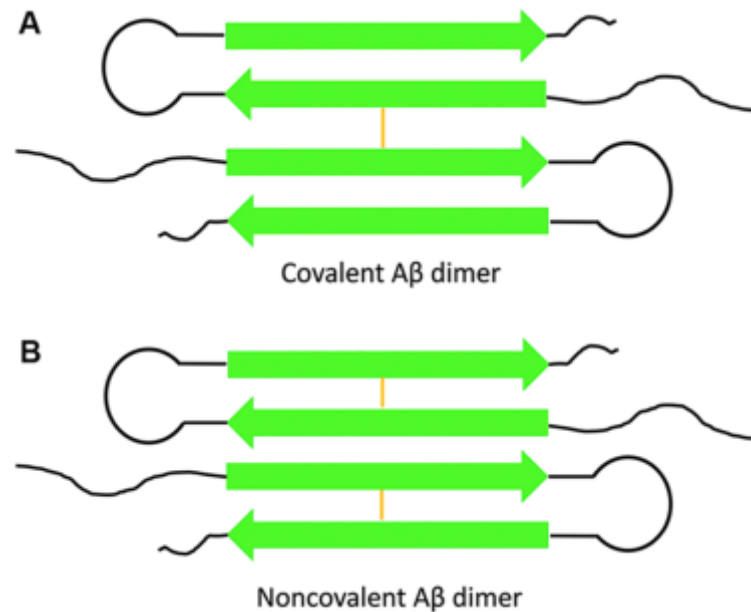


Figure 3: Dessins animés de dimères d'Aβ en feuillets β illustrant les différences entre les dimères covalents et non covalents. (A) Dimère Aβ covalent généré par une liaison disulfure intermoléculaire. (B) Dimère Aβ non covalent contenant deux monomères Aβ stabilisés par liaisons disulfures intramoléculaires. Les liaisons disulfures sont représentées par des traits orange Réf [8].

Il est à noter que ce type d'étude a nécessité l'utilisation de diverses techniques d'analyse, dont 3 types de spectroscopie de masse (MALDI, Native Ion Mobility, ESI), le dichroïsme circulaire, Fluorescence à base de thioflavin, et la microscopie électronique à transmission.

II-2- Application comme hydrogels :

Dernièrement, les chercheurs se sont intéressés de plus en plus au développement des hydrogels pour diverses raisons mentionnés dans l'introduction.

Les défauts osseux représentent un problème clinique critique non curable jusque-là. Ainsi, une approche thérapeutique considérée récemment serait d'appliquer des hydrogels formés par des peptides auto-assemblés, qui pourraient servir de matrices d'administrations de médicaments injectables ; la croissance osseuse serait alors favorisée par des facteurs libérés par la gélification *in situ* de ces derniers [9].

Les peptides conçus à cet effet sont les suivants, représentés en Figure 4.

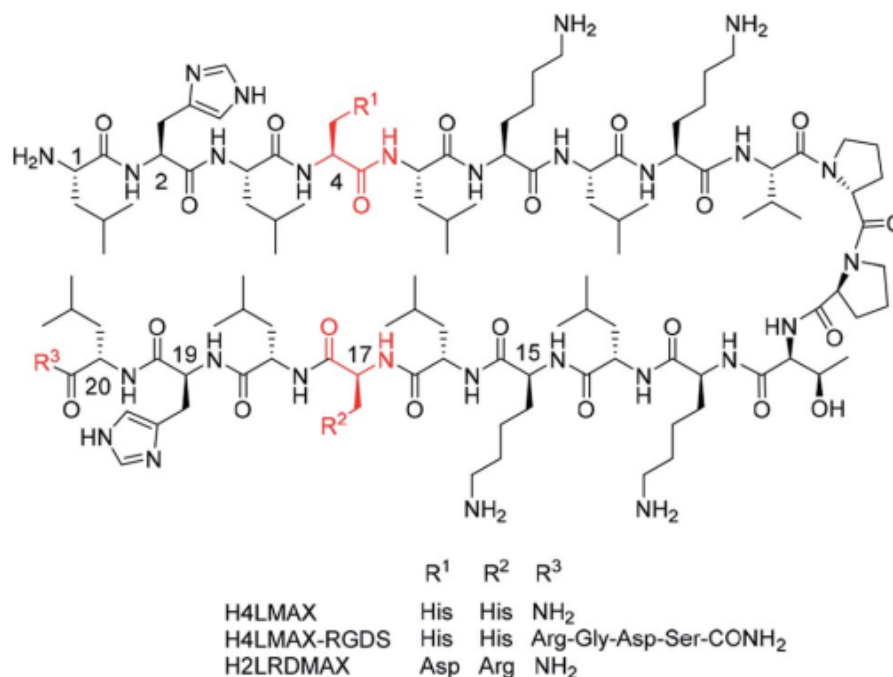


Figure 4: Les peptides conçus et étudiés dans le cas de la croissance et régénération des ostéoblastes.

Ainsi, l'utilisation du peptide de séquence NH₂-Leu-His-Leu-His-Leu-Lys-Leu-Lys-Val-DPro-Pro-Thr-Lys-Leu-Lys-Leu-His-Leu-His-Leu-Arg-Gly-Asp-Ser-CONH₂ (H4LMAX-RGDS) comme hydrogel a permis une augmentation du nombre de cellules ostéoblastiques ; ces cellules sont restées saines et en bonne santé après 07 jours.

Comme autre application des hydrogels peptidiques supramoléculaires en biomédecine, il y a la délivrance de médicaments pour la libération prolongée de molécules thérapeutiques. Il faut préciser que l'administration ciblée et sélective de médicaments est plus favorisée que l'administration systématique du fait qu'elle permet d'éviter la toxicité et les effets secondaires qui sont causés par la liaison hors cible en réduisant les doses [10].

II-3- Auto-assemblage de l'hydrogel peptidique :

Les auto-assemblages peptidiques des hydrogels attirent actuellement une attention notable puisqu'ils ont un potentiel important au niveau de leurs utilisation qui inclut l'ingénierie des tissus par exemple, ou la récupération d'énergie. Nouvellement, plusieurs règles commencent à devenir plus claires pour le contrôle d'auto-assemblage des peptides en fibres d'épaisseur définie ; ces derniers se ramifient et forment des réseaux 3D et des hydrogels qui ont un avantage appréciable, celui du fait que leurs propriétés mécaniques peuvent être ajustables [11].

Les études existantes ont bien montré qu'il y a plusieurs facteurs ou paramètres qui peuvent influencer le taux de libération de la molécule-médicament. Ces facteurs incluent la taille, le degré d'interactions avec la fibre-polymère, et la quantité du milieu aqueux aussi. Un grand nombre d'agents thérapeutiques sont des molécules chargées, et pour cela la compréhension et l'utilisation des interactions électrostatiques devient importante. Une expérience intéressante a été réalisée pour encapsuler deux petites molécules de médicaments, à savoir le jaune naphтол (NY) et le jaune de Martius (MY) portant des charges de -2 et -1 à pH 7 respectivement. Dans ce but, trois octapeptides ioniques-complémentaires portant des charges nettes de 0, +2 et -2 à pH 7 ont été utilisés (Figure 5) [11].

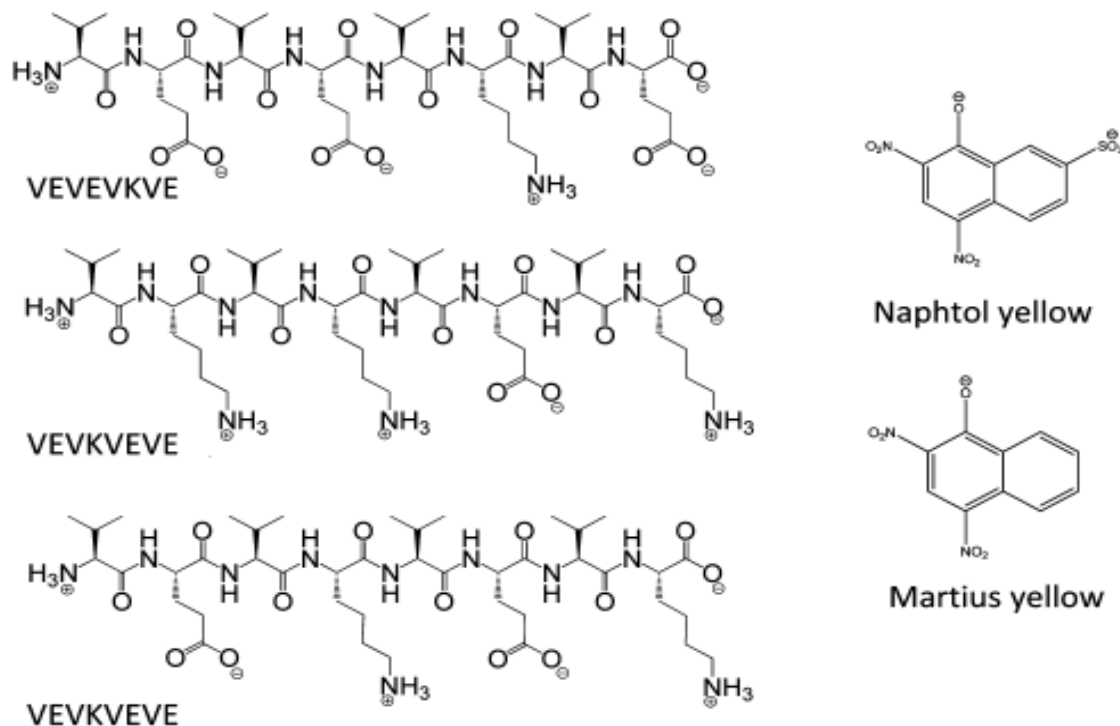


Figure 5: les trois octapeptides ioniques complémentaires ainsi que le jaune naphтол et le jaune Martius Réf [11].

II-4- Amélioration des biomatériaux peptidiques en bio-fabrication :

Le développement de biomatériaux peptidiques qui exhibent une capacité accrue à régénérer un corps natif est un domaine très exploité car il présente des opportunités très vastes pour traiter des maladies ou des blessures graves. C'est un domaine en plein progression qui a démontré l'efficacité et la convenance dans les applications cutanées, intestinales, les cellules souche et même les tissus cancéreux et musculaires ingénierés. La fonctionnalité des biomatériaux en bio-fabrication repose sur l'incorporation d'un mimétique qui imite la pratique des composants de la matrice extracellulaire native (Figure 6) [12].

Biofabricating with Peptide Materials

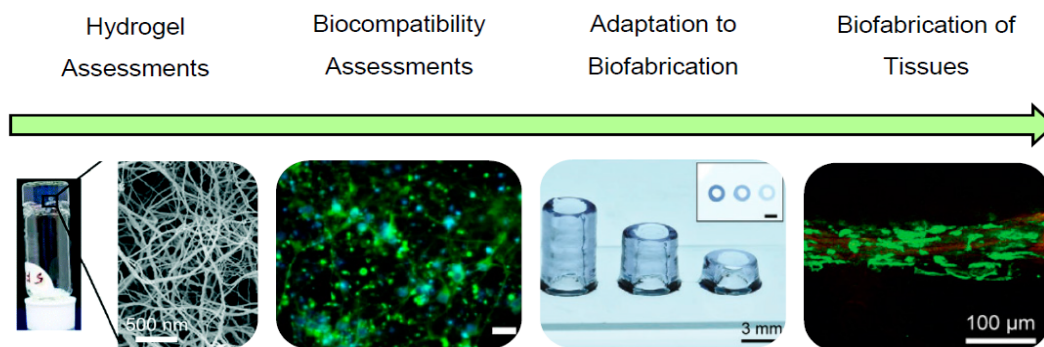


Figure 6: "La voie de biofabrication avec des matériaux à base de peptides implique la découverte de peptides auto-assemblés qui forment des hydrogels aux propriétés mimétiques de l'ECM" Réf [12].

D'autres études sont aussi importantes à considérer, mais qu'on ne pourra pas mentionner ici, tels que l'impact du pH sur le repliement des peptides en feuillets β , l'auto-assemblage et la formation de matériaux hydrogels [13].

Méthodologie conçue et plan de travail :

Pour notre projet de fin d'étude, nous avons choisi le sujet intitulé de "Synthèse d'un nouveau matériau peptidique pour application en hydrogel" en restant persuadé que ce serait un bon choix.

Le travail que nous essayerons de réaliser se base sur deux objectifs principaux : le premier consiste en la synthèse et résolution racémique du BINOL, et le second consiste en la synthèse de dipeptides supportés sur du BINOL chiral.

Objectif 01 : Synthèse et résolution racémique du BINOL (Schéma 3):

Le départ dans cette résolution se fera à partir d'un couplage oxydatif du 2-Naphtol avec un métal comme catalyseur, à savoir le CuCl_2 ou le FeCl_3 , ce qui produirait un mélange racémique de (R) et (S)-BINOL.

La résolution sera tentée en utilisant deux voies : la première sera par simple chélation avec une molécule chirale telle que le (+)-tartrate de diéthyle, avant d'initier le couplage oxydatif.

Dans un second temps, nous tenterons la séparation par réaction chimique, en convertissant le mélange énantiomérique (R) + (S)-BINOL en diastéréomères, par réaction avec un acide aminé chiral protégé (AA1Boc). Les deux diastéréoisomères seront éventuellement séparés par chromatographie. Une saponification des deux diastéréoisomères permettra la production et l'identification du (R)-BINOL qui est le composé majeur du deuxième but.

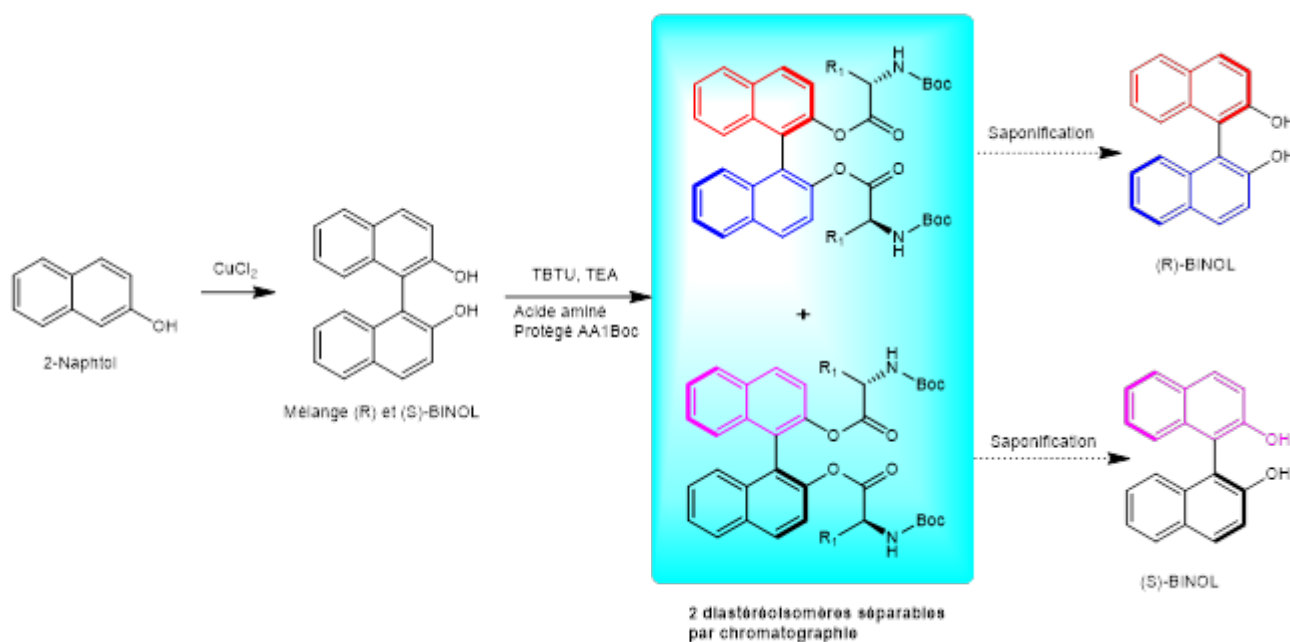


Schéma 3: Voie conçue pour la résolution du BINOL.

Objectif 02 : Synthèse de dipeptide supporté sur du BINOL chiral (Schéma 3):

Après obtention du (R)-BINOL, nous passerons à la réalisation de la synthèse du dipeptide en reposant sur la réaction de protection et déprotection des acides aminés (AA1Boc) et (AA2Boc), toujours en milieu basique (TEA) et en présence du HBTU comme réactif du couplage (Schéma 4).

A la fin, nous tenterons en quelque sorte de cycliser la molécule en fixant une fonction acrylate qui sera soumise à une lumière de longueur d'onde spécifique λ . Le but de cette tentative est de voir si l'on peut piéger un médicament de petite taille à l'intérieur du cycle dipeptidique.

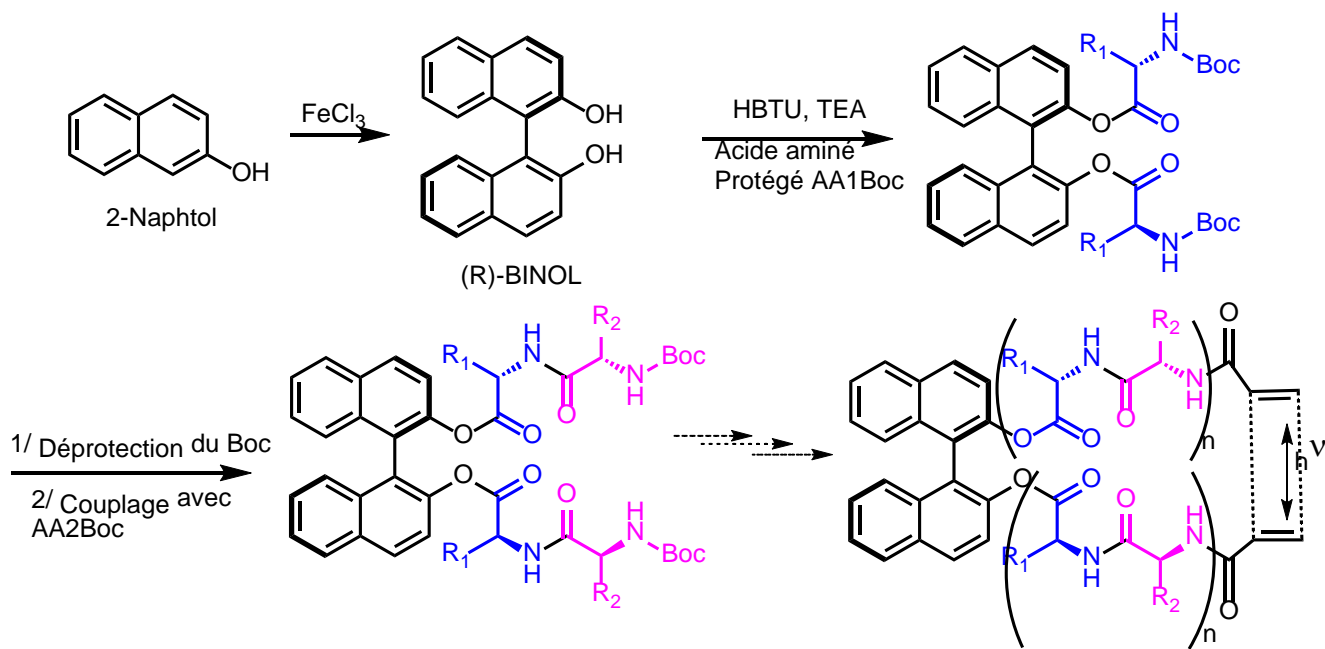


Schéma 4 : Voie conçue pour la synthèse de dimères supportés sur le BINOL.

Chapitre 02 :

Résultats et discussion

1. Introduction :

Comme mentionné dans le chapitre précédent, notre travail consiste en la synthèse d'un nouveau matériau peptidique pour application en hydrogel. Dans ce chapitre, nous allons discuter et décrire les différents résultats obtenus durant notre essai d'acquieser notre objectif.

2. Synthèse du BINOL :

Le BINOL est en général synthétisé à partir du 2-naphtol, par couplage oxydatif, en utilisant soit le cuivre II, soit le fer III.

Comme la littérature ne semble pas favoriser un métal par rapport à un autre pour ce type de couplage, nous avons opté d'utiliser le chlorure de Cuivre II, étant disponible dans notre laboratoire.

Protocole N°01 :

Le couplage oxydatif entre deux molécules de 2-naphtol semble être simple et succinct : les deux molécules de naphtol reçoivent chacun un électron à partir du cuivre II, produisant ainsi deux radicaux naphtyles, qui se coupleront directement pour produire un bi-naphtyl ; ce dernier, par aromatisation, produira le BINOL, comme schématisé en Figure 7.

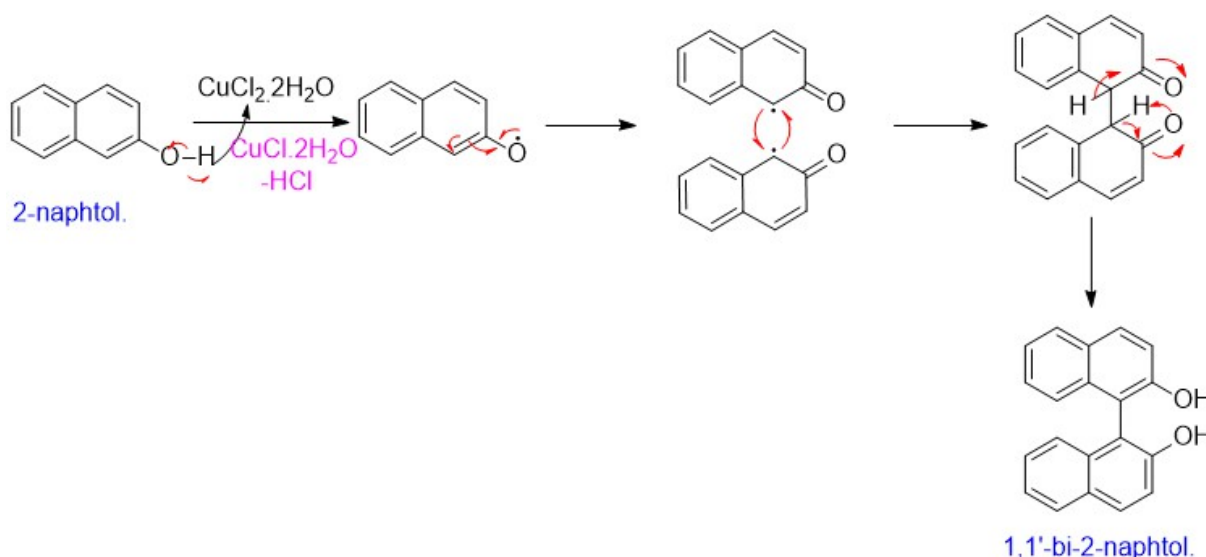


Figure 7 : mécanisme de la réaction du BINOL en utilisant le CuCl_2 .

Sur cette base, nous avons suivi le protocole décrit par Jacques Drouin [14], ce qui a entraîné la formation d'un solide de couleur gris foncé.

Notre premier instinct pour vérifier si la réaction a marché ou non fut la CCM. Malheureusement, le R_f du produit de réaction fut le même que celui du 2-naphtol, produit de départ. De ce fait, nous avons décidé de comparer le spectre RMN ^1H du produit de départ (Figure 9) avec celui de notre produit de synthèse (Figure 8).

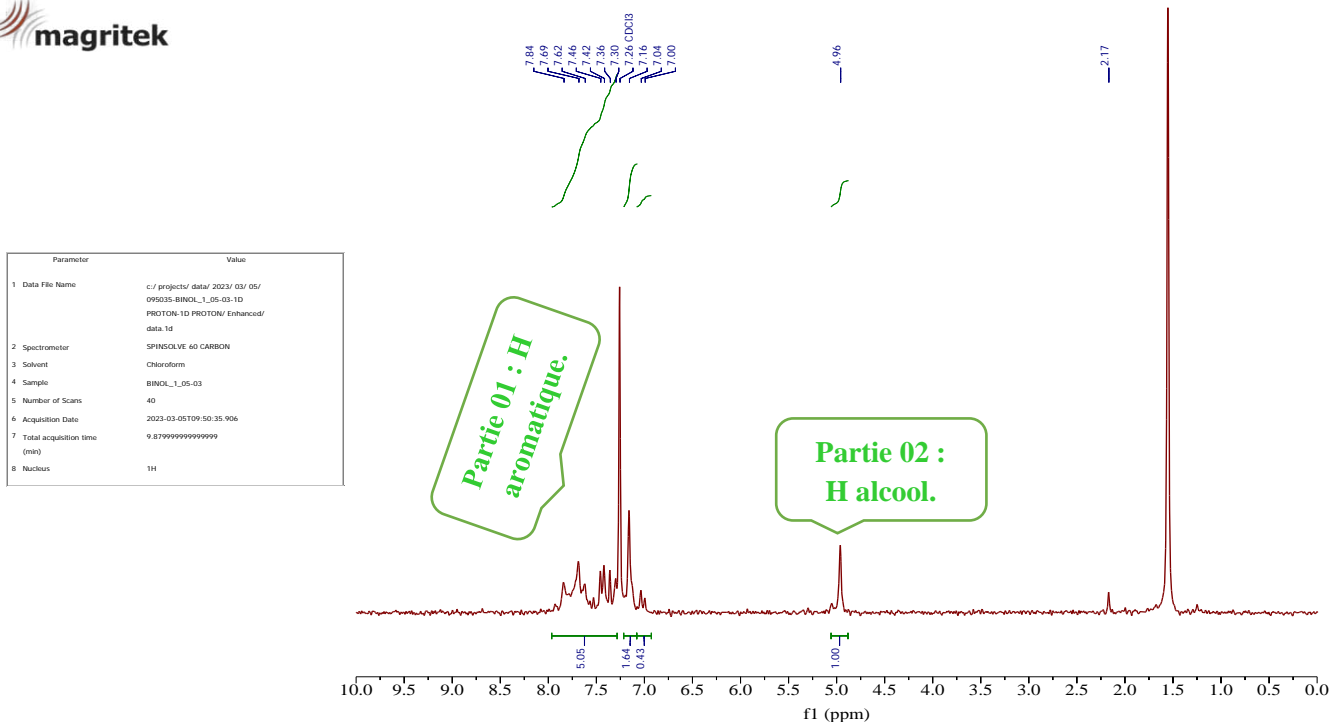


Figure 8 : spectre proton RMN du produit obtenu par le protocole N°01.

Dans cette figure, nous voyons clairement que l'on a un total de 7 protons dans la partie aromatique [7-7.84] ppm, pour 1 proton à 4.96ppm. Cela suggère fortement que l'on a un rapport d'intégration de 7/1, correspondant au 2-naphtol. De plus, le spectre semble identique à celui du 2-naphtol (Figure 9).

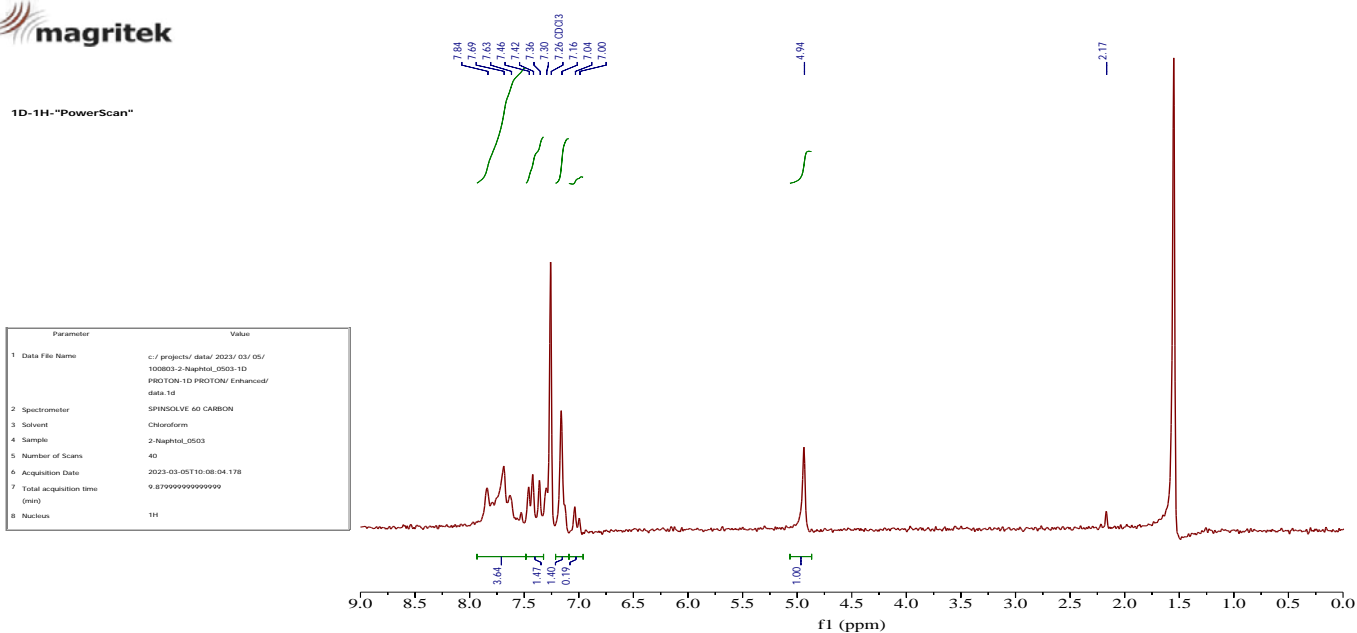


Figure 9 : spectre RMN proton du 2-naphtol.

Sur cette base, nous avons conclu que la réaction n'a pas marché. Par ailleurs, nous avons comparé notre spectre à celui de la littérature qui semblait légèrement différent en termes de déplacements chimiques (Figure 10).

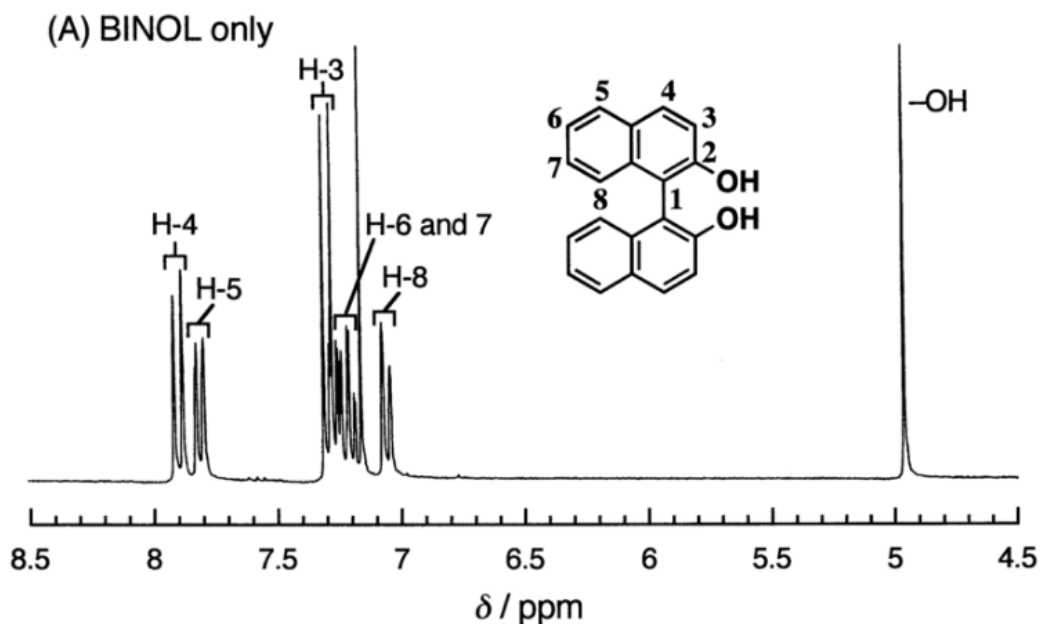


Figure 10 : spectre RMN du BINOL dans la littérature [15].

Donc pour résumer, malgré les indications de l'intégration en RMN ^1H suggérant la présence du produit de départ (Figure 8 et 9), nous n'avons pas pu conclure si le produit s'est formé ou pas pour de diverses raisons :

- La similarité des spectres entre le 2-naphtol et le BINOL. Leur différence réside dans le rapport des protons. Pour le 2-naphtol, le rapport est de 1H alcool pour 7H aromatiques, tandis que pour le BINOL, il est de 1H alcool pour 6H aromatiques.
- Par une simple comparaison du spectre de RMN avec du BINOL dans la littérature [15], on distingue une différence marquante malgré que les deux sont dissous dans le même solvant deutérié CDCl_3 (figures 8 et 10)
- Le rapport frontal R_f de CCM des deux composés est pratiquement le même, ils se situent au même niveau.

Par conséquent, nous avons dû nous baser sur le point de fusion pour une déduction décisive, sachant que la température de fusion passe de 120°C pour le 2-naphtol à $205\text{-}211^\circ\text{C}$ pour le BINOL.

Ainsi, le point de fusion mesuré s'est avéré être de 130°C , ce qui confirme la présence unique du produit de départ et donc l'échec de la réaction.

Sur cette base, nous avons pensé que peut-être le temps de réaction n'était pas suffisant. Nous avons ainsi pris la décision d'augmenter le temps de réaction de 5 heures à 18 heures. Malheureusement, une fois de plus, cela n'a pas abouti au produit désiré.

Nous avons réalisé un total de 5 tests en utilisant le chlorure de cuivre II, mais sans succès.

La figure 11 suivante représente une comparaison des produits des 5 tests réalisés.

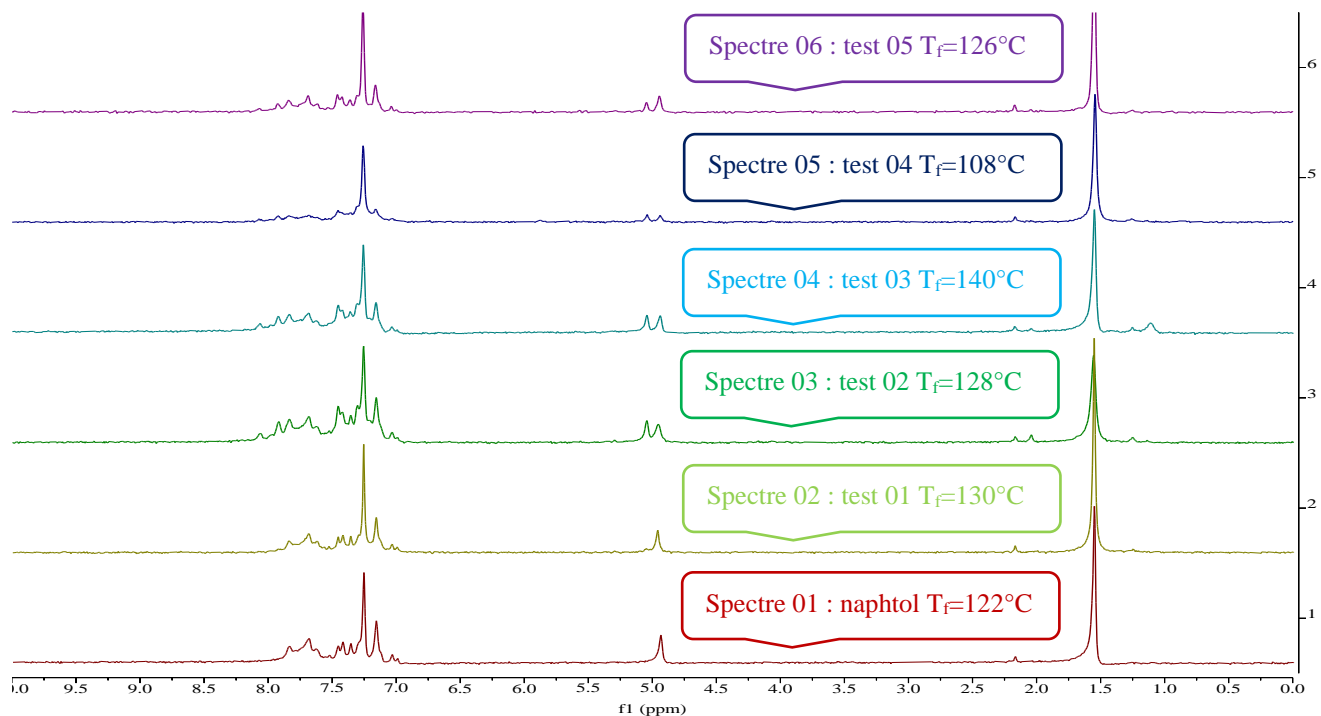


Figure 11 : spectres RMN proton pour les différentes tentatives du protocole N°01.

La comparaison des cinq spectres indique un échec de tous les essais. Il est intéressant aussi de remarquer que les résultats obtenus sont incohérents, dans les zones [4.5 – 5.5] et [7.00 – 8.00] ppm. Par contre, nous avons noté la présence d'un pic intense vers 1.52 ppm dans le spectre (figure 09) du 2-naphtol, et qui est présent dans les cinq spectres des cinq tests, alors qu'il ne devrait pas y être. En ajoutant les points de fusion inappropriés, nous pouvons confirmer que la réaction n'a pas réussi.

N.B : Un autre élément qui a confirmé cet échec est le fait que lorsqu'on a porté notre solide à ébullition dans de l'eau bouillante. En faisant cela, le 2-naphtol s'est évaporé totalement, ne laissant rien derrière lui. Si l'on avait du BINOL, ce dernier aurait été présent, vu son point de fusion élevé.

De ce fait, nous avons soupçonné la qualité du 2-naphtol et après avoir confirmé nos doutes avec la RMN, nous avons décidé d'utiliser un nouveau lot de 2-naphtol. Son spectre est le suivant (Figure 12) :

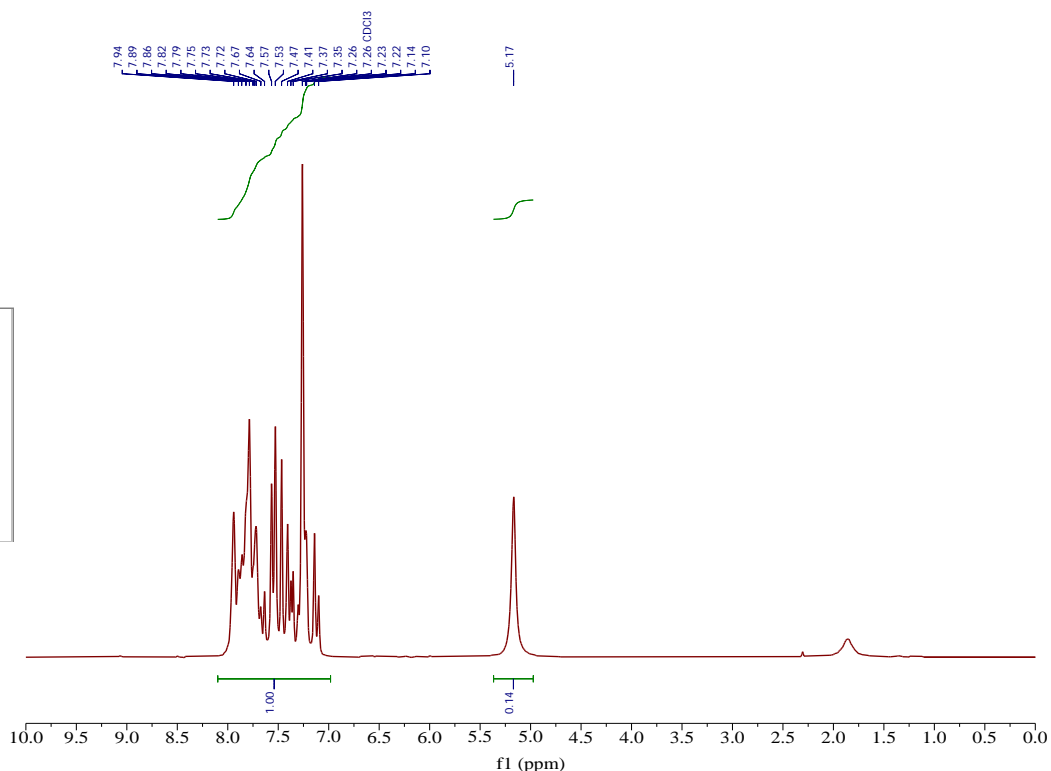


Figure 12 : spectre RMN du deuxième lot de 2-naphthol.

Contrairement au premier échantillon utilisé, celui-ci semble pur malgré la présence d'une légère impureté qui n'a pas affecté notre synthèse. Nous l'avons donc adopté pour tout le reste de notre travail.

Protocole N°02 :

Après ces échecs consécutifs à synthétiser le BINOL, et en même temps que le changement du lot de 2-naphthol, nous avons décidé d'utiliser le chlorure de fer III, en espérant que celui-ci nous donnerait de meilleurs résultats. Nous avons donc opté pour un autre protocole décrit par Brian E. Love et Robert A. Bills [16], qui recommande l'utilisation du chlorure de fer en présence d'alumine en tant qu'agent de couplage. Cependant, ce protocole n'a pas été testé vu l'indisponibilité de l'alumine.

Protocole N°03 :

Une variation du protocole 2 consiste à suivre le protocole décrit par Jacques DROUIN, qui recommande l'utilisation du chlorure de fer (III) hexahydraté [14]. Dans cette référence, deux protocoles pour la synthèse du BINOL sont rapportés, le premier décrivant une réaction utilisant des solvants et le second suggérant une réaction à sec. Dans notre cas, nous avons choisi le protocole à sec, ce qui a produit un solide de couleur marron.

A notre bonheur, les analyses spectroscopiques ainsi que le point de fusion ont tous confirmé l'obtention du bon produit.

Résultat RMN :

1D-1H-"PowerScan"

Parameter	Value
1 Data File Name	c:/projects/data/2023/04/29/145235-BINOL_pur-1D PROTON-1D PROTON/Enhanced/data.1d
2 Spectrometer	SPINOLVE 60 CARBON
3 Solvent	Chloroform
4 Sample	BINOL_pur
5 Number of Scans	16
6 Acquisition Date	2023-04-29T14:52:35.926
7 Total acquisition time (min)	3.89
8 Nucleus	1H

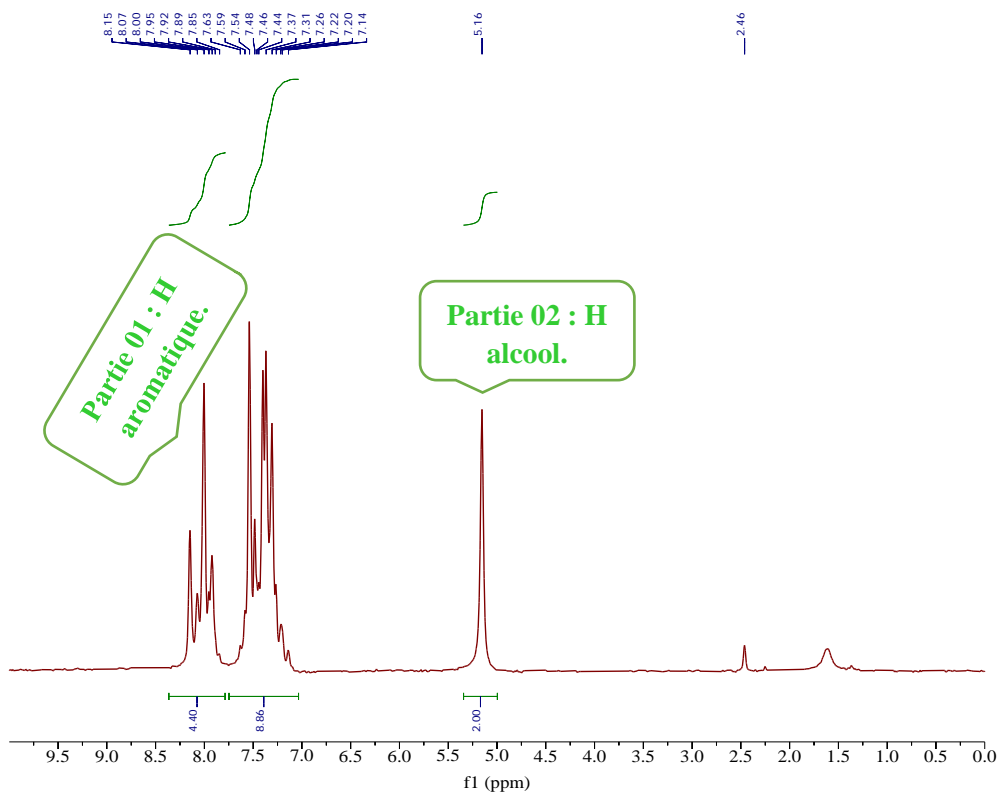


Figure 13 : spectre RMN proton du BINOL pur protocole N°03.

L'analyse du spectre indique que le produit obtenu est le 1,1'-bi-2-naphtol. En observant les pics du spectre, nous constatons que pour 2H alcool, nous avons une présence de 13H aromatiques. En tenant compte de l'intensité du signal du solvant (CDCl₃) estimé à environ 1H, nous observons un total de 12H aromatiques à des valeurs chimiques de 7.14-8.15 ppm du BINOL, ainsi que 2H à 5.16 ppm correspondant aux deux groupes hydroxyle (-OH).

Pour être encore plus sûr que le produit soit bien le BINOL avec ses deux alcools libres et non pas un complexe avec le fer, une analyse IR a été réalisée (Figure 14).

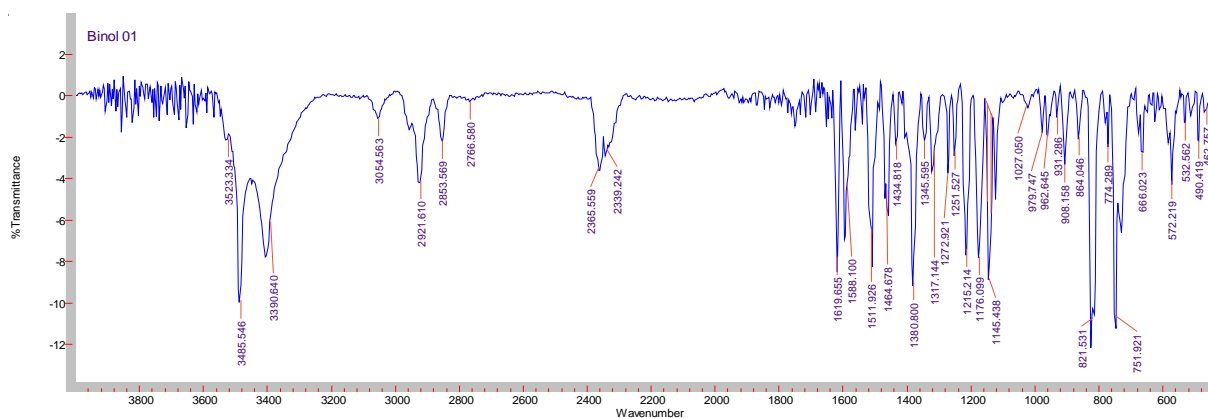


Figure 14 : résultat IR du BINOL.

En effet, la bande OH est présente à 3390.640 cm⁻¹ et 3485.546 cm⁻¹.

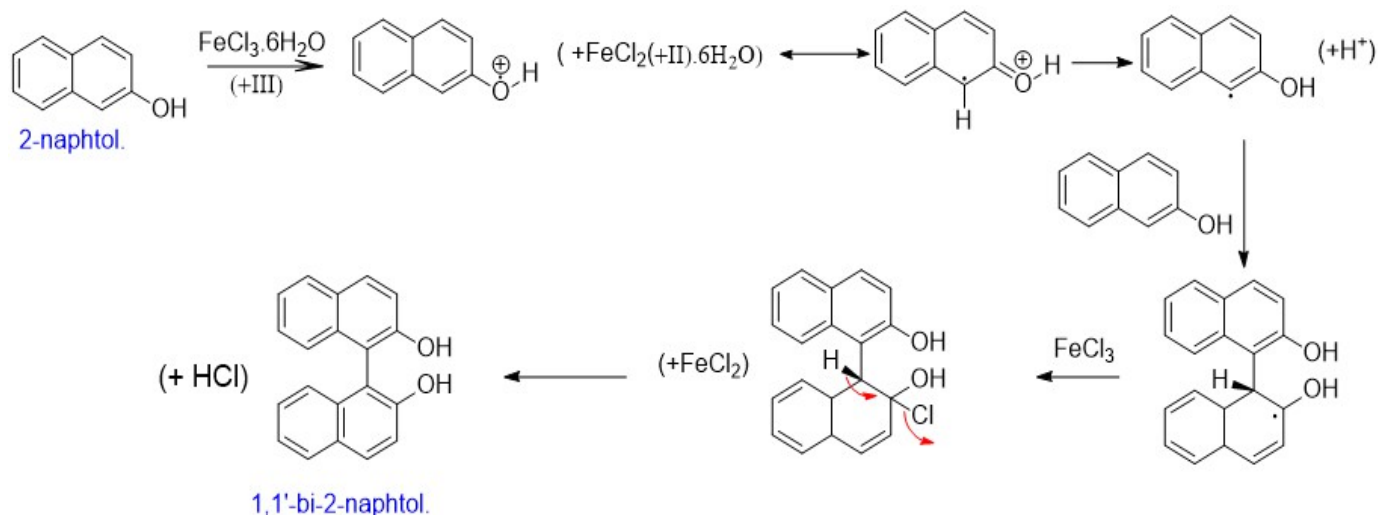
De plus, le point de fusion a été mesuré, et a été trouvé égal à T_f = 211°C.

Selon les données de la RMN, de l'IR et en particulier du point de fusion, nous pouvons enfin affirmer que le produit obtenu correspond bien au BINOL recherché, mais malheureusement avec un rendement très faible de 11.66%, qui peut être expliquée par la perte du produit durant la recristallisation en utilisant le toluène bouillant comme solvant, sachant que nous sommes partis de 4.29g de quantité à purifier à 0.9g de produit pur.

Mécanisme 02 :

Le mécanisme impliqué dans cette synthèse est le suivant :

Schéma 5 : mécanisme impliqué dans la synthèse du BINOL avec le FeCl₃.6H₂O.



Le mécanisme implique un couplage oxydatif où le naphthol cède un électron au fer (III). Le radical du naphthol prend la forme mésomère la plus stable et c'est celle où la charge est portée sur le carbone 1, car le proton peut être expulsé pour donner un radical qui peut attaquer une autre molécule de 2-naphtol sur cette position. L'addition se produit sur la même position de la deuxième molécule à cause de la stabilité du radical et enfin le produit se forme par une dernière oxydation.

3. Résolution racémique du BINOL :

Nous avons émis l'hypothèse que la résolution racémique du BINOL pourrait être réalisée en utilisant un acide aminé, ou même le tartrate d'éthyle. Cette hypothèse est fondée sur les travaux antérieurs de Dongwei Cai *et al* qui ont utilisé le chlorure de N-benzylcinchonidinium comme agent de résolution [17]. Comme, notre laboratoire ne dispose pas de ce réactif, nous avons décidé d'explorer la résolution racémique en utilisant le (+)-tartrate de diéthyle, un dérivé de l'acide tartrique disponible dans notre laboratoire.

BINOL synthétisé avec du (+)-tartrate de diéthyle:

Nous avons raisonné de la manière suivante : la chélation de (+)-tartrate de diéthyle avec le 2-naphtol suivie d'un couplage oxydant des deux radicaux naphtyles plus l'élimination du tartrate par recristallisation, conduit à l'obtention d'un seul diastéréoisomère du BINOL.

Explication d'hypothèse :

Étant donné que le (+)-tartrate de diéthyle est optiquement actif, nous postulons qu'en mélangeant les deux molécules de 2-naphtol avec le tartrate, des interactions de liaison de type hydrogène se produiront, ce qui orientera probablement les molécules de naphthol de manière précise (Figure 15). Cela devrait conduire à l'obtention d'un seul énantiomère du BINOL après l'oxydation des deux radicaux naphtyles.

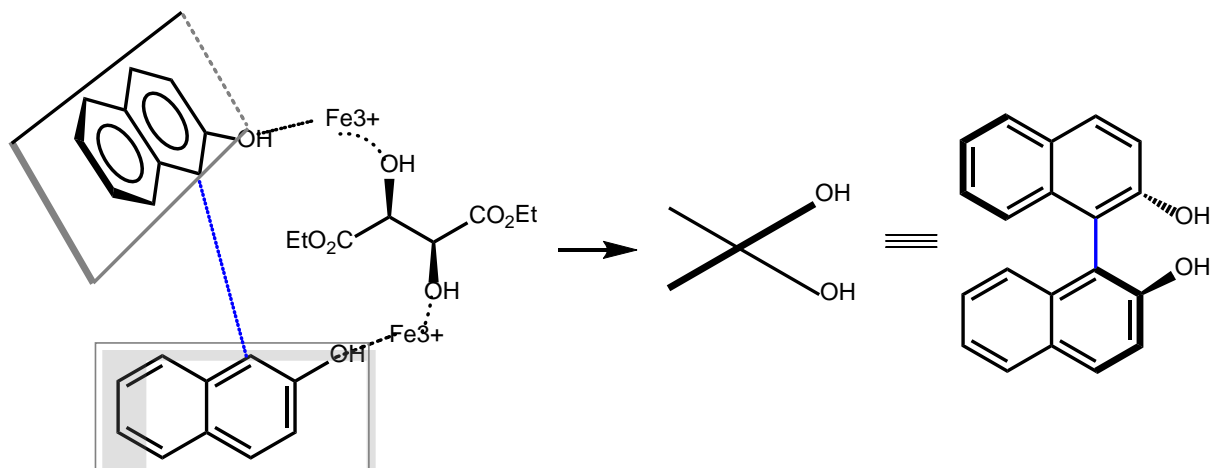


Figure 15 : Modèle de prédiction d'orientation d'un naphthol par rapport à l'autre.

Sur cette base, nous avons dans un premier temps mélangé le 2-naphthol et le (+)-tartrate à sec, dans un mortier que nous avons broyé pendant 15 min ; suite à cela, nous avons ajouté le chlorure de fer III et nous avons continué le broyage de manière vigoureuse en utilisant le pilon, pendant 1hr. Le produit isolé (voir partie expérimentale) a été analysé par RMN ^1H , ainsi que par point de fusion.

Les deux parties montrées sur le spectre (Figure 16) représentent bien les deux protons alcools à 5.04ppm et les 12 protons aromatiques entre 7.20 ppm à 8.06ppm, du BINOL. Cependant, nous observons à nouveau la présence d'un signal intense à 1.52 ppm, qui est vraisemblablement dû à une impureté que nous n'avons pas eu le temps d'investiguer.

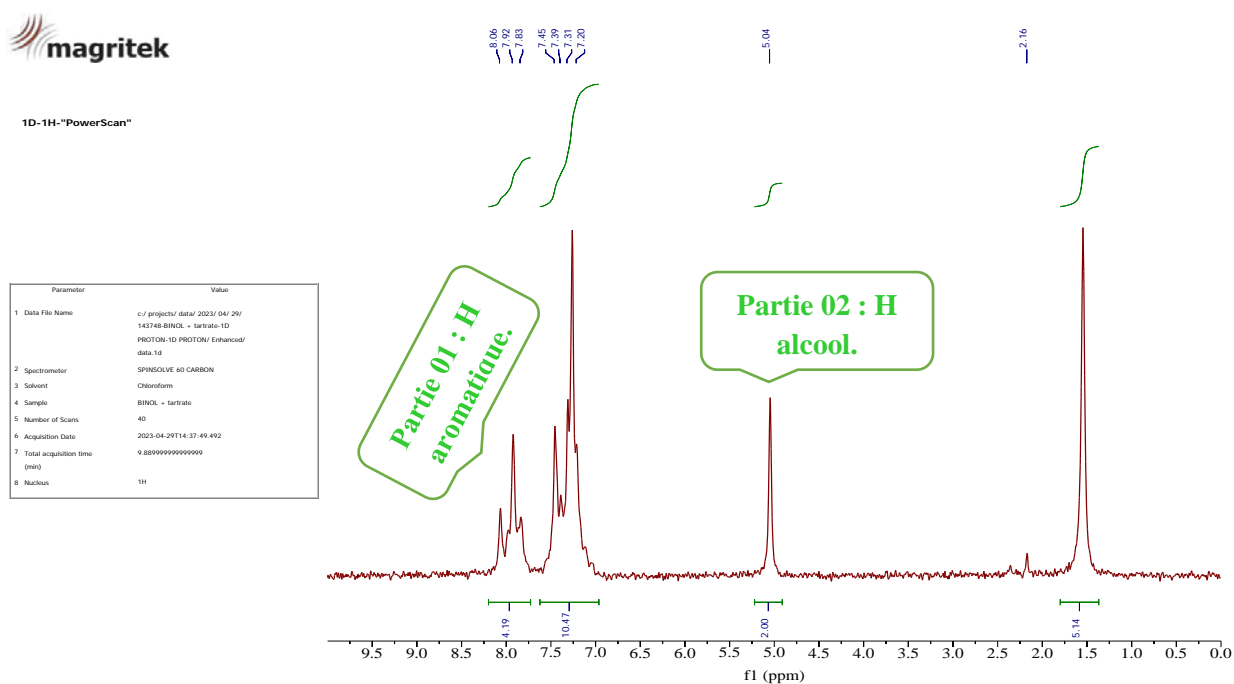


Figure 16 : résultat RMN proton du BINOL synthétisé en présence du tartrate.

La mesure du point de fusion a donné la valeur de $T_f = 212^\circ\text{C}$. Avec la RMN, nous avons pu confirmer la formation du BINOL de nouveau.

Cependant, la question suivante qui restait était la suivante : est-ce que la réaction en présence du tartrate a bien été stéréosélective, et avons-nous bien favorisé un énantiomère, plutôt qu'un autre ?

Pour pouvoir répondre à cette question, nous avons dû faire appel à la mesure du pouvoir rotatoire.

Pouvoir rotatoire spécifique :

Comme une technique de vérification d'énantiomérique nous avons opté pour la polarimétrie.

Le pouvoir rotatoire spécifique est une grandeur caractéristique d'une molécule chirale ce qui pourrait être le cas avec notre produit. Pour cela, nous avons décidé de mesurer son angle de déviation pour pouvoir déterminer si le BINOL que nous avons obtenu est racémique ou chiral.

Le pouvoir rotatoire spécifique est calculé par la loi de Biot :

$$[\alpha] = \frac{\alpha}{d \cdot c}$$

Avec : α le pouvoir rotatoire de la solution en degré ($^{\circ}$).

d la longueur de la cellule en dm.

C la concentration de la solution en g/cm^3 , parfois en $\text{g}/100\text{cm}^3$

Le pouvoir rotatoire du BINOL rapporté dans la littérature est de $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = -34.7^{\circ}$ (c 0.5 $\text{g}/100\text{cm}^3$, THF) et $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = -35.5^{\circ}$ (c 1.03 $\text{g}/100\text{cm}^3$, THF) [18]. Il s'agit donc dans notre cas de mesurer le pouvoir rotatoire dans les mêmes conditions, et de le comparer avec celui de la littérature.

Pouvoir rotatoire spécifique du BINOL simple :

Par principe, nous avons dans un premier temps mesuré le pouvoir rotatoire du BINOL synthétisé en absence du tartrate.

Les résultats de cette mesure sont présentés dans le tableau suivant :

Concentration $\times 10^{-2} \text{g}/\text{cm}^3$.	d (cellule).	α ($^{\circ}$).	$[\alpha]$
1	1.00 dm	-0.4	-40°

Tableau 1 : résultat du pouvoir rotatoire spécifique du BINOL simple.

D'après la littérature et ces résultats, nous pouvons dire que nous avons un seul énantiomère pur 'S-BINOL', ce qui a été surprenant pour nous, car on s'attendait à un pouvoir rotatoire nul ou presque. Ici, on trouve que la valeur est plus élevée que celle de la littérature. Sur cette base, nous avons refait les mesures, en utilisant le même lot, ainsi qu'un autre lot de synthèse. Dans les deux cas, nous avons obtenu la même valeur.

Pouvoir rotatoire spécifique du BINOL synthétisé en présence du (+)-tartrate de diéthyle :

Nous avons tenté de mesurer le pouvoir rotatoire du BINOL synthétisé en présence du (+)-tartrate de diéthyle, en utilisant les mêmes conditions que pour l'évaluation précédente du BINOL simple. Malheureusement, aucun résultat n'a pu être obtenu, probablement en raison de la présence persistante de traces de fer, ce qui a empêché toute mesure significative.

D'autres méthodes de détermination d'un excès énantiomérique existent, comme par exemple l'utilisation de sels d'euprium, l'alcool de Pirkle, ou encore l'acide de Mosher. Toutes ces méthodes sont basées sur

la conversion des énantiomères en « diastéréomères », et l'utilisation de la RMN pour déterminer le dédoublement des signaux, chacun correspondant à un diastéréoisomère pur.

La figure 17 suivante représente un exemple d'application, où les auteurs ont converti un mélange de deux énantiomères d'un di-amino-alcool protégé en esters de Mosher correspondants [19]. Ils ont ensuite utilisé la RMN pour mesurer les hauteurs des signaux dédoublés, ce qui leur a produit le rapport des diastéréoisomères, donc énantiomères par déduction, le signal le plus intense correspondant au diastéréoisomère majoritaire.

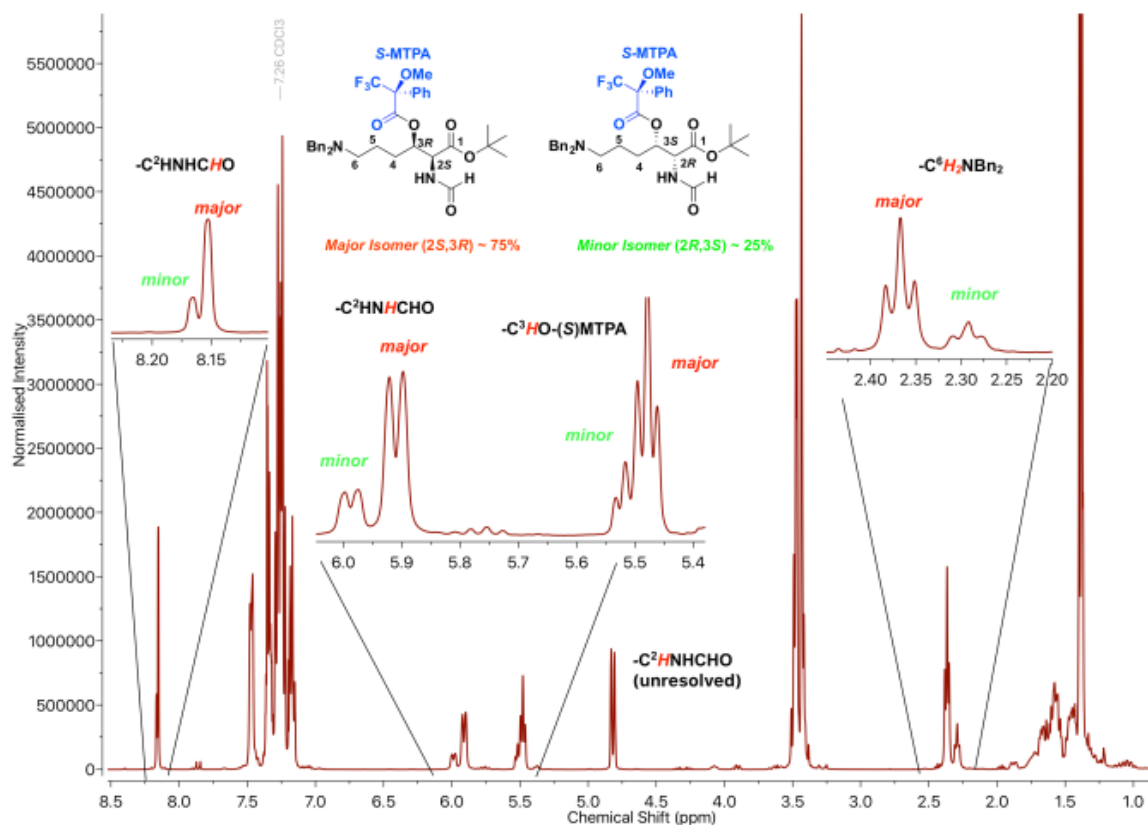


Figure 17 : spectre RMN de la détermination de l'excès énantiomérique [19].

Malheureusement, aucune de ces méthodes n'était applicable dans notre laboratoire, et nous sommes restés sans fin vis-à-vis de ce problème.

4. Synthèse d'un dipeptide sur le BINOL chiral :

A ce stade de notre étude, notre objectif était de synthétiser un dimère peptidique supporté sur le BINOL, ce qui impliquait essentiellement une réaction d'estérification.

Les réactions d'estérifications aux conditions neutres peuvent être réalisées de différentes manières, dont:

- Réaction de Mitsunobu.
- En utilisant les agents de couplage.

Dans notre cas, nous avons utilisé un agent de couplage, plus précisément le HBTU :

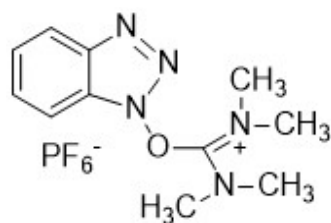


Figure 18 : Structure du HBTU.

Mise à part le HBTU, il existe d'autres agents de couplage qui sont les suivants : BOP, COMU, DEPBT, HATU, HCTU, PyAOP, PyBOP, PyOxim, TSTU.

Vu sa disponibilité au laboratoire, nous l'avons donc adopté pour notre synthèse.

Synthèse du premier couplage d'un acide aminé (Boc-Ile-OH):

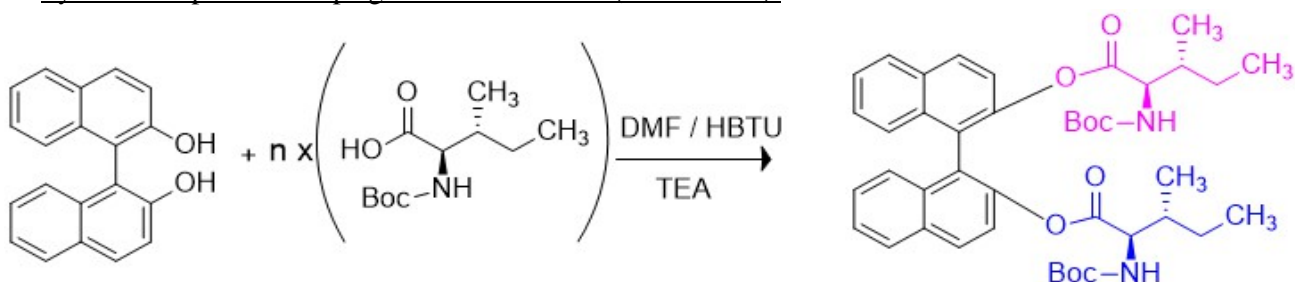


Schéma 6 : schéma représentant la réaction du couplage du Boc-Ile-OH avec le BINOL.

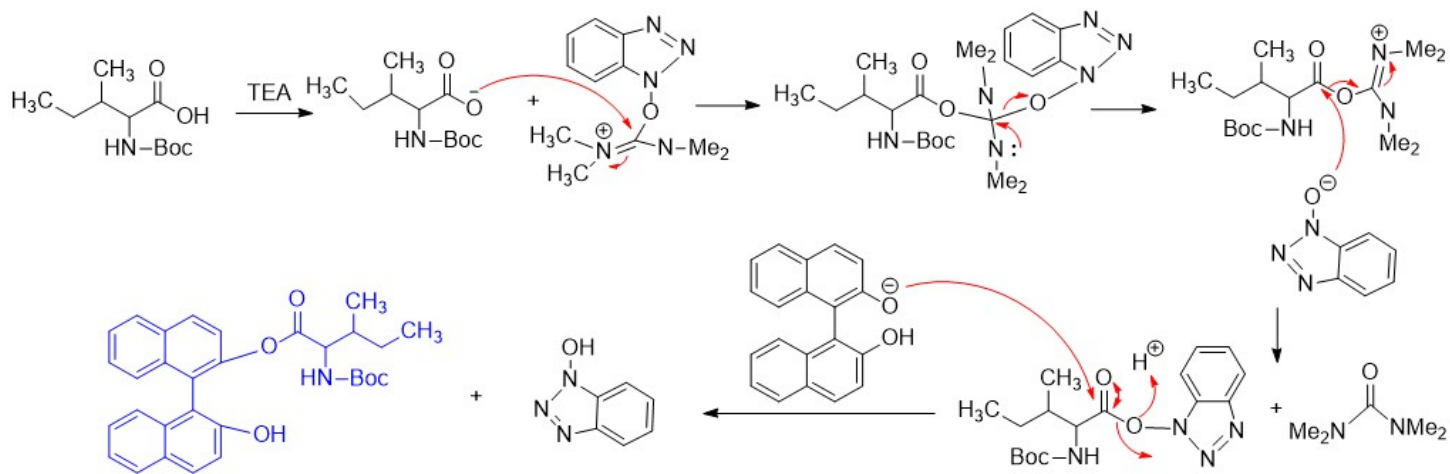
Les équivalents utilisés pour cette synthèse sont les suivants :

- 3 équivalents d'acide aminé pour 1 équivalent de BINOL.
- 3.3 équivalents de HBTU et 6 équivalents de triéthylamine pour 3 équivalents d'acide aminé.

Nous avons opté pour un excès de réactifs pour justement garantir le rendement et le fait que les protons désirés soient arrachés.

Mécanisme de couplage par HBTU :

Le couplage d'un acide aminé sur le BINOL par le HBTU se déroule en plusieurs étapes. Tout d'abord, l'acide aminé est activé par le HBTU, qui réagit avec son groupe carboxylique. Ensuite, un intermédiaire du BINOL qui est déjà déprotoné par la triéthylamine se forme. Enfin, une liaison peptidique se forme entre le BINOL et l'acide aminé, les reliant ensemble.



NB : le meme mécanisme se produit avec le deuxième OH du BINOL.

Schéma 7 : Mécanisme de couplage par le HBTU.

Continuons avec la discussion des résultats obtenus de ce premier couplage.

Cette réaction a conduit à l'obtention d'un solide marron avec un point de fusion $T_f = 148^\circ\text{C}$.

Résultat RMN :

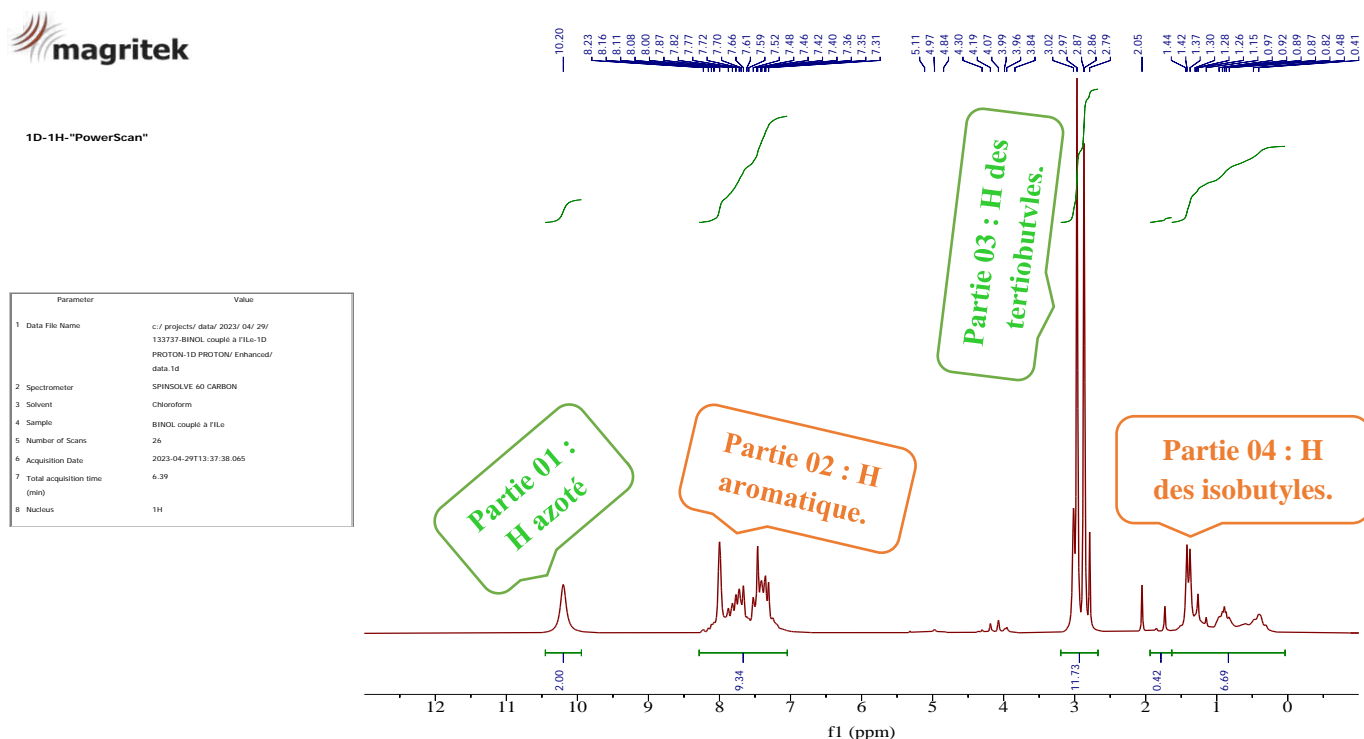


Figure 19 : résultats RMN du BINOL couplé avec le Boc-Ile-OH.

Comme l'on peut le voir sur le spectre, les 04 parties montrent bien que la réaction a bien marché et que le couplage avec l'isoleucine a réussi.

La partie 01 qui se trouve à 10.20 ppm représente les deux protons des deux azotes des acides aminés, suivie de la partie 02 de 7.31 ppm à 8.23 ppm qui représente les protons aromatiques du BINOL, continuant avec la partie 03 à 2.86 ppm et 2.97 ppm qui représente les protons des tertibutyles du Boc plus la partie 04 des protons des isobutyles des acides aminés. En mettant à l'écart ces 04 parties, on constate qu'il y a la présence de certains pics qui ne sont pas identifiés et qui montrent que le produit n'est pas pur, chose que nous avons confirmé par la chromatographie sur couche mince CCM.98908

Note :

La représentation du BINOL couplé avec le Boc-Ile-OH en 3D suivante peut montrer qu'effectivement la résolution peut être réalisée grâce à un acide aminé :

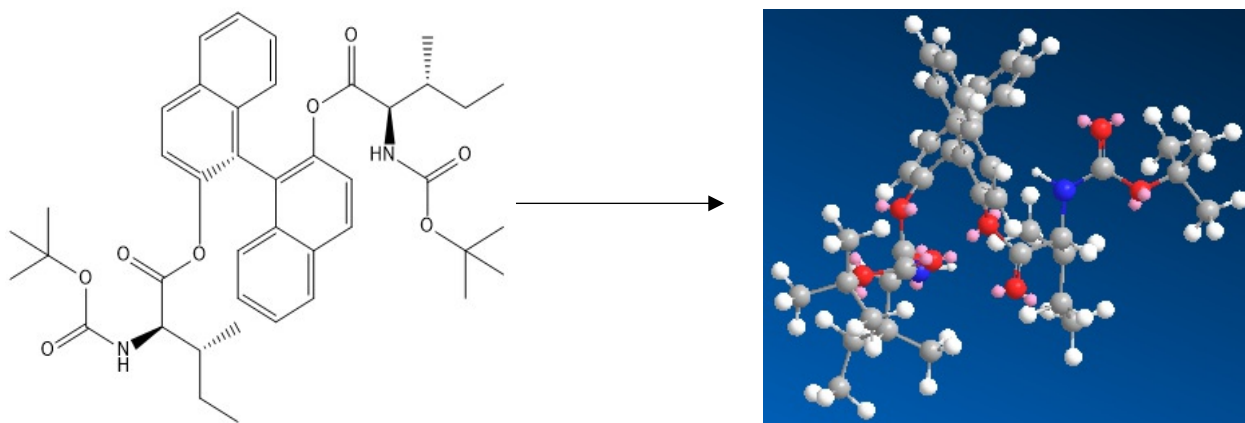


Figure 20 : représentation 2D et 3D du S-BINOL.

CONCLUSION GENERALE

Il a été précédemment mentionné dans l'objectif de notre travail que notre deuxième objectif consiste à synthétiser un dimère peptidique, voire un trimère, ancré sur la molécule de BINOL, puis une tentative de cyclisation de l'ensemble de la molécule afin de déterminer la possibilité de piéger un médicament à l'intérieur du cycle peptidique. Cependant, en raison du temps très limité dont nous disposions, nous n'avons pas pu approfondir davantage nos essais et nous nous sommes arrêtés à la synthèse d'un seul acide aminé (Boc-Ile-OH) sur le BINOL.

Ce travail préliminaire a pu dégager un certain nombre de problèmes techniques qu'il faudra résoudre par la suite. Cela reste dans les perspectives du laboratoire.

Par ailleurs, il a permis de mettre en évidence certaines questions chimiques intéressantes, tels que pourquoi le BINOL obtenu de manière purement achirale a quand même été chiral ?

Finalement, ce travail, quoique modeste, nous a permis de beaucoup apprendre au niveau de la paillasse, au niveau du raisonnement scientifique, et comment conduire un sujet de recherche.

Chapitre 03 :

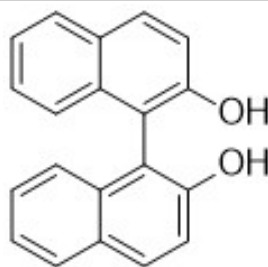
Partie Expérimentale.

I. Généralités :

- La chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée sur plaques en aluminium de gel de silice 60F254 (Merck) (40-63 μm) avec un révélateur sous lampe UV.
- Les produits et réactifs suivants ont été commercialisés et achetés de la société Sigma-Aldrich : β -naphthol, (+)-diéthyle tartrate, triéthyle amine TEA, acétate d'éthyle, dichlorométhane, éthanol, méthanol, heptane, HBTU.
- L'analyse RMN a été réalisée sur appareil Magritek SpinSolve 60 Carbon avec une référence interne 10% de H_2O dans D_2O à 4.74ppm ; les spectres ont été mesurés en utilisant le CDCl_3 comme solvant (sauf indication spécifique) et les déplacements chimiques sont donnés en ppm.
- Le pouvoir rotatoire a été mesuré par le polarimètre LABTRON LPMR-A10, utilisant une lampe à sodium standard à 589nm.
- Les températures de fusion ont été mesurées par le banc Kofler HEIZBANK de type WME avec une échelle allant de 50°C à 260°C.
- L'analyse IR a été réalisée sur spectromètre Cary 640 FTIR avec le logiciel Agilent Resolution Pro.
- L'évaporation des solvants a été faite avec le rotavap Heidolph avec une pompe de la même marque de 7.0mbar.

II. Protocole et mode opératoire :

1. Synthèse de BINOL (1,1'-Bis(2-naphthol)) :



BINOL (1,1'-Bis(2-naphthol)).

Formule brute : C₂₀H₁₄O₂.

Masse molaire : 286.32 g/mol.

Point de fusion T_f : 211°C.

[α]_D²⁰ pouvoir rotatoire spécifique : -40°.

Rapport frontal R_f : R_f = 0.40 (Heptane/EtOAc (70% / 30%)).

¹H RMN 60 MHz (CDCl₃) : δ 5.16 ppm (s, 2H), 7.14-8.15 ppm (m, nH (n=14)).

Pour pouvoir synthétiser le BINOL nous avons passé par 3 tests dont deux qui étaient un total échec. Les trois sont décrits plus détaillés par la suite :

a) Protocole N°01 :

Synthèse du BINOL en utilisant le CuCl₂.2H₂O comme oxydant :

Au début, deux solutions ont été préparées :

Solution 01: dans un erlenmeyer de 50mL, est introduit 1.97g de CuCl₂.2H₂O (1.15×10⁻² mol) avec 4.9mL d'eau distillé.

Solution 02: dans un autre erlenmeyer de 250mL muni d'un barreau magnétique, 0.5g de 2-naphtol (3.47×10⁻³ mol) est introduit avec 41.6mL d'eau distillée sous agitation et chauffage.

Lorsque l'ébullition commence à s'effectuer, la solution 1 du CuCl₂.2H₂O est ajoutée petit à petit, un précipité commence à apparaître et la réaction est laissée sous agitation et chauffage jusqu'à 5h-6h, voir même 18h. Le précipité est récupéré par une filtration sous-vide, ensuite il a été lavé avec de l'acétate d'éthyle et le solvant est éliminé par une évaporation au rotavapor [14].

Le produit a été purifié par une recristallisation en utilisant le toluène bouillant comme solvant.

b) Protocole N°03 :

Dans un mortier, 4g de 2-naphtol est broyé avec 15.20g de chlorure de fer (III) hexahydraté (FeCl₃.6H₂O) et est déposé dans un bécher de 9cm de façon à réaliser la CCM. Le bécher est ensuite mis dans un bain de sable à 50-70°C pendant 2h-2h30, le produit est ensuite trituré 4 fois avec 25mL d'eau bouillante et filtré sous vide. [14]. Le produit est ensuite purifié par recristallisation dans du toluène, filtré et séché dans l'étuve à 60°C.

2. Résolution racémique du BINOL :

Nous avons envisagé de faire une résolution racémique pour le BINOL en utilisant le diéthyl (+) tartrate et en suivant le même protocole précédent sauf que le 2-naphtol est broyé d'abord avec le diéthyl tartrate suivi par l'ajout de chlorure de fer (III) hexahydraté.

Il s'avère que nous avons suivi la même technique et les mêmes conditions de purification pour cette 2^{ème} synthèse (la recristallisation) en utilisant le toluène comme solvant, ainsi le (+)-tartrate de diéthyle peut être éliminé.

3. Pouvoir rotatoire spécifique :

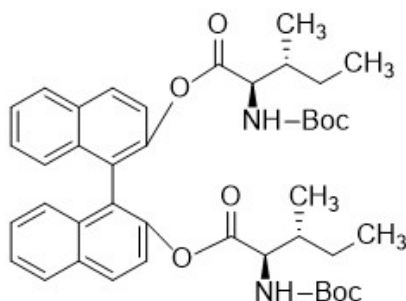
Dans une fiole jaugée de 25mL, on introduit 250.0mg de BINOL pur, qu'on dissout dans du THF. La température de la pièce est notée à 16° et la longueur d'onde est de 589nm.

Les résultats de cette mesure sont présentés dans le tableau suivant :

Concentration g/cm ³ .	d (cellule).	α (°).	$[\alpha]$
0.01	1.00 dm	-0.4	-40°.

4. Synthèse de dipeptide sur le BINOL chiral :

[1,1'-binaphtalène]-2,2'-diyl (2S,2S')-bis(2-((tert-butoxycarbonyl) amino)-3-méthylpentanoate



BINOL couplé avec le Boc-Ile-OH.

Formule brute : C₄₂H₅₂N₂O₈.

Masse molaire : 712.88 g/mol.

Point de fusion T_f (°C) : 148

Rapport frontal R_f : R_f = 0.2 (EtOAc/éther de pétrole (70% / 30%)).

¹H RMN 60 MHz (CDCl₃) : δ 7.31-8.23 ppm (m, nH (n=9H)), 10.20ppm (s,2H), 2.79-3.02 ppm (m, nH).

1) La synthèse du produit :

Deux solutions ont été préparées séparément et en même temps :

Dans un 1^{er} ballon muni d'un barreau magnétique, 1.76g du Boc-Ile-OH (7.60×10⁻³ mol) est dissous dans 35mL de DMF en présence de tamis moléculaire 4A activé. La solution est agitée pendant 30 min.

Dans le 2^{ème} ballon muni d'un 2^{ème} barreau magnétique, 0.5g de BINOL (1.74×10⁻³ mol) est dissous dans 15mL de DMF en présence de tamis moléculaire 4A activé. Le mélange est agité pendant 30 min.

Après que le temps désiré est passé la température est baissée à 0°C et 0.96mL de triéthylamine est ajouté au 1^{er} ballon à l'aide d'une seringue de 1.00mL. En gardant l'agitation, le deuxième mélange est ajouté au 1^{er} ballon et encore une fois la température est baissée à 0°C pour ajouter 0.48mL de triéthylamine à l'aide d'une seringue de 0.5mL. Le mélange est ensuite agité à température ambiante pendant deux heures [20]. Le mélange réactionnel est ensuite traité en ajoutant 20mL d'eau distillée ; on obtient une émulsion et pour séparer clairement les deux phases, une petite quantité de sel solide (NaCl) est ajoutée. La phase aqueuse est extraite 3 fois avec 25mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont combinées, rassemblées, lavées

pour une dernière fois avec une solution semi-saturée en NaCl et séchée sur MgSO₄ puis évaporée au rotavap pour obtenir le produit brut. Une mini chromatographie est réalisée en utilisant le gel de silice et un verre fritté pour obtenir le produit presque pur.

REFERENCES:

- [1] Hydrogels as Drug Delivery Systems: A Review of Current Characterization and Evaluation Techniques. Margaux Vigata, Christoph Meinert, Dietmar W. Hutmacher, and Nathalie Bock. *Pharmaceutics*. **2020** Dec; 12(12): 1188. Published online 2020 Dec 7. doi: 10.3390/pharmaceutics12121188.
- [2] Cosmeceuticals and peptides. Lijuan Zhang, Timothy J Falla. *Clinics in Dermatology*, **2009**; 27(5):485-94. doi: 10.1016/j.clindermatol.2009.05.013.
- [3] BINOL: A Versatile Chiral Reagent. Jean Michel Brunel. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 857-897. <https://doi.org/10.1021/cr040079g>.
- [4] A highly stereoselective synthesis of s(-)-[1,1'-binaphthalene]-2,2'-diol. Brussee J, Jansen AC *Tetrahedron Letters* **1983**, 24 (31): 3261–3262. doi:10.1016/S0040-4039(00)88151-4.
- [5] Peptide-Catalyzed Fragment Couplings that Form Axially Chiral Non-C2-Symmetric Biaryls. Gavin Coombs, Marcus H. Sak, Scott J. Miller. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2020** February 10; 59(7): 2875–2880. doi:10.1002/anie.201913563.
- [6] Conformational enantiodiscrimination for asymmetric construction of atropisomers. Shouyi Cen, Nini Huang, Dongsheng Lian, Ahui Shen, Mei-Xin Zhao, Zhipeng Zhang. *Nature Communications*, 12 Aout **2022**. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32432-8>.
- [7] Large Soluble Oligomers of Amyloid β -Protein from Alzheimer Brain Are Far Less Neuroactive than the Smaller Oligomers to Which They Dissociate. Yang, T.; Li, S.; Xu, H.; Walsh, D. M.; Selkoe, D. J. *J. Neurosci.* **2017**, 37, 152-163. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1698-16.2016>.
- [8] A Disulfide-Stabilized A β that Forms Dimers but Does Not Form Fibrils. Sheng Zhang, Stan Yoo, et al. *Biochemistry* **2022**, 61, 252-264. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00739>.
- [9] Design, characterization and evaluation of β -hairpin peptide hydrogels as a support for osteoblast cell growth and bovine lactoferrin delivery. Luis M. De Leon-Rodriguez, Young-Eun Park, et al. *RSC Adv.*, **2020**, 10, 18222. doi: 10.1039/d0ra03011b.
- [10] Peptide-Based Supramolecular Hydrogels as Drug Delivery Agents: Recent Advances. Carlos B. P. Oliveira, Valéria Gomes, et al. *Gels* **2022**, 8, 706. <https://doi.org/10.3390/gels8110706>.
- [11] Effect of Peptide and Guest Charge on the Structural, Mechanical and Release Properties of β -Sheet Forming Peptides. D. Roberts, C. Rochas, A. Saiani, et A. F. Miller. *Langmuir* **2012**, 28, 16196–16206. dx.doi.org/10.1021/la303328p.
- [12] Enhancing Peptide Biomaterials for Biofabrication. Kate Firipis, David R. Nisbet, et al. *Polymers* **2021**, 13,2590. <https://doi.org/10.3390/polym13162590>.

- [13] Tuning the pH Responsiveness of β -Hairpin Peptide Folding, Self-Assembly, and Hydrogel Material Formation. Karthikan Rajagopal, Matthew S. Lamm, et al. *Biomacromolecules* **2009**, 10, 2619–2625. doi: 10.1021/bm900544e.
- [14] Manipulations commentées de chimie organique. Jacques DROUIN **2005**. ISBN: 2-916346-01-5.
- [15] Asymmetric Polymerization of N-1-Anthrylmaleimide with Diethylzinc-Chiral Ligand Complexes and Optical Resolution Using the Polymer. Yukio Isobe, Kenjiro Onimura et al. January **2002**. DOI:10.1295/polymj.34.18
- [16] FACILE SYNTHESIS OF BINOL IN THE ABSENCE OF SOLVENT, *Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry*. Brian E. Love & Robert A. Bills (**2002**). 32:13, 2067-2073, DOI:10.1081/SCC-120004859.
- [17] *Organic Syntheses*. Dongwei Cai, David L. Hughes, Thomas R. Verhoeven, and Paul J. Reider. Coll. Vol. 10, p.93 (**2004**); Vol. 76, p.1 (**1999**). DOI:10.15227/orgsyn.076.0001
- [18] A HIGHLY STEREOSELECTIVE SYNTHESIS OF S(-)-[1,1'-BINAPHTHALENE]-2,2'-DIOL. Brussee" and A.C.A. Jansen. *Tetrahedron Letters*, Vol.24, No.31, pp 3261-3262, 1983.
- [19] Human carnitine biosynthesis proceeds via (2S,3S)-3-hydroxy-Nε-trimethyllysine. Robert K. Lesniak, Suzana Markolovic et al. **2016**. DOI: 10.1039/c6cc08381a
- [20] Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. Eric Valeur and Mark Bradley. **2008**. DOI: 10.1039/b701677h.