

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCCEN

Faculté des Sciences

Département de Chimie

Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et analyses

-COSNA-



# Mémoire

En vue de l'obtention du MASTER EN CHIMIE

Option : Chimie bio-organique et thérapeutique

## Thème

---

# Synthèse d'un *N*-aminooxy peptide cyclique

Présenté par: Kheira MEDJDOUB

Soutenu publiquement le 10 juin 2015 devant le jury composé de:

- |                                |                    |             |
|--------------------------------|--------------------|-------------|
| ▪ Mr Bachir MOSTEFA KARA       | Président          | UAB-Tlemcen |
| ▪ Mr Zoheir ARRAR              | Examinateur        | UAB-Tlemcen |
| ▪ Mme Wassila DRICI            | Examinatrice       | UAB-Tlemcen |
| ▪ Mme Latifa NEGADI            | Examinatrice       | UAB-Tlemcen |
| ▪ Mr Abdelmoumin MEZRAI        | Examinateur invité | UAB-Tlemcen |
| ▪ Mme Wafaa SEBAA, née LEMRINI | Examinatrice       | UAB-Tlemcen |
| ▪ Mr Djamel BENDIABDLLAH       | Examinateur        | UAB-Tlemcen |
| ▪ Mr Joseph KAJIMA MULENGI     | Encadreur          | UAB-Tlemcen |
| Superviseur scientifique       |                    |             |

ANNÉE UNIVERSITAIRE: 2014-2015

# **Dédicace**

*Je dédie ce travail*

*A mes parents,*

*A mes sœurs zineb, safia, fatima et à mon frère,*

*A ma famille,*

*A mes amis.*

# Remerciements

Les études ont été pour moi une grande étape dans ma vie auxquels j'ai eu la chance de me réaliser et de me surpasser en tant qu'étudiante, mais aussi en tant que personne. Ce parcours n'aurait pas été aussi formateur et agréable sans la présence de certaines personnes qui m'ont permis d'évoluer et de cheminer dans la bonne direction.

Je teins, tout d'abord, à remercier mon directeur de thèse le professeur J. KAJIMA MULENGI, directeur du laboratoire de chimie organique, substances naturelles et analyses COSNA de L'université Abou beker Belkaid Tlemcen. Je le remercie pour m'avoir permis de réaliser ce travail dans le laboratoire (COSNA) son soutien, sa confiance, ses conseils judicieux, pour la qualité de son encadrement, sa méthodologie et d'avoir mis à ma disposition tous les moyens.

J'exprime ma gratitude à Monsieur le Professeur B. Mostefa Kara pour avoir bien voulu me faire l'honneur de présider ce jury. Je remercie également Mme W. Drici, Mme A. Slimani Keniche, Mme L. Negadi, Mme W. Sebaa Lemrini, Mr Z. Arrar, Mr A. Mezrai, Mr D. Bendiabdllah pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie DGRS-DT et toute l'équipe de Laboratoire COSNA Mlles A. Amouri, S. Benyamina, F. Benyoucef, W. Bouazzaoui, F. Benattia doctorantes en chimie pour leurs aides et leurs disponibilités lors de mes différents séjours au sien du laboratoire. Je remercie Mr H. Benariba, pour les spectres infrarouges.

Merci à toutes les personnes qui j'ai passé ces dernières années au sien de l'UABT: Nadjet CHIBI, Hannane FERDJI, Nadia ATMANI, Wassila BELKAID, Nawel BOURSALI, Hafsa GHAFfour, Douniazed HADJ KADDOUR, Imène LAZOUNI, Ibtissem MALTI, Imène Riheb MAMI, Nadjija MERAD, H. SARI, M. E. SISAID, M. A. TALEB BENDIAB.

# Abréviations

## Acides aminés:

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

## Peptides:

ADN:	Acide DésoxyriboNucléique
ARN:	Acide RiboNucléique
CPP:	Cell Penetrating Peptide
HSV:	Herpes Simplex Virus
Gp41:	Glycoprotéine 41
GABA:	Acide $\gamma$ aminobutyrique
NLS:	Nuclear Localization Sequence
ODN:	Oligonucléotide
PNA:	Peptide Nucleic Acid
siRNA:	small interfering RNA
Tat:	Transcription-Transactivating
SV40:	Simian Virus 40
VIH:	Virus de l'Immunodéficiência Hummaine
VP-22:	Virus Protéin-22

## Groupes protecteurs:

Al :	Allyle
Alloc:	Allyloxy-carbonyle
Boc:	t-butoxy-carbonyle
Fm:	9-Fluorenylméthyle
Fmoc:	Fluorénylméthoxy-carboyle
Ft:	groupe phtalimido
Pac:	Phénacyle

ivDde: 1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)-3-methylbutyle  
tBu: t-butyle  
Trt: Trityle

### Réactifs:

Aoc: Acide aminooxy acétique  
DBU: 1,8-Diazabicyclo-[5.4.0] undec-7-ène  
DCC: *N, N'*-Dicyclohexylcarbodiimide  
DCI: Diimidazol  
DCU: Dicyclohexylurée  
DEA: Diethylamine  
DMAP: 4-Diméthylaminopyridine  
DIC: *N, N'*-Diisopropylcarbodiimide  
DIEA: *N*-Diisopropyl-éthylamine  
EDT: 1,2-Ethanedithiole  
HOBt: *N*-Hydroxybenzotriazole  
HSTBA: Hydrogénosulfate de tétrabutylammonium  
i-Pr<sub>2</sub>NEt: Diisopropyléthylamine  
ITBA: Iodure de tétrabutylammonium  
PcpOH: Pentachlorophénol  
Phth-OH: *N*-Hydroxyphtalimide  
TFA: Acide trifluoroacétique  
TMS-Cl: Trimethylsilyl chloride

### Solvants:

DMF: *N,N*-Diméthylformamide  
DCM: Dichlorométhane  
THF: Tétrahydrofurane  
TFE: 2, 2, 2-Tifluoroéthanol

# Tables des matières

I-REMERCIEMENTS.....	II
II-ABREVIATIONS.....	III
III-TABLE DES MATIERES.....	V
IV-PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	1
1-Introduction.....	2
2-La Trisomie 21.....	2
2-a-Caractéristiques cliniques.....	3
2-b-Prise en charge.....	3
2-c-Dépistage de la trisomie 21.....	4
3-Intérêt thérapeutique des peptides.....	4
3-a-Les vecteurs peptidiques.....	6
3-b-Interaction des peptides avec les membranes.....	9
4-Les peptides.....	10
4-a-Les peptides cycliques.....	10
4-b-Réactivité de l'aminooxy peptide.....	11
4-c-Synthèse sur support solide.....	13
4-d-Méthode de cyclisation de peptides.....	13
4-e-Exemples de synthèse.....	14
5-Objectif de ce travail.....	17
V-TRAVAIL EFFECTUÉ.....	20
1-Généralité.....	21
2-Protection du carboxyle des aminoacides.....	22
3-Protection de la fonction amine des aminoacides.....	24
4-Protection effectué.....	26
5-La réaction de transfert de phase.....	28
6-Réaction effectuée.....	29
7-Couplage peptidique.....	30
8-Le couplage effectué.....	33
VI-CONCLUSION ET PERSPECTIVE.....	36
VII-PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	38
VIII- RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHYQUES.....	47

---

# **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

## 1-Introduction

Ce travail consiste à synthétiser un peptidomimétique cyclique qui contient un fragment aminooxy inhibiteur du GABA (acide  $\gamma$  aminobutyrique) responsable de l'anomalie chromosomique de la trisomie 21.

De plus en plus d'entreprises pharmaceutiques tentent de contrecarrer la pénurie en médicaments en utilisant des peptides comme agents thérapeutiques, il s'agit donc d'un domaine qui mérite l'attention des chercheurs ces dernières années<sup>(1)</sup>. Dans une chaîne polypeptidique, la séquence des aminoacides détermine la formation de leur structure tridimensionnelle<sup>(2)</sup>. Aussi, la cyclisation des peptides est un outil efficace pour améliorer la stabilité chimique, enzymatique et conformationnelle de ces composés<sup>(3)</sup>.

Les peptides présentent nombre avantages par rapport aux petites molécules, toutefois leur utilisation pharmaceutique se heurte à certaines limites notamment leur faible capacité à traverser les barrières membranaires, ainsi que leur faible durée de demi de vie<sup>(4)</sup>. Des solutions peuvent être apportées pour surmonter ces problèmes: la modification du squelette de base (pseudopeptides)<sup>(5)</sup>, ou fixation d'un sucre (glycopeptides)<sup>(6)</sup>, d'acide gras, polyéthylène<sup>(1)</sup>.

Les CPPs (Cell Penetrating peptide) sont des peptides qui peuvent pénétrer dans les cellules et permettre ainsi la libération de molécules biologiquement actives dans les cellules<sup>(7)</sup>.

Récemment il a été mis en évidence que les pseudopeptides portant une chaîne latérale dérivée de l'acide aminooxyacétique pouvaient transférer l'ADN dans les cellules, ce qui permettrait leur usage comme vecteurs de gènes<sup>(8)</sup>.

## 2-La Trisomie 21

La trisomie 21, ou syndrome de Down, connue sous le nom de mongolisme, est une anomalie chromosomique définie par la présence d'un troisième exemplaire du chromosome 21. Ce chromosome supplémentaire est à l'origine d'un excès de matériel génétique responsable d'une surexpression génique<sup>(9, 10,11)</sup>.



## **a-Caractéristiques cliniques**

Les patients porteurs de Trisomie 21 présentent un large spectre de symptômes cliniques atteignant tous les systèmes tant au niveau structural que fonctionnel <sup>(9,10)</sup>. L'hypotonie musculaire est un signe constant dans la trisomie 21, elle est présente dès la naissance et elle est responsable de trouble de la déglutition, de la phonation et de la dentition; elle favorise les infections de la sphère ORL(oto-rhino-laryngologique) et respiratoire ainsi que les apnées obstructives du sommeil, elle a également des conséquences à court terme sur le développement psychomoteur et peut avoir à long terme un retentissement orthopédique (affaissement de la voûte plantaire, luxation de rotule, scoliose...); elle favorise également sur le plan digestif la constipation et le reflux gastro-œsophagien <sup>(9, 13)</sup>.

Les caractéristiques morphologiques concernent principalement l'aspect du crâne, du visage et des extrémités. Au niveau crânéo-facial, le cou est court et large avec un excès de peau et la nuque plate avec une implantation basse des cheveux, le crâne est petit et l'occiput plat (brachycéphalie). Le visage est rond et plat (faciès lunaire) <sup>(9, 10, 12)</sup>.

## **b-Prise en charge**

Actuellement, il n'existe pas de traitement spécifique de la trisomie 21. Un suivi médical adapté contribue néanmoins à améliorer la qualité de vie des personnes trisomiques 21. Le médecin doit se montrer particulièrement attentif à certaines particularités liées à la trisomie 21. Une modification du caractère, l'apparition de troubles du comportement, un syndrome dépressif, une régression peuvent être des modes d'expression d'un mal être en lien avec une pathologie, une douleur ou une difficulté affective ou sociale. Cette prise en charge devra être poursuivie pendant l'enfance et l'adolescence, et même à l'âge adulte pour maintenir les acquis <sup>(9)</sup>.

### **c-Dépistage de la trisomie 21**

On entend par dépistage, l'identification d'un problème de santé chez des individus apparemment en bonne santé. Il fait référence aux tests effectués chez les femmes enceintes afin de détecter celles qui ont un risque élevé de porter un enfant atteint de trisomie 21<sup>(11, 12, 14)</sup>. Le principe du dépistage de la trisomie 21 fœtale par les marqueurs sériques maternels repose sur le calcul d'un risque individuel de trisomie 21 obtenu en pondérant le risque lié à l'âge maternel par un facteur de correction lié aux valeurs des concentrations de molécules dosées dans le sérum maternel<sup>(12,14)</sup>.

### **3-Intérêt thérapeutique des peptides**

Les peptides trouvent de nombreuses applications dans le domaine biotechnologie, parmi lesquels des applications pharmaceutiques.

#### Avantage des peptides:

Parmi ces avantages, on peut citer le fait que les peptides thérapeutiques sont souvent la plus petite partie fonctionnelle d'une protéine et offrent donc une efficacité, une sélectivité et une spécificité qu'il est difficile d'atteindre avec des petites molécules<sup>(15)</sup>. Deuxièmement les produits de dégradation des peptides sont des acides aminés, ce qui diminue grandement les risques de toxicité. Troisièmement les peptides s'accumulent peu dans les tissus, diminuant d'autant les risques de toxicité. De plus ils offrent une diversité structurale supérieure aux petites molécules. Enfin, et ce n'est pas négligeable pour le secteur du médicament, les peptides médicaments présentent plusieurs possibilités de synthèse si bien qu'il y a peu de risques qu'ils soient déjà protégés par un brevet<sup>(16,17)</sup>.

#### Inconvénients des peptides:

Si les peptides présentent des avantages, leur conception pour une utilisation thérapeutique se heurte à de nombreux écueils. Un des problèmes est le coût de

production à l'échelle industrielle que ce soit par des méthodes chimiques ou biologiques<sup>(18)</sup>.

Ensuite, la fameuse règle des cinq, qui reste une référence pour les modélisateurs de molécules thérapeutiques, n'est pas respectée pour les peptides, notamment pour ce qui concerne le poids moléculaire. A ce titre on considère que les peptides sont peu administrables par voie orale car ils seraient peu enclins à passer du système digestif vers le système sanguin.

C'est la raison pour laquelle l'administration des peptides est à ce jour principalement de type intraveineuse, ce qui n'est pas particulièrement confortable pour le patient. Toutefois plusieurs stratégies alternatives de délivrance ont été développées ces dernières années<sup>(19)</sup>. C'est le cas par exemple de l'administration par les muqueuses que ce soit par voie nasale ou pulmonaire. D'autres techniques telles que celles mettant en œuvre des injecteurs à haute pression permettant au peptide de traverser la peau sans utilisation d'aiguilles ont également été développées<sup>(20, 21)</sup>.

Un second aspect négatif des peptides thérapeutiques réside dans le fait qu'ils sont très rapidement dégradés et que leur durée de vie dans l'organisme humain est de l'ordre de quelques minutes, ce qui est largement insuffisant pour atteindre la cible et agir de façon optimale<sup>(18)</sup>. La plupart du temps cette dégradation est due aux protéases ou peptidases principalement localisées dans le sang, le foie ou encore les reins<sup>(22)</sup>.

Différents moyens ont été imaginés pour contrecarrer cette action enzymatique. Au nombre de ceux-ci on retrouve les C-amidations et les N-acétylations pour empêcher l'action des exopeptidases ainsi que l'utilisation d'acides aminés D,  $\beta$  ou non naturels, moins sensibles à la dégradation enzymatique. Les cyclisations au travers de ligations Nter-Cter, d'anneaux lactames ou de ponts disulfures sont également proposées<sup>(18, 22)</sup>.

Enfin, d'autres modifications chimiques des peptides telles que la liaison d'acides gras ou la pegylation (liaison d'unités de polyéthylène glycol) ont pour but d'en augmenter le poids moléculaire et donc le temps de demi-vie. Ces molécules ont

des propriétés intéressantes pour des applications pharmaceutiques car elles sont solubles, non toxiques, peu immunogènes et sont facilement éliminées par l'organisme. Elles conservent ces propriétés lorsqu'elles sont associées au peptide d'intérêt.

Finalement la co-administration d'un peptide avec des inhibiteurs d'enzyme est également une voie qui a été explorée. Par ailleurs il a été montré qu'un peptide peut conserver sa fonction lorsqu'il est partiellement composé d'acides aminés non naturels et qu'il est possible de modéliser des peptides non naturels présentant une fonction ou un comportement donné.

En conclusion, au vu des moyens investis dans la recherche peptidique par les entreprises pharmaceutiques, il va sans dire que cette nouvelle voie thérapeutique est considérée comme hautement prometteuse<sup>(22)</sup>.

### **a-Les vecteurs peptidiques**

Il existe majoritairement trois grandes familles de vecteurs cellulaires: les vecteurs viraux, les systèmes lipidiques et les peptides ou protéines de translocation. A l'origine, ces systèmes ont été particulièrement développés pour les applications de thérapie génique. Aujourd'hui, leur utilisation se généralise à toutes les stratégies nécessitant une entrée cellulaire<sup>(23)</sup>.

Les CPPs (Cell Penetrating Peptides) constituent un outil prometteur pour la libération de molécules biologiquement actives dans les cellules et pourraient donc jouer un rôle dans le traitement futur de certaines maladies. Les CPPs sont généralement des peptides de moins de 30 acides aminés, dérivant de protéines naturelles ou non, ou de séquences chimériques. Ils ont été découverts dans les années 1980 sur l'observation que certaines protéines étaient capables de traverser les membranes des cellules eucaryotes<sup>(24, 25)</sup>.

Les CPPs sont aussi capables d'améliorer la libération intracellulaire, *in vitro* et *in vivo*, de biomolécules aussi différentes que des plasmides, des oligonucléotides, des siRNA (small interfering RNA), des PNA (peptide nucleic acid), des protéines,

des peptides, mais aussi des liposomes ou des nanoparticules. Les petits CPPs synthétiques ont été conçus pour déclencher le passage à travers la membrane cellulaire des cargos (petites molécules, nanoparticules ou brin d'ADN) dans le cytoplasme et pour améliorer leur trafic intracellulaire, facilitant ainsi l'accès à leur cible<sup>(24)</sup>.

Deux stratégies ont été décrites : la liaison covalente du cargo au CPP, et la formation d'un complexe non covalent entre le cargo et le CPP. Les CPPs covalents (Tat, VP-22,...) permettent d'améliorer la libération de peptides et de protéines dans les cellules.

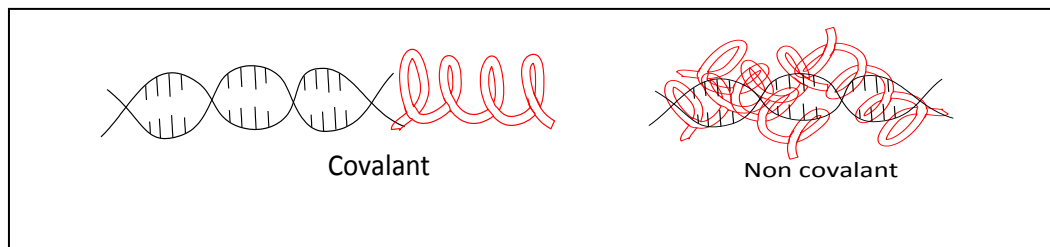


Figure 1: Représentation de Liaison entre CPP et cargo.

Peptides	Origine	Séquence	Types de cargo
Peptides dérivant de domaines de transduction de protéines			
Tat	Protéines Tat de VIH	PGRKKRRQRRPPQ	Protéines/peptides/ siRNA/liposome/ nanopaticule
VP-22	Protéines structurale de HSV-1	DAATATRGRSAASRP TER PRAPAR- SASRPRRPVD	Protéines
Peptides amphipatiques			
MPG	HIV Gp41-SV40 NLS	GALFLGFLGAAGSTM GA WSQPKKKRKV	siPNA/ODN/ Plasmide
Pep-1	Trp-rich motif-SV40 NLS	KETWWETWWTEXSQ P	Protéines/peptides

		KKKRKV	
MAP	Chimérique	KALAKALAKALA	Petite molécules: Plasmid

Tableau 1: Récapitulatif des CPPs.

La conjugaison du peptide au CPP apporte divers avantages pour les applications *in vivo*, comme la rationalisation et le contrôle du CPP-cargo. Cependant, les CPPs covalents sont limités d'un point de vue chimique et peuvent altérer les propriétés biologiques des cargos. L'alternative est l'utilisation de vecteurs peptidiques amphipathiques, tels que le MPG et Pep-1.

Ces domaines hydrophiles et hydrophobes sont nécessaires pour les interactions avec les acides aminés et les acides nucléiques, le transport intracellulaire du cargo et la solubilité du peptide vecteur. Pour ces deux peptides, il y a une flexibilité entre les deux domaines. Ces peptides forment des nanoparticules stables avec les cargos, sans réticulation ni modifications chimiques.

Du fait de leurs compositions respectives, le MPG est utilisé pour la vectorisation d'acides nucléiques (ADN plasmidique, oligonucléotides, siRNA), alors que Pep-1 est plus adapté pour la vectorisation de peptides et de protéines. Ils libèrent des molécules biologiques actives dans diverses lignées cellulaires *in vitro* mais sont également fonctionnels *in vivo* <sup>(26, 27)</sup>.

Cette stratégie présente de nombreux avantages, comme une libération rapide et efficace des cargos dans les cellules, une stabilité dans des conditions physiologiques et une absence de toxicité. De plus, l'absence de lien covalent entre le CPP et le cargo favorise la libération de celui-ci et son circulation intracellulaire. Ainsi, les CPPs non covalents constituent une excellente alternative aux stratégies covalentes et seront des outils essentiels pour l'utilisation thérapeutique des siARN, des protéines et de peptides. Ils constituent également de puissants outils pour la recherche fondamentale et pour le ciblage spécifique d'événements cellulaires à la fois *in vitro* et *in vivo*, ainsi que pour la découverte de nouvelles molécules

thérapeutiques. De plus, leur fonctionnalisation sera d'un intérêt majeur pour un ciblage rationnel et l'application systémique de molécules thérapeutiques *in vivo*<sup>(28)</sup>.

### **b-Interaction des peptides avec les membranes**

En fonction de leur composition en acides aminés, les peptides auront tendance soit à se situer en dehors des membranes, soit à interagir avec elles en adoptant une position particulière dans la membrane.

Les peptides dont la surface accessible au solvant est hydrophile resteront hors de la membrane et préféreront interagir avec l'eau, tandis que les peptides dont la surface accessible au solvant est hydrophobe auront tendance à s'enfouir dans le cœur hydrophobe des membranes constitué par les chaînes acylés des phospholipides. Les peptides amphiphiles quant à eux s'orienteront à l'interface hydrophile/hydrophobe de la membrane de manière à faire pointer les résidus polaires vers les têtes polaires des phospholipides et les résidus apolaires vers le cœur hydrophobe de la membrane<sup>(29)</sup>.

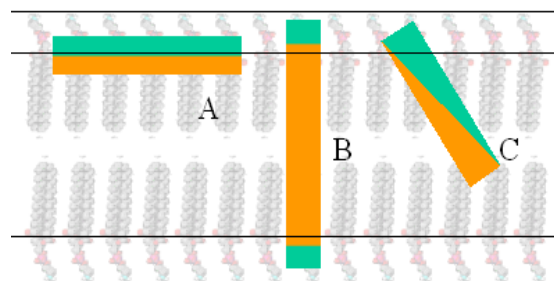


Figure 2 : Insertion membranaire des peptides amphipatiques (A), transmembranaires (B) et obliques (C)<sup>(1)</sup>.

Jusqu'il y a une vingtaine d'années, seuls deux types d'interactions peptide/membrane étaient décrits (amphipatiques et adsorbés à la surface membranaire, complètement hydrophobes et enchâssés dans le cœur de la membrane). En 1988, une étude des propriétés hydrophobes de la partie N terminale de la protéine d'enveloppe de NDV (Newcastle Disease Virus), a révélé l'existence d'un troisième type d'interaction membrane/peptide<sup>(29)</sup>.

Ces peptides particuliers sont amphipatiques et présentent une distribution asymétrique de leur hydrophobicité lorsqu'ils sont sous forme hélicoïdale. Ce gradient d'hydrophobicité explique l'insertion particulière, oblique par rapport à la normale à la membrane, de ces peptides dit « obliques ». Ils ont en général une longueur de 11 à 20 résidus, et ont une hydrophobicité moyenne de 0,2 à 0,9 sur l'échelle d'Eisenberg. L'orientation particulière des peptides obliques dans les membranes (entre 30° et 60°) induit une déstabilisation de l'organisation des phospholipides qui mène généralement au phénomène de fusion membranaire, raison pour laquelle ces peptides ont également reçu le vocable de "peptides de fusion".

A ce jour des peptides obliques ont été détectés dans nombre de protéines impliquées dans des processus pathogènes tant viraux tels que le SIV le HIV, que liés à des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer mais aussi dans des processus physiologiques normaux tels que la fécondation ou l'action des lipases (30, 31).

#### **4-Les peptides**

Les peptides comme les protéines sont constitués d'acides aminés, liés entre eux par des liaisons peptidiques. On considère généralement, même si cette distinction est subjective que l'on a à faire à un peptide en dessous de 50 résidus, au-delà de cette limite on parlera de protéine<sup>1</sup>. La chaîne polypeptidique se présente comme une succession de plans contenant des unités peptidiques-C $\alpha$ -CO-NH-C $\alpha$ - qui crée une chaîne principale d'où se projettent les chaînes latérales<sup>(1,2)</sup>.

##### **a-Les peptides cycliques**

La cyclisation de peptides est une stratégie très souvent utilisée pour diminuer la flexibilité conformationnelle d'une molécule et augmenter sa stabilité ainsi que son efficacité, sa sélectivité, sa biodisponibilité et perméabilité à travers les membranes biologique, afin d'avoir des ligands présentant une haute affinité et bonne spécificité. La contrainte conformationnelle résultant de la cyclisation des peptides est un moyen employé par la nature pour augmenter la probabilité d'une bonne affinité avec un



biorécepteur, ce qui a été démontré par un certain nombre de chercheurs depuis quelques années <sup>(32)</sup>.

Les peptides riches en cystéine sont stabilisés par un ou plusieurs ponts disulfures intramoléculaires. C'est un groupe très diversifié et le nombre de ponts disulfure conditionnent leur structure et leur activité : ces ponts disulfure peuvent être entre des feuillets  $\beta$  (ex. des  $\alpha$ -défensines), entre des structures mixtes  $\alpha$  et  $\beta$  aussi appelées « open-ended » (ex. de la drosomycine), ou encore en épingle à cheveux (« hairpin-like ») <sup>(33,34)</sup>.

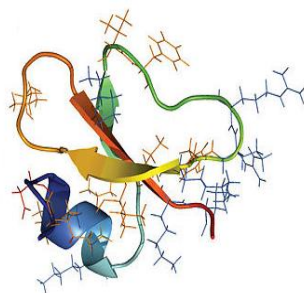
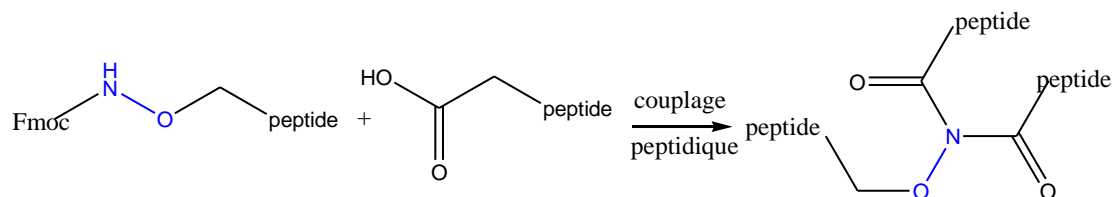


Figure 3: La  $\alpha$ -défensine <sup>(34)</sup>.

### b-Réactivité du peptide aminooxy

L'effet de l'atome d'oxygène en  $\alpha$  affecte le caractère nucléophile de l'azote adjacent et augmente considérablement le caractère acide du groupe aminooxy ( $pK_a = 4,6$ ), le rendant ainsi très sensible à l'acylation durant son couplage en stratégie Fmoc/*t*Bu. De ce fait, des phénomènes de bis-acylation ont pu être observés lorsque l'azote de l'aminoxy est mono protégé. Cette réaction secondaire peut être supprimée par l'utilisation de dérivés doublement protégés (Bis-Boc, phthaloyle) ou possédant un groupement protecteur encombré (Trt) <sup>(35, 36)</sup>.



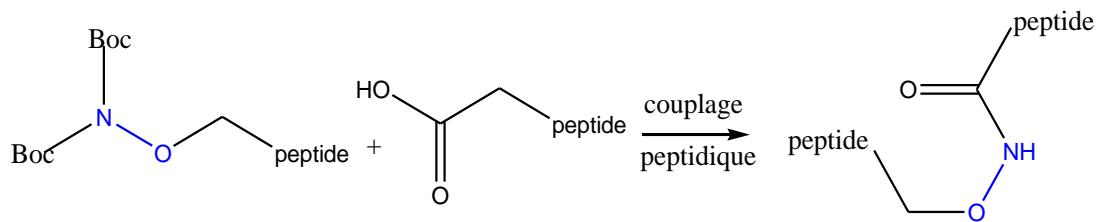


Schéma 1: Acylation de l'aminooxy peptide

La réaction d'oximation entre le groupe aminooxy et les carbonyles présente l'avantage de ne pas utiliser un catalyseur. Ainsi, la fonction aminooxy réagit chimiosélectivement avec le carbonyle d'un aldéhyde ou d'une cétone à température ambiante, dans plusieurs solvant y compris l'eau. L'oxime résultant résiste à l'hydrolyse. Le tableau suivant montre la différence entre le groupe aminooxy et l'amine primaire<sup>(37)</sup>.

Aminooxy	Amine primaire
$\text{R-O-NH}_2 \xrightleftharpoons{\text{H}^+} \text{R-O-NH}_3^+$ <p style="text-align: center;">pKa=5-6</p>	$\text{R-NH}_2 \xrightleftharpoons{\text{H}^+} \text{R-NH}_3^+$ <p style="text-align: center;">pKa=9-10</p>
<p>A température ambiante, l'aminooxy réagit chimiosélectivement avec l'aldéhyde et une cétone pour donner E/Z éther oxime</p>	<p>A température ambiante, l'amine primaire réagit avec les carbonyles pour former une imine, elle réagit avec un ester pour former un amide secondaire.</p>
<p>La liaison éther oxime est rigide, elle résiste à l'hydrolyse par l'eau.</p>	<p>La liaison imine est réversible et peut être hydrolysée par l'eau.</p>

Tableau 2: Comparaison entre aminooxy et l'amine primaire<sup>(37)</sup>.

### c-Synthèse sur support solide

Actuellement, La chimie des peptides comporte différentes techniques et procédures qui permettent la préparation de matériaux allant des petits peptides aux protéines de masses molaires élevées. La figure représentée ci-dessous, décrit le principe de la synthèse sur support solide.

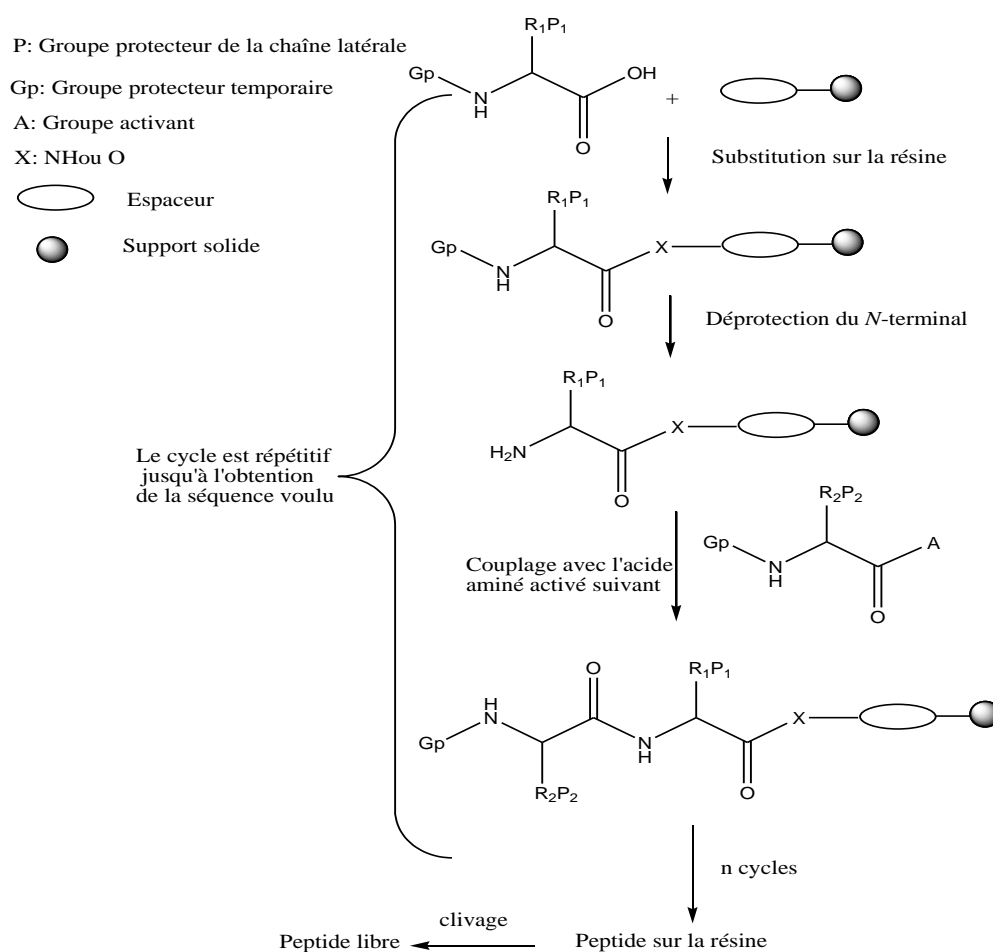


Schéma 2: Principe de synthèse sur support solide<sup>(38, 39)</sup>.

### d-Méthode de cyclisation de peptides

Il existe plusieurs combinaisons, les cyclisations tête-à-queue et chaîne latérale à chaîne latérale sont les exemples les plus connus pour former un macrocycle peptidique.

Les méthodes spécifiques permettant d'effectuer la macrocyclisation d'une séquence peptidique, varient la plupart du temps par les réactifs employés et les groupes protecteurs<sup>(40)</sup>.

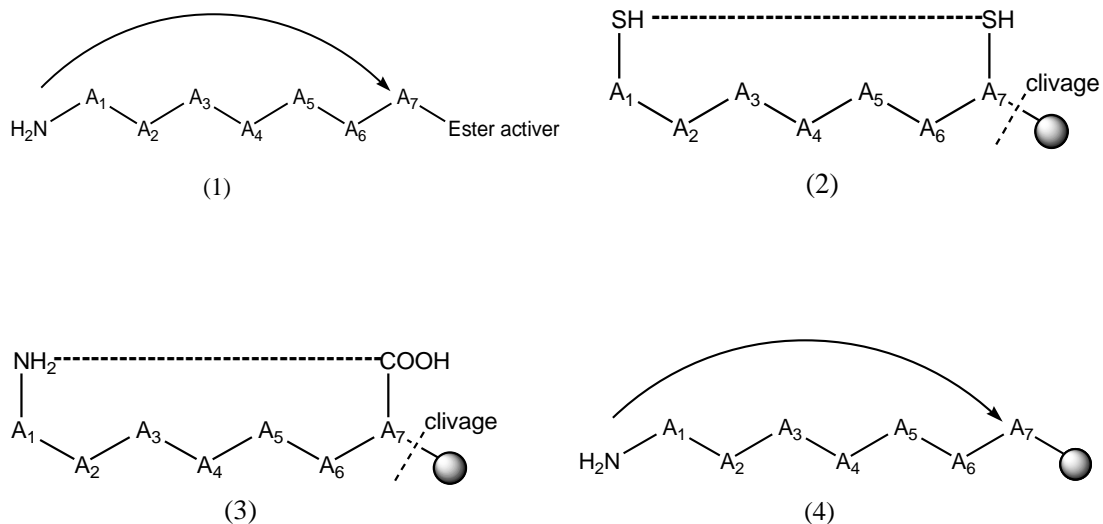


Schéma 3: Représentation des méthodes de cyclisation de peptides.

-La première méthode est la cyclisation intramoléculaire en solution très diluée pour éviter la polymérisation.

-La deuxième méthode est la formation de pont disulfure entre deux résidus cystéines de la chaîne peptidique sur support solide, et enfin on libère le peptide.

- Une autre méthode de cyclisation sur support solide consiste à établir un lien amide dans les conditions de couplage entre une lysine et un acide glutamique.

-la quatrième méthode, on utilise l'amine du N-terminal, en condition nucléophile, pour effectuer une réaction de cyclisation et clivage et former le peptide cyclique<sup>(41, 42)</sup>.

### e-Exemples de synthèse

- **Synthèse d'un pseudopeptide portant un motif aminooxy**

L'acide phthalimidooxy acétique (2) qui est formé à partir de l'ester tertiobutylique (1) par élimination du t-Bu par le TFA, a été couplé avec l'ester tertiobutylique de l'acide aminooxy acétique (3) en présence des agents de couplage

suivants: DIC, DIC-HOBt, DMAP. Il a été constaté que certains agents conduisent à un bon rendement comme DIC-HOBt alors les autres ne réagissent pas ou conduisent à de faibles rendements.

Le produit résultant a été alkylé dans PPh<sub>3</sub>, DIAD et alcool allylique pour former le dimère **(4)** *N*-alkyle avec 45% de rendement. La deuxième étape qui comprend l'élongation de la chaîne, la déprotection, le couplage et la *N*-alkylation recourt à l'utilisation de l'alcool benzylique pour donner le trimère **(5)** avec 25% de rendement. On utilise TFA et hydrazine pour la déprotection, la cyclisation tête-à-queue est réalisée par DCI<sup>(43)</sup>.

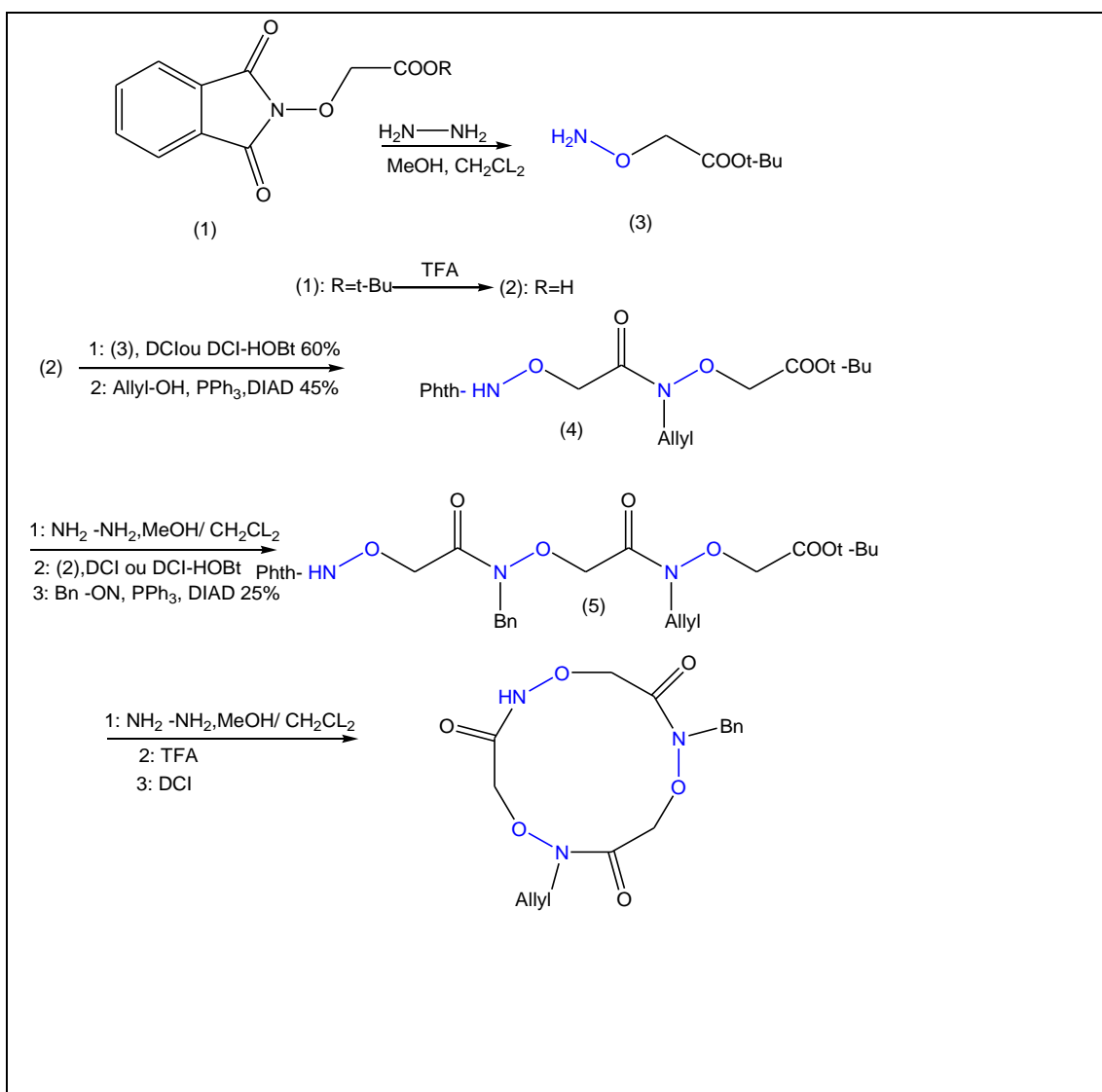


Schéma 4: Synthèse de pseudopeptide cyclique<sup>(43)</sup>.

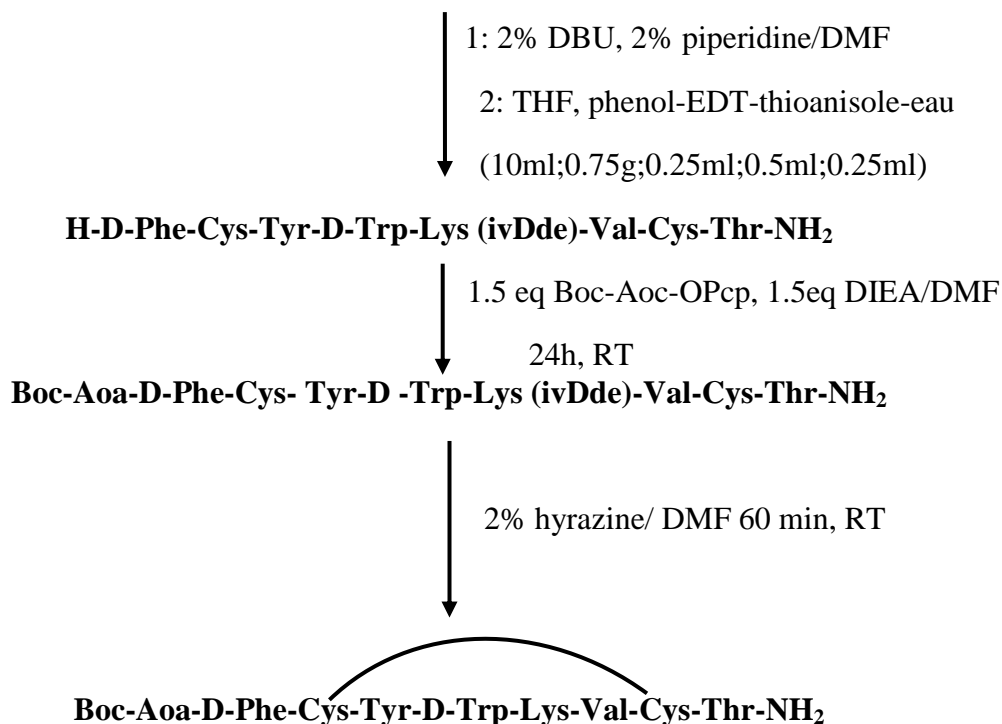
- **Synthèse de H-Aoa-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH<sub>2</sub>**

La synthèse de Boc-Aoa-OPcp a été effectuée en utilisant DCC comme agent de couplage entre l'acide aminooxy acétique Aoa protégé par Boc et pentachlorophénol HOPcpOH dans l'acétate d'éthyle avec un rendement de 72%, le point de fusion est de 165°-166°C.

La séquence linéaire des aminoacides suivant: phénylalanine, cystéine, tyrosine, tryptophane, lysine, valine, thréonine. (H- D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys (ivDde)-Val-Thr-NH) était synthétisée sur la résine Rink-Amide MBHA par la stratégie Fmoc/t-Bu pour la protection des acides aminés, en suite le couplage entre les aminoacides et le peptide est clivé de la résine. A la fin la déprotection de toute la chaîne peptidique sauf l'ivDpe de Lys.

La liaison entre Boc-Aoa-OPcp et la séquence linéaire est réalisée dans le DMF et DIEA. En suite la déprotection de Lys on utilise l'hydrazine dans le DMF, non seulement la déprotection de viDde aussi la formation de pont disulfure été réalisées, le rendement est de 47%. Finalement pour la déprotection de l'acide aminooxy acétique on utilise TFA et de l'eau. Le mélange de peptide cyclique et Aoc est précipité avec l'éther diethyle<sup>(44)</sup>.

**Fmoc-D-Phe-Cys(Trt)-Tyr(t-Bu)-D-Trp-lys (ivDde)-Val-Cys(Trt)-Thr(t-Bu)-**



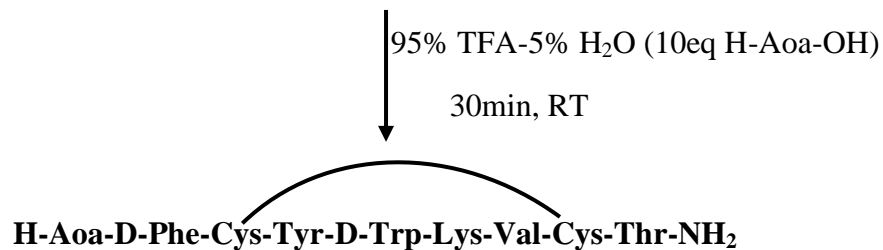


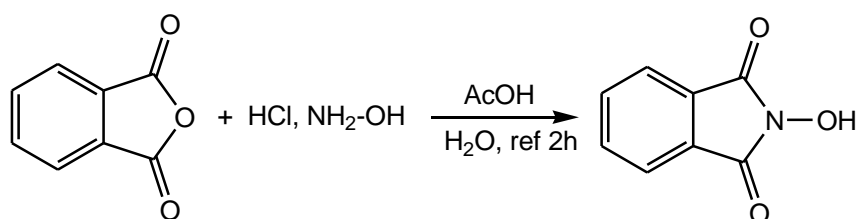
Schéma 5: Synthèse de H-Aoa-D-Phe-c [Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH<sub>2</sub> <sup>(44)</sup>.

### 5-Objectif de ce travail

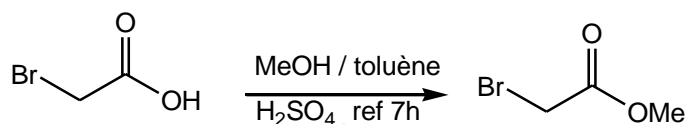
La synthèse des peptides est un domaine de recherche plus large dont de nombreux travaux ont été réalisés, spécialement en chimie organique. L'objectif de cette étude est de synthétiser un aminoxy peptide cyclique dérivés de l'acide aminoxyacétique possèdent des activités biologiques.

L'acide aminoxyacétique est un inhibiteur de l'enzyme de la trisomie 21 qui est appelée mongolisme, aussi il est un inhibiteur du GABA (acide  $\gamma$  aminobutrique). Notre but s'intéresse à la synthétiser d'un peptide cyclique contenant ce fragment aminoxy à partir de l'hydroxylamine comme produit de départ, selon les étapes suivant:

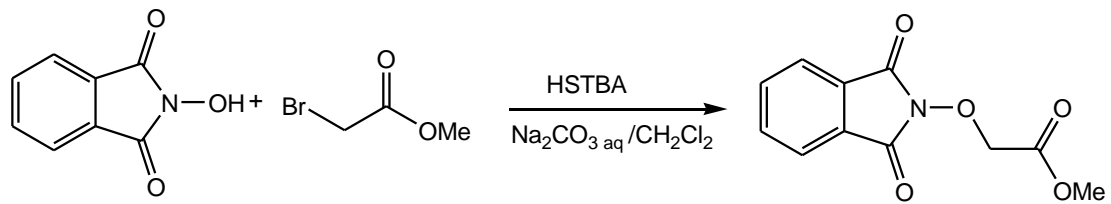
#### 1-Synthèse du *N*-hydroxylphtalimide



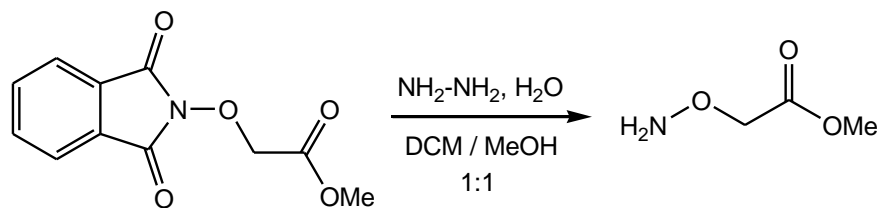
#### 2- Estérification de l'acide bromoacétique



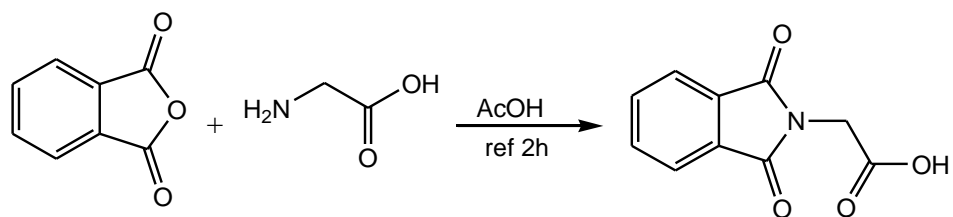
### 3-Synthèse de *N*-phtalimidooxyacétate de méthyle par réaction de transfert de phase



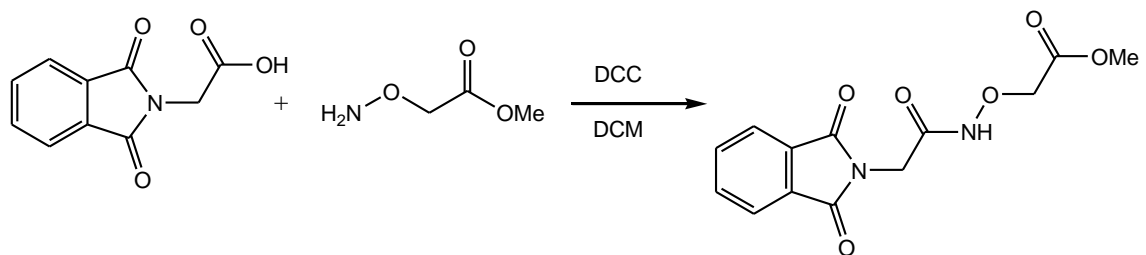
### 4- Hydrolyse du phtaloyle



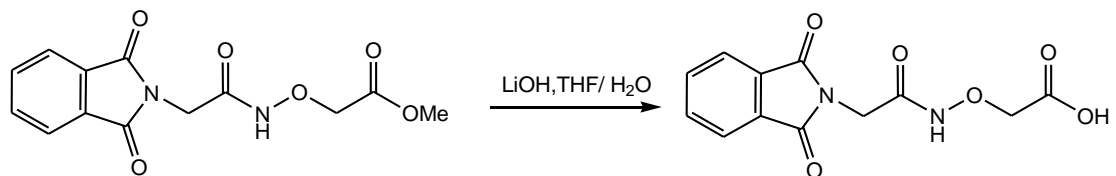
### 5- Protection de la glycine



### 6- Synthèse de dipeptide de l'ester aminoxy acétate de méthyle

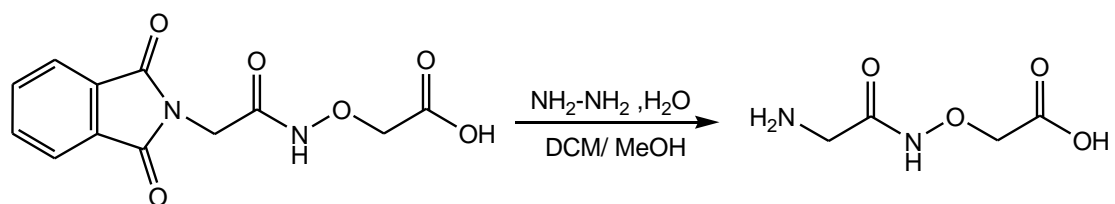


### 7- Hydrolyse de l'ester





### 8- Hydrolyse du phtaloyle



### 9- La cyclisation tête-à-queue



---

# **TRAVAIL EFFECTUÉ**

---

## 1-Généralités:

La synthèse des peptides reste toujours d'actualité, par ce qu'elle comprend des sujets de plusieurs recherches développés pour l'élaboration de la majorité des médicaments peptidiques. Deux méthodes chimiques principales en synthèse peptidique sont connues: synthèse en solution (SPS), et synthèse en phase solide (SPPS) <sup>(45)</sup>.

Au cours de ces dernières années, plus de 250 groupes protecteurs ont été proposés pour la synthèse des peptides ; cependant, un petit nombre de ceux proposés et qui sont réellement utilisés en raison de leur non sélectivité vis-à-vis d'autres fonctionnalités <sup>(46)</sup>.

Le but d'une protection est de préserver une fonction intacte, tout en faisant de nombreuses réactions sur les autres fonctions qui ne sont pas protégées. Puis, une ultime étape de déprotection est envisagée pour récupérer la fonction libre.

Le choix d'un groupe protecteur est une étape délicate. Il faut que le groupement choisi soit relativement stable et qui ne se déprotège pas de façon inattendue; il ne doit pas introduire de nouveau(x) centre(s) asymétrique(s) ; il doit être aussi disponible, peu toxique, et nécessiter des réactions de protection et déprotection faciles à mettre en œuvre. Les groupements protecteurs sont notés "P" ou "GP" <sup>(47)</sup>.

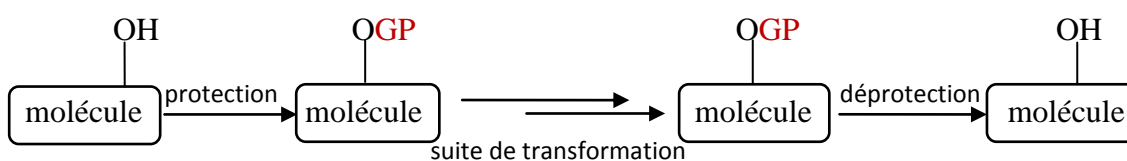


Schéma 1: Représentation de protection et déprotection d'une molécule.

## 2-Protection de la fonction acide carboxylique:

La protection des acides carboxyliques se fait généralement sous forme d'un ester, mais il y a plusieurs types d'esters et les plus utilisés sont:

- **L'ester tertiobutylique:**

C'est l'un des esters les plus utilisés dans la chimie des peptides, dans la mesure où il peut être facilement éliminé par l'acide trifluoroacétique (TFA) <sup>(48,49)</sup>.

Protection:

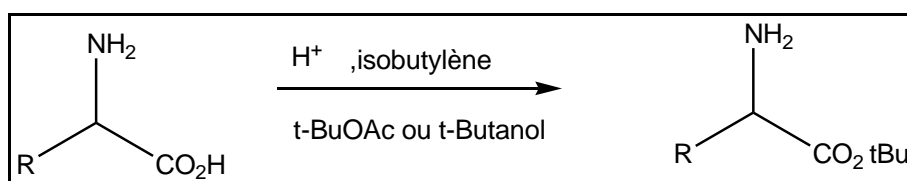


Schéma 2: La protection par le groupe tertiobutyle.

Déprotection:

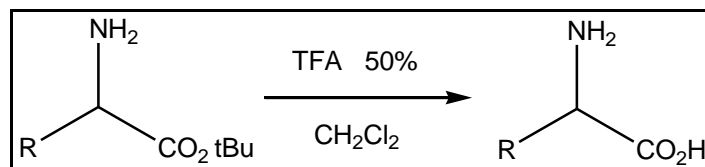


Schéma 3: L'élimination de tertiobutyle.

- **L'ester benzylique:**

Il peut être facilement décomposé par hydrogénation catalytique, régénérant l'acide aminé avec le toluène <sup>(50,51)</sup>.

Déprotection:

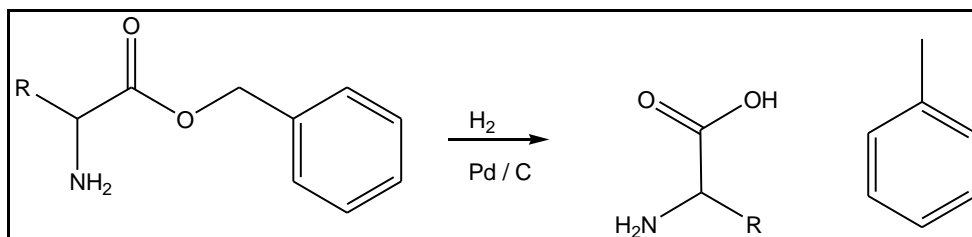


Schéma 4: La déprotection par l'hydrogénation catalytique.

- **L'ester méthylique:**

Protection: <sup>(52)</sup>.

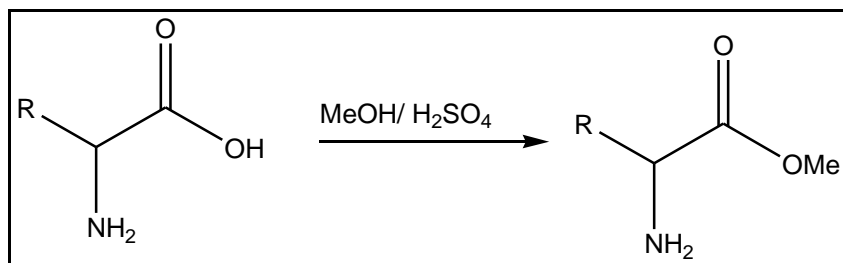


Schéma 5: Protection en ester méthylique.

Déprotection: <sup>(53,54)</sup>.

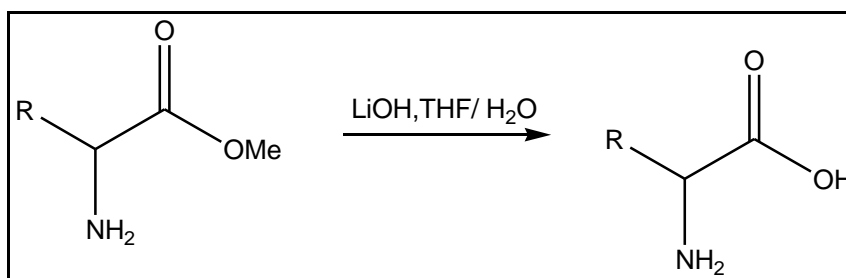
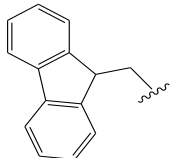
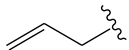
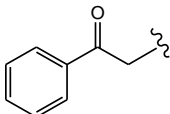


Schéma 6: L'hydrolyse de l'ester.

- **Autres groupes protecteurs:**

Nom et structure	Condition de déprotection	Références
<b>9-Fluorenylméthyle(Fm)</b> 	15% DEA ou 20% pipéridine –DMF ou DCM	(55)
<b>Allyle (Al)</b> 	Pd (Ph <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (0.1 eq) et (PhSiH <sub>3</sub> , 10 eq)-DCM	(56)
<b>Phénacyle (Pac)</b> 	1) Sodium thiophenoxyde 2) Zn dans AcOH	(57,58)

### 3-Protection de la fonction amine des aminoacides:

- Le t-butoxycarbonyle (Boc):

La première utilisation de ce groupement en synthèse peptidique pour la protection des aminoacides, a été réalisée par *M. Albertson et col.*,<sup>(59, 60)</sup>.

#### Protection:

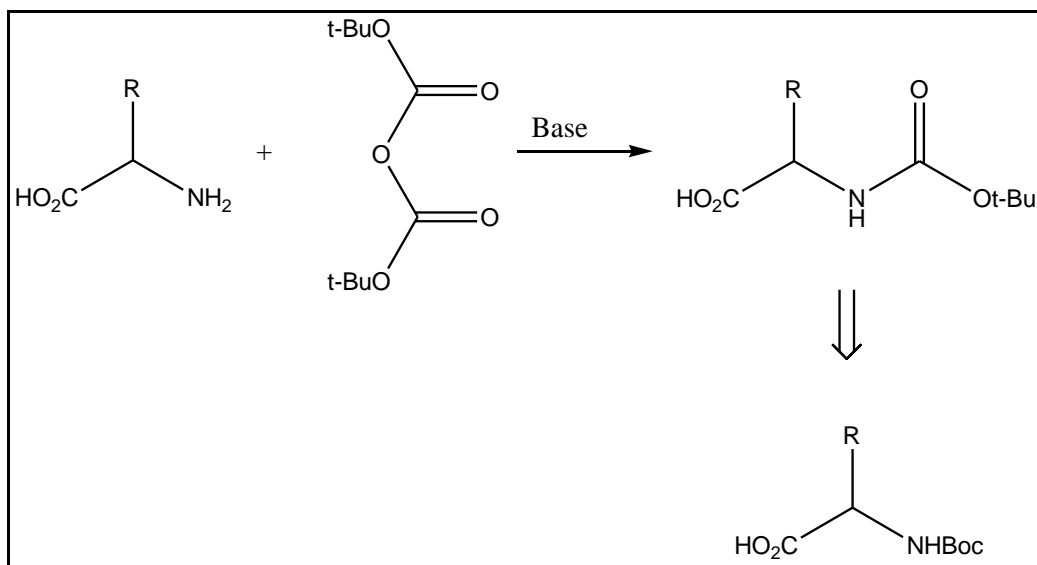


Schéma 7: Protection de l'amine par Boc.

Condition de déprotection: en milieu acide<sup>(61, 62, 63, 64, 65)</sup>.

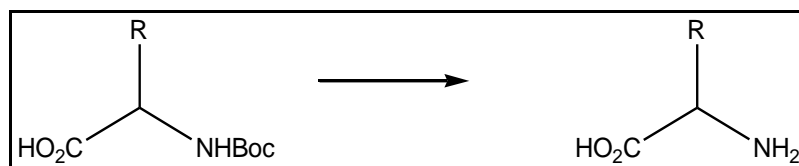


Schéma 8: Déprotection en milieu acide.

- 1) 25-50% TFA-DCM
- 2) 4 M HCl dans le dioxane
- 3) 2 M MeSO<sub>3</sub>H dans le dioxane
- 4) 1 M TMS-Cl, 1 M phénol-DCM

- **Le 9- fluorenylméthoxycarbonyle (Fmoc):**

Ce groupe protecteur est largement répandu dans la chimie de peptides en solution et en phase solide. Il est plus stable dans les conditions acides.

Protection:

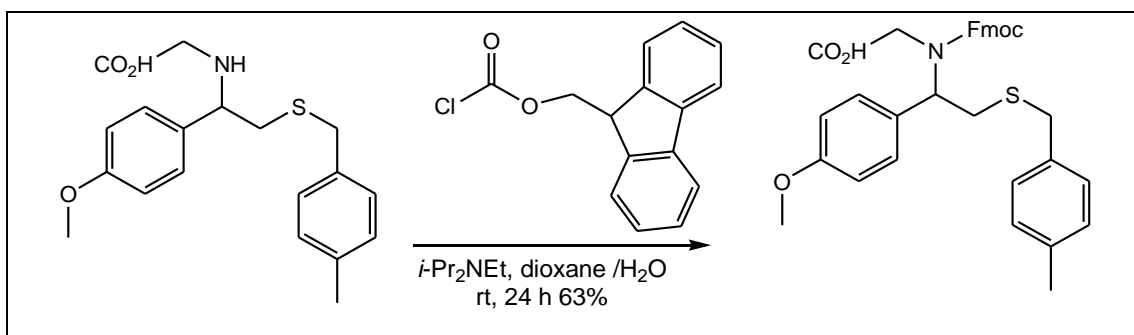


Schéma 9: Protection de l'amine par Fmoc.

Condition de déprotection: en milieu basique.

- 1)  $\text{Bu}_4\text{NF}$ , DMF<sup>(66)</sup>.
- 2)  $\text{Bu}_4\text{NF}$ ,  $n\text{-C}_8\text{H}_{17}\text{SH}$  le thiol est utilisé pour piéger le fulvène libéré<sup>(67)</sup>.
- 3) 20% pipéridine, DMF<sup>(68)</sup>.

- **L'anhydride phtalique (Ft):**

Les acides phtaliques ont été utilisés pour la première fois dans la synthèse peptique par *Kidd et col.*, 1948. Le groupe Ft est relativement stable dans des conditions acides et basiques, mais il est facile à éliminer avec les nucléophiles. Son clivage est souvent réalisé en utilisant l'hydrate d'hydrazine<sup>(69,70)</sup>.

Protection:

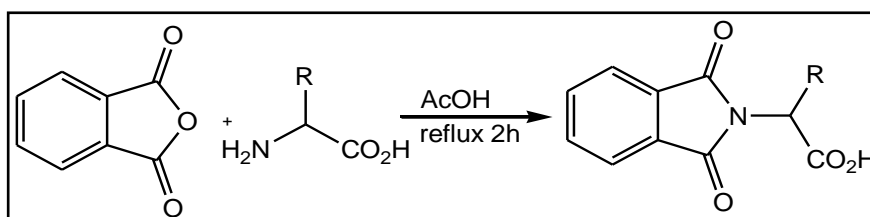


Schéma 10: Protection de l'amine par Ft.

### Déprotection:

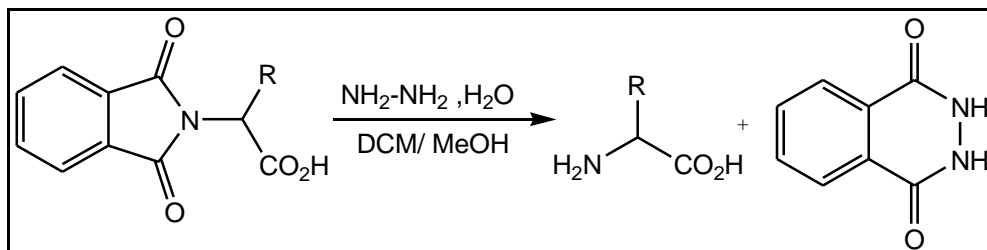
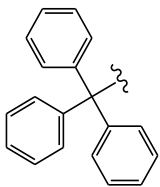
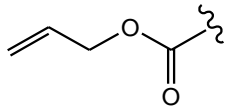


Schéma 11: Clivage par l'hydrate d'hydrazine.

- Autres groupes protecteurs:

Nom et structure	Condition de déprotection	Référence
<b>Trityle (Trt)</b> 	1) 1% TFA-DCM 2) 0.1 M HOBt-TFE 3) 0.2% TFA, 1% H <sub>2</sub> O-DCM	(71, 72, 73)
<b>Allyloxycarbonyle (Alloc)</b> 	Pd(PPh) <sub>3</sub> cat. Pour piéger H <sub>3</sub> N.BH <sub>3</sub> , MeHN.BH <sub>3</sub> Ou PhSiH <sub>3</sub> dans un solvant organique	(74,75)

### 4-Protection effectuée :

La première étape de ce travail consiste à protéger les fonctions amine et acide des aminoacides. Dans notre laboratoire la protection de la fonction amine est effectuée avec l'anhydride phtalique, dans l'acide acétique glacial sous un reflux de deux heures pour former le *N*-phtalimido-acide<sup>(69,70)</sup>.



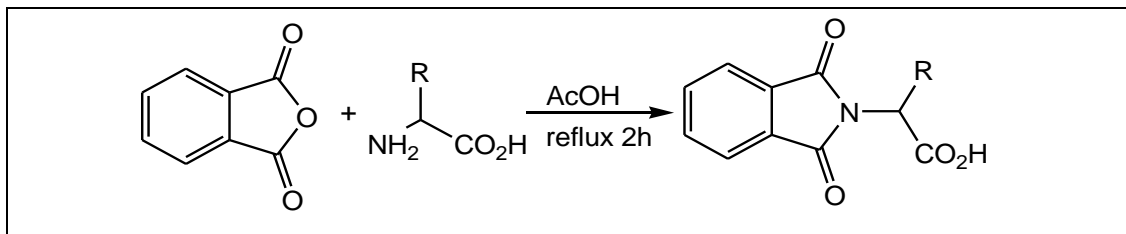


Schéma 12: Protection de l'amine par Ft.

Mécanisme:

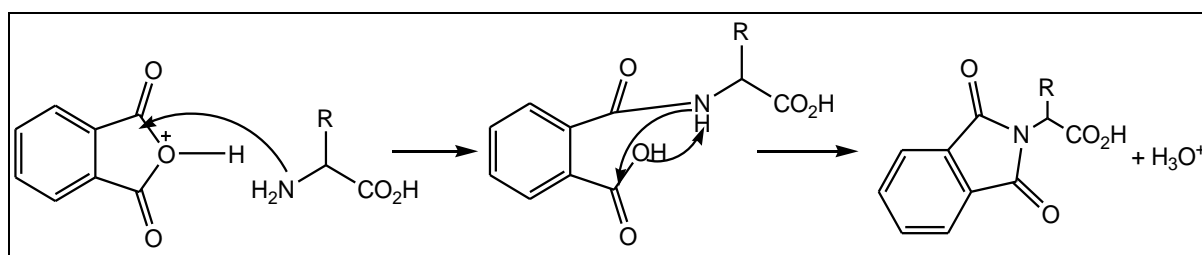


Schéma 13: Mécanisme de la protection.

La protection de la fonction acide a été réalisée par estérification en utilisant un groupement méthylique, afin de pouvoir associer un autre aminoacide protégé. L'acide bromoacétique et le méthanol sont mélangés dans le toluène avec quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Après un reflux de 7 h, on obtient l'ester méthylique<sup>(52)</sup>.

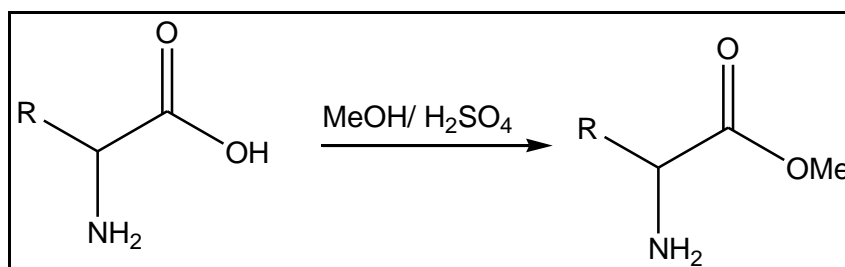


Schéma 14: Protection en ester méthylique.

Mécanisme:

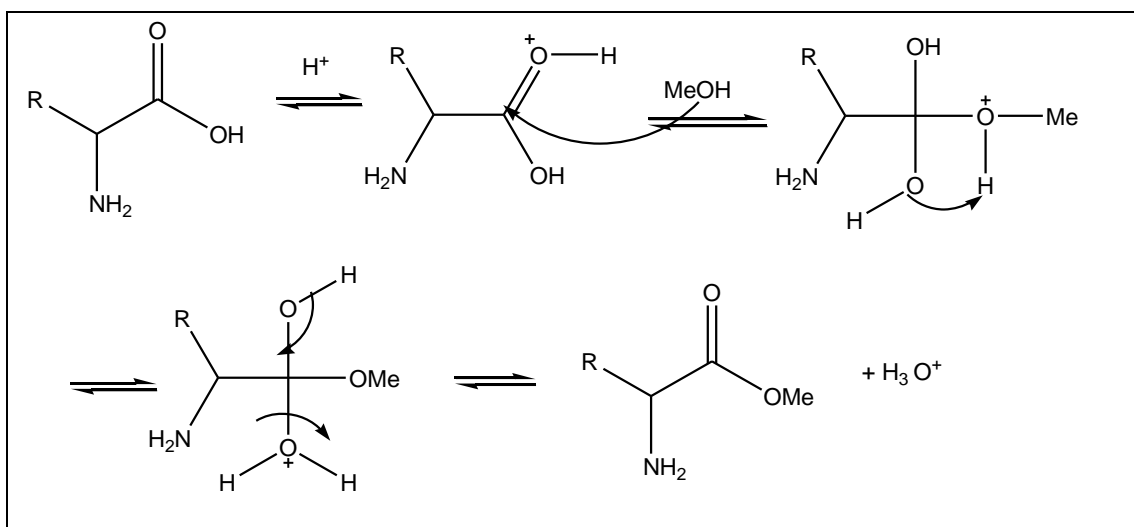


Schéma 15: Mécanisme de l'estérification.

**5-La réaction de transfert de phase:**

En 1971 *Straks et col.*, ont introduit le terme "catalyse par transfert de phase" pour expliquer le rôle des sels de tétraalkylammonium ou de phosphonium ( $Q^+X^-$ ), dans une réaction entre deux substances situés dans différentes phases non miscibles. Entre un sel dissous dans l'eau et une substance dissoute dans un solvant organique.

Le rôle de sel ( $Q^+X^-$ ) est un catalyseur, il a pour but de transférer l'anion que l'on veut faire réagir dans la phase organique dans laquelle le substrat réagit dans la phase organique et qui n'était pas en intime contact avec l'anion. Les catalyseurs les plus employés sont des sels "oniums" ou des agents complexant de cation alcalins, par exemple, l'hydrogénosulfate de tétrabutylamonium ( $Bu_4N^+$ ,  $HSO_4^-$ ) (HSTBA), l'iodure de tétrabutylamonium ( $Bu_4N^+$ ,  $I^-$ ) (ITBA).

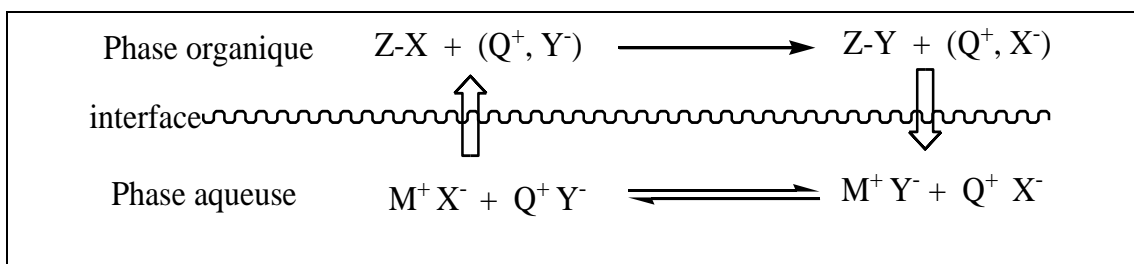


Schéma 16 :  $Q^+$  : cation ammonium quaternaire;  $M^+Y^-$  ; nucléophile inorganique soluble dans l'eau;  $Z-X$  : substrat organique;  $Z-Y$  : produit de la réaction ;  $Q^+Y^-$  ; le pair ammonium quaternaire –nucléophile ;  $Q^+X^-$  : le pair ammonium quaternaire-groupe libérale <sup>(76)</sup>.

### 6-Réaction effectuée :

On a synthétisé le *N*-phthalimidooxy acétate de méthyle, par une réaction de transfert de phase selon le schéma 17.

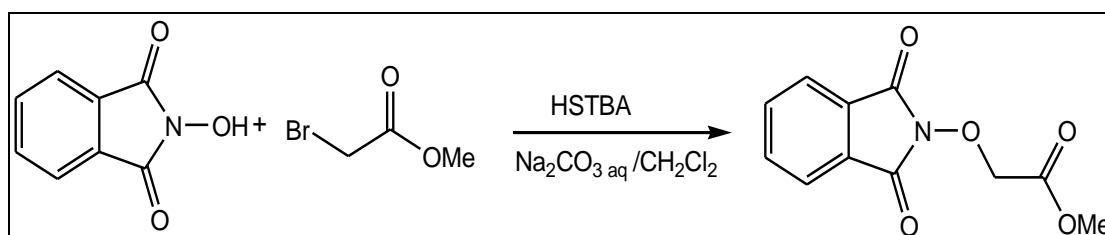


Schéma 17: La réaction de la catalyse par transfert de phase.

Mécanisme de cette réaction:

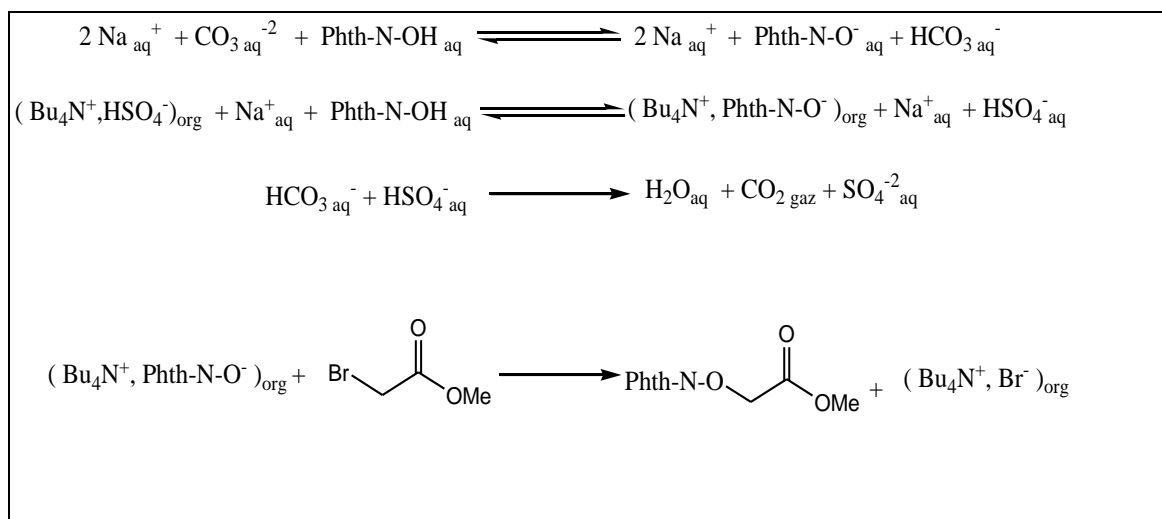


Schéma 18: Mécanisme de la réaction.

### 7-Couplage peptidique:

Le couplage peptidique constitue une des étapes dans la synthèse des peptides, où il y a la formation de petite molécule par exemple un dipeptide ou une protéine qui est une macromolécule. Ce processus sera décrit par la suite.

La formation d'une liaison amide ou ester se réalise par une condensation entre une fonction acide et fonction amine, ou alcool.

- Pour les alcools et les acides, il y a une réaction d'estérification simple qui est une réaction équilibrée.
- Pour un mélange d'un acide carboxylique et une amine, il s'agit d'une réaction acido-basique qui favorise la formation d'un sel ( $\text{RCOO}^-$ ,  $\text{R}'\text{NH}_3^+$ ) au lieu de la formation de l'amide ( $\text{RCONHR}'$ ).

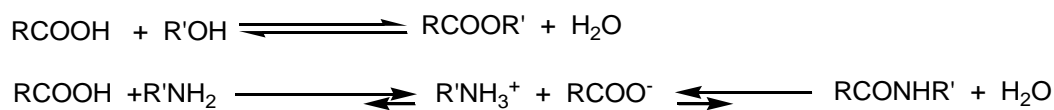


Schéma19: Formation de la liaison amide.

Par conséquent, pour créer une liaison amide, il faut activer la fonction acide par un groupe partant fixé sur le carbonyle de l'acide carboxylique correspondant. Cela conduit à couplé l'amine avec l'acide activé<sup>(77)</sup>.



Schéma 20: Activation et aminolyse d'un acide<sup>(77)</sup>.

### a- Les halogénures d'acyle:

Une des méthodes d'activation des acides carboxylique consiste d'abord à mettre en œuvre la synthèse des chlorures d'acyle. L'acide est activé en chlorure d'acyle durant la synthèse peptidique par plusieurs réactifs  $\text{SOCl}_2$ ,  $\text{COCl}_2$ ,  $\text{PCl}_3$ ,  $\text{POCl}_3$ ,  $\text{PCl}_5$  (réaction E1) en présence de diméthylformamide (DMF) comme solvant et en milieu basique avec l'amine pour la formation de la liaison amide<sup>(78)</sup>.

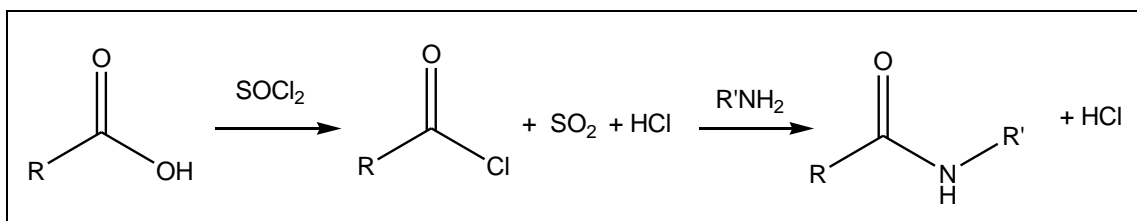


Schéma 21: L'activation de l'acide carboxylique par les halogénures d'acyle.

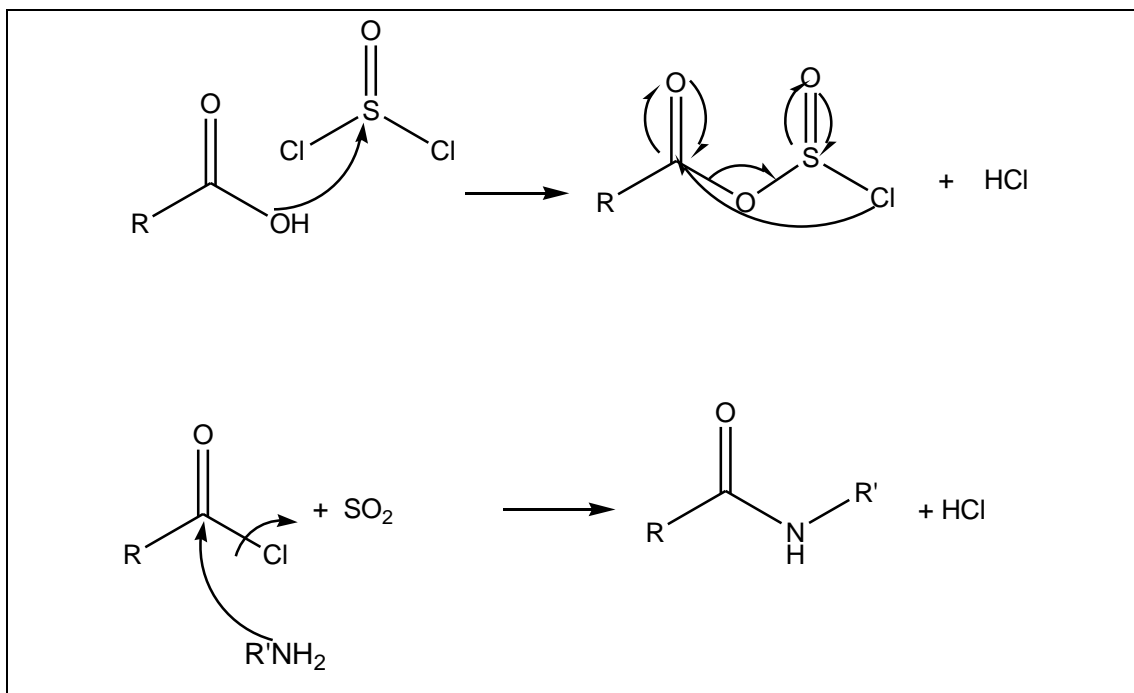


Schéma 22: Mécanisme d'activation.

L'utilisation des chlorures d'acyle est limitée, par ce qu'il y a un risque d'hydrolyse, clivage de groupes protecteur<sup>(79)</sup>.

#### a- Les azides d'acyle :

Le couplage d'une amine avec les azides d'acyle a été mis au point par *Curtius et col.*,<sup>(80)</sup>. L'azide d'acyle peut être formé, en deux étapes, à partir de l'ester méthylique correspondant à partir de l'acide de départ avec l'hydrazine pour donner l'hydrazide, qui peut former l'azide d'acyle grâce à une réaction de nitrosation. Une fois obtenu, ce dernier peut former une liaison amide.

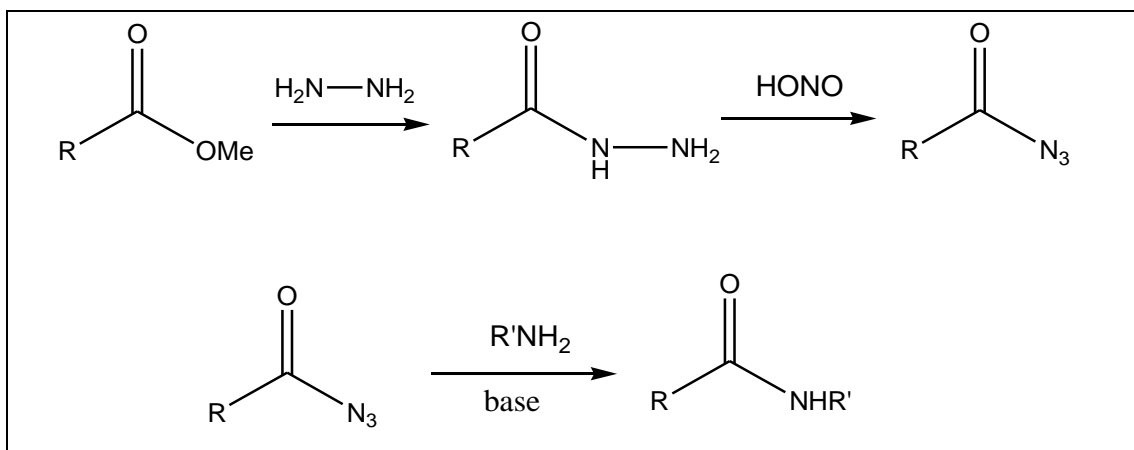


Schéma 23: Formation d'une liaison amide via l'azide d'acyle.

### b- Les anhydrides :

Ils sont utilisés comme des intermédiaires réactionnels et très efficaces dans le couplage peptidique, il existe deux types d'agent utilisés: les anhydrides symétriques et les anhydrides mixtes. Pour les anhydrides symétriques on a la DCC (*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide) qui est la plus utilisée dans le couplage des aminoacides.

Il est soluble dans le dichlorométhane, le tétrahydrofurane, l'acétonitrile et le diméthylformamide, mais insoluble dans l'eau. La DCC et le diisopropylcarbodiimide (DIC) sont couramment utilisés pour préparer des amides, des esters et des anhydrides d'acides à partir des acides carboxyliques<sup>(81,82)</sup>.

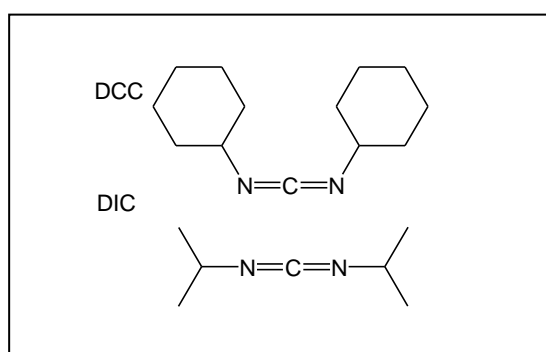


Schéma 24: Représentation de la DCC et le DIC.

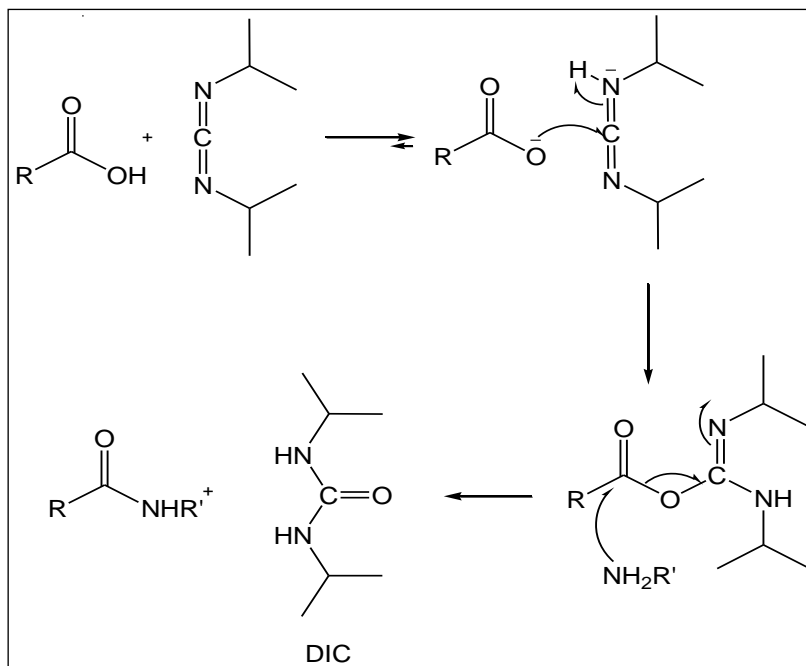


Schéma 25: Mécanisme d'un couplage avec le DIC.

### 8- Le couplage effectué:

En ce qui concerne ce travail, le couplage est effectué entre le *N*-aminoxyacétate de méthyle avec un aminoacide *N*-protégé en présence d'un agent activant (DCC).

On fait réagir l'acide *N*-protégé sur le *N*-aminoxyacétate de méthyle dans le DCM comme solvant, puis le DCC est additionnée en laissant l'agitation à 0°C pendant une heure, ensuite à température ambiante pendant 24h. La dicyclohexylurée formée DCU est éliminée par filtration, et le filtrat est concentré sous vide. Le mécanisme réactionnel de cette réaction de couplage est présenté dans le schéma suivant.

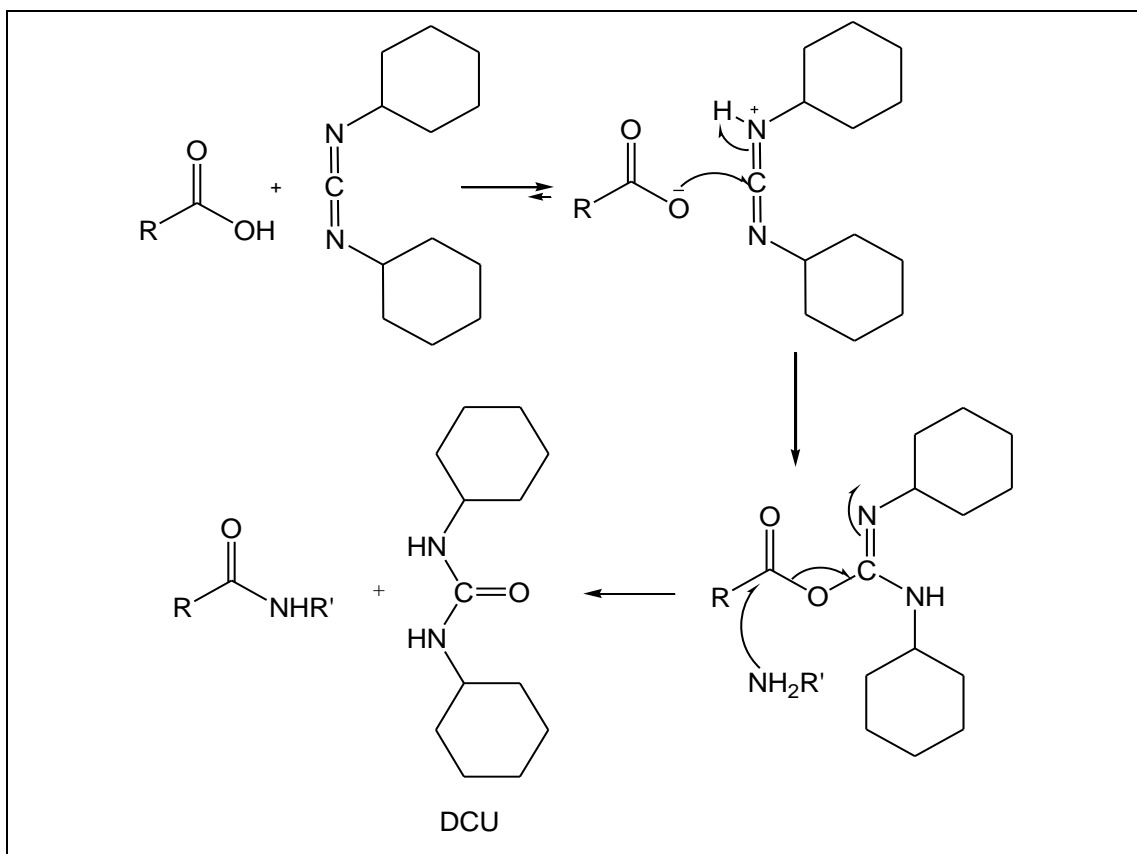


Schéma 26: Mécanisme d'un couplage avec le DCC.

### a-Cyclisation de peptide:

Pour la cyclisation il faut tout d'abord, déprotéger les extrémités du peptide.

*Hydrolyse de la fonction ester en acide:* on dissout le peptide dans un mélange THF/ $H_2O$ , puis on ajoute l'hydroxyde de lithium sous une agitation<sup>(53,54)</sup>.

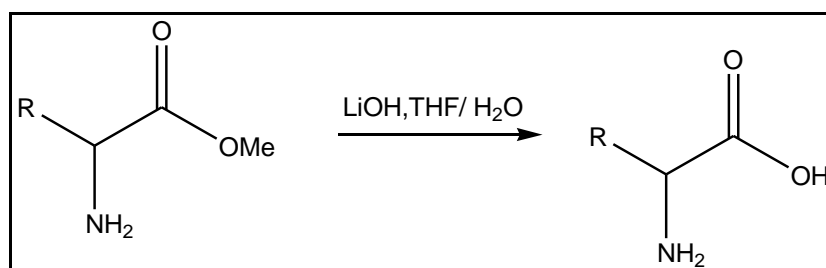


Schéma 27: l'hydrolyse de l'ester.

*Déprotection de la fonction amine:* l'acide aminé est dissous dans un mélange de dichlorométhane et de méthanol, on ajoute l'hydrate d'hydrazine sous agitation à température ambiante pendant une nuit<sup>(70)</sup>.



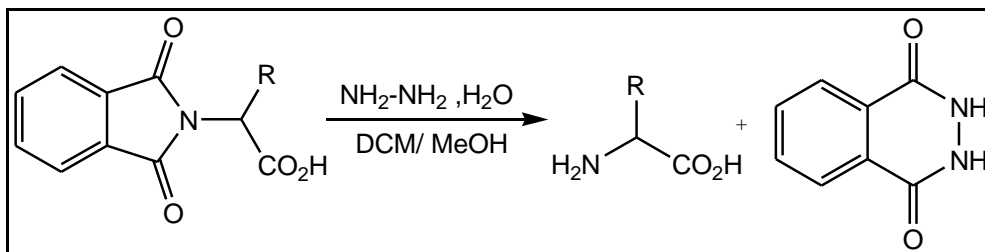


Schéma 28: Clivage par l'hydrate d'hydrazine.

La cyclisation tête-à-queue: on dissout le peptide dans le DCM puis on ajoute le DCC sous agitation pendant 24h<sup>(81,82)</sup>.

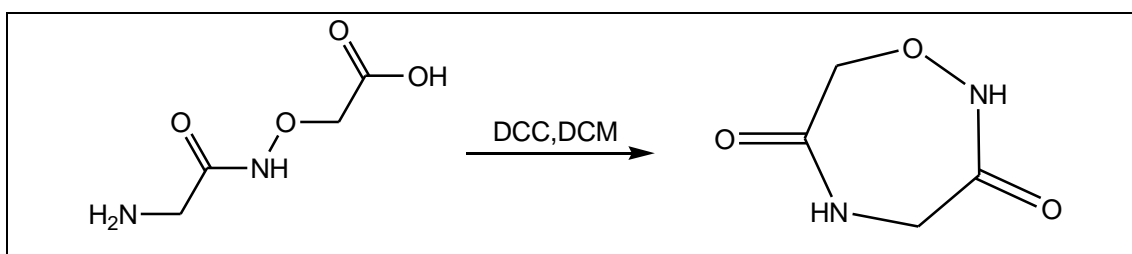


Schéma 29: Cyclisation tête-à-queue.

---

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

---

## Conclusion et perspectives :

De nombreux groupes de chercheurs comptent sur le développement de peptides, voire de leur utilisation dans la conception de petites molécules, comme nouvelles voies thérapeutiques ou de recherches thérapeutiques. Ceci a été rendu possible ces dernières années.

Ce mémoire s'est attaché à la préparation de dipeptides cycliques portant le motif aminoxy, ce composé rencontre largement dans la littérature par son activité biologique. En utilisant les réactifs disponibles au laboratoire, cette synthèse s'est effectuée en quatre étapes:

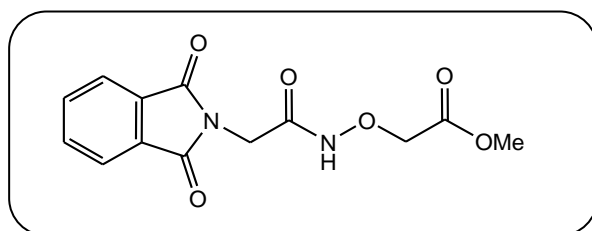
1-Protection de l'acide aminé et de l'hydroxylamine avec l'anhydride phtalique dans l'acide acétique.

2-Synthèse de l'aminooxyacétate de méthyle est réalisée à partir du *N*-phtalimidooxyacétate de méthyle par une réaction de transfert de phase entre le *N*-hydroxyphtalimide et du bromoacétate de méthyle. Par la suite, l'hydrolyse du groupe phtaloyl avec l'hydrate d'hydrazine, ce qui permet d'arriver à l'aminooxyacétate de méthyle.

3-Préparation du dipeptide de l'aminooxyacétate de méthyle par couplage de l'aminooxyacétate de méthyle avec l'acide aminé *N*-protégé en présence du DCC. Ensuite, on procède à l'hydrolyse de l'ester méthylique.

4-Après l'hydrolyse du phtaloyl avec l'hydrate d'hydrazine, nous avons fait la cyclisation tête-à-queue de peptide en présence du DCC pour aboutir au dipeptide aminooxyacétique cyclique souhaité.

Malheureusement à cause de la courte durée de ce travail et les contraintes rencontrées pendant les manipulations, nous n'avons pu préparer que le peptide linéaire. Une prolongation de ce travail porterait sur la synthèse d'autres analogues de notre produit cible.



---

# **PARTIE EXPÉRIMENTALE**

---

## **Techniques analytiques et purification de réactifs et solvant.**

- **Infra-rouge :**

Les spectres dans l'infra-rouge ont été obtenus au Centre de mesures du laboratoire COSNA sur un appareil Mattson Genesis II FTIR. Les échantillons étaient traités soit en solution dans le dichlorométhane (DCM) ou sous forme de pastilles de KBr. Les principales fréquences d'absorption sont données en nombre d'onde ( $\text{cm}^{-1}$ ).

- **Température de fusion :**

Tous les points de fusion ont été déterminés grâce à un fusionomètre digital de la série IA 9000 d'Electrothermal en utilisant des tubes capillaires.

- **Purification de réactif et de solvants:**

L'anhydride acétique ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ): distillé a pression atmosphérique.

L'anhydride phtalique : recristallisé dans l'anhydride acétique fraîchement distillé, lavé trois fois avec l'éther, puis séché.

Le méthanol ( $\text{MeOH}$ ) : distillé et gardé dans une bouteille contenant le tamis moléculaire 3Å.

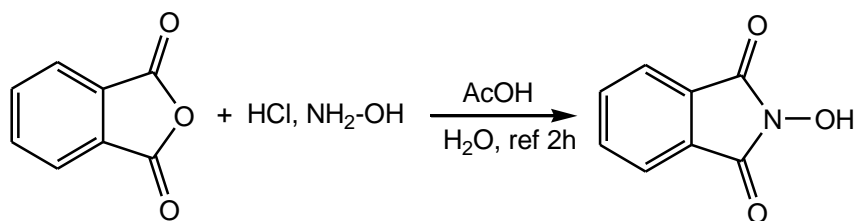
Le dichlorométhane (DCM): distillé et gardé dans une bouteille contenant  $\text{P}_2\text{O}_5$ .

### **1-Recristallisation de l'anhydride phtalique:**

On porte à chaud une suspension d'anhydride phtalique dans l'anhydride acétique fraîchement distillé (ébullition  $134^\circ\text{C}$ ) jusqu'à ce que le solide passe complètement en solution. Ensuite, on filtre et on laisse le solide se déposer. Ce dernier est trituré et filtré sur le büchner et on lave avec l'éther trois fois. L'élimination d'un peu de solvant permet de récupérer un peu de solide que l'on soumet au même traitement. Le produit pur fond à  $130^\circ\text{C}$ .

### **2-Protection de l'hydroxylamine**

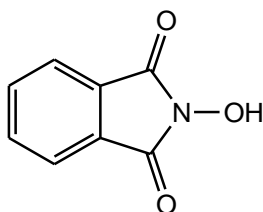
Schéma réactionnel:



Mode opératoire:

Dans un Bicol muni d'un réfrigérant, on introduit (1g, 14.39mmol) de chlorhydrate d'hydroxylamine, (2.13g, 14.39mmol) d'anhydride phtalique, 10 ml de l'acide acétique glacial et 2 ml de l'eau. On porte le mélange à reflux pendant 2h. Ensuite, on laisse le mélange au repos dans un bain de glace, le solide cristallise et on le filtre sous vide, suivi d'un lavage 2 fois avec l'éther.

Résultat: *N*-hydroxylphthalimide



\*le premier essai sans ajouter de l'eau.

**MM**=163.1g/mol

**Rdt**=78%

**Pf**=199°C

**IR (cm<sup>-1</sup>)** : 2600-3200 large (O-H de l'hydroxyle); 1403(C=C aromatique).

Aspect: solide blanc.

\*le deuxième avec l'eau.

**MM**=163.1g/mol

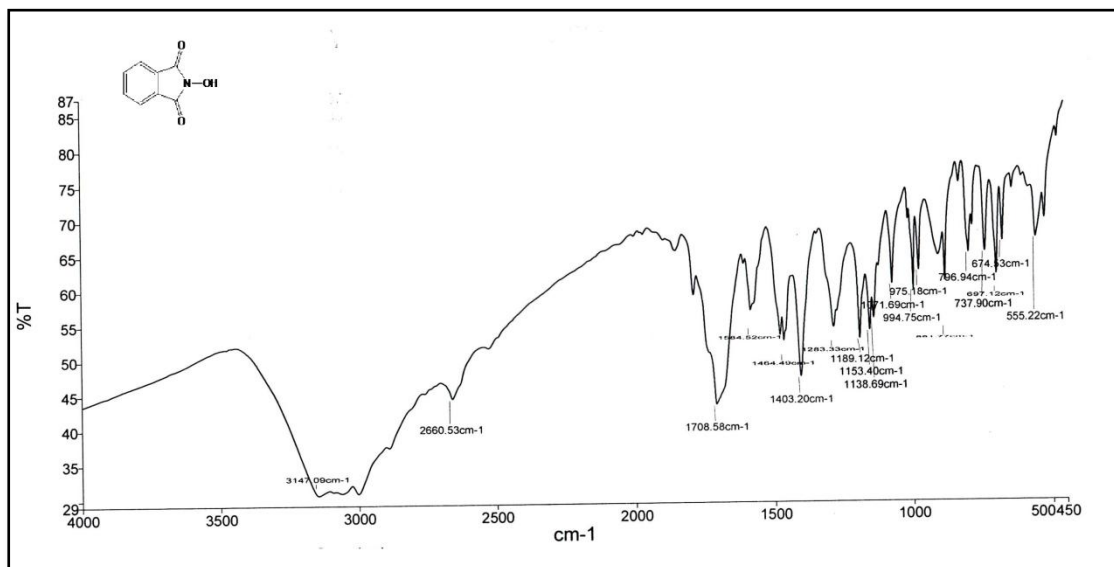
**Rdt**=84%

**Pf**=188°C

**IR (cm<sup>-1</sup>)** : 2600-3400 large (O-H de l'hydroxyle); 1770-1780 (C=O phtalimide);

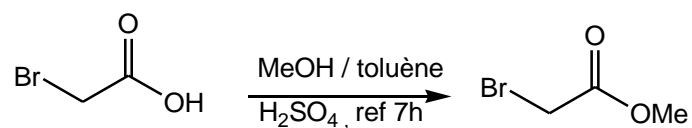
1464(C=C aromatique).

Aspect: solide blanc.



### 3-Estérification de l'acide bromoacétique

Schéma réactionnel:



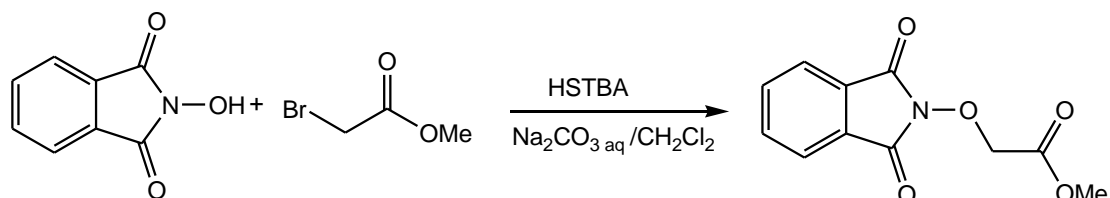
Mode opératoire:

Dans un ballon, on introduit (3g, 21.59mmol) de l'acide bromoacétique, quelques gouttes d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), du MeOH anhydre (5 ml, 0.12mmol) et du toluène (20ml). On chauffe à reflux pendant 7h. Ensuite on évapore le solvant (excès de méthanol).

On lave le résidu une fois avec l'eau glacée et on sépare les deux phases. Extraire la phase aqueuse trois fois avec le DCM (3×40ml) et on réunit les phases organiques. On les lave trois fois avec une solution de bicarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ) (3×40ml), de l'eau distillée (3×40ml) aussi une solution saturée de NaCl (3×30ml). A la fin on sèche sur sulfate de calcium anhydre ( $\text{CaSO}_4$ ) et on élimine le solvant sous pression réduite.

#### 4-synthèse de *N*-phtalimidooxyacétate de méthyle par réaction de transfert de phase

##### Schéma réactionnel:

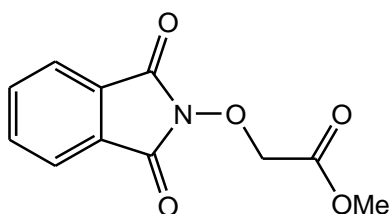


##### Mode opératoire:

Le *N*-hydroxyphthalimide (2.11g, 12mmol), le bromoacétate de méthyle préparé (1.9ml, 12mmol) et l'hydrogénéosulfate de tétrabutylammonium (2.19g, 6mmol) sont vigoureusement agités dans un mélange DCM/ solution 1M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5.3g), (50:50 ml v: v), et on laisse sous agitation toute la nuit.

On sépare les deux phases puis, on laver la phase organique avec de l'eau distillée (2×30ml), ensuite avec une solution aqueuse saturée de NaCl (2×30ml), pour finir par un séchage sur CaSO<sub>4</sub>. A la fin, on évapore le solvant on obtient un solide.

Résultat: *N*-phtalimidooxyacétate de méthyle.



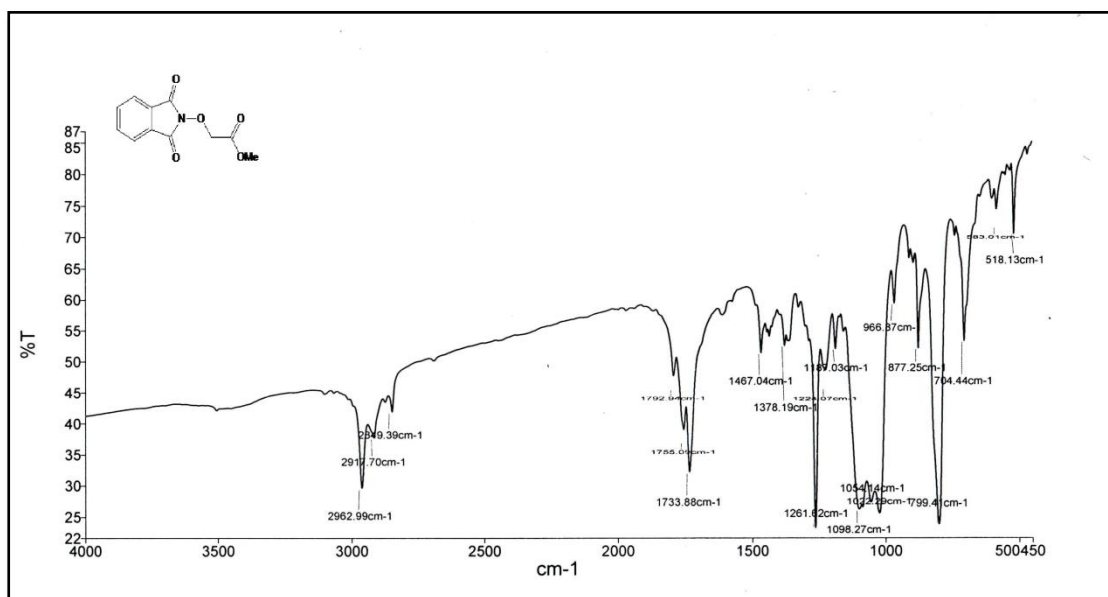
**MM**=235.18g/mol

**Rdt**=18%

**Pf**=112°C

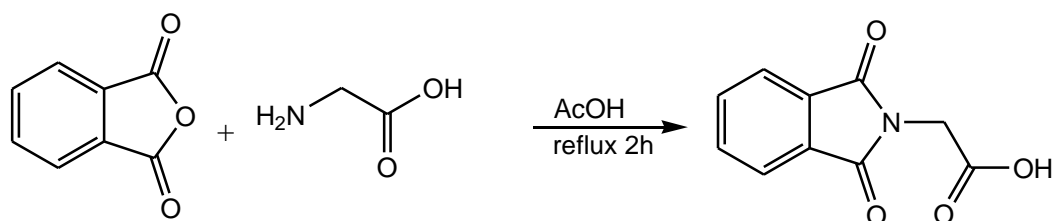
**IR (cm<sup>-1</sup>)** : 1792-1755 (C=O phtalimide); 1733 (C=O de carbonyle de l'ester) ; 1261(C-O de l'ester); 799(C=C de aromatique).





## 5-Protection de la glycine

Schéma réactionnel:

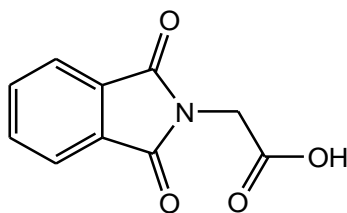


Mode opératoire:

Dans un bicol muni d'un réfrigérant, on introduit la glycine (2g, 26mmol), l'anhydride phtalique (3.9g, 26mmol) et de l'acide acétique glacial (12 ml). On porte le mélange à reflux pendant 2h.

Ensuite, on laisse le mélange au repos dans un bain de glace, le solide cristallise on filtre le solide formé sous vide et laver 2 fois avec l'éther. Recristallisé dans mélange eau -éthanol (4:1).

Résultat: N-phthalimidoglycine.



\*le premier essai reflux 2h

**MM**=205g/mol

**Rdt**=52%

**Pf**=167°C

**IR (cm<sup>-1</sup>)** : 3221 (N-H del'amine) fine ; 1747-1760 (C=O de phtalimide); 1709 (C=O de l'acide)

Aspect: solide blanc

N.B: la présence de la bonde N-H nous indique que la fonction amine de la glycine n'est pas protégée.

\*le deuxième reflux 4h

**MM**=205g/mol

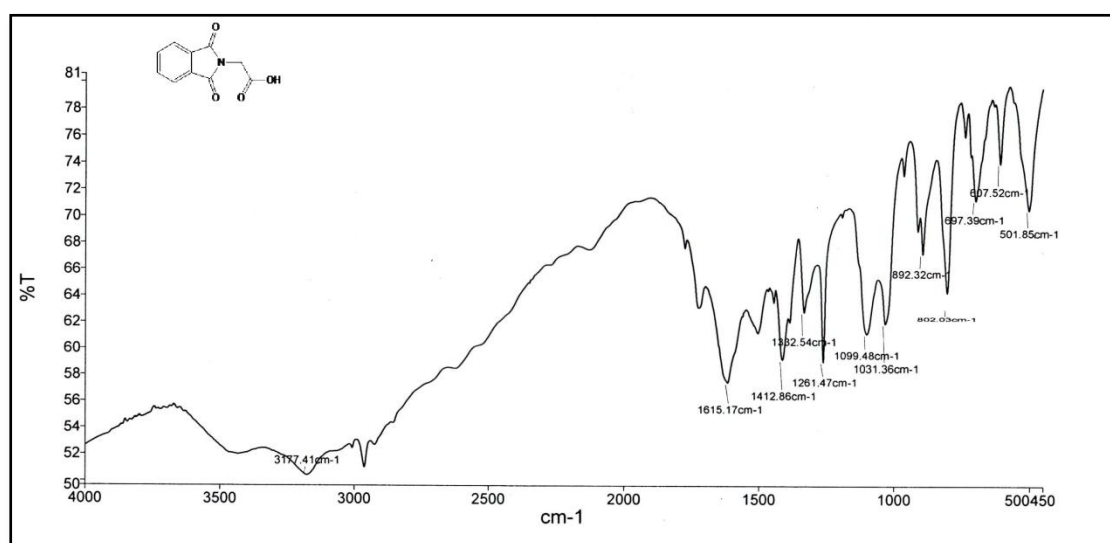
**Rdt**=30%

**Pf**=195°C

**Rf**: 0.15 (CCM l'éluant: le butanol, l'acide acétique, l'eau 7:3:1)

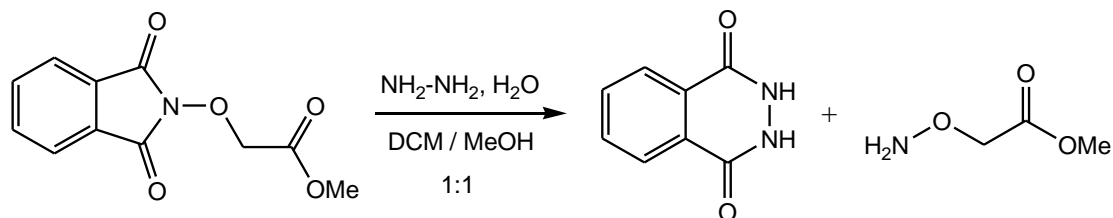
**IR (cm<sup>-1</sup>)** : 3000-3500 (O-H de l'acide carboxylique); 1700 (C=O de phtalimide)

Aspect: solide blanc.



## 6-Hydrolyse du phtaloyle

Schéma réactionnel:



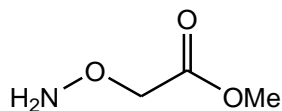
Mode opératoire:

A une solution de composé à déprotéger *N*-phtalimidooxyacétate de méthyle (0.25g, 1.06mmol) dissous dans un mélange DCM et le méthanol (1:1, 20 ml), on ajoute sous agitation l'hydrate hydrazine (0.1 ml, 2.05mmol) à température ambiante.

Après 20h, un solide se forme (phtaloylhydrazine), qui est éliminé par filtration. On évapore le mélange sous pression réduite. Le solide résiduel est dissous dans l'eau (25 ml), on ajoute 50 ml de DCM pour une dissolution totale.

On alcalinise à pH=11 par une solution de carbonate de sodium. Ensuite on lave avec une solution aqueuse saturée en NaCl et on sépare les deux phases. Le DCM est chassé sous pression réduite et le produit est obtenu.

Résultat:



**MM**=105.06g/mol

**Rdt**=36%

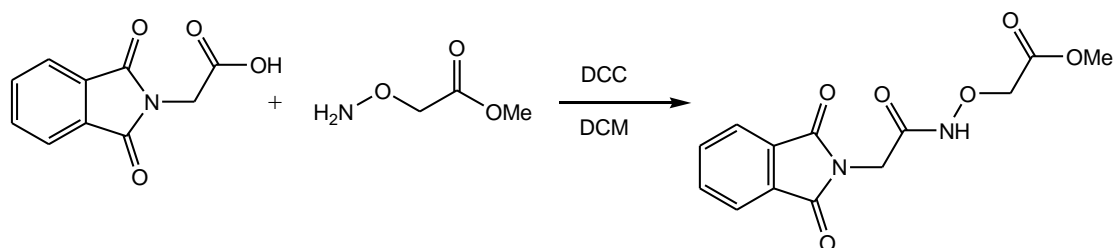
**Rf**: 0.12 (CCM l'éluant: DCM/ MeOH, 98:2)

**IR (cm<sup>-1</sup>)** : 3400 (N-H de l'amine); 2962 (C-H de CH<sub>3</sub>); 2916 (C-H de CH<sub>2</sub>)

Aspect: liquide.

## 7- Synthèse de dipeptide de l'ester aminooxy acétate de méthyle.

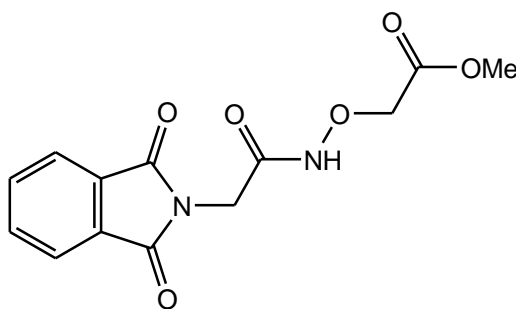
Schéma réactionnel:



Mode opératoire:

On introduit dans le DCM (20 ml) le *N*-phthalimidoglycine (1.42 mmol) avec l'aminooxyacétate de méthyle (1.42 mmol). On additionne à cette solution le dicyclocarbodiimide (DCC) (1.42mmol) dans 20 ml DCM sous agitation. Le mélange est maintenu à 0°C pendant 1h et à température ambiante pendant 24h. La dicyclohexylurée (DCU) est filtrée, et on évapore solvant.

Résultat: *N*-phthalimidoglycylaminooxy acétate de méthyle



**MM**=292.23g/mol

**Rdt**=70%

**Pf**=82°C

**Rf**: 0.44 (CCM l'éluant DCM/MeOH 9:1)

**IR (cm<sup>-1</sup>)**: 3328 (N-H); 2963 (C-H de CH<sub>3</sub>); 2852 (C-H de CH<sub>2</sub>); 1723 (C=O de l'ester)

Aspect: solide jaune.

## Références bibliographiques:

- (1): M. Decaffmeyer, Nouveaux outils *in silico* de modélisation de peptide: Design de peptides complémentaires et prédiction de structures peptidiques. Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, **2008**, 14.
- (2): S. Weinman, P. Méhul, Toute la biochimie. 1 ed; Dunod: Paris, **2004**, 8.
- (3): L. Saucedo, "Switch-Peptides": Conception et synthèse d'inhibiteurs ou des structures potentiels de fibrilles amyloïdes. École Polytechnique Fédérale de Lausanne, **2006**, 25.
- (4): A. Thomas, M. Decaffmeyer, R. Brasseur, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, **2008**, 12, 81.
- (5): J. Lawrence, Modifications de la liaison peptidique: N-hydroxy, N-acyloxy et N-alkyloxy-peptides. Université Joseph Fourier Grenoble I, **2006**, 17.
- (6): C. J. Castells, B. G. De la Torre, R. G. Gallego, D. Andreua, *Bioorg. Med. Chem. Lett*, **2007**, 17, 5155.
- (7): S. Dufort, Vectorisation de biomolécules pour l'imagerie et la thérapie des cancers. Université de Grenoble. École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant, **2010**, 23.
- (8): J. E. Murphy, T.Uno, J. D. Hamer, F. E. Cohen, V. Dwarki, R. N. Zuckermann, *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A*, **1998**, 95, 1517.
- (9): M. Goffinet, Vécu des parents de personnes trisomiques 21 et attentes vis-à-vis médecin traitement. Université Claude Bernard-lyon 1, **2008**, 21.
- (10): J.Laffaire, Modification du transcriptome au cours du développement post-natal du cervelet dans un modèle murin de trisomie 21. Université Pierre et Marie Curie, **2008**, 3.
- (11): F. Aime, Prise en charge orthodontique des patients porteurs de trisomie 21: à propos de cas clinique. Université de Lorraine, **2012**, 5.

- (12): F. Latreche, Trisomie 21: Dépistage sérique, Mise au point de culture cellulaire. Université de Mentuori Constantine, **2008**, 21.
- (13): M. J. Alao, G. Sagbo, A. Laleye, B. Ayivi, *Ashdin, Clinics in Mother and Child Health*, **2010**, 7, 1.
- (14): B. S. Bouy, D. Royère, P. Levy, Dépistage de la trisomie 21, Mise en place du dépistage combiné au premier trimestre de la grossesse, Agence de la Biomédecine. *Paticien12*, **2012**, 1340.
- (15): G. Hummel, U. Reineke, U. Reimer, *molecules.Mol.Biosyst*, **2006**, 2, 499.
- (16): A. Loffet, *J.Pept.science*, **2002**, 8, 1.
- (17): M. Ayoub, D. Scheidegger, *Chemistry today*, **2006**, 24, 46.
- (18): P.W.Lathan, *Nature Biotech*, **1999**, 17, 755.
- (19): S.Lien, H.B.Lowman, *Trends Biotechnol*, **2003**, 21, 556.
- (20): E.T. Maggio, *PharmaVenture*, **2005**, 13.
- (21): R. R. Stout, M. J.Gutierrez, M. D. Freeland, M. Fein, D. Taylor, Y. Davis, R. Quiuroz, O. Correa, A. Machado, S. Landau, M. Garcia, E. Arencibia, N. Chinery-Hesse, C. Wai, *Drug Deliv. Techn*, **2007**, 7, 2.
- (22): M. Werle, A. Bernkop-Schnürch, *Amino Acids*, **2006**, 30, 351.
- (23): A. Rawat, B. Vaidya, K. Khatri, A. K. Goyal, P. N. Gupta, S. Mahor, R. Paliwal, S. Rai, S. P. Vyas, *Pharmazie*, **2007**, 62, 643.
- (24): P. Jarver, U. Langel, *Drug Discov Today*, **2004**, 9, 395.
- (25): B.Gupta, T. S. Levchenko, V. P. Torchilin, *Adv Drug Deliv Rev*, **2005**, 57, 637.
- (26): M.C. Morris, J. Depollier, J. Mery, F. Heitz, G. Divita, *Nat Biotechnol*, **2001**, 19, 1173.
- (27): F. Simeoni, M.C.Morris, F. Heitz, G. Divita, *Nucleic Acids Res*, **2003**, 31, 2717.

- (28): K.N. Sugahara, T. Teesalu, P.P. Karmali, V.R. Kotamraju, L. Agemy, et al. *Cancer Cell*, **2009**, *16*, 510.
- (29): R. Brasseur, P. Lorge, D. Espion, E. Goormaghtigh, A. Burny, J. M. Ruyschaert, *Virus Genet*, **1988**, *1*, 325.
- (30): T. Pillot, M. Goethals, B. Vanloo, C. Talussot, Brasseur, J. Vandekerckhove, M. Rosseneu, L. Lins, *JBC*, **1996**, *271*, 28757.
- (31): Brasseur. *Mol.Memb.Biol*, **2000**, *17*, 31.
- (32): H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.***1982**, *21*, 512.
- (33): K. A. Brogden, *Nat Rev Microbiol*, **2005**, *3*, 238.
- (34): P. Bulet, R. Stocklin, et al, *Immunol Rev*, **2004**, *198*,169.
- (35): I. Decostaine, Ligation chimique sur support solide : vers la préparation d'analogues de la glycoprotéine MUC1. Université d'Orléans. École Doctorales Sciences et Technologiques, **2008**, 45.
- (36): A. F. G. Alghaith, A single-step reaction for glycosylation of aminoxy peptides. University of Kansas, **2012**, 10.
- (37): S. Laulhé, Aminoxy reagents for sythesis and analysis: expanding the role of oximation. University of Louisville.Kentucky, **2012**, 6.
- (38): M. Amblard, J. A. Fehrentz, J. Martinez, G. Subra, *Mol. Biotech*, **2006**, *33*, 239.
- (39): R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc*, **1963**, *85*, 2149.
- (40): J. S. J. Davies, *Peptide Sci*, **2003**, *9*, 471.
- (41): D. A. Horton, G. T. Bourne, M. L. Smythe, *J. Comp. AidedMol. Des*, **2002**, *16*.
- (42): J. P. Blanchette, Design et synthèse de peptides macrocycliques pour le développement de nanopores moléculaires. Université Laval Québec. Faculté des Sciences et de Génie, **2008**, 19.
- (43): R. Chadli, Synthèse de dipeptides tête-à-queue de l'acide aminoxy acétique. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, **2006**, 3.

- (44): G. Mezö, I. Szabo, I. Kertész, R. Hegedüs, E. Orbán, U. Leurs, S. Bösze, G. Halmose, M. Manea, *J of Peptide Science*, **2011**, 17, 39.
- (45): D. Goodwin, P. Simerska, I. Toth, *Current Medicinal Chemistry*, **2012**, 19, 4451.
- (46): F. Guzmán, S. Barberis, A. Illanes, *Electronic Journal of Biotechnology ISSN*, **2007**, 10, 279.
- (47): N. Rabasso, *Chimie Organique: Hétéroéléments, stratégies de synthèse et chimie organométallique*; 2<sup>e</sup> ed, De Boeck, **2009**.
- (48): A. L. McCloskey, G. S. Fonken, R. W. Kluber, W. S. Johnson, *Org. Synth*, **1963**, 1, 261.
- (49): D. B. Bryan, R. F. Hall, K. G. Holden, W. F. Huffman, *Chem. Soc*, **1977**, 99, 2353.
- (50): W. H. Hartung; Simonoff, *Org. React*, **1953**, 7, 263.
- (51): S. Rahal. *Chimie des produits naturels et des êtres vivants*, **2004**, 127.
- (52): S. Danishefsky, M. Hiram, K. Gombatz, T. Harayama, E. Berman, P. J. Schuda, *Am. Chem. Soc*, **1978**, 100, 6536.
- (53): E. J. Corey, I. Szekely, C. S. Shiner, *Tetrahedron Lett*, **1977**, 3529.
- (54): A. Isidro-Llobet, M. Alvarez, and F. Albericio, *Chem. Rev*, **2009**, 109, 2455.
- (55): N. Thieriet, F. Guibe, F. Albericio, *Org. Lett*, **2000**, 2, 1815.
- (56): K. J. Jensen, J. Alsina, M. F. Songster, J. Vagner, F. Albericio, G. J. Barany, *Am. Chem. Soc*, **1998**, 120, 5441.
- (57): G. C. Stelakatos, A. Paganou, L. Zervas, *J. Chem. Soc. C*, **1966**, 13, 1191.
- (58): J. B. Hendrickson, C. Kandall, *Tetrahedron Lett*, **1970**, 5, 343.
- (59): F. C. McKay, N. F. Albertson, *J. Am. Chem. Soc*, **1957**, 79, 6186.
- (60): G. W. Anderson, A. C. McGregor, *J. Am. Chem. Soc*, **1957**, 79, 6180.
- (61): L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc*, **1957**, 79, 4427.
- (62): N. F. Alberston, G. W. Anderson, *J. Am. Chem. Soc*, **1957**, 79, 6180.
- (63): R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc*, **1963**, 85, 2149. R. B. Merrifield, *Adv. Enzymol*, **1969**, 32, 221.



- (64): E. Kaiser, F.Picart, T. Kubiak, J. P.Tam, R. B. Merrifield, *J. Org. Chem*, **1993**, 58, 5167.
- (65): J. M.Stewart, D.J.Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd ed; Pierce Chemical Company: Rockford, IL, **1984**.
- (66): M .Ueki, M. Amemiya, *Tetrahedron Lett*, **1987**, 28, 6617.
- (67): M.Ueki, N. Nishigaki, H.Aoki, T. Tsurusaki, T.Katoh, *Chem. Lett*, **1993**, 721.
- (68): E. Atherton, R. C.Sheppard, Eds., *Academic Press: New York*, **1987**, 9, 1.
- (69): D.A.A. Kidd, F. E. King, *J.Chem.Soc*, **1948**, 62, 776.
- (70): J. C. Scheehan, VS Frank, *J. Amer. Chem. Soc*, **1949**, 71, 1856.
- (71): K.Barlos, P.Mamos, D.Papaioannou, S.Patrianakou, C. Sanida, W.Schaefer, *Liebigs Ann. Chem*, **1987**, 12, 1025.
- (72): M.Bodanszky, M. A.Bednarek, A.Bodanszky, *Int. J. Pept.Prot.Res*, **1982**, 20, 387.
- (73): J. Alsina, E. Giralt, F. Albericio, *Tetrahedron Lett*, **1996**, 37, 4195.
- (74): C. M. Stevens, R.Watanabe, *J. Am. Chem. Soc*, **1950**, 72, 725.
- (75): J .Tsuji, *Tetrahedron*, **1986**, 42, 4361.
- (76): C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron*, **2005**, 61, 10827.
- (77): W.Chu, Z. Tu, MeElveen, *Bioorg. Med.Chem*, **2005**, 13, 77.
- (78): H.H. Bosshard, R. Mory, M. Schmid, H. Zollinger, *Helv.Chem.Acta*, **1959**, 42, 1653.
- (79): U.Ragnarsson, L.Grehn, *Acc. Chem.Res*, **1998**, 31, 494.
- (80): M.H.Kim, D.V.Patel, *Tetrahedron Lett*, **1994**, 35, 5603.
- (81): Prasad KVSRG, Bharathi K, Haseena, **2011**, 8, 1, article-021.
- (82): T. Hashimoto, K. Maruoka, *WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA, Weinheim*, **2008**, 978-3-527-31842-1.

## Résumé:

Notre objectif au cours de travail consiste à synthétiser un peptidomimétique, dérivés de l'acide aminooxy acétique ce dernier se trouve largement dans la littérature de la synthèse organique et connu par ces activités biologiques. Nous avons choisi de préparer le dipeptide à partir de l'hydroxylamine, nous débutons par la protection de fonctions instantanées ensuite élongation de chaîne peptidique par une réaction de couplage finalement déprotection des extrémités de peptide et cyclisation tête-à-queue.

**Mots clés :** peptide-aminoacide-synthèse peptidiques-aminoxy peptide.

## Abstract:

Our objective during job is to synthesize a peptidemimetic, derivatives of acetic acid aminooxy it is largely found in the literature of organic synthesis and known by these biological activities. We chose to prepare the dipeptide from hydroxylamine, we start with the protection of instant functions then elongation of peptide chain by a coupling reaction finally deprotection of peptide ends and cyclization head-to-tail.

**Keywords:** peptide-amino acid-peptide synthesis-aminoxy peptide.

## ملخص:

هدفنا خلال العمل هو لتركييب شبه ببتييد من المشتقات حامض الخليك امين أكس هذا الاخير موجود إلى حد كبير في أدبيات التركيب العضوي ومعروف بالأنشطته البيولوجية. اخترنا لإعداد ثنائي الببتييد ابتداءً من هيدروكسيل، لقد بدأنا بحماية وظائف لمدة قصيرة ثم استطالة سلسلة الببتييد بتفاعل اقتران أخيراً نزع الحماية من اطراف الببتييد و تكوين حلقة من الرأس للا ذ يل.

**الكلمات المفتاحية :** الببتييد-الأحماض الأمينية- اصطناعية الببتييد- امين أكس ببتييد.

