

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE**

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEM



**Faculté des Sciences
Département de Chimie
Laboratoire de Chimie Organique, Substances naturelles et Analyses
-COSNA-**

Synthèse des tripeptides d'intérêt thérapeutique

Mémoire présenté par

MEBITIL Mourad

En vue de l'obtention du diplôme de

Master Chimie

Spécialité : Chimie Bio-Organique et Thérapeutique

Soutenu publiquement le : 25 juin 2012 devant les jurys :

Mr J. Kajima Mulengi	Directeur de mémoire	UAB – Tlemcen
Mme Drici W	Examineur	UAB – Tlemcen
Mr H. Allali	Examineur	UAB – Tlemcen
Mr A. Atmani	Examineur	UAB – Tlemcen
Mr B. Benabadji	Examineur	UAB – Tlemcen
Mr Med El Amine Dib	Examineur	UAB – Tlemcen
Mr Z. Arrar	Examineur	UAB – Tlemcen
Mr D. Bendiabdellah	Examineur	UAB – Tlemcen

D é d i c a c e

A mes parents,

A mes frères et ma sœur,

A ma famille,

A mes amis,

A toutes les mains qui m'ont été tendus.....

R E M E R C I E M E N T S

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses COSNA de l'université Aboubekr Belkaid Tlemcen, sous la direction de Monsieur le Professeur J. Kajima Mulengi.

je tiens à remercier Monsieur le Professeur J. Kajima Mulengi, directeur de mon sujet, pour m'avoir permis de réaliser ce travail dans son laboratoire (COSNA). Je le remercie pour son soutien, sa confiance, ses conseils judicieux, pour la qualité de son encadrement, sa rigueur, sa méthodologie et sa très grande disponibilité malgré ses obligations liées aux Laboratoire et l'université.

Mes plus sincères remerciements au Professeur J. Kajima Mulengi, pour l'honneur qu'il me fait de présider le jury de ce mémoire. Je remercie également Mme Drici W, Mr H. Allali, Mr A. Atmani, Mr B. Benabadj, Mr Med El Amine Dib, Mr Z. Arrar, Mr D. Bendiabdellah pour avoir accepté de juger ce travail.

Un merci tout particulier à Mr MEZRAI Abdelmoumin doctorant en Chimie pour leur aide et leur disponibilité lors de mes différents séjours au sein du laboratoire. Je remercie Mr Benariba Hassen, pour tous les spectres infrarouges.

Je remercie l'équipe de Laboratoire COSNA pour leur intérêt et leurs bons conseils. Merci à toutes les personnes qui j'ai passé ces dernières années au sein de l'UABT : CHAREF Mohamed, BENNACER Khalid, BENALI Ahmed, BELYOUSSI Oussama, GHALEM Zouleykha, AMOURI Amina, BENYAMINA Samia, BENYOUCEF Fatema, BEREKSI REGUIG Dalila, BILLAMI Esmâ, BOUAZZAOUI Wafaa, EPENIT RODY Davy Monjo, KADARI Abdelhamid, KEDDAR Miloud, MEMOU Sabah, MOKRI Fatima et avec qui j'ai passé de très bons moments.

MERCI DU FOND DU CŒUR....

TABLE DES MATIÈRES

I. <u>Introduction générale</u>	01
1- Généralités (définitions).....	02
a- Cancer.....	02
b- Métastase.....	02
c- Thérapie anti tumorale.....	02
2- Chimiothérapie.....	03
a- Produits utilisés en chimiothérapie.....	04
b- La mer, une source des produits anti tumoraux.....	06
3- Les peptides.....	06
a- Utilisation dans les médicaments.....	08
b- Difficultés liées à l'utilisation des peptides en thérapie.....	09
c- Peptidomimétiques.....	10
d- Méthodes de synthèse.....	10
e- Les analogues synthétiques de la cryptophycine.....	17
4- Objectif et plan général de travail.....	19
II. <u>Travail effectué</u>	24
1- Généralités.....	25
2- Protection de la fonction amino des aminoacides.....	26
3- Protection du carboxyle des aminoacides.....	28
4- Protection effectué.....	30
5- Couplage peptidique.....	33
6- Couplage effectué.....	36
III. <u>Conclusion et perspectives</u>	41
IV. <u>Partie expérimentale</u>	43
V. <u>Annexe</u>	73

ABREVIATIONS

Boc : tert-butyloxycarbonyl
Cbz : benzyloxycarbonyl
DCC: N, N'-dicyclohexylcarbodiimide
DCM: dichloromethane
DCU: dicyclohexylurée
DIC : N,N'-Diisopropylcarbodiimide
DMF : N,N-diméthylformamide
EPS : l'extraction en phase solide
Fmoc : 9-Fluorénylméthoxyloxycarbonyl
Ft: anhydride phtalique
HOBt: hydroxybenzotriazole
HPLC : chromatographie liquide haute performance
IF: infra-rouge
Leu : L-Leucine
Phe: phenylalanine
Pro: L-Proline
SPPS : synthèse peptidique en phase solide
TEA: triéthylamine
TFA: trifluoroacétique
THF: tétrahydrofurane
Trp: L-Tryptophane
Tyr: L-Tyrosine
β-Ala : β-alanine

Introduction Générale

1- GENERALITES (DEFINITIONS)

a- **Cancer :**

La cellule est l'unité de base de la vie. ⁽¹⁾ Un cancer est une maladie de la cellule. Une cellule cancéreuse est une cellule qui a subi des modifications fondamentales au point de ne plus contrôler sa division cellulaire. Ce genre de cellule possède des besoins énergétiques élevés.

Dans un organisme sain, ces modifications sont réparées par le système correcteur ; Par contre, les cellules tumorales perdent cette capacité de réparation, ou bien, ce système est inhibé par le pouvoir multiplicateur incontrôlable du mécanisme tumoral ^(2,3)

b- **Métastase :**

Les cellules cancéreuses ont tendance à migrer dans d'autres parties du corps par les vaisseaux lymphatiques ou par les vaisseaux sanguins, pour y développer de nouvelles tumeurs qu'on appelle métastases. ^(4, 5,6)

c- **Thérapie anti tumorale :**

Traiter un cancer consiste à éliminer la tumeur et à supprimer les cellules cancéreuses. Les traitements ont pour but de

- guérir le patient,
- réduire le risque de récurrence,
- augmenter la durée de l'espérance de vie,
- améliorer la qualité de vie.

Ces objectifs varient selon le type de cancer et son stade d'évolution. ⁽⁷⁾ Parmi les principaux traitements existant, on peut citer:

✓ **La chirurgie.**

La chirurgie permet de confirmer le diagnostic, et d'éliminer, grâce à une intervention chirurgicale, la tumeur ainsi que les éventuelles greffes cancéreuses métastatiques.

✓ **La radiothérapie.**

La radiothérapie est un traitement qui consiste à utiliser des rayons pour détruire les cellules cancéreuses. La chirurgie et la radiothérapie sont des traitements locaux du

cancer, c'est-à-dire qu'ils agissent localement sur les cellules cancéreuses de l'organe atteint ou dans les ganglions.

✓ *L'hormonothérapie.*

L'hormonothérapie est un traitement qui empêche l'action d'hormones susceptibles de stimuler la croissance des cellules cancéreuses. Ces hormones sont principalement des hormones sexuelles, œstrogène et testostérone entre autres, qui se trouvent impliquées dans le déclenchement des tumeurs hormono-dépendant comme le cancer du sein et celui de la prostate

✓ *L'immunothérapie.*

L'immunothérapie est un traitement qui vise à stimuler les défenses immunitaires de l'organisme contre les cellules cancéreuses et à lui permettre de faire face aux agressions futures.

✓ *La chimiothérapie.*

La chimiothérapie et l'hormonothérapie agissent par voie générale, c'est-à-dire qu'elles agissent sur les cellules cancéreuses présentes dans l'ensemble du corps. Il ne faut pas oublier que ces traitements ne s'adressent pas exclusivement aux cellules malades, mais ils affectent également les cellules saines. Si les cellules tumorales sont les plus touchées, c'est à cause de leur métabolisme accéléré et de leurs besoins accrus en énergie.

La radiothérapie, la chimiothérapie et l'hormonothérapie sont souvent utilisées en complément de la chirurgie pour améliorer les chances de guérison. On les qualifie alors de traitements adjuvants. Ils peuvent aussi être utilisés en monothérapie.

Chaque situation tumorale implique un traitement adapté ainsi qu'une prise en charge appropriée⁽⁸⁾. Comme notre travail est axé sur la recherche de nouveaux outils en chimiothérapie, nous allons développer cette dernière un peu plus en détail.

2- CHIMIOTHÉRAPIE :

La chimiothérapie est l'usage de certaines substances chimiques pour traiter une maladie. La majorité des substances chimiothérapeutiques utilisées dans le traitement du cancer inhibent la division cellulaire, en ciblant les cellules qui se divisent rapidement.

La chimiothérapie agit sur toutes les cellules cancéreuses, même sur celles qui n'ont pas été détectées par les examens d'imagerie.⁽⁹⁾

a- Produits utilisés en chimiothérapie :

- *Les alcaloïdes*

Substances contenant toutes au moins un atome d'azote d'où elles tirent leur activité biologique, les alcaloïdes forment un groupe très large des substances naturelles. Les sources plus prolifiques des alcaloïdes sont des organismes marins comme les cyanobactéries et *Lyngbya* marins. Les cyanobactéries produisent une grande variété d'alcaloïdes.

Certaines caractéristiques répétitives que l'on trouve dans les alcaloïdes isolés des cyanobactéries sont notamment la présence du noyau thiazole, des halogènes, particulièrement la présence du brome sur le motif indole, ainsi qu'une trichloration des groupes méthyle. Certains des composés isolés sont des médicaments connus pour leurs propriétés thérapeutiques précises. C'est le cas du Malevamide D et Jamaicamide A, isolés de *Lyngbya* marins et qui sont hautement cytotoxiques⁽¹⁰⁾.

- *Les Polyphénols*

Composés provenant du métabolisme secondaire des plantes, ils forment une famille largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés avec une structure de masse moléculaire élevée.

De plus en plus, les polyphénols prennent une importance croissante à cause de leurs effets bénéfiques sur la santé. En effet, leur rôle en tant qu'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour le traitement des maladies inflammatoires, cardiovasculaires, sans oublier le traitement du cancer.

Parmi les molécules dont l'intérêt est de plus en plus grandissant, on peut citer l'hydroxytyrosol, une substance phytochimique phénolique aux propriétés antioxydantes et anticancéreuses extrêmement intéressantes. Après l'acide gallique, l'hydroxytyrosol est considéré comme l'un des antioxydants les plus puissants qui existent. Sa capacité d'absorption des radicaux oxygène est dix fois plus élevée que celle du thé vert.

Dans la nature, l'hydroxytyrosol peut être isolé de la feuille d'olive. Il présente des propriétés immunostimulantes et antibiotiques. On le trouve également dans l'huile d'olive, sous la forme de son ester d'acide élénolique oleuropéine et en particulier après

la dégradation dans sa forme ordinaire. Cependant, à cause de sa forte solubilité dans l'eau, sa teneur dans l'huile d'olive vierge est très faible.

Un autre composé en vogue est le resvératrol : c'est un polyphénol de la classe des stilbènes qui est présent dans certains fruits comme les raisins, les mûres ou les cacahuètes. On le retrouve en quantité notable dans le vin rouge où sa présence a été invoquée pour expliquer les effets bénéfiques pour la santé d'une consommation modérée de vin.

Il est en partie responsable des effets anti-cholestérol du vin rouge, il diminue les risques d'infarctus du myocarde et les affections cardiaques. Il possède une action anticancéreuse par inhibition des trois étapes majeures associées à une tumeur : initiation, promotion et progression.⁽¹¹⁾

- *Les Terpénoïdes*

Ils sont beaucoup utilisés en raison de leurs qualités aromatiques. Ils jouent un rôle dans les traitements en herboristerie traditionnelle et font l'objet de recherche pour découvrir des effets antibactériens, antinéoplasiques ou autres effets pharmaceutiques. C'est de là que vient l'intérêt porté à la Cantharidine et la Norcantharidine qui sont des agents anticancéreux.⁽¹²⁾

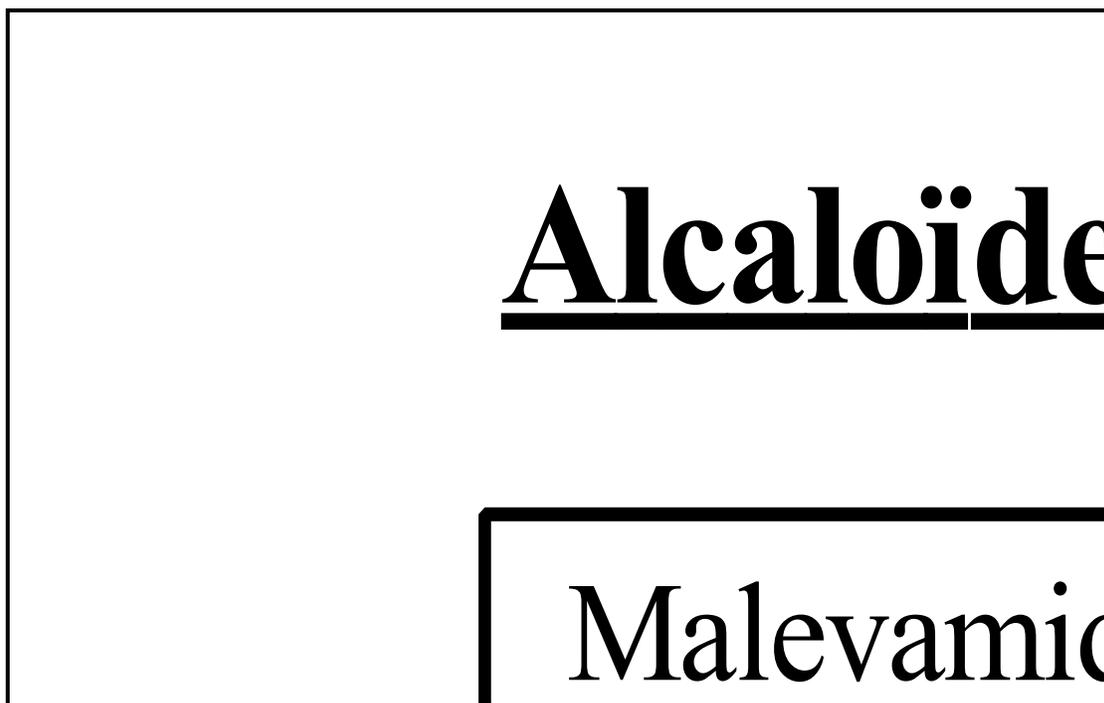


Schéma 1

b- La mer, une source de produits anti tumoraux

Le cancer est l'une des maladies les plus mortelles dans le monde. Bien que des progrès dans le domaine de la chimio-préventive et de la médecine thérapeutique ont été faits régulièrement au cours des dix dernières années, la recherche de nouveaux anticancéreux continue. Les produits naturels sont importants dans la compréhension des interactions intra et inter organismes.⁽¹³⁾ Les organismes marins sont des sources de substances potentiellement bioactives par leurs métabolites secondaires qui sont susceptibles de conduire à nouveaux agents anticancéreux.⁽¹⁴⁾

Dans ce domaine, l'environnement marin, avec sa richesse de variété d'organismes, est une source largement inexploitée de nouveaux composés ayant une activité anti tumorale, malgré l'existence de nombreux travaux portant sur l'isolation de composés anticancéreux⁽¹⁵⁾.

3- LES PEPTIDES

Les peptides et les protéines représentent plus de la moitié du poids sec des cellules dans le monde vivant. Ils possèdent de nombreuses fonctions : ils rentrent dans les processus biologiques et physiologiques pour assurer les fonctions des cellules comme la structuration, la catalyse, la compaction de l'ADN et l'expression des gènes⁽¹⁶⁾. Les peptides et protéines sont formés à partir des amino acides, unis les uns aux autres par une liaison amide appelée, liaison peptidique.⁽¹⁷⁾

Au début du 19^{ème} siècle, la chimie des peptides a fait son apparition grâce au chercheur Hermann Emil Fischer, qui a réalisé la première synthèse peptidique celle du dipeptide glycine-glycine en 1901.⁽¹⁸⁾

Les peptides n'ont pas évolué jusque dans les années 1930. La Glutathionne (Glu-Cys-Gly) et la Carnosite (β -ala-His) ont été synthétisées en 1935 et la Gramicidine S en 1947.⁽¹⁹⁾

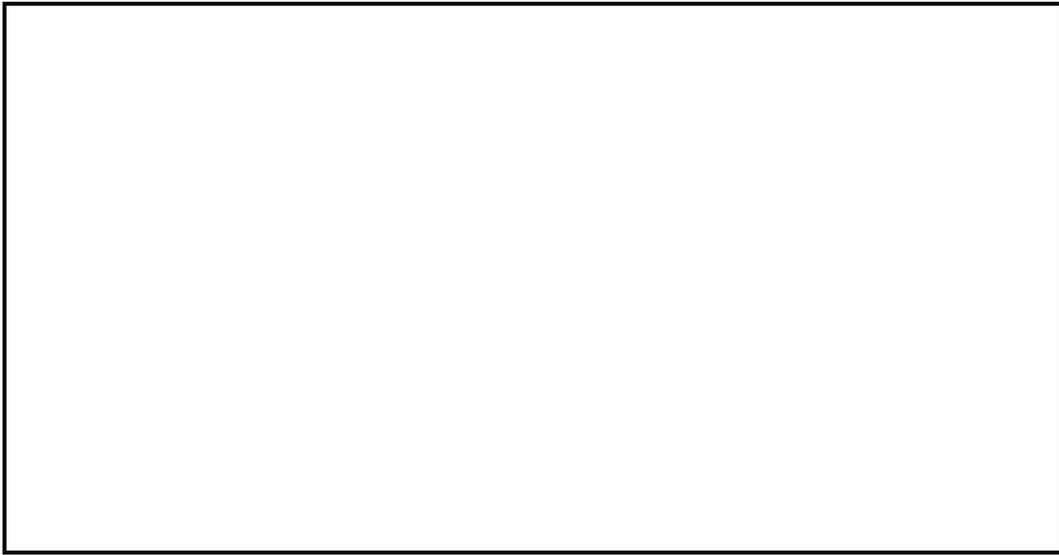


Schéma 2

Les processus vitaux des peptides sont devenus apparents au cours des années 1950 et 1960 grâce au développement des techniques d'analyse qui permettent leur isolation et leur purification.

Du Vigneaud en 1953 a contribué au développement majeur de la synthèse peptidique grâce à l'identification structurale et la synthèse totale de l'ocytocine. Cela lui a valu le Prix Nobel en 1955. Il a démontré que l'hormone naturelle et l'hormone synthétisée possédaient les mêmes activités. ⁽²⁰⁾

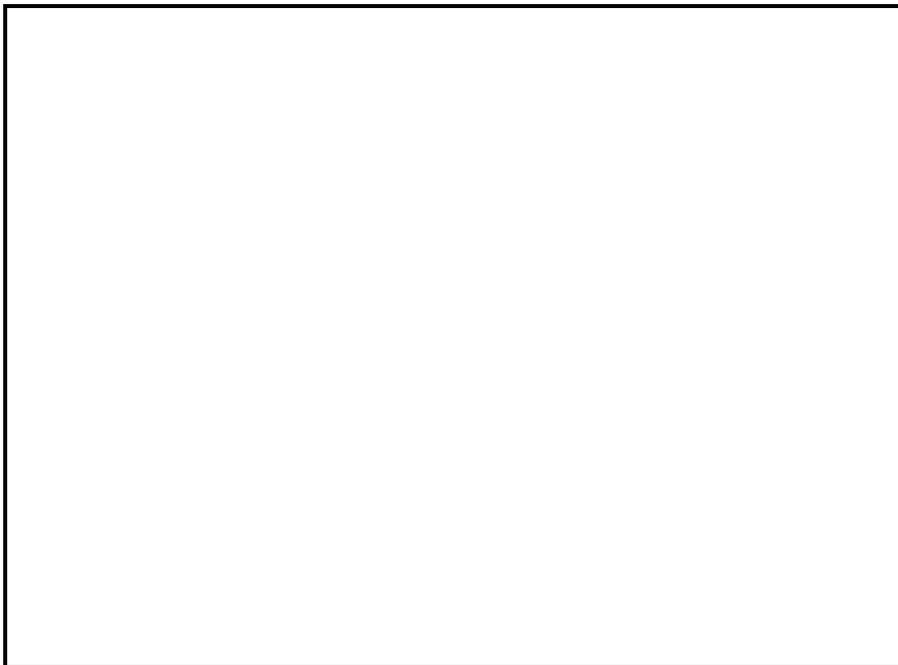


Schéma 3

Jusqu'aux années 1960, la voie de chimie classique était très longue pour la synthèse peptidique et les rendements étaient très faibles. Ainsi, la synthèse de l'oxytocine a été achevée plusieurs fois avec un rendement inférieur à 1%.

En 1984 Merrifield a reçu le Prix de Nobel grâce à la synthèse peptidique en phase solide (SPPS) qui a été à l'origine d'un développement sensible de la synthèse peptidique.

L'amélioration, le développement des techniques de séparation et la purification par chromatographie liquide haute performance (HPLC), sans oublier l'extraction en phase solide (EPS) ont permis d'augmenter le rendement et de mettre en valeur les peptides dans le domaine industriel. ⁽²¹⁾

a- Utilisation des peptides dans les médicaments:

Le développement et la découverte d'un nombre croissant de peptides qui comportent des propriétés biologiques ont dirigé les chercheurs vers l'utilisation des peptides comme des molécules thérapeutiques.

En 2004, environ 20% des médicaments à base de peptides étaient vendus dans le monde. Plus de 650 peptides étaient en étape de développement et 150 étaient aux stades cliniques dans plusieurs domaines tels que le traitement du cancer, du VIH, de l'ostéoporose et des maladies neurodégénératives. ⁽²²⁾

Théoriquement, les peptides offrent plusieurs avantages par rapport aux petites molécules. Premièrement, ils représentent la plus petite partie fonctionnelle d'une protéine. En deuxième lieu, ils peuvent offrir une efficacité, une sélectivité et une spécificité très importantes qui permettent leur utilisation en très faible quantité. Enfin, leur toxicité est très faible car les produits de leur dégradation métabolique sont des acides aminés.

Il existe plusieurs médicaments peptidiques tels que quelques hormones (insuline, calcitonine, cyclosporine A, goséréline, un immunosuppresseur, utilisé dans le traitement du cancer de sein et de la protéase).

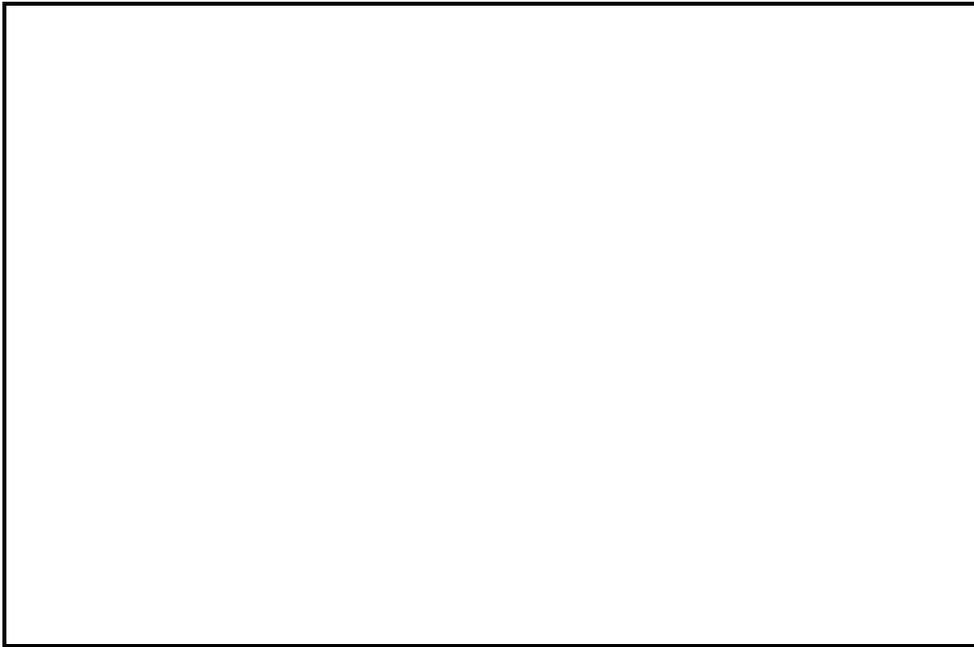


Schéma 4

b- Difficultés liées à l'utilisation thérapeutiques des peptides

Le médicament doit circuler dans l'organisme avant d'atteindre sa cible, il rencontre plusieurs obstacles tels le passage de certaines barrières et la diffusion dans des liquides, malheureusement les peptides ne combinent pas toutes les qualités qui permettent d'agir comme un bon médicament. C'est la raison pour laquelle leur usage thérapeutique reste limité. ⁽²³⁾

Un des inconvénients des peptides est leur poids moléculaire élevé qui les rend incapables de franchir le tractus digestif vers le système circulatoire ; ceci diminue leur absorption par voie orale. Par conséquent, l'administration des peptides thérapeutiques doit se faire par voie intraveineuse, ce qui provoque un manque de confort pour le patient.

Le deuxième inconvénient est leur faible stabilité métabolique au sein de l'organisme suite à une dégradation très rapide par les peptidases du système gastro-intestinal, d'où une durée de vie de l'ordre de minutes.

Par la suite les peptides présentent une faible perméabilité membranaire à cause de leur fort caractère hydrophile et polaire. Par conséquent, ils sont incapables de franchir certaines barrières biologiques comme les parois intestinales ou la barrière hémato-

encéphalique. Ceci conduit à leur rapide élimination par voie rénale si bien qu'ils ne peuvent pas atteindre le système nerveux central.

Enfin, la haute flexibilité conformationnelle des chaînes peptidiques peut entraîner l'activation d'autres récepteurs et donc des effets secondaires non désirés, alors que dans une thérapie ciblée, une seule conformation doit être privilégiée pour interagir avec un seul récepteur.

Pour conclure, les applications potentielles des peptides en tant qu'agents thérapeutiques paraissent évidentes, cependant il existe plusieurs inconvénients dans leur utilisation pharmaceutique, à cause des difficultés liées à leur administration, leur faible capacité à traverser les membranes et leur courte durée de vie ⁽²⁴⁾. Pour minimiser ces inconvénients, la recherche est orientée vers la synthèse de peptides modifiés, les peptidomimétiques.

c- Peptidomimétiques :

Malheureusement, de nombreux peptides sont rapidement dégradés par les protéases. Pour concevoir un nouveau médicament à la fois actif, sélectif et métaboliquement stable, les peptidomimétiques à conformation fixe ou limitée sont souvent recherchés comme cibles. Un peptidomimétique est un composé qui limite ou bloque l'effet biologique d'un peptide au niveau du récepteur. De manière type, il constitue une matrice rigide avec la capacité de présenter des conformations similaires à celles d'un peptide naturel. Il a été démontré que dans la plupart des cas, seuls quatre à huit chaînes latérales des acides aminés du peptide sont responsables de la reconnaissance du ligand par le récepteur.

En outre, les oligomères peptidomimétiques peuvent réduire immunogénicité, présenter une sélectivité accrue et moins d'effets secondaires, et conduire à l'amélioration de la biodisponibilité comparativement à des analogues peptidiques. ^(25,26)

d- Méthodes de synthèse :

Les peptides sont des longues chaînes moléculaires qui composent les protéines. Les peptides synthétiques sont utilisés soit comme médicaments, ou dans le diagnostic de la maladie. La synthèse des peptides n'est pas aisée, on doit veiller à ce que les acides aminés qui composent la chaîne soient ajoutés dans l'ordre correct et qu'ils ne subissent pas d'autres réactions. Par conséquent, il faut greffer les différents amino acides en

tenant compte des processus de protection et de déprotection. Tout ceci prend du temps, peut devenir laborieux spécialement lorsque les rendements s'en ressentent.

- *Synthèse organique :*

En chimie organique, la synthèse des peptides est la production de peptides, qui sont des composés organiques dans lesquels plusieurs acides aminés sont liés par des liaisons amides.

Quelques exemples peuvent nous servir pour illustrer ce propos. Le premier cas est celui de la cyclomarine, un cyclopeptide naturel. Sa synthèse implique de procéder à une rétro-synthèse afin de trouver des fragments simples à engager dans la reconstruction du squelette de départ.⁽²⁷⁾

Dans ce cas, il s'agit d'un ensemble d'acides aminés ou d'acides aminés modifiés.



Schéma 5

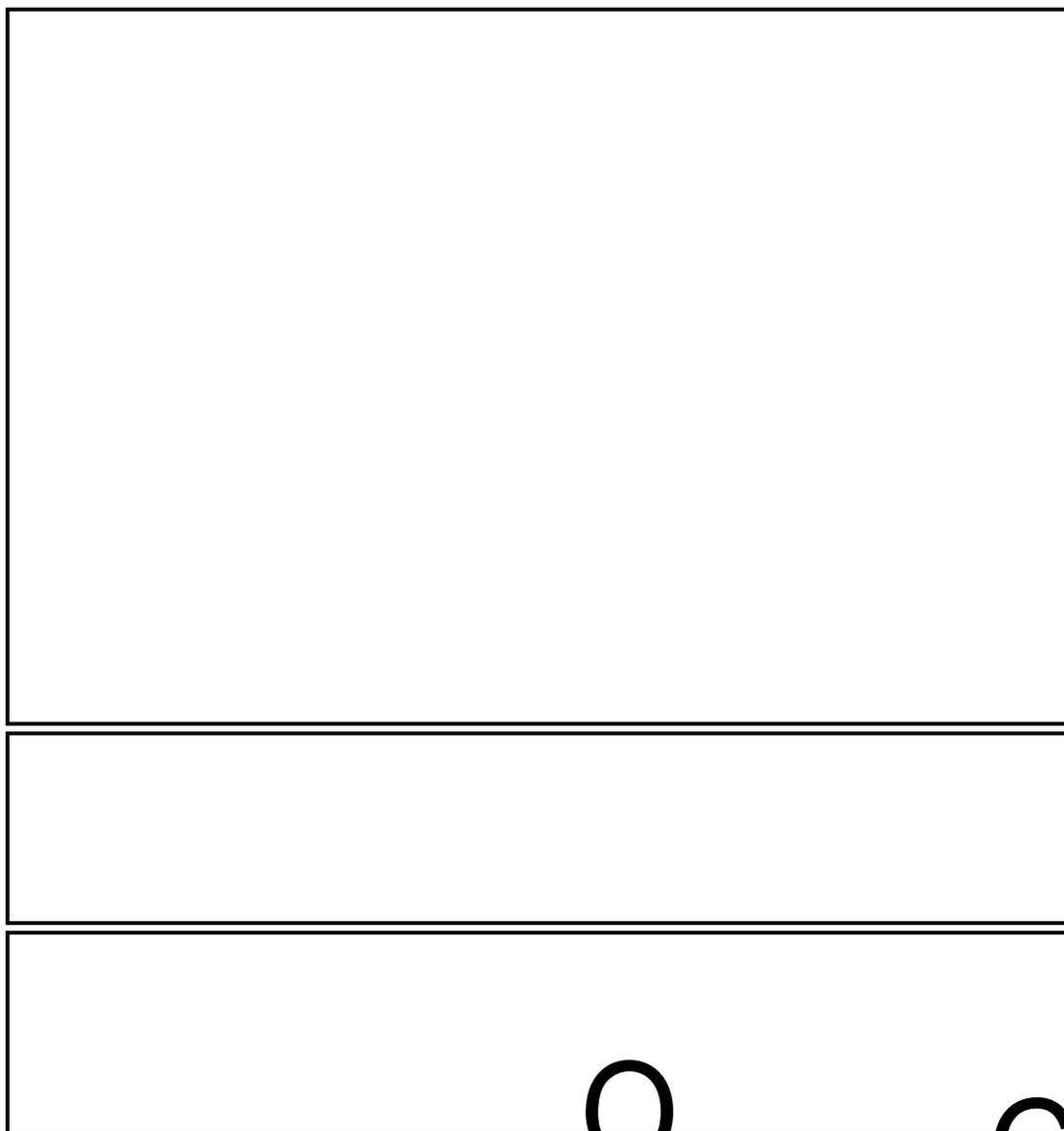


Schéma 6

a (EDCl, HOBt, CH₂Cl₂, 0°C-t.a, 24h, 75%)

b (Ag₂O, MeI, THF, 45°C, 48h, 92%)

c (EDCl, HOBt, CH₂Cl₂, 0°C-t.a, 18h, 75%)

- *Synthèse de tripeptide en phase solide :*

Depuis le travail de Merrifield en synthèse peptidique sur phase solide, qui lui a valu le Prix Nobel en 1963, la synthèse organique supportée a connu une popularité et un développement constants. La phase solide a tout d'abord été appliquée à la synthèse oligomérique de produits naturels tels que les polypeptides, polysaccharides et oligonucléotides. Ce sont les travaux de Fréchet et Leznoff, à la fin des années 1970, qui ont initié son utilisation dans la synthèse de petites molécules en effectuant des réactions organiques dans lesquelles un substrat, un réactif ou un catalyseur étaient greffés sur un polymère solide insoluble. Une autre application est la purification de mélanges réactionnels par des agents piégeants attachés sur supports solides : les « scavengers ». Un nombre important et une grande diversité de réactions organiques ont été transposés, avec succès, à la phase solide et ont été à l'origine, dans les années 1990, du développement de la synthèse combinatoire puis de la synthèse parallèle.

Une technique qui a été mise au point consiste à attacher une extrémité du peptide à un polymère solide, ce qui signifie que le peptide ne peut pas être éliminé avec l'acide en excès. C'est beaucoup plus rapide que la synthèse classique, et conduit de façon spectaculaire à l'amélioration des rendements. Le tripeptide était synthétisé par synthèse peptidique en phase solide en utilisant un synthétiseur automatique.



Schéma 7

a : Boc-NHCH(R₁) COOH (6eq, 0, 1M dans DMF), DIC (6eq), HOBt(6eq), 2h.

b : 55% TFA/ 45%DCM, 30min

c : Boc-NHCH(R₂)COOH (6eq, 0,1M dans DMF), DIC(6eq), HOBt(6eq), 2h.

d : Boc-NHCH(R₃)COOH (6eq. 0,1M dans DMF), DIC(6eq), HOBt(6eq), 2h.
e : HF, anisole, 0°C, 1,5h.

La chimie sur phase solide limite l'utilisation de solvants toxiques, inflammables, réduisant ainsi leur production et leur élimination, puisqu'elle résume les étapes de purification à de simples filtrations solide/liquide. Le polymère est recyclable, ce qui réduit les déchets. Les synthèses chimiques sont moins dangereuses et moins nocives, du fait de la grande stabilité chimique et physique des supports. L'activation par micro-ondes, ultrasons, haute pression et l'influence positive de solvants verts tels que les liquides ioniques ont été démontrées. Enfin, la toxicité ou la volatilité des composés greffés sont minimales, ce qui permet de prévenir les accidents, les maladies, les explosions et les incendies. Pour toutes ces raisons, la chimie sur phase solide a toute sa place dans le concept de la chimie verte. ⁽²⁸⁾

- *Synthèse enzymatique :*

Une nouvelle méthode efficace pour la synthèse est la synthèse multi-composée de peptidomimétiques tripeptidiques. De simples transformations chimioenzymatiques des produits de la réaction de **Passerini** permettent l'introduction de diverses fractions d'acides aminés dans l'échafaudage du tripeptide, avec un excellent contrôle de la stéréochimie. En outre, ce procédé permet l'introduction pratique d'un groupe méthyle sur l'azote de l'amide, conduisant à des dérivés de *N*-méthylés des acides aminés des composés intéressant la chimie médicinale.





Schéma 8

Les α -acétoxyamides (rac-7) ont été synthétisés par la Réaction de Passerini avec des rendements allant de bons à excellents (73-99%). A cet effet, les lipases constituent un excellent pour le contrôle de la stéréosélectivité des transformations et pour l'hydrolyse de composés racémiques 7. Ce genre d'enzymes peut être obtenu à partir de différentes sources comme les germes de blé, Novozym 435A, le pancréas du porc, les bactéries *Candida rugosa*, *Candida lipolytica*, *Pseudomonas cepacia* etc... Parmi les enzymes testées la lipase de germe de blé s'est révélée meilleure que les autres pour les réactions d'hydrolyse. ⁽²⁹⁾

- *Les peptides linéaires :*

Plusieurs familles de peptides se retrouvent dans des groupes de produits antitumoraux. C'est notamment le cas des cyanopeptides linéaires contenant les motifs thiazole et oxazole comme le Micromide. Il s'agit d'un composé cytotoxique qui contient un groupement 3-méthoxyhexanoyl qui lui confère une variété de conformations. ^(30,31, 32)

Les dolastatines sont un grand groupe de cyanopeptides cytotoxiques. A l'origine, elles ont été isolées du lièvre de mer *Dolabella auricularia*. Récemment, plusieurs dolastatines et analogues ont été isolés à partir des cyanobactéries, ce qui prouve que les cyanobactéries sont la vraie source biologique de dolastatines anticancéreuses. ^(33,34)



Schéma 9



Schéma 10

- *Les peptides cycliques*

Les peptides cycliques sont une classe inhabituelle de composés qui ont été découverts de micro-organismes, en raison de leurs activités biologiques. Ces activités vont du pouvoir antibiotique, anti-inflammatoire au pouvoir anticancéreux tels que présenté par la cryptophycine. Actuellement, ils sont l'objet d'une recherche très active comme sources potentielles de nouveaux médicaments en général et des anticancéreux en particulier.

Les cryptophycines, une famille unique de 16 chaînons macrolides, sont actuellement considérées comme l'une des pistes les plus prometteuses dans la thérapie du cancer. Le premier membre de cette famille est la cryptophycine-1. Elle a été isolée à partir de l'algue bleu-vert. L'arenastatin A, analogue structurale à la cryptophycine-1, est biologiquement et structurellement équivalente à la cryptophycine-24. Elle a été isolée de l'éponge marine.⁽³⁵⁾

Les principales propriétés de la cryptophycine sont les suivantes :

- Inhibition de la prolifération cellulaire et des métastases du cancer.
- Inhibition *in vitro* de la croissance et de l'invasion de l'organisme par les cellules tumorales.
- Inhibition de la formation de tumeurs micrométastases dans des organes éloignés. ⁽³⁶⁾

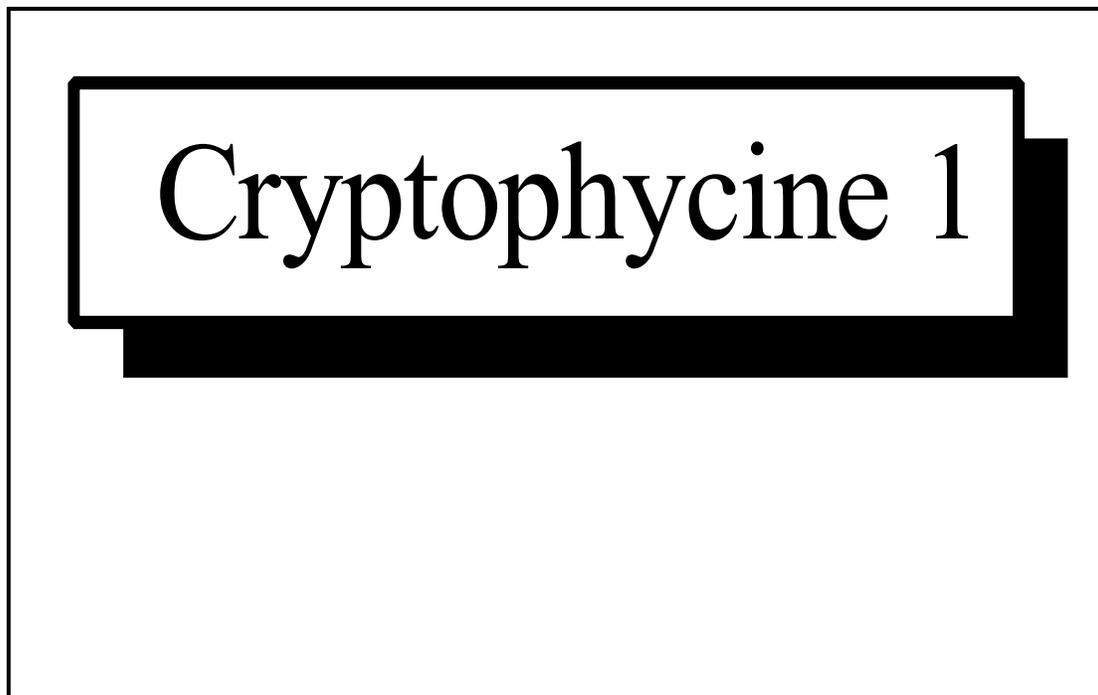


Schéma 11

Ces substances peuvent endommager les cellules, elles sont dites cytotoxiques. Certaines de ces molécules provoquent un véritable suicide cellulaire. ^(37,38)

e- Analogues synthétiques de la cryptophycine :

Chaque produit naturel a été modifié par la synthèse organique pour donner un nouvel analogue synthétique qui va moduler l'activité thérapeutique de la cryptophycine de départ, en lui gardant ses meilleurs atouts ou, au contraire, les amplifiant. ^(39,40)

Produ

Arenastatin A

Schéma 12

4- OBJECTIF ET PLAN GENERAL DE TRAVAIL :

La synthèse des peptides est un domaine de recherche plus large car on trouve plusieurs travaux et études de recherche, spécialement dans la synthèse organique, la biochimie et la biologie moléculaire.

L'objectif de notre mémoire est la synthèse de tripeptide, le choix n'a pas été fait au hasard car il est un précurseur dans la synthèse de cryptophycine qui représente les activités thérapeutiques citées précédemment.



Schéma 13

Donc l'objectif à atteindre en premier lieu est la synthèse de tripeptide [1] qui représente le fragment B de la cryptophycine naturel et après nous avons pensé à des autres analogues qu'on a synthétisé par la suite [2, 3, 4, 5]

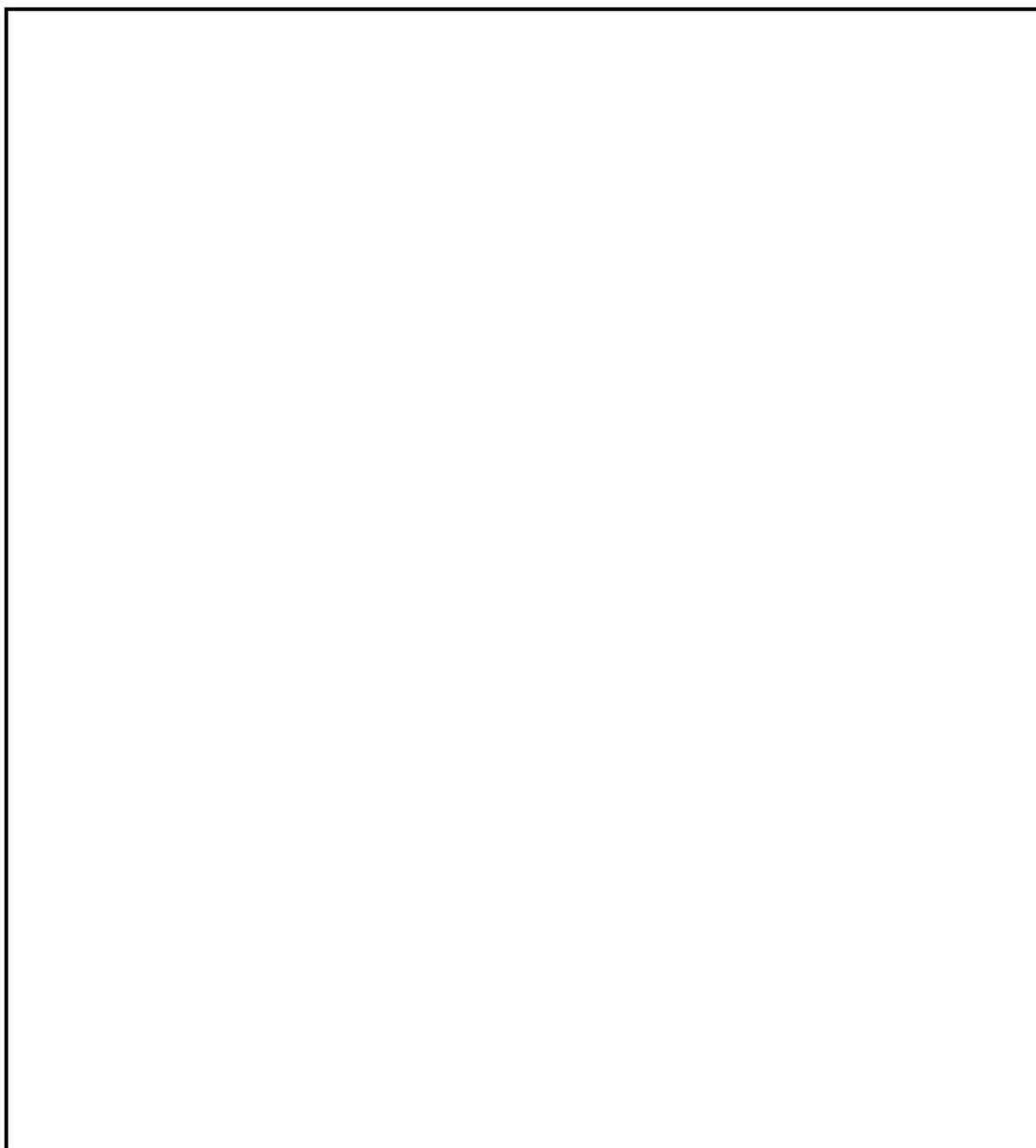


Schéma 14

Dans notre laboratoire, nous avons fait la synthèse de tripeptide de fragment B de la cryptophycine naturelle [1] et des autres analogues synthétiques [2, 3, 4, 5] et notre travail se déroule de la manière suivant :

- Protection de la fonction amino des aminoacides (L-phenylalanine, L-tyrosine, L-proline, L-tryptophane, L- β -alanine).
- Estérification du carboxyle des aminoacides (L-leucine, L- β -alanine).
- Métoxylation du Ft-L-tyrosine.

- Synthèse des dipeptides.
- Hydrolyse de la fonction ester en acide.
- Déprotection de la fonction amine.
- Et, finalement, la synthèse des tripeptides.

Référence :

- 1-*Larousse médical*, **2000**, p160.
- 2-Hamban, D. and Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*: 57-70, **2000**.
- 3-Douglas Hanahan et Robert A. Weinberg, « Hallmarks of cancer: the next generation », *Cell*, *144*, 646, **2011**.
- 4-Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al, Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* ,*351*: 337, **2004**.
- 5-Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, *26*: 1626, **2008**.
- 6-Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*, *35*: 757, **2008**.
- 7-Spitz F, Abbruzzese J, Lee J, et al. Preoperative and postoperative chemoradiation strategies in patients treated with pancreaticoduodenectomy for adenocarcinoma of the pancreas. *J Clin Oncol*, *15*:928,**1997**.
- 8-Jing Jin, M.D, Zhongxing Liao, Induction chemotherapy improved outcomes, *60*, 427, **2004**.
- 9- V. Srivastava et al. *Bioorg. Med. Chem.* *13*:5892,**2005**.
- 10-L.T. Tan, *Phytochemistry* ,*68* :954, **2007**.
- 11-R.Bemini et al, *European journal of medical chemistry*, *46* :439,**2011**.
- 12-C.-B. Yeh et al. *European Journal of Medicinal Chemistry* *45*:3981,**2010**.
- 13-C. Wagner et al. *Phytochemistry* *69* :323, **2008**.
- 14-Ali A. El Gamal. *Biological importance of marine algae.* *18* :1, **2010**.
- 15- M. Schumacher et al. / *Biotechnology Advances* ,*29* : 531,**2011**.
- 16-Fischer, E., Fourneau, E. Ber. *Them. GM.* *34*: 2868, **1901**.
- 17-Harington, C.R., Mead, H. *Biochem. J.* *29* :1602,**1935**.
- 18-Siffert, R.H., Du Vigneaud, V. J. *Biol.Chem.* *108* : 753,**1935**.
- 19-Consden, R., Gordon, A.H, Martin, A. J. P. *Biochem. J.* *41*: 596, **1947**.
- 20-Du Vigneaud, C.W., Katsoyannis, P. G., Gordon, S. J. *Am. Chem. Soc.* *75*: 4879,**1953**.
- 21-Merrifield, B. J. *Am. Chem. Soc.* *85*: 2149,**1963**.
- 22-McGee, P. *Drug Discovery Dev.* *4*,**2005**.
- 23-Loffet, A. J. *Pept. Sci.* *8* : 1,**2002**.
- 24-Lipinski C.A. et al. *Adv. Drug Delivery Rev.* *46* : 3,**2001**.
- 25-P. W. Latham; Therapeutic peptides revisited. *Nature Biotechnology.* *17*: 755, **1999**.
- 26-C. Adessi and C. Soto; Converting a peptide into a drug. *Med. Chem.* *9*: 963, **2002**.
- 27-K. Sathish et al. / *Tetrahedron:Asymmetry.* *22*:1568,**2011**.
- 28-A.N. Acharya et al. *Tetrahedron.* *57* :9911, **2001**.

- 29- W. Szymanski et al. / *Tetrahedron* 63 :7647,**2007**.
- 30-Van Wagoner Et Al, *Biogenetic Diversity Of Cyanobacterial Metabolites*, 89-217,**2002**.
- 31-Klein, D., Daloze, D., Hoffmann, L., Castillo, G., and Demoulin, V Lyngbyapeptin A, a modified, *Tetrahedron Lett.* 40:695, **1999**.
- 32-Williams, P. G., Yoshida, W. Y., Moore, R. E. Micromide and guamamide: Cytotoxic alkaloids from a species of the marine cyanobacterium *Symploca*. *J. Nat. Prod.* 67:49, **2004**.
- 33- A.M. Burjaet al. *Tetrahedron* . 57 : 9347. **2001**.
- 34-Luesch, H., Harrigan, G. G., Goetz, G. The cyanobacterial origin of potent anticancer agents originally isolated from sea hares. *Curr. Med.Chem.* 9:1791, **2002**.
- 35- M. A. Khanfar et al. *Bioorg. Med. Chem.* 17:6032,**2009**.
- 36- M. Schumacher et al. / *Biotechnology Advances* ,29 : 531,**2011**.
- 37- D,L,Varie et al, *Bioorg.Med.Chem,Lett*,9:369,**1999**.
- 38- J,M,Muys et al, Cryptophycins and related analogs, *Bioorg.Med.Chem ,Lett*,6:1111,**1996**.
- 39-D,L,Varie et al, *Bioorg.Med.Chem,Lett*,9:369,**1999**.
- 40- J ,Muys et al, Cryptophycins and analogs, *Bioorg.Med.Chem ,Lett* ,6: 1111, **1996**.

Travail
effectué

1- Généralités :

Les aminoacides sont des composés qui possèdent une fonction amino (basique) et une fonction acide carboxylique (acide). On note plusieurs familles d'acides aminés. Les α -aminoacides : les fonctions amine et acide carboxylique sont portées par le même carbone et les β -aminoacides: la fonction acide se trouve en position β de la fonction amine.

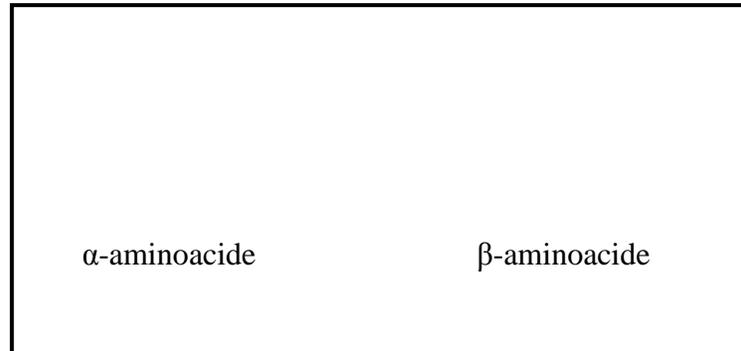


Schéma 1

Les aminoacides sont très importants en biochimie et en biologie car c'est eux qui constituent les protéines. Les protéines sont obtenues à partir d'acides aminés naturels et il en existe une vingtaine.

Les aminoacides naturels ont une configuration absolue de type S ou L en représentation de Fischer. ⁽¹⁾



Schéma 2

Souvent, les acides aminés sont représentés sous forme ionique, l'acide est déprotoné et en contre partie l'amine est protonée. NH_3^+ est un groupe électro attracteur, donc le carboxyle d'un acide aminé est plus acide que celui d'un carboxyle ordinaire. La liaison hydrogène intramoléculaire qui se forme stabilise la forme acide et donc augmente l'acidité.

Pour travailler sur les aminoacides, il faut faire des transformations chimiques satisfaisantes ; ceci impose de bloquer une ou plusieurs fonctions réactives sur la molécule (le groupe amine NH_2 , hydroxy OH , thiol SH , carboxylique COOH).⁽²⁾

Chaque groupement protecteur possède une spécificité de stabilité, de fixation et d'élimination en fonction des conditions opératoires.⁽³⁾

2- Protection de la fonction amino des aminoacides.

Le groupe amino doit être protégé par un groupe qui est stable vis-à-vis de la plupart des manipulations chimiques et qui peut facilement être éliminé dans des conditions douces.

- **Le t-butyloxycarbonyle (BOC) :** est le groupe le plus largement utilisé pour la protection des amines.⁽⁴⁾ La première utilisation du groupement t-butoxycarbonyle (Boc) pour la protection de la fonction amine dans les aminoacides au cours d'une synthèse peptidique est réalisée par McKay, Albertson, Anderson et Mc George.^(5,6)



Schéma 3

Condition de déprotection de Boc par les acides:



Schéma 4

- HCl dans l'acétate d'éthyle
 - HCl 1N dans l'acide acétique
 - L'acide trifluoroacétique (TFA)
 - 50% TFA dans CH₂Cl₂
 - Acide formique BF₃ étherate dans l'acide acétique
 - CF₃-SO₃H
 - HF liquide
- **Le 9- fluorenylméthoxycarbonyle (Fmoc) :** est largement répandu dans la chimie de peptide et la chimie en phase solide de peptide. Il est très stable dans des conditions acides. A.Caprino et Y.Han ont été utilisé ce groupe (Fmoc) pour la première fois dans la protection de la fonction amine .Dans des conditions acides, le groupe (Fmoc) est stable et résiste à l'hydrogénation catalytique mais son clivage s'effectue dans des conditions basiques et douces en présence d'une base comme la pyridine ou la morpholine à température ambiante.^(7,8)

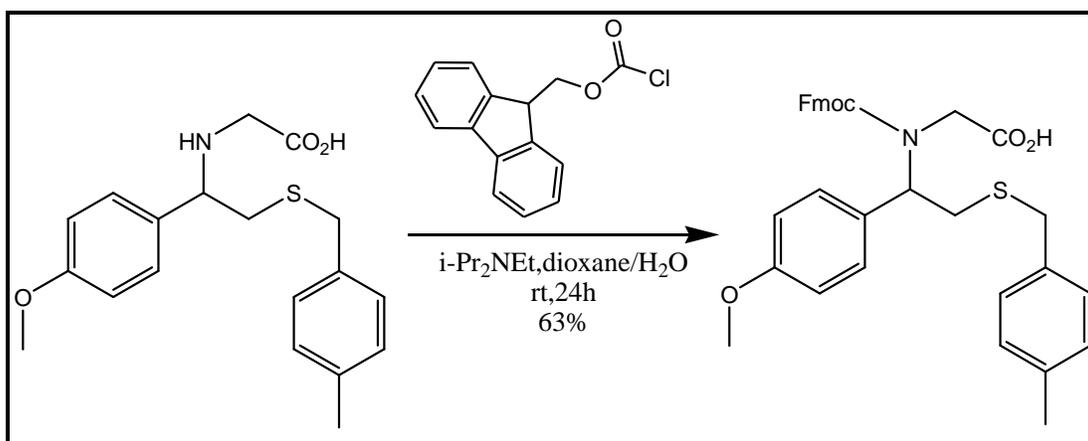


Schéma 5

- **Le benzyloxycarbonyle (Cbz):** est un groupe protecteur le plus utilisé pour la fonction amine ; il est très stable dans des conditions acides et bon groupement partant qui peut être éliminé par plusieurs méthodes. Il est obtenu par l'action de l'acide aminé sur le chlorure de benzyloxycarbonyle.^(9,10)

Condition de déprotection de Cbz:

- Hydrogénation catalytique
- Réaction avec le sodium dans l'ammoniac liquide

- HCl anhydre dans l'éthanol ou CH_3Cl
- Iodure de phosphonium dans l'acide acétique
- HCl, HBr et HI dans l'acide acétique
- L'acide trifluoroacétique chaud

- **L'anhydride phtalique (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'hydrazine. Les acides phtaliques ont été utilisés pour la première fois dans la synthèse peptidique par Kidd et King en 1948.^(11,12)

Protection :

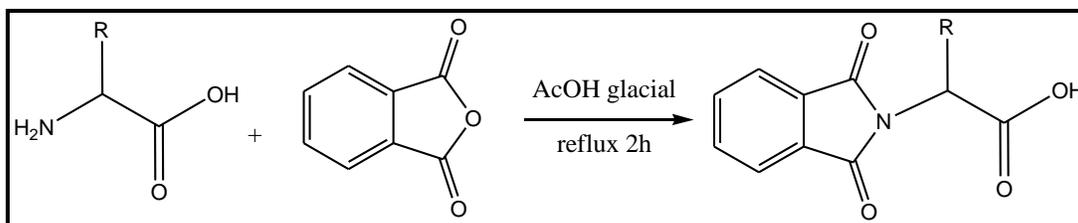


Schéma 6

Déprotection :

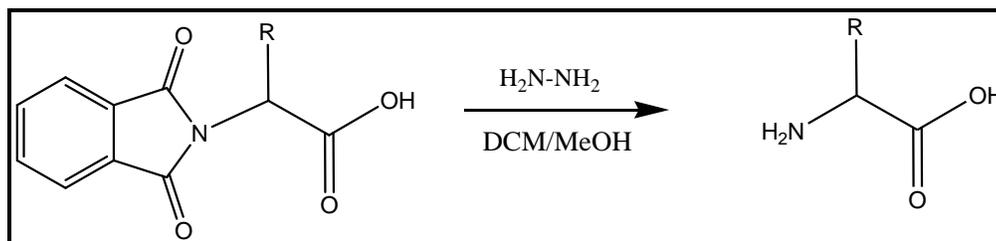


Schéma 7

3- Protection du carboxyle des aminoacides

Généralement, on trouve la protection des acides sous forme d'ester, mais il existe plusieurs types d'esters et les plus utilisés sont:

- **L'ester benzylique:**

Celui-ci est facilement clivé par hydrogénation catalytique pour obtenir l'acide aminé et le toluène. ⁽¹³⁾

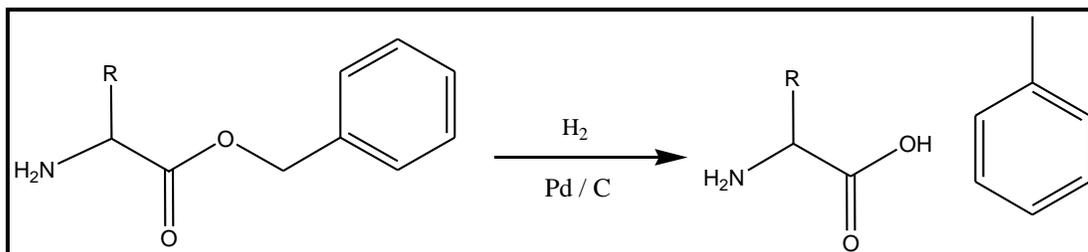


Schéma 8

- **L'ester tertiobutylique:**

Dans la chimie des acides aminés et des peptides, on utilise souvent l'ester tertiobutylique qui peut être facilement éliminé avec l'acide trifluoroacétique (TFA). ^(14,15)

Protection :



Schéma 9

Déprotection :



Schéma 10

- **Ester méthylique**

Protection :⁽¹⁶⁾



Schéma 11

Déprotection :⁽¹⁷⁾



Schéma 11

4- Protection effectuée :

Notre objectif est de protéger la fonction amine et la fonction acide des aminoacides. Pour cela, on commence par la fonction amine, ce qui permet de travailler sur la fonction acide. Dans notre laboratoire la protection de la fonction amine est effectuée avec deux groupements protecteurs :

- L'anhydride phtalique dans l'acide acétique glacial sous un reflux de deux heures fournit un N-phtalimido-acide.^(11,12)

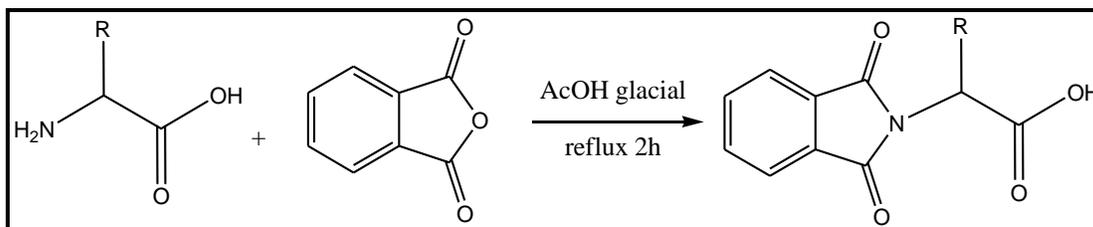


Schéma 12

Mécanisme :



Schéma 13

- L'anhydride acétique fraîchement distillé dans l'acide acétique glacial sous un reflux de deux heures fournit un *N*-acétyl-acide qui est purifié par la suite.

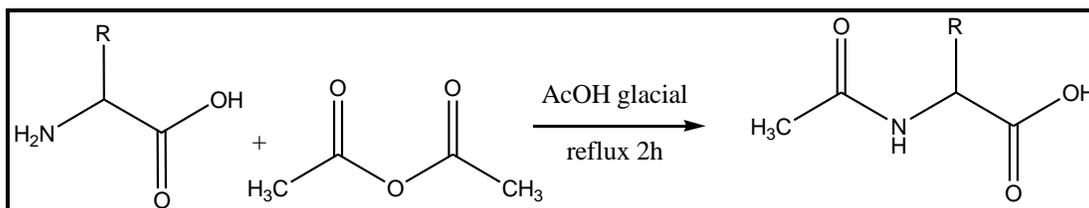


Schéma 14

Mécanisme :

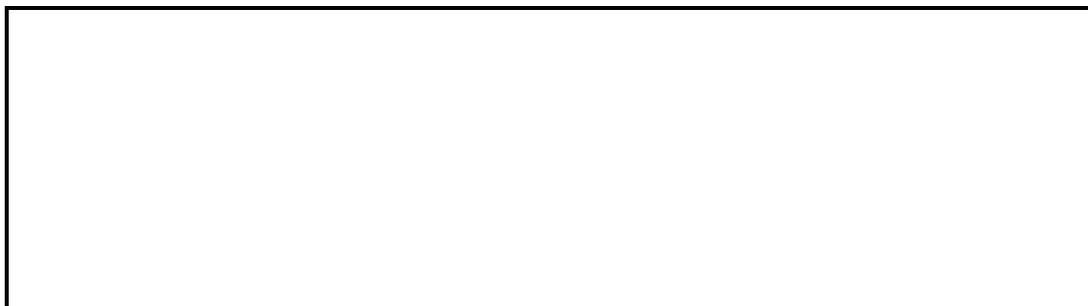


Schéma 15

À propos de la fonction acide, nous nous intéressons à la bloquer avec un groupement méthylique afin de pouvoir associer un autre amino-acide protégé. Ainsi, un amino-acide dans le chlorure d'acétyle et le méthanol sous un reflux de deux heures fournit un ester méthylique.⁽¹⁶⁾



Schéma 16

Mécanisme :

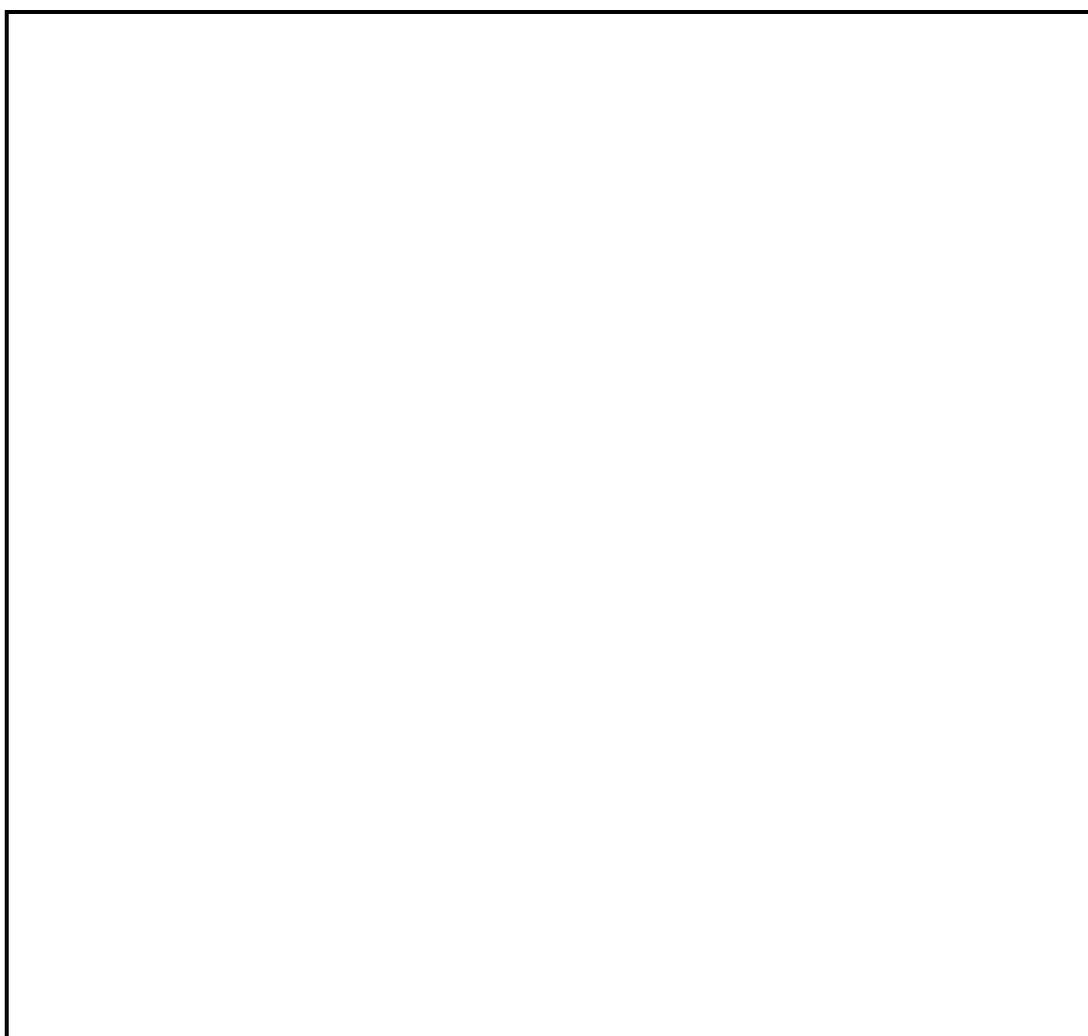


Schéma 17

5- Couplage peptidique :

La synthèse peptidique comprend une large gamme de techniques et de procédés qui permettent la préparation de molécules conduisant à des petits peptides aux protéines de grande taille. Cette partie se concentre sur les réactifs de couplage.

Une étape clé dans le processus de production de peptides est la formation de la liaison peptidique. Cela nécessite l'activation d'un acide carboxylique, qui est habituellement effectuée en utilisant les réactifs de couplage de peptides. La réalisation d'une liaison peptidique entre deux segments d'acides aminés est l'une des plus importantes réactions en chimie organique et bioorganique.⁽¹⁸⁾

De nombreuses stratégies ont été conçues pour la formation d'une liaison amide d'un acide carboxylique et un groupe amino, impliquant en général la protection, l'activation, le couplage et des étapes de déprotection. Ces dernières années, des réactions de couplage peptidique ont été avancées en conformité avec le développement de nouveaux réactifs de couplage peptidique en synthèse organique, développement qui a été régulièrement accéléré au cours des dernières années.⁽¹⁹⁾

- **Les halogénures d'acyle :**

Parmi les méthodes d'activation des acides carboxyliques la synthèse de chlorures d'acyle est une des méthodes parmi les premières à être mises en oeuvre. Lors de la synthèse peptidique on active l'acide en chlorure d'acyle, grâce à une série de réactifs notamment, SOCl_2 , $(\text{COCl})_2$, PCl_3 , POCl_3 ou le PCl_5 (en passant par E1) en présence de diméthylformamide comme un catalyseur. Par la suite, la formation de la liaison amide est effectuée à partir d'une amine avec le chlorure d'acyle dans un milieu basique.⁽²⁰⁾



Schéma 18



Schéma 19

Le chlorure d'acyle est moins utilisé dans le couplage peptidique à cause de HCl libéré qui peut hydrolyser le groupement protecteur.⁽²¹⁾

- **Les acylazides :**

Parmi les premiers intermédiaires décrits dans la synthèse peptidique, on trouve les acylazides, qui sont obtenus à partir d'un ester méthylique. Ce processus comporte deux étapes : le groupement méthoxy est remplacé par l'hydrazine ; l'hydrazide obtenu subit une réaction de nitrosation qui donne un acylazide après extrusion d'azote.⁽²²⁾



Schéma 20

On peut obtenir l'acylazide en une seule étape par l'utilisation de l'azide de diphenylphosphonique (DPPA).⁽²³⁾



Schéma 21

- **Acylimidazole (DCI) :**

La recherche de meilleur réactif de couplage a fait ressortir le DCC comme réactif parmi les plus accessibles. Cependant, d'autres ont été développés comme le diimidazole (DCI)⁽²⁴⁾. C'est un agent de couplage utile dans la synthèse des peptides, des esters et des thioesters.⁽²⁵⁾



Schéma 22

- **Anhydrides :**

Les anhydrides sont utilisés comme des intermédiaires réactionnels, ils sont très efficaces dans les couplages peptidiques. Il existe deux types d'agents utilisés dans cette procédure : les anhydrides symétriques et les anhydrides mixtes.

Pour les anhydrides symétriques on peut citer le DCC qui est le plus utilisé :

N, N'-dicyclohexylcarbodiimide est un composé organique de formule chimique $C_{13}H_{22}N_2$ dont la principale utilisation est le couplage des acides aminés pendant la synthèse peptidique. Dans des conditions normales, il existe sous la forme de cristaux blancs dur, l'odeur douce. Le point de fusion de ce matériau à faible température de fusion lui permet d'être fondu pour faciliter la manipulation. Il est hautement soluble dans du dichlorométhane, le tétrahydrofurane, l'acétonitrile et le diméthylformamide, mais insoluble dans l'eau. Le DCC et le diisopropylcarbodiimide (DIC) sont couramment utilisés pour préparer des amides, des esters et des anhydrides d'acides à partir des acides carboxyliques.^(26,27)

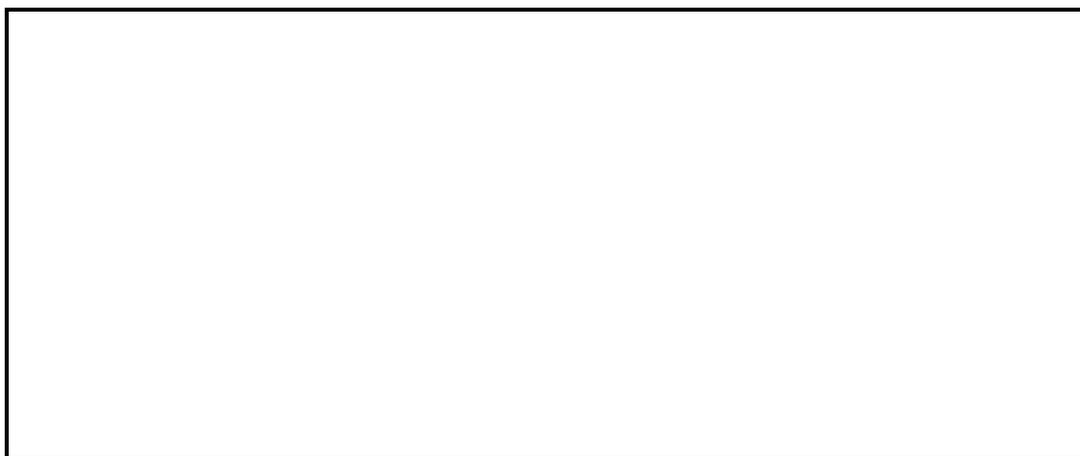


Schéma 23

6- Couplages effectués :

Concernant notre travail, nous avons synthétisé différents dipeptides entre deux aminoacides : l'un des deux porte une fonction amine protégée et la fonction acide libre et le contraire pour le deuxième aminoacide, tout cela en présence de DCC comme agent activant. On fait réagir les deux aminoacides dans le dichlorométhane (DCM) comme solvant, puis on ajoute la triéthylamine (TEA) pour neutraliser le chlorhydrate. Ensuite,

on ajoute une solution de DCC dans le DCM ($0^{\circ}\text{C} - \text{t.a}$) sous une très forte agitation pendant 24h. À la fin, la dicyclohexylurée (DCU) formée est éliminée par filtration.^(26,27)

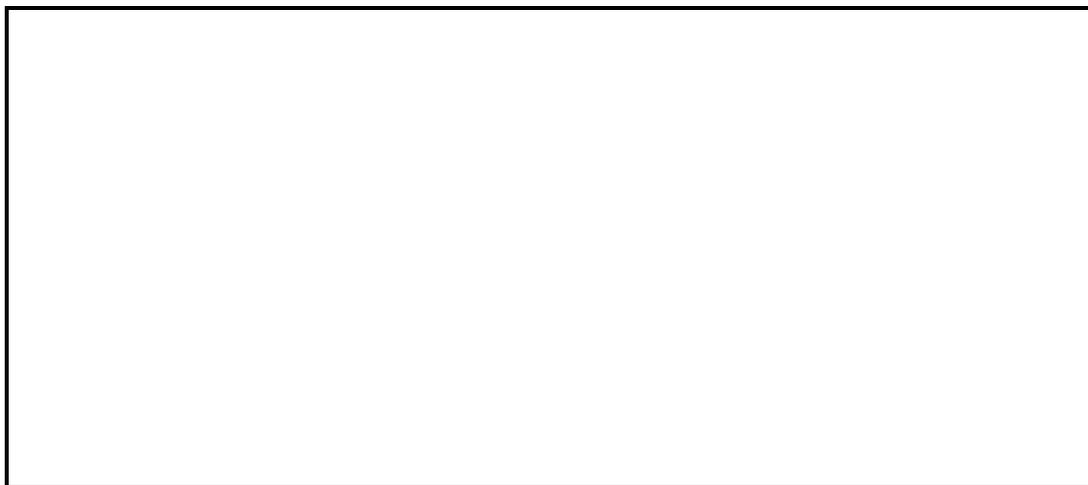


Schéma 24



Schéma 25



Schéma 26

Pour la synthèse du tripeptide, il faut avoir un dipeptide libre à une extrémité. Nous avons retenu deux voies de synthèse pour le faire :

Hydrolyse de la fonction ester en acide : il faut dissoudre le dipeptide dans un mélange THF/ H₂O, puis on ajoute l'hydroxyde de lithium sous une agitation pendant une nuit.
(17)



Schéma 27

Déprotection de la fonction amine : on ajoute l'hydrate d'hydrazine à une solution d'acidoamine dissoute dans un mélange de dichlorométhane et de méthanol, sous agitation à température ambiante pendant une nuit. ⁽¹²⁾

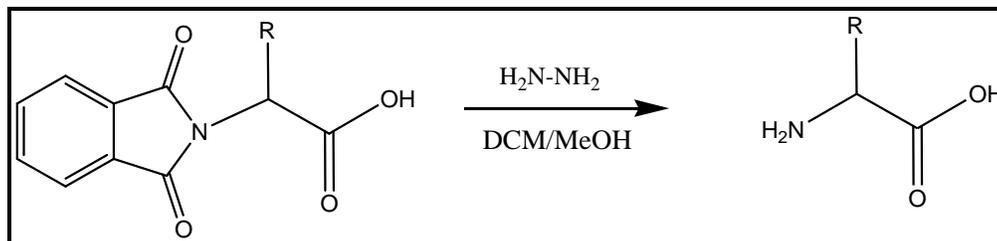


Schéma 28



Schéma 28

Références :

- 1- Jie Jackli, Chris Limberakis, Modern organic synthesis in the laboratory, *Oxford univ, USA*,**2007**.
- 2- M. Mikalajczyk, P.Balczewski, *Synthesis*, 659:**1987**.
- 3- J. Domagala, J. Wemple, *Tetrahedron Lett*, 14:1179, **1973**.
- 4- Davis, F. A.; Yang, B.; Deng, J. J. *Org. Chem.* 68:5147, **2003**.
- 5- L.A. Caprino, *J. Am. Chem. Soc*, 79:98, **1957**.
- 6- F.C. McKay, N.F. Albertson, *J. Am. Chem. Soc*, 79:6186, **1957**.
- 7- Tchertchian, S.; Hartley, O.; Botti, P. J. *Org. Chem.* 69: 9208, **2004**.
- 8- At herton, E.; Sheppard R.C. in the Peptides, *Academic Press: New York*, 9:1, **1987**.
- 9- M. Bergmann, L. Zervas, *Ber*, 65:1192, **1932**.
- 10- R. H. Sifferd, Duvigneaud, *J.Biol. Chem.* 108 :753,**1935**.
- 11- D. A. Kidd, F. E. King, *Nature*, 62:776, **1948**.
- 12- A. Rougny, M.Daudon, *Chem Soc*, 5:833, **1976**.
- 13- Hartung, W. H.; Simonoff, *Org.React*, 7:263, **1953**.
- 14- McCloskey, A.L. Fonken, G.S.; Kluber, R.W.; Johnson, W.S. *Org.Synth. 1* :261,**1963**.
- 15- Bryan, D.B. Hall, R.F. Holden, K.G. Huffman, W.F. *Chem.Soc.* 99:2353, **1977**.
- 16- Danishefsky, S. Harayama, T. Berman, E. *Chem.Soc.* 100:6536, **1978**.
- 17- Corey, E. J. Szekely, I. Shiner, C. S. *Tetrahedron Lett.* 3529, **1977**.
- 18- Carpino LA et al. Peptide Synthesis via amino acid halides. *Acc.Chem.Res.* 29: 268, **1996**.
- 19- Bodansky M, Martinez J. Side reactions in peptide synthesis. *Synthesis*. 333,**1981**.
- 20- Chu, W, Tu, Z, McElveen, *Bioorg. Med;Chem*, 13:77,**2005**.
- 21- Sanchez-Sancho, F. Man, E. *Syn Lett*, 4:509, **2000**.
- 22- Montalbetti, C.A.G.N. Flaquer, V. *Tetrahedron.* 61 :10827, **2005**.
- 23- Shioiri, T. Ninomiya. K. *Am Chem Soc*, 94 :6203, **1972**.
- 24- Anderson, G.W, Paul, R. A New Reagent For Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 80:4423,**1958**.
- 25- Poduska, K. Gross, H. *Chem, Ber.* 49:527, **1961**.
- 26- Kim, M.H, Patel, D.V, as reagent for mild and efficient preparation of esters. *Tetrahedron Lett.* 35: 5603,**1994**.
- 27- Prasad KVSRG, Bharathi K and Haseena, 8, 1, **2011**; Article-021.

Conclusion et perspective

Conclusion et perspectives :

Un nombre très important des peptides dont le squelette de base a été modifié, synthétisé ont conduit à des substances potentiellement bioactifs qui pourraient représenter un nouveau chemin dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques.

Notre mémoire s'est attaché à préparer des précurseurs de la cryptophycine. Le fragment B est un tripeptide constitué de trois acides aminés : L-leucine, L- β -alanine et L-tyrosine. Nous avons remplacé la L-tyrosine par d'autres acides aminés (L-phénylalanine, L-tryptophane et L-proline) afin de constituer une courte chimiothèque d'analogues potentiels. Ces tripeptides ont été obtenus selon un schéma synthétique accessible avec des réactifs disponibles au laboratoire.

Cet ensemble de synthons nous met en condition de pouvoir non seulement tenter la synthèse d'une série d'analogues de la cryptophycine mais aussi de procéder à la construction de cyclopeptides d'intérêt pour la recherche en thérapie anticancéreuse et l'accès à des antibiotiques peptidiques.

Partie

Expérimental

Appareils utilisés :

➤ 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 DCM ou sous forme pastilles de KBr. Les principales fréquences d'absorption sont données en nombre d'onde (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 solvants :

L'anhydride acétique : distillé a pression atmosphérique.

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

Le méthanol : distillé et gardé dans une bouteille contenant le tamis moléculaire.

1. Recristallisation de l'anhydride phtalique:

On distille l'anhydride acétique ($P_{\text{eb}}=134^{\circ}\text{C}$). On recristallise l'anhydride phtalique dans l'anhydride acétique fraîchement distillé, après on fait des lavages avec l'éther trois fois. On laisse refroidir à température ambiante, et le solvant est chassé sous pression réduite.

2. Protection de la L-phénylalanine:

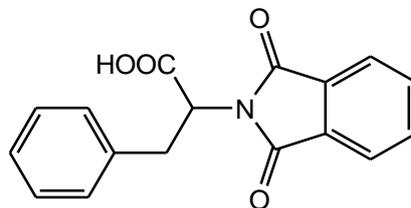
- Schéma réactionnel :

- Mode opératoire :

Dans un Bicol, on introduit 5g de L-phénylalanine (30,28mmol) dans 50 ml d'AcOH. On ajoute 4,48g d'anhydride phtalique recristallisé (30,28mmol). On porte à reflux pendant 2 h, et après on évapore un peu de solvant (AcOH Glacial) sous vide.

Une recrystallisation du produit dans le mélange eau-éthanol (3 :1) permet d'isoler 4g (Rdt=43%) solide blanc.

- Résultat :N-phtalimido-L-phénylalanine



$C_{17}H_{13}NO_4$: MM=295,29g/mol

Rdt =43%

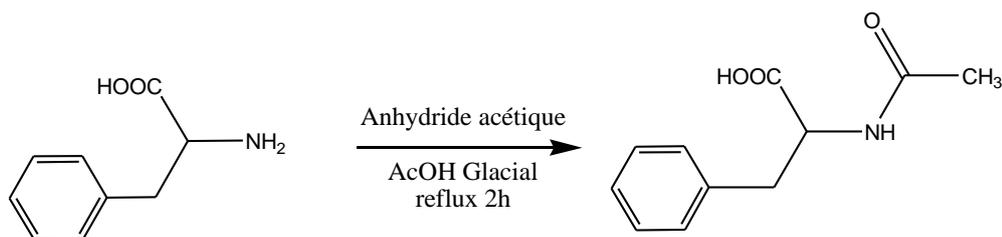
Aspect: solide blanc

Pf =165°C

IR v max(KBr)cm⁻¹: (3265,30; 1748,09;1772,32 ;1698,06).

3. Protection de la L-phénylalanine (autre approche) :

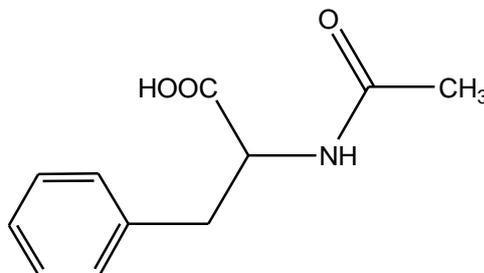
- Schéma réactionnel :



- Mode opératoire :

Dans un Bicol, on introduit 5g de L-phénylalanine (30,26mmol) dans 50 ml d'AcOH. On ajoute 3,09g d'anhydride acétique fraîchement distillé (30,26mmol). On porte à reflux pendant 2 h, et après on évapore le solvant (AcOH Glacial). Une cristallisation du produit dans l'éther permet d'isoler 5,7g (Rdt=90%) solide blanc.

- Résultat :N-acétyl-L-phénylalanine



$C_{11}H_{13}NO_3$, MM=207,23g/mol

Rdt =90%

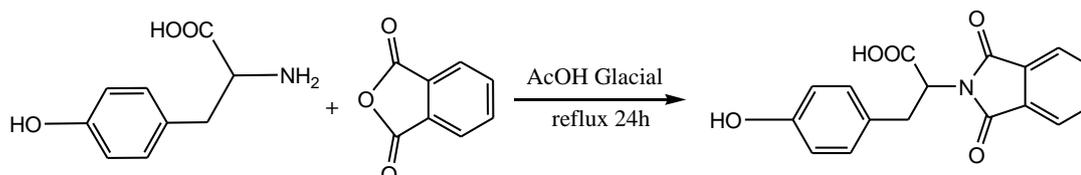
Aspect: solide blanc

Pf =136°C

IR v max (KBr) cm^{-1} : (3331,29 ; 3030,72 ; 1701,73 ; 1612,99).

4. Protection de la L-tyrosine

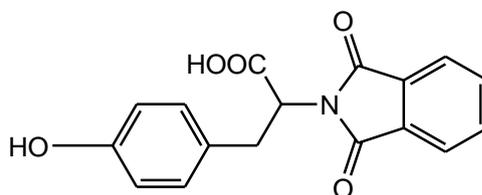
- Schéma réactionnel :



- Mode opératoire :

Dans un Bicol, on introduit 5g de L-tyrosine (27,59mmol) dans 50 ml d'AcOH. On ajoute 4,08g d'anhydride phtalique recristallisé (27,59mmol). On porte à reflux pendant 24 h, et après on évapore le solvant (AcOH Glacial). Une recristallisation du produit dans le mélange eau -éthanol (3 :1) permet d'isoler 6,15g (Rdt=72%) solide blanc.

- Résultat :N-phthalimido-L-tyrosine



$\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{NO}_5$, MM=311,29g/mol

Rdt =72%

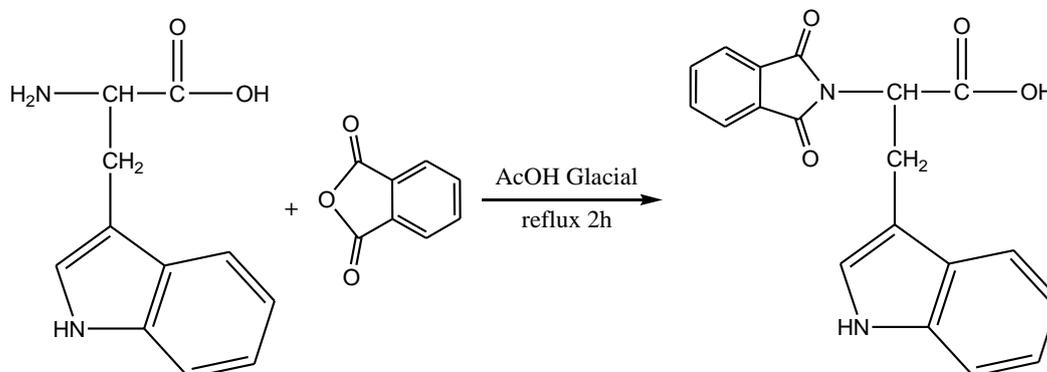
Aspect: solide blanc

Pf =190°C

IR v max (KBr) cm^{-1} : (3563,81; 3365,69;1771,18; 1725,02; 1697,87)

5. Protection de la L-tryptophane

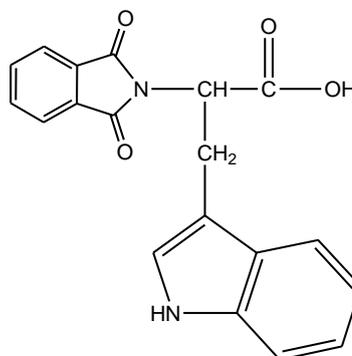
- Schéma réactionnel :



- Mode opératoire :

Dans un Bicol, on introduit 5g de L-tryptophane (24,48mmol) dans 50 ml d'AcOH. On ajoute 3,62g d'anhydride phtalique recristallisé (24,48mmol). On porte à reflux pendant 2 h, après on évapore le solvant (AcOH Glacial) avec un rota vapeur. Une recristallisation de produit dans le mélange eau-éthanol (3 :2) permet d'isoler 6,15g (Rdt=72%) solide jaune.

- Résultat : N-phthalimido-L-tryptophane



$C_{19}H_{14}N_2O_4$, MM=334,33g/mol

Rdt =90%

Aspect: solide jaune

Pf =176°C

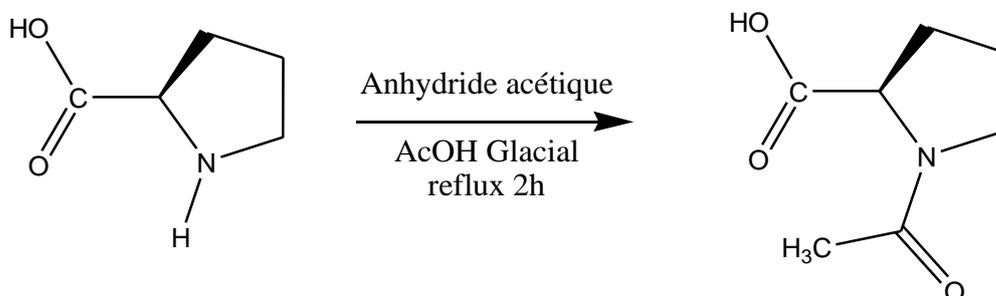
IR v max (KBr) cm^{-1} : (3404,77 ; 3348,21;3055,39 ; 1776,64;1710,68).

6. Protection de la L-proline

La L-proline est aussi engagée dans cette synthèse mais, à la différence des autres aminoacides, elle est la seule à avoir été protégée avec l'anhydride acétique et non pas l'anhydride phtalique en appliquant les mêmes conditions opératoire. Cela se

justifie par la présence d'un seul hydrogène sur la fonction amine de cet acide α -aminé. Le produit protégé ne demande pas de purification particulière.

- Schéma réactionnel :



- Mode opératoire :

Dans un Bicol, on introduit 5g de L-proline (43,42mmol) dans 50 ml d'AcOH. On ajoute 4,08g d'anhydride acétique fraîchement distillé (43,42mmol). On porte à reflux pendant 2 h, après on évapore le solvant. Une cristallisation du mélange dans l'éther permet d'isoler 5,33g (Rdt=78%) solide blanc.

- Résultat : N-acétyl-L-proline

$C_7H_{11}NO_3$, MM=157,17g/mol

Rdt =78%

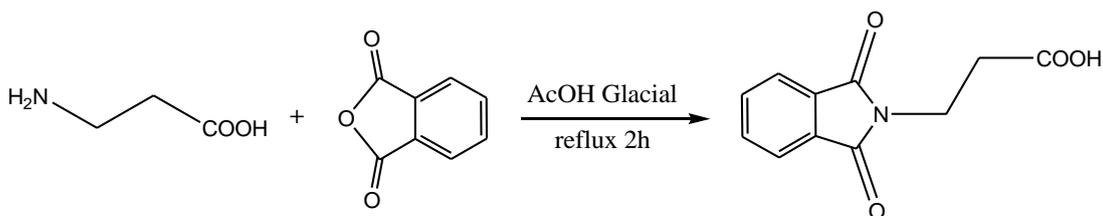
Aspect: solide blanc

Pf =126°C

IR ν max (KBr) cm^{-1} : (3406,81; 3194,84; 1725,20 ; 1605,96).

7. Protection de la β -alanine

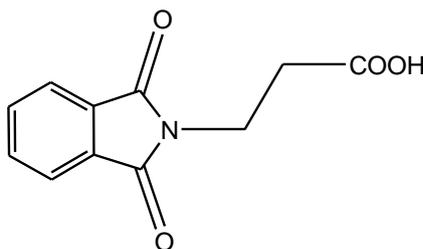
- Schéma réactionnel :



- Mode opératoire :

Dans un Bicol, on introduit 5g de β -alanine (56,12 mmol) dans 50 ml d'AcOH. On ajoute 8,31g d'anhydride phtalique recristallisé (56,12mmol). On porte à reflux pendant 2 h, après on évapore le solvant. Une recristallisation dans l'eau permet d'isoler 11,5g (Rdt=93,5%) solide blanc.

- Résultat :N-phtalimido- β -alanine



$C_{11}H_9NO_4$, MM=219,19g/mol

Rdt =93,5%

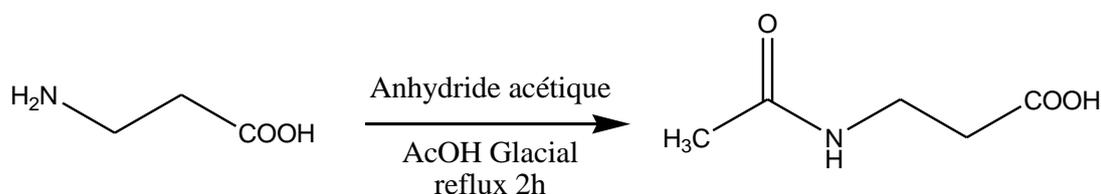
Aspect: solide blanc

Pf =139°C

IR v max (KBr) cm^{-1} : (3206,07;1769,29 ;1720,87; 1702,4).

8. Protection de la β -alanine (autre approche)

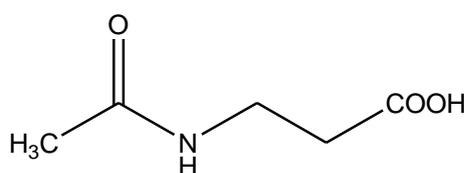
- Schéma réactionnel :



- Mode opératoire :

Dans un Bicol, on introduit 5g de β -alanine (52,12mmol) dans 50 ml d'AcOH. On ajoute 5,73g d'anhydride acétique fraîchement distillé (56,12mmol). On porte à reflux pendant 2 h, après on évapore le solvant. Une cristallisation de produit dans l'éther permet d'isoler 7,6g (Rdt=78%) solide blanc.

- Résultat :N-acétyl- β -alanine



$C_5H_8NO_3$, MM=103,12g/mol

Rdt =78%

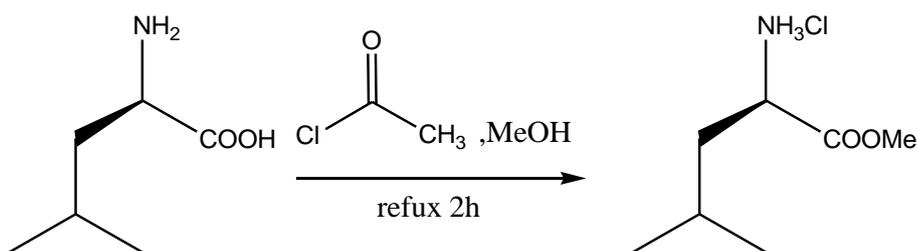
Aspect: solide blanc

Pf =60-62°C

IR v max (KBr) cm^{-1} : (3346,69 ; 3106,20; 1707,56 ; 1619,43).

9. Estérification de la L-leucine

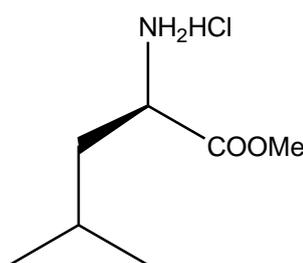
- Schéma réactionnel :



- Mode opératoire :

Dans un ballon sec et sous courant d'azote, on introduit du MeOH (100 ml) ; la solution est refroidie à 0°C. On verse lentement le chlorure d'acétyle (14,73ml) goutte à goutte dans la solution précédente, la solution est agitée 5min. Ensuite, la L-leucine (10g, 76,23mmol) est ajoutée en une seule portion, puis le mélange est chauffé lentement sous reflux pendant 2h. après on évapore le solvant. On laisse refroidir à température ambiante, et le solvant est chassé sous pression réduite.

- Résultat : Chlorhydrate-2-amino-4-methylpentanoate de methyle



$C_7H_{16}ClNO_2$, MM=181,66g/mol

Rdt =99%

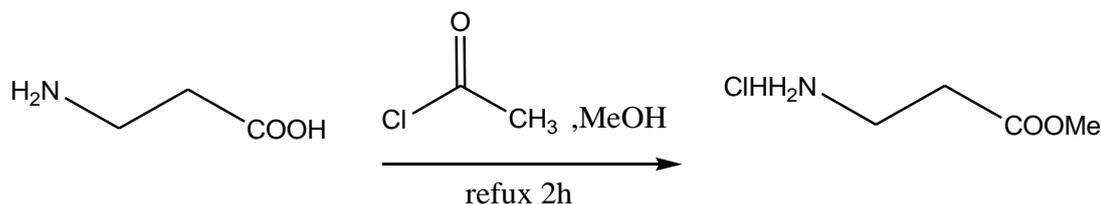
Aspect: solide blanc

Pf =127°C

IR v max (KBr) cm^{-1} : (2959,23 ; 1744,46 ; 1229,30).

10. Estérification de la β -alanine

- Schéma réactionnel :



- Mode opératoire :

Dans un ballon sec et sous courant d'azote, on introduit du MeOH (100 ml) ; la solution est refroidie à 0°C. On verse lentement le chlorure d'acétyle (21,54ml) goutte à goutte dans la solution précédente, la solution est agitée 5min. Ensuite, la β -alanine (10g, 112,24mmol) est ajoutée en une seule portion, puis le mélange est chauffé lentement sous reflux pendant 2h, après on évapore un peu de solvant. On laisse refroidir à température ambiante, et le solvant est chassé sous pression réduite.

- Résultat : Chlorhydrate-3-aminopropanoate de méthyle



$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{ClNO}_2$, MM=139,58g/mol

Rdt =95%

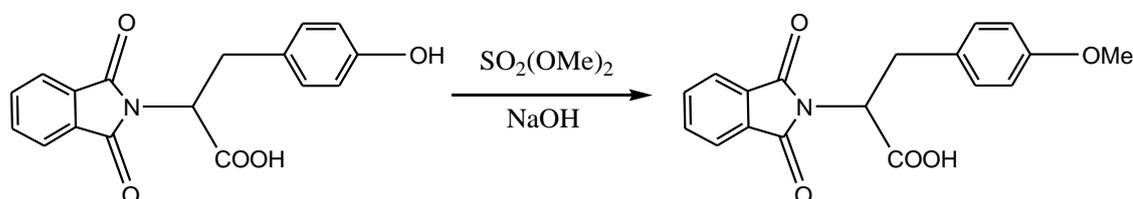
Aspect: solide blanc

Pf =66-68°C

IR ν max (KBr) cm^{-1} : (3016,42 ;1728,44;1227,69).

11. Méthoxylation du *N*-phtalimido-*L*-tyrosine

- Schéma réactionnel :



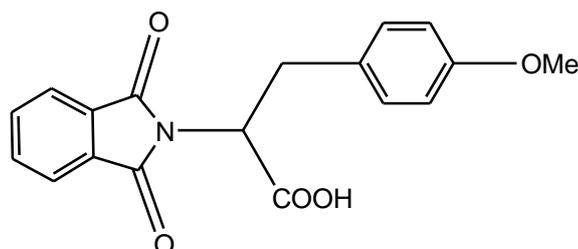
- Mode opératoire :

Dans un Bicol, on introduit 3g de la *N*-phtalimido-*L*-tyrosine (9.637mmol). On ajoute sous agitation goutte à goutte une solution de NaOH (3g de NaOH dans 25 ml d'eau) (le minimum pour dissoudre le *N*-phtalimido-*L*-tyrosine). On verse 2ml (15.85mmol)

d'une solution de diméthyle sulfate goutte à goutte (pendant 1h) dans la solution précédente avec une forte agitation.

On porte à reflux pendant 2 h (on remarque l'apparition d'une masse). On refroidit dans la glace. On acidifie avec HCl concentré jusqu'à pH = 3 pour précipiter le produit et on filtre.

- Résultat : Acide(2-N-phtalimido-3-methoxyphenyl) propanoïque



$C_{18}H_{15}NO_5$, MM=325,32g/mol

Rdt =78%

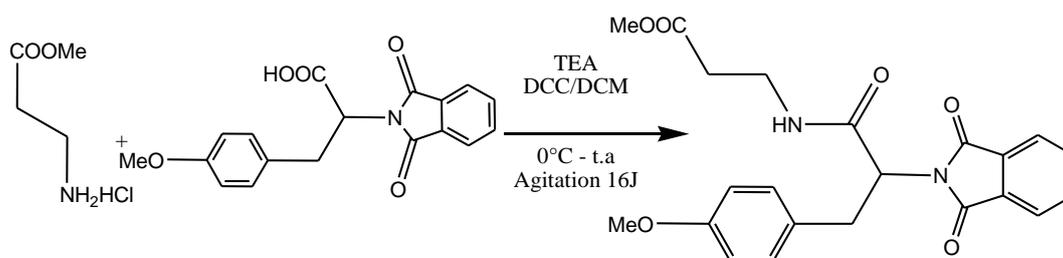
Aspect: solide blanc

Pf =136°C

IR v max (KBr) cm^{-1} : (3402,73 ; 1717,18 ; 1614,39 ; 1249,81).

12. Couplage de la L-tyrosine protégée avec chlorhydrate de l'ester méthylique de la β -alanine

- Schéma réactionnel :

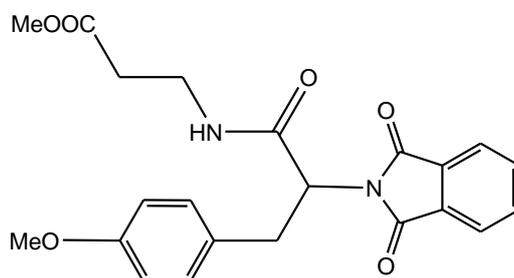


- Mode opératoire :

Dans un ballon on introduit la N-phtalimido-L-tyrosine-OMe (1,5g; 4,61 mmol) avec le Chlorhydrate-3-aminopropanoate de méthyle (0,64g ; 4,61mmol) dans 30ml de dichlorométhane à 0°C, on ajoute la triéthylamine (3,27ml ; 23,5mmol ; 5éq) goutte à goutte avec une forte agitation. Une solution de DCC (0,95g ; 4,61mmol) dans 10ml de dichlorométhane est additionnée goutte à goutte avec une forte agitation. Le mélange est agité de 0°C jusqu'à une température ambiante pendant 24h. À la fin, la dicyclohexylurée (DCU) formée est éliminée par filtration et le solvant est évaporé (DCM T_{eb} =40°C).

La réaction est terminée après 16J agitation.

- Résultat :3-(2-N-phtalimido-2-methoxybenzyl-acetamido)propanoate de méthyle



$C_{22}H_{22}N_2O_6$, MM=410,42g/mol

Rdt =70%

Aspect: pâteux

IR ν max (KBr) cm^{-1} : (3417,97;1732,35; 1715,69 ; 1651,90; 1263,88).

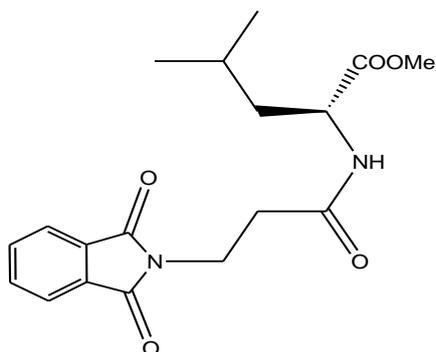
13. Couplage de la β -alanine protégée avec chlorhydrate de l'ester méthylique de la L-leucine

- Schéma réactionnel :

- Mode opératoire :

Dans un ballon on introduit la N-phtalimido- β -alanine (8,44g; 38,53 mmol) avec le Chlorhydrate-2-amino-4-methylpentanoate de methyle (7g ; 38,53mmol) dans 60ml de dichlorométhane a 0°C, on ajoute la triéthylamine (20ml ; 192,65mmol ; 5éq) goutte a goutte avec une fort agitation. Un mélange de DCC (7,95g ; 38,53mmol) avec 20ml de dichlorométhane est additionné goutte à goutte avec une forte agitation. Le mélange est agité à 0°C jusqu'à une température ambiante pendant 24h. À la fin la dicyclohexylurée (DCU) formée est éliminée par filtration et vérifier par infrarouge (absence du band 2117-2118 cm^{-1}), le solvant est évaporé (DCM Teb=40°C).La réaction est terminée après 12J agitation. Une recrystallisation de produit dans le mélange éthanol permet d'isoler 6,8g (Rdt=51,5%) solide blanc.

- Résultat : 2-(3-N-phtalimido-propanamido)-4-methylpentanoate de méthyle



$C_{18}H_{22}N_2O_5$, MM=346,38g/mol

Rdt =51, 5%

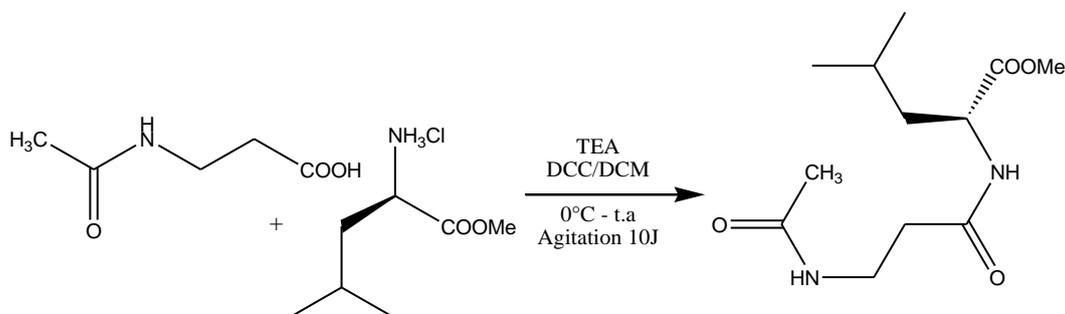
Aspect: solide blanc

Pf =154°C

IR ν max (KBr) cm^{-1} : (3318,24 ; 1770,95 ; 1708,74 ; 1656,68 ; 1223,21).

14. Couplage de la β -alanine protégée avec chlorhydrate de l'ester méthylique de la L-leucine

- Schéma réactionnel :

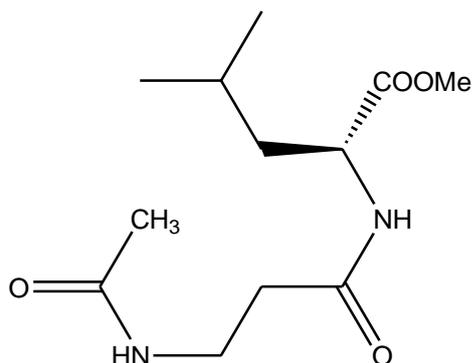


- Mode opératoire :

Dans un ballon on introduit la N-acétyl- β -alanine (4,33g; 33,02 mmol) avec le Chlorhydrate-2-amino-4-methylpentanoate de methyle (6g ; 33,02mmol) dans 60ml de dichlorométhane à 0°C, on ajoute la triéthylamine (23,01ml ; 165,1mmol ; 5éq) goutte à goutte avec une fort agitation. Un mélange de DCC (6,81g ; 33,02mmol) avec 20ml de dichlorométhane est additionné goutte à goutte avec une forte agitation. Le mélange est agité de 0°C jusqu'à une température ambiante pendant 24h. À la fin la dicyclohexylurée (DCU) formée est éliminée et solvant est évaporé (DCM $T_b=40^\circ C$).

La réaction est terminée après 10J agitation. Une cristallisation de produit dans l'éther permet d'isoler 8,34g (Rdt=98%) solide blanc.

- Résultat : 2-(3-N-acétyl-propanamido)-4-méthylpentanoate de méthyle



$C_{12}H_{22}N_2O_4$, MM=258,31g/mol

Rdt =98%

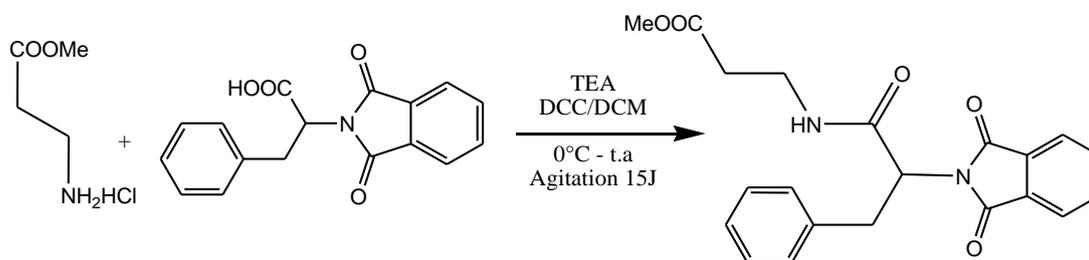
Aspect: solide blanc

Pf =89°C

IR v max (KBr) cm^{-1} : (3300,13 ; 1743,53 ; 1687,27 ; 1653,52 ; 1215,75).

15. Couplage de la L-phénylalanine protégée avec chlorhydrate de l'ester méthylique de la β -alanine

- Schéma réactionnel :

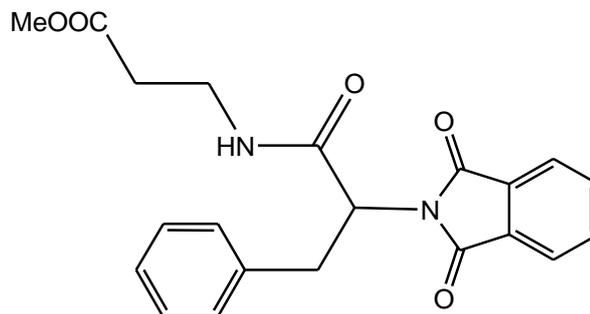


- Mode opératoire :

Dans un ballon on introduit la N-phtalimido-L-phénylalanine (2,5g; 8,46 mmol) avec le Chlorhydrate-3-aminopropanoate de méthyle (1,18g ; 8,46 mmol) dans 60ml de dichlorométhane à 0°C, on ajoute la triéthylamine (3,1ml ; 42,3mmol ; 5éq) goutte à goutte avec une forte agitation. Un mélange de DCC (1,74g ; 8,46mmol) avec 20ml de dichlorométhane est additionnée goutte à goutte avec une forte agitation. Le mélange est agité de 0°C jusqu'à une température ambiante pendant 24h. À la fin la dicyclohexylurée (DCU) formée est éliminée par filtration et le solvant est évaporé (DCM T_{eb} =40°C). La réaction est terminée après 15J agitation.

Une cristallisation de produit dans l'éther permet d'isoler 2,65g (Rdt=82,5%) solide blanc-jaune.

- Résultat :3-(2-benzyl-2-N-phthalimido-acétamido) propanoate de méthyle



$C_{21}H_{20}N_2O_2$, MM=380,39g/mol

Rdt =82, 5%

Aspect: solide blanc-jaune

Pf =114°C

IR v max (KBr) cm^{-1} : (3391,31 ; 1773,30 ; 1717,81; 1651,55 ; 1231,52).

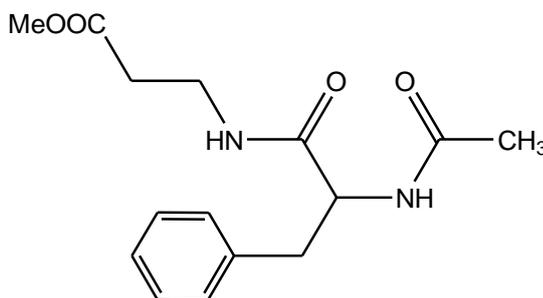
16. Couplage de la L-phénylalanine protégée avec le chlorhydrate de l'ester méthylique de la β -alanine

- Schéma réactionnel :

- Mode opératoire :

Dans un ballon on introduit la N-acétyl-L-phénylalanine (2,96g; 14,32 mmol) avec le Chlorhydrate-3-aminopropanoate de méthyle (2g ; 14,32mmol) dans 60ml de dichlorométhane à 0°C, on ajoute la triéthylamine (5,26ml ; 71,6mmol ; 5éq) goutte à goutte avec une fort agitation. Une solution de DCC (2,95g ; 14,32mmol) avec 20ml de dichlorométhane est additionné goutte à goutte avec une fort agitation. Le mélange est agité de 0°C jusqu'à une température ambiante pendant 24h. Le mélange est agité de 0°C jusqu'à une température ambiante pendant 24h. À la fin la dicyclohexylurée (DCU) formée est éliminée par filtration et le solvant est évaporé (DCM Teb=40°C).La réaction est terminée après 8J agitation. Une cristallisation de produit dans l'éther permet d'isoler 3, 5g (Rdt=85%) solide blanc.

- Résultat : 3-(2-benzyl-2-N-acétyl-acétamido) propanoate de méthyle



$C_{15}H_{20}N_2O_4$, MM=292,33g/mol

Rdt =85%

Aspect: solide blanc

Pf =88°C

IR v max (KBr) cm^{-1} : (3259, 86; 1738,83 ; 1669,15 ; 1639,07 ; 1209).

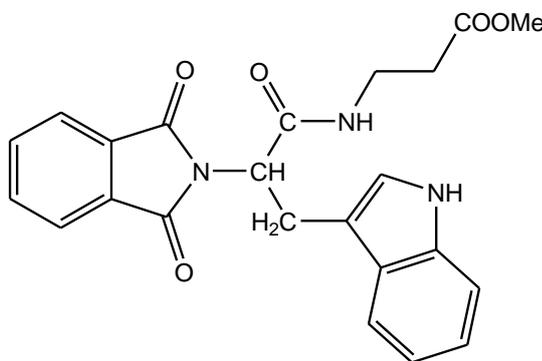
17. Couplage de la L-tryptophane protégée avec chlorhydrate de l'ester méthylique de la β -alanine

- Schéma réactionnel :

- Mode opératoire :

Dans un ballon on introduit la N-phtalimido-L-tryptophane (4,78g; 14,32 mmol) avec le Chlorhydrate-3-aminopropanoate de méthyle (2g ; 14,32mmol) dans 60ml de dichlorométhane à 0°C, on ajoute la triéthylamine (5,26ml ; 71,6mmol ; 5éq) goutte à goutte avec une forte agitation. Une solution de DCC (2,95g ; 14,32mmol) dans 20ml de dichlorométhane est additionnée goutte à goutte avec une forte agitation. Le mélange est agité de 0°C jusqu'à une température ambiante pendant 24h. Le mélange est agité de 0°C jusqu'à une température ambiante pendant 24h. À la fin la dicyclohexylurée (DCU) formée est éliminée par filtration et le solvant est évaporé (DCM Teb=40°C).La réaction est terminée après 10J agitation. Une cristallisation de produit dans l'éther permet d'isoler 4,8g (Rdt=80%) solide jaune.

- Résultat : 3-(2-N-phthalimido-3-(1H-indol-3-yl)propanamido)propanoate de méthyle



$C_{21}H_{23}N_3O_5$, MM=419,43g/mol

Rdt =80%

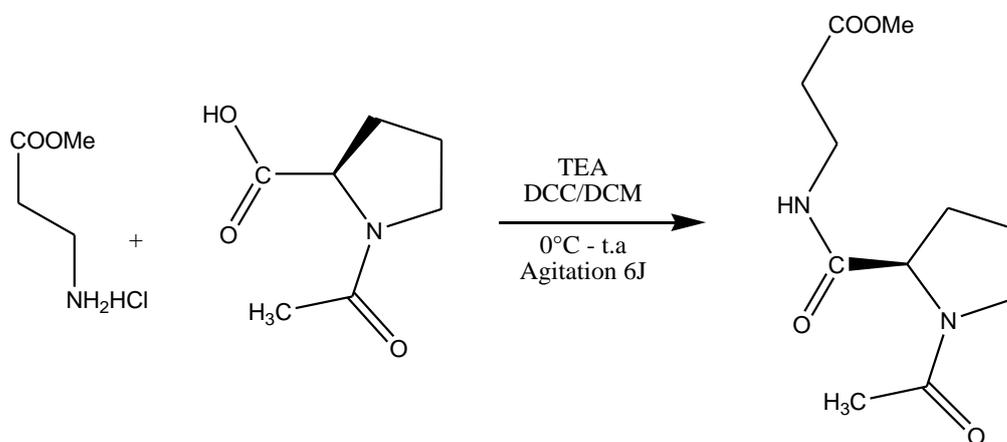
Aspect: solide jaune

Pf =107°C

IR v max (KBr) cm^{-1} : (3343,75 ; 1772,87 ; 1715,86; 1649,32 ; 1229,69).

18. Couplage de la L-proline protégée avec chlorhydrate de l'ester méthylique de la β -alanine

- Schéma réactionnel :

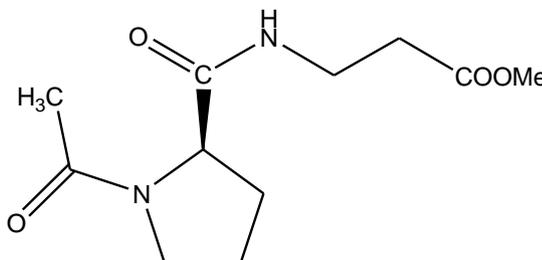


- Mode opératoire :

Dans un ballon on introduit la N-acétyl-L-proline (2,25g; 14,32 mmol) avec le Chlorhydrate-3-aminopropanoate de méthyle (2g ; 14,32mmol) dans 60ml de dichlorométhane à 0°C, on ajoute la triéthylamine (5,26ml ; 71,6mmol ; 5éq) goutte à goutte avec une forte agitation. Une solution de DCC (2,95g ; 14,32mmol) avec 20ml de dichlorométhane est additionné goutte à goutte avec une forte agitation. Le mélange est agité de 0°C jusqu'à une température ambiante pendant 24h. Le mélange est agité de 0°C jusqu'à une température ambiante pendant 24h. À la fin la

dicyclohexylurée (DCU) formée est éliminée par filtration et le solvant est évaporé (DCM $T_{eb}=40^{\circ}\text{C}$). La réaction est terminée après 6J agitation. Une cristallisation de produit dans le THF permet d'isoler 4,8g (Rdt=80%) solide blanc.

- Résultat : 3-(1-acétylpyrrolidine-2-carboxamido)propanoate de méthyle



$\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$, MM=242,27g/mol

Rdt =92,5%

Aspect: solide blanc

Pf =148°C

IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : (3394,99; 1734,47 ; 1715,51 ;1617,95; 1171,51).

19. Hydrolyse de l'ester 3-(2-benzyl-2-N-phthalimido-acetamido)propanoate de méthyle

- Schéma réactionnel :

- Mode opératoire :

Aune solution de 1g (2,62 mmol, 1 équiv.) de 3-(2-benzyl-2-N-phthalimido-acetamido) propanoate de méthyle dans un mélange de tétrahydrofurane/eau (2/1) placé à 0°C , sont ajouté 15,75ml (3,15mmol, 1,2 équiv.) d'une solution aqueuse d'hydroxyde de lithium (0,2M). Après une nuit d'agitation à température ambiante, sont additionnés 5ml d'une solution aqueuse d'HCl (1N). La solution est alors extraite trois fois par 50 ml d'acétate d'éthyle puis la phase organique est séchée, filtrée et évaporée sous pression réduite. Une cristallisation du produit dans l'éther permet d'isoler 0,44g (Rdt=46,3%) solide blanc.

- Résultat :Acide-3-(2-benzyl-2-N-phtalimido-acetamido) propanoïque

$C_{20}H_{18}N_5O_2$, MM=366,37g/mol

Rdt =46,3%

Aspect: solide blanc

Pf =107°C

IR v max (KBr) cm^{-1} : (3282,26 ; 30361,73; 1714,19; 1663,35; 1232,60).

20. Hydrolyse de l'ester 3-(2-benzyl-2-N-acethyl-acetamido) propanoate de méthyle

- Schéma réactionnel :

- Mode opératoire :

Aune solution de 1g (3,42 mmol, 1 équiv.) de 3-(2-benzyl-2-N-acétyl-acétamido) propanoate de méthyle dans un mélange de tétrahydrofurane/eau (2/1) placé à 0°C, sont ajouté 0,1722g (4,104mmol, 1,2 équiv.) d'une solution aqueuse d'hydroxyde de lithium (0,2M). Après une nuit d'agitation à température ambiante, sont additionnés 5ml d'une solution aqueuse d'HCl (1N). La solution est alors extraite trois fois par 50 ml d'acétate d'éthyle puis la phase organique est séchée, filtrée et évaporée sous pression réduite. Une cristallisation du produit dans l'éther permet d'isoler 0,38g (Rdt=41%) solide blanc.

- Résultat : Acide-3-(2-benzyl-2-N-acethyl-acétamido)propanoïque

$C_{14}H_{18}N_2O_4$, MM=278,3g/mol

Rdt =41%

Aspect: solide blanc

Pf =137°C

IR v max (KBr) cm^{-1} : (3293,14 ; 3030,57; 1713,50; 1650,55 ; 1231,52).

21. Hydrolyse de l'ester 3-(2-N-phtalimido-3-(1H-indol-3-yl)propanamido) propanoate de méthyle

- Schéma réactionnel :

- Mode opératoire :

Aune solution de 1g (2,38 mmol, 1 équiv.) de 3-(2-N-phtalimido-3-(1H-indol-3-yl)propanamido) propanoate de méthyle dans un mélange de tétrahydrofurane/eau (2/1) placé à 0°C, sont ajoutés 0,12g (2,86mmol, 1,2 équiv.) d'une solution aqueuse d'hydroxyde de lithium (0,2M). Après une nuit d'agitation à température ambiante, sont additionnés 5ml d'une solution aqueuse d'HCl (1N). La solution est alors extraite trois fois par 50 ml d'acétate d'éthyle puis la phase organique est séchée, filtrée et évaporée sous pression réduite. Une cristallisation du produit dans l'éther permet d'isoler 0,7g (Rdt=73%) solide jaune.

- Résultat :Acide-3-(2-N-phtalimido-3-(1H-indol-3-yl)propanamido) propanoïque

$C_{22}H_{19}N_3O_5$, MM=405,4g/mol

Rdt =73%

Aspect: solide jaune

Pf =109°C

IR ν max (KBr) cm^{-1} : (3359,28;3057,67 ; 1771,78 ; 1713,67;1624,85; 1231,42).

22. Hydrolyse de l'ester 3-(1-acétylpyrrolidine-2-carboxamido) propanoate de méthyle

- Schéma réactionnel :

- Mode opératoire :

Aune solution de 2,9g (11,97mmol, 1 équiv.) de 3-(1-acétylpyrrolidine-2-carboxamido) propanoate de méthyle dans un mélange de tétrahydrofurane/eau (2/1) placé à 0°C, sont ajoutés 0,6g (14,36mmol, 1,2 équiv.) d'une solution aqueuse d'hydroxyde de lithium (0,2M). Après une nuit d'agitation à température ambiante, sont additionnés 5ml d'une solution aqueuse d'HCl (1N). La solution est alors extraire trois fois par 50 ml d'acétate d'éthyle puis la phase organique est séchée,

filtrée et évaporée sous pression réduite. Une cristallisation de produit dans l'éther permet d'isoler 1,4g (Rdt=52%) solide jaune.

- Résultat :Acide-3-(1-acétylpyrrolidine-2-carboxamido)propanoïque

$C_{10}H_{16}N_2O_4$, MM=228,25g/mol

Rdt =52%

Aspect: solide jaune

Pf =128°C

IR v max (KBr) cm^{-1} : (3328,21 ; 3293,14 ; 1713,50 ; 1626,60 ; 1231,52).

23. Hydrolyse de l'ester 3-(2-N-phthalimido-2-méthoxybenzyl-acétamido) propanoate de méthyle

- Schéma réactionnel :

- Mode opératoire :

Aune solution de 0,7161g (1,74mmol, 1 équiv.) de 3-(2-N-phthalimido-2-méthoxybenzyl-acétamido) propanoate de méthyle dans un mélange de tétrahydrofurane/eau (2/1) placé à 0°C, sont ajoutés 0,0739g (1,76mmol, 1,01 équiv.) d'une solution aqueuse d'hydroxyde de lithium (0,2M). Après une nuit d'agitation à température ambiante, sont additionnés 5ml d'une solution aqueuse

d'HCl (1N). La solution est alors extraite trois fois par 50 ml d'acétate d'éthyle puis la phase organique est séchée, filtrée et évaporée sous pression réduite.

- Résultat :Acide-3-(2-N-phtalimido-2-methoxybenzyl-acetamido)propanoïque

$C_{21}H_{20}N_2O_6$, MM=396,39g/mol

Rdt =78%

Aspect:pâteux

IR ν max (KBr) cm^{-1} : (3463,25 ; 3321,09 ; 1732,35 ; 1711,73 ; 1631,09).

24. Déprotection de 2-(3-N-phtalimido-propanamido)-4-méthylpentanoate de méthyle

- Schéma réactionnel :

- Mode opératoire :

On ajoute sous agitation 1,07 ml (1,5eq) d'hydrate d'hydrazine à une solution de 5g (14,43 mmol) de 2-(3-N-phtalimido-propanamido)-4-méthylpentanoate de méthyle dissous dans un mélange de dichlorométhane et de méthanol (1/1, 40ml), à température ambiante pendant une nuit. On filtre et on évapore le mélange, le produit obtenu est un solide. On ajoute 5 ml d'eau distillée, puis le résidu est alcalinisé à

pH=11 avec une solution de NaOH à 0.1M, et extrait avec dichlorométhane. Une cristallisation de produit dans l'éther permet d'isoler 1,2g (Rdt=64%) solide blanc.

- Résultat : 4-méthyl-2-(3-aminopropanamido) pentanoate de méthyle

$C_{10}H_{20}N_2O_3$, MM=216,28g/mol

Rdt =64%

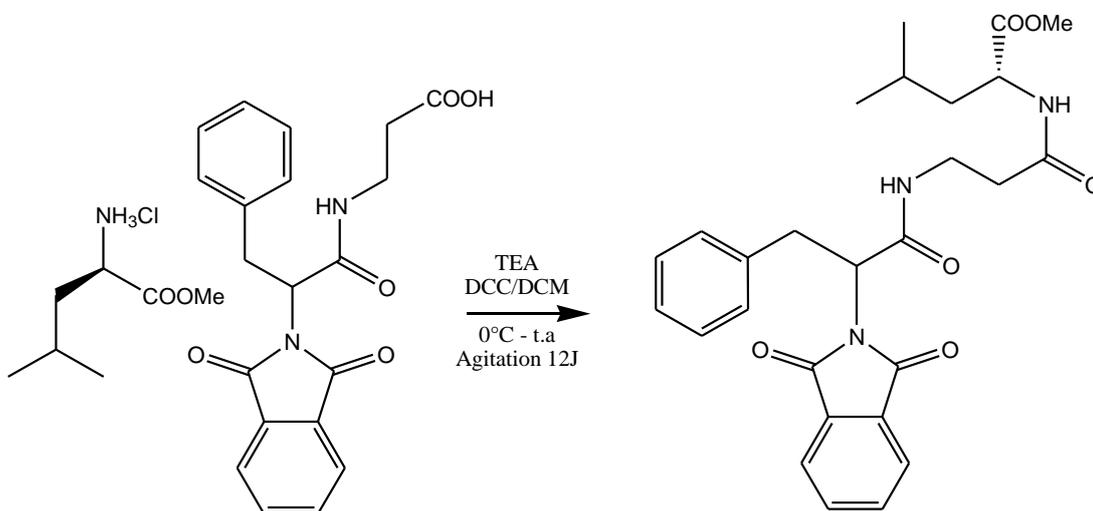
Aspect: solide blanc

Pf =82°C

IR v max (KBr) cm^{-1} : (3331,73 ;1683,05 ;1243,73).

25. Couplage de l'acide-3-(2-benzyl-2-N-phtalimido-acétamido) propanoïque avec chlorhydrate de l'ester méthylique de la L-leucine

- Schéma réactionnel :



- Mode opératoire :

Dans un ballon on introduit l'acide-3-(2-benzyl-2-N-phtalimido-acétamido) propanoïque (0, 2g; 0,54 mmol) avec le Chlorhydrate-2-amino-4-méthylpentanoate de méthyle (0,1g ; 0,54mmol) dans 30ml de dichlorométhane à 0°C, on ajoute la

triéthylamine (0,076ml ; 2,73mmol ; 5éq) goutte à goutte avec une forte agitation. Un mélange de DCC (0,1126g ; 0,54mmol) avec 10ml de dichlorométhane est additionné goutte à goutte avec une forte agitation. Le mélange est agité à 0°C jusqu'à une température ambiante pendant 24h. À la fin la dicyclohexylurée (DCU) formée est éliminée par filtration et le solvant est évaporé (DCM Teb=40°C). La réaction est terminée après 12J agitation. Une cristallisation de produit dans l'éther permet d'isoler 0,14g (Rdt=54%) solide gris.

- Résultat :2-(3-(2-benzyl-2-N-phtalimido-acétamido)propanamido)4-méthylpentanoate de méthyle



$C_{27}H_{31}N_3O_6$, MM=493,55g/mol

Rdt =54%

Aspect: solide gris

Pf =152°C

IR ν max (KBr) cm^{-1} : (3329,52 ;3279,24;1742,68;1713,45;1646,46 ;1627,76;1227,5).

26. Couplage de l'acide-3-(2-benzyl-2-N-acétyl-acétamido)propanoïque avec chlorhydrate de l'ester méthylique de la L-leucine

- Schéma réactionnel :

- Mode opératoire :

Dans un ballon on introduit l'acide-3-(2-benzyl-2-N-acétyl-acetamido)propanoïque (0,1g; 0,36 mmol) avec le Chlorhydrate-2-amino-4-méthylpentanoate de méthyle (0,0652g; 0,36mmol) dans 30ml de dichlorométhane à 0°C, on ajoute la triéthylamine (0,05ml ; 1,79mmol ; 5éq) goutte à goutte avec une forte agitation. Un mélange de DCC (0,0741g; 0,36mmol) avec 10ml de dichlorométhane est additionné goutte à goutte avec une forte agitation. Le mélange est agité de 0°C jusqu'à une température ambiante pendant 24h. Le mélange est agité de 0°C jusqu'à une température ambiante pendant 24h. À la fin la dicyclohexylurée (DCU) formée est éliminée par filtration et le solvant est évaporé (DCM $T_b=40^\circ\text{C}$). La réaction est terminée après 6J agitation. La réaction est terminée après 10J agitation. Une cristallisation de produit dans l'éther permet d'isoler 0,1g (Rdt=71,4%) solide blanc.

- Résultat : 2-(3-(2-benzyl-2-N-acétylacétamido)propanamido)-4-méthylpentanoate de méthyle

$\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_5$, MM=405,49g/mol

Rdt =71,4%

Aspect: solide blanc

Pf =136°C

IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : (3317,47 ; 1749,27 ; 1684,21; 1649,45; 1229,76).

27. Couplage de l'acide-3-(2-N-phtalimido-3-(1H-indol-3-yl)propanamido) propanoïque avec chlorhydrate de l'ester méthylique de la L-leucine

- Schéma réactionnel :

- Mode opératoire :

Dans un ballon on introduit l'acide-3-(2-N-phtalimido-3-(1H-indol-3-yl)propanamido) propanoïque (0,4g; 0,98mmol) avec le Chlorhydrate-2-amino-4-méthylpentanoate de méthyle (0,1792g ; 0,98mmol) dans 30ml de dichlorométhane à 0°C, on ajoute la triéthylamine (0,1375ml ; 4,93mmol ; 5ég) goutte à goutte avec une forte agitation. Un mélange de DCC (0,2035g ; 0,98mmol) avec 10ml de dichlorométhane est additionné goutte à goutte avec une forte agitation. Le mélange est agité de 0°C jusqu'à une température ambiante pendant 24h. Le mélange est agité de 0°C jusqu'à une température ambiante pendant 24h. À la fin la dicyclohexylurée (DCU) formée est éliminée par filtration et le solvant est évaporé (DCM Teb=40°C). La réaction est terminée après 6J agitation. La réaction est terminée après 10J agitation. Une cristallisation de produit dans l'éther permet d'isoler 0,36g (Rdt=70%) solide jaune.

- Résultat : 2-(3-(2-N-phtalimido-3-(1H-indol-3-yl)propanamido)propanamido)4-méthylpentanoate de méthyle

$C_{29}H_{32}N_4O_6$, MM=532,59g/mol

Rdt =70%

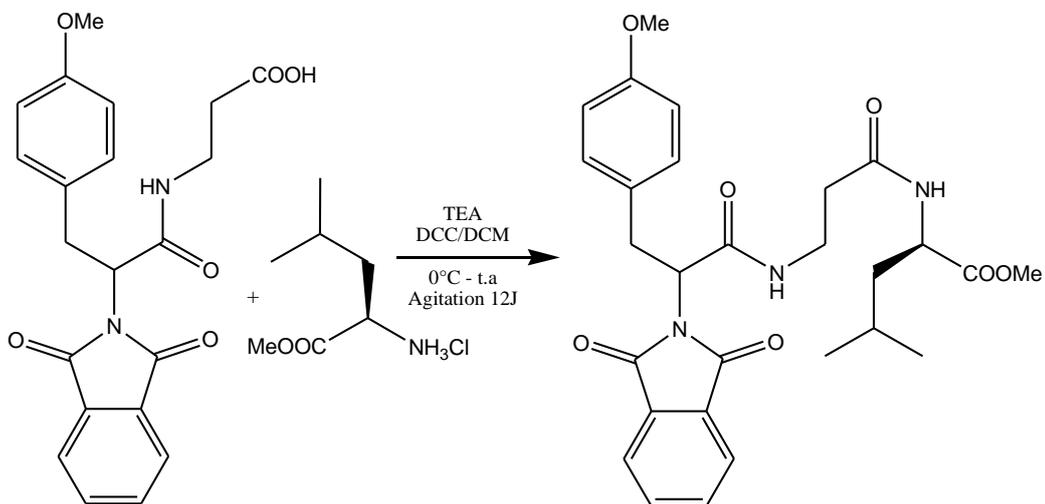
Aspect: solide jaune

Pf =125°C

IR v max (KBr) cm^{-1} : (3327,90 ;3286,78 ; 1740,80 ; 1716 ;1646,24 ;1630,86 ; 1229,67).

28. Couplage de l'acide-3-(2-N-phthalimido-2-méthoxybenzyl-acétamido) propanoïque avec chlorhydrate de l'ester méthylique de la L-leucine

- Schéma réactionnel :



- Mode opératoire :

Dans un ballon on introduit l'acide-3-(2-N-phtalimido-2-méthoxybenzyl-acétamido) propanoïque (0,3g; 0,75 mmol) avec le Chlorhydrate-2-amino-4-méthylpentanoate de méthyle (0,13g ; 0,75mmol) dans 20ml de dichlorométhane à 0°C, on ajoute la triéthylamine (0,52ml ; 3,78mmol ; 5ég) goutte à goutte avec une forte agitation. Un mélange de DCC (0,15g ; 0,75mmol) avec 20ml de dichlorométhane est additionné goutte à goutte avec une forte agitation. Le mélange est agité de 0°C jusqu'à une température ambiante pendant 24h. Le mélange est agité de 0°C jusqu'à une température ambiante pendant 24h. À la fin la dicyclohexylurée (DCU) formée est éliminée par filtration et le solvant est évaporé (DCM $T_{eb}=40^{\circ}C$). La réaction est terminée après 6J agitation. La réaction est terminée après 12J agitation. Une recristallisation de produit dans l'éthanol permet d'isoler 0,29g (Rdt=74%) solide gris-vert.

- Résultat : 2-(3-(2-N-phtalimido-2-méthoxybenzyl-acétamido)propanamido)-4-méthylpentanoate de méthyle

$C_{28}H_{33}N_3O_7$, MM=523,58g/mol

Rdt =74%

Aspect: solide gris-vert

Pf =132°C

IR ν max (KBr) cm^{-1} : (3477,24 ; 3397,19 ; 1740,16 ; 1715,38 ; 1623,05 ; 1242,86).

29. Couplage de l'acide-3-(1-acétylpyrrolidine-2-carboxamido)propanoïque avec chlorhydrate de l'ester méthylique de la L-leucine

- Schéma réactionnel :

- Mode opératoire :

Dans un ballon on introduit l'acide-3-(1-acétylpyrrolidine-2-carboxamido)propanoïque (0,536g ; 2,34 mmol) avec le Chlorhydrate-2-amino-4-méthylpentanoate de méthyle (0,46g ; 2,34mmol) dans 20ml de dichlorométhane à 0°C, on ajoute la triéthylamine (1,6ml ; 11,74mmol ; 5éq) goutte à goutte avec une forte agitation. Un mélange de DCC (0,48g ; 2,34mmol) avec 20ml de dichlorométhane est additionné goutte a goutte avec une fort agitation. Le mélange est agité de 0°C jusqu'à une température ambiante pendant 24h. Le mélange est agité de 0°C jusqu'à une température ambiante pendant 24h. À la fin la dicyclohexylurée (DCU) formée est éliminée par filtration et le solvant est évaporé (DCM Teb=40°C).La réaction est terminée après 6J agitation. La réaction est terminée après 12J agitation. Une recristallisation de produit dans l'éthanol permet d'isoler 0,5g (Rdt=62,5%) solide gris.

- Résultat :2-(3-(1-acétylpyrrolidine-2-carboxamido)propanamido)-4-méthylpentanoate de méthyle

$C_{17}H_{29}N_3O_5$, MM=355,43g/mol

Rdt =62,5%

Aspect: solide gris

Pf =82°C

IR ν max (KBr) cm^{-1} : (3336,87 ;1747,92 ;1698,08 ;1627,03 ;1260,14).