

MÉMOIRE

pour l'obtention du diplôme de

MAGISTER

SPÉCIALITÉ : CHIMIE ORGANIQUE



SYNTHÈSE DE NOUVEAUX INHIBITEURS DE LA GAMMA-SÉCRÉTASE EN VUE DU DÉVELOPPEMENT DE PRODUITS TRAITANT LA MALADIE D'ALZHEIMER

présenté par :

MME DIB NÉE BRIXI-GORMAT FATEMA-ZOHRRA SOULEF

devant le jury composé de :

Dr Mostefa-Kara Bachir	Maître de Conférences	Président	Université AB.B. de Tlemcen
Dr Gourmala Chafika	Maître de Conférences	Examinatrice	Université AB.B. de Tlemcen
Dr Aribi Mourad	Chargé de Cours	Examineur	Université AB.B. de Tlemcen
Dr Ziani-Cherif Chewki	Maître de Conférences	Encadreur	Université AB.B. de Tlemcen

bibliothèque des sciences



BFST1914

M/547-82/01

REMERCIEMENTS

Inscrit Sous le N°	30 MARS 2008
Date de:	
Cod.:	3060

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Catalyse et Synthèse en Chimie Organique L.C.S.C.O. de l'Université AbouBekr Belkaïd de Tlemcen sous la direction de Monsieur ZIANI-CHERIF Chewki; qu' il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour les précieux conseils qu'il n'a cessé de me prodiguer, pour sa contribution à ma formation ainsi que pour l'aide inestimable qu'il m'a apporté lors de la réalisation de ce mémoire.

Je voudrais aussi remercier Monsieur MOSTEFA-KARA Bachir, Maître de Conférences à l'Université de Tlemcen, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Je remercie Mademoiselle GOURMALA Chafika, Maître de Conférences à l'Université de Tlemcen, et Monsieur ARIBI Mourad, Chargé de Cours à l'Université de Tlemcen, pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie également toutes les personnes dont l'aide et l'enthousiasme ont permis l'avancement de ce travail, en particulier: Monsieur le Professeur CHOUKCHOU-BRAHAM Abderrahim, Directeur du Laboratoire de Catalyse et Synthèse en Chimie Organique pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, ainsi que Monsieur CHOUKCHOU-BRAHAM Noureddine, Maître de Conférences à l'Université de Tlemcen et Monsieur le Professeur DIDI Mohammed El-Amine, pour leur assistance dans l'obtention des spectres RMN ainsi que pour leur disponibilité et leur nombreux conseils.

J'adresse mes sincères remerciements à tous les membres du Laboratoire de Catalyse et Synthèse en Chimie Organique, qui nous ont toujours témoigné sympathie et gentillesse, que tous veuillent bien trouver ici l'expression de ma reconnaissance et ma profonde amitié.

Enfin, je remercie tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail

A mes très chers parents.

A mes chers beau-parents qui n'ont cessé de prier pour moi.

A mon cher mari

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS.....	i
GLOSSAIRE.....	iii
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 : LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	4
I. LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	6
I.1 Historique.....	6
I.2 Les symptômes de la Maladie d'Alzheimer.....	7
I.3 Les facteurs de risque.....	7
II. L'ASPECT NEUROPATHOLOGIQUE.....	12
II.1 Les plaques séniles.....	12
II.2 Les dégénérescences neurofibrillaires.....	13
III. LES ROLES DE L'APP, DE LA PS1 ET DES SECRETASES.....	14
III.1 La contribution de la préséniline 1.....	14
III.2 La protéine précurseur des Amyloïdes (APP).....	14
III.3 Le processus de clivage de l'APP.....	15
III.4 La γ -sécrétase.....	16
IV. LES APPROCHES THERAPEUTIQUES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	17
IV.1 L'inhibition de l'acétylcholine.....	18
IV.2 L'immunisation.....	18
IV.3 L'inhibition de la β -sécrétase.....	19
IV.4 Le renforcement de l'activité de la α -sécrétase.....	19
IV.5 L'inhibition de la γ -sécrétase.....	19
Références.....	22
CHAPITRE 2: STRATEGIE DE SYNTHESE	25
I. LES ACIDES AMINES.....	25
II. LES PROTEINES ET LES PEPTIDES.....	27
II.1. Les différentes structures des protéines.....	28
III. LES GROUPES PROTECTEURS.....	29
III.1. Protection des acides.....	30

TABLE DES MATIERES

III.2. Protection des amines.....	30
III.2.1. Le groupe t-butoxycarbonyle (Boc).....	31
III.2.2. Le groupe benzyloxycarbonyle (Cbz).....	32
III.2.3. Le groupe 9-fluorenylméthoxycarbonyle (Fmoc).....	32
III.3. Les agents de couplage.....	33
III.3.1. Le dicyclohexylcarbodiimide (DCC).....	33
III.3.2 le benzotriazol-1-yloxytris(dimethy-amino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP).....	34
III.3.3.le O-benzotriazol-1-YL-N,N,N',N'- tétra- méthyluronium tétrafluorophosphate (TBTU).....	35
IV. STRATEGIE DE SYNTHESE.....	35
IV.1. Introduction.....	35
IV.2. Stratégie de synthèse de dimère.....	38
IV.2.1 Couplage.....	39
IV.2.2 Réactif de Weinreb.....	40
IV.2.3 Changement de stratégie.....	43
V. CONCLUSION.....	45
Références.....	46
CHAPITRE 3 : PARTIE EXPERIMENTALE.....	48
I. MATERIELS ET METHODES.....	48
II. PARTIE EXPERIMENTALE.....	50
CONCLUSION GENERALE.....	58
COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS.....	59

LES ABRÉVIATIONS

MA	: Maladie d'Alzheimer.
AINS	: Anti-inflammatoire non stéroïdiens
Aβ	: Amyloïdes- β
APP	: Amyloid protein precursor.
BACE	: Beta Amyloid Cleaving Enzyme
AcOEt	: Acetate d'éthyle
Boc	: Tert-butoxycarbonyle.
Boc-Cl	: Tert-butyl chloroformiate
Boc-ON	: Ter-butoxycarbonyloxyimino-2-phenylacetonitrile
BOP	: Benzotriazol-1-yloxytris(dimethyl-amino)phosphonium hexafluorophosphate
Boc-Ilepoxyde	: Ter-butoxycarbonyle isoleucine leucine epoxyde
Cbz	: benzyloxycarbonyle
CCM	: Chromatographie sur couche mince
NICD	: Domaine intracellulaire du Notch
PS1	: Préséniline 1
PS2	: Préséniline 2
PHF	: Paires hélicoïdales de filaments
DNF	: Dégénérescence neurofibrillaire
DCC	: Dicyclohexylcarbodiimide
DCU	: Dicyclohexylurea
DMF	: Diméthylformamide
DCM	: Dichlorométhane
DIPEA	: Diisopropyléthylamine
DiBAL-H	: Hydrure d'isobutylaluminium
SAR	: Structure-Activity Relationship (Etude Structure- Activité)
Fmoc	: 9-fluorenylméthoxycarbonyle
HOBt	: Hydroxy benzotriazole
HBTU	: O- benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tétra-méthyluronium hexafluorophosphate

TBTU	: O- benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetra-methyluronium tétrafluorophosphate.
THF	: Tétrahydrofurane
TFA	: Acide trifluoroacétique
MeCN	: Acétonitrile
HIV	: Virus du Sida
PBr₃	: Tribromophosphore
CI₅₀	: Concentration à laquelle la moitié des amyloïdes est inhibées

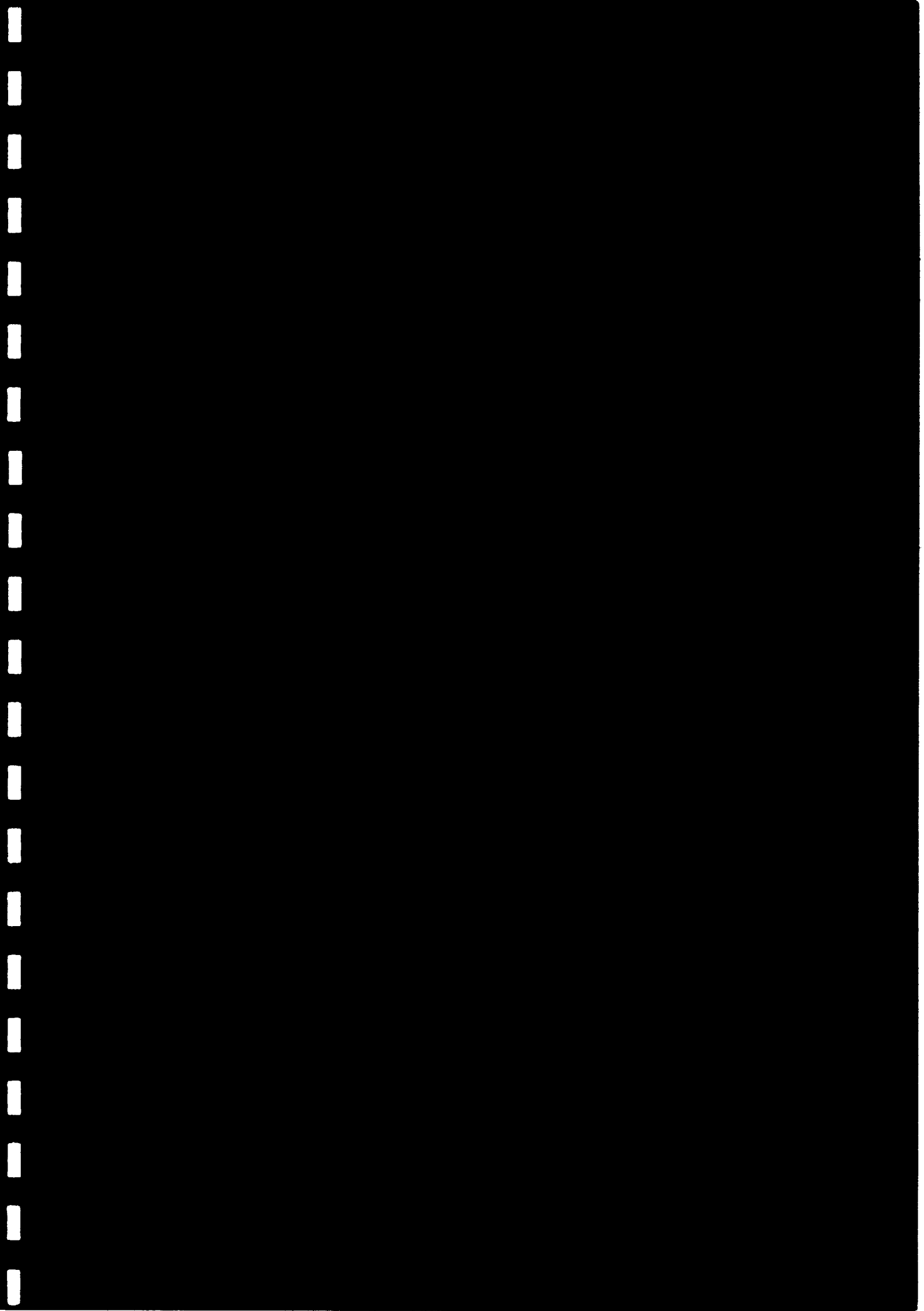
GLOSSAIRE

- **Amyloïde- β** :
Principal composant des plaques séniles.
- **Allèle** :
Chaque gène est présent en 2 exemplaires dans nos cellules, un exemplaire provenant du père, un exemplaire provenant de la mère. Ces exemplaires sont appelés allèles : allèle paternel et allèle maternel. Ces allèles peuvent porter strictement la même information génétique (la même séquence de bases azotées), le sujet est dit homozygote ; ou porter une information différente, le sujet est alors hétérozygote.
- **Amyloïde** :
Substance anormale ayant l'aspect de l'amidon et dont l'accumulation dans les tissus est responsable de maladies. Elle n'a pas de composition définie, c'est un mélange de différents composés comprenant parfois des hormones et d'autres protéines.
- **Apolipoprotéine** :
Une protéine dont le rôle essentiel est le transport du cholestérol et lipides, triglycides. Des polymorphismes ont été mis en évidence au sein de l'apolipoprotéine E (apoE). Il existe en effet pour ce gène trois allèles fréquents appelés, E2, E3 et E4. Plusieurs études ont montré que la présence de l'allèle est associée à un risque accru de développer la maladie d'Alzheimer, alors que l'allèle e2 a au contraire un effet protecteur.
- **APP: (Amyloid Precursor Protein)** :
Protéine précurseur de l'Amyloïde- β
- **Appareil de Golgi**:
Concentre et excrète les protéines élaborées par le réticulum endoplasmique.
- **Athérosclérose** :
Processus pathologique qui conduit à l'épaississement de la paroi (l'intima) des artères. Le dépôt de cholestérol dans la paroi artérielle déclenche des phénomènes complexes qui aboutissent à la formation des plaques d'athérome.
- **Axone** :
Un axone ou fibre nerveuse est le prolongement long, mince et cylindrique d'un neurone qui conduit les impulsions électriques en dehors du corps cellulaire. Les axones sont effectivement les principales lignes de transmission du système nerveux. Les nerfs sont constitués de faisceau d'axones. Les axones de nombreux neurones sont entourés par une gaine de myéline, synthétisée par des cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique et par des oligodendrocytes dans le système nerveux central, la gaine de myéline permet une vitesse de conduction plus élevée (jusqu'à 120 m/s).

- **Chromosome :**
Élément situé dans le noyau de la cellule, qui porte l'information génétique. Les chromosomes sont formés d'ADN et de protéines (histones) et existent sous forme de paires. L'homme et la femme possèdent 23 paires de chromosomes, dont une paire de chromosomes sexuels (XX dans le sexe féminin, XY dans le sexe masculin).
- **Cognition:**
Outil mental permettant l'analyse et la relation avec le monde extérieur, l'acquisition de connaissances et l'apprentissage, grâce aux capacités de mémoire, d'attention, de concentration, de jugement, de raisonnement, de perception de l'environnement.
- **Cohorte:**
Ensemble d'individus suivis chronologiquement, à partir d'un temps initial donné, dans le cadre d'une étude épidémiologique.
- **Cortex Cérébral:**
Partie périphérique des hémisphères cérébraux, siège des fonctions nerveuses les plus élaborées telles que le mouvement et la conscience.
- **Cytoplasme:**
Lieu ou un ensemble d'éléments qui se trouvent à l'intérieur de la cellule, à l'exclusion du noyau. Il est limité par la membrane cellulaire, renferme des éléments différenciés permettant à la cellule d'assurer son fonctionnement.
- **Démence:**
Détérioration progressive du fonctionnement mental cognitif (mémoire, jugement, raisonnement, langage, praxies, gnosies) et non cognitif (personnalité, affections) entraînant une altération des conduites sociales.
- **Ectodomaine:**
Une partie de la protéine transmembranaire (exple: récepteur) qui se projette à l'extérieur de la cellule.
- **Forme sporadique:**
Qualifie se qui touche seulement quelques personnes au sein d'une population, cas par cas sans qu'il se forme une chaîne de transmission.
- **Forme familiale:**
Contrairement au cas sporadique, c'est due a une transmission des gènes atteints de la maladie d'une personne à une autre.
- **Gène:**
Un gène est un "morceau" de l' ADN contenu dans le noyau de nos cellules et qui porte le plan de fabrication d'une protéine . Les gènes sont porteurs des informations relatives aux caractéristiques d'un individu (couleur des yeux par exemple). L'homme possède environ 30 000 gènes, ce qui ne représente que 5% de tout son ADN. Certaines espèces animales et végétales ont plus de gènes que l'homme

- **Glande:**
Organe dont le fonctionnement est caractérisé par la synthèse et la sécrétion d'une substance.
- **Glycoprotéine:**
Substance formée d'une protéine liée à un glucide.
- **Hyperphosphorylation:**
L'affinité de la protéine tau pour les microtubules est régulée par phosphorylation. Une hyperphosphorylation de la protéine tau empêche celle-ci d'exercer son rôle de polymérisation et de stabilisation des microtubules du cytosquelette neuronal. Il s'ensuit une perturbation du réseau microtubulaire et donc du transport axonal. L'atteinte de ce système vital entraînerait la dégénérescence du neurone.
- **Hypocampe:**
Structure du système limbique impliquée dans la mémoire et la représentation spatiale. Cette partie du cerveau joue également un rôle important dans le traitement et le stockage de la mémoire à long terme.
- **Membrane:**
Enveloppe qui limite la cellule ou le noyau cellulaire, un organe ou une partie d'organe.
- **Microtubules :**
Tubes présents dans les neurones. Ils servent de rails sur lesquels les constituants du neurone se déplacent. Dans la maladie d'Alzheimer, les microtubules sont déstabilisés et empêchent ainsi le passage de ces constituants, ce qui entraîne la mort du neurone.
- **Neurodégénérative :**
Altération progressive du fonctionnement du système nerveux.
- **Notch :**
La protéine Notch (notch: échancrure) a été identifiée au départ sur la mouche des fruits, *Drosophila*, et elle doit son nom à l'existence d'une échancrure caractéristique sur les ailes des mouches qui présentent une mutation du gène Notch. Il a été démontré par la suite qu'elle était importante chez les mammifères, en tant que ligand déclencheur d'une voie de signalisation intracellulaire, impliquée dans les décisions qui concernent le devenir des cellules pendant l'embryogenèse, l'hématopoïèse et la différenciation des neurones. Quand la protéine Notch se lie à son récepteur membranaire, la protéine réceptrice est clivée dans la membrane, libérant dans la cellule un fragment qui sert de signal. Ce fragment se lie aux autres molécules intracellulaires, et le complexe pénètre dans le noyau, où il se lie à l'ADN pour réguler l'activité de certains gènes qui empêchent les cellules de se différencier. Ainsi, le Notch sécrété par une seule cellule maintient les cellules avoisinantes dans un état d'immaturité.
- **Pathologie:**
L'étude du développement des maladies. L'étude des causes, des symptômes et leurs évolutions, ainsi que les lésions et les complications éventuelles.

- **Phénotype :**
Le génotype est constitué par l'ensemble des caractères héréditaires propres à un individu. La combinaison des deux gènes situés face à face sur les deux chromosomes homologues s'appelle «génotype». Le phénotype correspond à l'expression de ce patrimoine génétique dans un environnement donné. Il rend compte des caractéristiques anatomiques et physiologiques d'un individu. L'existence de gènes dominants et récessifs explique qu'à un même phénotype correspondent des génotypes différents.
- **Protéase :**
Toute enzyme qui, en coupant les liaisons chimiques (liaison peptidique) entre les acides aminés, assure la dégradation des protéines.
- **Protéolyse :**
La protéolyse correspond à la fragmentation d'une protéine en plusieurs morceaux sous l'action d'une enzyme protéolytique en utilisant des agents chimiques.
- **Réticulum endoplasmique :**
C'est un réseau de vésicules qui joue un rôle important dans la synthèse des protéines.
- **Secrétases :**
Se sont des protéases (jouent le rôle d'enzymes pour les protéines) qui régulent la sécrétion des fragments d'une protéine par une cellule. Dans le cas de l'APP, les trois secrétases (α , β , et γ) la coupe à différents endroits et donnent différents fragments.
- **Tau :**
La plus importante des protéines présentes dans les microtubules. La protéine tau est responsable de la stabilité des microtubules. Durant la maladie d'Alzheimer, tau s'accumule et se trouve incapable de se lier aux microtubules, entraînant la formation de paires de filaments en hélice.
- **Thalamus :**
Noyaux de la substance grise situés de part et d'autre de la cavité du troisième ventricule par lesquels convergent de nombreuses informations sensorielles et sensibles.
- **Transmembranaire :**
Une molécule (récepteur) qui traverse la membrane de la cellule. C'est à dire qu'elle a une partie à l'intérieur de la cellule et l'autre partie à l'extérieur de la cellule.
- **Ubiquitaire :**
Une molécule est dite ubiquitaire si elle est présente dans de très nombreux tissus de l'organisme.



En début de ce 21^{ème} siècle, de nombreuses maladies ont fait leurs apparitions ou ré-apparitions; c'est dire qu'elles sont ou restent non maîtrisées à nos jours.

On connaît celles que l'on croyait éradiquées ou que l'on croyait savoir guérir, comme les maladies infectieuses (tuberculose, paludisme...) et pour lesquelles des phénomènes de résistances remettent en cause les traitements.

Aussi, on connaît celles qui sont tristement célèbres et pour lesquelles aucune véritable solution thérapeutique n'existe encore aujourd'hui; comme le sida ou le cancer.

Et enfin celles qui de manière relativement récente, prennent une ampleur alarmante comme les maladies neurodégénératives telles que Parkinson et Alzheimer.

Les recherches conduisant à une amélioration de la santé publique et à la lutte contre les grandes maladies de notre siècle sont à peu près les seules dont l'intérêt fait l'unanimité aux yeux du public. Un public qui méconnaît les apports bénéfiques de la chimie pour ne voir que les effets négatifs, car les médias se font souvent l'écho de la nocivité des produits chimiques en oubliant de rappeler combien la chimie a apporté et continue d'apporter au domaine de la santé, comme par exemple pour le diagnostic des maladies avec les méthodes d'analyses et de dosage, permettant de déceler des traces de substances inconnues et de les identifier.

«La chimie a mauvaise presse, et pourtant on doit à cette discipline une part importante dans l'augmentation de notre espérance de vie.» Isabelle RICO-LATTES, Directeur de Recherches au CNRS, Directrice du Laboratoire Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique (IMRCP) (Unité mixte UPS/CN

L'un des axes majeurs de la recherche en chimie concerne la mise au point de molécules à intérêt thérapeutique; c'est un domaine en plein développement qui bénéficie d'interactions fortes entre chimistes et chercheurs dans le domaine médical (avec le groupe de chimistes travaillant en amont). C'est pour cette raison que les mots «chimie» et «santé» qui apparaissent trop souvent comme incompatibles sont associés volontairement.

Introduction Générale

La chimie est une alliée précieuse de la médecine, elle contribue à la compréhension du fonctionnement de la machinerie biologique au niveau moléculaire et de son dérèglement dans le cas de pathologie. La chimie permet également de mettre au point et d'utiliser des outils pour le diagnostic des maladies. On peut citer plusieurs applications comme: la conception et la synthèse de sonde moléculaire adressée à un récepteur impliqué dans une pathologie donnée (Cancer, Parkinson ou Alzheimer) et délivrant un signal magnétique (Imagerie par Résonance Magnétique; IRM) ou d'un signal radioactif résultant de l'émission de positrons par des molécules marquées au fluor-18 (Topographie par Émission de Positrons, TEP),etc...

Le chimiste peut également mettre à profit son savoir faire pour concevoir des médicaments à partir de la connaissance des mécanismes moléculaires, dysfonctionnements cellulaires et particularités pathogéniques.

Notre intérêt s'est porté sur la maladie d'Alzheimer qui est une maladie neurodégénérative. Plusieurs modifications surviennent au niveau du cerveau des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer, les cellules du cerveau rétrécissent ou disparaissent et sont remplacées par des taches ou plaques de formes irrégulières. Au même moment, des enchevêtrements filiformes apparaissent à l'intérieur des cellules cérébrales, entraînant à terme leur asphyxie. La protéine qui est à la base des plaques est appelée «béta-amyloïde», celle qui est à la base des enchevêtrements cependant est connue sous le nom de «tau». La recherche scientifique tente de comprendre les causes de la détérioration des cellules cérébrales en examinant de près ces protéines. Les facteurs de risque, la génétique et les techniques de soins.

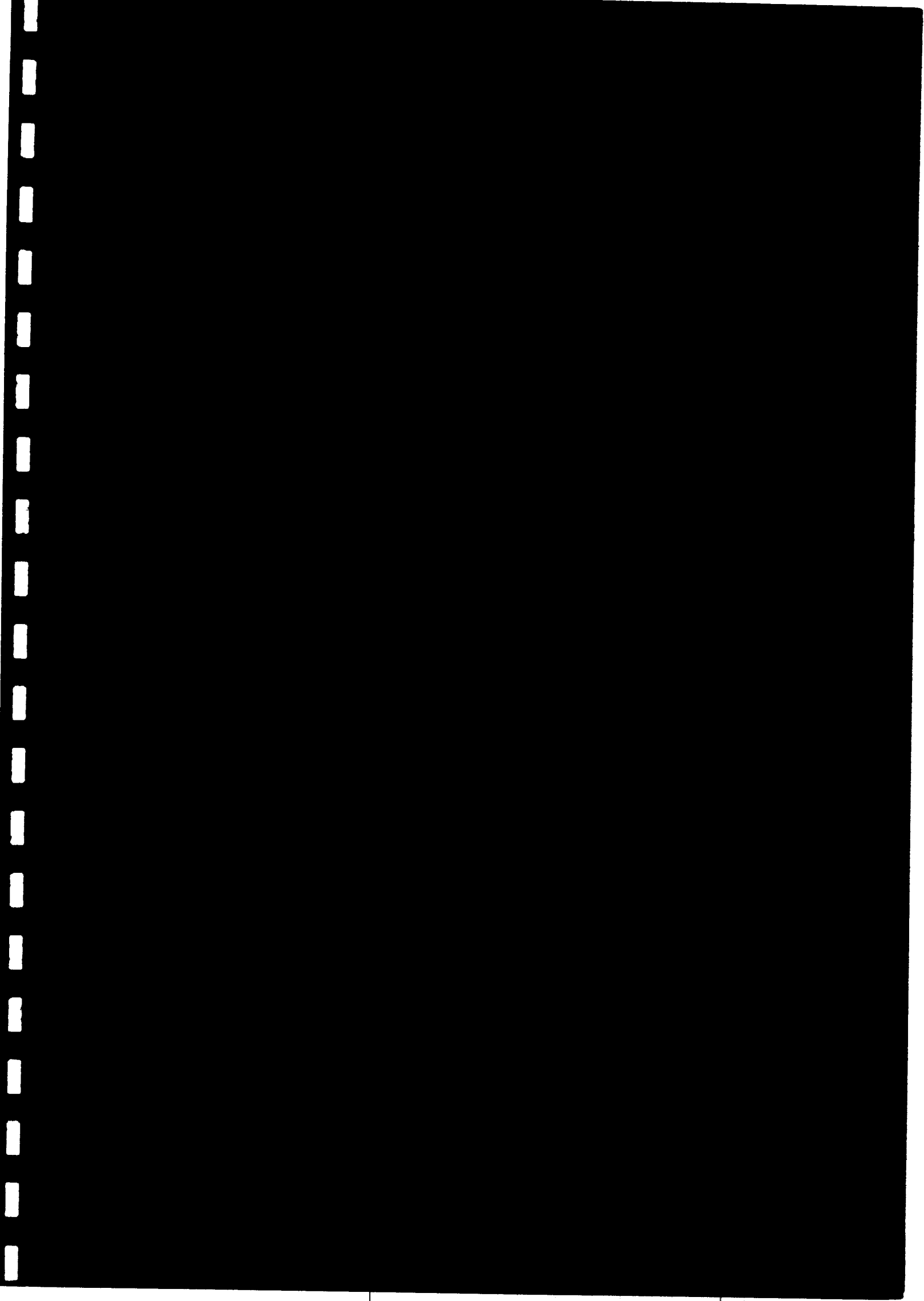
On peut toutefois souligner qu'il ne s'agit en rien d'un phénomène normal de vieillissement. C'est une véritable pathologie chronique à évolution progressive.

En étudiant les travaux publiés dans le cadre de la maladie d'Alzheimer et les différentes stratégies thérapeutiques qui ont été réalisées, les sécrétases (α , β , γ) sont les plus ciblés.

L'objectif de cette mémoire a été la synthèse de produits visant à inhiber la fonction de l'une de ces sécrétases (γ).

Introduction Générale

Dans un premier temps nous décrivons la maladie d'Alzheimer, ses symptômes, ses causes et ses facteurs de risques, puis nous étudions les outils chimiques impliqués dans la synthèse et enfin le travail réalisé au cours de ce mémoire.



Introduction :

Avant de présenter de façon appropriée la maladie d'Alzheimer (M.A), et pour bien comprendre sa pathologie, j'ai considéré utile de présenter d'abord et de façon simple l'anatomie du cerveau humain, d'où la figure suivante :

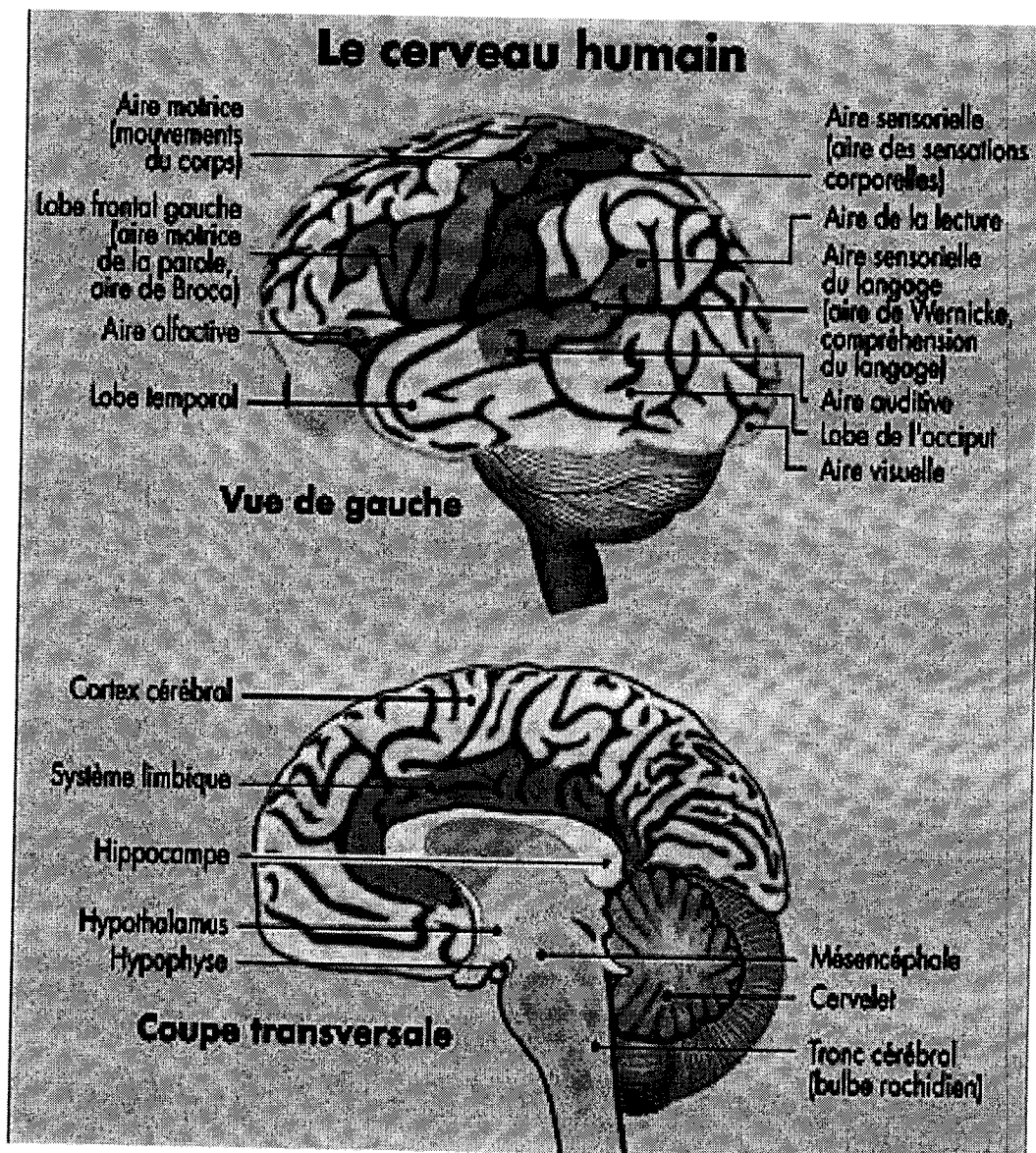


Figure 1: Représentation des différentes parties du cerveau avec ses différentes fonctions ainsi qu'une coupe transversale pour montrer l'emplacement du cortex cérébral ainsi que l'hippocampe, les deux parties qui sont les plus touchées au cours de la M.A.

CHAPITRE 1 : LA MALADIE D'ALZHEIMER

Ce qui est important de noter est que le cortex cérébral englobe la majorité de la masse du cerveau, touchant ainsi aux différentes aires (parole, sensation, olfaction, langage, audition, vision). Il est tout aussi important de noter le rôle de l'hippocampe qui touche à la mémoire et à la représentation spatiale.



Figure 2: Une image IRM d'un cerveau normal (à gauche) et une autre d'un cerveau atteint de la M.A (à droite). La figure montre bien l'atrophie du cerveau dans le cas de la maladie (disparition de l'hippocampe ainsi que la diminution du volume du cortex cérébral).

Notre espérance de vie augmente et avec elle le risque de développer la M.A. D'après une étude statistique publiée dans le quotidien d'Oran du 23 octobre 2006, la maladie touche aujourd'hui 90.000 algériens.

Un siècle après la description du premier cas, que sait-on de cette maladie qui fait atrophier le cerveau ? Quelles sont ses causes, ses symptômes et ses traitements ?

Ce présent chapitre fait le point sur ces questions et apporte des réponses à ces dernières.

I. LA MALADIE D'ALZHEIMER:

La maladie d'Alzheimer est définie comme un trouble du cerveau, qui se produit graduellement en causant une dégénérescence. Elle est alors décrite comme maladie neurodégénérative. Elle affecte approximativement 30 millions de personnes à travers le monde (1). Elle se résume en la perte progressive de la mémoire puis des fonctions cognitives menant ainsi à une mort neuronale et donc inévitablement à la mort de la personne atteinte.

À la fin du 19ème siècle, l'état de démence d'une personne âgée était considéré par la grande majorité des gens comme habituel et lié à l'usure normale du temps. Cependant, de plus en plus de médecins croyaient qu'il était nécessaire d'étudier de façon plus approfondie l'histologie du cerveau dans les maladies mentales, afin de mieux comprendre ces maladies.

Ce fut en 1906, lors d'une réunion de psychiatres allemands, que le docteur Alois Alzheimer (1864 – 1915) décrit pour la première fois les symptômes d'une patiente âgée de 51 ans, atteinte de démence et présentant des troubles de la mémoire, de l'orientation, en plus de désordres des fonctions cognitives et d'hallucinations ce qui mène à la perte de l'autonomie personnelle (2).

À l'aide du microscope, l'analyse histologique du cerveau des patients avait révélé des dépôts protéiniques (plaques), des enchevêtrements neurofibrillaires et une perte (mort) neuronale, en particulier dans le cortex cérébral et l'hippocampe. Peu de temps après ces observations, les gens de la communauté médicale de l'époque donnèrent à cette nouvelle maladie le nom de maladie d'Alzheimer. Cette description histologique initiale de la M.A n'est guère différente de la description actuelle. Et comme nous allons le voir, il a été possible d'avancer plusieurs hypothèses sur les causes de la maladie.

Aujourd'hui, des études statistiques démontrent que les hommes autant que les femmes, toutes ethnicités confondues, risquent de développer la maladie, quoique les femmes sont plus susceptibles de la développer que les hommes avec un rapport de 1,2 à 1,5 (3).

Dans les pays occidentaux, la M.A est la première cause de démence et la quatrième cause de décès, précédée par les maladies cardiaques, le cancer et les accidents vasculaires cérébraux (AVC). Les études statistiques avancent qu'en raison du vieillissement rapide de la population, le nombre de cas et les coûts liés aux soins des gens atteints de la maladie prendront des proportions alarmantes dans les années futures.

I. 2 Les symptômes de la maladie d'Alzheimer:

Au fur et à mesure que la M.A affecte chaque région du cerveau, elle entraînera la perte de certaines fonctions ou habiletés. Cela résulte en des symptômes ou changements spécifiques dans le comportement des personnes atteintes de la maladie. Il est important de rappeler qu'une fois l'habileté perdue, elle peut rarement être apprise de nouveau.

La M.A est un ensemble de symptômes qui se manifestent par l'atteinte de la mémoire dans un premier temps (ce symptôme est souvent le motif de la première consultation). L'atteinte de la mémoire est liée à des lésions situées dans le cerveau (l'hippocampe, cortex cérébral). Le patient oublie les faits récents, ce qui perturbe chaque jour un peu plus sa vie quotidienne. La progression des lésions entraîne d'autres troubles: trouble du langage, programme gestuel et reconnaissance d'objets et de visages. L'atteinte grave des capacités cognitives conduit à la perte progressive de l'autonomie personnelle qui caractérise cette démence.

Bien que la maladie entraîne des changements, elle ne modifie pas la capacité de la personne à éprouver des sentiments comme la joie, la colère, la peur, l'amour ou la tristesse, et à réagir à ces sentiments; les patients conscients de leur maladie deviennent dépressifs et agités (4).

I. 3 Les facteurs de risques:

Les causes de la M.A sont difficiles à identifier. Dans une très importante portion des personnes atteintes, la maladie survient soudainement chez des sujets âgés de 65 ans et plus. A coté de ces formes dites sporadiques, il y a les formes familiales dont de nombreuses études ont démontré un risque plus élevé d'être atteint si un parent est déjà atteint de la maladie (3).

CHAPITRE 1 : LA MALADIE D'ALZHEIMER

Dans les formes familiales de la maladie, trois chromosomes ont été identifiés comme porteurs de gènes impliqués dans le développement de la maladie: le gène APP sur le chromosome 21, le gène PS1 sur le chromosome 14 et le gène PS2 sur le chromosome 1 (voir **Tableau 1**). Il s'agit là de formes d'apparitions précoces qui sont dues à la présence d'un gène muté (5, 6, 7).

Pour ce qui est de la M.A sous la forme sporadique, il y a un gène codant pour l'apolipoprotéine E sur le chromosome 19 et plus précisément l'allèle ϵ_4 qui contribue à la formation des amyloïdes (5).

Tableau 1: Chromosomes et gènes impliqués dans le développement de la maladie.

CHROMOSOME	PROTÉINE IMPLIQUÉE	NOMBRE DE MUTATIONS	FONCTION
21	APP	18	Augmente la production des amyloïdes
19	APOE4	/	Favorise la formation des amyloïdes
14	Préséniline 1	142	Augmente la production des amyloïdes
1	Préséniline 2	10	Augmente la production des amyloïdes

Comme l'origine de la maladie est loin d'être clarifiée, il y a des facteurs de risque environnementaux qui sont moins évidents et qui semblent avoir une influence sur la progression de la pathologie, mais ne causent pas nécessairement la maladie. On peut citer parmi lesquels:

■ L'âge

Le facteur de risque le plus évident est l'âge : l'étude PAQUID (faite à bordeaux qui est une enquête épidémiologique dont l'objectif est d'étudier le vieillissement cérébral normal et pathologique dans une population de 4.000 personnes de 65 ans et plus vivants à domicile) a montré que l'évolution du risque de démence en fonction de l'âge est relativement stable avant 75 ans et s'établit à environ 3,5 pour 1.000 personnes/année. Après 75 ans, l'incidence (nombre de nouveaux cas par an) croît de façon linéaire pour atteindre 40 pour 1.000 personnes/année chez les personnes âgés de 90 ans et plus. La **Figure 3** ci-dessous représente la prévalence de la M.A (pourcentage de personnes atteintes dans la population) exprimée en pourcentage de la population pour une catégorie d'âge donnée (Résultats PAQUID, 2003).

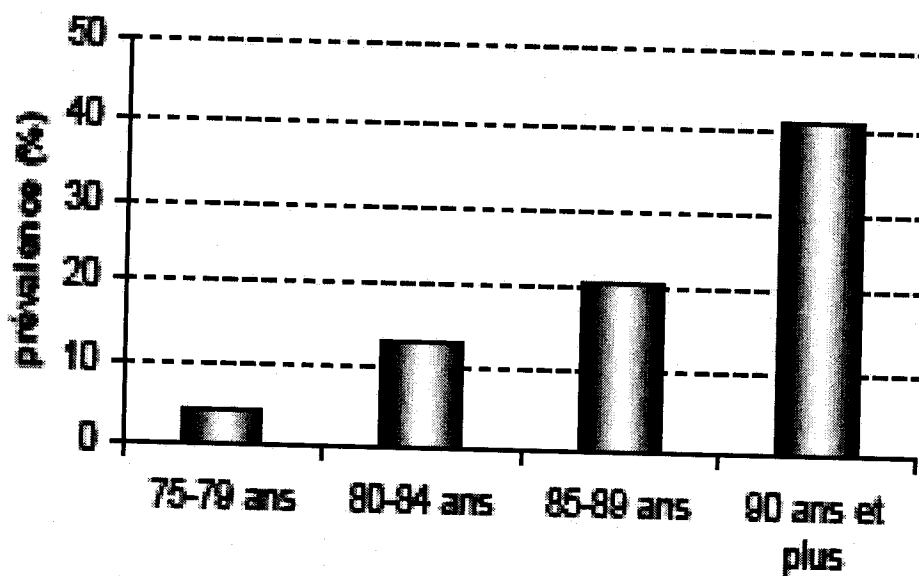


Figure 3: représentation graphique de la prévalence (%) de la maladie d'Alzheimer en fonction de l'âge (Résultats PAQUID, 2003).

● Le sexe

Les femmes ont plus de risque que les hommes de développer la M.A. L'étude PAQUID a montré que l'incidence de la M.A devenait plus importante chez les femmes que chez les hommes après l'âge de 80 ans, et que cette différence n'était pas liée à la différence de niveau d'éducation. Cette différence en fonction du sexe pourrait s'expliquer par les différences génétiques et hormonales (notamment liée à la baisse du niveau d'oestrogène avec l'âge chez la femme). Cependant, des différences sociales entre les deux sexes, ou simplement la différence

de longévité entre hommes et femmes, pourraient aussi expliquer ce phénomène. En effet, les hommes dont la longévité est accrue par rapport à la moyenne pourraient justement être les hommes les plus résistants aux maladies neurodégénératives. Le graphique ci-dessous (Figure 4) représente la prévalence de la M.A pour les deux sexes, et pour une catégorie d'âge donnée (Résultats PAQUID, 2003).

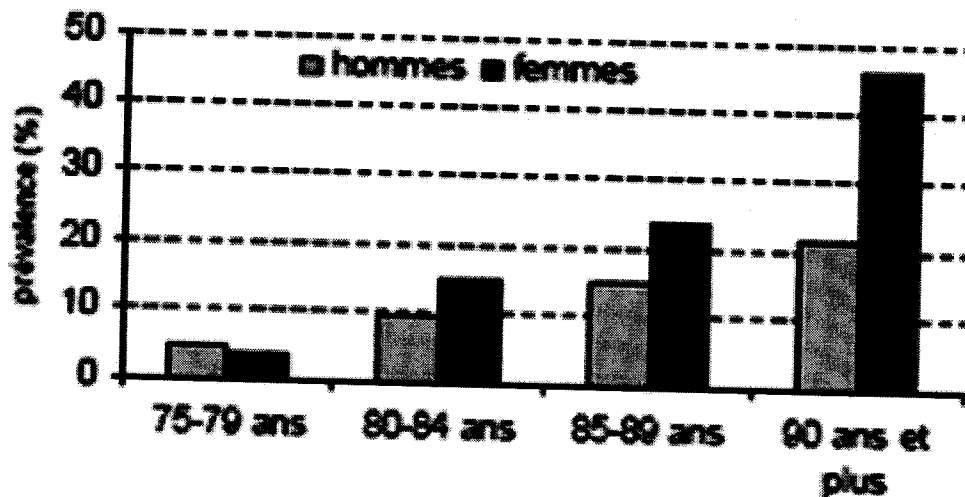


Figure 4: représentation graphique de la prévalence (%) de la M.A en fonction du sexe (Résultats PAQUID, 2003).

● La stimulation cognitive

Les personnes ayant un faible niveau d'éducation sont plus susceptibles de développer la maladie. Acquérir un haut niveau d'éducation pourrait différer la dégradation des capacités intellectuelles en constituant des possibilités de compensation lors du développement des symptômes habituels de la maladie. De la même façon, la pratique d'activité de loisirs et d'activités sociales tel que le sport, développant l'initiative et la planification des tâches, pourraient diminuer le risque de démence en entretenant un bon niveau d'entraînement intellectuel et en favorisant la stimulation cognitive des sujets (8, 9).

● Les facteurs vasculaires

L'athérosclérose semble être fortement associée à la M.A. En effet, il semble que le traitement de l'hypertension artérielle réduit l'incidence de la M.A. Ce facteur de risque représenté par les pathologies vasculaires est actuellement pris très au sérieux. Afin de confirmer les

résultats déjà obtenus, une grande étude épidémiologique est actuellement menée afin d'étudier la relation entre pathologie vasculaire et démence, sur une cohorte d'environ 10.000 sujets âgés de 65 ans et plus.

● **Les anti-oxydants**

Il se pourrait que la prise d'anti-oxydants comme la vitamine E puisse réduire le risque de la M.A (10). Il se pourrait également que les effets bénéfiques d'une consommation modérée d'alcool observés lors de l'étude PAQUID soient en partie dus aux propriétés anti-oxydantes des tannins contenus dans le vin, et/ou à l'action de l'alcool sur le système vasculaire.

● **Les anti-inflammatoires non stéroïdiens**

La prise d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) pourrait également avoir un rôle protecteur sur la survenue de la M.A. Ces substances pourraient contribuer à réduire l'inflammation cérébrale créée par la formation des plaques séniles au cours de la M.A (3).

● **L'allèle ϵ_4 de l'apolipoprotéine E**

Le rôle de l'hérédité dans la forme sporadique de la M.A est incertain et continue à faire l'objet de nombreuses recherches. Pour l'instant, le seul facteur de risque génétique dont l'implication dans la M.A reste indiscutable est la possession de l'allèle ϵ_4 de l'apolipoprotéine E (apoE₄) (5). L'apolipoprotéine existe sous trois formes ϵ_2 , ϵ_3 , ϵ_4 mais seulement la forme apoE₄ constitue un risque pour développer la maladie (11, 12) (mais pas une évidence), (12, 13, 14) alors que la forme apoE₂ peut conférer une protection contre le développement de la maladie (13). Il est également reconnu comme facteur de risque de maladies vasculaires. Là encore, la possession de l'allèle ϵ_4 ne provoque pas nécessairement la maladie.

D'autres facteurs moins importants ont aussi été considérés comme : un bas niveau de sérum folate et un faible niveau de la vitamine B12 (10, 15).

II. L'ASPECT NEUROPATHOLOGIQUE:

Comme il a été mentionné précédemment, la grande majorité des connaissances sur les causes probables de la M.A proviennent d'études histologiques du cerveau et de ses pathologies. Ces études ont montré qu'il s'agisse de forme sporadique ou familiales, toutes deux favorisent l'accumulation des plaques séniles et des enchevêtrements neurofibrillaires qui sont les vraies causes de la M.A (figure 5).

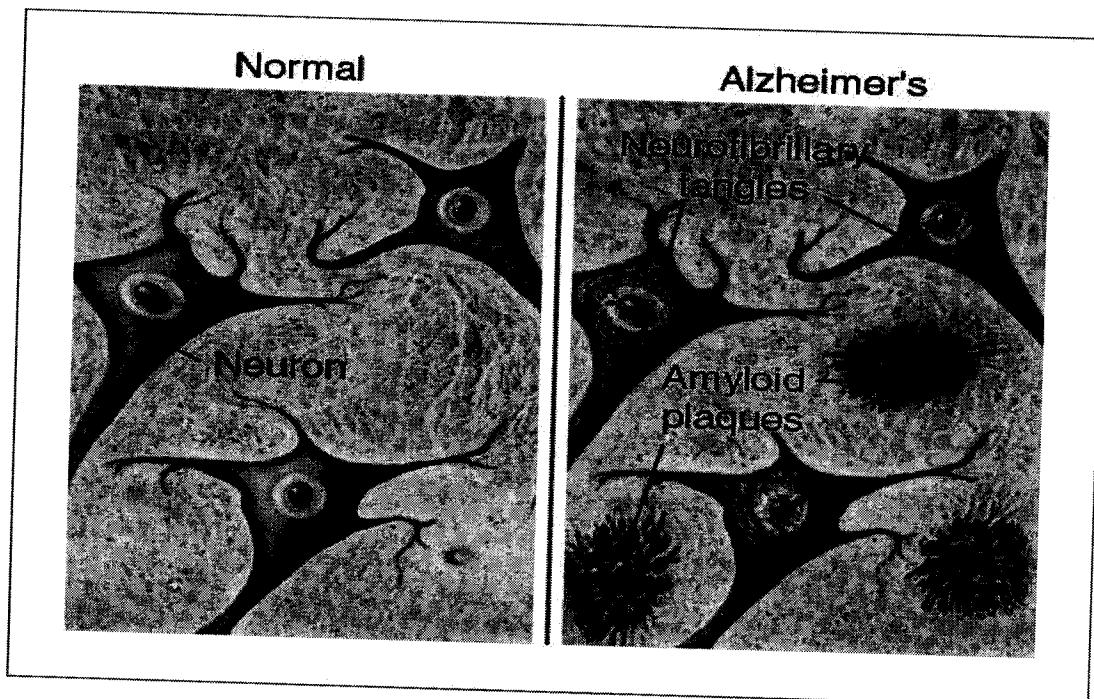


Figure 5: Les deux pathologies de la M.A, les plaques amyloïdes et les enchevêtrements fibrillaires. Ainsi que la différence entre des cellules d'un cerveau sain et ceux d'un cerveau atteint de la M.A

II. 1 Les plaques séniles:

Les plaques séniles ou amyloïdes sont situées dans l'espace entre les cellules. Le cœur des plaques est constitué de dépôts anormaux d'une protéine dite β -amyloïde qui est un fragment de dégradation d'une protéine précurseur (dite APP) dont le gène est situé sur le chromosome 21.

La protéine β -amyloïde ($A\beta$) est d'une longueur variée allant de 24 à 46 acides aminés. Cependant, les formes prépondérantes contiennent 40 ou 42 acides aminés (respectivement $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$) (1). Les plaques séniles (qui sont constituées majoritairement de la $A\beta_{42}$) sont

sous la forme de fibrilles insolubles (1) qui peuvent être révélées par une coloration au rouge Congo ou à la thioflavine-S (4).

Cette forme du peptide est la plus enclin à l'agrégation, par comparaison avec l' $A\beta_{40}$ moins hydrophobe (soluble) considérée non toxique, quoique des recherches récentes ont montré que la $A\beta_{40}$ est aussi un peptide toxique quand elle dépasse un certain seuil de concentration (16).

Les plaques séniles constituées de l'agrégat amyloïdogénique résistent à la dégradation protéolytique et tuent les neurones. Le processus de détection des plaques amyloïdes est difficile (11). En effet, des personnes âgées en bonne santé peuvent présenter une charge importante en $A\beta$ dans le cerveau sous forme de plaques diffuses et présentent des performances cognitives normales (1), avec un pourcentage de 95% et 5% pour $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$ respectivement (17).

II. 2 Les dégénérescences neurofibrillaires:

Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) désignent des agrégats de matériel fibrillaire anormal dans le cytoplasme des neurones. Elles correspondent à l'accumulation de filaments anormaux qui s'associent en hélice pour former les paires hélicoïdales de filaments (PHF) (18).

Les PHF sont constituées de protéines (les protéines TAU) qui sont hyperphosphorylées. Cette protéine est normalement capable de promouvoir l'assemblage des microtubules et d'en réguler la stabilité. La protéine tau joue un rôle essentiel au niveau des axones en étant impliquée dans le transport antérograde des substances. Dans le cerveau normal, l'équilibre entre phosphorylation et déphosphorylation de la protéine tau module la stabilité du cytosquelette et, par conséquent, la morphologie axonale. Cette particularité biochimique (l'hyperphosphorylation) provoque une perturbation du fonctionnement du neurone puis sa mort, (19, 20).

III. LES ROLES DE L'APP, DE LA PS1 ET DES SECRETASES :

III. 1. La contribution de la préséniline 1:

Chez l'humain, on dénote deux présénilines connues sous les abréviations de PS1 et PS2. Ces protéines serpentine possèdent 6 à 8 domaines transmembranaires. La préséniline 1 est exprimée dans tous les tissus, mais principalement dans le système nerveux central et périphérique. La préséniline 2 partage une homologie de 67% avec la séquence en acides aminés de PS1 (21) trouvée aussi dans le cerveau, alors que la PS2 est exprimée très peu dans le cerveau; cependant, elle est abondante dans le muscle cardiaque, squelettique, le pancréas et le cœur (7). Dans les neurones, elle se retrouve dans le corps cellulaire et les dendrites (21).

En plus des mutations existantes dans l'APP, il y a d'autres mutations qui s'effectuent dans la PS1 (22) et des mutations qui s'effectuent dans la PS2 (23). Toutes ces mutations sont dans le voisinage du domaine transmembranaire plus précisément entre les domaines 6 et 8 de la protéine. Toutes ces mutations sont identifiées comme étant des causes génétiques de la maladie d'Alzheimer (3). Il y'a d'autres évidences qui relie la PS1 à l'activité protéolytique de la γ -sécrétase (12, 24). Elles se résument en la production de $A\beta$ à partir de sa protéine précurseur (APP). Il faut noter cependant que l'absence de la PS1 diminue l'activité de la γ -sécrétase, (5, 25), et que l'absence de la PS1 et PS2 inhibe totalement l'activité de la γ -sécrétase.

III. 2. La protéine précurseur des amyloïdes (APP):

L'APP est une glycoprotéine transmembranaire dont le gène se situe sur le chromosome 21(25, 26). Le gène code plusieurs isoformes de l'APP de 365 à 770 acides aminés (3). Ces isoformes de l'APP contiennent toutes la séquence de 39 à 43 acides aminés correspondant à l' $A\beta$ retrouvée dans les plaques séniles. Il existe 5 isoformes de l'APP, qui sont APP₃₆₅, APP₅₆₃, APP₆₉₅, APP₇₅₁, APP₇₇₀. Mais les principales isoformes, qui sont APP₆₉₅, APP₇₅₁, APP₇₇₀, sont retrouvées dans le système nerveux avec APP₆₉₅ prédominante dans les cellules neuronales, alors que APP₇₅₁, APP₇₇₀ sont retrouvées dans les cellules neuronales aussi bien que dans les cellules non neuronales (2, 26, 27).

Aujourd'hui, on a répertorié plus de 18 mutations différentes dans le gène codant l'APP, cependant ces mutations ne représentent que 10% des cas de la forme familiale et seulement 2% des cause de la maladie d'Alzheimer (3).

III. 2. 1. Le processus de clivage de l'APP:

Le peptide de la β -amyloïde est un produit de dégradation de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) (28, 29). Elle y dérive par deux processus possibles : un processus amyloïdogénique ou un autre processus non amyloïdogénique (figure 6).

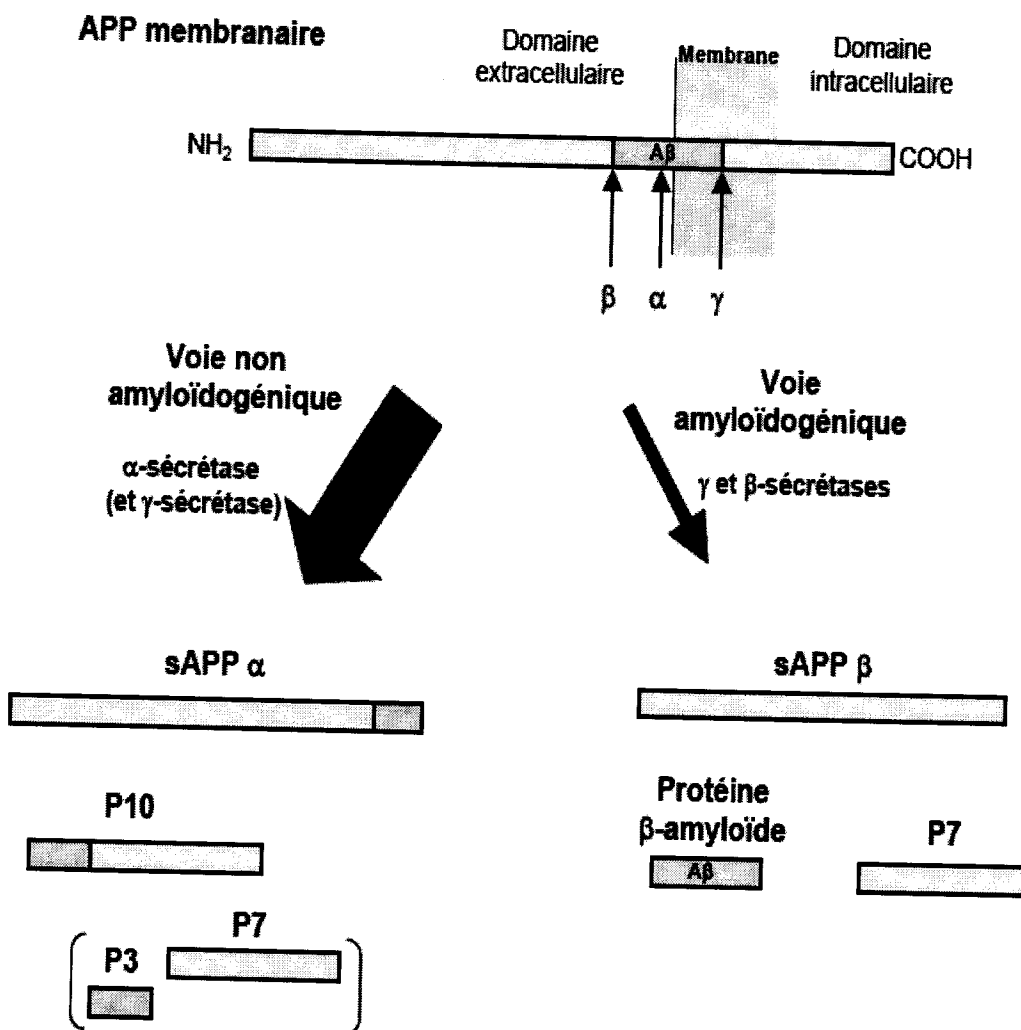


Figure 6: les deux processus possibles de clivage de l'APP, amyloïdogénique (il produit les plaque séniles) et non amyloïdogénique.

La voie non amyloïdogénique fait intervenir une activité α -sécrétase qui coupe l'APP au milieu de la séquence correspondant à l'A β , permettant ainsi la sécrétion dans l'espace extracellulaire d'une forme sécrétée de l'APP, le sAPP α . Puis le sAPP γ est libéré dans l'espace extracellulaire. Le fragment C-terminal de l'APP restant, nommé P10, peut être clivé par l'activité γ -sécrétase pour générer deux fragments P7 et P3. Cette voie de sécrétion ne produit donc pas de protéine β -amyloïde.

La voie amyloïdogénique fait intervenir les activités β - et γ -sécrétases. On a d'abord l'APP qui est coupé par la β -sécrétase (nommée aussi BACE "Beta Amyloïd Cleaving Enzyme") pour produire un fragment N-terminal nommé sAPP β , l'autre fragment est ensuite coupé par la gamma-sécrétase pour donner le fragment P7 et le fragment toxique (la β -amyloïde) constituée majoritairement de 42 acides aminés (2, 3).

III. 3. La gamma-sécrétase:

La gamma-sécrétase a été découverte comme étant une protéase intramembranaire. Dans un premier temps, elle a été découverte comme ayant un rôle dans la production des amyloïdes à partir de la protéine précurseur APP. En plus, elle a un rôle dans le processus de clivage de nombreux autres récepteurs transmembranaires intermédiaires de différents chemins de signalisation, comme par exemple le Notch pour la production du domaine intracellulaire du Notch (NICD).

Pour comprendre le métabolisme biologique de cette substance il fallait connaître son identité (30). En fin des années 90, on a soupçonné que la PS1 était la gamma sécrétase (21).

Mais l'activité gamma-sécrétase semblait de toute évidence nécessiter la participation d'autres protéines. Des recherches intensives au cours des dernières années ont permis de suggérer que l'activité gamma-sécrétase est en fait assurée par un large complexe protéique mu, appelé le complexe gamma-sécrétase. Quatre protéines membranaires participent à sa formation, dont la Nicastrine, l'Aph-1, la Pen-2 et finalement la préséniline (31, 30). (Figure 7)

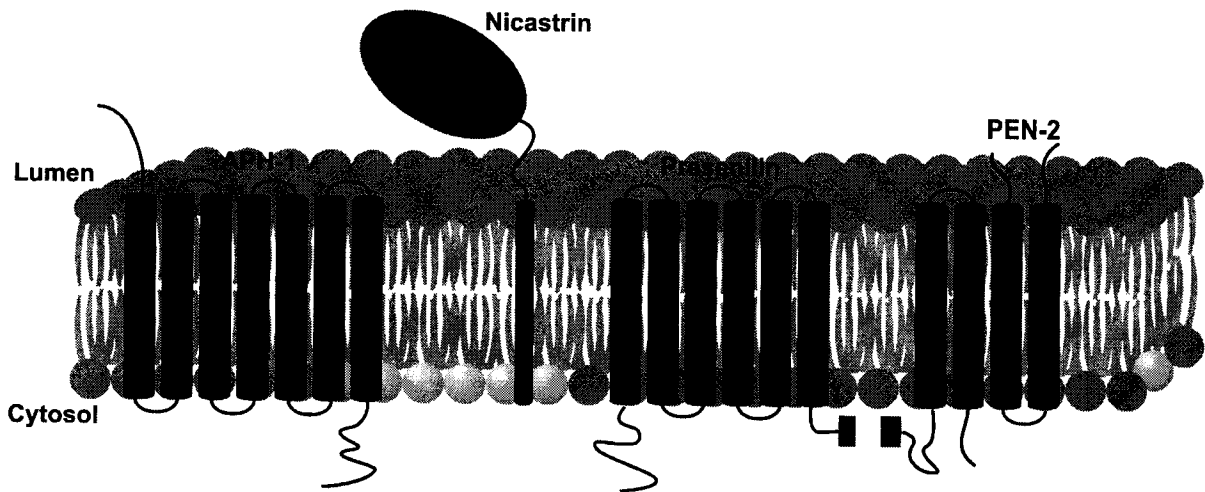


Figure 7: le complexe de la gamma-sécrétase.

Dans un premier temps, la protéine Nicastrine qui est une transmembrane liée à la PS 1 a une fonction de receveur. Elle capte les substances avec son fragment C-terminal (31), et elle est constituée de 709 acides aminés. Elle est exprimée de façon ubiquitaire mais préférentiellement dans le cerveau. Dans la cellule, la Nicastrine est principalement localisée dans le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi.

Peu de temps après la découverte de la Nicastrine, les protéines Aph-1 et Pen-2 furent isolées à partir d'un criblage génétique pour des phénotypes mutants de la voie de signalisation Notch (30). APH-1 est une protéine qui a un rôle d'échafaudage, avec la nicastrine ils facilitent la circulation de la gamma-sécrétase. PEN-2 est incorporée dans le trio PS1-NCT-APH-1 et liée directement au quatrième domaine de la PS1.

Ces quatre protéines confèrent à la gamma-sécrétase un haut poids moléculaire, et elles sont nécessaires pour son activité.

IV. LES APPROCHES THERAPEUTIQUES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER :

La médecine dispose actuellement de plusieurs traitements, qui permettent une amélioration des fonctions intellectuelles du patient mais ne guérissent pas la maladie.

Parallèlement, différentes stratégies de stimulation des capacités cognitives retardent la perte d'autonomie.

Dans ce qui suit, on présentera quelques unes des stratégies entreprises dans le monde:

IV. 1. L'inhibition de l'acétylcholinestérase:

L'acétylcholine est une substance chimique faisant partie des neurotransmetteurs, c'est-à-dire sécrétée par certains neurones pour transmettre l'influx nerveux vers d'autres cellules. L'acétylcholine est présente dans le système nerveux autonome (uniquement dans les ganglions et aux terminaisons parasynaptiques). Elle intervient dans le contrôle des muscles viscéraux ou de glandes ou des deux, selon les organes (cœur, branches, vessie, œil...). Par ailleurs, elle commande les contractions des muscles striés squelettiques (32).

Dans la M.A on recherche une diminution des taux de l'acétylcholinestérase, qui est une enzyme inhibant l'action de l'acétylcholine dès sa libération dans le système nerveux, dans différentes zones du cerveau (cortex et l'hippocampe).

À l'heure actuelle, les inhibiteurs de acétylcholinestérase sont les seuls approuvés pour les stades légers et modérés de la maladie. Ces inhibiteurs font décroître l'activité de l'enzyme qui décompose l'acétylcholine, permettant ainsi d'élever les niveaux d'acétylcholine et d'améliorer la fonction cérébrale. Des preuves récentes démontrent que cette médication contribue à l'amélioration des fonctions non-cognitives, tel que le comportement.

Ces traitements permettent de soulager certains des symptômes, mais ne guérit pas la maladie, ni arrête sa progression sous-jacente. Parmi les médicaments, on peut citer:

- Donepezil, développé par la firme Eisai Co. Ltd., développé et distribué en collaboration avec Pfizer Canada Inc.

IV. 2. L'immunisation:

Différentes stratégies de stimulation des capacités cognitives retardent la perte d'autonomie. La recherche offre néanmoins des perspectives encourageantes parmi lesquelles la mise au point d'un vaccin pour l'immunisation contre la M.A..

Les essais de ce vaccin anti-amyloïde sur les humains ont été interrompus en 2002, car il s'est avéré que ces essais mènent à une méningo-encéphalite chez 5% des patients (33). Les données de recherche obtenues au cours de ces essais fournissent des renseignements précieux sur les aspects cliniques de la maladie. D'autres équipes de scientifiques poursuivent la recherche sur des animaux, en abordant la question du point de vue de l'immunothérapie.

IV. 3. L'inhibition de la bêta-sécrétase:

Le premier pas dans la formation de la bêta-amyloïde est initié par la bêta-sécrétase, une protéase qui lyse la plus grosse partie de l'APP à l'extérieur de la membrane cellulaire. En 1999, cinq groupes de recherche indépendants ont découvert cette enzyme qui est particulièrement abondante dans les neurones du cerveau. Étant donné que la bêta-sécrétase s'inscrit clairement dans cette famille, les chercheurs sont parvenus à exploiter les grandes connaissances disponibles concernant ces protéases, ce qui a permis de bien comprendre cette enzyme et la façon dont elle pourrait être arrêtée. Les chercheurs connaissent, en effet, la structure tridimensionnelle de la bêta-sécrétase et s'en sont servis comme guide pour mettre au point, sur ordinateur, des inhibiteurs médicamenteux potentiels.

Les études génétiques laissent entendre que le blocage de l'activité de l'enzyme n'aura pas d'effet indésirable dangereux ; la suppression du gène codant la bêta-sécrétase chez la souris a supprimé la formation de bêta-amyloïde dans le cerveau des rongeurs sans que entraîner de conséquence négative apparente. Actuellement, les inhibiteurs de la bêta-sécrétase ne sont toutefois pas encore prêts pour entrer dans des essais cliniques.

IV. 4. Le renforcement de l'activité de la alpha-sécrétase:

Le point de départ de la M.A est le carrefour de la protéine précurseur des amyloïdes (APP). Comme on la déjà vu il y a deux chemins de coupure de l'APP. Dans cette stratégie on renforce l'activité de la α -sécrétase pour favoriser le chemin non-amyloïdogénique.

IV. 5. L'inhibition de la gamma-sécrétase:

La gamma-sécrétase a été un objet de prédilection pour un grand nombre de scientifiques à travers le monde, depuis qu'elle a été découverte comme étant une des protéines impliquées dans le processus de production des amyloïdes.

Plusieurs molécules ont été synthétisées dans le but d'inhiber la fonction de la gamma-sécrétase. On a choisi quelques inhibiteurs structurellement différents pour montrer la diversité dans les types d'inhibiteurs, tous actifs (**figure 8**).

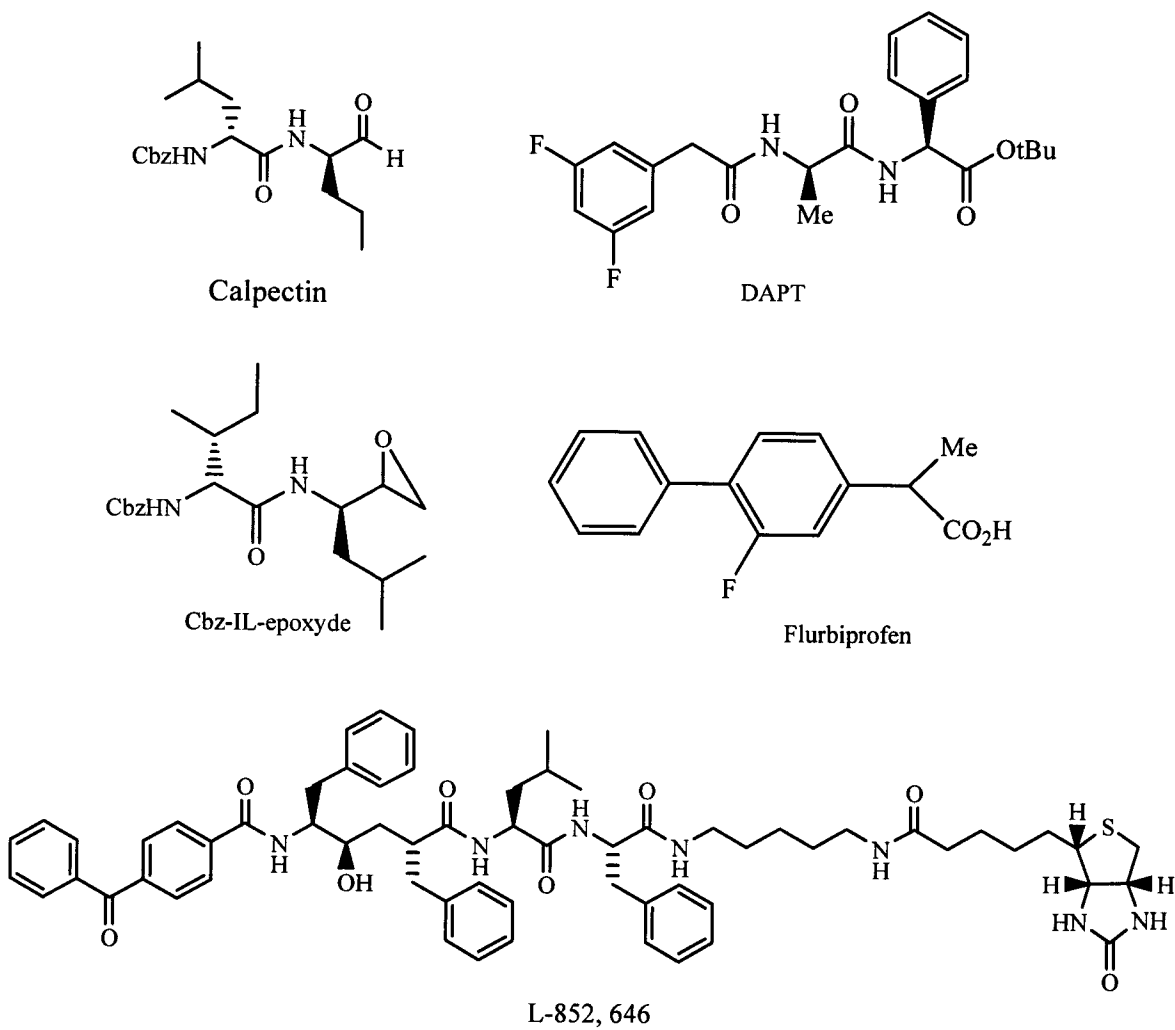


Figure 8: quelques inhibiteurs de la gamma-sécrétase.

Le calpectin est l'un des tous premiers inhibiteurs développés et a surtout démontré que la γ -sécrétase était une aspartyl protéase.

Le flurbiprofen a donné d'excellents résultats récemment, sauf qu'il rentre dans la catégorie des anti-inflammatoires (NSAIS) et donc des effets secondaires indésirables ont été détecté.

Elan Pharmaceuticals en collaboration avec Eli Lilly ont pu développé le DAPT qui jusqu'à ce jour a montré la plus puissante de toutes les inhibitions.

Le L-852,646 développé par Merk a aussi donné de bons résultats. Cependant, ces 2 composés n'ont pas résolu le problème majeur rencontré, à savoir celui de l'inhibition de la protéine Notch (3).

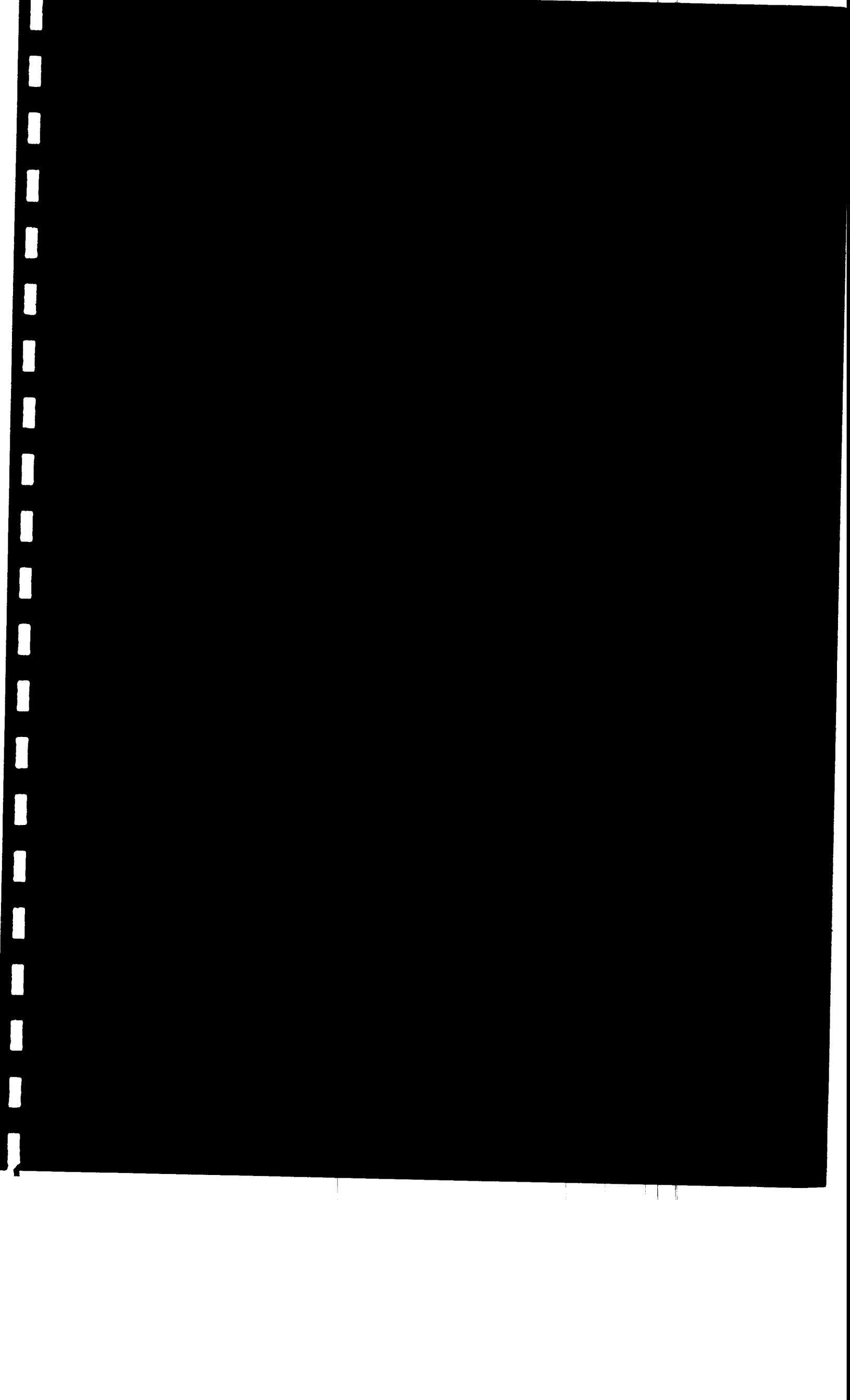
Le Cbz-IL-epoxyde, développé par Ziani-Cherif et collaborateurs a montré une inhibition acceptable et peut être considéré comme un composé Lead, permettant d'identifier d'autres inhibiteurs plus puissants, ce qui est le sujet de mon travail de magister.

REFERENCES:

1. D. J. Selkoe, Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann. Intern. Med.* 2004, 140, 627-638.
2. D.J. Selkoe, Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews.* 2001, 81 (2), 741-66.
3. C. Ziani-Cherif et al., Gamma-secretase as a pharmacological target in Alzheimer disease research: when, why and how. *Current. Pharm.design.* 2006, 12, 4313-4335.
4. R. Mayeux and M.R. Chun., Acquired and hereditary dementias in Alzheimer's disease.
5. R. E. Tanzi et al., Alzheimer's disease and post-operative cognitive dysfunction. *Experimental gerontology.* 2006, 41, 346-359.
6. A. Bour, Implication d'un dérivé sécrété du précurseur de la protéine β -amyloïde (sAPP₆₉₅) et de différentes isoformes de l'apolipoprotéine E humaine (apoE3 et apoE4) dans les processus mnésiques chez la Souris. Université de Louis Pasteur Strasbourg, France, 2004.
7. E.I. Rogaev, R. Sherrington et al., Analysis of the 5' sequence, genomic structure, and alternative splicing of the presenilin 1 (PSEN1) associated with early onset Alzheimer disease. *Genomics.* 1997, 40, 415-424.
8. D.A. Evans et al., Education and other measures of socioeconomic status and risk of incident Alzheimer in a defined population of older persons. *Arch. Neurol.* 1997, 54, 1399-1405.
9. L.J. Launer et al., Rates and risk factors for dementia and Alzheimer's disease. *Neurology.* 1999, 52, 78-84.
10. M. M. Corroda, et al. Reduced risk of Alzheimer disease with high folate intake: the Baltimore longitudinal study of aging. *Alzheimer's and dementia.* 2005, 1, 11-18
11. B. Frangione et al., Immunological and anti-chaperone therapeutic approaches for Alzheimer disease. Symposium: amyloid- β : a multifaceted protein. part II, 2004
12. D. Scheuner, C. Eckman, M. Jensen et al., Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 1996, 2, 864-70.
13. E.H. Corder et al., Protective Effect of Apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 1994, 7, 180-4.

14. R.E. Tanzi et al., Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: A Genetic Perspective. *J cell.* 2005, 120, 545-555.
15. R. Clarke et al., Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 1998, 55, 1449-55.
16. W. Wei, D.D. Norton, X. Wang, J.W. Kusiak, A β 17-42 in Alzheimer's disease activates JNK and caspase-8 leading to neuronal apoptosis. *Brain.* 2002, 125, 2036-2043.
17. S. Gandy, The role of cerebral amyloid β accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* 2005, 115, 1121-29.
18. D. J. Selkoe, Biochemistry of Alzheimer's disease. 1992
19. I. Grundke-Iqbal et al. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 1986, 26, 6084-89.
20. *J. Mol. Neurosci.* 2002, 19, 3.
21. M. Ferland, Preseniline et voies de signalisation. Université Laval. 2003.
22. J. Murrell, M. Farlow, B. Ghetti, M.D. Benson, A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science.* 1991, 254, 97-9.
23. E. Levy-Lahad et al., Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science.* 1995, 269, 973-7.
24. G. Thinakaran, The role of presenilins in Alzheimer's disease. *J. Clin. Invest.* 1999, 104, 1321-27.
25. B. De Strooper, P. Saftig et al., Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature.* 1998, 391, 387-90.
26. E.H. Koo, S.S. Sisodia, L.C. Cork, A. Unterbeck, R.M. Bayney, D.L. Price, Differential expression of amyloid precursor protein mRNAs in cases of Alzheimer's disease and in aged nonhuman primates. *Neuron.* 1990, 4, 97-104.
27. S. Kar, S.P.M Slowikowski, D. Westaway, H.T.J. Mount, Interactions between β -amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J. Psychiatry. Neurosci.* 2004, 29, 427-41.
28. N. Mitsuda et al., A novel alternative splice variant of nicastrin and its implication in Alzheimer disease. *Life sciences.* 2006, 78, 2444-2448.
29. S.Y. Yoon et al., BACE inhibitor reduces APP- β -C-terminal fragment accumulation in axonal swelling of okadaic acid-induced neurodegeneration. *Neurobiology of disease.* 2006, 22, 435-444.

30. A. Kimberly et al., γ -secretase is membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, aph-I, and pen-2.pnas. 2003, 11; 6383
31. T. Ogura et al., three-dimensional structure of the γ -secretase complex.biochemical and biohysical research communication. 2006, 343, 525-534.
32. Larousse Médicale, 1995
33. M. L. Michaelis, Drugs targeting Alzheimer's disease: somethings old and somethings new, J. Pharmacol. Exp. Ther., 2003, 304, 897-904.



I. LES ACIDES AMINÉS :

Les acides aminés sont des acides organiques constituant l'unité de structure des protéines. Comme leurs noms l'indiquent, les acides aminés sont des composés organiques contenant un groupe acide, une fonction amine et une chaîne latérale, qui varie d'un acide aminé à un autre (**figure 1**).

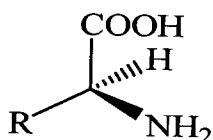


Figure 9 : la formule générale des acides aminés.

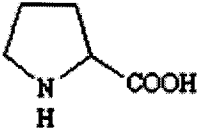
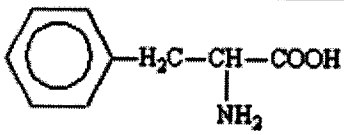
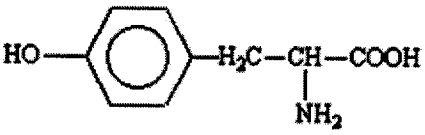
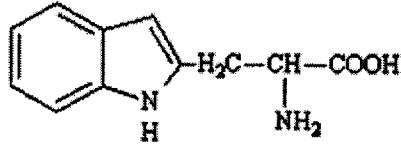
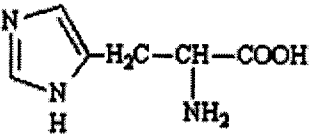
L'atome central est un carbone asymétrique appartenant à la série lévogyre (L), sauf dans la glycine pour laquelle la chaîne latérale est uniquement constituée d'un atome d'hydrogène. Comme le montre le **Tableau 2** ci-dessous, contrairement aux autres acides aminés, la proline forme un cycle par une liaison entre l'extrémité de la chaîne latérale et l'atome d'azote de la fonction amine. (1)

Il suffit de 20 acides aminés pour former toutes les protéines nécessaires pour le corps (2), tous étant répertoriés dans le **Tableau 2** suivant :

Tableau 2: les 20 différents acides aminés naturels existants.

Nom	Formule	Abréviation
glycine	$ \begin{array}{c} \text{H}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $	Gly (G)
Alanine	$ \begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $	Ala (A)
Valine	$ \begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{HC}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array} $	Val (V)
Leucine	$ \begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{HC}-\text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \quad \text{NH}_2 \end{array} $	Leu (L)
Isoleucine	$ \begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{H}_2\text{C}-\text{HC}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \quad \text{NH}_2 \end{array} $	Ile (I)

CHAPITRE II : STRATEGIE DE SYNTHÈSE

Sérine	$\begin{array}{c} \text{HOH}_2\text{C}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Ser (S)
Thréonine	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{HC}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Thr (T)
Méthionine	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{H}_2\text{C}-\text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Met (M)
Cystéine	$\begin{array}{c} \text{HS}-\text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Cys (C)
Proline		Pro (P)
Phénylalanine		Phe (F)
Tyrosine		Tyr (y)
Tryptophane		Try (W)
Acide aspartique	$\begin{array}{c} \text{HOOC}-\text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Asp (D)
acide Glutamique	$\begin{array}{c} \text{HOOC}-\text{H}_2\text{C}-\text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Glu (E)
Lysine	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-(\text{H}_2\text{C})_4-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Lys (K)
Arginine	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{C}=\text{NH}-\text{NH}-(\text{H}_2\text{C})_3-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{NH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Arg (R)
Histidine		His (H)

CHAPITRE II : STRATEGIE DE SYNTHÈSE

Asparagine	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \parallel \qquad \qquad \\ \text{O} \qquad \qquad \text{NH}_2 \end{array}$	Asn (N)
Glutamine	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \parallel \qquad \qquad \qquad \\ \text{O} \qquad \qquad \qquad \text{NH}_2 \end{array}$	Gln (Q)

II. LES PROTÉINES ET LES PEPTIDES :

Les protéines au même titre que les peptides sont des substances chimiques constituées de très longues chaînes d'acides aminés. Chaque carboxyle d'un acide aminé est réuni à la fonction amine du suivant par une liaison amide, dite aussi peptidique comme représentée dans la **Figure 10**.

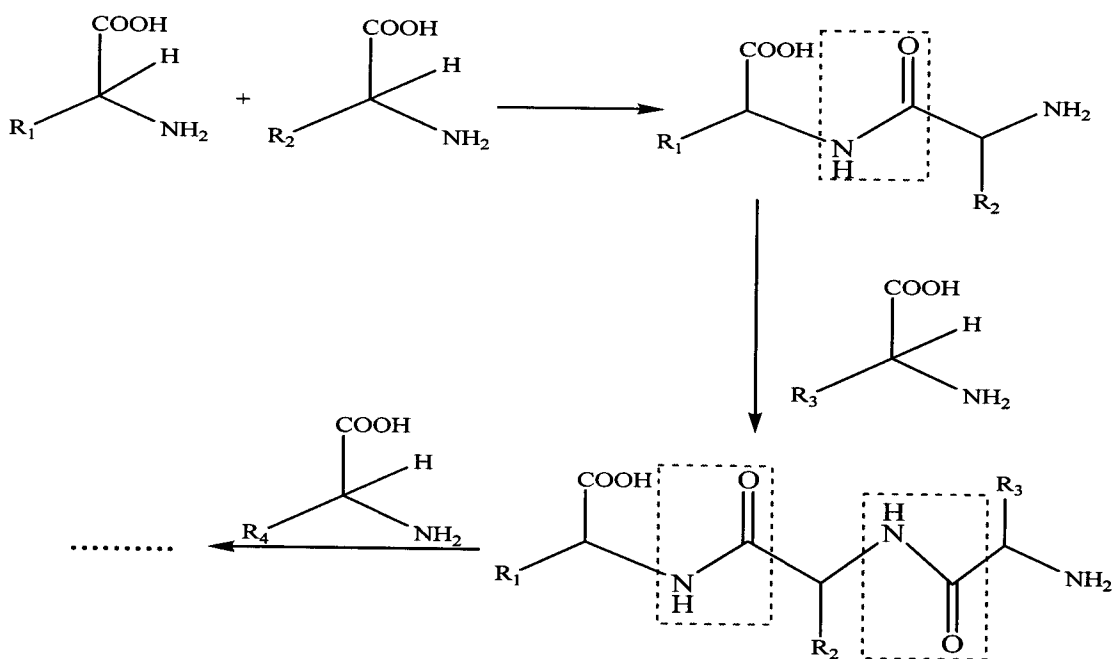


Figure 10 : Séquence de formation d'un peptide.

Chaque deux amino-acides peuvent être liés pour former un dipeptide. De même, chaque dipeptide contenant un groupe acide ou amine libre peut se lier à son tour avec un troisième acide aminé pour donner un tripeptide, puis un tétrapeptide, un pentapeptide, etc....

(3). En continuant d'ajouter des acides aminés, il arrive que leur nombre dépasse les centaines ou les milliers et on parle dans ce cas de protéines. Les chaînes courtes de moins de 100 acides aminés sont appelés 'polypeptides'.

Les peptides et protéines ont des rôles divers dans le corps vivant : certains font partie d'une structure de soutien (membrane qui entoure les cellules, trame des os, etc...) tandis que d'autres (hormones, anticorps, enzymes, neurotransmetteurs, etc...) interviennent dans divers mécanismes physiologiques (4).

On distingue deux principales sources alimentaires de protéines. Les protéines animales (qui sont les mieux équilibrées car elles contiennent tous les acides aminés indispensables en bonne proportion) et les protéines végétales. Les aliments les plus riches en protéines sont les produits laitiers (fromage, lait, yaourt), les viandes, les poissons et les céréales (4).

II. 1. Les différentes structures des protéines:

La structure des protéines est une donnée essentielle pour la compréhension de la fonction des protéines. On décompose généralement cette structure en différents niveaux : la structure primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire (**Figure 11**) (5).

- ✚ La structure primaire: c'est la séquence proprement dite des acides aminés enchaînés les uns aux autres par des liaisons covalentes. En commençant par la terminaison amine et en terminant par le résidu portant la fonction acide. Le premier résidu est alors nommé N-terminal et le dernier C-terminal.
- ✚ La structure secondaire: elle correspond aux formations périodiques qu'adoptent des portions partielles d'une protéine donnée. Ces repliements forment des hélices alpha ou des feuillets bêta qui sont liés par des liaisons hydrogène.
- ✚ La structure tertiaire: c'est une forme tridimensionnelle due à un ensemble de liaisons covalentes et d'autres non-covalentes comme les liaisons hydrogènes ou les ponts salins qu'adoptent les différents éléments de la structure secondaire entre eux pour former la protéine.
- ✚ La structure quaternaire: c'est une protéine constituée de plusieurs sous unités. Leur rassemblement forme un complexe.

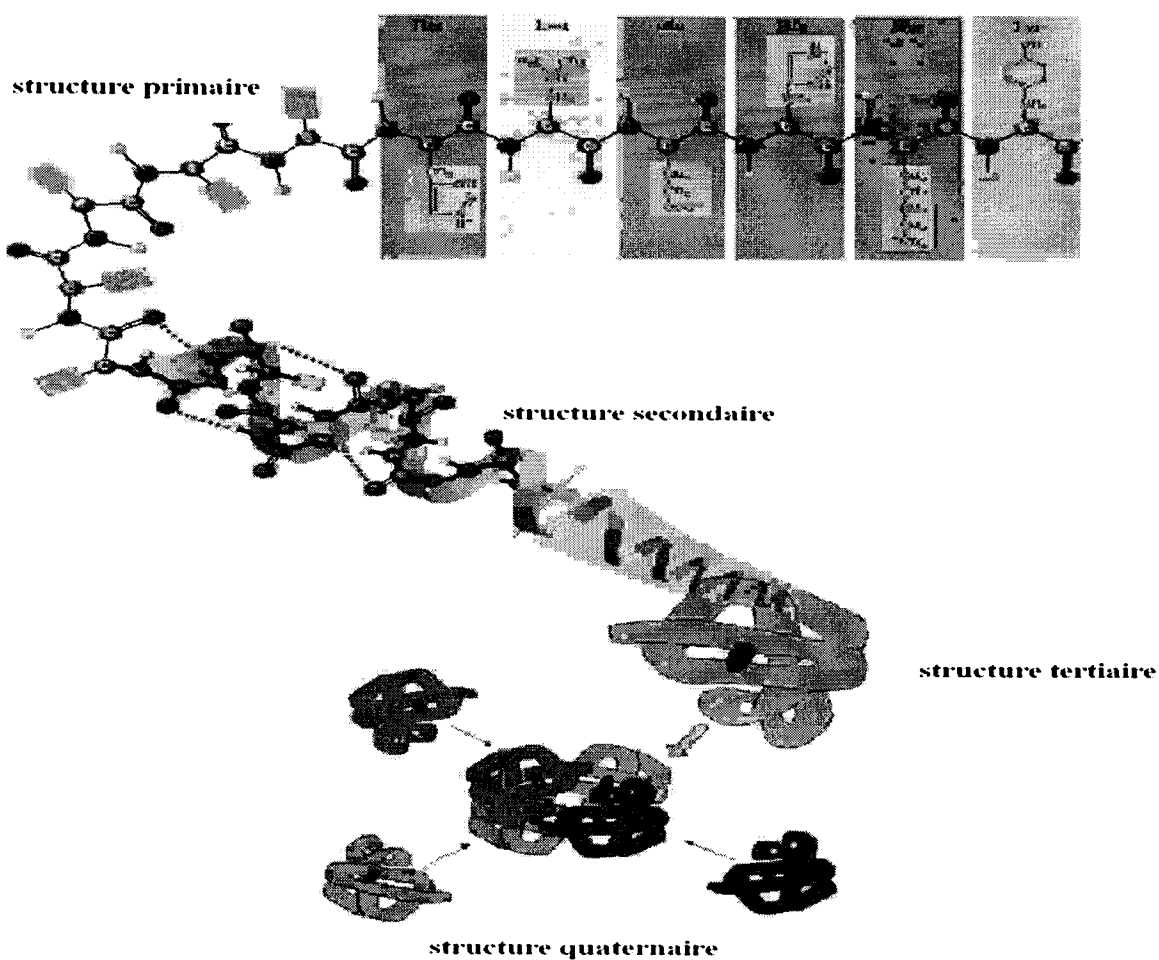


Figure 11 : Les quatre structures possibles pour une protéine.

III. LES GROUPES PROTECTEURS :

Il est souvent nécessaire de protéger une ou plusieurs fonctions réactives présentes sur une molécule pour effectuer des transformations chimiques satisfaisantes, telles que les groupes amines, hydroxyles, thiols ou carboxyles. Chaque groupement protecteur possède une spécificité de stabilité, fixation et élimination qui sont fonction des conditions opératoires (6)

III. 1. Protection des acides:

La protection des fonctions acides se fait généralement par une simple estérification de la fonction carboxylique.

Les groupements tertibutylique et méthylique sont fréquemment utilisés dans la chimie des acides aminés et peptides, (voir Schéma 1,2) (6).

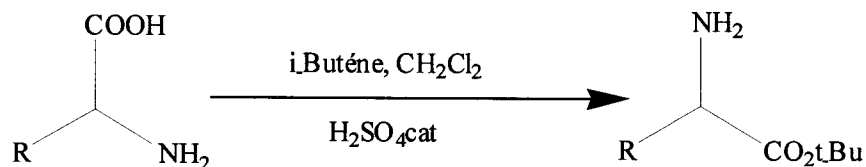


Schéma 1

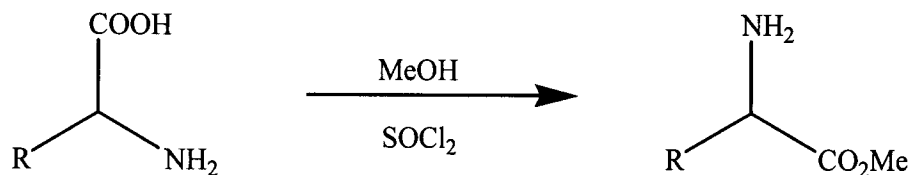


Schéma 2

III. 2. Protection des amines :

La fonction amine doit être protégée par un groupe stable vis-à-vis de la plupart des manipulations chimiques et qui peut être facilement enlevé dans des conditions douces.

Les groupements tels que : le tert-butoxycarbonyle (Boc), le benzyloxycarbonyle (Cbz) et 9-fluorenylméthoxycarbonyle (Fmoc) comptent parmi les plus utilisés pour la protection des fonctions amines des acides aminés (Figure 12) (7).

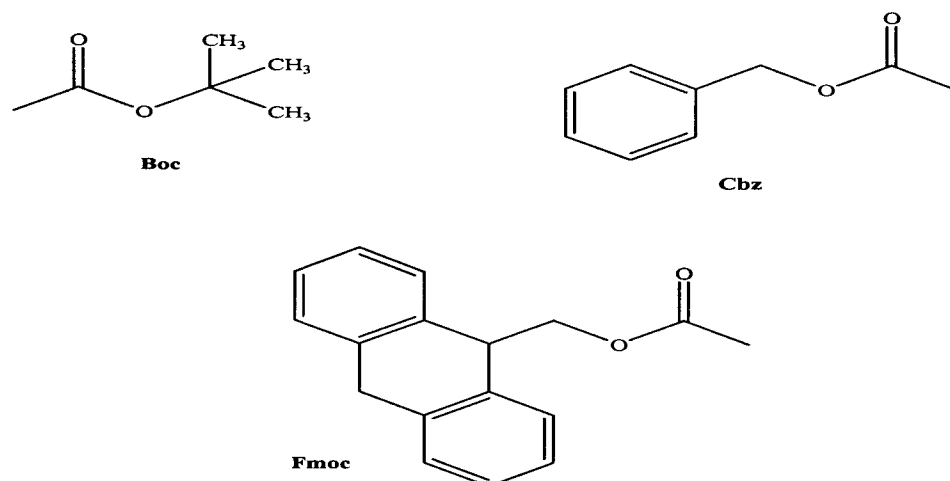


Figure 12 : Les différents groupes protecteurs des acides aminés les plus utilisés.

III. 2. 1. Le groupe t-butoxycarbone (Boc):

A cause de l'instabilité du t-butyl chloroformiate, le di-t-butyl dicarbonate est largement utilisé pour l'introduction du groupe t-butoxycarbone. Le groupement Boc est inerte vis-à-vis de l'hydrogénation catalytique et est extrêmement résistant à des réactifs basiques et nucléophiles ; cependant son clivage s'effectue facilement dans des conditions acides douces et à cette fin, l'acide trifluoroacétique convient parfaitement (7).

Deux autres réactifs peuvent être utilisés pour induire le groupe Boc sur une fonction amine ; il s'agit du t-butyl chloroformiate (Boc-Cl) et du t-(butoxycarboxyloxyimino)-2-phenylacetonitrile (Boc-ON) (Figure 13).

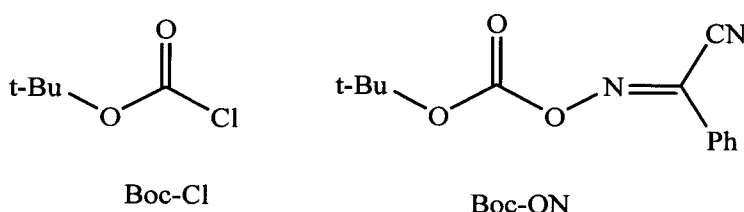


Figure 13 : autres réactifs introduisant le groupe Boc.

III. 2. 2. Le groupe benzyloxycarbone (Cbz):

Le groupe Cbz est l'un des groupes les plus utilisés pour la protection de la fonction amine. La protection se fait dans des conditions basiques douces (Schéma 3) et d'excellents rendements sont en général obtenus. Le groupe Cbz est stable dans les conditions utilisées pour la formation de la fonction amide (7).

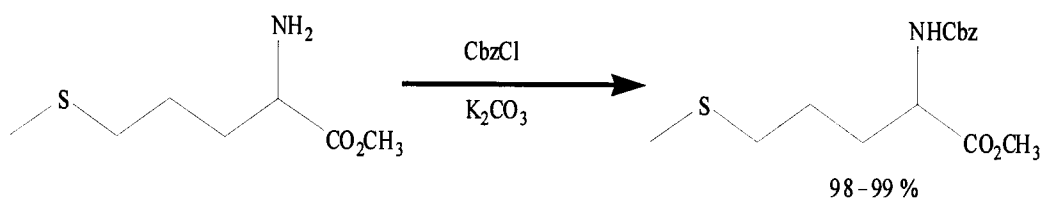


Schéma 3

Le Cbz présente l'avantage d'être stable dans des conditions considérablement acides ou basiques, et requiert une hydrogénation catalytique pour sa déprotection.

III. 2. 3. Le groupe 9-fluorenylméthoxycarbonyle (Fmoc) :

Le 9-fluorenylméthoxycarbonyle, contrairement au Boc ou le Cbz, est le plus utilisé dans la synthèse peptidique en phase solide. Son introduction s'effectue par réaction de la fonction amine avec le 9-fluorenylméthoxycarbonyle en présence d'une base faible du type bicarbonate de sodium (Schéma 4).

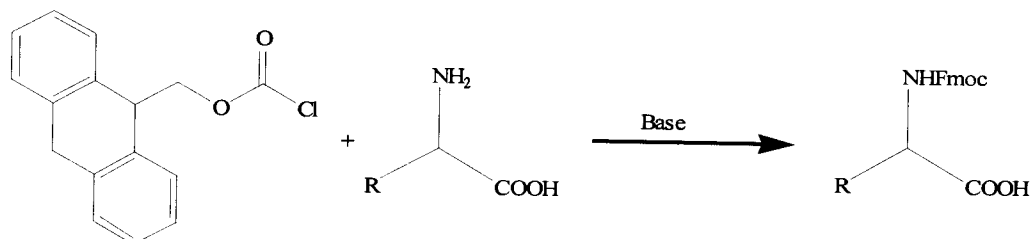


Schéma 4

Ce groupe est stable dans des conditions acides et résiste à l'hydrogénation catalytique. Néanmoins, le clivage s'effectue dans des conditions basiques douces en utilisant une base comme la pipéridine ou la morpholine à température ambiante.

III. 3. Les agents de couplage :

La formation de la liaison peptidique peut souvent présenter des difficultés telles que les faibles rendements, la racémisation, la dégradation, la purification difficile. Pour faire face à ces difficultés, de nombreux agents (réactifs) de couplage ainsi que diverses méthodes ont été développés qui ont abouti non seulement à des bons rendements, mais ont contribué à empêcher la racémisation des centres chiraux voisins. Dans la Figure 14 ci-dessous, on a une représentation de certains des agents de couplages les plus utilisés en synthèse peptidique.

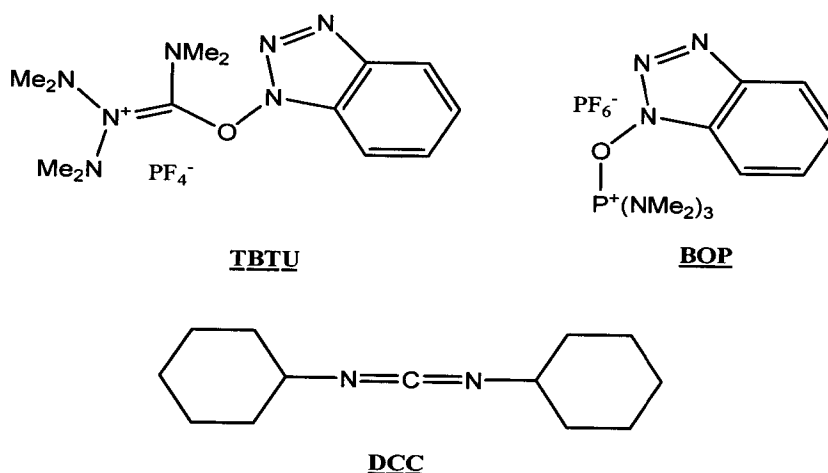


Figure 14 : Les agents de couplages les plus utilisés en synthèse peptidique.

III. 3. 1. Le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) :

Le dicyclohexylcarbodiimide (**Figure 14**) est fréquemment utilisé dans la formation de la liaison amide et la synthèse peptidique. Le DCC est ajouté au mélange de l'acide, de la base et de l'amine dans le dichlorométhane ou l'acétonitrile à 0°C pour former l'amide désirée, mais aussi la formation du dicyclohexylurea (DCU) qui précipite rapidement et la réaction est terminée au bout d'une heure à température ambiante. Le DMF ou le THF peuvent être utilisés mais le temps de réaction est plus long et favorise la racémisation qui est représentée un inconvénient majeur (**Schéma 5**).

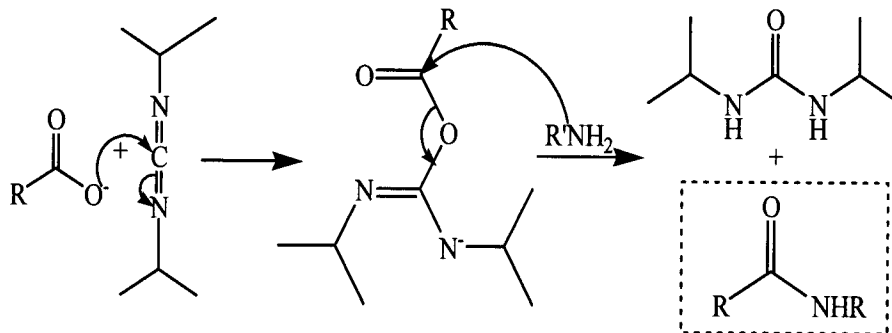


Schéma 5

III. 3. 2. Le Benzotriazol-1-yloxytris (diméthyl-amino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) :

Le BOP est très efficace dans les réactions de couplage et la synthèse peptidique. Le couplage est réalisé en mélangeant l'acide et l'amine désirés en présence du BOP et de 3 équivalents de base. Celle-ci doit nécessairement être suffisamment encombrée pour éviter tout risque de racémisation. Pour ce faire, la diisopropyléthylamine est le choix idéal pour la grande majorité des chimistes qui travaillent dans ce domaine. Le solvant utilisé peut être l'un des suivants : DMF, THF, DCM, MeCN. L'acide réagit avec le BOP pour former le HOBT et le phosphonium d'acyle ; le HOBT réagit avec l'acide actif (phosphonium d'acyle) pour obtenir l'ester qui subit l'aminolyse (**schéma 6**).

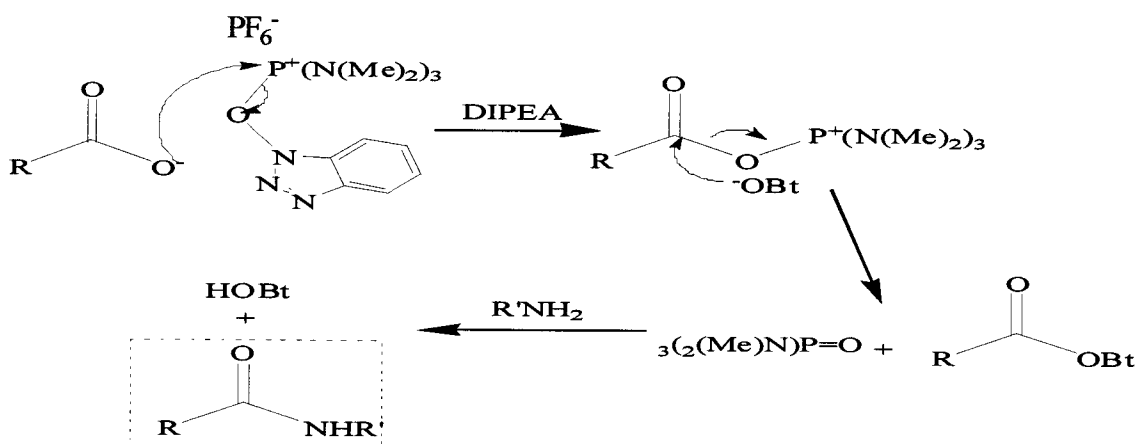


Schéma 6

III.3.3. Le O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tétra-méthyluronium tétrafluorophosphate (TBTU):

Le TBTU est un agent de couplage utilisé aussi bien en solution comme en phase solide. Son utilisation est identique à celle du BOP (schéma 7).

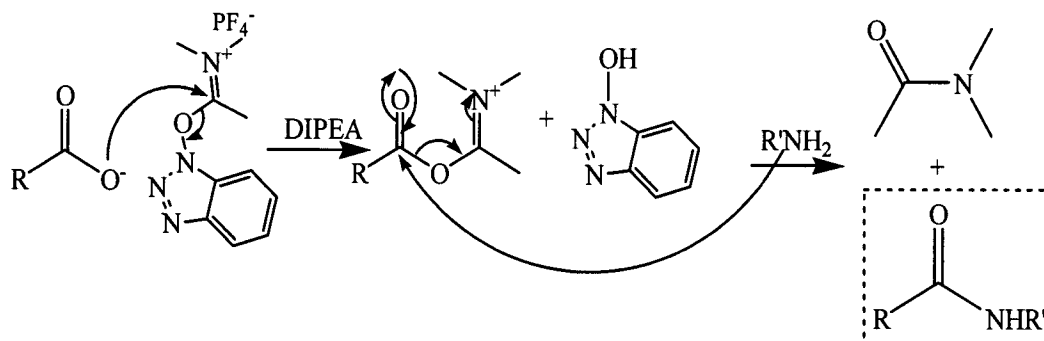


Schéma 7

Il est à noter finalement que le TBTU n'est qu'un des composés de toute une famille de benzotriazol-yl uroniums qui ne diffèrent en fait que du type de substituant sur la partie uronium (éthyle, propyle, etc...au lieu du méthyle), ou alors du type de l'anion (BF_4^- au lieu du PF_4^-). L'avantage du TBTU est son coût bas par rapport au reste. Il en est de même pour le BOP. Il reste que lors de l'accomplissement de cette présente recherche, le TBTU était moins coûteux que le BOP, d'où notre choix évident.

IV. STRATEGIES DE SYNTHÈSE :

IV. 1. Introduction :

La bivalence est une stratégie efficace pour l'amélioration des traitements du point de vue du potentiel et de la sélectivité, un récent concept décrit par Portugese (8). En effet, dans le cas de plusieurs sites actifs pour un même substrat, les dimères montrent souvent une amélioration exponentielle de l'activité biologique en tant qu'agonistes, et ce par rapport au monomère. Basé sur ces études, plusieurs chercheurs se sont rapidement versés sur l'application de ce concept. Ainsi, Wender *et al* ont décrit la synthèse et activité biologique de dimères esters du phorbol en tant qu'activateurs puissants de la protéine kinase C (PKC), une protéine fortement impliquée dans la régulation cellulaire (Figure 15) (9).

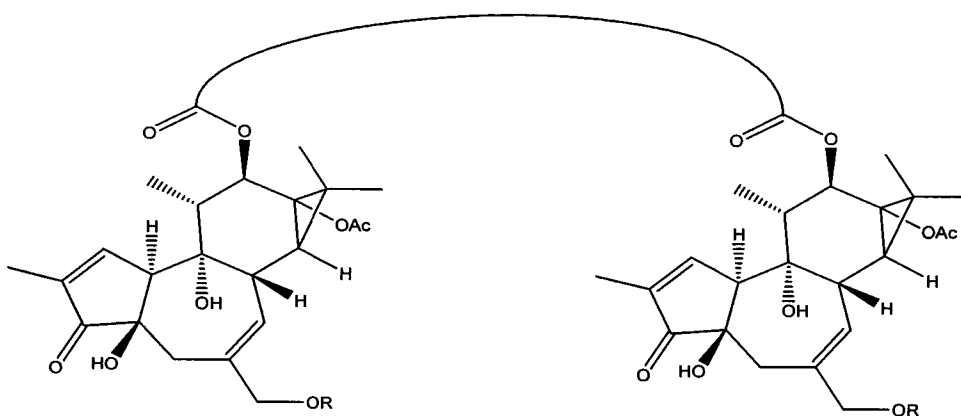


Figure 15

Raynes *et al* ont de leur côté démontré la puissance de ce concept dans le développement de composés résistants à la malaria (Figure 16) (10).

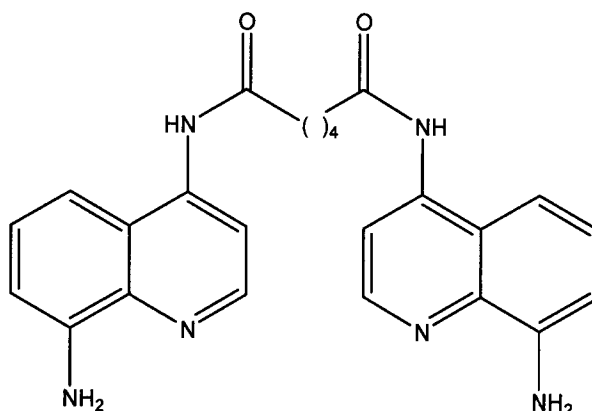


Figure 16

Dans le cas des travaux effectués dans le cadre de la M.A, Paul Carlier et ses collaborateurs se sont investis dans la synthèse de dimères qui ciblent l'inhibition de l'acétylcholinestérase en vue de ralentir la dégénérescence de la mémoire du patient. La (-) huperzine A est une molécule naturelle, et est un inhibiteur puissant de l'acétylcholinestérase (AChE), cependant réversible (**Figure 17**). Dans le but de trouver des inhibiteurs puissants et irréversibles, des études SAR ont été réalisées et ont montré que le squelette 5-amino-2(1H)-quinolinone possédait toutes les fonctionnalités requises pour une activité adéquate. Expérimentalement cependant, une très faible activité avec un $CI_{50} = 500$ nM fut enregistrée, alors que le dimère exhiba un CI_{50} de 52 nM (**11**).

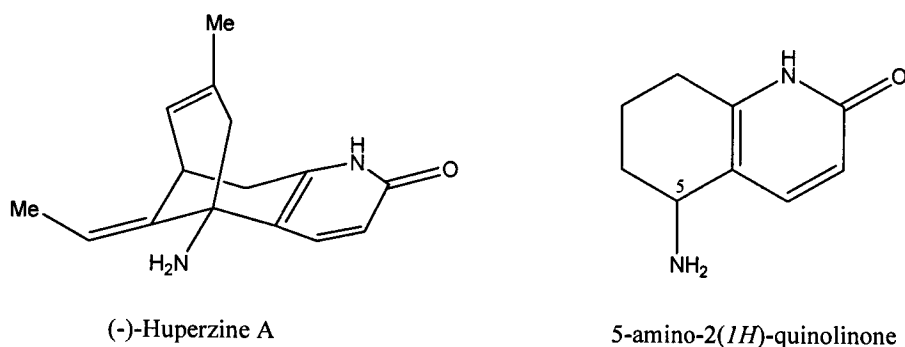


Figure 17

Ceci illustre clairement l'efficacité et importance de la méthode dite 'de bivalence'.

L'appliquer toujours dans le cadre de la thérapeutique de la M.A, mais dans un volet différent de celui considéré par Carlier *et al* a constitué notre sujet de recherche lors de ce magister.

En effet, Ziani-Cherif et ses collaborateurs ont précludé en 1998 qu'un époxyde devrait inhiber le site actif de la gamma-sécrétase qui est une protéase, puisque le site actif de la protéase de la HIV est inhibé par un époxyde. Toute une série d'époxydes ont donc été synthétisés et testés. Deux d'entre eux ont retenu leur attention (**Figure 18**) (**12**).

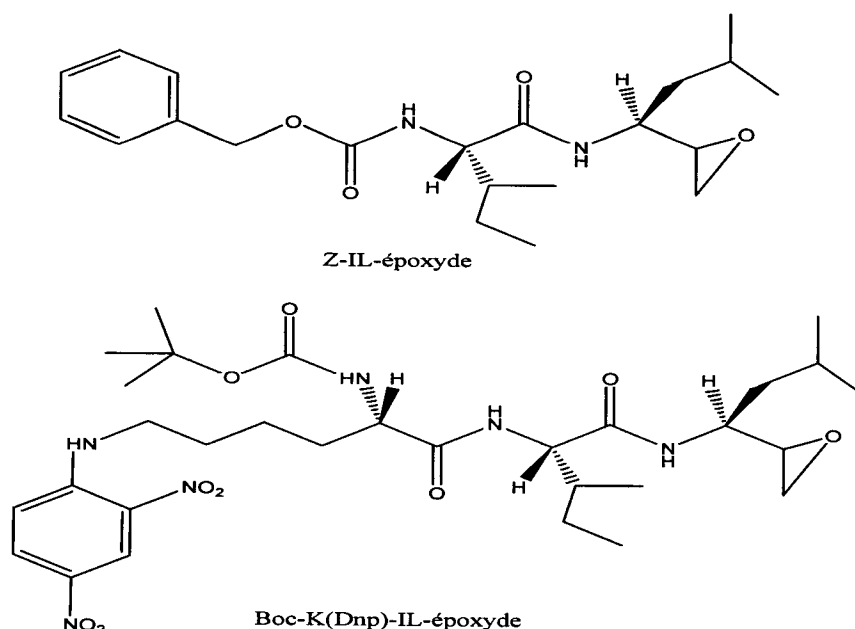


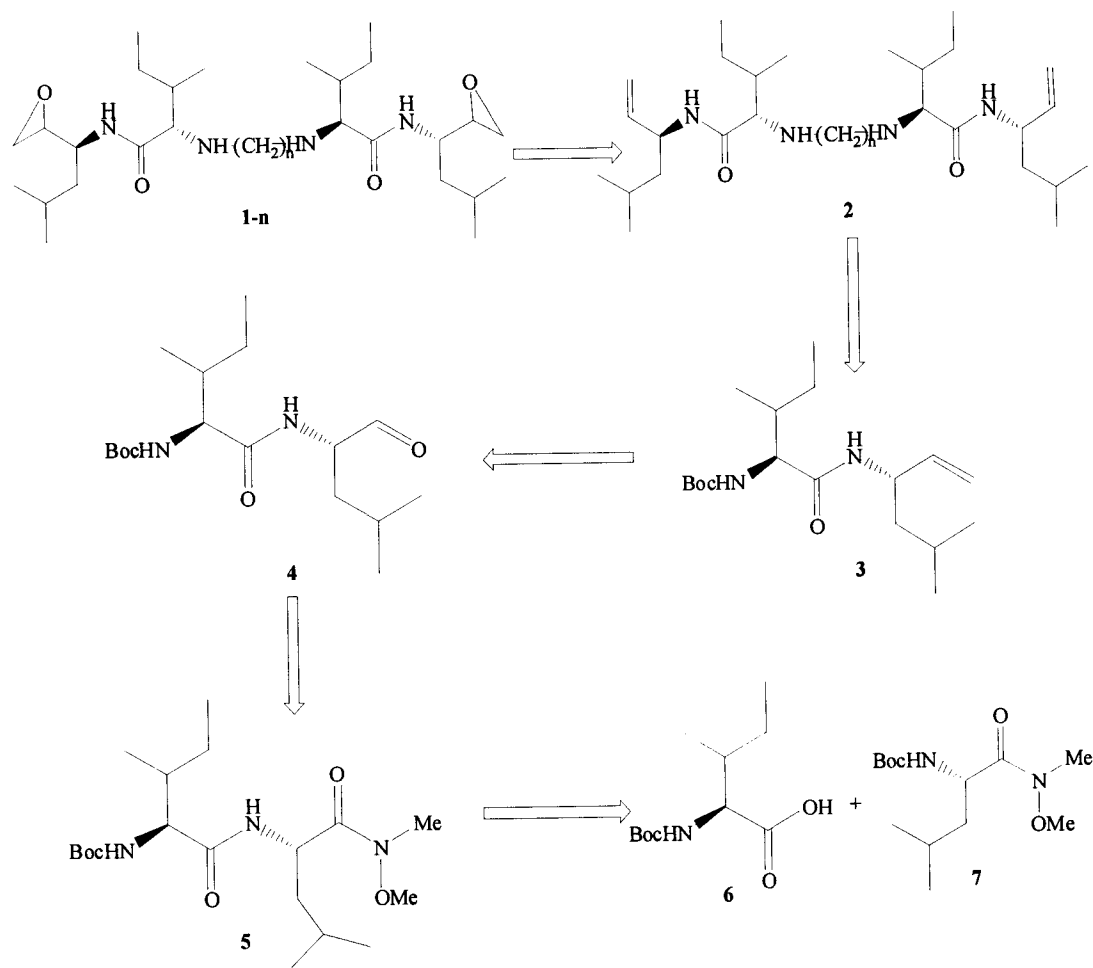
Figure 18

Ainsi donc, ces époxydes se sont avérés des inhibiteurs irréversibles contrairement aux aldéhydes, mais avec des CI_{50} satisfaisant. Il était donc tout à fait raisonnable de penser qu'un dimère de l'un de ces époxydes aurait une activité accrue par rapport à celle du monomère. Ainsi, notre choix dans un premier temps s'est porté sur le dimère de type 1-n (Schéma 8), étant donné une simplicité raisonnable de sa synthèse. Il est à noter que l'indice n représente le nombre de méthylènes liant les deux monomères. La série **1-n** représente donc toute une série de composés similaires, mais avec des longueurs variées.

IV. 2. Stratégie de synthèse :

La synthèse d'aldéhydes et époxydes de peptides est connue dans la littérature et différents chercheurs ont adopté des protocoles différents, selon le cas (13,14). Le protocole que nous avons sélectionné est celui déjà décrit par Ziani-Cherif *et al* (12,14).

Il est évident de constater que le composé cible **1-n** serait obtenu par époxydation du composé **2** qui serait accessible via son monomère **3** (Schéma 8). Ce dernier serait accessible par réaction de Wittig sur l'aldéhyde **4**, lequel serait obtenu auparavant par simple réduction de l'amide de Weinreb **5**. Cette dernière finalement serait obtenue par simple couplage peptidique entre les composés **6** et **7**.



IV. 2. 1. Couplage :

Un simple regard sur le schéma rétrosynthétique précédent permet de constater que le couplage entre les deux composés **6** et **7** ne pourrait se faire sans déprotection au préalable du groupement Boc de l'amine **7**. Ceci est réalisé avec un mélange équivalent en volume d'acide trifluoacétique et de dichlorométhane, conduisant à l'ammonium **7'** avec un rendement quasi-quantitatif (98%) (**Schéma 9**). La déprotection peut aussi être effectuée avec un mélange concentré (3N) d'acide chlorhydrique dans l'acétate d'éthyle, conduisant au même résultat.

Suite à cela, le couplage fut effectué en présence de 1 équivalent de TBTU et de 4 équivalents de diisopropyléthylamine (**schéma 9**). Ce nombre d'équivalents en base est nécessaire pour une réaction totale. Il est intéressant de noter que la réaction est suffisamment

propre pour ne pas avoir recours à une purification. Le rendement obtenu dans ce cas est de l'ordre de 75%.

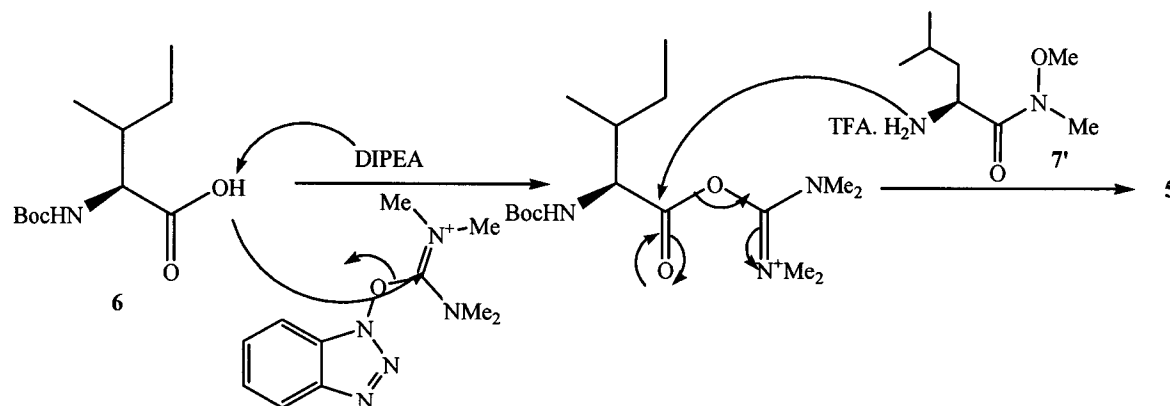


Schéma 9

Nous avons aussi essayé la DCC comme agent de couplage. Cependant, la réaction n'était pas aussi propre; de plus, nous avons rencontré des problèmes de reproductibilité. Vu notre intérêt porté sur l'obtention de la cible finale, nous n'avons pas jugé utile d'investiguer dans cette direction.

IV. 2. 2. Réactif de Weinreb :

Le réactif de Weinreb (Figure 19) est l'un des dérivés des acides aminés commercialement disponible mais peut-être obtenu par réaction de l'acide aminé avec la N,O-diméthylhydroxylamine en utilisant le BOP dans le dichlorométhane (16). R peut être une chaîne latérale ou un cycle aromatique.

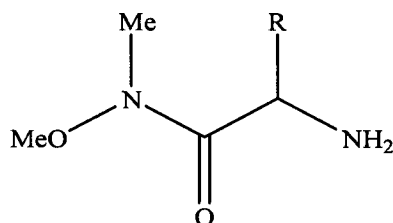


Figure 19: La structure générale d'une amide de Weinreb.

L'amide de Weinreb dérivant des acides aminés a trouvé de nombreuses utilités dans la préparation des α -aminoaldehydes et α -aminocétone (15-17). En réagissant avec des organomagnésiens ou organolithiens, on obtient des α -aminocétone (schéma 10). Par contre

si l'on fait réagir l'amide de Weinreb avec un agent réducteur comme le DIBAL-H ou le LiAlH_4 , on obtient la formation d' α -aminoaldéhyde (**schéma 11**).

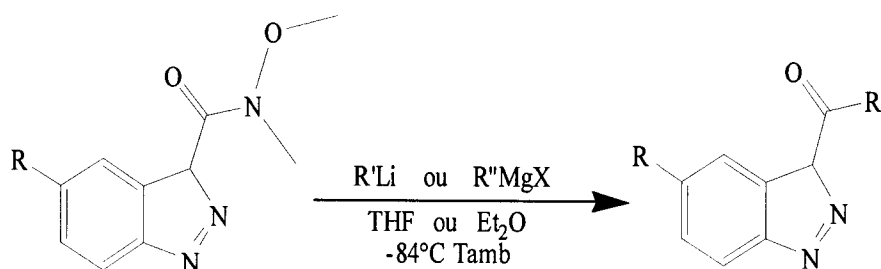


Schéma 10

Récemment une très grande attention a été dirigée vers l'utilisation de l'amide de Weinreb (**Schéma 11**). Ainsi, Wolfe *et al*, travaillant aussi dans le domaine de la M.A et plus précisément dans le cadre d'inhibition de la gamma-sécrétase, a pu accomplir la réduction d'une amide de Weinreb en aldéhyde en utilisant 5 équivalents de LiAlH_4 dans l'éther (**Schéma 11**) (17). La réaction était complète après seulement 30 min.

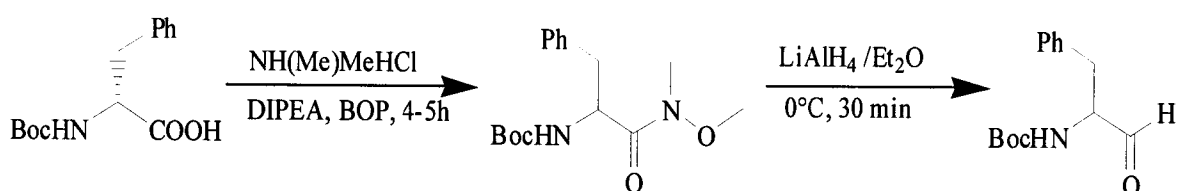
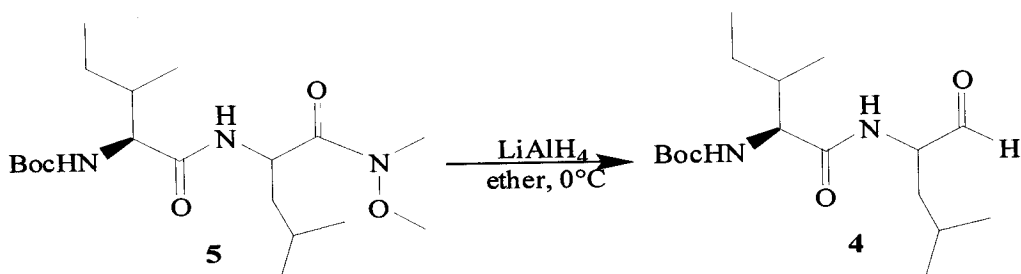


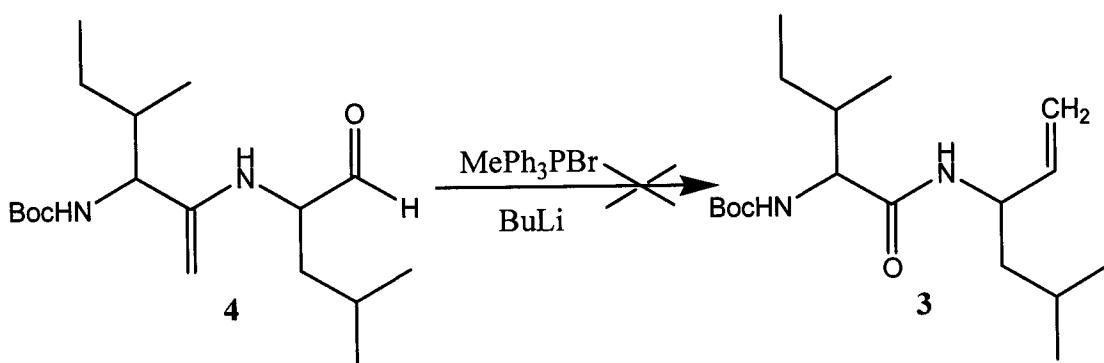
Schéma 11

Au cours de notre travail, nous avons effectué la réduction de l'amide de Weinreb **5** en aldéhyde **4**, en utilisant l'hydrure d'aluminium et de lithium (**schéma 12**). Ce réducteur a été sélectionné du fait de l'indisponibilité du DIBAL, clairement meilleur dans ce cas. Nous avons ainsi suivi les mêmes conditions que celles décrites par Wolfe. Pour certaines raisons cependant, la réduction n'a pu être complète, même avec un large excès de LiAlH_4 . La formation de l'aldéhyde a été prouvée par RMN H^1 qui montre clairement un singulet net à 9,2 ppm.



Vu que nous travaillons déjà sur des quantités inférieures au demi-gramme, une chromatographie sur colonne pour séparer l'aldéhyde formé de l'amide de départ s'avéra très difficile. Nous avons donc décidé d'essayer une séparation après l'étape suivante qui consiste en une réaction de Wittig, en utilisant le bromure de méthyltriphenylphosphonium, disponible chez Aldrich. Ceci a été accompli dans le THF comme solvant, et 2 équivalents de n-BuLi comme base à 0°C (schéma 14).

Une coloration rouge sang clairement visible a prouvé la formation de l'anion. L'addition successive de l'aldéhyde dans le THF cependant inhibait la réaction, comme prouvé par CCM et on récupérait la totalité des composés de départ. Une recherche bibliographique approfondie montra que cette réaction est en fait très sensible, l'anion devant nécessairement être refroidi à -78°C avant l'addition de l'aldéhyde à la même température. Il nous était impossible d'obtenir cette température avec les moyens que nous avons ; le mieux que nous puissions faire était -40°C, mais cela n'a pas résolu notre problème pour autant. Ainsi, vu l'échec dans les dernières étapes, nous avons décidé d'abandonner cette stratégie ainsi que cette molécule dans un premier temps, tout en comptant y revenir plus tard.



IV. 2. 3. Changement de stratégie:

On a pensé à une autre stratégie de synthèse en utilisant cette fois-ci la glycine ester éthylique ; notre choix était en fait raisonnablement fondé sur les points suivants :

Un ester éthylique, tout comme le méthylique, représente un centre électrophile ; de ce fait, il pourrait à un degré considérable remplacer un époxyde, aussi centre électrophile. Dans ce cadre, innombrables sont les exemples d'esters méthyliques et éthyliques pourvus d'activités biologiques assez satisfaisantes. Ceci a été largement démontré par les différentes molécules décrites par différents auteurs et développées comme inhibiteurs de la gamma-sécrétase (**13**). La molécule finale conçue est un dimère dont la liaison est une chaîne carbonée linéaire. De ce fait, il ne doit pas présenter de rigidité, et donc une gêne stérique en bout de chaîne n'est pas requise.

Ainsi, notre choix s'est porté sur la synthèse du composé dimérique **12** (schéma 17), en utilisant une stratégie proche à celle décrite plus haut.

Ainsi donc, l'amino-ester **10** fut couplé avec l'acide **9** en utilisant le TBTU et 3 équivalents de diisopropyléthylamine en produisant le dipeptide **11** sous forme de poudre blanche avec 80% de rendement (**Schéma 15**). Ce dernier fut soumis à une solution 1.5N de HCl dans l'acétate d'éthyle pendant 2hr pour garantir une déprotection totale du groupement BOC. Le sel d'ammonium **11'** ainsi obtenu avec un rendement quantitatif était prêt pour le couplage final afin d'accéder au dimère.

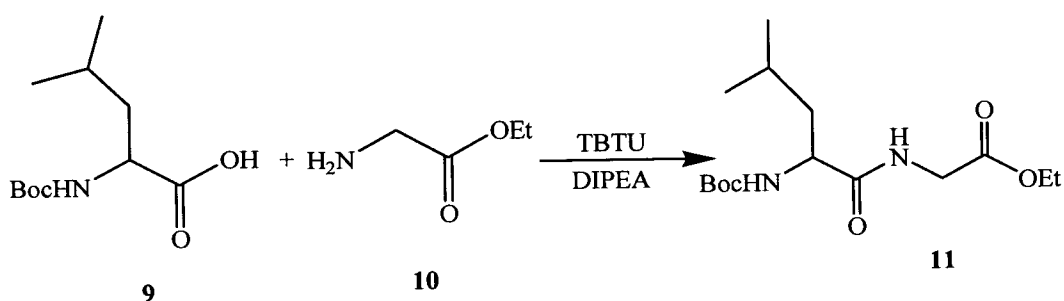


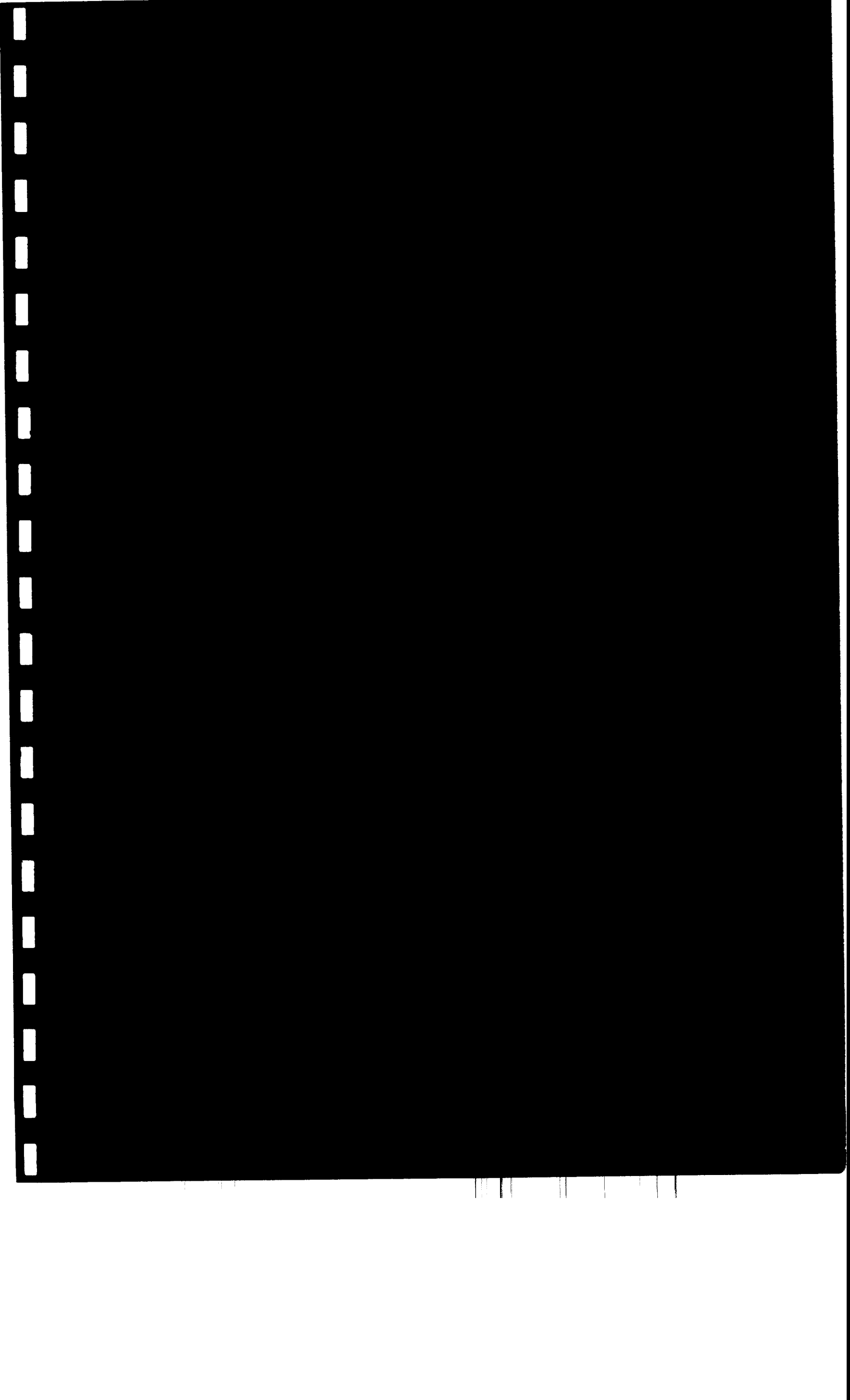
Schéma 15

Il nous restait cependant la préparation de la chaîne carbonée qui sera utilisée en tant qu'espaceur. Notre choix dans un premier temps s'est porté sur le di-iodure **8**. Ce dernier a été facilement obtenu à partir de l'héxane-diol en le soumettant au mélange de

REFERENCES :

1. C. Lambert, Développement d'une méthode automatique fiable de modélisation de la structure tridimensionnelle des protéines par homologie et application au protéome de *Brucella melitensis*, Facultés universitaires notre dame de la paix, 2003
2. M. Bodanszky, Peptide chemistry, a practical textbook. 2nd. Edition. Spring-Verlag. 1993.
3. B. Brown, March, Introduction to general, Organic and Biochemistry. 6^{ème} Edition. 2001.
4. Dictionnaire Médicale Larousse 1995.
5. G. Chakroun, Prédiction de la structure d'une protéine, Pôle de Modélisation, Simulation Numérique et Traitement de l'Information, Université Blaise Pascal, 2004
6. M. Ben Mohamed, Synthèse des peptides queue-à-tête de l'acide aminooxy Acétique. Thèse de Magister 2006, Université Abou-Bekr Belkaid, Tlemcen, Algérie.
7. Handbook of Reagents for Organic Synthesis. Activating agents and protecting groups. Chief .Ed. Leo A. Paquette. Editors A. J. Pearson and W. R. Roush. Wiley. 1999.
8. P. S. Portoghese, The Role of Concepts in Structure-Activity Relationship Studies of Opioids Ligands. *J. Med.Chem* 1992, 35(11), 1927-37.
9. P. A. Wender, Michael F.T. Koehler, Dennis L.Wright, Kazuhiro Irie, Mapping Phorbol Ester Binding Domains of Protein Kinase C (PKC): The Design, Synthesis and Biological Activity of Novel Phorbol Ester Dimers. *Synthesis* 1999, 1401-06.
10. K. Raynes, D. Galatis, A.F. Cowman, L. Tilley, L.W. Deady, *J.Med.Chem* 1995, 38, 204.
11. P. R. Carlier et al., Dimerization of an inactive fragment of hyperzine A produces a drug with twice the potency of the natural product. *Angew.Chem.Int.Ed* 2000, 39(10), 1775-77.
12. Siân C. Piper, Zareen Amtul, Laura Galifianes-Garcia, Victor G. Howard, Chewki Ziani-Cherif, Chris McLendon, Marjorie Rochette, Abdul Fauq, Todd E.Golde, M.P.Murphy, Peptide-based, irreversible inhibitors of γ -secretase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 2003, 305, 529-33.

13. C. Ziani-Cherif, B. Mostefa-Kara and F. Z. Brixi-Gormat, Gamma-Secretase as a Pharmacological Target in Alzheimer Disease Research: When, Why and How? *Current Pharmaceutical Design*, 2006, 12, 4313-35. et refs106-109, 204 citées dedans.
14. C. McLendon, T. P. Xin, C. Ziani-Cherif, M.Paul Murphy, Kirk A.Findlay, Patrick A.Lewis, Inga Pinnix, Kumar Sambamurti, Rong Wang, Abdul Fauq, Todd E.Golde. *The FASEB Journal*, 2000, 2383-86.
15. K. Shreder, Li Zhang, and Murray Goodman. Synthesis of a Constrained Enkephalin Analog to Illustrate a novel Route to the Piperazinone Ring Structure. *Tetrahedron letters*. 39 (1998)221-224.
16. A. R. Katritzky et al. An efficient conversion of carboxylic acids into Weinreb amides. *Arkivoc* 2002 (xi) 39-44.
17. P. Bakchi and Michael S. Wolfe. Stereochemical analys of (hydroxyethyl) urea Peptidomimetic Inhibitors of γ -secretase. *J. Med. Chem.* 2004, 6485-6489.



I – MATERIELS & METHODES

Température de fusion:

Tous les points de fusion ont été mesurés sur un appareil Banc Kofler HEIZBANK type WME 50-260°C.

Chromatographie sur couche mince:

Le déroulement des réactions a été suivi par chromatographie sur couche mince (CCM) à l'aide de plaque Merck Kiesegel 0.040-0.063 mm UV254nm.

Les révélations sont faites à l'aide d'une lampe UV, d'une solution d'acide phosphomolybdique dans l'éthanol (5%), de l'iode ou une solution de ninhydrine.

Chromatographie sur colonne:

La chromatographie sur colonne a été utilisée pour purifier les produits de réaction. Elle utilise comme support solide le gel de silice et comme éluant différents mélanges de solvants selon le cas examiné. En général, l'éluant qui donne les meilleurs résultats sur couche mince est reconduit sur la colonne.

Infra-rouge:

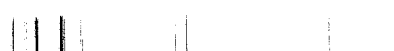
Les spectres dans l'infra-rouge ont été obtenus au centre de mesure du laboratoire COSNA sur un appareil « Mattson Genesis II FTIR ». Les échantillons sont traités soit en solution dans le chloroforme ou sous forme de pastilles de KBr. Les fréquences d'absorption sont données en nombre d'onde (cm^{-1}).

Résonance magnétique nucléaire:

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton ^1H et du carbone ^{13}C ont été enregistrés sur un appareil BRUKER AC 250 à l'institut des Sciences de la Matière et du Rayonnement Atomique et Groupes de laboratoire CNRS-Caen (France). Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au solvant deutérié pris comme référence interne: chloroforme à 7,27 ppm. Les abréviations s, d, t, q, qn, sex, m désignent la multiplicité, soit, respectivement, singulet, doublet, triplet, quadruplet, quintuplet, sextuplet et multiplet.

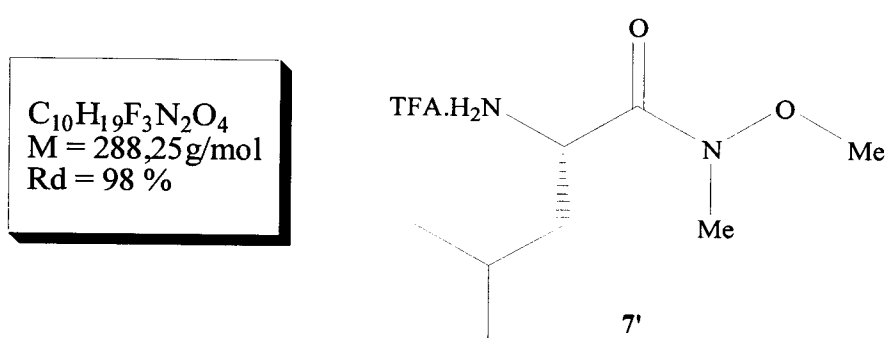
Les solvants ont été séchés avant leur utilisation:

- le tétrahydrofurane (THF) est distillé sur sodium en présence de benzophénone.
- le diméthylformamide (DMF) est préséché sur tamis moléculaire puis distillé sous pression réduite.
- l'acétonitrile est aussi préséchée sur tamis moléculaire.



1. Le N-méthyl-N-méthoxy-isoleucine amide, sel de trifluoroacétique (7') :

Dans un monocol de 50mL sec, introduire 400mg (1,46 mmoles) de l'amide **7** et 40 ml d'un mélange (1/1 : v/v) de dichlorométhane et d'acide trifluoroacétique. Suivre la réaction par CCM, l'éluant utilisé étant l'acétate d'éthyle/hexane (2/8); en général la réaction dure entre 4-5h. Une fois la déprotection finie, le mélange DCM/TFA est chassé sous pression réduite; faire attention aux vapeurs fumantes de l'acide clairement en large excès. Après concentration totale, 20mL de dichlorométhane sont ajoutés dans le ballon et le mélange re-concentré sous pression réduite au maximum. L'opération est répétée autant de fois que nécessaire (au moins 4 fois) jusqu'à ne plus sentir l'odeur de l'acide qui est la même que celle de l'acide acétique. On obtient ainsi le produit **7'** sous forme visqueuse.



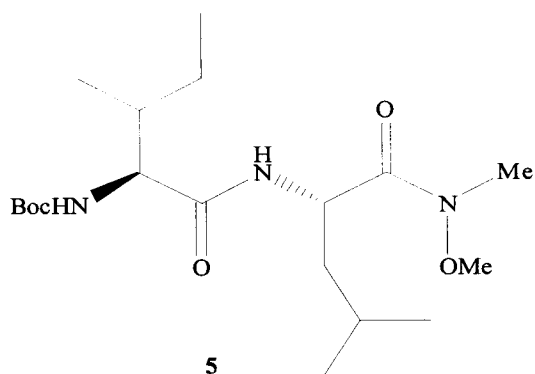
2. (+) Tertibutoxycarbonyl-isoleucine-leucine N-méthyl-N-méthoxy-amide (5):

Dans le même ballon contenant le produit **7'** et sous flux d'azote, introduire le tertibutoxycarbonyl-Leucine acide **6** (340 mg, 1eq). Les dissoudre dans 5 ml de DMF, puis ajouter toujours sous flux d'azote le TBTU (490 mg, 1,02eq). Refroidir le mélange à 0°C puis ajouter la DIPEA (1,02 ml, 4eq). Laisser agiter pendant 20 min à 0°C puis enlever le bain de glace, et suivre la réaction par CCM en utilisant AcOEt/hex (2/8) comme éluant.

Une fois la réaction finie, hydrolyser le mélange à l'eau (25ml) à 0°C puis extraire avec l'acétate d'éthyle (2 x 25ml). Les phases organiques combinées sont lavées à l'eau (1x 25mL), solution saturée de NaCl (1x25ml) puis séchées sur Na₂SO₄.

Une filtration puis concentration sous pression réduite produit le Boc-IL-N(Me)OMe **5** sous forme d'une poudre blanche.

C₁₉H₃₇N₃O₅
 solide blanc
 M = 387,51 g/mol
 Rd = 75 %
 Pf = 164-166°C



IR:

Bande:	cm⁻¹:
NH	3350,84 – 3226,85
CO-NH	1686,87 – 1648,25
CH ₂ ; CH	2963,13 – 2932,98

RMN H¹:

Bandes:	δ (ppm), Multiplicité:
tBoc	1,42 (6H, s)
N-Me	3,18 (3H, s)
N-OMe	3,77 (3H,s)
CO-NH-Boc	6.42 (1H, d)
NH-CH(Leu)-CO	3.94 (1H, t)
NH-CH-(lLeu)-CO	5.05 (1H, d)

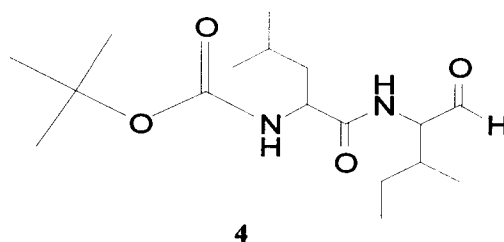
RMN C¹³:

11.37; 15.52; 21.58; 23.26; 24.72; 28.26; 32.18; 37.37; 41.84; 47.56; 59.26; 61.59;
55.62; 171.40; 172.81

3. (+) Tertiobutoxycarbonyl-Isoleucine Leucine aldéhyde (4):

Dans un bicol préséché, introduire le dipeptide **5** (120 mg; 0,309 mmoles; 1 éq). Ajouter le THF (7 ml) puis refroidir à 0 °C et ajouter le LiAlH₄ (82 mg, 7 eq). Suivre la réaction par CCM, en utilisant le mélange AcOEt/DCM (2/8) comme éluant.

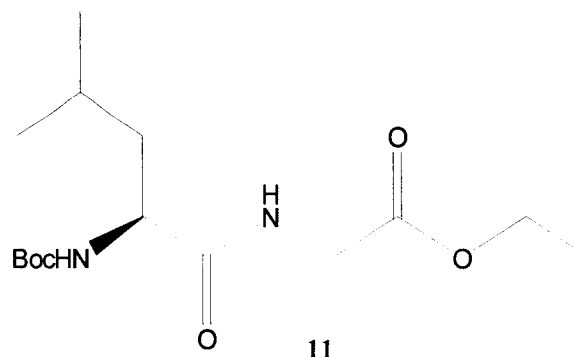
Cette réaction incomplète a donné un mélange de produits (**5** et **4**), impossible pratiquement à séparer.



4. (+) Tertiobutoxy-Leucine Glycine, ester éthylique (11):

Dans un bicol préséché, on introduit l'acide **9** (830 mg; 3,58 mmoles; 1éq) et la Glycine éthyle ester **10** (500 mg, 1 éq). Les dissoudre dans 7 mL d'acétonitrile, puis ajouter le TBTU (1,17 g; 1,02 eq). Après avoir refroidi le mélange à 0 °C, ajouter la diisopropyléthylamine (2,44 ml; 4 éq). Suivre la réaction par CCM en utilisant l'hexane/Acétate d'éthyle (6/4) comme éluant et la ninhydrine comme révélateur. Une fois la réaction finie, évaporer le solvant puis refroidir à 0°C avant d'hydrolyser le mélange avec de l'eau (10mL). Extraire avec de l'acétate d'éthyle (2 x 20mL). Les phases organiques combinées sont lavées à l'eau (1 x 15mL) puis avec une solution saturée en NaCl (1 x 15mL), séchées sur Na₂SO₄ et enfin concentrées sous vide pour obtenir le composé **11** sous forme de poudre blanche.

C₁₅H₂₈NO₅
 solide blanc
 M = 316,39 g/mol
 Rd = 80 %
 Pf = 92-94 °C



IR :

<u>Bande:</u>	<u>cm⁻¹:</u>
NH	3327,37
CO-NH	1662,97

RMN H¹:

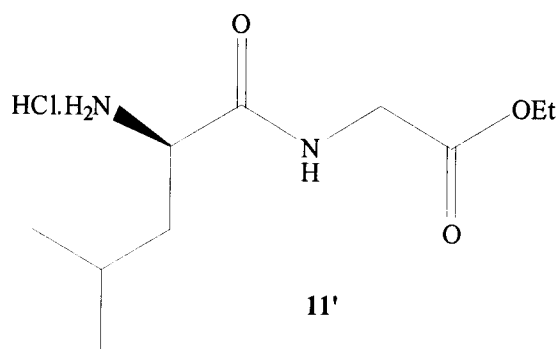
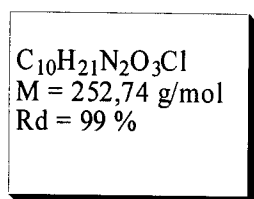
<u>Bandes:</u>	<u>δ (ppm), Multiplicité:</u>
CO-CH ₃	1,40 (9H, s)
CO-NH-Boc	6,85(1H, d)
CO-NH-CH	5,08(1H, d)
NH-CH(Leu)-CO; NH-CH-CO	4,17 (2H, dblet de dble)
OCH ₂ CH ₃	3,98 (2H, q)
OCH ₂ CH ₃	1,24 (3H, t)

RMN C¹³:

14.08; 21.85; 22.92; 24.66; 28.26; 41.24; 41.32; 52.90; 61.38; 80.02; 155.69; 169.67;
 172.99

5. Leucine Glycine éthyl ester, sel de chlorure d'ammonium (11') :

Dans un ballon introduire (300 mg; 0,948 mmoles) de dipeptide **11** et 10 ml d'un mélange de HCl dans l'acétate d'éthyle (1,5 N). La réaction est suivie par CCM en utilisant Eau/A.Acétique/Butanol (1/1/3) comme éluant (la réaction dure 2hrs en général). Une fois la déprotection finie, le solvant est évacué sous pression réduite pour obtenir **11'** sous la forme d'un produit jaunâtre visqueux.



6. Le 1,6-diiodohexane (8):

Dans un bicol de 100mL, introduire (1g; $1,3 \cdot 10^{-2}$ moles) de 1,6-hexanediol. Dissoudre dans 80 ml d'éther et 25 ml d'acétonitrile.

Ajouter la triphenylphosphine (9,02 g; $3,44 \cdot 10^{-2}$; 2,64 eq) et l'imidazole (1,95g; $2,86 \cdot 10^{-2}$; 2,2 eq). Laisser le mélange en agitation pendant 20 min puis refroidir le mélange à 0 °C et commencer à ajouter l'iode (8,44g; $3,31 \cdot 10^{-2}$; 2,56 eq) en 4 portions pendant 1h. Le mélange est agité pendant 2h à 0°C puis 1hr à température ambiante.

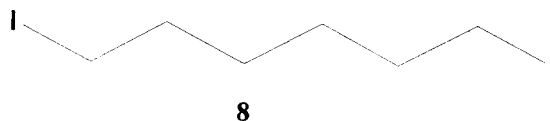
Faire une dilution avec 200 ml d'éther, suivie d'une filtration. Le filtrat est lavé avec une solution de $Na_2S_2O_3$, puis une solution de $CuSO_4$ et enfin une solution saturée en NaCl. Sécher sous Na_2SO_4 , filtrer et évaporer le solvant.

Obtention d'un liquide jaune huileux qui est le mélange de 2 produits, le 1,6-diiodohexane et le 6-iodohexanol. Une chromatographie sur colonne avec un mélange d'acétate d'ethyl, hexane (4/6) comme éluant permet la séparation du composé **8** sous forme

CHAPITRE III : PARTIE EXPERIMENTALE

d'huile jaunâtre avec un rendement de 43%, ainsi que le produit 6-iodohexanol **13** avec un rendement de 54% qui est aussi sous forme d'huile jaunâtre.

$C_6H_{12}I_2$
liquide jaune
 $M = 337,97 \text{ g/mol}$
 $Rd = 43 \%$



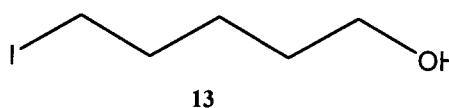
IR:

<u>Bande:</u>	<u>cm⁻¹:</u>
CH ₂	2851,46
CH ₃	2925,35
CH-I	506,68

RMN H¹:

<u>Bandes:</u>	<u>δ (ppm), Multiplicité:</u>
ICH ₂ CH ₂	3.21 (4H, t)
ICH ₂ CH ₂ CH ₂	1.80 (4H, m)
ICH ₂ CH ₂ CH ₂	1.40 (4H, m)

$C_6H_{13}IO$
liquide jaune
 $M = 228,07 \text{ g/mol}$
 $Rd = 54 \%$



IR :

<u>Bande:</u>	<u>cm⁻¹:</u>
CH ₂	2925,35
OH	3339,14
CH-I	501,41

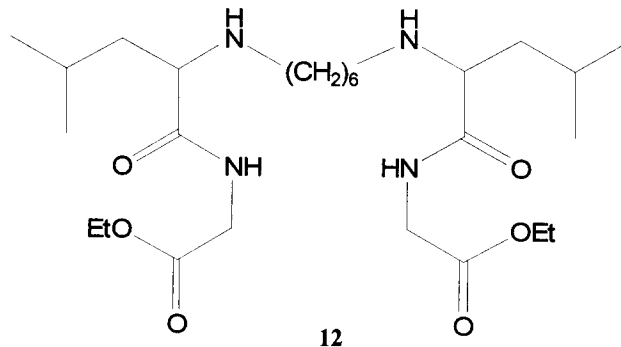
RMN :

<u>Bandes:</u>	<u>δ (ppm), Multiplicité:</u>
ICH ₂ CH ₂	3.16 (2H, t)
ICH ₂ CH ₂ CH ₂	1.51 (2H, m)
ICH ₂ CH ₂ CH ₂ ; HOCH ₂ CH ₂ CH ₂	1.37 (4H, m)
HOCH ₂ CH ₂	3,59 (2H, t)
HOCH ₂ CH ₂ CH ₂	1,80ppm (2H, m)

7. 1,6-Bis-Leucine Glycine ester éthylique, n-héxane (12):

Dans un ballon sec, introduire (0,8 g; 5,8 mmoles, 4,3 eq) de K₂CO₃ sous flux d'azote. Ajouter le sel **11'** (300 mg; 2,2 eq); dissoudre dans 10ml d'acétonitrile puis ajouter le diiodure **8** (200 mg; 1 eq). Porter le mélange à reflux dans un bain de sable et suivre la réaction par CCM en utilisant le mélange eau/a.acétique/butanol (1/1/3) comme éluant et la nynhidrine comme révélateur. Une fois la réaction finie, refroidir le mélange à 0 °C et hydrolyser avec 10mL d'eau. Extraire avec l'acétate d'éthyle (2 x 25ml). Les phases organiques combinées sont lavées à l'eau (1 x 20ml) puis avec une solution saturée en NaCl, séchées sur Na₂SO₄ et enfin concentrées sous vide. Le brut est ensuite filtré sur une petite couche de silice en utilisant le mélange eau/a.acétique/utanol (1/1/3) comme éluant pour obtenir le composé final **12** sous forme d'une huile jaune.

C₂₅H₄₉N₄O₆
 M = 501,68 g/mol
 liquide jaune
 Rd = 45 %



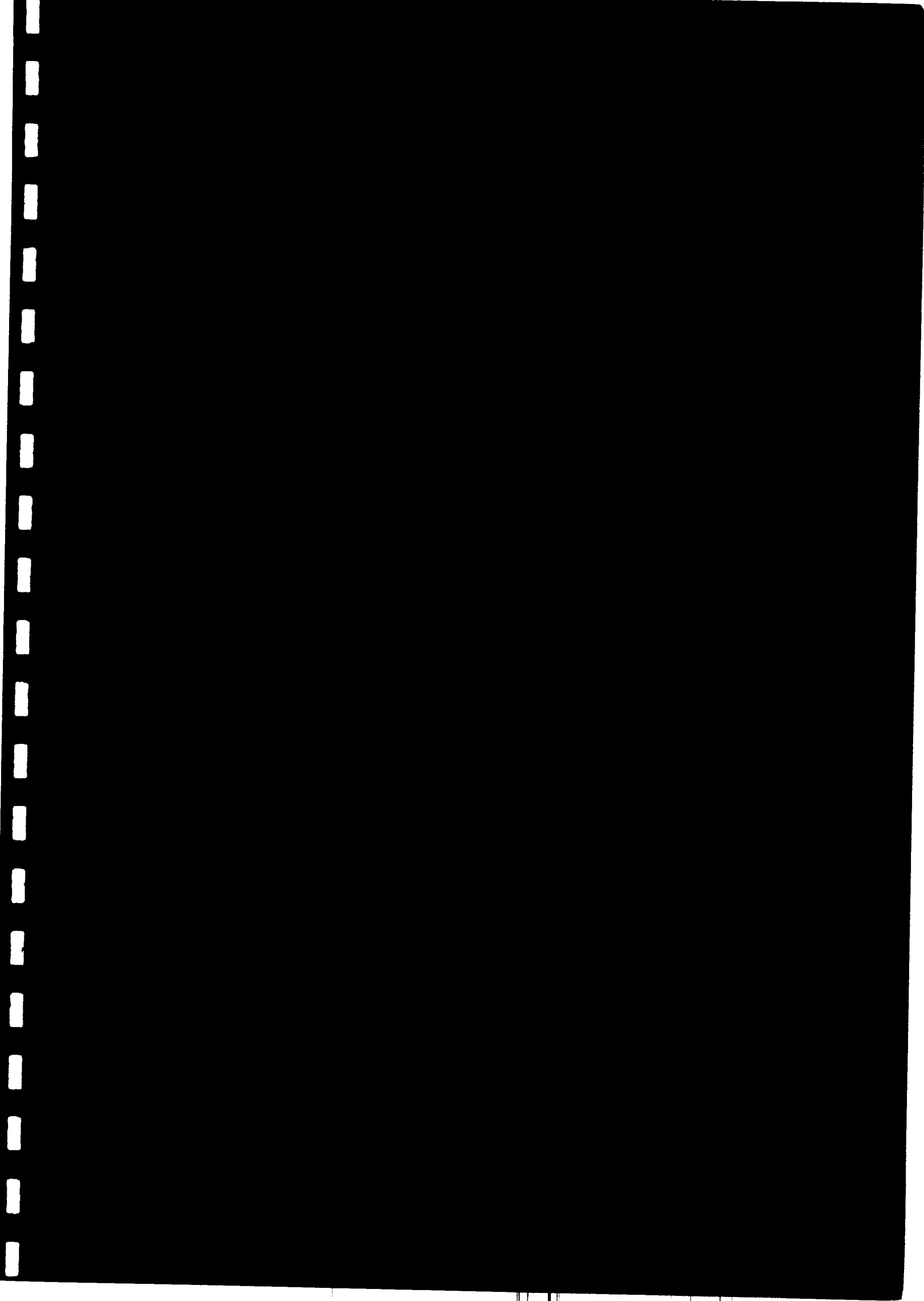
RMN H¹:

Bandes:

I-Pr
 CH₃
 CH₂
 CH₂-NH-CH
 CH₂-NH-CH
 CH₂-NH-CH
 NH-CH-CO
 CH₂
 NH
 NH

δ (ppm), Multiplicité:

0,85ppm (12H, d)
 1,2 ppm (6H, t)
 1,2-1,9 ppm(14H, m)
 1,95 ppm(2H, s)
 3,1 ppm (4H, t)
 3,8 ppm (2H, m)
 4,1 ppm (4H, t)
 4,15 ppm (4H, q)
 7,75 ppm (1H, s)
 8,1ppm (1H, s)

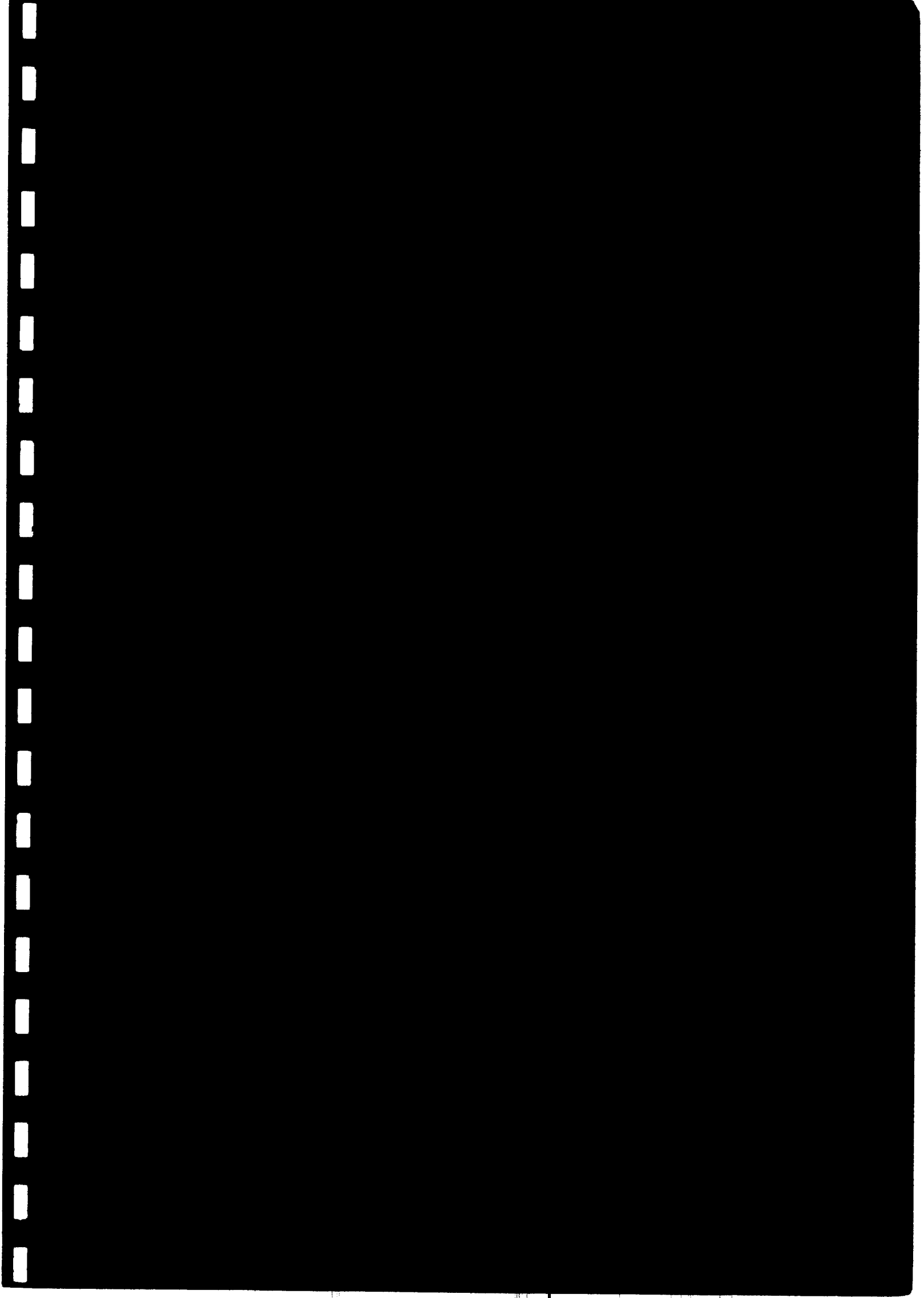


CONCLUSION GENERALE :

Lors de ce présent travail, nous nous sommes intéressés à l'inhibition de la gamma-sécrétase en développant le dimère **12** qui est un inhibiteur de type nouveau, développé sur le concept de bivalence. La synthèse de ce dimère fut réalisée non sans peine, et cela spécialement dû au fait que toutes nos synthèses ont été accomplies sur de toutes petites quantités, à cause de la cherté des produits de base. Cependant, notre grand réconfort fut dans le fait qu'on a pu obtenir un dimère, et que nous avons appris certaines des bases de la chimie thérapeutique, et spécialement certaines bases du principe SAR afin de pouvoir développer une molécule biologiquement active.

LES PERSPECTIVES :

L'obtention du dimère **12** n'est qu'une première étape dans ce projet. Comme perspectives, nous pensons revoir les conditions opératoires afin d'améliorer les rendements. Suite à cela, nous envisageons la synthèse de toute la série 12-n; puis finalement de les envoyer à des collaborateurs biologistes qui travaillent dans le domaine de la maladie d'Alzheimer afin de tester ces produits.



PUBLICATIONS :

Gamma-Secretase as a Pharmacological Target in Alzheimer Disease Research: When, Why and How? C. Ziani-Cherif, B. Mostefa-Kara and F.Z. Brixi-Gormat, **Current Pharmaceutical Design**, **12**, 2006, 4313-4335 .

COMMUNICATIONS :

Synthèse de Molécules Thérapeutiques Traitant la Maladie d'Alzheimer, F.Z. Brixi-Gormat, C. Ziani-Cherif, B. Mostefa-Kara, P. Murphy, **Société Algérienne de Chimie**, **7^{ième} Congrès**, 16-18 Mai, 2006, Oran, Algérie.