



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

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCEEN

MEMOIRE

Présenté à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

MASTER EN CHIMIE

Spécialité : Chimie des Produits Naturels

Par :

Mahmoud-Imad FARDEHEB

Sur le thème

Conception synthèse de séquence peptidique du peptide amyloïde : application maladie Alzheimer

Soutenu publiquement le 24 Juin 2025 à Tlemcen devant le jury composé de :

Pr. ALLALI Hocine
Dr. KENICHE Assia
Dr. MAMI Imane Rihab

Université Aboubekr Belkaid – Tlemcen
Université Aboubekr Belkaid – Tlemcen
Université Aboubekr Belkaid – Tlemcen

Président
Encadrante
Examinatrice

Année Universitaire : 2024 ~ 2025

DÉDICACE

À la Chimie,
Artisan discret des possibles,
Qui nous arme contre l'oubli.

À la Science,
Infatigable quête de lumière,
Qui transforme l'espoir en certitude.

À tous ceux qui,
Se sont battus contre les ombres de l'Alzheimer,
Dans l'attente d'un avenir où chaque mémoire retrouvera sa place.

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à l'ensemble des membres du jury pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'évaluer ce travail.

*Je remercie chaleureusement **Dr. KENICHE Assia**, qui a su allier avec bienveillance son rôle de directrice du laboratoire COSNA et d'encadrante exigeante, offrant un cadre propice à l'épanouissement de ce travail.*

*Une reconnaissance particulière va au **Pr. ZIANI-CHERIF Chewki**, dont la passion contagieuse pour la science a constamment nourri ma créativité et mon désir d'apprendre.*

*Je souhaite également témoigner toute ma gratitude envers **ma famille**, mes amis ; **Abdelillah, Safaa** et **Sanaa** dont le soutien indéfectible, à travers des encouragements discrets ou des sacrifices invisibles, a été le pilier de cette réalisation.*

*Enfin, un merci sincère aux doctorantes **KALACHE Chaimaa** et **CHEBIEB Assia** pour leurs échanges et à qui je souhaite une brillante continuation dans leurs travaux de recherche.*

Abstract:

Liquid-phase peptide synthesis (LPPS) involves a series of protection, coupling and deprotection steps. While most research efforts focus on the development of new protecting groups and coupling agents, strategies that minimize the use of protecting groups remain underexplored. In this study, we target the amyloid peptide A β -42, implicated in Alzheimer's disease through its aggregation into β -sheet structures, by synthesizing the recognition sequence Boc-LVFF, derived from the KLVFF motif, known for its specific interaction with A β -42. This approach relies on organic chemistry method using DCC and HOBt as coupling agents in a green THF-H₂O solvent system. The method eliminates the need for protecting groups, shortens reaction times, and allows the recycling of HOBt during iterative couplings. Unlike solid-phase peptide synthesis (SPPS), this work enables a sequential "end-to-end" peptide construction, producing intermediates readily available for subsequent coupling steps.

Keywords: peptide aggregation, A β -42, KLVFF sequence, synthesis, amino acids.

Résumé :

La synthèse peptidique en phase liquide (LPPS) repose sur une succession d'étapes de protection, couplage et de déprotection. Si la plupart des recherches se concentrent sur le développement de nouveaux groupes protecteurs et agents de couplage, les approches minimisant l'utilisation de groupes protecteurs restent peu explorées. Dans ce travail, nous ciblons le peptide amyloïde A β -42, impliqué dans la maladie d'Alzheimer via son agrégation en structures β , en synthétisant la séquence de reconnaissance Boc-LVFF (dérivée du motif KLVFF), connue pour son interaction spécifique avec l'A β -42. Cette méthode repose sur une approche de chimie organique, utilisant le DCC et l'HOBt comme agents de couplage dans un système de solvant verts THF-H₂O, éliminant le besoin de groupes protecteurs, réduisant les temps de réaction et permettant la réutilisation de l'HOBt lors des couplages itératifs. Contrairement à la synthèse peptidique en phase solide (SPPS), ce travail permet une construction séquentielle "de bout en bout" des peptides, générant des précurseurs utilisables pour l'étape suivante.

Mots-clés : agrégation peptide, A β -42, séquence KLVFF, synthèse, acides aminés.

ملخص :

تعتمد التوليفات الببتيدية في طور السائل (LPPS) على سلسلة من خطوات الحماية، التوصيل وإزالة الحماية. وعلى الرغم من أن معظم الدراسات تركز على تطوير مجموعات حماية جديدة وعوامل توصيل فعالة، فإن الأساليب التي تسعى لتقليل استخدام مجموعات الحماية لا تزال غير مستكشفة بشكل كافٍ. في هذا العمل، نهدف الببتيد الأميلويدي A β -42، المرتبط بمرض ألزهايمر نتيجة تجمعه في بنى صفائحية β ، من خلال توليف السلسلة التعريفية Boc-LVFF، المشتقة من المتواليات KLVFF المعروفة بتفاعلها الانتقائي مع A β -42. تستند هذه المنهجية إلى مقارنة في الكيمياء العضوية، تعتمد على استخدام DCC و HOBt كمعامل توصيل ضمن مزيج مذيبات صديق للبيئة (THF-H₂O)، مما يلغي الحاجة لاستخدام مجموعات الحماية، ويقلل من زمن التفاعل، ويتيح إعادة استخدام HOBt في عمليات التوصيل المتكررة. وعلى خلاف التوليف في الطور الصلب (SPPS)، تسمح هذه الطريقة ببناء متتابع "من الطرف إلى الطرف" للسلسلة الببتيدية، منتجةً سلائف قابلة للاستخدام في المراحل التالية.

الكلمات المفتاحية: تجميع الببتيد، A β -42، تسلسل KLVFF، التخليق، الأحماض الأمينية.

Sommaire

I. INTRODUCTION	1
A. Maladie d'Alzheimer	1
B. Les mécanismes moléculaires de la maladie d'Alzheimer	1
C. La fibrillogénèse de la protéine Bêta-amyloïde	2
D. Problématique	2
E. Objectif de l'étude	3
II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1. Introduction	4
2. Choix de la méthode de synthèse	4
3. Synthèse du Phth-Leu-Val-Phe-Phe-OH par couplage peptidique	7
4. Conclusion	10
III. RESULTATS ET DISCUSSION	11
1. Introduction	11
2. Synthèse du dipeptide Phth-Leu-Val-OH	11
3. Synthèse du tétra-peptide Boc-Leu-Val-Phe-Phe-OH	13
4. Résultats avant purification du Boc-LVFF	15
5. Purification par chromatographie sur colonne du Boc-LVFF	16
6. Résultats après purification du Boc-LVFF	17
7. Conclusion	18
8. Perspectives	18
IV. PARTIE EXPERIMENTALE	19
A. Indications générales	19
B. Matériel et méthodes	19
1. Produits chimiques et solvants	19
2. Suivi et analyses	19
C. Etapes de Synthèse peptidique	20
1. Synthèse du Boc-Leu-Val-OH par couplage Boc-Leucine/Valine	20
2. Synthèse du Boc-Leu-Val-Phe-OH par couplage Boc-Leu-Valine/Phénylalanine	21
3. Synthèse du Boc-Leu-Val-Phe-Phe-OH par couplage	22
Tableau 2 - récapitulant les réactifs utilisés, produits synthétisés et résultats obtenus	23
Références bibliographiques	25
ANNEXE	26

I. INTRODUCTION

A. Maladie d'Alzheimer :

La maladie d'Alzheimer (MA), qui tient son nom du chercheur allemand Alois Alzheimer – le premier à l'avoir décrite en 1907 – est la forme la plus répandue de démence. Il avait observé chez sa patiente des symptômes tels qu'une désorientation spatio-temporelle, des troubles du comportement, des pertes de mémoire sévères, ainsi que des difficultés à écrire et à parler. L'examen post-mortem avait révélé un cerveau atrophié, marqué par des enchevêtrements neuronaux anormaux et une perte massive de neurones dans la couche corticale supérieure¹. Bien qu'elle soit à l'origine de 60 à 80 % des cas de démence, la maladie d'Alzheimer reste énigmatique : ses mécanismes profonds sont mal élucidés, et aucun traitement curatif n'existe à ce jour². Son impact, tant humain que statistique, est pourtant alarmant.

B. Les mécanismes moléculaires de la maladie d'Alzheimer :

La pathogenèse de la maladie d'Alzheimer reste incomplètement élucidée, avec un débat persistant sur le rôle exact des dépôts amyloïdes intracellulaires et des agrégats tau extracellulaires - sont-ils cause ou conséquence de la maladie ?³ Selon l'hypothèse de la cascade amyloïde, l'accumulation et l'agrégation des peptides A β génèrent des plaques amyloïdes qui initient un mécanisme en cascade⁴. Ce processus entraîne ultérieurement une dysfonction de la barrière hémato-encéphalique, provoquant une réaction inflammatoire, la formation de dégénérescences neurofibrillaires et une perte neuronale. Ces altérations pathologiques progressives conduisent finalement à l'apparition de troubles cognitifs et à l'installation d'un état démentiel caractéristique de la maladie d'Alzheimer⁵.

C. La fibrillogenèse de la protéine Bêta-amyloïde :

La production anormale de l'A β 42 implique une fibrillogenèse et donc une neurotoxicité⁶. Des analyses par diffraction des rayons X ont révélé que les fibres amyloïdes sont constituées de feuillets β organisés en configuration antiparallèle et que suite à ce changement conformationnel, des ponts hydrogène apparaissent et donc la fibrillation⁷.

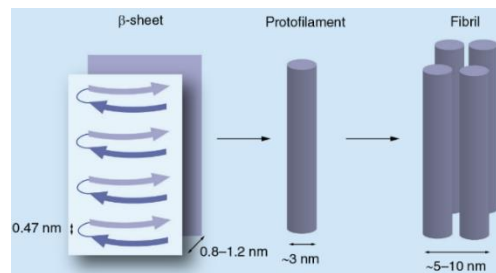


Figure 1 - Structure hiérarchique des fibrilles amyloïdes ⁸

D. Problématique :

Dans ce mémoire, nous nous intéressons à l'amyloïdogenèse (ou fibrillation amyloïdique). Afin de bloquer ce processus, nous proposons de cibler l'agrégation de l'A β -42. En tant que chimistes, nous pouvons concevoir des inhibiteurs chimiques capables soit de détruire les amyloïdes, soit de s'insérer entre les feuillets β en cours de formation. Cependant, il est nécessaire de développer un fragment peptidique de reconnaissance permettant une interaction sélective avec le peptide cible.

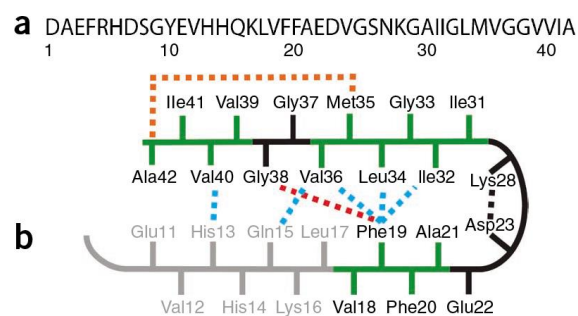


Figure 2 - Séquence et structure de l'unité monomère dans les fibrilles d'A β 40 et d'A β 42

(a) Séquence d'A β 42 dérivée de l'APP humaine (b) Contraintes structurales dans les fibrilles d'A β 40 et d'A β 42

Les mesures RMN des fibrilles d'A β 40 ont montré que les résidus 1–10 sont non structurés et que les résidus 11–40 adoptent un repliement β -turn- β . Un empilement des chaînes latérales est observé entre Phe19 et Ile32, Leu34 et Val36, ainsi qu'entre Gln15 et Val36, et entre His13 et Val40 (lignes pointillées bleues). Dans les fibrilles d'A β 42, les résidus 1–17 peuvent être flexibles (en gris), tandis que les résidus 18–42 forment un repliement β -turn- β . Des contacts moléculaires ont été rapportés au sein de l'unité monomère des fibrilles d'A β 42 entre Phe19 et Gly38 (ligne pointillée rouge) et entre Met35 et Ala42 (ligne pointillée orange). Dans les deux cas, A β 40 et A β 42, la conformation en virage est stabilisée par des interactions hydrophobes (résidus en vert) et par un pont salin entre Asp23 et Lys28 (ligne pointillée noire)⁹. Il est donc difficile de déterminer de manière arbitraire le peptide le plus court et le plus susceptible d'être l'agent responsable des interactions entre les feuillets A β . Pour clarifier cela, plusieurs études ont été réalisées, identifiant la séquence A β 16-20, KLVFF, comme jouant un rôle clé dans ces interactions.

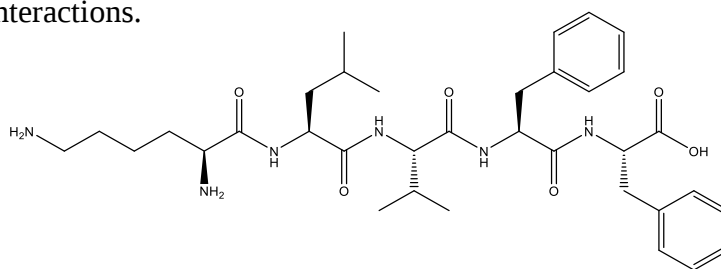


Figure 3 - Représentation schématique de la séquence peptidique KLVFF

E. Objectif de l'étude :

L'objectif de ce travail est de mimer la séquence peptidique KLVFF et synthétiser un fragment dérivé de cette dernière. La synthèse peptidique en phase liquide (LPPS) repose sur une succession d'étapes de protection, couplage et déprotection. Bien que la plupart des recherches se concentrent sur le développement de nouveaux groupes protecteurs et agents de couplage, les approches minimisant l'utilisation de groupes protecteurs restent peu explorées. Nous découvrons dans la partie suivante, quelques méthodes permettant de mimer ce peptide.

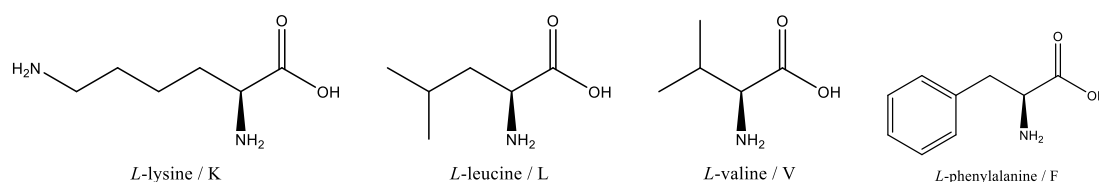


Figure 4 - Représentation schématique des acides aminés constituant la séquence KLVFF

II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Introduction :

La séquence peptidique KLVFF, dérivée de la région hydrophobe (résidus 16-20) de la protéine bêta-amyloïde (A β), se distingue comme l'une des séquences les plus efficaces pour inhiber l'agrégation d'A β . Des études montrent que KLVFF module l'agrégation d'A β en réduisant le temps de latence et la quantité de fibrilles β -sheet formées, tout en maintenant une affinité élevée pour les sites hydrophobes critiques d'A β . Comparée à d'autres peptides comme LPFFD (un briseur de feuillets β)¹⁰, KLVFF présente une meilleure stabilité et une capacité accrue à perturber les interactions protéine-protéine pathologiques. De plus, des dérivés de KLVFF, tels que P4 et P5, enrichis en résidus sarcosine ou thymine, améliorent encore son efficacité en bloquant les liaisons hydrogène et en empêchant l'agrégation latérale. Ainsi, KLVFF et ses analogues peptidomimétiques émergent comme des candidats prometteurs pour cibler à la fois les agrégats d'A β et de tau, offrant une approche thérapeutique duale contre la MA¹¹.

2. Choix de la méthode de synthèse :

Le chemin réactionnel initialement ciblé dans ce travail repose sur un couplage peptidique classique, nécessitant d'une part la protection de la fonction amine du premier acide aminé à l'aide d'anhydride phtalique et d'autre part la méthylation de la fonction acide du deuxième acide aminé avant la réalisation du couplage, comme illustré dans le schéma suivant¹².

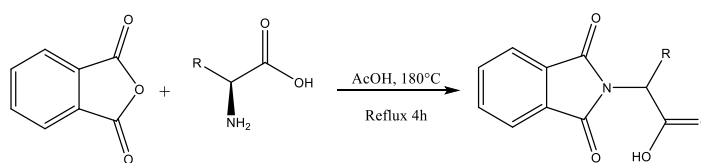


Figure 5 - Réaction bilan de la protection de l'amine

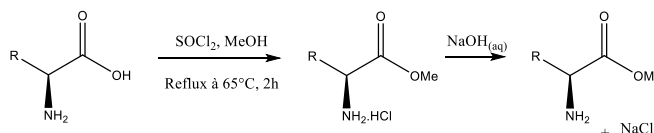


Figure 6 - Réaction bilan de la protection de l'acide (estérification : méthylation)

La synthèse de la séquence *KLVFF* se déroule théoriquement selon trois étapes :

1. Formation du dipeptide Lys-Leu-OH : Protection de la fonction *amine* de la *lysine* (*K*) par le groupe protecteur (Phth), protection de la fonction *acide* de la *leucine* (*L*) sous forme d'ester méthylique, couplage entre la lysine protégée et la leucine protégée en présence d'un agent de couplage comme le DCC¹³. Enfin la déprotection de la fonction *acide* de la leucine pour obtenir Lys(Phth)-Leu-OH.

2. Élongation en tri-peptide Lys(Phth)-Leu-Val-OH : Protection de la fonction *acide* de la *valine* (*V*) sous forme d'ester, couplage entre le dipeptide Lys(Phth)-Leu-OH et la *valine* protégée, puis déprotection de la fonction *acide* pour obtenir Lys(Phth)-Leu-Val-OH.

3. Couplage avec de la phénylalanine (Phe) en deux fois : On utilise la *phénylalanine* (*F*) avec sa fonction *acide* protégée pour un premier couplage avec le tripeptide afin de former Lys(Phth)-Leu-Val-Phe-OH (après hydrolyse), puis le couplage avec une autre unité de Phe-OMe pour obtenir le penta-peptide protégé Lys(Phth)-Leu-Val-Phe-Phe-OMe avant de procéder à la déprotection globale et libérer le produit KLVFF : Lys-Leu-Val-Phe-Phe-OH.

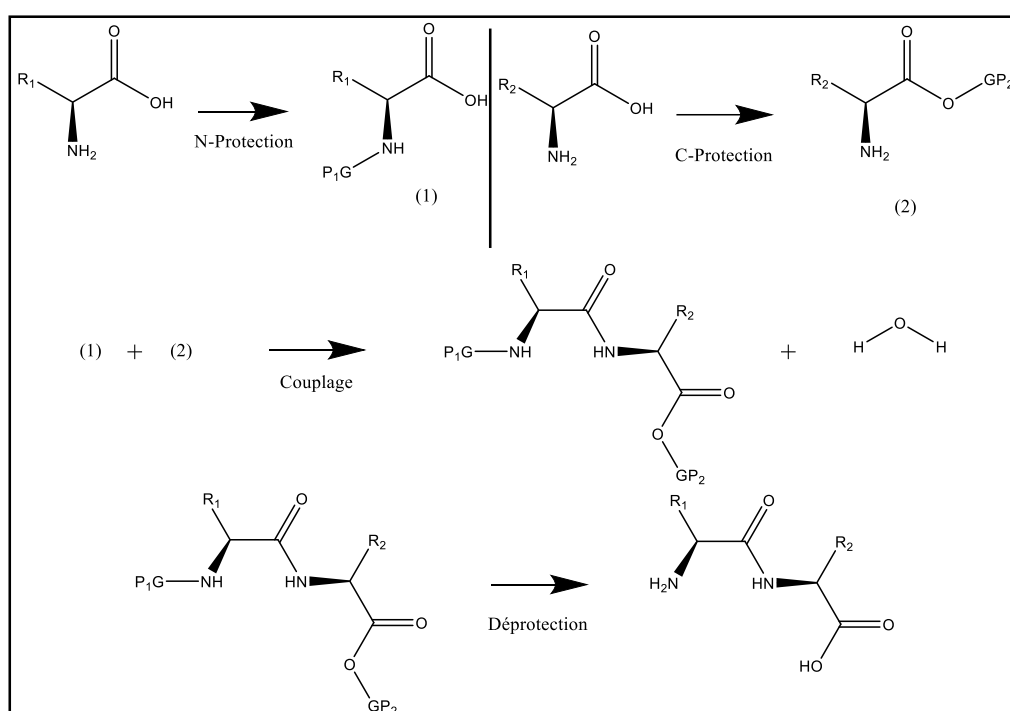


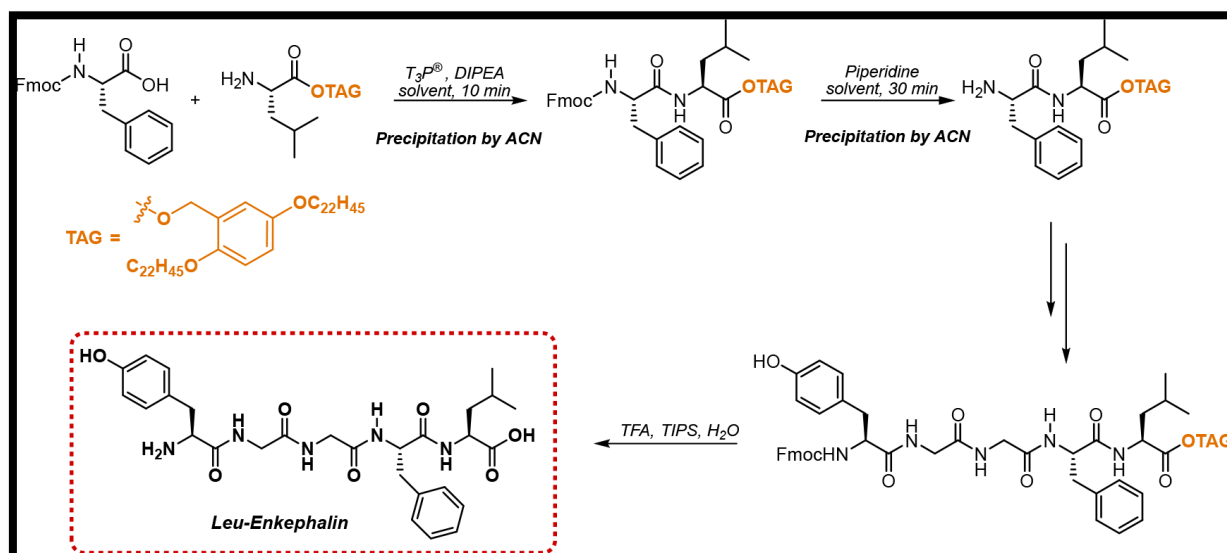
Figure 7 - Réaction bilan du couplage peptidique

Il est à noter que les groupes protecteurs –Phth (amine) et, -OMe (acide) - sont choisis pour leur orthogonalité, ainsi qu'à chaque étape de couplage une purification est nécessaire et que l'activation des acides carboxyliques est essentielle pour éviter les sous-produits¹⁴. Pour procéder à la déprotection, il est important de connaître la nature du groupe protecteur :

Tableau 1 – Conditions de déprotection selon la nature du groupe protecteur

Conditions de protection	Groupe protégé	Déprotection
<i>amine</i>		
FmocCl	NFmocRH	Condition basiques
Boc ₂ O	NBocRH	Condition acides
CbzCl	NCbzRH	Hydrobromation ou hydrogénation
Anhydride phthalique	Phtalimide	Hydrazine
BnBr	RNBn ₂	Hydrogénation ou réduction de Birch
Ac ₂ O ou AcCl, APTS	NROAcH	Hydrolyse acide
<i>acide</i>		
SOCl ₂ / MeOH	-OMe	Hydrolyse basique

Des exemples comparatifs de LPPS et SPPS sont également présentés :



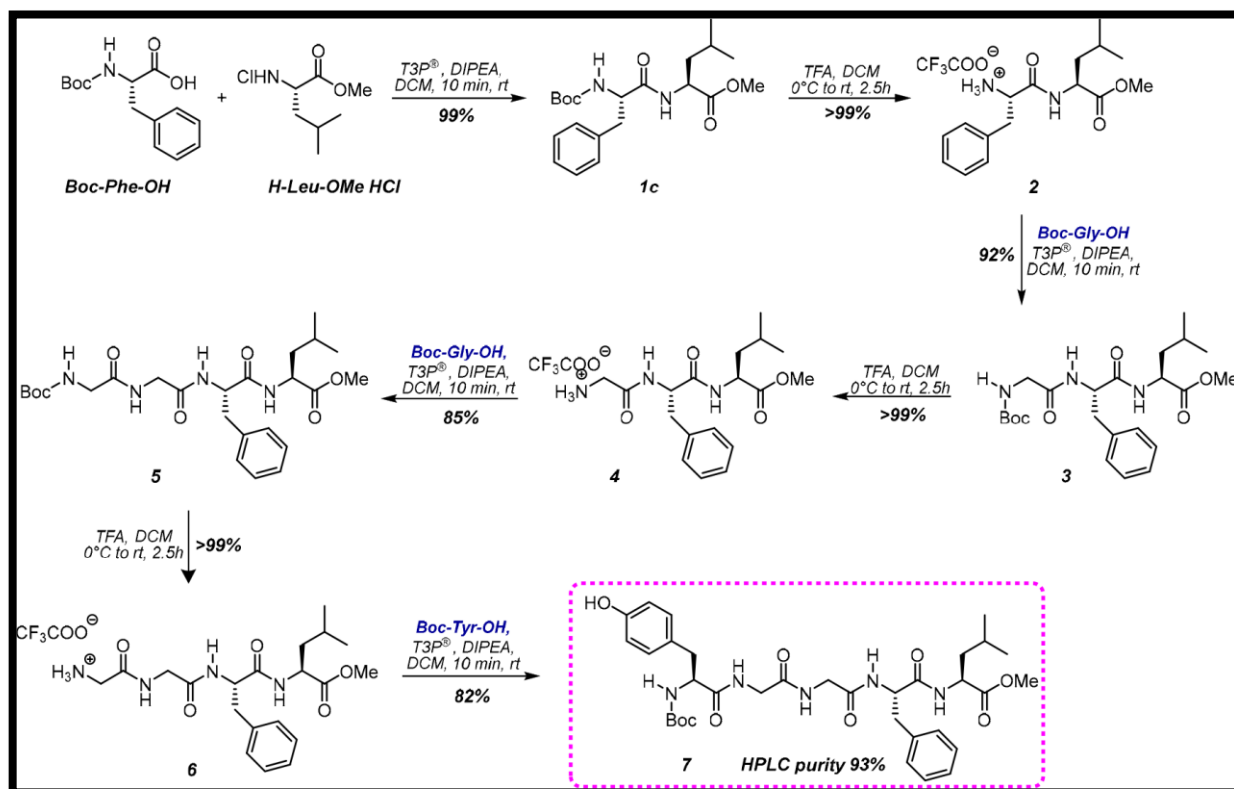


Figure 9 - Exemple de synthèse peptidique en phase solide SPPS¹⁶

3. Synthèse du Phth-Leu-Val-Phe-Phe-OH par couplage peptidique :

3.1. Protection de l'amine de la Leucine : Phth-Leu-OH

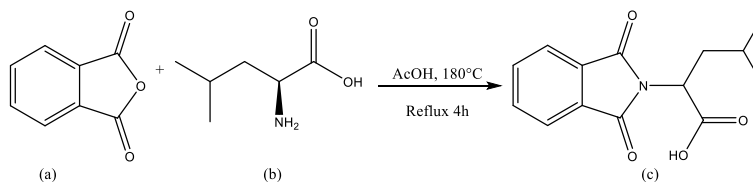


Figure 10 – Réaction de protection de l'amine par du phthalique anhydride

3.2. Synthèse du dipeptide Phth-Leu-Val-OH – Premier couplage

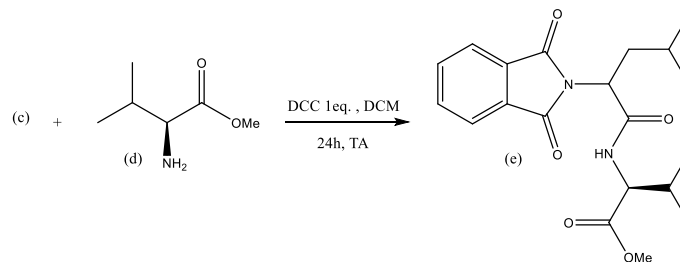


Figure 11 – Réaction de couplage Phth-Leucine/Valine

Hydrolyse de l'ester :

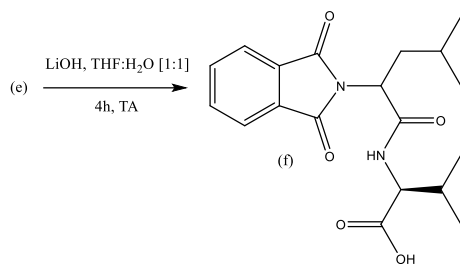


Figure 12 – Hydrolyse de l'ester de la valine

3.3. Synthèse du tri-peptide Phth-Leu-Val-Phe-OH – Deuxième couplage :

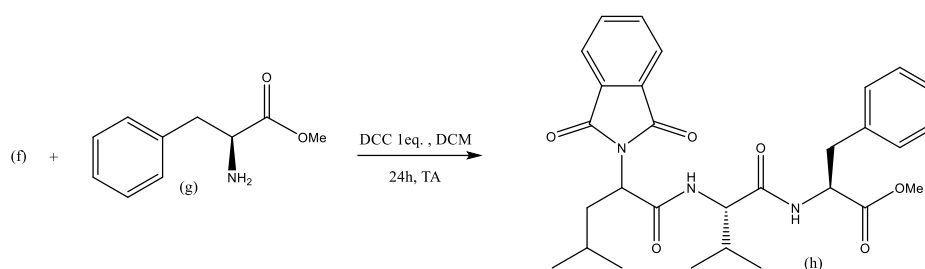


Figure 13 – Réaction de couplage Phth-Leu-Valine/Phénylalanine

Hydrolyse de l'ester :

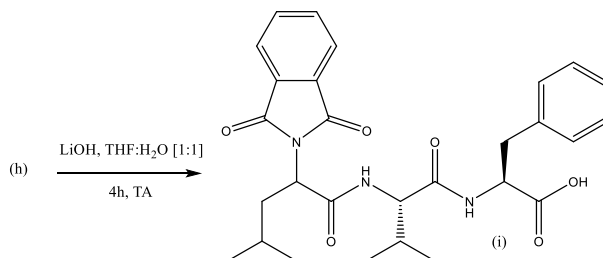


Figure 14 – Hydrolyse de l'ester de la phénylalanine

3.4. Synthèse du tétra-peptide Phth-Leu-Val-Phe-Phe-OH – Troisième couplage :

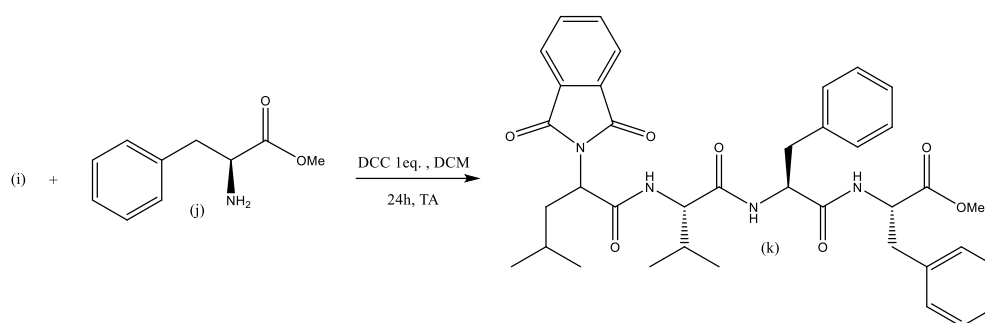


Figure 15 - Réaction de couplage Phth-Leu-Val-Phénylalanine/Phénylalanine

Hydrolyse de l'ester :

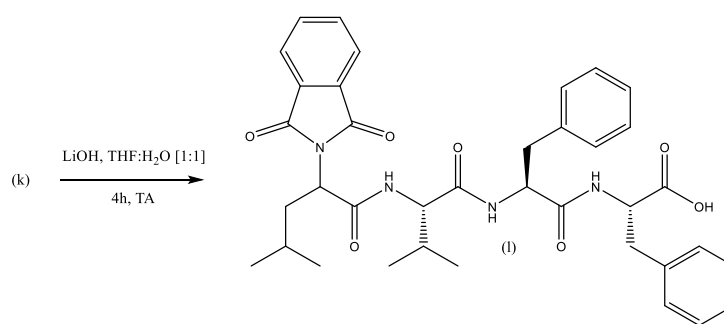


Figure 16 - Hydrolyse de l'ester de la phénylalanine

Pour le même objectif de couplage peptidique, nous avons également exploré une autre méthode différente de celle mentionnée ci-dessus qu'on peut illustrer comme suit :

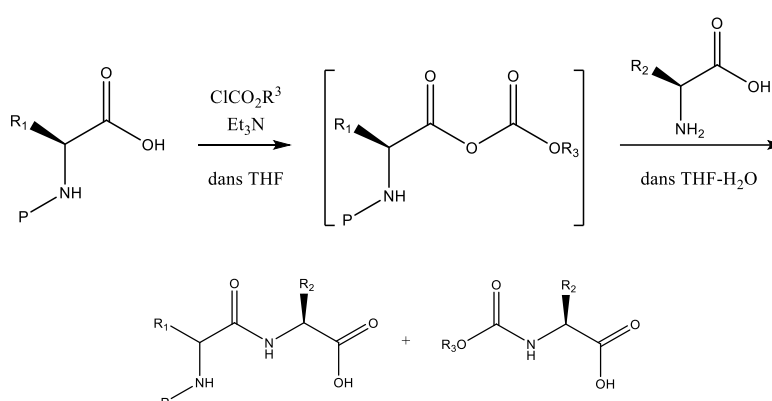


Figure 17 - Méthode de synthèse des dipeptides via les anhydrides mixtes carboniques-carboxyliques

Cette méthode repose sur la formation d'anhydrides mixtes carboniques-carboxyliques. Elle consiste à protéger la fonction amine du premier acide aminé avec l'anhydride phthalique, puis à le coupler directement avec un second acide aminé non protégé.

4. Conclusion

Bien que quelques méthodes communes de synthèse peptidique aient été présentées, leur mise en œuvre reste exigeante en termes de conditions réactionnelles, de temps et de purification. C'est pourquoi nous avons limité notre étude à des essais préliminaires et opté par la suite pour une approche plus simple et efficace, détaillée dans la section suivante.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

1. Introduction :

Dans cette section, nous présentons les résultats de deux approches distinctes de synthèse peptidique ; la première, où le produit est le dipeptide Phth-Leu-Val-OH, est basée sur la formation d'anhydrides mixtes carboniques carboxyliques, cette méthode consiste à protéger la fonction amine du premier acide aminé à l'aide de l'anhydride phthalique, avant de le coupler directement à un second acide aminé non protégé. La deuxième approche, sujette de ce mémoire, concerne la synthèse de la séquence de reconnaissance Boc-LVFF, dérivée du motif KLVFF. Cette méthode repose sur une stratégie de chimie organique verte, utilisant le DCC et le HOBt comme agents de couplage dans un système THF-H₂O, sans recourir à des groupes protecteurs. Cette approche permet une réduction significative des temps de réaction, la réutilisation de l'HOBt lors des couplages itératifs et l'élimination des étapes intermédiaires de purification et de déprotection. Contrairement aux méthodes classiques ou à la synthèse en phase solide (SPPS), cette stratégie propose une construction séquentielle "de bout en bout", générant des précurseurs directement utilisables pour les étapes suivantes, tout en s'inscrivant dans une démarche plus simple, efficace et respectueuse de l'environnement¹⁷.

2. Synthèse du dipeptide Phth-Leu-Val-OH :

2.1. Protection de la fonction amine de la Leucine *Phth-N-Leucine*

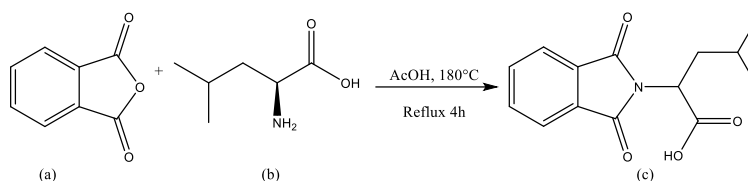


Figure 18 - Réaction de protection de l'amine par du phthalique anhydride

2.2. Couplage entre la *Phth-N-Leucine* et la *Phénylalanine*

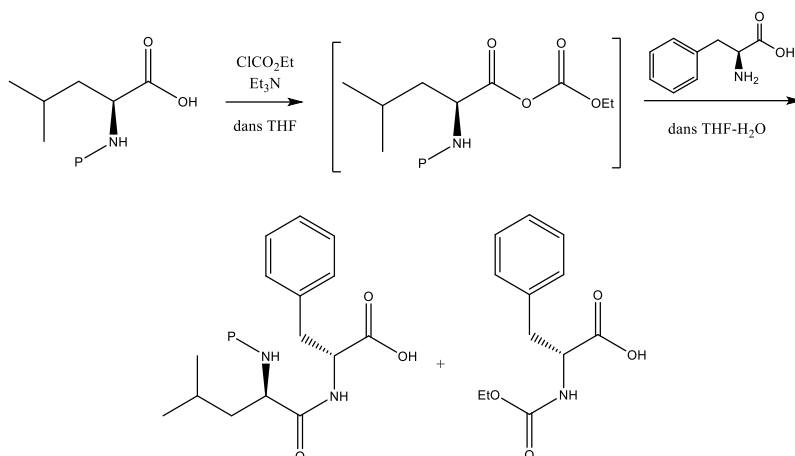


Figure 19 - Réaction de couplage *Phth-Leucine*/*Phénylalanine*

Des analyses Infrarouge ont été réalisées sur *Phth-Leu-OH* et *Phth-Leu-Phe-OH* dont les spectres non alignés sont ci-dessous :

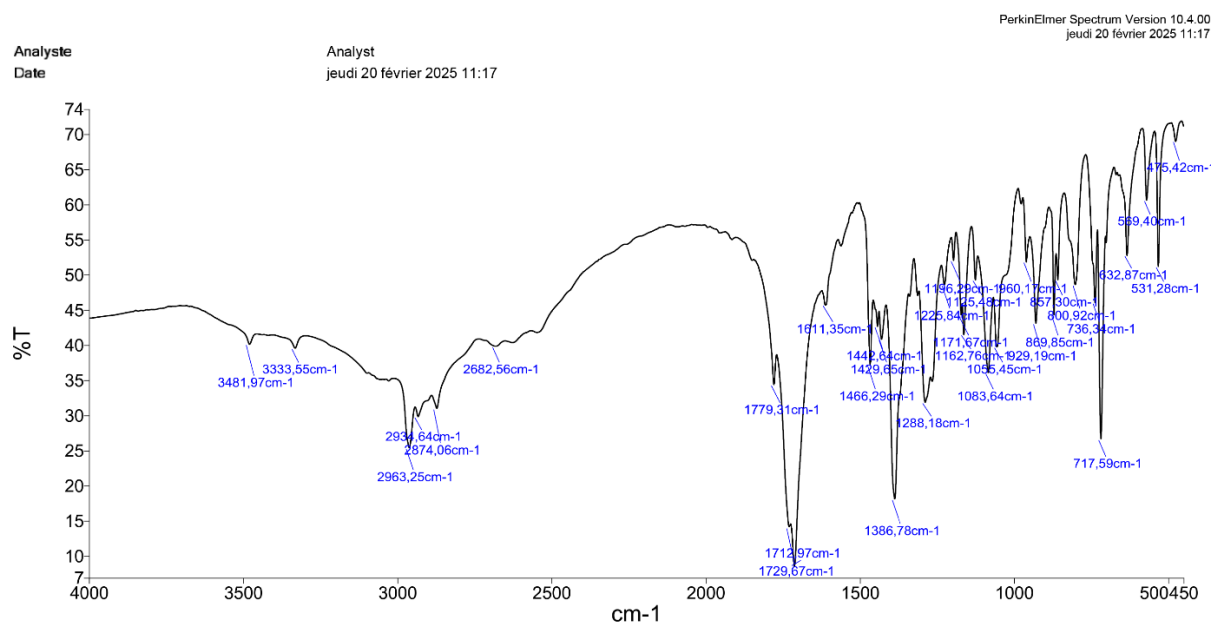


Figure 20 – Spectre IR du *Phth-Leucine*

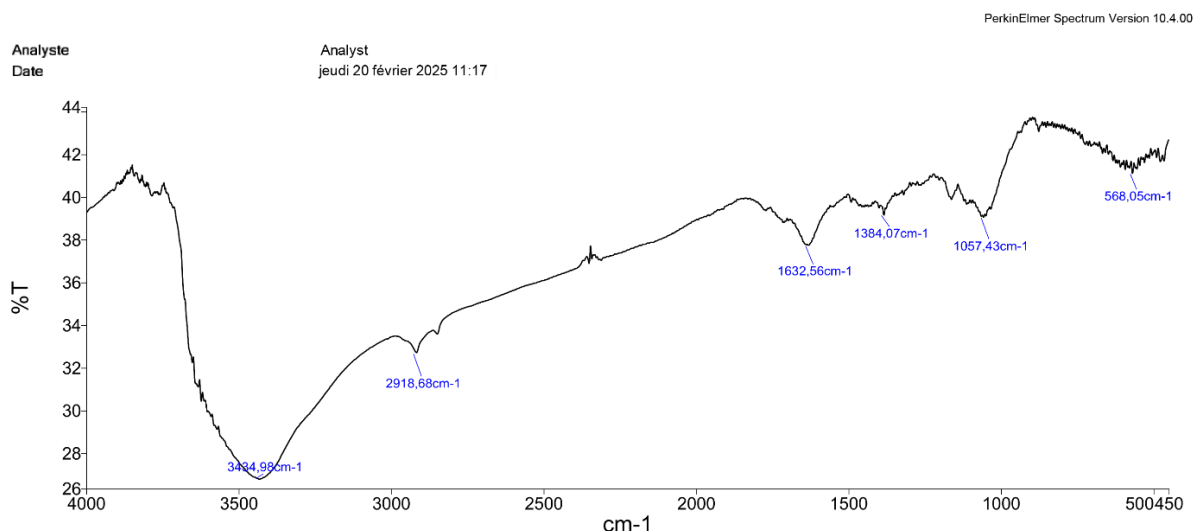


Figure 21 – Spectre IR du Phth-Leu-Phe-OH

Nous nous sommes arrêtés à ce niveau-là en exploitant cette méthode, pour la suite, on s'est orienté vers une deuxième approche plus pratique détaillée dans la partie suivante pour la synthèse des petits peptides comme le Boc-LVFF.

3. Synthèse du tétra-peptide Boc-Leu-Val-Phe-OH :

3.1. Synthèse du dipeptide Boc-Leu-Val-OH – Premier couplage :

La première étape de ce schéma réactionnel consiste à réaliser un couplage entre deux acides aminés où le premier est le Boc-Leucine, acide aminé commercialisé avec sa fonction amine protégée et prêt à l'utilisation, avec le deuxième qui est la Valine. Le rendement brut du dipeptide (en présence de HOBt) était de 76,92 %. La réaction a été suivie par CCM.

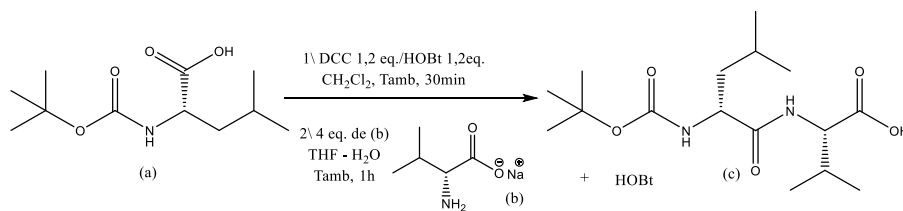


Figure 22 - Synthèse du dipeptide Boc-Leu-Val-OH – Premier couplage

3.2. Synthèse du tripeptide Boc-Leu-Val-Phe-OH – Deuxième couplage :

Après avoir entamé notre synthèse par une formation d'un dipeptide dont la fonction amine reste protégée, ce dernier est pris, dans une deuxième étape, comme réactif de départ avec la phenylalanine afin de former le tripeptide en gardant le HOBt dans le milieu réactionnel. Le rendement du tripeptide (en présence de HOBt) était de 32,22%. Réaction suivie par CCM.

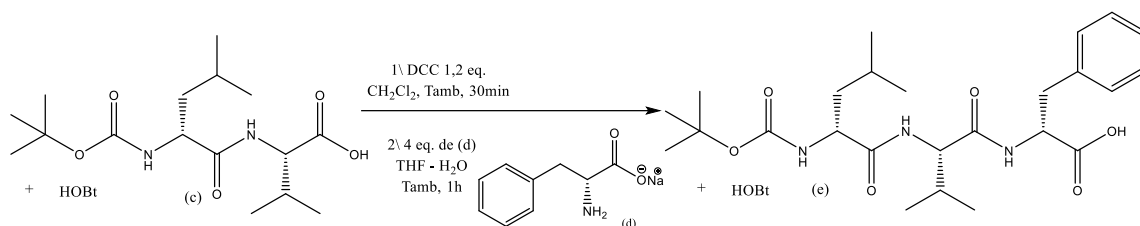


Figure 23- Synthèse du tripeptide Boc-Leu-Val-Phe-OH – Deuxième couplage

3.3. Synthèse du tetrapeptide Boc-Leu-Val-Phe-Phe-OH – Troisième couplage :

La troisième et dernière étape de synthèse du tetrapeptide en question consiste à prendre le tripeptide formé en deuxième étape dont la fonction amine est gardée protégée et en ayant le HOBt dans le milieu, avec de la phenylalanine. Le rendement du tétrapeptide (en présence de HOBt) était de 27%. Réaction suivie par CCM.

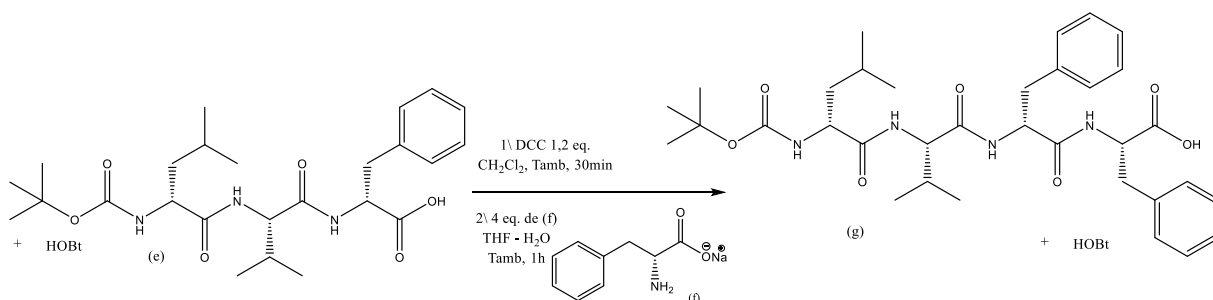
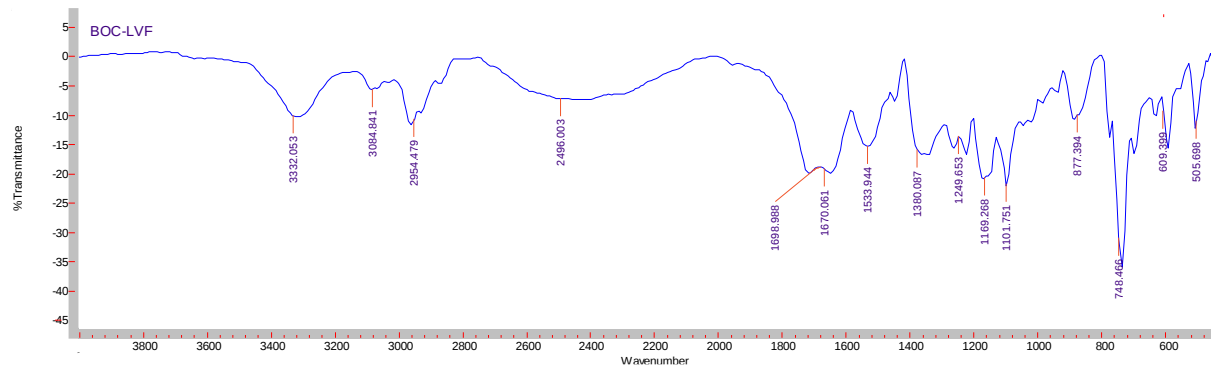
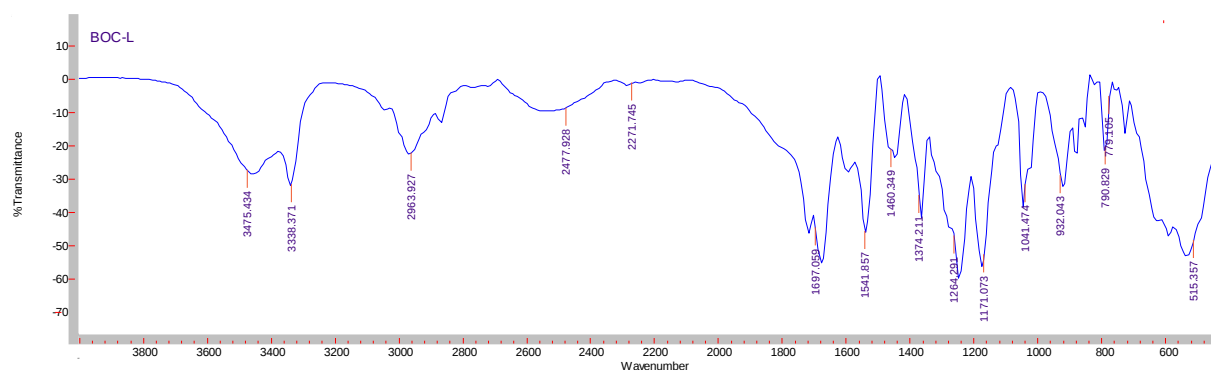
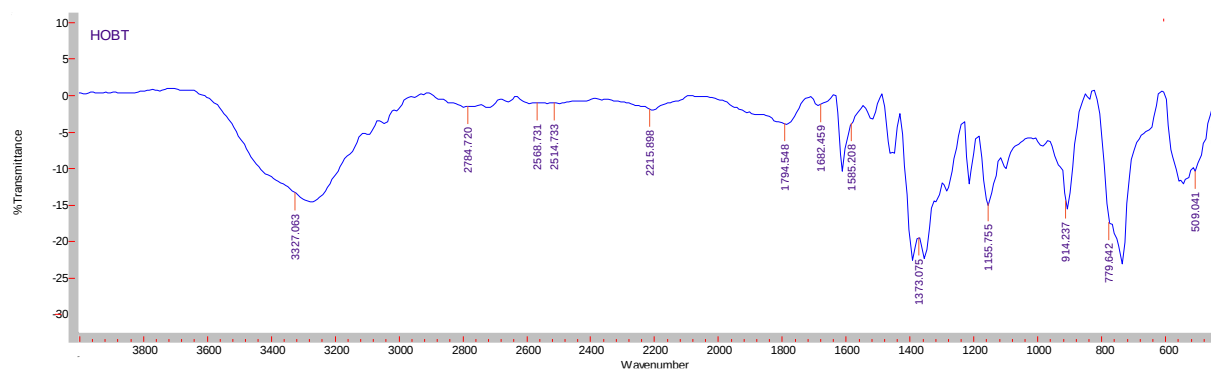


Figure 24 - Synthèse du tetrapeptide Boc-Leu-Val-Phe-Phe-OH – Troisième couplage

4. Résultats avant purification du Boc-LVFF

Une analyse IR a été menée pour toutes les réactions. Le suivi par CCM et la détermination du point de fusion n'est mentionné dans ce mémoire que pour le produit final purifié par chromatographie sur colonne.

Spectres IR :



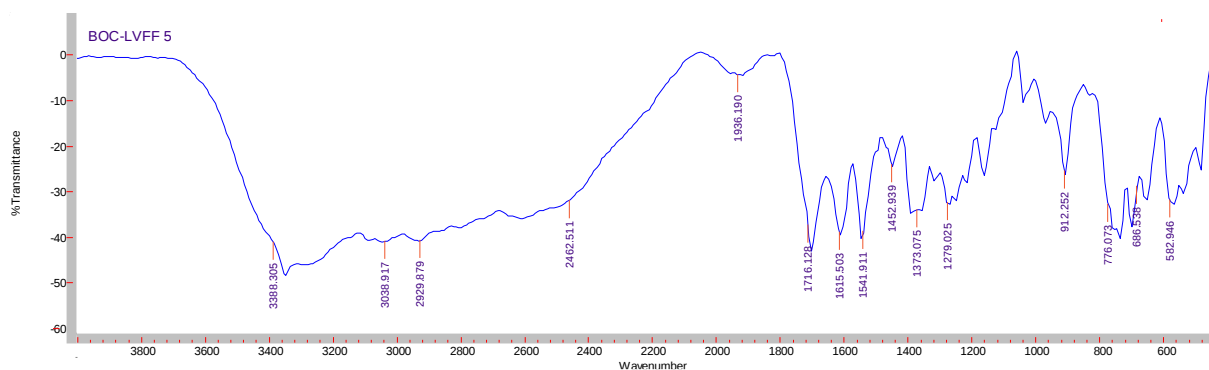


Figure 28 - Spectre IR Boc-LVFF sans purification

5. Purification par chromatographie sur colonne du Boc-LVFF :

Pour purifier le produit brut contenant le tétra-peptide Boc-LVFF et HOBt, une chromatographie sur colonne de silice est réalisée en utilisant comme éluant un mélange d'EtOAc/MeOH/AcOH (7:2:1). Le produit brut est d'abord dissous dans du MeOH pur, puis chargé sur une colonne pré-équilibrée avec l'éluant. L'élution est effectuée en collectant des fractions de 5–10 mL, suivies d'une analyse par CCM pour identifier les fractions contenant le peptide pur. Le HOBt, plus polaire, migre rapidement, tandis que le Boc-LVFF est récupéré dans les fractions ultérieures. Les fractions pures sont combinées et évaporées sous pression réduite pour éliminer les solvants. La pureté finale est vérifiée par CCM (ninhydrine). Le protocole permet ainsi d'isoler Boc-LVFF avec un bon rendement tout en éliminant les impuretés. Les manipulations sont effectuées sous hotte avec des équipements de protection.

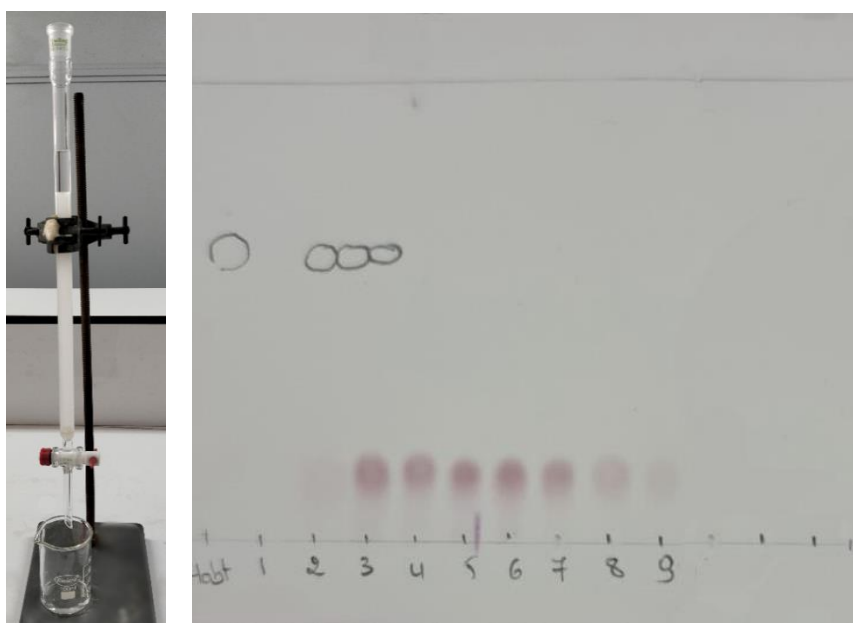


Figure 29 - Représentation de la chromatographie sur colonne réalisée et le suivi par CCM

6. Résultats après purification du Boc-LVFF

Détermination du point de fusion et résultat de la CCM :

Le point de fusion du produit final – Boc-LVFF – purifié a été déterminé expérimentalement à 164 °C, pour la CCM le rapport frontal était de 0,38 soit 2,1cm de la ligne de départ.



Figure 30 - Plaque CCM du Boc-LVFF après purification avec un $R_f = 0,38$

Spectres IR :

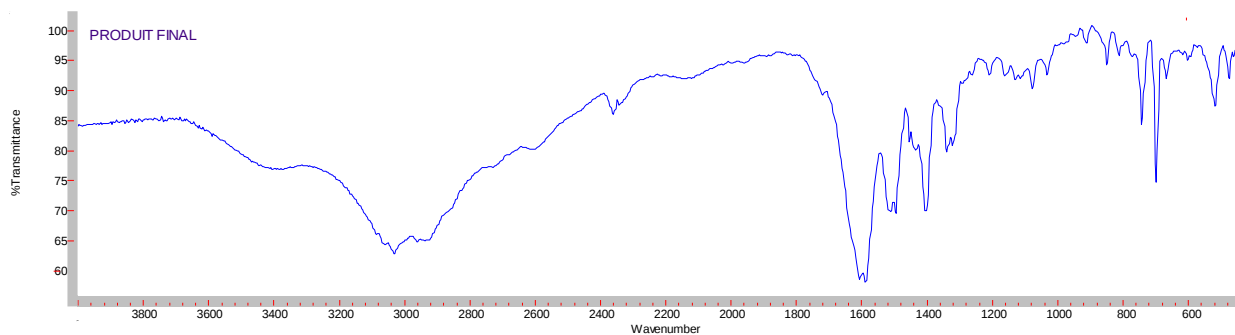


Figure 31 - Spectre IR non aligné du Boc-LVFF après purification

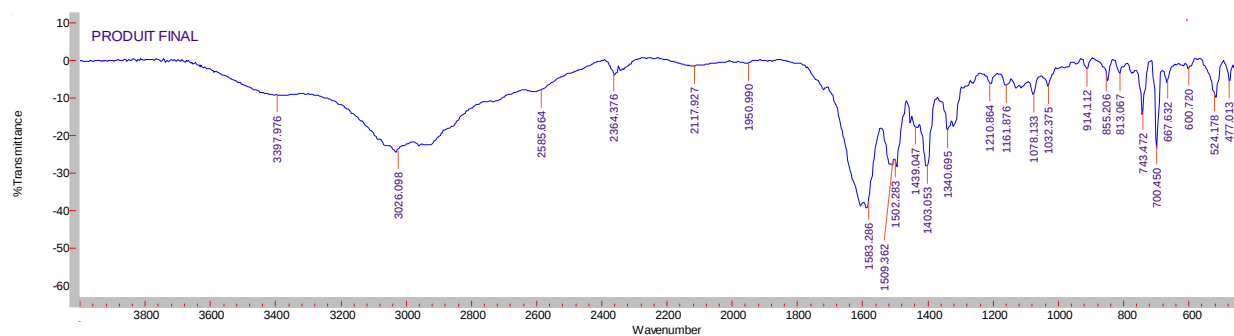


Figure 32 - Spectre IR aligné du Boc-LVFF après purification

7. Conclusion :

Bien qu'une éradication radicale de la maladie d'Alzheimer (MA) reste inaccessible à ce jour, l'étude des peptides β -amyloïdes ($A\beta$ -42) constitue une piste prometteuse, comme en témoignent les nombreuses publications scientifiques soulignant leur rôle clé dans le déclenchement de la maladie. Notre séquence cible, Boc-LVFF, représente un site peptidique de reconnaissance potentiel capable de bloquer l'agrégation fibrillaire en association avec des inhibiteurs. Cependant, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour valider son efficacité thérapeutique, notamment via des tests biologiques approfondis. Sur le plan synthétique, la méthode employée (couplage de bout en bout) offre des avantages significatifs par rapport aux approches classiques, notamment en termes de modularité. Une optimisation des rendements pourrait être envisagée via l'utilisation de réactifs alternatifs ou de techniques de purification améliorées.

8. Perspectives :

Ce travail constitue une des premières étapes vers le développement d'inhibiteurs peptidiques ciblant l'agrégation des β -amyloïdes ($A\beta$ -42) dans la maladie d'Alzheimer. Dans le cadre de futures recherches¹⁸, on pourra envisager une étude approfondie par modélisation moléculaire pour évaluer les interactions entre nos peptides (notamment Boc-LVFF) et les fibrilles amyloïdes. Cette approche permettra d'identifier les sites de reconnaissance critiques et d'optimiser la conception de nouveaux analogues. Par ailleurs, nous pourrions explorer des modifications structurales visant à améliorer à la fois l'affinité et la stabilité des inhibiteurs greffés à ce genre de sites de reconnaissance. Par exemple, introduction de groupes triazoliniques, pourrait renforcer l'activité anti-agrégante, tandis que le greffage de cyclodextrines fonctionnalisées pourrait faciliter le franchissement de la barrière hémato-encéphalique (BHE), un enjeu majeur pour les thérapies neuroactives. Enfin, une validation biologique systématique sera nécessaire pour confirmer l'efficacité des composés sélectionnés. Des tests *in vitro* et *in vivo* permettront d'évaluer leur capacité à inhiber l'agrégation d' $A\beta$ -42 et leur innocuité, ouvrant potentiellement la voie à des essais précliniques. Ces travaux pourraient aboutir à la conception d'une molécule thérapeutique multifonctionnelle, combinant haute spécificité et biodisponibilité¹⁹.

IV. PARTIE EXPERIMENTALE

A. Indications générales :

Au cours de notre travail, les manipulations ont été réalisées dans le laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA). Les analyses IR ont été réalisées au Laboratoire de Catalyse et Synthèse en Chimie Organique (LCSCO) de l'Université Aboubakr Belkaid-Tlemcen.

B. Matériel et méthodes :

1. Produits chimiques et solvants : Les réactifs et les solvants sont tous de marque Sigma-Aldrich. Ils ont été utilisés sans traitement spécifique, sauf précision.
2. Suivi et analyses :
 - a) Chromatographie : Chromatographie sur Couche Mince (CCM), réalisée sur des plaques de d'Aluminium recouvertes de gel de silice 60 F254, visualisées sous une lampe UV à 354nm et en chauffant les plaques trempées dans une solution éthanolique de ninhydrine à 2 % comme révélateur. Les éluants utilisés sont des mélanges de solvants ; EtOAc :MeOH :AcOH (7 :2 :1). Une chromatographie sur colonne a été développée en utilisant du gel de silice (70-230) avec le même éluant de la CCM afin de purifier notre peptide de l'HOBt.
 - b) Infra rouge et points de fusion : Les analyses dans l'infrarouge (IR) ont été effectuées au LCSCO à l'aide du spectrophotomètre IR de marque *Agilent Technologies* (Varian 640-IR FT-IR). Les échantillons étaient traités sous forme de pastilles de KBr. Les principales fréquences d'absorption sont données en nombre d'onde (cm⁻¹). Les points de fusion sont déterminés par un *BANC KOFLER* au laboratoire (COSNA).

C. Etapes de Synthèse peptidique :

1. Synthèse du Boc-Leu-Val-OH par couplage Boc-Leucine/Valine :

1.1. Activation du Boc-Leucine (Récipient A) :

Dissoudre N-Boc-Leucine (1,0 g ; 4,323 mmol), DCC (1,0705 g ; 5,188 mmol, 1,2 éq) et HOBt (0,7010 g ; 5,188 mmol, 1,2 éq) dans DCM (30 mL). Le tout est mis sous agitation à température ambiante (T.A.) pendant 30 min. Évaporer le DCM sous pression réduite et dissoudre le résidu dans THF anhydre (50 mL).

1.2. Préparation de la Valine en milieu basique (Récipient B) :

Dissoudre Val-OH (2,0260 g ; 17,29 mmol, 4 éq) dans THF (30 mL). Ajouter NaOH 1N (18,6 mL,) et agiter 5 min à T.A.

1.3. Couplage peptidique :

Ajouter lentement (sur 5 min) la solution B dans le récipient A sous agitation à T.A. Agiter 1h, puis filtrer pour éliminer le DCU (précipité). Transférer le filtrat dans une ampoule à décanter et extraire la phase aqueuse avec EtOAc (2 × 50 mL).

Acidifier la phase aqueuse à pH = 3 avec HCl 1N, puis extraire à nouveau avec EtOAc (3 × 50 mL). Combiner les phases organiques, laver avec une solution saturée de NaCl (3 × 50 mL), sécher sur Na₂SO₄ anhydre, filtrer et évaporer sous vide.

Produit brut : Dipeptide **Boc-Leu-Val-OH** contenant des traces de HOBt.

Formule brute : C₁₆H₃₀N₂O₅ correspondant à une **Masse molaire théorique** : 330,42 g/mol.

Masse théorique = 1,43g, **Masse expérimentale** = 1,1g **Rendement** : 76,92%

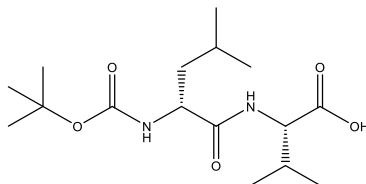


Figure 33 - Boc-Leu-Val-OH synthétisé par couplage Boc-Leucine/Valine

2. Synthèse du Boc-Leu-Val-Phe-OH par couplage Boc-Leu-Valine/Phénylalanine :

2.1. Activation du Boc-Leu-Valine (Récipient A) :

Dissoudre N-Boc-Leu-Val-OH (1,1 g ; 3,33 mmol), DCC (0,8245 g ; 3.996mmol, 1,2 éq) et HOBt restant de la réaction précédente dans DCM (30 mL). Agiter à température ambiante (T.A.) pendant 30 min. Évaporer le DCM sous pression réduite et dissoudre le résidu dans THF anhydre (50 mL).

2.2. Préparation de la Phénylalanine en milieu basique (Récipient B) :

Dissoudre Phe-OH (2,2003g ; 13,32 mmol, 4 éq) dans THF (30 mL). Ajouter NaOH 1N (15,8 ml) et agiter 5 min à T.A.

2.3. Couplage peptidique :

Ajouter lentement (sur 5 min) la solution B dans le récipient A sous agitation à T.A. Agiter 1h, puis filtrer pour éliminer le DCU (précipité). Transférer le filtrat dans une ampoule à décanter et extraire la phase aqueuse avec EtOAc (2 × 50 mL).

Acidifier la phase aqueuse à pH = 3 avec HCl 1N, puis extraire à nouveau avec EtOAc (3 × 50 mL). Combiner les phases organiques, laver avec une solution saturée de NaCl (3 × 50 mL), sécher sur Na₂SO₄ anhydre, filtrer et évaporer sous vide.

Produit brut : Tripeptide **Boc-Leu-Val-Phe-OH** contenant des traces de HOBt.

Formule brute : C₂₅H₃₉N₃O₆ correspondant à une **Masse molaire théorique** : 475,6 g/mol.

Masse théorique = 1,583g, **Masse expérimentale** = 0,51g **Rendement** : 32,22%

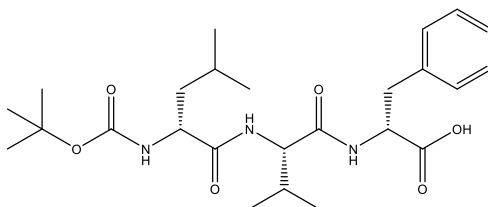


Figure 34 - Boc-Leu-Val-Phe-OH synthétisé par couplage Boc-Leu-Valine/Phénylalanine

3. Synthèse du Boc-Leu-Val-Phe-Phe-OH par couplage Boc-Leu-Val-Phénylalanine/Phénylalanine :

3.1. Activation du Boc-Leu-Valine-Phénylalanine (Récipient A) :

Dissoudre N-Boc-Leu-Val-Phe-OH (0,51 g ; 1,0723 mmol), DCC (0,265 g ; 1,2876 mmol, 1,2 éq) et HOBt restant de la réaction précédente dans DCM (30 mL). Agiter à température ambiante (T.A.) pendant 30 min. Évaporer le DCM sous pression réduite et dissoudre le résidu dans THF anhydre (50 mL).

3.2. Préparation de la Phénylalanine en milieu basique (Récipient B) :

Dissoudre Phe-OH (0,7085 g ; 4,2892 mmol, 4 éq) dans THF (30 mL). Ajouter NaOH 1N (7,1 mL,) et agiter 5 min à T.A.

3.3. Couplage peptidique :

Ajouter lentement (sur 5 min) la solution B dans le récipient A sous agitation à T.A. Agiter 1h, puis filtrer pour éliminer le DCU (précipité). Transférer le filtrat dans une ampoule à décanter et extraire la phase aqueuse avec EtOAc (2 × 50 mL).

Acidifier la phase aqueuse à pH = 3 avec HCl 1N, puis extraire à nouveau avec EtOAc (3 × 50 mL). Combiner les phases organiques, laver avec une solution saturée de NaCl (3 × 50 mL), sécher sur Na₂SO₄ anhydre, filtrer et évaporer sous vide.

Produit brut : Tetrapeptide **Boc-Leu-Val-Phe-Phe-OH** contenant des traces de HOBt.

Formule brute : C₃₄H₄₈N₄O₇ correspondant à une **Masse molaire théorique** : 624,764 g/mol.

Masse théorique = 0,669g, **Masse expérimentale** = 0,18g, **Rendement** = 27 %

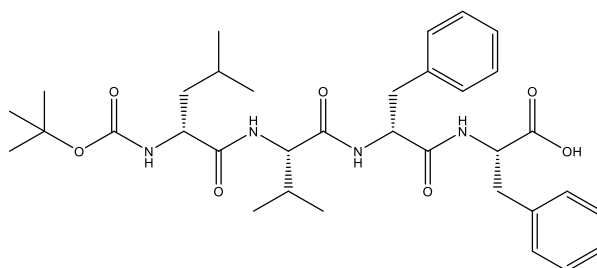
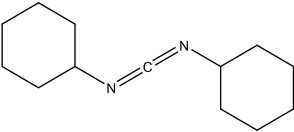
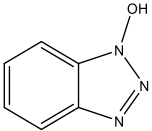
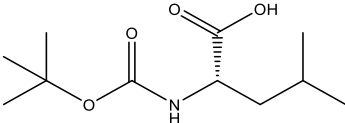
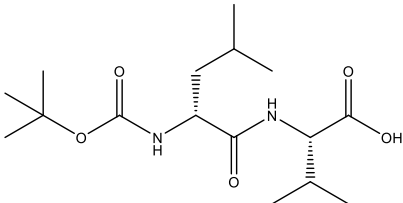
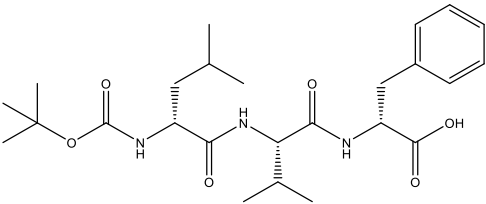
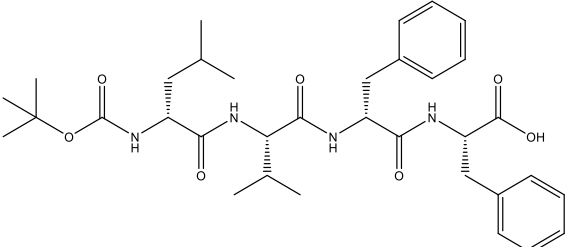


Figure 35- Boc-Leu-Val-Phe-Phe-OH synthétisé par couplage Boc-Leu-Val-Phénylalanine/Phénylalanine

Tableau 2 - récapitulant les réactifs utilisés, produits synthétisés et résultats obtenus

Espèce N°	Aspect	Structure
1 : DCC	Solide cristallin Blanc	
2 : HOBT	Solide cristallin Blanc	
3 : Boc-L	Solide cristallin Blanc	
4 : Boc-LV	Solide amorphe crème	
5 : Boc-LVF	Solide jaune pale	
6 : Boc-LVFF	Solide beige clair	

Espèce N°	MM (g.mol⁻¹)	R (%)	Pf (°C)	Rf	IR (cm⁻¹) Bandes caractéristiques
1 : DCC	206,33	-	35	0,84	2110 (C=N, carbodiimide), 1640 (C=O)
2 : HOBt	135,12	-	156	0,7	3200-2500 (OH-large), 1610 (C=N, triazole)
3 : Boc-L	231,29	-	86	0,58	1720 (C=O ester Boc), 1690 (C=O acide)
4 : Boc-LV	330,42	76,92	122	0,48	3320 (NH amide), 1710 (C=O Boc), 1640 (C=O amide)
5 : Boc-LVFF	475,6	32,22	146	0,44	3300 (NH), 1720 (Boc), 1650 (amide I), 1530 (amide II)
6 : Boc-LVFF	624,764	27	Décomposition avant fusion 164	0,38	3300 (NH), 1715 (Boc), 1650 (amide I), 1510 (amide II)

Références bibliographiques :

1. Alzheimer, A., Stelzmann, R. A., Schnitzlein, H. N., & Murtagh, F. R. (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clinical anatomy* (New York, NY), 8(6), 429-431.
2. Alzheimer's Association. (2016). 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 12(4), 459-509.
3. Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054), 184-185.
4. Fonseca, A. C. R., Resende, R., Cardoso, S. M., & Pereira, C. F. (2015). The role of proteotoxic stress in vascular dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Cell Pathology*, 2(1), 67-81.
5. Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological reviews*.
6. Haass, C., & Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(2), 101-112.
7. Serpell, L. C., Blake, C. C., & Fraser, P. E. (2000). Molecular structure of a fibrillar Alzheimer's A β fragment. *Biochemistry*, 39(43), 13269-13275.
8. Rymer, S. J., Tendler, S. J., Bosquillon, C., Washington, C., & Roberts, C. J. (2011). Self-assembling peptides and their potential applications in biomedicine. *Therapeutic delivery*, 2(8), 1043-1056.
9. Ahmed, M., Davis, J., Aucoin, D., Sato, T., Ahuja, S., Aimoto, S., ... & Smith, S. O. (2010). Structural conversion of neurotoxic amyloid- β 1-42 oligomers to fibrils. *Nature structural & molecular biology*, 17(5), 561-567.
10. Gorantla, N. V., Sunny, L. P., Rajasekhar, K., Nagaraju, P. G., Cg, P. P., Govindaraju, T., & Chinnathambi, S. (2021). Amyloid- β -derived peptidomimetics inhibits tau aggregation. *ACS omega*, 6(17), 11131-11138.
11. Tjernberg, L. O., Näslund, J., Lindqvist, F., Johansson, J., Karlström, A. R., Thyberg, J., ... & Nordstedt, C. (1996). Arrest of Amyloid Fibril Formation by a Pentapeptide Ligand (*). *Journal of Biological Chemistry*, 271(15), 8545-8548.
12. Homsí, A., & Kasideh, A. (2015). Synthesis of some N-phthalimide amino acids derivatives and Evaluation their Biological Activity. *Synthesis (Stuttg)*, 8, 1817-1825.
13. Valeur, E., & Bradley, M. (2009). Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Reviews*, 38(2), 606-631.
14. Isidro-Llobet, A., Alvarez, M., & Albericio, F. (2009). Amino acid-protecting groups. *Chemical reviews*, 109(6), 2455-2504.
15. Mattellone, A., Corbisiero, D., Cantelmi, P., Martelli, G., Palladino, C., Tolomelli, A., ... & Ferrazzano, L. (2023). Fast solution-phase and liquid-phase peptide syntheses (SolPSS and LPPS) mediated by biomimetic cyclic propylphosphonic anhydride (T3P®). *Molecules*, 28(20), 7183.
16. Amblard, M., Fehrentz, J. A., Martinez, J., & Subra, G. (2006). Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Molecular biotechnology*, 33, 239-254.
17. Karina Herrera-Guzmán, Miguel Ángel Jaime-Vasconcelos, Eréndira Torales, Itzel Chacón, Rubén Gaviño, Eréndira García-Ríos, Jorge Cárdenas and José A. Morales-Serna (2024). A practical method for the synthesis of small peptides using DCC and HOBt as activators in H₂O–THF while avoiding the use of protecting groups.
18. Zhang, C., Browne, A., Child, D., & Tanzi, R. E. (2010). Curcumin decreases amyloid- β peptide levels by attenuating the maturation of amyloid- β precursor protein. *Journal of Biological Chemistry*, 285(37), 28472-28480.
19. Torchilin, V. P. (2006). Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(14), 1532-1555.

ANNEXE

LISTE DES ABREVIATIONS

A β	Amyloïde bêta
A β -42	Peptide amyloïde bêta de 42 acides aminés
Ala	Alanine
Asp	Acide aspartique
BHE	Barrière hémato-encéphalique
Boc	tert-Butyloxycarbonyle
CCM	Chromatographie sur couche mince
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DCU	Dicyclohexylurée
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyle
Gln	Glutamine
Gly	Glycine
His	Histidine
HOBt	Hydroxybenzotriazole
Ile	Isoleucine
IR	Infrarouge
KLVFF	Lys-Leu-Val-Phe-Phe
Leu	Leucine
LPSS	Liquid-Phase Peptide Synthesis
Lys	Lysine
MA	Maladie d'Alzheimer
Met	Méthionine
pH	Potentiel d'hydrogène
Phe	Phénylalanine
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SPSS	Solid-Phase Peptide Synthesis
THF	Tétrahydrofurane
Val	Valine