REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCEN

MEMOIRE

Présenté à :

FACULTE DES SCIENCES _ DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de:

MASTER EN CHIMIE

Spécialité: Chimie Pharmaceutique

Par: Mr. **Hassaîne Bachir Ziyed**

Sur le thème

Tentative de Synthèse de Dimères Peptidiques pour Evaluation comme modulateur potentiel de la Gamma-Sécrétase

---

Soutenu via Teams le 30/10/2021 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mr. BENSAID Okkacha	Professeur	Université de Tlemcen	Président
Mme. DRICI Wassila	Professeur	Université de Tlemcen	Examinatrice
Mr. ZIANI-CHERIF Chewki	Professeur	Université de Tlemcen	Encadrant

Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses

COSNA

Remerciements

J’aimerais tout d’abord exprimer toute ma gratitude à mon directeur de mémoire, le professeur Ziani-Cherif Chewki qui m’a guidé et conseillé du mieux qui soit. Un grand merci.

Je souhaiterais aussi rendre hommage au professeur Merad Meriem qui allait être mon examinatrice, et qui nous a quitté. Qu’Allah l’accueille dans son vaste paradis.

Un remerciement au directeur de laboratoire COSNA, monsieur Djabou Nassim. Toute ma reconnaissance également au docteur Keniche Assia pour sa gentillesse et sa bienveillance.

Je remercie par ailleurs mes camarades de paillasse qui se reconnaîtront, amenant leur bonne humeur et leurs avis pertinents.

Et enfin j’exprime toute ma gratitude au Professeur Drici Wassila et Professeur Bensaid Okkacha pour avoir accepté de juger ce modeste travail.

Table des matières

A) Partie Théorique 6

Introduction 6

Facteurs de risque 6

Prévention possible 6

Marques histopathologiques 7

Les dégénérescences neurofibrillaires 7

Les plaques amyloîdes 8

Complexe Gamma-secrétase 9

Voie non-amyloîdogénique 10

Voie amyloîdogénique 10

Objectif 11

Rétrosynthèse 12

B/ Chapitre 2 13

Premier protocole 15

Deuxième protocole 18

Changement de réactifs 19

Protocole 21

Conclusion 23

C/ Partie experimentale 25

Conclusion générale 27

Références bibliographiques 28

Abstract

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease. The neuropathological hallmarks include amyloid plaques and neurofibrillary tangles. The Gamma secretase enzyme plays a major role in the emergence of those hallmarks. We try to synthesize a modulator of the Gamma Secretase complex as remedy to the current issue.

Résumé

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative incurable à ce jour du tissu cérébral. Elle se caractérise des autres maladies de démence par les dégénérescences neurofibrillaires ainsi que la présence de plaques amyloïdes. L'enzyme gamma secrétase joue un rôle important dans ce processus. Afin d'enrayer ce mécanisme biologique, on propose de synthétiser un modulateur de la gamma secrétase.

نبذة مختصرة

داء الزهايمر هو ضمور في خلايا المخ السليمة مما يؤدي إلى تراجع مستمر في الذاكرة وفي القدرات العقلية والذهنية. يتميز بمؤشرين هما لويحات أميلويد والحبيكات العصبية الليفية. تلعب دورًا حاسمًا في بروز المؤشرين.

نقترح تركيب مغيرلانزيم **γ-secretase** لحل هذه الإشكالية.

CHAPITRE 1

Partie théorique

Introduction

La maladie d'Alzheimer est une pathologie neurodégénérative qui fut décrite pour la première fois en 1906 par Alois Alzheimer, un neurologue et psychiatre allemand. Cette maladie est la première cause de démence chez les personnes âgées.

La maladie d'Alzheimer est très invalidante puisqu'elle se caractérise par de nombreux changements relatifs aux fonctions cérébrales (troubles importants de la mémoire, inattention, désorientation, altération de la personnalité, difficultés d'élocution et de compréhension). Il s'agit d'une maladie évolutive, irréversible et pour le moment incurable. Les premières années de la maladie sont asymptomatiques. Son incidence augmente fortement avec l'âge, qui reste le principal facteur de risque.

Cependant, on distingue deux formes de maladie d'Alzheimer, la plus fréquente est une forme sporadique mais environ 1% des malades présentent des cas génétiques, pour lesquels l'apparition des symptômes est plus précoce et l'évolution beaucoup plus rapide.

Facteurs de risque

La maladie d'Alzheimer semble être une pathologie multifactorielle complexe, pour laquelle la prédisposition génétique (1% des malades) et les facteurs environnementaux entrent en interaction.

Des facteurs génétiques favorisent plus ou moins l'apparition de la maladie d'Alzheimer. Il existe d'une part des facteurs génétiques qui augmentent la susceptibilité d'une personne vis-à-vis de la maladie d'Alzheimer, et d'autre part des formes familiales héréditaires rares qui se caractérisent notamment par une survenue à un âge plus précoce.

Le facteur de risque génétique le plus connu implique le gène (situé sur le chromosome 19) de l'Apolipoprotéine E (APOE), une protéine qui intervient dans le transport du cholestérol. Concernant les facteurs environnementaux, ils englobent classiquement les facteurs sociodémographiques comme l'âge, le niveau d'étude (qui renvoie à la notion de réserve cognitive), les facteurs liés au mode de vie comme la pratique d'activité physique, les habitudes alimentaires, la consommation de tabac, d'alcool mais également certains facteurs biologiques liés au mode de vie et modifiables au cours du temps tels que l'hypertension, la dyslipidémie ou le diabète.

Prévention possible

Les facteurs environnementaux sont évitables en adoptant une bonne hygiène de vie : alimentation équilibrée, activité physique, réduction du tabagisme. Les connaissances actuelles orientent vers une prévention de la maladie d'Alzheimer par le contrôle des troubles cardiovasculaires et leurs facteurs de risque (hypertension, diabète, tabagisme).

Marques histologiques

Sur le plan histologique, les premières structures cérébrales touchées sont le cortex entorhinal, l'hippocampe et le noyau basal de Meynert. Ces structures appartiennent au système cholinergique et sont impliquées notamment dans la mémorisation à court terme et la perception émotionnelle.

Le diagnostic de maladie d'Alzheimer avérée nécessite à la fois une composante clinique et une composante histologique. Les cerveaux de patients atteints présentent deux marques histopathologiques : des dégénérescences neurofibrillaires et des plaques séniles.

Les dégénérescences neurofibrillaires

Les dégénérescences neurofibrillaires ou DNF, représentées sur la figure 1, sont des lésions intracellulaires constituées par l'appariement en hélices de filaments protéiques.

Le composant principal de ces filaments hélicoïdaux est une protéine anormalement hyperphosphorylée, la protéine Tau [1].

Cette protéine est impliquée, en conditions physiologiques, dans le transport axonal en stabilisant les microtubules. Les états de phosphorylation de la protéine Tau définissent un équilibre dynamique. Une hyper-phosphorylation, en conditions pathologiques, induit non seulement son détachement des microtubules mais également son accumulation sous une forme métaboliquement plus stable et qui s'agrège en paires hélicoïdales de filaments. Le transport axonal de vésicules ou de protéines cargo est alors perturbé.

La contribution de la protéine Tau dans les dysfonctionnements synaptiques et la neurodégénérescence font l'objet de nombreuses études. La présence de la protéine Tau anormale, c'est-à-dire agrégée, épissée, phosphorylée ou encore catabolisée, n'est pas spécifique à la maladie d'Alzheimer et touche d'autres démences telles que les démences fronto-temporales et les syndromes parkinsoniens.

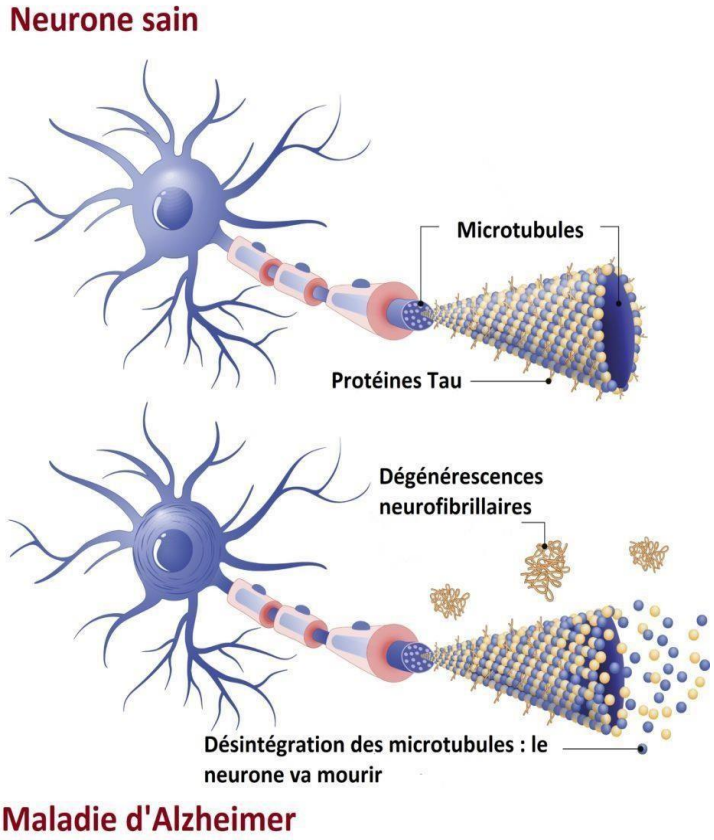


Figure 1 : modification de la protéine tau qui entraîne la dégradation des microtubules dans les neurones

Les plaques amyloïdes

Les plaques séniles ou amyloïdes (Figure 2) sont des agrégats extracellulaires dont le constituant majeur est un petit peptide (4kDa) de 38 à 48 acides aminés, le peptide amyloïde ou Aβ [2].

Les plaques amyloïdes sont des marqueurs du vieillissement cérébral normal, toutefois, on les retrouve chez les patients sains à des taux beaucoup plus faibles que ceux retrouvés dans des cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer. Les dépôts amyloïdes évoluent tant sur le plan morphologique que structural. On distingue deux types de dépôts cérébraux, des dépôts amyloïdes dits « diffus » et des dépôts plus denses, les plaques séniles. Les dépôts diffus, volumineux et morphologiquement mal délimités, sont constitués par le peptide amyloïde Aβ42 sous une forme non agrégée.

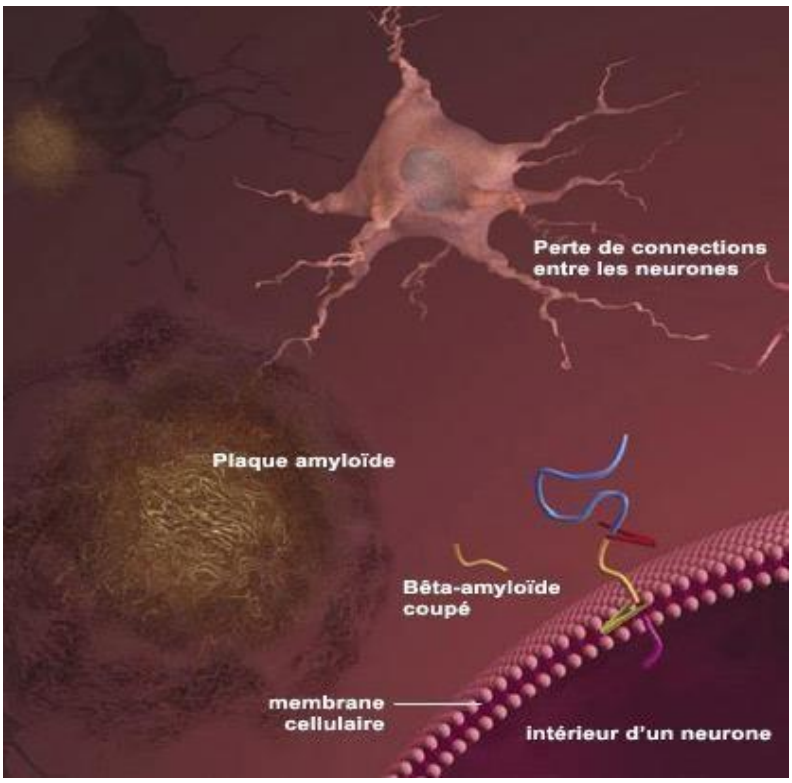


Figure 2 : Dépôt de la β-amyloïde qui s'agglutine et forme la plaque amyloïde

Les plaques séniles sont constituées majoritairement d'un agrégat d'un peptide qui comporte un minimum de 42 acides aminés, le peptide amyloïde. Ce dernier est formé suite au clivage d'un précurseur transmembranaire, la βAPP, par deux activités enzymatiques distinctes mais successives, nommées β- et γ- secrétases.

Complexe Gamma-secrétase

L'activité γ-secrétase est portée par un complexe macromoléculaire composé de quatre entités protéiques, la préséniline (PS1 ou PS2), la nicastrine, une isoforme d'Aph-1 (Aph-1aS, Aph-1aL ou Aph-1b) et la protéine Pen-2 (Figure 3). L'absence de l'une ou l'autre de ces quatre protéines induit une inhibition significative de l'activité γ-secrétase [5]. Ce complexe n'est pas seulement responsable de la production du peptide amyloïde, mais intervient également dans le clivage de nombreuses protéines transmembranaires de type I impliquées dans divers processus physiologiques, dont la protéine Notch I. De ce fait, le maintien de l'activité de la γ-secrétase est vital au bon fonctionnement neuronal.

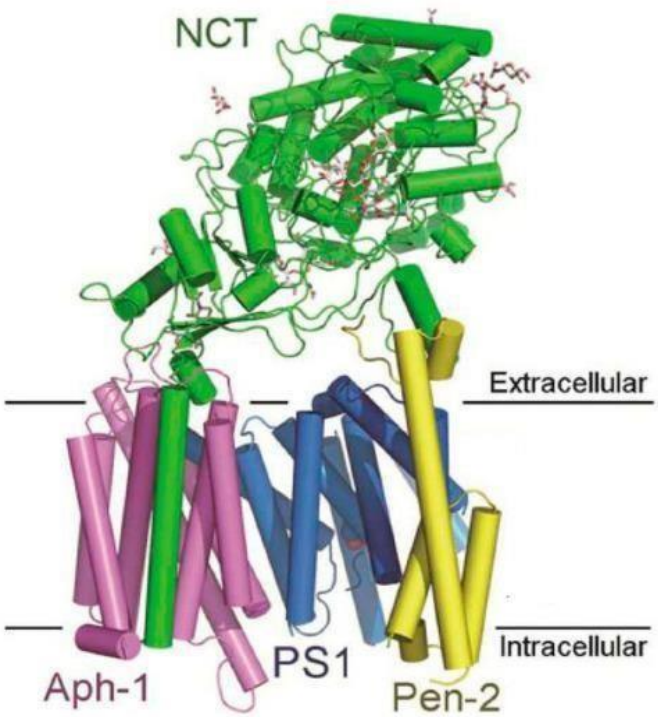


Figure 3 : Représentation topographique de la gamma-sécrétase

La voie non amyloïdogène :

La voie non-amyloidogénique est la voie normale, retrouvée dans les sujets sains. Dans cette voie, le clivage de la βAPP se fait dans un premier temps par une activité enzymatique nommée α-secrétase, au milieu de la séquence du peptide amyloïde βAPP.

Il en résulte un fragment soluble, le sAPPα, aux propriétés neurotrophiques, et un fragment intramembranaire, le C83 qui sera ensuite soumis à un second clivage par la γ-secrétase [4].

La voie amyloïdogène :

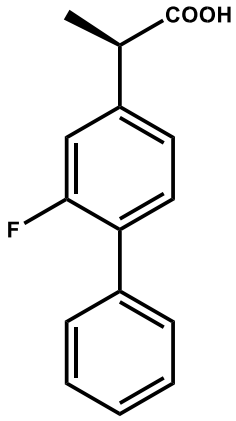
Le peptide amyloïde est engendré par un clivage alternatif de la βAPP par deux activités enzymatiques distinctes, la β-secrétase et la γ-secrétase [5a] (il est important à ce stade de reconnaitre que la α-secrétase est exclus de toute activité pour des raisons qui restent inconnues). Ce peptide est retrouvé majoritairement sous sa forme de 40 acides aminés (Aβ40) mais 5 à 15% de la quantité totale de peptide amyloïde produit, est un peptide contenant deux acides aminés supplémentaires (Aβ42). D'autre part, des formes plus longues ou plus courtes sont produites mais en plus faibles quantités. Les peptides Aβ40 et Aβ42 ne se différencient que par deux acides aminés qui ont pourtant la capacité de modifier de manière décisive les capacités agrégantes et neurotoxiques de ce peptide [5b].

Parmi les diverses approches thérapeutiques suggérées, la modulation de la gamma-sécrétase représente une approche raisonnable. En effet, si l'on arrive à moduler correctement cette enzyme, on arrivera à inhiber la formation des Aβ42, et donc des plaques amyloides. Cela représenterait un avancement significatif dans la lutte perpétuelle contre cette maladie. Cependant, et comme mentionné plus haut, il est

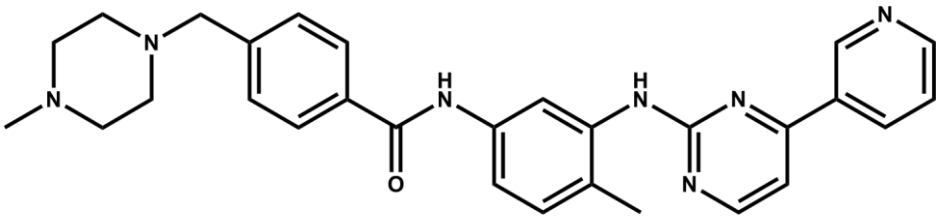
important de souligner qu'il s'agit de moduler l'enzyme, et non pas l'inhiber totalement car elle cette enzyme est vitale dans d'autres processus biologiques.

Exemples de modulateurs de la gamma secrétase :

Quelques modulateurs synthétisés sont le Flurizan et le Gleevec.



Acide (*R*)-2-(2-fluoro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)propanoique (Flurizan)



***N*-(4-methyl-3-((4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)-4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)benzamide (Gleevec)**

Objectif du travail:

Le travail décrit ici représente un effort parmi tant d'autres afin d'identifier un modulateur convenable. Selon les diverses études déjà décrites dans la littérature, un modulateur adéquat devrait être un peptide qui devrait se greffer sur la partie Nicastrine (NCT) de la gamma-sécrétase (Figure 3). Nous avons donc opté pour la synthèse d'un dimère peptidique. La rétrosynthèse générale conçue est représentée en Figure 4.

Ainsi, on peut utiliser divers acides aminés. On peut aussi varier la longueur n de la chaine.

Rétrosynthèse

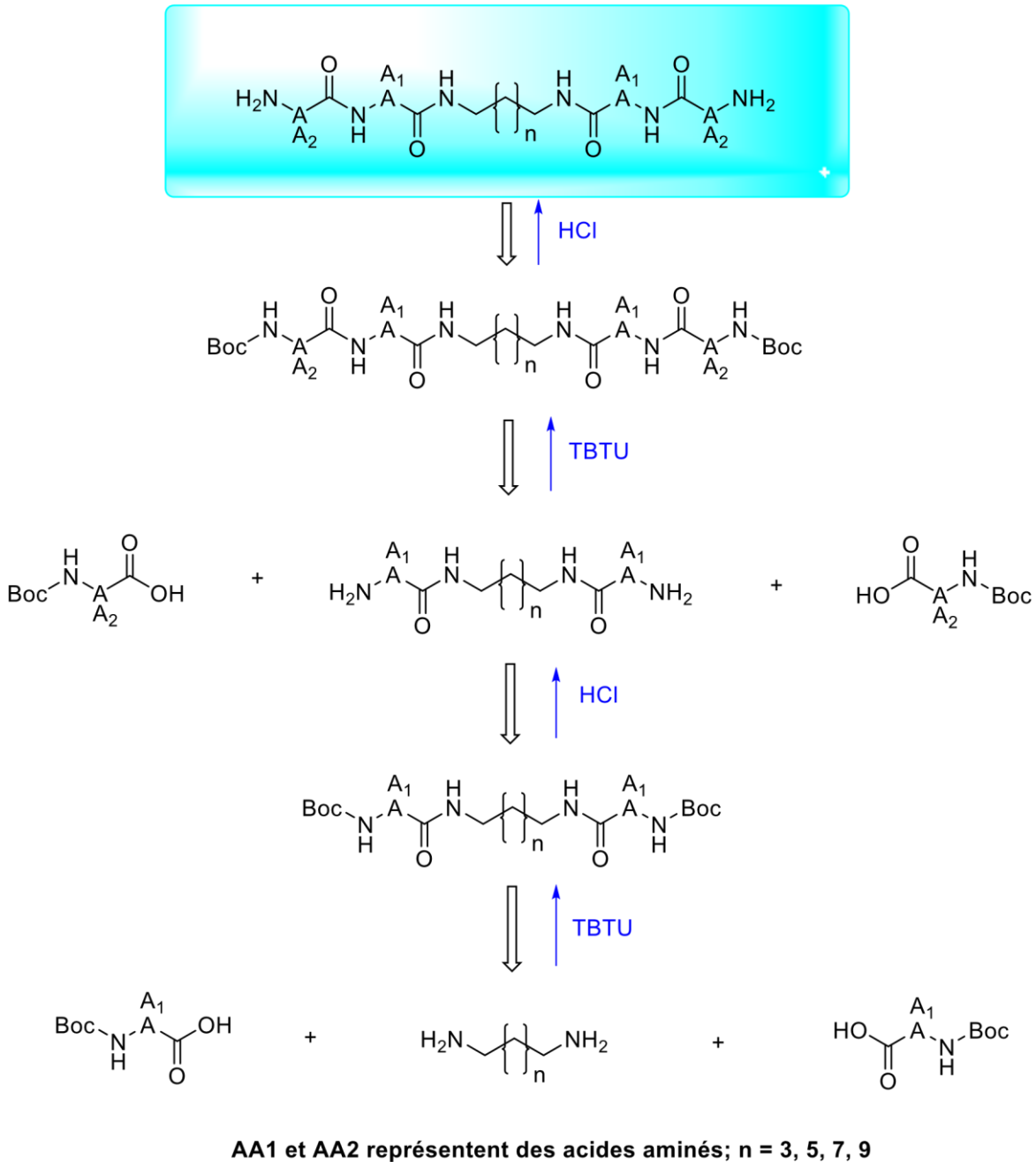


Figure 4 : rétro-synthèse conçue

CHAPITRE 2

Résultats et Discussion

Notre plan de travail consiste à faire réagir une diamine de longueur définie n avec deux équivalents d'un acide aminé AA1; cet acide aminé a la caractéristique d'avoir la partie de l'amine protégée par un groupement protecteur Boc. La raison à cela est que l'on veut éviter une éventuelle réaction intramoléculaire de la partie amine qui viendrait attaquer le carbone de l'acide carboxylique. La protection est donc une étape essentielle dans ce que l'on voudrait faire.

On utilise l'agent de couplage TBTU qui est un activateur de groupement carbonyle. Il facilite l'attaque de l'amine de la diamine sur le carbonyle de la fonction carboxylique de AA1 avec un rendement élevé.

Après cela, on effectue une déprotection de la fonction amine avec HCl dans le Méthanol.

En suivant le même principe, la fonction amine obtenue devra réagir avec le carbonyle de la fonction carboxylique de l'acide aminé AA2. Enfin, on procèdera à la déprotection finale avec HCl pour obtenir le modulateur potentiel de la gamma-sécrétase.

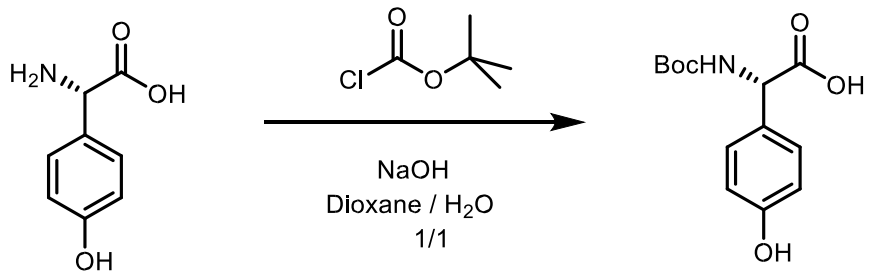
Notre premier acide aminé sélectionné est la tyrosine, en raison de sa disponibilité en quantités appréciables au niveau du laboratoire COSNA. Cependant, cet acide aminé se trouve en forme libre non protégé, et donc on a dû dans un premier temps considérer le protéger.

Concernant l'étape de protection, on utilise des groupements protecteurs comme le Boc (tertButoxycarbonyle) qui présente l'avantage de ne pas réagir avec la plupart des bases et des nucléophiles. Le processus offre généralement un rendement élevé et dans des conditions relativement douces [9]. Le groupement Boc est en général introduit par l'utilisation de son anhydride, le di-tertio-butyle dicarbonate $(Boc)_2O$.

Le tert-butyl chloroformate, est un équivalent du $(Boc)_2O$ et peut aussi être utilisé pour introduire le Boc. Cela se fait en utilisant une base faible comme la triméthylamine dans un solvant organique comme le DCM ou le THF [10].

Les deux agents de protection sont disponibles au laboratoire LCSCO qui a bien voulu nous en prêter. Ainsi, on a décidé de réaliser la protection de la Tyrosine avec le tert-Butyl chloroformate dans un premier temps.

Premier protocole :



1 **2**

Pour synthétiser le composé 2, le protocole sélectionné a été adapté des travaux réalisés par Keller *et al* [11]. Ainsi, on utilise 1 équivalent-gramme de (L)-Tyrosine, 1,2 équivalent-gramme de solution 1M de NaOH, et 1,1 équivalent-gramme de tert-butyl chloroformate, le tout dans un mélange de Dioxane et d'eau (1/1).

Après 24 heures, une chromatographie sur couche mince CCM effectuée avec comme éluant un mélange de méthanol : acide acétique : eau de proportion (4/1/1).

3 échantillons sont placés sur la CCM :

1er échantillon : Tyrosine solubilisée dans de l'eau distillée.

2ème échantillon : Mélange réactionnel.

3ème échantillon : Echantillon de Tyrosine + mélange réactionnel.

La Ninhydrine (solution 0.2%) a été utilisée comme révélateur des acides aminés.

Malheureusement, la CCM n'a pas été conclusive quant à la réaction si elle a marché ou non.



L'analyse par RMN du proton et la COSY du brut montre la présence de l'aromatique à travers le doublet de doublets à 6,00 - 7,5 ppm, mais montre malheureusement l'absence du groupement t-butyle qui autrement aurait dû être présent entre 0,5 et 1 ppm (Figures 5 et 6).

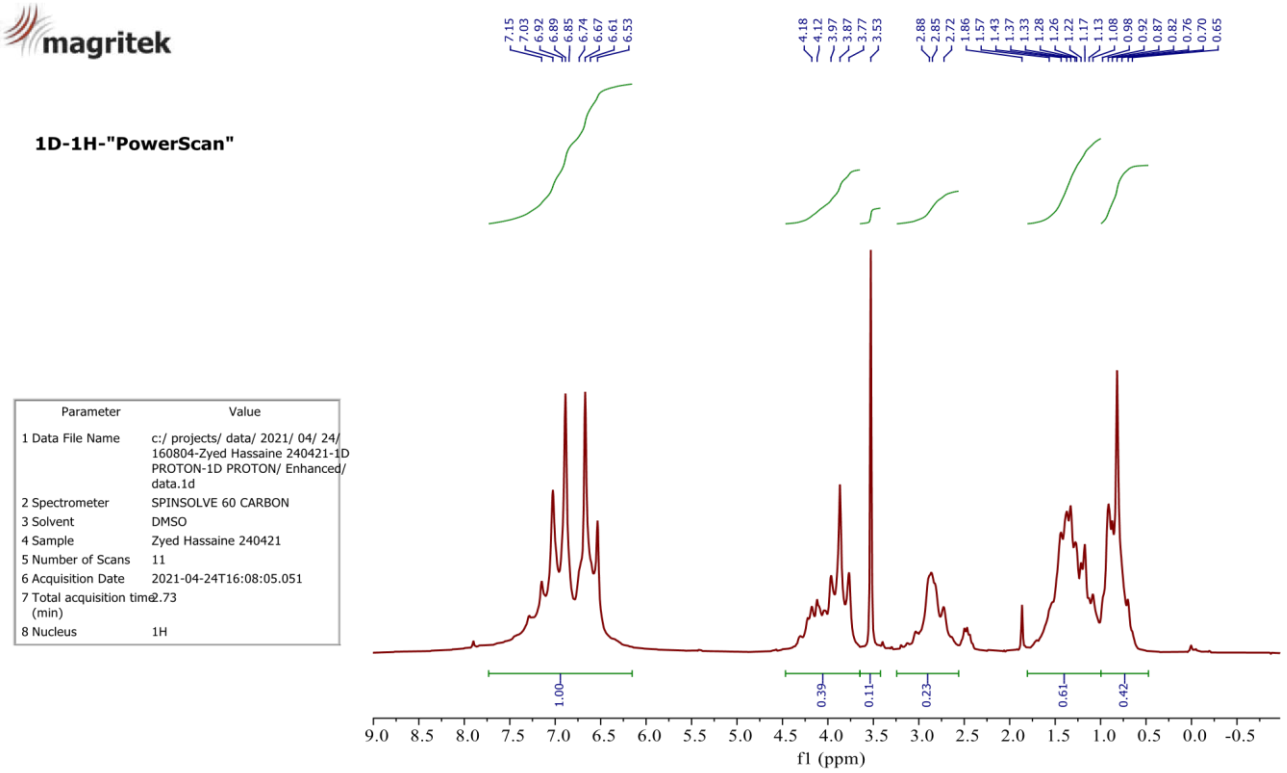


Figure 5 : RMN H^1 du brut du premier essai.

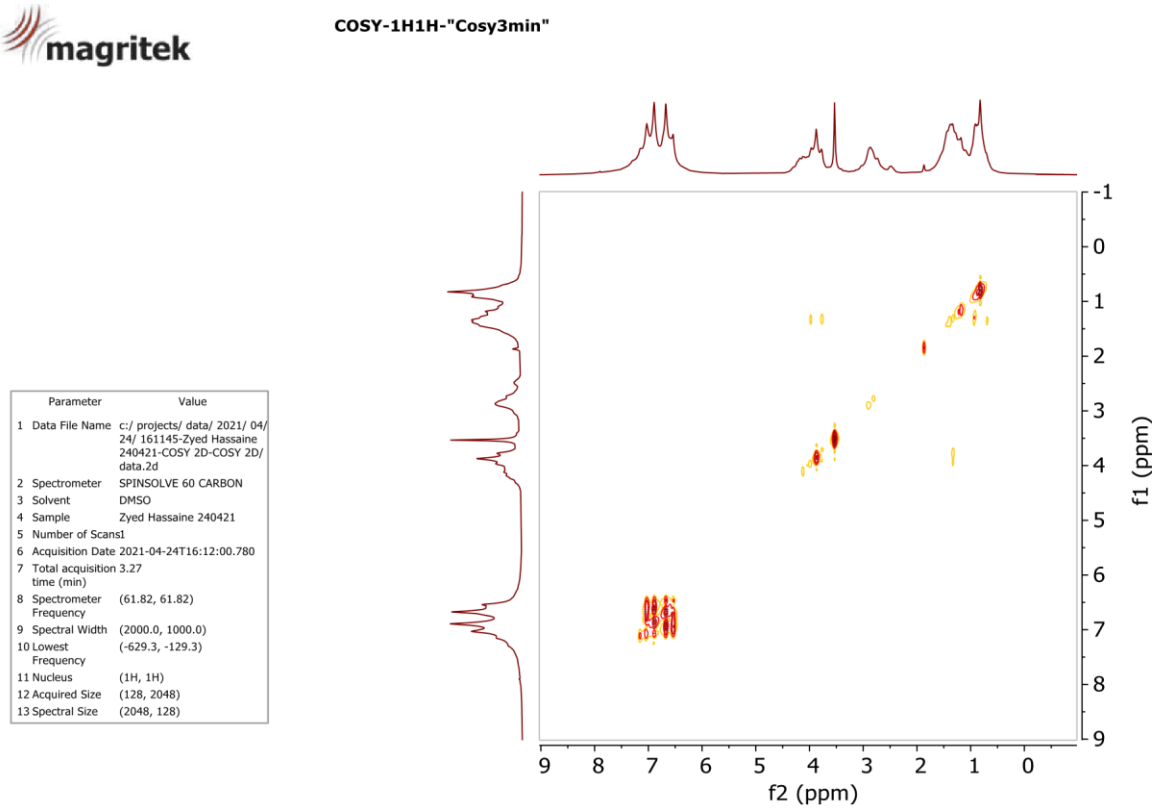


Figure 6 : COSY du brut du premier essai.

Comme on n'a pas obtenu le produit souhaité, on a refait la réaction en utilisant le même protocole, mais cette fois-ci en utilisant 4 équivalents-grammes de NaOH (1M) au lieu des 1,2 équivalent-gramme. Car plus le milieu est basique, plus l'azote deviendra meilleur nucléophile vis-à-vis du carbonyle du tert-butyl chloroformate.

Cette fois ci, les conditions modifiées nous ont permis d'obtenir le bon produit, mais en très faible quantité. En effet, le spectre de RMN proton du brut de la réaction (Figure 7) montre clairement la présence de l'aromatique entre 6,5 et 7,5 ppm, mais aussi le singulet à environ 0.3 ppm.

L'intégration cependant de ce singulet montre que le composé désiré est en faible quantité.

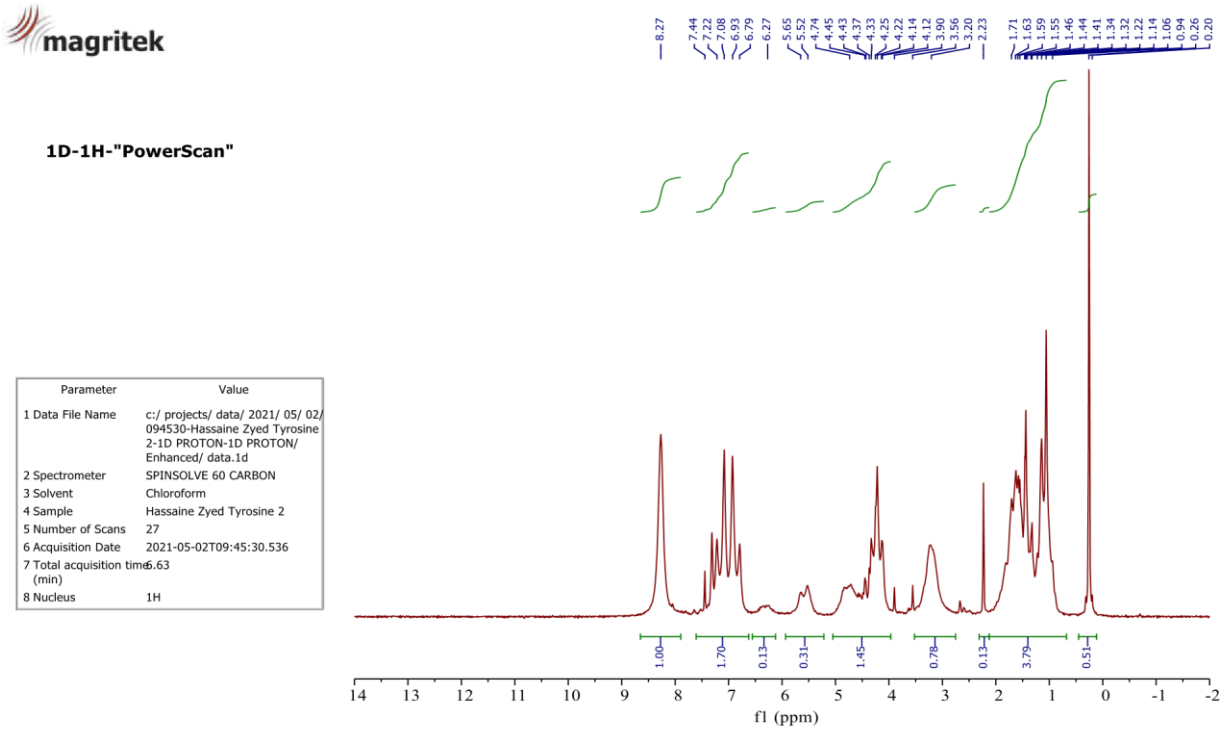
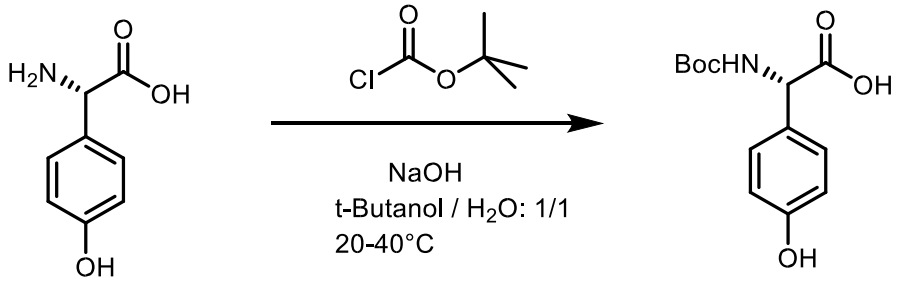


Figure 7 : RMN H^1 du brut du second essai

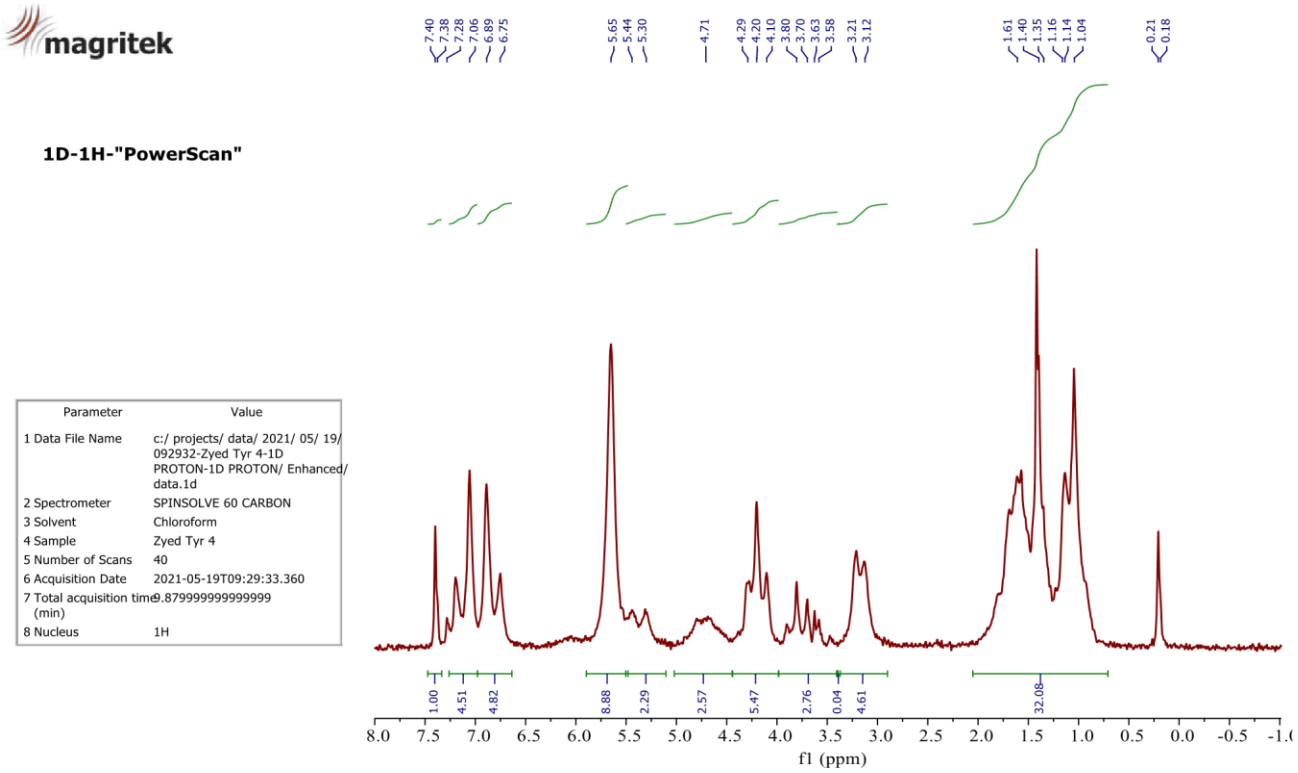
Suite à ce premier échec, on a décidé de modifier de nouveau le protocole.

Deuxième protocole



1 **2**

Ce second protocol est basé sur une ré-évaluation de mode opératoire décrit par Keller *et al* [11] qui rapporte que le t-Butanol est meilleur solvant que le dioxane dans le cas de la tyrosine. Ainsi, on utilise 3mL d'une solution 1M de NaOH, avec 500mg de Tyrosine à température ambiante et on complète avec 2,1mL de tert-butanol. Le tert-butyl chloroformate est ajouté uniquement après homogénéisation de la solution qui donne un pH situé entre 12 et 12,5. Ainsi, l'addition de l'agent protecteur est synonyme d'un précipité blanc qui se forme au fur et à mesure, ce qui est un indicateur positif. Après deux heures d'agitation, Le pH diminue à environ 8 (pH = 8).

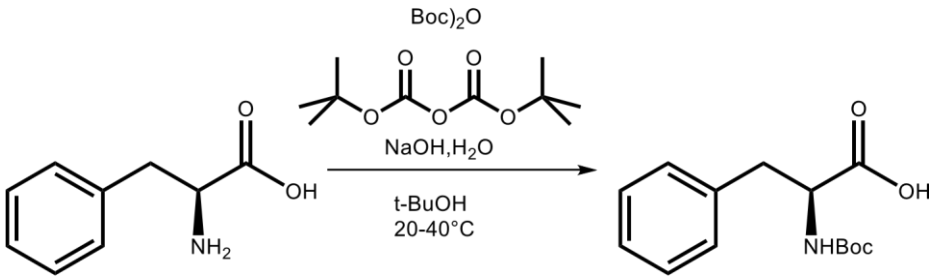


Malheureusement, de nouveau, l'interprétation du spectre de RMN montre que la réaction n'a pas marché. A ce stade, nous avons considéré que l'état du tert-butylchloroformate était la source de nos échecs, et qu'il fallait peut-être le changer par le $(Boc)_2O$.

Changement de réactifs

On a décidé de changer le groupement protecteur « tert-butyl chloroformate » par le « dicarbonate de ditert-butyle » et de remplacer la L-Tyrosine par un autre acide aminé, la L-phénylalanine qui était disponible en plus larges quantités. Parce que jusqu'ici les produits obtenus étaient impurs, l'éventualité que les produits de départ soient eux-mêmes impurs existe.

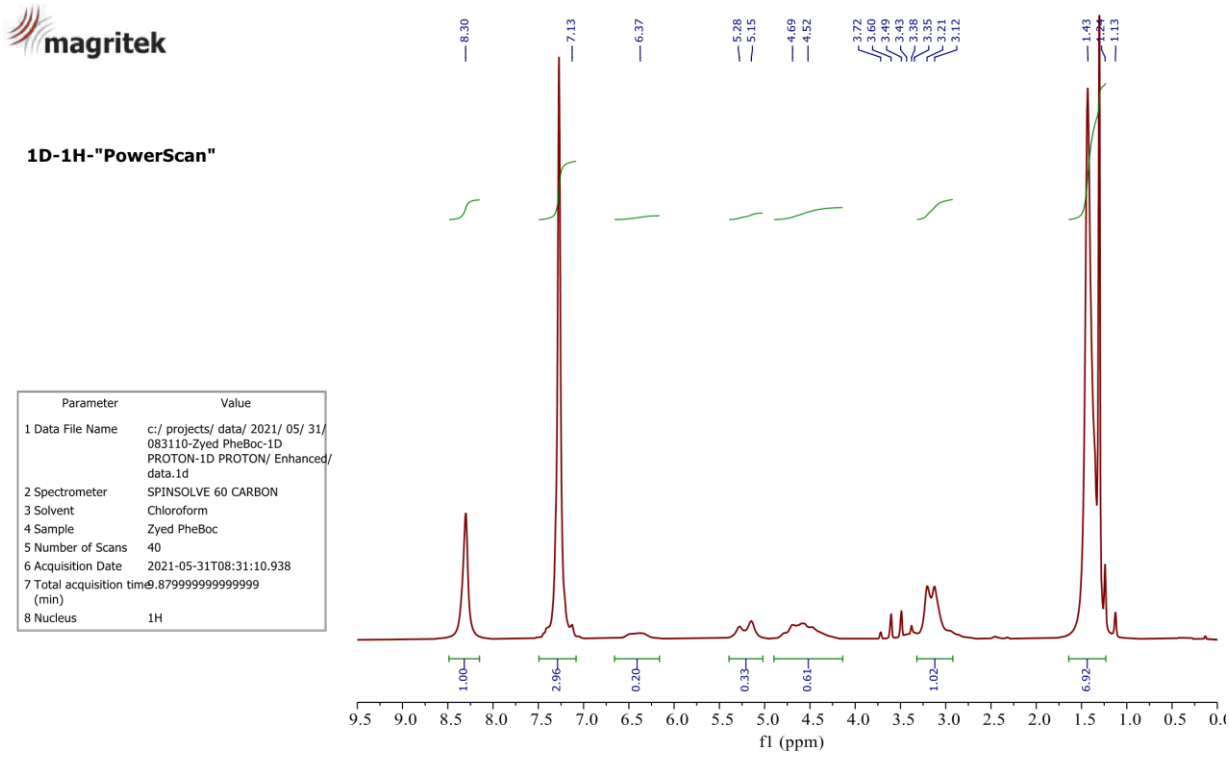
On s'est dit aussi qu'une cause possible du non-aboutissement de notre réaction était la quantité de matière de nos réactifs. Désormais, on travaillera avec 1g de L- Phénylalanine.



Malheureusement, comme montré dans le spectre RMNH[1] suivant, la réaction n'a pas fonctionné comme on le souhaitait. En effet, le spectre montre clairement la présence du phényle ainsi que le tert-butyle qui sont indicateurs du bon produit. Un autre indicateur du bon produit semble être le pic à 3,2 ppm correspondant aux protons benzéniques.

Cependant, le pic à 8,3 ppm nous a laissé perplexe quant à son identité.

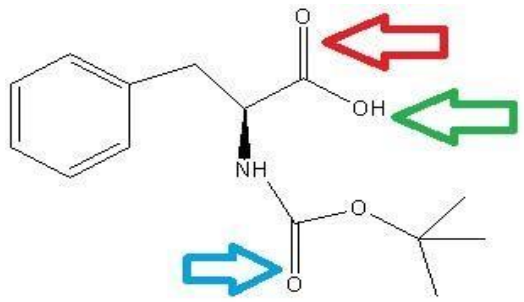
Analyse RMN :



Parameter	Value
1 Data File Name	c:/ projects/ data/ 2021/ 05/ 31/ 083110-Zyed PheBoc-1D PROTON-1D PROTON/ Enhanced/ data.1d
2 Spectrometer	SPINSOLVE 60 CARBON
3 Solvent	Chloroform
4 Sample	Zyed PheBoc
5 Number of Scans	40
6 Acquisition Date	2021-05-31T08:31:10.938
7 Total acquisition time (min)	9.879999999999999
8 Nucleus	1H

Par ailleurs, l'analyse par IR a permis de confirmer la présence de l'acide carboxylique qui apparait à 3436 cm-1 et 1629 cm-1 ; Cependant, nous n'avons pas pu confirmer la présence de l'amine, ni du carbonyle du Boc.

Interprétation du spectre IR :



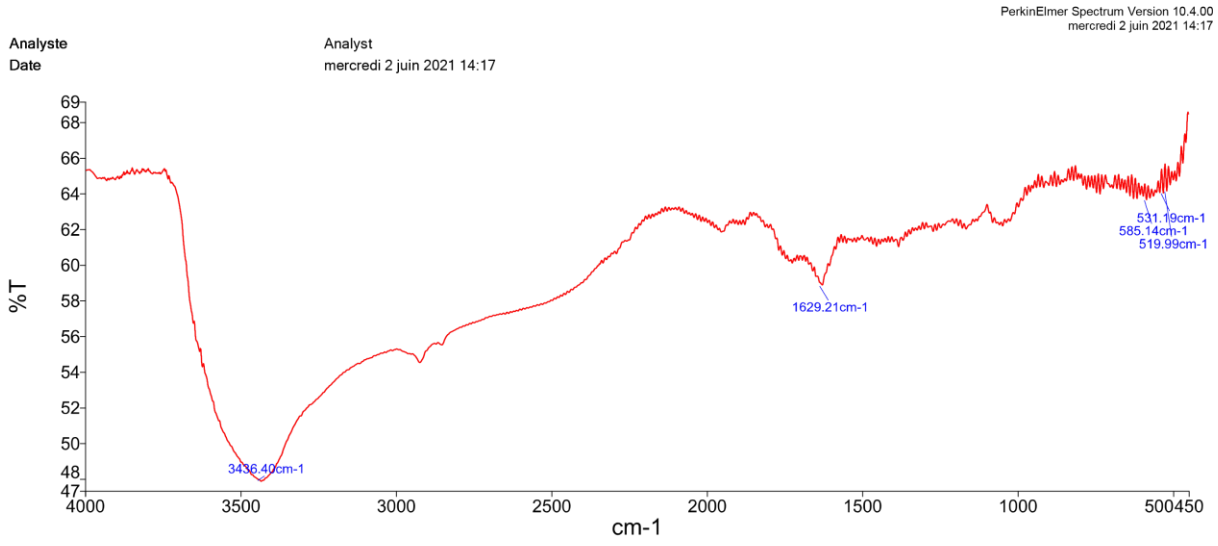
C=O acide carboxylique 1629 cm-1

O-H acide carboxylique 3436 cm-1

N-H amide : vers 1640 (recouverte par la bande du C=O)

Absence de bande du C=O amide

Spectre Infra-Rouge :

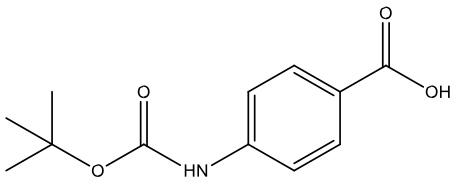


Nom de l'échantillon	Description
A1	Échantillon 606 Par Analyst Date mercredi, juin 02 2021

En conclusion, nous n'avons pas pu confirmer avec certitude la formation du bon produit.

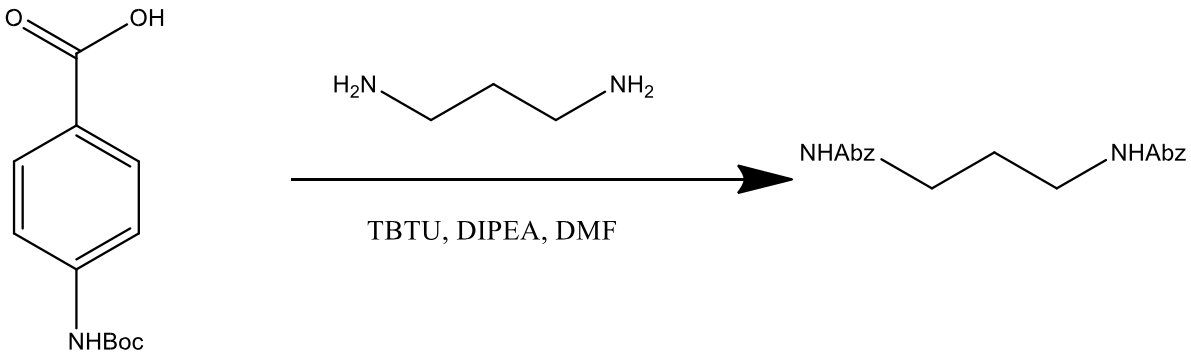
Jusqu'ici toutes les tentatives de protection d'acide aminé par le Boc ont échoué.

Du fait de ce constat, on a pris un acide aminé synthétique protégé par le Boc : « 4-Boc-Abz-OH », un acide amino benzoîque avec son azote protégé par le dicarbonate de di-tert-butyle :



Et on le fait réagir avec une diamine. Tout ceci afin de passer outre cette étape de protection.

Protocole :



4-Boc Abz-OH

Mélanger dans un ballon muni d'un agitateur magnétique, 500mg (2,2 équivalents-grammes) de 4-Boc Abz-OH. Ajouter la 1,3-diaminopropane (1,1 équivalent-gramme) de volume V=0,1mL. Ainsi que l'agent de couplage TBTU (2,2 équivalent-gramme) de masse m=0,68g.

Sécher à la pompe à palette pendant 15 minutes, casser ensuite le vide avec un ballon de baudruche rempli d'un gaz rare comme l'Azote ou l'Argon. Y incorporer du DMF anhydre (V=1,6mL) et continuer l'agitation jusqu'à dissolution complète.

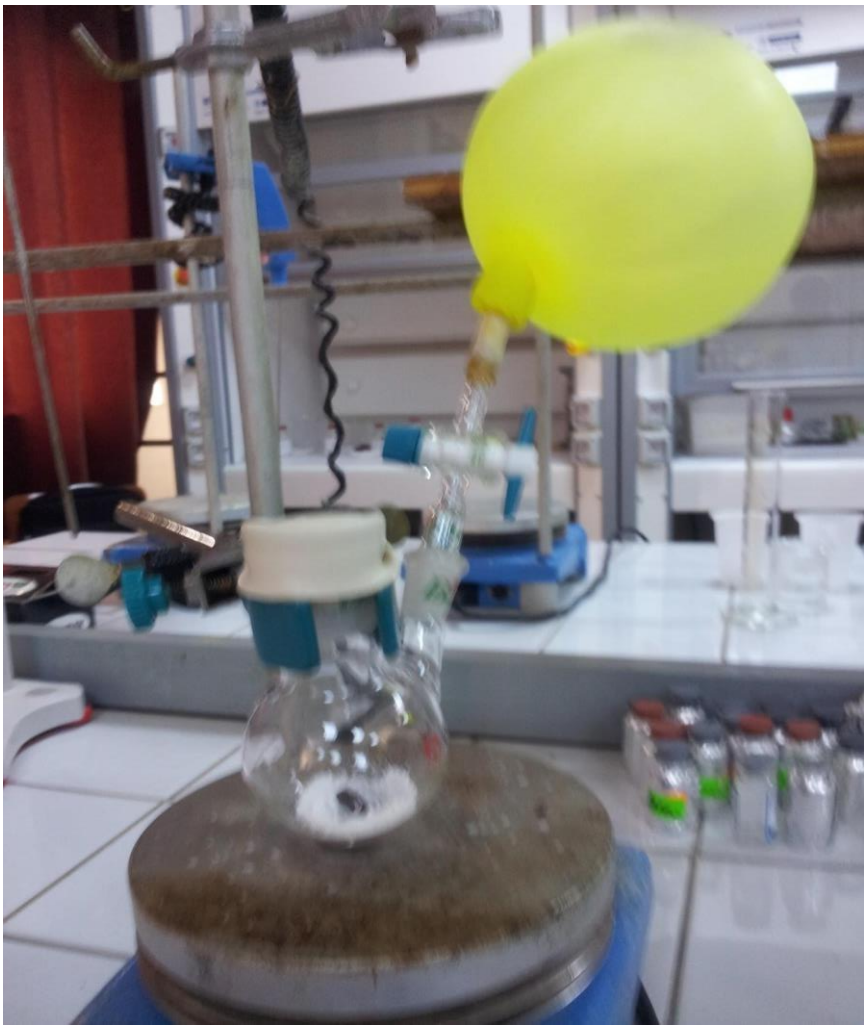
Refroidir à 0°C et ajouter la DIPEA goutte à goutte rapide d'un volume V=1mL. Laisser 10 minutes à 0°C puis remonter la température à une température ambiante et laisser la réaction se poursuivre pendant 2 à 3 heures. Effectuer une CCM avec comme éluant un mélange de proportion égale d'éther de pétrole et d'acétate d'éthyle.

Après cela, refroidir à 0°C et ajouter une solution saturée de NH_4Cl (10 fois le volume de DMF). Ajouter de l'eau (3 fois le volume de NH_4Cl) et extraire 3 fois avec l'Acétate d'éthyle (Volume

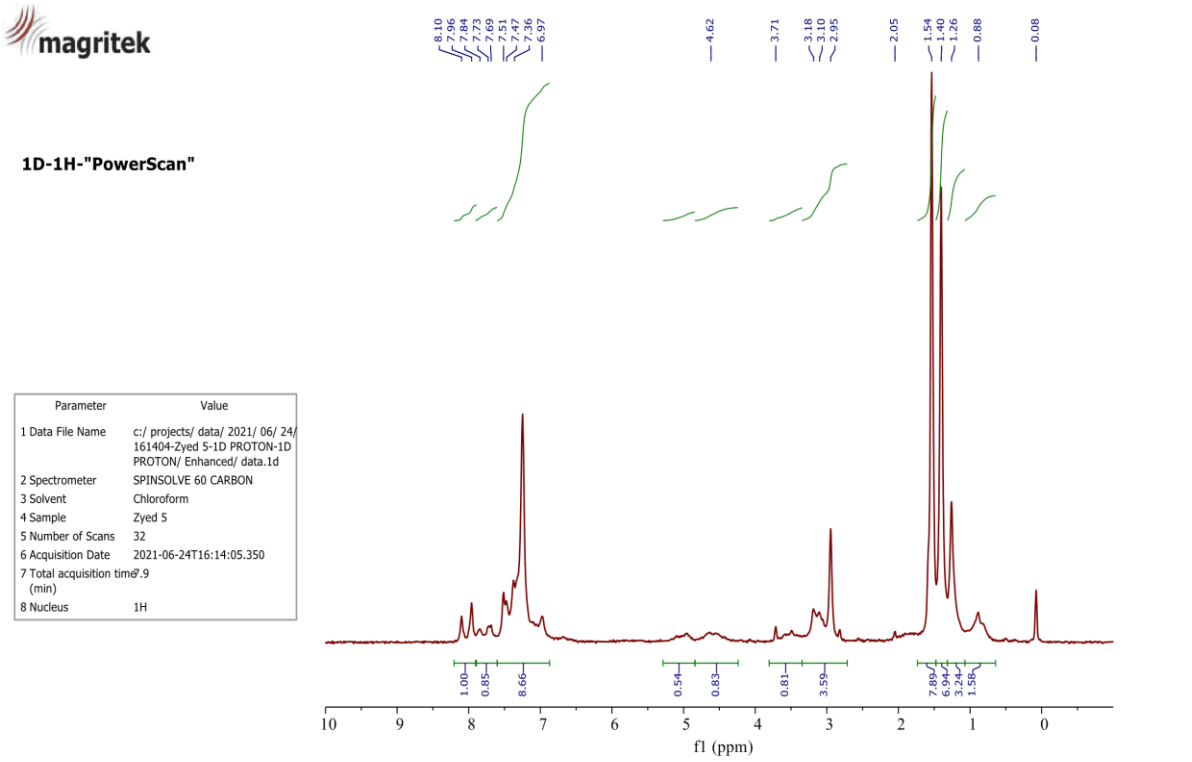
AcOEt $= \frac{1}{2}$ volume NH_4Cl+H_2O).

Combiner les phases organiques et les laver 1 fois avec de l'eau et 1 fois avec une solution saturée de NaCl.

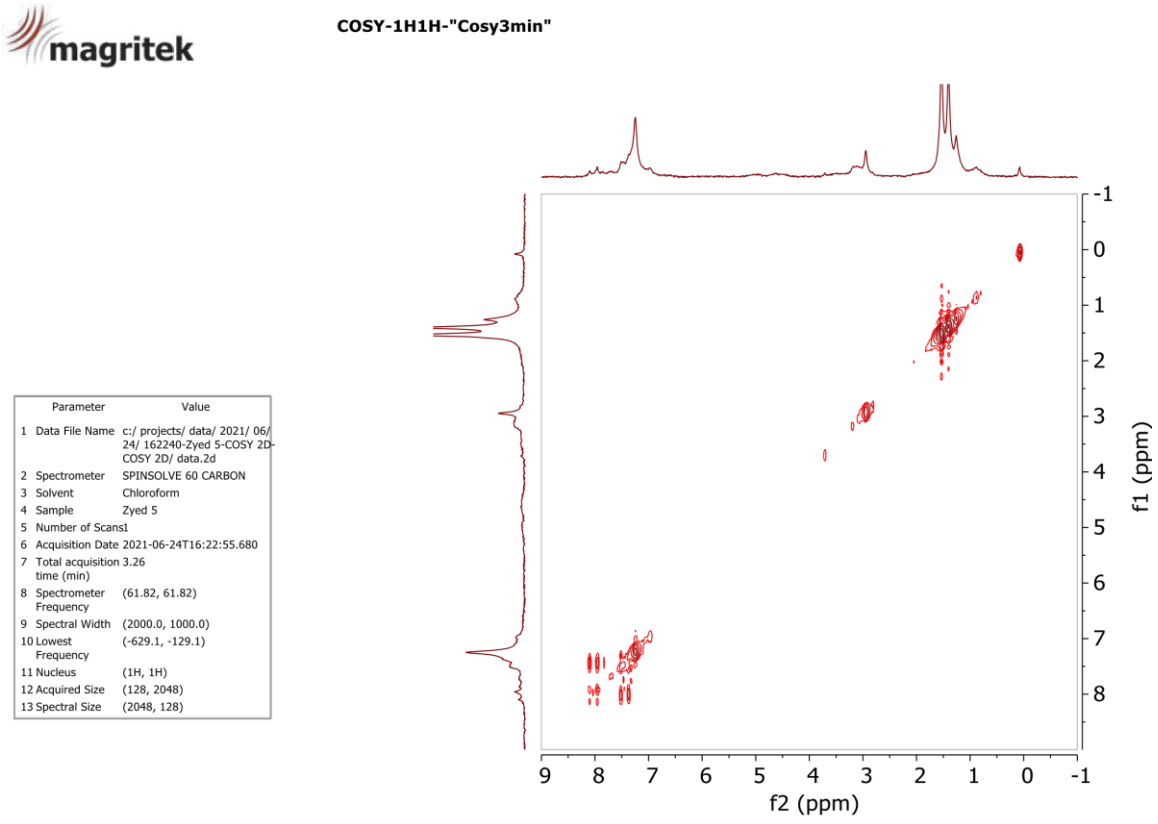
Sécher sur Na_2SO_4, filtrer et évaporer avec l'évaporateur rotatif.



Analyse RMN :



Parameter	Value
1 Data File Name	c:/ projects/ data/ 2021/ 06/ 24/ 161404-Zyed 5-1D PROTON-1D PROTON/ Enhanced/ data.1d
2 Spectrometer	SPINSOLVE 60 CARBON
3 Solvent	Chloroform
4 Sample	Zyed 5
5 Number of Scans	32
6 Acquisition Date	2021-06-24T16:14:05.350
7 Total acquisition time (min)	7.9
8 Nucleus	1H



Parameter	Value
1 Data File Name	c:/ projects/ data/ 2021/ 06/ 24/ 162240-Zyed 5-COSY 2D-COSY 2D/ data.2d
2 Spectrometer	SPINSOLVE 60 CARBON
3 Solvent	Chloroform
4 Sample	Zyed 5
5 Number of Scans	1
6 Acquisition Date	2021-06-24T16:22:55.680
7 Total acquisition time (min)	3.26
8 Spectrometer Frequency	(61.82, 61.82)
9 Spectral Width	(2000.0, 1000.0)
10 Lowest Frequency	(-629.1, -129.1)
11 Nucleus	(1H, 1H)
12 Acquired Size	(128, 2048)
13 Spectral Size	(2048, 128)

Conclusion :

A 7.5ppm on a les hydrogènes du cycle aromatique. Entre 1 et 1.6ppm on a des signaux des protons CH_3 du Boc. A 3 ppm on a le signal du proton labile de l'Azote.

La RMN montre notre produit souhaité, mais qui n’est pas totalement purifié. Il fallait poursuivre ou refaire les étapes de purification.

CHAPITRE 3

Partie Expérimentale

Généralités

Solvants :

Les mélanges des différents solvants ou les éluants sont sous-entendus en rapport volume/volume.

Chromatographie :

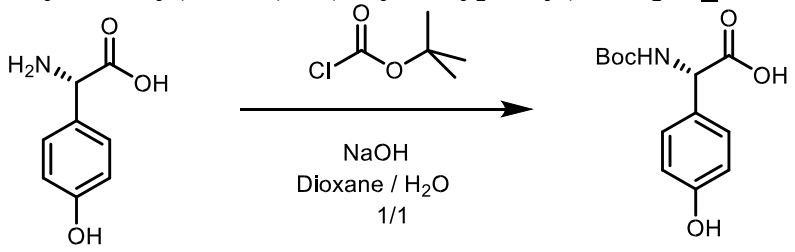
Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques de silice de type Kieselgel 60 F254 Merck.

Analyse :

Les spectres de résonance magnétique (RMN) de proton H1 et COSY (60 MHz) ont été enregistrés sur un appareil Magritek 60. Les déplacements chimiques δ sont exprimés par rapport au D_2O (4,76 ppm) pris comme référence interne.

Les spectres sont traités avec le logiciel MNova™ 6.0.3.

Acide (S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-hydroxyphenyl)acétique 2



1 **2**

Protocole 1 :

Ainsi, on dissout à température ambiante 500 mg (1 équivalent-gramme) de (L)-Tyrosine dans un mélange de Dioxane et d'eau (1/1), et on utilise la quantité juste suffisante pour solubiliser la Tyrosine. On ajoute 1,2 équivalent-gramme de solution 1M de NaOH. Après agitation du mélange, la solution est refroidie à 0°C avec un bain de glace. On ajoute, goutte à goutte, 1,1 équivalent-gramme de tert-butyl chloroformate, et on laisse l'agitation se poursuivre durant 24 heures à température ambiante.

Au bout de 24 heures, on stoppe l'agitation, on place le ballon dans un bain de glace et on acidifie le produit réactionnel avec une solution 10% de Bisulfate de sodium jusqu'à obtenir un pH=3.

On Place le produit réactionnel dans une ampoule à décanter, et on extrait 3 fois avec l'acétate d'éthyle comme solvant d'extraction.

Les extraits organiques obtenus sont séchés sur sulfate de magnésium $MgSO_4$, le tout est filtré puis évaporé en utilisant l'évaporateur rotatif pour donner le produit sous forme d'une huile jaunâtre.

Protocole 2 :

Dans un ballon muni d'un barreau magnétique, ajouter un volume de 3mL d'une solution 1M de NaOH, lancer l'agitation et y ajouter 500mg de Tyrosine à température ambiante.

Compléter avec 2,1mL de tert-butanol. Attendre que la solution s'homogénéise, vérifier que le pH se situe entre 12 et 12,5. Puis ajouter goutte à goutte 0,36mL de tert-butyl chloroformate, un précipité blanc apparaît durant l'addition de l'agent protecteur. La température augmente de 2 ou 3 degré. Laisser l'agitation se poursuivre à température ambiante pendant environ 2 heures. Le pH à ce moment-là, doit être entre 7,5 - 8,5.

Après cela, le mélange réactionnel est extrait 2 fois avec 5mL d'Ether de pétrole. Puis la phase organique est lavée 3 fois avec une solution saturée de bicarbonate de potassium.

Les phases aqueuses sont combinées, mises dans un bain de glace puis acidifiées avec une solution de HCl 5% pour arriver à un pH =1 - 1,5.

L'acidification est accompagnée d'un dégagement copieux de CO_2.

Notre produit réactionnel est extrait 4 fois avec l'éther diéthylique. Les phases organiques combinées sont lavées 2 fois avec de l'eau, puis séchées avec le sulfate de magnésium anhydre. Enfin on effectue une filtration et le solvant est retiré sous pression réduite à l'aide de l'évaporateur rotatif. La CCM est effectuée avec le tert-butanol / acide acétique / H_2O de proportion (2 :1 :1) comme éluant.

Conclusion générale :

En se basant sur les résultats obtenus, notamment avec la RMN, on peut affirmer l'obtention du produit voulu, mais, sous forme impure. Il aurait fallu reprendre les étapes de purification. Cela n'a pas être réalisé par manque de temps et de moyens surtout.

Et de fait, je n'ai pas réussi à constituer le modulateur de la Gamma-secrétase dans le temps imparti, qui était le but de mon travail.

Références bibliographiques

[1] Elena L.Paley Protein Biosynthesis Interference in Disease 2021, Pages 97-99. Chapter 19 - Senile plaques and/or neurofibrillary tangles in brain of non-demented individuals L. Paley. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823485-3.00019-1.

[2] Yasuhiro Arai, Yuji Iwasaki, Toshihiro Suzuki, Shuuhe Ide, Makiko Kaga. Elimination of amyloid precursor protein in senile plaques in the brain of a patient with Alzheimer-type dementia and Down syndrome. https://doi.org/10.1016/j.braindev.2018.07.017.

[3] Baulac, S., LaVoie, M.J., Kimberly, W.T., Strahle, J., Wolfe, M.S., Selkoe, D.J. and Xia, W. (2003) Functional gamma-secretase complex assembly in Golgi/trans-Golgi network: interactions among presenilin, nicastrin, Aph1, Pen-2, and gamma secretase substrates. Neurobiol Dis, 14, 194204. doi: 10.1016/s0969-9961(03)00123-2.

[4] Thomas L. Kukar, Thomas B. Ladd, Maralyssa A. Bann1, Patrick C. Fraering, Rajeshwar Narlawar, Ghulam M. Maharvi1, Brent Healy, Robert Chapman, Alfred T. Welzel, Robert W. Price1, Brenda Moore, Vijayaraghavan Rangachari, Bernadette Cusack, Jason Eriksen, Karen Jansen-West, Christophe Verbeeck, Debra Yager, Christopher Eckman, Wenjuan Ye, Sarah Sagi, Barbara A. Cottrell, Justin Torpey, Terrone L. Rosenberry, Abdul Fauq, Michael S. Wolfe, Boris Schmidt, Dominic M. Walsh, Edward H. Koo & Todd E. Golde. Substrate-targeting c-secretase modulators. Nature. 2008 Jun 12; 453(7197): 925–929. doi: 10.1038/nature07055

[5] Michael S. Wolfe. Probing Mechanisms and Therapeutic Potential of -Secretase in Alzheimer's Disease. doi: 10.3390/molecules26020388.

[5a] X. Zhang, Y. Li, H. Xu, Y.W. Zhang, The gamma-secretase complex: from structure to function, Front. Cell. Neurosci. 8 (2014) 427, https://doi.org/10.3389/ fncel.2014.00427.

[5b] Hui Jia, Zuojun Wang, Jingyi Zhang, Fan Feng. γ-Secretase inhibitors for breast cancer and hepatocellular carcinoma: From mechanism to treatment. (2020). doi:10.1016/j.lfs.2020.119007.

[6] Figure 1 : tiré le 24/06/2021 du lien suivant : https://www.123rf.com/photo_72304407_stock-vector-alzheimer-s-disease-is-the-change-in-tauprotein-that-results-in-the-breakdown-of-microtubules-inbr.html?utm_source=shareasale&utm_medium=affiliate&utm_campaign=2280303_1195097&sscid=91k5_s4q3t

[7] Figure 2 tiré le 25/06/2021 du lien suivant : http://hgpalzheimers.synthasite.com/background.php

[8] Figure 3 tiré le 25/06/2021 du lien suivant : https://www.technologynetworks.com/drug-discovery/articles/do-you-have-a-games-console-youcould-be-solving-the-structure-of-proteins-281377

[9] tiré le 25/06/2021 du lien suivant https://www.fishersci.fr/fr/fr/scientific-products/labreporter-europe/chemicals/amine-protection-deprotection.html

[10] https://www.carbosynth.com/carbosynth/website.nsf/(wproductdisplay)/4C9FF865B2C4DE4D482581FC002125BB 25/06/2021

[11] Oskar Keller, Walter E. Keller, Gert van Look, and Gernot Wersin. Organic Syntheses, Coll. Vol. 7, p.70 (1990); Vol. 63, p.160 (1985). DOI:10.15227/orgsyn.063.0160.