



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID – TLEMCCEN

MEMOIRE

Présenté à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

MASTER EN CHIMIE

Spécialité : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Par :

M^{lle}.Berouaine zehor

Sur le thème

Synthèse de quelques dérivés de fragments de Plitidepsine, inducteur de l'apoptose

Soutenu le 15 juin 2022 à Tlemcen devant le jury composé de :

Pr. MERAD NOURIA

Présidente

Université de Tlemcen

Dr. KENICHE Assia

Examinatrice

Centre universitaire de Maghnia

Dr. MEZRAI Abdelmoumin

Encadrant

ESGEE-Oran

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2021– 2022

Je dédie ce travail

A mes très chers parents

Pour ces longues années de soutien inconditionnel, leur confiance permanente et ses encouragements incessants.

A mes très chères Sœurs

Saliha, Fatima, pour ses encouragements, ses conseils et son soutien moral.

A mes amis

Benzerafa manal

Nedjari amina

Djalad widad

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

Remerciements

*Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses COSNA de l'université Aboubekr Belkaid Tlemcen, sous la direction de Monsieur le **Pr.N.JABOU**.*

*Je remercie tout d'abord le bon **DIEU** le puissant de m'avoir donné la santé, la patience, la puissance, et la valanté pour réaliser ce mémoire.*

*Je tiens à remercier, Monsieur **Mezrai Abdelmoumin** mon directeur de mémoire.*

*Je voudrais remercier le **Pr.MERAD NOURIA** l'honneur qu'il me fait de présider le jury de ce mémoire. Je remercie également **Dr. KENICHE ASSIA**, pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Je remercie infiniment, à **Dr. KENICHE ASSIA** d'avoir pris notre responsabilité toute cette année et de nous encourager et d'être debout et patient avec nous.*

*Un merci tout particulier à **Mme Aboura Amina, M^{lle} soltani, yasmine, M^{lle} belbachir fatima zohra** doctorantes en Chimie pour leurs aides et leurs disponibilités lors de mes différents séjours au sein du laboratoire.*

TABLE DE MATIERE

I. INTRODUCTION GENERAL.....	01
II. BIBLIOGRAPHIE.....	04
Généralités sur la plitidepsine.....	05
Introduction.....	05
a-Définition	05
b-Méthodes de synthèses.....	05
c-Intérêt biologique.....	06
d-Objectif et plan général du travail.....	07
III. Résultats et discussions.....	09
1- Généralités.....	10
2- Protection de la fonction amino des aminoacides.....	10
3- Protection du carboxyle des aminoacides.....	15
4- Protection effectué.....	18
5- Couplage peptidique.....	19
6- Couplage effectué.....	22
IV. CONCLUSION GENERAL.....	28
V. REFERENCES.....	41

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Exemples de la diversité chimique du monde végétal terrestre : structures de la Camptothécine (A), la vinblastine (B) et de l'étoposide 5 (épipodophyllotoxine) (C).

Figure 02 : La Romidepsine (FK228)

Figure 03 : Structure de la trabectedine et photographie d'Ecteinascidia turbinata

[Photographie d'Ecteinascidia turbinata de PharmaMar Inc., Madrid, Espagne

Figure 04 : Structure d'E7974 et photographie de Hemiasterella minor

[Photographie de hemiasterella minor reproduite d'Y. Benayahu et S. Perkol-Finkel.

Figure 05. Déhydrodidemnine B.

Figure 06 : représentation de la structure de DDB

Figure 07 : Représentation de la synthèse en phase solide.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: acide désoxyribonucléique.

DDB: Déhydrodidemnine.

DCC: dicyclohexylcarbodiimide.

DCM: dichlorométhane.

DCU: dicyclohexylurée.

Boc: t-butoxycarbonyle.

Cbz: Benzyloxycarbonyle.

Fmoc: 9-fluorenylméthoxycarbonyle.

TEA: triéthylamine.

MeOH: méthanol.

THF: tétrahydrofurane.

CCM : chromatographie sur couche mince.

DMF : N, N-diméthylformamide

INTRODUCTION GENERALE :

Les produits naturels étaient toujours la source de la guérison humaine y inclus la lutte contre cancer. De nombreuses molécules sont extraites :

Des plantes :

Durant les 40 dernières années, les plantes ont été la plus grande source de métabolites secondaires avec l'avantage de présenter une grande diversité chimique. Des médicaments tels que les camptothécines, les taxanes, les vinca-alcaloïdes et les épipodophyllotoxines continuent d'être intensément prescrits (figure1).

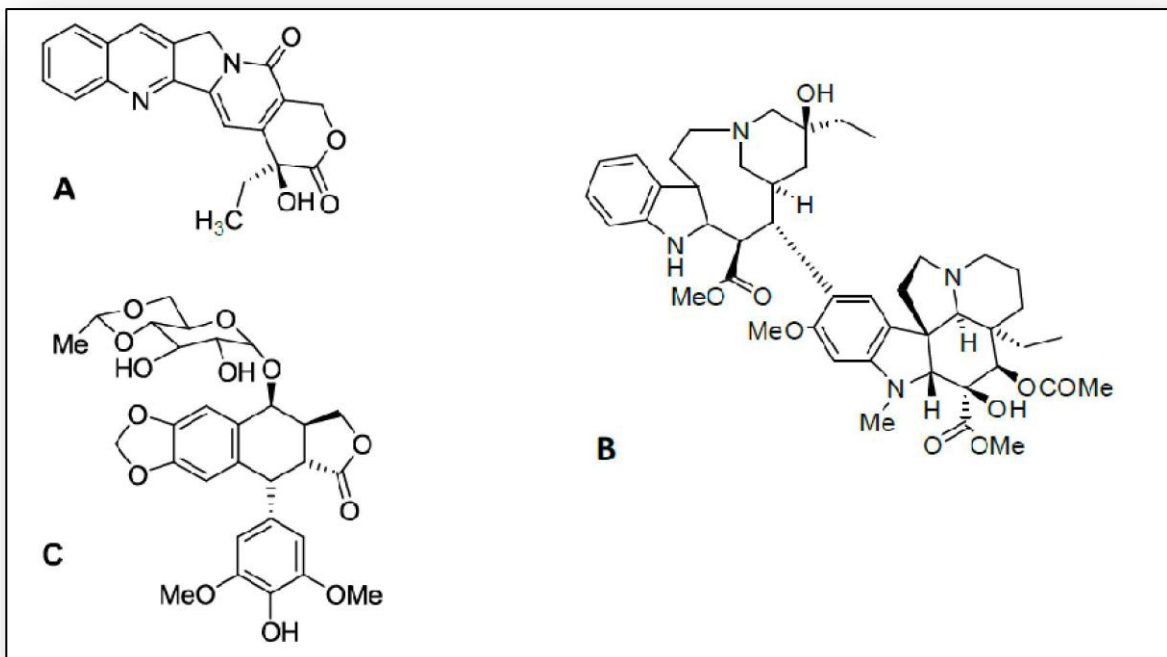


Figure 1 : Exemples de la diversité chimique du monde végétal terrestre : structures de la Camptothécine (A), la vinblastine (B) et de l'étoposide 5 (épipodophyllotoxine) (C).

Des micro-organismes :

La Romidepsine (FK228, figure 2), isolée de la bactérie *Chromobacterium violaceum*, est un depsipeptide inhibiteur des histones déacétylases. Il a montré une bonne activité dans le traitement des patients souffrant de lymphome.

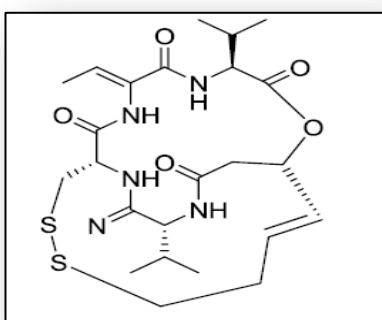


Figure 2 : La Romidepsine (FK228)

La mer et les océans représentent La partie majeure de la biodiversité de la planète, avec une diversité chimique (chimiodiversité) exceptionnelle.¹

A titre d'exemple on 'a :

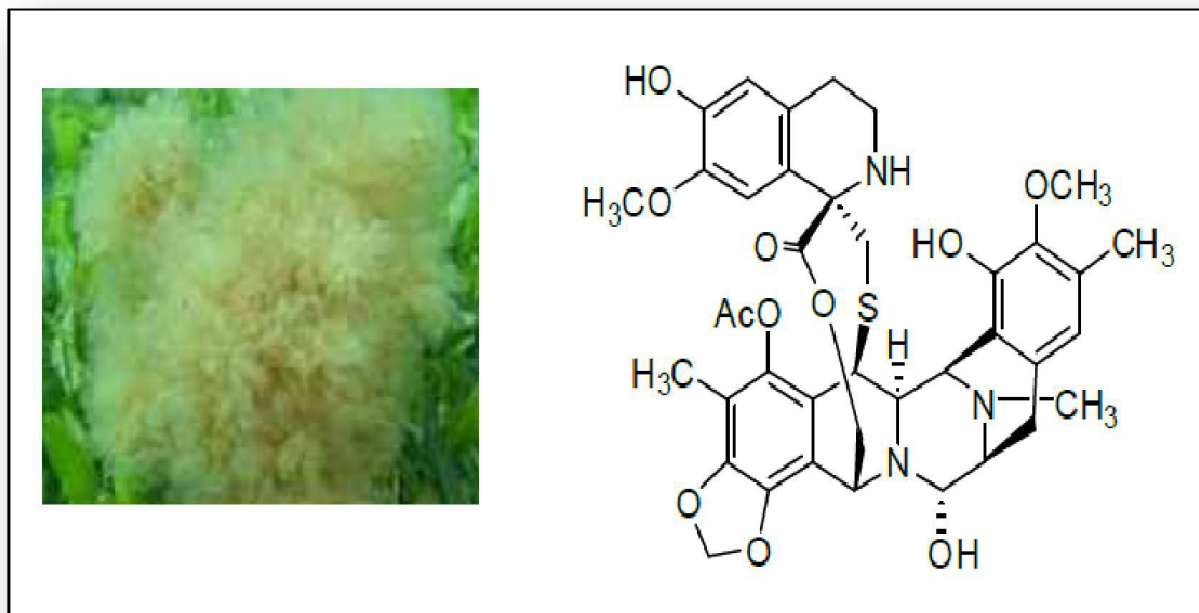


Figure 3 : Structure de la trabectedine et photographie d'Ecteinascidia turbinata

[Photographie d'Ecteinascidia turbinata de PharmaMar Inc., Madrid, Espagne.²

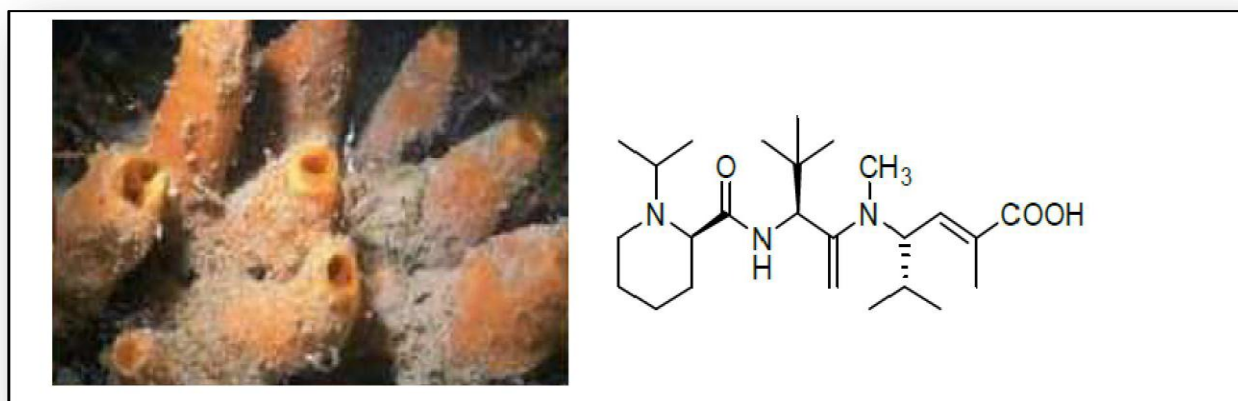


Figure 4 : Structure d'E7974 et photographie de Hemiasterella minor

[Photographie de hemiasterella minor reproduite d'Y. Benayahu et S. Perkol-Finkel.²

¹Bernard Banaigs et Jean-Michel Kornprobst, *La biodiversité marine et le médicament l'actualité chimique-mars 2007-n° 306*

² Mayer, A.M.S., K.B. Glaser, C. Cuevas, R.S. Jacobs, W. Kem, R.D. Little, J.M.McIntosh, D.J. Newman, B.C. Potts, D.E. Shuster, *Trends in Pharmacological Sciences*, **2010**, 31(6), 255.

Plitidepsine, ou déhydrodidemnine B a une structure similaire à celle de la Didemnine avec taux de toxicité modéré.³ Cette molécule est utilisée dans le traitement du cancer depuis son isolement d'**Aplidium Albicans (tunicien) en 1991**. Elle est devenue parmi les meilleurs exemples dans la recherche thérapeutique des anticancéreux.

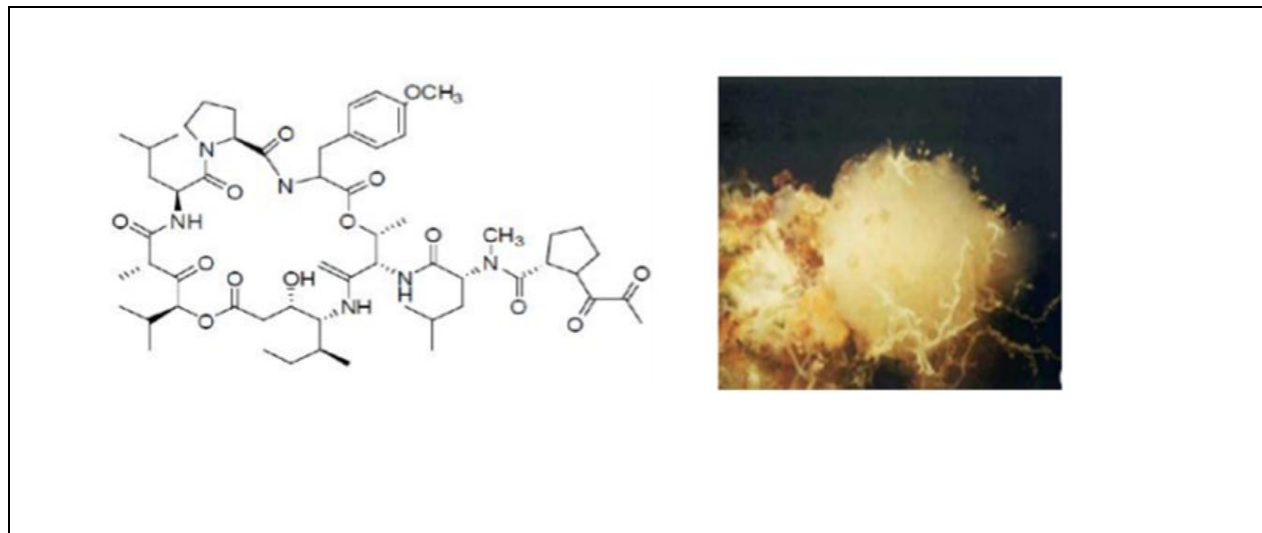


Figure 5: Déhydrodidemnine B.

³ D. Papamichael, *The use of thymidylate synthase inhibitors in the treatment of advanced colorectal cancer: current status. Oncologist* **1999**, 4(6), 478-487.

Bibliographie

Généralités sur la plitidepsine

Introduction :

Aplidine®, le nom commercial de la Plitidepsine également connue sous le nom de déhydrodidemnine **B**, est un agent anticancéreux obtenu par synthèse, qui a été initialement isolé d'un tunicier marin méditerranéen, *Aplidium albicans*.^{1 2}

a- Définition :

La plitidepsine est un depsipeptide structurellement apparentés aux Didemnines, la seule différence est que le résidu de lactate dans la didemnine B est présent dans la version de pyruvate oxydé. la didemnine a été remplacée par l'Aplidine qui a un taux de toxicité modéré.³

Sa formule molaire **C₅₇H₈₇N₇O₁₅** et masse moléculaire est **1110,34 g/mol**¹³.

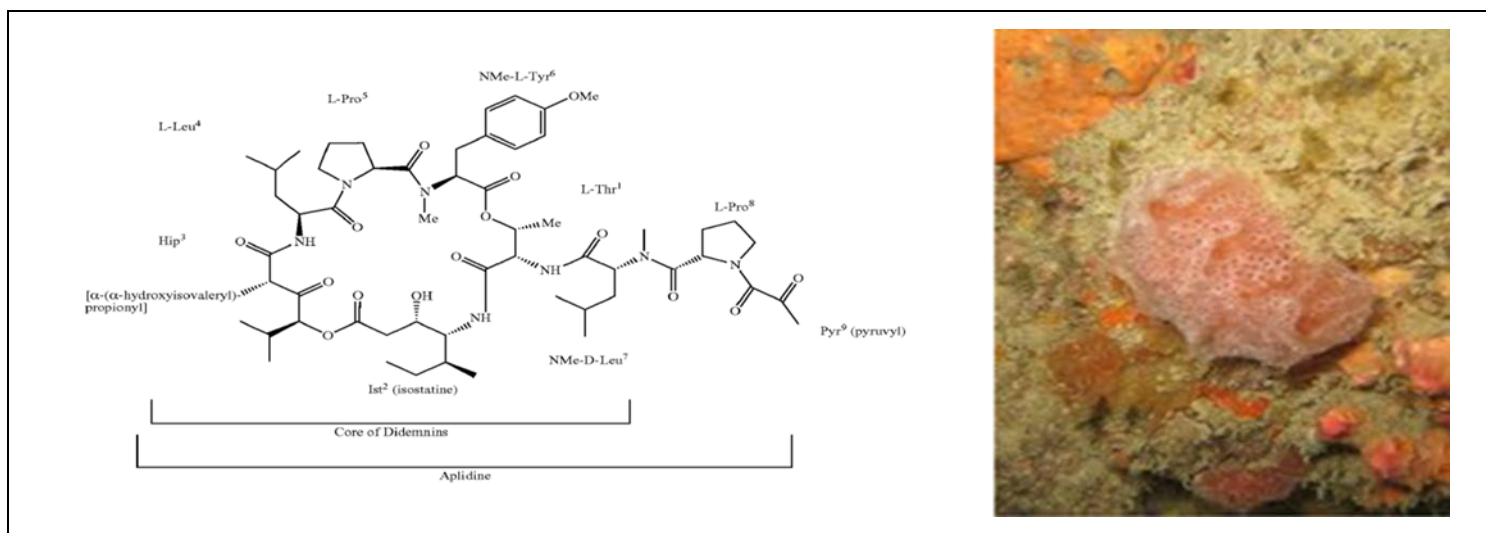


Figure 6 : représentation de la structure de **DDB**

b- Méthodes de synthèse :

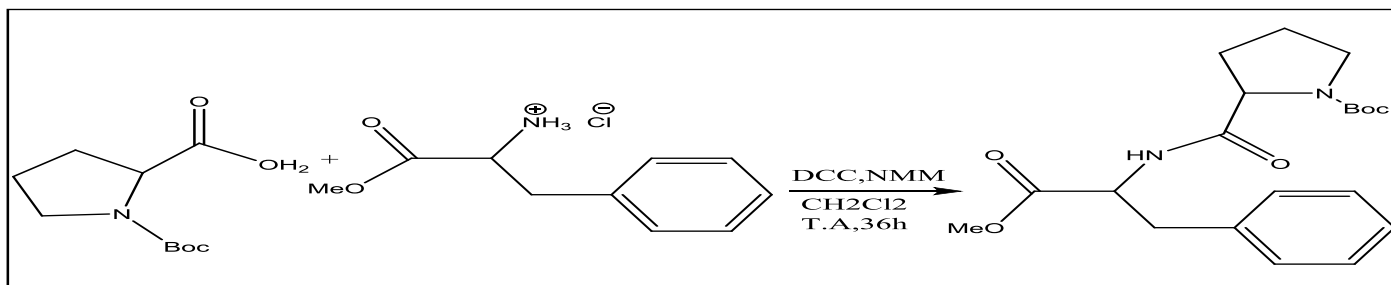
❖ Synthèse en solution :

La synthèse peptidique en solution se fait dans un solvant, généralement le dichlorométhane en présence d'un agent de couplage et des catalyseurs parfois. Pour préparer les peptides désirés il faut protéger la fonction acide dans aminoacide ou peptide et la fonction amine dans l'autre aminoacide ou peptide.

Le schéma ci-après illustre la synthèse d'un dipeptide en solution.

¹ Rinehart L ; Antitumor compoundd from tunicates. *Mer Res Rev.* **2000** ; 20 :1-27.

² Urdials JL, Morata P, Nunez De Castro I Antiproliferative effect of dehydrodidemnin B, a depsipeptide isolated from Mediterranean tunicates. *Cancer Lett.* **1996** ;102 :31-37.



❖ La synthèse en phase solide :

La synthèse en phase solide est basée sur l'utilisation d'un support solide (il reste à l'état solide lors de la synthèse) sur laquelle les molécules à faire réagir sont liées par des liaisons covalentes¹.

La première étape, appelée greffage, consiste à lier les molécules nécessaires à la synthèse à la résine (support solide). La réaction sera conduite de manière que chaque molécule greffée ne possède qu'un seul site de réactif. Il est donc nécessaire de protéger les fonctions. En reliant les étapes entre elles, la construction de la molécule se fera de manière similaire à l'ajout d'un maillon de chaîne, où une extrémité libre sera modifiée. Lorsque toutes les étapes de synthèse sont terminées, la molécule est récupérée lorsqu'elle est séparée de son support. Cette opération, appelée clivage, rompt les liaisons avec la matrice solide et récupère la molécule en filtrant le support.²

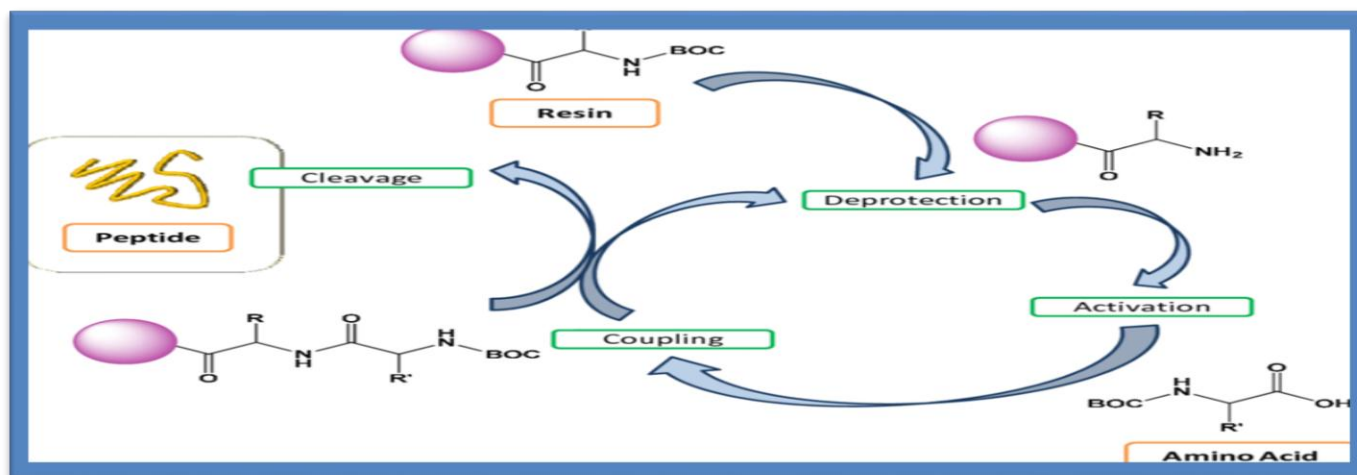


Figure7: Représentation de la synthèse en phase solide.

c-Intérêt biologique :

Le rôle principal de **déhydrodidemnine B** est d'induire l'apoptose^{3 1}. Le déhydrodidemnine interagit également avec le palmitate Thioestérase en inhibant la translocation pendant la phase d'élongation.^{2 3}

¹(en) Merrifield, Robert B., *Solid phase Peptide Synthesis.I.The Synthesis of a Tetrapeptide*, J.Am.Chem.Sos.vol.85,n°14,juillet 1963,p.249-2154.

² A b et c Max Malacria, Jean Philippe Goddard, Cyril Ollivier et Géraldine Gouhier, *Chimie supportée sur phase solide ; Technique de l'ingénieur*, 10 novembre 2008.

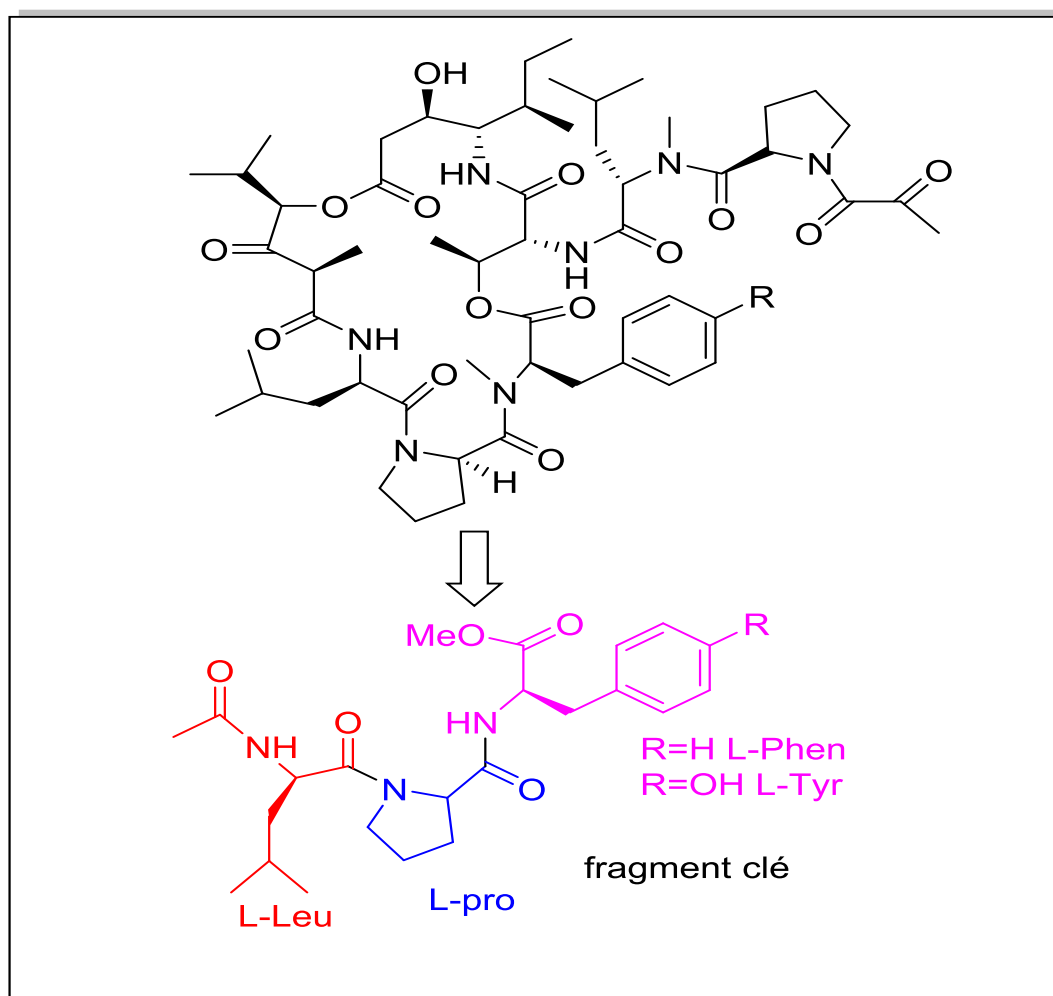
³ .(a) A.Cuadrado et al., *AplidinTM induces apoptosis in human cancer cells via glutathione depletion and sustained activation of the epidermal growth factor receptor, Src, JNK, and p38 MAPK*. *Journal of biological chemistry*, 241-250, 278(1), 2003. (b) L.F.Garcia-Fernandez et al., *AplidinTM induces the mitochondrial apoptotic pathway via oxidative stress-mediated JNK and p38 activation and protein kinase C*. *Oncogene* 7533-7544, 21(49), 2002.

d-Objectif et Plan général du travail :

L'objectif de notre travail est la synthèse de quelques dérivés de fragments du Déhydrodidemnine B, Ci-dessous dans le schéma, est indiqué l'examen retro synthétique :

La première étape de notre travail consiste à préparer une dérivée du fragment clé de la Déhydrodidemnine B qui est le tripeptide [1].

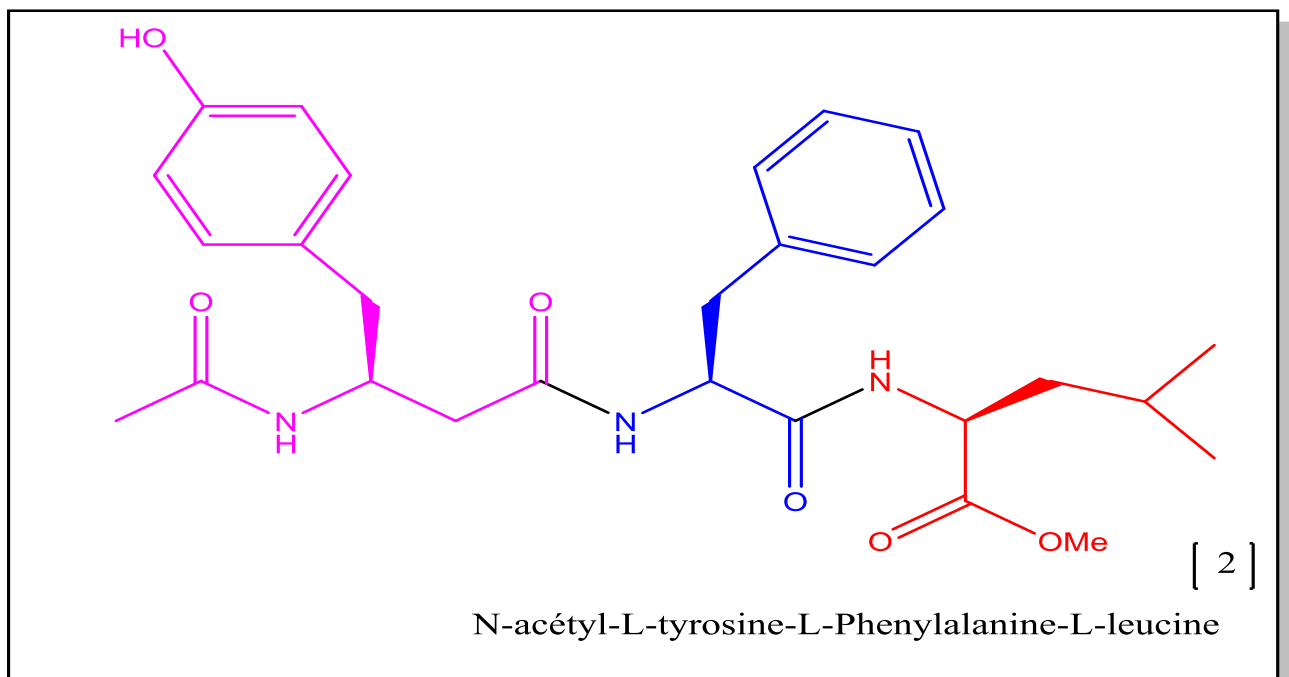
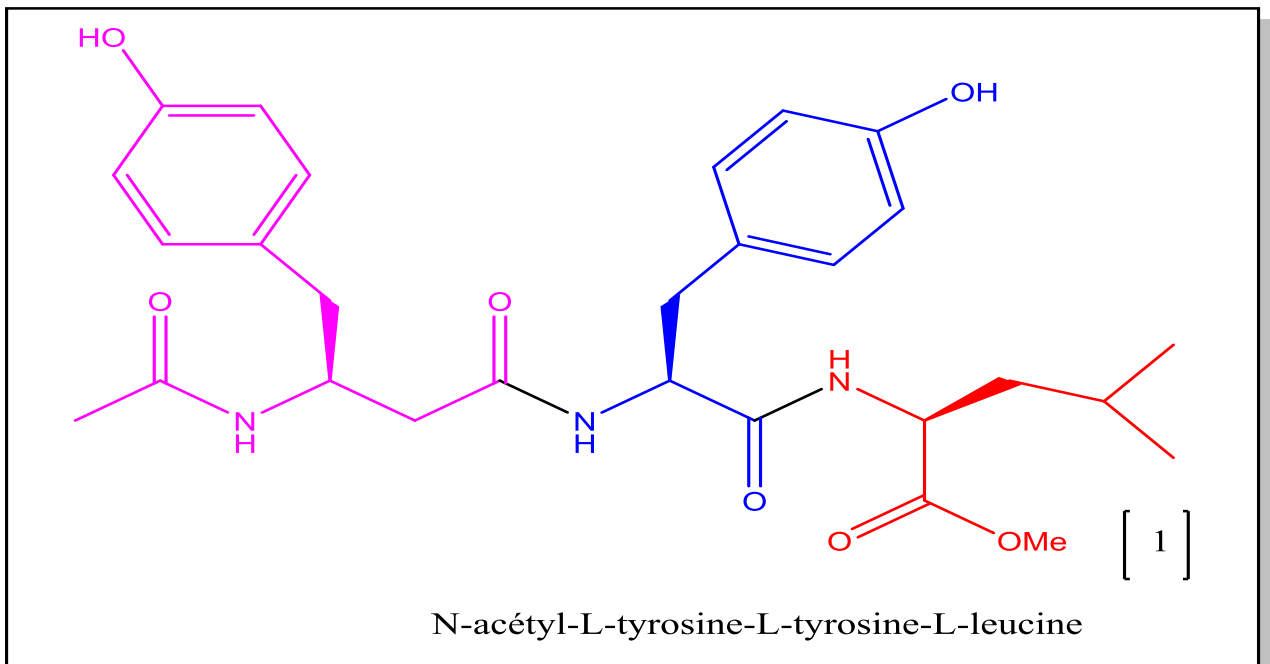
La deuxième étape de notre travail consiste à préparer un analogue du fragment [1] de la Déhydrodidemnine B qui est le tripeptide [2].



¹ .L.Bassano et al., Cell cycle phase perturbations and apoptosis in tumor cells induced by Aplidine.Br J Cancer 1510-7,86(9),2002.

².(a) Jisun Lee et al., Didemnins, tamandarins and related natural products.N a t. Prod .Rap,404, 29, 2012.DOI:10.1039/c2np00065b
(b) M.S.Alejandro et al., Marine pharmacology in2005-2006: Antitumor and cytotoxiccompounds.European Journal of Cancer , 2376 , 44, 2008.

³ Claire HAUVILLE, Produits marines et cancers: les substances en cours d'essais cliniques, 14, 2008, NANTES.



Notre travail se déroule de la manière suivante :

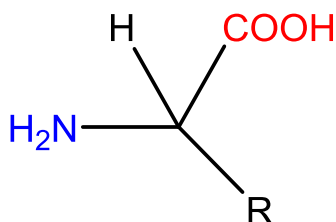
- ✓ Protection de la fonction amino de l'acide aminé : L-tyrosine.
- ✓ Estérification du carboxyle des acides aminés : L-tyrosine, L-phénylalanine, L-leucine.
- ✓ Synthèse du dipeptide.
- ✓ hydrolyse de la fonction ester en acide.
- ✓ Finalement, synthèse des tripeptides.

Résultats et Discussions

Généralités :

Un acide aminé ou aminoacide est un composé organique qui contient une fonction amine (-NH₂) et une fonction acide carboxylique (-COOH). La position de la fonction amine par rapport à la fonction acide peut varier (acides α aminés β aminés, etc.).

Ci-après la structure générale de l'acide-amino :



Exemples :

Acides aminés neutres	Acides aminés acides	Acides aminés basiques
<p>Glycine</p>	<p>acide aspartique</p>	<p>lysine</p>
<p>Alanine</p>	<p>acide glutamique</p>	<p>Alanine</p>

Pour des transformations chimiques satisfaisantes avec des acides aminés, il est souvent nécessaire de protéger un ou plusieurs groupements fonctionnels réactifs (amino, hydroxyle, thiol ou carboxyle)¹ présents sur la molécule. Chaque groupement protecteur a une spécificité de stabilité, d'attachement et d'élimination, selon les conditions opératoires².

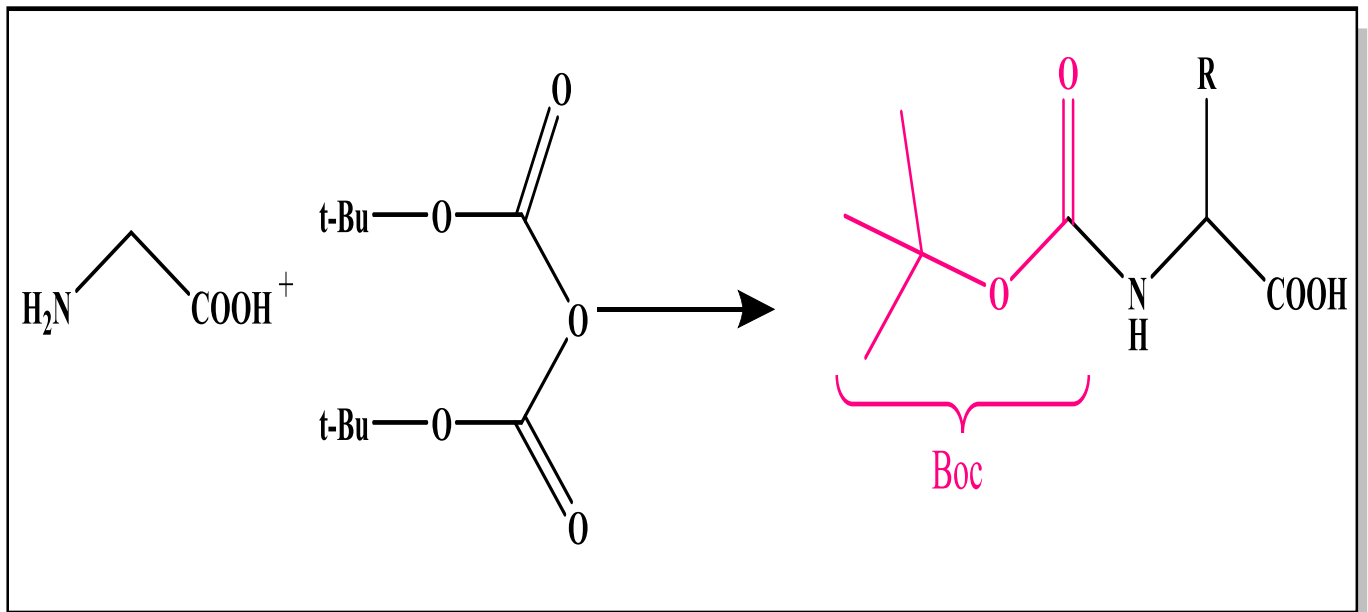
- **Protection de la fonction amino des aminoacides :**

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

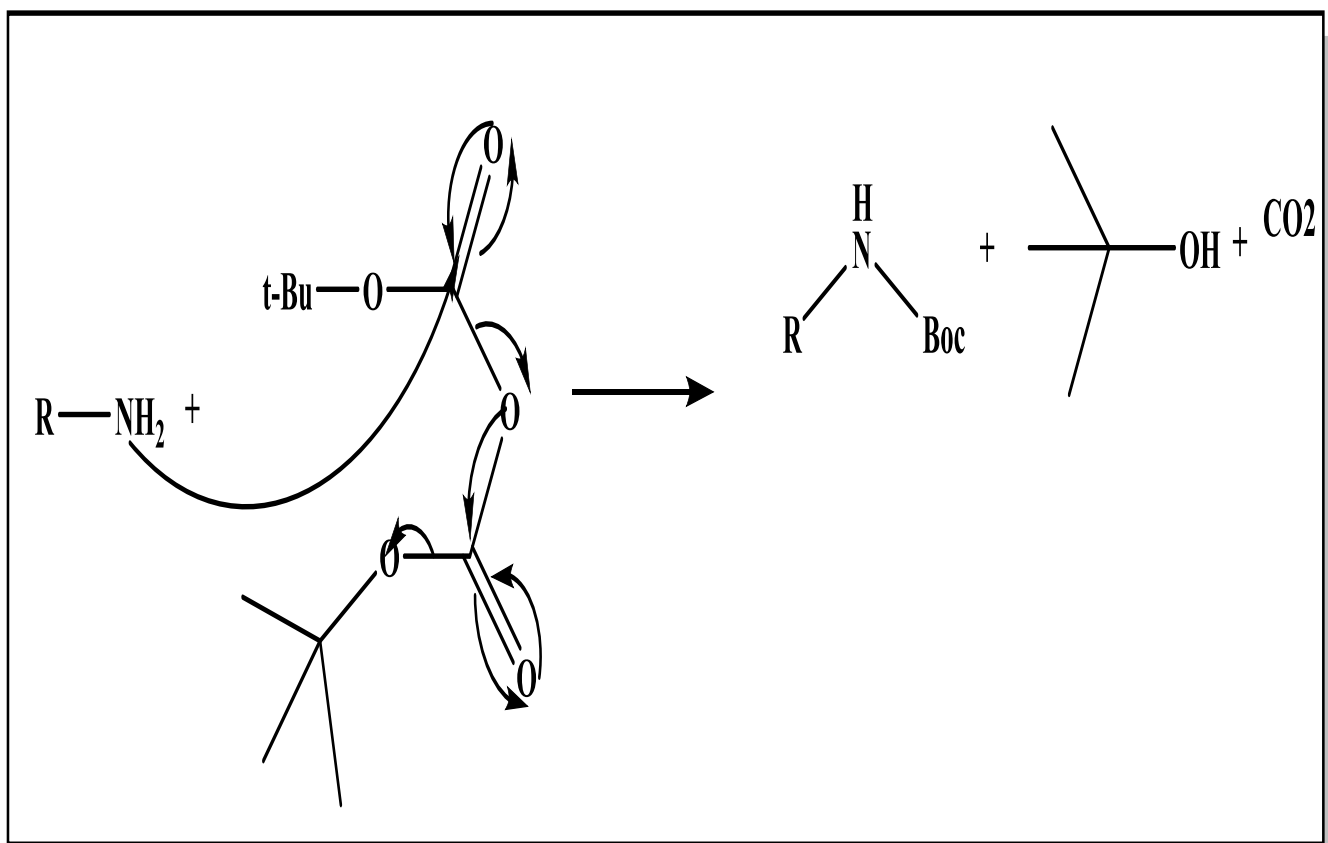
¹ M. Mikalajczyk, P. Balczewski, *Synthesis*, 659:1987.

² J. Domagala, J. Wemple, *Tetrahedron Lett*, 14:1179, 1973.

➤ Protection par t-butoxycarbonyl(Boc)¹ :

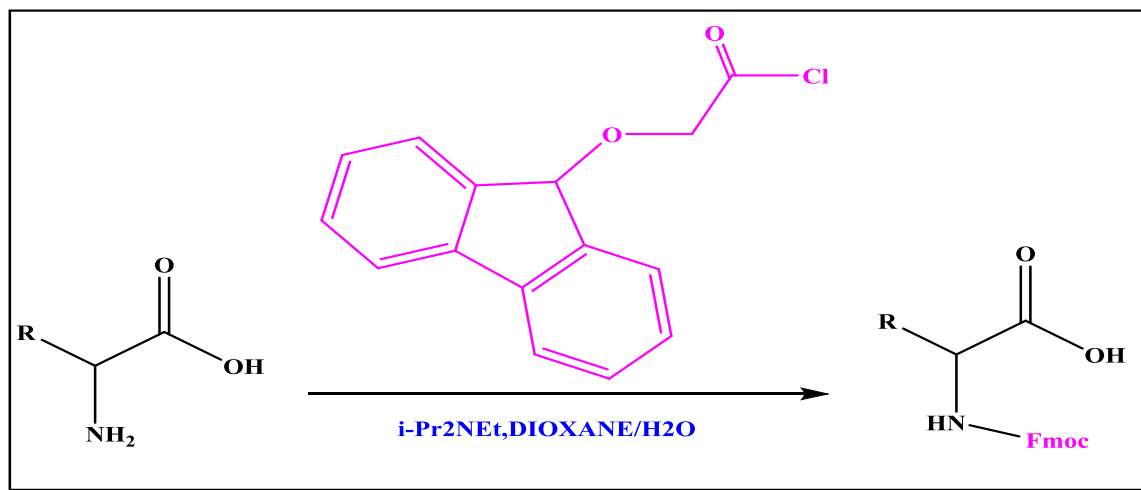


Le mécanisme de la protection par le Boc est le suivant :

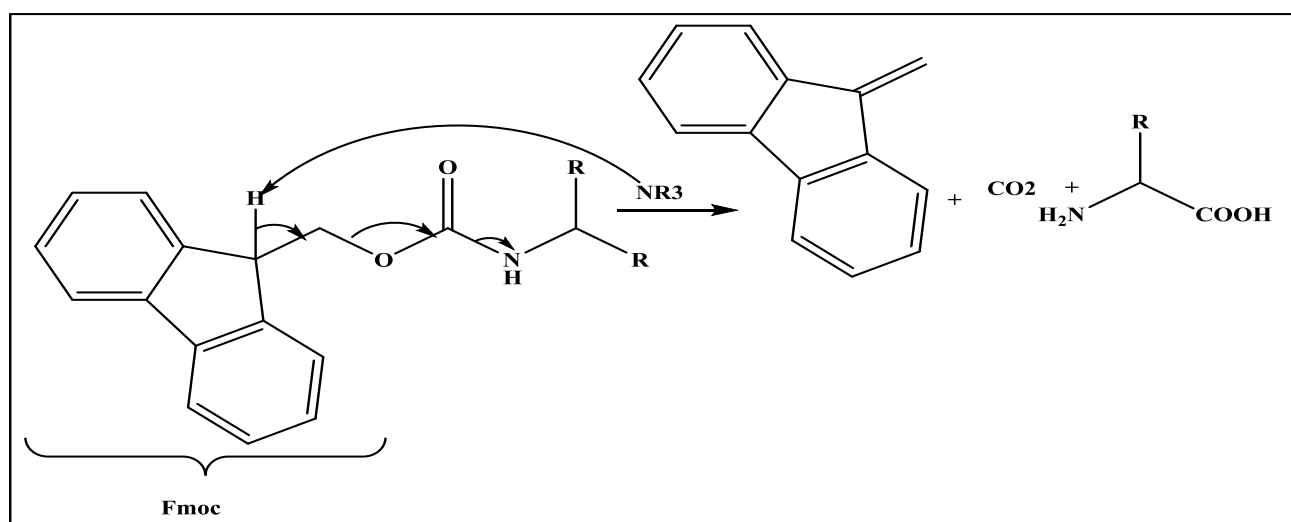


¹ M.Bodanszky, Y.S.Klausner, A.M.Ondentti, *Peptide synthesis*. Wiley, Ne York, 1976,26.

➤ Protection par le 9-Fluorenylméthoxycarbonyl (Fmoc)^{1 2 3}:



La déprotection du groupe Fmoc se fait selon le schéma suivant:

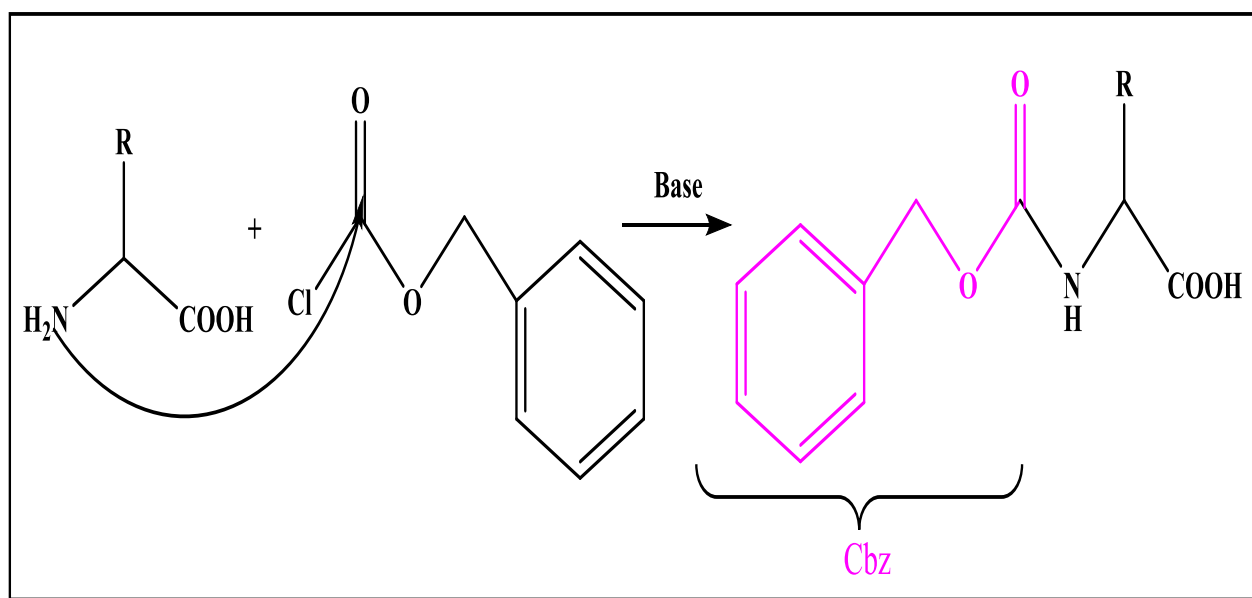


¹a.S.Tchertchian, O.Hartly, P.J.Botti, *OrgChem*.2004, 69,9208. b.E.H.Carter, L.R.Franc, W.H.Johnston *Organic Synthesis*1955, 3,167

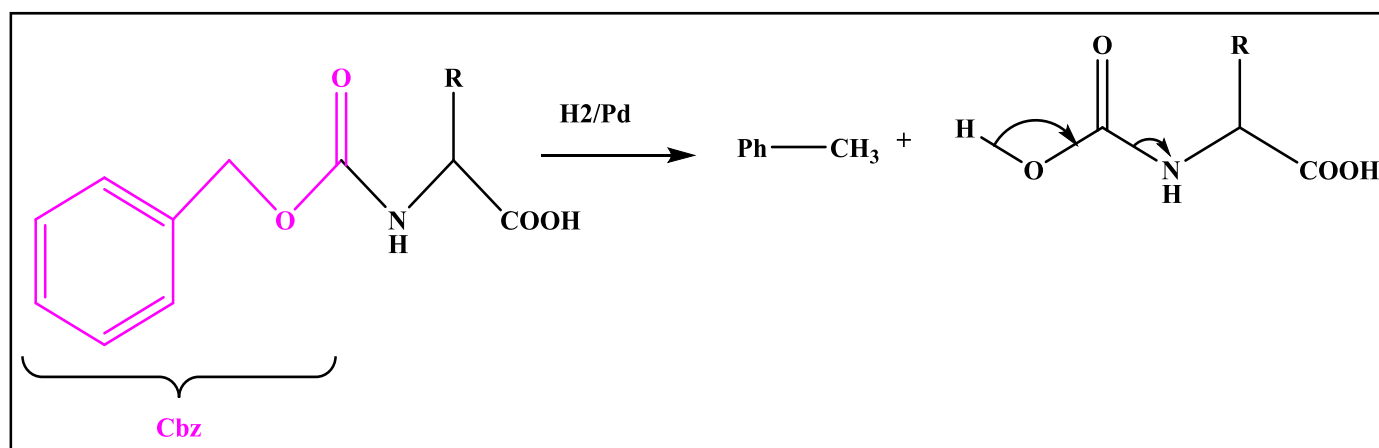
²E.Ziherton, Sheppard.R.C.inthe *Peptides*, AcademicPress : NewYork, 1987, 9,1.

³E.Kaiser, R.L.Colescott, C.D.Bossinger, *P.I.CookAnal.Biochem*.1970, 3 4 ,595.

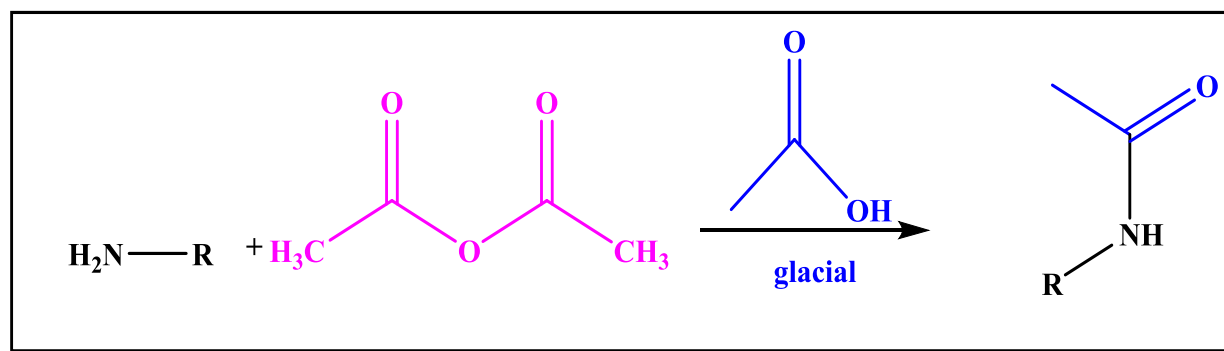
➤ Protection par le benzyloxycarbonyle (Cbz)¹⁷ :



La déprotection de groupe Cbz se fait dans les conditions opératoires suivantes : Hydrogénolyse, HBr, CH₃CO₂H.

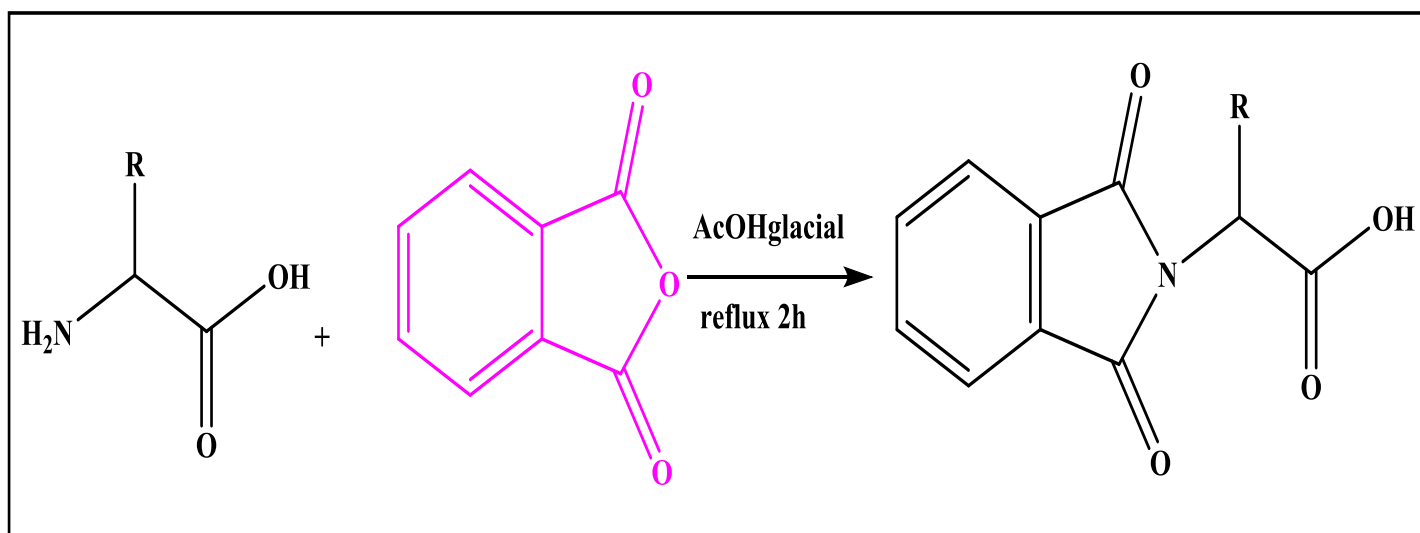


➤ Protection par l'anhydride acétique¹ :

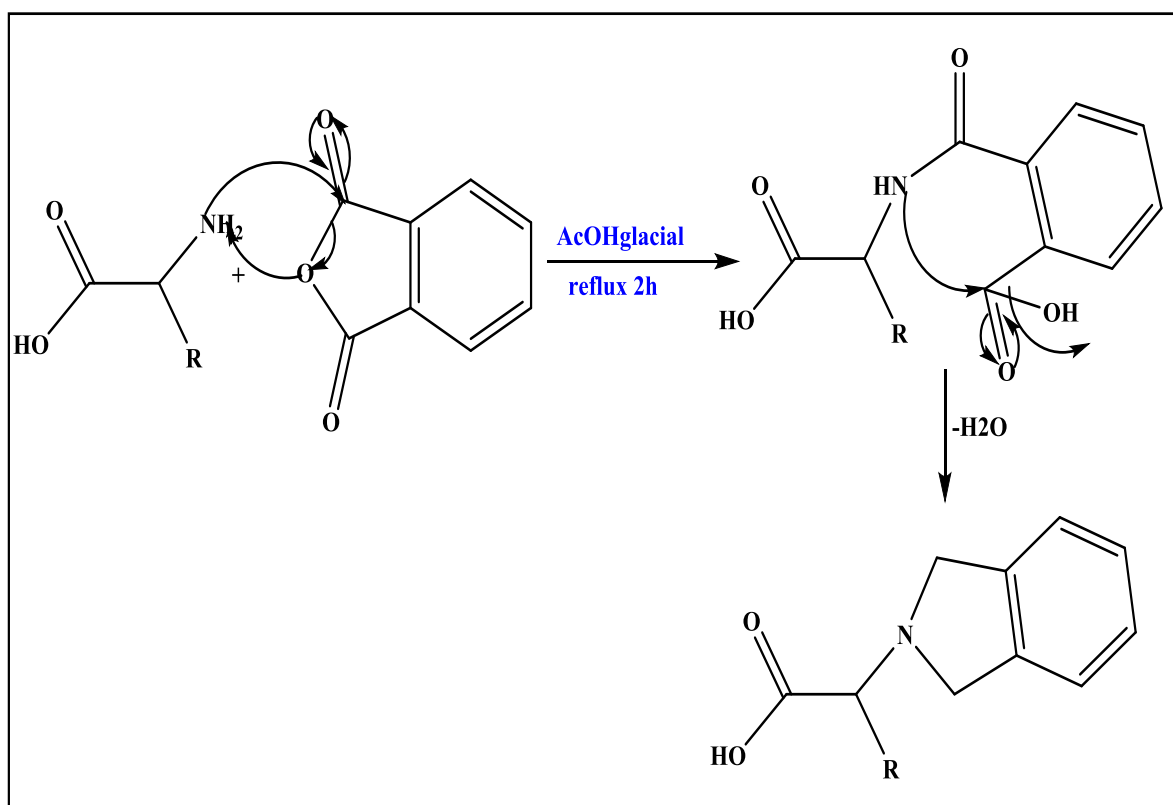


¹J.Mathieu, R.Panico Mécanismes réactionnels en chimieorganique. 1972, HermannEd.n°1357.

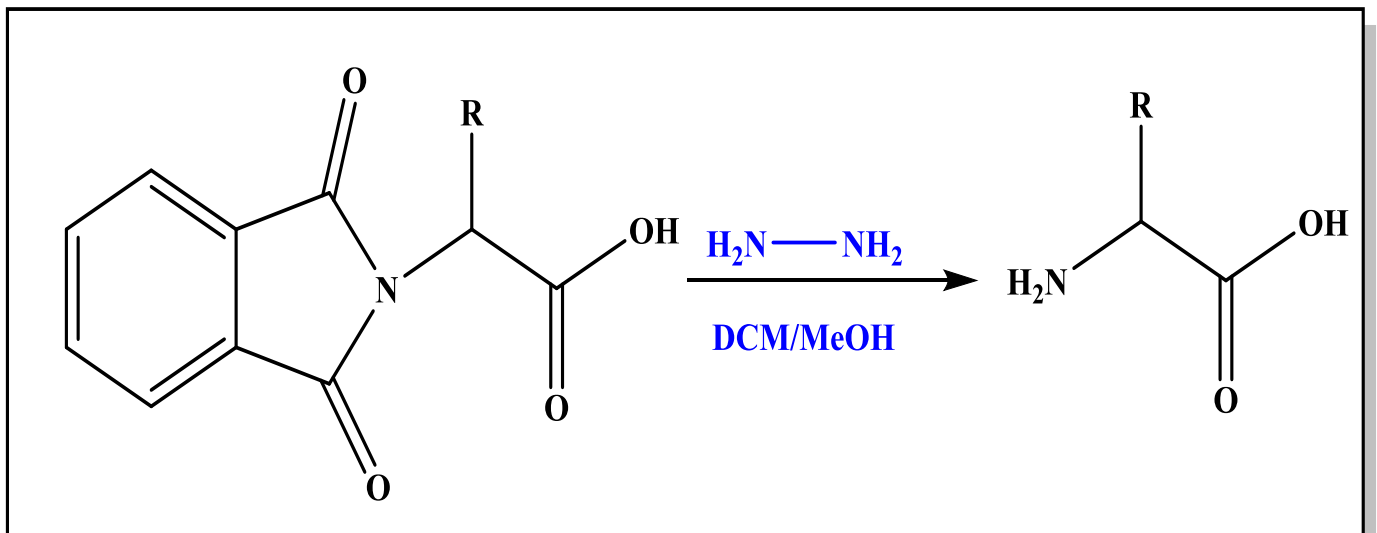
➤ Protection par l'anhydride phtalique¹⁸:



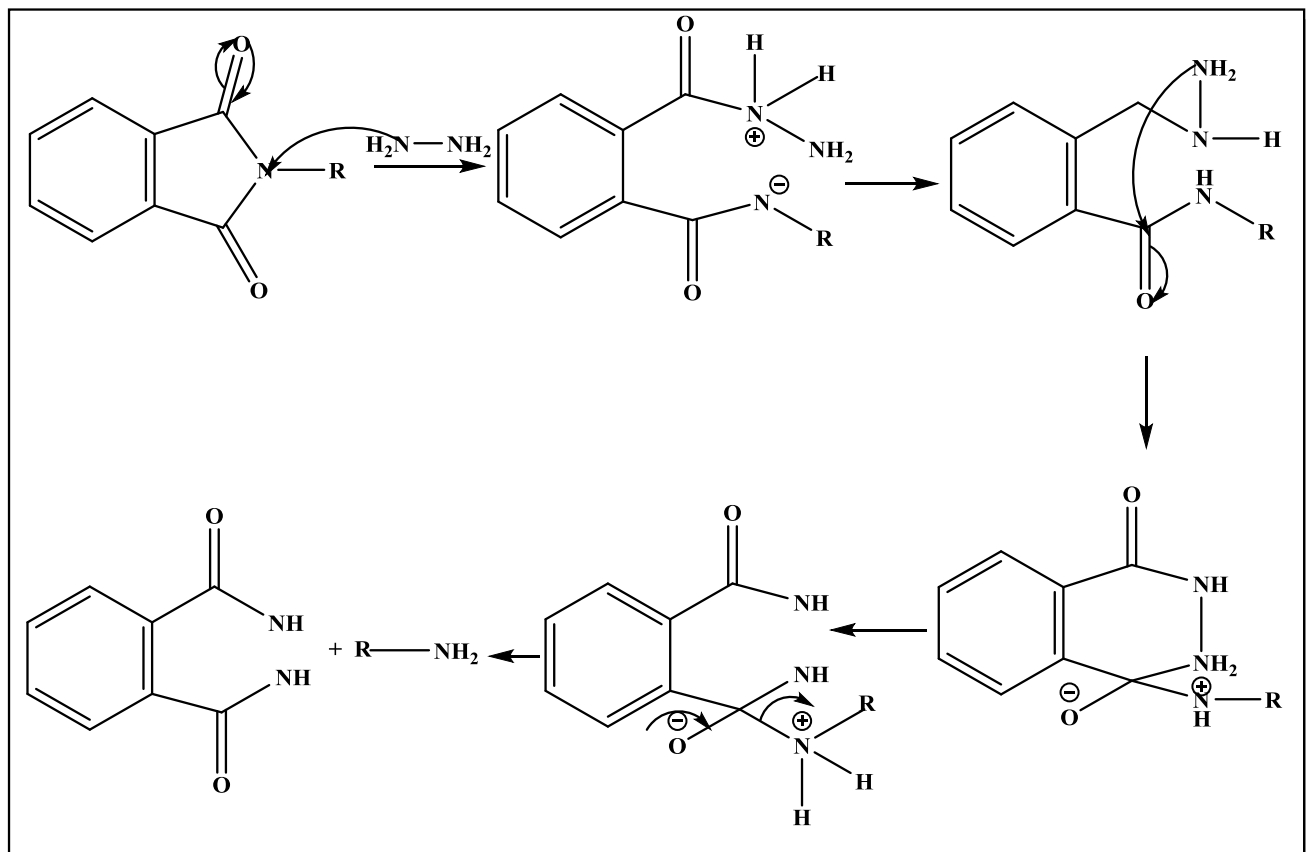
Le mécanisme de la protection est le suivant:



Le clivage du groupement phthalimido est souvent réalisé en utilisant l'hydrazine¹:



Le mécanisme de la déprotection est le suivant:



- **Protection du carboxyle des aminoacides :**

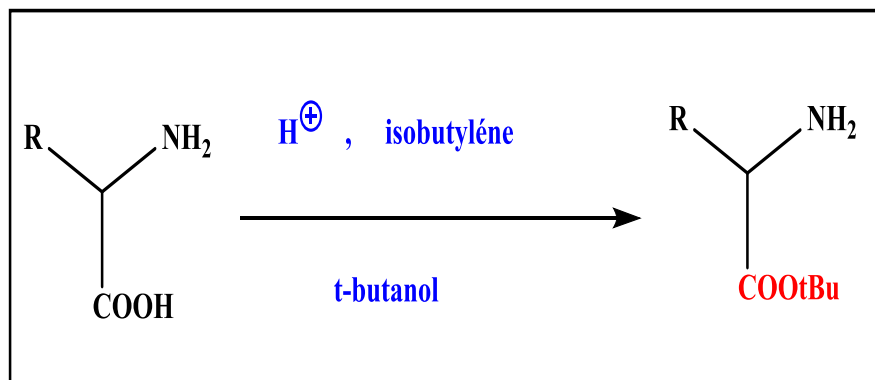
Généralement, on trouve la protection des acides sous forme d'ester, mais il existe plusieurs types d'esters et les plus utilisés sont:

¹ D.A.Kidd, F.E.King, *Nature*, 1948.62, 776

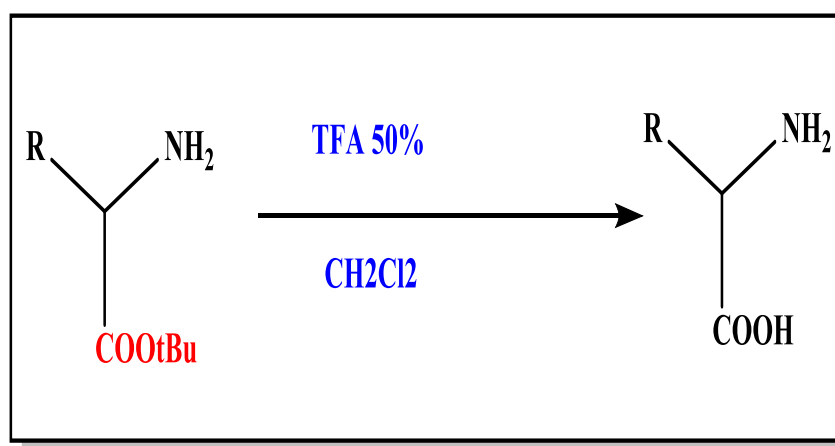
➤ **L'ester tertiobutylique:**

Dans la chimie des aminoacides et des peptides, on utilise souvent l'ester tertiobutylique qui peut être facilement éliminé avec l'acide trifluoroacétique (TFA).^{1 2}

Protection :

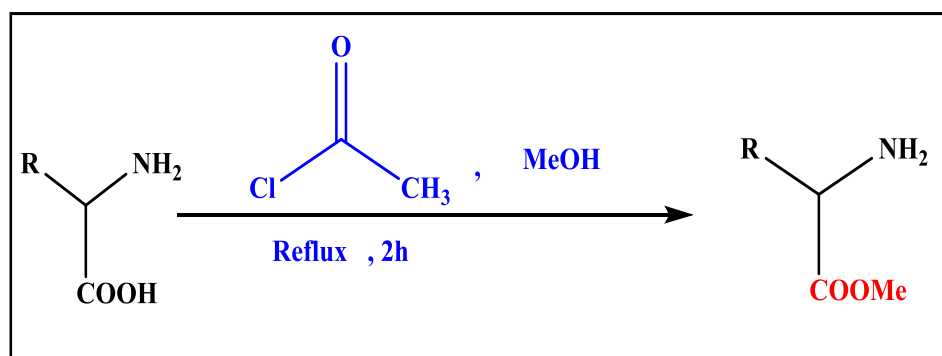


Déprotection :



➤ **Ester méthylique :**

Protection³ :

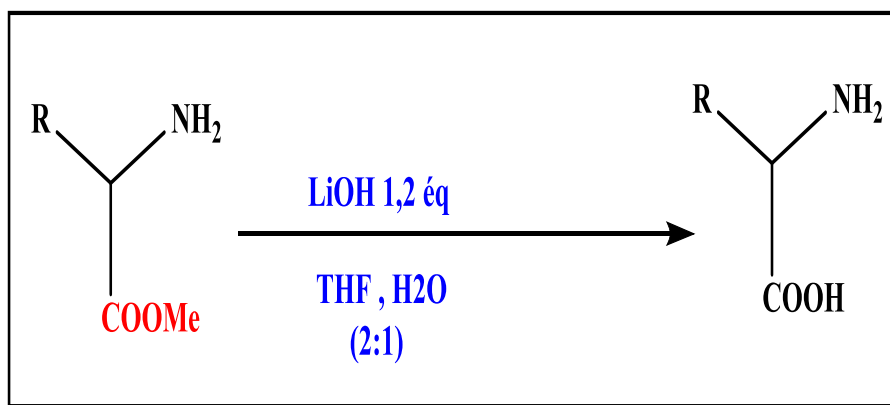


¹ McCloskey, A.L. Fonken, G.S.; Klüber, R.W.; Johnson, W.S. *Org.Synth.* 1 :261, 1963.

² Bryan, D.B. Hall, R.F. Holden, K.G. Huffman, W.F. *Chem.Soc.* 99:2353, 1977.

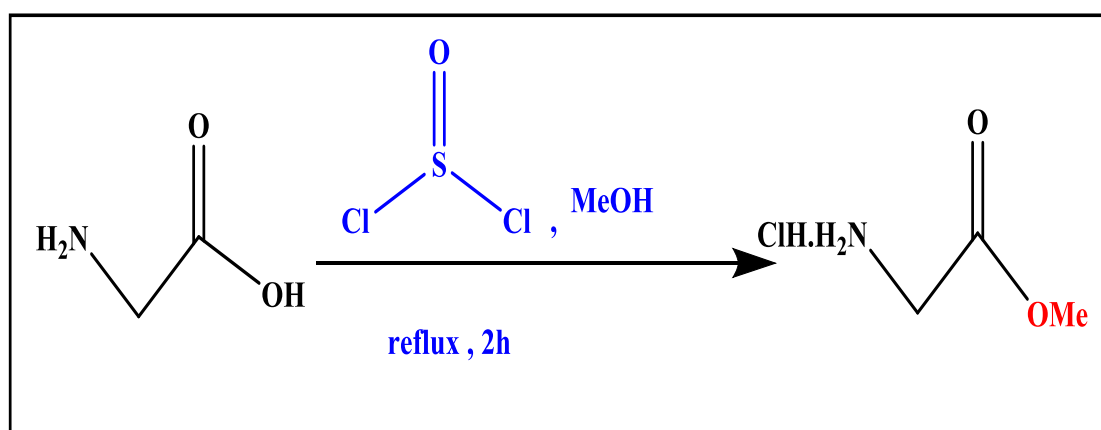
³ Danishefsky, S. Harayama, T. Berman, E. *Chem.Soc.* 100:6536, 1978.

Déprotection¹ :

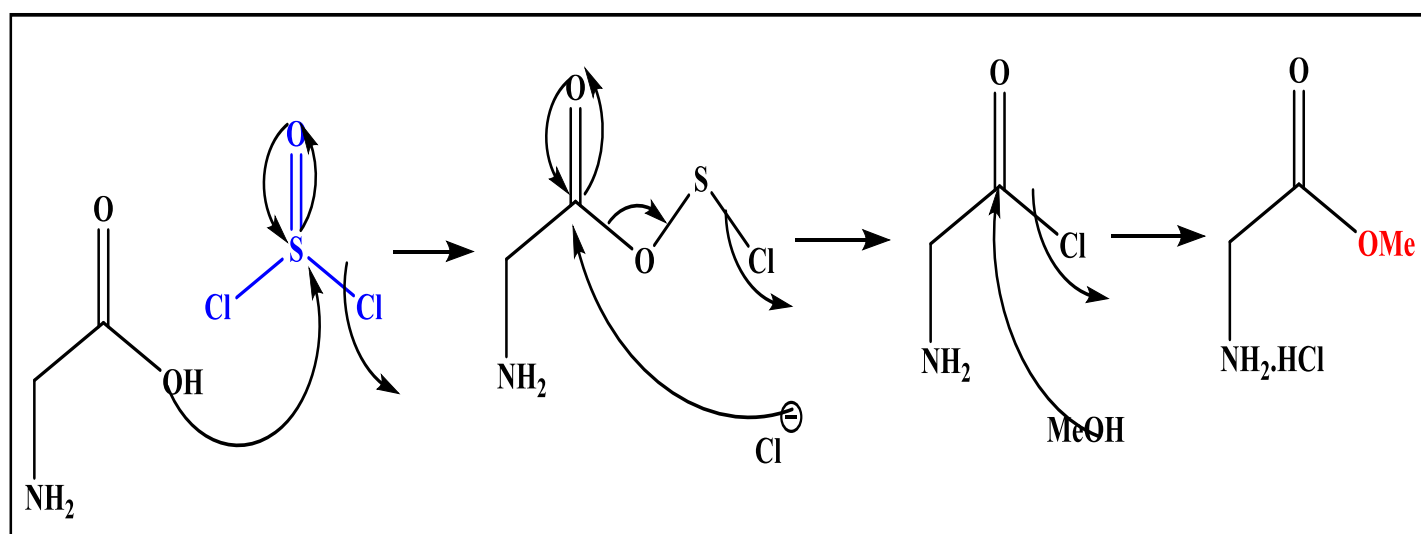


➤ Le chlorure de thionyle (SOCl₂) :

Protection :



Mécanisme de protection :



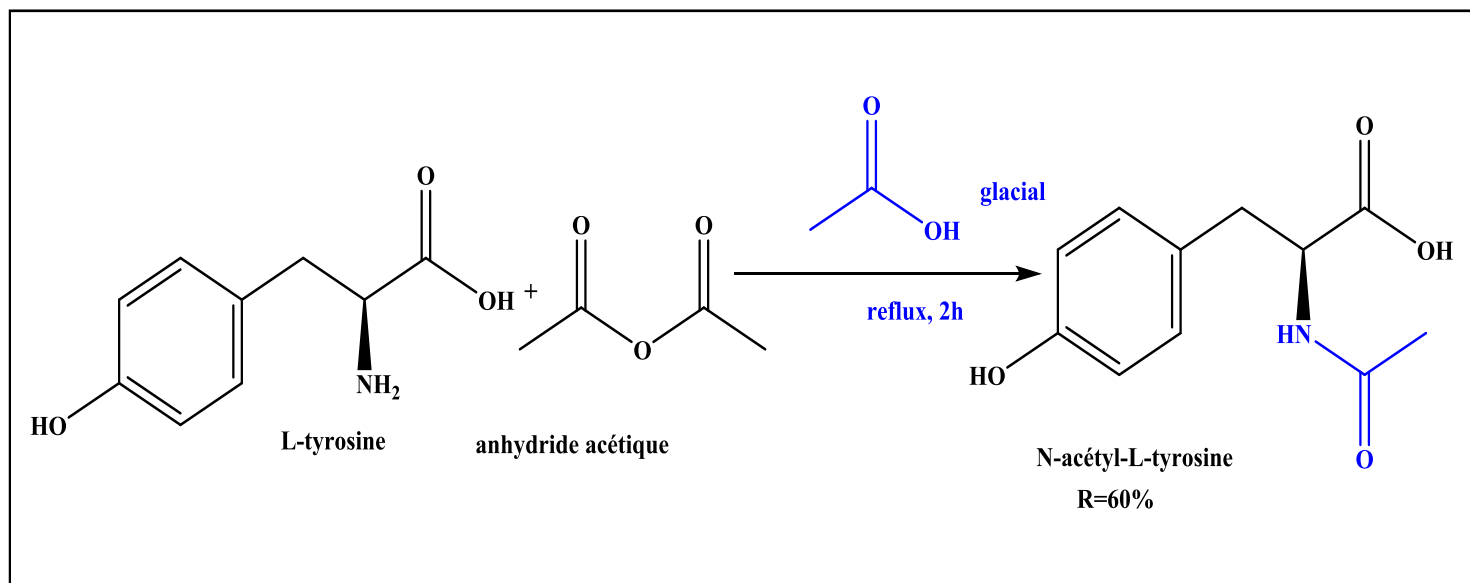
¹ Corey, E. J. Szekely, I. Shiner, C. S. *Tetrahedron Lett.* 3529, 1977.

- **Protection effectuée :**

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

Le groupement protecteur l'anhydride acétique dans l'acide acétique glacial sous un reflux de deux heures fournit un N-acétyl-acide qui est purifié par la suite.

Concernant notre travail on va protéger **L-tyrosine par l'anhydride acétique** :

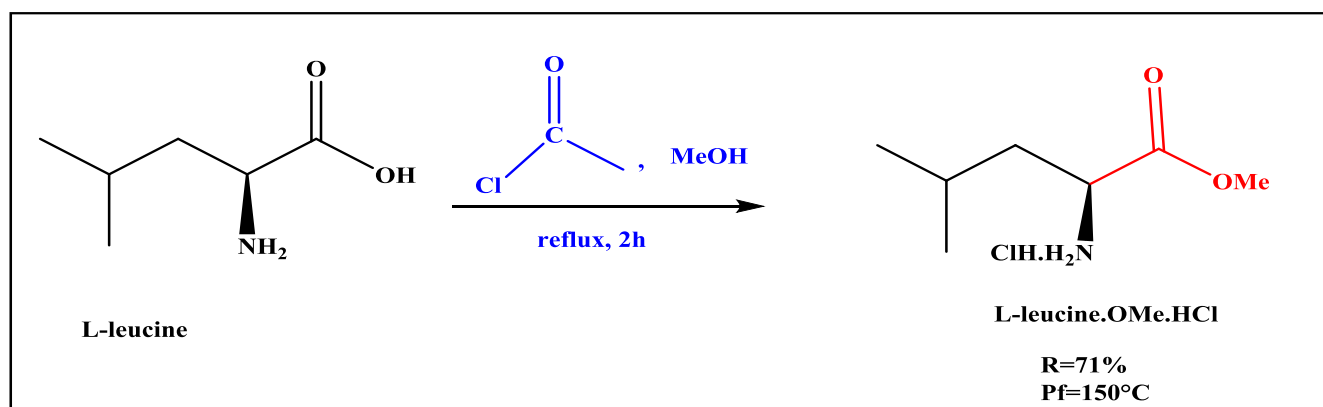
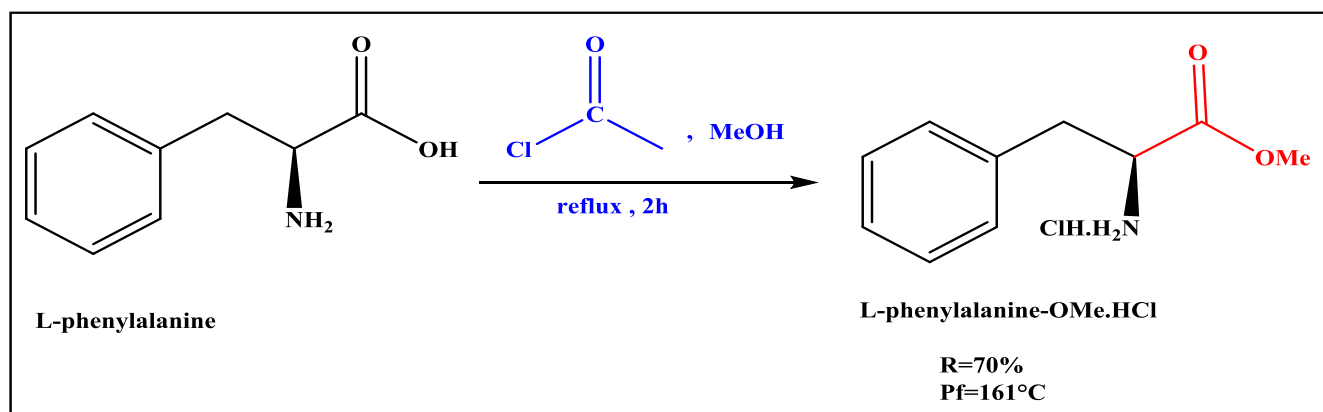
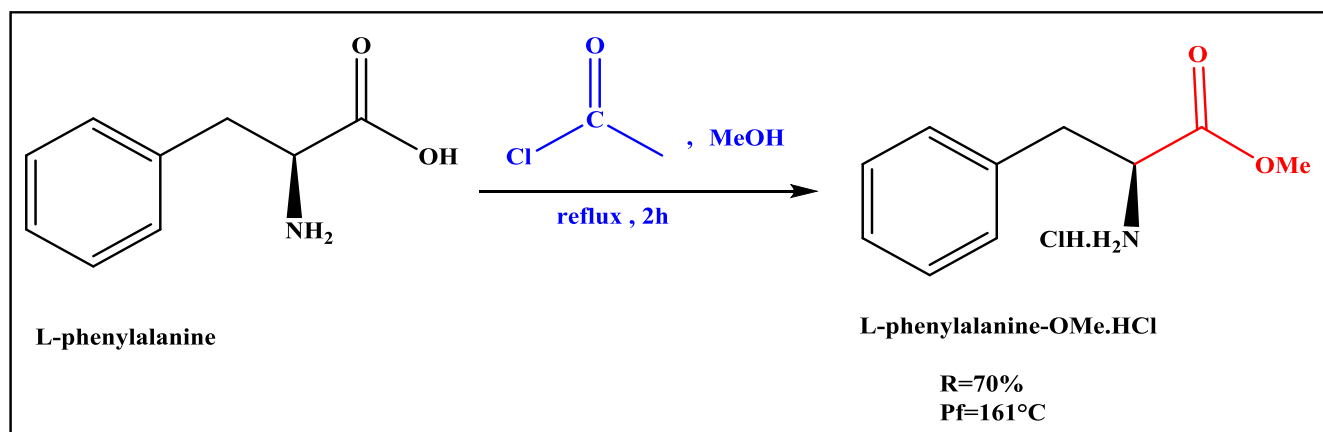


À propos de la fonction acide, nous nous intéressons à la bloquer avec un groupement méthylique afin de pouvoir associer un autre amino-acide protégé. Ainsi, un amino-acide dans le chlorure d'acétyle et le méthanol sous un reflux de deux heures fournit un ester méthylique.¹

- **Estérification effectuée :**

Les estérifications de la tyrosine, phénylalanine et leucine sont effectuées conformément à ce dernier procédé.

¹Danishefsky, S. Harayama, T. Berman, E. Chem.Soc. 100:6536, 1978.

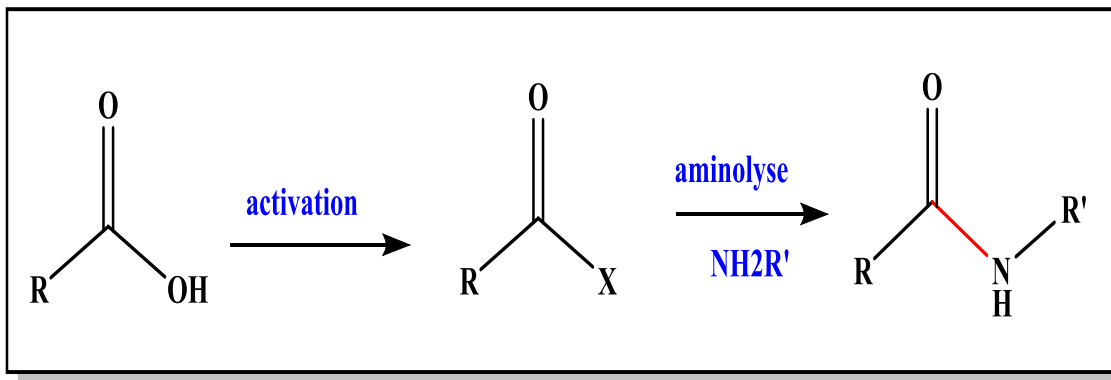


- **Couplage peptidique :**

La synthèse peptidique comprend un large éventail de techniques et procédés, permet la préparation de molécules qui convertissent de petits peptides en protéines grande taille. Cette section se concentre sur les réactifs de couplage.

Une étape clé dans le processus de production de peptides est la formation de liaisons peptides. Cela nécessite l'activation de l'acide carboxylique, qui généralement utiliser des réactifs de couplage peptidique. Etablir une connexion un peptide entre deux fragments d'acides aminés est l'un des réactions les plus importantes en chimie organique et bioorganique.¹

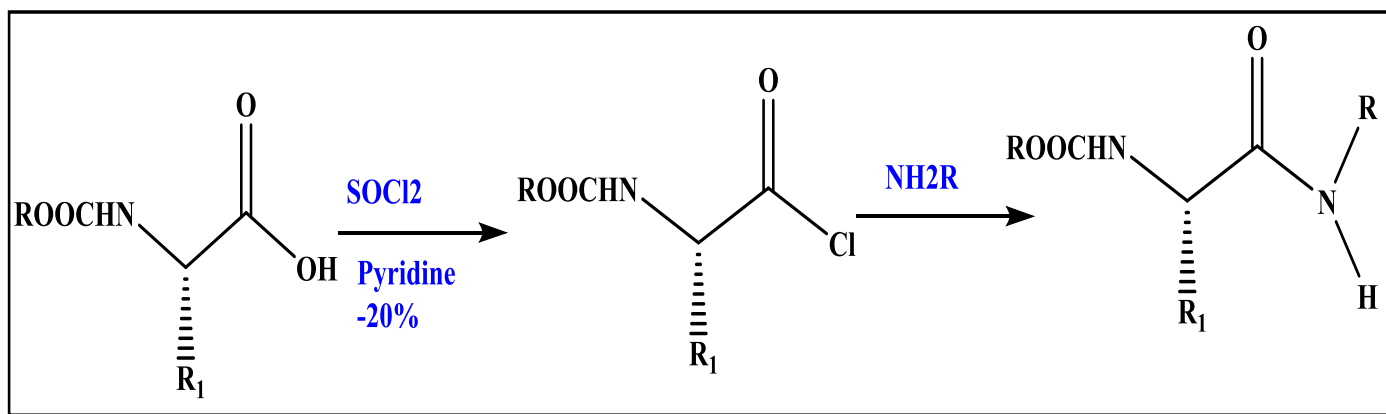
¹ Carpino LA et al. *Peptide Synthesis via amino acid halides*. *Acc.Chem.Res.* 29: 268, 1996.



Différentes procédures de couplage peptidique sont employées ; nous nous limitons aux méthodes les plus utilisées :

➤ **Chlorures d'acides :**

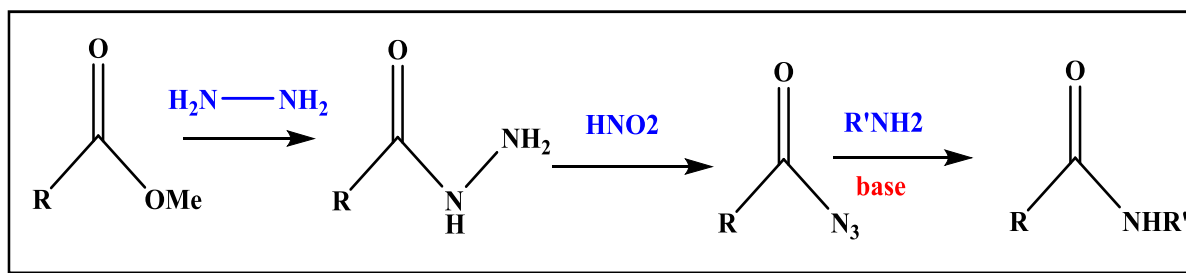
Les chlorures d'acides sont des bons réactifs de couplage, qui sont obtenus généralement par action du SOCl_2^1 , COCl_2^2 , PCl_3 , POCl_3 , ou PCl_5^3 .



➤ **Les Acylazides :**

Réaction de Curtius :

Cette réaction de couplage est la première qui respecte la chiralité des acides aminés, qui a été mise au point par Curtius.⁴ Cette méthode n'est pas très importante car la réaction est lente et génère de nombreux produits secondaires.



¹ W. Chu, Z. Tu, E. McElveen, J. Xu, M. Taylor, R.R. Luedtke, R. H. Mach. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13:77.

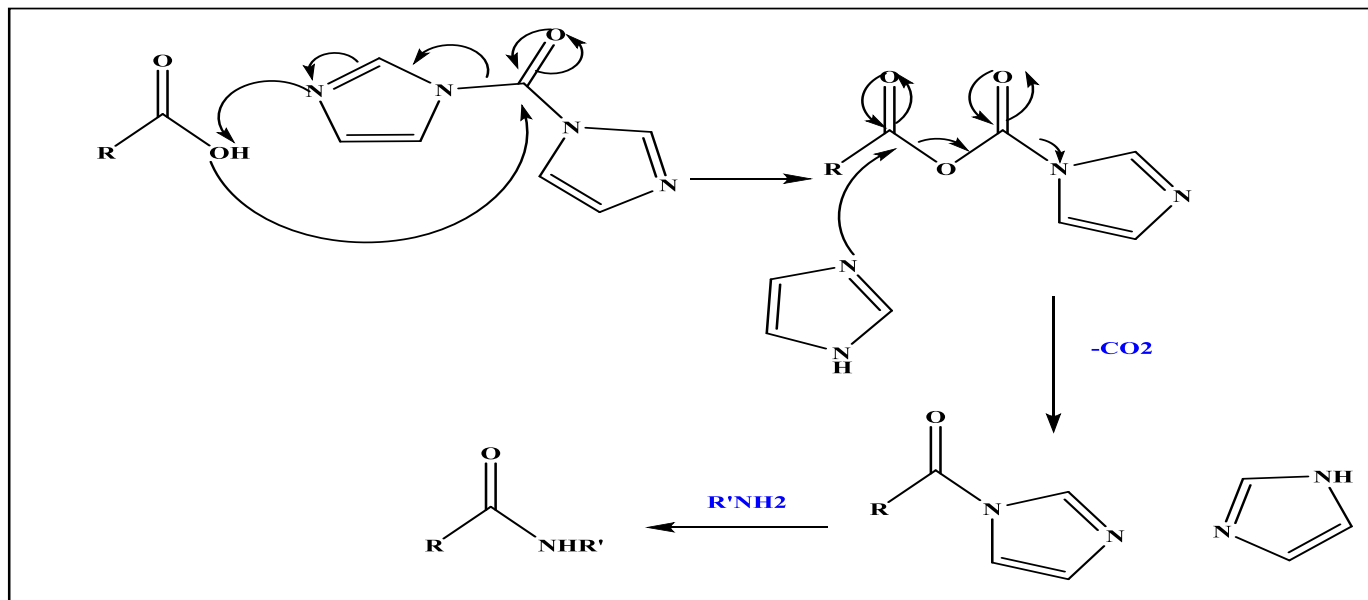
² I. Kuwajima, H. Urabe. *Organic Syntheses*, Wiley: New York. **1993** Collect. VIII, 486.

³ J. Klosa. *Prakt. Chem.* **1962**, 19: 45.

⁴ T. Curtius. *Chem. Ber.* **1902**, 35: 3226.

➤ Acylimidazole (DCI) :

DCC c'est le réactif le plus accessibles a fait ressortir par la recherche de meilleur réactif de couplage. Cependant, d'autres ont été développés comme le diimidazole(**DCI**)¹. C'est un agent de couplage utile dans la synthèse des peptides, des esters et des thioesters².



➤ Anhydrides :

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

Parmi les anhydrides symétriques on peut citer le **DCC** qui est largement utilisable :

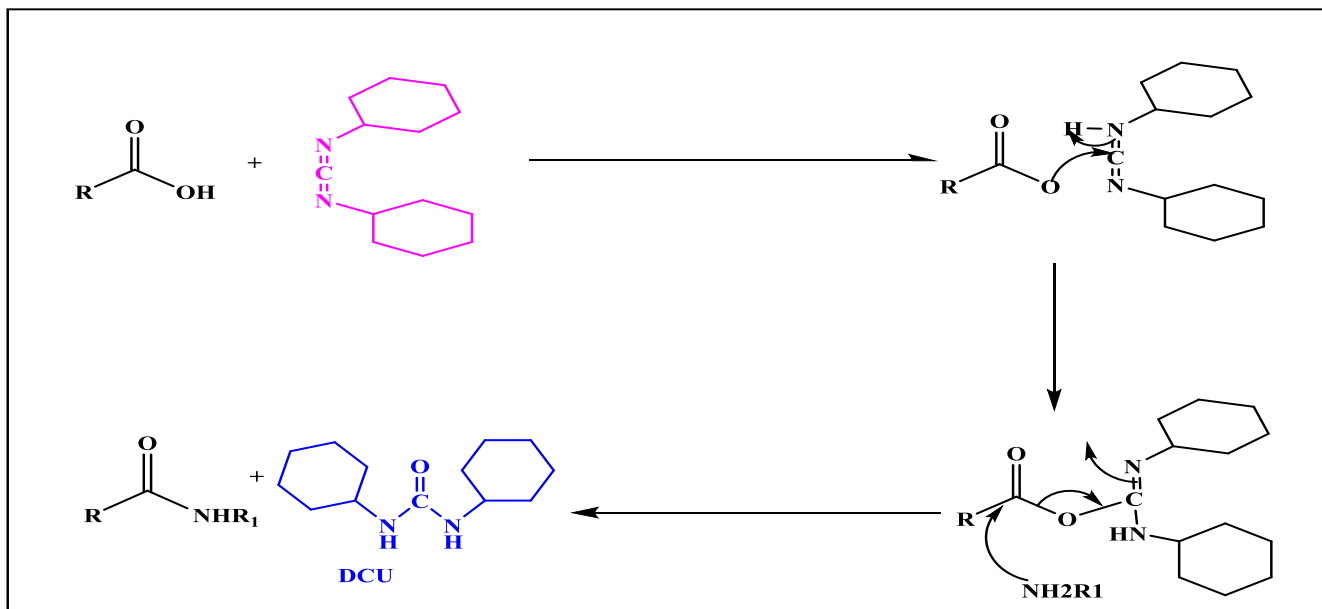
N, N-dicyclohexylcarbodiimide composé organique de formule chimique C₁₃H₂₂N₂ son utilisation principale est le couplage des aminoacides durant la synthèse peptidique. Il existe sous la forme de cristaux blancs dur, l'odeur douce, dans les conditions normales. à faible température de fusion ce matériau est fusionner qui permet d'être fondu pour faciliter la manipulation. il est insoluble dans l'eau, mais il est hautement soluble dans le **DCM**, **THF**, **DMF** et l'acétonitrile.^{3 4}

¹Anderson, GW, Paul, R. A New Reagent For Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 80:4423, **1958**.

²Poduska, K. Gross, H. *Chem, Ber.* 49:527, **1961**.

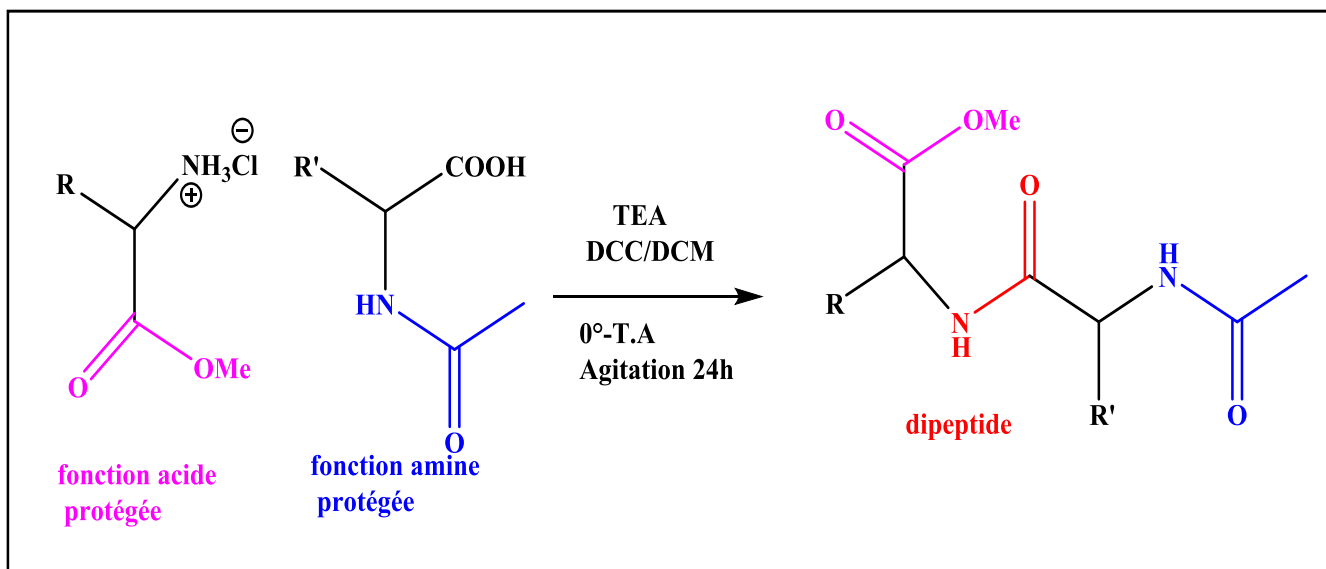
³Kim.MH, Patel.DV, as reagent for mild and efficient preparation of esters. *Tetrahedron Lett.* 35: 5603, **1994**.

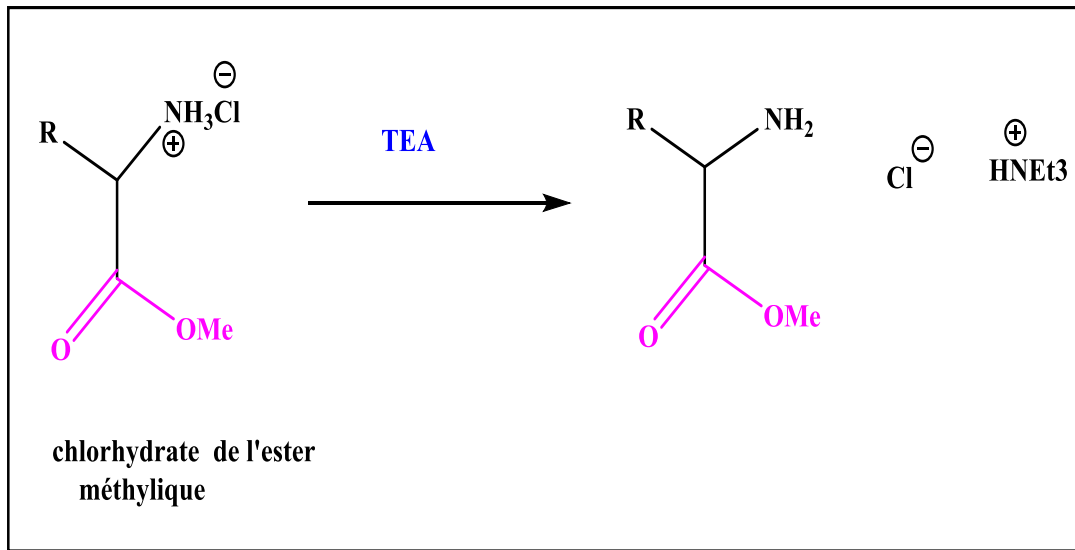
⁴Prasad KVSRG, Bharathi K and Haseena, 8, 1, **2011**; Article-021.



- **Couplage effectue :**

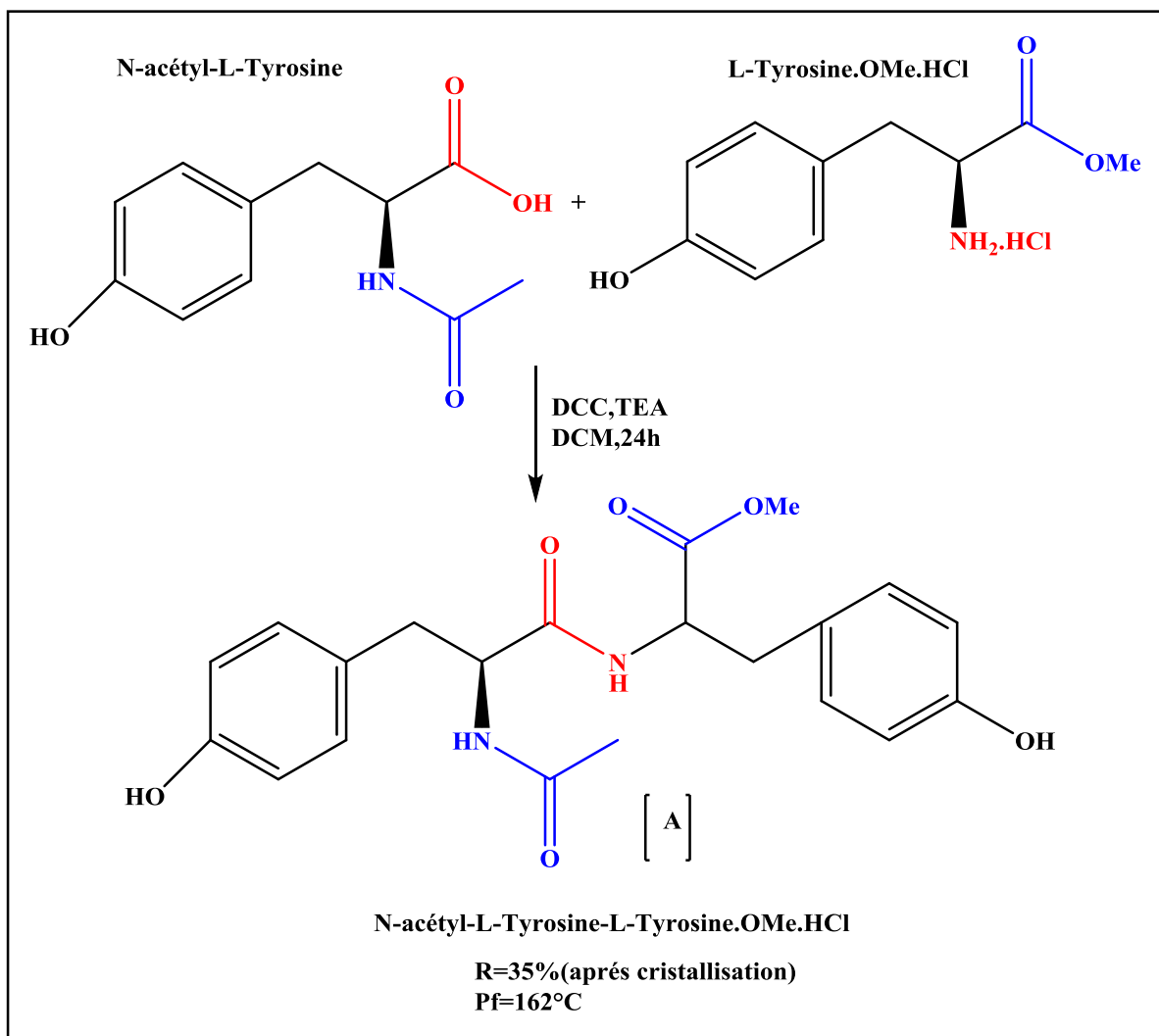
Dans cette synthèse, les dipeptides obtenus ont été préparés par un couplage entre deux acides aminés : l'un des deux porte une fonction amine protégée et la fonction acide libre et le contraire pour le deuxième aminoacide, avec le **DCC** en présence de la triéthylamine(**TEA**), afin de neutraliser le chlorhydrate de l'acide aminé utilisé sous forme ester dans cette synthèse. À la fin le **DCU** formée est éliminée par filtration. Le couplage peptidique en présence de **DCC** se fait selon le schéma suivant :





La synthèse de la dipeptide [1] se déroule comme présenté dans la schéma suivant :

Couplage N-acétyl-L-tyrosine-L-tyrosine.OMe.HCl



On a suivi le couplage de ce dipeptide préparés par CCM comme présente ci-dessus :

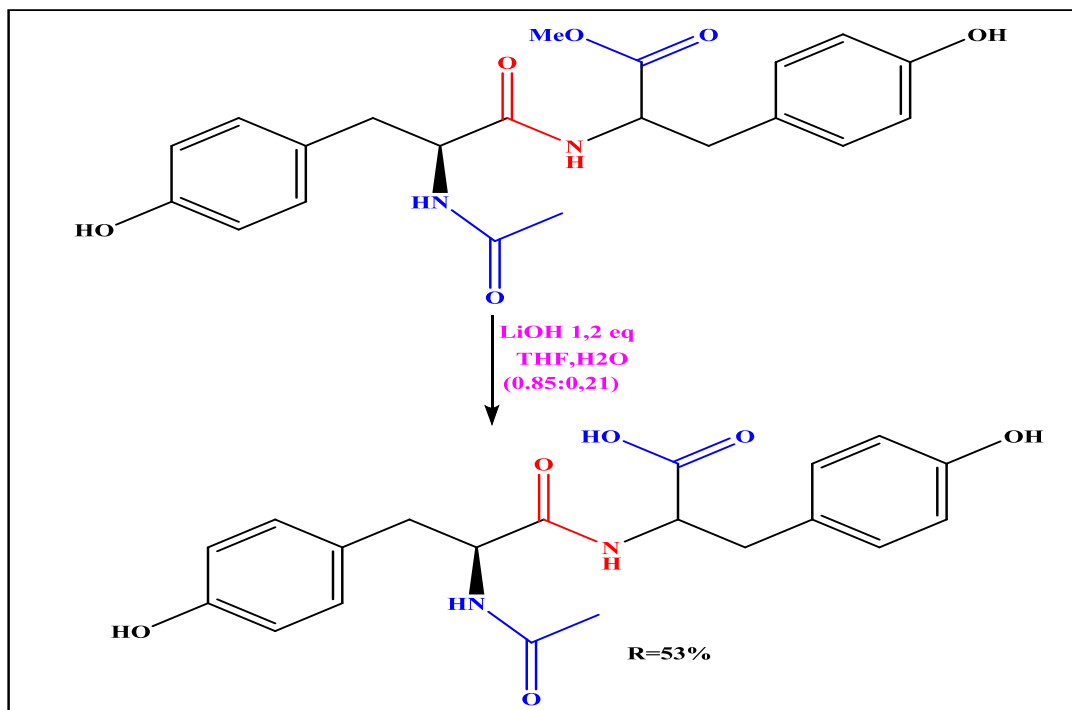


Cette plaque CCM pour le couplage de dipeptide [A], l'éluant utilisée c'est DCM avec l'acétate d'éthyle (4 :6).
Rf =0,39

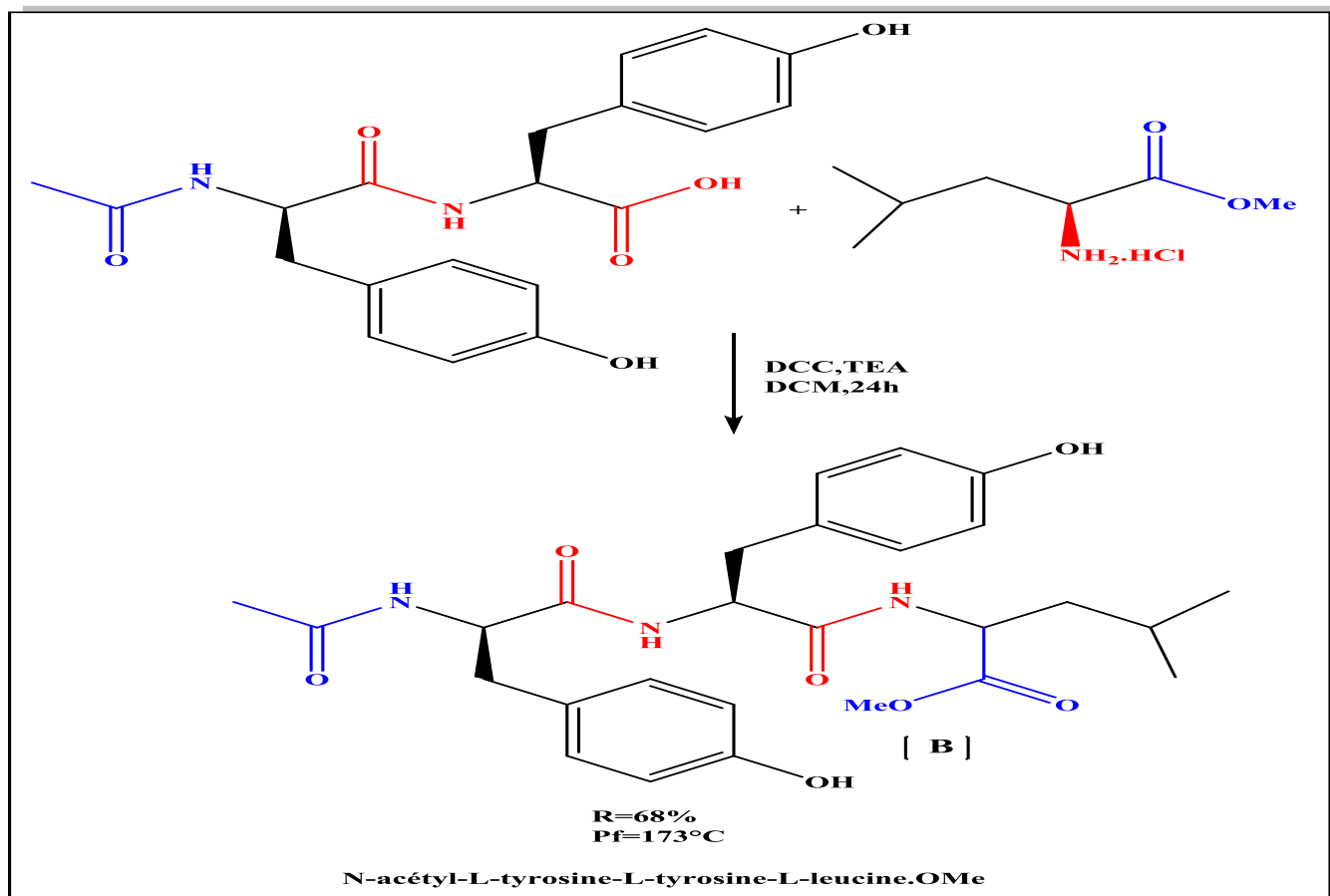
Pour la synthèse du tripeptide, il faut avoir un dipeptide libre à une extrémité. Nous avons retenu une voie de synthèse pour le faire :

Hydrolyse de la fonction ester en acide : il faut dissoudre le dipeptide dans un mélange THF/ H₂O, puis on ajoute l'hydroxyde de lithium sous une agitation pendant une nuit.³³

Hydrolyse de la fonction ester de dipeptide N-acétyl-L-Tyrosine-L-Tyrosine. OMe :



Le schéma suivant présente la synthèse de tripeptide concerné pour notre travail :



Le suivi du couplage du tripeptide [B] par CCM comme suite :

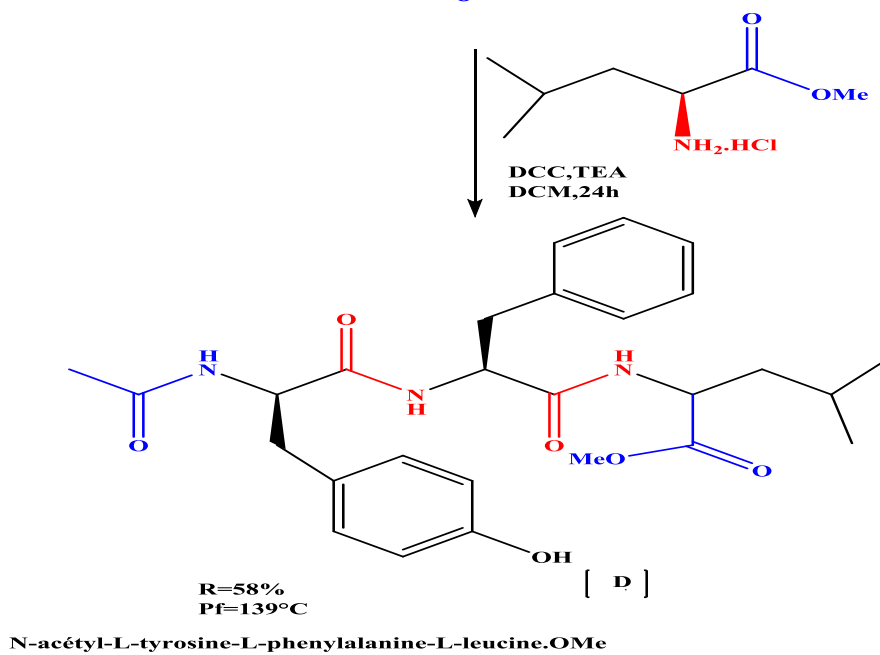
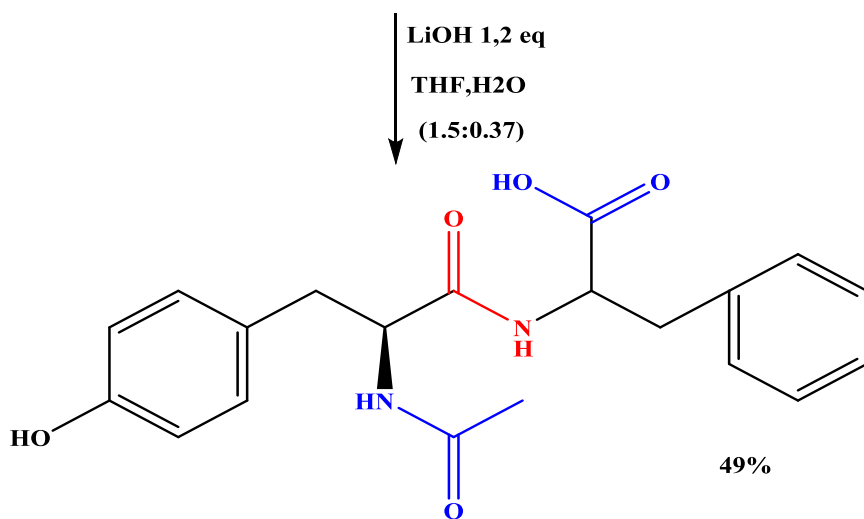
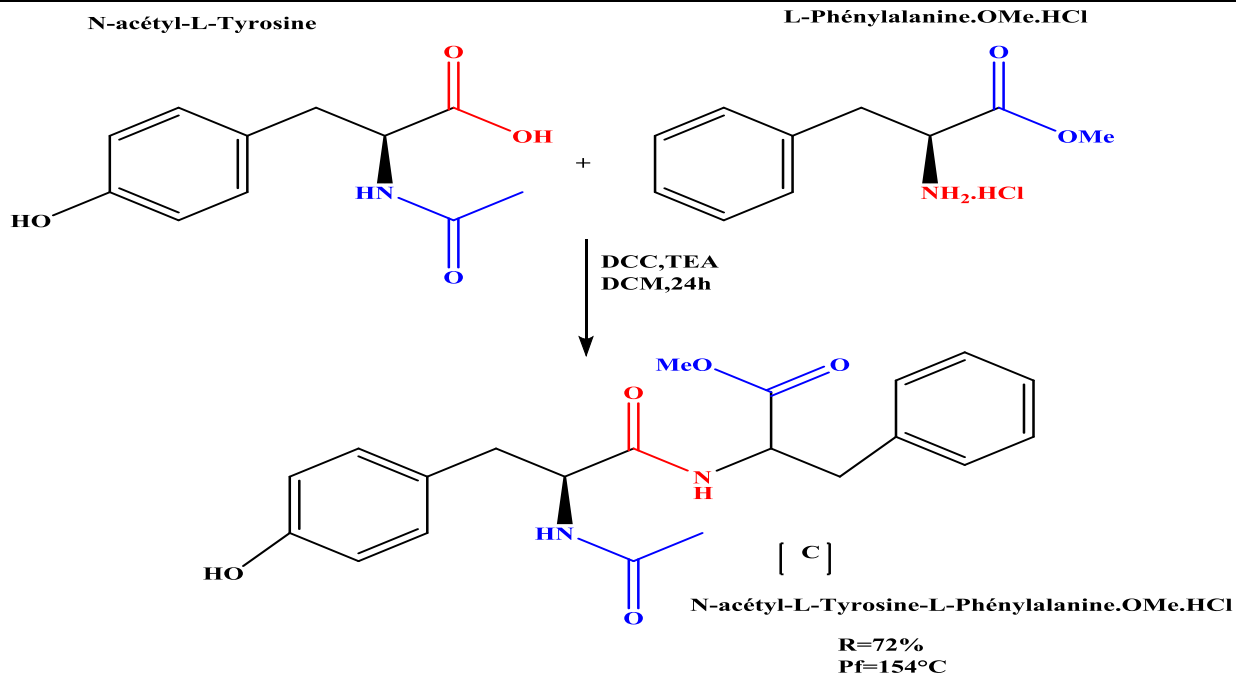


L'éluant est acétate
d'éthyle avec éther (2:3)
Rf=0,3



L'éluant est acétate
d'éthyle avec hexane (2:3)
Rf=0,25

Synthèse du tripeptide [2] : N- acétyl-L-tyrosine-L-phénylalanine-L-leucine.OMe.HCl.



Pour le dipeptide [c], on 'a fit des essais pour avoir le bon éluant :



L'éluant de cette plaque est DCM avec l'acétate d'éthyle (2 :3).
Rf=0,4



L'éluant utilisée est acétate d'éthyle avec hexane (2:3).
Rf=0,41

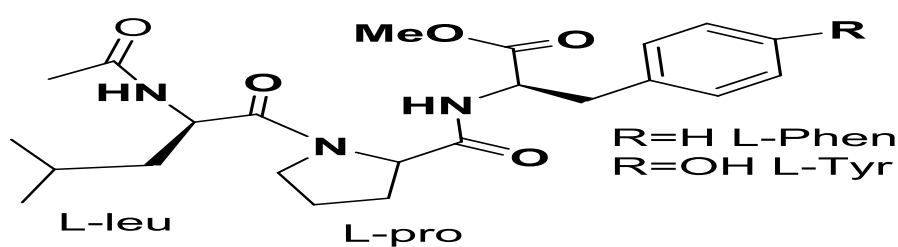


L'éluant utilisée est acétate d'éthyle avec l'éther (2 :3).
Rf=0,53

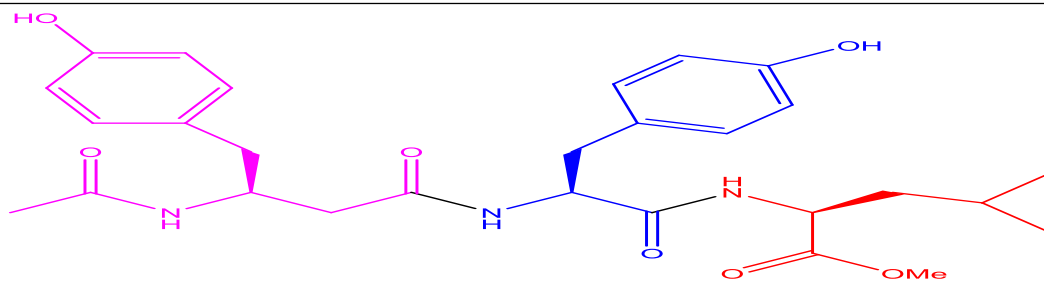
CONCLUSION GENERALE

Un grand nombre de squelettes de base sont des peptides modifiés et synthétisés ont abouti à des substances potentiellement biologiquement actives qui peuvent représenter de nouveaux médicaments thérapeutiques. Notre thèse porte sur la préparation des quelques dérivées de fragment de la plitidepsine, inducteur de l'apoptose. Le fragment clé de la plitidepsine est un tripeptide constitué de trois acides aminés :

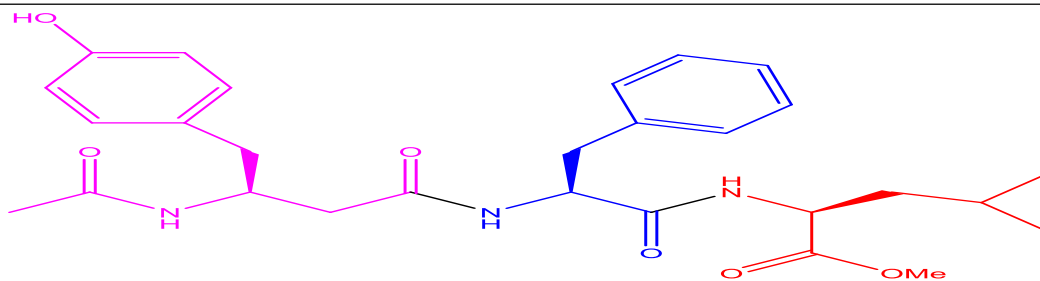
L-leucine, L-proline, L-tyrosine. Nous utilisons d'autres acides aminés (L-tyrosine, L-phénylalanine, L-leucine) pour former une courte bibliothèque chimique analogues potentiels. Ces tripeptides ont été obtenus selon le schéma de synthèse disponible avec des réactifs disponibles en laboratoire.



le fragment clé de DBB



N-acétyl-L-tyrosine-L-tyrosine-L-leucine.OMe



N-acétyl-L-tyrosine-L-Phenylalanine-L-leucine.OMe

Les deux tripeptides synthétisés nous permet non seulement d'essayer la synthèse des analogues de la plitidepsine a également réalisée construction de peptides cycliques d'intérêt pour la recherche cancérothérapie et obtenir des antibiotiques peptidiques.

Partie expérimental

❖ Appareils utilisés :

✚ Infrarouge :

L'obtention des spectres infrarouge (**FTIR**) lors de l'analyse sur l'appareil de type **Perkin Elmer** avec les conditions ci-contre: nombre de balayage **10**, résolution de **4 cm⁻¹** et avec un temps d'analyse de **0.25 min**. Les échantillons étaient traités sous forme de pastilles de **KBr**. Les principales fréquences d'absorption sont données en nombre d'ondes (**4000-400**) **cm⁻¹**.

✚ Chromatographie sur couche mince :

Cette technique est réalisée sur des plaques de silice sur support d'aluminium. Différents mélanges utilisés pour réaliser l'élution en proportions variables selon le cas (DCM : acétate d'éthyle), (éther : acétate d'éthyle), (hexane : acétate d'éthyle). La révélation est effectuée suivant observation en ultraviolet.

✚ Température de fusion :

Le banc Köfler est utilisé pour déterminer le point de fusion.

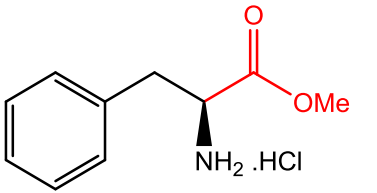
✚ Protocoles de la synthèse :

N-acétyl-L-tyrosine : R=OH

Formule brute : C ₁₁ H ₁₃ NO ₄	
Masse molaire : 223,23 g/mol	
Liquide jaune visqueux	
Litt : Pf=149°C.	
Cas : 537-55-3	

Peser 2g de L- tyrosine (9.6mmol) et préparer le mélange 1.05 ml (11.03) d'anhydride acétique dans 50ml d'acide acétique glaciale, après on les met dans un ballon avec un réfrigérant, et on porte à reflux pendant 2h. Après le refroidissement du mélange réactionnel, évaporation du solvant sous pression réduite. Obtention de 1,62g (75%) du composé.

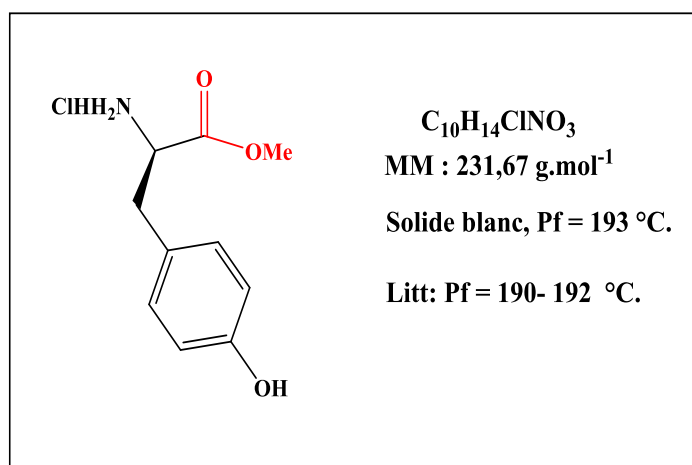
L-Phénylalanine-OMe. HCl : R =H

Formule brute : $C_{10}H_{14}ClNO_2$	 L-phenylalanine-OMe.HCl
MM : 215.68g/mol	
Solide blanc, Pf=160°C	
Litt : Pf=158-162°C	

On verse 50ml de MeOH, dans un ballon sec ; on met la solution dans un bain glace. 5,59ml de chlorure d'acétyle est ajouté goutte à goutte dans la solution précédente. 5 min agitation du mélange réactionnelle préparé. On pèse 3g de L-phénylalanine (18,16mmol) sont ajoutés dans une seule proportion, après le mélange a porté en reflux pendant 2h. Refroidissement du mélange à température ambiante, évaporation du solvant sous pression réduite. Obtention 2.79g du produit.

- **IR v_{max} (KBr) cm⁻¹**: 1747,15 (C=O de l'ester); 1242,05 (OMe) ; 3309,24 (NH₂)

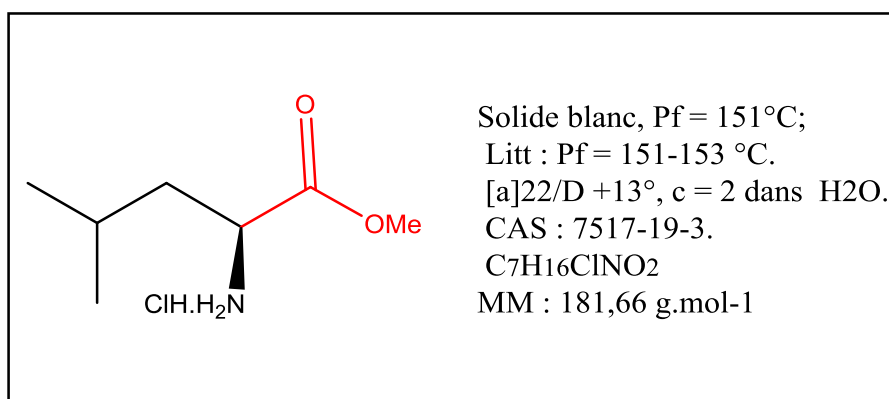
L-Tyrosine-OMe. HCl: R =OH.



On verse 50ml de MeOH, dans un ballon sec ; on met la solution dans un bain glace. 5,10ml de chlorure d'acétyle est ajouté goutte à goutte dans la solution précédente. 5 min agitation du mélange réactionnelle préparé. On pèse 3g de L-tyrosine (16,56mmol) sont ajoutés dans une seule portion, après le mélange a porté en reflux pendant 2h. Refroidissement du mélange à température ambiante, évaporation du solvant sous pression réduite. Obtention 3.14g du produit.

- **IR v_{max} (KBr) cm⁻¹**: 1743,56 (C=O de l'ester); 1225,00 (O-Me) ; 3013,07 (NH₂); 3341,91 (OH de phénol).

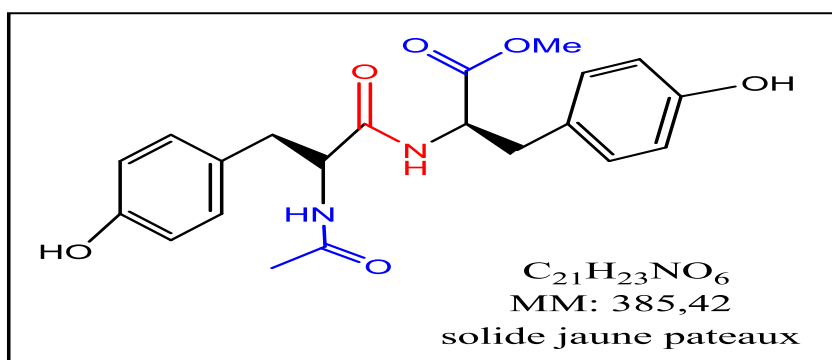
L-leucine.OMe.HCL.



. On verse 25ml de MeOH, dans un ballon sec ; on met la solution dans un bain glace. 8ml de chlorure d'acétyle est ajouté goutte à goutte dans la solution précédente. 5 min agitation du mélange réactionnelle préparé. On pesé 1.5g de L-leucine (11,5mmol) sont ajoutés dans une seule portion, après le mélange a porté en reflux pendant 2h. Refroidissement du mélange à température ambiante, évaporation du solvant sous pression réduite. Obtention 1.50022 du produit.

- **IR v_{max} (KBr) cm⁻¹**: 1737,43 (C=O de l'ester); 2957,77 ; 3400(NH₂).

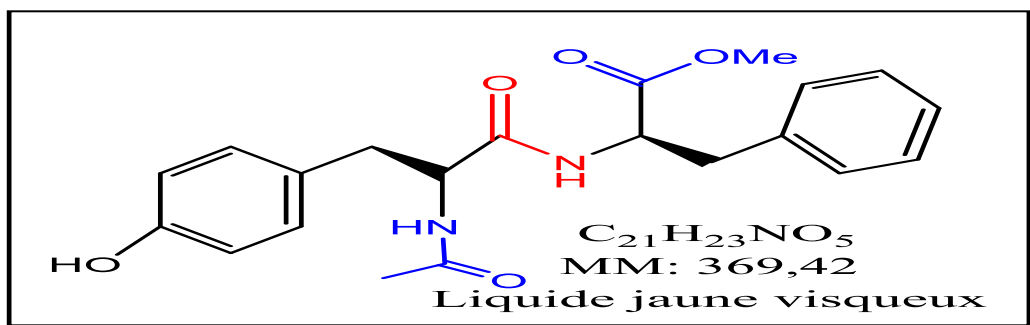
N-acétyl-L-tyrosine-L-tyrosine. OMe.



On met un ballon dans un bain de glace, on introduit (0.5161g, 0.0024mol) de la N-acétyl-tyrosine et (0.5059g, 0.0028 mol) de l'ester méthylique de la tyrosine dans le DCM. on prépare une solution de DCC (0.49 g, 0.0024mol) dans 15 ml de dichlorométhane est ajouté goutte à goutte avec une forte agitation. après on additionne (2.79 ml, 0.0267mol) de TEA à la solution précédente et laisser agiter pendant 24h à température ambiante. Filtration pour éliminer le DCU formée, ensuite on sèche avec le desséchant Na₂SO₄, filtration puis évaporation du solvant. Une cristallisation dans l'éthanol-eau permet d'isoler 0.15g du produit.

- **IR v_{max} (KBr) cm⁻¹**: 1574,70 (C=O amide); 1627 (C=O acétyl), 1708,29 (C=O ester); 3327,24 (N-H amide).

N-acétyl-L-tyrosine-L-phénylalanine.OMe.

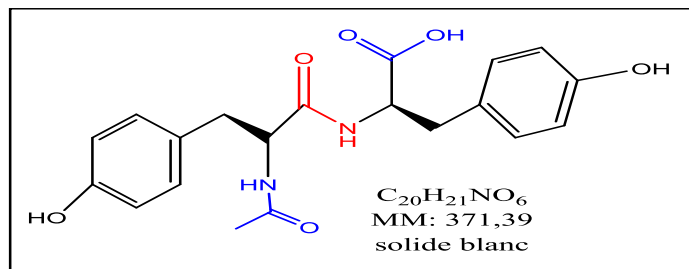


Même mode opératoire précédant à suivre pour cette synthèse, mais avec des quantités correspondantes aux réactifs.

Masse de N-acétyl-L-tyrosine(g)	Masse de L-phénylalanine(g)	DCM (ml)	DCC(g)	TEA (ml)
0.315g (0.0015mol)	0.979g (0.0059mol)	15ml	0.3g	1.80ml

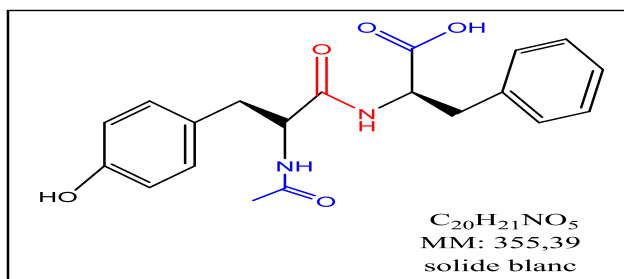
Le spectre correspond a ce couplage montre aucune bande caractéristique.

Hydrolyse de dipeptide N-acétyl-L-tyrosine-L-tyrosine. OMe.



on pesé 0.15 g du dipeptide (0.3800mmol) et on le met dans un ballon et on ajoute un mélange de THF/ eau (0.85 :0.21),le ballon est met dans un bain de glace, après on verse 3.14 ml (1,2eq, 0.6275mmol) d'une solution aqueuse de LiOH (0,2M), agitation du mélange pendant 24h à température ambiante. L'étape suivante est l'ajout 1.88ml d'une solution aqueuse d'HCl (1N). La solution est porté dans une ampoule à décanté pour l'extraction de la phase organique avec l'acétate d'éthyl (3fois), séchage, filtration suivi d'un évaporation de la phase organique.

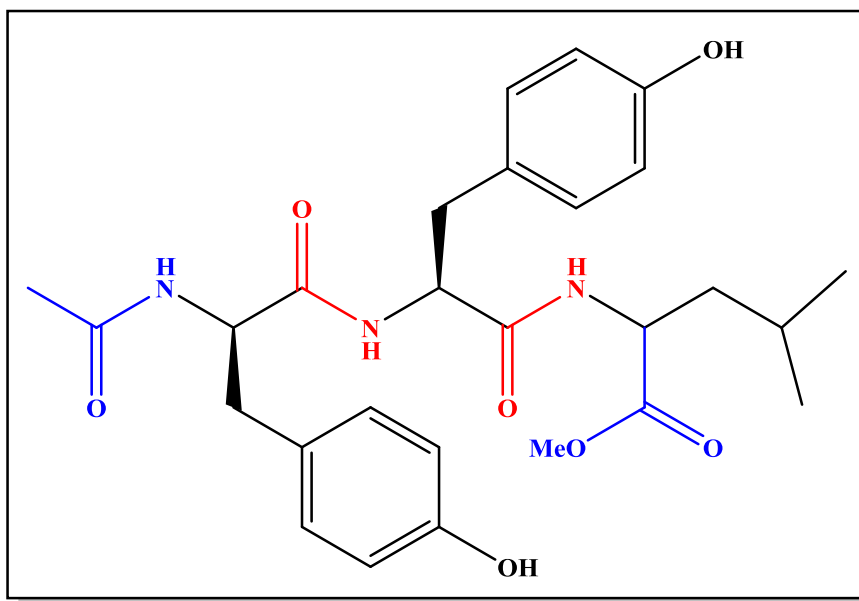
Hydrolyse N-acétyl-L-tyrosine-L-phénylalanine.OMe. HCl.



Même mode opératoire précédant à suivre pour cette synthèse, mais avec des quantités correspondantes aux réactifs. Le produit est cristallisé dans l'éthanol.

- **IR v_{max} (KBr) cm⁻¹:** 1575,13 (C=O amide); 1629,36 (C=O ester); 3034(N-H amide); 3327,41 (O-H de l'acide).

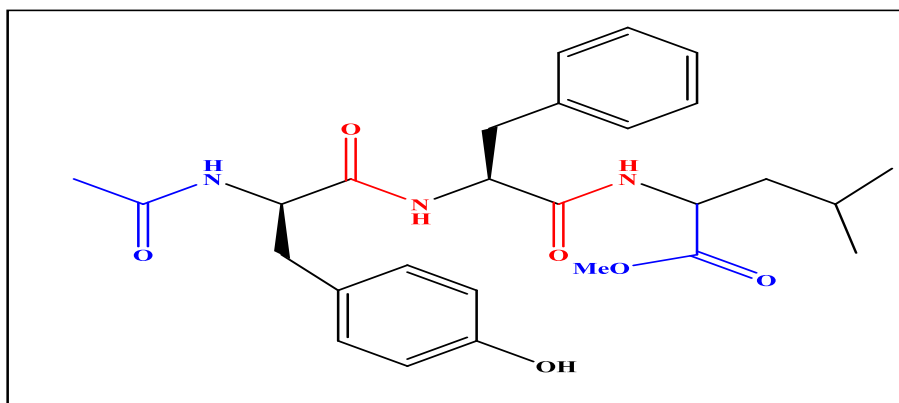
Couplage de N-acétyl-L-tyrosine-L-tyrosine avec l'ester méthylique de L-leucine. OMe.



Dans un bain de glace on met un ballon, et on introduit 0,15 g de N- acétyl-L-tyrosine-L-tyrosine (0.2 mmol) et 0,07g du chlorhydrate de l'ester méthylique de L-leucine (0.53 mmol) dans 15 ml de DCM (solvant) on additionne 0,22 ml de TEA (5éq) goutte à goutte avec une forte agitation. On ajoute goutte à goutte un mélange de DCC (0.041, 0.2 mmol) dans 15 ml de DCM avec une forte agitation. On laisse Le mélange est agité à température ambiante pendant 24h. Filtration pour l'élimination de DCU formée, ensuite évaporation du solvant .Une cristallisation de produit obtenu dans l'éthanol permet d'isoler 0.075 (68%) de tripeptide ciblé.

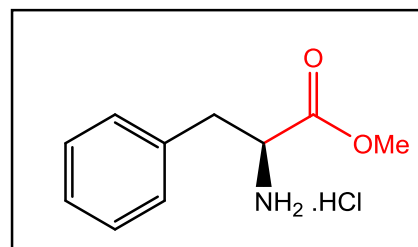
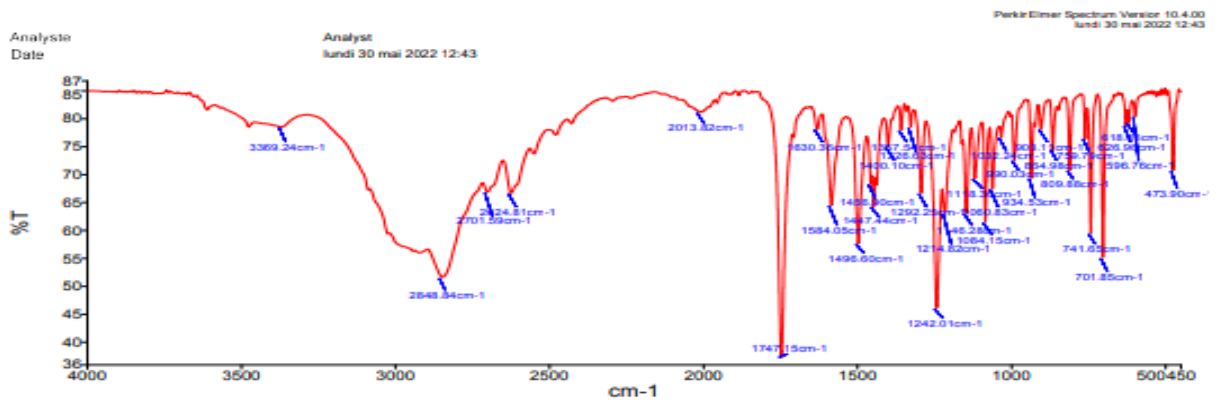
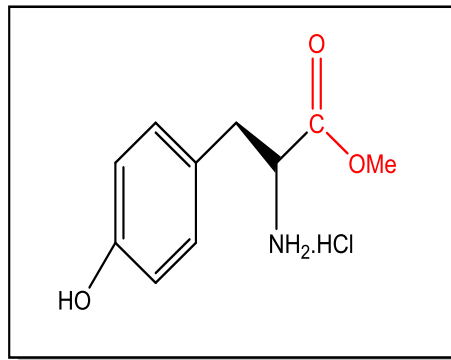
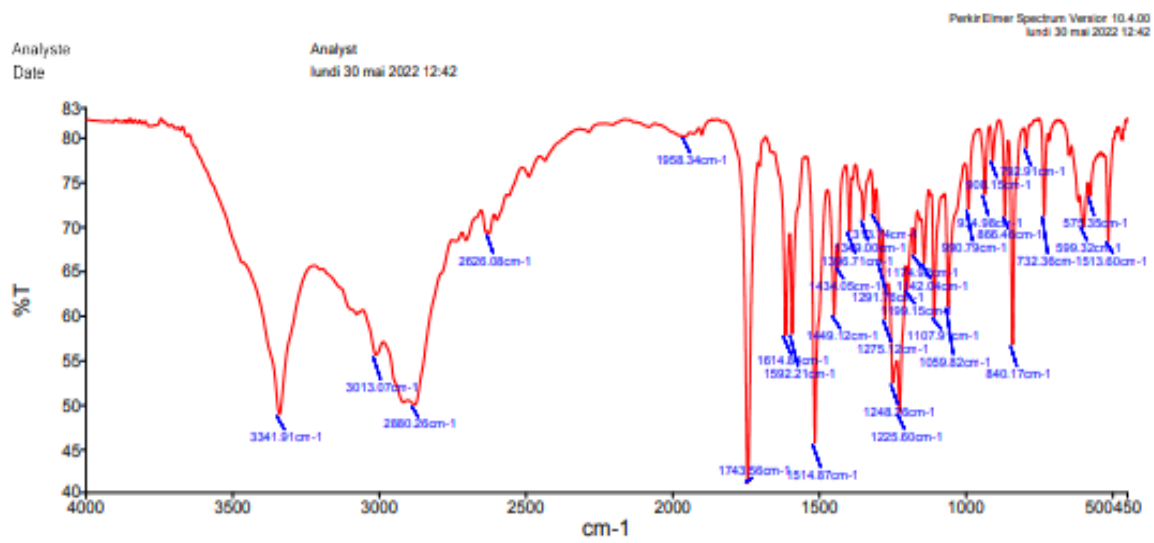
- **IR v_{max} (KBr) cm⁻¹:** 1637,64 (C=O amide); 1767,47(C=O ester); 3329,45 (N-H amide); 2930 (OH phénol).

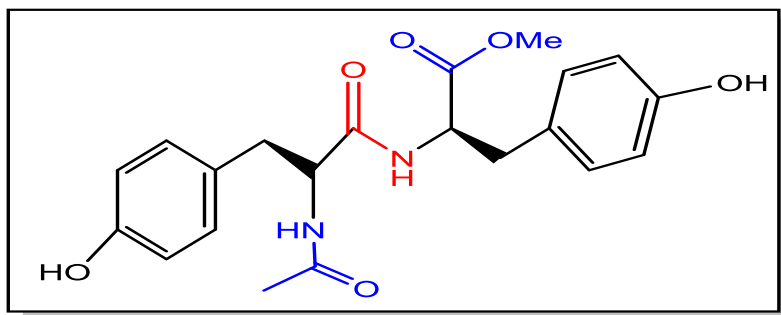
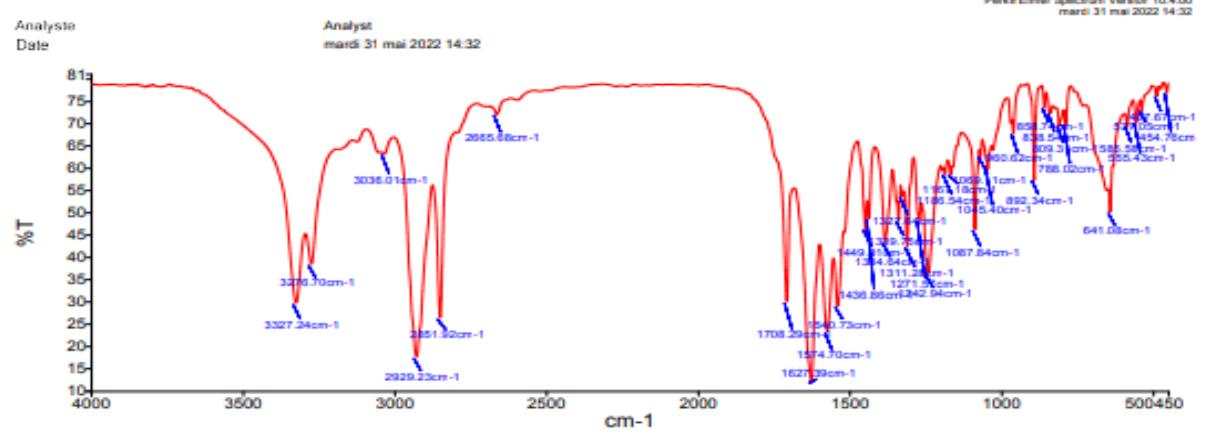
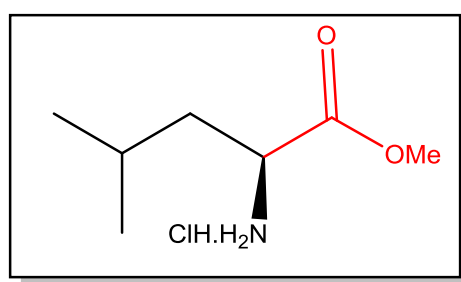
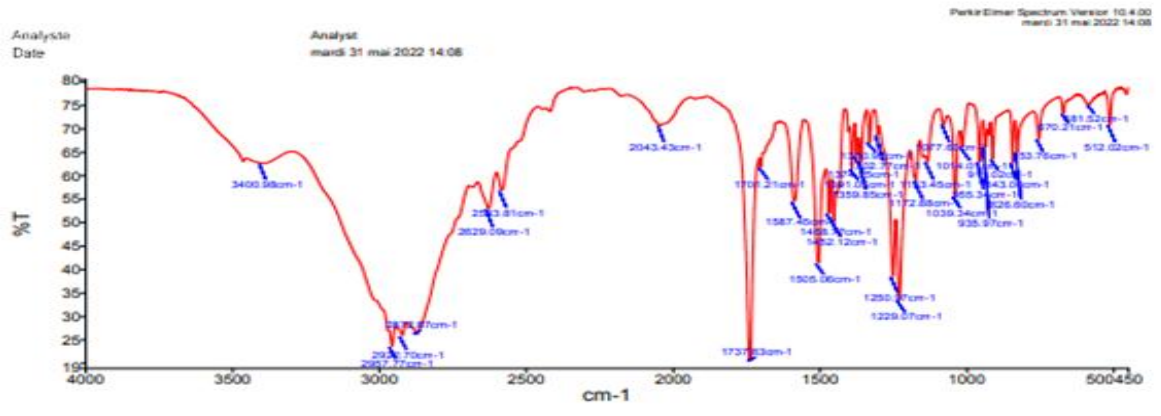
Couplage de N-acétyl-L-tyrosine-L-phénylalanine avec l'ester méthylique de L-leucine.OMe.HCl.

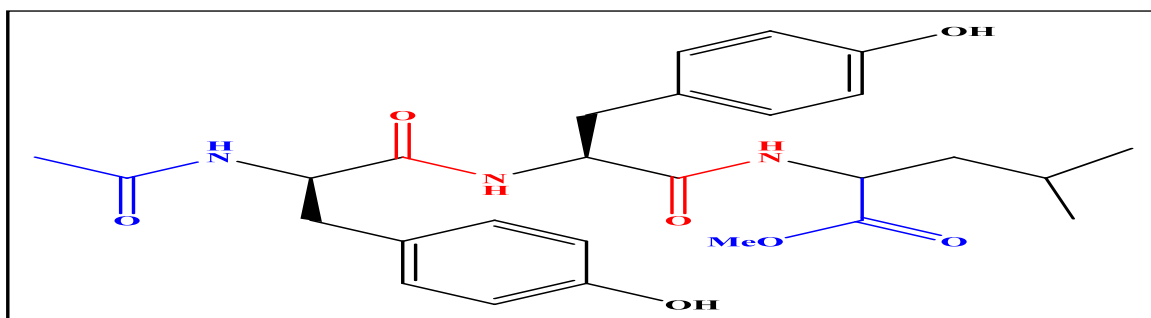
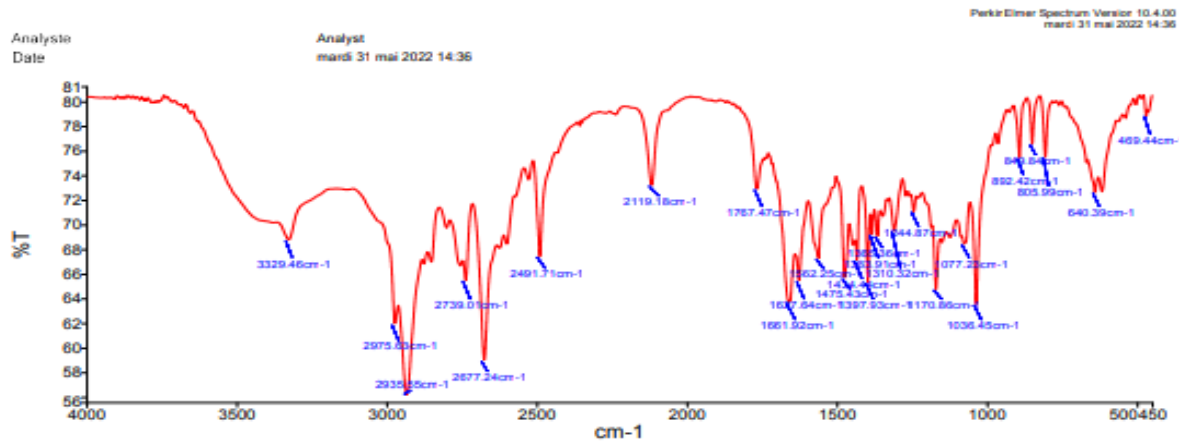


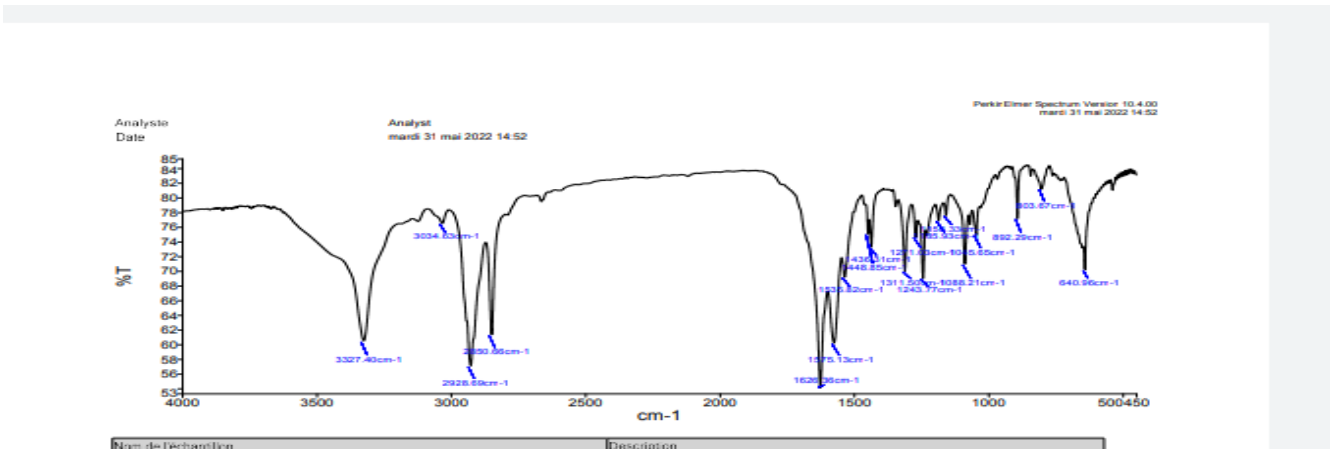
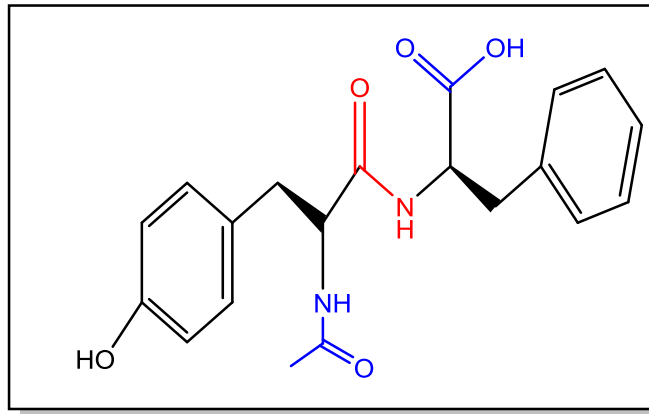
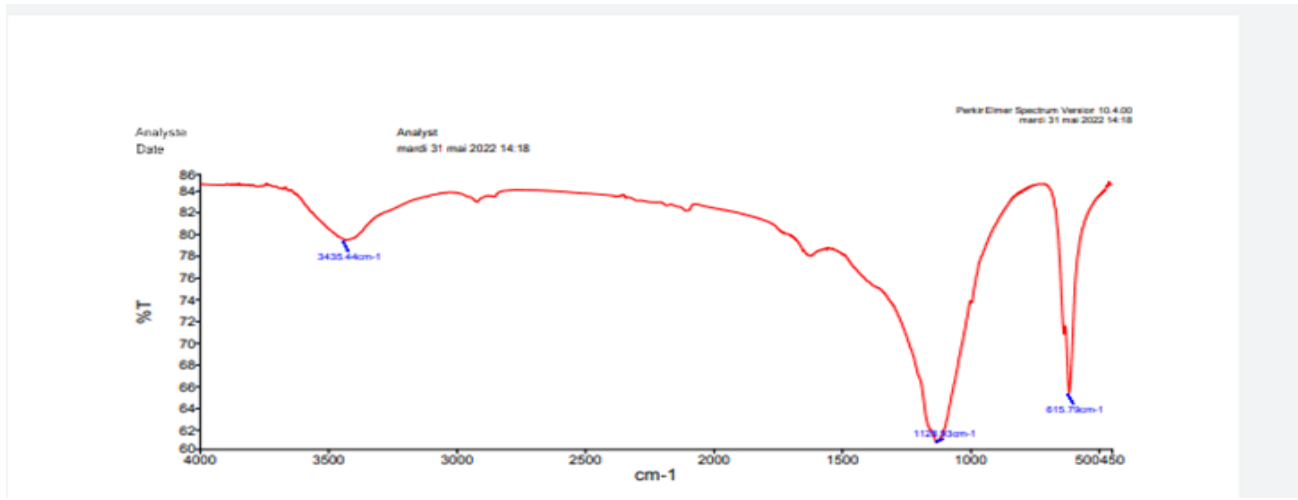
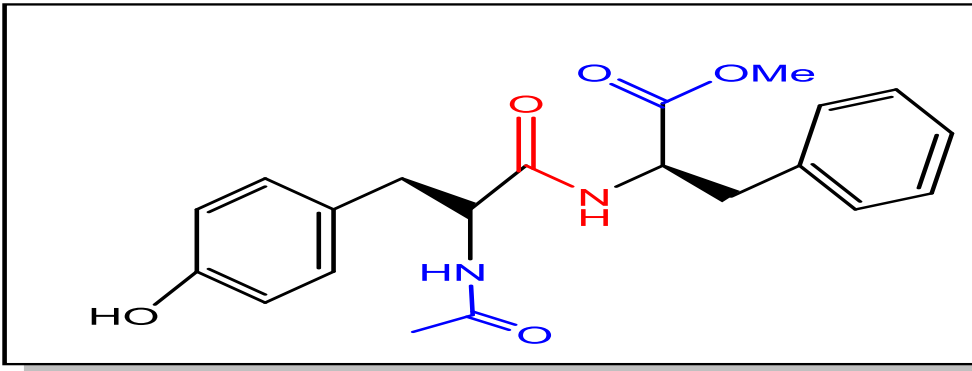
Même mode opératoire précédant à suivre pour cette synthèse, mais avec des quantités correspondantes aux réactifs. Le produit est cristallisé dans l'éthanol.

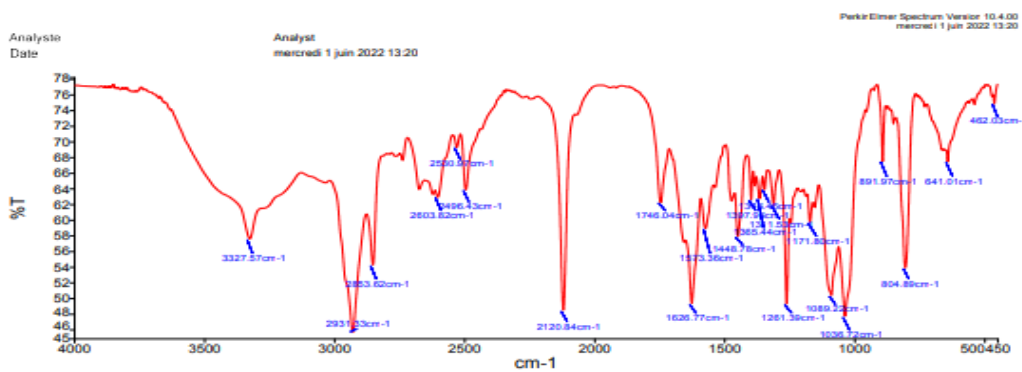
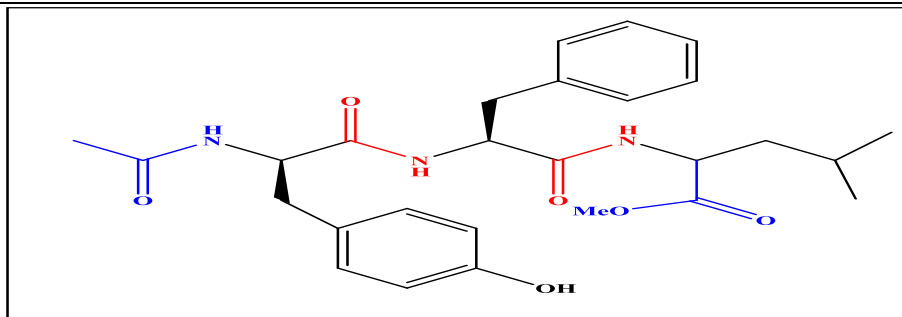
IR v_{max} (KBr) cm⁻¹: 1626,77 (C=O amide); 1746,04 (C=O ester); 3327,57 (N-H amide).











Les références :

1. Bernard Banaigs, et, Jean-Michel Kornprobst, *La biodiversité marine et le médicament: espoirs, réalités et contraintes*, Actualité chimique, 7, n°306, 2007.
2. Mayer, A.M.S., K.B. Glaser, C. Cuevas, R.S. Jacobs, W. Kem, R.D. Little, J.M. McIntosh, D.J. Newman, B.C. Potts, D.E. Shuster, *Trends in Pharmacological Sciences*, 2010, 31(6), 255.
3. D. Papamichael, *The use of thymidylate synthase inhibitors in the treatment of advanced colorectal cancer: current status*. *Oncologist* 1999, 4(6), 478-487.
4. Rinehart L ; *Antitumor compoundd from tunicates*. *Mer Res Rev*. 2000 ; 20 :1-27.
5. Urdials JL, Morata P, Nunez De Castro I *Antiproliferative effect of dehydrodidemnin B, a depsipeptide isolated from Mediterranean tunicates*. *Cancer Lett*. 1996 ; 102 :31-37.
6. (en) Merrifield, Robert B., *Solid phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide*, *J. Am. Chem. Soc.* vol. 85, n°14, juillet 1963, p.249-2154.
7. A b et c Max Malacria, Jean Philippe Goddard, Cyril Ollivier et Géraldine Gouhier, *Chimie supportée sur phase solide ; Technique de l'ingénieur*, 10 novembre 2008.
8. (a) A. Cuadrado et al., *AplidinTM induces apoptosis in human cancer cells via glutathione depletion and sustained activation of the epidermal growth factor receptor, Src, JNK, and p38 MAPK*. *Journal of biological chemistry*, 241-250, 278(1), 2003. (b) L.F. Garcia-Fernandez et al., *AplidinTM induces the mitochondrial apoptotic pathway via oxidative stress-mediated JNK and p38 activation and protein kinase C*. *Oncogene* 7533-7544, 21(49), 2002.
9. L. Bassano et al., *Cell cycle phase perturbations and apoptosis in tumor cells induced by Aplidine*. *Br J Cancer* 1510-7, 86(9), 2002.
10. G. Consuelo et al., *Rapid and selective apoptosis in human leukemic cells induced by Aplidin through ta fas/CD95 and mitochondrial mediated mechanism*. *Clinical Cancer Research*, 1535-1545, 9, 2003.
11. (a) Jisun Lee et al., *Didemnins, tamandarins and related natural products*. *Nat. Prod. Rap*, 404, 29, 2012. DOI:10.1039/c2np00065b (b) M.S. Alejandro et al., *Marine pharmacology in 2005-2006: Antitumor and cytotoxic compounds*. *European Journal of Cancer*, 2376, 44, 2008.
12. Claire HAUVILLE, *Produits marines et cancers: les substances en cours d'essais cliniques*, 14, 2008, NANTES.
13. M. Mikalajczyk, P. Balczewski, *Synthesis*, 659:1987.
14. J. Domagala, J. Wemple, *Tetrahedron Lett*, 14:1179, 1973.
15. M. Bodanszky, Y.S. Klausner, A.M. Ondentti, *Peptide synthesis*. Wiley, Ne York, 1976, 26.
16. a.S. Tchertchian, O. Hartly, P.J. Botti, *Org Chem*. 2004, 69, 9208. b.E.H. Carter, L.R. Franc, W.H. Johnston *Organic Synthesis* 1955, 3, 167
17. E. Zherston, Sheppard. R.C. in *the Peptides*, Academic Press : New York, 1987, 9, 1.
18. E. Kaiser, R.L. Colescott, C.D. Bossinger, P.I. Cook *Anal. Biochem*. 1970, 34, 595.
19. J. Mathieu, R. Panico *Mécanismes réactionnels en chimie organique*. 1972, Hermann Ed. n°1357.
20. D.A. Kidd, F.E. King, *Nature*, 1948. 62, 776.
21. McCloskey, A.L. Fonken, G.S.; Kluiber, R.W.; Johnson, W.S. *Org. Synth.* 1 :261, 1963.
22. Bryan, D.B. Hall, R.F. Holden, K.G. Huffman, W.F. *Chem. Soc.* 99:2353, 1977.
23. Danishefsky, S. Harayama, T. Berman, E. *Chem. Soc.* 100:6536, 1978.
24. Corey, E. J. Szekely, I. Shiner, C. S. *Tetrahedron Lett.* 3529, 1977.
25. Carpino LA et al. *Peptide Synthesis via amino acid halides*. *Acc. Chem. Res.* 29: 268, 1996.
26. W. Chu, Z. Tu, E. McElveen, J. Xu, M. Taylor, R.R. Luedtke, R. H. Mach. *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13:77.
27. I. Kuwajima, H. Urabe. *Organic Syntheses*, Wiley: New York. 1993 Collect. VIII, 486.
28. J. Klosa. *Prakt. Chem*, 1962, 19: 45.

29. T.Curtius. *Chem. Ber.* **1902**, 35: 3226.
30. Anderson, GW, Paul, R. A New Reagent For Peptide Synthesis.*J. Am. Chem. Soc.* 80:4423,1958.
31. Poduska, K. Gross, H. *Chem, Ber.* 49:527, **1961**.
32. Kim.MH, Patel.DV, as reagent for mild and efficient preparation of esters.*Tetrahedron Lett.* 35: 5603,**1994**.
33. Prasad KVSRG, Bharathi K and Haseena,8, 1, **2011**; Article-021.

Résumé :

De nombreuses molécules issues du monde marin présentant des activités anticancéreuses n'ont pas franchi toutes les étapes des essais cliniques. La plitidepsine (Aplidine®) analogue de la déhydrodidemnine B est un depsipeptide cyclique isolé d'Aplidium albicans (tunicier). Il induit l'apoptose en déclenchant le relargage de cytochrome c et active la caspase-3. Il provoque également l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et G2, ce qui inhibe la prolifération cellulaire.

Mot clé : Aplidine, déhydrodidemnine B, depsipeptide, anticancéreuses.

Abstract :

Many molecules from the marine world presenting activities anticancer drugs have not passed all stages of clinical trials. The similar plitidepsin (Aplidine®) of déhydrodidemnine B is a depsipeptide isolated cyclic of Aplidium albicans(tunicas). It induces apoptosis by triggering the release of cytochrome c and activates caspase-3. It also causes the cycle to stop cell phase G1 and G2, which inhibits cell proliferation.

Keywords: Aplidin, Déhydrodidemnin B, depsipeptide, anticancer.

ملخص

جزيئات كثيرة من العالم البحري تعرض أنشطة مضادة للسرطان لم تجتاز جميع مراحل التجارب السريرية . البليتيدي بيسين الابليدين المماثل من الديهيدروديدمنين ب هو ديبسي بيبتيدي دوري معزول من ابليديوم البيكانز تونيكات يحفز موت الخلايا المبرمج عن طريق تحفيز اطلاق السييتوكوم ج و تفعيل كاسباس 3. كما انه يتسبب في توقيف دورة الخلية في المرحلة ل1ول2, التي تمنع تكاثر الخلايا.

الكلمات المفتاحية الابليدين , الديهيدروديدمنين ب , ديبسي بيبتيدي , مضادة للسرطان .