REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE TLEMCEN

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

LABORATOIRE DE CHIMIE ORGANIQUE, SUBSTANCES NATURELLES ET ANALYSES

DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE

FILIERE : CHIMIE

SPECIALITE : CHIMIE BIO ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE

MEMOIRE DE MASTER

SYNTHESE DE NOUVEAUX INHIBITEURS DE LA FIBRILLOGENESE DE L'AMYLOIDE $A\beta_{42}$ ET ETUDE DE LEUR COMPLEXES D'INCLUSION AVEC LA ß-CYCLODEXTRINE

SOUTENU PUBLIQUEMENT PAR Ould Taleb Ourida Katia LE 14 JUIN 2017

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

ABDEL KARIM ATMANI,PR — PRESIDENT

BACHIR MOSTEFA KARA, PR — EXAMINATEUR

ASSIA SLIMANI KENICHE, DR — ENCADREUR

- ANNEE 2016-2017

ABSTRACT :

L'amyloïde Aβ-42, peptide impliqué, suite à un changement conformationnel en feuillets β , dans la maladie d'Alzheimer ; on a pris ce peptide pour cible dans notre travail. Dont ce dernier rapporte la synthèse de deux inhibiteurs, liés à une séquence de reconnaissance bien spécifique synthétisée lors de ce travail (Tryp-Val-Val-COOH), l'un lié à deux groupes perturbateurs, le premier est un cycle aziridinique et l'autre une amino-β-CD méthylée pour pouvoir stopper l'agrégation du peptide impliqué. De plus, ce travail s'inscrit dans l'étude du complexe d'inclusion du tripéptide (Tryp-Val-Val-COOH) molécules invitées avec la β-cyclodextrine native qui a été effectuée en utilisant la spectroscopie IR.
Mots clés : Synthèse, peptide Aβ-42, β-cyclodextrine, complexe d'inclusion, spectroscopie IR.

RÉSUMÉ :

Amyloid Aβ-42, peptide involved, following a conformational change in β-sheet form, in Alzheimer's disease. This peptide was targeted in our work. The synthesis of two inhibitors, linked to a specific recognition sequence synthesized during this work (Tryp-Val-Val-COOH), one linked to two disrupting groups, the first one being an aziridine cycle and the other is a methylated amino-β-CD in order to be able to stop the aggregation of the peptide involved. In addition, this work is part of the study of the inclusion complex of the tripeptide (Tryp-Val-Val-COOH) molecules invited with the native β-cyclodextrin which was carried out using IR spectroscopy.
Key words: Synthesis, Aβ-42 peptide, β-cyclodextrin, inclusion complex, IR spectroscopy

ملخص:

من المعروف أن البيبتيد Aβ-42 مسؤل عن مرض الزهايمر و في هذا الإيطار عملي يتدرج في تركيب مثبطات، و اللتان ترتبط مع سلسلة محددة للغاية و لفت خلال هذا العمل (Tryp-Val-Val-COOH) و واحدة منها ترتبط مع aziridine والآخر إلى ميثليته β-CD لتكون قادرة على وقف تجمع البيتيد المسؤل
وبالإضافة إلى ذلك، هذا العمل يدرس مجمع إدراج ثلاثي البيتيد (Tryp-Val-Val-COOH) جزيئات ضيوف مع الأصلي β-السيكلودكسترين التي أجريت باستخدام التحليل الطيفي IR.
كلمات البحث: التجميعي، 42 البيتيد،- السيكلودكسترين مجمع إدراج، أطياف الأشعة تحت الحمراء RI.

DÉDICACE

Au nom de la chimie.

Au nom de la science et pour la science.

Mais aussi aux malades atteints de l'Alzheimer dans l'espoir qu'un jour qu'ils guérissent.

REMERCIEMENTS

Je remercie fortement l'ensemble des membres de mon jury de mémoire de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer mon travail.

Je tiens à remercier le Professeur JOSEPH KAJIMA MULENGI *d'avoir bien voulu m'accueillir au sein de ses étudiants* et de m'avoir permis de profiter d'une bonne et solide formation.

Je suis infiniment reconnaissante au Docteur SLIMANI née KENICHE ASSIA. Qui m'a soutenu, aidé et encadré dans ce travail, dont ce dernier n'aurait pu aboutir sans elle, un grand merci !

Remerciement à Mr.Bendi pour l'analyse IR.

Remerciement aux doctorantes du laboratoire COSNA, et un remerciment speciale à Imane Mami, pour son aide et son temps consacré aux analyse IR .

J'ai également une pensée pour toute ma promotion, et tout particulièrement à Baghdad Hichem, je leur souhaite plein de réussite pour la suite.

Je remercie aussi tous ceux, qui, chacun à sa façon, ont participé à la concrétisation de ce travail.

J'ouvre une parenthèse pour témoigner ma gratitude pour mes chers parents qui grâce à eux je suis là aujourd'hui, leur soutien m'était vitale longue vie à eux aussi à mes sœurs, à mon frère et à ma famille, oncles, tantes, cousins, cousines et grands parents maternels et paternels que dieu vous bénisse.

Je teins à saluer mes camarades de l'USTHB ainsi que tous mes ami(e)s.

A cœur vaillant rien n'est impossible go go GO……

LISTE DES ABREVIATIONS

Aβ : Amyloïde beta

Al : Alanine

APP : Protéine précurseur de la bêta-amyloïde

Ar : Aryle

BACE : Bêta-amyloïde clivage enzyme

Boc : tert-butoxycarbonyle

CCM : Chromatographie sur couche mince

CD : Cyclodextrine

α-CD : alpha-cyclodextrine

ß-CD : béta-cyclodextrine

γ-CD : gamma-cyclodextrine

COMU : (1-cyano-2-éthoxy-2-oxoéthylidèneaminooxy) diméthyl-amino-morpholino-carbène)

DCC : Dicyclohexycarbodiimide

DCM : Dichlorométhane

DCU : Dicyclohexylurée

DMAP : 4-diméthylaminopyridine

DMF : Diméthylformamide

Ft : Phtalimide

MA : Maladie d'Alzheimer

pH : Potentiel Hydrogène

TA : Température Ambiante

TEM : Microscope à transmission électronique

THF : Tétrahydrofurane

Try : Tryptophane

Val : Valine

Sommaire

I. INTRODUCTION GÉNÉRALE 1

A. La maladie d'Alzheimer 1

B. La protéine Beta-amyloïde 1

1. Définition : 1
2. Mécanisme de formation des fibres (la fibrillogenèse) : 1
3. Les dépôts amyloïdes sont-ils d'innocents agrégats ? 2

C. Problématique : 3

D. Projet de recherche : 3

II. PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 5

A. Chapitre 1 : Inhibiteurs de la fibrillogénèse du peptide Aβ 5

1. INTRODUCTION 5
2. Etat de l'art sur les Inhibiteurs peptidiques de la fibrillogénèse du peptide Aβ42 : 5
3. Synthèse des inhibiteurs azahétérocyclique : 6
4. Synthèse des ihnibiteurs dérivés de phtalimide et saccharine : 7
5. Synthèse des dérivés du resvératrole comme inhibiteurs de l'agrégation de l'Aβ42 : 8
6. Conclusion : 9

III. PARTIE II : RESULTATS ET DISSCUSSION 10

A. Chapitre 2 : Travail effectué 10

1. INTRODUCTION : 10
2. Choix des Ihnibiteurs : 10
3. Purification des solvants et synthèse de nos composés : 11
4. Synthèse du premier inhibiteur : 11
5. Synthèse Ft-TRY-VAL-VAL- β-CD methylée : 13
6. Synthèse du deuxième inhibiteur Ft-Try-Val-Val-aziridine: 15

B. Etude du Complexe d'inclusion Tryp-VAL-VAL-COOH et la βCD par spectroscopie IR: 16

Conclusion : 20

Perspectives: 20

IV. PARTIE III : PARTIE EXPERIMENTALE 21

Indications générales : 21

A. Matériel et méthodes : 21

1. Produits chimiques et solvants : 21
2. Chromatographie : 21
3. Infra rouge et points de fusion : 21

B. Synthèse des inhibiteurs peptidiques 22

1. Eesterification de la Valine : 22
2. Traitement du chlorhydrate de la valine estérifiée : 22

***C.* Etapes de synthese du premier site de reconnaissance Proline-Val-Val-COOH : 22**

1. Couplage peptidique entre Val-CO_2Me et Benzyl-Proline: 22
2. Hydrolyse de du dipeptide N-Carbobenzyl-proline-Val-COOMe : 22

3. Couplage peptidique entre N-Carbobenzyl-Proline-Val et Val-COOMe : 23
4. Hydrolyse du tripeptide N-Carbobenzyl-proline-Val- Val-COOMe 23

D. Etapes de synthèse du deuxième site de reconnaissance Ft-Try-Val-Val-COOH: 23

1. Couplage peptedique entre Ft-Tryptophane et Val-COOMe : 23
2. Hydrolyse du dipeptide Ft-Tryptophane-Val-COOMe : 24
3. Couplage peptedique entre Val-COOMe et Ft-Try-Val-COOH : 24
4. Hydrolyse du tripeptide Ft-Try-Val-Val-COOMe : 24

E. Couplage peptidique entre le tripeptide et la β-CD- OMe: 25

F. Complexe d'inclusion du tripéptide avec les B-Cyclodextrines 25

1. Protocole géneral de la complexation: 25

G. Synthèse du 2-azido-3-hydroxypropyl-4-méthlbenzosulfate: 25

1. Protection du glycidol : 25
2. Synthèse de l'azido-alcool : 26
3. Synthèse de l'aziridine : 26
4. Couplage peptidique entre le tripeptide et l'aziridine : 26

Tableau récapitulatif des produits synthétisés et résultats obtenus :..... 27

Référence Bibliographiques :..... 30

Annexe

I. INTRODUCTION GÉNÉRALE

A. La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer, est un trouble neurodégénératif qui altère la mémoire et les fonctions cognitives et conduit progressivement à une démence [1], une déchéance physique et une perte progressive d'autonomie. Cette maladie peut être due à d'autres facteurs non génétiques tels que l'agrégation du bêta-amyloïde Aβ-42.

B. La protéine Beta-amyloïde

1. Définition :

La protéine précurseur de la bêta-amyloïde (APP) peut être divisé par des enzymes distincts coupant l'APP à différents endroits, qui vont produire deux peptides différents (un peptide est une petite protéine). Selon l'hypothèse de la cascade amyloïde, un dysfonctionnement dans la voie amyloïdogénique entraînerait la production accrue du peptide bêta-amyloïde.

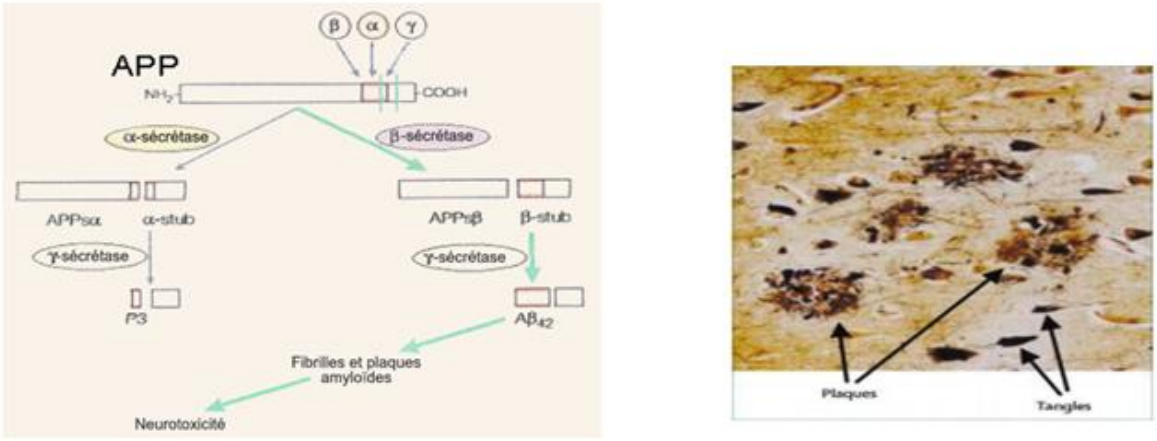


Figure 1 : a). Les étapes de la « cascade amyloïde » ; b). *Coupe d'un cortex cérébral de la maladie d'Alzheimer avec les plaques séniles (plaques) et les dégénérescences neurofibrillaires (tangles)*[2].

2. Mécanisme de formation des fibres (la fibrillogenèse) :

L'amyloïdogenèse :

L'agrégation des peptides Aβ conduit à la formation de fibres d'amyloïde. Des études par diffraction aux rayons X ont montré que les fibres d'amyloïde étaient composées de feuillets β en configuration antiparallèles [3].

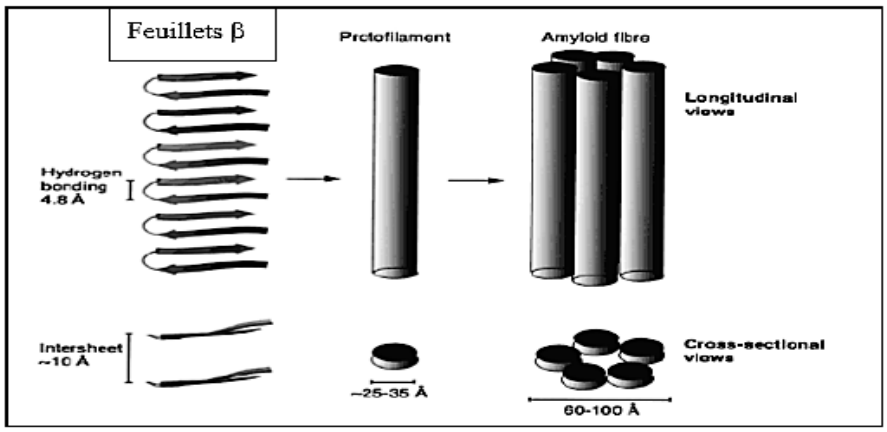


Figure 3 : La formation et l'élongation des fibres d'amyloïde.

3. Les dépôts amyloïdes sont-ils d'innocents agrégats ?

Tableau 1 : Exemples de pathologies humaines associées aux dépôts amyloïdes[4]

Pathologies	**Peptides ou protéines**	**Nombres de résidus**	**Structures à l'état natif**
Maladies neurodégénératives			
Alzheimer	Peptides β amyloïdes, Aβ	40 ou 42	Non structurée
Encéphalopathie spongiforme	Protéine Prion, PrP	253	Partiellement structurée en hélice α
Maladie de Parkinson	*α-synucléine*	140	Non structurée
Démence à corps de Lewy			
Maladie de Huntington	Huntingtin Polyglutamique	3144	Non structurée
Amyloses non neuropathiques systémiques			
Amylose AL	Chaîne légère de l'immunoglobuline, Ig	~ 90	Feuillet β
Amylose AA	Protéine sérum amyloïde A	76-104	Hélice α
Amylose systémique sénile	Transthyrétine, TTR	127	Feuillet β
Amyloses non neuropathiques localisées			
Diabète de type II	Amyline ou polypeptide amyloïde islet, IAPP	37	Non structuré
Amylose au point d'injection	Insuline	21+30	Hélice α

C. Problématique :

Si on arrive à bloquer la fibrillogenèse, on doit bloquer d'abord l'agrégation de l'amyloïde Aβ42, en ciblant autant que chimistes les résidus responsable du repliement.

Est-ce que c'est POSSIBE ?

Plusieurs travaux ont été effectués afin d'identifier la séquence minimale nécessaire à la fibrillation du peptide Aβ. La séquence Aβ19-28 est suffisante pour former des fibres amyloïdes [5]. Quant aux 17 premiers résidus de la partie N-terminale du peptide Aβ ne sont pas nécessaires pour la formation de fibres amyloïdes [6]. Leur élimination permet d'amplifier la fibrillation. La séquence Aβ16-20, KLVFF (Fig. 4), est désignée comme nécessaire pour l'interaction entre les peptides Aβ [7, 8].

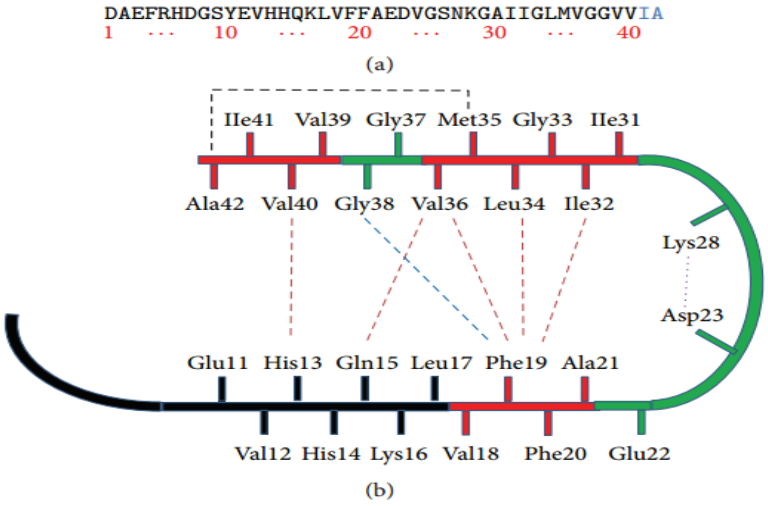


Figure 4 : Structure de l'Aβ40 et Aβ42 qui impliquée dans la formation des fibrilles [9].

D. Projet de recherche :

Notre projet s'inscrit dans le cadre de la conception et de l'élaboration de nouvelles molécules bioactives, ciblant l'inhibition de l'agrégation fibrillaire de l'amyloïde $A\beta_{42}$, peptide impliqué, suite à un changement conformationnel en feuillets Aβ, dans la pathologie du principal désordre neurodégénératif de la maladie d'Alzheimer.

L'objectif de nos travaux consiste d'une part à mettre au point une méthode de synthèse de la molécule cible (figure 1 au chapitre « Travail effectué »), qui agira en deux temps : elle se lierait d'abord au peptide Aβ (1-42) grâce à sa séquence de reconnaissance, puis elle subirait une modification in situ induisant la formation d'un coude grâce au motif aziridine introduit dans le peptidomimétique , détruisant alors les feuillets Aβ en cours d'agrégation, un motif aziridine est une approche prometteuse due à l'inversion de son cycle.

Puis nous envisagerons de développer une nouvelle série de peptides conjugués, reliant la séquence de reconnaissance amyloïde à une molécule connue soit pour détruire les amyloïdes, soit pour s'intercaler entre les feuillets Aβ en cours de formation. Dans cette optique, nous utiliserons la cyclodextrine totalement méthylée, qui portera une chaine

peptidique de reconnaissance (figure 2 au chapitre « travail effectué ». L'utilisation de la cyclodextrine nous permettra de greffer autant de chaine peptidique sur le cycle. De plus sa capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique et son pouvoir connue de vecteur pharmaceutique. Ces approches consistent donc à combiner un élément de forte affinité, de reconnaissance avec le peptide amyloïde ($A\beta_{42}$), avec un élément perturbateur qui va empêcher la formation d'une structure ordonnée d'où l'inhibition de la fibrillogenèse.

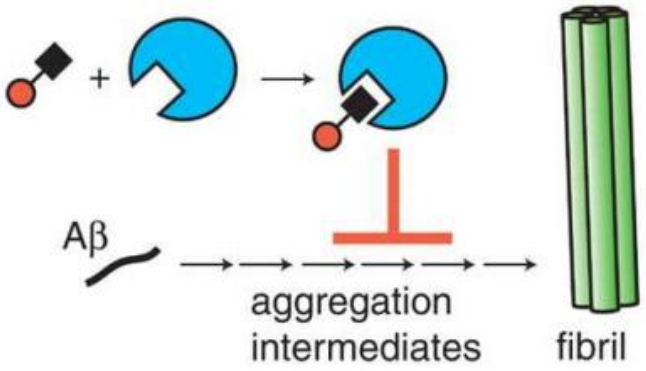


Figure 5 : Approche générale.

D'autre part la synthèse, la caractérisation et l'évaluation des propriétés de complexation de ces nouveaux inhibiteurs à base de β-cyclodextrine (β-CD) afin d'augmenter la biodisponibilité du principe actif dans l'organisme, et d'améliorer sa vectorisation au site actif (cerveau) .

Le plan de ce mémoire s'articule autour de deux grandes parties, dont la première est une synthèse bibliographique, tandis que la deuxième nommée «Travail effectué » qui détaillera nos résultats obtenus au sein du laboratoire ainsi que les données expérimentales relatives à chaque synthèse. Bien sûr cela suivie d'une conclusion générale et voir les différentes perspective d'avenir, comme le dit souvent notre professeur **JOSEPH KAJIMA MULENGI : «** *QUAND VOUS RENTREZ DANS UN DOMAINE, LAISSEZ TOUJOURS LA PORTE OUVERTE POUR LES AUTRES* **».**

II. PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

A. Chapitre 1 : Inhibiteurs de la fibrillogénèse du peptide Aβ

1. INTRODUCTION

Comme il a été décrit dans la partie précédente, la formation des fibres amyloïdes β, l'inhibition de ce phénomène pourrait contribuer à réduire la mort neuronale. Dans cette première partie, nous allons décrire quelques des inhibiteurs de la littérature ciblant la fibrillation du peptide Aβ/42.

2. Etat de l'art sur les Inhibiteurs peptidiques de la fibrillogénèse du peptide Aβ42 :

De nombreux inhibiteurs ont été développés ces dernières années dont la plupart sont de nature peptidique ou sont des mimes de peptides. Une grande partie des inhibiteurs est basée sur le cœur hydrophobe du feuillet β du domaine N-terminal : la séquence KLVFF (Aβ16-20) [10]. Tous ces composés bloquent l'agrégation en empêchant la propagation de la formation de feuillets β et sont appelés des briseurs de feuillets β (« β-sheet breakers ») [11].

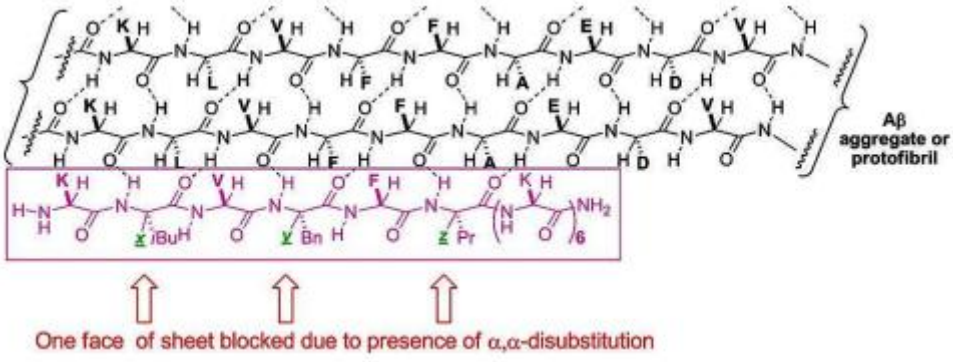


Figure 9 : Exemple d'Inhibiteurs possédant des acides aminés α,α-disubstitués [12].

Hamada et col [13], ont conçus des inhibiteurs peptidiques dotés d'un site de reconnaissance (fragment peptidique) et d'un groupement perturbateur (dibenzofurane) qui élimine les interactions entre les β-feuilles peptidique pour résulter une inhibition de l'agrégation de peptide Aβ42 dans la maladie d'Alzheimer.

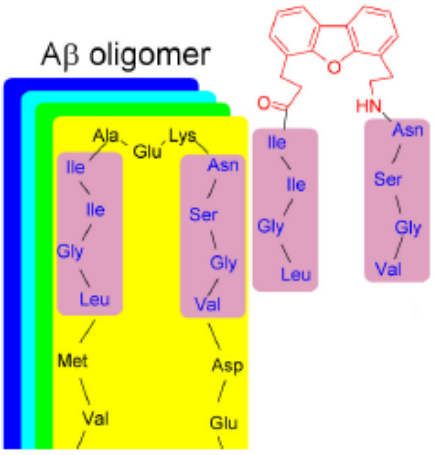


Figure 10 : Model de l'inhibiteur peptide-groupe perturbateur[13].

Les peptides **3** et **5** ont été synthétisés à base de phase solide par la méthode traditionnelle 9-Fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc).

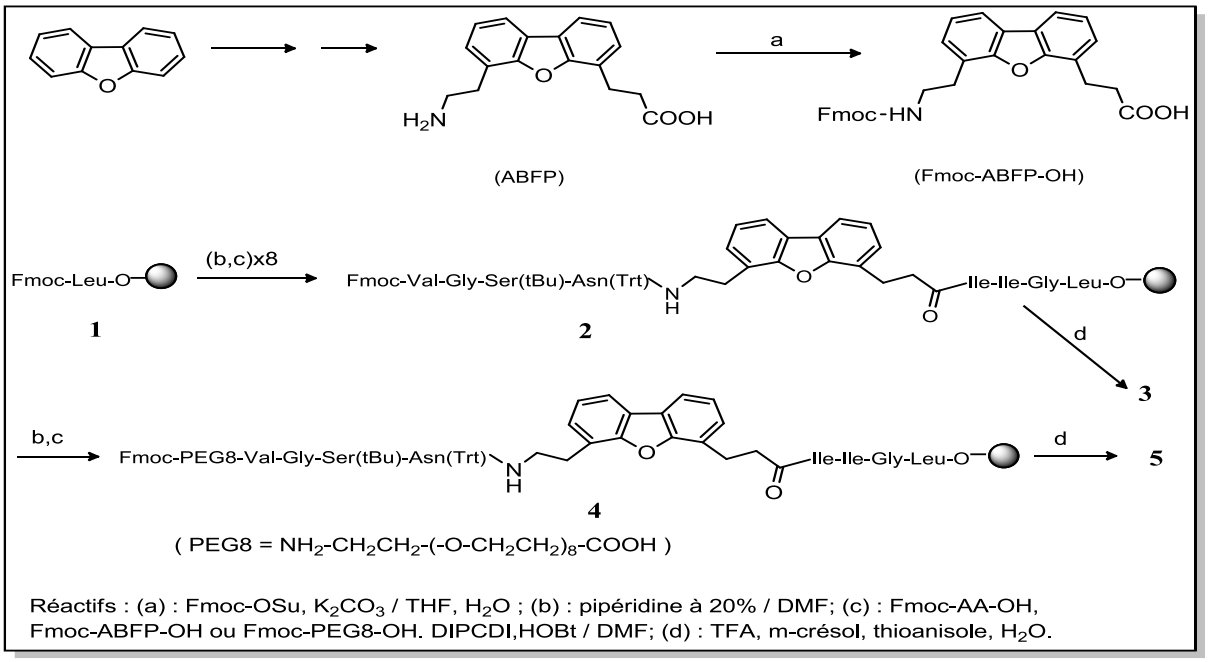


Schéma 1 : exemple d'inhibiteur peptidique (pour la reconnaissance avec Aβ42) et le groupe perturbateur.

3. Synthèse des inhibiteurs azahétérocyclique :

Plusieurs édifices chimiques à base des résiduels hétéro-aromatique plane, inhibent la fibrillogenèse de l'amyloïde Aβ42 [14, 15]. Les hétérocycles I et II sont de bons inhibiteurs de la fibrillogenèse grâce au système azaheterocycle, qui est important à l'interaction hydrophobe π–π avec le peptide, de pus la présence du motif quinone bloque auto-assemblage en feuille b, ainsi inhibant le processus de l'agrégation[16].

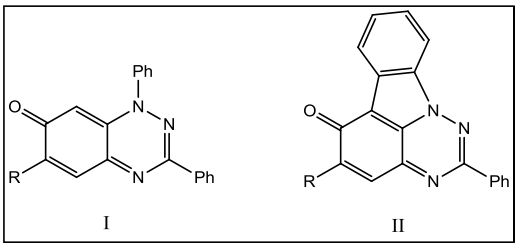


Figure 11: benzotriazinone (I) et Triazinocarbazole (II).

La méthode de synthèse, a permis de donner une série de dérivés dont le tau d'inhibition d'agrégation de Aβ42 varie considérablement selon la nature du groupe (R), impliquant une relation structure-activité.

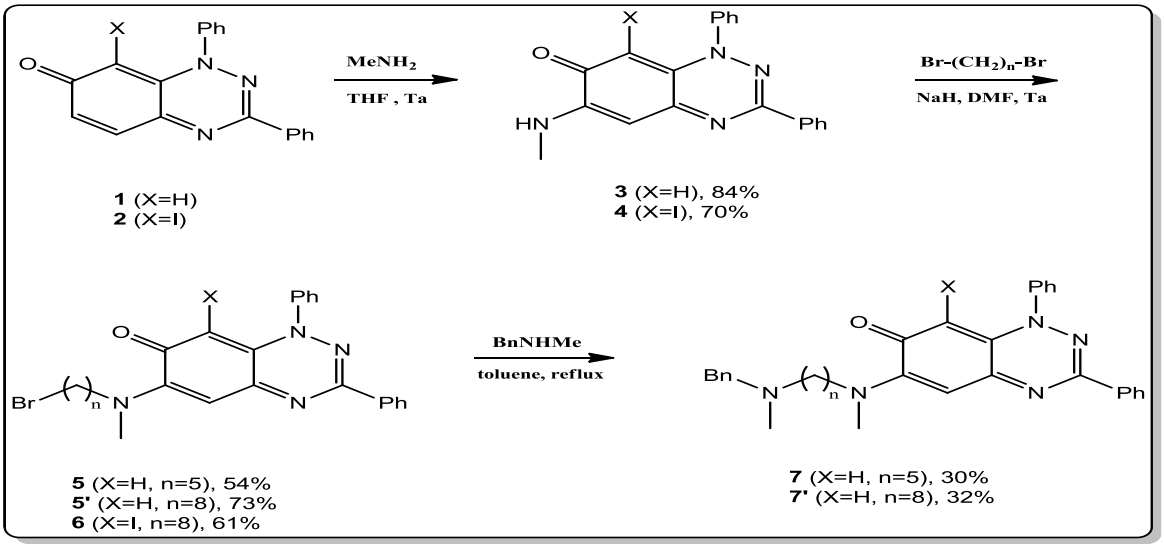


Schéma 2 : Méthode de synthèse des inhibiteurs 7 et 7'.

4. Synthèse des ihnibiteurs dérivés de phtalimide et saccharine :

La complexité de la maladie d'Alzheimer (MA) nécessite la recherche de composés multifonctionnels[17]. Comme des candidats potentiels pour un traitement efficace[18, 19]. *Paneck et col*[20]**,** ont développé une série de dérivés de phtalimide et de saccharine liés par différents fragments (pipérazine, hexahydropyrimidine, 3-aminopyrrolidine ou 3-aminopipéridine) avec des fragments phénylalkyle fixés. Ces dérivés ont été évalués en tant qu'agents anti-MA multifonctionnels avec comme cible : cholinestérase, β-sécrétase et β- Amyloïdes.

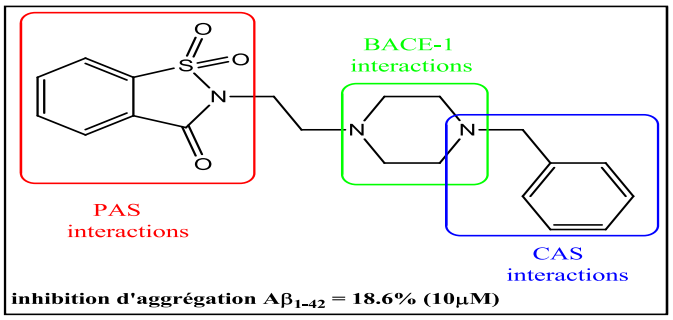


Figure 12 : Dérivé anti-AD multifonctionnels.

Les dérivés phtalimido, sont obtenus à partir du 3-aminopiperidine protégé (5) et le bromure d'aryle pour former le composé (6, 6', 6''), qui subit par la suite une déprotection en utilisant l'acide chlorhydrique donnant ainsi le composé (7, 7', 7''). Ces produits ou le réactif 8 va substituer le N-2-brmoéthyl-phtalimide pour engendrer les dérivés (9, 10).

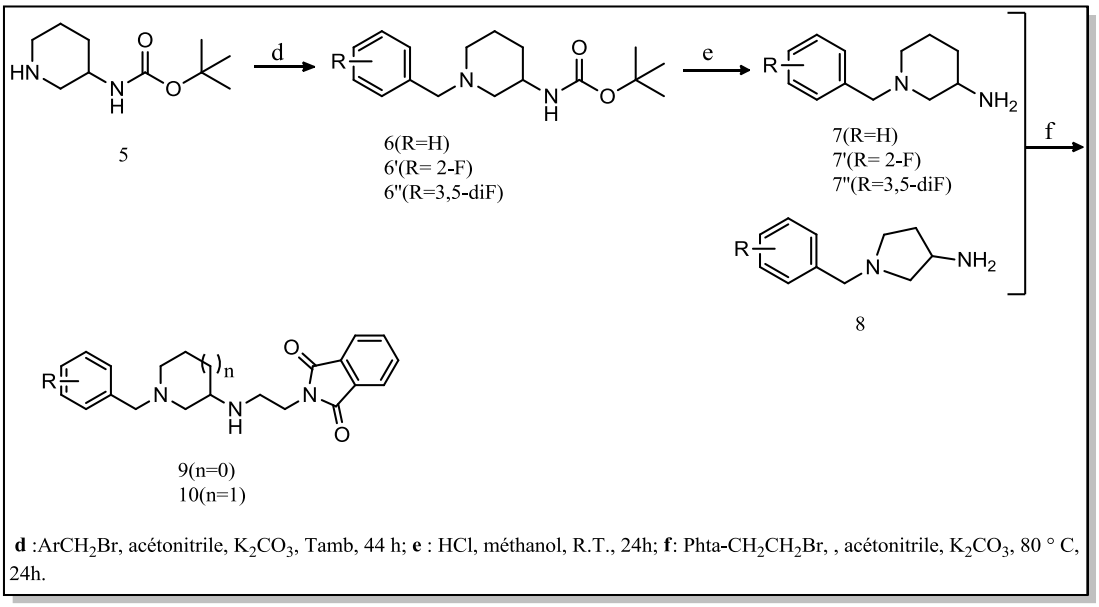


Schéma 4: synthèse des dérivés de phtalimide.

5. Synthèse des dérivés du resvératrol comme inhibiteurs de l'agrégation de l'Aβ42 :

Lu et col [21] ont conçus et évalués une série de nouveaux dérivés du resvératrol, comme agents thérapeutiques potentielles pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. Parmi ces composés, le composé : (E) -5- (4- (isopropylamino)-Styryl) benzène-1,3-diol, a présenté une puissante activité d'inhibition de l'agrégation des ß-amyloïdes, comme le montre (diminution des fibriles fig.A par rapport fig. C) les images du microscope à transmission électronique (TEM),

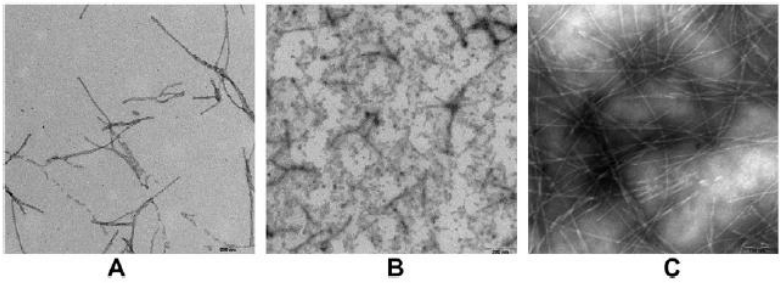


Figure 13 : Images du TEM : (A) $A\beta_{1-42}$ + 7l à 24 h; (B)$A\beta_{1-42}$ + Resvératrol à 24 h; (C) $A\beta_{1-42}$ à 24h.

Les composés cibles 7a à 7n ont été synthétisés via cinq étapes comme suit :

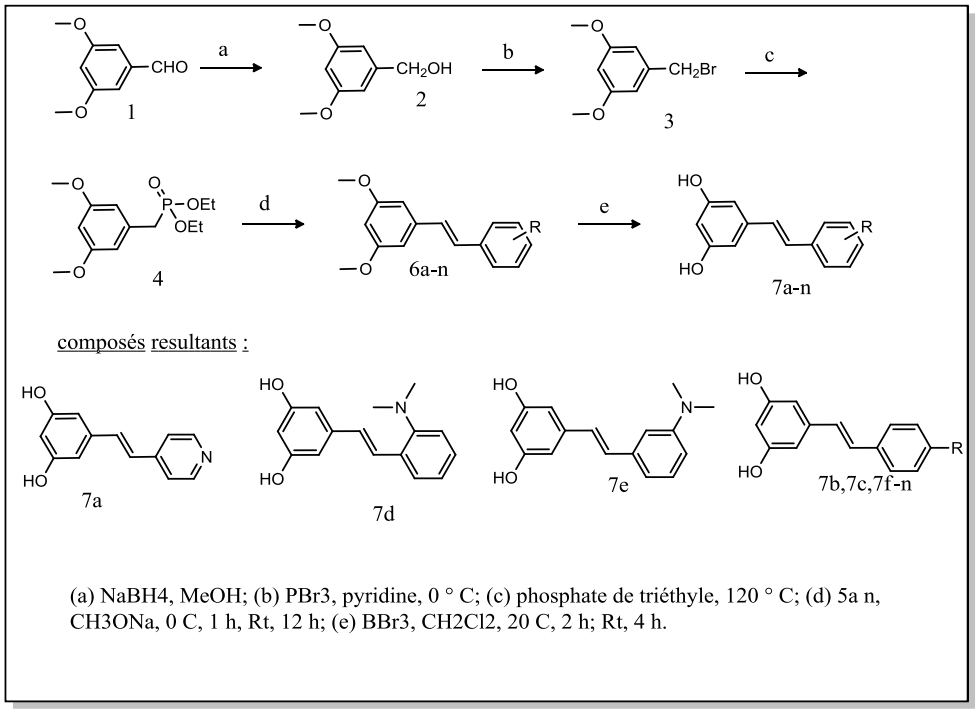


Schéma 5 : Synthèse des inhibiteurs Aβ42 dérivés du resvératrol.

6. Conclusion :

La littérature est riche en ce domaine, bien que nous ayons présenté juste quelques exemples des inhibiteurs de la fibrillogenèse ou bien de l'agréation de l'Aβ42.

Notre stratégie rassemble un peu de chaque inhibiteur, un cycle à trois « aziridine » comme groupe perturbateur associé à un peptide pour la reconnaissance avec l'Aβ42. Aussi, un motif phtalimido dont son activité inhibitrice est bien prouvé et une cylcodxtrine soit dans le squelette comme (groupe perturbateur) ou bien comme vecteur suite à la formation d'un complexe d'inclusion. Pour cela, dans la partie suivante, on présente nos résultats.

III. PARTIE II : RESULTATS ET DISSCUSSION

A. Chapitre 2 : Travail effectué

1. INTRODUCTION :

Dans cette partie, nous allons exposer nos résultats de synthèse d'une nouvelle série de peptides conjugués, reliant la séquence de reconnaissance amyloïde à une molécule perturbatrice de l'agencement pathogène de l'Aβ42.

2. Choix des Ihnibiteurs :

L'idée principale dans notre schéma synthétique retenu dans notre travail, constitue donc à élaborer des composés conçus d'un fragment peptidique à savoir Ft-TRYP-VAL-VAL qui va être copulé à un groupe perturbateur une aziridine, en premier lieu pour le premier inhibiteur et en deuxième lieu à une amino-β-CD pour le second.

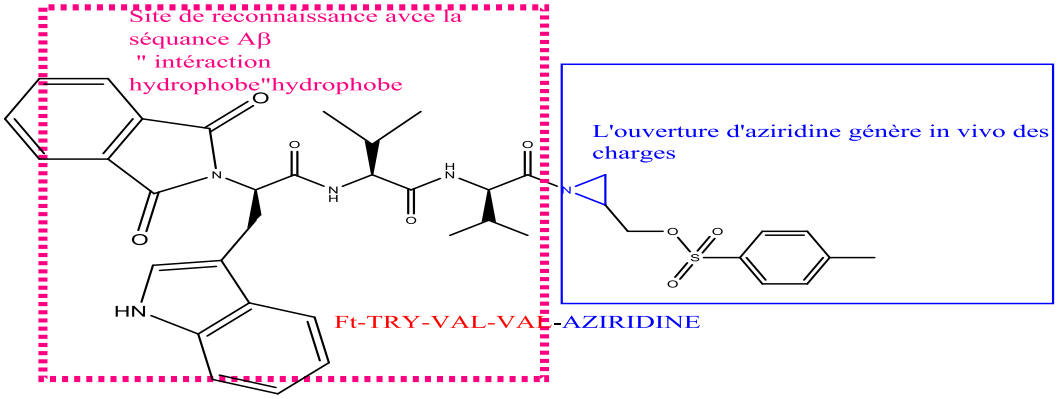
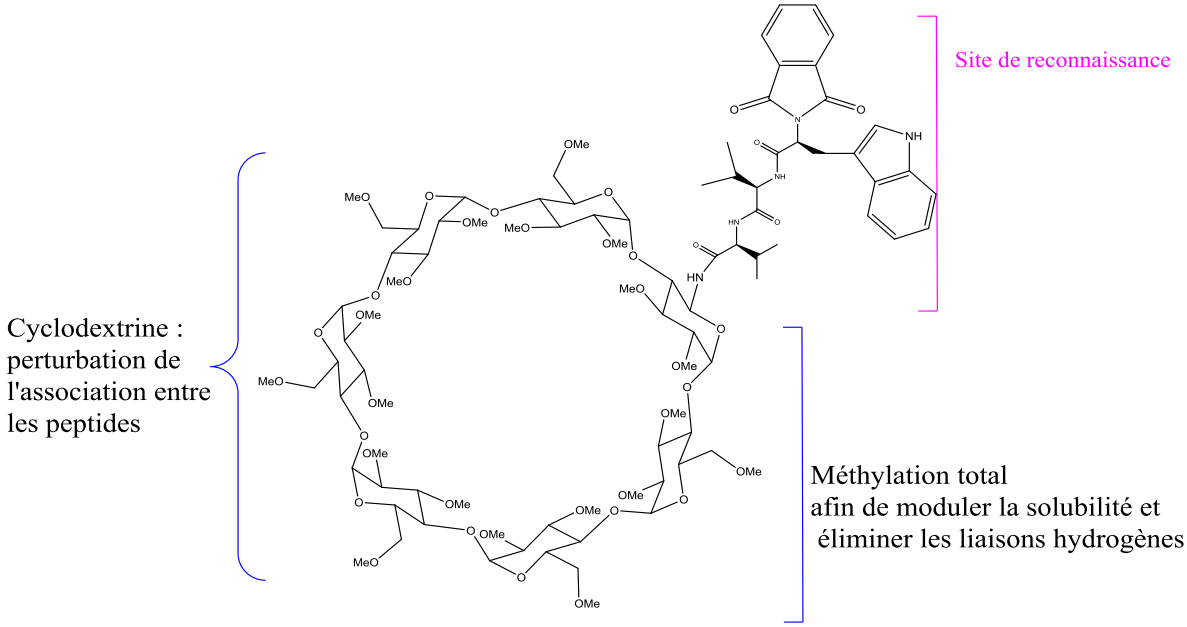


Figure 1 : Conception d'un inhibiteur modèle greffé à une aziridine.



Méthylation de la cyclodextrine pour rompre l'aggregation via les liaisons hydrogènes

Figure 2 : Conception d'un inhibiteur modèle greffé à une β-CD.

3. Purification des solvants et synthèse de nos composés :

Avant d'entamer nos synthèses, il est important de purifier notre solvant dont on aura besoin par la suite, à savoir : MeOH

a) Purification du MeOH :

Dans un ballon on verse 800 ml de méthanol (MeOH) ensuite, on ajoute 0.8g d'iode (I_2) et 5.6 g de Magnésium (Mg). On porte notre mélange à reflux (T=40°C) pendant 2h, Après le refroidissement puis on place un montage de distillation.

$$Mg_{(s)} + I_{2(s)} \leftrightarrows Mg^{2+}_{(s)} + 2I^-_{(s)}$$

$$Mg^{2+}_{(s)} + 2MeOH_{(l)} \longrightarrow \underline{MeOMgOMe_{(s)}} + H_{2(g)}$$

MeOMgOMe: *Méthanoate de Magnésium, sert à piéger les traces d'eau*

$$MeOMgOMe_{(s)} + 2H_2O_{(l)} \longrightarrow 2MeOH_{(l)} + Mg(OH)_{2(s)}$$

4. Synthèse du premier inhibiteur :

a) synthèse du groupe de reconnaissance N- Carbobenzyl-Proline-Val-Val-COOH :

i. Estérification de la valine et élimination du chlorhydrate :

La première étape de notre schéma réactionnel pour la synthèse de notre 1er inhibiteur, consiste à l'estérification de la valine, et par la suite convertir le groupe amino du chlorhydrate obtenu sous sa forme libre, en traitant notre réactif de départ par la TEA ce qui nous a permis d'obtenir notre produit cible avec un bon rendement 99%.

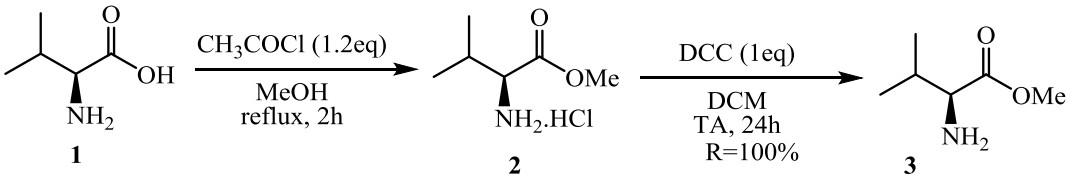


Schéma 1: Estérification de la valine et traitement du chlorhydrate par la TEA.

b) Couplage de la N-C-Proline à l'ester méthylique de la Valine:

Nous avons entamé notre synthèse, par l'introduction du motif N-carbobenzyl-Proline (b), à la (Val-CO_2Me) produit (a) via une réaction de couplage peptidique en présence du dicyclohexycarbodiimide (DCC) dans le DCM anhydre. Le dipeptide (2) est obtenu après 24h de réaction, sous forme d'un solide blanc avec un rendement de **96**%.

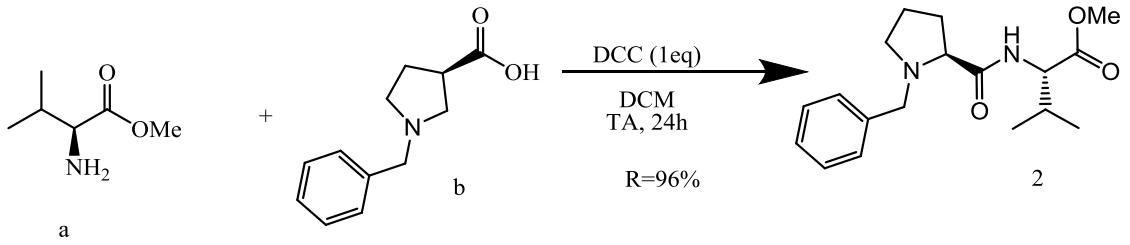


Schéma 2: *Couplage de la N-C-Proline à l'ester méthylique de la valine.*

c) Hydrolyse du Dipeptide N- Carbobenzyl-Proline-Val-COOMe:

Par la suite, nous avons effectué une hydrolyse de l'ester par une solution de LiOH (1N) à 0°C pendant une heure, puis à Tamb en utilisant un mélange THF: Eau (2:1) comme solvant. Puis, après traitement nous avons bien obtenu l'acide carboxylique, confirmé par l'analyse IR avec une large bande vers 3300cm^{-1}. Quant au rendement de cette hydrolyse, il est de 26% (3).

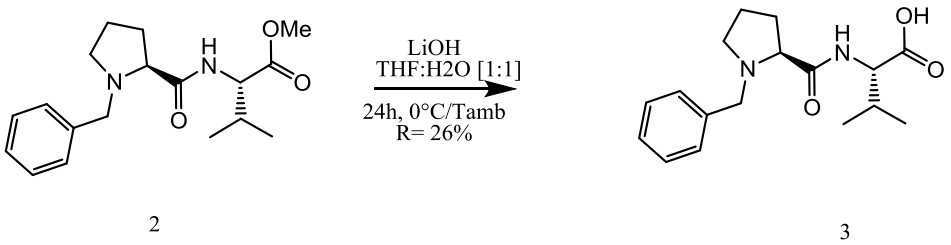


Schéma 2 *: Hydrolyse de l'ester du dipeptide N- Carbobenzyl-Proline-Val-COOMe.*

d) Couplage peptedique entre Val-COOMe et N- Carbobenzyl-Proline-Val-COOH :

Selon le même protocole, on réalise un couplage peptidique entre le produit (3) et Val-COOMe. Le tripeptide (4) est obtenu après 24h de réaction, sous forme de cristaux blancs avec un rendement de **10.92** %, que l'on justifie par un temps de couplage insuffisant.

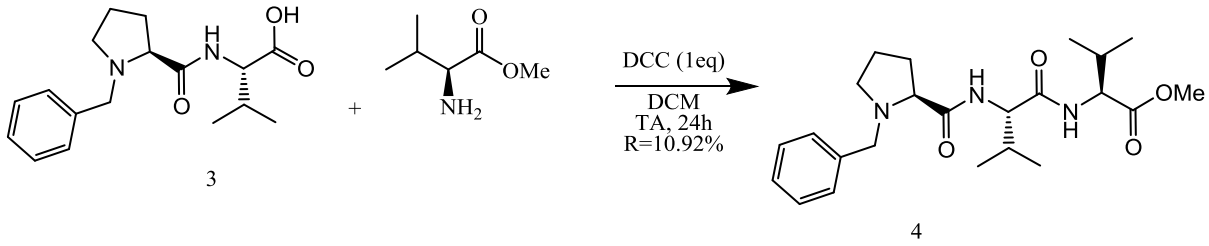
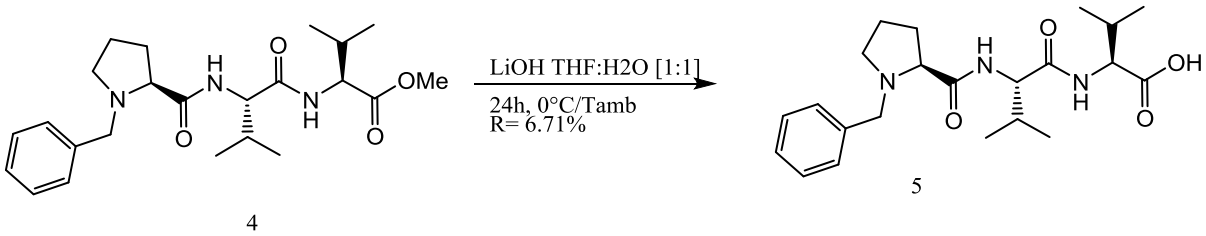


schéma 3: Couplage N-C-Proline-Val-COOH et Val-COOMe.

e) Hydrolyse du tripeptide N-C-Proline-Val-Val-COOMe :

L'hydrolyse de la fonction C-terminale du produit (4) est réalisée dans un mélange THF:Eau (1:1) comme solvant au lieu de (2 :1), afin d'augmenter le rendement d'extraction. Ensuite on y ajoute une solution de LiOH (1N) à 0°C pendant une heure, et après acidification avec une solution de HCl 1N, et traitement de cette phase à Tamb, nous avons obtenu une très faible quantité (5) avec un rendement de 6.71%, ce qui fait qu'on n'a pas pu terminer nos synthèses concernant ce tripeptide.



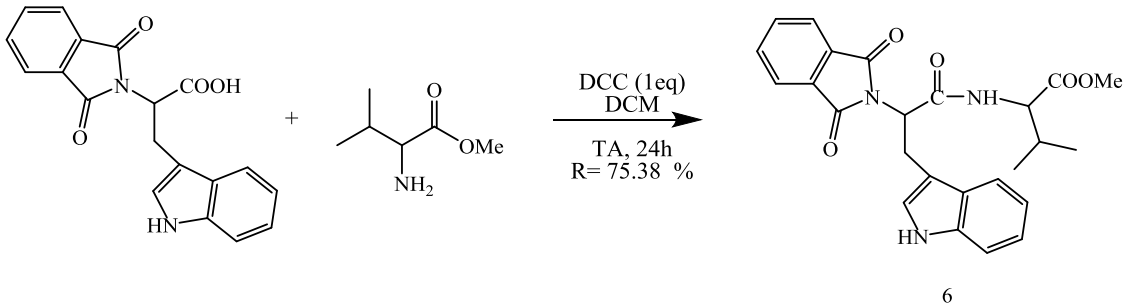
4 5

Schéma 4 : Hydrolyse du tripeptide N-C-Proline-Val-Val-COOMe.

5. Synthèse Ft-TRY-VAL-VAL- β-CD methylée :

a) Couplage peptedique entre Ft-Tryptophane et Val-COOMe

Nous avons poursuivi notre synthèse, par l'introduction du motif Ft-Tryptophane, via la réaction de couplage avec l'ester méthylique de la Valine (Val-CO_2Me) selon le même protocole. Le dipeptide est obtenu après 24h de réaction, sous forme d'un solide jaunâtre avec un rendement de **75.38** %.



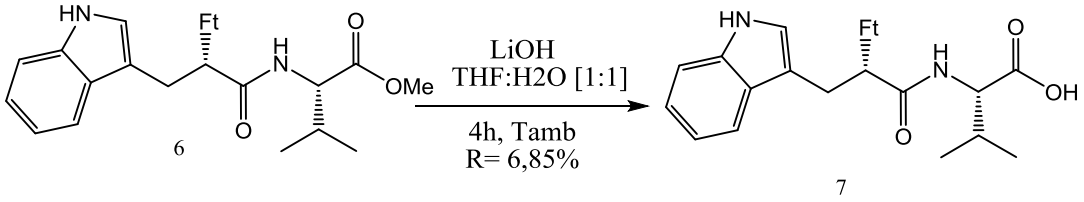
6

Schéma 5 : Couplage de la Ft-Try et de la VAL-CO_2Me.

b) Hydrolyse du Dipeptide Ft-Try-Val-COOMe:

Selon la même méthode d'hydrolyse, l'ester (6) a été déprotégé et après traitement nous avons bien obtenu l'acide carboxylique (7), confirmé par l'analyse IR avec une large

bande vers 3300cm^{-1}. Quant au rendement de cette hydrolyse, il est de 6,85%, de nouveau il y a une grande perte de la masse lors des extractions de notre produit dont on ressoudera par la suite.

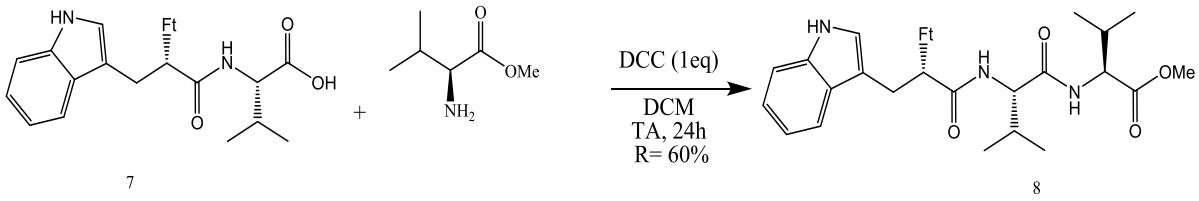


6 7

Schéma 6: Hydrolyse de l'ester du dipeptide Ft-Try-Val-COOMe.

c) Couplage peptedique entre Val-COOMe et Ft-Try-Val-COOH :

Par la suite pour rallonger la chaine de reconnaissance hydrophobe nous avons ajouté un autre motif valine, via la même méthode de couplage. Le tripeptide est obtenu après 48h (réaction suivie par CCM), on obtient un produit sous forme d'un liquide huileux avec un rendement de **60** %. On a procédé à des filtrations de la DCU, afin d'augmenter le rendement et ça a permet de repérer la fin de la réaction.

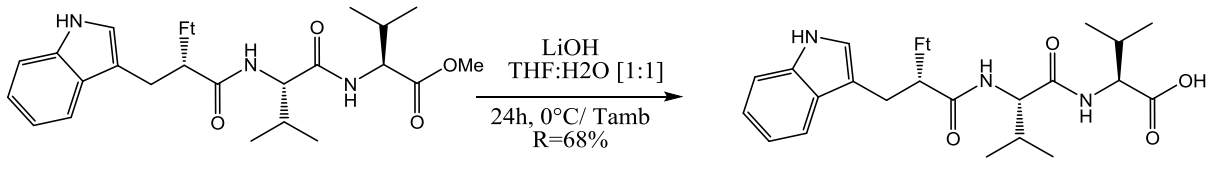


7 8

Schéma 7: Couplage Ft-Try-Val-COOMe et Val-COOMe.

d) Hydrolyse du tripeptide Ft-Try-Val-Val-COOMe :

Il est nécessaire de libérer la fonction C-terminal, pour les futurs couplages avec les groupes perturbateurs. C'est pour cela qu'on a procédé à une hydrolyse de l'ester **(8)** par le même protocole décrit auparavant. Sauf, qu'on a réalisé une extraction en continue afin d'augmenter le rendement via un montage sous agitation magnétique et ajout après acidification d'une solution de HCl 1N dans un premier essai, et de l'acide concentré dans un deuxième essai, ce qui a nettement augmenter le rendement, or on obtient un produit huileux de couleur jaunâtre dont le rendement est de 68% (10).



9 **10**

Schéma 8 : Hydrolyse du tripeptide Ft-Try-Val-Val-COOMe.

Tableau 2: Essais de protocole d'extraction après hydrolyse.

1er Essai	R% = 38	Temps d'extraction = 45 min
2 ème Essai	R%= 68	Temps d'extraction = 20 min

e) Couplage peptidique entre le tripeptide et la NH2-β-CD-OMe:

Pour terminer le premier inhibiteur la dernière étape consiste à greffer le tripéptide obtenu avec la NH2-β-CD methylée, via la réaction de couplage entre le tripeptide Ft-Try-Val-Val-COOMe en présence du dicyclohexycarbodiimide (DCC) dans le DCM anhydre. L'ordre d'ajout des réactifs est très important dans ce cas, car on risque la formation d'un complexe d'inclusion in situ avant la réaction de couplage et sa précipitation.

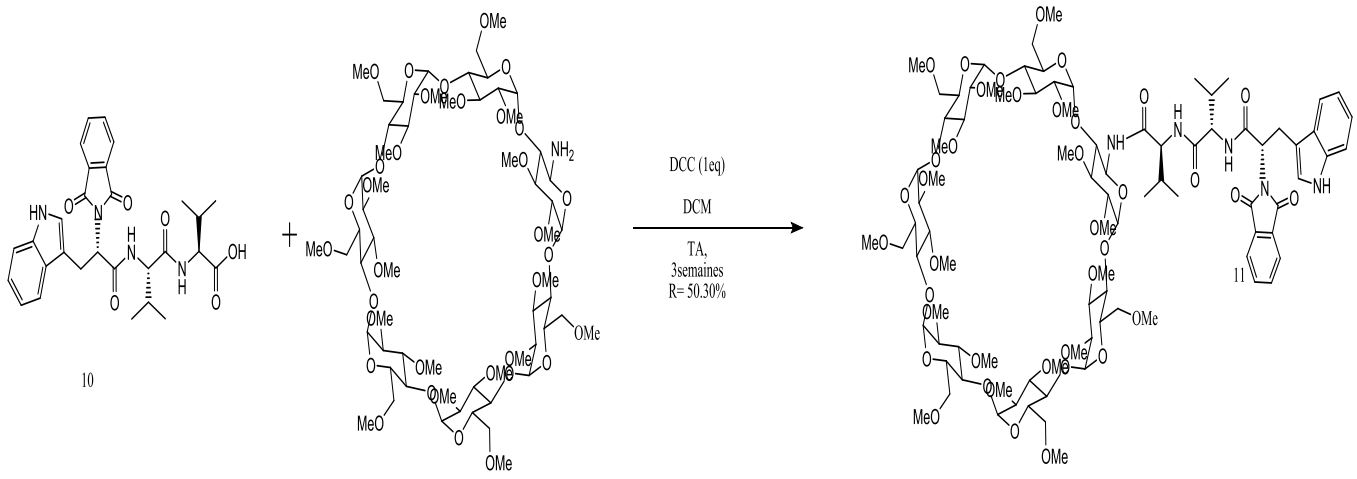


Schéma 9 : synthèse du premier inhibiteur Ft-Try-Val-Val-β-CDOMe

6. Synthèse du deuxième inhibiteur Ft-Try-Val-Val-aziridine:

a) Synthèses du deuxième perturbateur :

Le deuxième perturbateur à savoir l'Aziridine tosylate est synthétisé à partir du glycidole à qui on a protégé la fonction alcool par le chlorure de 4-toluénesulfonyle (TsCl), suivie d'une ouverture de l'époxyde grâce au NaN_3, qui a conduit au composé 14 (2-azido-3-hydroxypropyl-4-méthylbenzosulfate) ce dernier est traité par la triphénylphosphine (PPH_3) pendant 18 heures pour donner le perturbateur II correspondant.

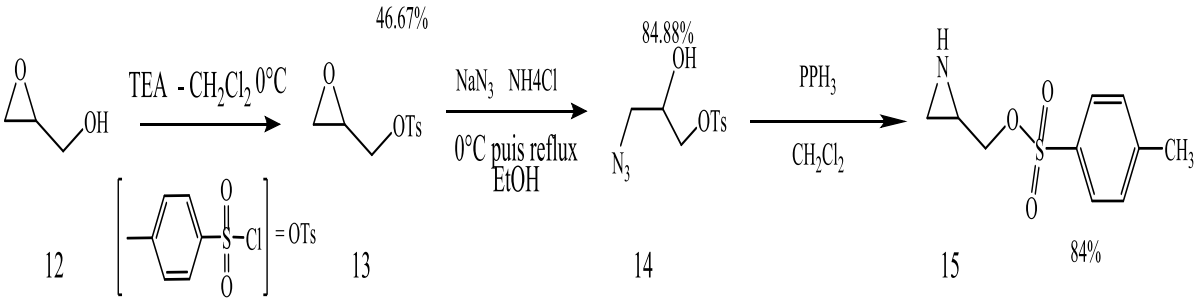


Schéma 10 : synthèse de l'aziridine (groupe perturbateur).

b) <u>Couplage peptidique entre le tripeptide et l'aziridine :</u>

A fin de terminer le deuxième inhibiteur la dernière étape consiste à greffer le tripeptide obtenu avec l'aziridine, via la réaction de couplage en présence du (DCC) dans le DCM anhydre. Le tripeptide est obtenu après 24h de réaction, avec un rendement de 90% (16).

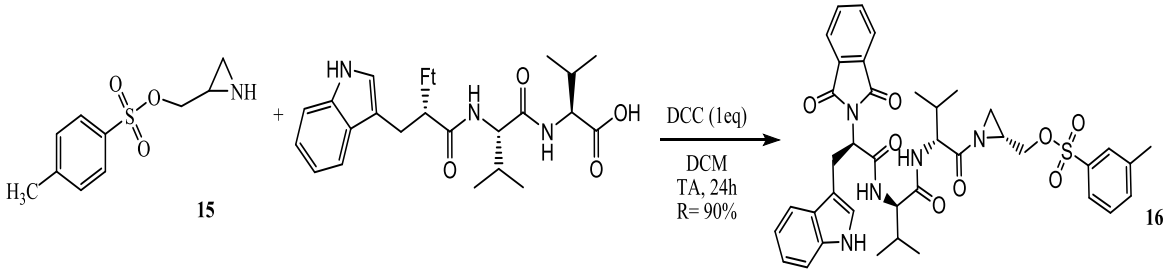


Schéma 11: synthèse du deuxième inhibiteur Ft-Try-Val-Val-aziridine.

B. Etude du Complexe d'inclusion Tryp-VAL-VAL-COOH et la βCD par spectroscopie IR:

Le complexe d'inclusion β-CD-Tryp-Val-Val-COOH a été préparé en utilisant la méthode de malaxage. Les deux composés (β-CD native et le tripeptide) ont été mélangés à ratio molaire de 1:1 et soigneusement broyés dans un mortier pendant une heure, jusqu'à l'obtention d'un solide homogène. le produit obtenu sera ensuite caractérisé par infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) vu que c'est un outil très utile pour prouver l'existence d'un complexe d'inclusion, en le comparent avec le spectre IR du tripeptide seul et la β-CD native seule.

L'intérêt de cette étude, est de mettre en évidence si le tipeptide Tyrp-VAL-VAL-COOH qui est fixé sur la CD, qui servira de groupe de reconnaissance avec l'Aβ-42 subira une intra-inclusion ou non.

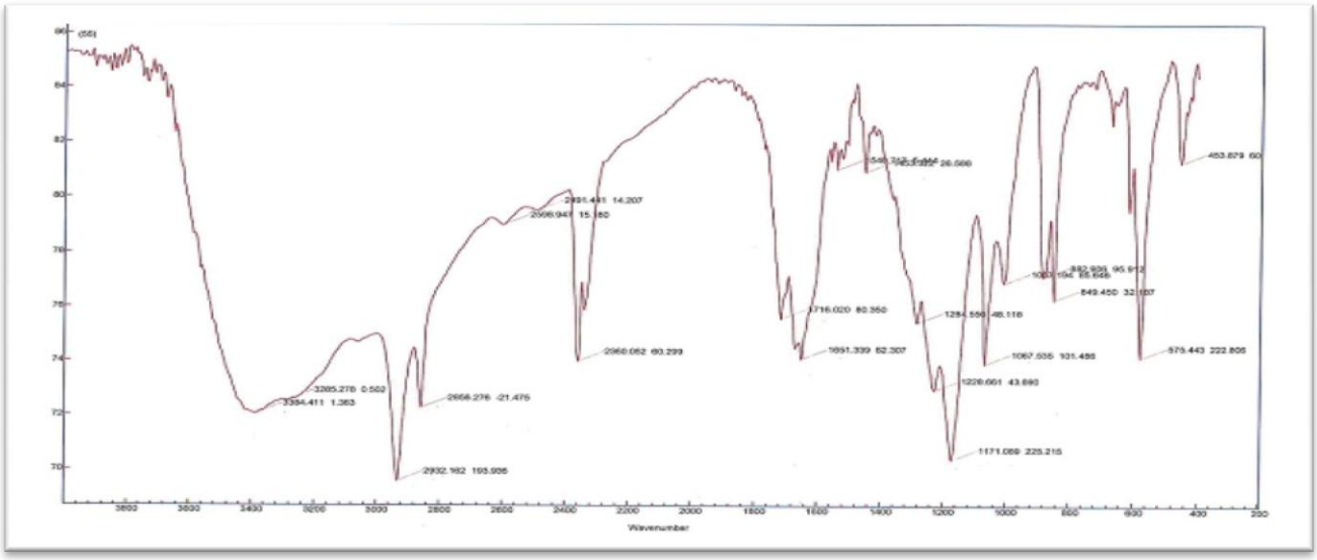


Figure 3 : Spectre IR du tripeptide Tryp-Val-Val-COOH.

Tableau 3 : Bandes caractéristiques du tripeptide et le complexe d'inclusion :

Groupe fonctionnels	***tripeptide***	***Complexe d'inclusion (cm^{-1})***	***Changement : Δδ***	***Intensité des bandes Tripeptide***	***Intensité des bandes du complexe d'inclusion.***
ν [OH]	*3384.41*	*3384.36*	***+0.05***	*Forte*	*Forte*
ν [C=O]	*1651.33*	*1626.31*	***-25.02***	*moyenne*	*faible*
ν [C-O]	*1171.08*	*1081.35*	***-89.73***	*Forte*	*moyenne*
ν [CH] des CH_3 et CH_2 asymétrique	*2932.16*	*2928.32*	***-3.84***	*Forte*	*moyenne*
ν [CH] des CH_3 et CH_2 symétrique	*2856.27*	*2925*	***+68.73***	*moyenne*	*Faible*

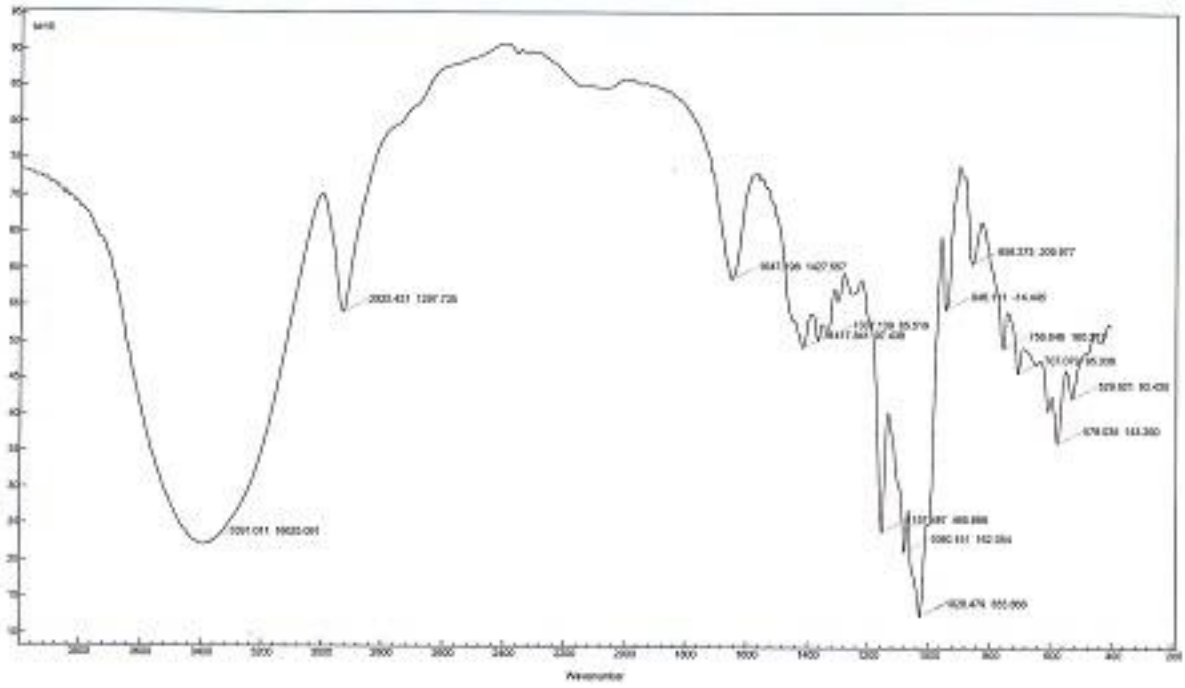


Figure 4 : Spectre IR de la β-CD native.

Tableau 4 : Bandes caractéristiques de la CD libre et le complexe d'inclusion :

Groupe fonctionnels	***β-CD (cm^{-1})***	***Complexe d'inclusion (cm^{-1})***	***Changement : Δδ***	***Intensité des bandes de la β-CD seule***	***Intensité des bandes du complexe d'inclusion.***
ν [OH]	*3391.01*	*3384.36*	***-6.65***	*Forte*	*Forte*
ν [CH_2] asymétrique du carbone 6	*2925.43*	*2928.32*	***+2.89***	*faible*	*Moyenne*
ν [CH_2] symétrique du carbone 6	/	*2925*	***+2925***	/	*Faible*
ν [C-O]	*1080.15*	*1081.35*	***+1.2***	*Forte*	*Moyenne*
ν [C-C]	*1157.48*	*1156,34*	***-1.14***	*Forte*	*Faible*
ν [OH] déformation	*1028,47*	*1028,58*	***+0.11***	*Forte*	*Forte*

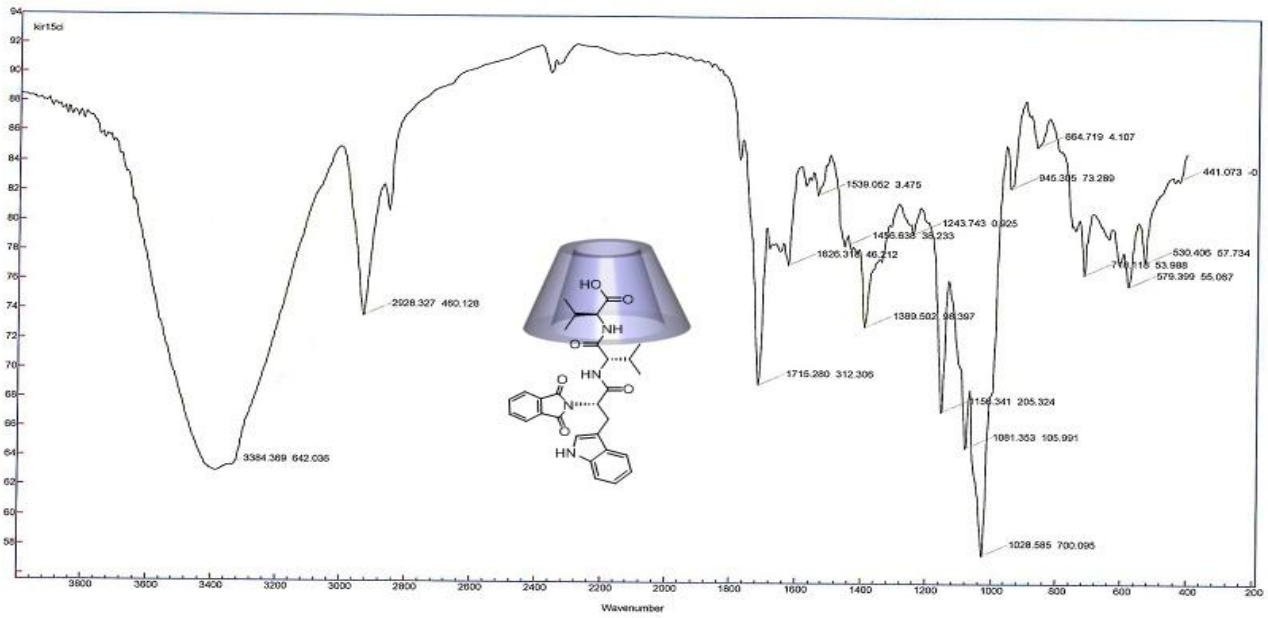


Figure 5 : Spectre IR du complexe d'inclusion tripeptide avec la β-CD.

Proposition de la géométrie du complexe d'inclusion :

Il est difficile d'élucider la géométrie du complexe d'inclusion sans avoir recours au ROESY, mais en se basant sur la spectroscopie IR et le changement dans la fréquence et l'intensité des bandes du tripeptide, (valeurs mentionnées dans les tableaux précédents) qui montrent un changement flagrant au niveau des liaisons C=O (amide) qui n'apparaissent pas sur le spectre du complexe d'inclusion, cela dit on retrouve les liaisons C-O , C-C et OH (déformation) sur les deux spectres de la β-CD native et d'inclusion ainsi ces dernières liaisons n'apparaissent pas sur le spectre du tripeptide (Tryp-VAL-VAL-COOH) de ce fait on peut dire que ces résultats prouve donc l'encapsulation de la partie aliphatique dans la cavité hydrophobe de la β-CD.

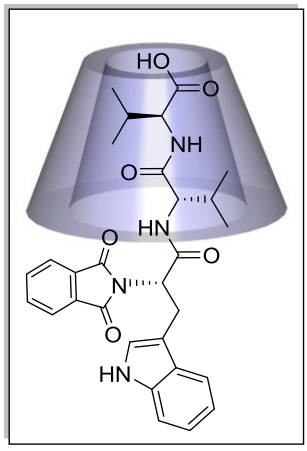


Figure 6 : Géométrie proposé du complexe d'inclusion tripeptide-CD.

Conclusion :

Pour conclure on peut dire qu'éliminer la maladie d'Alzheimer d'une manière radicale, on n'est pas encore là mais le faite de pencher sur ce problème en étudiant la question des beta amyloïdes (Aβ-42) reste une approche assez studieuse et prometteuse vu les études et publication scientifiques qui mettent en évidence la responsabilité de ce dernier dans le déclanchement de la MA. Concernant nos deux inhibiteurs à savoir le Ft-Try-Val-Val-β-CD-OMe et Ft-Try-Val-Val-aziridine pour pouvoir stopper l'agrégation fibrillaire, du chemin reste encore à faire pour les mettre réellement au point dans le but de nous assurer de leur efficacité, pour cela il faut encore les analysés et confirmer leur activité biologique. Du moins sur le plan synthèse, la méthode suivie est simple ; des couplages peptidiques classiques, qui peuvent être amélioré sur le plan de rendement et le temps de réaction par l'utilisation d'autre réactifs tel que DMAP, dont on ne dispose pas au niveau de notre laboratoire. Nous terminons notre travail, par une étude de complexation du tripeptide avec la CD native, le résultat prouve bien une intra-complexation de la partie de reconnaissance à l'interieur de la cavité de la CD, ce qui aura un impact cinétique sur l'interaction avec le peptide (Aβ-42).

Perspectives:

Ceci n'est qu'une initiation d'un grand travail qui reste à faire ; nous projetons dans le futur proche, vers une étude détaillée de simulation moléculaire des inhibiteurs peptidiques de différent sites de reconnaissance en modifiant les résidus avec plusieurs groupes perturbateurs, essentiellement à base de triazoline (le cycle azoté est indispensable vu les résultats biologique déjà vus dans la littérature), à base de différentes cyclodextrines modifiées (leur capacité à améliorer le passage à travers la barrière hémato encéphalique).

Sélectionné par la suite celle qui présente les meilleures interactions déstabilisantes de l'agrégation, et perturbation de l'agrégation de amyloïdes (Aβ-42).

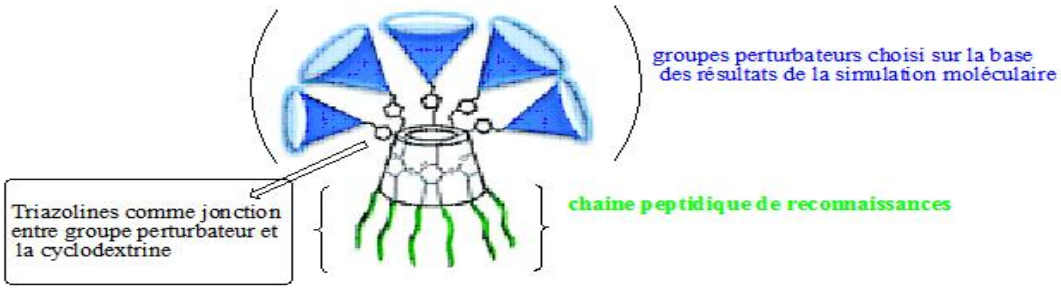


Figure 7 : Structure générale du model des inhibiteurs cibles.

Les êtres humains soignent Mais c'est DIEU qui guérit

IV. PARTIE III : PARTIE EXPERIMENTALE

Indications générales :

Au cours de notre travail, les manipulations et analyses ont été réalisées dans le laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA), et les analyses IR sont aussi réalisées dans le même laboratoire de l'Université Aboubakr Belkaid-Tlemcen.

A. Matériel et méthodes :

1. Produits chimiques et solvants :

Les réactifs et les solvants de réaction ont été utilisés sans traitement spécifique, sauf précision. Les solvants nécessitant une utilisation dans des conditions anhydres sont distillés.

2. Chromatographie :

Chromatographie sur Couche Mince (CCM), réalisée sur des plaques de d'Aluminium recouvertes de gel de silice 60 F_{254}. Les éluants utilisés sont des mélanges de solvant ; (Les proportions seront précisées pour chaque cas, dans la partie synthèse).

3. Infra rouge et points de fusion :

a) Infra-Rouge

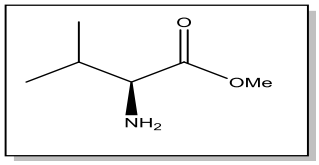
Les analyses dans l'infrarouge (IR) ont été effectuées au centre de mesures du laboratoire (COSNA). Les échantillons étaient traités sous forme de pastilles de KBr. Les principales fréquences d'absorption sont données en nombre d'onde (cm^{-1}).

b) Points de fusion

Les points de fusion sont déterminés sur un fusionomètre digital de la série IA9200 d'Electrothermal au laboratoire (COSNA).

B. Synthèse des inhibiteurs peptidiques

1. Eesterification de la Valine :



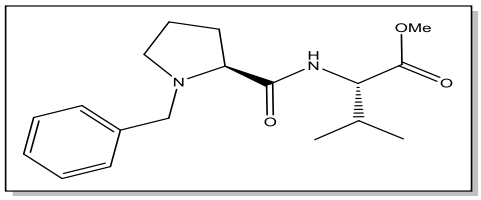
Sous atmosphère d'azote et à (T=0°C) on additionne du chlorure d'acétyle (5ml, 1,2eq) à 40ml de MeOH froid, auxquels on ajoute la valine (5g, 66.43mmol). On note une solubilisation instantanée. Après 30 minutes, on porte le mélange à reflux pendant 2h (40°C). Une fois les deux heures écoulées, on évapore sous vide, et on récupère (7,2g, 100%) d'ester méthylique de valine. **Formule brute:** $C_6H_{14}ClNO_2$, **MM** = 167,64 g.mol^{-1}; **Rendement:** 100%.

2. Traitement du chlorhydrate de la valine estérifiée :

A une soluion de chlorhydrate de Valine-CO_2Me (7.2g, 57.23 mmol) dans le CH_2Cl_2 (DCM) (40ml), on ajoute (9ml, 1,5 eq) de TEA goutte à goutte et on laisse réagir sous agitation à température ambiante pendant 45 minutes. Le produit est alors filtré puis évaporé sous vide. (3,06 g 42.85%) de NH_2Val-CO_2Me sont récupérés. **Formule brute:** $C_6H_{13}NO_2$; **MM** = 132.15 g.mol^{-1}; **Rendement:** 42.85% ; **Pf** >260°C

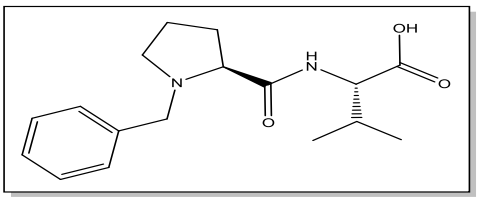
C. Etapes de synthese du premier site de reconnaissance Proline-Val-Val-COOH :

1. Couplage peptidique entre Val-CO_2Me et Benzyl-Proline:



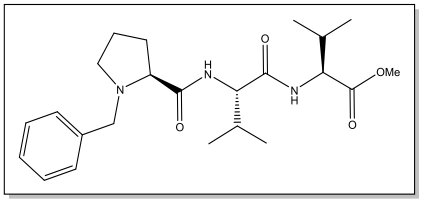
On dissout (20mg, 0,22mmol) de Val-CO_2Me et (0.3g, 1eq) de N-Carbobenzylproline dans du DCM, et on y ajoute goutte à goutte (0.31g/1eq) de DCC dissouts dans un petit volume de DCM. On laisse réagir pendant 24 h à TA. On filtre et on évapore sous vide pour obtenir (0,46g, 96%) de cristaux blancs. **Formule brute:** $C_{19}H_{28}N_2O_3$; **MM** =318.281 g.mol^{-1} **Rendement:** 96%; **CCM: Rf =** 0.72 (éluant: ACOEt/ $CHCl_3$) (1:1); **I.R(cm-1)** : 3325.92 NH (amide), 1704.37 -C=O (ester), 1627,60 C=O (amide), 1206.13 C-O (acide carboxylique), 2931.34 -C-H (CH3/CH2)

2. Hydrolyse de du dipeptide N-Carbobenzyl-proline-Val-COOMe :



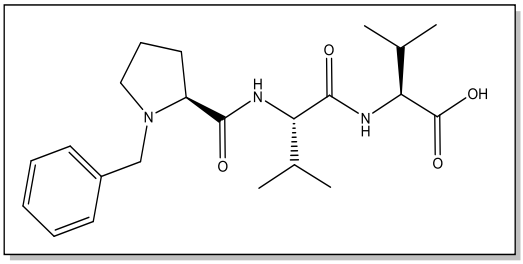
Dans un mélange THF: Eau (2:1) on dissout (0.46g, 3.1mmol) de notre dipeptide protégé, auxquels on ajoute à 0°C (1,5ml, 1eq) de solution LiOH 1N. On laisse réagir pendant 4h, ensuite on lave la solution avec l'acétate d'éthyle, ensuite on acidifie la phase aqueuse avec une solution de HCl 1N jusqu'à pH=1, et on l'extrait avec l'acétate d'éthyle. On sèche puis on filtre et en fin on évapore sous vide, et on obtient (11.8mg, 26%) du composé. **Formule brute:** $C_{18}H_{26}N_2O_3$; **MM** = 304.281 g.mol^{-1}; **Rendement:** 26 %.

3. Couplage peptidique entre N-Carbobenzyl-Proline-Val et Val-COOMe :



On dissout (0.05g,) de Val-CO_2Me et (0.118g, 1eq) de N-Carbobenzylproline-Val-COOH dans du DCM, et on y ajoute goutte à goutte (0.08g/1eq) de DCC dissouts dans un petit volume de DCM. On laisse réagir pendant 24h à TA. On filtre et on évapore sous vide pour obtenir (0.178g, 10.92 %) de cristaux blancs. **Formule brute:** $C_{23}H_{36}N_3O_4$; **MM** = 418g.mol^{-1}; **Rendement: 10.92**%

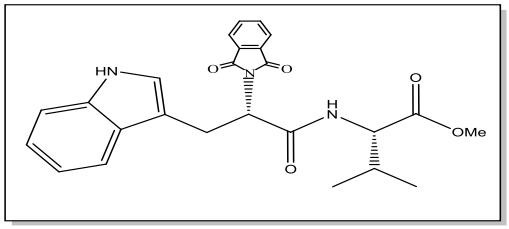
4. Hydrolyse du tripeptide N-Carbobenzyl-proline-Val- Val-COOMe



Dans un mélange THF: Eau (2:1) on dissout (0.178g) du dipeptide protégé, auxquels on ajoute à 0°C (0.53ml, 1eq) de solution LiOH 1N. On laisse réagir pendant 24h, ensuite on lave la solution avec l'acétate d'éthyle, ensuite on acidifie la phase aqueuse avec une solution de HCl 1N jusqu'à pH=1, et on l'extrait avec l'acétate d'éthyle. On sèche puis on filtre et en fin on évapore sous vide, et on obtient (0.978g 6.71 %) du composé huileux o ronge. **Formule brute:** $C_{22}H_{34}N_3O_4$; **MM** = 404g.mol^{-1}; **Rendement:** 6.71%; **CCM: Rf =** 0.73 (éluant: ACOEt/ $CHCl_3$) (1:1).

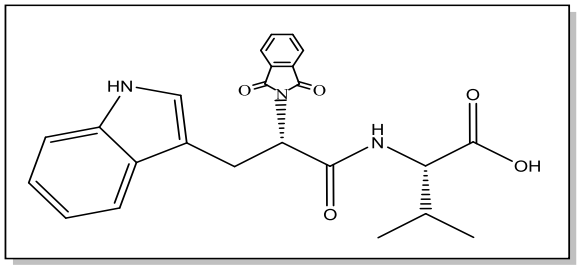
D. Etapes de synthèse du deuxième site de reconnaissance Ft-Try-Val-Val-COOH:

1. Couplage peptedique entre Ft-Tryptophane et Val-COOMe :



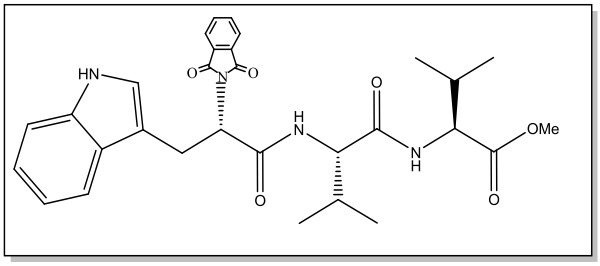
On dissout (50mg, 0,55mmol) de Val-CO_2Me et (1.2g, 1eq) de Ft-tryptophane dans du DCM, et on y ajoute goutte à goutte (0.78g/1eq) de DCC dissouts dans un petit volume de DCM. On laisse réagir pendant 24h à TA. On filtre et on évapore sous vide pour obtenir un solide jaunâtre (1.28g, 75.38%). **Formule brute:** $C_{25}H_{25}N_3O_5$; **MM** =447 g.mol^{-1}; **Rendement: 75.38** %; **PF= 172°C**; **CCM: Rf =** 0.95 (éluant: ACOEt/ $CHCl_3$) (1:1); **I.R(cm-1)** : 3341.20NH (amide), 1716.89 -C=O (ester), 1650,66 C=O (amide), 1101.52 C-O (acide carboxylique), 2931.12 -C-H (CH3/CH2), 739.19 C-H (déformation aromatique).

2. Hydrolyse du dipeptide Ft-Tryptophane-Val-COOMe :



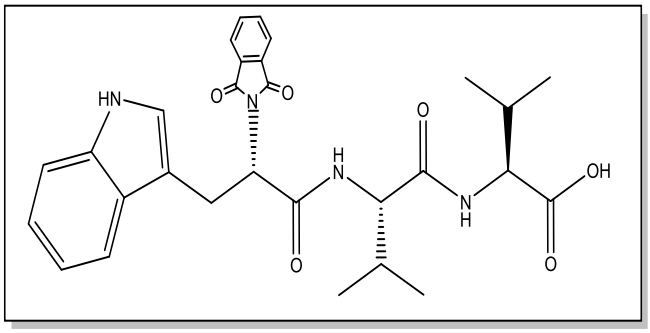
Dans un mélange THF: Eau (2:1) on dissout (1.28g, 3.1mmol) de notre dipeptide protégé, auxquels on ajoute à 0°C (3.85ml, 1eq) de solution LiOH 1N. On laisse réagir pendant 24h, ensuite on lave la solution avec l'acétate d'éthyle, ensuite on acidifie la phase aqueuse avec une solution de HCl 1N jusqu'à pH=1, et on l'extrait avec l'acétate d'éthyle. On sèche puis on filtre et en fin on évapore sous vide, et on obtient (1.13g, 6.85%) d'un composé huileux de couleur orange. **Formule brute:** $C_{24}H_{23}N_3O_5$; **MM** = 433 g.mol^{-1}; **Rendement:** 6.85 %, **CCM: Rf =** 0.88 (éluant: ACOEt/ $CHCl_3$) (1:1).

3. Couplage peptedique entre Val-COOMe et Ft-Try-Val-COOH :



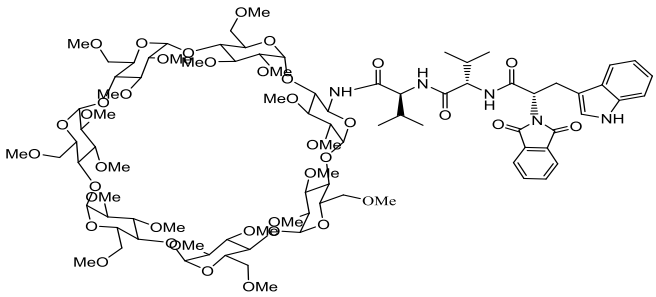
On dissout (0.33g) de Val-CO_2Me et (1.1g, 1eq) de Ft-Try dans du DCM, et on y ajoute goutte à goutte (0.51g/1eq) de DCC dissouts dans un petit volume de DCM. On laisse réagir pendant 24h à TA. On filtre et on évapore sous vide pour obtenir un solide jaunâtre (0.486g, 60%). **Formule brute:** $C_{30}H_{34}N_4O_6$; **MM** =546 g.mol^{-1}; **Rendement:** 60%; **CCM: Rf =** 0.9 (éluant: ACOEt/ $CHCl_3$) (1:1).

4. Hydrolyse du tripeptide Ft-Try-Val-Val-COOMe :



Dans un mélange THF: Eau (1:1) on dissout (0.486g,) de notre dipeptide protégé, auxquels on ajoute à 0°C (1,5ml, 1eq) de solution LiOH 1N. On laisse réagir pendant 24h, ensuite on lave la solution avec l'acétate d'éthyle, ensuite on acidifie la phase aqueuse avec une solution de HCl 1N jusqu'à pH=1, et on l'extrait avec l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl puis on la sèche avec du Na_2SO_4, on la filtre et en fin on évapore sous vide, et on obtient (0.16g, 6.85%) d'un composé huileux de couleur orange, et de cristaux blancs dans l'éther. **Formule brute:** $C_{29}H_{32}N_4O_6$; **MM** = 547.64 g.mol^{-1}; **Rendement:** 68% .**PF>à 260°C**; **CCM: Rf =** 0.89 (éluant: ACOEt/ $CHCl_3$) (1:1). **I.R (cm^{-1})**: 3384.41 OH (acide) 3285.72 NH (amide), 1171.09 –C-O (acide), 1651,33 C=O (amide), 1206.13 C-O, (acide carboxylique), 2932.16 -C-H (CH3/CH2), 843.45 –C-H (aromatique).

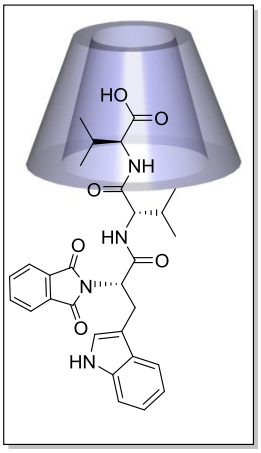
E. Couplage peptidique entre le tripeptide et la β-CD- OMe:



On dissout (40mg) de Ft-Try-Val-Val-CO_2Me et (0.1g, 1eq) de β-CD-OMe dans du DCM, et on y ajoute goutte à goutte (0.15g/1.2eq) de DCC dissouts dans un petit volume de DCM. On laisse réagir pendant 3 semaines à TA. On filtre et on évapore sous vide pour obtenir un produit huileux blanc (0.07g, 50.30 %). **Formule brute:** $C_{79}H_{121}N_6O_3$; **MM** = 1784.01g.mol^{-1}; **Rendement:** 50.30%; **CCM: Rf =** 0.09 (éluant: ACOEt/ $CHCl_3$) (1:1). **I.R (cm^{-1})**: 3326.20 NH (amide), 1574.00 C=C (aromatique), 1626.08 C=O (amide), 1042.87 C-O (acide carboxylique), 2929.39/ 2850.85 -C-H (CH3/CH2), 968.85 –C-H (aromatique).

F. Complexe d'inclusion du tripéptide avec les B-Cyclodextrines

1. Protocole géneral de la complexation:

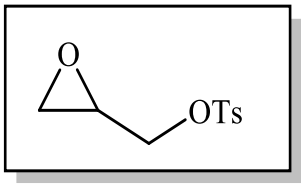


La complexation des β-CD avec le tripéptide, se déroule à température ambiante (25°C). On prépare deux quantités équivalentes du tripéptide (Ft-Try-Val-Val-COOH) et de β-CD, qui seront mélangés dans un mortier afin de les homogénéiser, et solubiliser la totalité des deux produits. Puis on soumet cette préparation aux analyses IR.

I.R (cm^{-1}): 3384.36 OH (acide) / NH (amide), 1715.28 C=O (phtalmido), 1626.31 C=O (amide), 1081.35 C-O (acide carboxylique), 2928.32 -C-H (CH3/CH2), 718.11 –C-H (aromatique), 1156.34 –C-C (valence), 1028.58 OH (déformation).

G. Synthèse de l'aziridine tosylate:

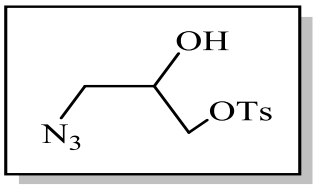
1. Protection du glycidol :



On dissout (5g) de glycidole dans 9.39 ml de TEA et une petite quantité de CH_2Cl_2 auquel on ajoute le chlorure de 4-toluénesulfnyle (TsCl) (12.90 g), à fin de protéger la fonction alcool, on laisse sous agitation magnétique à Tamb, on obtient (7.15g) d'un composé huileux de couleur, et de cristaux blancs dans l'éther. **Formule brute:** $C_{10}H_{12}O_4S$; **MM** = 228.26g.mol^{-1}; **Rendement:** 46.67%; **CCM: Rf =** 0.82 (éluant: ACOEt/ $CHCl_3$) (1:1).

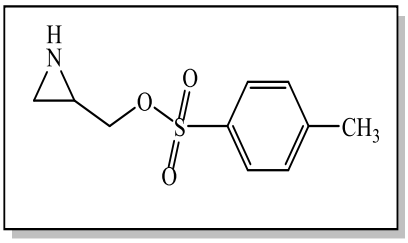
I.R (cm^{-1}): 2924.79 (-C-H); 1597.53 (O=S); 1360.0 (S-O); 1176.80 (–C-O).

2. Synthèse de l'azido-alcool :



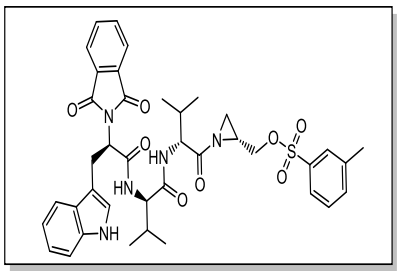
On dissout (2g) de glicidole protégé par le chlorure de tosyle dans 50 ml de EtOH et 48 ml d'eau distillée auquel on additionne 2.17g de l'azide (NaN_3) à température ambiante, après on porte à reflux T=70°C pendant 5H à la fin de ce temps on laisse sous agitation magnétique pour 24h, on obtient (4g) d'un composé huileux. **Formule brute:** $C_{10}H_{12}O_4S$; **MM** = 228.26g.mol^{-1}; **Rendement:**84.88 %, **CCM: Rf =** 0.50 (éluant: ACOEt/ $CHCl_3$) (1:1); **I.R (cm^{-1})**: 3379.65 OH (libre), 2925.71 -C-H (CH3/CH2), 2103.28 –C-(N=N-N)$^-$, 1597.69 (O=S), 1362.032 (S-O), 1176.84 (C-O).

3. Synthèse de l'aziridine :



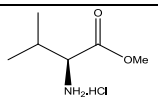
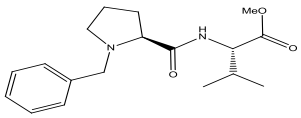
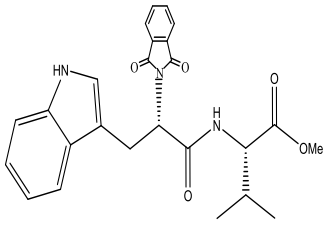
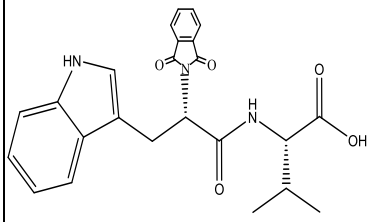
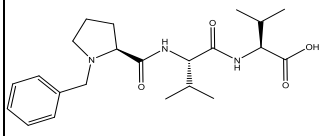
On dissout 1 eq de l'azidoalcool dans 20 ml de CH_2Cl_2 sous atmosphère anhydre à 0°C ensuite on ajoute 1.02 eq de la triphénylphosphine (PPH_3) (1.16g) et on laisse réagir pendant 18 heures à TA. Par la suite, on filtre et on évapore sous vide pour obtenir un produit huileux (0.03g, 84%). **Formule brute:**$C_{10}H_{13}NO_3S$; **MM** =227.28 g.mol^{-1}; **Rendement: 84%**, **CCM: Rf =** 0.7 (éluant: ACOEt/ $CHCl_3$) (1:1).

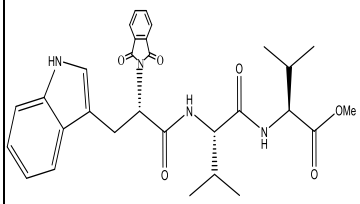
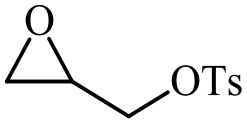
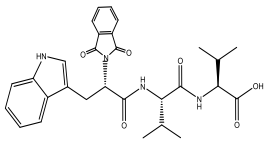
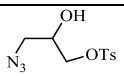
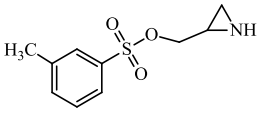
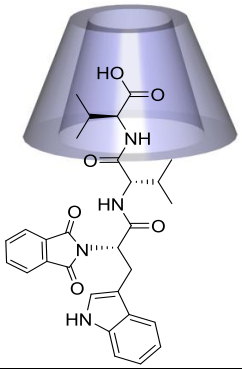
4. Couplage peptidique entre le tripeptide et l'aziridine :

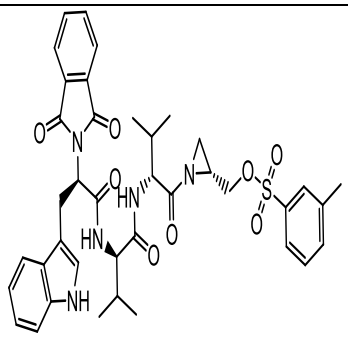
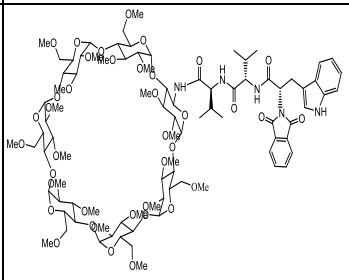


On dissout (0.07g) de Ft-Try-Val-Val-CO_2Me et (0.03g, 1eq) de l'aziridine dans du DCM, et on y ajoute goutte à goutte (0.2g/1.eq) de DCC dissouts dans un petit volume de DCM. On laisse réagir pendant 72H à TA. On filtre et on évapore sous vide pour obtenir un produit huileux (0.09g, 90%). Formule **brute:** $C_{41}H_{50}N_5O_8S$; **MM =** 792.95g.mol^{-1}; **Rendement:** 90% **CCM: Rf =** 0.88 (éluant: ACOEt/ $CHCl_3$) (1:1).

Tableau récapitulatif des produits synthétisés et résultats obtenus :

Code nature	**N**	**Structure**	**Masse molaire ($g.mol^{-1}$)**	**R (%)**	**Pf (°C)**	**Rf**	**IR (cm^{-1})**
KIR1 Solide banc	**1**		167,64	100	/	/	/
KIR2 Cristaux blanc	**2**		132.15	96	/	0.72	3325.92 1704.37 1627,60 1206.13 2931.34
KIR3 Solide Jaunâtre	**3**		447	75.38	/	0.95	3341.2 1716.89 1650,66 1101.52 2931.12 739.19
KIR4 Produit huileux	**4**		546	6.85	/	0.88	/
KIR5 Solide jaunâtre	**5**		403.52	620.71	/	0.73	/

KIR6 Cristaux blanc	**6**		532	60	/	0.9	/
KIR7 Cristaux blanc	**7**	Impureté Nacl	/	/	/	0.06	/
KIR8 Produit huileux	**8**		228.26	46.67	/	0.82	2924.79 1597.53 1360.0 1176.80
KIR9 Produit huileux	**9**		547.64	60.85	>260	0.89	3384.41 3285.72 1704.37 1651,33 1206.13 2932.16 843.45
KIR12 Produit huileux	**12**		257.27	84.88	/	0.50	3379.65 2925.71 2103.28 1597.69 1362.032 1176.84
KIR13 Produit huileux	**13**		227.28	84	/	0.7	/
KIR15 Solide blanc	**15**		1749.76	/	/	0.85	3384.36 1715.28 1626.31 1081.35 2928.32 718.11 1156.34 1028.58

KIR17 Produit Huileux brun	**17**		771.92	90	/	0.88	/
KIR18 Produit huileux Blanc	**18**		1784.01	50.30	/	0.09	3326.20 1574.00 1626.08 1042.87 2929.39 2850.85 968.85

Référence Bibliographiques :

[1] Ritchie, K.; Robine, J.M.; La démence sénile en France, une estimation de la charge actuelle et projection des tendances futures, *Medicine*, **1994** , *10* , 680-6.

[2] Blennow, K.; de Leon, M. J.; Zetterberg, H. Alzheimer's disease. *Lancet*, **2006**, *368*, 387-403.

[3] Clippingdale, B.; Wade, J. D.; Barrow, C. J.; The amyloid β peptide and its role in Alzheimer's disease, *Review Journal of Peptide Science*, **2001**, *7*, 227-249.

[4] Sipe, J. D.; Benson, M. D.; Buxbaum, J. N.; Ikeda, S.-i.; Merlini, G.; Saraiva, M. J. M.; Westermark, P., Amyloid fibril protein nomenclature: recommendations from the Nomenclature Committee of the *International Society of Amyloidosis. Amyloid*, **2012**, *19*, 167-170.

[5] Gorevic, P.; Castano, E.; Sarma, R.; Frangione, B., Ten to fourteen residue peptides of Alzheimer's disease protein are sufficient for amyloid fibril formation and its characteristic Xray diffraction pattern, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **1987**, *147 (2)*, 854-862.

[6] Pike, C. J.; Overman, M. J.; Cotman, C. W., Amino-terminal deletions enhance aggregation of β-amyloid peptides in vitro, *J. Biol. Chem*, **1995**, *270* , 23895-23898.

[7].(a) Tjernberg, L. O.; Näslund, J.; Lindqvist, F.; Johansson, J.; Karlström, A. R.; Thyberg, J.; Terenius, L.; Nordstedt, C., Arrest of -Amyloid Fibril Formation by a Pentapeptide Ligand, *J. Biol. Chem*, **1996**, *271 (15)*, 8545-8548; (b) Tjernberg, L. O.; Lilliehöök, C.; Callaway, D. J. E.; Näslund, J.; Hahne, S.; Thyberg, J.; Terenius, L.; Nordstedt, C., Controlling Amyloid β-Peptide Fibril Formation with Protease-stable Ligands, *J. Biol. Chem*, **1997**, *272 (19)*, 12601-12605.

[8] .Tjernberg, L. O.; Callaway, D. J. E.; Tjernberg, A.; Hahne, S.; Lilliehöök, C.; Terenius, L.; Thyberg, J.; Nordstedt, C., A molecular model of Alzheimer amyloid β-peptide fibril formation, *J. Biol. Chem*, **1999**, *274*, 12619-12625.

[9] .Kumar Singh, S.; Overview of Alzheimer's Disease and Some Therapeutic Approaches Targeting A*β* by Using Several Synthetic and Herbal Compounds Oxidative Medicine and Cellular Longevity, **2016**, Article ID 7361613, 22.

[10] . Soto, C.; Sigurdsson, E. M.; Morelli, L.; Asok Kumar, R.; Castano, E. M.; Frangione, B., β-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: Implications for Alzheimer's therapy, *Nat Med*, **1998**, *4*, 822-826.

[11]. Dufour, E.; Inhibiteurs et modèles moléculaires de fibres amyloïdes beta et tau impliquées dans la maladie d'Alzheimer : conception, synthèse et caractérisation, thèse de Doctorat université de Grenoble, **2006**.

[12] .Bett, C. K.; Ngunjiri, J. N.; Serem, W. K.; Fontenot, K. R.; Hammer, R. P.; McCarley, R. L.; Garno, J. C., *ACS Chem Neurosci*, **2010**, *1*, 608-626.

[13].Hamada, Y., Miyamoto, N., Kiso, Y., Novel β-amyloid aggregation inhibitors possessing a turn mimic, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2015**, 1572-1576.

[14] .Bartolini, M. ; Andrisano, V. ; *ChemBioChem*, **2010**, *11*, 1018-1035.

[15] .DeToma, A.S.; Salamekh, S.; Ramamoorthy, A.; Lim, M.H. .; *Chem. Soc. Rev*. 41, **2012**, 608-621.

[16] Convertino,M.; Pellarin, R.; Catto, M. ; Carotti, A.; Caflisch, A.; *Protein Sci*., **2009**, *18*, 792-800.

[17] Guzior, N.; Bajda, M.; Rakoczy, J.; Brus, B. ; Gobec, S. ; Malawska, B. ; *Bioorganic Med. Chem*, *23*, **2015**, 1629–1637.

[18] Więckowska,A.; Więckowski, K.; Bajda,M.; Brus, B.; Sałat, K.; Czerwińska, P.; Gobec, S.; Filipek, B.; Malawska, B.; *Bioorg. Med. Chem*, **2015**, *23*, 2445–57.

[19] N. Guzior, M. Bajda, M. Skrok, K. Kurpiewska, K. Lewiński, B. Brus, A. Pišlar, J. Kos, S. Gobec, B. Malawska, Eur. J. Med. Chem. 92 , **2015** ,738–749.

[20] D.Panek, A.Więckowska, T.Wichur, M.Bajda, J.Godyń, J.Jończyk, K.Mika, J.Janockova, O.Soukup, D.Knez, J.Korabecny, S.Gobec, B.Malawska, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2016**, *125*, *1-1132.*

[21] Chuanjun, L.; Yueyan, G.; Jianheng, L.; Meicun, Y.; Qiongfeng, L.; Zhiyong, X.; Xingshu Li , *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2012,** *22*, 7683–7687.

ANNEXE