

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté des Sciences

Département de Chimie

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Chimie Physique des Polymères

SYNTHESE ET CARACTERISATION D'UN PSEUDOPEPTIDE CAS D'UN AZAPEPTIDE

Par

M^{elle} ALIOUAT Hafidha

Devant le jury composé de :

Mr. R. BELAL	Professeur, U.S.D.B	Président
Mr. Y. BADJA HADJ-AHMED	Professeur, U.S.T.H.B	Examineur
Mr. A. DAHMANI	Professeur, U.S.T.H.B	Examineur
Mme. O. MOHAMMEDI	Maître de Conférences, U.S.D.B	Examineur
Mr. M. ZOUIKRI	Maître de Conférences, U.S.D.B	Rapporteur

Blida, Juin 2006

ملخص

من بين مقلدات البيبتيدات التي تتميز بخصائص صيدلانية و بيولوجية، الأزابيبتيدات التي تعد من عائلة شبيهة البيبتيدات الناتجة عن استبدال المجموعة $(CH)^{\alpha}$ لحمض أميني أو لعدة أحماض أمينية بذرة أزوت. من بين الفوائد المهمة لهذا الاستبدال هو الحفاظ على الطبيعة الكيميائية للسلسلة الفرعية و التي تلعب دورا جدها خاصة في مراحل التعرف الجزيئية.

إخترنا دراسة الأزابرولين، مشتق البرولين، الذي يدخل في تركيب البروتينات الجينية، كما أنه حمض أميني ينفرد بخصائص جدها مهمة، خاصة في تحديد البنية الكيميائية للبروتينات، لذلك قمنا أولا بتركيب سابقته التي تتمثل في حلقة البيرازولدين و ذلك على شكل بلوري نقي مع تثبيط لذرتي الأزوت النهائيين بتابعين مختلفين من نوع ايغيتان بتحرير متعامد. هذا التركيب يتم في مرحلتين؛ المرحلة الأولى تكمن في تثبيط انتقائي للهيدرازين الابتدائي بواسطة بنزيل أوكسيكربونيل أما المرحلة الثانية فهي تركز على ضم الهيدرازين- N^{α} ، N^{β} ثنائي التثبيط الناتج عن المرحلة الأولى مع 1،3-ثنائي برومو بروبان.

لإدخال وحدة الأزابرولين في سلسلة ازابيبتيدية مع الفينيل ألانين، استخدمنا بروتوكول تجميع جديد يعتمد على ثلاثي الفوسجين لتثبيط النهاية الكربوكسيلية للفينيل الانين، على عكس الأساليب المعروفة و التي تستلزم شروط صارمة كدرجة الحرارة المرتفعة مع طول زمن التفاعل. هذا المركب يسمح لنا بالعمل في درجة حرارة منخفضة مع اختصار لزمن التفاعل.

على الصعيد البنوي، الحسابات النظرية التي قمنا بها على نماذج بسيطة بينت أن الوحدة ازابروليل تساعد على اكتساب بنية من فئة انثناء βVI مع الوحدة التي تسبقها و أن ذرة الأزوت N^{α} لحلقة البيرازوليدين تكتسبت تهجين من نوع SP^3 ذي هندسة هرمية وبالتالي يصبح بروكيرال.

RESUME

Parmi les peptidomimétiques présentant des propriétés pharmacologiques et biologiques intéressantes, les azapeptides constituent une famille de pseudopeptides dans laquelle le groupe $(CH)^\alpha$ d'un ou de plusieurs résidus a été substitué par un atome d'azote isoélectronique. Un des avantages de cette substitution, est de garder intacte la nature chimique de la chaîne latérale dont le rôle est si important dans les processus de reconnaissance moléculaire. De plus, nous avons choisi d'étudier l'azaproline, analogue de la proline qui fait partie des amino acides protéinogènes et qui, en tant qu'imino acide, présente une forte singularité au sein de ces derniers. Nous avons procédé en premier lieu à la préparation de son précurseur en réalisant la synthèse sous forme cristalline pure du cycle pyrazolidine protégé sur ses deux atomes d'azote par deux fonctions de type uréthane différentes avec déprotection orthogonale. Cette synthèse a été effectuée en deux étapes: la première consiste en la protection régiosélective du synthon de base par le groupement benzyloxycarbonyl (Z); la deuxième qui est l'étape déterminante, est basée sur l'addition du 1,3-dibromopropane à l'hydrazine- N^α, N^β -diprotégée résultant de la première étape.

Pour introduire le résidu azaprolyl dans une séquence aza-dipeptidique avec la phénylalanine, nous avons utilisé un nouveau protocole de synthèse faisant appel au triphosgène dans la C-activation de la phénylalanine. Contrairement aux méthodes décrites dans la littérature nécessitant des conditions sévères (reflux pendant plusieurs heures), en plus des réactions secondaires indésirables, ce réactif nous a permis de travailler à faible température avec des temps de réactions réduits.

Sur le plan structural, les calculs ab-initio que nous avons effectués sur des modèles simples montrent que le résidu azaprolyl favorise un repliement de type pseudo βVI avec le résidu qui le précède. L'azote N^α du cycle pyrazolidine acquiert un caractère pyramidal qui le rapproche d'un azote SP^3 et lui confère une prochiralité.

REMERCIEMENTS

Ce présent travail a été réalisé au laboratoire de chimie physique moléculaire et macromoléculaire (LCPMM) de l'université Saâd Dahlab de Blida sous la direction de monsieur M. Zouikri, maître de conférence à l'USDB.

Mes remerciements les plus respectueux vont à monsieur le Professeur R. Bellal, directeur de laboratoire, pour avoir mis à ma disposition les moyens financiers et matériels de mener à terme ce travail, ainsi que pour ses conseils et sa bienveillance tout au long de ces années au laboratoire. Je tiens à le remercier une autre fois pour l'honneur qu'il me fait en acceptant la présidence du jury.

Je tiens à présenter mes plus vifs remerciements à mon directeur de thèse monsieur M. Zouikri, pour m'avoir initiée à la recherche avec un sujet aussi passionnant et pour m'avoir aidée à développer mon raisonnement et ma rigueur scientifique par ses conseils judicieux. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère gratitude.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent aux messieurs Y. Badja Hadj-Ahmed et A. Dahmani, Professeurs à L'USTHB pour avoir accepté de faire partie du jury et de bien vouloir juger ce travail.

Je voudrais remercier particulièrement madame O. Mohammedi, maître de conférence à l'USDB, pour avoir accepté d'examiner ce travail et de faire partie du jury, je la remercie aussi pour son esprit scientifique, pour ses encouragements et ses conseils constants.

Mes sincères remerciements vont également à monsieur M. Brahim Erahmani, chef de département de chimie pour ces conseils, sa confiance et pour nous avoir permis de bénéficier du matériel du département. Qu'il trouve ici ma profonde reconnaissance.

A mes très chers parents qui m'ont soutenue et encouragée durant toutes ces années. Je leur dédie ce travail et les remercie du fond du cœur. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma sincère gratitude et ma profonde reconnaissance. A mes frères et sœurs qui ont été toujours présents pour moi. Je remercie aussi madame et monsieur Khouli pour leurs conseils et leurs encouragements. A mes très chères amies, pour leur présence et leur fidélité.

ABSTRACT

Among the peptidomimetics presenting interesting pharmacological and biological properties, we distinguish, azapeptides, which are pseudopeptides in which N has been substituted for the $(CH)^\alpha$ group contained in one or several amino acids. One of the advantages of this substitution is to keep the integrity of the side chain, the role of which is so important, for example, in molecular recognition processes. Moreover we chose to deal with the azaproline analogue because proline belongs to the proteinogenic amino acids and as an iminoacid, presents a great singularity within these last. We proceeded initially to the preparation of its precursors by carrying out the synthesis in pure crystalline form of the pyrazolidine cycle, protected on its two nitrogen atoms by two different urethane functions with orthogonal cleavage. this synthesis has been done in two stage; the first, consists in regioselective protection of the basis synthon by the benzyloxycarbonyl group (Z); the second which is the determining stage, is based on the addition of 1,3-dibromopropane to the N^α, N^β -protected hydrazine resulting from the first stage.

In the aim at introducing the azaprolyl residue into an azadipeptidic sequence with phenylalanine, we used a new synthetic protocol which requires triphosgene for the C-activation of phenylalanine. Unlike usual methods described in literature which necessitate drastic conditions (reflux for many hours), this reagent allows for completing at low temperature and with reduced reaction times.

On the structural level, ab-initio calculations which we carried out on simple models show that unlike proline the azaprolyl residue supports a βVI turn-like with the preceding residue. The nitrogen N^α pyrazolidine ring which is partially SP^3 -hybridized acquires a pyramidal character and become prochiral.

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1 Enchaînement peptidique	15
Figure 1.2 Exemple d'une chaîne peptidique; Alanaylglucylsérylvalylphénylalanine (Ala-Gly-Sér-Val-Phé ou A-G-S-V-F)	16
Figure 1.3 Les Formes de résonances (caractère partiel π) de la liaison peptidique	17
Figure 1.4 Structure de la liaison peptidique	17
Figure 1.5 Structure primaire de la chaîne A de l'insuline de bœuf	18
Figure 1.6 Conformation C5	19
Figure 1.7 Conformation C7	20
Figure 1.8 Conformation C ₇ axial (à gauche) et équatorial (à droite)	20
Figure 1.9 Conformation C ₇ C ₅	21
Figure 1.10 Conformation C ₅ C ₇	21
Figure 1.11 Structure générale d'un repliement β	22
Figure 1.12 Formation de la liaison amide entre deux amino acides	23
Figure 1.13 Activation de la fonction carboxylique	24
Figure 1.14 Préparation du Boc-amino acide	25
Figure 1.15 Clivage du groupement Boc	25
Figure 1.16 Préparation du Z-amino acide	26
Figure 1.17 Clivage du groupement Z	26
Figure 1.18 Préparation du Fmoc-amino acide	27
Figure 1.19 Clivage du groupement Fmoc	28
Figure 1.20 Schéma représentatif des différents groupements protecteurs de la chaîne latérale	29
Figure 1.21 Formation du lien peptidique par la méthode d'azide	30
Figure 1.22 Formation de la liaison amide par la méthode de chlorure d'acide	30
Figure 1.23 Formation de la liaison amide par la méthode de l'anhydride mixte	31
Figure 1.24 Formation de la liaison amide par la méthode de l'ester activé	32
Figure 1.25 Mécanisme d'activation par le carbodiimide	33
Figure 1.26 La racémisation dans le couplage des peptides	34
Figure 2.1 Modification par échange d'unité individuelle dans l'unité peptidique C ^{α} -CO-NH [60]	37

Figure 2.2 Modification du squelette peptidique par insertion d'un atome ou d'un groupe d'atome	38
Figure 2.3 Principaux modes de rigidification du squelette peptidique par introduction d'un hétérocycle [65,66]	39
Figure 2.4 Amino acide (a) et aza-amino acide (b)	40
Figure 2.5 Vue en perspective de la conformation du Boc-(S-N ₁)-AzaTic-Leu-OMe	42
Figure 2.6 Structure cristalline des composés I et II	43
Figure 2.7 Vue stéréochimique du repliement β du composé Piv-Pro-AzaAsn(Me)-NHiPr. La liaison hydrogène est représentée par des pointillés	43
Figure 2.8 Vue stéréochimique du repliement βI dans la structure moléculaire cristalline du Z-AzaAsn(Me)-Pro-NHiPr (IV) et Z-AzaAsp(OEt)-Pro-NHiPr (V)	44
Figure 2.9 Représentation de la structure moléculaire cristalline du Piv-(R)-AzaPip-L-Ala-NHiPr (VIII) à gauche et du Piv -D-Pip-NHMe (X) à droite	45
Figure 2.10 Structure moléculaire cristalline du composé Boc-L-Ala-(S)AzaPip-NHiPr montrant le repliement βVI stabilisé par une liaison intramoléculaire (4-1).	45
Figure 2.11 Modèle construit à partir des données expérimentales obtenues par analyse NOESY	46
Figure 2.12 Les Structures moléculaires cristallines du Boc-D-Ala-L-Pip-NHiPr (à gauche) et du Boc-L-Ala-(S)AzaPip-NHiPr (à droite) avec les valeurs des angles dièdre φ, ψ et ω.	47
Figure 2.13 Incorporation de quelques résidus d'aza-amino acides dans le LHRH. a. LHRH: Gly ¹ -His ² - Trp ³ -Ser ⁴ -Tyr ⁵ -Gly ⁶ -Leu ⁷ -Arg ⁸ -Pro ⁹ -Gly ¹⁰ -NH ₂ b. Activité supérieure (+), nettement supérieure (++), ou plusieurs fois supérieure (+++) à celle du produit parent	48
Figure 2.14 Diaminopyrrolidinone, inhibiteur de l'ostéoclaste cathepsine K	49
Figure 2.15 Structure chimique de l'aza-analogue de la sécrétagogue	49
Figure 2.16 Structure de l'inhibiteur de la trombine	50
Figure 2.17 La structure chimique d'un atazanavir	50
Figure 2.18 principales méthodes de synthèse d'un aza-peptide	51
Figure 2.19 Schéma général de la méthode d'isocyanate	52
Figure 2.20 Synthèse d'un aza-amino acide et son incorporation selon la méthode des esters actifs	53
Figure 2.21 Incorporation de l'azaglycine dans la chaîne peptidique par la méthode au chlorure d'acide	53

Figure 2.22 Incorporation d'un résidu aza-amino acide dans la chaîne peptidique par la méthode d'azolide	54
Figure 2.23 Synthèse d'un résidu aza-amino acide selon la méthode de 1,3,4-Oxadiazol-2(3H)-one	54
Figure 2.24 Incorporation du résidu aza-alanyle dans [Ala6]-élédoisine selon Niedriche et Coll. [111]	55
Figure 2.25 Incorporation des résidus aza-aspartyle ou aza-asparagyle selon Niedrich et Coll. [111]	56
Figure 2.26 Synthèse d'un azapeptide à partir de la méthyl- ou benzyl-hydrazine d'après Gant et Niedrich [112]	57
Figure 2.27 Rendement régiosélectif de la N-protection par le groupe Z des azotes de la méthylhydrazine (R=Me) et de l'hydrazinoacétate d'éthyle (R= CH ₂ CO ₂ Et)	58
Figure 2.28 Synthèse et incorporation du résidu azaglycine dans la protéase de la cystéine	59
Figure 2.29 Schéma général pour la synthèse des lactames azapeptidomimétiques	59
Figure 2.30 Préparation du monomère Boc-Alkylhdrazine	60
Figure 2.31 Schéma général pour la synthèse d'un diazotide en solution	61
Figure 3.1 Exemple de calcul de R _f	63
Figure 3.2 Appareillage pour chromatographie sur colonne	64
Figure 3.3 Groupements protecteurs Boc et Z	65
Figure 3.4 Formule chimique développée du triphosgène	66
Figure 3.5 Formule chimique développée de Boc-NH-NH-Z	66
Figure 3.6 Formule chimique développée de Boc-AzaPro-OBzl	68
Figure 3.7 Formule chimique développée du chlorhydrate d'azaproline	69
Figure 3.8 Formule chimique développée de Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl	70
Figure 4.1 Schéma réactionnel de notre travail	73
Figure 4.2 Spectre UV du Boc-NH-NH ₂	74
Figure 4.3 Réaction de synthèse du N ^α -benzyloxycarbonyl-N ^β -tertiobutyloxy-carbonylhydrazine (Boc-NH-NH-Z)	75
Figure 4.4 Mécanisme proposé pour la protection du Boc-NH-NH ₂ par le groupement Z	75
Figure 4.5 Spectre UV du Boc-NH-NH-Z	77
Figure 4.6 Spectre FTIR du N ^α -benzyloxycarbonyl,N ^β -tertiobutyloxy-carbonylhydrazine (Boc-NH-NH-Z) en pastille de KBr	79
Figure 4.7 Les différents types de proton du Boc-NH-NH-Z	80

Figure 4.8 Spectre RMN- ¹ H du N ^α -benzyloxycarbonyl,N ^β -tertiobutyloxy-carbonylhydrazine (Boc-NH-NH-Z) à 300 MHz	81
Figure 4.9 Réaction de synthèse du Boc-AzaPro-OBzl	82
Figure 4.10 Mécanisme proposé pour la synthèse de Boc-AzaPro-OBzl	83
Figure 4.11 Spectre UV du Boc-AzaPro-OBzl	84
Figure 4.12 Spectre FTIR du Boc-AzaPro-OBzl en pastille de KBr	86
Figure 4.13 Les différents types de proton du Boc-AzaPro-OBzl	87
Figure 4.14 Spectre RMN- ¹ H du Boc-AzaPro-OBzl dans le CDCl ₃ à 300 MHz	88
Figure 4.15 Réaction de synthèse du HCl.AzaPro-OBzl	89
Figure 4.16 Mécanisme réactionnelle proposé pour la déprotection du Boc-AzaPro-OBzl	90
Figure 4.17 Spectre UV du chlorhydrate du Boc-AzaPro-OBzl	91
Figure 4.18 Superposition des spectres UV du Boc-AzaPro-OBzl et de son chlorhydrate	92
Figure 4.19 Spectre FTIR du HCl.AzaPro-OBzl en pastille de KBr	94
Figure 4.20 Réaction de synthèse de l'aza-dipeptide Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl	95
Figure 4.21 Mécanisme proposé pour le couplage de l'azaproline à la phénylalanine	96
Figure 4.22 Spectre UV du compose Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl superposé avec le spectre du chlorhydrate d'azaproline	98
Figure 4.23 Spectre FTIR de l'aza-dipeptide Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl en pastille de KBr	100
Figure 4.24 Les différents types de proton du Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl	101
Figure 4.25 Spectre RMN- ¹ H du Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl dans le CDCl ₃ à 300 MHz	102
Figure 5.1 Représentation spatiale de la forme la plus stable du modèle Acé-Pro-NHMe	106
Figure 5.2 Représentation spatiale de la forme la plus stable du modèle Acé-AzaPro-NHMe	107
Figure 5.3 Longueurs (Å) des liaisons du motif azaprolyl comparées aux dimensions standard du motif peptidique	108
Figure 5.4 La géométrie la plus stable du PES du modèle For-AzaPro-NH ₂ obtenue par optimisation sur HF/6-31 G* et réoptimisation sur HF/3-21G*	109
Figure 5.5 La surface de l'énergie potentielle (PES) du modèle For-AzaPro-NH ₂ obtenue par la méthode HF/3-21G*.	110
Figure 5.6 Courbe de l'énergie potentielle HF/3-21G* de la rotation autour de la liaison N—N ^α . L'écart au plan est donné en Å.	111
Figure 5.7 Courbe de l'énergie potentielle HF/3-21G* de la rotation autour de la liaison N ^α —CO (ψ). L'écart au plan est donné en Å.	112

Tableau 3.1	Pourcentages massiques obtenus par analyse élémentaire du Boc-NH-NH-Z	67
Tableau 3.2	Pourcentages massiques obtenus par analyse élémentaire du Boc-AzaPro-OBzl	68
Tableau 3.3	Pourcentages massiques obtenus par analyse élémentaire du chlorhydrate de l'AzaPro-OBzl	70
Tableau 3.4	Pourcentages massiques obtenus par analyse élémentaire du Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl	71
Tableau 4.1	Résultats de l'analyse élémentaire du Boc-NH-NH-Z	76
Tableau 4.2	Résultats de l'analyse élémentaire du Boc-AzaPro-OBzl	83
Tableau 4.3	Résultats de l'analyse élémentaire du chlorhydrate de l'AzaPro-OBzl	90
Tableau 4.4	Résultats de l'analyse élémentaire du Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl	97
Tableau 5.1	Angles et longueurs des liaisons caractéristiques des résidus prolyl et azaprolyl	107
Tableau 5.2	Variation de l'énergie et de l'écart au plan ΔN^α du modèle For-AzaPro-NH ₂ en fonction de φ	111
Tableau 5.3	Variation de l'énergie et de l'écart au plan ΔN^α du modèle For-AzaPro-NH ₂ en fonction de ψ	112

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	
REMERCIEMENTS.....	
TABLE DES MATIERES.....	
LISTES DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX.....	
INTRODUCTION.....	13
1. LES PEPTIDES	
1.1 Généralités.....	15
1.2 Les chaînes peptidiques et leur nomenclature.....	16
1.3 Géométrie de la liaison peptidique.....	16
1.4 Structures des peptides.....	18
1.4.1 Structure primaire.....	18
1.4.2 Structure secondaire.....	19
1.4.3 Structure tertiaire.....	22
1.4.4 Structure quaternaire.....	22
1.5 Synthèse des peptides.....	23
1.5.1 Introduction.....	23
1.5.2 Groupements protecteurs.....	24
1.6 Les Méthodes de synthèse des peptides.....	29
1.6.1 Méthode d'azide.....	29
1.6.2 Méthode de chlorure d'acide.....	30
1.6.3 Méthode de l'anhydride mixte.....	31
1.6.4 Méthode des esters activés.....	31
1.7 Agents de couplage.....	32
1.7.1 Couplage au DCCI.....	32
1.8 Problème de racémisation.....	34
2. LES AZAPEPTIDES, CONFORMATION, ACTIVITE BIOLOGIQUE ET SYNTHESE	
2.1 Pseudopeptides.....	36
2.2 Azapeptides.....	40
2.2.1 Propriétés conformationnelles des azapeptides.....	40
2.2.2 Activité biologique des azapeptides.....	47
2.2.3 Synthèses des azapeptides.....	51
2.3 Exemples de synthèse de quelques azapeptides.....	55

3. PARTIE EXPERIMENTALE

3.1 Techniques et méthodes.....	62
3.1.1 Chromatographie sur couche mince.....	62
3.1.2 Chromatographie sur colonne.....	63
3.2 Synthèse d'un aza-dipeptide.....	65
3.2.1 Groupements protecteurs.....	65
3.2.2 La méthode de couplage.....	65
3.2.3 Synthèse de Boc-NH-NH-Z.....	66
3.2.4 Synthèse du Synthone Boc-AzaPro-OBzl.....	67
3.2.5 Synthèse du HCl, AzaPro-OBzl.....	69
3.2.6 Synthèse du Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl.....	70
3.2.7 Les différentes techniques de caractérisation.....	71

4. RESULTATS ET DISCUSSION

4.1 Caractérisation du Boc-NH-NH ₂ par spectroscopie UV.....	74
4.2 Réaction de synthèse du (Boc-NH-NH-Z).....	74
4.2.1 Analyse élémentaire du Boc-NH-NH-Z.....	76
4.2.2 Caractérisation du Boc-NH-NH-Z par spectroscopie UV.....	76
4.2.3 Caractérisation du Boc-NH-NH-Z par spectroscopie FTIR.....	77
4.2.4 Caractérisation du Boc-NH-NH-Z par RMN- ¹ H.....	80
4.3 Réaction de préparation du synthone précurseur de l'azaproline: Boc-AzaPro-OBzl.....	82
4.3.1 Analyse élémentaire de Boc-AzaPro-OBzl.....	83
4.3.2 Caractérisation du Boc-AzaPro-OBzl par spectroscopie UV.....	83
4.3.3 Caractérisation du Boc-AzaPro-OBzl par spectroscopie FTIR.....	84
4.3.4 Caractérisation du composé Boc-AzaPro-OBzl par RMN- ¹ H.....	87
4.4 Réaction de déprotection du Synthone par clivage du groupement Boc.....	89
4.4.1 Analyse élémentaire du HCl.AzaPro-OBzl.....	90
4.4.2 Caractérisation du HCl.AzaPro-OBzl par spectroscopie UV.....	91
4.4.3 Caractérisation du HCl.AzaPro-OBzl par spectroscopie FTIR.....	92
4.5 Réaction de couplage de l'azaproline à la phénylalanine.....	95
4.5.1 Analyse élémentaire de l'aza-dipeptide Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl.....	97
4.5.2 Caractérisation par spectroscopie UV du Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl.....	97
4.5.3 Caractérisation du Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl par spectroscopie FTIR.....	98
4.5.4 Caractérisation de l'aza-dipeptide Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl par RMN- ¹ H.....	101

5. ETUDE THEORIQUE DE LA SUBSTITUTION (CH)^α/ N DANS LA PROLINE

5.1 Introduction	103
5.2 Méthode de Hartree- Fock	103
5.2.1 Modèle de Hartree-Fock pour les molécules polyatomiques.....	105
5.2.2 Systèmes à couches fermées et ouvertes.....	105
5.3 Bases de calcul	105
5.4 Etude théorique de la substitution du groupe (CH) ^α par un atome d'azote dans la proline.....	106

5.4.1 Etude comparative entre les deux modèles Acé-AzaPro-NHMe et Acé-Pro-NHMe obtenus par optimisation complète sur la base HF/6-31 G*	106
5.4.2 Etude théorique du résidu azaproyl.	109
5.5 Conclusion	113
CONCLUSION	114
APPENDICE	
A. Liste des symboles et des abréviations	
B. Données de l'optimisation complète du modèle For-AzaPro-NH ₂	
REFERENCES	

INTRODUCTION

Les peptides comme les neurotransmetteurs, les neuromodulateurs et les hormones interviennent dans divers processus physiologiques. Ils influencent la cellule de communication et contrôlent une série de fonctions vitales telles que le métabolisme, les défenses immunitaires, la digestion, la respiration, la sensibilité à la douleur et la reproduction. Ils ont donc un énorme intérêt médical. En outre, leur rôle dans l'apparition et le maintien de diverses maladies a pu être prouvé sans équivoque. Cependant l'utilisation des peptides comme médicaments ou agents thérapeutiques est limitée par leur faible stabilité métabolique envers les protéases, et par leur lente progression à travers les barrières physiologiques, où ils peuvent subir des réactions d'hydrolyse partielle ou totale, ou des réactions d'oxydoréduction. Ils sont également limités par leur biodisponibilité et par leurs effets indésirables causés par l'interaction de peptides structurellement flexibles avec divers récepteurs. Pour remédier à ces inconvénients, les peptidomimétiques ou les pseudopeptides semblent tout indiqués pour minimiser la flexibilité et réduire les effets secondaires du peptide médicament. Il est également possible d'introduire une contrainte stérique dans la structure des peptides pour réduire et stabiliser la flexibilité et le nombre de conformations pouvant avoir lieu en milieu physiologique.

Les peptidomimétiques [1-3] comme les pseudopeptides, résultant des modifications des chaînes latérales et du squelette lui-même, sont des composés qui miment le peptide naturel. Ils ont montré dans certains cas, une meilleure stabilité métabolique, une haute affinité ou sélectivité vis à vis du récepteur, et des effets secondaires minimaux par rapport aux produits de base [4]. Dans le cas des azapeptides résultant de la substitution isoélectronique du groupe $(CH)^\alpha$ par un atome d'azote, diverses propriétés biologiques et thérapeutiques ont été observées selon la position des résidus Aza incorporés dans le composé parent [5-7]. Dans le cas de l'azaproline, le remplacement du groupement $(CH)^\alpha$ de la proline par un atome d'azote entraîne certes la perte du centre chiral, mais laisse intacte la chaîne latérale. L'importance de l'homologue proline est due au fait qu'il est le seul imino acide naturel cyclique codé

génétiqumnt, induisant par sa présence dans l'enchaînement peptidique des propriétés particulières tant structurales que biochimiques [8]. Quand elle est impliquée dans une chaîne peptidique, la liaison amide en amont peut adopter une configuration cis, alors que dans la plupart des cas la configuration trans est majoritaire [9]. Cette dernière est hydrolysable par les peptidases contrairement à la conformation cis.

A la lumière de ces données, notre travail consiste dans un premier temps à synthétiser le résidu azaproyl homologue de la prolyl pour obtenir le composé Boc-AzaPro-OBzl, où les deux groupements protecteurs Boc et Z peuvent être clivés sélectivement. Dans un deuxième temps, le chlorhydrate HCl-AzaPro-OBzl obtenu par déprotection du synthon Boc-AzaPro-OBzl est couplé avec la phénylalanine de configuration absolue (L) à chaîne latérale hydrophobe. Cette dernière intervient non seulement dans les étapes de reconnaissances moléculaires, mais également dans la stabilité des interactions intramoléculaires (liaison hydrogène) et la structure tridimensionnelle des peptides et protéines dont l'activité biologique en dépend [10,11]. Ce couplage génère le dipeptide Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl. Tous les synthons et produits synthétisés ont été identifiés par spectroscopie FTIR, RMN-¹H et UV.

Dans le but de comprendre le comportement structural de l'azaproline au sein d'un peptide, nous avons effectué des calculs théoriques de type ab-initio sur des molécules modèles, simples contenant le résidu azaproyl encadré par les groupements acétyle et NHMe ou Formyle et NH₂.

CHAPITRE 1 LES PEPTIDES

1.1 Généralités

Les peptides, comme les protéines, sont formés par l'enchaînement d' α -amino acides au moyen de liaisons amides (figure 1.1). Ils sont présents dans tous les organismes vivants.

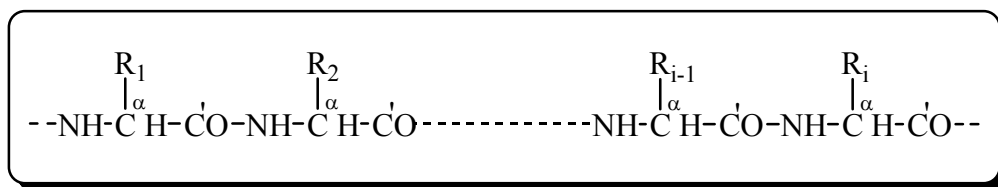


Figure 1.1: Enchaînement peptidique

Ces enchaînements polypeptidiques exercent diverses fonctions. Par exemple, les hormones liées à leurs récepteurs spécifiques initient une réponse biologique particulière ; les enzymes jouent le rôle de catalyseur au cours de maintes réactions biochimiques dans les organismes; d'autres protéines encore, véhiculent, complexent de simples entités comme l'oxygène et l'ion de fer, transportés et stockés respectivement par l'hémoglobine et la myoglobine, ainsi que la transferrine et la ferritine. Les anticorps, responsables de notre protection vis-à-vis d'agents extérieurs agresseurs, et d'autres protéines du système immunitaire, sont conçus pour identifier spécifiquement tout élément exogène. Des protéines jouent également un rôle capital dans la coordination des mouvements contrôlent la croissance et la différenciation cellulaire. Certaines régulent la qualité et la quantité de l'information génétique stockée dans l'ADN, et qui doit être utilisée en temps voulu. En conséquence, beaucoup de peptides et protéines ont un intérêt médical ou industriel. Les avancées majeures en chimie organique et en biologie moléculaire, conjuguées avec l'emploi judicieux de méthodes physiques d'analyse ont permis d'isoler, de purifier et d'identifier un grand nombre de protéines et de peptides naturels, et de synthétiser un grand nombre d'entre eux ou de leur analogues. Ces études ont en outre généré un large ensemble de données sur les propriétés structurales des peptides et des protéines.

1.2 Les chaînes peptidiques et leur nomenclature

Les chaînes peptidiques sont vectorisées, les liaisons peptidiques attachent les amino acides dans un ordre spécifique. Les amino acides engagés dans une chaîne peptidique sont appelés résidus, leur nom est celui de l'acide aminé auquel on ajoute le suffixe (yl). Par convention le groupement amine du premier amino acide (aussi appelé N-terminal) est placé à gauche, et le groupement carboxylique du dernier amino acide (aussi appelé C-terminal) est placé à droite. La notation de la chaîne peptidique se fait de l'extrémité N-terminal vers l'extrémité C-terminal (figure 1.2) [12].

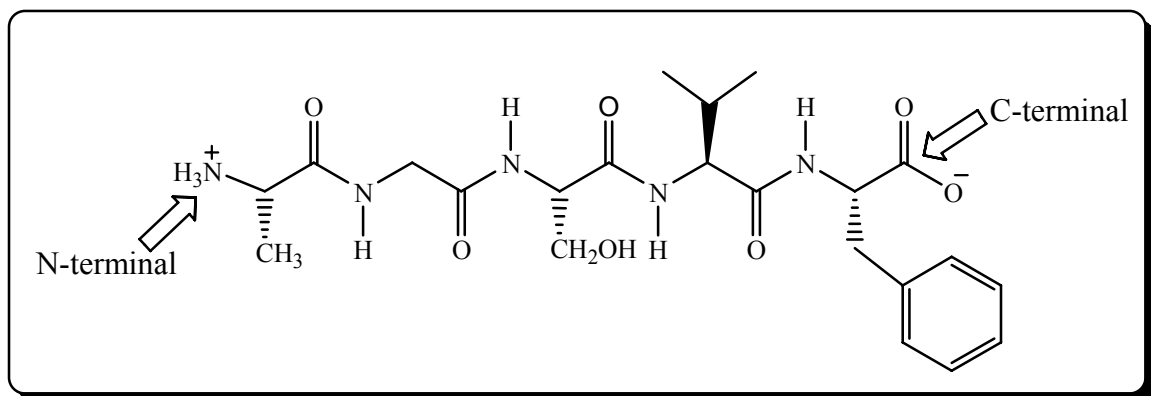


Figure 1.2: Exemple d'une chaîne peptidique; Alanylglycylsérylvalylphénylalanine (Ala-Gly-Sér-Val-Phé ou A-G-S-V-F)

1.3 Géométrie de la liaison peptidique

La liaison peptidique CO-NH peut se trouver sous deux formes de résonance. Une des deux formes fait apparaître une double liaison entre le carbone et l'azote de la liaison peptidique (figure 1.3). De ce fait la taille moyenne d'une liaison peptidique (0,132 nm) sera beaucoup plus petite que celle d'une liaison covalente simple normale (par exemple, une liaison simple carbone-carbone est de 0,154 nm de longueur). En conséquence, la liaison peptidique présente un caractère spécifique de double liaison [13,14] (figure 1.3).

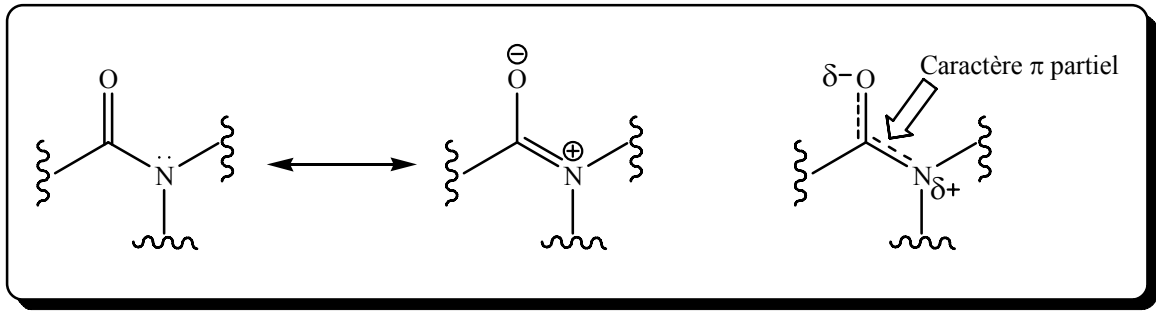


Figure 1.3: Les Formes de résonances (caractère partiel π) de la liaison peptidique

La liaison peptidique est en général dans une conformation trans, sauf dans les systèmes de type X-Pro qui peuvent exister dans les conformations cis et trans.

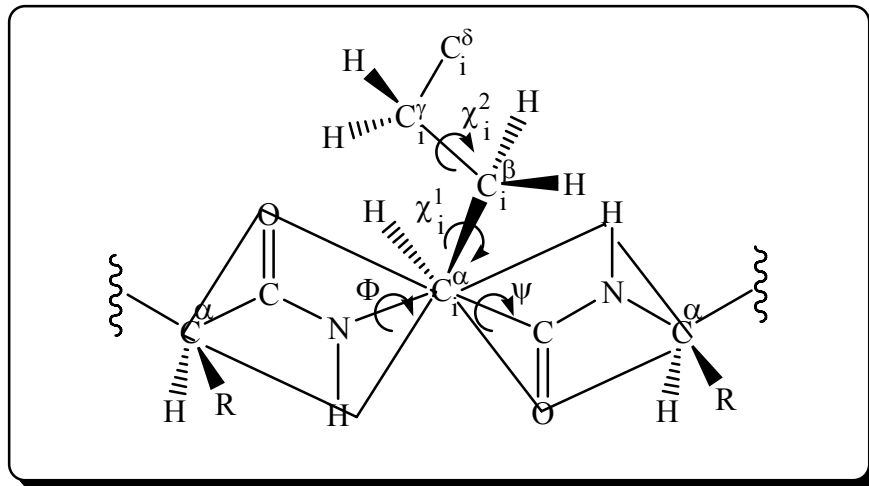


Figure 1.4: Structure de la liaison peptidique.

- Les quatre atomes de la liaison peptidique sont coplanaires (figure 1.4). Ceci donne un caractère rigide à la liaison peptidique et empêche la libre rotation autour de cette liaison. Les seules liaisons dont l'orientation reste libre, sont celles qui entourent chacun des carbones asymétriques porteurs des chaînes latérales.
- La liaison ($\text{NH}-\text{C}^\alpha$) située à l'extrémité NH_2 -terminale peut tourner librement: l'angle de rotation de cette liaison est appelé angle (ϕ).
- La liaison ($\text{C}_\alpha-\text{CO}$) située vers l'extrémité COOH -terminale peut tourner librement: l'angle de rotation de cette liaison est appelé angle (ψ).

- La liaison peptidique (CO—NH) est de caractère partiellement double, dont la rotation est restreinte. L'angle de rotation de cette liaison est appelé angle ω (oméga) et adoptera généralement la valeur de 180° (*trans*) ou parfois de 0° (*cis*). Les angles ϕ et ψ demeurent eux aussi habituellement près de 180° (*trans*) mais avec un peu plus de variation que l'angle ω , grâce à leur caractère de liaison simple.
- Les atomes d'oxygène et d'hydrogène d'une liaison peptidique sont d'excellents accepteurs et donateurs de liaisons hydrogène.

La conformation de la chaîne peptidique est déterminée effectivement par les valeurs des trois angles dièdres ϕ , ψ , ω qui sont définis par les atomes de la chaîne principale, ϕ et ψ sont comptés positivement quand on se déplace dans le sens des aiguilles d'une montre et inversement. Pour les groupements latéraux le sens de parcours est celui qui se dirige du carbone C^α vers l'extrémité du substituant. L'angle qui définit la rotation autour de $C^\alpha-C^\beta$ est noté χ_i , cependant les χ_i sont les angles de rotation autour de la $j^{\text{ème}}$ liaison de la chaîne latérale [15]. Il faut noter que les conformations de la chaîne latérale sont mesurées par des angles χ_i où (i) représente le numéro de l'atome depuis le carbone de la chaîne principale.

1.4 Structures des peptides

On distingue quatre différents types de structure dans les peptides et les protéines: La structure primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire [16].

1.4.1 Structure primaire

On appelle structure primaire d'un peptide ou d'une protéine l'ordre dans lequel sont enchaînés les α -aminoacides dans la molécule (figure 1.5). C'est une chaîne linéaire allant du N-terminal au C-terminal, en ne tenant compte que des liaisons peptidiques, le nombre, la nature des aminoacides constitutifs ainsi que l'emplacement des ponts disulfures inter et intramoléculaires. Les α -aminoacides existent dans les protéines uniquement sous la forme L.

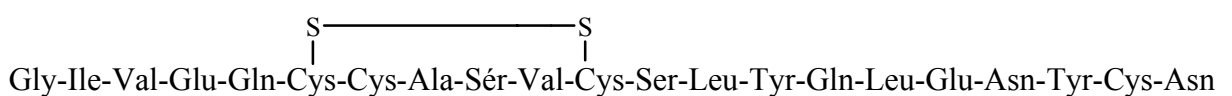


Figure 1.5: Structure primaire de l'insuline de bœuf

1.4.2 Structure secondaire

La structure secondaire des protéines et des peptides résulte de la possibilité de formation de liaison hydrogène entre l'oxygène du carbonyle et l'hydrogène de l'azote de la liaison amide [17].

L'organisation de la chaîne polypeptidique en une structure ordonnée fait intervenir des structures en feuillets plissés, soit de structures hélicoïdales. L'étude structurale des polypeptides naturels, a montré essentiellement les hélices α droites, les feuillets plissés parallèles et antiparallèles, les structures β et les structures de type collagène [18]. Par ailleurs les α -amino acides doivent être de configuration L. Les chaînes latérales n'influencent pas la structure secondaire à l'exception de la proline à cause de sa nature planaire, de sa rigidité stéréochimique, de la perte d'hydrogène sur l'azote en position α . Ce dernier lorsqu'il est impliqué dans une liaison hydrogène, entraîne le plissement de la chaîne peptidique et peut même inverser le sens de propagation de la chaîne.

1.4.2.1 Conformation C_5

La conformation C_5 est caractérisée par l'existence d'une liaison hydrogène intramoléculaire du type ($i \rightarrow i$) fermant un cycle à cinq atomes (figure 1.6). Bien que l'angle $H_i-N \dots O_i$ est très loin de la linéarité, elle se déforme progressivement lorsque le substituant R_i devient de plus en plus encombrant [19]. Elle est approximativement plane lorsqu'il s'agit de dérivés de la glycine (H, Me). La conformation C_5 subit, dans tous les autres cas, un gauchissement plus au moins prononcé.

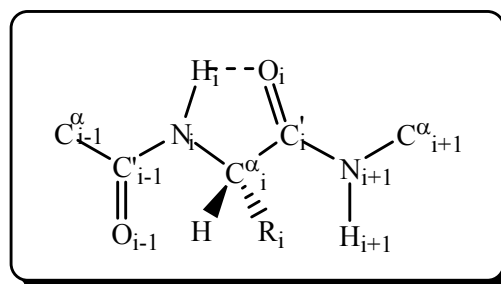


Figure 1.6: Conformation C_5

1.4.2.2 Conformation C_7

La conformation C_7 ou repliement γ [20], est due à la présence d'une liaison hydrogène du type ($i+2 \rightarrow i$) (figure 1.7). Deux dispositions de cette conformation sont

possibles, selon la situation du substituant R_1 relativement à l'arrête du dièdre formé par les deux plans qui contiennent les deux unités peptidiques. Dans un cas la direction $C^\alpha-R_{i+1}$ est peu inclinée par rapport à cet arrête et la conformation C_7 correspondante est qualifiée d'équatoriale. La seconde éventualité appelée C_7 axiale, s'obtient en permutant les liaisons $C^\alpha-H^\alpha$ et $C^\alpha-R_{i+1}$. La disposition équatoriale est généralement la plus favorisée des deux conformations (figure 1.8).

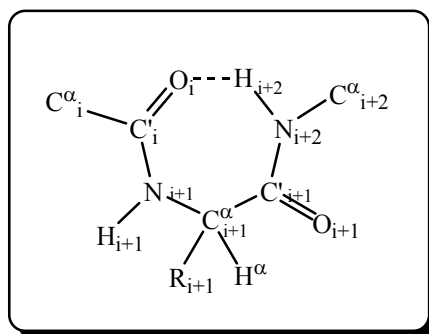


Figure 1.7: Conformation C_7

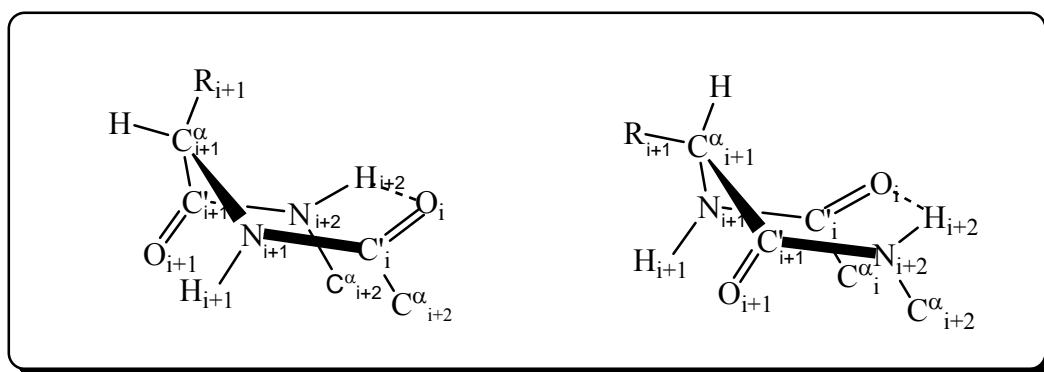
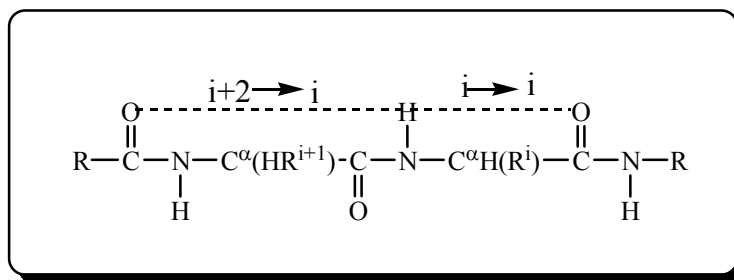
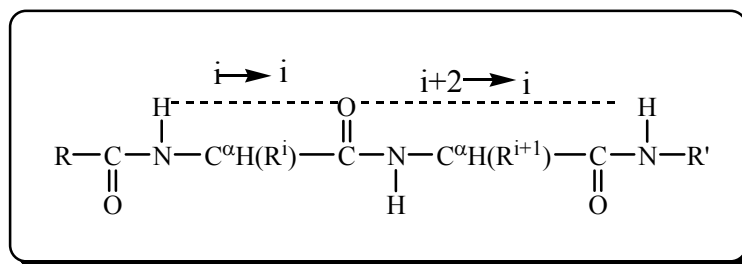


Figure 1.8: Conformation C_7 axial (à gauche) et équatorial (à droite)

1.4.2.3 Conformation C_5C_7 et C_7C_5

Les conformations C_5 et C_7 sont observées sous forme d'accolements permis par le biais d'une liaison hydrogène bifide pour C_7C_5 (figure 1.9) par la double interaction $i \rightarrow i \leftarrow i+2$ [21,22] (figure 1.10).

Figure 1.9: Conformation C_7C_5 Figure 1.10: Conformation C_5C_7

Des calculs théoriques montrent que le conformère C_5C_7 (figure 1.10) est prédominant en milieu inerte. Par ailleurs des exemples de doubles interactions intramoléculaires ont été reconnues au sein des structures cristallines de certaines protéines globulaires [23].

1.4.2.4 Conformères C_{10} ou repliements (β)

Dans une protéine, un tiers environ des amino-acides font partie de tours qui permettent à la chaîne peptidique de faire un demi-tour (quelques fois sensiblement moins que le changement de direction de 180°). Elles agissent comme une clé de reconnaissance dans l'initiation des phénomènes biologiques [24-26].

Les tours β sont formés par quatre résidus consécutifs notés ($i, i+1, i+2, i+3$), caractérisés par une liaison hydrogène entre le groupement $C=O$ du résidu i et le groupement NH du résidu ($i+3$) fermant un cycle de chélation de 10 atomes (figure 1.11), la distance $C^\alpha_i \dots C^\alpha_{i+3}$ est de 7.5 \AA .

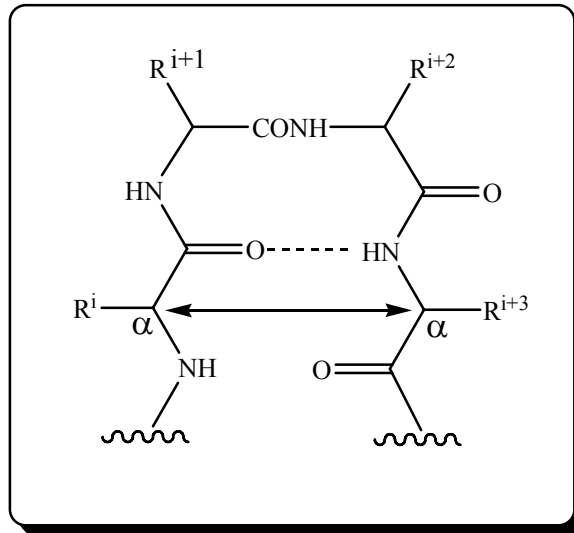


Figure 1.11: Structure générale d'un repliement β

Richardson [27] a classé les tours du type βVI qui sont rares en deux sous types, le premier noté βVIa (-60° , 120° , -90° , 0°), est caractérisé par une liaison hydrogène interne, tandis que dans le deuxième type noté βVIb (-120° , 120° , -60° , 0°) la liaison hydrogène n'est pas toujours observée.

1.4.3 Structure tertiaire

La chaîne polypeptidique déjà ordonnée en structure secondaire se replie sur elle-même pour former une molécule compacte, présentant une configuration spatiale bien déterminée. C'est cette géométrie tridimensionnelle de la molécule constitue la structure tertiaire [16]. A partir des chaînes latérales, se forment un certain nombre de liaisons intramoléculaires, des liaisons covalentes comme les ponts disulfures et un grand nombre de liaisons de faible énergie : liaison hydrogène, liaison hydrophobe et liaisons salines. Ces différentes liaisons confèrent à la structure sa stabilité. C'est la structure tertiaire qui conditionne en particulier l'activité biologique spécifique des protéines (cas de protéine globulaire).

1.4.4 Structure quaternaire

L'activité d'un grand nombre d'enzymes dépend étroitement de cette structure; elle résulte de l'association convenable de sous unités par des interactions non covalentes de type Van der Waals ou hydrophobes [16]. Les sous unités peuvent être ou non identiques. Dans certains cas, elle disparaît sous l'influence des conditions qui favorisent la

dissociation. Toutes fois les protéines n'acquièrent pas forcément des structures quaternaires.

1.5 Synthèse des peptides

1.5.1 Introduction

La synthèse des peptides constitue un défi que les chimistes organiciens s'efforcent de relever depuis le début du siècle passé. Un grand nombre de peptides ont été synthétisés et leur capacité d'induire une réponse biologique a été prouvée. L'étape clé dans la synthèse chimique des peptides est la formation de la liaison amide CO-N entre le groupement carboxylique d'un amino acide et le groupement amine d'un autre amino acide avec libération d'une molécule d'eau (figure 1.12) [28].

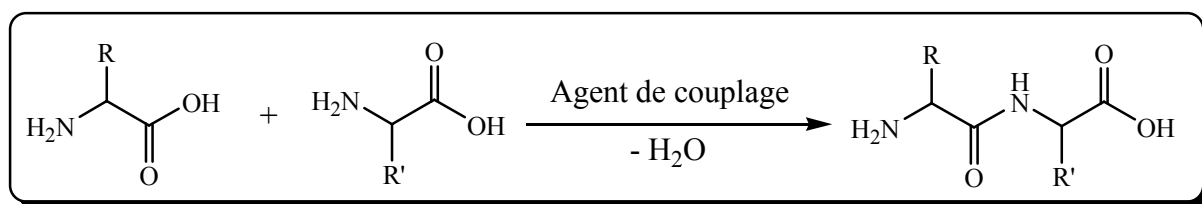


Figure 1.12: Formation de la liaison amide entre deux amino acides

Notons que la synthèse chimique des peptides a lieu dans le sens C→N contrairement à la synthèse biologique. La formation du lien amide nécessite l'activation de la fonction carboxylique par l'introduction d'un groupement bon partant pour augmenter le caractère électrophile du carbone du carbonyle et facilite son attaque par une fonction amine libre (figure 1.13). Cependant, la synthèse d'un peptide à partir d'un amino acide à fonction amine libre est ambiguë, car dans ce cas, le composé activé réagirait non seulement avec la fonction amine du deuxième amino acide mais également avec son propre groupement amine. Par conséquent la synthèse d'un peptide pur exige la protection de toutes les fonctions susceptibles d'induire des réactions secondaires indésirables.

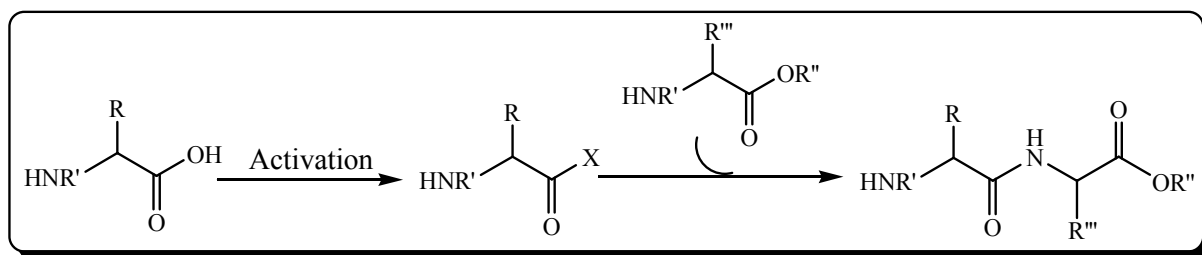


Figure 1.13: Activation de la fonction carboxylique

En synthèse peptidique deux approches sont utilisées : synthèse en solution, avec purification du peptide entre chaque étape [28], et synthèse sur support solide [29] où la séparation se fait par simple rinçage après les étapes de couplage et de clivage de la protection intermédiaire.

Chacune de ces méthodes a ses avantages et ses inconvénients. La synthèse en phase liquide est longue et fastidieuse, mais on peut travailler sur des quantités très importantes. De plus la purification intermédiaire garantit la propreté du produit final. La synthèse sur support solide est plus rapide, elle est automatisable entièrement, mais elle reste limitée à quelques grammes de peptide par synthèse. Elle est plus exigeante au point de vue des rendements et déprotection intermédiaire, car l'on conserve sur la résine toutes les ratées de couplage. Il faut aussi disposer d'un support adéquat pour l'élongation du peptide, et d'être capable de cliver le peptide de la résine en fin de synthèse.

1.5.2 Groupements protecteurs

La multiplicité des groupements fonctionnels dans les amino acides rend délicate la formation de la liaison amide. La réaction de l'acide aminé AA1 par exemple avec un autre acide aminé AA2 donne non seulement le produit AA1-AA2 qui est ultraminoritaire mais il se forme aussi bien les produits AA2-AA1, AA1-AA1, AA2-AA2, et d'autres polymères plus lourds. De la même façon, si les fonctions réactives portées par les chaînes latérales de ces deux acides aminés ne sont pas bloquées, il se formera aussi des branchements latéraux de diverses manières. Il est donc nécessaire d'utiliser des groupements protecteurs si l'on veut obtenir un seul produit et en respectant en même temps l'orthogonalité des protections et diminuer la racémisation lors des opérations de couplage. En effet, lorsque l'on voudra coupler un 3^{ème} acide aminé AA3, il faudra pouvoir libérer sélectivement la fonction COOH de AA2 pour permettre la formation de la nouvelle liaison peptidique.

1.5.2.1 Protection de la fonction amine

Les uréthanes trouvent leur utilisation étendue en tant que groupements protecteurs pour la fonction amine. Ces derniers sont facilement introduits et peuvent être aisément clivés en utilisant les conditions appropriées.

1.5.2.1.1 Groupement tert-butyloxycarbonyl (Boc)

Le groupement tert-butyloxycarbonyl (Boc) [30,31] est parmi les meilleurs groupements protecteurs du type uréthane. Il est insensible à l'hydrogénation catalytique, en milieu alcalin et en présence d'hydrazine. Les Boc-amino acides sont généralement préparés à partir du di-tert-butyl dicarbonate à cause de l'instabilité du chloroformate tert-butylique (figure 1.14)

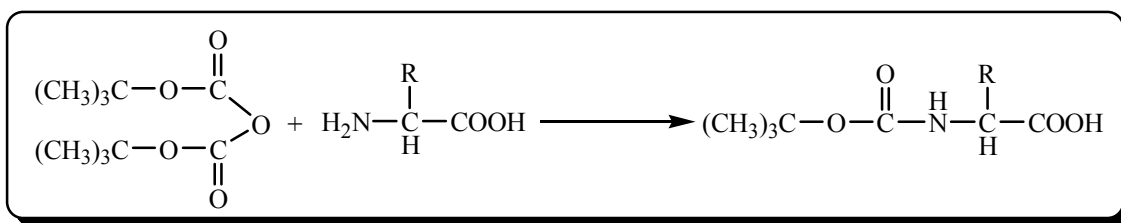


Figure 1.14: Préparation du Boc-amino acide

Clivage du Boc

Le groupement Boc est généralement éliminé en milieu acide. La méthode classique consiste à traiter le dérivé Boc- avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) ; ainsi l'action de l'acide chlorhydrique dans l'acétate d'éthyle ou de l'acide bromhydrique sur le dérivé Boc peut cliver plus rapidement le groupement Boc [28]. Le mécanisme de clivage implique dans un premier temps la protonation de l'oxygène lié au groupement *tert*-butyle; puis libération du carbocation *tert*-butylique (figure 1.15).

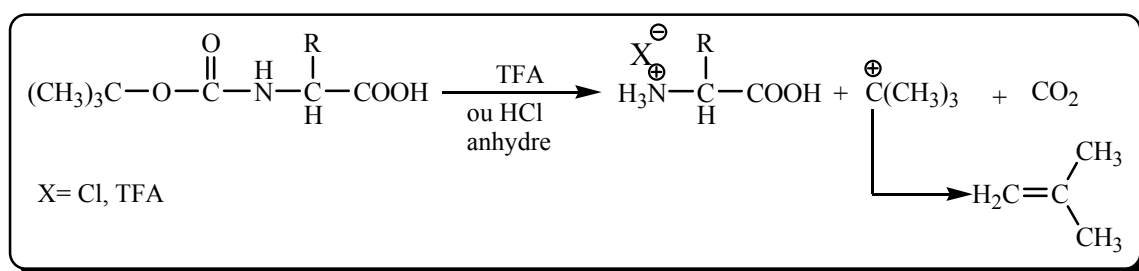


Figure 1.15: Clivage du groupement Boc

1.5.2.1.2 Groupement benzyloxycarbone (Z)

C'est le groupement protecteur idéal de la fonction amine [28,32]. La préparation des Z-amino acides, implique une réaction entre le chlorure de benzyloxycarbonyl et l'acide aminé choisi (figure 1.16). La fonction ester ainsi formée par le groupement Z est remarquablement stable à l'hydrolyse en milieu alcalin. Par conséquent, il est possible de cliver sélectivement d'autres fonctions esters.

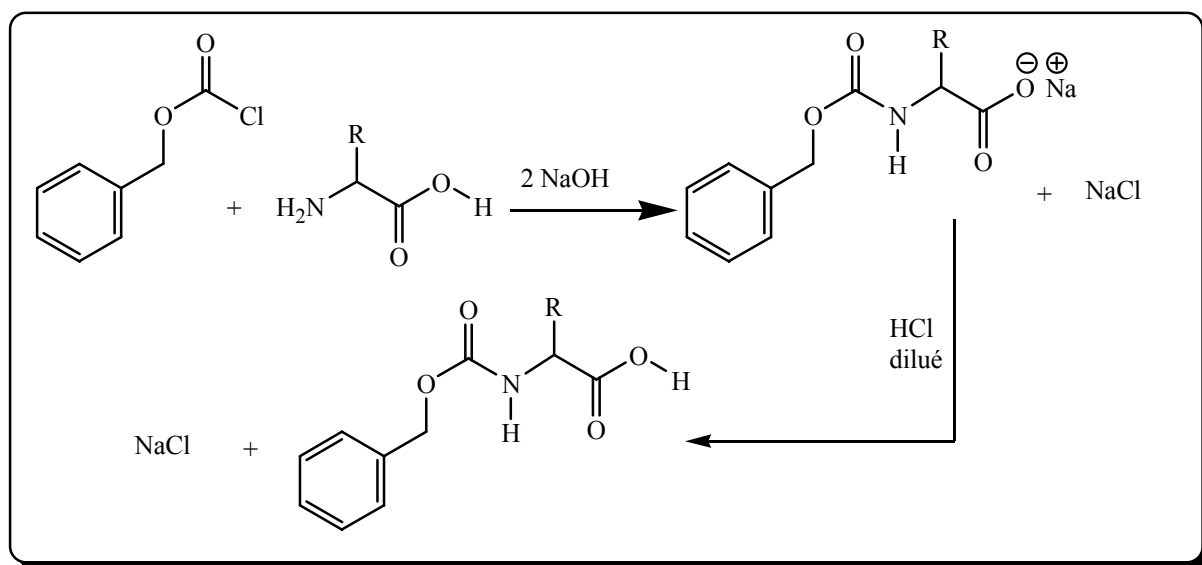


Figure 1.16: Préparation du Z-amino acide

Clivage du Z

Le groupement Z peut être clivé par une variété de méthodes. La plus utilisée est l'hydrogénation catalytique à température ambiante sous pression atmosphérique [28,33]. Ce processus laisse la liaison peptidique et les différentes chaînes latérales intactes en générant des produits inoffensifs, qui sont le toluène et le dioxyde de carbone (figure 1.17).

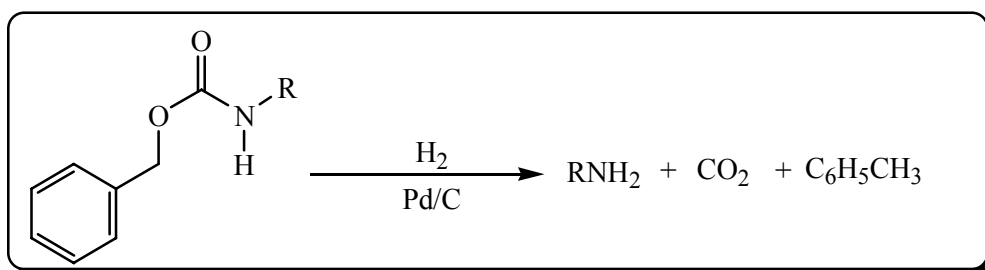


Figure 1.17: Clivage du groupement Z

1.5.2.1.3 Fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc)

En principe, les groupements protecteurs clivables par une base forte ne sont pas très recommandés, à cause du problème de la racémisation qui est fortement favorisée par la présence d'une base forte. Cependant, la protection labile en milieu basique doux a une grande importance dans la synthèse des peptides. Le Fmoc est le groupement protecteur le plus utilisé dans la synthèse des peptides en phase solide [29,34]. Il est introduit par acylation de la fonction amine par le chlorure d'acide: chlorure de fluoréthoxycarbonyle [35] (figure 1.18).

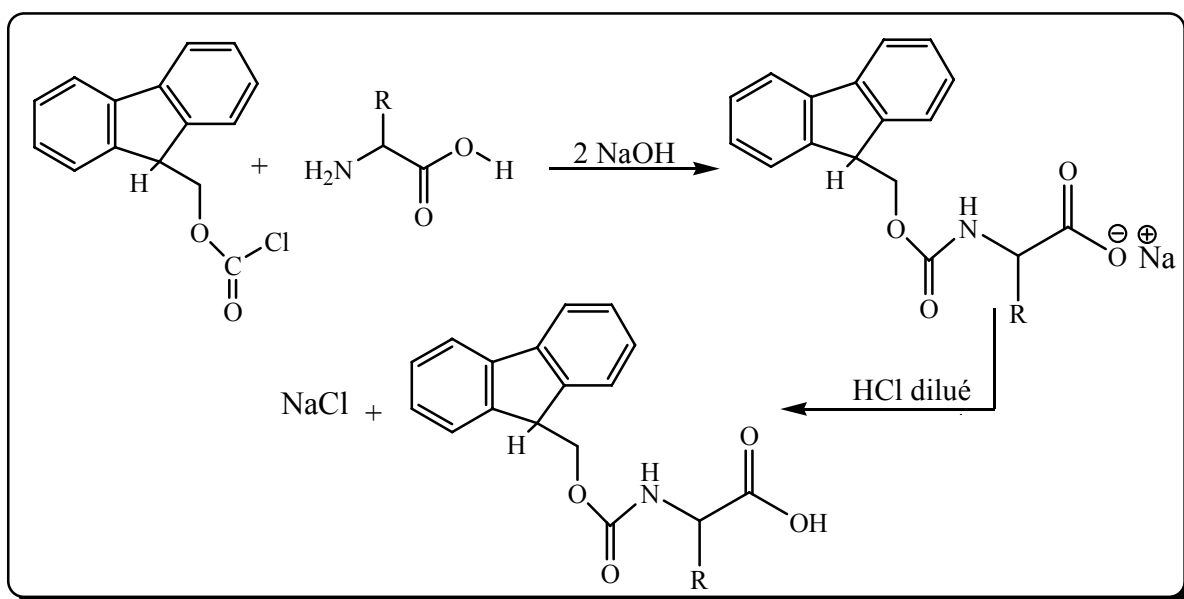


Figure 1.18: Préparation du Fmoc-amino acide

Clivage du Fmoc

En effet le Fmoc est éliminé par l'action d'une amine secondaire plus particulièrement avec les amines secondaires cycliques comme la pipéridine (figure 1.19). Ce groupement est stable en milieu acide mais malheureusement il ne résiste pas à l'hydrogénation catalytique. Il est également coûteux [28,35].

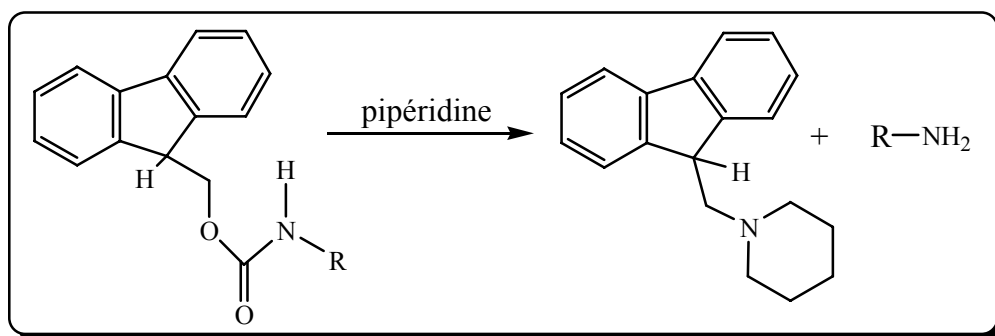


Figure 1.19: Clivage du groupement Fmoc

1.5.2.2 Protection latérale

Comme la fonction portée par la chaîne latérale de certain amino acide peut interférer durant la synthèse peptidique, il est nécessaire de les bloquer pour éviter la formation de réactions secondaires.

Les fonctions alcools de la sérine et la thréonine, le phénol de la tyrosine, la guanidine de l'arginine et le thiol de la cystéine peuvent subir en même temps l'acylation et l'alkylation. La protection de la cystéine est également impérative pour éviter la formation non contrôlée des ponts dissulfures. Les fonctionnalités de type amide primaire de l'asparagine et de la glutamine ne sont pas impliquées dans des réactions secondaires, mais une fois incorporées dans un peptide leur protection est souvent recommandée pour éviter la déshydratation en nitriles durant l'activation [28].

Le choix du groupement protecteur dépend du type de protection de la fonction amine liée au C^α. Si le groupement protecteur de cette dernière est labile en milieu acide, le cas typique du groupe tert-butyloxycarbonyl (Boc), alors la protection de la chaîne latérale doit être stable en milieu acide moyennement fort. Là où Z est employé, le groupement protecteur de la chaîne latérale doit être résistant à l'hydrogénation ou à l'acidolyse avec des acides forts (figure 1.20).

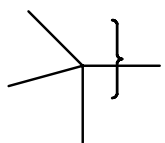
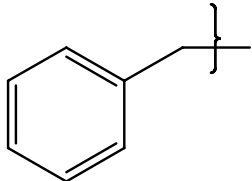
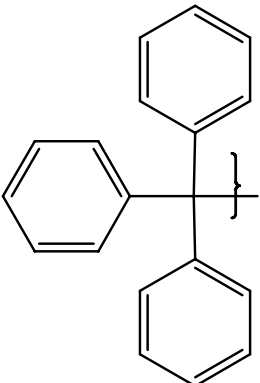
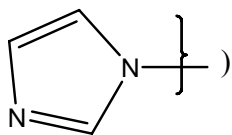
Groupement protecteur	Groupement à protégé	Conditions de clivage
	-CO ₂ H -OH -SH	Acide fort (95% CF ₃ CO ₂ H ou HCl dans le dioxane
	-CO ₂ H -OH -SH	Hydrogénolyse (H ₂ /Pd) ou acide fort HF ou HBr dans l'acide trifluoroacétique
	-CONH ₂ -SH (His imidazole  (-NH ₂))	Milieu acide doux (CH ₃ COOH)
(Etyl, métyl)	-CO ₂ H	Saponification basique (CH ₃ OH/NaOH)

Figure 1.20: Schéma représentatif des différents groupements protecteurs de la chaîne latérale

1.6 Les Méthodes de synthèse des peptides

1.6.1 Méthode d'azide

L'ester de l'acide aminé est converti en hydrazide, ce dernier subit à son tour un traitement à l'acide nitreux pour donner la forme azide qui constitue un fort agent d'acylation. Sa réaction avec un acide aminé génère l'acyldipeptide [36] (figure 1.21).

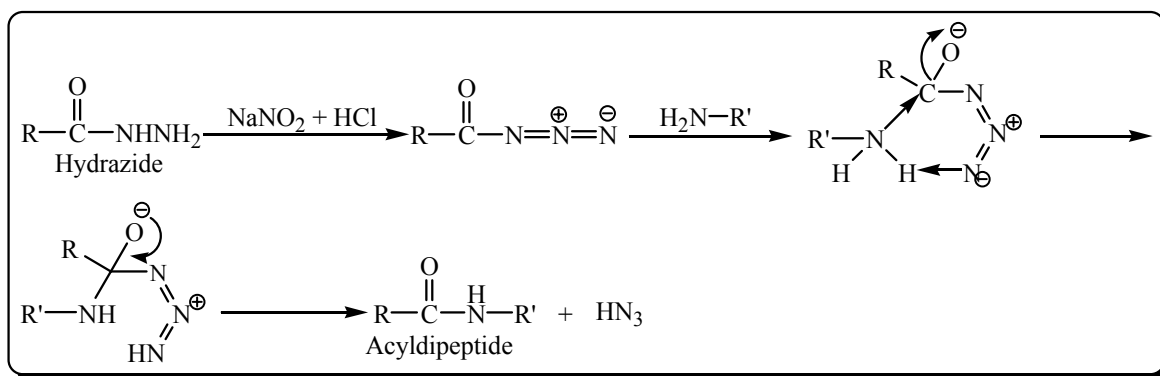


Figure 1.21: Formation du lien peptidique par la méthode d'azide

L'avantage de cette méthode est qu'elle se fait sans acylation de la fonction hydroxyl. Cependant, elle présente l'inconvénient d'accroître considérablement le temps de couplage ce qui favorise certaines réactions secondaires. Avec la méthode d'azide le problème de la racémisation ne se présente pas. Ceci peut être expliqué par l'aminolyse de l'azide peptidyl catalysé par une base d'une façon pseudointramoléculaire ce qui empêche la formation de l'oxazolone [28].

1.6.2 Méthode du chlorure d'acide

Les chlorures d'acide [37], sont des agents d'acylation très efficaces mais très susceptibles à la racémisation quand la fonction amine liée au C^α est protégée sous forme de carbamate. Contrairement aux chlorures d'acide, les fluorures d'acide sont très stables et ne donnent pas des réactions secondaires [38,39] (figure 1.22).

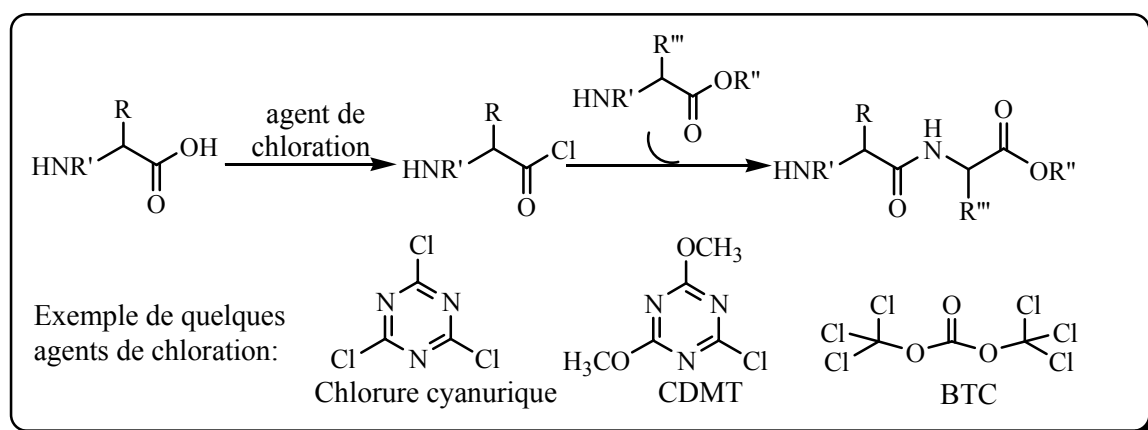


Figure 1.22: Formation de la liaison amide par la méthode du chlorure d'acide

1.6.3 Méthode de l'anhydride mixte

Cette méthode est très efficace à basse température et donne des rendements élevés de produits purs [40]. Elle s'effectue en deux étapes ; la première consiste à activer la fonction carboxylique de l'acide aminé N-protégé avec l'alkylchlorocarbonate, comme l'éthylchlorocarbonate ou préférablement l'isobutylchloro-carbonate. L'activation s'effectue dans un solvant organique en présence d'une base tertiaire ; la seconde étape implique la réaction de l'anhydride carbonique avec la fonction amine libre d'un acide aminé ou d'une unité peptidique. A cause de leur grande réactivité qui les rend très susceptibles à la racémisation, les anhydrides mixtes sont préparés juste avant leurs utilisations (figure 1.23).

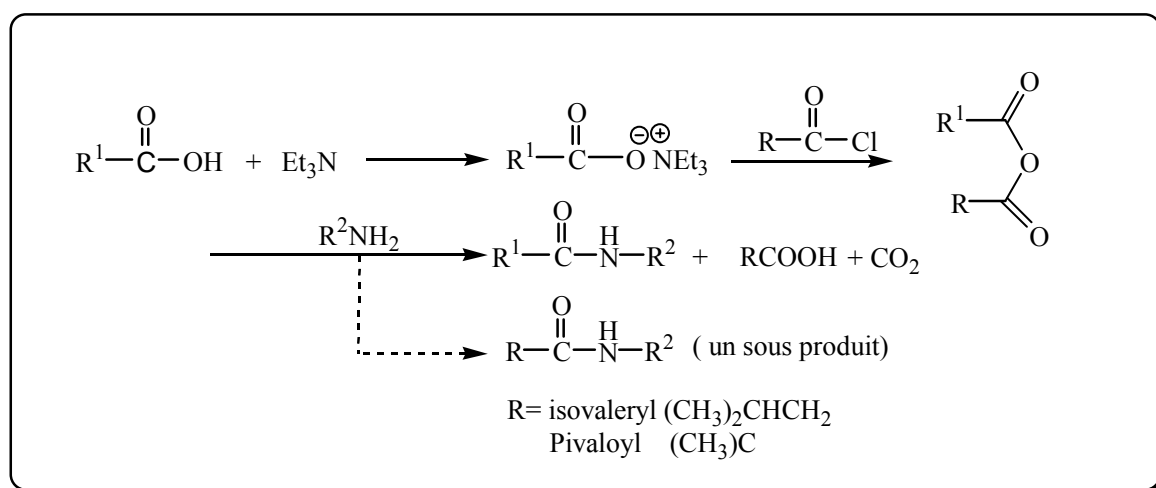


Figure 1.23: Formation de la liaison amide par la méthode de l'anhydride mixte

Contrairement aux anhydrides mixtes, l'aminolyse des anhydrides symétriques mène seulement au peptide désiré. Cet avantage compense légèrement la perte de la moitié de l'acide aminé protégé employé dans la préparation de l'agent d'acylation.

1.6.4 Méthode des esters activés

Les esters activés stables d'acides aminés constituent une alternative commode aux anhydrides mixtes. Ils sont moins réactifs mais plus sélectifs et plus résistants à l'hydrolyse que les anhydrides [41-43]. Il s'agit généralement des esters phénoliques préparés par condensation de l'acide aminé avec un phénol porteur de groupements attracteurs (Hydroxybenzotriazole, pentafluorophénol ou l'hydroxy succinimide) en présence du carbodiimide. Les esters du pentafluorophényl (PFP) des acides aminés N-protégés sont des agents d'acylation très efficaces. Ils sont préparés par action du carbodiimide sur le

pentafluorophénol (figure 1.24); Leur réactivité est légèrement inférieure à celle des anhydrides, mais peut être augmentée par l'addition de l'hydroxybenzotriazole (HOBT) [44-46].

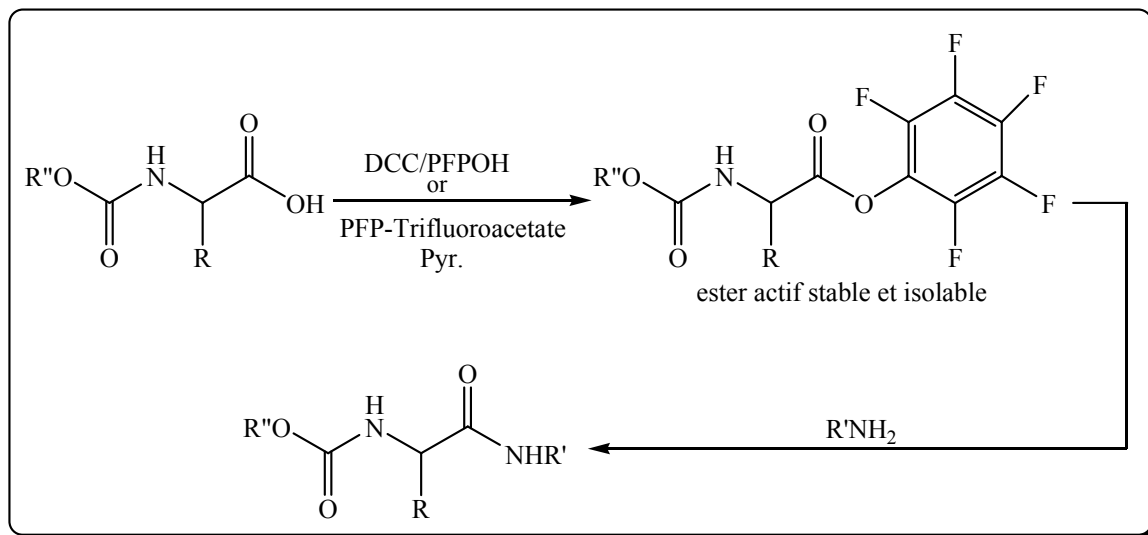


Figure 1.24: Formation de la liaison amide par la méthode de l'ester activé

Elle peut constituer une méthode de choix lorsque l'ester activé est obtenu sous une forme cristalline pure et stable, ce qui facilite son stockage et son utilisation dans d'autres synthèses.

1.7 Agents de couplage

Le champ des agents de couplage a connu une grande évolution depuis 1955 par l'introduction du carbodiimide jusqu'aux sels d'uronium et de phosphonium récemment appliqués comme agents de couplage [47-49].

1.7.1 Couplage au DCCI

Le dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) [48,50] très connu comme réactif de couplage pour la formation du lien peptidique, ne remplit pas toutes les conditions d'un bon agent de couplage à cause de sa grande réactivité qui peut provoquer la racémisation et d'autres réactions secondaires (figure 1.25).

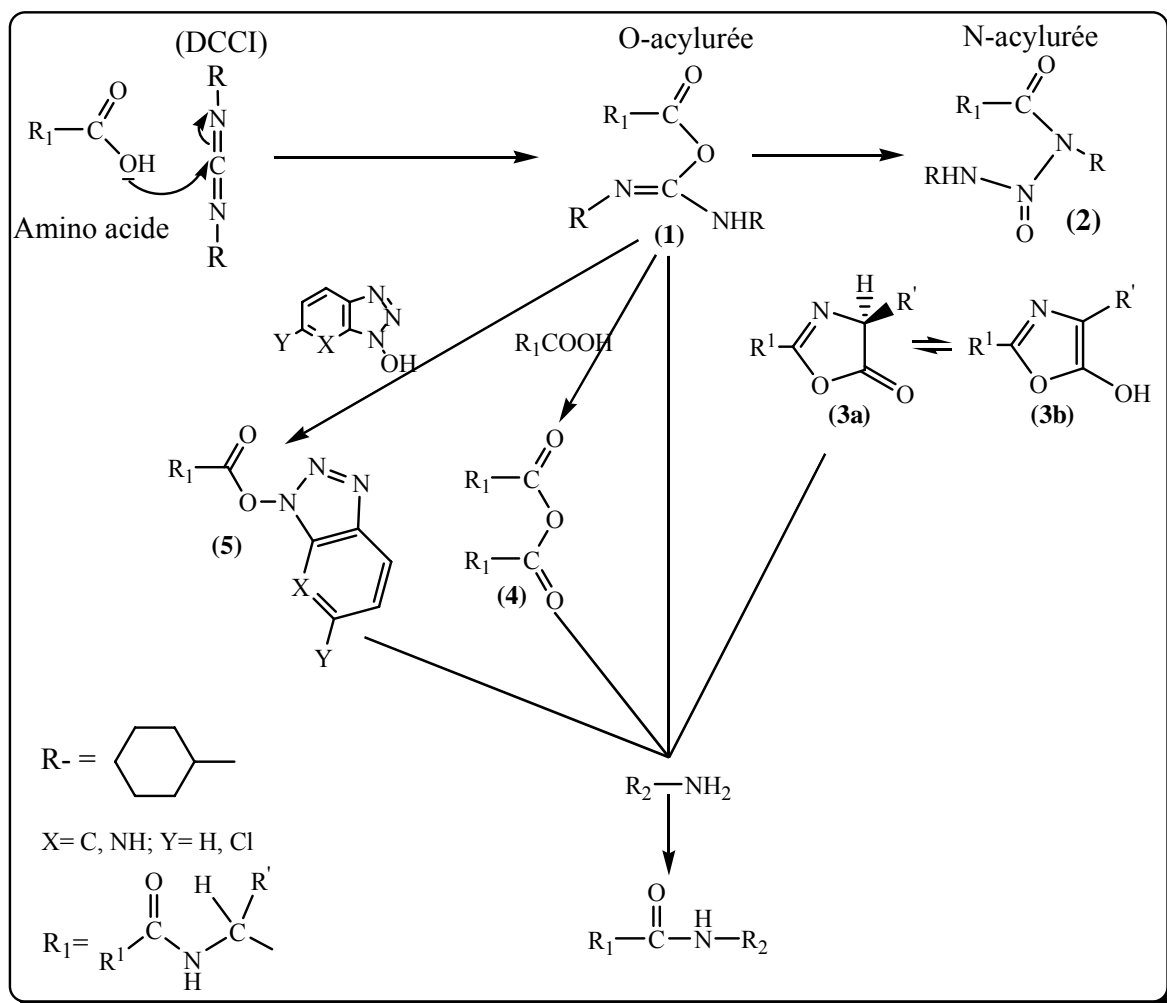


Figure 1.25: Mécanisme d'activation par le carbodiimide (DCCI) [48]

Le mécanisme d'activation par le Carbodiimide est un peu compliqué. Il débute par un transfert de proton, suivi par l'addition d'un carboxylate pour former le O-acylurée (1). Cette dernière espèce très réactive est capable de réagir avec un groupement amine libre pour donner l'amide correspondant. Toutefois le O-acylurée a tendance de se réarranger en N-acylurée (2) qui n'est pas réactif, comme il peut conduire, par une cyclisation intramoléculaire au 5(4H) oxazolone (3a), ce dernier peut subir une tautomérisation et induire par conséquent la perte de la chiralité. La présence d'un équivalent supplémentaire de l'acide aminé durant l'étape d'activation génère le composé (4) qui est très réactif. Les esters activés du OBT (5) sont moins réactifs que (1) mais ils sont plus stables et moins susceptibles à la racémisation [48]. Les réactions secondaires indésirables ainsi que les rendements faibles obtenus avec le DCCI rendent l'ajout des dérivés du benzotriazole nécessaire. L'inconvénient majeur de cet agent de couplage est la précipitation du

N,N'-dicyclohexylurée (DCHU) difficile à éliminer, n'est pas complètement soluble dans le solvant de la réaction. Par conséquent, le produit désiré est souvent contaminé.

1.8 Problème de racémisation

Au cours de la synthèse peptidique, il est important que les centres asymétriques conservent leur chiralité. Il faut donc éviter l'épimérisation durant les différentes étapes de la synthèse. L'activation est incontestablement l'étape qui affecte le plus l'intégrité optique du peptide synthétique. Elle consiste à remplacer l'hydroxyle carboxylique de l'acide N-protégé par un substituant à effet inductif attracteur, ce qui augmente le caractère électrophile du carbone carboxylique et facilite son attaque par l'oxygène carbonyle (2). L'intermédiaire cyclique ainsi obtenu, est stabilisé par élimination d'un hydracide HX en Oxazolone (Azlactone) ce dernier se tautomérise à son tour en oxazolidine responsable de la racémisation (figure 1.26) [51,52]. L'explication de la tendance des azalactones à racémiser est due à la facilité avec laquelle le proton acide peut être arraché par une base (figure 1.26).

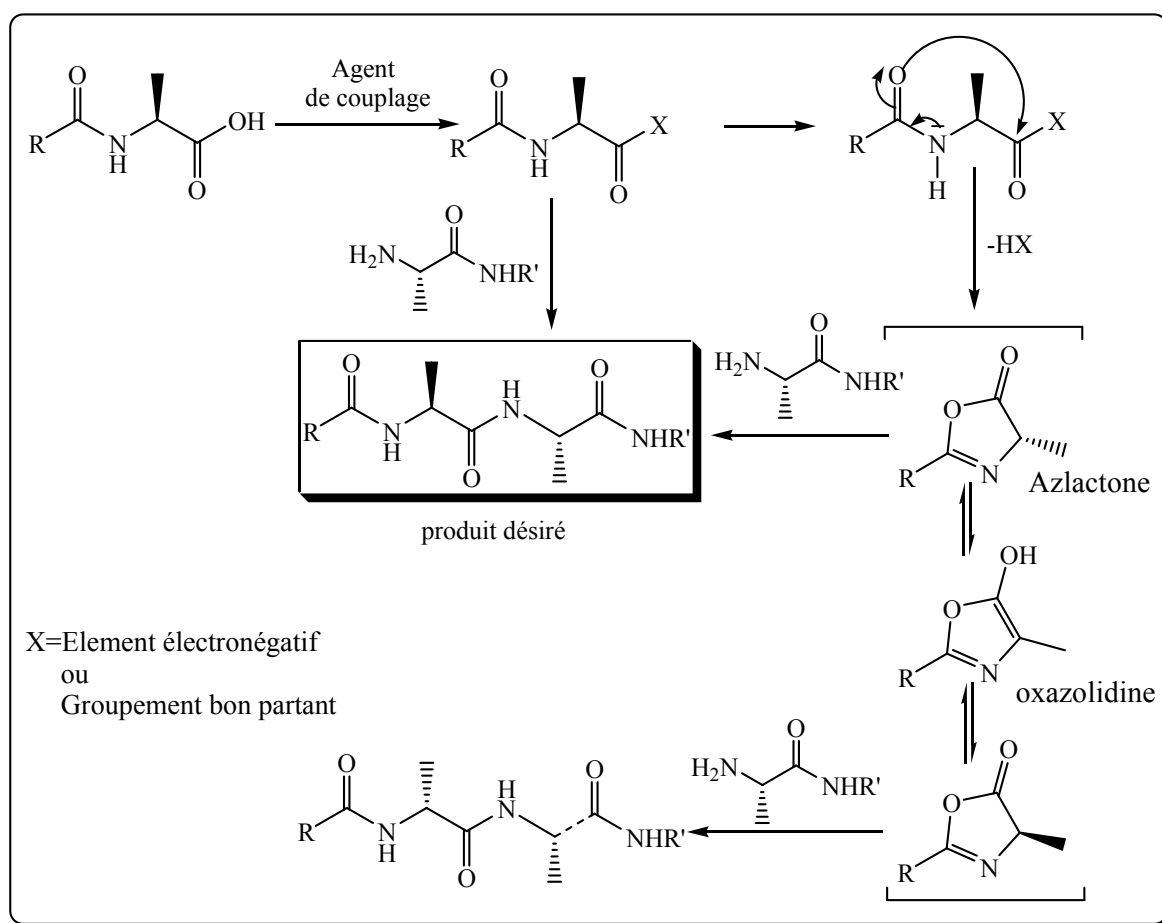


Figure 1.26: La racémisation dans le couplage des peptides

Le degré de racémisation dépend de plusieurs facteurs parmi lesquels, on peut citer la méthode et les agents de couplage, le type de protection, la nature de la base utilisée, les conditions de travail ainsi que d'autres facteurs.

Bien que la réaction de couplage soit très lente, les esters actifs comme le pentafluorophényl ester, sont très utiles pour éviter le problème de la racémisation. Les agents de couplages ont également une grande influence sur la racémisation, dans le cas du carbodiimide par exemple le degré de racémisation augmente avec la température, comme il dépend aussi de la nature de solvant, il est plus prononcé dans un solvant polaire comme le DMF que dans un solvant moins polaire comme le CH_2Cl_2 . L'addition de HOBT qui est un très bon nucléophile, réduit considérablement le risque de la racémisation en formant avec l'intermédiaire réactif un ester actif de type $-\text{OTB}$, avant que le groupement amine attaque intramoléculairement le groupement acyle de l'intermédiaire réactif.

Le taux de racémisation dépend aussi de la nature des amino acides utilisés dans la synthèse d'une séquence peptidique. Les amino acides possédant un substituant électronégatif en position β comme la cystéine, la sérine, thréonine, l'acide aspartique, les amino acides aromatiques comme (la phénylalanine, tyrosine, tryptophane et l'histidine), ont une grande tendance à la racémisation contrairement aux amino acides aliphatiques [53].

Grâce à leur faible tendance à former un azalactone, les groupements protecteurs de type uréthane comme les groupements Boc, Fmoc, CBz, réduisent considérablement le taux de racémisation comme ils peuvent l'éliminer complètement. Le trifluoroacétyl, utilisé récemment comme groupement protecteur de la fonction amine, protège le chlorure d'acide non seulement des réactions secondaires mais également de la racémisation [54].

CHAPITRE 2

LES AZAPEPTIDES, CONFORMATION, ACTIVITE BIOLOGIQUE ET SYNTHÈSE

2.1 Pseudopeptides

Un peptide résulte d'une polycondensation dirigée de α -amino acides, reliés par une liaison amide, cette dernière est appelée généralement liaison peptidique. Initialement, la recherche de composés présentant une activité biologique, et dérivés de peptides naturels, a consisté en l'échange, l'addition ou la perte de résidus amino acides, de telle sorte que la chaîne principale resterait de nature peptidique. Plus récemment, est apparue une démarche raisonnée et planifiée, qui découle du concept de structure bioactive. Elle consiste à produire par synthèse des analogues du peptide en plaçant les fonctions reconnues comme indispensables sur support moléculaire de nature plus ou moins peptidique. Cette démarche conduit à des analogues appelés pseudopeptides [55]. Cependant, l'activité biologique d'une molécule ne dépend pas uniquement de sa structure chimique, mais également du milieu biologique complexe où elle agit, et de sa liaison plus ou moins spécifique à un récepteur, de plus, il faut que cette molécule puisse arriver intacte à son site d'action après avoir franchi, sans être altérée, les diverses barrières hépatique, hémato-encéphalique, intestinale.... Il faut donc tenir compte, que durant le transport jusqu'à son site d'action, cette substance bioactive peut subir des réactions de métabolisation par oxydo-réduction, d'hydrolyse partielle ou totale sous l'influence des diverses protéases circulantes.

La modification du squelette peptidique par l'introduction de groupes non peptidiques, permet d'espérer une limitation de la dégradation des molécules par les peptidases. Un autre avantage est de pouvoir moduler les propriétés conformationnelles des analogues sans nécessairement atteindre les chaînes latérales dont elles peuvent être indispensables à une étape de reconnaissance moléculaire par exemple. La molécule idéale serait celle qui résisterait le plus efficacement aux processus de la biodégradation (temps de vie plus long) [56] et qui se comporterait comme un superagoniste doué d'une très grande spécificité et d'une absence de toxicité.

Les figures 2.1 et 2.2 rassemblent quelques exemples de modification du squelette peptidique que l'on trouve dans la littérature.

La plupart des modifications citées dans la figure 2.1 et 2.2 stabilisent plutôt le repliement β . Certaines cependant déstabilisent le repliement β : c'est le cas par exemple du lien amide inversé (NH-CO) [57]. Les altérations du lien amide peuvent aussi conduire à un changement du type de repliement: β III, ou β II par introduction respective d'une C $^{\alpha}$ -alkylation [58] et d'une α,β -insaturation [59].

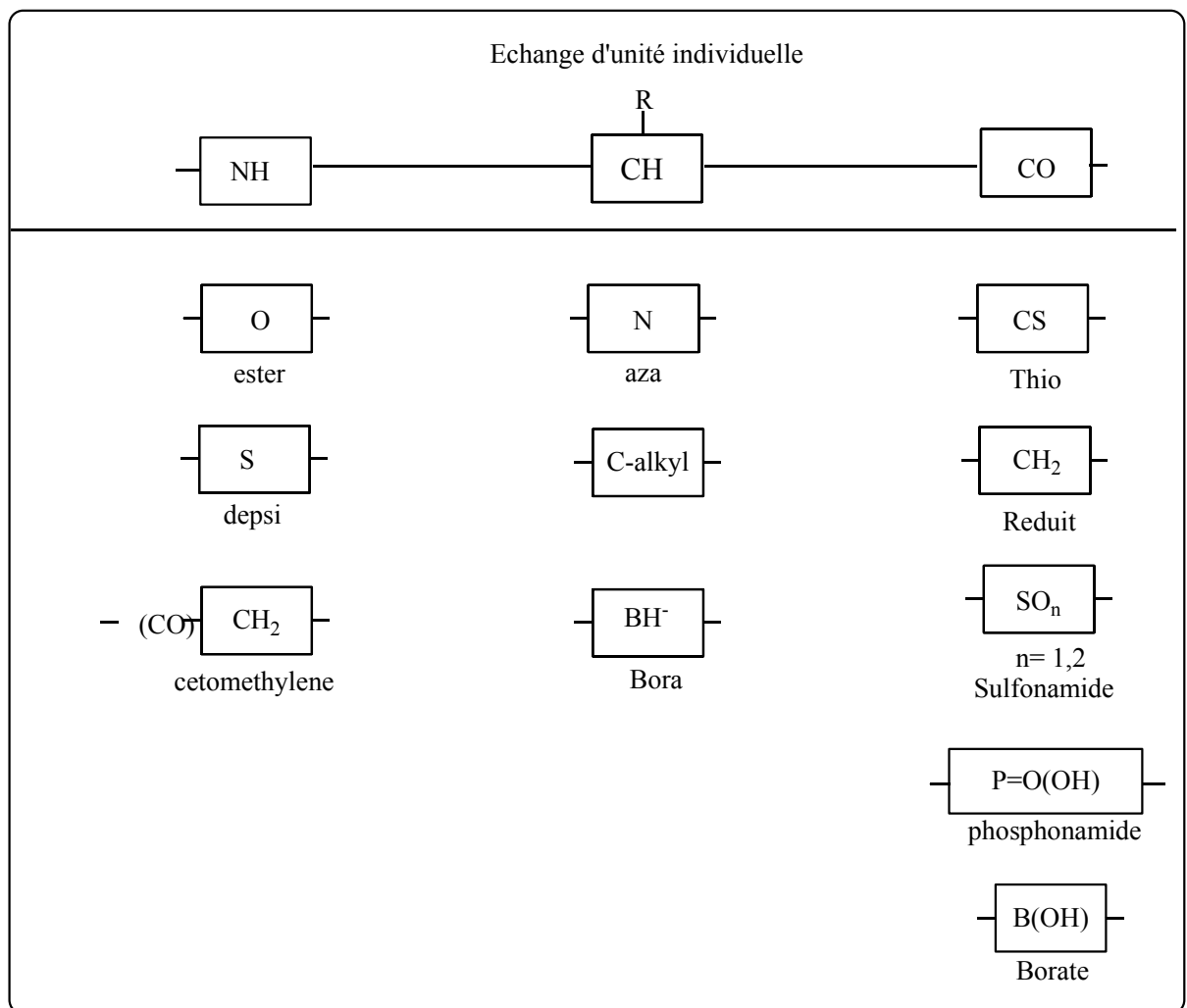


Figure 2.1: Modification par échange d'unité individuelle dans l'unité peptidique C $^{\alpha}$ -CO-NH [60]

Extention de la chaine peptidique	Remplacement de la liaison amide
$ \begin{array}{c} \text{R} \\ \\ \text{-NH-} \boxed{\text{X}} \text{-CH-CO-} \end{array} $ $ \begin{array}{c} \boxed{\text{O}} \quad \text{Oxamide} \\ \boxed{\text{NH}} \quad \text{Hydrazide} \\ \boxed{\text{CH}_2} \quad \beta\text{-amino acide} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \boxed{\text{CO-NH}} \\ \text{retro-inverse} \\ \boxed{\text{CH(OH)CH}_2} \\ \text{Hydroxyéthylène} \\ \boxed{\text{CH=CH}} \\ \text{(E)-alcen} \\ \boxed{\text{CH}_2\text{-CH}_2} \\ \text{carba} \\ \boxed{\text{P=O(OH)-CH}_2} \\ \text{Phosphonate} \end{array} $

Figure 2.2: Modification du squelette peptidique par insertion d'un atome ou d'un groupe d'atome

L'introduction d'hétérocycles ou de ponts covalents de longueurs variables en différents points de la molécule peut aussi moduler la conformation des peptides tout en la rigidifiant. C'est le cas par exemple des lactames [61], des pyrrolinones [62], des azoles . Ces hétérocycles résultent du couplage, soit de deux chaînes latérales, soit de deux sites du squelette principal, soit d'une chaîne latérale et d'un azote de la chaîne principale. Enfin, la liaison peptidique elle-même peut être incorporée dans l'hétérocycle (figure 2.3).

Certains lactames sont considérés comme des mimes des repliements β et γ [63,64], ainsi que d'autres hétérocycles non peptidiques ; on y trouve aussi des initiateurs d'hélice α , comme les hydrazides hepta- et hexa-cycliques. On connaît des analogues porteurs de mimes cycliques et qui présentent une activité biologique, comme des antagonistes de la Leu- enképhaline et de l'hormone de croissance humaine (hGH), ou comme des puissants inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). Actuellement, la

reproduction d'une structure secondaire est l'un des thèmes qui donnent lieu à un grand nombre d'études en vue de la mise au point de molécules bioactives.

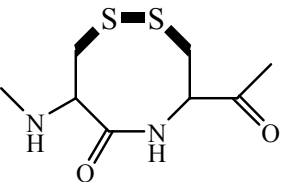
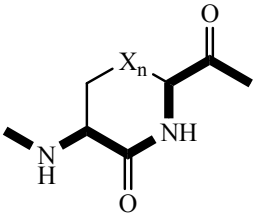
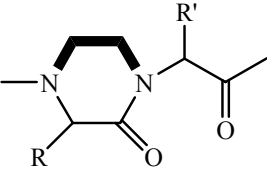
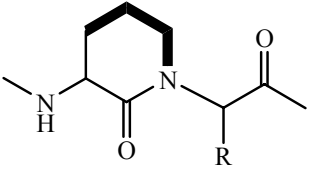
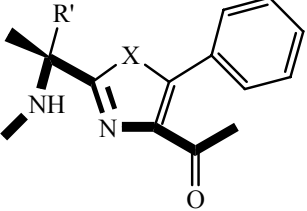
Modification	Position du pont	Dénomination
	Le pont relie deux chaîne latérales	n=1 X=CH ₂ γ-lactame [61] n=2 X=CH ₂ δ-lactame [61]
	Le pont relie deux chaîne latérales	n=1 X= NH azalactame X=O oxalactame X=S Thiolactame
	Le pont relie deux unités du squelette	Pipérazinone-2
	Le pont relie la chaîne et l'azote du squelette	Lactame [61,66]
	Peptide azole, incluant un mime d'une liaison amide.	X =S, Thiazole-1,3 [66] X =O, oxazole-1,3 [66] X =N, diazole-1,3

Figure 2.3: Principaux modes de rigidification du squelette peptidique par introduction d'un hétérocycle [65,66]

2.2 Azapeptides

2.2.1 Propriétés conformationnelles des azapeptides

L'activité biologique d'un peptide dépend fortement de sa structure tridimensionnelle. Ainsi, pour pouvoir interagir avec un récepteur, le peptide bioactif doit avoir une conformation bien spécifique. L'étude de ces conformations bioactives est d'un intérêt majeur dans la conception d'agents thérapeutiques efficaces et sélectifs, comme elle permet d'établir le rapport structure/activité [67]. L'introduction d'une contrainte structurale dans une séquence peptidique peut favoriser une conformation en limitant sa flexibilité conformationnelle et par conséquent, ses substituants sont disposés dans l'espace d'une manière précise et prévisible.

La substitution du C^α d'un amino acide par un atome d'azote entraîne des modifications dans la structure et la dynamique du squelette peptidique en raison de la perte de l'asymétrie associée au C^α et la libre rotation autour de la liaison $C^\alpha-C$ de l'acide, ce qui pourrait mener à la perte de la flexibilité du peptide.

L'introduction d'un atome d'azote en position α génère deux éléments structuraux ; l'hydrazine dont la conformation est décrite par l'angle de torsion des peptides ϕ , et la partie urée pour laquelle l'angle de torsion ψ représente les différentes conformations possibles [68] (figure 2.4).

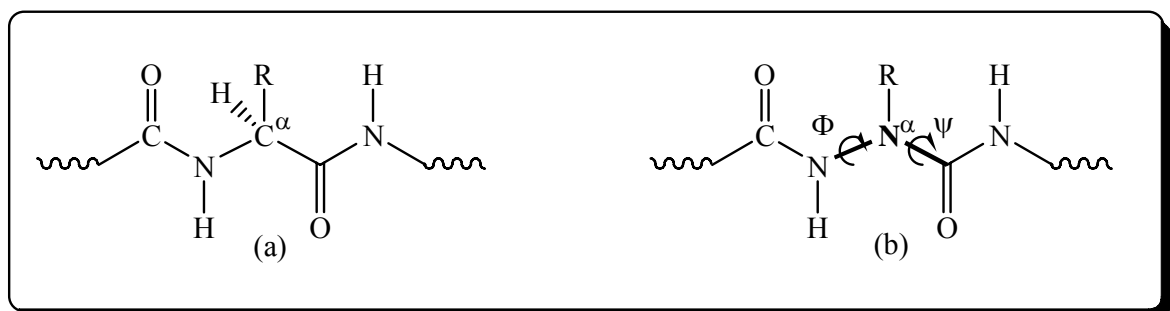


Figure 2.4: Amino acide (a) et aza-amino acide (b)

En raison de la structure plane de l'urée et pour mieux comprendre la structure des azapeptides, l'hydrazine et ses dérivés 1,2-diformyle hydrazine qui représentent la partie hydrazine de l'azapeptide, ont fait l'objet de nombreuses études en chimie quantique [68,69]. Les calculs théoriques ont montré que le minimum global du 1,2-diformyl

hydrazine et ses dérivés N-substitués correspondent à une structure non plane dans laquelle les doublets libres des atomes d'azote sont perpendiculaires l'un vis-à-vis de l'autre. La pyramidicité des atomes d'azote du 1,2-diformyl hydrazine considéré comme un constituant des azapeptides, change considérablement avec l'angle de torsion φ . Le caractère pyramidal le plus élevé est observé pour $\varphi = 0$, alors que la planéité prédomine pour $\varphi = 180$ [68].

L'importance de la chiralité dans les azapeptides reste un peu ambiguë à cause de la possibilité d'inversion des atomes d'azote. La préférence d'un arrangement pyramidal peut influencer l'orientation de la chaîne latérale qui joue un rôle très important dans l'interaction avec d'autres molécules, ainsi que la configuration absolue des amino acides adjacents qui peuvent favoriser certain type de structure secondaire. Le caractère pyramidal de chaque azote peut être mesuré par l'écart au plan défini par les trois atomes auxquels il est lié. Ce phénomène est influencé par la conjugaison électronique dans l'enchaînement CO-N-N^α-CO-N qui est probablement différente de celle dans l'enchaînement peptidique CO-N-C^α-CO-N [70,71]. L'analyse structurale de nombreux azapeptides contenant le résidu prolyle a montré que ces derniers adoptent une structure de type repliement β [72,73]. Cependant, le rôle des aza-amino acides en tant que motifs des tours β a été quelque peu ambiguë à cause de la présence du résidu prolyle qui lui-même favorise les repliements β .

Parmi toutes les structures secondaires, les repliements β [17] sont d'une grande importance dans la conception de molécule bioactive. Ils sont considérés comme une clé de reconnaissance dans l'initiation des processus biologiques [24-26]. Dans cette optique, l'étude et le développement de nouveaux aza-analogues capables de stabiliser les différents types de repliement β constituent désormais une extension particulièrement importante.

Récemment les études théoriques menées sur quelques modèles d'azapeptides du type For-AzaXaa-NH₂ avec (Xaa =Gly, Ala, leu) [74] et qui avaient comme objectif la recherche d'outil favorisant les repliements β , ont montré que les conformations préférées du résidu aza-amino acide sont limitées par les valeurs des angles dièdres stériquement permises, suivantes ($\varphi = \pm 90 \pm 30^\circ$, $\psi = 0 \pm 30^\circ$ ou $\pm 180 \pm 30^\circ$). Ce résultat s'est avéré très intéressant du fait que les angles dièdres ($\varphi = \pm 90 \pm 30^\circ$, $\psi = 0 \pm 30^\circ$) sont caractéristiques du résidu (i+2) d'un repliement β . Ainsi, la conformation la plus stable du Boc-Ala-

AzaAla-NH₂ Correspond à un repliement de type β II, ce qui suggère que l'incorporation du résidu Ala dans l'azapeptide For-AzaAla-NH₂ n'a pas une grande influence sur les angles dièdres et sur le repliement β [75].

Incorporé dans le dipeptide Boc-AzaTic-LeuOMe, le résidu 3,4-dihydro-2 (1H) phtalazine carboxylique (AzaTic) [76] favorise une conformation C₅ (figure 2.5) dans laquelle l'azote N ^{α} est pratiquement plan avec une hybridation sp² alors qu'un caractère pyramidale élevé est observé pour l'azote N₁ qui participe à la formation d'un pont hydrogène du type N₂H...N₁.

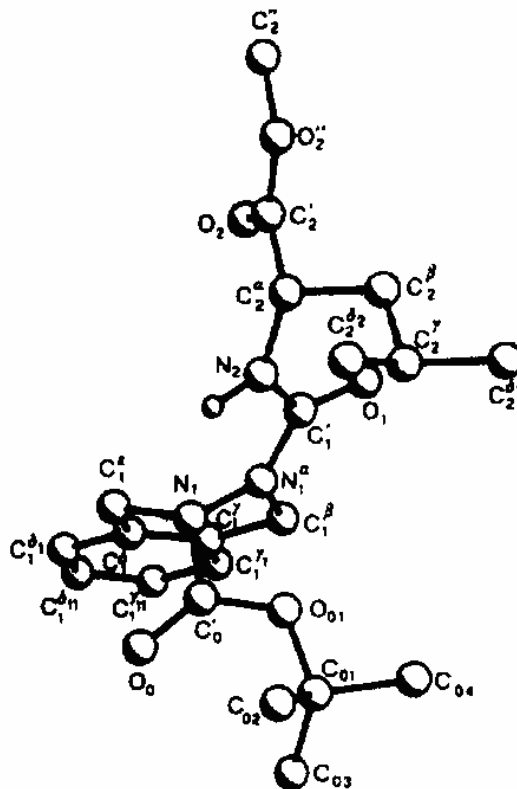


Figure 2.5: Vue en perspective de la conformation du Boc-(S-N₁)-AzaTic-Leu-OMe

Les structures moléculaires déterminées par Diffraction des rayons X des deux aza-dipeptides Z-AzaAsp(NHMe)-Pro-NHiPr (I) et Z-AzaAsp(Oet)-Pro-NHiPr (II) synthétisés par Frédérique [77] ont montré que l'aza-dipeptide (II) est caractérisé par un repliement β stabilisé par une liaison hydrogène intramoléculaire, tandis que (I) présente une interaction intrarésidu N ^{α} ...H ^{δ} N ^{δ} (figure 2.6).

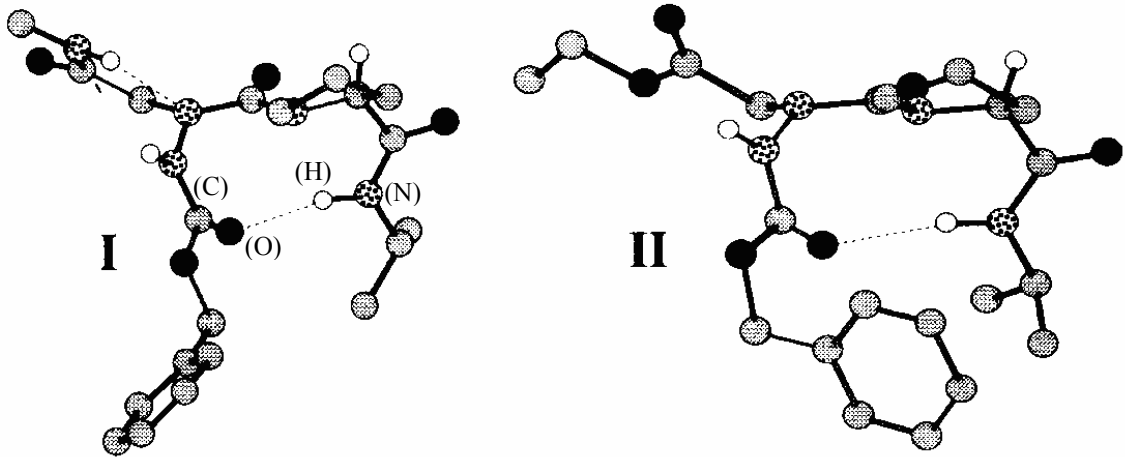


Figure 2.6: Structure cristalline des composés I et II

Pour déterminer les conséquences structurales de l'échange $N^{\alpha}/C^{\alpha}H$ dans les azapeptides, et plus particulièrement le comportement de la chaîne latérale carboxamide dans les dérivés contenant l'AzaAsn, Frédérique et coll [78] ont étudié la structure cristalline de quelques dérivés contenant l'aza-analogue de l'asparagine [Z-AzaAsn(Me)- NM_2 (III), Z-AzaAsn(Me)-Pro-NHiPr (IV) et Piv-Pro-AzaAsn(Me)-NHiPr (VII)] (figure 2.7), de l'acide aspartique [Z-AzaAsp(Oet)-Pro-NHiPr (V)] (figure 2.8) et d'alanine [Boc-AzaAla-Pro-NHiPr (VI)]; la diffraction des rayons X de ces dérivés montrent que l'azote- α adopte une structure pyramidale (III-VI) ou planaire (VII) selon la séquence. Quand il est pyramidal, l'azote- α acquit une configuration absolue R. Tous ces dérivés sauf (III) adoptent un repliement de type βI (IV-VI) ou βII (VII) dans lequel la liaison amide (AzaAsn) $N^{\delta}H$ forme une liaison hydrogène avec l'azote- α (figure 2.8).

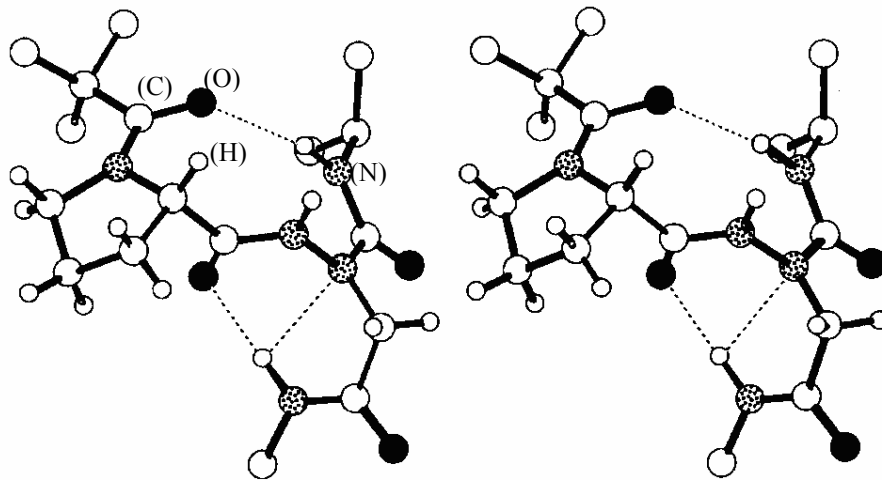


Figure 2.7: Vue stéréochimique du repliement β du composé Piv-Pro-AzaAsn(Me)-NHiPr

La liaison hydrogène est représentée par des pointillés

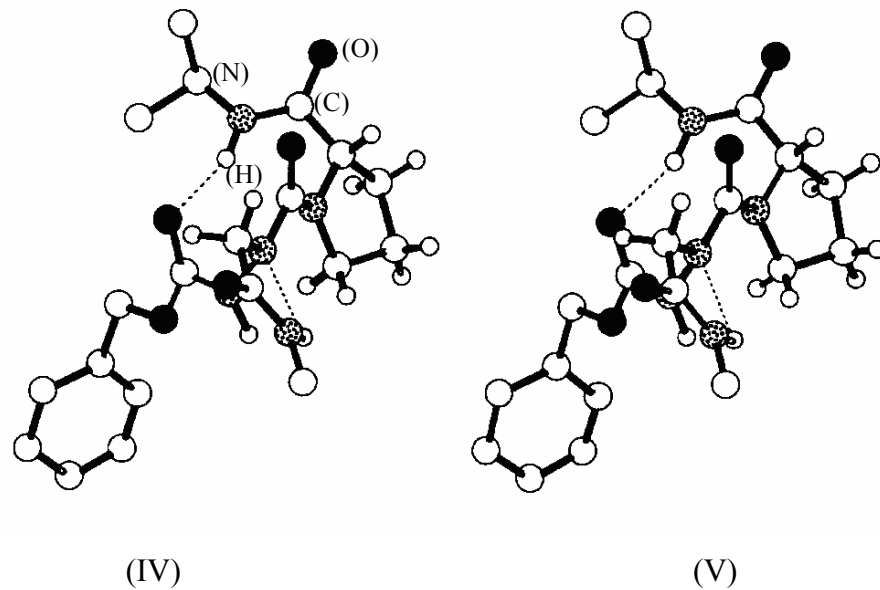


Figure 2.8: Vue stéréochimique du repliement βI dans la structure moléculaire cristalline du
 Z-AzaAsn(Me)Pro-NHiPr (IV) et Z-AzaAsp(OEt)-Pro-NHiPr (V)

L'acide pipecolique (amino acide 2-piperidinecarboxylique) non codé génétiquement est un homoproline, n'appartenant pas aux 20 amino acides naturels, mais on le trouve dans le règne végétal et dans certains antibiotiques (efrapeptine, elvapeptine, rapamycine) [79]. L'isomérisation cis-trans de la liaison amide pipecolique a été analysée [80] à travers les systèmes d'acétyl-Gly-X-Pip-Gly-carboxamide (GXPIP), où X=A, F, Y, W, cyclohexylalanine (Cha). La substitution de la proline par le résidu pipecolyle a conduit à l'augmentation du pourcentage du conformer cis et à la formation d'une interaction de type $i \rightarrow i+2$ dans la forme trans des peptides contenant un résidu aromatique, une interaction stabilisatrice entre le résidu aromatique et le cycle pipecolique qui le succède est observé aussi dans la forme cis. Plusieurs analyses conformationnelles ont été réalisées pour étudier la perturbation locale due au remplacement du résidu Pip par son analogue AzaPip dans différentes séquences peptidiques. Les résultats expérimentaux des rayons-X montrent que les deux cycles piperidine et hexahydroindolizine [79,81] ont quelque propriétés en commun, tel que la conformation chaise, la disposition axiale du substituant du squelette C-terminal, la forme cisoïde de la fonction amide N-terminal et l'hybridation sp^3 de l'azote N^α (figure 2.9).

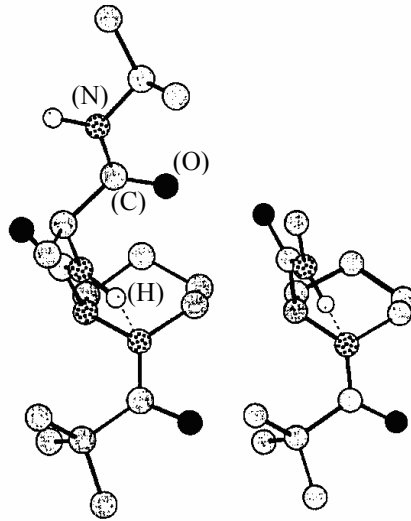


Figure 2.9: Représentation de la structure moléculaire cristalline du Piv-(R)-AzaPip-L-Ala-NHiPr (VIII) à gauche et du Piv -D-Pip-NHMe (X) à droite

Les aza-dipeptides Piv-AzaPip-L-Ala-NHiPr (VIII), Boc-L-Ala-AzaPip-NHiPr (IX) et le Piv-DL-Pip-NHMe (X) ont été Synthétisés pour évaluer l'influence de la position du résidu AzaPip dans une séquence aza-dipeptidique sur les propriétés conformationnelles [79]. L'aza-dipeptide heterochiral Boc-L-Ala-(s)AzaPip-NHiPr (XI) adopte une conformation plutôt étendue, tandis que l'aza-dipeptide homochiral (XII) est replié en un pseudotour β -VI stabilisé par une liaison hydrogène intramoléculaire de type $i+3 \rightarrow i$ (figure 2.10).

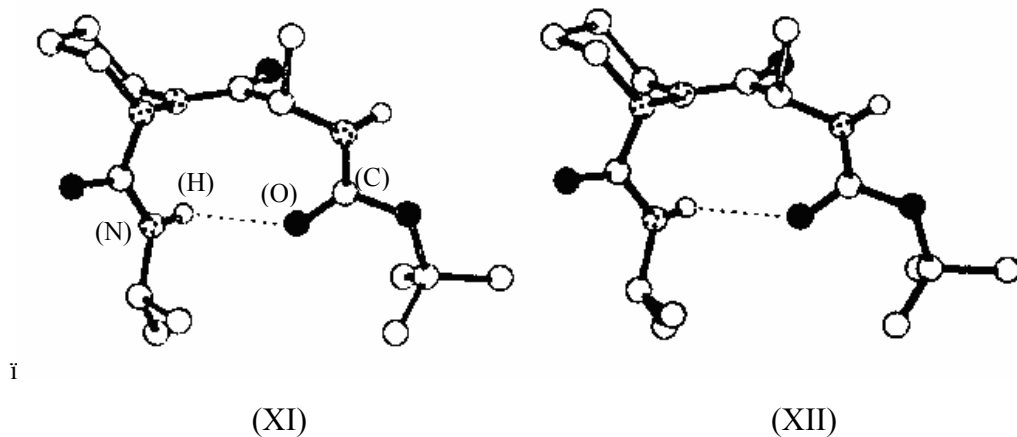


Figure 2.10: Structure moléculaire cristalline du composé Boc-L-Ala-(S)AzaPip-NHiPr montrant le repliement β VI Stabilisé par une liaison intramoléculaire ($4 \rightarrow 1$)

Dans le même but Christine et coll. [81] ont synthétisé L'aza-tripeptide Boc-Ala-AzaPip-Ala-NHiPr, sa structure moléculaire cristalline est caractérisée par la présence d'un pseudo tour β VI autour de la séquence Ala-AzaPip N-terminal, stabilisé fortement par deux liaisons hydrogènes intramoléculaires, la première $(\text{Boc})\text{C}=\text{O}\cdots\text{HN}(\text{Ala}^3)$ est de type $i+3\rightarrow i$ tandis que la deuxième $(\text{Boc})\text{C}=\text{O}\cdots\text{HN}(\text{iPr})$ est de type $i+4\rightarrow i$ fermant un cycle à 13 atomes et partageant le même groupement carbonyle accepteur $(\text{Boc})\text{CO}$ avec la première. En solution (chloroforme, DMSO) deux isomères sont en équilibre. L'un d'eux ressemble au stéréoisomère du cristal (figure 2.11), l'autre est non replié, mais conserve l'isomérisie cis de la liaison Ala-AzaPip et le degré de pyramidicité élevé de l'atome N^α axiale de la seconde fonction amide.

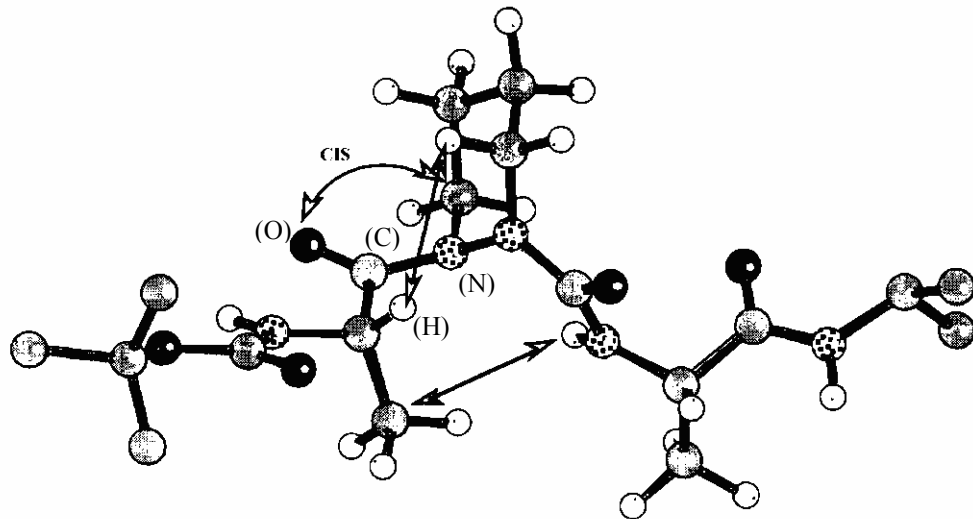


Figure 2.11: Modèle construit à partir des données expérimentales obtenues par analyse NOESY de l'isomère Boc-L-Ala¹-Pip-L-Ala³-NHiPr caractérisé par un repliement β VI

L'aza-dipeptide $\text{R-CO-AzaPip-L-Ala-NHiPr}$ ($\text{R}=\text{tBu}$ ou tBu) est caractérisé par deux populations de stéréoisomères dans le DMSO-D₆, tandis que le pseudodipeptide Boc-L-Ala-AzaPip-NHiPr possède un seul. La figure 2.12 montre que les deux molécules contenant les séquences (AlaPip/AzaPip) adoptent respectivement les structures de type β VI (avec une isomérisie trans autour de la liaison amide centrale) et de type β II (avec une isomérisie cis autour de la liaison amide centrale), tandis que la valeur de l'écart au plan de l'atome d'azote- 2N^α est pyramidal avec une configuration absolue (S) [82].

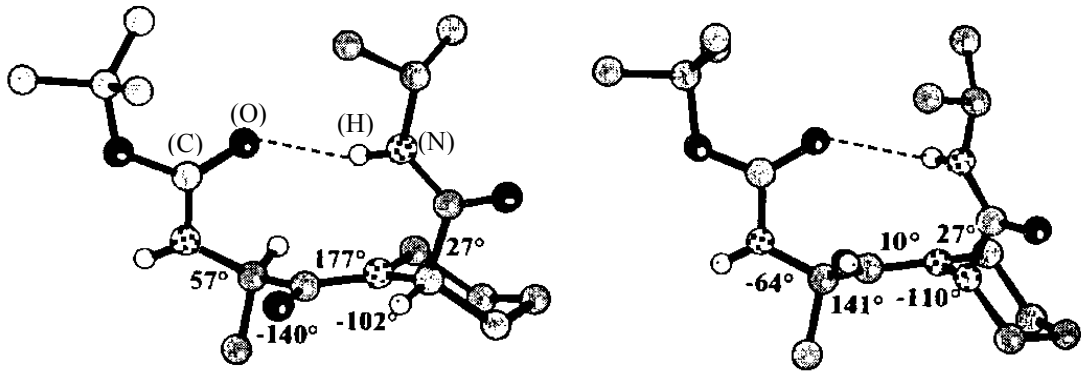


Figure 2.12: Les Structures moléculaires cristallines du Boc-D-Ala-L-Pip-NHiPr (à gauche) et du Boc-L-Ala-(S)-AzaPip-NHiPr (à droite) avec les valeurs des angles dièdre φ , ψ et ω .

2.2.2 Activité biologique des azapeptides

Des études biologiques et pharmacologiques ont montré que certains aza-analogues naturels et synthétiques présentent une action biologique accrue, des durées d'action plus longues, et une résistance supérieure à la biodégradation. Dans le cas de l'[AzaAsn⁵]-élédoïsine par exemple, les deux effets, augmentation de l'activité et la prolongation des durées d'action, ont été observées [83].

Des résultats dignes d'intérêt ont été obtenus en remplaçant l'alanine ou la lysine par leur aza-analogue dans des inhibiteurs d'ECA, qui sont respectivement l'enalprilate et le lisinopril [84]. Des résultats particulièrement intéressants ont été obtenus aussi avec des aza-analogues de luliberine (LHRH) à partir desquels de puissants agonistes et antagonistes ont été préparés pour produire ou empêcher l'ovulation [85]. Par exemple, les agonistes analogues de LHRH, où le résidu azaglycine est introduit en position 6 et 10, sont beaucoup plus actifs que la luliberine elle-même. Une combinaison d' α -amino acide lipophile, 3-(2-naphthyl)-D-Alanine, en position 6, avec le résidu azaglycyle en position 10, a généré les agonistes les plus puissants connus à ce jour, 100 à 200 fois plus actifs que la LHRH (figure 2.13). Un produit de cette série, qui est l'aza-analogue [D-ser(tbu)⁶,AzGly¹⁰] LHRH a été introduit sur le marché pharmaceutique sous le nom du Zoladex, ICI118630, pour le traitement du cancer de prostate [86].

Peptide parent	Résidu incorporé	Activité ^b
LHRH ^a	AzaGly ¹⁰ -LHRH	++
	AzaGly ⁶ -	+
	AzaAla ⁶ -	++
	D-Ala ⁶ -azaGly ¹⁰ -	+++
	-3-(2-Napthyl) ⁶ -D-Ala-AzaGly ¹⁰ -D-Ser(tBu) ⁶ -AzaGly ¹⁰ -	+++

Figure 2.13: Incorporation de quelques résidus d'aza-amino- acides dans le LHRH.

a. LHRH: Gly¹-His²- Trp³-Ser⁴-Tyr⁵-Gly⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-Gly¹⁰-NH₂

b. Activité supérieure (+), nettement supérieure (++) , ou plusieurs fois supérieure (+++) à celle du produit parent.

L'azatide est un cas particulier des azapeptides et dont le C^α de chaque résidu est remplacé par un atome d'azote, ce n'est qu'en 1995 que Gante a synthétisé le premier azatide biologiquement actif qui est un inhibiteur de la rénine [87,88].

Le plus grand problème de la série des enképhalines est leur dégradation rapide dans le plasma du sang. Le remplacement d' α -amino acide par son aza-analogue dans certaines positions entraîne une augmentation d'activité et / ou de la sélectivité [89].

Le lien aza-peptidique confère une résistance à la dégradation par des enzymes protéolytiques. La liaison azapeptidique a été incorporée dans plusieurs inhibiteurs d'enzymes telque l'angiotensine de conversion d'enzyme [90], protéase de la cystéine [91,92] (figure 2.14), la leucocyte élastase humain [93], protéase du rhinovirus 3C [94]. Les aza-inhibiteurs du cathépsinne B et k [95] et du 1, 3-, 6-, 8-caspase [96] sont plus efficaces et plus sélectifs que les inhibiteurs parents.

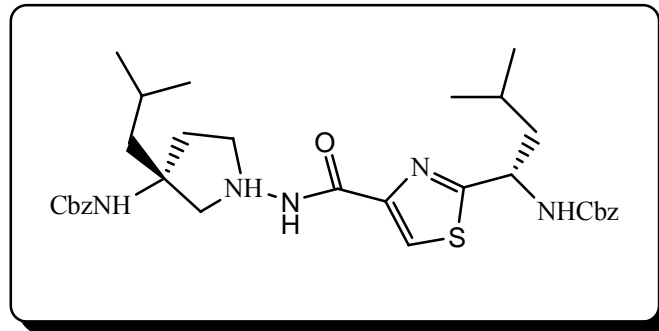


Figure 2.14: Diaminopyrrolidinone, inhibiteur de l'ostéoclaste cathepsine K.

L'aza-analogue du sécrétagogue (figure 2.15) hormone de croissance a été synthétisé et testé biologiquement. Il constitue un bon traitement pour la maladie de Turner et les brûlures, comme il peut réduire aussi certains effets liés à l'âge [97].

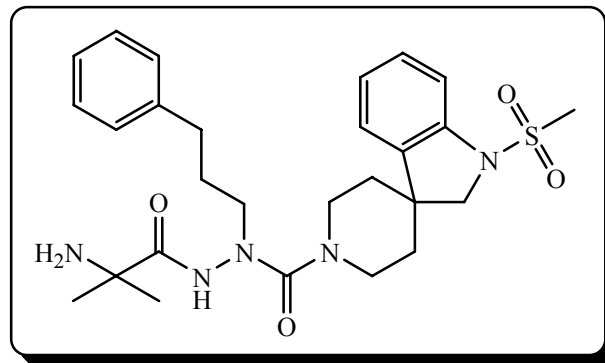


Figure 2.15: Structure chimique de l'aza-analogue de la sécrétagogue

La thrombine joue un rôle très important dans la thrombose qui est l'une des causes de la maladie cardiovasculaire. L'azaphénylalanine est incorporé dans la partie centrale de l'argatrobane, inhibiteur de la thrombine (figure 2.16). L'activité inhibitrice et la capacité anticoagulante de l'aza-inhibiteur sont plus élevées que celle de l'analogue-C. Certains de ces composés présentent une activité élevée ou à la limite égale à celle de l'argatrobane [98].

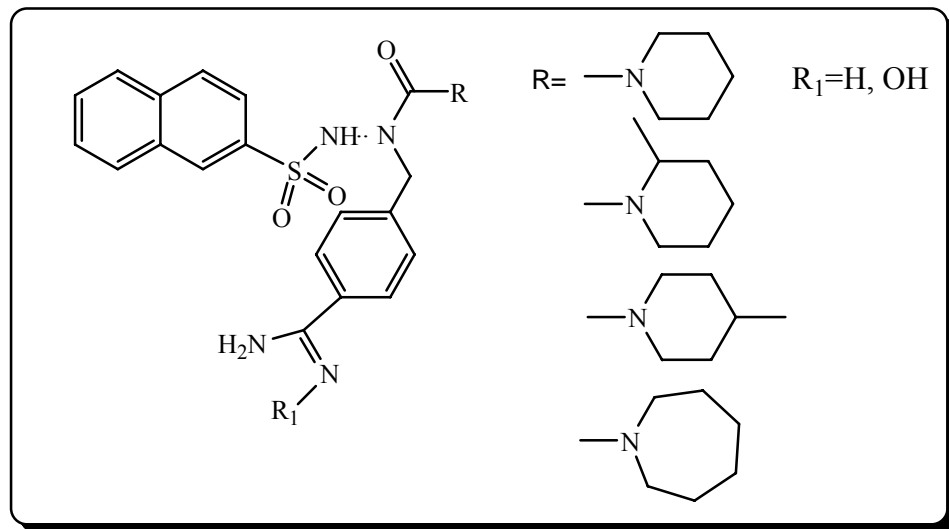


Figure 2.16: Structure de l'inhibiteur de la thrombine

De nombreux inhibiteurs de protéases ont été proposés pour le traitement de l'infection au HIV. Cependant en plus de leur faible activité, les programmes de traitement très durs, sont accompagnés par des complications sévères. Plus récemment, les tests cliniques de l'atazanavir qui est un nouveau azapeptide, ont montré que ce dernier constitue un inhibiteur sélectif du HIV-1: Il intervient dans le processus de reproduction du HIV et empêche la formation des virons infectés. Grâce à sa bonne biodisponibilité, le minimum d'effets secondaires est observé grâce à sa structure chimique unique (figure 2.17), l'atazanavir (Rayataz ®) est considéré comme le seul inhibiteur dans sa classe qui est administré sous forme d'une seule dose quotidiennement [99].

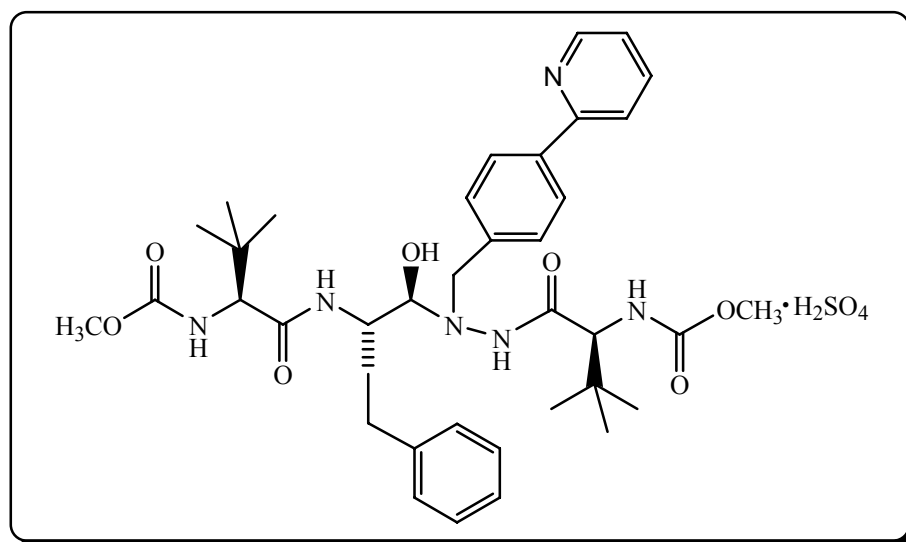


Figure 2.17: La structure chimique d'un atazanavir

2.2.3 Synthèse des azapeptides

La synthèse d'un aza-amino acide et son incorporation dans une chaîne peptidique est une combinaison de la chimie des peptides et des hydrazines [100-103]. La construction d'un azapeptide à partir des hydrazines et des hydrazides substitués se fait par l'introduction d'un groupement carbonyle entre deux atomes d'azote, tandis que l'allongement de la chaîne se fait par les méthodes classiques de la synthèse peptidique. Il existe plusieurs méthodes de synthèse d'aza-amino acides et de leur incorporation dans une séquence peptidique (figure 2.18). Cependant, le choix de la méthode à utiliser dépend de la nature et de la position de l'aza-amino acide à incorporer.

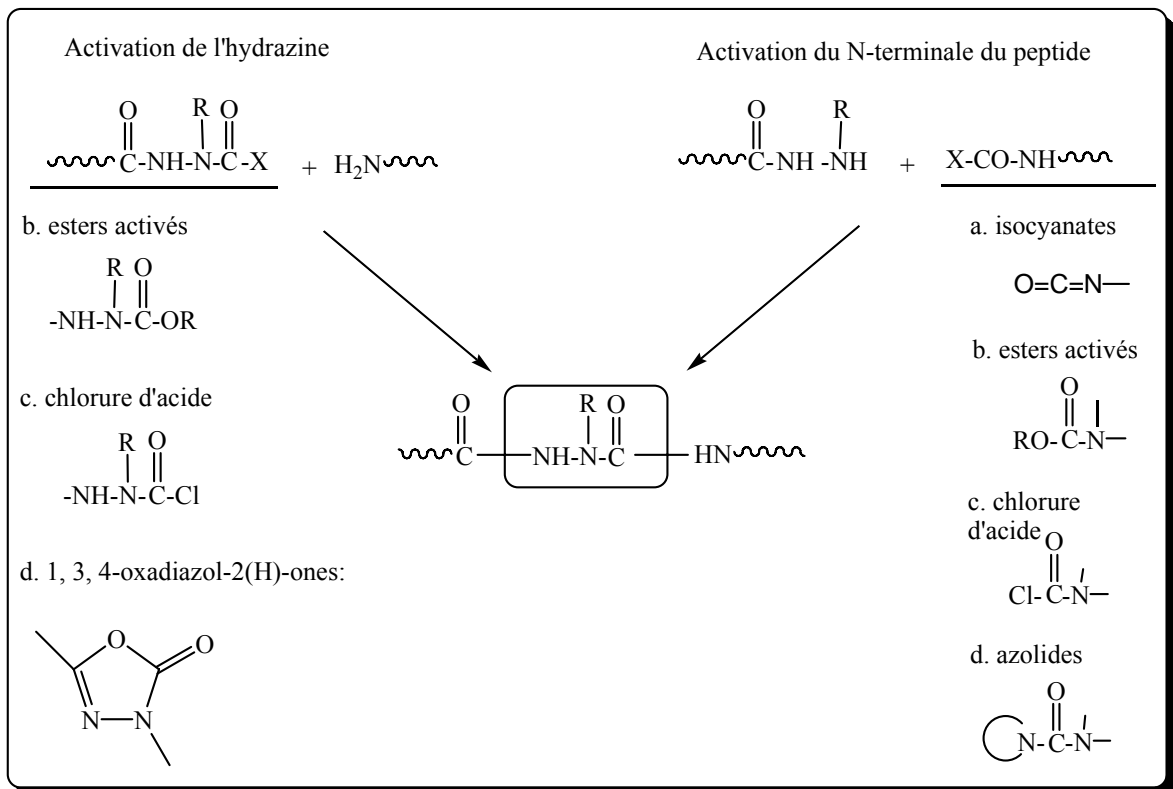


Figure 2.18: Principales méthodes de synthèse d'un azapeptide

2.2.3.1 Méthode de l'isocyanate

C'est le mode de synthèse le plus fréquemment utilisé. Elle consiste à faire réagir une hydrazine adéquatement protégée avec un isocyanate. Ce dernier est généralement obtenu par action du phosgène, ou du chloroformate d'aryle ou de carbonate sur l'extrémité N-terminal d'un fragment peptidique [100,104] (figure 2.19).

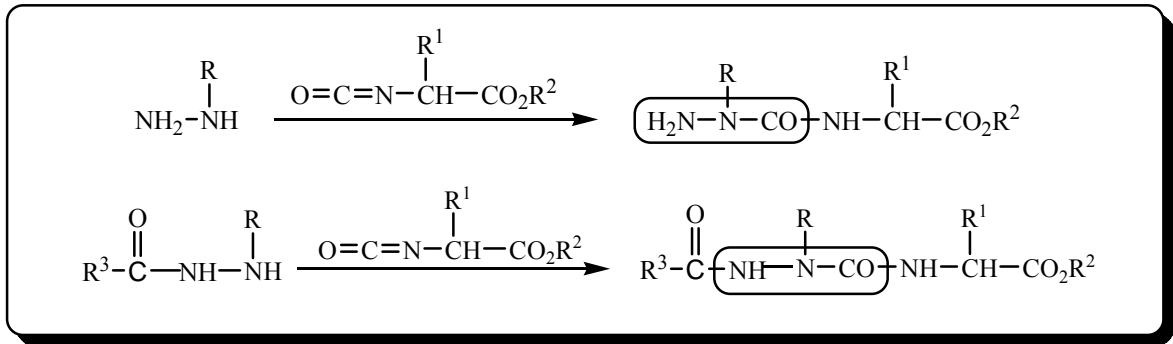


Figure 2.19: Schéma général de la méthode d'isocyanate

2.2.3.2 Méthode des esters actifs

L'utilisation des esters d'aryl actifs comme élément de base dans cette méthode a donné une certaine flexibilité synthétique [104 -107]. Il est possible par exemple de synthétiser non seulement n'importe quel analogue de peptide mixte, mais, de coupler directement n'importe quel nombre d'aza-amino acide et dans n'importe quel ordre, ce qui ouvre la voie devant la synthèse des azapeptides purs [100]. Ceci est rendu possible, car en plus de la C-Activation, on peut effectuer une N-activation qui n'est pas possible par la méthode d'isocyanate. Les esters N-Activés et C-activés sont obtenus par action d'un chlorocarbonate d'ester ou d'un diester carbonique sur un groupement amine libre de l'extrémité N-terminal et sur l'hydrazine, respectivement [100] (figure 2.20).

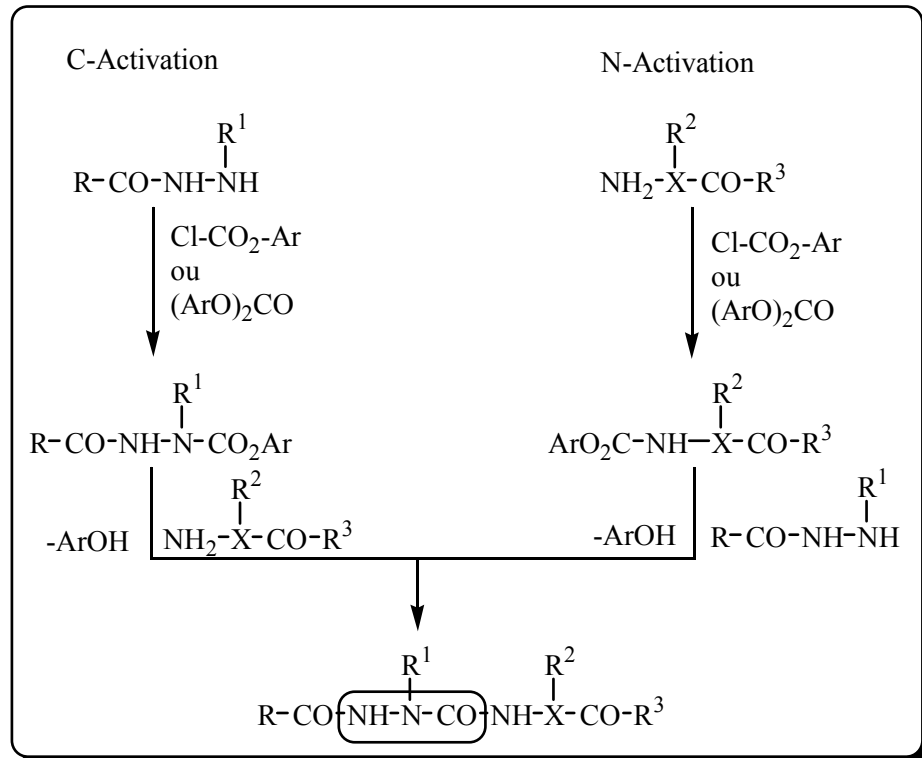


Figure 2.20: Synthèse d'un aza-amino acide et son incorporation selon la méthode des esters actifs

2.2.3.3 Méthode du chlorure d'acide

Dans cette méthode le Z-hydrazine réagit avec le phosgène pour donner le Chlorure du Z-azaglycine. Le couplage nécessite une température élevée et donne un mélange de polyazaglycine (figure 2.21). Le Z-azaleucine, par exemple est plus stable et donne seulement les dérivés azapeptidiques correspondants [100,108].



Figure 2.21: Incorporation de l'azaglycine dans la chaîne peptidique par la méthode au chlorure d'acide

2.2.3.4 Méthode de 1,3,4-Oxadiazol-2(3H)-one

Cette méthode consiste à faire réagir le 1, 3, 4-oxadiazol-2(3H)-one dont le substituant en position 5 peut être un alkyl, aryl ou un Z-amino-alkyle, avec plusieurs azadipeptides N-protégés, par une ouverture de cycle suivie d'une addition des tri- ou des tétrapeptides [100,105]. L'hétérocycle peut être obtenu par la réaction de l'hydrazide

correspondant avec le phosgène ou à partir de l'aza amino acide 4-nitrophénylester en milieu basique [100] (figure 2.22).

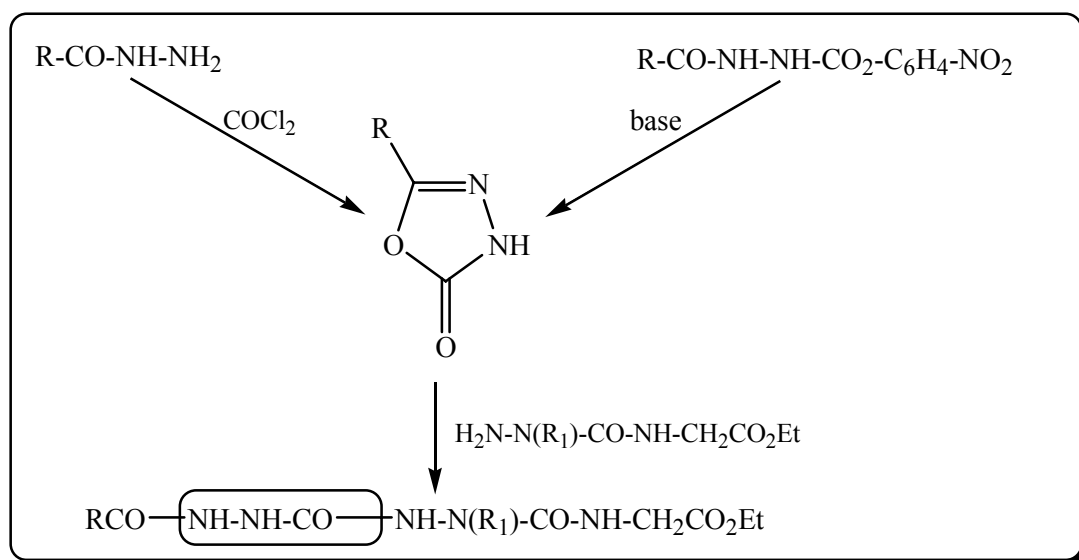


Figure 2.22: Incorporation d'un résidu aza-amino acide dans la chaîne peptidique par la méthode d'azolide

2.2.3.5 Méthode d'azolide

Cette méthode est basée sur la réaction d'un azolide (l'imidazolide ou le 1, 2, 4-triazolides) avec un hydrazide, pour donner l'imidazole ou le 1,2,4-triazole [100,109] (figure 2.23).

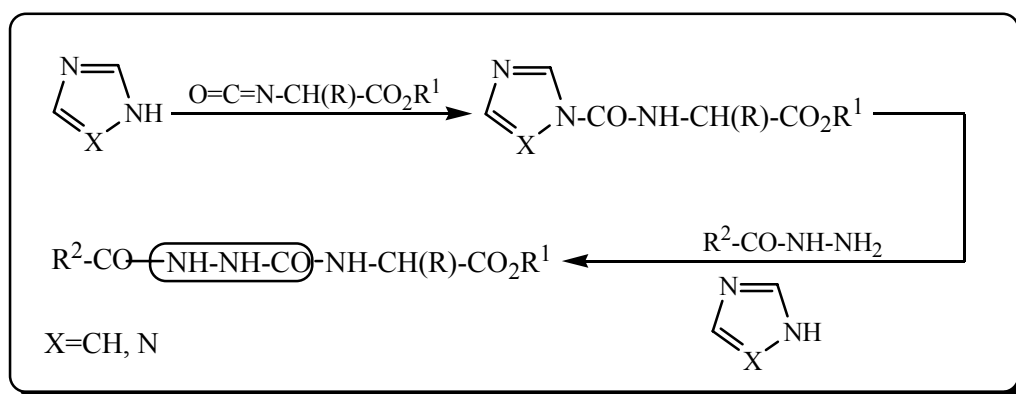


Figure 2.23: Synthèse d'un résidu aza-amino acide selon la méthode de 1,3,4-Oxadiazol-2(3H)-one

2.3 Exemples de synthèse de quelques azapeptides

Niedrich et ses collaborateurs [110] incorporèrent les aza-analogues de l'asparagine et de la glycine dans l'octapeptide oxytocine, ainsi que l'aza-alanine dans l'élédoisine [110], par acylation de l'hydrazino-acétamide ou de la méthylhydrazine, respectivement (figure 2.24).

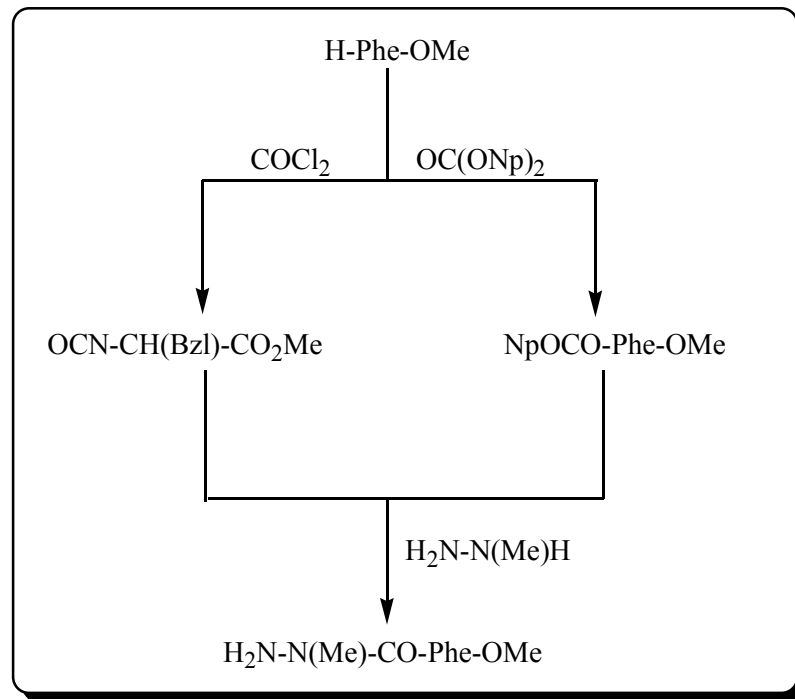


Figure 2.24: Incorporation du résidu azaalanyl dans [Ala6]-élédoisine selon Niedrich et Coll. [111]

Niedrich et coll. proposent différentes méthodes de synthèse, dont l'une est surtout utilisée pour l'incorporation de l'acide aza-aspartique sous forme de γ -esters, et de l'aza-asparagine à partir de l'hydrazinoacétamide [12] (figure 2.25).

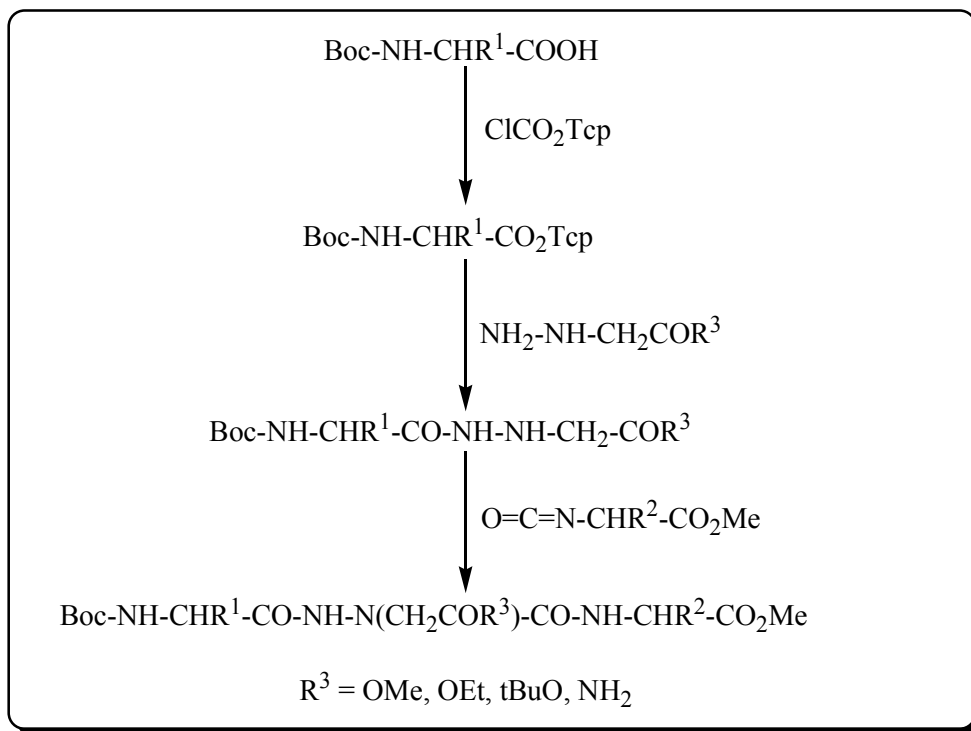


Figure 2.25: Incorporation des résidus aza-aspartyle ou aza-asparagyle selon Niedrich et coll. [111].

Enfin, Gante [112] et Niedrich [111] ont mis à profit la régiosélectivité des réactions d'acylation de la méthylhydrazine et de la benzylhydrazine avec les esters d'acides aminés N-activés (sous forme d'isocyanate ou de N-(4-nitro ou 2,4-dinitro-phényloxy-carbonyl) dans la préparation de peptides contenant des résidus AzaAla et AzaPhe (figure 2.26).

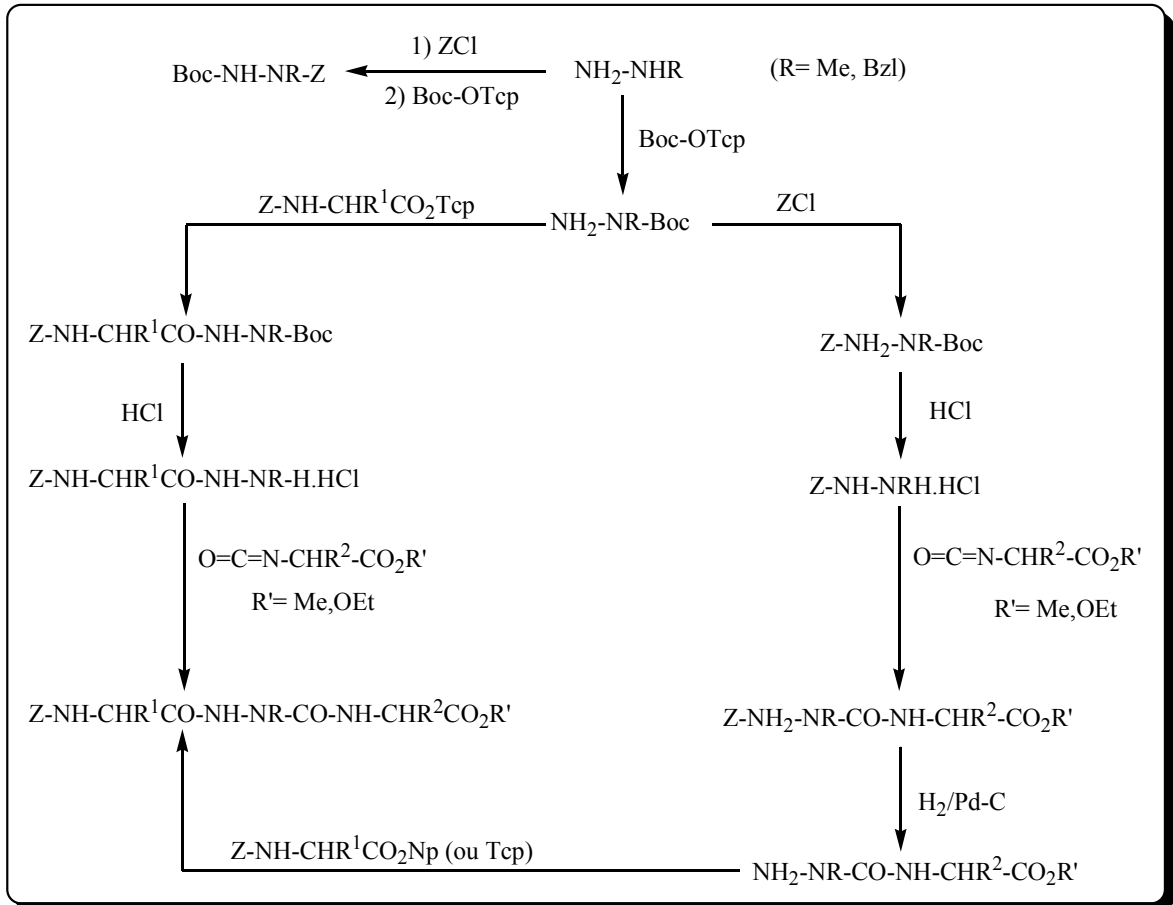


Figure 2.26: Synthèse d'un azapeptide à partir de la méthyl- ou benzyl-hydrazine d'après Gant et Niedrich [112]

Le synthon de base est le plus souvent une alkyldiazine N^β -protégé par un groupe uréthane. Il est donc nécessaire de disposer de procédés de protection régiosélective des hydrazides. De nombreux travaux [112], y compris ceux conduits au laboratoire de l'ENSIC [113], ont montré que l'acylation régiosélective des hydrazines dépend, à la fois, de la nature de la chaîne latérale R, et de la nature de l'agent acylant (figure 2.27). C'est généralement l'azote α qui est le plus réactif, sauf lorsque R est encombrant. De plus, un agent acylant de type ester activé comme Z-Osu oriente préférentiellement l'acylation en β [114].

	R = Me	H ₂ N ^β -N ^α H-R	R=CH ₂ CO ₂ Et	
ZCl	→	H ₂ N ^β -N ^α (Z)-R + H-N ^β (Z)-N ^α H-R + H-N ^β (Z)-N ^α (Z)-R		
		68%	20%	10%
Z-OSu	→	70%	5%	—
Z ₂ O	→	75%	15%	—
		H ₂ N ^β -N ^α (Z)-R' + H-(Z)N ^β -N ^α H-R' + HZN ^β -N ^α (Z)-R'		
		60%	25%	10%
		10%	83%	—
		80%	10%	5%

Figure 2.27: Rendement régiosélectif de la N-protection par le groupe Z des azotes de la méthylhydrazine (R=Me) et de l'hydrazinoacétate d'éthyle (R= CH₂CO₂Et)

André et coll ont utilisé le triphosgène comme agent de chlorocarbonylation de la fonction amine (NH)^β dans la synthèse d'un azapeptide aza-analogue MIR=Trp-Asn-Pro-Ala-Asp-Tyr-Gly-Gly-Ile-Lys, récepteur de l'acétylcholine et responsable de la réponse auto immune de la maladie de myasthénie [114].

Les différents exemples de synthèse donnés précédemment nous permettent de résumer la synthèse d'un azapeptide en trois étapes:

- (i) Une protection- N^β régiosélective d'un hydrazine N^α-substitués.
- (ii) Carbonylation –activation et couplage de ce dernier à un peptide N-terminal.
- (iii) Elongation de l'hydrazine de l'extrémité N-terminale.

La protection-N^β doit être sous forme de carbamate pour éviter la formation du 1, 3, 4-oxadiazol-2(3H)-one connu pour être beaucoup moins réactif que les azalactones rencontrés dans la synthèse classique des peptides [100].

Le Bis(trichloromethyl) carbonate est un dérivé solide stable, il joue un rôle très important comme agent de chloroformylation, carbonylation, chloration et de déshydratation, comme il peut transformer les amines primaires en isocyanate [115,116]. Il correspond à

trois molécules de phosgène d'où son nom de triphosgène. Avec le précurseur hydrazine N^{α} -substitué N^{β} -protégé de résidu AzaAla ou AzaAsx, le triphosgène réagit à -10°C pour donner le chlorure d'acide carbazique correspondant qui n'est pas isolable et doit être utilisé in situ. Il réagit rapidement à basse température (-10°C) avec une amine pour donner un carbazamide protégé en N^{β} ou avec la fonction amine libre d'un amino acide protégé pour donner un aza-dipeptide.

Dans le but d'améliorer les propriétés biologiques de la cystéine protéase, le résidu glycine de la partie N-terminal de l'enzyme a été remplacé par son analogue azaglycine [93]. Ce dernier a été synthétisé et incorporé dans la chaîne désirée par l'addition du Boc-NH-NH₂ à l'extrémité N-terminale libre du peptide désiré, avec le DCCI comme agent de couplage (figure 2.28). L'utilisation de ce dernier a donné un rendement plus élevé et une grande pureté comparé au bis-(2,4-dinitrophenyl)carbonate. Le Boc-NH-NH₂ a servi aussi comme synthon de base dans la synthèse d'aza-analogues d'amino acides non naturels comme l'acide azapipecolique [79].

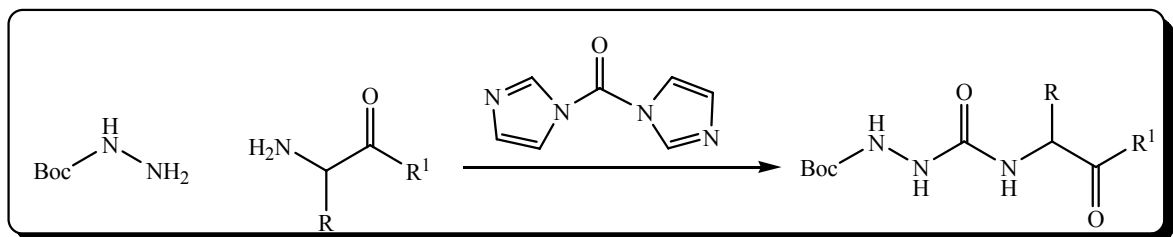


Figure 2.28: Synthèse et incorporation du résidu azaglycyl dans la protéase de la cystéine

De nombreux azapeptidomimétiques contenant le cycle lactame comme contrainte stérique ont été préparés par cyclisation du Mitsunobu (figure 2.29) à partir des dérivés de la sérine-aza-alanine [117,118]. Cette méthode inclue la synthèse des β -lactames, ainsi que les analogues de butyrolactame et du D-valérolactame, avec de très bons rendements.

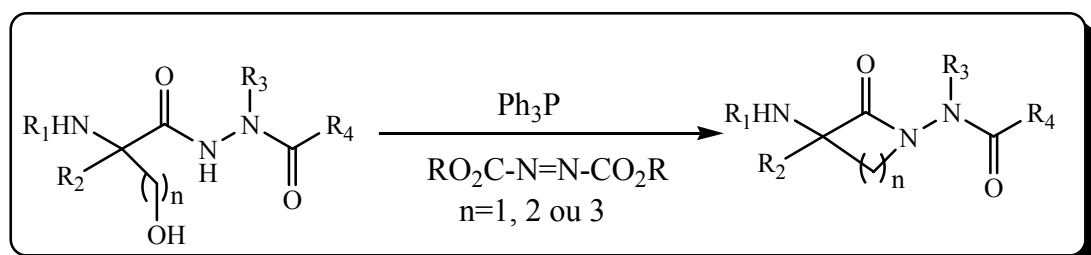


Figure 2.29: Schéma général pour la synthèse des lactames azapeptidomimétiques

La synthèse d'un azatide [119,120], dont tous les résidus sont des aza-amino acides, peut être effectuée selon deux méthodes ; la première (figure 2.30) est basée sur la réduction du Boc-hydrazone, résultant de la réaction du Boc-carbazate avec un aldéhyde ou une cétone (Eq. 2.1). La deuxième méthode porte sur l'alkylation d'hydrazine avec un halogénure d'alkyl. L'alkyl hydrazine ainsi obtenu est protégé ensuite par le groupement Boc (Eq. 2.2).

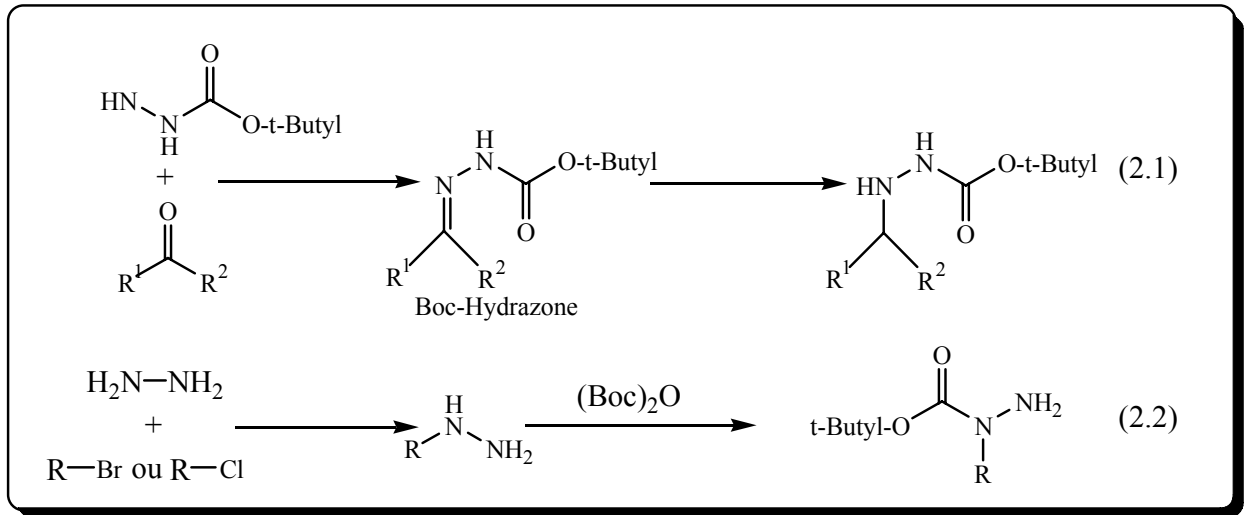


Figure 2.30: Préparation du monomère Boc-Alkylhydrazine

Pour convertir les Boc-aza-amino acides en agents d'acylation et permettre l'allongement de la chaîne, la partie hydrazine de la molécule doit être activée (figure 2.31). L'activation de cette partie est un problème du fait que les Boc-alkylhydrazines sont des nucléophiles faibles, plus faibles qu'une amine simple ou un amino acide. Par conséquent, un synthon fortement activé est exigé pour faciliter le couplage entre deux Boc-aza-amino acides et former le lien azatide.

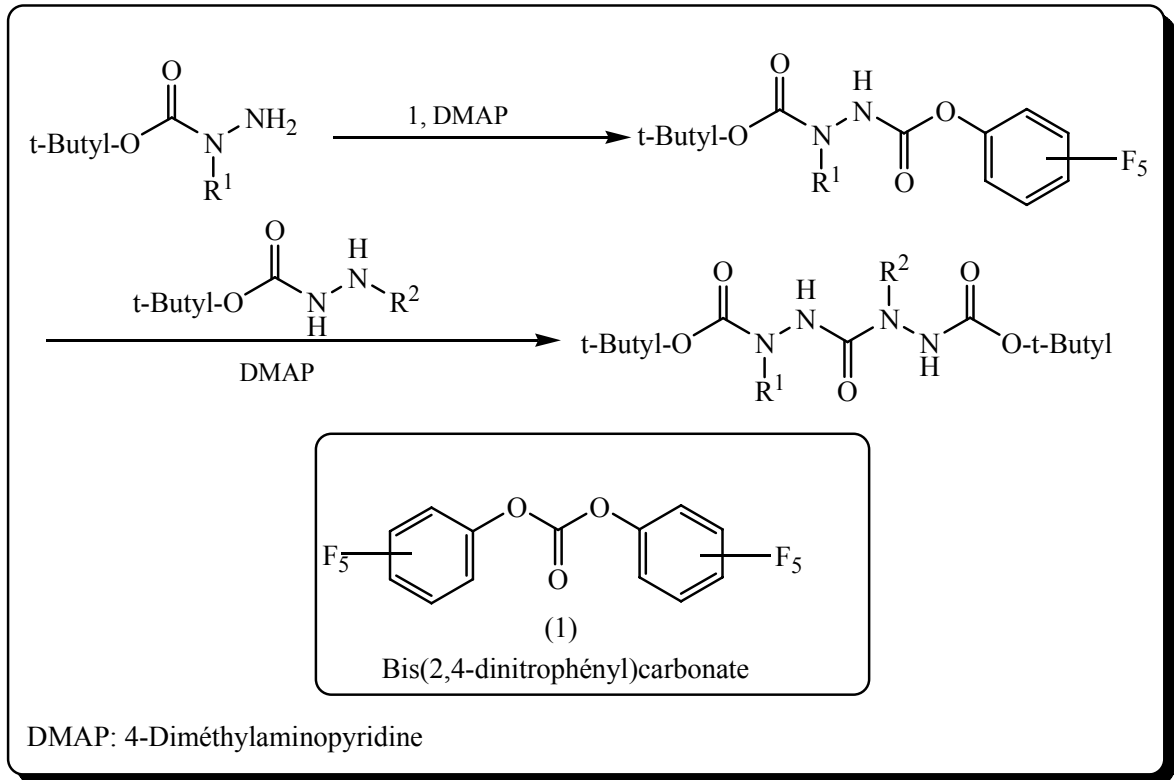


Figure 2.31: Schéma général pour la synthèse d'un diazotide en solution

L'emploi du chloroformate du p-nitrophényl, carbonyldiimidazol, bis (2,4-nitrophényl) carbonate ou le trichlorométhyl chloroformate pour l'association de deux aza-amino acides souffre de plusieurs problèmes: des réactions secondaires, des rendements faibles et un temps de réaction prolongé. Ces problèmes sont dus au fait que le p-nitrophénol et l'imidazole sont de mauvais groupements partants ainsi qu'à la gêne stérique du groupement O-nitro dans le cas de bis (2,4-dinitrophényl) carbonate. Pour éviter ces problèmes, le bis (pentafluorophényl) carbonate (1) a été utilisé comme agent d'activation.

La synthèse d'un diazotide en phase liquide, consiste à activer d'abord le carbazate de départ, ensuite le Boc-aza-amino acide est ajouté goutte à goutte. Le complexe activé ainsi formé, réagit immédiatement avec un deuxième Boc-alkylhydrazine pour donner le diazotide (figure 2.31). Cette procédure de couplage donne un bon rendement en diazotide, peu de réactions secondaires et un temps de réaction acceptable.

CHAPITRE 3

PARTIE EXPERIMENTALE

Les produits de départ et les réactifs sont de source Aldrich et Fluka. Ils ont été utilisés tels quels. Les solvants utilisés dans les étapes de synthèse ont été distillés et séchés sur MgSO_4 .

L'avancement de la réaction a été suivi par chromatographie sur couche mince (CCM), à l'aide de plaques d'aluminium revêtues de gel de silice 60 F₂₅₄ en tant que phase stationnaire (Merck, 5735), et en utilisant des éluants appropriés comme phase mobile. Les purifications ont été réalisées par précipitation, cristallisation, et par chromatographie par gravité à pression atmosphérique et sur colonne de silice (63-200 μm). La pureté des composés a été contrôlée par l'obtention d'une seule tache en CCM pour au moins deux éluants différents, et confirmée par l'examen et l'interprétation des spectres FTIR, RMN-¹H à 300 MHz dans le CDCl_3 avec le TMS comme référence interne.

3.1 Techniques et méthodes d'analyse

3.1.1 Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption. L'échantillon est mis en suspension dans un solvant très volatile qui est le chloroforme dans notre cas, la solution obtenue est déposée à l'aide d'un capillaire et perpendiculairement en un point de la plaque situé à 1cm de la partie inférieure et le diamètre de la tache doit être le plus faible possible pour avoir une bonne séparation (figure 3.1). Pour augmenter la quantité on a effectué plusieurs dépôts au même point en séchant rapidement entre chaque dépôt. Le développement de la plaque a été effectué verticalement dans une cuve conçue pour la CCM et contenant une quantité de la phase mobile dont la hauteur ne doit pas dépasser le dépôt du produit sur la plaque. Les différents composés sont entraînés par la phase mobile et par capillarité vers le haut de la plaque à différentes vitesses. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques

retenant le composé sur la phase stationnaire, et d'autre part de sa solubilité dans la phase mobile qui le porte sur la plaque.

❖ Révélation

Pour la visualisation des différents produits nous avons utilisé une lampe UV, car les produits obtenus après cristallisation ou même avant purification c-à-d dans le suivi des différentes réactions sont invisibles sur les plaques, en plus de la fluorescence des plaques que nous avons utilisées et qui sont de type Silica gel F₂₅₄. Sous la lampe UV toute la plaque est de couleur verte brillante sauf les taches des produits qui sont de couleur rose.

❖ Calcul de R_f

Pour calculer le Facteur de rétention R_f qui reste constant pour les mêmes conditions, on mesure d'abord la distance d_{solv}, parcourue par le front du solvant. On détermine ensuite les distances, d_{sub} parcourues par chaque substance durant le développement. La mesure est effectuée à partir du centre de la tache, le R_f est donné par le rapport suivant:

$$R_f = \frac{d_{sub}}{d_{solv}}$$

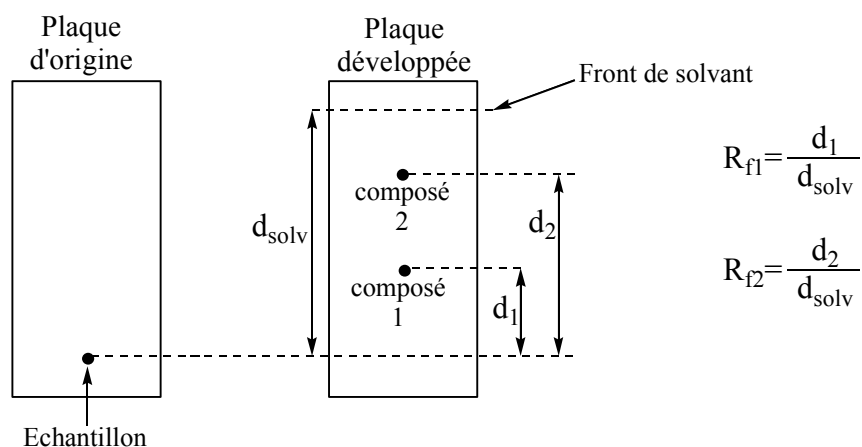


Figure 3.1: Exemple de calcul de R_f

3.1.2 Chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne est une technique de purification et de séparation fondée principalement sur des phénomènes d'adsorption; elle s'apparente étroitement à la chromatographie sur couche mince. La phase solide que nous avons utilisée est le gel de

silice 60 F₂₅₄ tandis que la phase mobile est déduite à partir de la CCM effectuée pour chaque réaction.

❖ Remplissage de la colonne

Pour avoir le remplissage le plus homogène possible et sans bulle d'air nous avons choisi de remplir la burette par voie humide. Cette méthode consiste à préparer d'abord un mélange homogène du gel de silice 60 F₂₅₄ avec le solvant le moins polaire de l'éluant, en ajoutant par petite quantité la silice dans le solvant jusqu'à l'obtention d'une bouillie suffisamment fluide coulant facilement dans la colonne. On a utilisé 40g de silicagel 60 pour 1g de produit à purifier ou à séparer.

Lorsque l'échantillon en solution concentrée est déposé au sommet de la colonne (figure 3.2), il est aussitôt adsorbé en une zone cylindrique de faible épaisseur. L'écoulement continu de l'éluant dans la colonne provoque alternativement la désorption et l'adsorption des molécules de l'échantillon. Les molécules sont entraînées vers le bas à des vitesses variables selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans l'éluant, le chromatogramme se développe en formant une succession de zones cylindriques qui se séparent en migrant vers le bas.

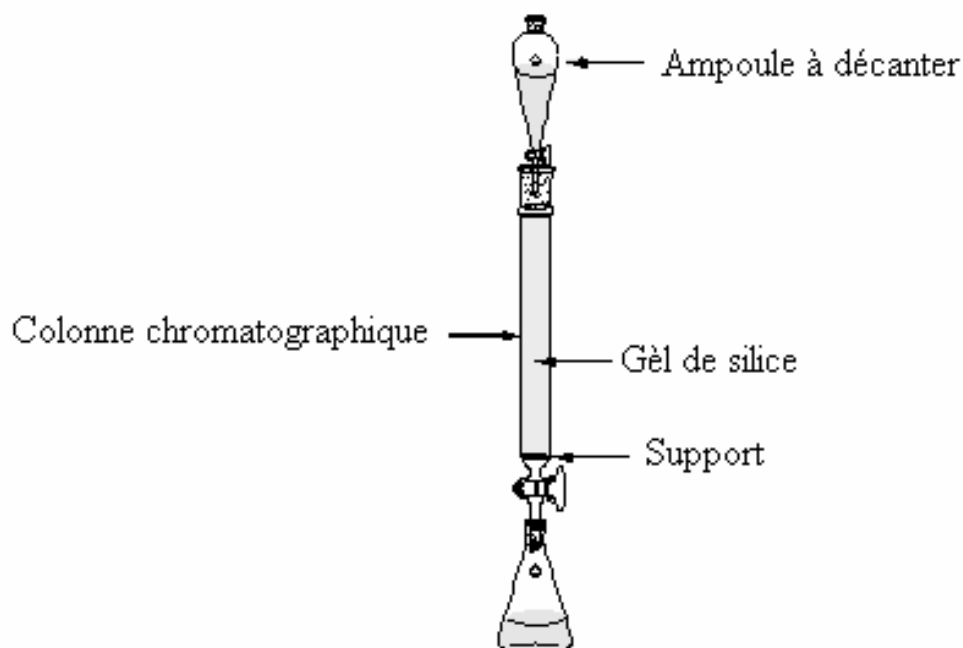


Figure 3.2 : Appareillage pour chromatographie sur colonne

3.2 Synthèse d'un aza-dipeptide

La synthèse d'un azapeptide est une combinaison entre la synthèse classique des peptides et la chimie des hydrazines. L'étape déterminante dans la synthèse classique des peptides est la condensation de deux amino acides avec libération d'une molécule d'eau. Pour éviter une condensation aléatoire ou une autocondensation il faut veiller à protéger les fonctions qui ne doivent pas réagir et activer les fonctions acides carboxyliques.

3.2.1 Groupements protecteurs

Les groupements protecteurs de type uréthane comme les groupements Boc, CBz (Z) et Fmoc sont considérés comme les meilleurs groupements protecteurs de la fonction amine dans la synthèse peptidique. Ils protègent non seulement des réactions secondaires mais de la racémisation aussi. Il faut noter également qu'ils résistent aux conditions sévères des différentes étapes de la synthèse. Nous avons choisi d'utiliser les groupements Boc et Z (figure 3.3) dans notre synthèse. L'un résiste aux conditions de clivage de l'autre. Le groupement tertibutyloxycarbonyl est clivable en milieu acide, alors que la déprotection de benzyloxycarbonyl est effectuée par hydrogénolyse.

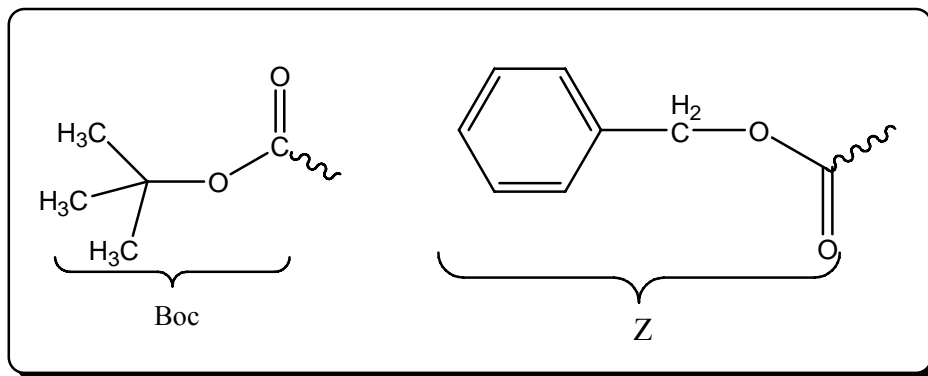


Figure 3.3: Les groupements protecteurs Boc et Z

3.2.2 La méthode de couplage

La réaction de condensation est effectuée suivant la méthode de l'anhydride mixte en utilisant le triphosgène (figure 3.4) qui est un solide stable comme agent d'activation de l'acide aminé C-terminal. L'anhydride mixte obtenu réagit in-situ en présence d'une base tertiaire avec l'acide aminé N-terminal pour donner l'azapeptide désiré.

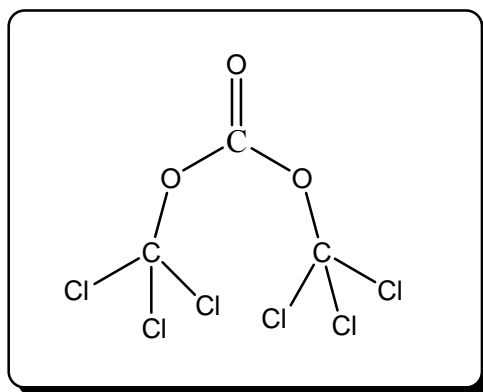


Figure 3.4: Formule chimique développée du triphosgène

3.2.3 Synthèse du Boc-NH-NH-Z

Dans un ballon de 100 ml, on introduit successivement 20 mM (2.64g) de Boc NH-NH₂ dissous dans 15 mL de THF anhydre et 20 mM de (2.2 mL) de NMM. Le mélange est refroidi à 0°C sous agitation pendant 30 mn. On ajoute alors lentement 20 mM (2.86 mL) de chlorocarbonate de benzyle ZCl à la solution précédente. Après 2 heures d'agitation à 0 °C et une nuit à température ambiante, on se débarrasse du sel formé (HCl.NMM) par filtration sur bûchner, sous pression réduite et on évapore à sec le filtrat. L'huile brute obtenue est selon le cas, soit chromatographiée sur colonne avec comme éluant un mélange THF/Hx, soit directement cristallisé dans ce milieu. Les cristaux de 1-benzyloxycarbonyl-2-terbutyloxycarbonylhydrazine (figure 3.5) blancs obtenus sont séchés puis pesés.

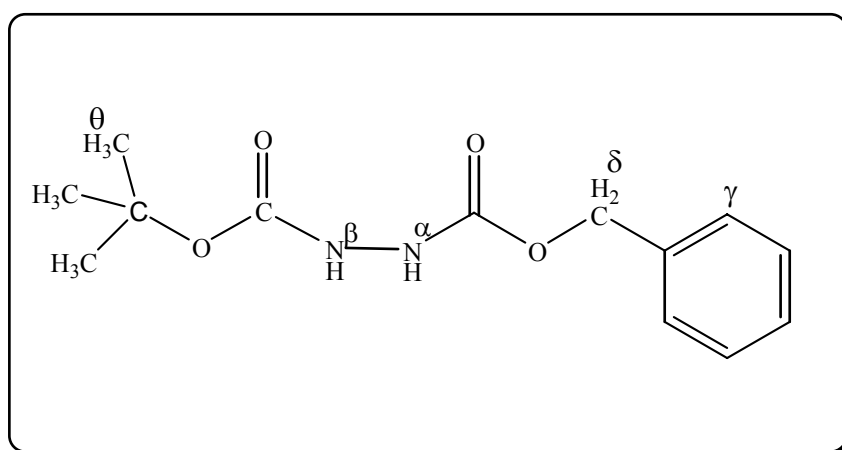


Figure 3.5: Formule chimique développée du Boc-NH-NH-Z

M = 266 g/mol

Rendement = 86%

T_f = 81-82°C

R_f=0.6 (AcOEt), 70/30); 0.8 (DCM/iPrOH, 95/5); 0.8 (AcOEt/iPrOH, 95/5)

RMN-¹H (CDCl₃):

δ(ppm): 1,41 (9H, θ,s); 6,45 (1H, β/α, s); 6,69 (1H, β, s); 5,2 (2H, δ, s); 7,3 (5H, γ, m)

Les résultats de l'analyse élémentaire sous forme de pourcentages massiques du composé Boc-NH-NH-Z sont regroupés dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Pourcentages massiques obtenus par analyse élémentaire du Boc-NH-NH-Z

C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₄	C	H	N
Pourcentages expérimentaux	57.95	6.42	9.21

3.2.4 Synthèse du Boc-AzaPro-OBzl

3.2.4.1 Lavage de NaH

Dans un ballon de 100 mL une dispersion de NaH 4 mM (0.22 g) à 60 % dans de la paraffine est mise en suspension dans 10 mL d'éther de pétrole anhydre; après 10 mn sous forte agitation le NaH est récupéré par filtration sous vide puis relavé une deuxième fois pour éliminer toute trace de l'huile de paraffine, le NaH ainsi obtenu est utilisé directement dans l'étape suivante.

3.2.4.2 Formation du cycle pyrazolidine

Dans un tricol de 250 ml, 4 mM (0.132 g) de NaH sont mises en suspension dans 6 mL de DMF anhydre, pendant 30 mn et sous atmosphère d'azote avec agitation à température ambiante. On ajoute alors lentement 20 mM (0.532 g) de Boc-NH-NH-Z dissous dans 2 mL de DMF et on maintient le mélange sous atmosphère d'azote et sous agitation pendant 60 mn avant d'ajouter goutte à goutte 2 mM (0.21mL) de 1.3-dibromopropane dilué dans 2 mL de DMF. Après une nuit sous agitation, le mélange réactionnel, débarrassé de son solvant est repris par 50 mL d'acétate d'éthyle, puis lavé successivement par 10 mL d'eau (2 fois), 10 mL d'acide citrique à 5% (2 fois), 10 mL de NaHCO₃ 10 mL d'eau (2 fois) et 10 mL d'une solution saturée de chlorure de sodium NaCl (2 fois). Après une nuit de séchage sur Na₂SO₄, l'huile obtenue, (5,4 g) est purifiée par chromatographie sur colonne avec comme éluant AcOEt/EP, (70/30 %), puis cristallisé

dans un mélange THF/Hx. Le solide blanc, le 1-benzyloxycarbonyl-2-tertio-butylcarbonyl-pyrazolidine (figure 3.6), sous forme d'aiguilles ou de paillettes, est séché puis pesé.

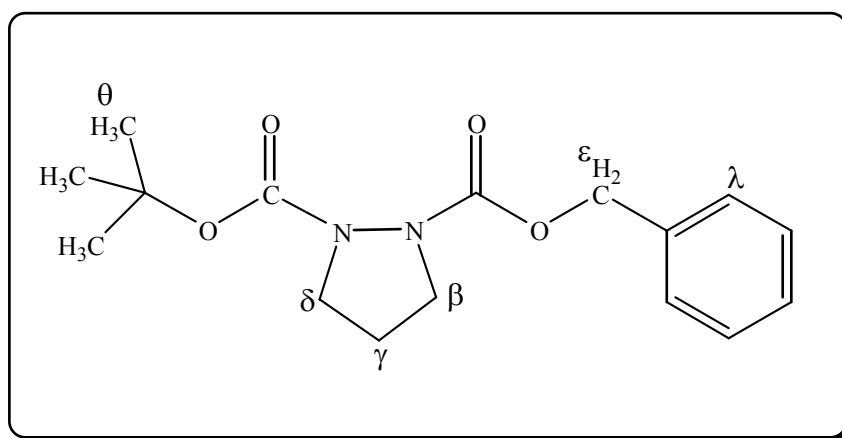


Figure 3.6: Formule chimique développée du Boc-AzaPro-OBzl

$M=306$ g/mol

Rd= 48%

$T_f= 41^\circ\text{C}$

$R_f= 0.5$ (AcOEt, 70/30); 08 (AcOEt/iPrOH, 95/5); 0.8 (DCM/iPrOH, 95/5).

RMN- ^1H (CDCl_3):

δ (ppm): 1,39 (9H, θ , s); 2.13 (2H, γ , m); 3.27 (2H, $\delta'+\beta'/\beta'+\delta'$, m); 3.93 (2H, $\delta+\beta/\beta+\delta$, m); 5,2 (2H, ϵ , s); 7,34 (5H, λ , m).

La composition en carbone, hydrogène et en azote de la formule brute du Boc-AzaPro-OBzl a été déterminée par analyse élémentaire et les résultats sont donnés dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2 : Pourcentages massiques obtenus par analyse élémentaire du Boc-AzaPro-OBzl

$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$	C	H	N
Pourcentages expérimentaux	61.62	7.29	7.91

3.2.5 Synthèse du HCl.AzaPro-OBzl

3.2.5.1 Préparation d'une solution d'acétate d'éthyle contenant HCl (3N)

Dans un bicol de 125 mL, on introduit 20 mL d'acétate d'éthyle anhydre dans lequel on fait arriver un courant gazeux d' HCl sec pendant 20 mn environ. Le titre de la solution est déterminé par pesée, avant et après la dissolution du gaz. La solution fraîchement préparée est utilisée dans l'étape suivante.

3.2.5.2 Elimination du Boc

A 3,5 mM (1,071g) du composé N-protégé par Boc, on ajoute, à raison d'une mM par mL de la solution précédente, 3,5 mL. Après 45 mn sous forte agitation à température ambiante, on chasse le solvant au moyen d'un évaporateur rotatif. Le résidu solide obtenu (chlorhydrate) est repris en solution par quelques millilitres d'eau avant lyophilisation. Le chlorhydrate obtenu (figure 3.7) est cristallisé dans un mélange EtOH/Et₂O. Le solide Blanc cristallin est séché puis pesé.

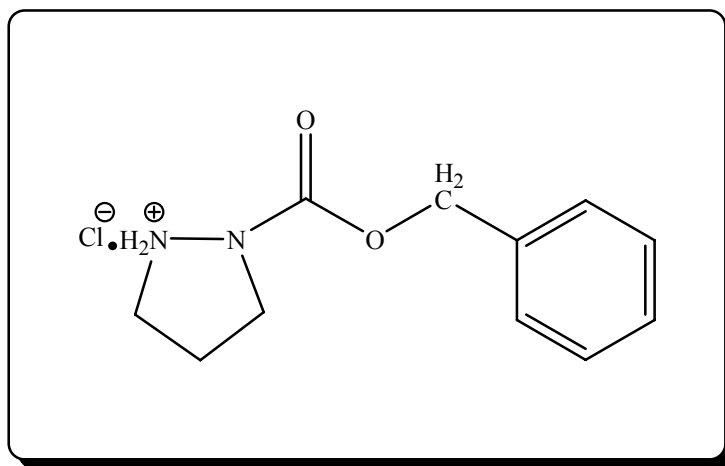


Figure 3.7: Formule chimique développée du chlorhydrate d'azaproline
HCl.AzaPro-OBzl

M =242.5 g/mol

Rd =96%.

T_f=158-164 °C

R_f = 0.45 (EtOH/Et₂O, 70/30); 0.61 (EtOH/ THF, 50/50);
0.76 (MeOH/Acétonitrile, 70/30).

Les résultats de l'analyse élémentaire du chlorhydrate de l'azaproline protégée en position N^α, sont sur le tableau 3.3.

Tableau 3.3 : Pourcentages massiques obtenus par analyse élémentaire du chlorhydrate de l'AzaPro-OBzl

C ₁₁ H ₁₅ N ₂ O ₂ Cl	C	H	N
Pourcentages expérimentaux	52.46	6.16	11.86

3.2.6 Synthèse du Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl

1.2 mM (0.32 g) du dérivé N-protégé à extrémité carboxylique libre Boc-L-Phe-OH et 1.2 mM (0.13 mL) de TEA en solution dans 5 mL de THF anhydre, sont agitées et refroidies à -15°C avec un mélange réfrigérant de (NaCl/Glace pilé, 50/50) pendant 15 mn. On additionne alors lentement 0.4 mM (0.36 g) de triphosgène, après trente minutes toujours sous agitation et à -15 °C. On ajoute lentement goutte à goutte 2 x 1.2 mM (0.26 mL) de NMM et immédiatement après, 1.2 mM (0.29g) de HCl.AzaPro-OBzl par portion. On laisse encore une heure à -15 °C avant de revenir à température ambiante et de poursuivre l'agitation pendant 6 h. Après filtration du sel formé sous pression réduite et évaporation à sec du filtrat, on obtient une huile incolore qu'on cristallise dans l'acétate d'éthyle. La formule chimique développée du Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl est donnée sur la figure 3.8.

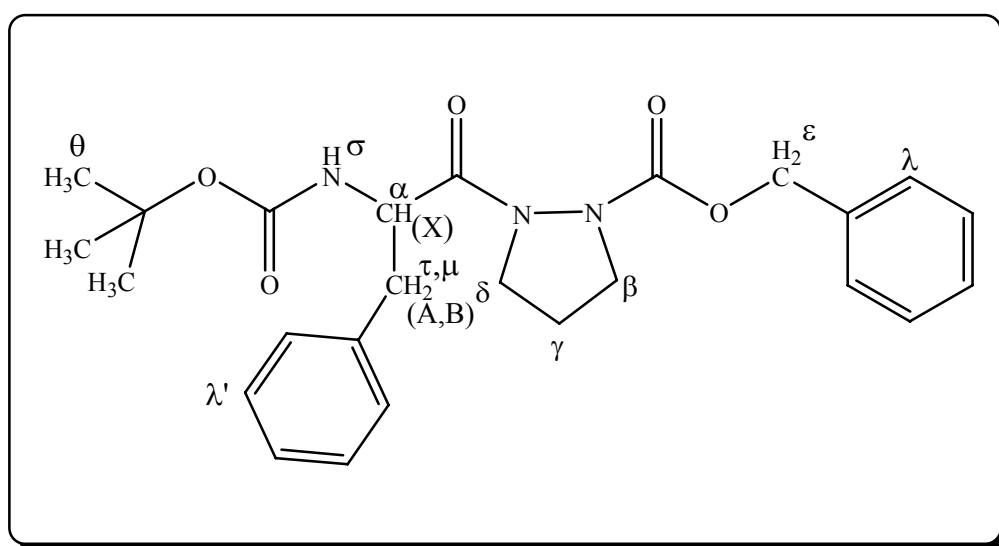


Figure 3.8: Formule chimique développée du Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl

$M = 354 \text{ g/mol}$

Rendement: 60-70%

$T_f = 80 \text{ }^\circ\text{C}$.

$R_f = 0.55$ (THF/Hx, 50/50); 0.6 (AcOEt/EP, 70/30); 0.72 (DCM/iPrOH, 90/10);

0.76 (AcOEt/iPrOH, 80/20).

RMN- ^1H (CDCl_3):

δ (ppm): 1.30 (9H, θ , s); 1.84 (2H, γ , m); 3.00 (4H, 2H ($\delta' + \beta' / \beta' + \delta'$)+2H (τ et μ)
 $\underline{\text{ABX}}$, m); 3.84 et 4.35 (2H, $\beta + \delta / \delta + \beta$, d); 4.86, 5.0, 5.2 (4H, 1H α ($\underline{\text{ABX}}$),
 1H σ (NH), 2H ϵ , m); 7.23 (10H, $\lambda + \lambda'$, m).

La composition en carbone, hydrogène et en azote de la formule brute du l'aza-dipeptide Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl a été déterminée par analyse élémentaire. Les résultats sont donnés dans le tableau 3.4.

Tableau 3.4 : Pourcentages massiques obtenus par analyse élémentaire du Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl.

$\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_5$	C	H	N
Pourcentages expérimentaux	66.91	7.26	9.56

3.2.7 Les différentes techniques de caractérisation

Les composés synthétisés au cours de ce travail ont été caractérisés par les techniques suivantes:

❖ Point de fusion et analyse élémentaire

La détermination des points de fusion qui est une constante physique caractéristique de chaque produit solide a été réalisée à l'aide d'un appareil de type STUART SCIENTIFIC SMP3.

❖ Analyse élémentaire

Tous les produits synthétisés ont été caractérisés par analyse élémentaire. L'appareil utilisé est de type LECO CHN-900 menué d'un détecteur infrarouge. Elle est

basée sur la combustion de l'échantillon à analyser. Après la combustion du composé synthétisé, les gaz obtenus passent à travers une cellule infrarouge entre deux fenêtres de CaF_2 où ils vont être détectés.

❖ Spectroscopie UV-Vis.

L'analyse par la spectrophotométrie d'absorption électronique UV dans la gamme 200 à 400 nm a été effectuée en solution dans l'éthanol, dans des cellules en quartz de trajet optique 1cm, l'appareil utilisé est de marque VARIAN, de type Cary Win UV (scan application).

❖ Spectroscopie infrarouge

Les spectres d'absorption du rayonnement infrarouge (IR) sont enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre à transformée de Fourier de type GENISIS II menu du logiciel « WinFirst » dans la gamme de 400 à 4000 cm^{-1} , sur des pastilles où l'échantillon solide (1mg) est dispersé dans du KBr (250 mg). La résolution employée est de 4 cm^{-1} .

❖ Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton ont été enregistrés sur un spectromètre BRUKER 300 MHz dans le CDCl_3 .

CHAPITRE 4 RESULTATS ET DISCUSSION

La synthèse des azapeptides est conditionnée par deux aspects, l'un est lié à la synthèse peptidique classique, à savoir l'utilisation et le choix des groupes N et C-terminaux en fonction des conditions choisies pour construire la chaîne peptidique. L'autre consiste à introduire l'aza-résidu dans une chaîne en cours de construction par des procédés compatibles avec les principes fondamentaux de la synthèse peptidique. En particulier, la synthèse peptidique doit être conduite selon le mode récurrent, en accrochant les résidus un à un à partir de l'extrémité carboxylique, de façon à minimiser les risques d'énantiomérisation du carbone α . L'objectif de notre travail est résumé sur le schéma réactionnel de la figure 4.1.

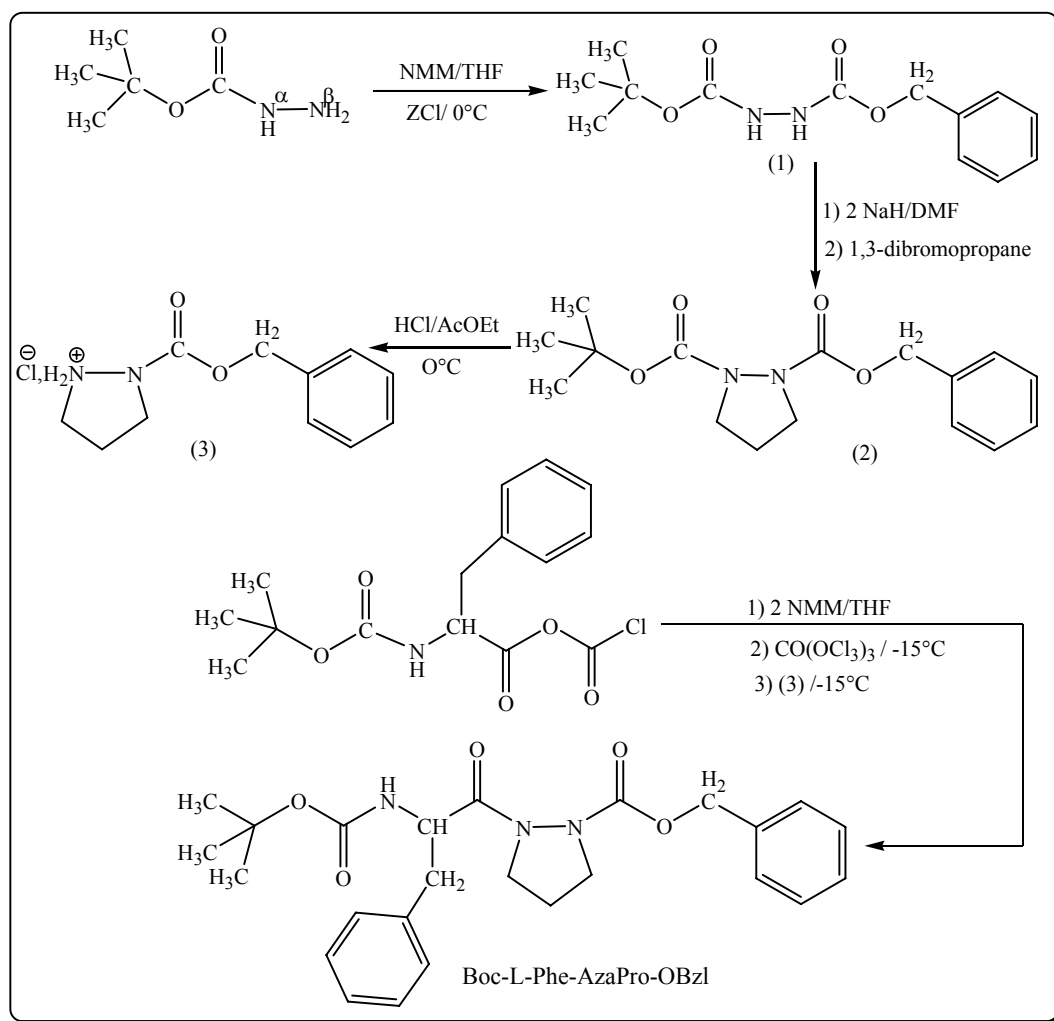
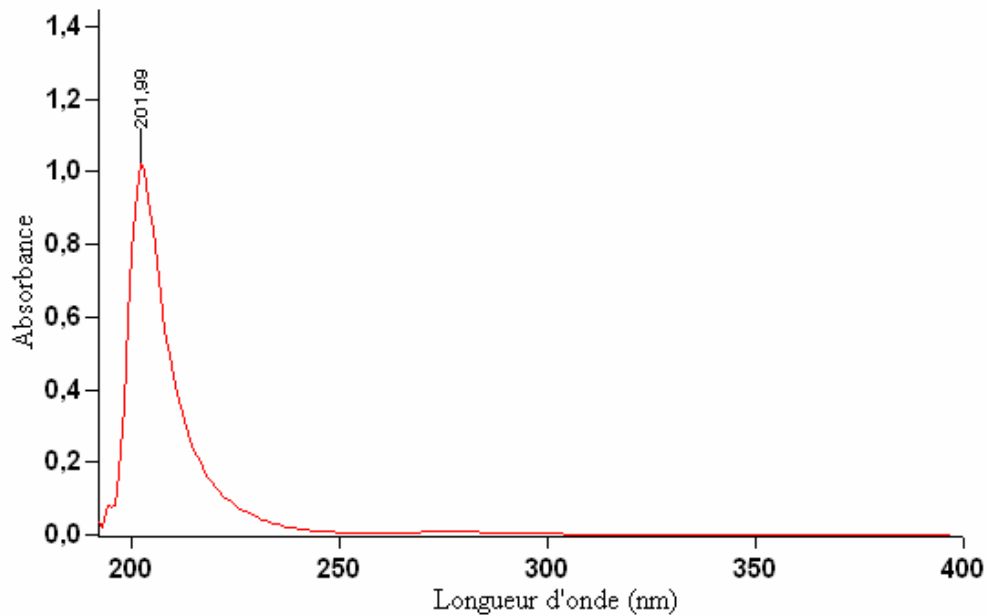


Figure 4.1: Schéma réactionnel de notre travail

4.1 Caractérisation du Boc-NH-NH₂ par spectroscopie UV

Le spectre UV du Boc-NH-NH₂ dans l'éthanol ($C=10^{-3}$) (figure 4.2) présente un seul pic à 202 nm qui correspond à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du carbonyle de la fonction uréthane du groupement protecteur tertbutyloxycarbonyle (Boc).

Figure 4.2: Spectre UV du Boc-NH-NH₂ dans l'éthanol ($C=10^{-3}$ M)

4.2 Réaction de synthèse du Boc-NH-NH-Z.

Comme le pyrazolidine n'est pas commercialisé, on a utilisé le carbazate de tertibutyl comme produit de base. Nous avons d'abord préparé le N^α-benzyloxycarbonyl-N^β-tertibutyloxycarbonylhydrazine (Boc-NH-NH-Z) sous forme cristalline pure par réaction du Boc-NH-NH₂ avec le chloroformiate de benzyle (ZCl) dans le THF anhydre à 0°C (figure 4.3). La présence d'un équivalent d'une base tertiaire est obligatoire pour piéger l'acide chlorhydrique sous forme d'un sel blanc insoluble dans le milieu. Avec la triéthylamine comme base tertiaire on a obtenu une huile très visqueuse et collante qu'il faut purifier par Chromatographie sur colonne pour pouvoir cristalliser le Boc-NH-NH-Z, tandis que l'emploi de la N-méthylmorpholine comme base a donné facilement le produit sous forme de cristaux sans passer par la chromatographie sur colonne, avec un rendement de 88 %.

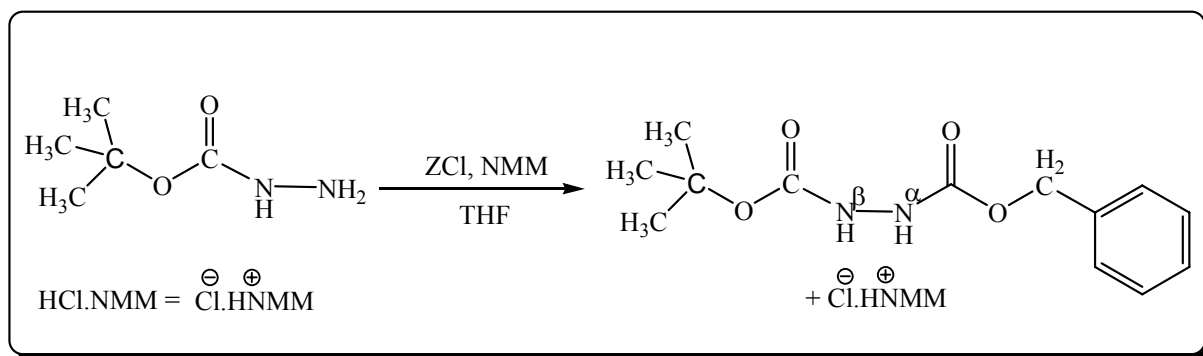


Figure 4.3: Réaction de synthèse du
 N^{α} -benzyloxycarbonyl- N^{β} -tertiobutyloxycarbonylhydrazine
 (Boc-NH-NH-Z)

Le groupement benzyloxycarbonyl est parmi les meilleurs groupements protecteurs de la fonction amine. Il protège sélectivement l'hydrazine Boc-NH^β-NH₂^α en position α et résiste aux conditions de l'acydolyse du groupement Boc. L'introduction de ce dernier implique un mécanisme d'addition élimination. La protection par le groupement Z est basée sur l'acylation de l'extrémité N^α de l'hydrazine en présence d'une base tertiaire qui est de préférence la N-méthylmorpholine (NMM). Le mécanisme d'acylation (figure 4.4) débute par une attaque nucléophile de l'azote N^α du Boc-NH-NH-Z sur le carbone du carbonyle du groupement Z et provoque le départ de Cl⁻. Cette attaque fragilise en même temps la liaison N^α-H et facilite l'arrachement du proton H^α par la N-méthylmorpholine pour former un sel blanc (HCl.NMM).

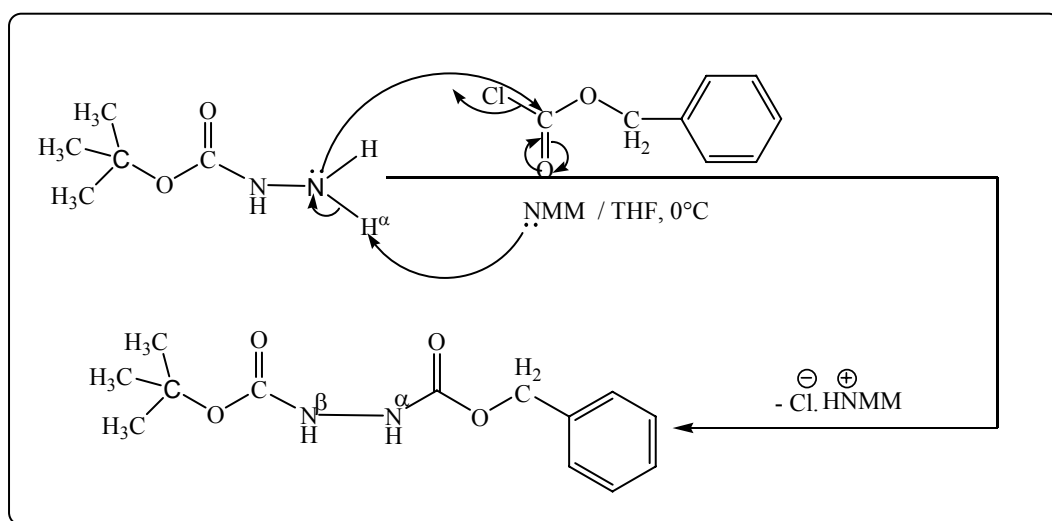


Figure 4.4: Mécanisme proposé pour la protection du Boc-NH-NH₂
 par le groupement Z

4.2.1 Analyse élémentaire du Boc-NH-NH-Z

Pour vérifier la formule brute du Boc-NH-NH-Z, nous avons procédé à l'analyse élémentaire. Les pourcentages donnés par cette dernière (tableau 4.1) vérifient la masse molaire théorique et la formule brute du Boc-NH-NH-Z.

Tableau 4.1 : Résultats de l'analyse élémentaire du Boc-NH-NH-Z

$C_{13}H_{18}N_2O_4$	C	H	N
Pourcentages expérimentaux	57.95	6.42	9.21
Pourcentages théoriques	58.64	6.76	10.52

4.2.2 Caractérisation du Boc-NH-NH-Z par spectroscopie UV.

Comparé au spectre UV dans l'éthanol du Boc-NH-NH₂ ($C=10^{-3}$ M) qui ne présente aucune absorption dans la zone de 230 nm à 275 nm, le spectre du Boc-NH-NH-Z dans l'éthanol ($C=10^{-3}$ M) (figure 4.5) présente une large bande de faible intensité avec trois pics (263.02 nm, 257.03 nm, 251.99 nm) caractéristiques des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ des liaisons C=C conjugués du cycle benzénique. Ceci confirme l'addition du groupement protecteur benzyloxycarbonyle (Z). Les deux transitions à 213.98 nm et 210.04 nm sont du type $\pi \rightarrow \pi^*$, elles sont dues aux carbonyles C=O de type uréthane des deux groupements protecteurs (Boc et Z).

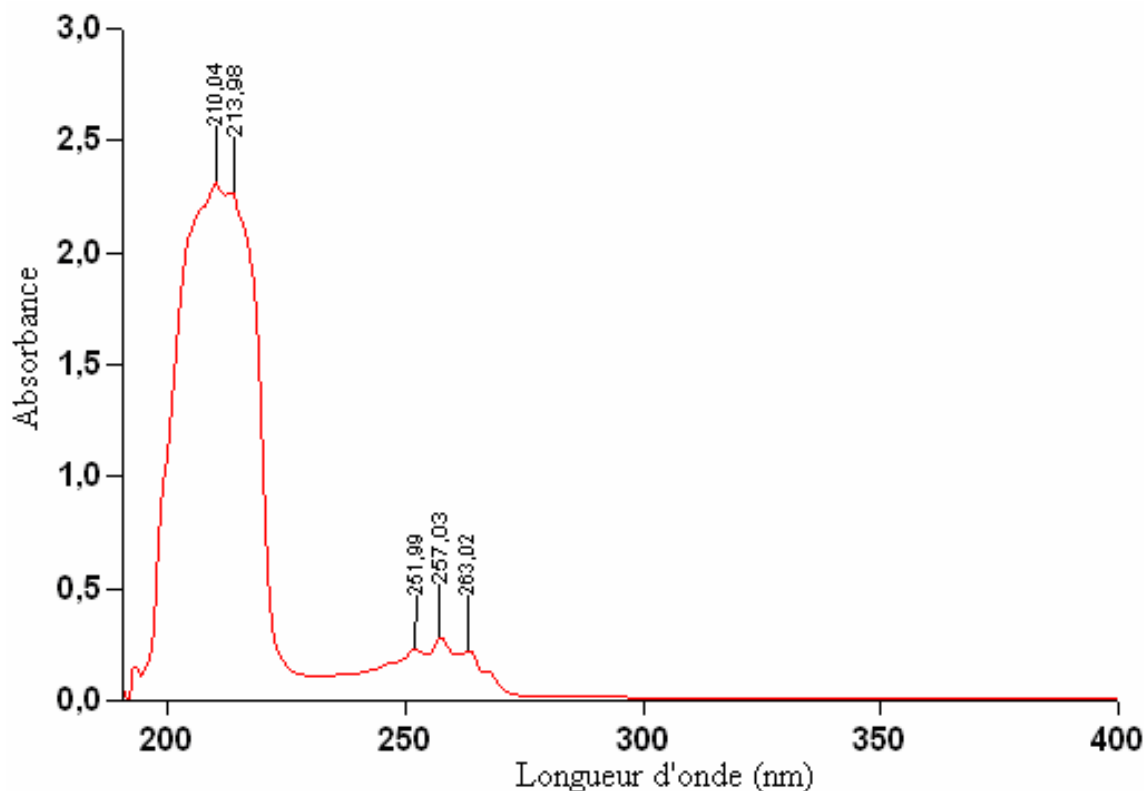


Figure 4.5: Spectre UV du Boc-NH-NH-Z dans l'éthanol ($C=10^{-3}$ M)

4.2.3 Caractérisation du Boc-NH-NH-Z Par spectroscopie FTIR

Le spectre du composé Boc-NH-NH-Z dans une pastille de KBr (figure 4.6) présente des bandes très intenses à 1699.79 et 1723.12 cm^{-1} caractéristique des vibrations de valence d'élongations des C=O uréthanes des deux groupement Boc et Z, ainsi la bande à 1539.91 cm^{-1} peut être attribuée à la vibration de déformation du C-H et C-N uréthane et celles à 1227.10 et 1274.64 cm^{-1} aux vibrations d'élongation C-N et C-O d'uréthane. La vibration de valence des deux liaisons N-H uréthanes est présente par deux pics à 3272 cm^{-1} et 3299 cm^{-1} .

L'examen des bandes d'absorption des basses fréquences révèle la présence des bandes à 699.95 cm^{-1} et 752.69 cm^{-1} , relatives aux deux modes de déformations hors du plan pour 5 hydrogènes adjacents, ce qui affirme la monosubstitution du cycle benzénique. On trouve également d'autres modes de vibration d'élongation du noyau aromatique qui apparaissent à $1473,79$ cm^{-1} et 1495.38 cm^{-1} . Plus loin dans la zone des hautes fréquences, les bandes à 3008.97 cm^{-1} et 3033 cm^{-1} sont caractéristiques des vibrations d'élongation des C-H aromatiques, ce qui est compatible avec les bandes des basses fréquences et confirme la présence du groupement protecteur Z.

Les bandes à 2933.18 cm^{-1} , 2952.99 cm^{-1} et 2977.91 cm^{-1} correspondent aux vibrations d'élongation C-H, des CH_3 tert-butylique, qui présentent également des bandes de déformations à 1388.55 cm^{-1} et 1393.37 cm^{-1} , tandis que les bandes intenses à 1054 cm^{-1} et 1161.66 cm^{-1} peuvent être attribuées à la vibration d'élongation de la liaison C-O.

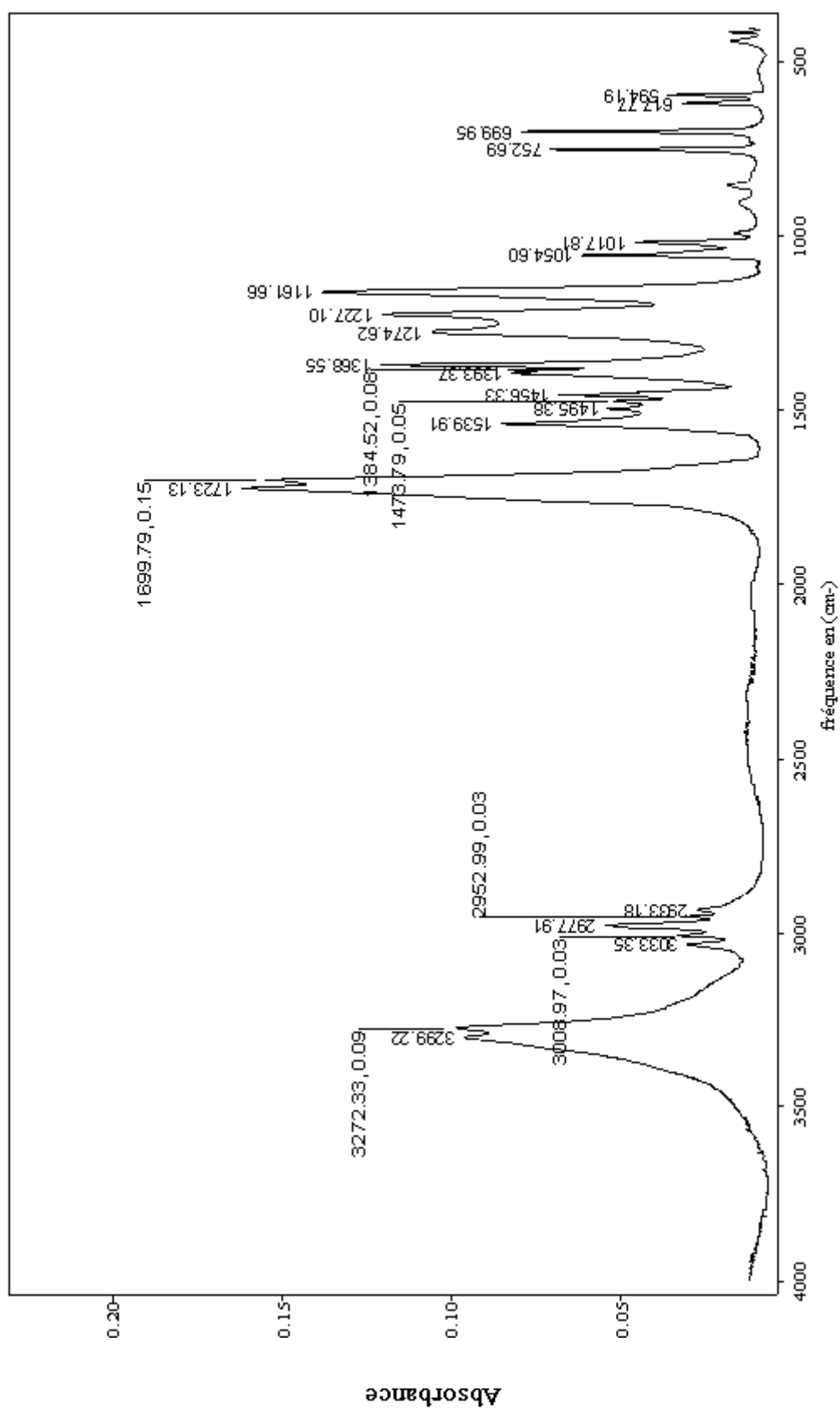


Figure 4.6: Spectre FTIR du N^α-benzyloxycarbonyl, N^β-tertiobutyloxycarbonylhydrazine (Boc-NH-NH-Z) en pastille de KBr

4.2.4 Caractérisation du Boc-NH-NH-Z par RMN-¹H

Le signal à 7.33 ppm observé sur le spectre RMN- ^1H (figure 4.8) du Boc-NH-NH-Z (figure 4.7) enregistré dans le CDCl_3 avec TMS comme référence correspond au déplacement chimique des 5 protons γ du cycle benzénique (Z). Les deux protons Z $\delta(\text{CH}_2)$ résonnent sous forme d'un singulet d'intégration 2 à 5,2 ppm confirmant la protection de l'extrémité N^α par le groupement benzyloxycarbonyle.

Les deux signaux importants de ce spectre à 6.45 ppm et 6.69 ppm d'intégration 1 pour chacun, correspondent à la résonance magnétique nucléaire de 2H de type uréthane (1H_β du Boc-NH et 1H_α du NH-Z).

Les protons méthyliques θ (CH_3) $_3$ du groupement tertibutyloxycarbonyle ne se couplant à aucun proton, présentent un singulet intense situé à 1.45 ppm d'intégration 9. Le massif à 2.2 ppm correspond aux protons de l'acétone de lavage du tube RMN.

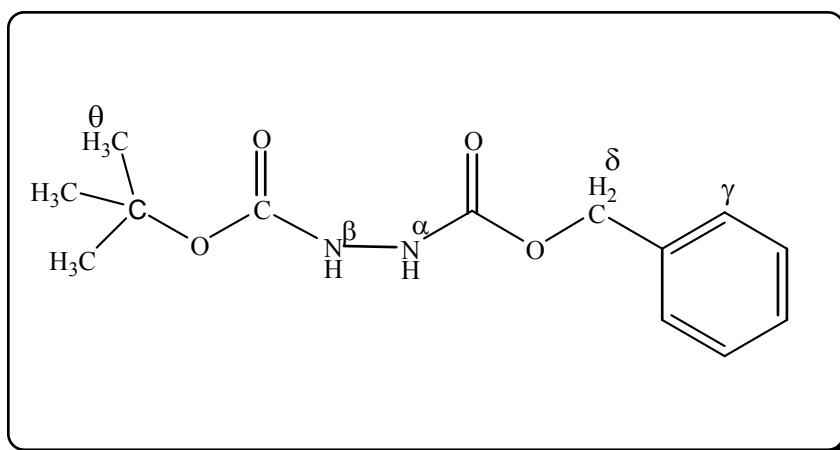


Figure 4.7: Les différents types de proton du Boc-NH-NH-Z

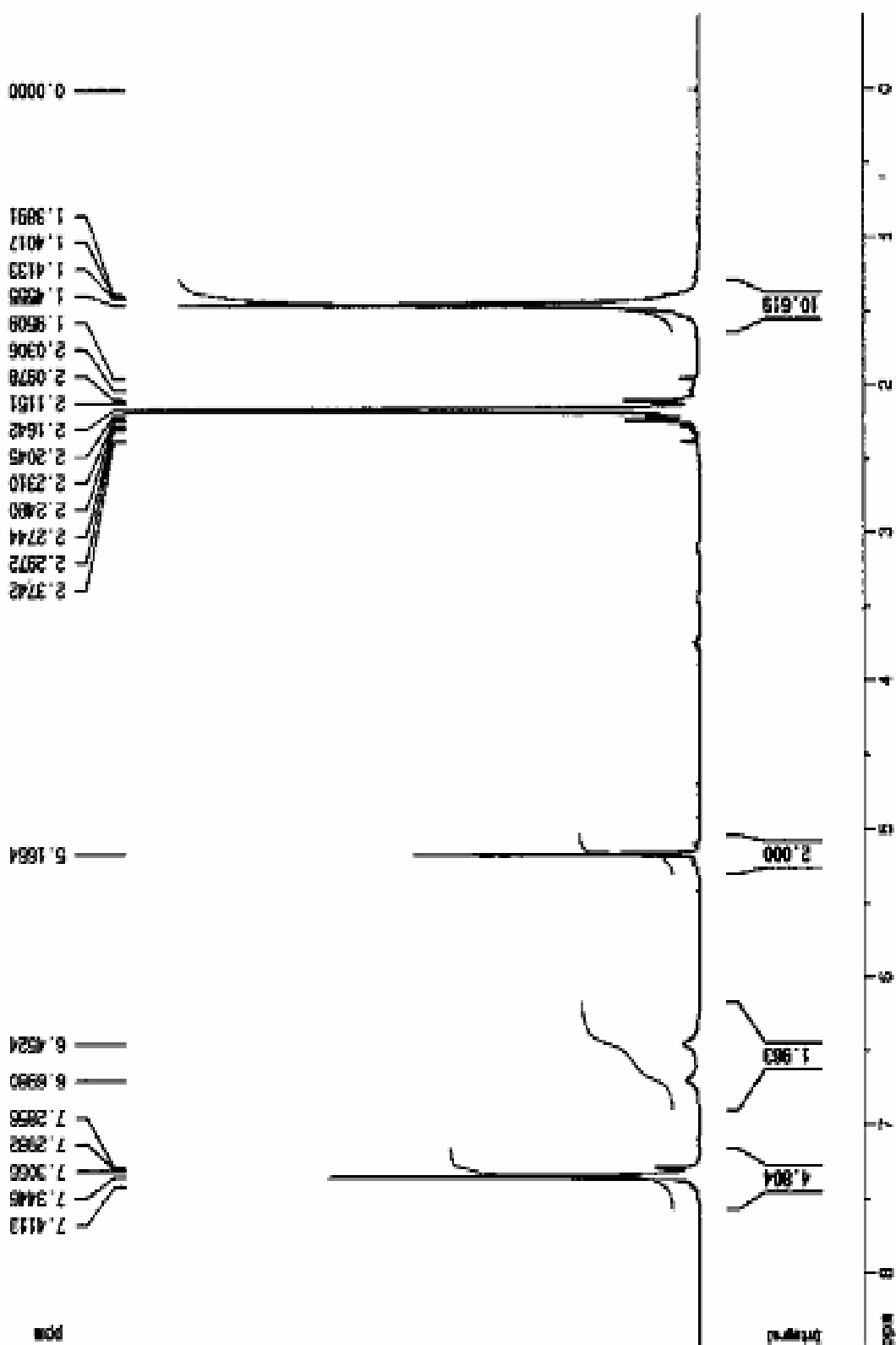


Figure 4.8: Spectre RMN- ^1H du N^α -benzyloxy-carbonyl, N^β -tertiobutyloxy-carbonylhydrazine (Boc-NH-NH-Z) dans le CDCl_3 à 300 MHz

4.3 Réaction de préparation du synthon précurseur de l'azaproline: Boc-AzaPro-OBzl

La Synthèse du cycle pyrazolidine N^α-N^β-Protégé (figure 4.9) est l'étape clé dans la synthèse de l'azapeptide; Le Boc NH-NH-Z obtenu dans l'étape précédente est traité par 2 équivalents de NaH dans le DMF pour former le dianion de couleur rouge, cette dernière se dégrade en orange puis en jaune suite à l'ajout de 1,3-dibromopropane. La réaction est suivie par CCM avec le THF/Hx comme éluant. Après une nuit sous forte agitation, l'huile obtenue est lavée par 10 mL d'eau (2 fois), 10 mL d'acide citrique à 5% (2 fois), 10 mL de NaHCO₃ 10 mL d'eau (2 fois) et 10 mL d'une solution saturée de chlorure de sodium NaCl (2 fois), ensuite elle est purifiée par chromatographie sur colonne. Le Boc-AzaPro-OBzl ainsi obtenu avec un rendement total certes plutôt moyen (45 %), mais sous forme cristalline pure. Son point de fusion est de 41°C.

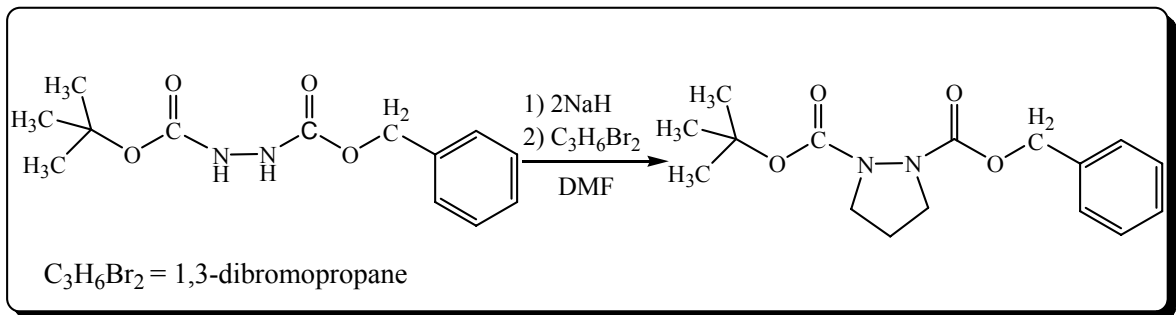


Figure 4.9: Réaction de synthèse du Boc-AzaPro-OBzl

Le mécanisme de cette réaction (figure 4.10) qui est en réalité une réaction de cyclisation est de type addition élimination, elle consiste à arracher les deux protons de la fonction hydrazine pour créer un dianions, responsable de la couleur rouge, ce dernier réagit par un mécanisme d'addition avec le 1,3-dibromopropane pour former le cycle pyrazolidine avec libération d'un sel jaune le NaBr.

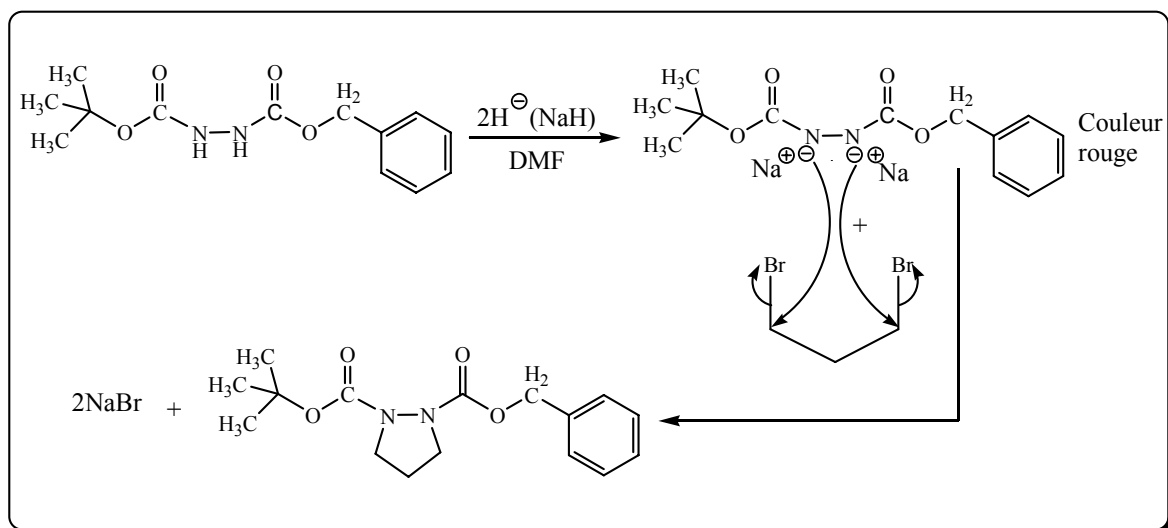


Figure 4.10: Mécanisme proposé pour la synthèse de Boc-AzaPro-OBzl

4.3.1 Analyse élémentaire de Boc-AzaPro-OBzl.

La formule brute du cycle pyrazolidine-N^α-N^β -Protégé (Boc-AzaPro-OBzl) a été confirmée par les pourcentages en masse du carbone, azote et d'hydrogène obtenus par analyse élémentaire (CHN) regroupés sur le tableau 4.2 et qui sont très proches des pourcentages théoriques .

Tableau 4.2 : Résultats de l'analyse élémentaire du Boc-AzaPro-OBzl

C ₁₆ H ₂₂ N ₂ O ₄	C	H	N
Pourcentages expérimentaux	61.62	7.29	7.91
Pourcentages théoriques	62.74	7.18	9.15

4.3.2 Caractérisation du Boc-AzaPro-OBzl par spectroscopie UV

Le spectre UV du Boc-AzaPro-OBzl dans l'éthanol (C=10⁻³ M) (figure 4.11) présente la même allure que celui du Boc-NH-NH-Z sauf que les bandes de transition π→π* sont un peu décalés vers les basses longueurs d'onde, ce phénomène peut être expliqué par la disparition des groupements amines secondaires qui induisent généralement des effets bathochromes. Les trois pic à 251.9 nm, 257,9 nm et 262.9 nm représentent toujours les transitions π→π* du cycle benzénique du groupement benzyloxycarbonyle qui sont peu affectés par les groupements amines secondaires.

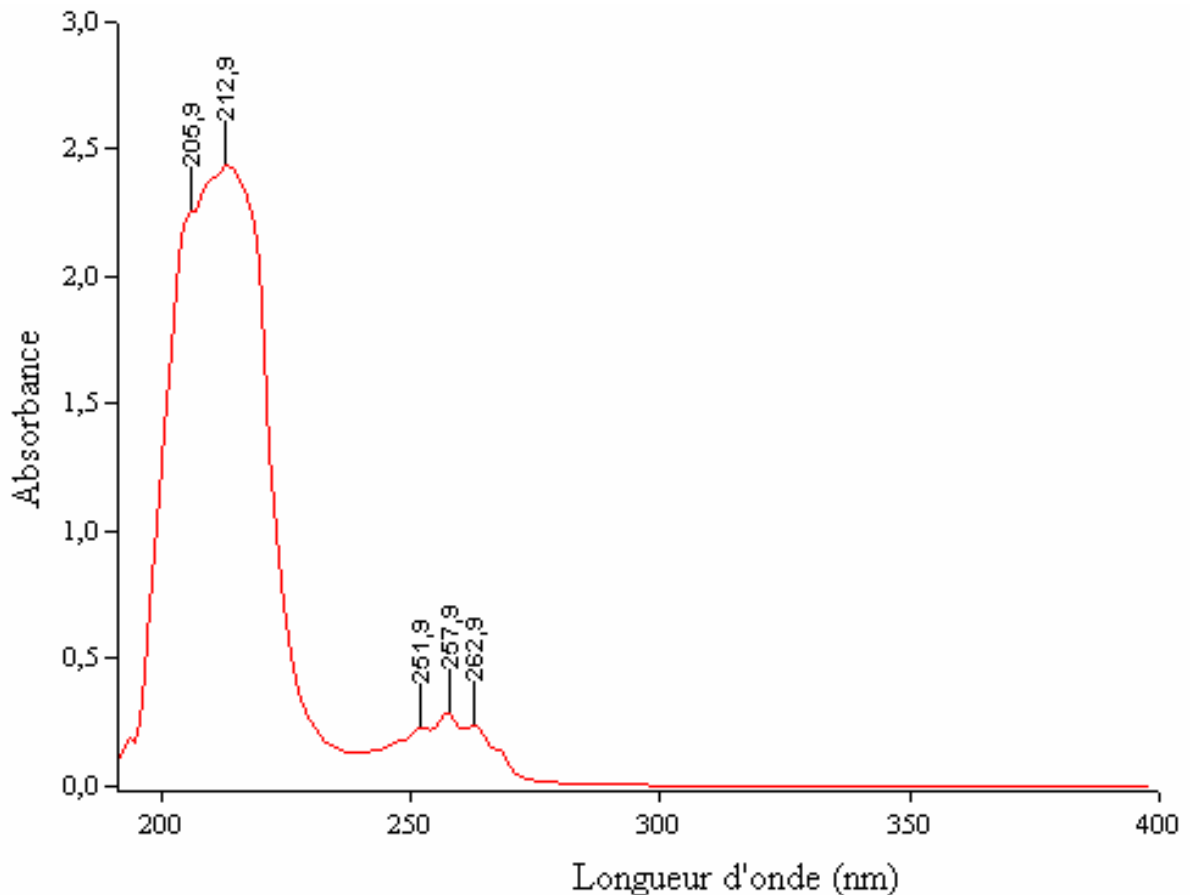


Figure 4.11: Spectre UV du Boc-AzaPro-OBzl dans l'éthanol
($C = 10^{-3}$ M)

4.3.3 Caractérisation du Boc-AzaPro-OBzl par spectroscopie FTIR

Le spectre FTIR (figure 4.12) du Boc-AzaPro-OBzl dans une pastille de KBr présente un pic très intense à 1695.62 cm^{-1} caractéristique de la vibration d'élongation du C=O des deux groupements uréthanes. Les C-N, C-O uréthanes donnent aussi des vibrations d'élongation qui sont dans notre cas à 1215.97 cm^{-1} et 1246.35 cm^{-1} .

L'absence de bande à haute fréquence plus particulièrement les bandes de vibration de la liaison N-H, confirme la formation et la présence d'un cycle pyrazolidine, les pics à 1313.50 cm^{-1} et 1352.88 cm^{-1} peuvent être attribués aux vibrations d'élongation des deux C-N du cycle pyrazolidine. Les C-H du groupement méthyle et méthylène présentent également des bandes de vibration d'élongation qui sont à 2934.88 cm^{-1} et 2979.59 cm^{-1} , 2902.60 cm^{-1} , tandis que leurs bandes de déformation symétrique et asymétrique sont à 1352.88 cm^{-1} et 1416.77 cm^{-1} . Le noyau aromatique est présent par ces différents modes de vibration, les bandes à 695.75 cm^{-1} et 751.10 cm^{-1} de déformation en dehors du plan des

5 C-H aromatiques tandis que sa vibration d'élongation est observée à 1460.91 cm^{-1} . Les autres bandes faibles à basse fréquence comme celles à 1103.71 cm^{-1} , 938.04 cm^{-1} et 908.99 cm^{-1} peuvent être attribuées à la vibration de valence des liaisons C-C, C-N et C-O.

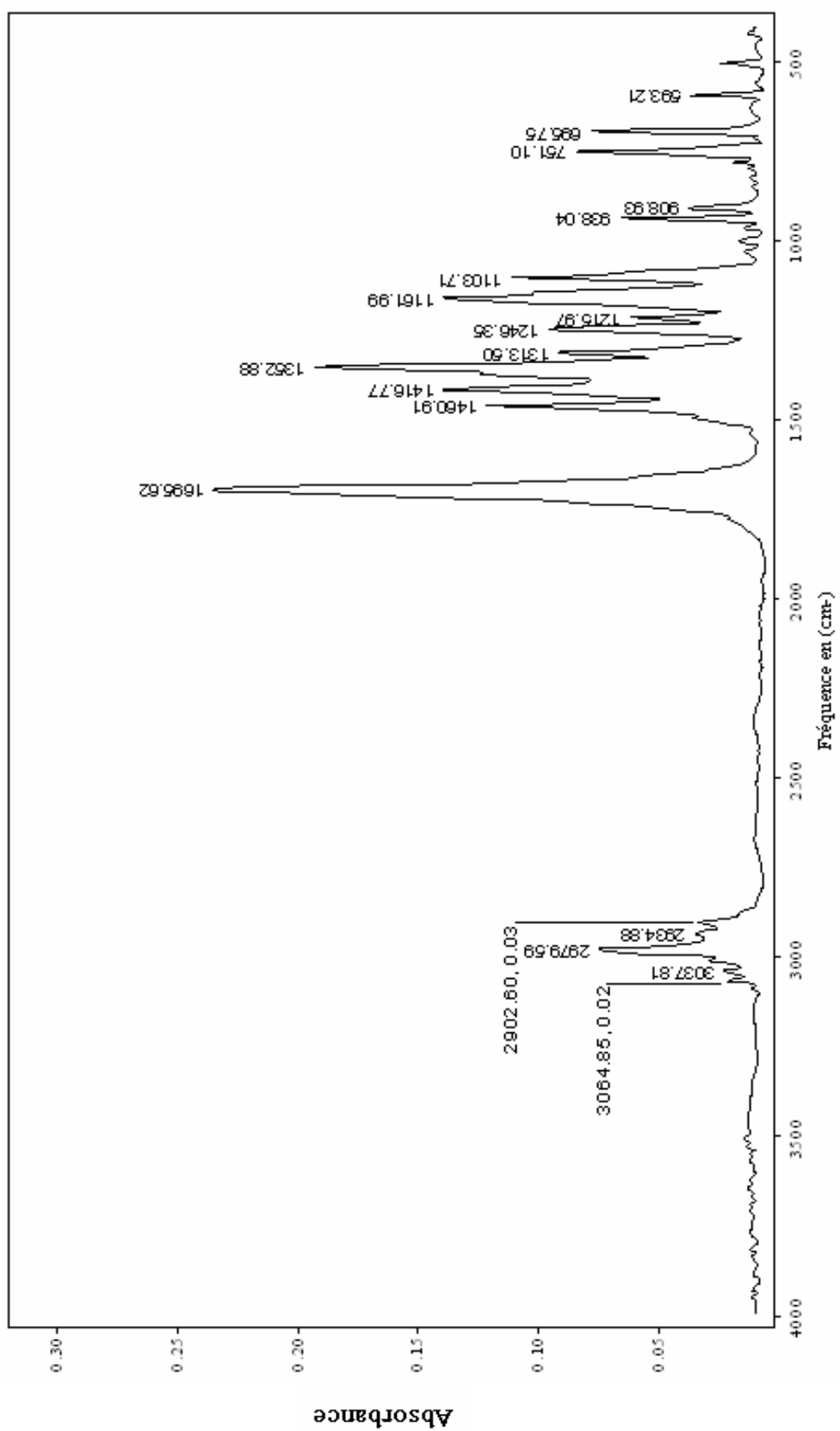


Figure 4.12: Spectre FTIR du Boc-AzaPro-OBzl en pastille de KBr

4.3.4 Caractérisation du composé Boc-AzaPro-OBzl par RMN-¹H

Le spectre RMN-¹H de la figure 4.14 du composé Boc-AzaPro-OBzl (figure 4.13) dans le CDCl₃ et le TMS comme référence présente un large multiplet à 2.13 ppm avec une intégration de 2 caractéristique des 2H^γ (cyclane). Le signal à 3.27 ppm d'intégration 2 est attribué à la résonance magnétique nucléaire de 1H^β et 1H^δ non équivalents magnétiquement. Le proton β (β') est couplé avec le proton β' (β) et doublement couplé aux deux protons γ. Ainsi les pics obtenus sont doublement dédoublé par le couplage à travers le cycle pyrazolidine avec les protons δ et δ' qui ne sont pas équivalents entre eux. Du fait de la symétrie du cycle pyrazolidine l'écart entre les déplacements chimiques des protons β et β' est faible, ce qui entraîne le chevauchement de leurs pics et donne un multiplet. Les autres protons 1H^{β'} et 1H^{δ'} sont déblindés par rapport aux protons (1H^β, 1H^δ) de même pour les protons (1H^β, 1H^δ), les protons 1H^{β'} et 1H^{δ'} présentent un large multiplet au environ de 3.93 ppm.

Les deux protons γ sont couplés avec les deux protons β, β' et les protons δ et δ' avec des constants de couplage différentes. La non équivalence de ces quatre protons génère un multiplet au environ de 2 ppm.

Le singulet intense d'intégration 9 à δ=1.39 ppm correspond au déplacement chimique des 9 protons méthyliques (CH₃)₃ du groupement tertibutyloxy-carbonyl. On observe également un autre signal situé à 7.34 ppm propre au 5 protons du noyau aromatique (Z), les deux protons benzylique Z(CH₂) existent sur le spectre par un signal à 5.2 ppm d'intégration 2. Le massif à 2.14 ppm est dû à la présence d'acétone de lavage dans le tube RMN.

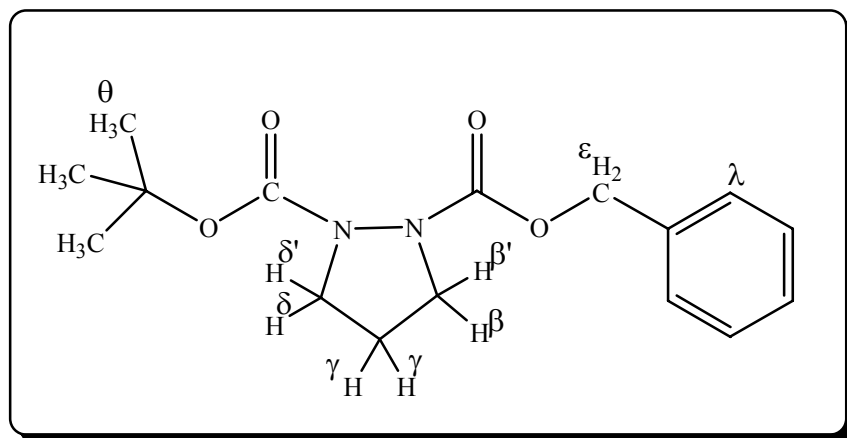


Figure 4.13: Les différents types de proton du Boc-AzaPro-OBzl

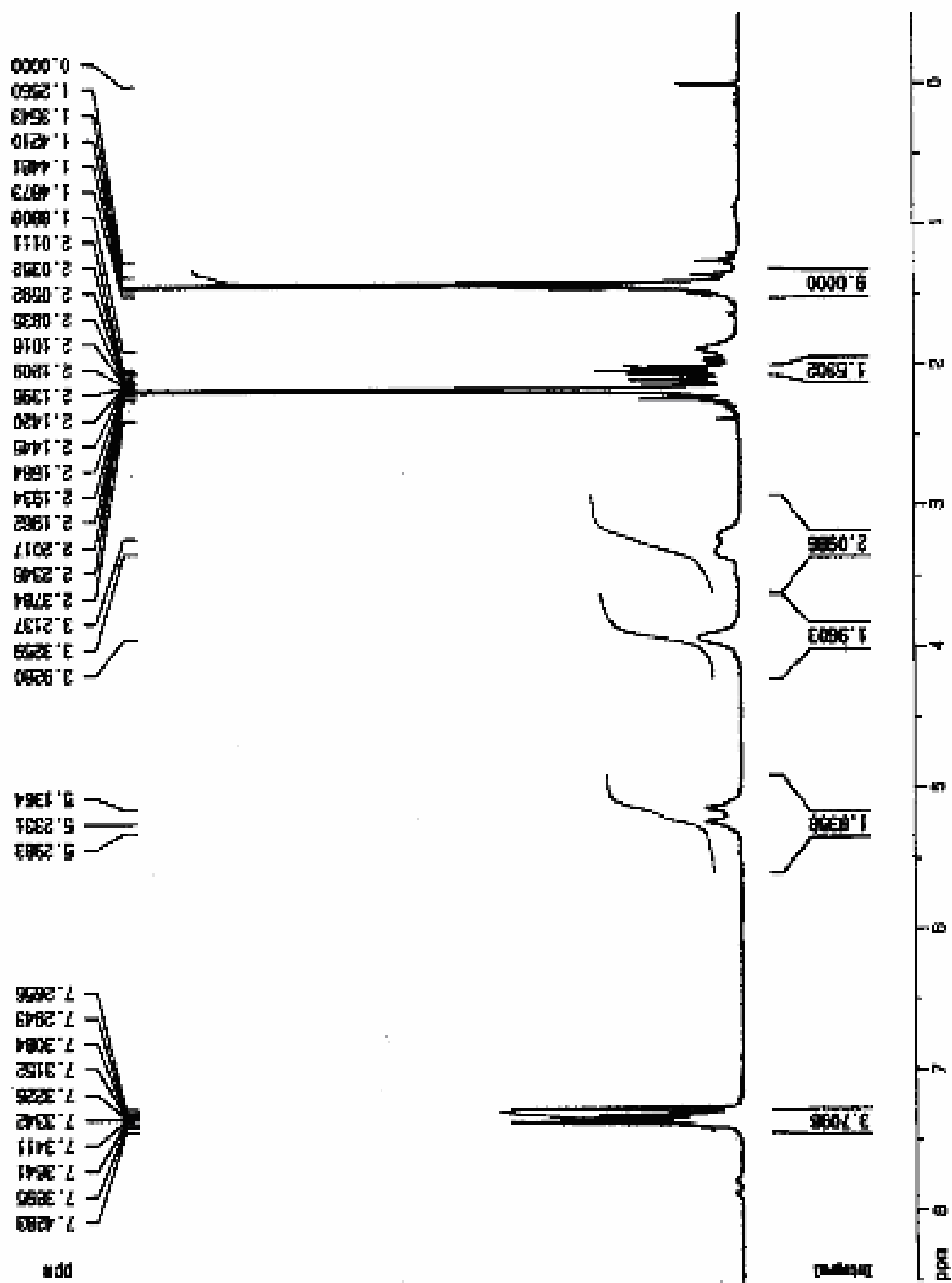


Figure 4.14 : Spectre RMN- ^1H du Boc-AzaPro-OBzl dans le CDCl_3 à 300 MHz

4.4 Réaction de déprotection du Synthone Boc-AzaPro-OBzl par Clivage du groupement Boc

Le chlorhydrate HCl.AzaPro-OBzl sous forme de cristaux blancs est obtenu par action de l'acide chlorhydrique gazeux dissout dans l'acétate d'éthyle anhydre sur le synthon de base (figure 4.15) selon le mode de clivage cité dans la partie expérimentale. Le chlorhydrate obtenu a été cristallisé dans l'éthanol/éther de pétrole. Le rendement de la réaction est quasi-quantitatif (96%). La température de fusion du HCl.AzaPro-OBzl est dans l'intervalle de 158°C-164°C.

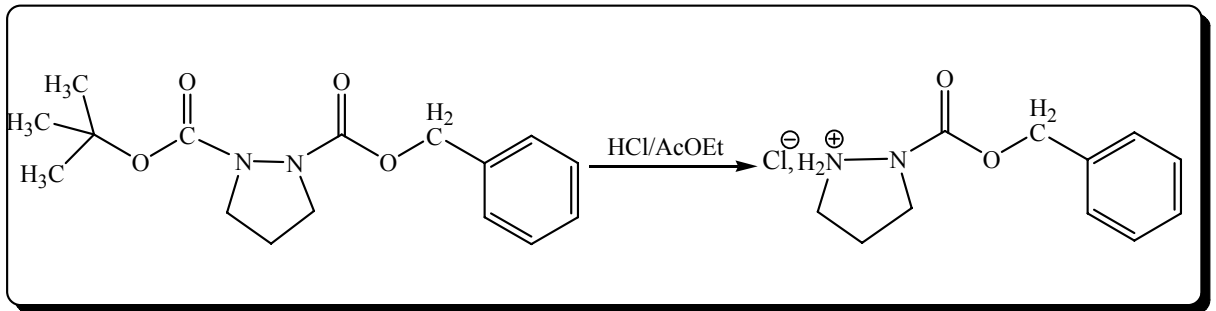


Figure 4.15: Réaction de synthèse du HCl.AzaPro-OBzl

Le mécanisme de clivage des fonctions uréthane (figure 4.16) commence généralement par la protonation de l'atome d'oxygène du carbonyle du groupement protecteur le tertbutyloxycarbonyl (Boc) dans notre cas, suivie par la fission de la liaison *t*butyl- O., la décarboxylation de l'acide carbamique libère le chlorhydrate de l'azaproline N^α-protégé et un carbocation tertbutylique qui se réarrange en isobutène.

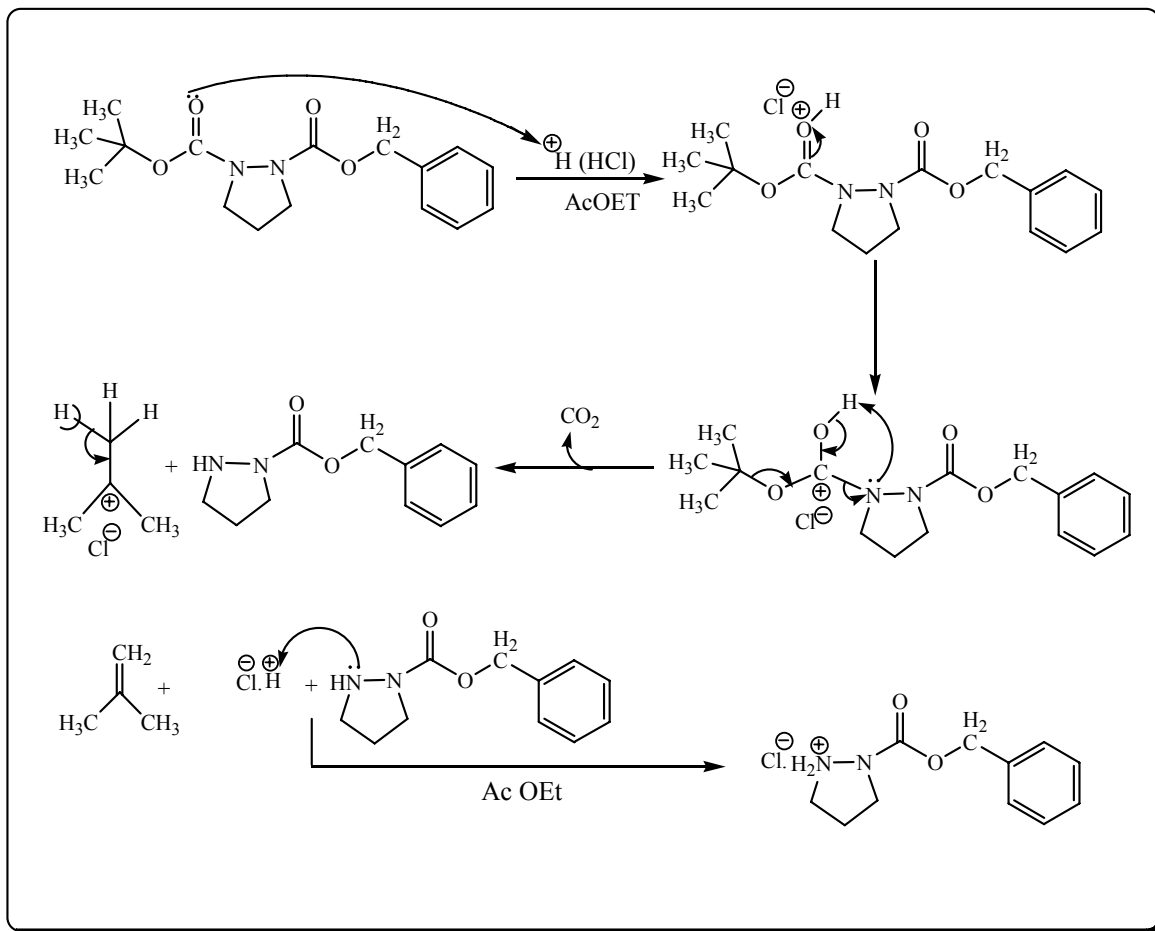


Figure 4.16: Mécanisme réactionnelle proposé pour la déprotection du Boc-AzaPro-OBzl

4.4.1 Analyse élémentaire du HCl.AzaPro-OBzl

L'analyse élémentaire du chlorhydrate de l'azaproline (HCl.AzaPro-OBzl), dont les résultats sont rassemblés dans le tableau ci-dessous sont en accord avec la formation de ce produit (tableau 4.3).

Tableau 4.3 : Résultats de l'analyse élémentaire du chlorhydrate HCl.AzaPro-OBzl

C ₁₁ H ₁₅ N ₂ O ₂ Cl	C	H	N
Pourcentages expérimentaux	52.46	6.16	11.86
Pourcentages théoriques	54.43	6.185	11.54

4.4.2 Caractérisation du HCl.AzaPro-OBzl par spectroscopie UV

L'action de l'acide chlorhydrique sur le Boc-AzaPro-OBzl provoque le clivage du groupement Boc et ne laisse qu'une seule fonction uréthane (Z). Le spectre UV dans l'éthanol du chlorhydrate ($C = 10^{-3} \text{ M}$) (figure 4.17) confirme ce fait par la présence d'un seul pic à 213,9 nm de la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ de la liaison C=O (Boc) qui est plus décalé vers les grandes longueurs d'ondes par rapport à celui du Boc-AzaPro-OBzl à cause de la présence du groupement $-\text{NH}_2^+$. La superposition des deux spectres Boc-AzaPro-OBzl et de son chlorhydrate (figure 4.18), montre aussi que cette bande (213,9 nm) est moins large que celle du Boc-AzaPro-OBzl à cause de la diminution du nombre de carbonyle.

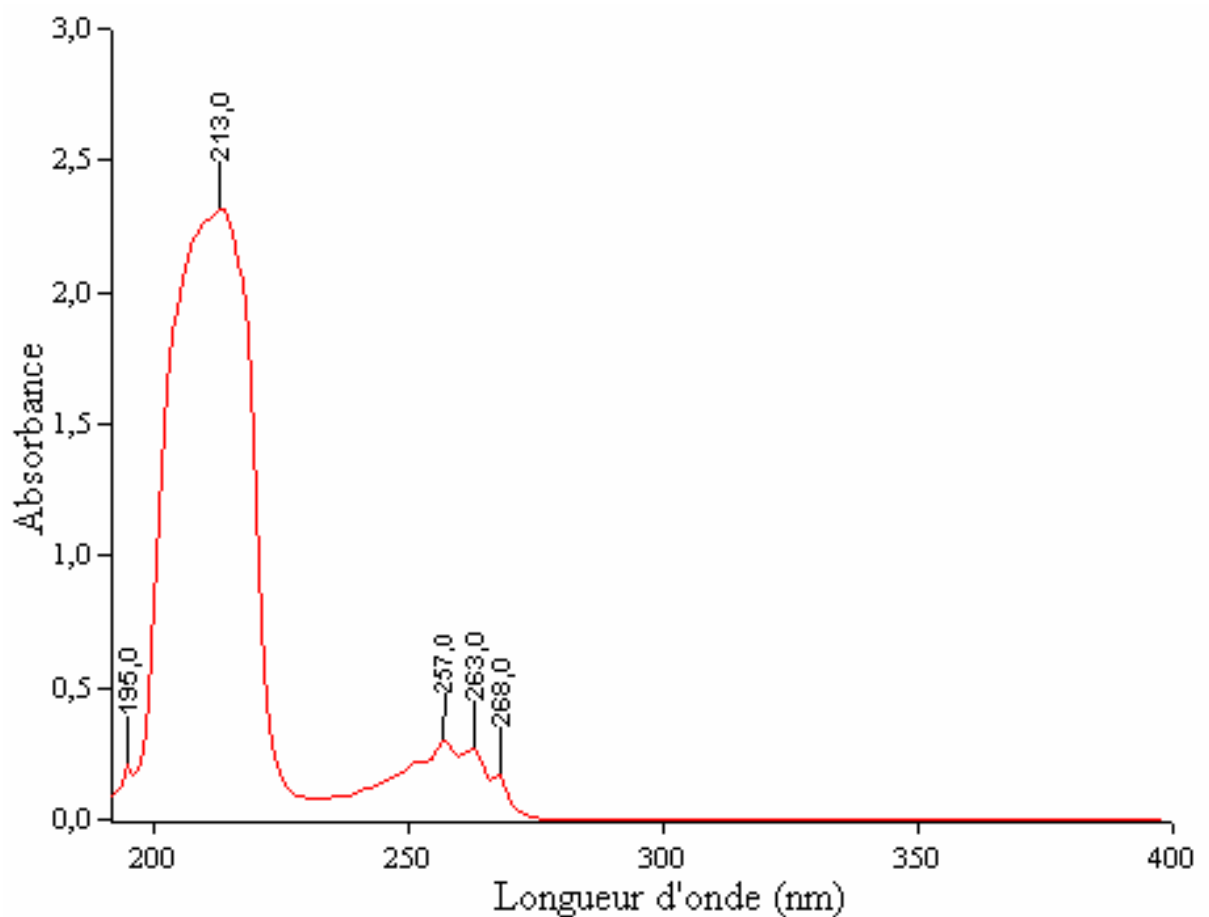


Figure 4.17: Spectre UV du chlorhydrate HCl.AzaPro-OBzl dans l'éthanol ($C = 10^{-3} \text{ M}$)

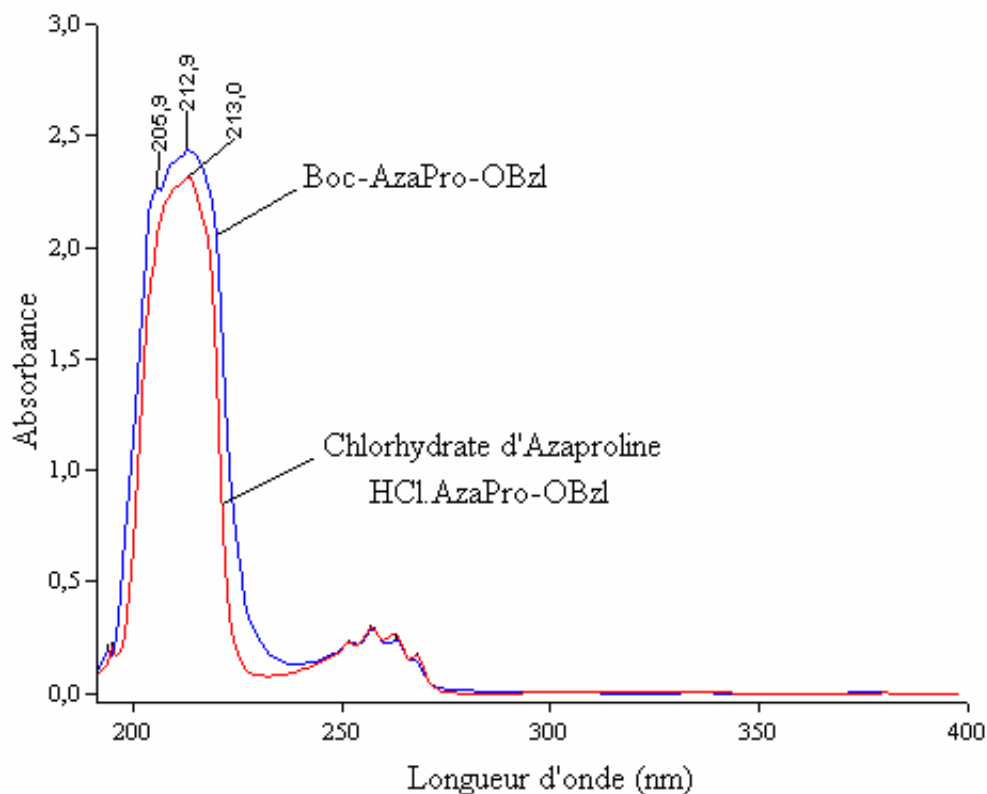


Figure 4.18: Superposition des spectres UV du Boc-AzaPro-OBzl et de son chlorhydrate dans l'éthanol ($C= 10^{-3}$ M)

4.4.3 Caractérisation du HCl.AzaPro-OBzl par spectroscopie FTIR

Les nouvelles bandes enregistrées dans le spectre du chlorhydrate (HCl.AzaPro-OBzl) en pastille de KBr (figure 4.19) à 3428 cm^{-1} et $3250,63\text{ cm}^{-1}$ sont dues aux vibrations d'élongation du N-H (HCl.H-N) du cycle pyrazolidine. Cette attribution est renforcée par la faible bande à $1608,18\text{ cm}^{-1}$ relative à la vibration de déformation de la liaison N-H et par la présence des bandes de vibration d'élongation à 2667 cm^{-1} et $2865,2\text{ cm}^{-1}$ caractéristiques du $-\text{NH}_2^+$, ce qui confirme le clivage du groupement Boc par HCl gazeux.

La seule et la plus intense bande à $1737,19\text{ cm}^{-1}$ est caractéristique de la vibration de valence d'élongation d'un seul C=O uréthane. La bande à $1390,45\text{ cm}^{-1}$ est attribuée à la vibration d'élongation C-N et C-O uréthane (Z), amide IV. Le cycle benzénique du groupement benzyloxycarbonyle est resté intact suite aux bandes de vibration d'élongation du noyau aromatique à $1503,18\text{ cm}^{-1}$, $1533,16\text{ cm}^{-1}$ et $1567,22\text{ cm}^{-1}$ et les bandes à 738 cm^{-1} , 770 cm^{-1} et 696 cm^{-1} de la monosubstitution. Les bandes de vibration d'élongation des C-H aromatiques sont présentes à $3030,22\text{ cm}^{-1}$ et $3075,26\text{ cm}^{-1}$. Aux faibles

fréquences, on trouve des bandes à $1140,90\text{ cm}^{-1}$ et $1217,81\text{ cm}^{-1}$ qui correspondent aux vibrations d'élongation des liaisons C - O et C - N.

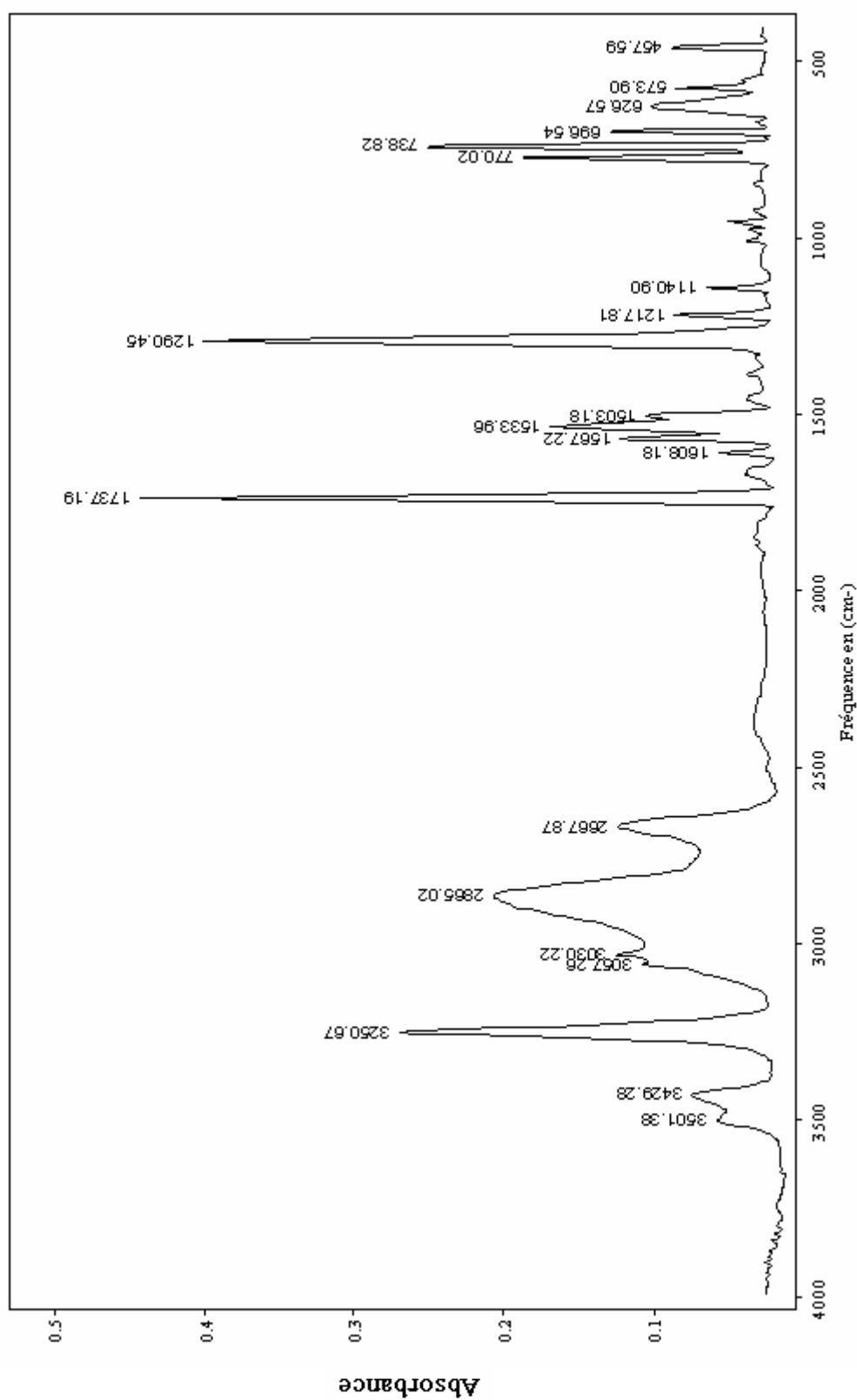


Figure 4.19: Spectre FTIR du HCl.AzaPro-OBzl en pastille de KBr

4.5 Réaction de couplage de l'azaproline à la phénylalanine

L'agent de couplage est un élément crucial dans l'étape d'activation des acides aminés. Malheureusement, la majorité des réactifs de couplage, habituellement utilisés, induisent des réactions secondaires indésirables et nécessitent des conditions de réaction sévères et un temps de réaction très long qui peut aller jusqu'à trois jours. Nous avons proposé le triphosgène qui est un solide stable et moins dangereux que le phosgène, comme agent d'activation dans la réaction de couplage de l'azaproline à la phénylalanine (figure 4.20). L'aza-dipeptide Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl est obtenu sous forme de cristaux blancs avec un rendement de 70 %, son point de fusion est de 80°C.

Le suivi de la réaction de couplage par Chromatographie sur couche mince (CCM) révèle la présence d'un intermédiaire qui se forme in situ, qui n'est autre que la forme C-activée du Boc-Phénylalanine. Cet intermédiaire a un $R_f = 0.49$ dans le mélange (THF/Héxane, 70/30) comme éluant.

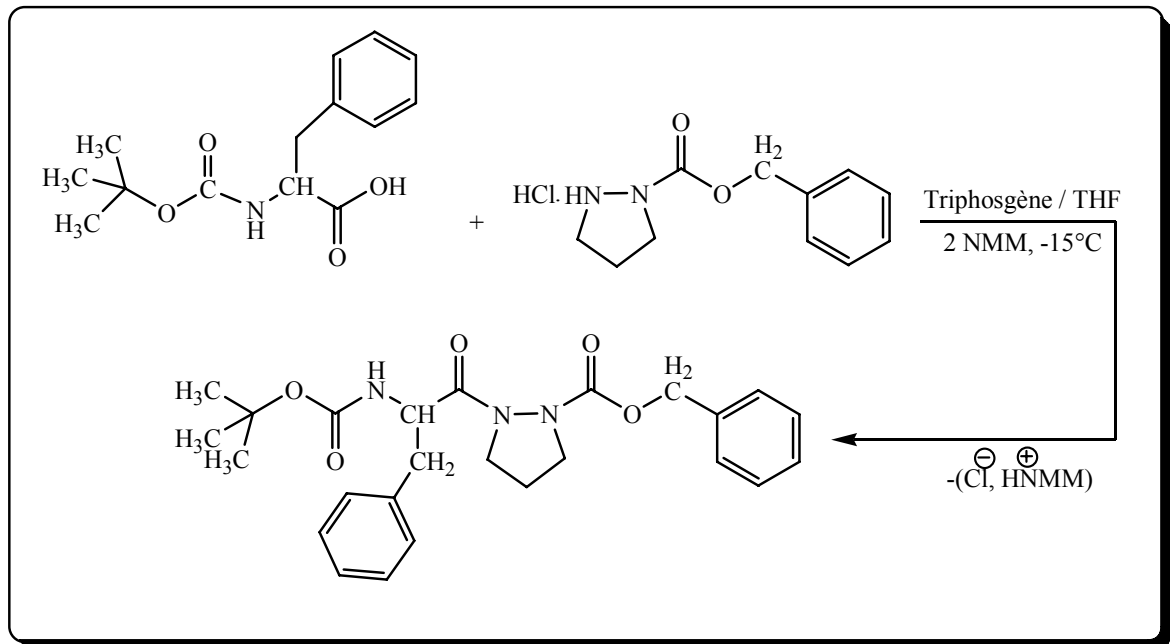


Figure 4.20: Réaction de synthèse de l'aza-dipeptide Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl

Le mécanisme de couplage (figure 4.21) implique en première étape l'activation de la fonction carboxylique du Boc-phénylalanine par acylation au triphosgène, plus précisément 1/3 de la molécule de triphosgène. L'intermédiaire ainsi obtenu (2) est un anhydride mixte qui réagit in situ par un mécanisme d'addition avec l'azaproline-

N^α-protégée (4) résultant de la neutralisation du chlorhydrate de l'azaproline (3) par le deuxième équivalent de la N-méthylmorpholine (NMM) pour aboutir à l'aza-dipeptide (5) Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl.

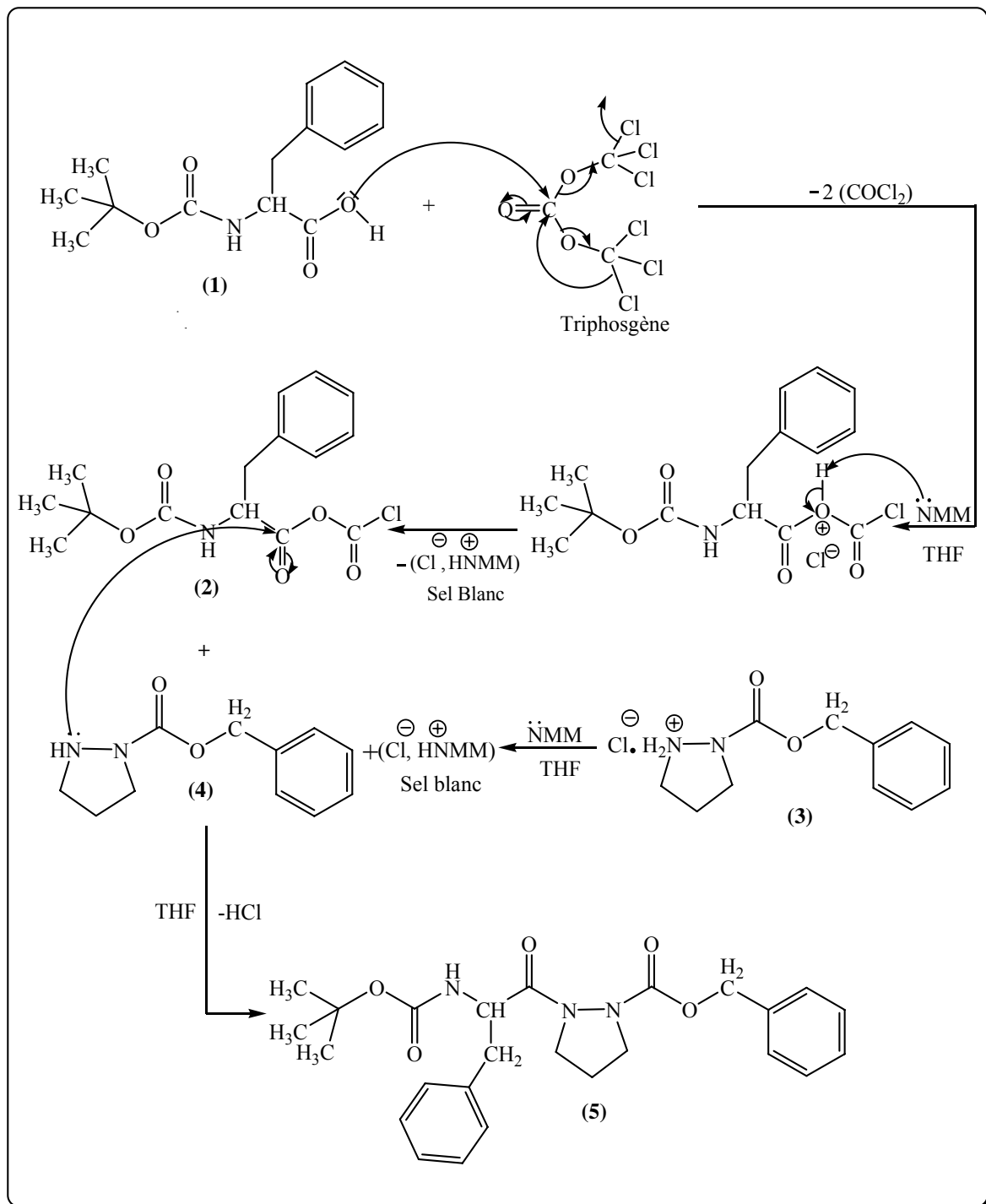


Figure 4.21: Mécanisme proposé pour le couplage de l'azaproline à la phénylalanine

4.5.1 Analyse élémentaire de l'aza-dipeptide Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl

D'après les résultats donnés par l'analyse élémentaire sur le tableau 4.4 les pourcentages expérimentaux sont très proches des valeurs théoriques, ce qui peut confirmer la formule brute proposée pour le composé Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl.

Tableau 4.4: Résultats de l'analyse élémentaire du Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl.

C ₂₅ H ₃₁ N ₃ O ₅	C	H	N
Pourcentages expérimentaux	66.91	7.26	9.56
Pourcentages théoriques	66.22	6.84	9.27

4.5.2 Caractérisation par spectroscopie UV du Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl

Par rapport à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du C=O obtenu dans les spectres précédents, l'aza-dipeptide obtenu présente dans l'éthanol à 10^{-3} M (figure 4.22) une plus large et plus intense bande entre 200 nm et 250 nm avec deux pics à 226 nm et 211 nm et un épaulement à 213 nm. Le pic à 211 nm et l'épaulement à 213 nm correspondent d'après les spectres précédant aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ du C=O des deux fonctions uréthanes des deux groupements protecteurs (Boc et Z), tandis que le pic à 226 nm plus intense et déplacé vers les grandes longueurs d'ondes, est dû à l'addition d'un nouveau chromophore à ceux observés dans le spectre UV du chlorhydrate de l'azaproline et qui chevauche un peu avec les transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ des systèmes conjugués.

Le pic à 258 nm et les deux épaulements à 263 nm et 266 nm sont plus larges et plus intenses comparés aux spectres précédents, ceci peut être expliqué par la présence d'un nouveau système conjugué qui s'ajoute par ses transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ et qui ne peut être que le cycle benzénique de la phénylalanine.

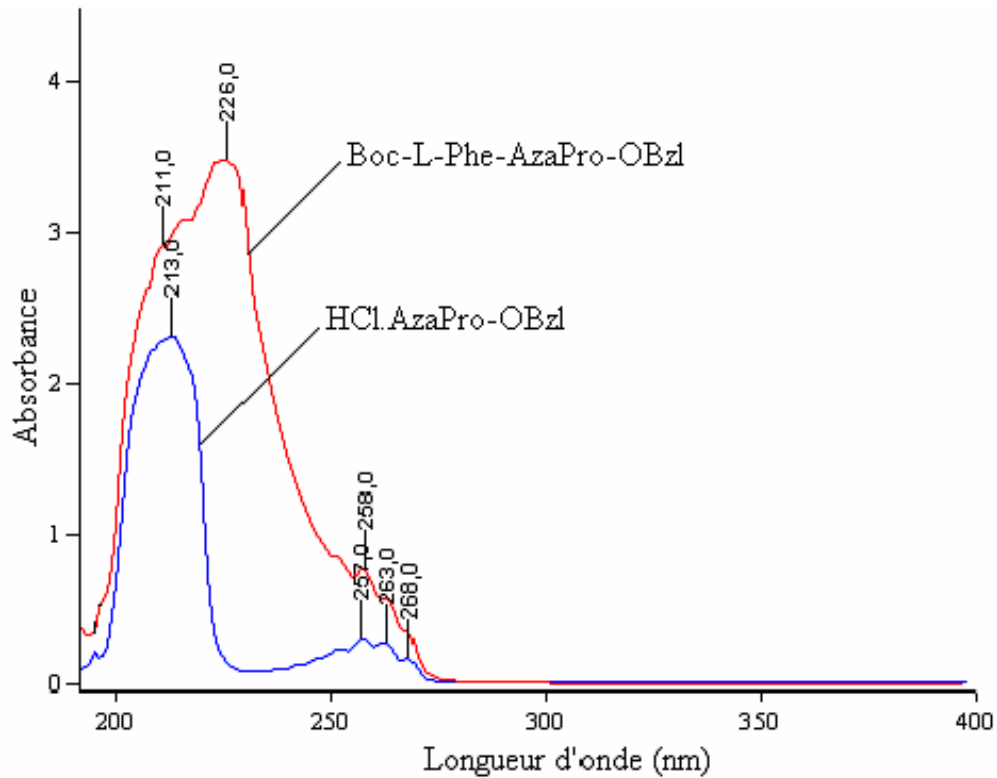


Figure 4.22: Spectre UV du composé Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl superposé avec le spectre du chlorhydrate d'azaproline dans l'éthanol à 10^{-3} M

4.5.3 Caractérisation de l'aza-dipeptide Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl par spectroscopie

FTIR

Le spectre FTIR du Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl en pastille de KBr (figure 4.23) enregistre l'apparition d'un pic à 3387 cm^{-1} caractéristique des vibrations d'élongation d'un N-H uréthane et une bande très intense à 1653.21 cm^{-1} relative aux vibrations d'élongation d'un C=O amide tertiaire, ce qui confirme la réussite de la réaction de couplage. La bande à 1706.64 cm^{-1} correspond à la vibration de valence d'élongation de C=O uréthane, par conséquent les bandes à 1330 cm^{-1} et 1301 cm^{-1} peuvent être attribuées aux vibrations d'élongation des C-N amide III et les pics à 1205 cm^{-1} et 1242 cm^{-1} sont caractéristiques du C-N, C-O Uréthane (amide IV). Lorsqu'on passe aux basses fréquences, le spectre présente un pic à 2975.24 cm^{-1} et un épaulement à 2893.92 cm^{-1} correspondant aux vibrations d'élongation des C-H des groupements CH_2 et CH_3 , ce dernier présente également des vibrations d'élongation symétrique et asymétrique à 1388.42 cm^{-1} et 1425.02 cm^{-1} respectivement.

Les pics à 1456 cm^{-1} et 1508 cm^{-1} correspondent à la vibration du noyau aromatique monosubstitué par les pics à 702.03 cm^{-1} et 750.22 cm^{-1} . Les épaulements à 3064.20 cm^{-1} et 3025.73 cm^{-1} sont caractéristiques de la vibration d'élongation des C—H aromatiques. Les bandes à 1163 cm^{-1} et 1091 cm^{-1} représentent les vibrations d'élongation des liaisons C—O et C—N.

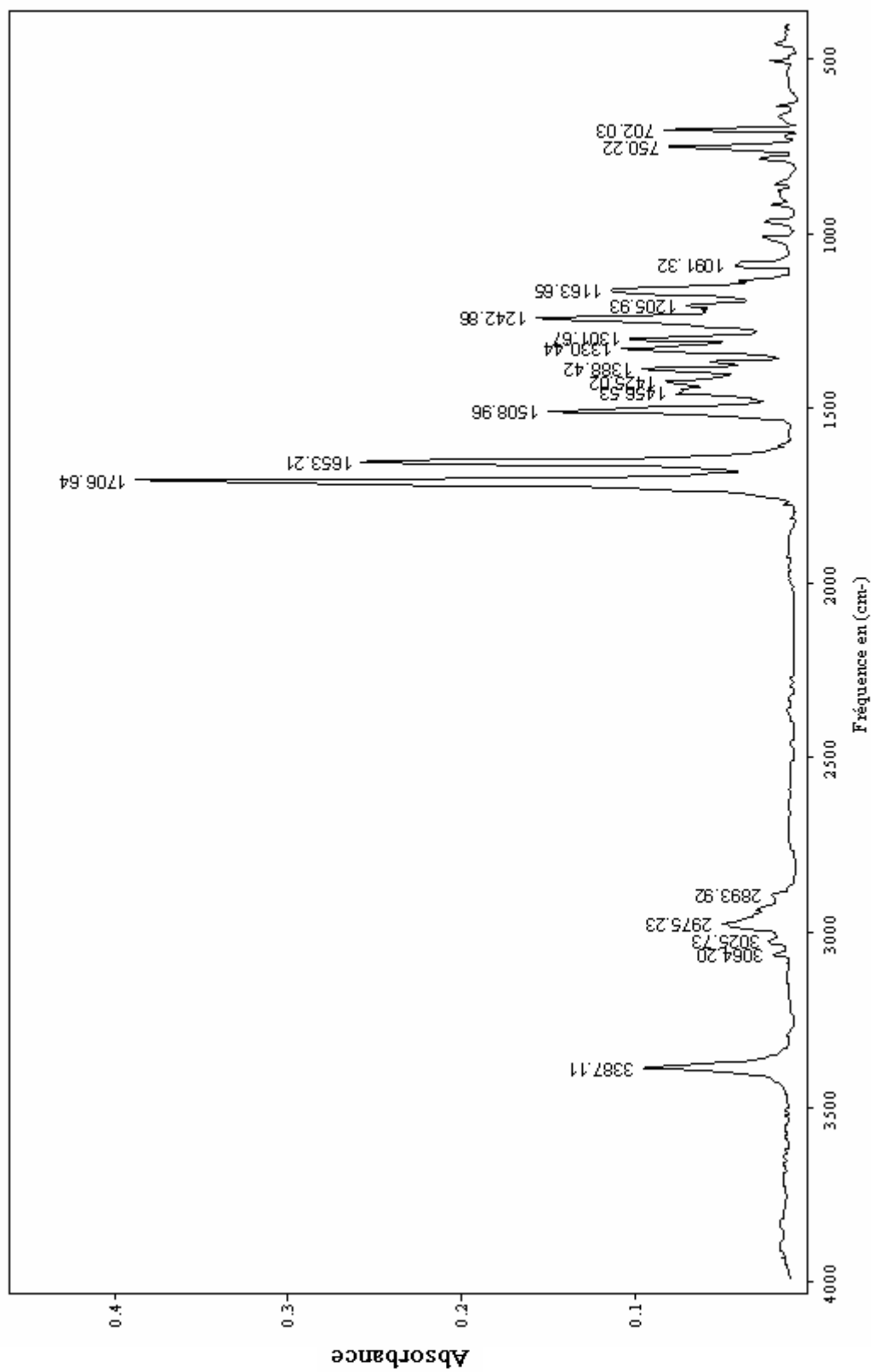


Figure 4.23: Spectre FTIR de l'aza-dipeptide Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl en pastille de KBr

4.5.4 Caractérisation de l'aza-dipeptide Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl par RMN-¹H

Le spectre RMN-¹H (figure 4.25) du Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl (figure 4.24) a été effectué dans le CDCl₃ avec le TMS comme référence. Les deux signaux très intenses à 1.30 ppm et 7.23 ppm d'intégration 9 et 10, présents sur le spectre RMN-¹H de l'aza-dipeptide, proviennent respectivement des 9 protons méthyliques (CH₃)₃ du groupement Boc et des 10 protons aromatiques du groupement benzyloxycarbonate (Z) et de la phénylalanine.

Les protons (γCH₂) sont équivalents, ils se couplent avec les quatre protons βCH₂ et δCH₂, ce couplage est présent par un large multiplet à 1.84 ppm. Les deux protons βCH₂ ne sont pas équivalents magnétiquement et se couplent différemment avec les deux protons δCH₂ non équivalents aussi. Par conséquent, les deux protons 1Hβ+ 1Hδ (1Hδ + 1Hβ) présentent un large multiplet à 3 ppm tandis que les signaux à 3.80 ppm et 4.35 ppm correspondent aux deux protons 1Hδ'+ 1Hβ'(1Hβ' + 1Hδ').

Les signaux à 5.25 ppm, 5.0 ppm et 4.86 ppm sont attribués respectivement aux 4 protons suivant ; 2H du Z(CH₂) du groupement OBzl, 1H du NH^σ-CO-O et 1 H lié au C^α de la phénylalanine, ce dernier proton déblindé à cause de la présence de l'azote et la fonction urétane voisins, représente la partie X du système ABX formé avec les deux protons τ et μ de la phénylalanine. Les deux Parties A et B du système ABX correspondant aux deux protons τ et μ de la phénylalanine, sont représentées sur le spectre par un multiplet autour de 3 ppm. Le singulet à 1.60 ppm d'intégration 2 dans le CDCl₃ est caractéristique des deux protons de H₂O présents dans le solvant du lavage du tube RMN.

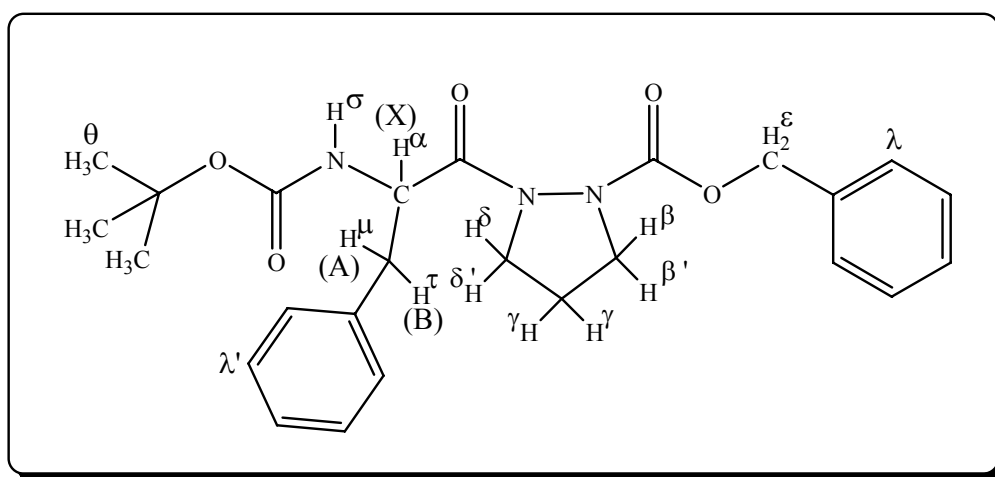


Figure 4.24 : Les différents types de proton dans le Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl

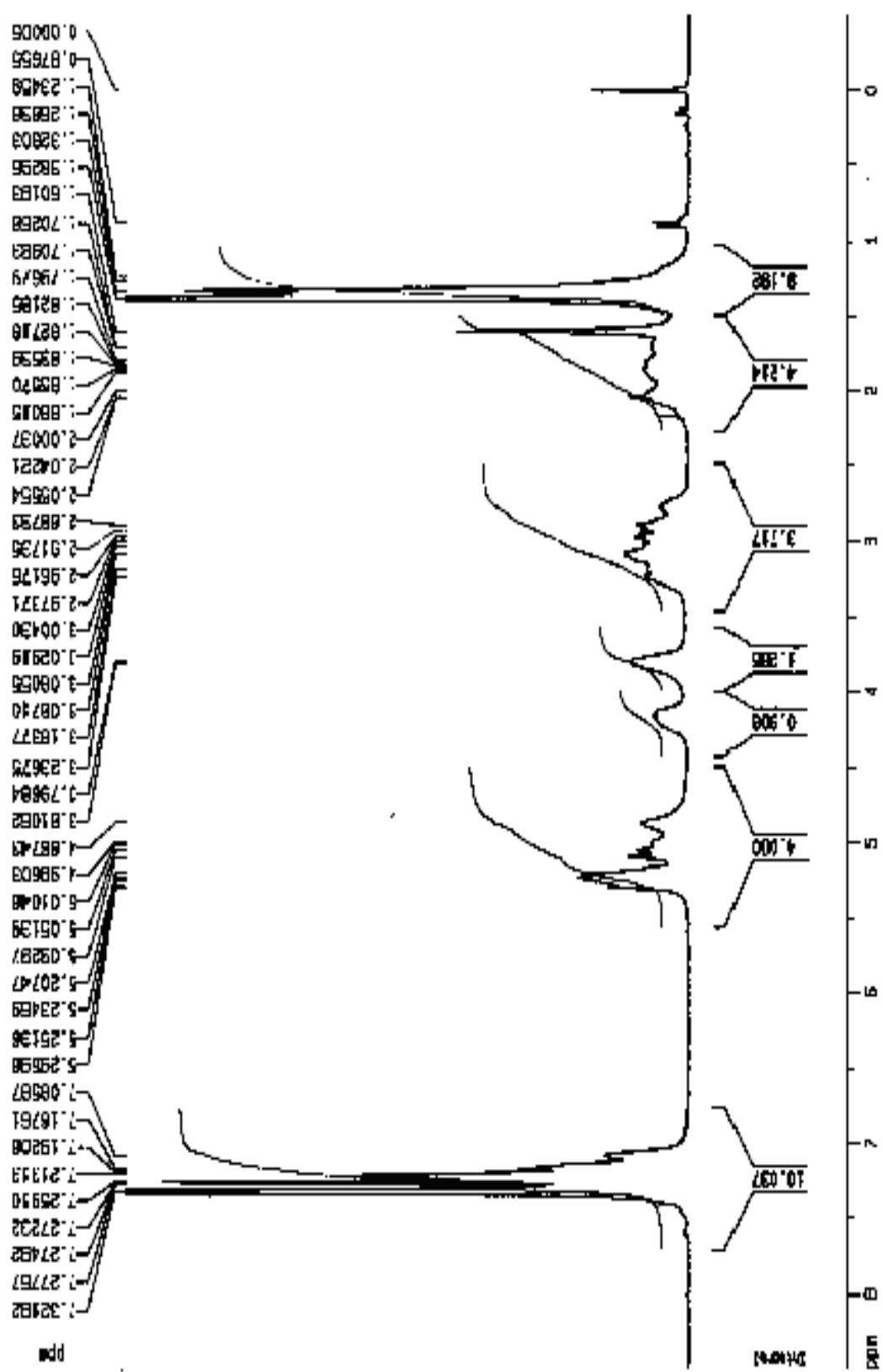


Figure 4.25: Spectre RMN- ^1H du Boc-L-Phe-AzaPro-OBzl dans le CDCl_3 à 300 MHz

CHAPITRE 5 ETUDE THEORIQUE DU RESIDU AZAPROLYL

5.1 Introduction

L'application des méthodes de la chimie quantique à l'étude des molécules s'est révélée être d'un apport non négligeable dans la détermination de leurs propriétés physico-chimiques et de leurs structures géométriques.

Plusieurs études théoriques ont été effectuées sur des aza-amino acides incorporés dans des modèles simples, dans le but essentiel de trouver une corrélation quantitative entre grandeurs quantiques et activités biochimiques, qui permet de prévoir l'activité biologique et thérapeutique d'une quelconque molécule même hypothétique avant son utilisation ou parfois même avant sa synthèse.

5.2 Méthode de Hartree-Fock

La méthode Hartree-Fock (HF) [121] repose sur un principe simple qui stipule que l'interaction électrostatique du type $1/r_{ij}$ (Eq. 5.1), d'un électron i donné d'un atome polyélectronique avec tous les autres électrons j est remplacée par l'interaction de cet électron avec un champ moyen, ou potentiel effectif $V_{\text{eff}(i)}$ (Eq. 5.2), crée par le noyau et la totalité des autres électrons:

$$\hat{H}_{el} = \sum_i -\frac{1}{2}\Delta(i) - \sum_{i,k} \frac{1}{r_{ik}} + \sum_{i(j)} \frac{1}{r_{ij}} = \sum \hat{H}(i) + \sum \hat{H}(i, j) \quad (5.1)$$

$$V_{\text{eff}} = e^2/r_{ij} = \sum \int e^2/r_{ij} \phi_j^2(j) d\tau_j \quad \phi_j : \text{orbitale atomique} \quad (5.2)$$

Chaque électron est décrit par une fonction monoélectronique dite spin-orbitale. La fonction d'onde totale peut être écrite sous la forme d'un déterminant de Slater [122] (Eq. 5.3).

$$\Psi = \frac{1}{(N!)^{1/2}} \begin{vmatrix} \phi_1(1) & \phi_2(1) & \dots & \phi_N(1) \\ \phi_1(2) & \phi_2(2) & \dots & \phi_N(2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \phi_1(N) & \phi_2(N) & \dots & \phi_N(N) \end{vmatrix} \quad (5.3)$$

L'équation monoélectronique de Hartree-Fock (Eq. 5.4) est de la forme:

$$\hat{F}(1)\phi(1) = \epsilon(1)\phi(1) \quad (5.4)$$

Avec $\hat{F}(1)$ est l'opérateur monoélectronique de Fock

$$\hat{F}(1) = \hat{H}(1) + \sum_i \left[\hat{J}_i(1) - \hat{K}_i(1) \right] \quad (5.5)$$

$$\text{Avec : } \hat{J}_i(1)|\phi_i(1)\rangle = \phi_i(1) \int_2 \phi_i^*(2) \frac{1}{r_{12}} \phi_i(2) d\tau_2 \quad (5.6)$$

$$\hat{K}_i(1)|\phi_i(1)\rangle = \phi_i(1) \int_2 \phi_i^*(2) \frac{1}{r_{12}} \phi_i(2) d\tau_2 \quad (5.7)$$

L'opérateur de Coulomb \hat{J}_i (Eq. 5.6) tient compte de la répulsion coulombienne entre les électrons. L'opérateur d'échange \hat{K}_i (Eq. 5.7) représente la modification d'énergie due aux effets de corrélation de spin.

Le fait important ressortant de ces expressions est que l'opérateur \hat{F}_0 dont on cherche les fonctions propres ϕ_k est défini à partir des fonctions $\{\phi\}$ elles mêmes. On doit donc utiliser une *méthode itérative* (ou auto-cohérente, *self consistent*). Un ensemble de *fonctions d'essai* (*initial guess*) $\{\phi\}_0$ (obtenues souvent par la méthode de Hückel généralisée, EHT) fournit une valeur de l'énergie moyenne $\langle E \rangle_0$ et permet de calculer \hat{F}_0 , dont la diagonalisation fournit un nouveau jeu de fonctions $\{\phi\}_1$ qui donne une nouvelle valeur E_1 et un nouvel ensemble $\{\phi\}_2$ etc. On arrête ce processus lorsque deux valeurs consécutives de l'énergie diffèrent de moins d'une valeur fixée d'avance, généralement de 10^{-5} à 10^{-8} hartree.

5.2.1 Modèle de Hartree-Fock pour les molécules polyatomiques

La méthode de Hartree-Fock, pour le calcul des fonctions d'ondes totales approchées d'un système moléculaire, est le prolongement des équations obtenues pour les atomes polyélectroniques. La fonction d'onde totale Ψ est approchée au moyen de fonctions monoélectroniques (OM) dites spin-orbitales, notées (ϕ_k) , comme dans le cas des atomes polyélectroniques. Cette fonction d'onde totale Ψ est prise comme le produit antisymétrique de toutes les fonctions monoélectroniques ϕ_k . C'est la théorie des orbitales moléculaires (LCAO).

5.2.2 Systèmes à couches fermées et ouvertes.

Dans un système à couches électroniques complètes (*closed-shell*), chaque électron est soumis à la répulsion d'un ensemble de paires électroniques, en plus l'électron de spin opposé occupant la même OM. Les OM des électrons α et β sont donc deux à deux dans un environnement identique et on leur attribue à priori les mêmes coefficients: c'est la méthode *RHF* (*Restricted Hartree-Fock*, H-F avec contrainte de spin) RHF ou HF.

Dans des systèmes possédant des couches incomplètes (*open-shell*), les électrons α et β ne sont pas soumis à la même répulsion, on peut donc optimiser indépendamment leurs coefficients orbitales au cours du processus SCF: c'est la méthode *UHF* (sans contrainte de spin, (*Unrestricted H-F*)).

5.3 Bases de calcul

La base de calcul est une description mathématique des orbitales formant un système, elles sont introduites pour faciliter les différentes étapes du calcul théorique. La majorité des bases considèrent les orbitales comme une combinaison linéaire de fonctions gaussiennes.

Les deux bases que nous avons utilisées, la 3-21G* et la 6-31G* sont de type Split valence. Le premier nombre de chaque base représente le nombre de gaussienne décrivant l'orbitale 1S. La présence de deux numéros dans la deuxième partie montre que les orbitales de valence sont décrites par deux types de fonction, et chaque numéro représente le nombre de gaussienne formant chaque fonction.

5.4 Etude théorique de la substitution de carbone C^α par un atome d'azote dans la proline

Afin de donner une description structurale au résidu azaproyl et étudier les perturbations structurales de la substitution du groupe $(CH)^\alpha$ de la proline par un atome d'azote, nous avons procédé à l'optimisation de la géométrie des modèles For-AzaPro-NH₂ et Acé-AzaPro-NHMe par des méthodes ab-initio avec les deux bases 3-21G* et 6-31G*. L'optimisation a été faite à partir des structures générées par Chem3D.

Le choix des modèles à étudier a été basé sur la simplicité, le faible poids moléculaire et la représentation au mieux du résidu prolyl et azaproyl. Nous avons choisi d'utiliser les deux bases, HF/6-31G* et HF/3-21G*, cette dernière est moins coûteuse que la première, elle a été utilisée pour effectuer la surface de l'énergie potentielle du modèle For-AzaPro-NH₂. Les calculs théoriques ont été effectués sur un micro-ordinateur de type Pentium 3.

5.4.1 Etude comparative entre les deux modèles Acé-AzaPro-NHMe et Acé-Pro-NHMe obtenus par optimisation complète sur la base HF/6-31G*

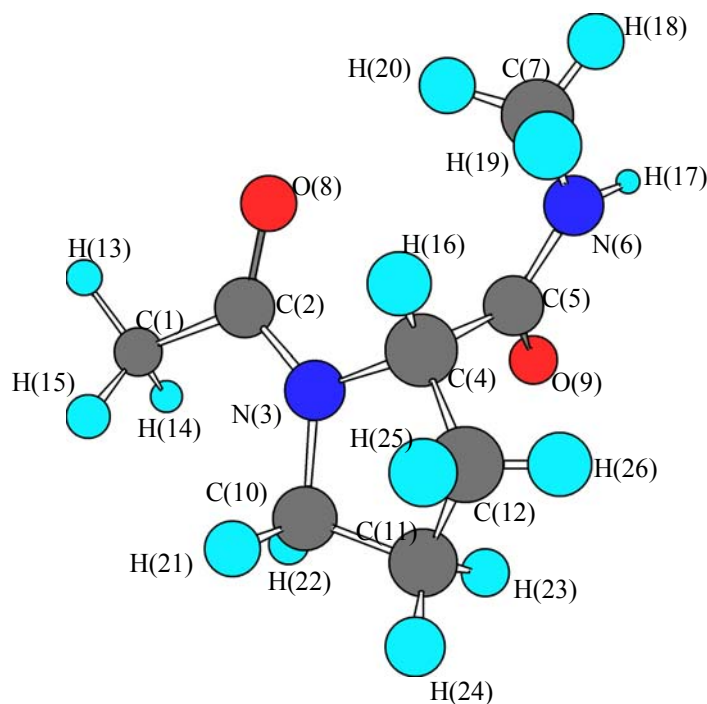


Figure 5.1: Représentation spatiale de la forme la plus stable du modèle Acé-Pro-NHMe

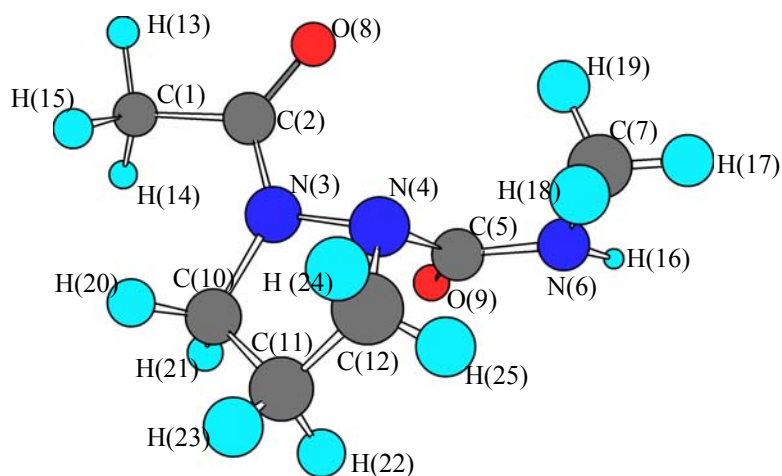


Figure 5.2: Représentation spatiale de la forme la plus stable
du modèle Acé-AzaPro-NHMe

Tableau 5.1: Angles et longueurs des liaisons caractéristiques des résidus prolyl et azaprolyl

Liaisons et angles	Acé-AzaPro-NHMe	Acé-Pro-NHMe
Energie (E: HF/6-31G*)	-585.7095 hartree	-569.7540 hartree
C^2-O^8	1.197 Å	1.207 Å
C^2-N^3	1.361 Å	1.351 Å
$N^3-N^{a/4}$	1.392 Å	1.451 Å
$N^{a/4}-C^5$	1.417 Å	1.53 Å
C^5-O^9	1.196 Å	1.203 Å
C^5-N^6	1.358 Å	1.352 Å
$N^3-N^{a/4}-C^5$	112.654°	
$N^3-N^{a/4}-C^{12}$	103.328°	
$C^5-N^{a/4}-C^{12}$	115.349°	
	$\sum N^a = 331.331^\circ$	

NB. $\sum N^a$ représente la somme des trois angles autour de N^a .

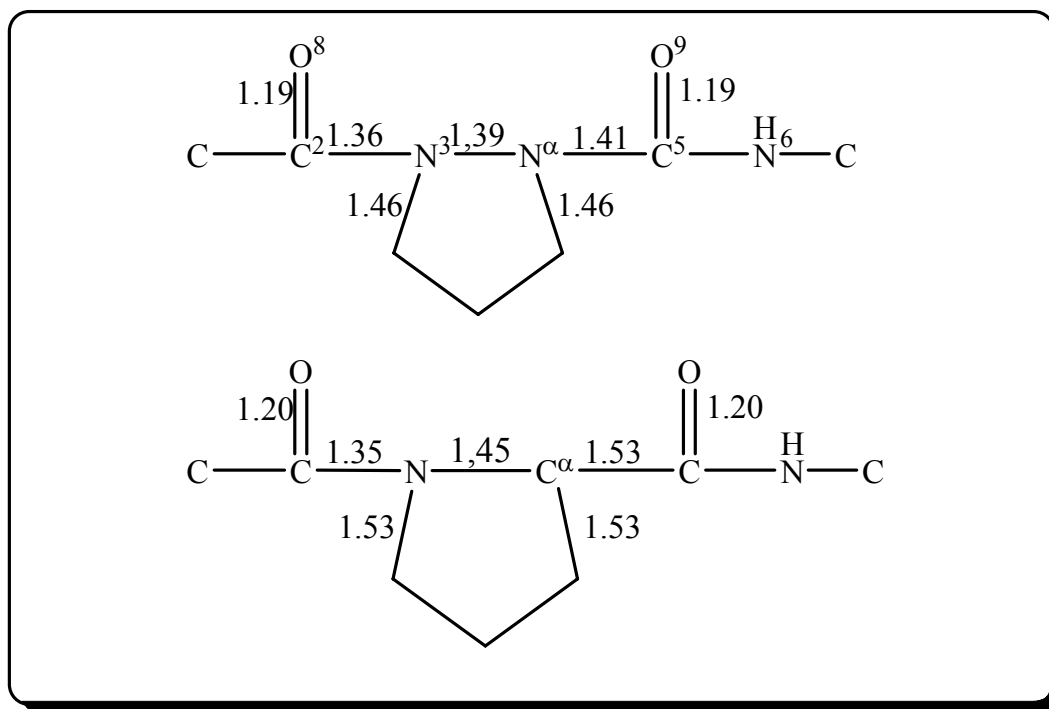


Figure 5.3: Longueurs (Å) des liaisons du motif azapropyl comparées aux dimensions standard du motif peptidique

Les résultats du calcul théorique résumés sur la figure 5.3, montre que la liaison N^{α} -CO est plus courte de 0.12 Å que la liaison C^{α} -CO dans le peptide (figure 5.1). Les liaisons amides qui encadrent le cycle pyrazolidine (figure 5.2) sont plus longues de 0.01 Å. Corrélativement, les liaisons carbonyles C=O sont un peu plus courtes de 0.01 Å. Si les carbonyles conservent la même planéité que dans les peptides (la somme des trois angles de valences est égale à 360°), l'atome d'azote $N^{\alpha/4}$ du cycle pyrazolidine, bien qu'acylé, il est pyramidal. Le caractère pyramidal de cet azote peut être mesuré par l'écart au plan défini par les trois angles autour du N^{α} ($\Delta N^{\alpha} = 0.19$ Å, $\Sigma N^{\alpha} = 331.331^{\circ}$).

La conjugaison électronique dans l'enchaînement CO-N- N^{α} -CO-N est probablement différente de celle dans l'enchaînement peptidique et il en résulte une variation des longueurs de liaison, allongement du lien amide CO- N^{β} , raccourcissement des liaisons N- N^{α} et N^{α} -CO par rapport aux liaisons homologues dans les peptides.

5.4.2 Etude théorique du résidu azaprolyl

Dans le but de voir si la molécule For-AzaPro-NH₂ (figure 5.4) présente des conformations plus stables que celle obtenue par l'optimisation complète de la géométrie, nous avons fait varier les angles dièdres ϕ et ψ , caractéristiques de l'unité azaprolyle par un "Relax Scan" en effectuant des optimisations avec une variation systématique d'un pas de 30° des deux angles ϕ et ψ . Le changement de la conformation nécessite la relaxation de toutes les coordonnées moléculaires sauf ϕ et ψ , pour permettre à tous les atomes de se placer dans l'espace au mieux afin d'atténuer les répulsions.

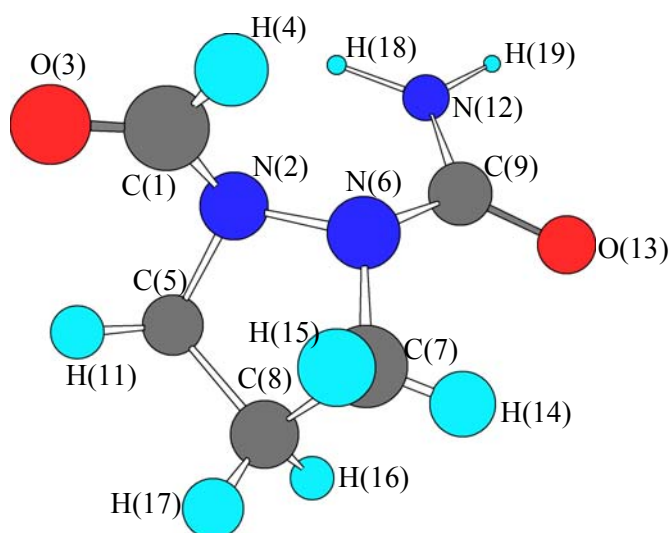


Figure 5.4: La géométrie la plus stable du PES du modèle For-AzaPro-NH₂ obtenue par optimisation sur HF/6-31G* et réoptimisation sur la base HF/3-21G* (voir appendice B)

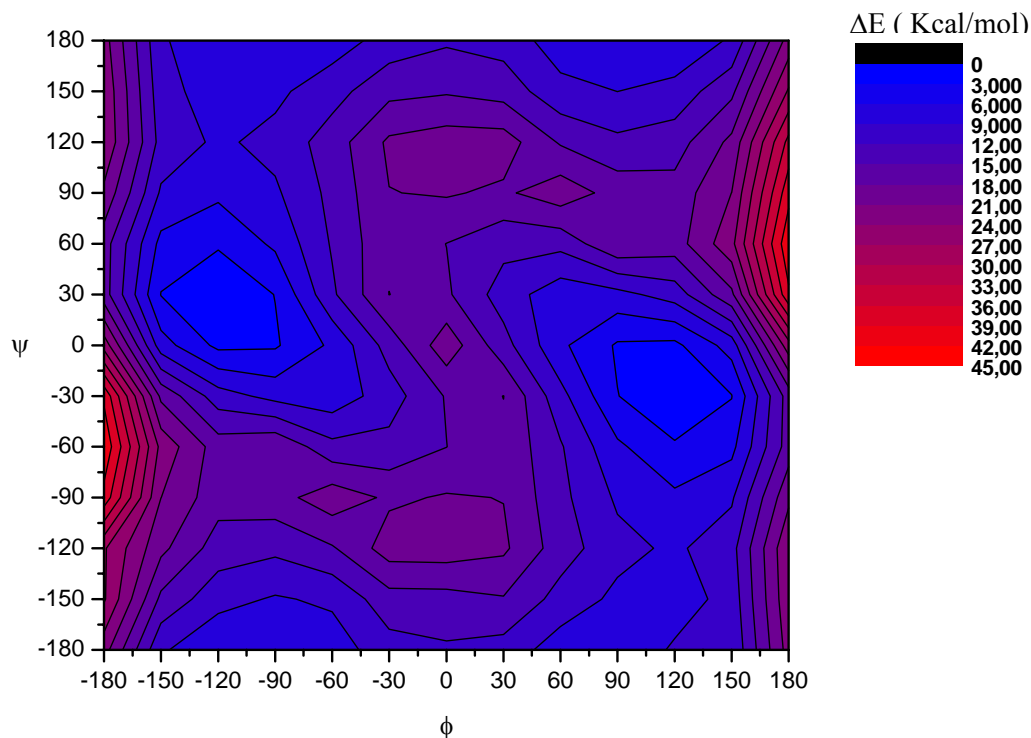


Figure 5.5: La surface de l'énergie potentielle (PES) du modèle For-AzaPro-NH2 obtenue par la méthode HF/3-21G*

$$E^{\circ} (\text{HF}/6\text{-}31\text{G}^*//3\text{-}21\text{G}^*) = -504.82007 \text{ hartrée}$$

ΔE : Energie relative par rapport à E° .

La surface de l'énergie potentielle présente une symétrie par rapport au point (0,0). Pour les conformations les plus stables (stériquement permises) (figure 5.5) l'angle de rotation ϕ autour de la liaison centrale N-N $^{\alpha}$ adopte les valeurs $\pm 120^{\circ} \pm 30^{\circ}$ tandis que l'angle ψ autour de N $^{\alpha}$ -C(O) est dans la zone de $\pm 30^{\circ} \pm 30^{\circ}$ et l'optimisation complète donne une valeur de 0° pour l'angle ω . Toutes ces données et plus particulièrement ($\phi = -120.05^{\circ}$, $\psi = 23.51^{\circ}$, $\omega = 22.85^{\circ}$) obtenues par optimisation complète, montrent que l'introduction du résidu azapropylyl en position i+3 favorise un repliement de type β VI avec le résidu qui le précède.

L'azote N $^{\alpha}$, a un caractère sp 3 du fait de sa pyramidicité exprimée par la somme de ces trois angles $\sum N^{\alpha} = 331^{\circ}$, très proche de 328° , caractéristique d'un carbone sp 3 , ce qui lui

confère une prochiralité. Le caractère pyramidale du N^α réduit considérablement la conjugaison électronique du doublet libre de l'azote avec l'orbitale π du carbonyle adjacent et par conséquence, il induit l'allongement du lien $N^\alpha-C^5$ (1.417) par rapport aux liaisons amides standard C^2-N^3 et C^5-N^6 de longueurs 1.361 Å et 1.358 Å respectivement.

Tableau 5.2: Variation de l'énergie et de l'écart au plan ΔN^α du modèle For-AzaPro-NH₂ en fonction de Φ

Φ en degré	ψ en degré	ΔE en Kcal/mol	ΣN^α en degré	ΔN^α Å
-180	30	16,3277	322.384	0.232
-150	30	2,8439	332.323	0.195
-120	30	0,1568	339.860	0.163
-90	30	3,081	344.351	0.143
-60	30	11,4645	349.137	0.118
-30	30	18,0346	355.865	0.072
0	30	15,4808	354.219	0.085

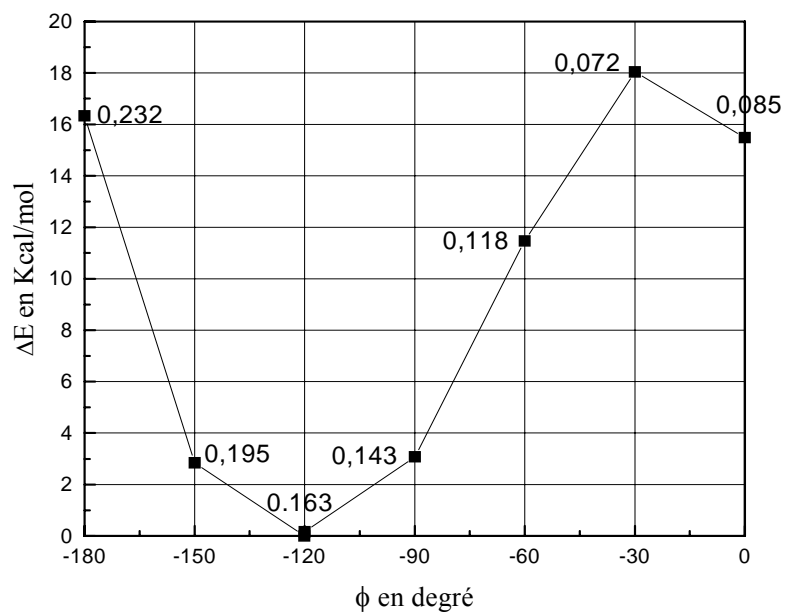


Figure 5.6: Courbe de l'énergie potentielle HF/3-21G* de la rotation autour de la liaison $N-N^\alpha$. L'écart au plan est donné en Å

La courbe de l'énergie potentielle HF/3-21G* décrivant la rotation autour de la liaison $N-N^\alpha$ donnée par la figure 5.6, montre que le seul minima entre -180° et 0° et qui correspond à

$\varphi = -120^\circ$ présentent un caractère pyramidale de $\Delta N^\alpha = 0.163$, la somme $\sum N^\alpha$ et l'écart au plan ΔN^α changent considérablement avec l'angle de rotation autour de $N-N^\alpha$. la pyramide avec le plus grand écart au plan est obtenue pour $\varphi = -180^\circ$, tandis que la planéité prédomine pour un $\varphi = 0^\circ$ (tableau 5.2).

La rotation autour de la liaison $N^\alpha-CO$ au voisinage du minimum global (figure 5.7) peut donner des écarts aux plans (ΔN^α) (tableau 5.3) plus accrus que ceux obtenus par la rotation autour de la liaison $N-N^\alpha$ et qui nécessite plus d'énergie à cause de la contrainte du cycle (tableau 5.2).

Tableau 5.3: Variation de l'énergie et de l'écart au plan ΔN^α du modèle For-AzaPro-NH₂ en fonction de ψ

φ en degré	ψ en degré	ΔE en Kcal/mol	$\sum N^\alpha$ en degré	ΔN^α Å
-120	0	2.2464	347.772	0.12
-120	30	0.1568	339.856	0.163
-120	60	3.3760	331.255	0.198
-120	90	6.6202	325.057	0.221
-120	120	8.4588	323.682	0.226
-120	150	7.3795	325.887	0.218
-120	180	6.3503	331.884	0.195

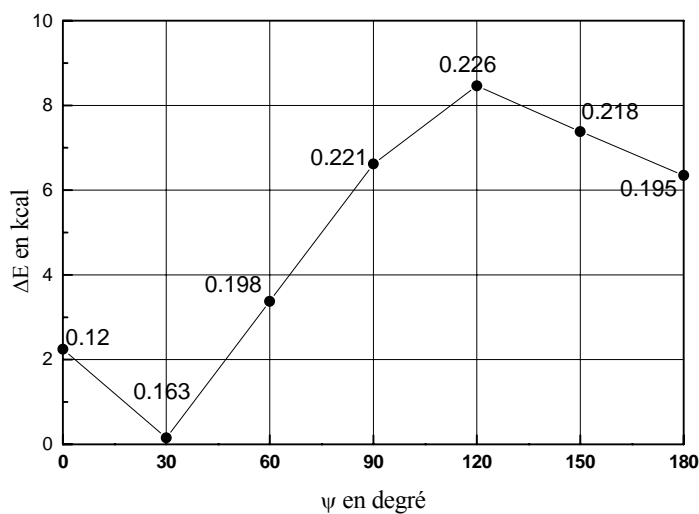


Figure 5.7: Courbe de l'énergie potentielle HF/3-21G* de la rotation autour de la liaison $N^\alpha-CO$ (ψ). L'écart au plan est donné en Å.

5.5 Conclusion

Du point de vue du calcul théorique sur les modèles For-AzaPro-NH₂, Acé-Pro-NHMe, Acé-AzaPro-NHMe, la substitution du (CH)^α par un atome d'azote dans la proline induit des perturbations structurales locales très importantes; l'atome d'azote α acquiert un caractère pyramidale qui le rapproche d'un azote sp³ et lui confère une prochiralité. En conséquence, les liaisons N-CO de chaque côté de cycle sont plus longues que celles des liens amides standard. L'étude de la surface de l'énergie potentielle du modèle For-azaPro-NH₂ montre que le résidu azaproyl favorise un repliement de type βVI avec le résidu qui le précède (i+1).

L'étude de l'énergie en fonction des deux angles φ et ψ séparément, montre que la barrière de rotation autour de la liaison N—N^α (φ) est plus grande qu'autour de la liaison N^α—CO à cause de la contrainte de cycle. La variation des deux angles φ et ψ séparément influe aussi sur le caractère pyramidal de l'azote N^α. Pour la même variation autour du minimum global, ψ donne des écarts au plan plus accrus que φ.

CONCLUSION

Nous avons porté dans ce travail un grand intérêt à la synthèse du résidu azaprolyl et son couplage avec la phénylalanine à chaîne latérale hydrophobe et encombrante. Du fait que l'aza-résidu est composé de deux parties, la partie urée et la partie hydrazine, nous avons procédé en premier lieu à la protection régiosélective du N^β-tertiobutylhydrazine par le groupement benzyloxycarbonyl pour générer le N^α-benzyloxycarbonyl-N^β-tertiobutylloxycarbonylhydrazine sous forme cristalline pure. Le rendement de cette réaction et la qualité des cristaux dépendent de la nature de la base utilisée. Avec la triéthylamine on a obtenu un produit difficile à cristalliser tandis qu'avec la N-méthylmorpholine, des cristaux blancs sont obtenus par cristallisation, sans passer par chromatographie sur colonne. En outre, cette protection a été détectée par FTIR et la régiosélectivité est confirmée par RMN-¹H.

La deuxième étape est l'étape déterminante. Elle consiste à préparer le précurseur du résidu azaprolyl en réalisant la synthèse sous forme cristalline pure du cycle pyrazolidine protégé sur ces deux atomes d'azote par deux fonctions uréthanes différentes (Boc et Z) avec déprotection orthogonale. Comme la réaction de couplage de l'azaproline à la phénylalanine exige une extrémité N-terminal libre, on a déprotégé le synthon obtenu par clivage du groupement tertibutylloxycarbonyl (Boc) en milieu acide. Le rendement de la réaction est quasiment quantitative et donne un produit pur après lyophilisation et recristallisation.

Afin d'incorporer le résidu azaprolyl dans un peptide, nous avons proposé un protocole de synthèse faisant appel au triphosgène, un solide stable, pour la C-activation de la phénylalanine N-protégée. Contrairement aux méthodes utilisées et décrites dans la littérature et qui nécessitent des conditions sévères (reflux pendant plusieurs heures), ce réactif permet de travailler à faible température avec des temps de réaction réduits et donne des produits purs. Une fois que la réaction de couplage du chlorhydrate de l'AzaPro-OBzl à la phénylalanine suivie par CCM est effectuée avec succès, l'azadipeptide est récupéré sous forme de cristaux blancs. Tous les produits synthétisés ont été caractérisés par spectroscopie FTIR, RMN-¹H et UV.

Sur le plan structural et d'après les calculs théoriques, l'azote N^α du résidu azaprolyl acquiert un caractère pyramidal qui le rapproche d'un azote sp³ et lui confère une prochiralité résultant de la répulsion stérique, ce qui facilite sa participation éventuelle à une liaison hydrogène. En conséquence, les liaisons N-CO de chaque côté de l'hétérocycle sont plus longues que celles des liens amides standard et la conjugaison électronique dans l'enchaînement CO-N-N^α-CO-N est donc différente de celle de l'enchaînement peptidique CO-N-C^α-CO-N. Les calculs ab-initio, montrent que le résidu azaprolyl favorise un repliement de type pseudo βVI avec le résidu qui le précède contrairement au résidu prolyl qui favorise un repliement βVI avec le résidu qui le suit.

APPENDICE A
LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

Ala:	Alanine
Arg:	Arginine
Asp:	Asparagine
AzaTic:	Acide 3,4-dihydro-2(1H)-phtalazinecarboxylique
Cys:	Cystéine
Ile:	Isoleucine
Leu:	Leucine
Lys:	Lysine
Phe:	Phénylalanine
Pro:	Proline
Pip:	Acide pipecolique
Tyr:	Tyrosine
Acé:	Acétyle
For:	Formyle
Boc :	Tertiobutyloxycarbonyle
Fmoc :	Fluorénylméthylloxycarbonyle
Z:	Benzyloxycarbonyle
Z-Cl:	Chloroformiate de benzyle
DCC:	Dicyclohexylcarbodiimide
HOBT:	Hydroxybenzotriazole
Cl-CO ₂ -Ar:	Chlorocarbonate d'aryle
OC(ONp) :	Bis-(2,4-dinitrophényl)carbonate
Cl-CO ₂ -Tcp:	Chlorocarbonate de 2,4,5-trichlorophényle
Boc-OTcp:	Tertiobutyloxycarbonyloxy de 2,4,5-trichlorophényle
Z-OSu :	N-(Benzyloxycarbonyloxy) Succinimide

AcOEt :	Acétate d'éthyle
DCM :	Dichlorométhane
DMAP:	4-Diméthylaminopyridine
DMF :	Diméthylformamide
EP :	Ether de pétrole
Et ₂ O :	Ether diéthylique
EtOH	Ethanol
Hx :	Héxane
MeOH	Méthanol
iPrOH :	Isopropanol
NEt ₃ :	Triéthylamine
NMM :	N-méthylmorpholine
THF :	Tétrahydrofurane
TMS:	Tétraméthylsilane
CCM :	Chromatographie sur couche mince
FTIR:	Infrarouge à transformée de Fourier
RMN- ¹ H:	Résonance magnétique nucléaire du proton
d (RMN- ¹ H)	Doublet
m (RMN- ¹ H)	Multiplet
s (RMN- ¹ H)	Singulet
ppm:	Partie par million
Rd:	Rendement

APPENDICE B

B.1. Données de l'optimisation complète du modèle For-AzaPro-NH₂

E (HF/6-31G**/HF/3-21G*) = -504.82007 hartree

C(1)-N(2)	1.380	C(8)-C(7)-H(15)	111.268
C(1)-O(3)	1.208	H(14)-C(7)-H(15)	110.626
C(1)-H(4)	1.080	C(5)-C(8)-C(7)	104.459
N(2)-C(5)	1.489	C(5)-C(8)-H(16)	110.161
N(2)-N(6)	1.422	C(5)-C(8)-H(17)	111.588
C(5)-C(8)	1.561	C(7)-C(8)-H(16)	109.947
C(5)-H(10)	1.078	C(7)-C(8)-H(17)	111.687
C(5)-H(11)	1.078	H(16)-C(8)-H(17)	108.937
N(6)-C(7)	1.478	N(6)-C(9)-N(12)	114.667
N(6)-C(9)	1.405	N(6)-C(9)-O(13)	120.470
C(7)-C(8)	1.553	N(12)-C(9)-O(13)	124.843
C(7)-H(14)	1.075	C(9)-N(12)-H(18)	121.537
C(7)-H(15)	1.080	C(9)-N(12)-H(19)	118.052
C(8)-H(16)	1.081	H(18)-N(12)-H(19)	120.351
C(8)-H(17)	1.080	O(3)-C(1)-N(2)-C(5)	-24.345
C(9)-N(12)	1.346	O(3)-C(1)-N(2)-N(6)	-158.495
C(9)-O(13)	1.218	H(4)-C(1)-N(2)-C(5)	157.009
N(12)-H(18)	0.994	H(4)-C(1)-N(2)-N(6)	22.857
N(12)-H(19)	0.995	C(1)-N(2)-C(5)-C(8)	-120.096
N(2)-C(1)-O(3)	123.848	C(1)-N(2)-C(5)-H(10)	120.260
N(2)-C(1)-H(4)	111.712	C(1)-N(2)-C(5)-H(11)	0.633
O(3)-C(1)-H(4)	124.425	N(6)-N(2)-C(5)-C(8)	16.541
C(1)-N(2)-C(5)	120.299	N(6)-N(2)-C(5)-H(10)	-103.105
C(1)-N(2)-N(6)	115.307	N(6)-N(2)-C(5)-H(11)	137.279
C(5)-N(2)-N(6)	109.150	C(1)-N(2)-N(6)-C(7)	105.452
N(2)-C(5)-C(8)	104.184	C(1)-N(2)-N(6)-C(9)	-120.052
N(2)-C(5)-H(10)	109.857	C(5)-N(2)-N(6)-C(7)	-33.570
N(2)-C(5)-H(11)	107.942	C(5)-N(2)-N(6)-C(9)	100.927
C(8)-C(5)-H(10)	111.581	N(2)-C(5)-C(8)-C(7)	5.674
C(8)-C(5)-H(11)	113.326	N(2)-C(5)-C(8)-H(16)	-112.360
H(10)-C(5)-H(11)	109.729	N(2)-C(5)-C(8)-H(17)	126.501
N(2)-N(6)-C(7)	106.179	H(10)-C(5)-C(8)-C(7)	124.147
N(2)-N(6)-C(9)	117.391	H(10)-C(5)-C(8)-H(16)	6.108
C(7)-N(6)-C(9)	117.999	H(10)-C(5)-C(8)-H(17)	-115.025
N(6)-C(7)-C(8)	103.439	H(11)-C(5)-C(8)-C(7)	-111.390
N(6)-C(7)-H(14)	108.827	H(11)-C(5)-C(8)-H(16)	130.575
N(6)-C(7)-H(15)	108.713	H(11)-C(5)-C(8)-H(17)	9.437
C(8)-C(7)-H(14)	113.607	N(2)-N(6)-C(7)-C(8)	35.710

N(2)-N(6)-C(7)-H(14)	156.810
N(2)-N(6)-C(7)-H(15)	-82.630
C(9)-N(6)-C(7)-C(8)	-98.460
C(9)-N(6)-C(7)-H(14)	22.640
C(9)-N(6)-C(7)-H(15)	143.199
N(2)-N(6)-C(9)-N(12)	23.511
N(2)-N(6)-C(9)-O(13)	-158.023
C(7)-N(6)-C(9)-N(12)	152.629
C(7)-N(6)-C(9)-O(13)	-28.908
N(6)-C(7)-C(8)-C(5)	-24.637
N(6)-C(7)-C(8)-H(16)	93.543
N(6)-C(7)-C(8)-H(17)	-145.401
H(14)-C(7)-C(8)-C(5)	-142.449
H(14)-C(7)-C(8)-H(16)	-24.270
H(14)-C(7)-C(8)-H(17)	96.790
H(15)-C(7)-C(8)-C(5)	91.913
H(15)-C(7)-C(8)-H(16)	-149.907
H(15)-C(7)-C(8)-H(17)	-28.849
N(6)-C(9)-N(12)-H(18)	-6.405
N(6)-C(9)-N(12)-H(19)	176.404
O(13)-C(9)-N(12)-H(18)	175.218
O(13)-C(9)-N(12)-H(19)	-1.951

REFERENCES

1. Arosio, D., Bertoli, M., Manzonib, L., Scolastico, C., *Tetrahedron Letters*, 47, (2006), 3697-3700.
2. Patch, J.A., Barron, A.E., *Current Opinion in Chemical Biology*, 6, (2002), 872-877.
3. Ahn, J.M., Boyle, N.A., MacDonald, M.T., Janda, K.D., *Mini-Rev. Med. Chem.* 2, 5, (2002), 463-473.
4. Martin-Martinez, M., Patino-Molina, R., Garcia-Lopez, M.T., Gonzalez-Muniz, R., *Mini-Rev. Med. Chem.* 4, (2004), 669-680.
5. Melendez, R.E., Lubell, W.D., *J. Am. Chem. Soc.* 126, 21, (2004), 6759-6764.
6. Vilme, M., Edwards, D., Macpherson-barkere, S., MPM, BCPS. *Drug Forecast*, 30, 1, (2005), 27-35.
7. Khanlou, H., Louie, Stan Pharm., Farthing, C., *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 41, 3, (2006), 394.
8. Andreotti, A.H., *Biochemistry*, 42, (2003), 9515-24.
9. Wedemeyer, W.J., Welker, E., Scheraga, H.A., *Proline cis-trans isomerization and protein folding.*, *Biochemistry*, 41, (2002), 14637-14644.
10. Marshall, G.R. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2, (1992), 904-919.
11. Gibson, S.E., Guillo, N., Tozer, M.J., *Tetrahedron*, 55, (1999), 585-615.
12. *Biochemical Nomenclature and Related Documents*, 2nd edition, Portland Press, (1992), 39-67.
13. Wiberg, K.B., Breneman, C.M., *J. Am. Chem. Soc.* 114, (1992), 831-840.
14. Fogarasi, G., Szalay, P.G., *J. Phys. Chem. A.*, 101, (1997), 1400-1408.
15. Schulz, G.E., Schirmer, R.H., *Principles of Protein Structure (Cantor, C.R. Series Ed.)* Springer, New York, 19, (1979).
16. MacArthur, M.W., Thornton, J.M., *J. Mol. Biol.* 264, (1996), 1180-1195.
17. Rose, G.D., Gierach, L.M., Smith, J.A., *Adv. Protein Chem.* 37, (1985), 100-109.
18. Ramachandran, C.N., Sasisekharan, V., Thathachari, Y.T., *Structure of collagen at the molecular level in collagen.*, Ramanathan (Ed). John Wiley, New York, (1963), 81-115.
19. Cung, M.T., Marraud, M., Néel, J., *Am. Chim. (Paris)*, 7, (1972), 183-209.
20. Etzkorn, F.A., Travins, J.M., Hart, S.A., *In advances in Amino Acide Mimetics and peptidomimetics*, Bell. A. Ed. JAIPress inc. Stamford, 2, (1999), 126-163.
21. Cung, M.T., Marraud, M., Néel, J., *Ann Chim. Paris*, (1972), 183-209.

22. Boussard, G., Cung, M.T., Marraud, M., Néel, J., *J. Chim. Phys. Biol.* 71, (1974), 1159-1166.
23. Boussard, G., Marraud, M., Aubry, A., *Biopolymers*, 18, (1979), 1297-1331.
24. Marshall, G.R. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2, (1992), 904-919.
25. Marshall, G.R., *Biopolymers*, 60, (2001), 246-277.
26. Che, Y., In. *Molecular biophysics*. Washington University. StLouis, MO. (2003), 1-208
27. Halab, L., Lubell, W.D., *J. Am. Chem. Soc.* 124, (2002), 2474-2484.
28. Okada, Y., *Current Organic chemistry*, 5, 1, (2001), 1-43.
29. Aimoto, S., *Current Organic Chemistry*, 5, 45, (2001), 45-87.
30. Agami, C., Couty, F., *Tetrahedron*, 58, (2002), 2701-2724.
31. Kocienski, P.J., *Protecting groups*, 3rd Edition Thieme Verlag, (2004).
32. Jarowicki, K., Kocienski, P., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, (2000), 2495-2527.
33. Gowda, C., Mahesh, B., *Protein and Peptide Letters*, 9, 3, (2002), 225-230.
34. Albericio, F., *Biopolymers, Pept. Sci.* 55, (2000), 123-139.
35. Anwer, M.K., Spatola, A.F., *Synthesis*, (1980), 929.
36. Vommina, V., Babu, S., Ananda, K., Ramu, G., Kamur, V.J., *Chem. Soc., Perkin trans. 1*, (2000), 4328-4331.
37. Vedejs, E., Lin, S., Klapars, A., Wang, J., *J. Am. Chem. Soc.* 118, (1996), 9796.
38. Depew, K.M., Marsden, S.P., Zatorska, D., Zatorski, A., Bormann, W. G., Danishefsky, S.J., *J. Am. Chem. Soc.* 121, (1999), 11953-11963.
39. Kaduc, C., Wenschuh, H., Beyermann, M., Forner, K., Carpino, L.A., Bienert, M., *Lett. Pept. Sci.* 2, (1996), 285-288.
40. Zeggaf, C., Poncet J., Jouin P., Dofour M.N., Castro, B., *Tetrahedron*, 45, (1989), 5039.
41. Green, M., Berman, J., *Tetrahedron Lett.* 31, (1990), 5851-5854.
42. Deng, J., Hamada, Y., Shioiri, T., *Tetrahedron Letters*, 37, (1996), 2261-2264.
43. East, S.P., Joullié, M.M., *Tetrahedron Lett.* 39, (1998), 7211-7214.
44. Carpino, L.A., *J. Am. Chem. Soc.* 115, (1993), 4397.
45. Sabatino, G., Mulinacci, B., Alcaro, M.C., Chelli, M., Rovero, P., Papini, A.M., *Lett. Pept. Sci.* 9, (2002), 119-123.
46. Albericio, F., Chinchilla, R., Dodsworth, D.J., Najera. *Org. Prep. Proc. Int.* 33, (2001), 202.
47. Marder, O., Shvo, V., Albericio, F., *Chimica oggi.* 37, (2002), 7-8.
48. Marder, O., Albericio, F., *Chimica oggi.* (2003).
49. Han, S.Y., Kin, Y.A., *Tetrahedron*, 60, (2004), 2447-2467.

50. Ueiki, M., Yanagihare, T., In peptide 1998 (proceeding of the 25 th European peptide Symposium. Ajus, S.B., Hudez., Z.F., Ed. Akademiai. Kiado. Budapest, (1998), 252.
51. Ramage, R., Ashton, C.P., Hopton, D., Parrot, M.J., Tetrahedron Lett. 25, (1984), 4825.
52. Carpino, L.A., Ionescu, D., El Faham, A., Beyermann, M., Heenklen, P., Hanay, C., Wenschuh., Bienert, M., Org. Lett. 5, (2003), 975-977.
53. Sieber, P., Riniker, B. Tetrahedron Lett. 28, (1987), 6031-6034.
54. Jass, P.A., Rosso, V.W., Saibaba, R., Soundararajan, N., Venit, J.J., Andrew, R., Swaminathan, S., Livshitz, J., Delaney, E.J., Tetrahedron, 59, (2003), 9019-9029.
55. Wiley, R.A., Rich, D.H., Med. Res. Rev. 13, (1993), 327-3884.
56. Fauchere, J.L., Thurieau, C., Adv. Drug. Res. 23, (1992), 127-159.
57. Shao, H., Rueter, J.K., Goodman, M., J. Org. Chem. 63, (1998), 5240-5244.
58. Jung, G., Brückner, H., bosch, R., Winter, W., Schaal, H., Sträckle, J., Liebigs. Ann. Chem. (1983), 1096.
59. Aubry, A., Marraud, M., Biopolymers, 25, (1986), 228-244.
60. Verdini, A.S., Silvestri, S., Becherucci, C., Longobardi, M.G., Parente, L., Peppoloni, S., Perretti, M., Pileri, P., Pinori, M., Viscomi, G.C., J Med Chem. 34, 12, (1991), 3372-3379.
61. Freidinger, R.M., J. Med. Chem. 46, (2003), 5553-5566.
62. Smith, A.B., Liu, H., Hirschmann, R., Org. Lett. 2, 14, (2000), 2037-2040.
63. Genin, M.J., Ojala, W.H., Gleason, W.B., Johnson, R.L., J. Org. Chem. 58, (1993), 2334-2337.
64. Robinson, J.A. Synlett, (2000), 429-441.
65. Giannis, A., Kolter, T., Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 32, (1993), 1244-1267.
66. Davies, J.S., Amino Acids and Peptide (Jones, J.H., Ed.), the Royal Society of chemistry, Cambridge, 22, (1991), 145-199.
67. Goodman Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovrey. Ed. M. E. Wolff. New York, John Wiley Sons, Inc. (1995), 803-861.
68. Thormann, M., Hofmann, H.J., J. Mol. Struct. (THEOCHEM), 469, (1999), 63-76.
69. Ramondo, F., Bencivenni, L., J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, (1995), 1797-1804.
70. Zouikri, M., Boussard, M., Didierjean, C., Del Duca, V., Aubry, A., (1995) in Maia M.L.S, Ed., Peptides 1994, Proceeding of the 23th European Peptide Symposium, pp. 601-2, ESCOM, Leiden, the Netherlands.
71. Leea, H.J., Leeb, M.H., Choia, Y.S., Parka, H.M., Leea, K.B., Journal of Molecular Structure (Theochem), 631, (2003), 101-110.
72. Didierjean, C., DelDuca, V., Benedetti, E., Aubry, A., Zouikri, M., Marraud, M., Boussard, G.J., Pept. Res. 50, (1997), 451-457.

73. André, F., Vicherat, A., Boussard, G., Aubry, A., Marraud, M., *J. Pept. Res.* 50, (1997), 372-381.
74. Lee, H.A., Choi, K.H., Ahn, I.A., Ro, S., Jang, H.G., Choi, Y.S., Lee, K.B., *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)*, 569, (2001), 43-54.
75. Lee, H.J., Ahn, I.A., Ro, S., Choi, K.H., Choi, Y.S., Lee, K.B., *J. Peptide Res.* 56, (2000), 35-46.
76. Torrini, I., Pagani Zechini, G., Paglialunga Paradisi, M., Mastropietro, G., Lucent. G., Gavuzzo. E., Mazza. F., *Tetrahedron*, 55, (1999), 2077-2090.
77. André, F., Boussard, G., Marraud, M., Didierjean, C., Aubry, A., *Lett Peptide Science*, 2, (1995), 239-242.
78. André, F., Boussard, G., Bayeul, D., Didierjean, C., Aubry, A., Marraud, M., *J. Pept. Res.* 49, (1997), 556-562.
79. Didierjean, C., Aubry, A., Wyckaert, F., Boussard, G.J., *Peptide Res.* 55, (2000), 308-317.
80. Wu, W., Raleigh, D.P., *J. Org. Chem.* 63, (1998), 6689-6698.
81. Hemmerlin, C., Cung, H., Boussard, G., *Tetrahedron Letters*, 42, (2001), 5009-5012.
82. Wyckaert, F., Boussard, G., didierjean, C., Aubry, A., peptide 2000. Eds Jean Martinez And Jean Fehrentz. EDK, Paris, France © (2001).
83. Oehme, C., Bergman, J., Falk, M., Reich, J.G., Vorgt, W.E., Niedrich, M., Pirrwitz, J., Berseck, C., Jung, F., *ActaBiol. Med. Chem.* 28, (1972), 109-131.
84. Ulm, E.H., Mickens, M., Gomez, H.J., Till. A.E., Mand. E., *Clin. Pharmacol.* 14, (1982), 357-62.
85. Folkers, K., Bowers, C.Y., Stepinsky, J., Plunski, T., Stagami, M., Jubi ak, T.Z., *Naturforsch. Teil. B.* 39, (1984), 528-32.
86. *Chem. Drug.* 227, (1987), 379.
87. Gante, J., Krug, M., Lauterbach, G., Weitzel, R., Hiller, W., *J. Pept. Sci.* 1, (1995), 201-206.
88. Han, H., Yoon, J., Janda, K.D., In *Peptidomimetics Protocols*, Kazmierski, W.M., Ed., Humana Press., Totowa, NJ. 23, 106, (1998), 87-102.
89. Han, H., Yoon, J., Janda, K.D., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8, (1998), 117-120.
90. Greenlee, W.J., Thorsett, E.D., Springer, I.P., Patchett, A.A., *Biochem. Biophys. Res Commun*, 122, (1984), 791-797.
91. Xing, R., Hanzlik, K.R., *J. Med. Chem.* 41, (1998), 1344-1351.
92. Wiczerak, E., Drabik, P., Lankiewicz, L., Oidziej, S., Crzonka, Z., Abrahamson, M.A., Grubb, A., Bromme. D., *J. Med. Chem.* 45, (2002), 4202-4211.
93. Powers, J.C., Boon, R., Carroll, D.L., Guption, B.F., Kam, C.M., Nishino, N., Sakamoto, M., Tuhy, P.M., *J. Biol. Chem.* 259, (1984), 4288-4294.

94. Venkatraman, S., Kong, J., Nimkar, S., Wang, Q.M., Aube, J., Hanzlik, R.P., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, (1999), 577-580.
95. Wiczerzak, E., Jankowska, E., Rodziewicz-Motowidło, S., Giedon, A., Łągiewka, J., Grzonka, Z., Abrahamson, M., Grubb, A., Brömme, D., *J. Peptide Res.* 66, 1, (2006), 1-11.
96. James, K.E., Asgian, J.L., Li, Z.Z., Ekici, Ö.D., Rubin, J.R., Mikolajczyk, J., Salvesen, G.S., Powers, J.C., *J. Med. Chem.* 47, 6, (2004), 1553-1574.
97. Hansen, T.K., *Tetrahedron Lett.* 40, (1999), 9119-9120.
98. Zega, A., Mlinsek, G., Sepic, P., Golic-grdadolnik, S., Solmajer, T., Tschopp, T.B., Steiner, B., Kikelj, D., Urleb, U., *Bioorg. Med. Chem.* 9, (2001), 2745-2756.
99. Musial, B.I., Chojnacki, J.K., Coleman, C.I., *Am. J. Health Syst Pharm.* 61, (2004), 1365-1374.
100. Gante, J., *Synthesis*, (1989), 405-413.
101. Gante, J., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, (1994), 1699-1720.
102. Benatalah, Z., Aubry, A., Boussard, G., Marraud, M., *Int. J. peptide Proteine Res.* 38, (1992), 603-605.
103. Lecoq, A., Boussard, G., Marraud, M., Aubry, A., *Tetrahedron Lett.* 33, (1992), 5209-5212.
104. Gray, C.J., Quibell, M., Jiang, K.L., Baggett, N., *Synthesis*, (1991), 141-146.
105. Gupton, B.F., Carrol, D.L., Tuhy, P.M., Kam, C.M., Powes, J.C., *J. Biol. Chem.* 259, (1984), 4279.
106. Lipkowski, A.W., Tam, S.W., Portoghese, P.S., *J. Med. Chem.* 29, (1986), 1222 .
107. Gante, J., Krug, M., Lauterbach, G., Weitzel, R., *Liebigs Ann. Chem.* (1994), 1231-1233.
108. Gante, J., *Ber.* 97, (1964), 2551.
109. Gray, C.J., Ireson, J.C., Parker, R.C. *Tetrahedron*, 33, (1977), 739-743.
110. Niedrich, H., *J. Prakt. Chem.* 314, (1972), 769-779.
111. Niedrich, H., Oehme, C., Bergmann, J., *J. Prakt. Chem.* 316, (1974), 729-741.
112. Gante, J., Kahlenberg, H., *Liebigs Ann. Chem.* (1989), 1058-1087.
113. Lecoq, A., Marraud, M., *Tetrahedron Lett.* 32, (1991), 2765-2768.
114. Andre, F., Marraud, M., Tsouloufis, T., Tzartos, S.J., Boussard, G., *J. Pept. Sci.* 3, (1997), 429-441.
115. Eckert, H., Forster, B., *Angew. Chem. Int. ed. Engl.* 26, (1987), 894-895.
116. Pasquato, L., Modena, G., Cotarca, L., Delogu, P., Mantovani, S., *J. Org. Chem.* 65, (2000), 8224.
117. Malachowski, P.W., Tie, C., Wang, K., Broadrup, L.R., *Org. Chem.* 67, 25, (2002), 8962-8969.

118. Broadrup, R.L., Wang, B., Malachowski, W.P., *Tetrahedron*, 61, 43, (2005), 10277-10284.
119. Han, H., Janda, K.D., *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 11, (1996), 2539-2544.
120. Efimov, V.A., Kalinkina, A.L., Chakhmakhcheva, O.G. *Nucleic Acids Res.* 21, (1993), 5337.
121. Hartree, D.R., *Pro. Cambridge Phil. Soc.* 24, (1928), 89.
122. Hariharan, P.C., Pople, J.A., *Mol. Phys.* 27, (1974), 209.