

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté des Sciences
Département de Chimie

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Chimie-physique Organique

SYNTHESE DE PSEUDOPEPTIDES : CAS DE L'AZAPEPTIDE BOC-GLY-AZAPRO-OBZL ET ANALYSES SPECTROSCOPIQUES

Par

M^{elle} TALEB MERIEM

Devant le jury composé de

O.MOHAMMEDI	Professeur, U. de Blida	Président
N.SALHI	Maître de conférences, U. de Blida	Examineur
Y.FOUDIL-CHERIF	Maître de conférences, USTHB, Alger	Examineur
M.ZOUIKRI	Maître de conférences, U. de Blida	Rapporteur

Blida, Juin 2008

RESUME

Ce présent travail porte sur la synthèse et la caractérisation d'un azapeptide contenant le résidu azaprolyl, l'aza-analogue de la prolyl, résultant de l'échange du CH^α de la prolyl par un atome d'azote.

Le pseudo-azadipeptide en question, le Boc-Gly-Azapro-OBZI, est obtenu en quatre étapes de synthèse ; à commencer par une protection orthogonale du tert-butylcarbazate par le groupement benzyloxycarbonyl. La deuxième étape, qui est considérée comme cruciale est la génération du cycle pyrazolidine par action de l'hydrure de sodium suivi du 1,3-dibromopropane sur le premier produit de synthèse. Le résidu azaprolyl ainsi obtenu est soumis à un traitement par du $\text{HCl}_{(g)}$ dans le but de cliver le groupement tert-butyl oxycarbonyl et de libérer l'extrémité N-terminale de l'azaprolyl sous forme d'un chlorhydrate. Pour coupler la glycine N-protégée au chlorhydrate de l'azaprolyl, nous avons opté pour la méthode des anhydrides faisant appel au triphosgène comme agent de couplage. Ce dernier, permettra l'activation de la partie C-terminale de la glycine sous forme d'anhydride qui réagira in-situ avec le chlorhydrate pour aboutir au produit final.

La conjugaison des méthodes physiques d'analyse: FTIR, RMN- H^1 et dans quelques cas la C.H.N, RMN- C^{13} et DEPT 135, a permis d'identifier chaque produit de la synthèse.

ABSTRACT

The ultimate objective of this work is the synthesis and the characterisation of an azapeptide containing an azaPro residue which results by the substitution of the α -carbon of the prolyl residue by a nitrogen atom.

This azadipeptide, Boc-Gly-azapro-OBZI, is obtained in four steps starting with an orthogonal protection of the tert-butyl carbazate by the carbenzoyl group. The second step which is considered as a crucial one is the formation of the pyrazolidine ring by action of sodium hydride followed by the 1,3-dibromopropane on the first synthesised product. In order to remove the tert-butyl oxycarbonyl group from the azapro residue obtained before, we submitted it to the action of chlorhydric acid gas and we obtained the chlorhydrate of the azaprolyl. Finally, we coupled the glycine to this chlorhydrate by the mixed anhydrides method using triphosgen as a coupling reagent. This later, will activate the carboxylic moiety of the glycine by forming an anhydride which reacts in-situ with the amine moiety of the chlorhydrate of the azaprolyl to lead to the final product.

All the synthesised products have been identified by the physical methods of analyses: FTIR, NMR- ^1H and in some cases C.H.N, NMR- ^{13}C and DEPT 135.

ملخص

يرمي هذا العمل إلى تركيب و الكشف عن أزابيبتيد يحتوي ضمن سلسلته على الجزيء أزابروليل. هذا الأخير هو الأزانظير البروليل الناتج عن استبدال كربونه α بذرة آزوت. للحصول على هذا الأزابيبتيد؛ قمنا أولاً بحماية ثلاثي بوتيل الكريزات بواسطة المجمع Z فتحصلنا على المركب Boc-HN-HN-Z. المرحلة الثانية و التي تعتبر المرحلة الحاسمة في هذا التركيب هي الحصول على الجزيء أزابروليل؛ و هذا بتفاعل NaH متبوع بثنائي بروم البروبان على المركب السابق. بصدد خلع المجمع Boc من الجزيء أزابروليل و تحرير نهايته الأمينية؛ وضعناه تحت تأثير تيار غازي من حمض الكلور للحصول على ملح كلوري الأزابروليل. أخيراً قمنا بتفاعل تركيب بين الغليسين؛ ذو نهاية أمينية محمية؛ و الأزابروليل. تم هذا التفاعل بطريقة الأنيديرات مستعملين كربونات ثنائي (ثلاثي كلور الميثيل) كعون التركيب. كل النواتج المحصل عليها في كل مرحلة من المراحل السابقة تم الكشف عنها بالطرق الفيزيائية التحليلية: FTIR, RMN-H¹ و في بعض الأحيان DEPT 135, RMN-C¹³, C.H.N.

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord, notre vénéré Allah,
le Tout puissant, à qui nous devons le tout.

Le travail présenté dans ce mémoire a été effectué au laboratoire de Chimie-physique Moléculaire et Macromoléculaire, Faculté des Sciences, Université Saâd Dahlab de Blida.

Arrivée au terme de ce travail, je remercie mes chers parents qui étaient à mes côtés et m'ont tant aidée et soutenue. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma sincère gratitude et ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier Monsieur M. ZOUIKRI, Maître de conférences à l'Université de Blida, pour m'avoir permise d'entreprendre cette recherche, pour ses conseils, sa rigueur et sa gentillesse.

Je remercie vivement Madame O.MOHAMMEDI, Professeur à l'Université de Blida, pour avoir accepté d'examiner ce travail, et qui me fait l'honneur de présider la commission d'examen.

Mes plus sincères remerciements s'adressent également à Madame N.SALHI, Maître de Conférences à l'Université de Blida, et à Monsieur Y.FOUDIL-CHERIF, Maître de Conférences à l'USTHB, d'avoir aimablement accepté d'être membre du jury et qui me font l'honneur d'examiner mon travail.

J'adresse mes remerciements aussi au Pr R.BELAL, Directeur de notre laboratoire pour l'aide qui nous procure, pour sa gentillesse et sa modestie.

Un tout grand merci à mes frères, mes soeurs et mon beau frère pour leurs encouragements, leur soutien et leur aide.

Mes remerciements les plus distingués vont à Mr et Mme KHOULI ainsi qu'à Mme S.PERINO et Mr M.DANIEL de l'Université d'Avignon pour leur précieuse aide.

Toute ma gratitude et toute ma reconnaissance vont à mes amies pour leurs encouragements incessants, leur aide et leur soutien.

Enfin, je remercie toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

TABLE DES MATIERES

RESUME	
REMERCIEMENTS	
TABLE DES MATIERES	
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	
INTRODUCTION.....	12
1. LES PEPTIDES	
1.1 Généralités.....	14
1.2 Notation des chaînes peptidiques.....	15
1.3 La liaison peptidique.....	15
1.4 Structure des peptides.....	17
1.5 Synthèse des peptides en phase liquide.....	25
2. LES AZAPEPTIDES	
2.1 Généralités.....	34
2.2 Modification du squelette peptidique.....	34
2.3 Les Azapeptides.....	35
2.4 Propriétés conformationnelles des azapeptides.....	36
2.5 Actions biologiques des azapeptides.....	41
2.6 Synthèse des azapeptides.....	47
3. PARTIE EXPERIMENTALE	
3.1 Choix des groupements protecteurs.....	55
3.2 Agent de couplage.....	56
3.3 Réactions de synthèse de l'azadipeptide.....	56
3.4 Méthodes et techniques d'identification.....	61
4. RESULTATS ET DISCUSSIONS	

4.1 Réaction de synthèse du 1-benzyloxycarbonyl2-tertiobutyloxycarbonyl Hydrazine.....	67
4.2 Réaction de synthèse du 1-benzyloxycarbonyl2-tertiobutyloxycarbonyl Pyrazolidine.....	74
4.3 Réaction de synthèse du chlorhydrate de l'azaproline HCl.H-AzaPro- OBZI	82
4.4 Réaction de synthèse de l'azadipeptide Boc-Gly-AzaPro-OBZI.....	92
CONCLUSION.....	99
REFERENCES	
APPENDICES	

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Structure d'un térapeptide	15
Figure 1.2	Formation d'une liaison peptidique	16
Figure 1.3	Formes résonantes de la liaison peptidique	16
Figure 1.4	Formes cis et trans de la liaison peptidique	16
Figure 1.5	Géométrie et angle de rotation d'une liaison peptidique	17
Figure 1.6	Dimensions de la liaison peptidique	17
Figure 1.7	Structure primaire d'un peptide	18
Figure 1.8	Structure en hélice α	19
Figure 1.9	Structure en feuillet β	20
Figure 1.10	Structure en conformation C_5	21
Figure 1.11	Structure en conformation C_7	21
Figure 1.12	Structure du tour β	22
Figure 1.13	Structure de l'insuline	24
Figure 1.14	Introduction du Boc sur un acide aminé	26
Figure 1.15	Clivage du groupement Boc	26
Figure 1.16	Introduction du Z sur un acide aminé	27
Figure 1.17	Clivage du groupement Z	27
Figure 1.18	Introduction du Fmoc sur un acide aminé	28
Figure 1.19	Clivage du groupement Fmoc	28
Figure 1.20	Schéma d'une réaction de couplage	29
Figure 1.21	Réaction de couplage en utilisant le chlorure de thionyle	29
Figure 1.22	Réaction de couplage en utilisant le DCCI	30
Figure 1.23	Réaction de couplage en passant par les anhydrides	31
Figure 1.24	Schéma général du couplage aux esters actifs	31
Figure 1.25	Structure du HOBt (a), du PNP (b) et du PFP (c).	32
Figure 1.26	Réaction de couplage en employant le PNP	32
Figure 1.27	Structure de la DIEA et la NMM	33
Figure 2.1	Structure d'un amino acide (a) et d'un azaamino acide (b) au sein d'une chaîne peptidique	35

Figure 2.2	Structure de l'hydrazine (a) et du 1,2 diformyl hydrazine (b)	37
Figure 2.3	Structures moléculaires de Boc-Ala-Pip-NHiPr (a) et Boc-Ala-azaPip- NHiPr (b). Les ponts hydrogène intramoléculaires sont indiqués en lignes discontinues	38
Figure 2.4	Repléments β I des structures moléculaires cristallines de Z-azAsn(Me)-Pro-NHiPr 1 (a), Z-azAsp(OEt)-Pro-NHiPr 2 (b) et de Boc-azAla-Pro-NHiPr 3 (c). Les ponts hydrogène intramoléculaires sont indiqués en lignes discontinues	39
Figure 2.5	Repliement β II de la structure moléculaire cristalline de Piv-Pro-azAsn(Me)-NHiPr 4 . Les ponts hydrogène intramoléculaires sont indiqués en lignes discontinues	40
Figure 2.6	Structures moléculaires cristallines de Z-azAsp(NHMe)-Pro-NHiPr 5 (I) et de Z-azAsp(OEt)-Pro-NHiPr 2 (II)	40
Figure 2.7	Structure de la TRH (a), AzPro ³ -TRH (b) et Phe ² -AzPro ³ -TRH (c)	43
Figure 2.8	Structure d'un aza-analogue d'un sécrétagogue de l'hormone de croissance	44
Figure 2.9	Structure d'un aza-amino acide fonctionnel	45
Figure 2.10	Structure d'un aza-analogue de l'argatroban	45
Figure 2.11	Structure d'aza-inhibiteurs de la protéase HAV	46
Figure 2.12	Structure d'un aza-inhibiteur du HRV	46
Figure 2.13	Structure de l'atazanavir	47
Figure 2.14	Voies synthétiques d'un azaamino acide	48
Figure 2.15	Introduction de l'azaalanine dans l'élédoisine	48
Figure 2.16	Synthèse des azapeptides par la méthode des azolides	49
Figure 2.17	Réactions de synthèse du tBuCO-Pro-AzAla-NHiPr	50
Figure 2.18	Structure du HBTU (a), du CDI (b) et du BOP (c)	51
Figure 2.19	Schéma de synthèse du tripeptide Boc-Phe-AzaLeu-Ala-OMe	51
Figure 2.20	Réaction de synthèse du Boc-AzaGly-Val-OBZI, inhibiteur de la cathepsin B	52
Figure 2.21	Schéma de synthèse d'un inhibiteur du HAV	52
Figure 2.22	Introduction d'un azarésidu au sein d'une chaîne peptidique par synthèse en phase solide	53
Figure 2.23	Introduction d'un aza-résidu au sein d'une chaîne peptidique en utilisant le phosgène	54

Figure 3.1	Structure des groupements Boc et Z	56
Figure 3.2	Structure du triphosgène	56
Figure 3.3	Formule développée du Boc-NH-NH-Z	57
Figure 3.4	Formule développée du Boc-AzPro-OBZI	58
Figure 3.5	Formule développée du HCl,H-AzPro-OBZI	59
Figure 3.6	Formule développée du Boc-Gly-AzPro-OBZI	60
Figure 3.7	Plaques de CCM initiale et développée	62
Figure 3.8	Exemple d'un spectre RMN-C ¹³ et DEPT 135	64
Figure 4.1	Schéma des différentes étapes de la synthèse du dipeptide Boc-Gly-AzaPro-OBZI	66
Figure 4.2	Réaction de synthèse du Boc-NH-NH-Z	67
Figure 4.3	Mécanisme proposé pour la synthèse du Boc-NH-NH-Z	67
Figure 4.4	Comparaison entre le spectre FTIR du Boc-NH-NH ₂ (a) et du Boc-NH-NH-Z (b) en pastille de KBr	70
Figure 4.5	Spectre FTIR du Boc-NH-NH-Z en pastille de KBr	71
Figure 4.6	Les types de protons du Boc-NH-NH-Z	72
Figure 4.7	Spectre RMN-H ¹ du Boc-NH-NH-Z dans le CDCl ₃ à 300 MHz	73
Figure 4.8	Réaction de synthèse du Boc-AzaPro-OBZI	74
Figure 4.9	Mécanisme proposé pour la génération du cycle pyrazolidine	75
Figure 4.10	Comparaison entre le spectre FTIR du Boc-NH-NH-Z (a) et du Boc-AzaPro-OBZI (b) en pastille de KBr	76
Figure 4.11	Spectre FTIR du Boc-Azapro-OBZI synthétisé dans le DMF en pastille de KBr	77
Figure 4.12	Les types de protons du Boc-AzaPro-OBZI	78
Figure 4.13	Spectre RMN-H ¹ du Boc-AzaPro-OBZI dans le CDCl ₃ à 300 MHz	79
Figure 4.14	Spectre FTIR du Boc-Azapro-OBZI synthétisé dans le THF en pastille de KBr	81
Figure 4.15	Réaction de synthèse du HCl.H-AzaPro-OBZI	82
Figure 4.16	Mécanisme proposé pour le clivage du groupement Boc	83
Figure 4.17	Comparaison entre le spectre FTIR du Boc-Azapro-OBZI (a) et de son chlorhydrate (b) en pastille de KBr	85

Figure 4.18	Spectre FTIR du HCl.H-AzaPro-OBZI en pastille de KBr	86
Figure 4.19	Les types de protons du HCl.H-AzaPro-OBZI	87
Figure 4.20	Spectre RMN- H^{-1} du HCl.H-AzaPro-OBZI dans le $CDCl_3$ à 300 MHz	88
Figure 4.21	Les types de carbones du HCl.H-AzaPro-OBZI	89
Figure 4.22	Spectre RMN- C^{13} avec découplage de protons du HCl.H-AzaPro-OBZI dans le $CDCl_3$ à 300 MHz	90
Figure 4.23	Spectre DEPT 135 du HCl.H-AzaPro-OBZI dans le $CDCl_3$ à 300 MHz	91
Figure 4.24	Réaction de synthèse de l'azadipeptide Boc-Gly-AzaPro-OBZI	92
Figure 4.25	Mécanisme proposé pour la synthèse de l'azadipeptide	93
Figure 4.26	Comparaison entre le spectre FTIR du Boc-Gly-OH (a) et de l'azadipeptide (b) en pastille de KBr	95
Figure 4.27	Spectre FTIR du Boc-Gly-AzaPro-OBZI en pastille de KBr	96
Figure 4.28	Les différents types de protons de l'azadipeptide	97
Figure 4.29	Spectre RMN- H^{-1} du Boc-Gly-AzaPro-OBZI dans le $CDCl_3$ à 300 MHz	98
Tableau 1.1	Valeurs standards des angles dièdres des différents tours ou coudes β	23
Tableau 1.2	Valeurs des angles dièdres des deux classes du tour βVI	23
Tableau 2.1	Modification de l'unité C^{α} -CO-NH	35
Tableau 2.2	Modification du squelette peptidique par insertion d'un atome ou groupe d'atomes dans la chaîne et par remplacement dans la liaison amide	35
Tableau 2.3	Introduction d'azaamino acides dans des peptides biologiquement actifs	42
Tableau 4.1	Résultats de l'analyse élémentaire du Boc-NH-NH-Z	68
Tableau 4.2	Résultats de l'analyse élémentaire du HCl.H-AzaPro-OBZI	83

INTRODUCTION

Les chaînes peptidiques et protéiniques exercent diverses fonctions au sein de l'organisme. A citer, les hormones, secrétées par les glandes endocrines, initient un acte biologique. Les enzymes jouent le rôle de catalyseurs dans les diverses réactions biochimiques de l'organisme. Les anticorps sont responsables de notre défense immunitaire et de notre protection à l'égard de tout agent agresseur intrus. D'autres protéines, transportent ou véhiculent des entités simples et indispensables telles que l'oxygène et le fer. Des protéines jouent un rôle majeur dans la croissance, le stockage des informations génétiques et la différenciation cellulaire. Elles sont aussi la charpente des acides nucléiques. Leur présence dans le corps est indispensable à sa croissance et à son entretien.

Mais, l'utilisation des peptides en l'état dans le domaine pharmaceutique, biologique et médical est souvent altérée par des limitations dues à :

- leur faible stabilité vis à vis des réactions de métabolisation.
- leur faible résistance aux protéases.
- leurs structures flexibles.
- leur faible transfert à travers les barrières physiologiques.

Par conséquent, ces peptides auront de faibles chances d'atteindre leur site d'action, ou bien l'atteindront partiellement ou complètement détériorés.

L'idéal serait d'avoir une molécule résistante capable de franchir toutes ces barrières physiologiques et arrivée intacte à son site d'action pour accomplir efficacement son activité biologique.

L'axe de recherche s'est orienté vers la synthèse et la conception de composés capables de mimer un peptide naturel tout en gardant son effet biologique principal. On appelle ces composés peptidomimétiques ou pseudopeptides résultant d'une modification apportée aux chaînes latérales ou au sein du squelette peptidique lui même.

Les azapeptides font partie de la famille des pseudopeptides où le carbone α (CH^α) d'un ou de plusieurs résidus amino-acides a été substitué par un atome d'azote.

Ce type de molécules a été largement utilisé dans le domaine pharmaceutique, biologique et médical, à savoir : dans la conception des analogues d'hormones, des inhibiteurs de protéases et de nouveaux agents thérapeutes.

Nous avons procédé dans ce travail à la synthèse du résidu azaprolyl, l'aza-analogue de la prolyl, puis son introduction dans un azadipeptide avec la glycine.

Ce présent travail se scinde en quatre chapitres : le premier chapitre traite des généralités sur les peptides, leurs structures et leurs méthodes de synthèse. Nous avons consacré le deuxième chapitre aux azapeptides, leurs propriétés conformationnelles et biologiques ainsi que leurs méthodes de synthèse. La partie expérimentale est décrite dans le troisième chapitre. Enfin les résultats obtenus et leurs discussions sont traités au quatrième et dernier chapitre.

CHAPITRE 1 LES PEPTIDES

1.1 Généralités

Les peptides et protéines sont les constituants de la matière vivante. Ils se trouvent dans la peau, les cheveux, les muscles.....Ils assurent la structure de la cellule et exercent diverses fonctions au sein de notre organisme. Parmi eux, il y a ceux qui participent aux différents processus de la vie tel que le transport d'oxygène, d'autres ont un rôle protecteur tels que les anticorps, il y a également les enzymes, qui jouent le rôle de catalyseurs dans les différentes réactions biochimiques de notre organisme . Les peptides et protéines sont aussi la charpente des acides nucléiques, des hormones et des antigènes. Leur présence dans le corps est indispensable à la croissance et à l'entretien de l'organisme.

De là, nous voyons que ces entités ont une immense importance biologique, il est donc intéressant de porter un grand intérêt à ce type de molécules et à leurs analogues.

Les peptides ou protéines résultent de la condensation des aminoacides reliés entre eux par une liaison peptidique. Ils diffèrent par le nombre, la nature et l'ordre des acides aminés. On distingue :

- Peptide : enchaînement d'un nombre d'acides aminés inférieur à cinquante (50), parmi ceux-ci on parle d'oligopeptide pour un nombre d'acides aminés inférieur à dix (10) et de polypeptide pour un nombre supérieur à dix (10).
- Protéine : enchaînement d'un nombre d'acides aminés au-delà de cinquante (50). Elles peuvent atteindre une masse supérieure à 10000 Da ($1,66018 \cdot 10^{-20}$ g).

Il existe vingt (20) acides aminés dans la nature, leur formule générale est $R-CHNH_2-COOH$, le carbone porteur des groupements amine et carboxyle est appelé carbone α (C^α). Ils diffèrent entre eux par le résidu R (appendice B) qu'on appelle chaîne latérale.

1.2 Notation des chaînes peptidiques

Dans une chaîne peptidique, les acides aminés sont liés dans un ordre bien spécifique en respectant les conventions suivantes :

- Les acides aminés engagés dans une chaîne peptidique sont appelés résidus. Leur nom est celui de l'acide aminé auquel on ajoute le suffixe yl.
- Les deux acides aminés aux extrémités de la chaîne sont appelés :
 - N-terminal : pour celui qui a sa fonction amine libre à gauche de la chaîne peptidique.
 - C-terminal : pour celui qui a sa fonction acide libre à droite de la chaîne peptidique.
- On numérote les acides aminés en écrivant l'enchaînement de gauche à droite à partir de l'extrémité N-terminal.

La figure 1.1 schématise la structure du peptide H-Gly-Ala-Cys-Ser-OH :

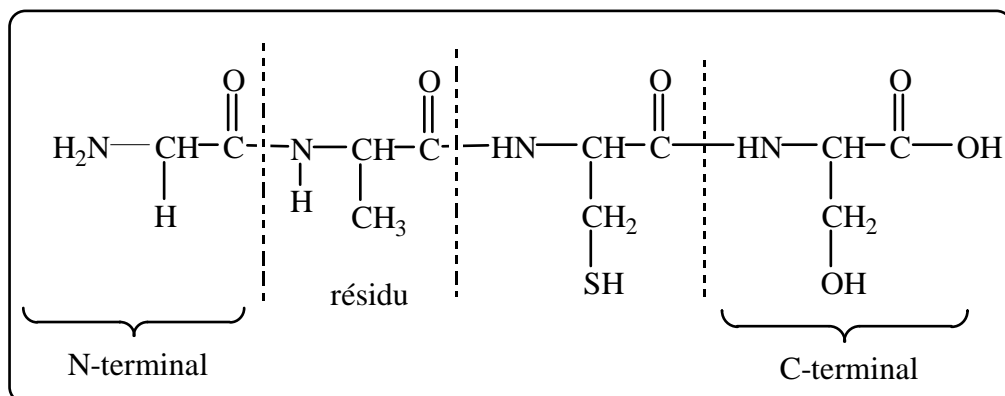


Figure 1.1 : Structure d'un térapeptide.

1.3 La liaison peptidique

1.3.1 Type de liaison

La liaison peptidique est de type amide, elle résulte de la condensation entre deux acides α -aminés consécutifs, elle relie le groupement carboxyl d'un acide aminé au groupement amine de l'acide aminé suivant en libérant une molécule d'eau (fig. 1.2).

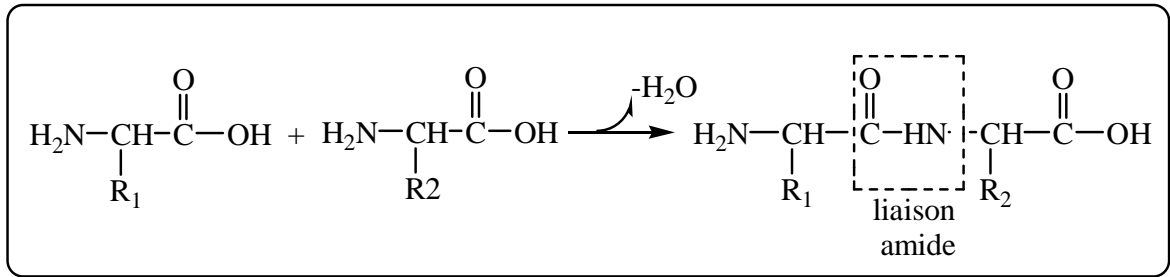


Figure 1.2 : Formation d'une liaison peptidique

1.3.2 Géométrie de la liaison peptidique

Les électrons π du groupement carbonyle et le doublet libre de l'azote sont proches. La résonance de ces électrons donne deux formes mésomères (fig. 1.3).

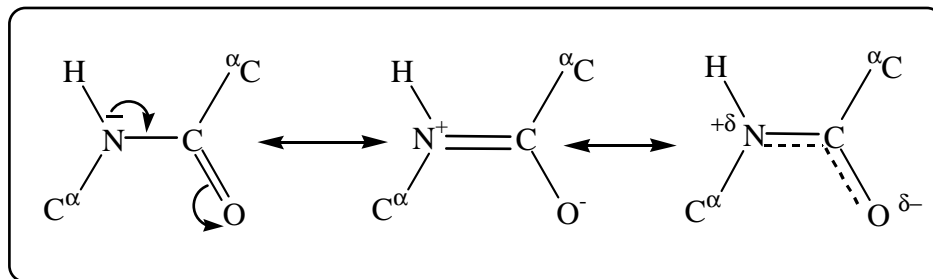


Figure 1.3 : Formes résonantes de la liaison peptidique.

Cette liaison est intermédiaire entre une simple et une double liaison, ce qui lui confère un caractère sp^2 . La liaison peptidique est plane : les atomes (C^α , O, N, H, C^α) sont coplanaires.

Du fait du caractère partiellement double de cette liaison, la rotation autour de $C-N$ est empêchée, mais il existe une liberté de rotation entre $N-C^\alpha$ et $C^\alpha-C$, par conséquent, seules les conformations cis et trans sont possibles (fig. 1.4).

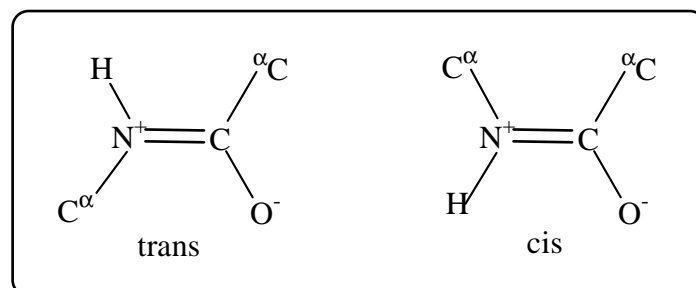


Figure 1.4 : Formes cis et trans de la liaison peptidique.

Dans une chaîne peptidique, on définit les angles dièdres Φ , Ψ et ω (fig. 1.5) tel que :

Φ : angle de rotation autour d'une liaison $C^\alpha - N$.

Ψ : angle de rotation autour d'une liaison $C^\alpha - C$.

ω : angle de rotation autour d'une liaison $C - N$.

Les dimensions de la liaison peptidique sont indiquées dans la figure 1.6.

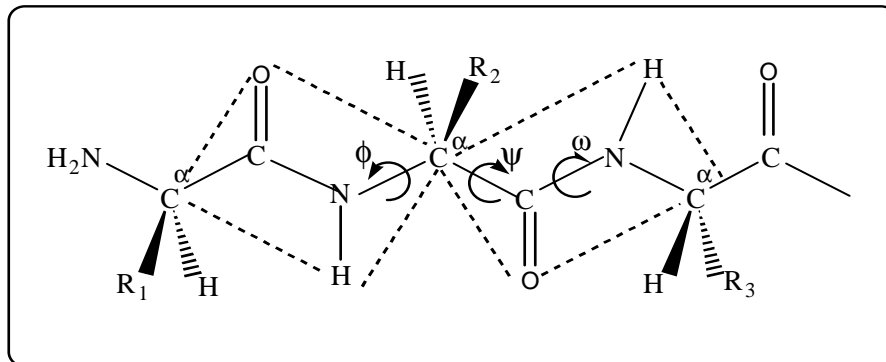


Figure 1.5 : Géométrie et angle de rotation d'une liaison peptidique.

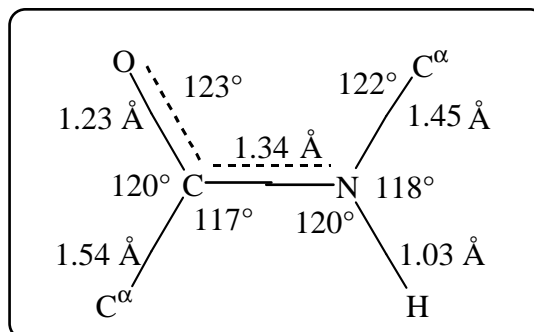


Figure 1.6 : Dimensions de la liaison peptidique

1.4 Structure des peptides

1.4.1 Structure primaire

L'enchaînement des acides aminés au sein d'une chaîne peptidique est appelé structure primaire d'un peptide ou encore séquence d'un peptide (fig. 1.7).

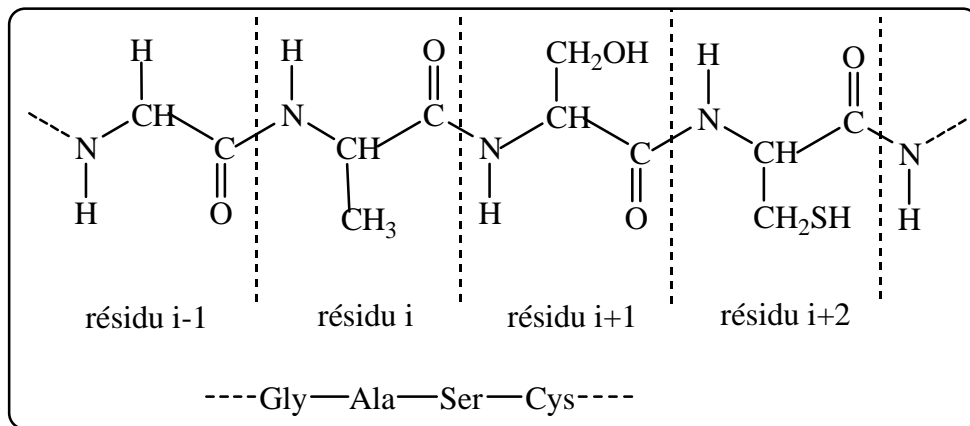


Figure 1.7 : Structure primaire d'un peptide.

1.4.2 Structure secondaire

La structure secondaire des peptides résulte de la possibilité de formation de liaisons hydrogène entre l'oxygène du carbonyle et l'hydrogène de l'azote amidé de la liaison peptidique. La structure secondaire d'un peptide est caractérisée par des éléments réguliers tels que les hélices α et les feuillets β et des éléments irréguliers tels que les tours et les boucles [1,2]. Usuellement, les structures secondaires des peptides et protéines peuvent être décrites par les angles dièdres Φ et Ψ [3,4].

1.4.2.1 L'hélice α

C'est une structure où la chaîne peptidique est enroulée sous forme d'hélice. Elle est stabilisée par la présence de liaisons hydrogène entre l'oxygène du carbonyle du résidu i et l'hydrogène amide du résidu $i+4$ (fig.1.8). Au sein d'une hélice α , les chaînes latérales des résidus sont situées à l'extérieur de l'hélice α ce qui minimise les encombrements stériques.

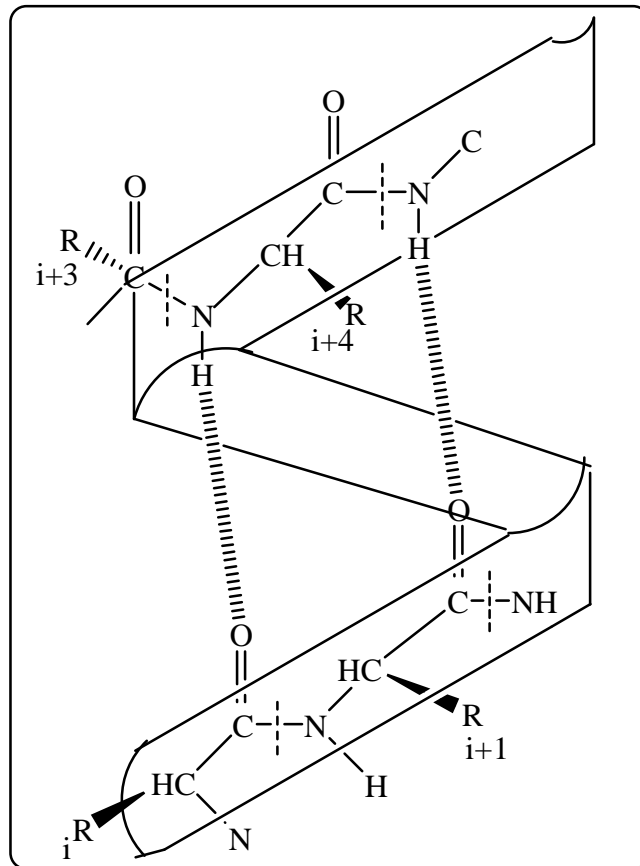


Figure 1.8 : Structure en hélice α .

1.4.2.2 Feuille β

Le feuillet β est une structure où le squelette peptidique est replié de manière à former une surface plus ou moins plane. Des liaisons hydrogènes s'établissent entre des segments différents qui peuvent appartenir à la même chaîne ou à des chaînes différentes.

Dans un feuillet β , les chaînes latérales des résidus sont placées au-dessus et en-dessous du feuillet.

On distingue dans cette structure deux réseaux (fig. 1.9) :

- Feuillet β parallèle 1 : le sens des deux chaînes est identique.
- Feuillet β antiparallèle 2 : les deux chaînes sont de sens contraire.

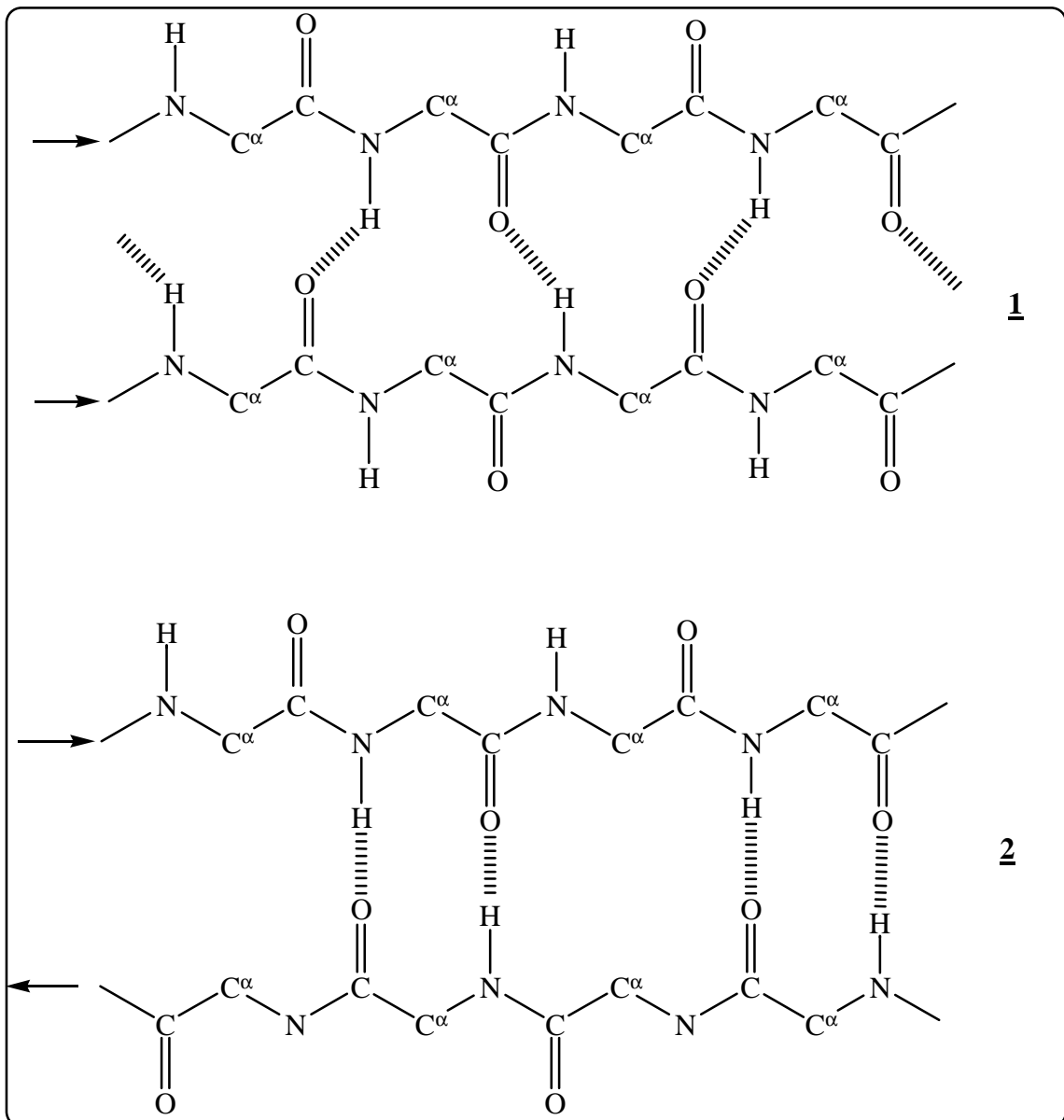


Figure 1.9 : Structure en feuillet β .

1.4.2.3 Conformation C_5

La conformation C_5 (fig. 1.10) est une disposition qui résulte d'une liaison hydrogène intrarésiduelle du type ($i \rightarrow i$) entre l'oxygène du carbonyle du résidu i et l'hydrogène amide du même résidu, fermant un cycle à 5 atomes [5].

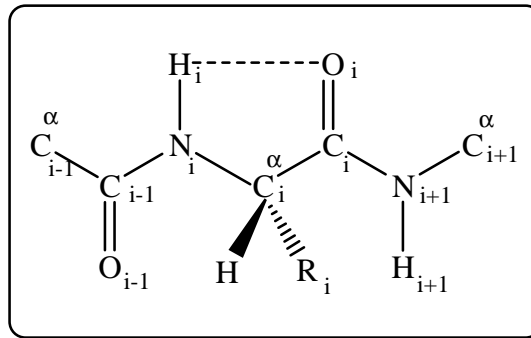


Figure 1.10 : Structure en conformation C_5 .

1.4.2.4 Conformation C_7 ou tour γ

Les tours γ présentent une liaison hydrogène entre l'oxygène du carbonyle du résidu i et l'hydrogène amide de résidu $i+2$ [6], formant ainsi un cycle à 7 atomes (fig.1.11), que l'on note indifféremment tour γ ou conformation C_7 [7]. On distingue deux types de tour γ , selon l'orientation de la chaîne latérale. Le tour γ inverse qui présente un C_7 avec la chaîne latérale centrale en position équatorial, et le tour γ classique qui présente un C_7 de chaîne latérale centrale axiale.

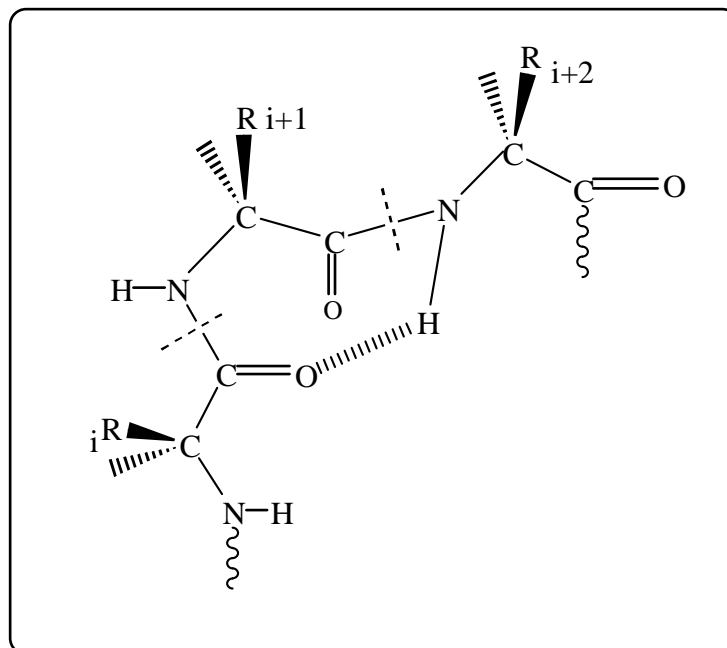


Figure 1.11 : Structure en conformation C_7 .

présente usuellement un pont hydrogène, tandis que le type VIb ne présente pas une liaison hydrogène [11,13].

Les valeurs des angles (Φ_{i+1} , Ψ_{i+1}), (Φ_{i+2} , Ψ_{i+2}) de ces deux classes du type β VI sont regroupées dans le tableau 1.2 [8,11,13].

Tableau 1.1 : Valeurs standards des angles dièdres des différents tours ou coudes β .

Tour β	Φ_{i+1} (°)	Ψ_{i+1} (°)	Φ_{i+2} (°)	Ψ_{i+2} (°)
β I	-60	-30	-90	0
β I'	60	30	90	0
β II	-60	120	80	0
β II'	60	-120	-80	0
β III	-60	-30	-60	-30
β III'	60	30	60	30
β V	-80	80	80	-80
β V'	80	-80	-80	80
β VIII	-60	-30	-120	120

Tableau 1.2 : Valeurs des angles dièdres des deux classes du tour β VI.

Tour β VI	Φ_{i+1} (°)	Ψ_{i+1} (°)	Φ_{i+2} (°)	Ψ_{i+2} (°)
VIa	-60	120	-90	0
VIb	-120	120	-60	0

1.4.3 Structure tertiaire

La structure tertiaire des peptides est la conformation générale de la chaîne polypeptidique dans l'espace. Elle résulte du repliement de cette dernière ;

ordonnée en structure secondaire ; sur elle même pour former une molécule assez compacte présentant une conformation spatiale bien déterminée.

La structure tridimensionnelle des peptides est d'une grande importance, du fait que l'activité biologique dépend fortement de leur structure moléculaire spatiale [9].

Cet arrangement spatial est stabilisé par des interactions de nature différente qui se produisent entre les chaînes latérales des résidus; On distingue :

- Des liaisons covalentes , qui sont principalement les ponts disulfures qui s'établissent entre les résidus cystéine (appendice B) situés tout le long d'une séquence peptidique [17], exemple de l'insuline qui contient 51 acides aminés et 3 ponts disulfures [17] (fig. 1.13).
- Des liaisons hydrophobes, hydrogènes et des ponts salins.

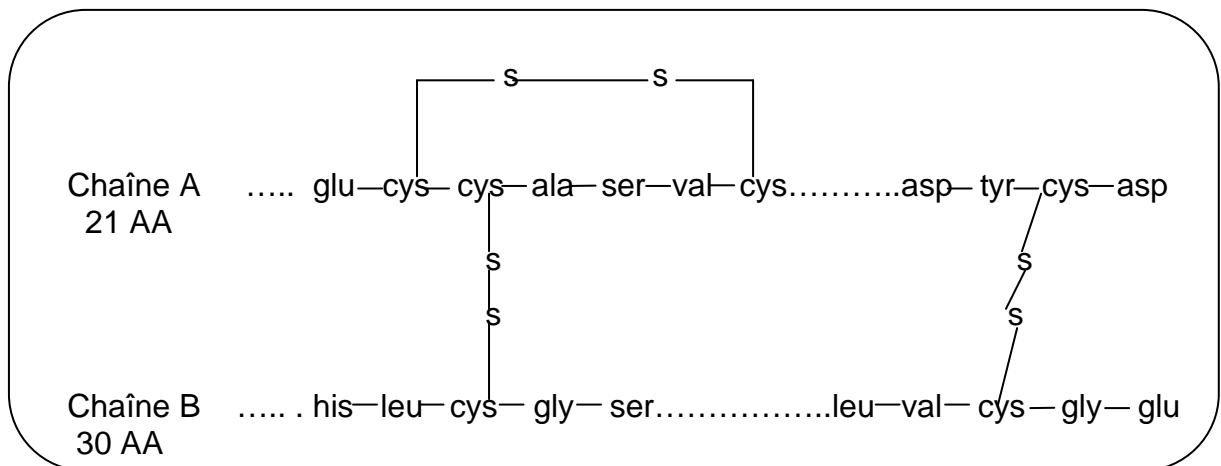


Figure 1.13 : Structure de l'insuline.

Selon la structure tridimensionnelle, on classe les polypeptides et protéines en deux classes :

- Protéines fibreuses : elles forment des agrégats ordonnés, constituant la charpente de la cellule, tels que : la kératine prépondérante dans les cheveux, les ongles,..... et le collagène, protéine principale de la peau, des os et de l'ivoire dentaire.
- Protéines globulaires : ceux sont des macromolécules plus ou moins sphériques, elles englobent généralement les protéines douées d'activités biologique telles que les enzymes, les hormones,.....

1.4.4 Structure quaternaire

La structure quaternaire des protéines désigne l'association et l'organisation de plusieurs chaînes polypeptidiques –identiques ou différentes– entre elles. Chacune de ces chaînes est appelée sous unité.

Cette structure perdure grâce aux liaisons hydrogène, aux interactions ioniques, aux liaisons de Van Der Waals, ainsi que parfois grâce à des ponts disulfures qui relient deux cystéines.

L'hémoglobine est un exemple de structure quaternaire ; elle est constituée de quatre sous unités : deux sous unités englobant cent quarante et un (141) acides aminés et deux sous unités renfermant cent quarante six (146) acides aminés.

1.5 Synthèse des peptides en phase liquide

La formation de la liaison amide est une étape clé dans la synthèse peptidique [18,19], elle résulte, de la condensation entre deux acides aminés successifs. Cependant, si nous voulons condenser deux acides aminés AA et AA', on peut obtenir AA-AA', AA-AA, AA'-AA et AA'-AA'.

Par conséquent, pour pouvoir synthétiser sélectivement le dipeptide AA-AA', il est indispensable d'utiliser des groupements protecteurs et des agents activateurs des fonctions amines ou acides des acides aminés pour permettre la formation de la liaison peptidique désirée. Dans certains cas il faut également protéger les chaînes latérales des résidus pour éviter les branchements latéraux. En général, on active le groupement carboxyle et on protège le groupement amine. De préférence cette protection soit orthogonale pour libérer spécifiquement la fonction amine.

La synthèse des peptides se fait dans le sens contraire de la synthèse biologique, c'est à dire que c'est le groupement carboxyle activé d'un acide aminé qui est condensé sur le groupement amine d'une chaîne polypeptidique en croissance.

1.5.1 Groupements protecteurs de la fonction amine

Protéger un groupement c'est le rendre moins réactif. De nos jours, il existe un très grand nombre de groupements protecteurs, nous allons dans ce qui

suit, citer les plus importants d'entre eux ainsi que les conditions dans lesquelles ils peuvent être enlevés ou clivés sans rupture de la liaison peptidique.

1.5.1.1 Groupement tertibutyloxycarbonyle (Boc)

Parmi les groupements protecteurs, le tertibutyloxycarbonyle noté (Boc) est considéré comme l'un des plus largement utilisés en synthèse organique quand il est nécessaire de protéger une amine [20]. Cette grande utilité est due à son introduction et clivage faciles et au fait qu'il peut être orthogonalement associé à d'autres groupements protecteurs [20]. Le groupe Boc est de type uréthane ou carbamate, il est introduit par l'action du di-tert-butyl dicarbonate $(\text{Boc})_2\text{O}$ sur l'extrémité amine d'un acide aminé en présence d'une base (fig. 1.14).

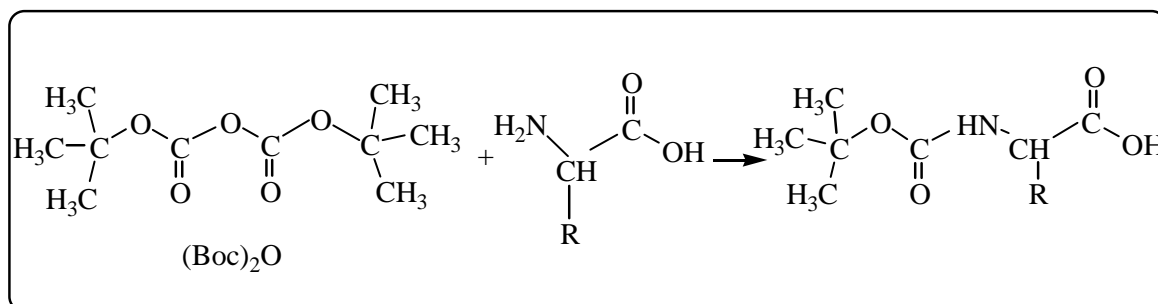


Figure 1.14 : Introduction du Boc sur un acide aminé

Le groupe Boc résiste aux agents basiques. Il est éliminé ou clivé en milieu acide anhydre [21] en utilisant l'acide trifluoroacétique (TFA) ou bien l'acide chlorhydrique (fig. 1.15).

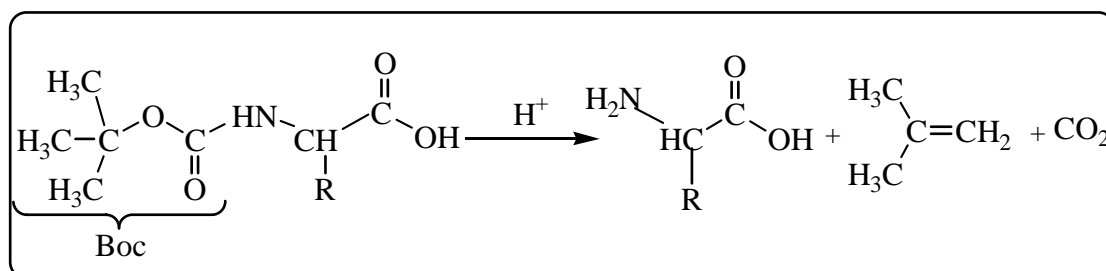


Figure 1.15 : Clivage du groupement Boc.

1.5.1.2 Groupement Z

Le benzyloxycarbonyle noté Z ou Cbz est considéré comme le premier agent protecteur utilisé, lui aussi est de type uréthane, il est introduit par l'action

du chloroformiate de benzyle (ZCl) sur l'extrémité amine d'un acide aminé en présence d'une base (fig.1.16).

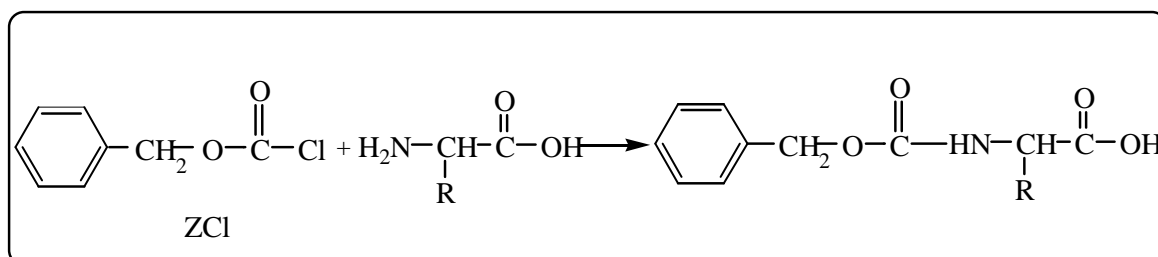


Figure 1.16 : Introduction du Z sur un acide aminé.

Le groupement Z est clivé par hydrogénolyse [22] en donnant le dioxyde de carbone et le toluène comme sous produits (fig.1.17).

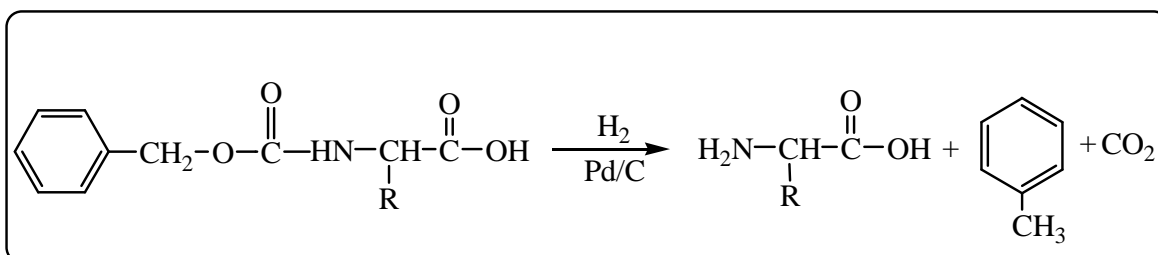


Figure 1.17 : Clivage du groupement Z.

1.5.1.3 Groupement Fmoc

Le fluorénylméthoxycarbone noté Fmoc est lui aussi un groupement couramment utilisé dans la protection de la fonction amine des acides aminés. Usuellement, il est introduit sous les conditions de SCHOTTEN-BAUMEN [23] (fig.1.18). Il résiste aux milieux acides mais présente l'inconvénient que les Fmoc acides aminés sont peu solubles dans la majorité des solvants organiques.

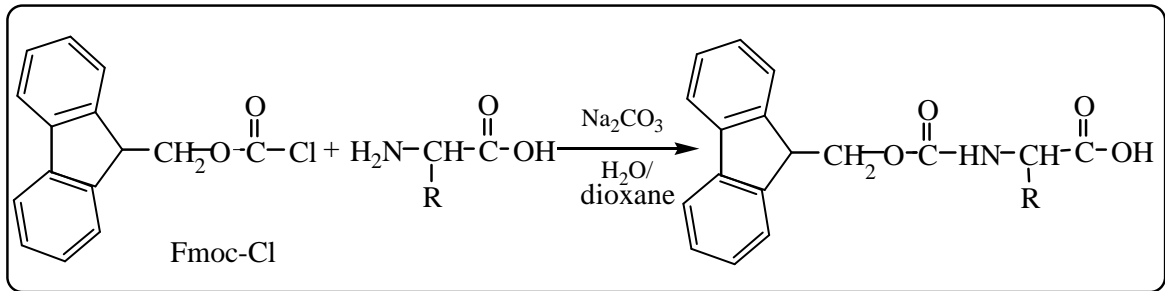


Figure 1.18 : Introduction du Fmoc sur un acide aminé.

Le groupement Fmoc est clivé dans des conditions basiques douces en utilisant la pipéridine [21,24,25] ou la morpholine comme base (fig.1.19).

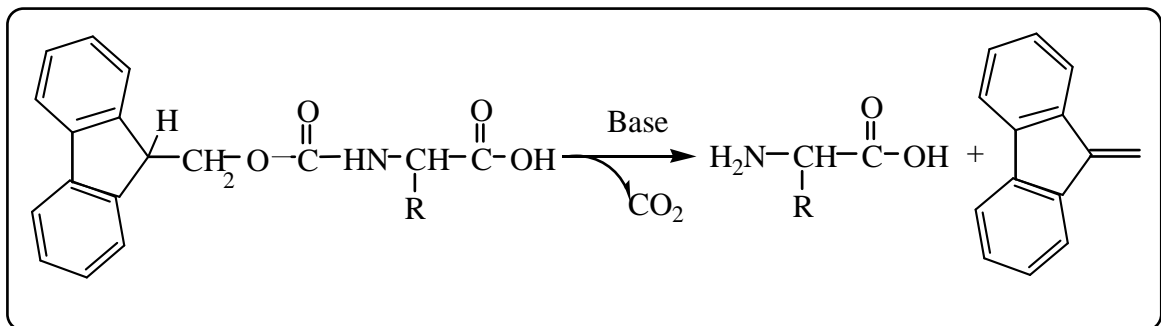


Figure 1.19 : Clivage du groupement Fmoc.

1.5.2 Protection des chaînes latérales

Plusieurs acides aminés contiennent des groupements fonctionnels: carboxyle, amine, hydroxyle, thiol,.....au sein de leur chaîne latérale. Il est donc nécessaire de protéger ces fonctions pour éviter toute liaison latérale.

1.5.3 Activation de la fonction acide et méthodes de couplage

Pour coupler deux amino acides on active la fonction acide carboxylique de l'acide I par un agent de couplage, qu'on fait réagir avec la partie amine de l'acide I' où les autres fonctions sont protégées [26] (fig.1.20).

rendements par rapport à la méthode des anhydrides [29]. Le schéma ci-dessous (fig. 1.22) illustre la réaction de couplage entre deux acides aminés par le DCCI en donnant le dicyclohexylurée (DCU) comme sous produit.

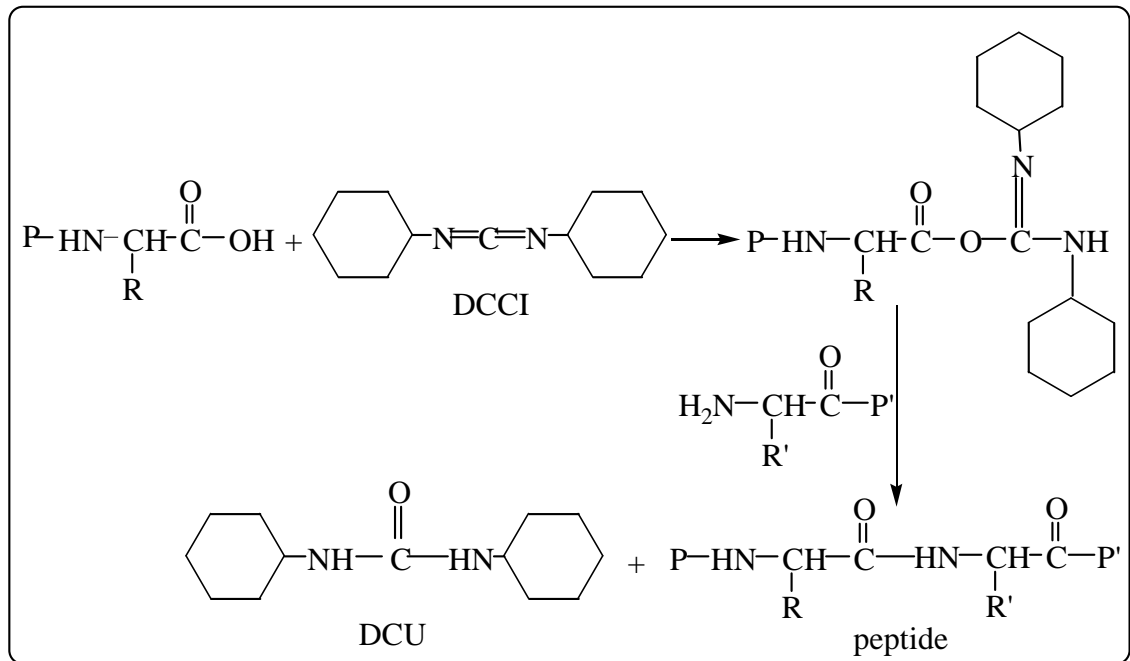


Figure 1.22 : Réaction de couplage en utilisant le DCCI.

1.5.3.3 Méthode des anhydrides

Les anhydrides sont des espèces qui réagissent facilement avec une vaste gamme de nucléophiles tels que les alcools, les thiols et bien sûr les amines [25]. Ils sont formés en faisant réagir deux équivalents d'acide en présence d'un équivalent de DCCI [25,30]. L'anhydride est par la suite couplé à un autre acide aminé pour obtenir le peptide désiré selon le schéma suivant (fig.1.23).

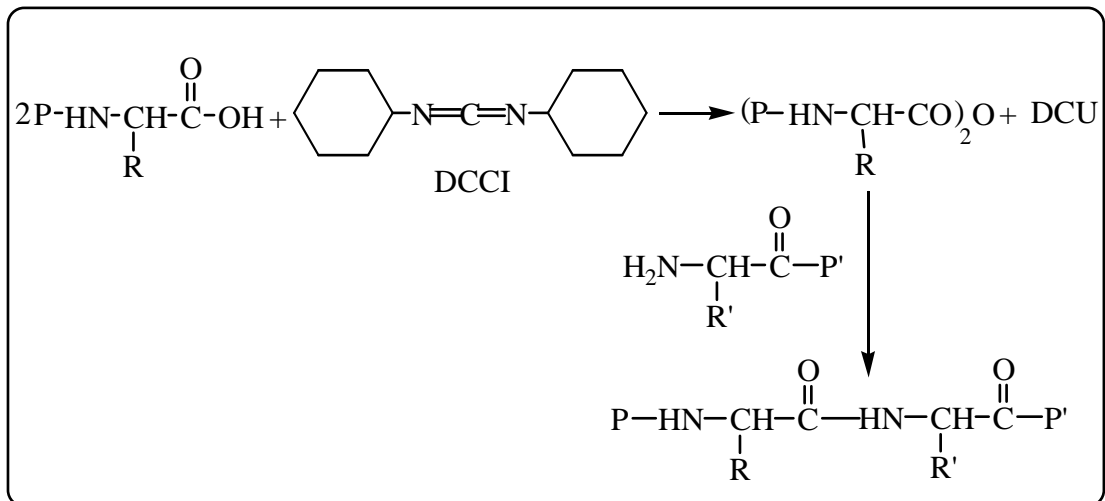


Figure 1.23 : Réaction de couplage en passant par les anhydrides.

1.5.3.4 Méthode des esters actifs

Les esters actifs tels que les esters aromatiques sont susceptibles de réagir avec une large gamme de nucléophiles. Plus précisément, ils réagissent avec les amines sous des conditions douces [25]. Le schéma général de la formation de la liaison amide par cette méthode est illustré dans la figure 1.24 [25].

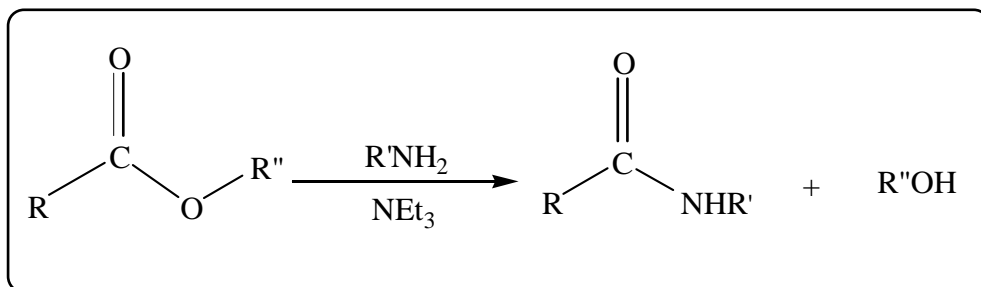


Figure 1.24 : Schéma général du couplage aux esters actifs.

L'électrophilicité du centre carbonyle augmente par présence d'un groupement électroattracteur sur R'', et, ceci dépend de l'alcool utilisé [25].

En synthèse peptidique, les alcools couramment employés (fig. 1.25) sont le HOBt (hydroxy benzotriazol), le PNP (p-nitrophénol) et le PFP (penta fluorophénol) [25].

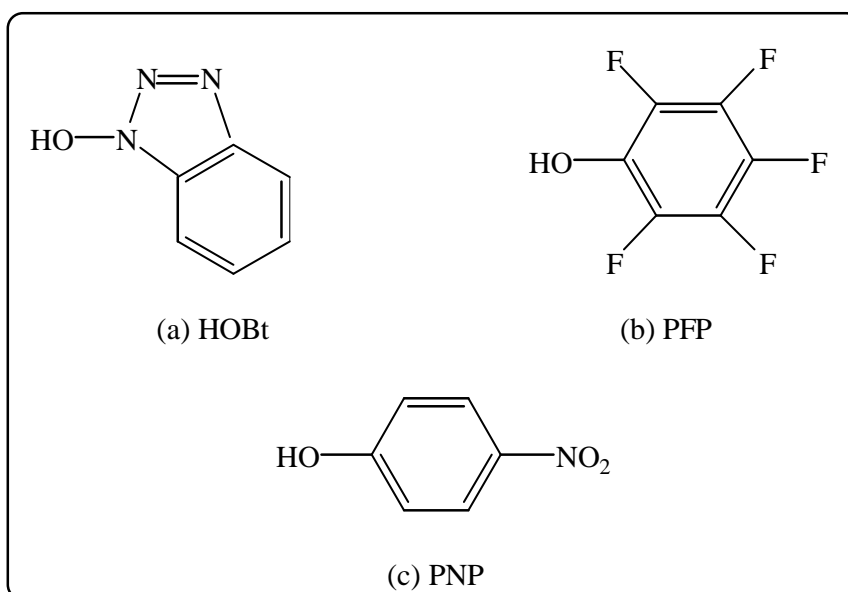


Figure 1.25 : Structure du HOBt (a), du PNP (b) et du PFP (c).

Cette méthode a été largement recommandée du moment que l'ester actif peut être aisément préparé, purifié et stocké pour un usage ultérieur [25]. La figure 1.26 illustre la réaction de couplage aux esters actifs en utilisant le PNP comme alcool.

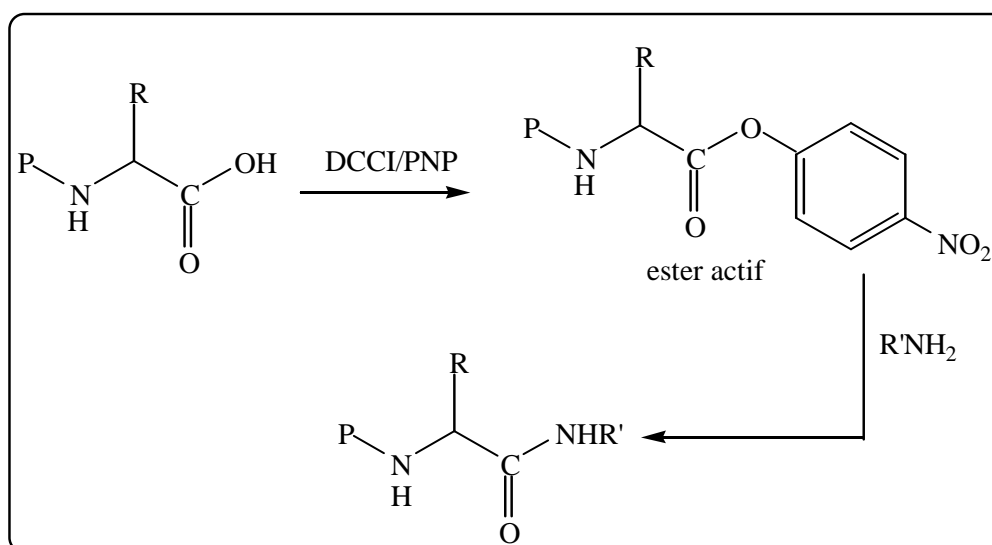


Figure 1.26 : Réaction de couplage en employant le PNP.

1.5.4 Choix de la base

Le choix de la base est aussi important dans une réaction de couplage de peptides [26]. Les amines tertiaires telles que la diisopropylethylamine (DIEA) et la N-méthylmorpholine (NMM) (fig. 1.27), ont été considérées comme des bases pratiquement utiles en synthèse peptidique, en raison de leur très faible nucléophilie [26].

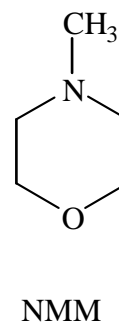
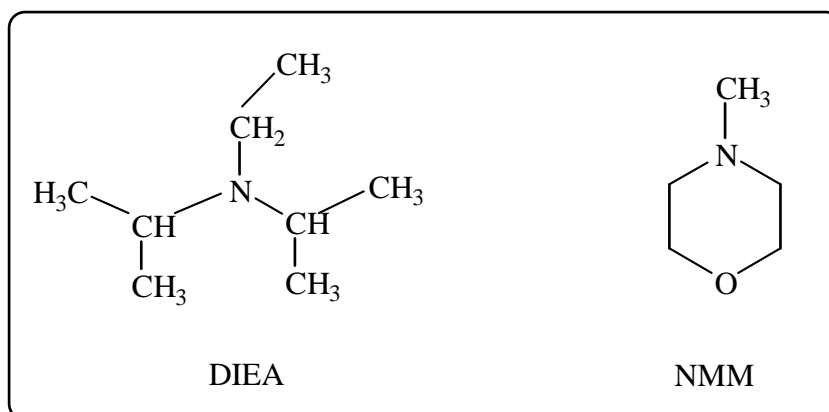


Figure 1.27 : Structure de la DIEA et de la NMM.

CHAPITRE 2

LES AZAPEPTIDES

2.1 Généralités

Les peptides sont un enchaînement d'amino acides reliés entre eux par une liaison amide. Plusieurs peptides naturels ont été isolés, d'autres ont été synthétisés pour les employés comme agents thérapeutiques, des inhibiteurs de protéases ainsi que des analogues d'hormones. Et pour que ces molécules accomplissent leur activité biologique, il est demandé qu'elles arrivent intactes à leur site d'action. Mais durant leur transport au sein de l'organisme, ces dernières sont exposées aux diverses réactions de métabolisation et à l'action des protéases [31], en plus de leur problème de flexibilité [31,32].

Pour remédier à ça, la recherche d'analogues peptidiques par l'introduction de contraintes géométriques à la structure d'un peptide [7, 32-34] s'est avérée être une solution attrayante.

Ces analogues qu'on nomme peptidomimétiques ou pseudopeptides ont gagné une énorme popularité ces dernières années car ils peuvent mimer un peptide naturel tout en gardant son effet biologique principal [9, 35].

Les peptidomimétiques présentent une résistance aux dégradations physiologiques [33] et une stabilité métabolique accrue [9,35] de même qu'une faible flexibilité conformationnelle [33]. Ils sont aussi considérés comme des agents thérapeutes puissants [36] et prometteurs.

2.2 Modification du squelette peptidique

Durant les années récentes, plusieurs modifications structurales ont été introduites dans le squelette peptidique lui même et dans la chaîne latérale des amino acides. Ces modifications ont donné un grand nombre de structures dotées de propriétés biologiques supérieures à celles du produit parent et une résistance à la biodégradation [37-51].

Les tableaux 2.1 et 2.2 rassemblent les plus importantes modifications du squelette peptidique. La majorité d'entre elles favorisent le tour β qui est considéré comme une conformation bioactive des peptides [8,26].

Tableau 2.1 : Modification de l'unité C $^{\alpha}$ - CO-NH.

Carbone C $^{\alpha}$	Site CO	Site NH
N : Aza [13,33,34,52-58]	CS : Thioamide	O : Depsi ester [61]
C $^{\alpha}$ RR' : Dialkyl	CH $_2$: Méthylène amine	S : Thio ester [39]
BO : Bora	SO $_2$: Sulfonamide	CH $_2$: Cétométhylène
C $^{\alpha}$ = C $^{\beta}$: Déhydro [59,60]	O=P(OH) : Phosphoro	N(OH) : Hydroxamide
	B(OH) : Dialkylboro	

Tableau 2.2 : Modification du squelette peptidique par insertion d'un atome ou groupe d'atomes dans la chaîne et par remplacement dans la liaison amide [62].

Extension de la chaîne -NH-X- C $^{\alpha}$ HR-	Modification du lien amide
-O- : Oxamide [39,61]	-NH-CO- : Amide inversé
-N- : Hydrazide [39]	-CH $_2$ -O-CH $_2$: Hydroxyéthylène
-CH $_2$: Acide β aminé	-CH=CH- : Z/E vinylène [39]
	- CH $_2$ - CH $_2$ - : Ethylène

2.3 Les Azapeptides

Les azapeptides sont des analogues peptidiques où le carbone α (CH $^{\alpha}$) d'un résidu amino acide a été remplacé par un atome d'azote [31-34,53-57,63-65] (fig. 2.1).

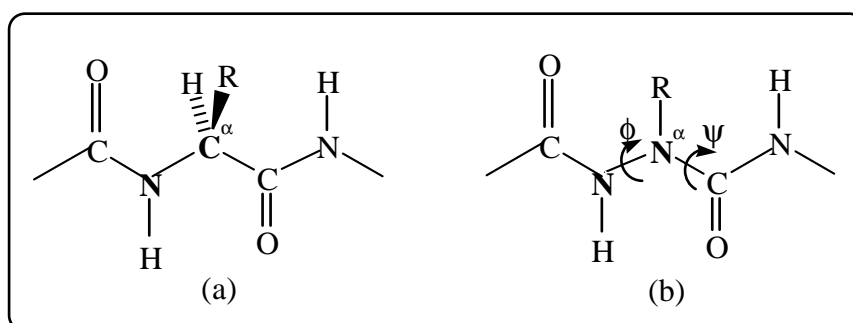


Figure 2.1 : Structure d'un amino acide (a) et d'un azaamino acide (b) au sein d'une chaîne peptidique.

Une telle substitution isoélectronique va conférer des propriétés conformationnelles particulières à la structure des peptides et protéines et minimise leur flexibilité. Certes le centre asymétrique ainsi que la libre rotation autour de la liaison C-C^α sont perdus mais la chaîne latérale est intacte [12,65]. Cette dernière joue un rôle capital dans les étapes de reconnaissance moléculaires et intervient dans la stabilité de la structure tridimensionnelle des peptides.

Ces propriétés conformationnelles singulières, ainsi que leur synthèse relativement facile [9,43,53,66], ont fait des azaamino acides un sujet intéressant de recherche. HESS et al. en 1963 [31,67] ont été les premiers à remplacer un amino acide par un azaamino acide dans un peptide naturel, et depuis, les azapeptides ont été activement développés par plusieurs chercheurs [43-52] pour la conception d'analogues d'hormones, des inhibiteurs de protéases et de nouveaux agents thérapeutes [6,32,33].

2.4 Propriétés conformationnelles des azapeptides

L'activité biologique des peptides et des protéines est fortement liée à une structure moléculaire bien définie [9,31,33] et plus spécialement la structure β qui est considérée comme une structure bioactive [9,12,56]. En effet, les peptides bioactifs doivent adopter cette conformation spécifique pour pouvoir se lier à une molécule acceptrice [9,12]. Par conséquent, l'aspect structural et les propriétés conformationnelles des azapeptides sont très importants pour leur possible application dans le domaine biologique [33].

L'introduction d'un atome d'azote dans un résidu amino acide va générer deux parties structurales : la partie hydrazine caractérisée par l'angle de torsion Φ et la partie urée décrite par l'angle de torsion Ψ [9,31] (fig. 2.1).

Dans le but d'investiguer les propriétés conformationnelles des azapeptides, plusieurs modèles azapeptidiques ont été synthétisés et étudiés.

THORMANN et al. [31] ont porté leur intérêt sur l'hydrazine et son dérivé le 1,2 diformyl hydrazine (fig. 2.2) qui ressemble à la partie hydrazine dans les azapeptides. Leurs calculs ab initio ont abouti à des valeurs des angles de torsion qui correspondent à quelques angles de torsion de la majorité des types du tour β [9,31].

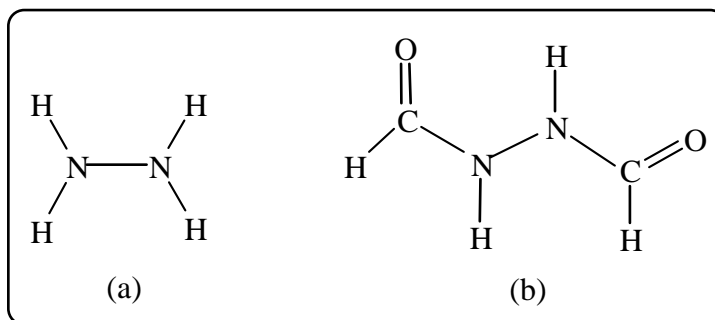


Figure 2.2 : Structure de l'hydrazine (a) et du 1,2 diformyl hydrazine (b).

Des études théoriques sur des modèles azapeptidiques du type For-azaXaa-NH₂ (Xaa= Gly, Ala ,Leu) ont montré que les valeurs des angles dièdres relatifs à l'azaamino acide sont ceux du tour β [12,33]. Ces résultats ont été confirmés par des études IR, RMN et par modélisation moléculaire sur les azapeptides synthétiques, Boc-Phe-azaLeu-Ala-OMe [12] , Boc-Ala-Phe-azaLeu-Ala-OMe [33] et Ac-Aib-azaGly-NH₂ [52], tel que le tour β II a été observé pour les deux premiers azapeptides [12,33], tandis que le troisième azapeptide a adopté le tour β I [52].

D'autre part, la diffraction des rayons-X (DRX) de l'azapeptide tBuCO-Pro-azaAla-NHiPr, préparé sous forme cristalline, a mis en évidence le tour β II [54].

La synthèse et l'étude conformationnelle par DRX, FTIR et RMN d'azapeptides contenant le résidu azapipécolique (azaPip), Boc-Ala-azaPip-NHiPr, Boc-Ala-azaPip-Ala-NHiPr et Ac-azaPip-NHMe [32,35,56,78] ont révélé le coude β VI (fig. 2.3) [32,35,78].

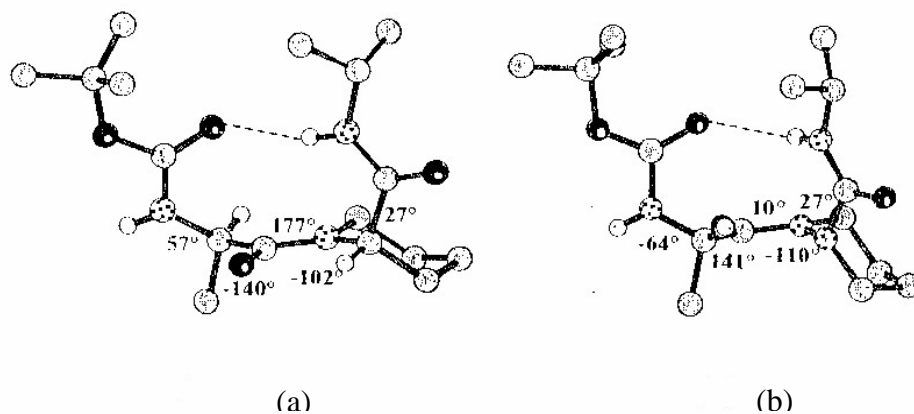


Figure 2.3 : Structures moléculaires de Boc-Ala-Pip-NHiPr (a) et Boc-Ala-azaPip-NHiPr (b). Les ponts hydrogène intramoléculeaires sont indiqués en lignes discontinues.

Toujours pour étudier les propriétés conformationnelles des azapeptides, les structures moléculaires de certains dérivés contenant l'azaanalogue de l'asparagine : Z-azAsn(Me)-Pro-NHiPr **1** et Piv-Pro-azAsn(Me)-NHiPr **4**, de l'acide aspartique : Z-azAsp(OEt)-Pro-NHiPr **2** et Z-azAsp(NHMe)-Pro-NHiPr **5** [55,63] et de l'alanine : Boc-azAla-Pro-NHiPr **3** ont été résolues par DRX [63].

Il s'est avéré que ces dérivés adoptaient soit le tour β I **1-3** (fig. 2.4) ou le tour β II **4** (fig. 2.5) [63].

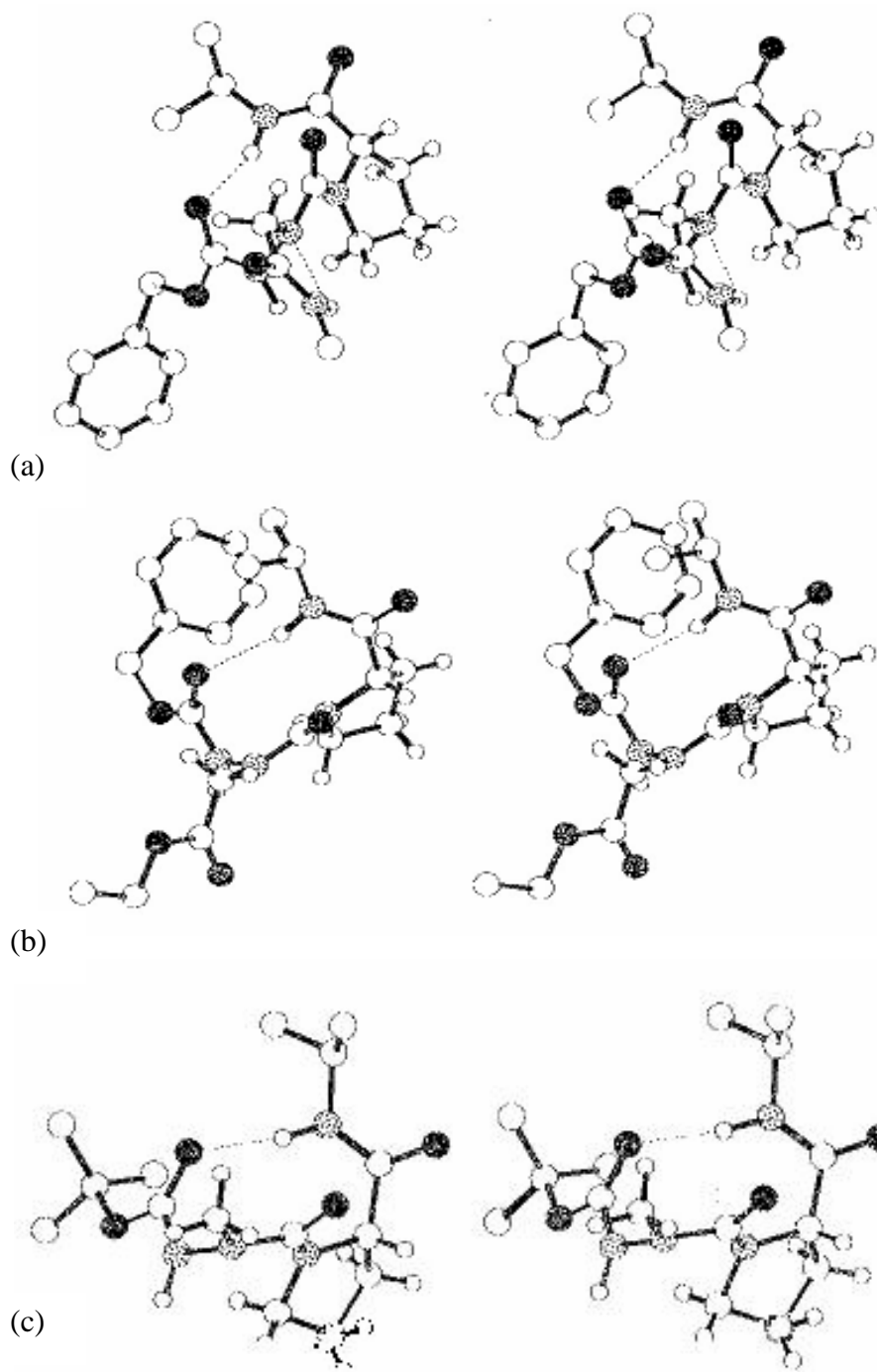


Figure 2.4 : Repliements β I des structures moléculaires cristallines de Z-azAsn(Me)-Pro-NHiPr **1** (a), Z-azAsp(OEt)-Pro-NHiPr **2** (b) et de Boc-azAla-Pro-NHiPr **3** (c). Les ponts hydrogène intramoléculaires sont indiqués en lignes discontinues.

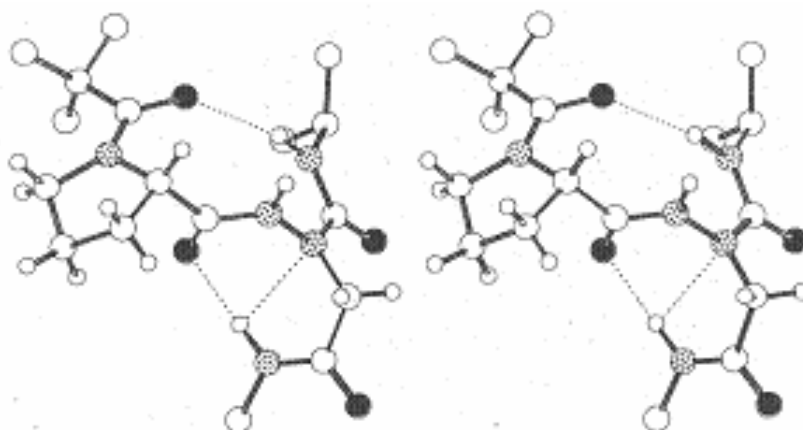


Figure 2.5 : Repliement β II de la structure moléculaire cristalline de Piv-Pro-azAsn(Me)-NHiPr **4** . Les ponts hydrogène intramoléculaires sont indiqués en lignes discontinues.

En plus de la DRX, les composés **2** et **5** ont été étudiés par FTIR et RMN [55]. La présence d'un tour β stabilisé par un pont hydrogène intramoléculaire du type $i+3 \rightarrow i$ a été prouvée, (fig. 2.6) [55].

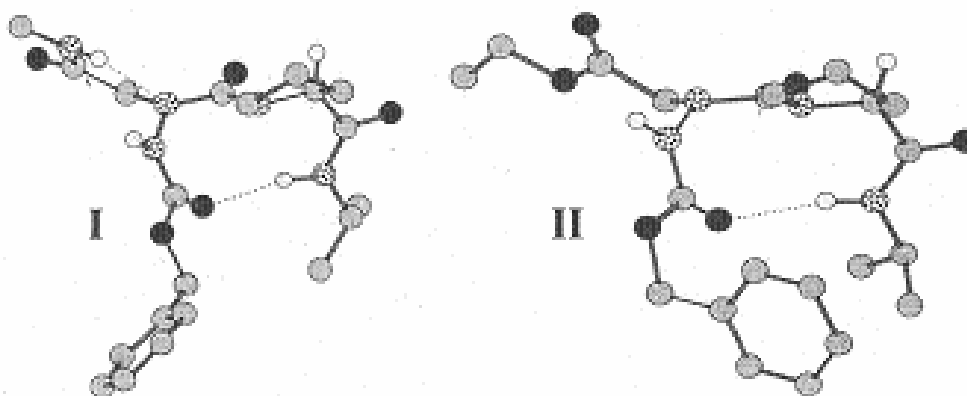


Figure 2.6 : Structures moléculaires cristallines de Z-azAsp(NHMe)-Pro-NHiPr **5** (I) et de Z-azAsp(OEt)-Pro-NHiPr **2** (II).

Très récemment, le résidu azaphénylalanine (azPhe) a été introduit dans des tripeptides, Boc-Xaa-azPhe-Ala-OMe (Xaa= Gly, Ala, Phe, Asn) [65]. Tous ont été synthétisés puis analysés par RMN et les techniques de modélisation

moléculaires ; les résultats obtenus ont largement démontré que l'intercalation d'un résidu azaPhe dans un tripeptide induisait le tour β II [65].

Il va sans dire que l'introduction d'un résidu azaamino acide dans un peptide implique la conformation bioactive β . Ceci fait d'eux d'excellents candidats pour la conception d'analogues de peptides biologiquement actifs [9,52,54,65].

2.5 Actions biologiques des azapeptides

La présence d'un résidu azaamino acide dans un peptide biologiquement actif va très probablement affecter son absorption, son transport, sa distribution, sa liaison à une enzyme ou à un récepteur et sa stabilité métabolique dans l'organisme [53], comme elle pourra aussi améliorer les propriétés pharmacocinétiques du peptide parent [53].

Des études biologiques et pharmacologiques menées sur des peptides modifiés, ont montré dans plusieurs cas, une action biologique accrue, des durées d'action plus longues et une résistance aux protéases, comme il a été découvert par GANTE [53], OEHME et al. [79] et par DUTTA et GILLES [80].

HESS et al. ont synthétisé l'Angiotensine II modifiée avec une activité réduite mais une longue durée d'action [67,81]. Ce n'est qu'en 1995 que GANTE et al. ont synthétisé le premier aza-analogue total, azatide, d'un peptide naturel [69].

Dans les analogues de l'ocytocine, hormone qui favorise les contractions lors de l'accouchement, une perte ou une augmentation d'efficacité a été observée selon la position du résidu azaamino acide incorporé [82,83].

Quelques aza-analogues de l'élédoisine, peptide qui a une action hypertensive et stimule la détente musculaire, sont plus puissants que le produit parent et une action prolongée a été observée [82-85].

Des résultats particulièrement intéressants ont été trouvés avec les aza-analogues de la lulibérine (LHRH), hormone qui stimule l'ovulation [86-92]. Les composés les plus actifs sont 100 fois plus puissants que la lulibérine elle même [9]. Parmi cette série, le produit [D-Ser(tBu)⁶, azaGly¹⁰]-LHRH connu sous le nom commercial, Zoladex. ICI 118630 est utilisé pour le traitement du cancer de la prostate [9,13,56].

Le plus grand problème dans la série des enképhalines, neurotransmetteurs qui ont des effets antalgiques, c'est leur dégradation rapide in vivo. En échangeant un amino acide par son aza-analogue à plusieurs positions l'activité a augmenté dans la majorité des cas [93-95].

Le tableau 2.3 rassemble les modifications apportées à quelques peptides biologiquement actifs.

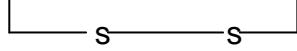
Tableau 2. 3 : Introduction d'azaamino acides dans des peptides biologiquement actifs.

Peptide parent	Résidu incorporé	Activité
LHRH (a) [86-92]	AzGly ¹⁰ -LHRH	++
	AzGly ⁶ -LHRH	+
	AzAla ⁶ -LHRH	++
	Ala ⁶ -AzGly ¹⁰ -LHRH	+++
	Ser(tBu) ⁶ -AzGly ¹⁰ -LHRH	+++
Angiotensine (b) [67,81]	AzVal	-
	AzAsn	-
Oxytocine (c) [82,83]	AzGly	++
Elédoisine (d) [82-85]	AzAsn	+++
Peptide parent	Séquence modifiée	Activité
Enképhaline (e) [93-95]	AzLeu ⁵ -enk-OMe	+
	AzAla ² -enk-OMe	+
	AzLeu ⁵ -enk-OH	-
	AzLeu ⁵ -enk-NH ₂	+
	AzAla ³ -enk-OMe	-

LHRH (a) : Gly-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂.

Angiotensine (b) : Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH.

Oxytocine (c) : Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂.



Elédoisine (d) : Val³-Lys-Asn-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH₂.

Enképhaline (e): Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH.

(-) : pas d'activité, (+) : activité supérieure, (+ +) : activité nettement supérieure, (+ + +) : activité très supérieure.

L'insertion de l'azaproline au sein de la TRH (Thyrotropin Releasing Hormon), un tripeptide naturel de formule pGlu-His-ProNH₂ (fig. 2.7) secrété par l'hypothalamus, a été récemment réalisée [13]. Les aza-analogues synthétisés, azPro³-TRH et Phe²-azPro³-TRH (fig. 2.7) ont montré une activité biologique parfaitement cohérente avec celle des produits originaux [13].

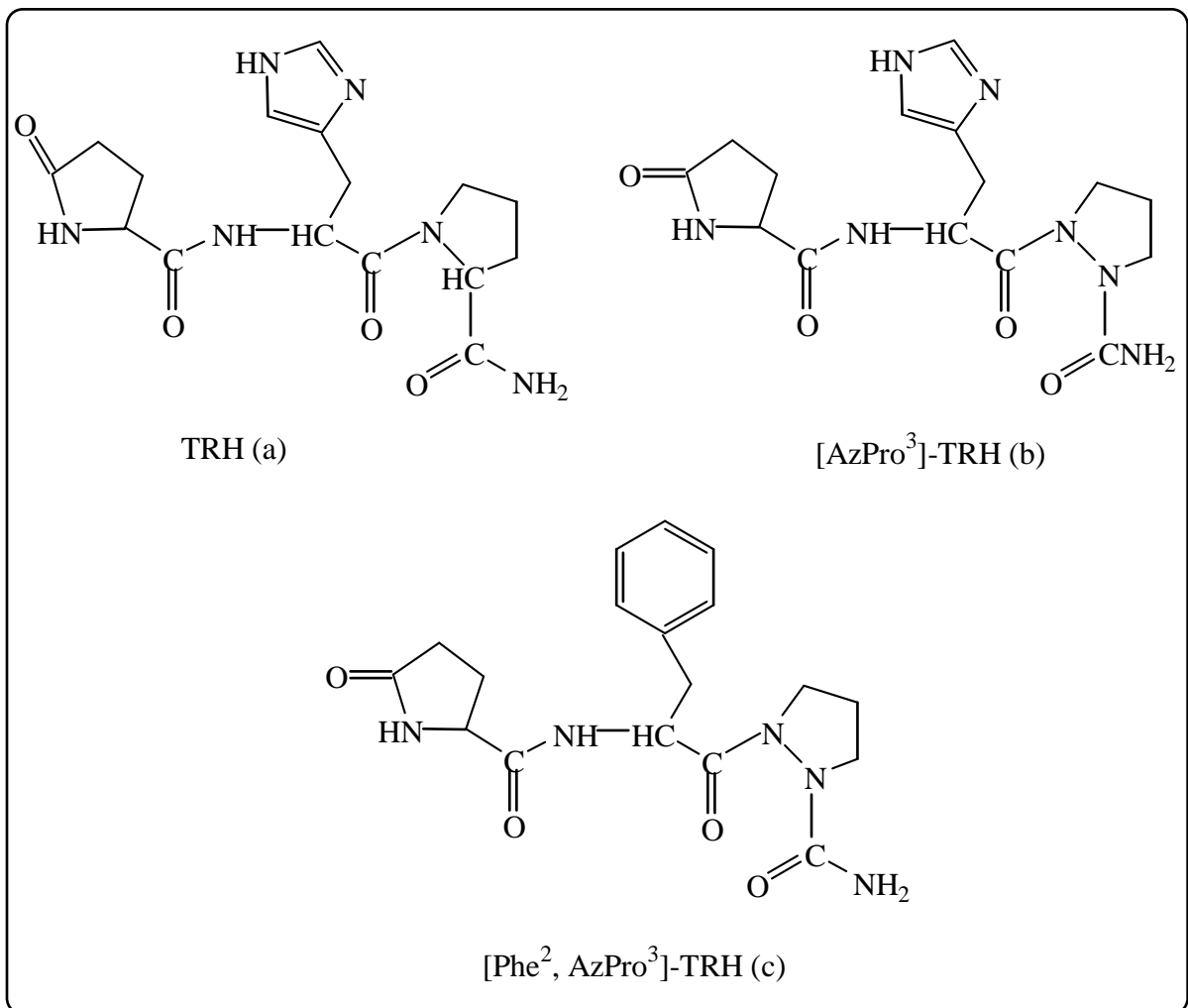


Figure 2.7 : Structure de la TRH (a), AzPro³-TRH (b) et Phe²-AzPro³-TRH (c).

Il en est de même dans le cas de l'insertion de l'azaglycine dans les inhibiteurs des protéases de la cystéine [57].

De forts effets inhibiteurs ont aussi été observés dans les aza-analogues de l'énalaprilate et lisinopril, inhibiteurs de l'ECA (enzyme convertrice de l'angiotensine) [9].

Les aza-analogues des sécrétagogues de l'hormone de croissance (HGH) (fig. 2.8) utilisés pour le traitement des brûlures, des troubles de sommeil ainsi que pour la réduction des effets du vieillissement, ont montré une puissante activité biologique [96].

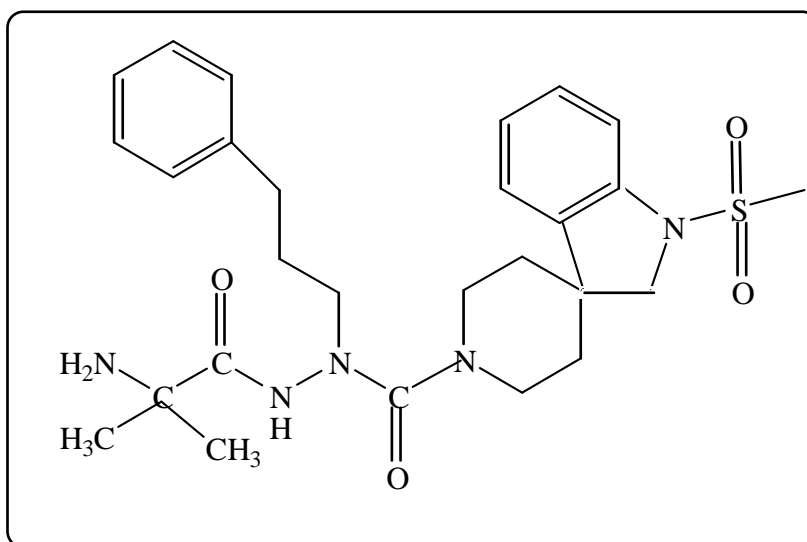


Figure 2.8 : Structure d'un aza-analogue d'un sécrétagogue de l'hormone de croissance.

Une activité anticonvulsante satisfaisante a été obtenue avec quelques aza-analogues d'acides aminés fonctionnels (fig. 2.9). Mais, la plupart d'entre eux sont moins puissants que leurs acides aminés d'origine [97].

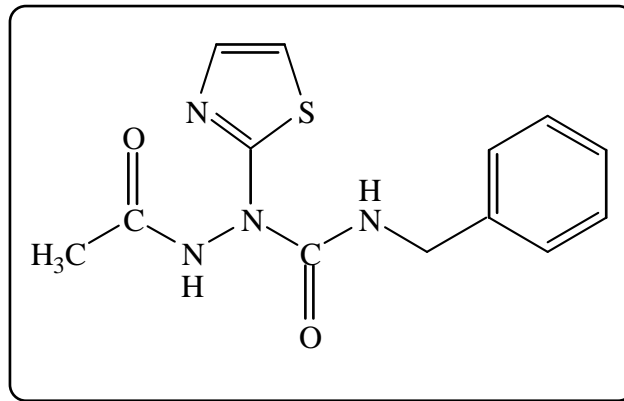


Figure 2.9 : Structure d'un aza-amino acide fonctionnel.

La thrombine, enzyme provoquant la coagulation du sang joue un rôle majeur dans la thrombose, qui est une des causes des maladies cardiovasculaires.

L'introduction d'un azaphénylalanine au sein de l'argatroban, inhibiteur de la thrombine (fig. 2.10), a conduit à des aza-analogues de pouvoir anticoagulant plus important que les C-analogues [98,99]. La plupart de ces nouveaux composés ont exhibés une activité inhibitrice plus grande ou au moins identique à l'argatroban [98,99].

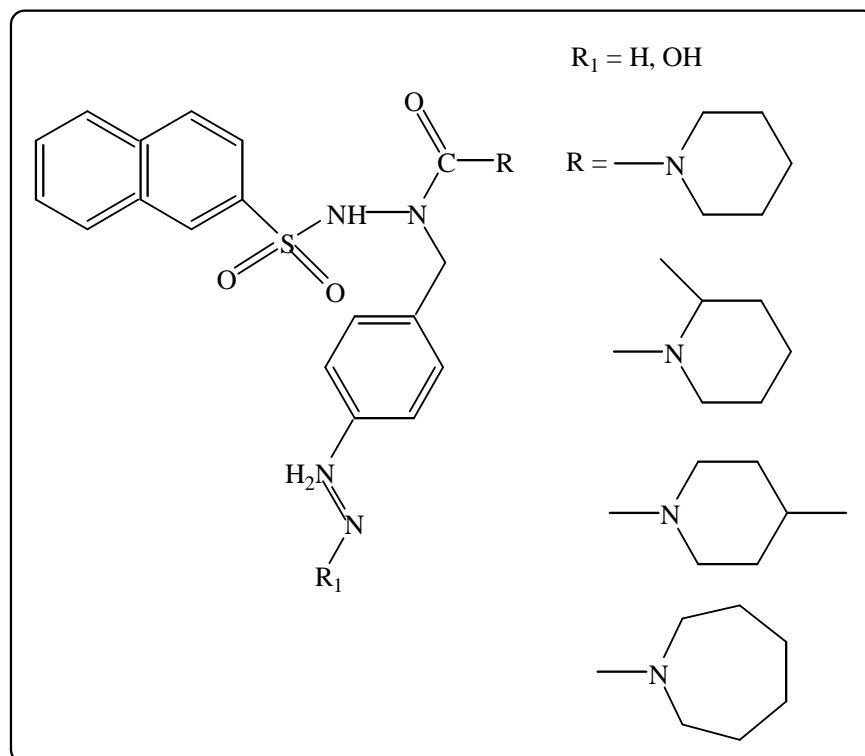


Figure 2.10 : Structure d'un aza-analogue de l'argatroban.

L'hépatite A, maladie infectieuse du foie, est causée principalement par la protéase HAV (Hepatitis A Virus). L'introduction d'un dérivé de l'azaglutamine dans les inhibiteurs de cette protéase (fig. 2.11) a conduit à de puissants analogues inactivateurs du HAV [100].

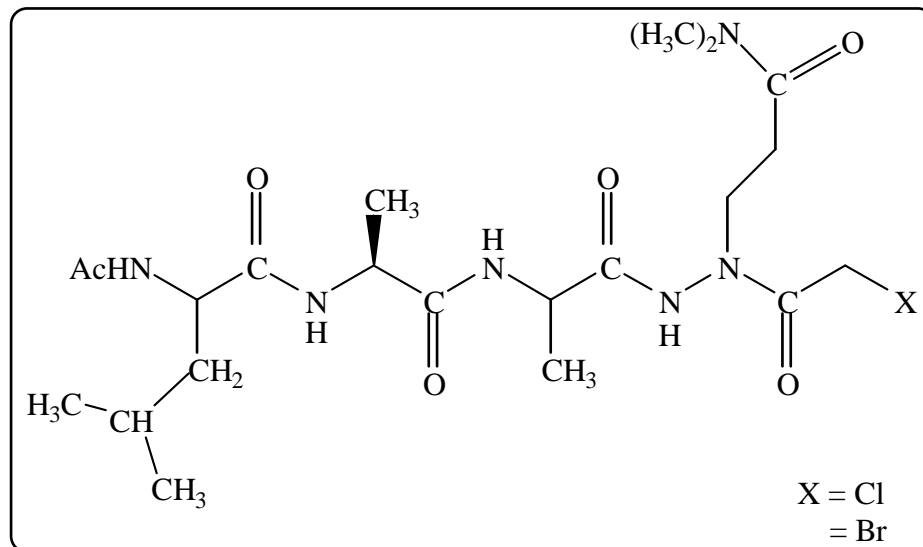


Figure 2.11 : Structure d'aza-inhibiteurs de la protéase HAV.

Il en est de même dans le cas de l'insertion de l'azaglutamine dans les inhibiteurs de la protéase HRV (Human RhinoVirus) (fig. 2.12), virus responsable du rhume et de la grippe [101].

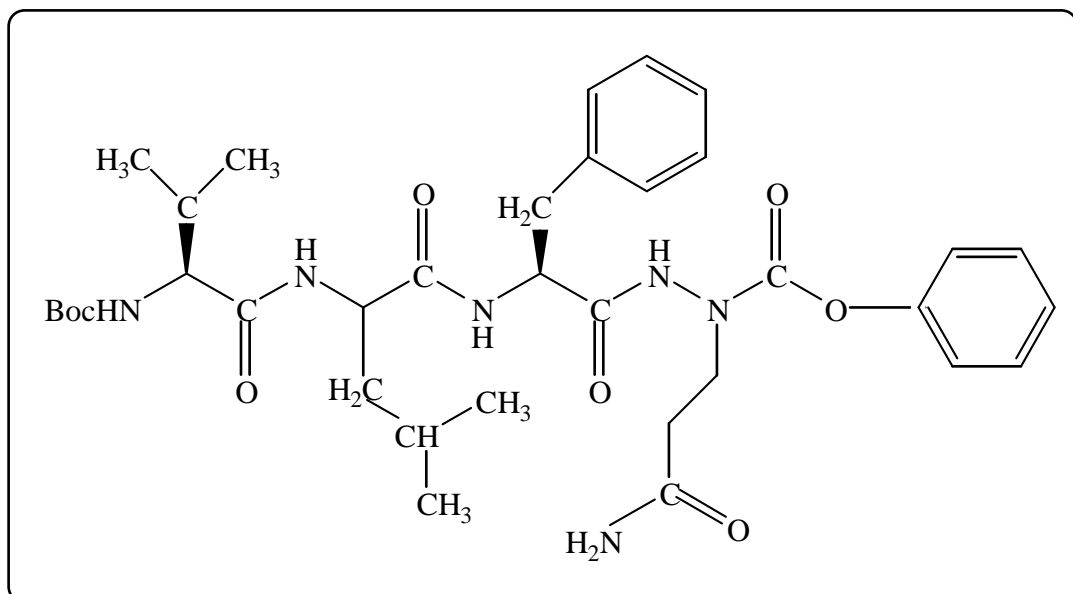


Figure 2.12 : Structure d'un aza-inhibiteur du HRV.

Le syndrome d'immunodéficience acquise connu sous le nom du sida est l'une des maladies dont l'ampleur s'étend à travers le monde. Cette épidémie est causée principalement par le virus HIV. Depuis son apparition, plusieurs inhibiteurs du virus ont été élaborés et administrés aux patients, mais la majorité d'entre eux ont présenté des effets secondaires sévères. Dernièrement, des résultats dignes d'intérêt ont été obtenus avec l'Atazanavir (BMS-232632) (fig. 2.13) , un inhibiteur contenant le résidu azaphénylalanine, qui bloque ou du moins freine la réplication du HIV au sein des cellules qu'il a infectées et présente le minimum de complications au cours du traitement [102-106].

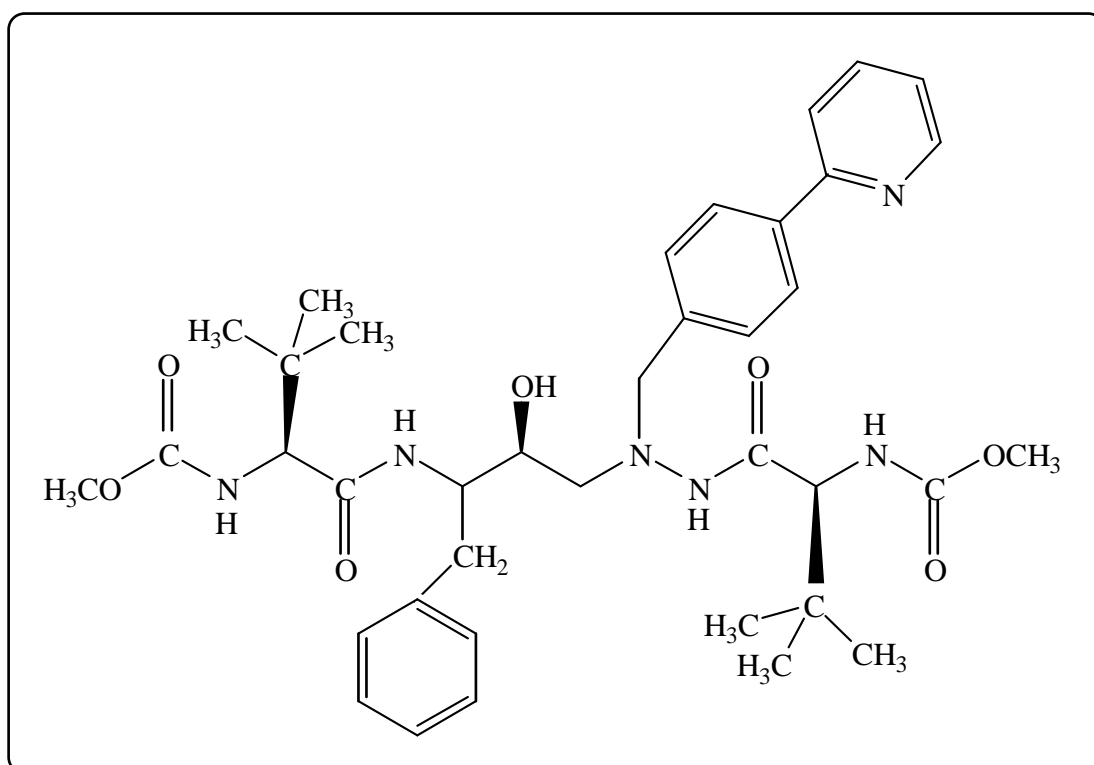


Figure 2.13 : Structure de l'atazanavir.

2.6 Synthèse des azapeptides

STOLLE [107] fut le premier à obtenir un azapeptide : azaGly-azaGly-hydrazide, mais sans en avoir conscience. Plus tard, la synthèse des azapeptides a été introduite par GOLDSCMIDt et WICK [108] puis activement développée par Gante [53,109] et par DUTTA et MORLEY [110].

L'insertion d'un aza-résidu au sein d'une chaîne peptidique est une combinaison entre la chimie de l'hydrazine et celle des peptides [53]. La figure

2.14 [9] ci-dessous, schématise les différentes voies synthétiques d'un aza-amino acide.

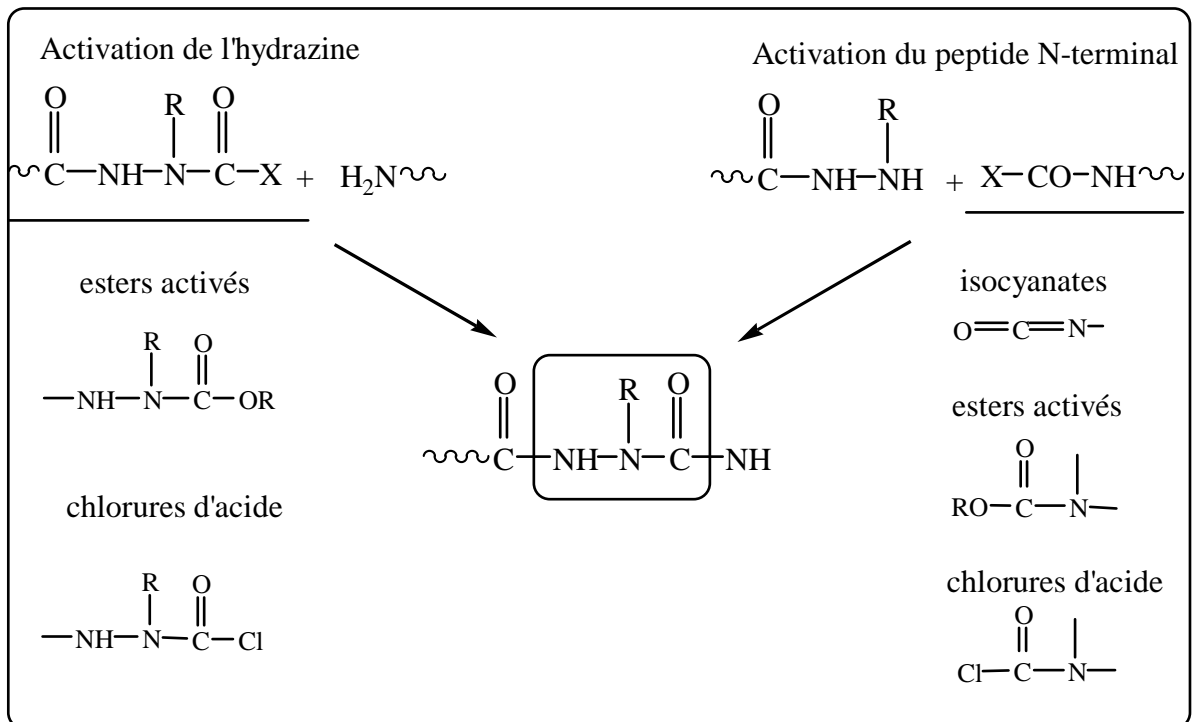


Figure 2.14 : Voies synthétiques d'un azaamino acide [9].

GANTE et al. [53,82] ont obtenu Z-azGly et Z-azLeu par la méthode des chlorures d'acide, en faisant réagir l'hydrazine protégée, Z-hydrazine avec le phosgène. Cette méthode nécessite de très hautes températures et a conduit à un mélange de produits, le polyazaglycine, dans le cas de l'aza-analogue de la glycine.

HESS et coll. [67] ont préparé un analogue de l'angiotensine dans lequel le résidu Val est remplacé azVal. NIEDRICH et coll. [86] ont introduit l'azaalanine dans l'élédoisine par acylation de la méthyl-hydrazine (fig. 2.15).

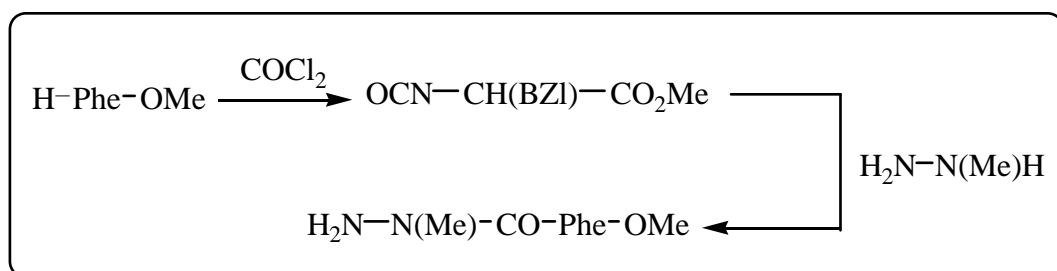


Figure 2.15 : Introduction de l'azaalanine dans l'élédoisine.

DUTTA et al. [110] ainsi que GRAY et al. [111] ont utilisé la méthode des esters d'aryle activés. Dans cette méthode, deux approches se présentent :

- Soit on fait réagir l'hydrazine protégée avec un chlorocarbonate Cl-CO-OX ou un bis-carbonate CO(OX)₂ (x : est un dérivé d'aryle). L'intermédiaire obtenu est par la suite mis en contact avec la partie C-terminale d'un fragment peptidique.
- Ou bien, on active la partie N-terminale d'un fragment peptidique par les mêmes réactifs, puis on la fait réagir avec l'hydrazine protégée [53].

Cette méthode nécessite des conditions assez sévères, notamment une température élevée et une longue durée d'action [13].

Toute fois, l'approche la plus utilisée consiste à ajouter l'hydrazine adéquate protégée sur un dérivé peptidique N-terminal sous forme d'isocyanate [110,111].

GANTE [53,112,113] a utilisé une autre méthode de synthèse d'azapeptides faisant appel au azolides (imidazolide et 1, 2,4-triazolide). Ces derniers sont faits réagir avec les hyrazides pour former l'azapeptide désiré (fig. 2.16).

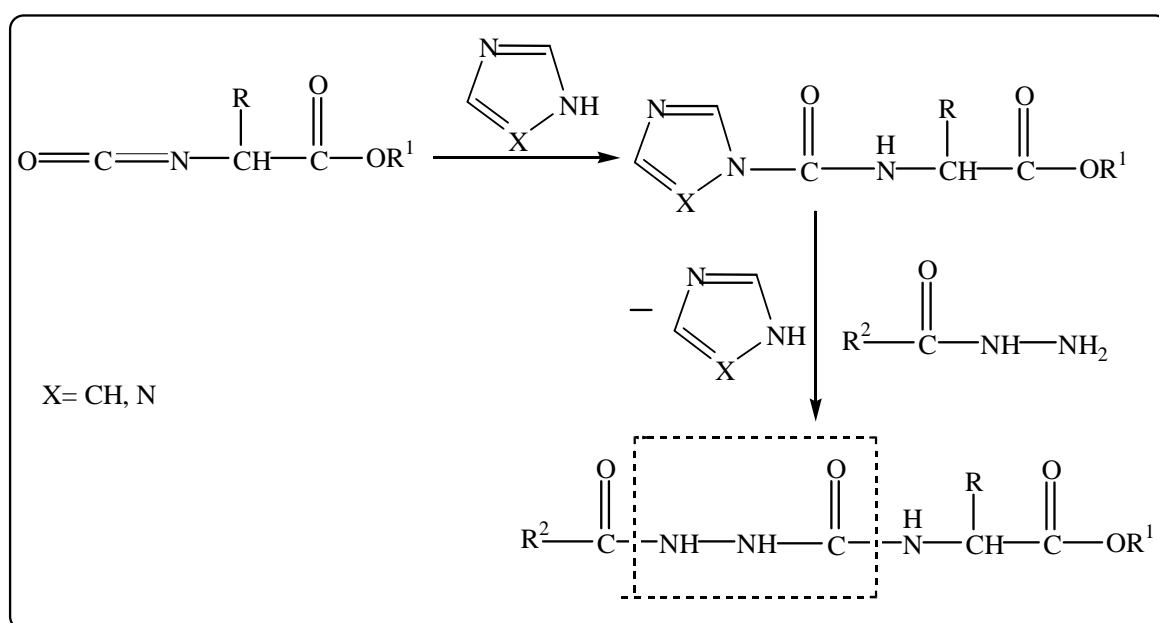


Figure 2.16: Synthèse des azapeptides par la méthode des azolides.

BENATALAH et al. [54] ont synthétisé un azadipeptide, le tBuCO-Pro-AzaAla-NHiPr, par la méthode des estres actifs en utilisant le DCCI comme agent

de couplage. La réaction de couplage schématisée dans la figure 2.17 a été effectuée dans le DMF anhydre à une température de 60°C et avec un rendement de 65%.

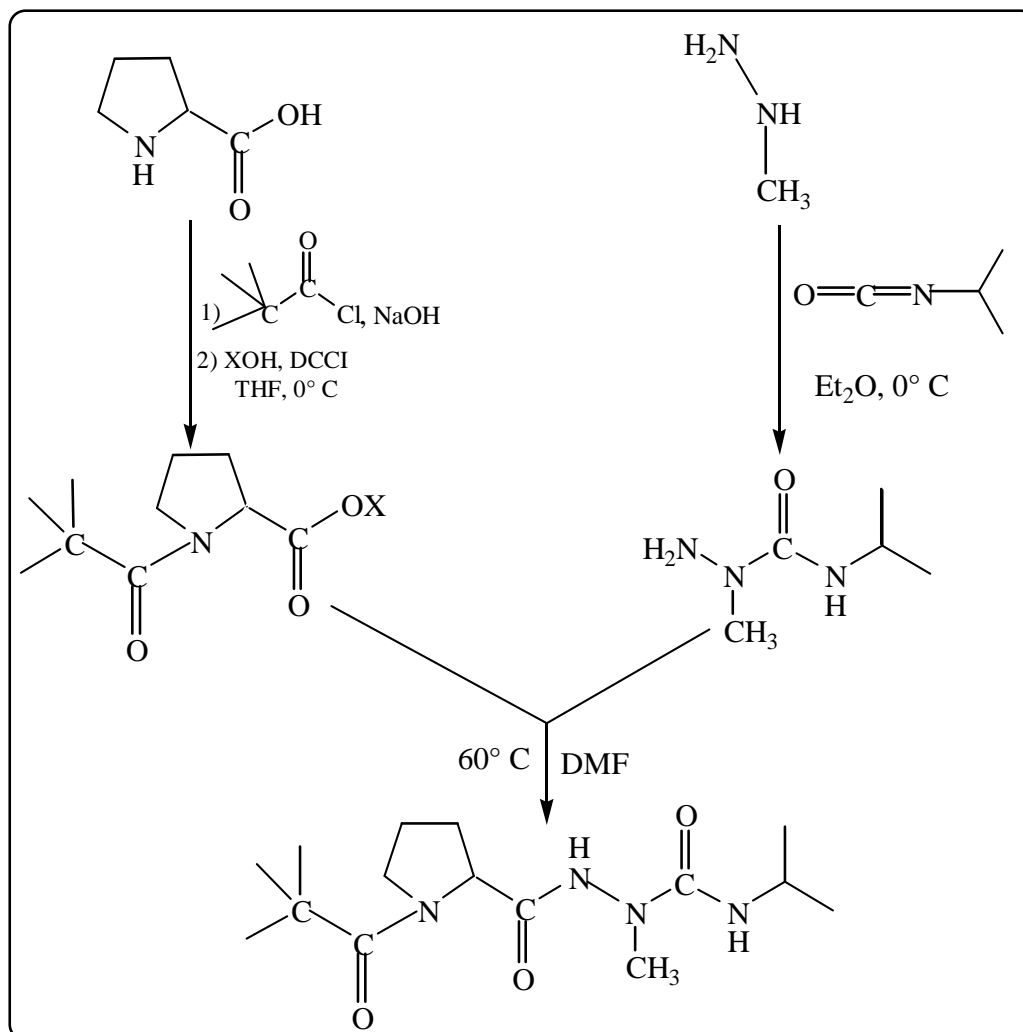


Figure 2.17: Réactions de synthèse du tBuCO-Pro-AzAla-NHiPr.

OX= N-oxysuccinimidyl.

LEE et al. ont synthétisé le Boc-Phe-AzaLeu-Ala-OMe [12], le Boc-Ala-Phe-AzaLeu-Ala-OMe [33] et le Boc-Xaa-AzaPhe-AlaOMe (Xaa = Gly, Ala, Phe, Asn) [65] par la méthode des esters actifs, aussi, en utilisant le HBTU (fig. 2.18) comme agent de couplage.

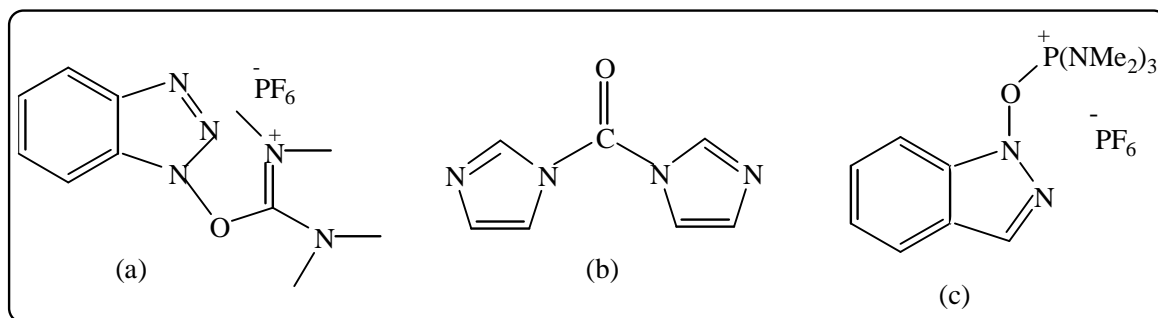


Figure 2.18: Structure du HBTU (a), du CDI (b) et du BOP (c).

Le processus de synthèse de l'azatripeptide Boc-Phe-AzaLeu-Ala-OMe est schématisé dans la figure 2.19 [12].

Le Boc-Phe (4) a été couplé au produit (3) par le HBTU et la DIEA comme base pour aboutir au produit final avec un rendement de 40%.

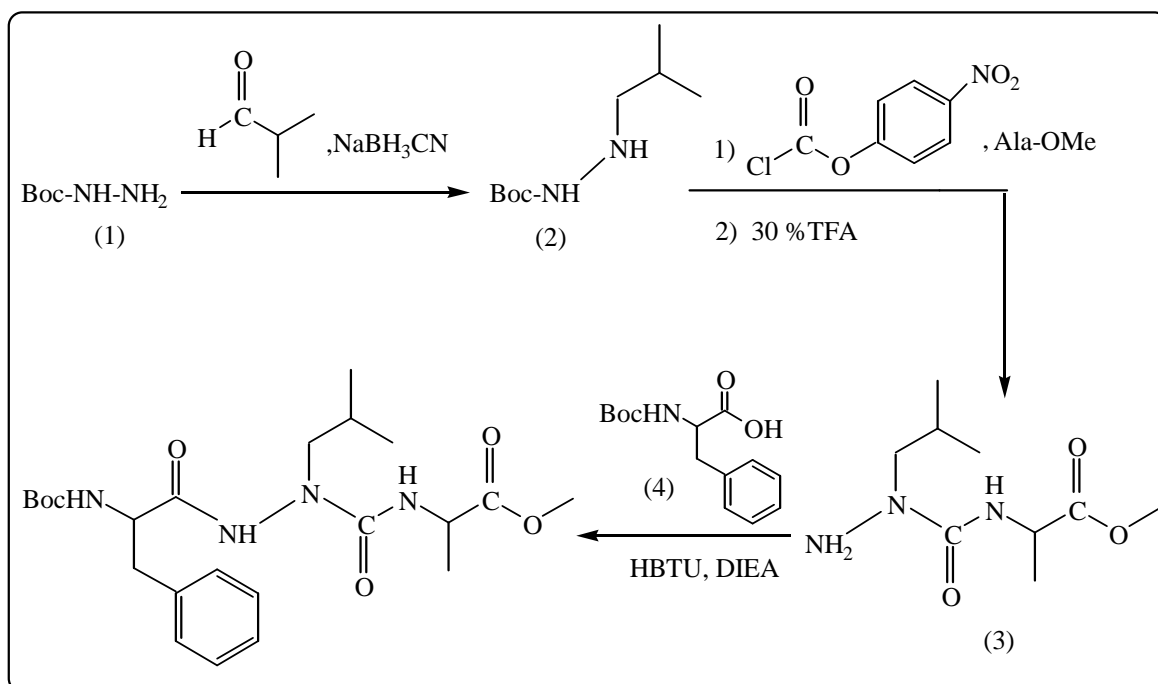


Figure 2.19: Schéma de synthèse du tripeptide Boc-Phe-AzaLeu-Ala-OMe.

WIECZERZAK et al. [57] ont préparé le Boc-AzaGly-Val-OBZI, un inhibiteur de la cathepsine B qui est une protéase de la cystéine, par la méthode des anhydrides. Le résidu azaglycine a été incorporé dans la chaîne peptidique en couplant le Boc-NH-NH₂ avec l'ester de l'acide aminé approprié en présence du CDI (fig. 2.18) comme agent de couplage (fig. 2.20).

Il a été découvert que l'emploi du CDI a permis d'obtenir des produits purs avec un bon rendement [57].

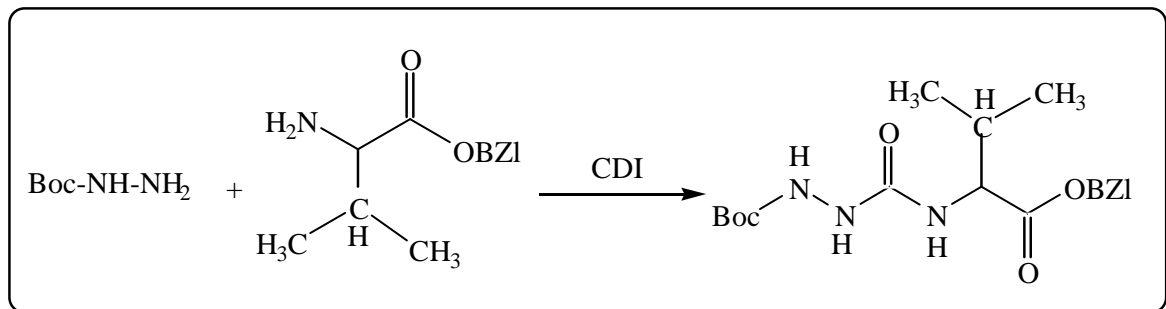


Figure 2.20: Réaction de synthèse du Boc-AzaGly-Val-OBZI, inhibiteur de la cathepsin B.

HUANG et al. [100] ont préparé un aza-inhibiteur du HAV contenant un dérivé de l'azaglutamine (fig. 2.21). Ce dernier a été introduit dans la chaîne peptidique par la méthode des esters actifs en employant le BOP (fig. 2.18) comme agent de couplage.

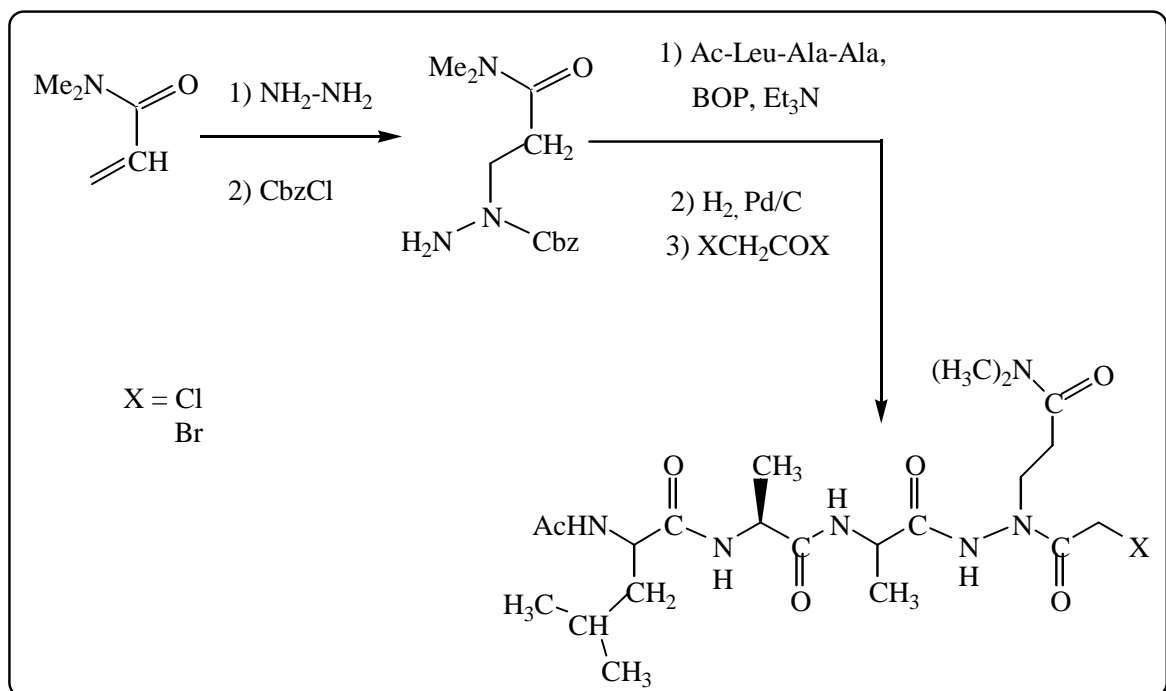


Figure 2.21: Schéma de synthèse d'un inhibiteur du HAV.

Les azapeptides ont aussi été obtenus par synthèse en phase solide [114-118]. Cette méthode a été plutôt utilisée pour la synthèse de longs azapeptides d'intérêt biologique.

Une des stratégies consiste à convertir la partie N-terminale d'une chaîne peptidique, reliée à une résine, en isocyanate en employant le bis (2,4-dinitrophényl) carbonate en présence d'une base. Par la suite, l'intermédiaire obtenu réagit avec l'hydrazide d'un amino acide protégé, portant sur l'azote β la chaîne latérale adéquate d'un acide aminé, ce qui complètera la structure de l'azapeptide [114,115,118] (fig. 2.22).

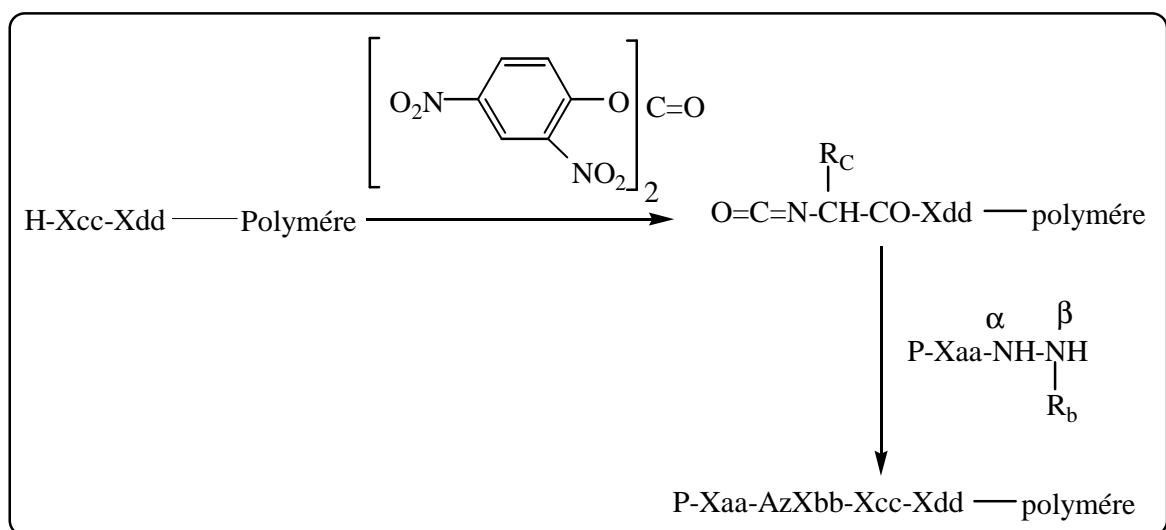


Figure 2.22: Introduction d'un azarésidu au sein d'une chaîne peptidique par synthèse en phase solide.

Une autre stratégie consiste à utiliser une solution de phosgène dans le toluène [117]. Cet agent carbonylant est efficace pour la synthèse d'azapeptides en phase solide selon le schéma illustré dans la figure 2.23.

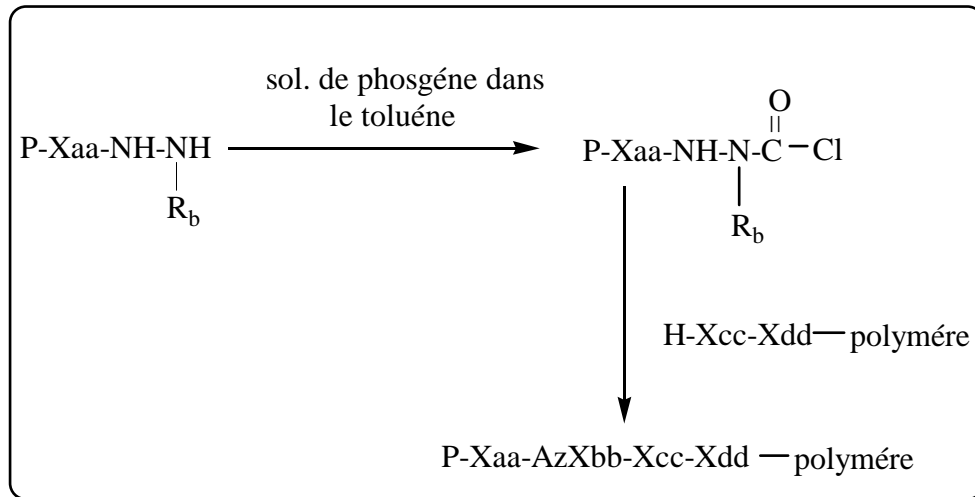


Figure 2.23: Introduction d'un aza-résidu au sein d'une chaîne peptidique en utilisant le phosgène.

CHAPITRE 3

PARTIE EXPERIMENTALE

Tous les solvants (tetrahydrofurane, diméthylformamide, acétate d'éthyle, éther diéthylique, éthanol, hexane.....) sont de source Fluka, Riedel-deHaën et Panréac, et ont été utilisés tels quels sans distillation préalable. Le DMF, THF et ACOEt ont été séchés sur sulfate de sodium (Na_2SO_4) avant utilisation.

Les produits de départ et les réactifs (Boc-NH-NH₂, Z-Cl, NaH 60%, Boc-Gly-OH, triphosgène, 1,3-dibromopropane et NMM) sont de source Aldrich et Fluka et ont été utilisés tels quels.

L'avancement de la réaction a été suivi par chromatographie sur couche mince (CCM) avec des plaques en aluminium revêtues de gel de silice 60 F₂₅₄ en tant que phase stationnaire (Merck, 5735), l'éluant est soit un seul solvant ou une combinaison de solvants.

La pureté des produits a été contrôlée par l'obtention d'une seule tache en CCM, et confirmée par l'examen des spectres FTIR et RMN-H¹ à 300 MHz dans le CDCl₃ avec le TMS comme référence interne ainsi qu'en mesurant le point de fusion.

Les solvants ont été éliminés par un évaporateur rotatif de marque BÜCHI R-200 sous pression réduite.

3.1 Choix des groupements protecteurs

Le tertibutyloxycarbonyle noté (Boc) et le benzyloxycarbonyle noté (Z) (fig. 3.1) sont les deux groupements protecteurs utilisés tout au long de la synthèse.

Le groupement Boc est de type uréthane. Il est résistant aux bases employées en synthèse peptidique mais sensible aux milieux acides. Son rôle de groupement N-protecteur, son élimination facile ainsi que sa solubilité dans la majorité des solvants organiques font de lui un groupement de choix.

Le groupe N-protecteur, Z, est lui aussi de type uréthane, résistant aux milieux acides. Il peut être largement associé au groupement Boc du fait de leur

orthogonalité. Le groupe Z est éliminé par hydrogénéolyse par contre le groupement Boc est clivé en milieu acide.

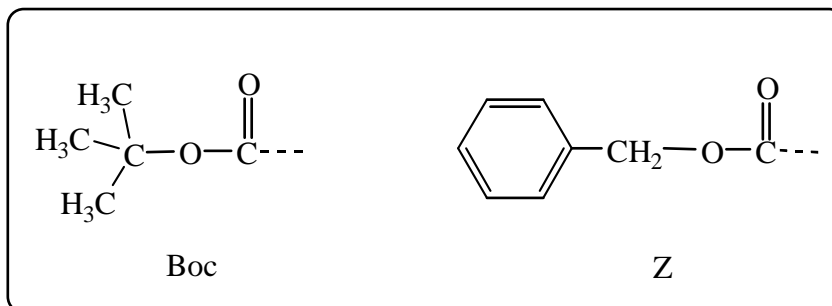


Figure 3.1 : Structure des groupements Boc et Z.

3.2 Agent de couplage

Le triphosgène ou le bis (trichlorométhyle) carbonate (fig. 3.2), solide de couleur jaunâtre, est l'agent de couplage utilisé. Il permet l'activation de la partie C-terminale d'un amino acide, puis la condensation de ce dernier sur la partie N-terminale d'une chaîne peptidique en croissance.

L'activation au triphosgène nécessite des conditions opératoires douces de température et de solvant.

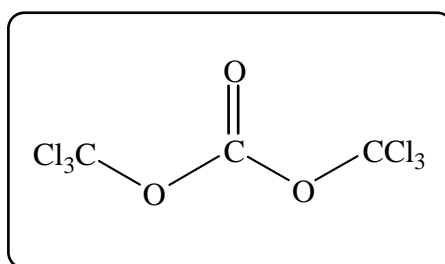


Figure 3.2 : Structure du triphosgène.

3.3 Réactions de synthèse de l'azadipeptide

3.3.1 Synthèse du Boc-NH-NH-Z

Dans un ballon de 100 ml, on introduit successivement 15mM (2g) de Boc-NH-NH₂ qu'on fait dissoudre dans 10 ml de THF, et 15mM (1,65 ml) de NMM. Le mélange est maintenu sous agitation pendant 30 min à 0°C. On ajoute alors,

lentement 15mM (2,15 ml) de chloroformiate de benzyle (Z-Cl). On laisse le mélange réactionnel sous agitation pendant 2h à 0°C et une nuit à température ambiante.

On se débarrasse du sel formé par filtration sous vide. On élimine le solvant du filtrat par un évaporateur rotatif sous pression réduite.

L'huile obtenue est cristallisée dans le système THF/Hx. Les cristaux de la 1-benzyloxycarbonyl-2-tertiobutyloxycarbonyl hydrazine, Boc-NH-NH-Z (fig.3.3), sont séchés, pesés puis analysés.

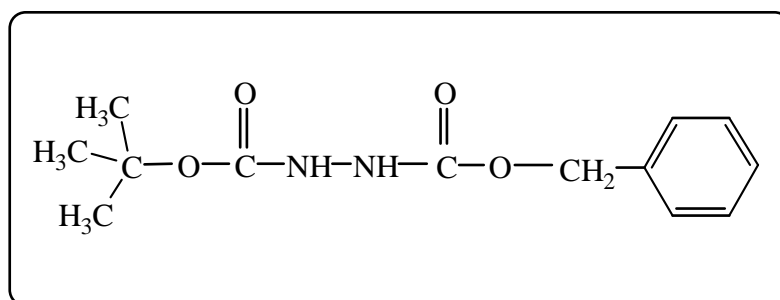


Figure 3.3 : Formule développée du Boc-NH-NH-Z.

MM = 266 g/mol

R_{dt} = 89%

T_f = 80.9 °C

R_f = 0.61 (ACOEt/EP 70/30)

0.47 (ACOEt/Hx 70/30)

0.80 (DCM/iPrOH 95/5)

3.3.2 Synthèse du Boc-AzPro-OBZI

Dans un tricol de 250 ml, une dispersion d'hydruure de sodium NaH 8mM (0,32g) à 60% dans l'huile de paraffine est mise en suspension dans 10 ml de DMF anhydre pendant 45 min sous atmosphère d'azote avec agitation à température ambiante. On ajoute alors par petites quantités 4mM (1,06 g) de Boc-NH-NH-Z solide. On maintient le mélange sous azote et sous agitation pendant 1h, puis on verse goutte à goutte 4mM (0,42 ml) du 1,3-dibromopropane et on laisse le mélange réactionnel sous agitation durant une nuit.

On élimine le solvant par un évaporateur rotatif sous pression réduite. L'huile résiduelle est d'abord reprise par 10 ml d'ACOEt et lavée successivement par 5 ml d'une solution d'acide citrique 5%, 5 ml d'une solution de bicarbonate de sodium 5% et 5 ml d'une solution saturée de NaCl, puis mise à sécher sur sulfate de sodium (Na_2SO_4) pour une nuit.

L'huile du 1-benzyloxycarbonyl-2-tertiobutyloxycarbonyl pyrazolidine (fig. 3.4) obtenue après élimination de l'ACOEt est pesée, analysée et utilisée telle quelle dans l'étape suivante.

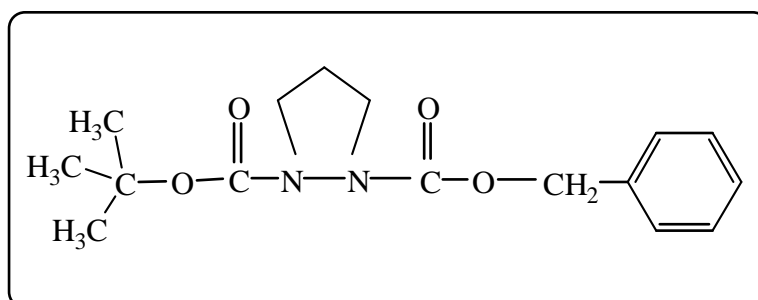


Figure 3.4 : Formule développée du Boc-AzPro-OBZI.

MM = 306 g/mol

$R_{dt} = 49\%$

$R_f = 0.49$ (ACOEt/EP 70/30)

0.83 (ACOEt/iPrOH 95/5)

0.56 (ACOEt/ Hx 70/30)

Nous avons aussi tenté la synthèse du Boc-AzaPro-OBZI dans le THF, en suivant le protocole de synthèse précédent et en remplaçant le DMF par le THF. L'huile obtenue après synthèse est mise à cristalliser dans l'Hx. Les cristaux obtenus sont séchés pesés puis analysés.

$R_{dt} = 21\%$

$T_f = 71,2\text{ }^\circ\text{C}$

$R_f = 0,4$ (ACOEt/Hx 70/30)

0,69 (ACOEt/EP 70/30)

0,80 (ACOEt/iPrOH 95/5)

0,80 (DCM/iPrOH 95/5)

3.3.3 Synthèse de HCl,H-AzPro-OBZI

3.3.3.1 Préparation de HCl gazeux dans l'acétate d'éthyle (~3N)

On fait barboter pendant 25 min dans 20 ml d'ACOEt, du HCl gazeux provenant de la réaction de NaCl avec H₂SO₄. Le titre de la solution est déterminé par pesée avant et après réaction. La solution ainsi préparée est utilisée directement dans la prochaine étape.

3.3.3.2 Elimination du Boc

On verse, à raison d'un ml par mM, 10.5 ml de la solution précédente fraîchement préparée sur 10.5 mM (3.21 g) de Boc-AzPro-OBZI refroidi. On maintient le mélange sous forte agitation pour 2h.

On chasse l'ACOEt au moyen d'un évaporateur rotatif sous pression réduite.

Le chlorhydrate HCl,H-AzPro-OBZI (fig. 3.5) sous forme d'un sel blanc apparaît soit directement au fur et à mesure de l'élimination de l'ACOEt, ou bien après cristallisation de l'huile obtenue dans le mélange EtOH/Et₂O.

Le chlorhydrate obtenu est séché, pesé puis analysé.

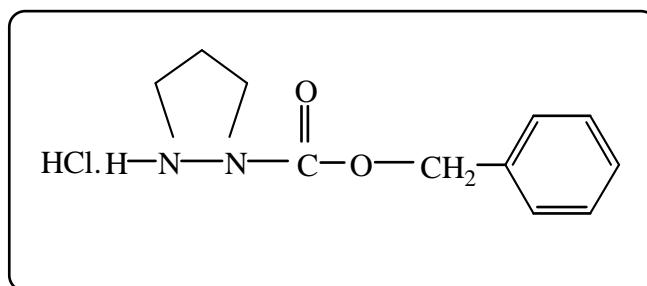


Figure 3.5 : Formule développée du HCl,H-AzPro-OBZI.

MM = 242.5 g/mol

R_{dt} = 32%

T_f = 157-164 °C

R_f = 0.55 (EtOH/Et₂O 70/30)

0.60 (EtOH/ACOEt 70/30)

3.3.4 Synthèse du Boc-Gly-AzPro-OBZI

On introduit dans un ballon de 100 ml, 4.1mM (0.72 g) du dérivé N-protégé à extrémité carboxylique libre, Boc-Gly-OH, dissout dans 10 ml de THF et 4.1mM (0.45 ml) de NMM. Le tout étant refroidi à $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, avec un mélange réfrigérant (NaCl/glacé pilée), est maintenu sous agitation pour 20 min. On additionne alors, 1.37mM (0.4 g) du triphosgène par portions. Après 45 min d'agitation toujours à $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, on ajoute 2 x 4.1mM de NMM et tout de suite après 4.1mM (1 g) de HCl, H-AzPro-OBZI par petites quantités. On laisse le mélange réactionnel sous agitation à $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 1h avant de revenir lentement à température ambiante et de poursuivre l'agitation durant une nuit.

On filtre le sel formé, on évapore à sec le filtrat. L'huile résiduelle du Boc-Gly-AzPro-OBZI (fig. 3.6) obtenue est pesée et analysée.

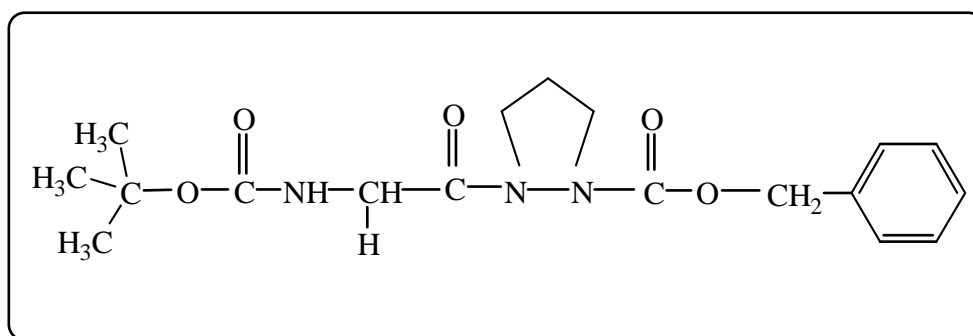


Figure 3.6 : Formule développée du Boc-Gly-AzPro-OBZI.

MM = 363 g/mol

$R_{dt} = 86\%$

$R_f = 0.8$ (ACOEt)

0.5 (ACOEt/EP 70/30)

0.65 (ACOEt/MeOH 70/30)

3.4 Méthodes utilisées et techniques d'identification

3.4.1 Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une méthode chromatographique basée sur les différences d'affinité des substances à analyser à l'égard de la phase stationnaire et de la phase mobile.

Le principe de cette méthode est le dépôt de l'échantillon sur des plaques chromatographiques. Nous avons utilisé dans notre cas des plaques en aluminium (4cm x 8cm) revêtues de gel de silice 60 F₂₅₄. L'échantillon est d'abord mis en solution à 5% dans le THF puis déposé en un point à 1cm de l'extrémité inférieure de la plaque à l'aide d'un capillaire figure 3.7.

Le développement de la plaque s'effectue dans une cuve fermée contenant l'éluant dont le niveau est ajusté à environ 0,5 cm du fond de la cuve. La plaque est mise dans la cuve en position verticale en prenant soin que le dépôt soit au dessus du niveau de l'éluant. Ce dernier va migrer sur la plaque par capillarité en entraînant avec lui les différents constituants de l'échantillon à des vitesses différentes derrière le front du solvant. Ces vitesses dépendent des forces électrostatiques (adsorption désorption) retenant le constituant sur la phase stationnaire ainsi qu'à sa solubilité dans la phase mobile.

Une fois que le front du solvant arrive à 1 cm de l'extrémité supérieure de la plaque, cette dernière est retirée de la cuve puis mise à sécher à l'air libre.

Du moment que les constituants de nos échantillons sont invisibles sur la plaque, leur révélation a été effectuée avec une radiation UV en exposant la plaque chromatographique à une lampe UV. Sous la lampe la plaque devient verte fluorescente et les constituants apparaissent sous forme de tâches rose brillantes. Le front du solvant ainsi que la position des tâches sont marqués au crayon. On pourra ainsi calculer le facteur de rétention R_f donné par la relation:

$$R_f = d_{\text{sub}} / d_{\text{solv}}$$

d_{sub} : distance parcourue par le composé.

d_{solv} : distance parcourue par le front du solvant.

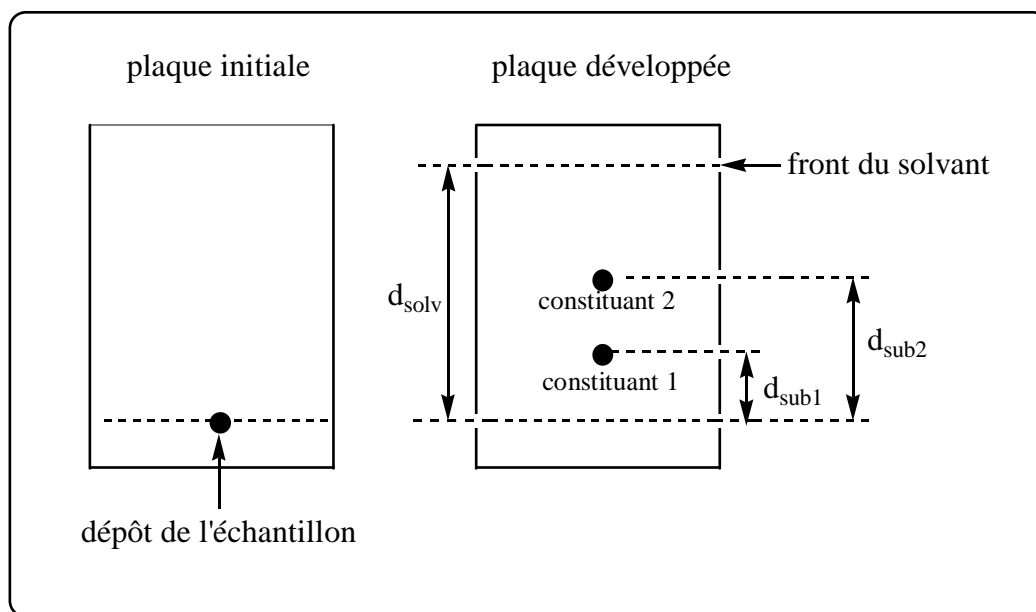


Figure 3.7: Plaques de CCM initiale et développée.

3.4.2 Mesure du point de fusion

Le point de fusion est une constante physique caractéristique de chaque corps pur. La température de fusion des produits cristallisés a été mesurée par un appareil Stuart Scientific Melting Point Apparatus SMP3.

3.4.3 Analyse élémentaire

Les produits cristallisés ont été caractérisés par analyse élémentaire sur un appareil LECO CHN-900.

Cette analyse est basée sur la combustion totale de l'échantillon en donnant le pourcentage des éléments C, H, N. On introduit 2 mg de l'échantillon dans des capsules d'étain ou d'argent. Après combustion, les gaz obtenus vont être détectés par infrarouge ou par conductivité thermique.

3.4.4 La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Les produits obtenus ont été caractérisés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) à l'aide d'un appareil du type Thermo Nicolet Nexus 670.

Les échantillons ont été introduits sous forme de pastille soit en broyant 1mg de produit dans 250mg de KBr spectroscopique ou bien en étalant le produit entre deux pastilles vierges de KBr. L'étude a été effectuée avec une résolution de 4 cm^{-1} et un nombre de balayage égal à 40 dans le domaine $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$.

Les spectres infrarouges ont été interprétés selon les tables du livre : Identification spectrométriques de composés organiques, Silverstein R.M., Basler G.G, Morill .T.C, 5^{ème} édition, 1991.

3.4.5 La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire

Les produits ont aussi été caractérisés par la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) à 300 MHz dans le CDCl_3 avec le TMS comme référence interne, 20 mg de produit sont dissous dans 0,4 ml de solvant. Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm).

Le spectre RMN- H^1 du Boc-AzaPro-OBZI a été enregistré sur une BRUCKER AC 200P.

Les spectres RMN- H^1 , RMN- C^{13} et DEPT 135 du chlorhydrate de l'azaproline ainsi que les spectres RMN- H^1 du Boc-NH-NH-Z et de l'azadipeptide ont été enregistrés sur une BRUCKER AC 250, au niveau du " Laboratoire de Chimie Bioorganique et des Systèmes Moléculaires Vectoriels" à l'université d'Avignon-France.

➤ *DEPT 135*

DEPT est l'abréviation en anglais de Distortionless Enhancement by Polarization Transfert. Cette analyse est de type RMN 1D liée à la RMN- C^{13} . Elle permet de connaître le nombre d'hydrogènes portés sur un atome de carbone.

La DEPT 135 est une technique RMN qui donne la multiplicité des différents carbones. Elle distingue entre un méthyle (CH_3), méthylène (CH_2), méthyne (CH) et un carbone quaternaire en donnant un signal positif (+) pour un CH_3 ou un CH, un signal négatif (-) pour un CH_2 et un signal nul pour un carbone quaternaire (figure 3.8).

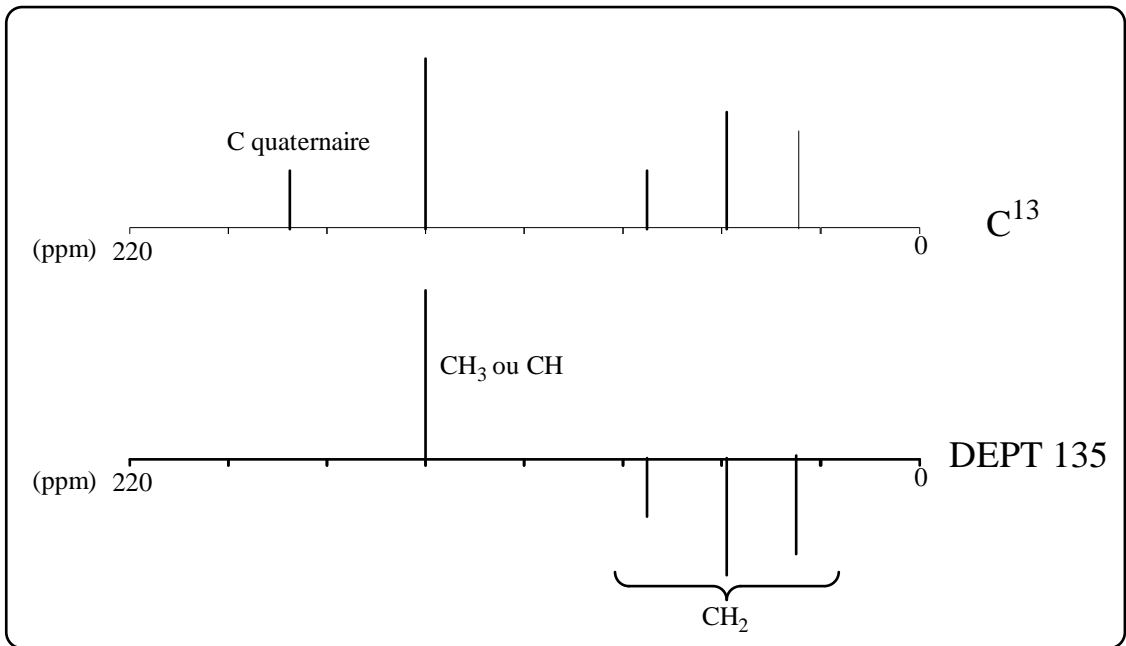


Figure 3.8: Exemple d'un spectre RMN- C^{13} et DEPT 135.

CHAPITRE 4

RESULTATS ET DISCUSSIONS

La synthèse d'un azapeptide fait appel aux méthodes classiques de synthèse peptidique, au choix judicieux des groupements protecteurs ainsi qu'à la chimie des hydrazines pour permettre l'introduction de l'azarésidu adéquat selon les principes fondamentaux de la synthèse peptidique, et ceci, consiste à construire la chaîne peptidique pas à pas par voie récurrente en condensant la partie C-terminale activée d'un amino acide N-protégé sur la partie N-terminale d'une chaîne peptidique en croissance.

Notre choix s'est porté sur la synthèse du résidu azaproyl analogue de la prolyl, puis le coupler à la glycine par la méthode des anhydrides moyennant le triphosgène comme agent de couplage.

La proline est le seul acide iminé cyclique codé génétiquement, son azote est impliqué dans la fermeture du cycle. Cet hétérocycle est doué d'une certaine rigidité, on le trouve dans un grand nombre de polypeptides comme les hormones, les facteurs de croissance, les enzymes et les neurotransmetteurs.

La glycine est un acide aminé naturel ne possédant pas de carbone asymétrique, sa chaîne latérale est un hydrogène. C'est l'acide α -aminé le plus simple.

Le projet initialement conçu est représenté dans la figure 4.1.

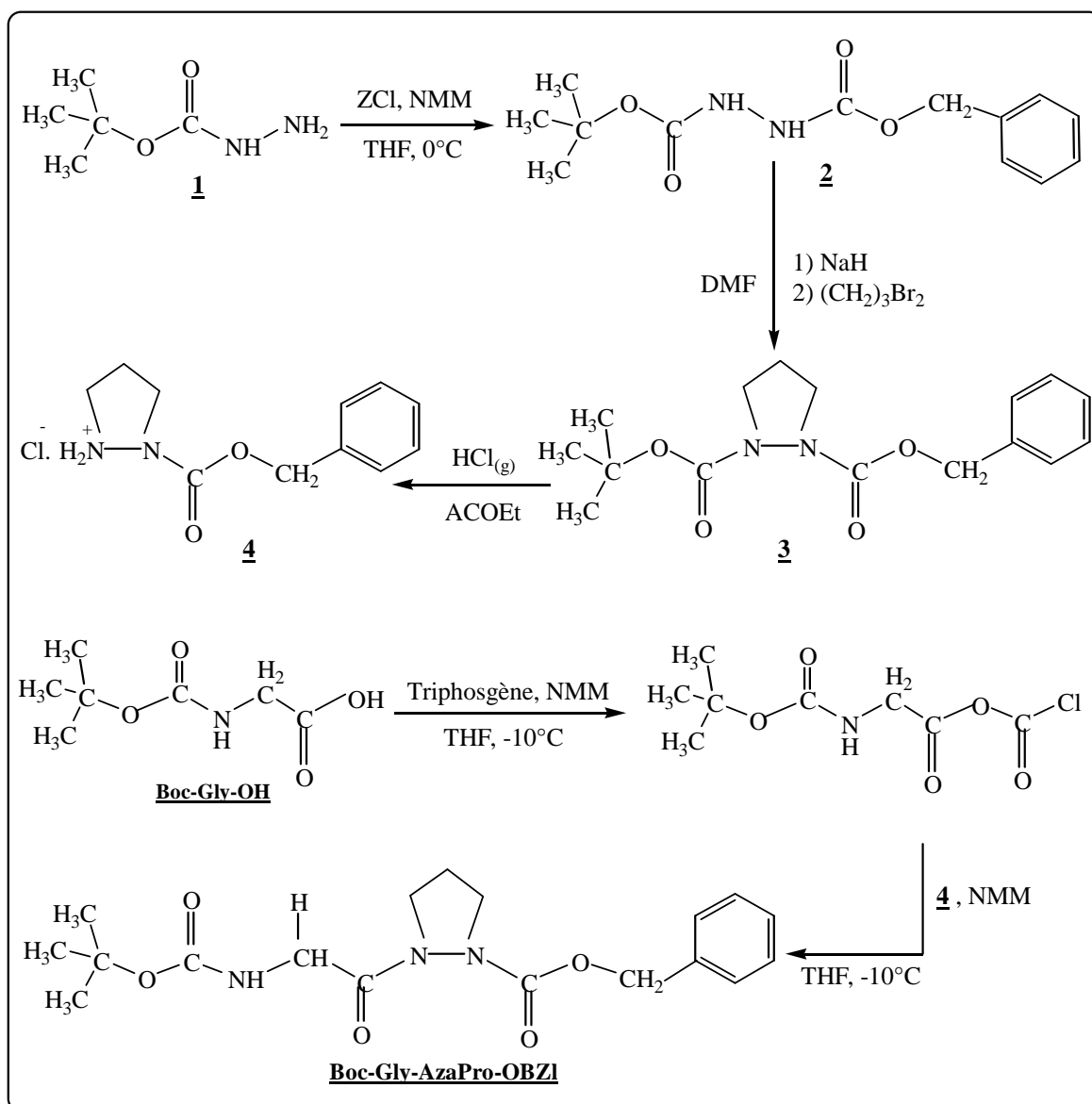


Figure 4.1 : Schéma des différentes étapes de la synthèse du dipeptide Boc-Gly-AzaPro-OBZI.

4.1 Réaction de synthèse du 1-benzyloxycarbonyl-2-tertiobutyloxycarbonylhydrazine (Boc-NH-NH-Z)

Nous avons premièrement procédé à la synthèse du Boc-NH-NH-Z sous forme de cristaux blancs en faisant réagir le *tert*-butyl carbazate Boc-NH-NH₂, produit commercial, avec le chloroformiate de benzyl (Z-Cl) dans le THF à 0°C en présence de la NMM, comme base, pour piéger l'acide chlorhydrique libéré sous forme d'un sel blanc Cl⁻.HN⁺MM insoluble dans le milieu. Après filtration du sel formé et élimination du solvant, le Boc-NH-NH-Z obtenu sous forme d'huile est cristallisé dans le système THF/Hx avec un rendement de 89% en produit pur et d'un point de fusion de 80,9°C.

La figure 4.2, ci-dessous schématise la réaction de synthèse du Boc-NH-NH-Z.

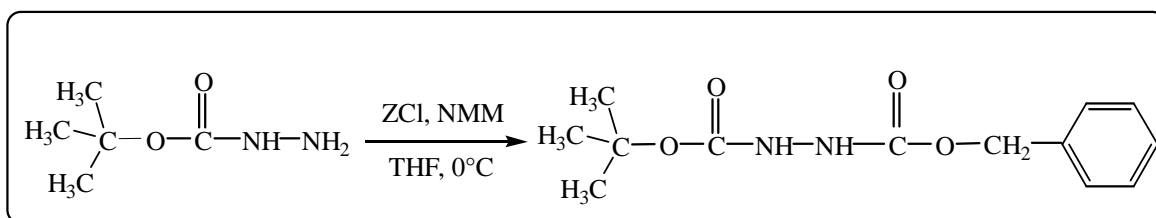


Figure 4.2 : Réaction de synthèse du Boc-NH-NH-Z.

Le mécanisme proposé pour la synthèse du Boc-NH-NH-Z est schématisé dans la figure 4.3.

L'attaque nucléophile du doublet libre de l'azote N₁ sur le carbone du carbonyle du Z-Cl provoque le départ de Cl⁻ et fragilise la liaison (N₁-H₁) simultanément. Par conséquent, l'hydrogène H₁ du *tert*-butyl carbazate est facilement arrachable par la NMM pour former le sel blanc Cl⁻.H⁺NMM insoluble dans le milieu.

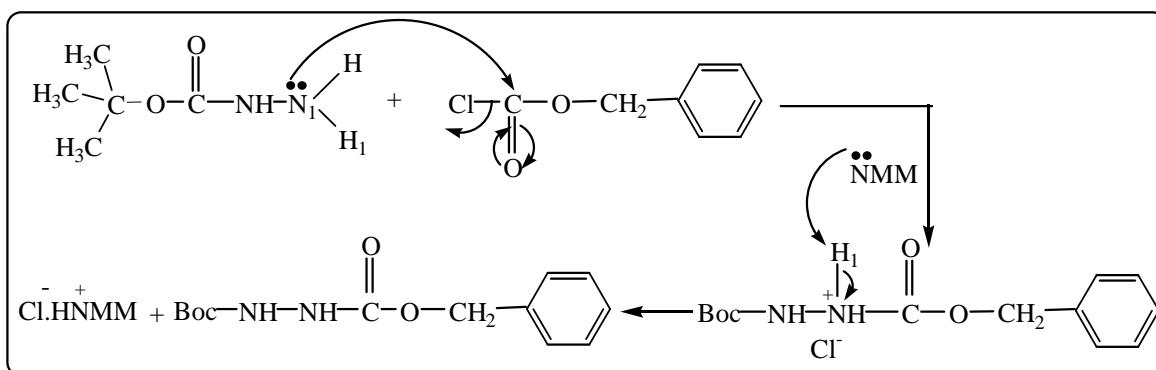


Figure 4.3: Mécanisme proposé pour la synthèse du Boc-NH-NH-Z.

4.1.1 Analyse élémentaire du Boc-NH-NH-Z

L'analyse élémentaire du Boc-NH-NH-Z a permis de vérifier la formule brute du composé. La concordance des pourcentages expérimentaux et théoriques (tableau 4.1) confirme la composition du Boc-NH-NH-Z.

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

$C_{13}H_{18}O_4N_2$	C	N	H
Pourcentages expérimentaux	57,35	9,73	6,71
Pourcentages théoriques	58,64	10,52	6,76

4.1.2 Caractérisation du Boc-NH-NH-Z par FTIR

En comparant le spectre FTIR du Boc-NH-NH₂ et celui du Boc-NH-NH-Z en pastille de KBr (figure 4.4), on remarque l'apparition de bandes à 700 cm⁻¹, 752 cm⁻¹ et 3033 cm⁻¹ correspondant aux différents modes de vibration du cycle benzénique, ce qui confirme la réussite du greffage du groupement Z sur le Boc-NH-NH₂.

Le spectre FTIR du Boc-NH-NH-Z en pastille de KBr (figure 4.5) présente des bandes fortement intenses à 1694 cm⁻¹ et 1723 cm⁻¹ caractéristiques des vibrations d'élongation du groupement C=O de type uréthane des deux groupements protecteurs Boc et Z.

Les bandes intenses à 3273 cm⁻¹ et 3300 cm⁻¹ correspondent aux vibrations d'élongation des deux NH de type uréthane.

La bande à 1540 cm⁻¹ pourrait être attribuée aux vibrations de déformation angulaire C-N-H uréthane et les bandes à 1226 cm⁻¹ et 1276 cm⁻¹ sont attribuées aux vibrations d'élongation C-N et C-O uréthanes.

Les bandes aux basses fréquences à 700 cm⁻¹ et 752 cm⁻¹ correspondent aux vibrations de déformation hors du plan des CH aromatiques du groupement Z, ainsi, on peut attribuer la bande à 1456 cm⁻¹ aux vibrations d'élongation C-C du noyau aromatique et la bande à 3034 cm⁻¹ aux vibrations d'élongation des CH aromatiques.

Les bandes à 2953 cm^{-1} et 2978 cm^{-1} correspondent aux vibrations d'élongation asymétriques des CH des groupes méthyles du groupement Boc. Leurs bandes de déformation sont à 1367 cm^{-1} .

Les bandes à 994 cm^{-1} , 1054 cm^{-1} et 1162 cm^{-1} peuvent être causées par les vibrations d'élongation C-O et C-N.

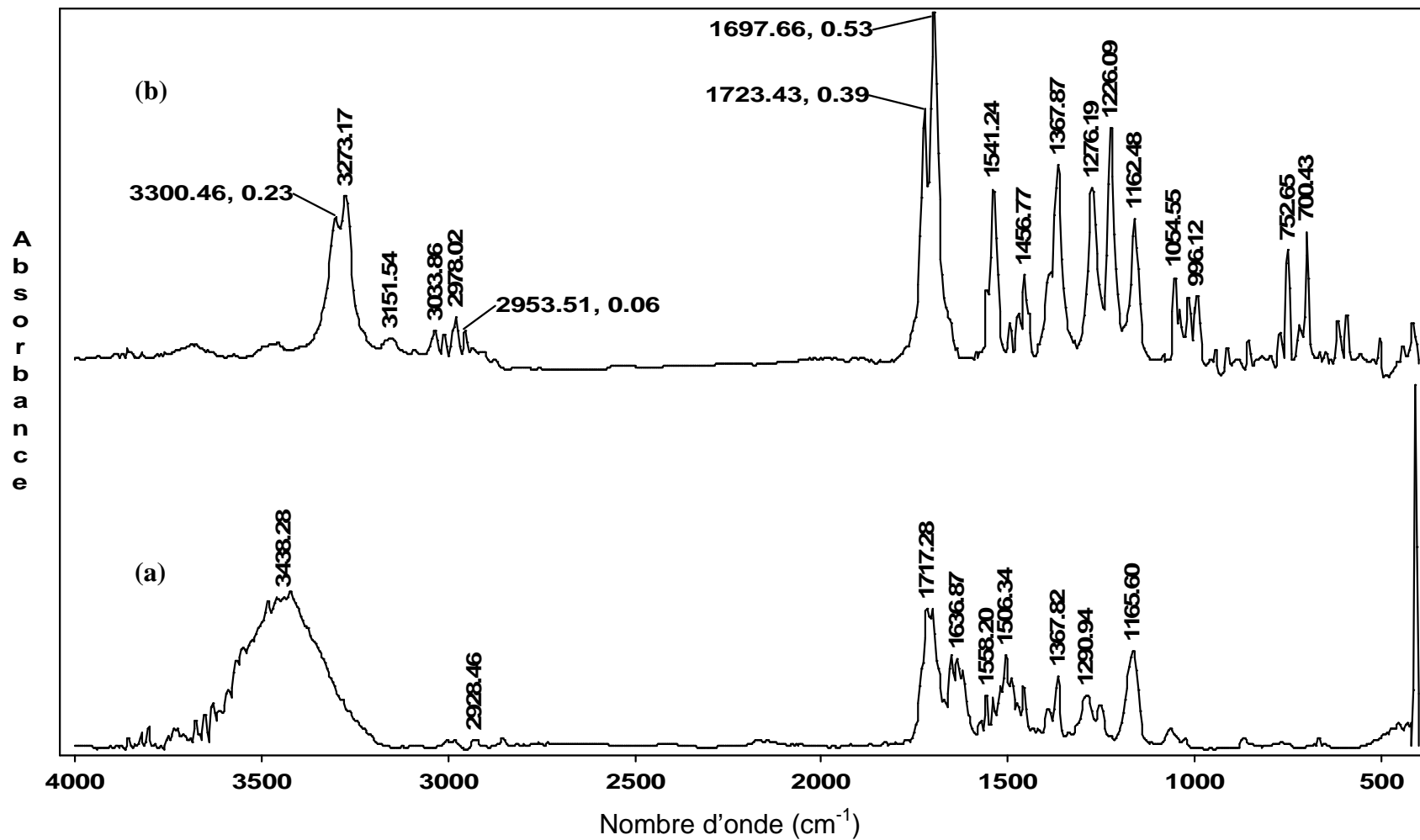


Figure 4.4 : Comparaison entre le spectre FTIR du Boc-NH-NH₂ (a) et du Boc-NH-NH-Z (b).

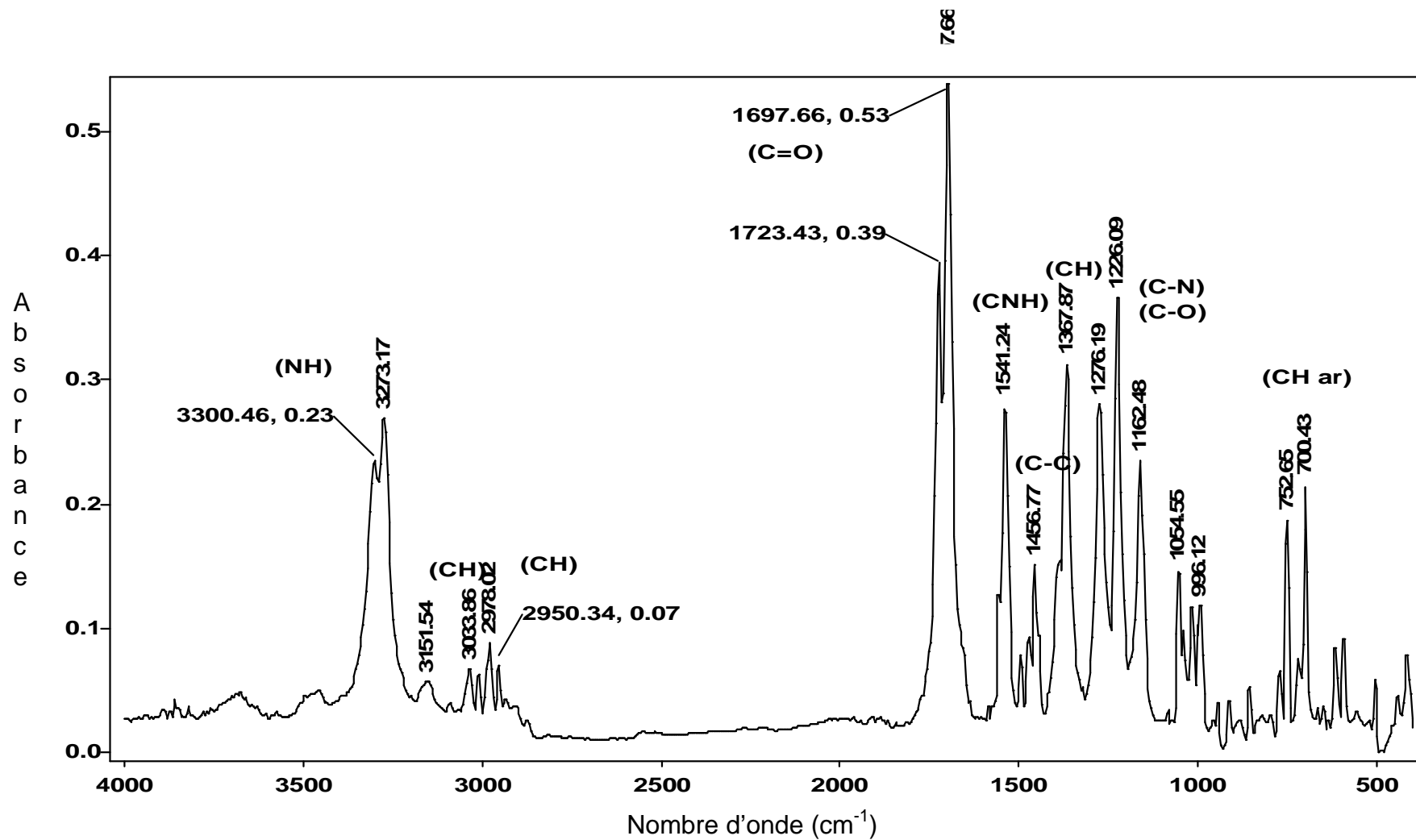


Figure 4.5: Spectre FTIR du Boc-NH-NH-Z.

4.1.3 Caractérisation du Boc-NH-NH-Z par RMN-H¹

Le spectre RMN-H¹ du Boc-NH-NH-Z dans le CDCl₃, figure 4.7, présente un singulet à 1,4 ppm correspondant au déplacement chimique des neufs protons **a** des trois méthyles (CH₃) du groupement Boc.

Le signal à 5,15 ppm d'intégration 2 correspond aux deux protons **c** du groupement CH₂ précédant le cycle benzénique.

Les deux signaux à 6,2 ppm et 6,4 ppm d'intégration 1 pour chacun, correspondent au déplacement chimique des deux hydrogènes uréthanes **b**, **b'** des groupement Boc et Z : Boc(NH, **b**) et Z(NH, **b'**).

Le signal à 7,3 ppm est intrinsèque au déplacement chimique des cinq protons **d** du cycle benzénique.

Enfin, les signaux à 2,16 ppm et celui de 1,6 ppm sont probablement dus à des traces du solvant humide utilisé pour le lavage des tubes RMN.

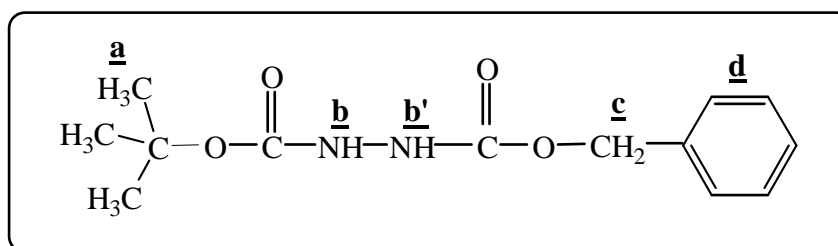


Figure 4.6 : Les types de protons du Boc-NH-NH-Z.

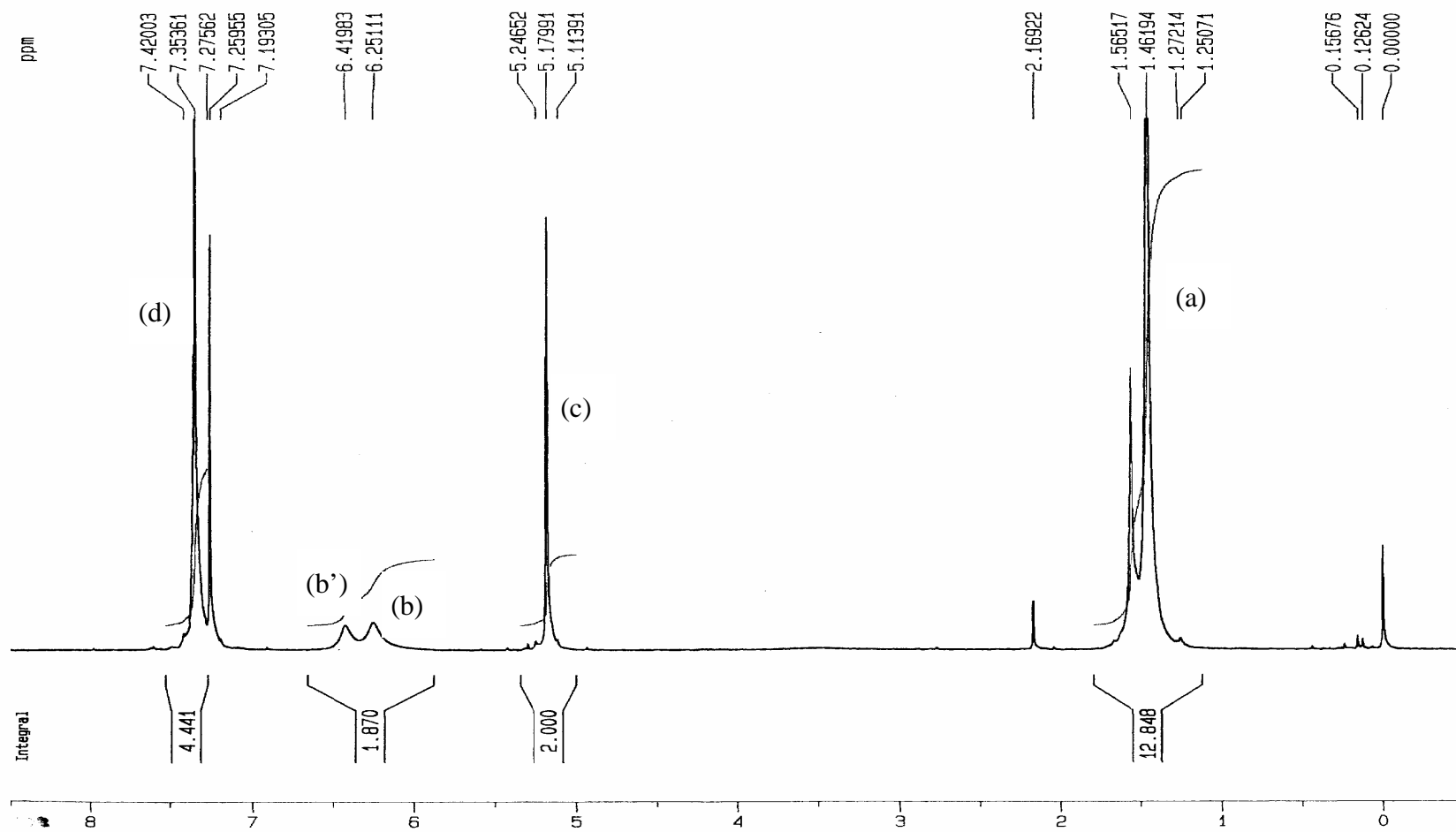


Figure 4.7 : Spectre RMN- H^1 du Boc-NH-NH-Z dans le $CDCl_3$ à 300 MHz.

4.2 Réaction de synthèse du 1-benzyloxycarbonyl-2-tertiobutyloxycarbonylpyrazolidine (Boc-AzaPro-OBZI)

Après l'obtention du Boc-NH-NH-Z sous forme cristalline, ce dernier est utilisé pour la génération du cycle pyrazolidine, un synthon de base pour la suite de la synthèse. Un équivalent du Boc-NH-NH-Z est traité par deux équivalents de NaH dans le DMF pour former le dianion ($\text{Boc-}\ddot{\text{N}}\text{-}\ddot{\text{N}}\text{-Z}$, 2Na^+) caractérisé par une coloration rouge intense qui se dégrade graduellement à l'orange puis au jaune très clair après l'ajout du 1,3-dibromopropane. Ce dernier réactif permettra la formation du cycle pyrazolidine en libérant deux équivalents de NaBr. Le Boc-AzaPro-OBZI obtenu sous forme d'huile jaune clair avec un rendement de 49% sera utilisé tel quel dans la prochaine étape. La figure 4.8, ci-dessous, résume la réaction de synthèse du Boc-AzaPro-OBZI.

Nous avons noté les mêmes observations pour le produit synthétisé dans le THF, seulement, l'huile obtenue a cristallisé dans l'Hx avec un rendement de 21%. Cependant, l'examen du spectre FTIR (page 80) de ce composé a révélé l'existence de groupe NH ce qui prouve que la formation du cycle pyrazolidine n'a pas eu lieu.

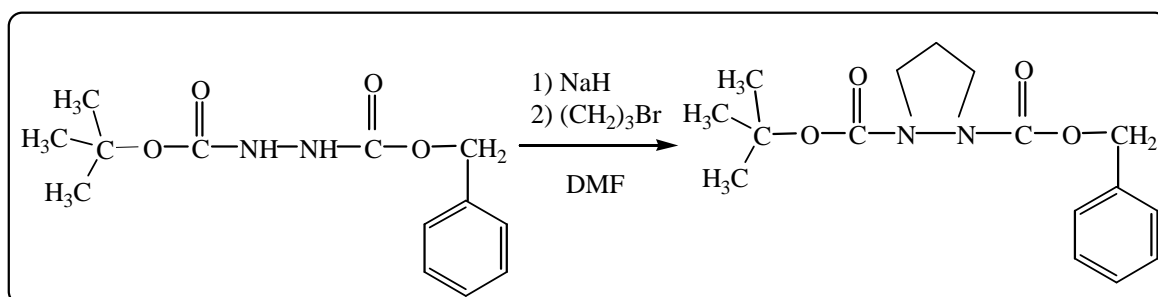


Figure 4.8 : Réaction de synthèse du Boc-AzaPro-OBZI.

Le mécanisme proposé pour la génération du cycle pyrazolidine est schématisé dans la figure 4.9.

Les deux H^- libérés par les deux équivalents de l'hydrure de sodium NaH vont arracher les deux protons H_1 et H_2 du Boc-NH-NH-Z pour former le dianion $\text{Boc-}\ddot{\text{N}}\text{-}\ddot{\text{N}}\text{-Z}$. Ce dernier réagira avec le 1,3-dibromopropane pour générer le cycle pyrazolidine et libérer deux équivalents de NaBr.

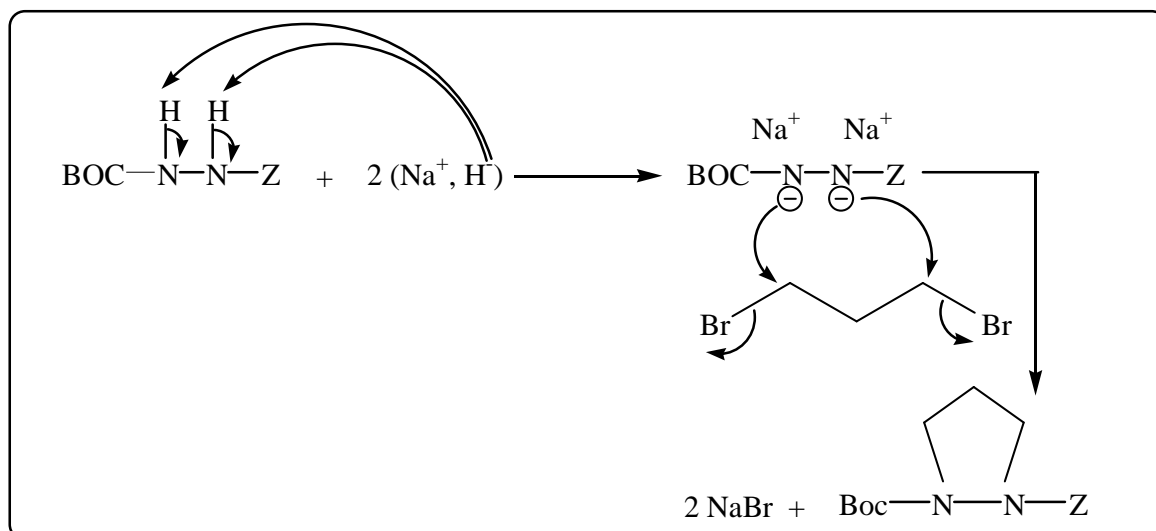


Figure 4.9 : Mécanisme proposé pour la génération du cycle pyrazolidine.

4.2.1 Caractérisation du Boc-AzaPro-OBZI synthétisé dans le DMF par FTIR

En comparant le spectre FTIR du Boc-NH-NH-Z et celui du Boc-AzaPro-OBZI en pastille de KBr (figure 4.10), on remarque la disparition des bandes vers les hautes fréquences entre 3200-3300 cm^{-1} et celle de 1540 cm^{-1} , ce qui confirme l'inexistence du groupement NH et la formation du cycle pyrazolidine.

Le spectre FTIR du Boc-AzaPro-OBZI en pastille de KBr, figure 4.11, présente une bande très intense à 1710 cm^{-1} caractéristique de la vibration d'élongation du C=O de type uréthane.

Les bandes à 1145 cm^{-1} , 1239 cm^{-1} et 1305 cm^{-1} sont attribuées aux vibrations d'élongation C-N du cycle pyrazolidine et les vibrations d'élongation C-O.

Le cycle benzénique est présent par les bandes à 698 cm^{-1} et 755 cm^{-1} caractéristiques des vibrations de déformation hors du plan des CH aromatiques du groupement Z et par les bandes à 3033 cm^{-1} et 1456 cm^{-1} attribuées aux vibrations d'élongation des CH et du noyau aromatique, respectivement.

Les bandes à 2931 cm^{-1} et 2977 cm^{-1} correspondent aux vibrations d'élongation asymétriques des CH des groupes méthyles du groupement Boc et des méthylènes (CH_2) du cycle pyrazolidine, tandis que leurs bandes de vibration de déformation apparaissent à 1364 cm^{-1} et 1394 cm^{-1} .

Les bandes à 925 cm^{-1} et 1002 cm^{-1} sont celles des vibrations d'élongation C-O.

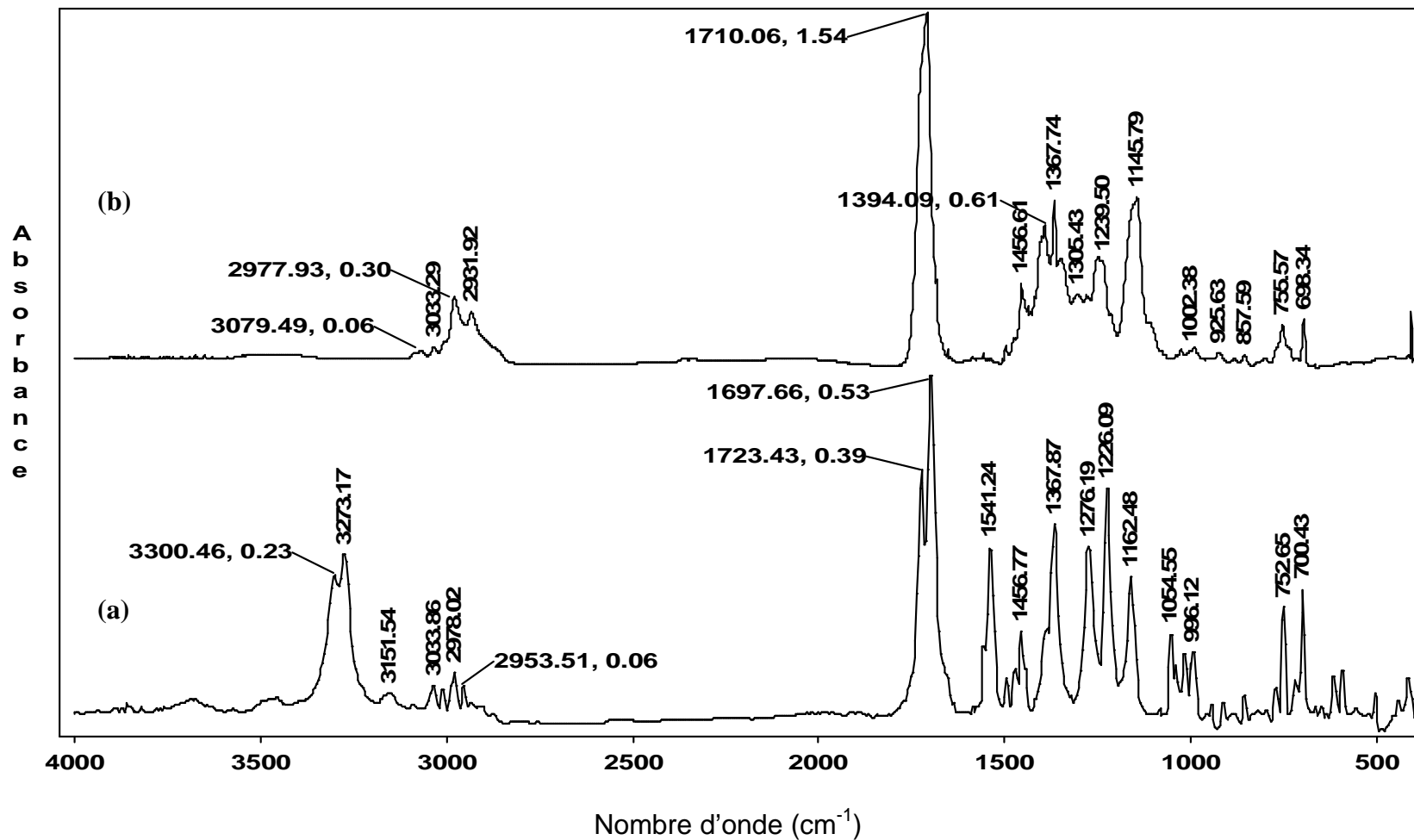


Figure 4.10 : Comparaison entre le spectre FTIR du Boc-NH-NH-Z (a) et du Boc-AzaPro-OBZI (b) .

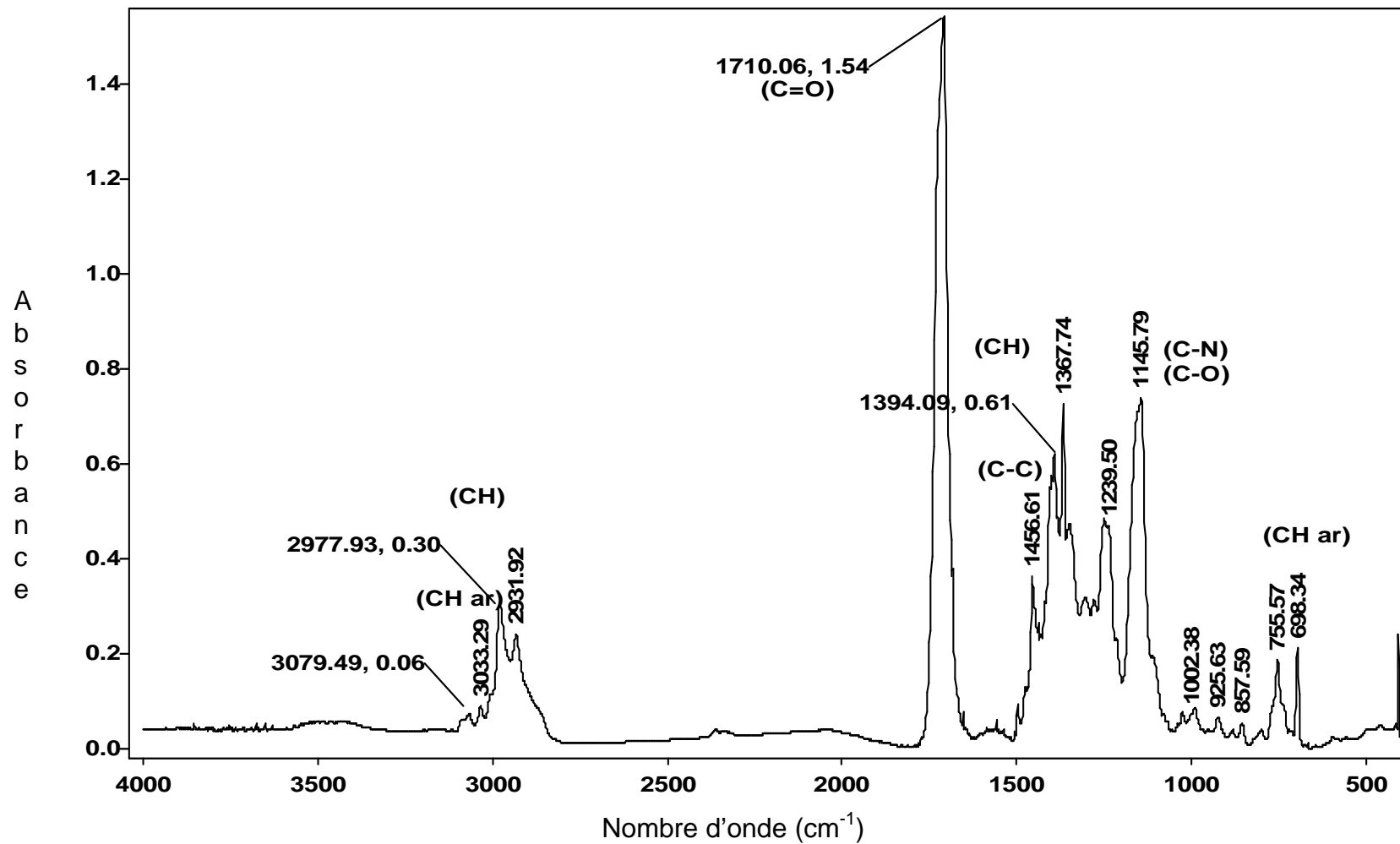


Figure 4.11 : Spectre FTIR du Boc-Azapro-OBZI synthétisé dans le DMF .

4.2.2 Caractérisation du Boc-AzaPro-OBZI synthétisé dans le DMF par RMN-H¹

Le spectre RMN-H¹ du Boc-AzaPro-OBZI dans le CDCl₃, figure 4.13, présente un pic à 1,4 ppm d'intégration neuf correspondant aux neuf protons **a** des trois méthyles du groupement Boc.

Le multiplet à 7,3 ppm est propre au déplacement chimique des protons benzéniques **c**.

Le signal à 5,2 ppm d'intégration deux correspond au deux protons **b** du CH₂ précédant le cycle benzénique.

Les deux protons **d** du cycle pyrazolidine étant équivalents, se couplent avec les autres protons **e** et **f** en donnant un multiplet d'intégration deux à 2,1 ppm.

Les quatre autres protons du cycle (2H_e, 2H_f) étant non équivalents, se couplent entre eux et avec les protons **d** en donnant de larges signaux à 3,2 ppm et 3,9 ppm d'une intégration de deux pour chaque signal.

Le signal aux environs de 2,2 ppm est probablement dû à des traces du solvant utilisé pour le lavage des tubes RMN.

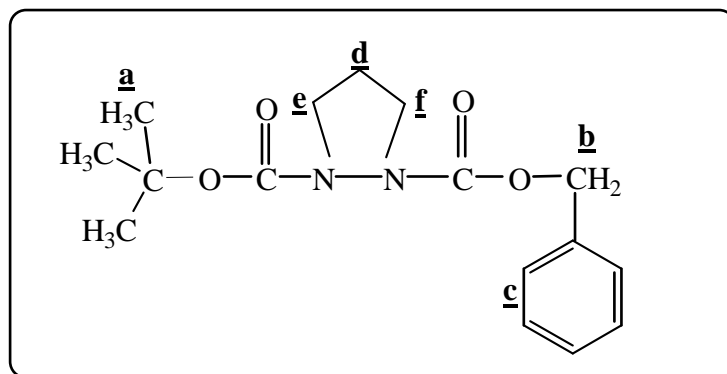


Figure 4.12 : Les types de protons du Boc-AzaPro-OBZI.

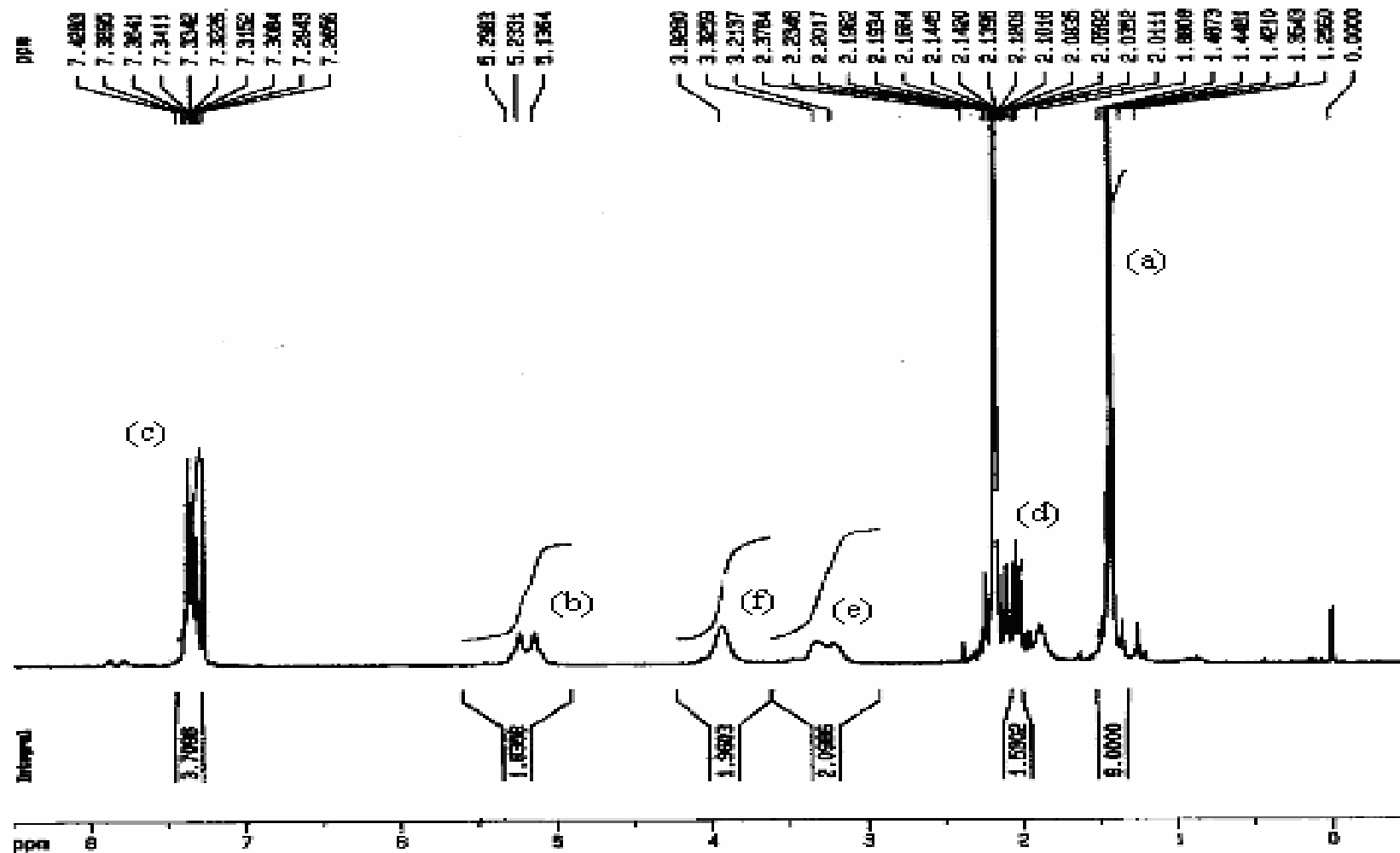


Figure 4.13 : Spectre RMN-H¹ du Boc-AzaPro-OBZI dans le CDCl₃ à 300 MHz.

4.2.3 Caractérisation du Boc-Azapro-OBZI synthétisé dans le THF par FTIR

Le spectre FTIR en pastille de KBr du produit synthétisé dans le THF (figure 4.14), présente des bandes fortement intenses à 3272 cm^{-1} et 3297 cm^{-1} caractéristiques des vibrations d'élongation NH et une bande moyennement intense à 1539 cm^{-1} attribuée aux vibrations de déformations angulaires C-N-H uréthane.

Les bandes intenses à 1697 cm^{-1} et 1723 cm^{-1} correspondent aux vibrations d'élongation des groupements C=O de type uréthane des deux groupements protecteurs Boc et Z.

Les bandes enregistrées à 701 cm^{-1} , 752 cm^{-1} , 1453 cm^{-1} et 3036 cm^{-1} sont propres aux différents modes de vibration du cycle benzénique.

Les bandes à 2978 cm^{-1} et 1367 cm^{-1} sont attribuées, respectivement, aux vibrations d'élongation et de déformation des CH méthyles du groupe Boc.

Les bandes enregistrées à 995 cm^{-1} , 1050 cm^{-1} , 1161 cm^{-1} , 1225 cm^{-1} et 1275 cm^{-1} correspondent aux vibrations d'élongation C-O et C-N.

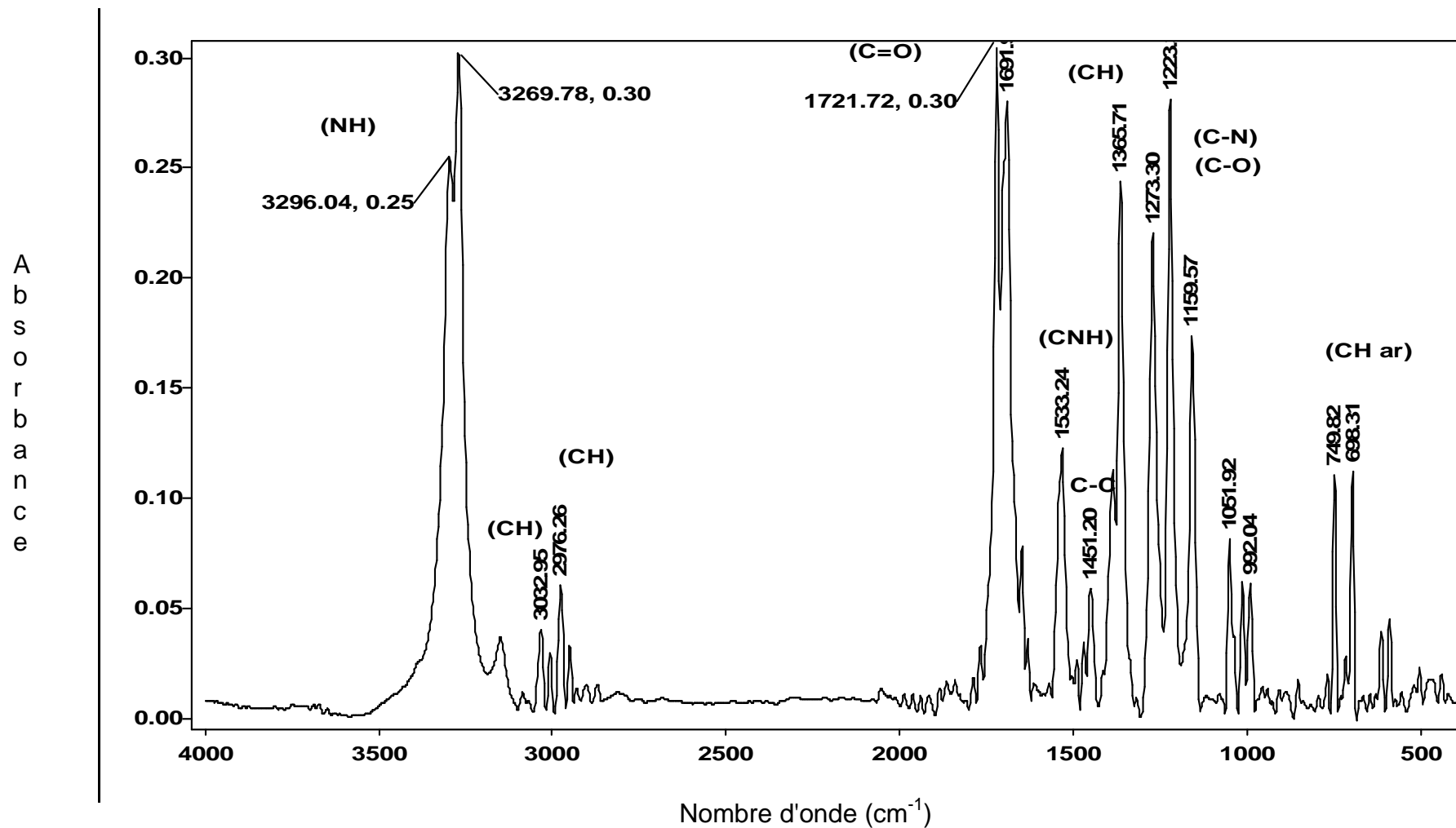


Figure 4.14 : Spectre FTIR du Boc-Azapro-OBZI synthétisé dans le THF .

4.3 Réaction de synthèse du chlorhydrate de l'azaproline HCl.H-AzaPro-OBZI

Dans le but de cliver le groupement protecteur Boc, nous avons d'abord préparé une solution de HCl gazeux (~3N) dans l'ACOEt. Cette solution fraîchement préparée est ensuite versée directement sur le synthon Boc-AzaPro-OBZI à raison d'un ml par mM. Le chlorhydrate HCl.H-AzaPro-OBZI apparaît sous forme d'un sel blanc très hygroscopique avec un rendement de 32% et d'un point de fusion de (157-164)°C. La réaction de synthèse du HCl.H-AzaPro-OBZI est schématisée dans la figure 4.15.

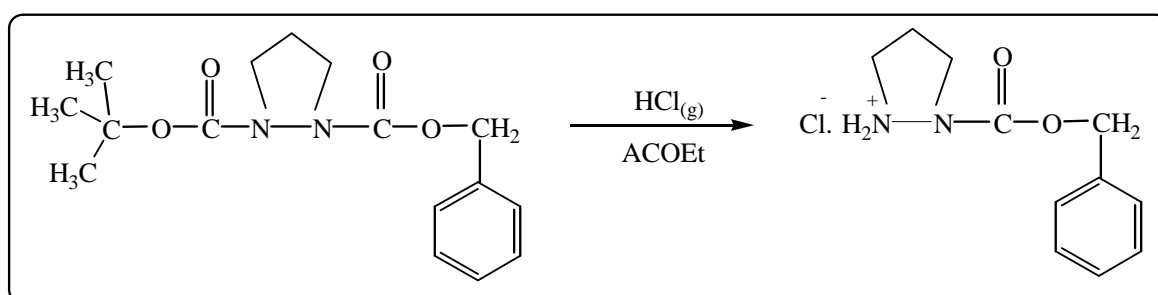


Figure 4.15 : Réaction de synthèse du HCl.H-AzaPro-OBZI.

Le mécanisme de la déprotection du Boc-AzaPro-OBZI est schématisé dans la figure 4.16.

Le clivage du groupement Boc commence par la protonation de son carbonyl par H^+ . Un réarrangement d'électrons se produit ce qui stabilisera les charges formelles et conduira au clivage du groupe tert-butyl en formant un acide carbamique **I** et le carbocation tert-butyl. Ce dernier est déprotoné par Cl^- et se réarrange en 2-méthyl propène **II**.

L'acide carbamique formé est instable vis à vis de la décarboxylation et produit le chlorhydrate de l'azaproline et CO_2 .

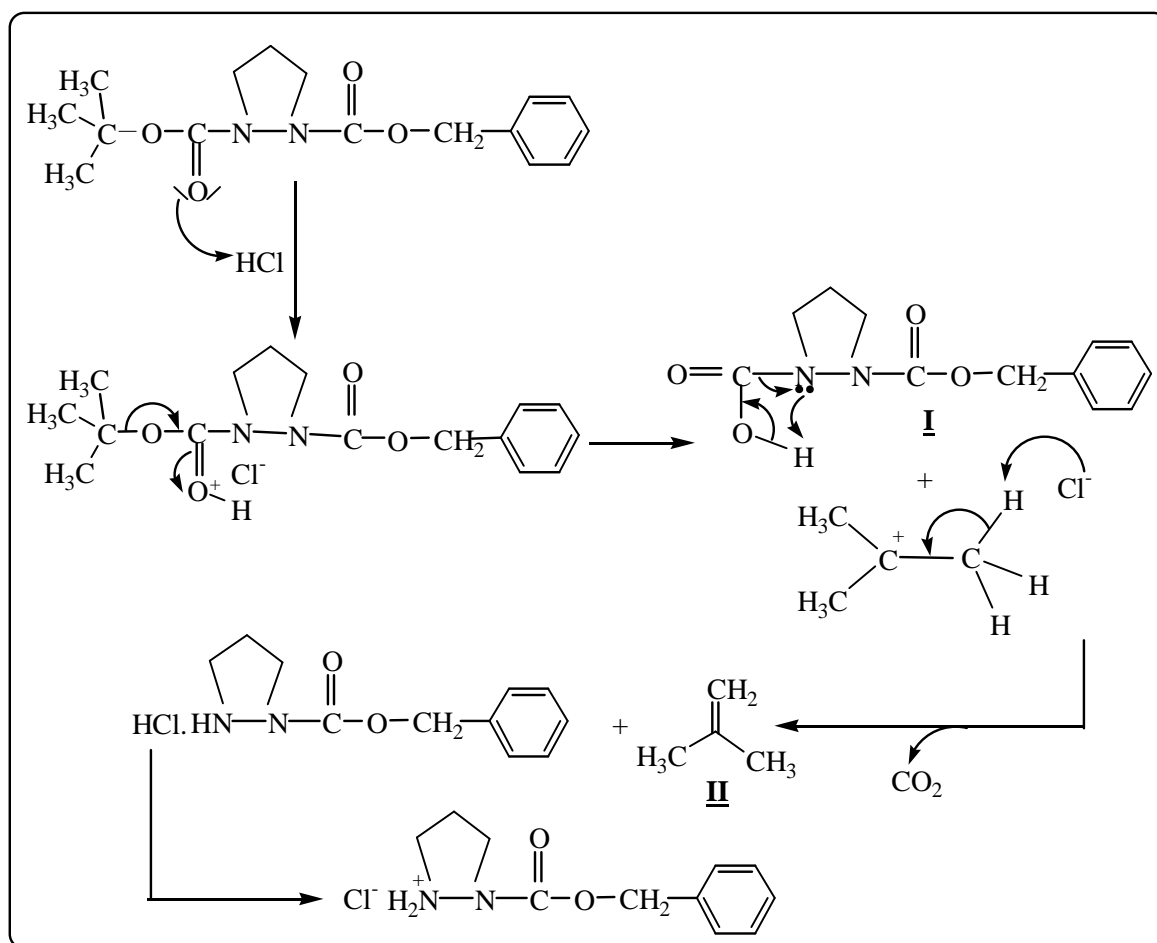


Figure 4.16 : Mécanisme proposé pour le clivage du groupement Boc.

4.3.1 Analyse élémentaire du HCl.H-AzaPro-OBZI

L'analyse élémentaire du HCl.H-AzaPro-OBZI a permis de vérifier la formule brute du composé. La concordance des pourcentages expérimentaux et théoriques (tableau 4.2) confirme la composition du chlorhydrate de l'azaproline.

Tableau 4.2 : Résultats de l'analyse élémentaire du HCl.H-AzaPro-OBZI.

$C_{11}H_{15}O_2N_2Cl$	C	N	H
Pourcentages expérimentaux	52,67	10,30	5,17
Pourcentages théoriques	54,43	11,54	6,18

4.3.2 Caractérisation du HCl.H-AzaPro-OBZI par FTIR

En comparant le spectre FTIR du Boc-AzaPro-OBZI et celui de son chlorhydrate en pastille de KBr (figure 4.17), on remarque la disparition des bandes entre 2930-2980 cm^{-1} , attribuées aux vibrations d'élongation des CH des méthyles du groupe Boc, ce qui confirme le clivage du groupement protecteur Boc.

Le spectre FTIR du HCl.H-AzaPro-OBZI en pastille de KBr, figure 4.18, présente une bande intense à 1718 cm^{-1} relative aux vibrations d'élongation C=O de type uréthane.

Le sel d'amine secondaire ($^+\text{NH}_2$) est caractérisé par l'apparition de bandes à 2534 cm^{-1} , 2646 cm^{-1} et 2849 cm^{-1} .

Le cycle benzénique est toujours présent par ses bandes à 703 cm^{-1} et 751 cm^{-1} relatives à la déformation hors du plan des CH aromatiques et par la bande à 1457 cm^{-1} relative aux vibrations d'élongation C-C du noyau aromatique.

Les bandes enregistrées à 1341 cm^{-1} et 1399 cm^{-1} correspondent aux vibrations de déformation des CH des méthylènes du cycle pyrazolidine.

Les bandes à 1214 cm^{-1} et 1311 cm^{-1} sont attribuées aux vibrations d'élongation C-N et C-O uréthanes, celles de 1034 cm^{-1} et 1120 cm^{-1} peuvent être causées par les vibrations d'élongation C-O.

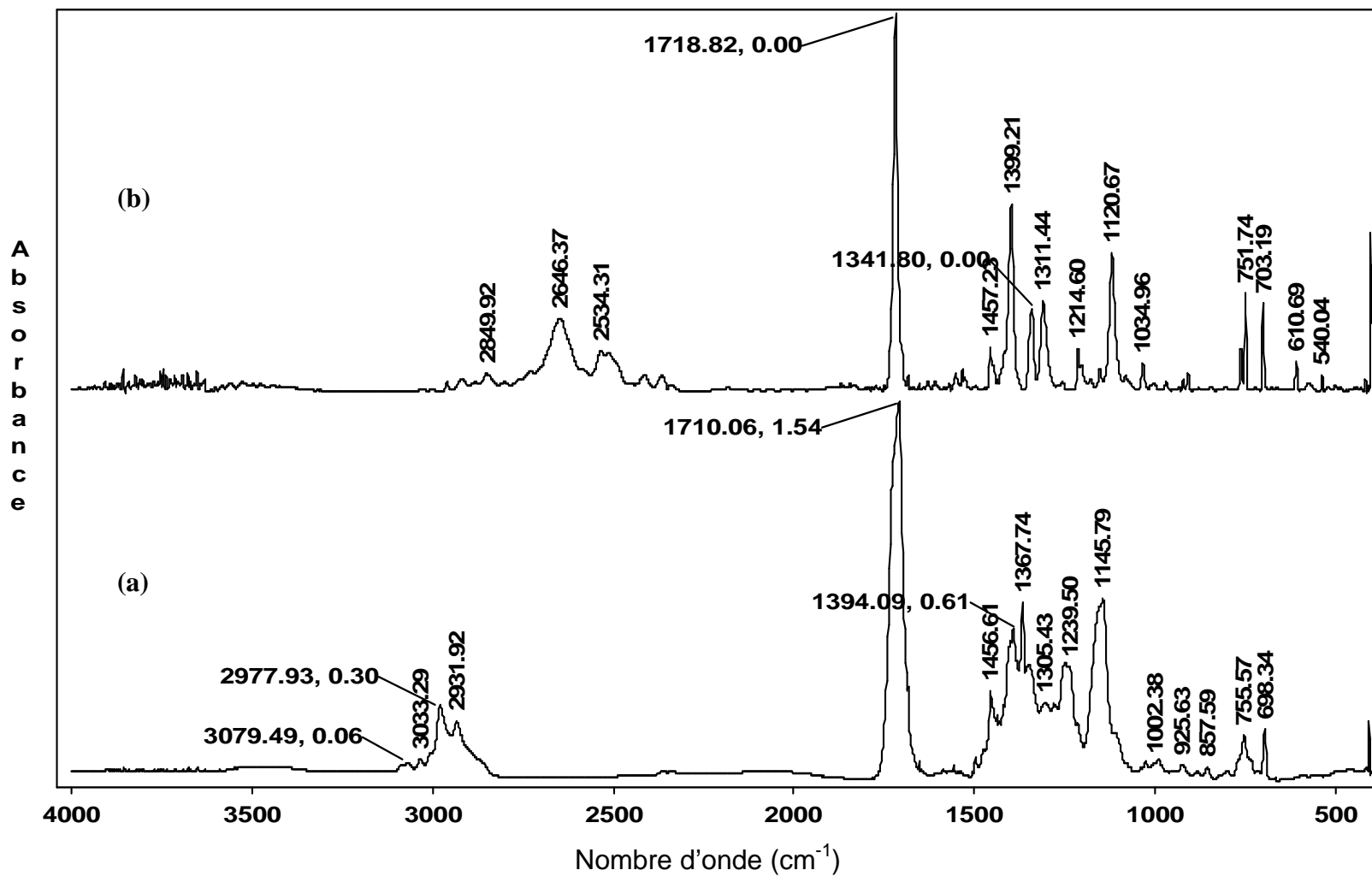


Figure 4.17 : Comparaison entre le spectre FTIR du Boc-Azapro-OBZI **(a)** et de son chlorhydrate **(b)**.

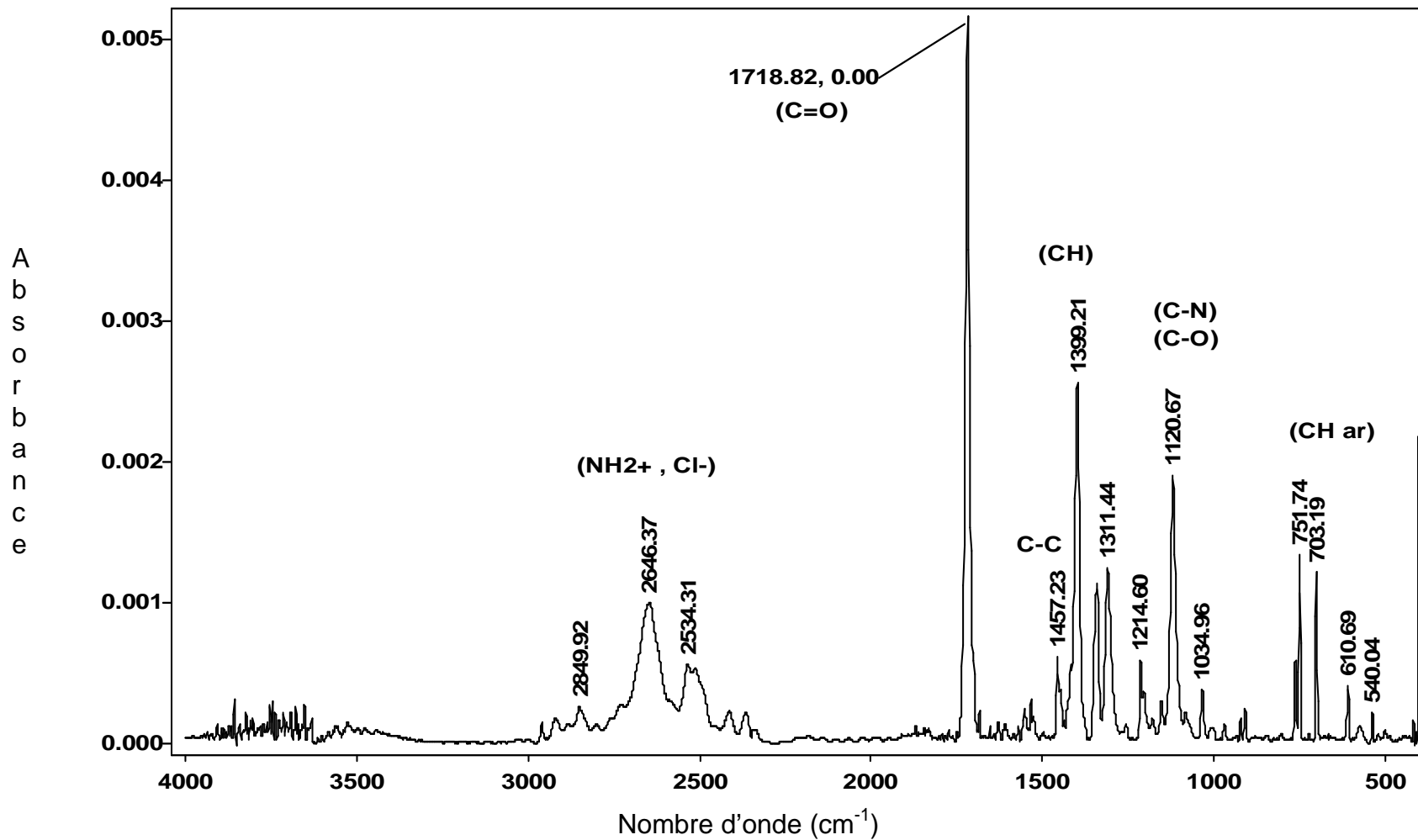


Figure 4.18 : Spectre FTIR du HCl-H-AzaPro-OBZI.

4.3.3 Caractérisation du HCl.H-AzaPro-OBZI par RMN- H^1 :

Le spectre RMN- H^1 du chlorhydrate de l'azaproline dans le $CDCl_3$, figure 4.20, présente un multiplet à 7,4 ppm propre aux protons benzénique **a**.

Le singulet à 5,25 ppm correspond aux protons **b** du CH_2 précédant le cycle benzénique.

Les deux protons **c** du cycle pyrazolidine étant non équivalents, se couplent avec les quatre protons **d** et **e** ($2H_d$, $2H_e$) du cycle. Ce couplage est présent par un triplet avec un épaulement de part et d'autre à 2,35 ppm.

Les deux protons **d** et les deux protons **e** étant non équivalents, se couplent différemment avec les protons **c** en triplets à 3,6 ppm et 3,8 ppm.

Les protons **f** du sel d'amine secondaire résonnent en bande large aux alentours de 11 ppm, hors échelle sur le spectre.

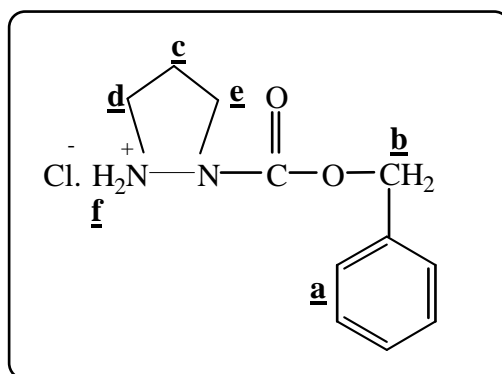


Figure 4.19 : Les types de protons du HCl.H-AzaPro-OBZI

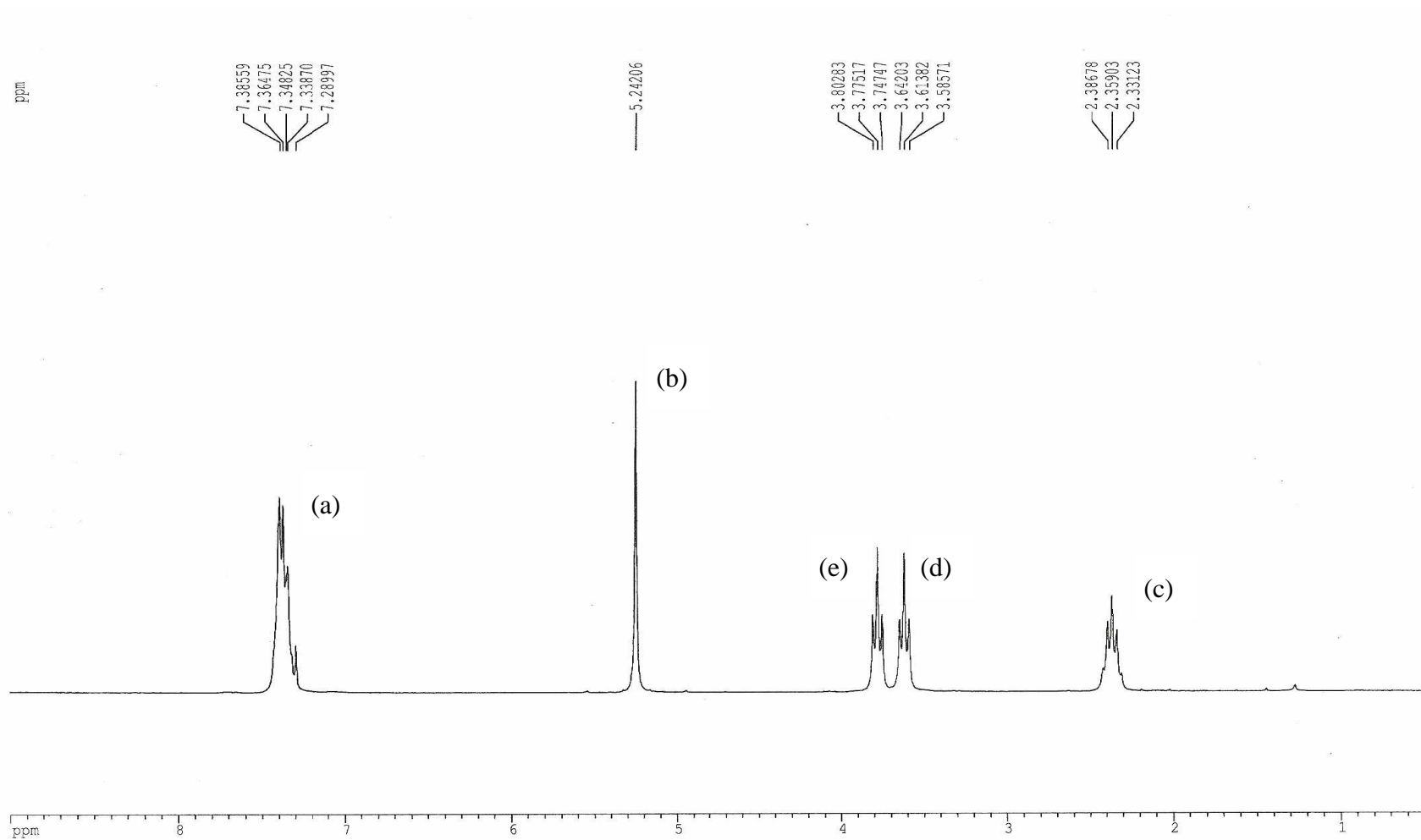


Figure 4.20 : Spectre RMN- H^{-1} du HCl.H-AzaPro-OBZI dans le CDCl_3 à 300 MHz.

4.3.4 Caractérisation du HCl.H-AzaPro-OBZI par RMN-C¹³ et DEPT 135:

Le spectre RMN-C¹³ du HCl.H-AzaPro-OBZI dans le CDCl₃ avec découplage de protons (figure 4.22) présente six signaux correspondant aux six types de carbone du chlorhydrate de l'azaproline (figure 4.21).

Les signaux à 24,4 ppm, 46,3 ppm et 69,1 ppm correspondent à la résonance des carbones de méthylènes (CH₂) puisqu'ils ont donné des signaux négatifs aux mêmes déplacements chimiques dans le spectre DEPT 135 du HCl.H-azaPro-OBZI (figure 4.23).

Le pic à 128,5 ppm correspond au déplacement chimique de carbone de type CH du moment qu'en DEPT 135 il est caractérisé par un signal positif au même déplacement chimique.

Les signaux à 135,1 ppm et 153,7 ppm correspondent aux déplacements chimiques de carbones quaternaires du moment qu'ils ne donnent aucun signal en DEPT 135.

Par conséquent : le signal à 128,5 ppm est propre au déplacement chimique des cinq carbones **a** méthynes (CH) du cycle benzénique. Le sixième carbone **b** du cycle benzénique étant un carbone quaternaire et site de la liaison résonne plus loin à 135,1 ppm.

Le pic à 153,7 ppm correspond à la résonance du carbone **c** du carbonyle (C=O) de la fonction uréthane.

Le signal à 69,1 ppm correspond au déplacement chimique du carbone **d** du méthylène benzénique (Phe-CH₂).

Le pic à 24,4 ppm est attribué à la résonance du carbone **e** du méthylène du cycle pyrazolidine. Les deux carbones **f** et **f'** des deux autres méthylènes du cycle pyrazolidine étant équivalents donnent un signal à 46,3 ppm.

Enfin les pics entre 76,6 ppm et 77,6 ppm correspondent au signal du solvant utilisé le CDCl₃.

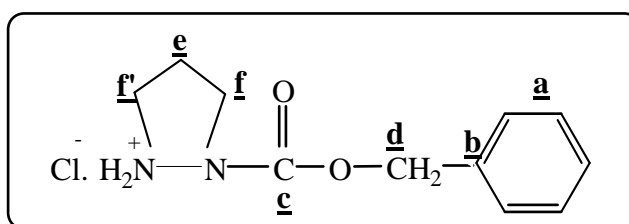


Figure 4.21 : Les types de carbones du HCl.H-AzaPro-OBZI.

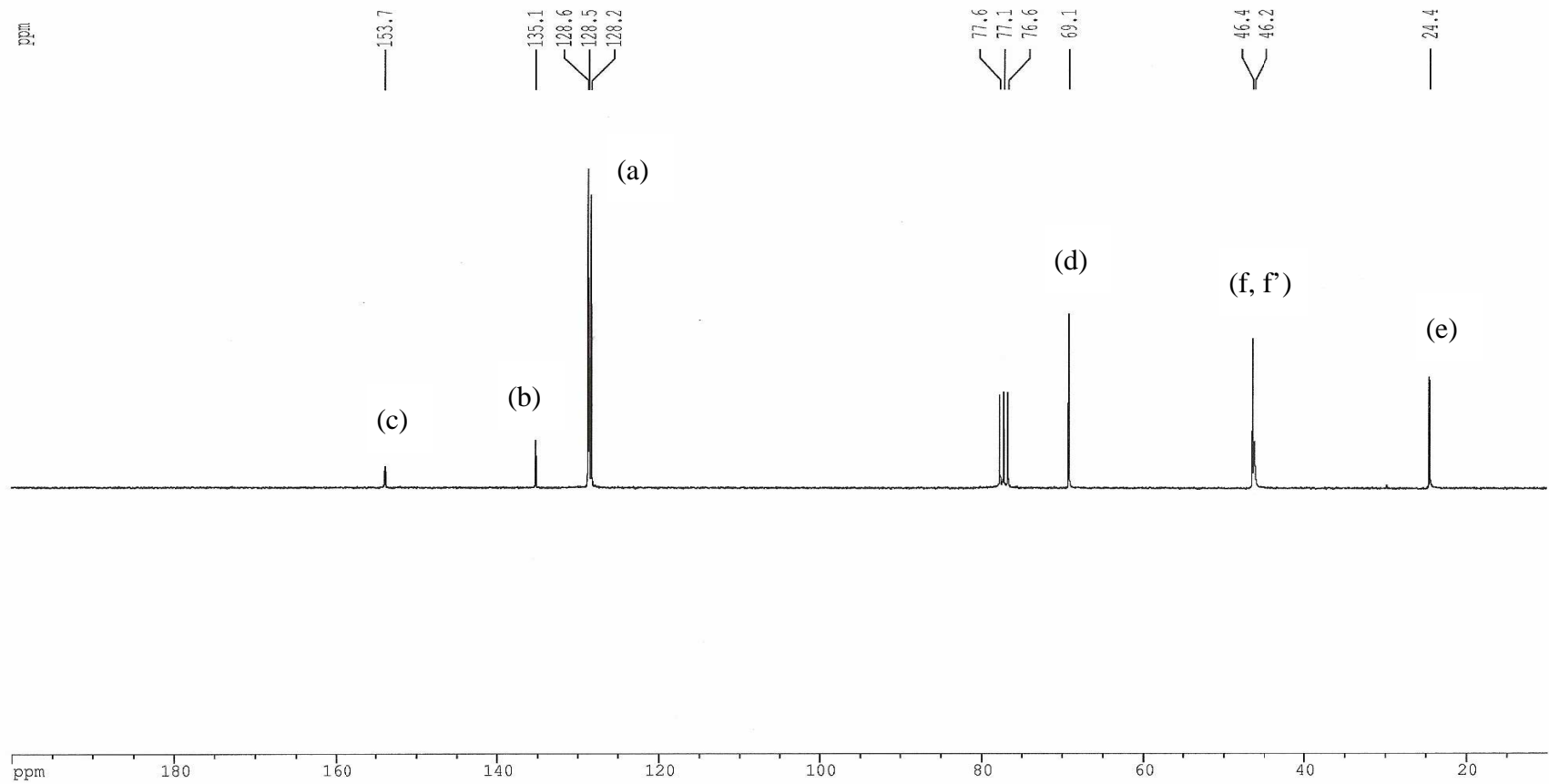


Figure 4.22 : Spectre RMN-C¹³ avec découplage de protons du HCl.H-AzaPro-OBZI dans le CDCl₃ à 300 MHz.

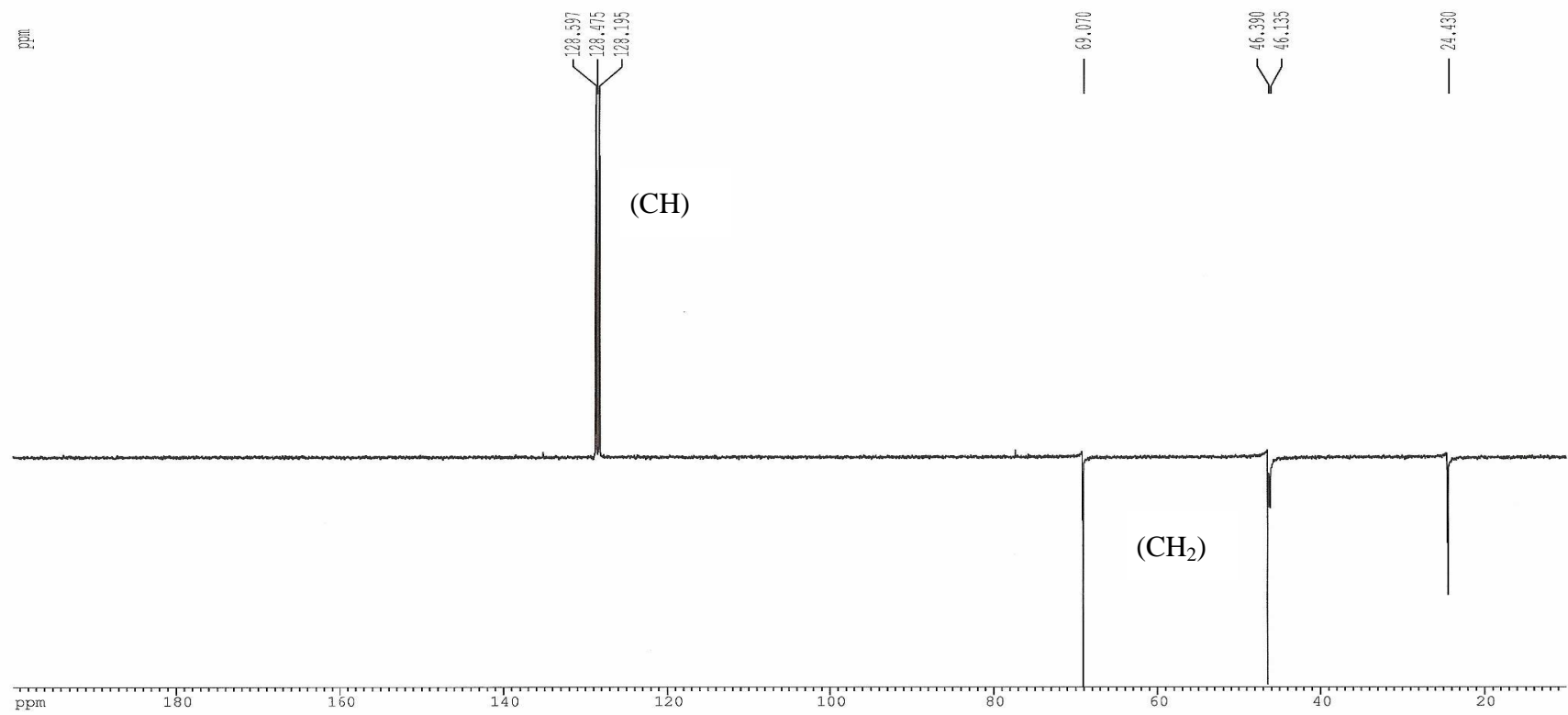


Figure 4.23 : Spectre DEPT 135 du HCl.H-AzaPro-OBZI dans le CDCl₃ à 300 MHz.

4.4 Réaction de synthèse de l'azadipeptide Boc-Gly-AzaPro-OBZI

L'azadipeptide Boc-Gly-AzaPro-OBZI a été obtenu en couplant la glycine avec le chlorhydrate de l'azaproline par la méthode des anhydrides mixtes moyennant le triphosgène comme agent de couplage. Nous avons d'abord activé l'extrémité C-terminale du Boc-Gly-OH par le triphosgène, puis l'anhydride formé réagira in-situ en présence de la NMM avec la partie N-terminale du résidu azaprolyl pour former l'azadipeptide. La réaction de couplage, figure 4.24, a été réalisée dans le THF à -10°C avec un rendement de 86%.

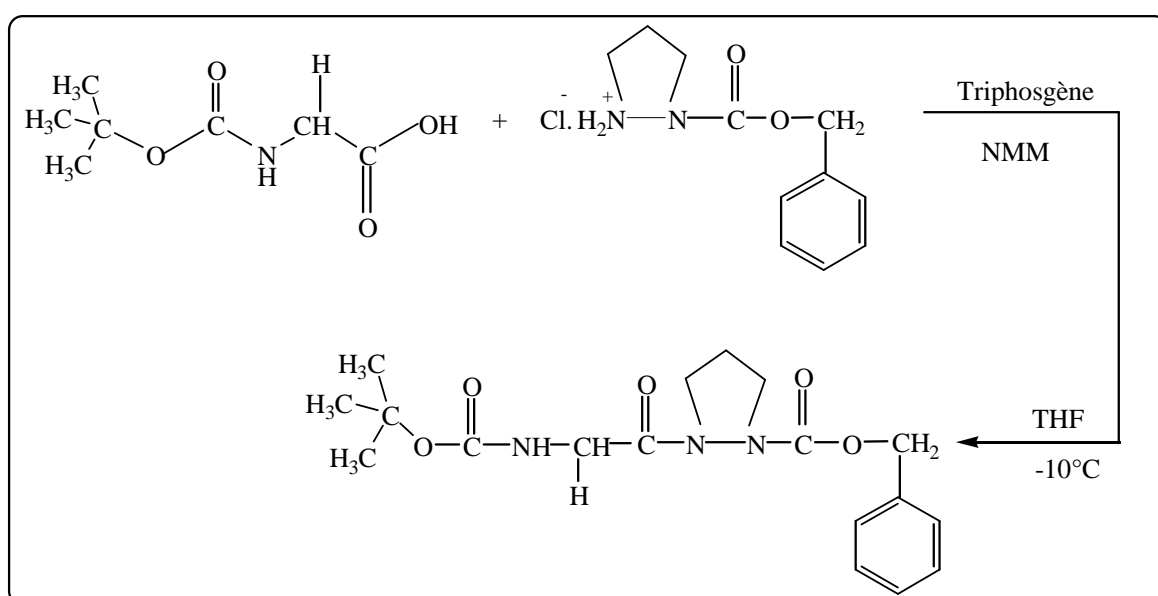


Figure 4.24 : Réaction de synthèse de l'azadipeptide Boc-Gly-AzaPro-OBZI.

Le mécanisme proposé pour le couplage du Boc-Gly-OH au chlorhydrate de l'azaproline est schématisé dans la figure 4.25.

L'extrémité C-terminale de la glycine est d'abord activé par le triphosgène $\text{CO}(\text{OCCl}_3)_2$ par formation d'un anhydride mixte **III**. Le chlorhydrate de l'azaproline est neutralisé par un équivalent de la NMM puis réagit in situ avec l'anhydride formé pour aboutir au produit final.

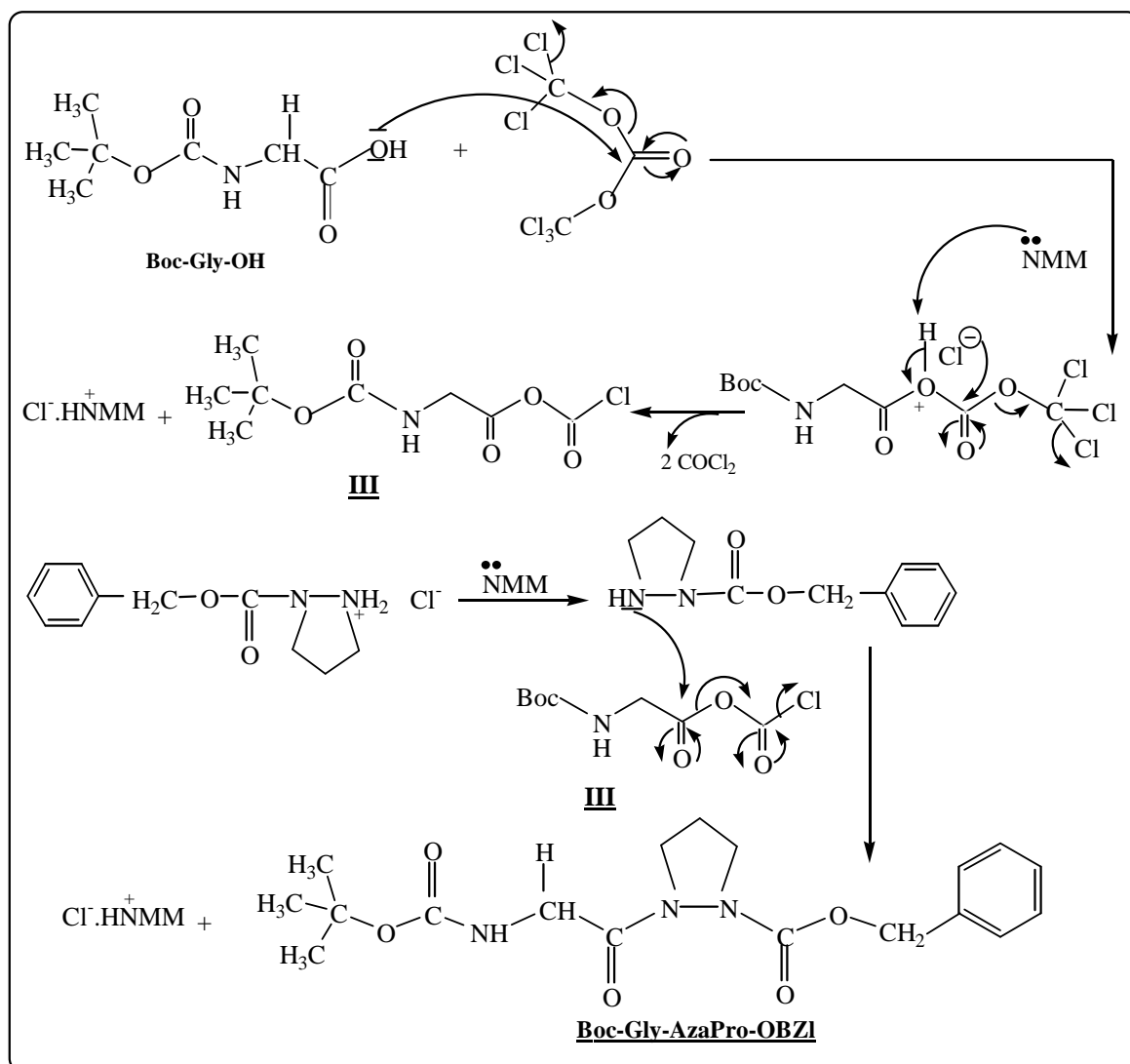


Figure 4.25: Mécanisme proposé pour la synthèse de l'azadipeptide.

4.4.1 Caractérisation du Boc-Gly-AzaPro-OBZI par FTIR :

En comparant le spectre FTIR de l'azadipeptide avec celui du Boc-Gly-OH (figure 4.26), on remarque la disparition de la bande large entre 3000-3300 cm⁻¹ relative aux vibrations d'élongation OH et l'apparition de bandes à 699 cm⁻¹, 755 cm⁻¹ et 3032 cm⁻¹ relatives aux différents modes de vibration du cycle benzénique.

Le spectre FTIR du Boc-Gly-AzaPro-OBZI en pastille de KBr figure 4.27, présente des bandes à 1720 cm⁻¹ et 1759 cm⁻¹ caractéristiques des vibrations d'élongation C=O de type uréthane et une bande à 1649 cm⁻¹ caractéristique des vibrations d'élongation C=O de type amide dite bande I des amides.

La bande à 3358 cm^{-1} est relative aux vibrations d'élongation NH uréthane, celle de 1531 cm^{-1} est attribuée aux vibrations de déformations angulaires CNH uréthanes.

Les bandes enregistrées à 1218 cm^{-1} , 1287 cm^{-1} et 1157 cm^{-1} sont relatives aux vibrations d'élongation C-N et C-O uréthanes et C-N du cycle pyrazolidine.

La présence du cycle benzénique est indiquée par les bandes à 699 cm^{-1} et 755 cm^{-1} relatives aux vibrations de déformations hors du plan des CH aromatiques du groupement Z, par la bande à 1454 cm^{-1} correspondant aux vibrations d'élongation C-C du noyau aromatique et par un épaulement à 3031 cm^{-1} attribué aux vibrations d'élongation des CH aromatiques.

Les bandes enregistrées à 2934 cm^{-1} et 2976 cm^{-1} sont relatives aux vibrations d'élongation des CH des méthyles du groupement Boc et des méthylènes du cycle pyrazolidine. Leurs bandes de déformations apparaissent à 1366 cm^{-1} et 1395 cm^{-1} .

Les bandes à 1054 cm^{-1} , 951 cm^{-1} et 861 cm^{-1} peuvent être attribuées aux vibrations d'élongation C-O et C-C.

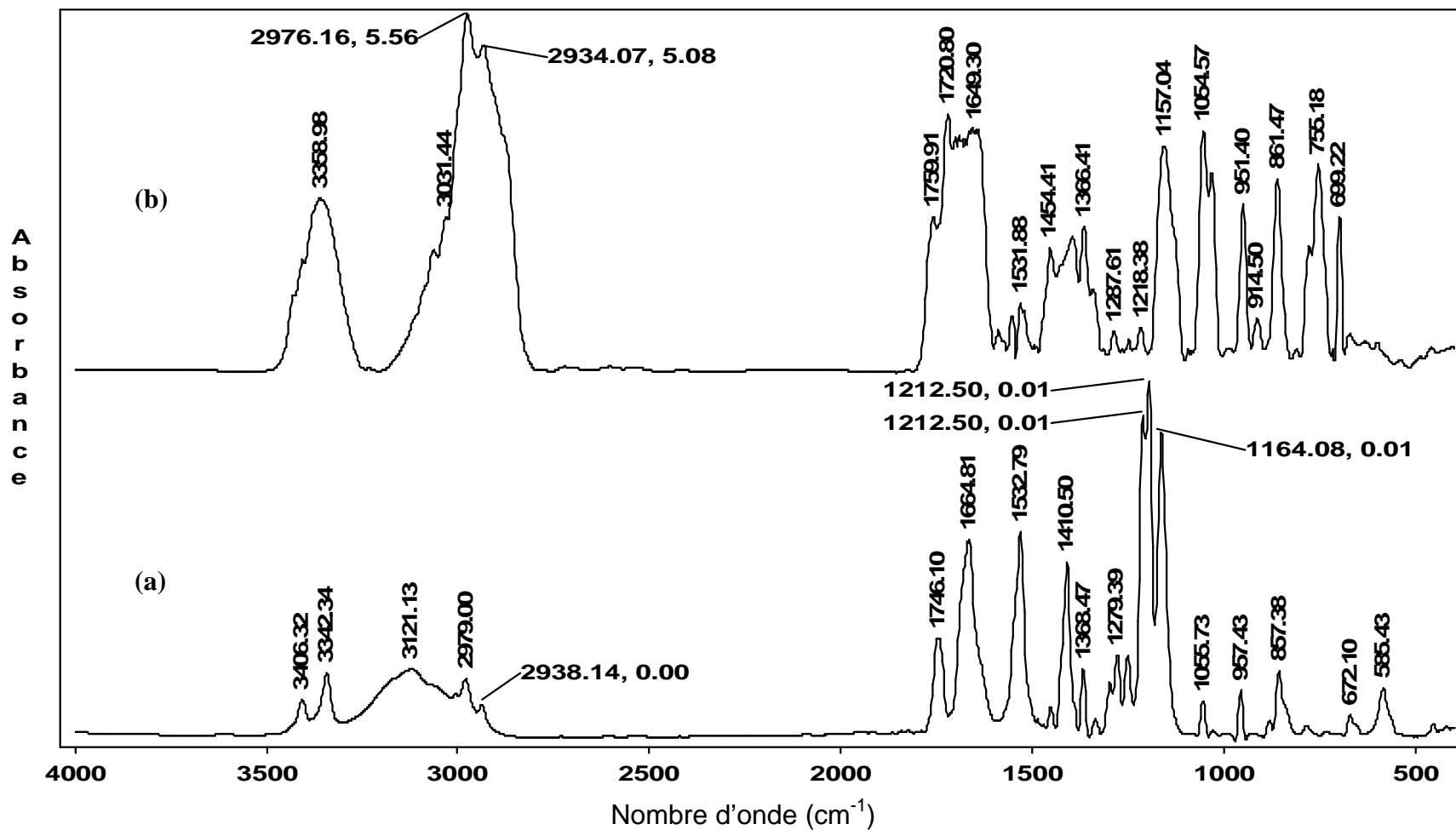


Figure 4.26 : Comparaison entre le spectre FTIR du Boc-Gly-OH **(a)** et de l'azadipeptide **(b)** en pastille de KBr.

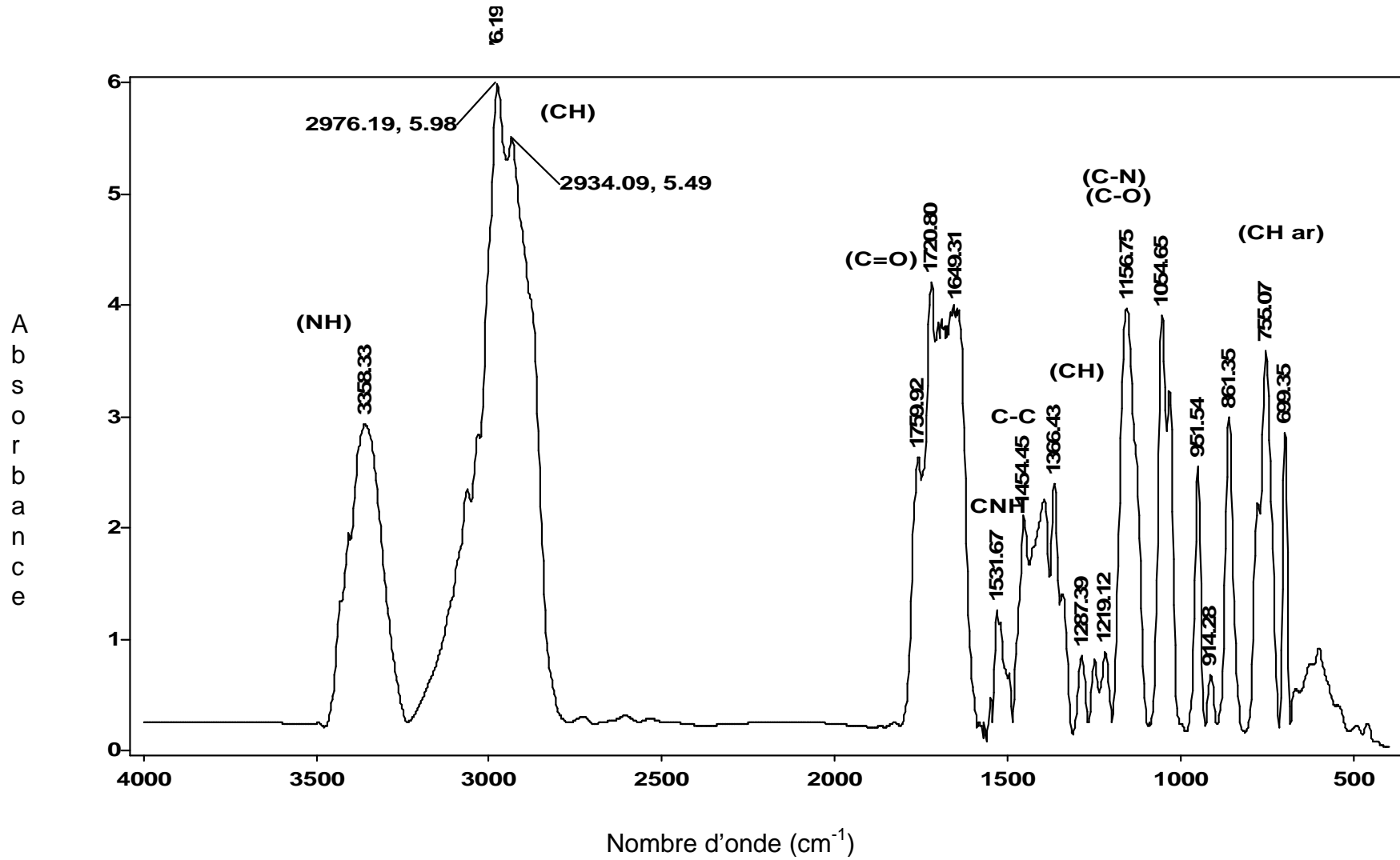


Figure 4.27 : Spectre FTIR du Boc-Gly-AzaPro-OBZI .

4.4.2 Caractérisation de l'azadipeptide Boc-Gly-azaPro-OBZI par RMN-H¹ :

Le spectre RMN-H¹ du Boc-Gly-azaPro-OBZI dans le CDCl₃, figure 4.29, présente un singulet à 1,4 ppm d'intégration neuf correspondant aux neufs protons **a** des trois méthyles du groupement Boc. Le multiplet à 7,35 ppm est propre au déplacement chimique des cinq protons benzéniques **h**.

Le signal à 5,2 ppm d'intégration deux correspond aux deux protons **g** du CH₂ précédant le cycle benzénique.

La bande large d'intégration un entre 6,1-6,6 ppm correspond au proton **b** du NH.

Les deux protons **c** du CH₂ de la glycine donnent un signal à 4,5 ppm.

Les deux protons **d** du cycle pyrazolidine se couplent avec les protons **e** et **f** et résonnent en multiplet d'intégration deux à 1,9 ppm.

Les quatre autres protons du cycle (2H_e, 2H_f) étant non équivalents magnétiquement, se couplent différemment entre eux et avec les protons **d** en donnant de bandes larges à 3,2 ppm et 4,1 ppm et de multiplets à 3,78 ppm et 3,9 ppm.

Le signal à 6,98 ppm peut être dû à une impureté.

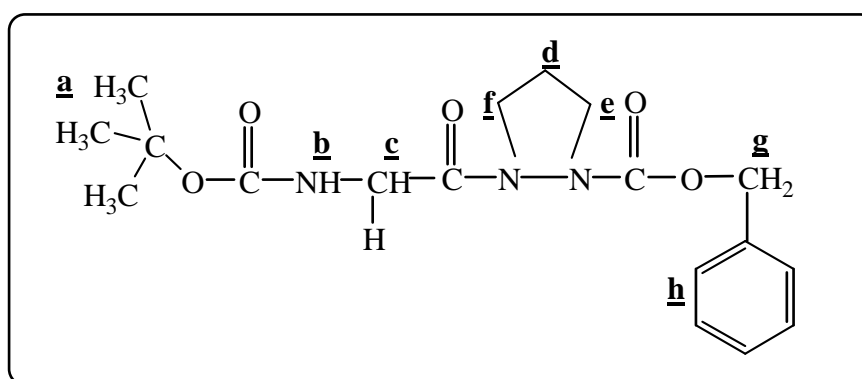


Figure 4.28 : Les différents types de protons de l'azadipeptide.

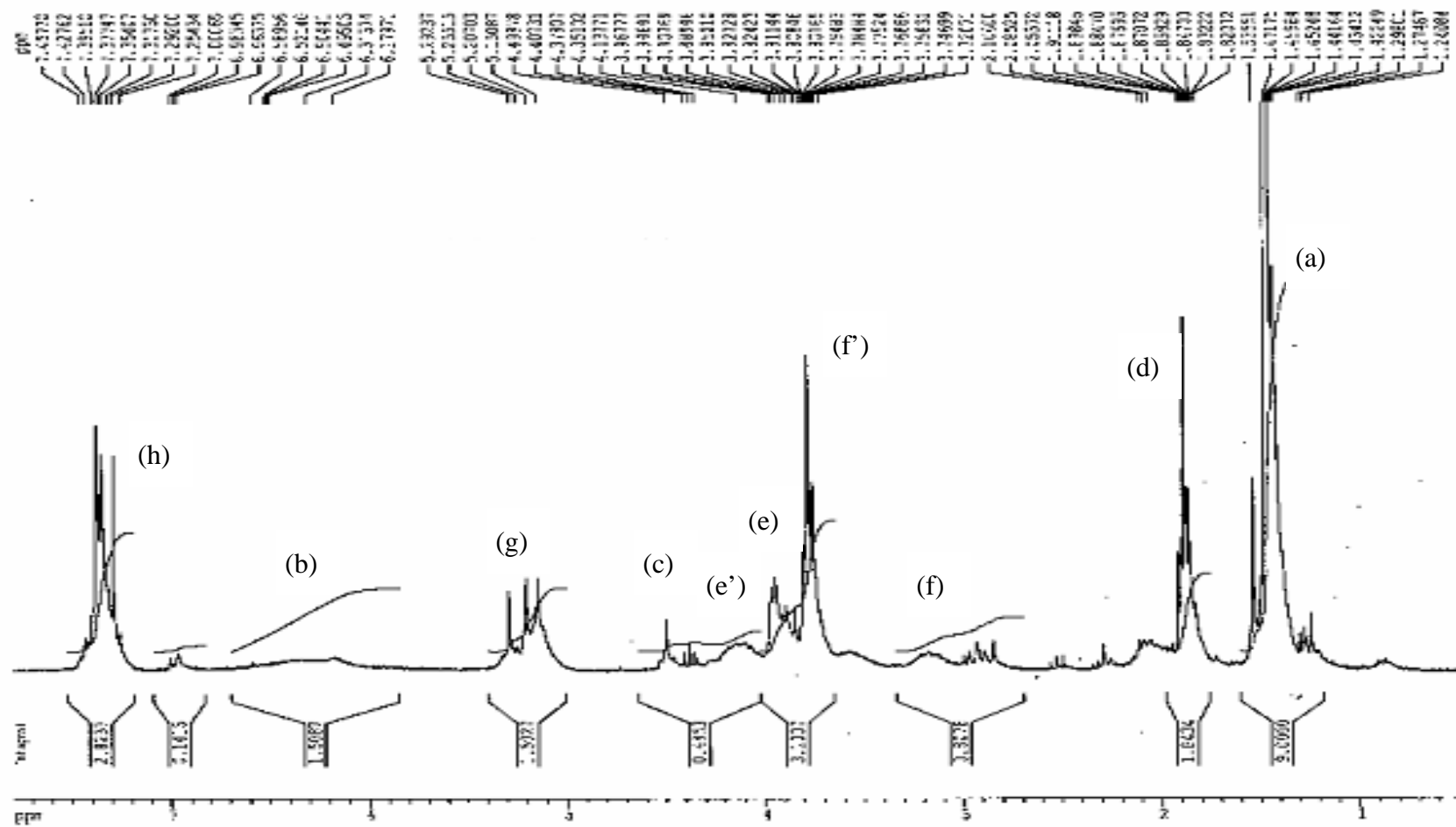


Figure 4.29 : Spectre RMN- H^1 du Boc-Gly-AzaPro-OBZI dans le $CDCl_3$ à 300 MHz.

CONCLUSION

A l'issue de ce travail, nous avons en premier lieu réalisé la protection orthogonale du tert-butyl carbazate par le groupement benzyloxycarbonyl en faisant réagir le Z-Cl sur le Boc-NH-NH₂ en présence de la NMM. L'hydrazine (N¹, N²) protégée par les deux groupements orthogonaux Boc et Z, a été obtenue sous forme cristalline pure en cristallisant l'huile obtenue dans le système THF/Hx avec un rendement de 89%. La structure du Boc-NH-NH-Z a été confirmée par analyse C.H.N, FTIR et RMN-H¹.

En deuxième lieu, nous avons synthétisé le résidu azaprolyl, l'aza-analogue de la prolyl, en faisant réagir le NaH suivi du 1,3-dibromopropane sur le Boc-NH-NH-Z dans deux solvants différents : le THF et le DMF.

Bien que le produit obtenu dans le THF ait cristallisé dans l'Hx avec un rendement de 21%, son spectre FTIR a révélé l'existence toujours de groupe NH. Ce qui laisse croire que le cycle pyrazolidine ne s'est pas formé.

Par contre, le produit synthétisé dans le DMF, malgré son utilisation en l'état (sous forme d'huile), ses spectres FTIR et RMN-H¹ ont révélé une parfaite cohérence avec la structure du Boc-azaPro-OBZI. De là nous pouvons conclure que la formation du cycle pyrazolidine n'a eu lieu que dans le DMF.

Dans le but de cliver le groupement Boc et de libérer la fonction amine de l'azaprolyl, nous avons soumis le Boc-azaPro-OBZI à une acidolyse par du HCl_(g)/ACOEt (~3N). La structure du chlorhydrate, obtenu sous forme d'un sel blanc hygroscopique, a été confirmée par analyse C.H.N, FTIR, RMN-H¹, RMN-C¹³ et DEPT 135.

En dernier lieu, nous avons procédé au couplage de la glycine N-protégée par le groupement Boc (Boc-Gly-OH) au chlorhydrate de l'azaprolyl C-protégé par le groupement Z.

La réaction de couplage avec un taux de 86% a été réalisée par la méthode des anhydrides mixtes moyennant le triphosgène comme agent de couplage et la NMM comme base. Le triphosgène active la partie C-terminale de la glycine N-protégée en formant un anhydride mixte à basse température (-10 °C), susceptible de réagir in-situ avec la partie N-terminale du chlorhydrate de l'azaproyl. La structure de l'azadipeptide Boc-Gly-Azapro-OBZI a été confirmée par l'examen des spectres FTIR et RMN-H¹.

Enfin, en perspectives nous projetons d'allonger cette chaîne peptidique en lui clivant le groupement Z puis la couplant à un autre acide aminé pour la recherche d'éventuels tours β .

APPENDICE A

SYMBOLES ET ABREVIATIONS

Ac : acétyle.

ACOEt : acétate d'éthyle.

AzaPip : azapipécolique.

Boc : tertibutyloxycarbonyle.

BOP: benzotriazoloxyl tris(diméthyl-amino)-phosphonium hexafluorophosphate.

CDI : carbonyl diimidazol.

CCM : chromatographie sur couche mince.

Da : dalton (1 Da = $1,66018 \cdot 10^{-24}$ g)

DCCI : dicyclohexylcarbodiimide.

DCM : dichlorométhane.

DCU : dicyclohexyl urée.

DEPT : Distortionless Enhancement by Polarization Transfert.

DIEA : diisopropyl éthyl amine.

DMF : diméthyle formamide.

DRX : diffraction des rayons X.

EP : éther de pétrole.

EtOH : éthanol.

Et₂O : éther diéthylique.

Fmoc : fluorénylméthoxycarbonyl.

For : formyle.

FTIR : infrarouge à Transformée de Fourier.

HAV: Hepatitis A virus.

HBTU : benzotriazolyl tétraméthyl-uronium hexafluorophosphate.

HGH : Hormon Growth Hormon.

HIV: human immunodeficiency virus.

HOBt : hydroxy benzotriazol.

HRV : Human Rhino Virus.

Hx : hexane.

IBCF : isobutylchloroformate.

iPrOH : isopropanol.

MeOH : méthanol.

MM : masse molaire.

NaH : hydrure de sodium.

NMM : N-méthyle morpholine.

PFP : pentafluorophénol.

PNP : p-nitrophénol.

R : rendement.

R_f : facteur de rétention.

RMN-C¹³ : résonance magnétique nucléaire du carbone.

RMN-H¹ : résonance magnétique nucléaire du proton.

T_f : température de fusion.

TFA : acide trifluoroacétique.

THF : tetrahydrofurane.

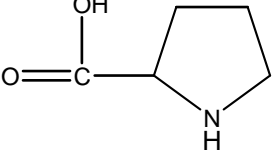
Xaa: acide aminé X.

Z : benzyloxycarbonyle.

Z-Cl : chloroformiate de benzyle.

APPENDICE B
LISTE DES ACIDES AMINES NATURELS

Nom	Formule	Symbole
Glycine	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$	Gly
Alanine	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Ala
Valine	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_3 \end{array}$	Val
Leucine	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	Leu
Isoleucine	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\overset{\text{H}_2}{\text{C}}-\text{CH}-\text{CH}_3 \end{array}$	Ile
Sérine	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{CH}_2 \end{array}$	Ser
Thréonine	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{OH} \end{array}$	Thr

Méthionine	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{C}-\text{CH}_2 \end{array} $	Met
Cystéine	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HS}-\text{CH}_2 \end{array} $	Cys
Proline		Pro
Phénylalanine	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array} $	Phe
Tyrosine	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4-\text{OH} \end{array} $	Tyr
Tryptophane	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2 \end{array} $	Try
Acide aspartique	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HOOC}-\text{CH}_2 \end{array} $	Asp
Acide glutamique	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}_2 \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{CH}_2 \end{array} $	Glu
Lysine	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4 \end{array} $	Lys

Arginine	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3 \\ \parallel \\ \text{HN} \end{array} $	Arg
Histidine	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{Imidazole ring} \end{array} $	His
Asparagine	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} $	Asn
Glutamine	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{C} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} $	Gln

REFERENCES

1. Harpet, K. and Raghava, G.P.S, « Prediction of α -turns in proteins using PSI-Blast profiles and secondary structure information », *Proteins : Structure, Functions and Bioinformatics*, 55, 2004, 83-90.
2. Chou, K.C., « Prediction of tight turns and their types in proteins », *Analytical Biochem*, 286,2000, 1-16.
3. Ro, S., Lee, H.-J. , Ahn, I.-A, Shin, D.K. , Lee, K.B. , Yoon, C.-J. and Choi Y.-S. « Torsion angle based design of peptidomimetics : a dipeptidic template adopting β -I turn (Ac-Aib-AzGly-NH₂) », *Bioorganic and Medicinal Chemistry* , 9, 2001, 1837-1841.
4. Goodman, M. , Ro, S. , In Burger's Medicinal Chemistry and drug discovery, Principles and Practise, 5th Ed ; Wolff, M.E , Ed. ; John Wiley and Sons : New York, Vol.1, 1995, p 803 and references therein.
5. Ashish, R. Kishore, « Thermodynamic characterizations of an intramolecularly hydrogen bonded C₅-structure across proteinogenic residue », *FEBS letters*, 417, 1997, 97-100.
6. Ramanathan, S. K., Keeler, J., Lee, H.-J., Keddy, D. S. , Ton , G. L., and Aubé J., « Modular Synthesis of cyclic peptidomimetics Inspired by γ -turn », *Organic Letters*, vol.7, N^o6, 2005, 1059-1062.
7. Jiménez, A.I., Marraud, M. and Cativiela, C., « Cyclopropane analogue of valine : influence of side chain orientation on peptide folding », *Tetrahedron Letters*, 44, 2003, 3147-3150.
8. Rose, G.D. ; Gierasth, L.M. ; Smith, J.A., *Adv. Protein Chem.* , 37, 1985, 1-109.
9. Zega, A., Urleb, U., « Azapeptides » , *Acta. Chem. Slov.*, 49, 2002, 649-662.
10. Gil, A.M., Bunnell, E., Jiménez, A.I. and Cativiela, C., « Stabilisation of the type β I-turn conformation by a bicyclic analogue of proline », *Tetrahedron Letters*, 44, 2003, 5999-6002.
11. Che, Y., and Marshall, G.R. « Impact of Azaproline on peptide conformation », *J.Org.Chem.*, 69,2004, 9030-9042.
12. Lee, H.-J., Ahn, I.-A., Ro , S., Choi, K.-H., Y.-S. and Lee, K.-B., « Role of azaamino acid residue in β -turn formation and stability in designed peptide » *J.Peptide Res.*,56, 2000, 35-46.

13. Zhang, W. J. ; Berglund, A. ; Kao, J. L.-F. ; Couty, J.-P. ; Gersnengorn, M. C. ; Marshall, G. R., « Impact of azaprolone on amide cis-trans Isomerism : Conformational analyses and NMR studies of model peptide including TRH analogues », *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 1221-1235.
14. Vankatachalam, C. M. , *Biopolymers*, 6, 1986 , 1425-1436.
15. Lewis, P. N. ; Momany, F. A.; Scherga, H. A., *Biochem. Biophys. Acta.*, 303, 1973, 211-229.
16. Richardson, J. S. , *Adv. Protein Chem.*, 34, 1981, 167-339.
17. Grzegorz B., « Formation of disulfide bonds in proteins and peptides », *Biotechnology Advances*, 23, 2005, 87-92.
18. Albericio, F., « Developments in peptide and amide synthesis », *Current Opinion in Chemical Biology*, 8 , 2004 , 211-221.
19. Albericio F., Chinchilla R., Dods Worth DJ., Najera C., « New trends in peptide coupling reagents », *Org. Pep. Proced. Int.*, 33, 2001, 203-303.
20. Agami, C. and Couty, F., « The reactivity of the N-Boc protecting group : an underrated feature », *Tetrahedron*, 58, 2002 , 2701-2724.
21. Ricardo L.E. Furlan and Ernesto G. Mata, « Efficient and simple one-pot conversion of resin-bound N-Fmoc amino acids and dipeptides into N-Boc derivatives », *ARKIVOC*, X, 2003, 32-40.
22. Edward A. Papageorgiou, Matthew J. Gaunt, Jim-Quan Yu and Jonathan B. Spencer, « Selective hydrogenolysis of novel benzyl carbamate protecting group », *Org. Lett.*, Vol 2, N°8, 2000, 1049-1051.
23. R. N. Salvatir, C. H. Yon and K. W. Jung, « Synthesis of secondary amines », *Tetrahedron*, 57, 2001, 7785-7811.
24. Karen M. Bromfield, Julia Cianci and Peter J. Duggan, *Molecules*, 9, 2004, 427-439.
25. Christian A.G..N. Montalbetti and Virginie Falque, « Amide bond formation and peptide coupling », *Tetrahedron*, 61, 2005 , 10827-10852.
26. Han, S.-Y. and Kim ,Y.-A., « Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis », *Tetrahedron*, 60, 2004, 2447-2467.
27. Fisher, E. ; Otto, E. *Ber. Deutsch, Chem. Ges.*, 36, 1903, 2106-2116.
28. Shechan, J. C. ; Hess, G. P. , *J. Am. Soc.*, 77, 1955, 1067-1068.

29. Wincenty Kwapiszewski, Jan Kolwas, « Synthesis of amino acid derivatives of benzocaines », *Acta. Polon Pharm*, XXXIV, Nr 2, 1977, 167-170.
30. Mikolajezuk, M. ; Kielbasinski, P. ; *Tetrahedron*, 37, 1981, 233-284.
31. Thormann, M., Hofmann H.-J., « Conformational properties of azapeptides », *Journal of Molecular Structure (Thechem)*, 469, 1999, 63-76.
32. Didierjean, C. ; Aubry, A. ; Wyckert, F. et Boussard, G., « Structural features of The Pip/azaPip couple in the crystalline state : influence of the relative azPip location in an azadipeptide sequence upon the induced chirality and conformartional characteristics », *J. Peptide Res.*, 55, 2000, 308-317.
33. Lee, H.-J. ; Choi, K.-H. ; Ahn, I.-A. ; Ro, S. ; Jang, Y.-S. ; Lee, K.-B., « The β -turn preferential solution conformation of a tetrapeptide containing an aza-amino residue », *Journal of Molacular Structure*, 569, 2001, 43-54.
34. Tushar K. Chakraborty, Animesh Ghosh, Ravi Sankar A. et Ajit C. Kunwar , « Development of 2,3-daazabicyclo [2.2.1] heptane as a constrained azapeptide template and its uses in peptidomimetics studies », *Tetrahedron Letters*, 43, 2002, 5551-5554.
35. Hemmerlin, C. , Manh, T. C. and Boussard, G., « Synthesis and conformationl preferences in solution and crystalline states of an aza-tripeptide », *Tetrahedron Letters*, 42, 2001, 5009-5012.
36. Biswadip Banerji, Madhushree Bhattacharya, Rajesh B. Madhu, Saibal Kumar et Javed Iqbal, « Synthesis of β -turn mimics from L-Pro-Phe/ Phe-L-Pro derived di- and tripeptides via ring closing metathesis : the role of chirality of the Phe residue during cyclization », *Tetrhedron Letters*, 43, 2002, 6473-6477.
37. Hruby, V. J., *Life Sci.*, 31, 1982, 189.
38. Toniolo, C., *Int. J. Pept. Protein Res.*, 35, 1990, 287.
39. Spatola, A. F., in : B. Weinstein (Ed)., *Chemistry and Biochemistry of Aminoacids, Peptides and Proteins*, Vol. 7, Marcel Dekker, New York, 1983, p. 267-357.
40. Hruby, V. J. ; Al-Obeidi, F. ; Kazmiersky, W., *Biochem. J.*, 268, 1990, 249.
41. Olson, G. L. ; Bolin, D. R. ; Bonner, M. P. ; Rös, M. ; Cook, C. M. ; Fry, D. C. ; Graves, B. J. ; Hatada, M. ; Hill, D. E. ; Kahn, M. ; Madison, V. ; Ruisiecki, V. K. ; Sarabu, R. ; Sepinwell, J. ; Vincent, G. P. ; Voss, M. E., *J. Med. Chem.*, 36, 1993, 3039.
42. Giannis, A. ; Kolter, T., *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, 32, 1993, 1244.
43. Gante, J., *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, 33, 1994, 1699-1720.

44. Wiley, R. A. ; Rich, D. H., *Med. Res.*, 13, 1993, 327.
45. Kahn, M., *Syn. Lett.*, 1993, 821.
46. Hagihara, H. ; Anthony, N. J. ; Stout, T. J. ; Clardy, J. ; Schreiber, S. L., *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 1992, 6568.
47. Martin, S. F. ; Dorsey, G.O. ; Gante, T. ; Hillier, M. C. ; Kessler, H. ; Baur, M. ; Mathä, B. ; Erickson, J.W. ; Nagarajan Bhat, T. ; Munski, S. ; Gulnick, S. V. ; Topol, T. A. ; *J. Med. Chem.*, 41, 1998, 1581.
48. Chorev, M. ; Goodman, M. ; « A dozen years of retro inverso peptidomimetics », *Account of Chemical Research*, 26, 1993, 266-273.
49. Hryby, V. J. ; Li, G. G. ; Haskell Luenevo, C. Shenderovich, M., « Design of peptides, proteins and peptidomimetics in chi space », *Biopolymers*, 43, 1997, 219-266.
50. Tran, T. T. ; Zeng, J. ; Treutlein, H. ; Burgee, A. W., « Effects of thioamide substitutions on the conformation and stability of α and 3(10)-helices », *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 2002, 5222-5230.
51. Lee, H.-J. ; Kim, J. H. ; Jung, H. J. ; Kim, K. Y. ; Kim, E. J. ; Choi, Y. S. ; Yoon, C. J. ; « Computational study of conformational preferences of thioamide-containing azaglycine peptides », *J. Comput. Chem.*, 25, 2004, 169-178.
52. Ro, S. ; Lee, H.-J. ; Ahn, I.-A. ; Shin, D. K. ; Lee, K.-B. ; Yoon, C. J. ; Choi, Y.S., « Torsion angle based design of peptidomimetics: a dipeptidic template adopting β -I turn (Ac-Aib-AzGly-NH₂) », *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 9, 2001, 1837-1841.
53. Gante, J., *Synthesis*, 1989, 405-413.
54. Benatalah, Z. ; Aubry, A. ; Boussard, G. ; Marraud, M., « Evidence for a β -turn in an azadipeptide sequence », *Int. J. Peptide Protein Res.*, 38, 1991, 603-605.
55. André, F. ; Boussard, G. ; Marraud, M. ; Didierjean, C. ; Aubry, A., « Synthesis and conformational analysis of AzAsx-containing oligopeptide », *Letters in Peptide Science*, 2, 1995, 239-242.
56. Che, Y. ; Marshall, G. R., « Impact of azaproline on peptide conformation », *J. Org. Chem.*, 69, 2004, 9030-9042.
57. Wiczerzak, E. ; Drabik, P. ; Lankiweicz, L. ; Oldziej, S. ; Grzonka, Z. ; Abrahamson, M. ; Grubb, A. ; Brömme, D., « Azapeptide structurally based upon inhibitory sites of cystatins as potent and selective inhibitors of cysteine proteases », *J. Med. Chem.*, 45, 2002, 4202-4211.

58. Zouikri, M. ; Vicherat, A. ; Aubry, A. ; Marraud, M. ; Boussard, G., *J. Pep. Res.*, 52, 1998, 19-26.
59. Vijay, K. G., Sharmistha, D., Tej, P. S., « Design of peptides with α , β -dehydro residues synthesis and crystal structure of a tripeptide N-benzyloxycarbonyl- Δ Val- Δ Phe-Ala-OCH₃ », *Journal of Molecular Structure*, 738, 2005, 189-192.
60. Jain, R. et Chauhan, V. S., *Biopolymers Pept. Sci.*, 40, 1996, 105-119.
61. Boussard, G. ; Marraud, M. ; Néel, J. ; Maignret, B. ; Aubry, A., *Biopolymers*, 16, 1977, 1033-1052.
62. Thèse de Doctorat, Zouikri, M., « Le résidu azaprolyl, son introduction dans un peptide , modifications dues à la substitution azpro/pro » Nancy 1996.
63. André, F. ; Boussard, G. ; Bayeul, D. ; Didierjean, C. ; Aubry, A. et Marraud, M., « X-Ray structure of aza-alanine and aza-asparagine containing peptides », *J. Peptide Res.*, 49, 1997, 556-562.
64. Hyunso han and Kim D. Janda, « Azatides : solution and solid phases synthesis of a new peptidomimetic », *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 118, N°11, 1996, 2539-2544.
65. Lee, H. J. ; Park, H. M. ; Lee, K.B., « The β -turn scaffold of tripeptide containing an azaphenylalanine residue », *Biophysical Chemistry*, 125, 2007, 117-126.
66. Ahn, I. A. ; Kim, D. W. ; Ro, S., *Mol Divers*, 4, 1998-1999, 23-24.
67. Hess, H. J. ; Marchand, W. T. ; Laubach, G. D., *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 1963, 4040-4041.
68. Gante, J. ; Krug, M. ; Lauterbach, G. ; Weitzel, R. ; Hiller, W., *J. Peptide Science*, 2, 1995, 201-206.
69. Xing, R. ; Hanzlik, R. P., *J. Med. Chem.*, 41, 1998, 1344.
70. Calcagni, A. ; Dupre, S. ; Lucchte, G. ; Luisi, G. ; Pinnen, F. ; Rossi, D., *Int. J. Pept. Protein Res.*, 46, 1995, 434.
71. Greenlee, W. J. ; Thorset, E. D. ; Springer, J. P. ; Patchet, A. A. ; Ulm, E. H. ; Vassil, T. C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122, 1984, 791.
72. Powers, J. C. ; Boone, R. ; Carroll, D. L. ; Gupton, B. F. ; Kam, C. M. ; Nishino, N. ; Sakamoto, M. ; Tuhy, P. M., *J. Biol. Chem.*, 259, 1984, 4288.
73. Gupton, B. F. ; Carroll, D. L. ; Tuhy, P. M. ; Kam, C. M. ; Powers, J. C., *J. Biol. Chem.* 259, 1984, 4279.

74. Dutta, A. S. ; Furr, B. J. ; Gilles, M. D. ; Morley, J. S., Clin. Endocrinol., 5, 1976, 291-298.
75. Gray, C. J. ; Dessai, N. I. ; Gost, R. ; Masih, G., Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids, 2, 1996, 13.
76. Dutta, A. S. ; Furr, B. J. ; Gilles, M. D. ; Valcaccia, B., J. Med. Chem., 21, 1978, 1018-1024.
77. Magrath, J. ; Abeles, R. H., J. Med. Chem., 35, 1992, 4279.
78. Wyckaert, F. ; Boussard, G. ; Didierjean, C. ; Aubry, A., « Synthesis, Molecular structure and conformational study of dipeptides containing pipercolic acid or its α -azaanalogue », Peptides 2000. Jean Martinez and Jean Alain Fehrentz (Eds.), EDK, Paris, France © 2001, 549-550.
79. Oehme, P. ; Katzwink, S. ; Voigt, W. E. ; Niedrich, H., Experientia, 29, 1973, 947-948.
80. Dutta, A. S. ; Gilles, M. B., J. Chem. Soc. Perkin Trans I, 1976, 244-248.
81. Gante, J. et Lautsch, W., Chem. Ber., 97, 1964, 983-988.
82. Niedrich, H., J. Prakt. Chem., 314, 1972, 769-779.
83. Niedrich, H. ; Oehme, C., J. Prakt. Chem., 314, 1972, 759-768.
84. Oehme, C. ; Bergmann, J. ; Falck, M. ; Reich, J. G. ; Voigt, W. ; Niedrich, E. ; Pirrwitz, J. ; Bersack, C. ; Jung, F., Acta. Biol. Med. Ger., 28, 1972, 109-131.
85. Niedrich, H. ; Oehme, C. ; Bergmann, J., J. Prakt. Chem., 316, 1974, 741-749.
86. Dutta, A. S. ; Furr, B. J. A. ; Gilles, M. B., J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I, 1979, 379-388.
87. Dutta, A. S. ; Furr, B. J. A. ; Gilles, M. B., J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I, 1979, 389-394.
88. Ho, T. L. ; Nestor, J. J. ; Mc Rae, G. I. ; Vickery, B. H., Int. J. Pept. Res., 24, 1984, 79-84.
89. Dutta, A. S. ; Furr, B. J. A., Annu. Rep. Med. Chem., 20, 1985, 203-214.
90. Nestor, J. J. ; Thilramani, R. ; Ho, T. L. ; Mc Rae, G. I. ; Vickery, B. H., J. Med. Chem. 31, 1988, 65-72.
91. König, W. ; Sandow, J. ; Jerobek-Sandow, G. ; Kolar, C. ; Jung, C. and Bayer, E., Ed. Walter de Gruyter : Berlin, 1989, pp. 334-336.

92. Hutchinson, F. G. ; Furr, B. J. A., Trends Biotechnol., 5, 1987, 102-106.
93. Dutta, A. S. ; Gormley, J. J. ; Hayward, C. F. ; Morley , J. S. ; Shaw, J. S. ; Stacy, G. J. ; Turnbull, M. T., Life Sci., 21, 1977, 559-562.
94. Gacel, G. ; Zajac, J. M. ; Delay-Goyet, P. ; Dangé, V. ; Roques, B. P., J. Med. Chem., 31, 1988, 374-383.
95. Han, H. ; Yoon, J. ; Janda, K. D., Bioorg. Med. Chem. Lett., 8, 1998, 117-120.
96. Hansen, T.K., Tetrahedron Letter, 40, 1999, 9119-9120.
97. Andurkar, S. V., Béguin, C., Stables, J.P., Kohn, H. ; J. Med. Chem., 44, 2001, 1475-1478.
98. Zega, A., Mlinsek, G., Sepic, P., Golic-Grdadolnik, S. , Solmajer, T., Tschopp, T. B., Kikelj, D., Urleb, U., Bioorg. Med. Chem., 9, 2001, 2745-2756.
99. Zega, A., Trampus-Bakija, A., Fortunr, M., Stegnar, M., Tschopp, T. B., Steiner, B., Urleb, U., Pharmazie, 56, 2001, 683-685.
100. Huang, Y., Malcolm, B. A. , Vederas, J. C., « Synthesis and Testing Azaglutamine derivates as inhibitors of Hepatitis A Virus (HAV) 3C proteinase », Bioorganic and Medecinal Chemistry, 7, 1999, 607-619.
101. Vankatraman, S., Kong, J.-S., Nimkar, S., Wang, Q. M., Aubé, J., Hanzlik, R. P., « Design, synthesis and evaluation of azapeptides as substrates and inhibitors for Human Rhinovirus 3C protéase », Bioorganic and Medecinal Chemistry Letters, 9, 1999, 577-580.
102. Witherell, G., Curr. Opin. Invest. Drugs, 2, 2001, 340-347.
103. Gong, Y.-F., Robinson, B. S., Rose , R. E., Deminie, C., Spicer, T. P., Stock, D., Colonna, R. J., Lin, P.-F., Antimicrobial Agents Chemotherapy, 44, 2000, 2319-2396.
104. Patal, R. N., Chu, L. Mueller, R., Tetrahedron : Asummetry, 14, 2003, 3105-3109.
105. Goldsmith, D. R., Perry, C. M., Drugs, 63, 2003, 1679-1693.
106. Loregian, A., Pagni, S. , Ballarin, E., Sinigalia, E., Parisi, S. G., Palù, G., « Simple determination of the HIV protease inhibitor : atazanavir, in human plasma by HPLC with UV detection », Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 42, 2006, 500-505.
107. Stollé, R., Ber. Dtsh. Chem. Ges., 43, 1910, 2469.

108. Goldschmidt, S. ; Wick, M., Liebigs. Ann. Chem., 575, 1952, 217-231.
109. Gante, J., Chem. Ber., 98, 1965, 540-547.
110. Dutta, A. S. ; Morley, J. S., J. Chem. Soc. Perkin Trans I, 1975, 1712-1720.
111. Gray, C. J. ; Quibell, M. ; Jiang, K ;-L. ; Bagget, N., Synthesis 1991, 141-146.
112. Gante, J., J. Chem. Ber., 99, 1966, 2521-2525.
113. Gante, J., Angew. Chem., 78, 1966, 602- 603.
114. Gray, C. J., Quibell, M., Baggett, N., Hammerle, T., Int. J. Pep. Prot. Res., 40, 1992, 351-362.
115. Quibell, M., Turnell, W. G., Johnson, T. J., Chem. Soc. Perkin Trans., I, 1993, 2843-2849.
116. André, F., Marraud, M., Tsouloufis, T., Tzartos, S. J., Boussard, G., J. Pept. Sci., 3, 1997, 429-441.
117. Gibson, C., Goodman, S. L., Hahn, D. , Holzmann, G., Kessler, H., J. Org. Chem., 64, 1999, 7388-7394.
118. Liley, M., Johnson, T., Tetrahedron Letter, 41, 2000, 3983-3985.