

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE.
UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA 1



Faculté des Sciences
Département de Chimie

Mémoire de Master
en vue d'obtention du diplôme de Master
Spécialité: Chimie Organique

Thème:

Synthèse et caractérisation d'acides aminés^t
N,C- protégés

Présenté par :

KHEMIRI LOUBNA

AOUDJ FELLA

Soutenu le 12/07/2022 devant le jury composé de:

A.OURADI
N.YAHI
M.TALEB

MCA
MCB
MAA

Président
Examinatrice
Promotrice

Université Blida 1
Université Blida 1
Université Blida 1

Promotion 2021/2022

Remerciement

Merci à notre Dieu avant tout ç'est grâce à lui que nous sommes arrivés ou nous en sommes.

Nous voudrions tout d'abord à remercier Mme Taleb meriem, notre directrice de mémoire pour tout le soutien, l'aide, l'orientation, la guidance qu'elle m'a apportés lors de la réalisation de notre PFE.

Nous adressons nos remerciements les plus sincère aux membres de jury: M^r OURADI et M^{me}YAHY pour avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous voudrions remercier aussi notre chef d'option Mme Salhi. Nous remercions également les ingénieurs de laboratoire au niveau de pavillon 5 M^{em} Lyla et M^{me} Hassina .

Un merci tout particulier à M^{lle} Nashida doctorante en Chimie pour son aide. Nous ne voudriez pas oublier les collègues de la promotion de master chimie organique pour tous ce qu'on a vécu ensemble ces deux dernières années.

Dédicace

Loué soit Dieu et sa suffisance et ses prières soient sur le Mustafa et sa famille et ceux qui ont accompli la suite.

Je dédie le fruit de mes efforts à mes anges dans la vie, à celui que j'ai aimé avec sa tendresse, à celui qui a divisé la mer de la connaissance et de l'apprentissage pour moi, à celui qui a souhaité me voir pendant que j'accomplis ce succès, le pilier de ma vie, ma fierté et mon honneur est mon cher père, que Dieu ait son âme j'espère que j'ai parfaitement rempli ta volonté papa ..

A la source d'amour et de don, à la source de tendresse et au baume de la vie, ma chère mère, que Dieu la préserve.

A mon lien et ma force, celui qui a semé l'espoir dans mon cœur, mon mari ABD EL RAHIM (Mon lien et la rectitude de mon dos après mon père)

A ma fierté et honneur mes frères (ISLAM ,ABD EL BQSSET ET FAYCAL).

Au meilleur de ceux qui le destin m'a connu mon binôme de travail et d'amitié ma chère LOUBNA sans oublier ma copine et mon âme-sœur ROMAISSA....

A ceux qui m'ont soutenu de près ou de loin, même si en priant pour mes proches de spécialité de Chimie organique spécialement madame NASHIDA et mes professeurs ,et qui sont proches de mon cœur...

fella

Dédicace

Loué soit Dieu et sa suffisance et ses prières soient sur le Mustafa et sa famille et ceux qui ont accompli la suite.

Je dédie ce travail A mes parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, Leur tendresse, leur soutien et leurs prières Tout au long de mes études, pour toute Leur assistance et leur présence dans ma vie.

A ma fierté et honneur mes frère (Zakaria, Ibrahim, Iyad).

Aux meilleurs de ceux qui le destin m'a fait connaître mon binôme de travail et d'amitié ma chère Fella , Zineb , Nadjat, Marwa, Romaissa mes cousine Imen ,Lamia...

A ceux qui m'ont soutenu de spécialité de Chimie Organique , mes professeurs , et qui sont proches de mon cœur.

Loubna

Abstract

The work focuses on the synthesis and characterization of N,C-protected amino acids. C-protection was made by a primary amine using the medium DCCI carbodiimide method as a coupling agent. N-protection existed on the commercial product.

Three amino acids have been used as main reagents which are “Boc-Ala-OH”, “Boc-Gly-OH”, “Boc-Leu-OH” protected by the Boc Protective Group. The synthesis in question consisted first of activating the C-terminale part (acid function) by the DCCI. then the intermediate formed will react with isopropylamine by a condensation reaction thus forming an amide bond.

In the end, an amino acid is obtained ready for a peptide synthesis sequence.

The identification of each product of our synthesis was done by: FTIR, by melting point measurement and by CCM.

Résumé

Le travail porte essentiellement sur la synthèse et la caractérisation d'acides aminés N,C-protégés . La C-protection a été faite par une amine primaire en utilisant la méthode des carbodiimides moyennement le DCCI comme agent de couplage. La N-protection existait sur le produit commercial.

On a utilisé trois acides aminés comme réactifs principaux qui sont « Boc-Ala-OH », « Boc-Gly-OH », « Boc-Leu-OH » protégés par le groupement protecteur Boc. La synthèse en question consistait d'abord à activer la partie C-terminale (fonction acide) par le DCCI. puis l'intermédiaire formé réagira avec l'isopropylamine par une réaction de condensation formant ainsi une liaison amide.

On obtient à la fin un acide aminé prêt pour une suite de synthèse peptidique.

L'identification de chaque produit de notre synthèse a été faite par : FTIR, en mesurant point de fusion et par .CCM.

ملخص

يركز العمل على توليف و توصيف الاحماض الأمينية المحمية من مادة N و C تم تصنيع الحماية بواسطة امين اولي باستخدام طريقة كربودييميد DCC المتوسطة كعامل اقتران كانت الحماية N موجودة على المنتج التجاري.

تم استخدام ثلاثة احماض امينية ككواشف رئيسية Boc-Ala-OH , Boc-Gly-OH , Boc-Leu-OH , المحمية من قبل مجموعة Boc Protective Groupe. تالف التخليق المعني اولا من تنشيط الجزء C-terminal (وظيفة الحمض) بواسطة DCC.

ثم يتفاعل الوسيط المتشكل مع الانيزوبروبيلامين عن طريق تفاعل تكثيف وبالتالي تشكيل رابطة اميد.

في النهاية يتم الحصول على حمض اميني جاهز لتسلسل تخليق الببتيد.

تم تحديد كل منتج من نواتج توليفنا بواسطة: FTIR , عن طريق قياس نقطة الانصهار و CCM.

Remerciement	
Dédicaces	
Sommaire	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
CHAPITRE 1 : Partie théorique	3
1.1 Généralités	3
1.2 Définition.....	3
1.3 Acides aminés essentiels et non-essentiels.....	4
1.3.1 Acides aminés essentiels	4
1.3.2 Acides aminés non-essentiels	4
1.4 Configuration des acides aminés	5
1.5 Les groupements protecteurs des acides aminés et leurs clivages	6
1.5.1 Le groupement benzyloxycarbonyle(Z)	6
1.5.2 Le groupement tertibutyloxycarbonyle(Boc)	7
1.5.3 Le groupement 9-fluorénylméthoxycarbonyle(FMOC)	8
1.6 Couplage peptidique	11
1.6.1 Chloruresd'acyle.....	11
1.6.2 Autres halogénuresd'acyle	11
1.6.3 Les Acylazides.....	13
1.6.4 Les anhydrides.....	13
1.6.5 Les esters activés	15
1.6.6 Isocyanates.....	15
1.7 Les peptides	16
1.7.1 La liaison amide	16
1.7.2 Propriétés géométriques de la liaison peptidique	16
1.8 Structure des peptides.....	18
1.8.1 Structure primaire	18
1.8.2 Structure secondaire	18
1.8.3 Structure tertiaire	20
1.8.4 Structure quaternaire.....	21
1.8.5 Synthèse chimique des peptides	22
1.8.6 Applications des peptides dans les différents domaines	24
CHAPITRE 2: Partie expérimentale.....	26
2.1 Choix de groupement protecteur	26
2.2 Agent de couplage	26
2.3 Réaction de synthèse des acides aminés N,C-protégés	27

2.3.1 Synthèse de Boc-Ala-NHiPr.....	27
2.3.2 Synthèse de Boc-Gly-NHiPr	28
2.3.3 Synthèse de Boc-Leu-NHiPr	29
2.4 Méthodes utilisées et techniques d'identification	31
2.4.1 Chromatographie sur couche mince	31
2.4.2 Mesure du point de fusion	32
2.4.3 La spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier.....	32
CHAPITRE 3: Résultats et discussions	33
3.1 Réaction de synthèse du BOC-Ala-NHiPr	35
3.1.1 Caractérisation du Boc-Ala-NHiPr par FTIR.....	39
3.2 Réaction de synthèse du BOC-Gly-NHiPr.....	40
3.2.1 Caractérisation du Boc-Gly-NHiPr par FTIR	44
3.3 Réaction de synthèse du BOC-Leu-NHiPr.....	45
3.3.1 Caractérisation du Boc-Leu-NHiPr par FTIR	48
Conclusion	
Appendice	
Références bibliographiques	

Listes des figures

Figure 1 : Structure d'un acide aminé	3
Figure 2 : Configuration L et D.....	5
Figure 3 : Projection de Fischer des configurations D et L	5
Figure 4 : Mécanisme de la protection par Cbz.....	6
Figure 5 : Mécanisme de l'hydrogénolysation sur le palladium.....	6
Figure 6 : Conditions de clivage du groupe Cbz	7
Figure 7 : Composés nécessaires pour l'introduction de BOC.....	7
Figure 8 : Déprotection du BOC dans DMF/H ₂ O.....	8
Figure 9 : Déprotection de BOC en milieu acide	8
Figure 10 : Réactifs nécessaires pour l'introduction du Fmoc	8
Figure 11 : Mécanisme de clivage du Fmoc en milieu basique	9
Figure 12 : Préparation d'un chlorure d'acyle.....	11
Figure 13 : Préparation d'un fluorure d'acyle	11
Figure 14 : Préparation d'un bromure d'acyle.....	11
Figure 15 : Préparation des Acylazides.....	12
Figure 16 : Réaction de couplage avec un anhydride mixte	13
Figure 17 : Structure de DCC et EDC	13
Figure 18 : Formation d'anhydride symétrique	13
Figure 19 : Pentafluorophényle (Pfp).....	14
Figure 20 : Synthèse d'ester activé en présence de PfpO.....	14
Figure 21 : Formation d'une liaison peptidique	15
Figure 22 : Extrémités d'une chaîne polypeptidique	15
Figure 23 : Schéma de liaison peptidique.....	16
Figure 24 : Configuration cis et trans de la liaison amide	16
Figure 25 : Trois angles dièdres (ω , ψ , ϕ) d'une liaison peptidique.....	16
Figure 26 : Structure primaire d'un peptide	17
Figure 27 : Structure Hélice α droite	18
Figure 28 : Structure en feuillet β	18
Figure 29 : Coude β	19
Figure 30 : Structure tertiaire d'une protéine.....	19
Figure 31 : Structure quaternaire d'une protéine	20
Figure 32 : Structure de l'ornithyl-taurine	24

Figure 33 : Structeur de DCCI.....	25
Figure 34: Montage de synthèse	26
Figure 35 : Formule développée du BOC-Ala-NHiPr.....	26
Figure 36 : Formule développée du BOC-Gly-NHiP	28
Figure 37 : Formule développée du BOC-Leu-NHiPr	29
Figure 38 : Chromatographie sur couche mince.....	30
Figure 39 : Fusion mètre.....	31
Figure 40 : Appareille infra rouge	31
Figure 41 : Mécanisme générale pour la synthèse des acides aminés	33
Figure 42 : Réaction de synthèse du Boc-AlaNHipr.....	34
Figure 43: Mécanisme proposé pour la synthèse du BOC-Ala-NHipr.....	35
Figure 44 : Spectre FTIR du Boc-Ala-OH	36
Figure 45 : Spectre FTIR du Boc-Ala-NHiPr.....	37
Figure 46 : Réaction de synthèse du Boc-Gly-NHiPr	39
Figure 47 : Mécanisme proposé pour la synthèse du BOC-Gly-NHipr	40
Figure 48 : Spectre FTIR du Boc-Gly-NHiPr	41
Figure 49 : Spectre FTIR du Boc-Gly-OH	42
Figure 50 : Réaction de synthèse du Boc-Leu-NHiPr	44
Figure 51 : Mécanisme proposé pour la synthèse du BOC-LEU-NHipr.....	45
Figure 52 : Spectre FTIR du Boc-Leu-OH.....	45
Figure 53 : Spectre FTIR du Boc-Leu-NHiPr	46

Listes des Tableaux:

Tableau 1: Les solvants utilisés pour la protection du Fmoc	9.
---	----

Liste des principales abréviations

ACOH : acide acétique.

AMPs : peptides antimicrobiens.

Boc : tertibutyloxycarbonyle .

CCM : chromatographie sur couche mince.

CPPs : Les peptides vecteurs .

DBU : 1,8- diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene.

DCCI : dicyclohexylcarbodiimide.

DCC : dicyclohexylcarbodiimide.

DCM : dichlorométhane.

DCU : dicyclohexyl urée.

DMF : diméthyle formamide.

DME : diméthoxyethane .

EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide.

Fmoc : fluorénylméthoxycarbonyl.

Hx : hexane.

IR : infra rouge.

iPrOH : isopropanol.

Lpps : la synthèse peptidique en phase liquide .

MeOH : méthanol.

MM : masse molaire.

NMM : N-méthyle morpholine.

NMP : N-méthylpyrrolidone.

Pfp : pentafluorophényle.

R : rendement.

Rf : facteur de rétention.

SPPS : la synthèse peptidique en phase solide.

TBDMS : tert-Butyldimethylsilyl.

Tf : température de fusion.

TFA : acide trifluoroacétique.

THF : tetrahydrofurane.

Xaa: acide aminé X.

Z : benzyloxycarbonyl.

Introduction générale

Les Peptides sont des composés naturels ou synthétiques qui résultent d'un enchainement d'un nombre déterminé d'acides aminés (AA) reliés entre eux par une liaison peptidique .la liaison peptidique est de type amide ,elle se forme par condensation entre la partie N-terminale d'un acide aminé et la partie C-terminal d'un autre acide aminé . Les peptides et les protéines sont des éléments essentiels dans l'organisme car ils ont des rôles très variés

- Un rôle de structure ,
- Un rôle catalytique (les enzymes),
- Un rôle de régulation de l'expression des gènes (les facteurs de transcription), etc.

Les acides aminés constituent une partie distinctive du corps humain et de l'alimentation. Ils sont extrêmement vitaux pour que le corps humain fonctionne correctement. Leur role principal est de transporter et de stocker de manière optimale l'ensemble des nutriments apportés à l'organisme : lipides, glucides, protéines, minéraux, vitamines, eau... En régulant les métabolismes de base du corps humain, comme ils réduisent le risque des maladies liées à notre mode de vie moderne.

Les acides aminés étant des molécules organique bifonctionnels présentant une fonction acide carboxylique et une fonction amine, doivent subir au préalable une modification structurale pour être utilisé dans une synthèse peptidique.

En général, on utilise des réaction de protection et d'activation de ces fonctions pour former sélectivement la liaison amide voulue. Et cela en protégeant la partie C-terminale sous forme d'une amide pendant que la partie N-terminale était protégée commercialement par le groupement Boc.

Notre choix s'est porté sur trois acides aminés:

Glycine : acide aminé achiral.

Alanine et leucine : acides aminés chiraux.

Et sur une amine primaire (isopropylamine) pour la C-protection qui va mimer dans une certaine mesure de prolongement de la chaine peptidique .

Nous avons orienté notre travail vers la synthèse d'acides aminés prêts pour une synthèse peptidique. Ce travail se scinde en trois chapitres : le premier chapitre axé sur la partie théorique qui inclue des généralités sur les acides aminés et la synthèse peptidique ainsi que leurs domaines d'applications, la partie expérimentale est décrite au chapitre deux. Les résultats obtenus et leurs discussions sont traités au troisième et dernier chapitre.

En fin nous terminons par une conclusion et perspectives.

Chapitre 1: Partie théorique

1.1 Généralité

Les acides aminés sont aux organismes vivants ce qu'un arbre est à une forêt, ils constituent l'unité de base de tous systèmes vivants et ils remplissent un rôle essentiel dans le maintien de la vie. L'agencement des acides aminés forme des chaînes peptidiques qui agissent en tant qu'enzymes, hormones, protéines structurales, contractiles, de transport, de stockage et immunologiques.¹ On comprend donc l'intérêt des acides aminés puisqu'ils interviennent dans tous les processus biologiques. On les retrouve comme agents agroalimentaires, agrochimiques et cosmétiques ² en plus d'être utilisés comme réactifs et ligands chiraux dans les synthèses asymétriques.³ Les acides aminés sont également intégrés dans la biosynthèse des alcaloïdes et de plusieurs autres métabolites secondaires. Les acides α -aminés nous intéressent plus particulièrement. Ils sont définis ainsi à cause du carbone C-2 (**ou α**) qui porte le groupe amine et carboxyle. Dans le corps humain, il en existe 20 acides aminés de configuration absolue « **L** » que l'on nomme acides aminés photogéniques.

1.2 Définition:

L'acide aminé est une substance organique contenant un carbone tétraédrique central (**α**) (**figure 1**) sur lequel sont fixés une fonction amine, une fonction acide carboxylique, un hydrogène et un groupement variable appelé chaîne latérale (**R**) ⁵. Le carbone **α** est asymétrique sauf pour la glycine où il possède deux substituants hydrogène. La distinction entre les différents acides aminés fait par la chaîne latérale plus ou moins complexe qui leur confère des propriétés physico-chimiques différentes.⁶

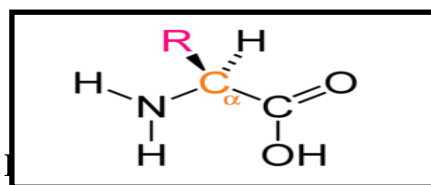


Figure 1 : Structure d'un acide aminé.

La chaîne latérale (R) peut être simple (Alanine), ramifiée (Leucine, isoleucine, valine), hydroxylée (Sérine, Thréonine) soufrée (Cystéine, Méthionine), dicarboxylique (asparagine, aspartate, glutamate) avec un groupement amines supplémentaire (glutamine, lysine, arginine),

aromatique (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) ou avec un groupement imine (histidine et proline). La glycine est l'acide aminé le plus simple avec un atome d'hydrogène pour substituant latéral ⁶.

1.3 Acides aminés essentiels et non-essentiels:

On distingue deux groupes d'acides aminés:

1.3.1 Acides aminés essentiels:

Les acides aminés essentiels ou indispensables ont été définis comme étant les acides aminés dont l'organisme humain est incapable de faire la synthèse.⁷ L'alimentation est la seule source d'apport. Ils sont au nombre de neuf : l'isoleucine, l'histidine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane et la valine.

1.3.2 Acides aminés non-essentiels:

Ceux sont des acides aminés synthétisés dans l'organisme et dont l'apport ne dépend pas uniquement de l'alimentation. Il s'agit de : l'alanine, l'arginine, l'asparagine, l'aspartate, la cystéine, la glutamine, le glutamate, la glycine, la proline, la sérine, et la tyrosine.

1.4 Configuration des acides aminés:

Le carbone α des acides aminés est un carbone asymétrique (sauf pour la glycine), il est lié à quatre atomes ou groupements d'atomes différents : $-H$, $-NH_2$, $-COOH$ et la chaîne latérale R . Il est au centre d'un tétraèdre dont les sommets sont occupés par les différents substituants. Cela signifie qu'il est possible d'avoir deux configurations différentes d'un même acide aminé, On désigne L et D (**figure 2**).

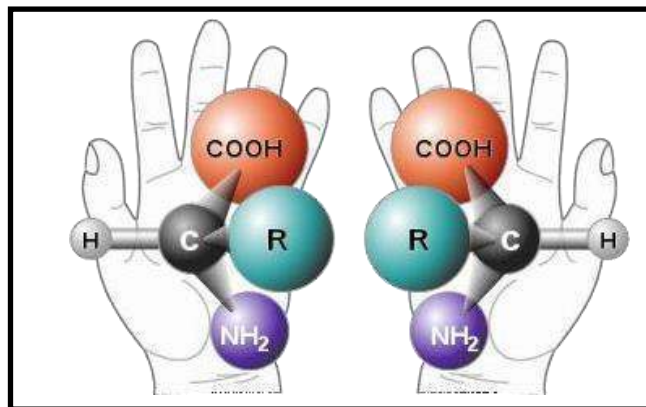


Figure 2 : Configuration L et D.

On dit que le carbone α est un centre chiral et les deux stéréo-isomères sont des énantiomères. Les lettres (D) et (L) font référence au D : dextrogyre , L : lévogyre. Si elle sont à droite, la molécule est (D) et si elle est à gauche , la molécule est (L). Ces deux isomères optiques sont représentés selon la projection de Fisher (**figure 3**). Les protéines naturelles sont constituées uniquement d'acides aminés de type L Pour les acides aminés naturels de type D, on les trouve dans les parois des bactéries et dans certains peptides antibiotiques.

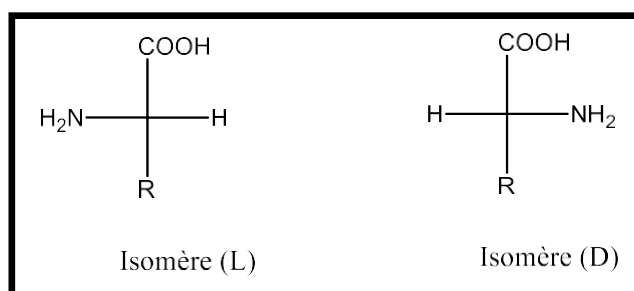


Figure 3 : Projection de Fischer des configurations D et L.

1.5 Les groupements protecteurs des acides aminés et leurs clivages:

Une condition obligatoire dans la synthèse chimique des peptides est la sélection et l'utilisation d'un groupe protecteur temporaire pour la synthèse d'un acide aminé. En 1932 que le premier groupe protecteur facilement clivable, le groupe carbobenzoxy (Z) de Bergman et Zervas, a été mis au point pour permettre la synthèse de peptides. Cependant, la nécessité d'une hydrogénolyse prolongée du groupe Z pour son élimination a considérablement limité son utilisation à plus grande échelle. Comme en parlant de groupe tert-butyloxycarbonyle (Boc) par Carpino à la fin des années 1950, qui a permis de faciliter et de faire progresser de manière significative la synthèse chimique des peptides⁸. Cependant, en 1970, il ya presque 50 ans, Carpino a décrit la préparation et les propriétés chimiques d'un nouveau groupe protecteur d'aminouréthane, le groupe 9- fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc) qui possède une labilité vis-à-vis des bases⁹.

1.5.1 Le groupement benzyloxycarbonyle (Z):

Proposé par Zervas et Bergman en 1932, le groupe Z a été très largement utilisé en synthèse Peptidique¹⁰, IL est obtenu en faisant réagir le chlorure de benzyloxycarbonyle sur l'acide aminé :

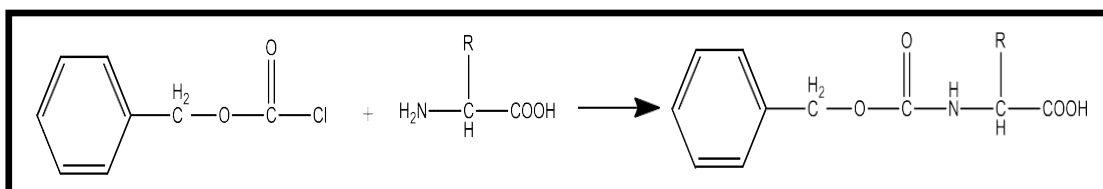


Figure 4 : Mécanisme de la protection par benzyloxycarbonyle.

L'intérêt du groupe Z est sa grande stabilité face à l'hydrolyse en milieu alcalin, par conséquent, il est déplacé sélectivement par :

- hydrogénolyse catalytique sur palladium :

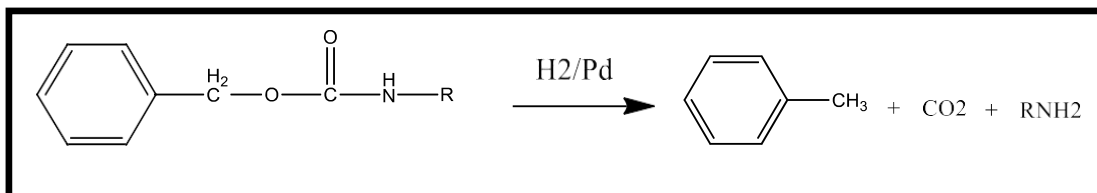


Figure 5 : Mécanisme de l'hydrogénolysation sur le palladium.

Les Z-aminoacides sont stables en milieu basique, nucléophile et faiblement acide. Ils sont clivés par hydrogénation catalytique (voie a), par le sodium dans l'ammoniac liquide (voie b) ou par l'acide bromhydrique 6N dans l'acide acétique (voie c) (**Figure 6**)

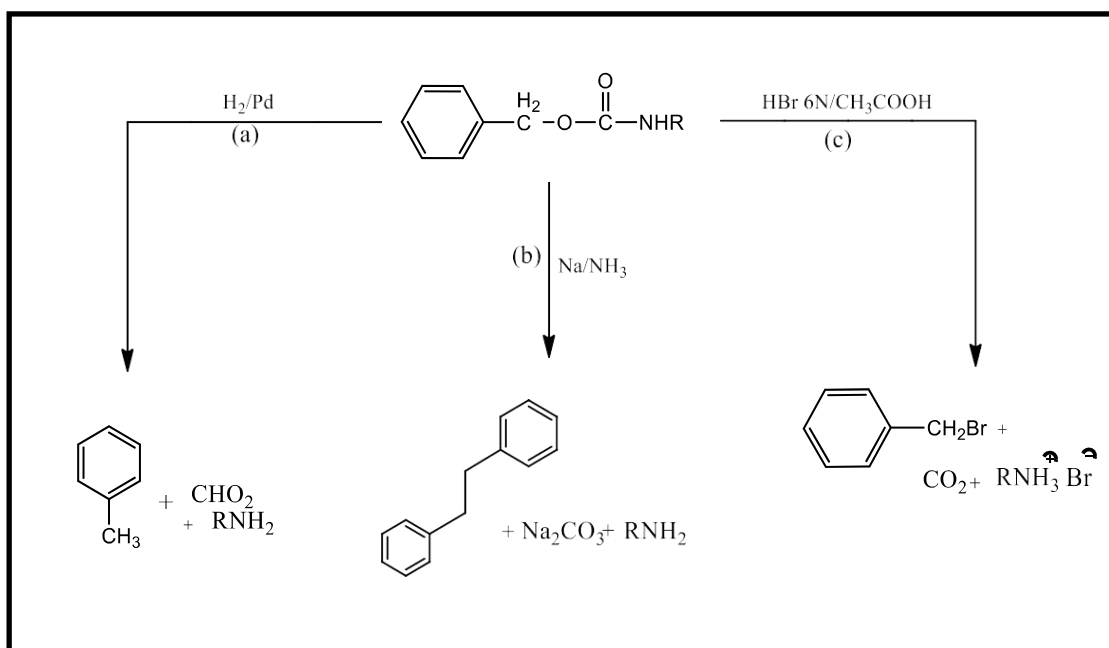


Figure 6 : les conditions de clivage du groupe benzyloxycarbonyle.

1.5.2 Le groupement tertibutyloxycarbonyle (Boc):

L'utilisation du motif tertibutyloxycarbonyle pour protéger les amines a été suggérée par Carpino en 1956 ¹¹, en 1957 Il a été introduit en synthèse peptidique par MAC KAY ALBERTSON ANDERSON et MAC GREGOR, ce groupement conduit à des carbamates de tert-butyle labiles en milieu acide.

L'introduction du motif Boc peut être réalisée à partir du carbonate mixte de tertibutanol et de para-nitrophénol (a), de l'azidocarbonate de tertibutyle (b) ou du di-tertibutyldicarbonate (c)^{12,13}.

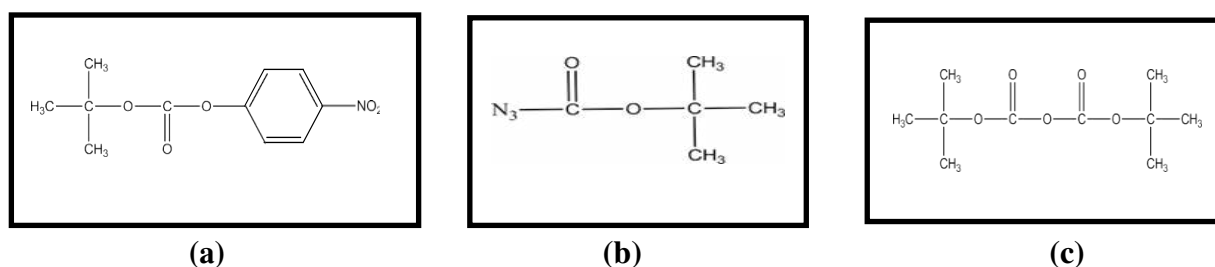


Figure 7 : Les composés nécessaires pour l'introduction de Boc.

Ce groupement est stable en milieu basique, réducteur et nucléophile. La formation d'amines et d'acides aminés protégés par Boc est réalisée dans des conditions aqueuses ou anhydres, par réaction avec une base et l'anhydride Boc. Des esters actifs et d'autres dérivés tels que Boc-ONH₂ et Boc-N₃ peuvent également être utilisés.

Plusieurs méthodes de déprotection ont été développées mettre en évidence une voie simple et sélective consiste son traitement par le carbonate de sodium Na₂CO₃ à reflux dans un mélange DMF/H₂O.

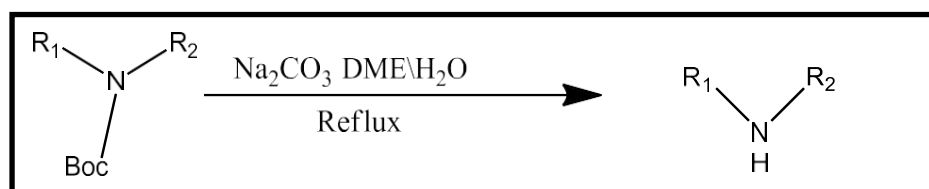


Figure 8 : Déprotection du Boc dans DMF/H₂O.

La déprotection chimio sélective de N-Boc est communément réalisé par un traitement acide et est accomplie rapidement en utilisant 5 équivalents de THF à 60°C pendant 30 min (figure 9).

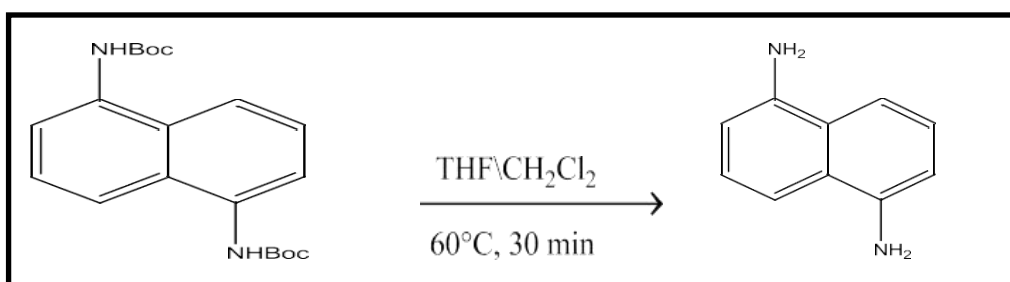


Figure 9 : Déprotection de Boc en milieu acide.

1.5.3 Le groupement 9-fluorénylméthoxycarbonyl (Fmoc):

Le groupement Fmoc décrit par Carpino en 1970 est introduit à partir du chloroformate ou de l'azidocarbonate correspondant :

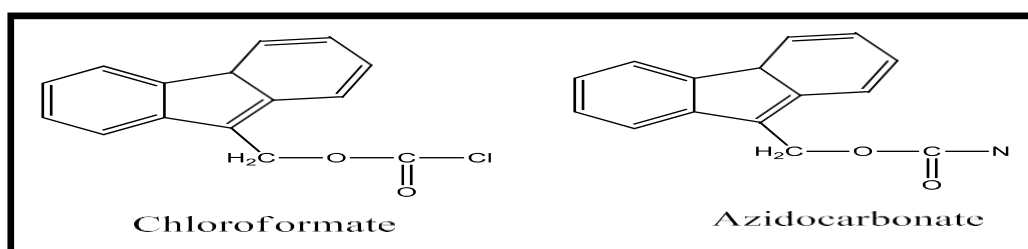


Figure 10 : Les réactifs nécessaires pour l'introduction du Fmoc.

Les caractéristiques chimiques attrayantes du groupe Na-Fmoc sont nombreuses, ^{14,15} notamment son introduction facile dans les acides aminés, sa stabilité en milieu acide, et son clivage en milieu basique (**figure 11**).

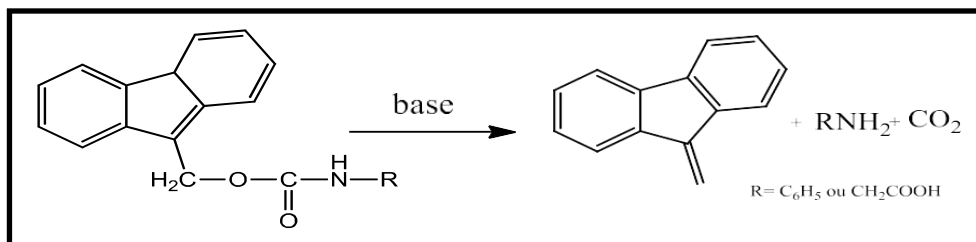


Figure 11 : Mécanisme clivage du Fmoc en milieu basique.

Cependant il présente des inconvénients comme son hydrophobie importante qui rend ses dérivés d'acides aminés moins solubles que les dérivés Boc correspondants. Son encombrement stérique contribue à l'apparition d'agréats peptidique pendant la SPPS de ce que l'on appelle les "peptides difficiles" ¹⁶.

La réaction de déprotection est beaucoup plus rapide dans les solvants polaires comme le DMF et la N-méthylpyrrolidone (NMP) que dans les solvants apolaires comme le dichlorométhane¹⁷. Le tableau 1 présente des exemples de clivage de Fmoc-aminoacides par diverses bases :

Tableau 1 : Les solvants utilisés pour la protection du Fmoc.

Base	Solvant	Temps (min)	Déprotection %
50% de morpholine	DMF	1min	50%
20% de piperidine	DMF	0,1 min	100%
5 % de Piperazine	DMF	0,33 min	50%
50% de Dicyclohexylamine	DMF	35 min	50%
10% 4-Diméthylaminopyridine	DMF	85 min	50%

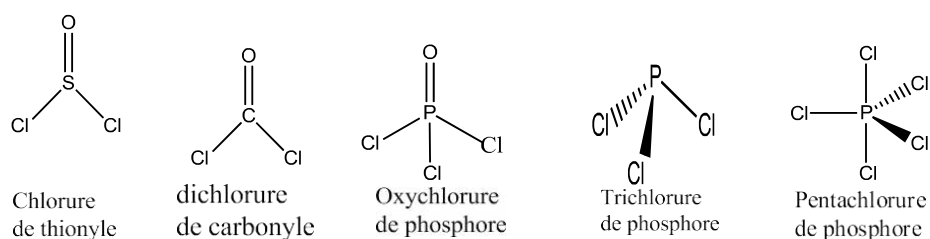
1.6 Couplage peptidique :

Le couplage peptidique consiste à assembler des acides aminés entre eux en formant une fonction amide. Afin de procéder au couplage, la fonction acide carboxylique de l'acide aminé *N*-protégé et activée sous différentes formes en utilisant un agent de couplage.

Différentes procédures de couplage peptidique sont employées, les plus utilisées sont décrites dans ce qui suit :

1.6.1 Chlorures d'acyle:

Une méthode simple et évidente d'activer un acide carboxylique est de le transformer en chlorure d'acide. Elle a été utilisée pour la première fois dans la synthèse des peptides en 1903 par le groupe du Pr. Fisher.¹⁸ Les chlorures d'acide, généralement obtenus par action du SOCl_2 ¹⁹, COCl_2 ²⁰, PCl_5 , POCl_3 ou le PCl_3 ²¹, sont de bons réactifs de couplage.



Fisher en 1903 utilise un chlorure d'acyle d'acide aminé protégé par un groupement *N*-éthoxycarbonyl²². Les chlorures d'acyle sont facilement obtenus en faisant réagir l'acide aminé avec un agent de chloration comme par exemple le chlorure de thionyle (SOCl_2).

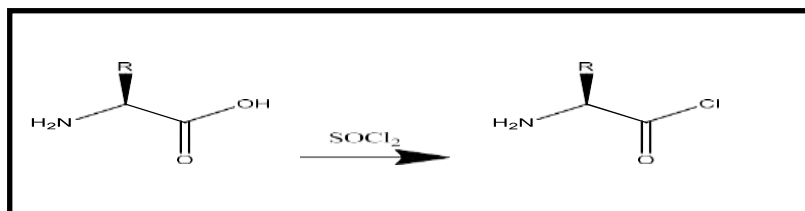


Figure 12 : Préparation d'un chlorure d'acyle.

La présence de base est nécessaire à la réaction afin de neutraliser l'acide chlorhydrique libéré. Pour diminuer le contact entre la base et le chlorure d'acyle, la réaction peut se faire dans des conditions de Schotten-Baumann, c'est-à-dire un système biphasique DCM/solution aqueuse de carbonate potassium.

L'utilisation de chlorures d'acyle est particulièrement efficace pour réaliser des couplages d'acides aminés encombrés et/ou faiblement nucléophiles.

L'un des inconvénients majeurs de cette méthode réside dans la production de HCl qui favorise la déprotection de certains groupements protecteurs comme dans le cas des composés protégés par le Boc.

1.6.2 Autres halogénures d'acyle:

Pour réaliser des couplages difficiles dans des conditions standards on utilise le fluorure d'acyle. Les fluorures d'acyle sont généralement préparés en faisant réagir la trifluorotriazine, toxique, avec l'acide aminé.

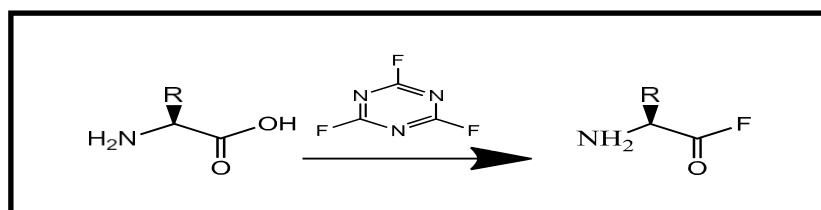


Figure 13 : Préparation d'un fluorure d'acyle.

Pour réaliser des couplages très délicats on peut utiliser parfois les bromures d'acyle. Cette méthode est limitée à cause de leur très grande réactivité. Pour former le bromure d'acyle la 1-bromo-*N*, *N*-2-triméthyl-1-propénylamine est souvent utilisée car elle permet de réaliser la réaction dans des conditions douces (sans chauffer), elle n'est pas commerciale et sa préparation est délicate (**figure 14**)²³.

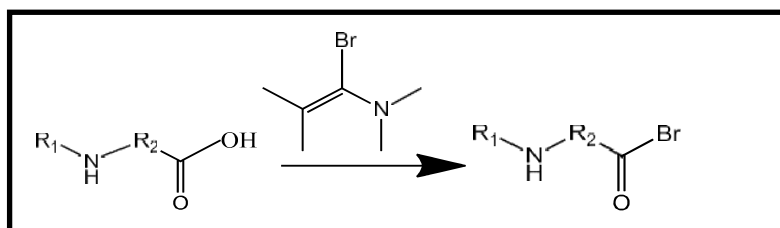


Figure 14 : Préparation d'un bromure d'acyle.

1.6.3 Les Acylazides:

Réaction de Curtius :

La première réaction de couplage qui respecte la chiralité des acides aminés a été mis par Curtius (**figure 15**)²⁴. Cette méthode n'est pas très importante car la réaction est lente et génère de nombreux produits secondaires.

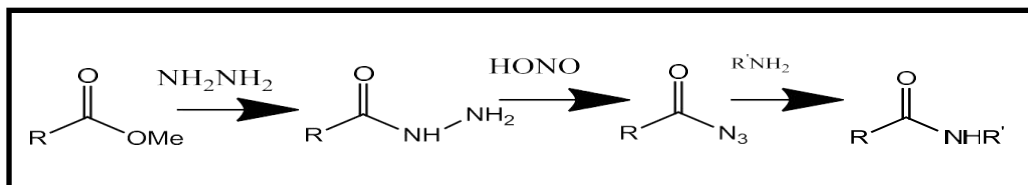


Figure 15 : Préparation des Acylazides.

1.6.4 Les anhydrides

C'est la méthode la plus efficace et la plus propre pour réaliser des couplages peptidiques, qui utilise les anhydrides comme intermédiaires réactionnels. Il existe deux types d'agents employés: les anhydrides mixtes et les anhydrides symétriques.

1.6.4.1 Les anhydrides mixtes:

Les chloroformiates :

L'anhydride mixte est généralement formé par réaction d'un chloroformiate d'isobutyle (ICF) avec l'anion de l'acide aminé *N*-protégé généré par déprotonation de l'acide par une amine tertiaire telle que la *N*-méthylmorpholine (NMM).

C'est une méthode de couplage propre et efficace. La réaction de formation de l'anhydride est de durée de quelques minutes puis l'acide aminé à coupler est ajouté. Elle nécessite une basse température ($-20^{\circ}C$) pour la stabilité des anhydrides. Pour des températures élevées on observe la formation irréversible d'esters.

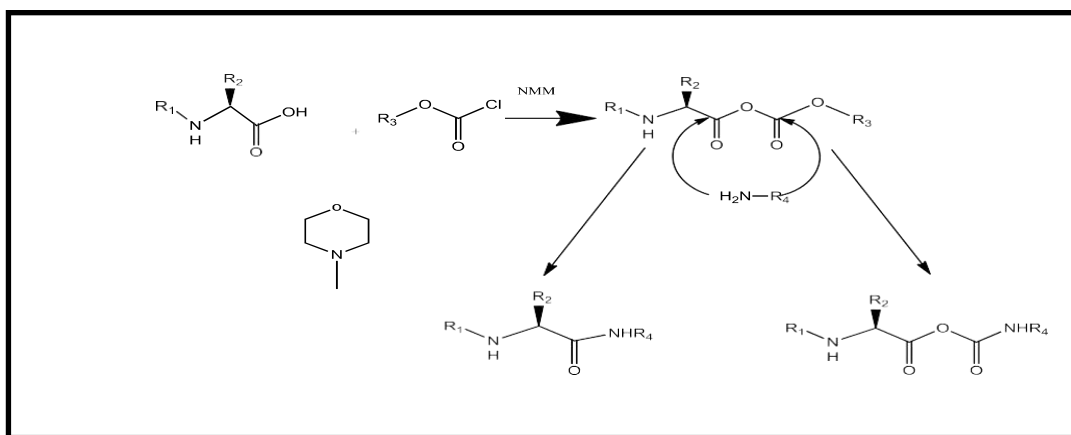


Figure 16 : Réaction de couplage avec un anhydride mixte

Les carbodiimides:

Parmi les agents de couplage le plus importants en synthèse peptidique : les carbodiimides. Le plus connue est le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (**figure 17**)²⁵, La DCC et parfois remplacée par le 1-éthyl-3-(3' diméthylaminopropyl) carbodiimides (EDC)²⁶.

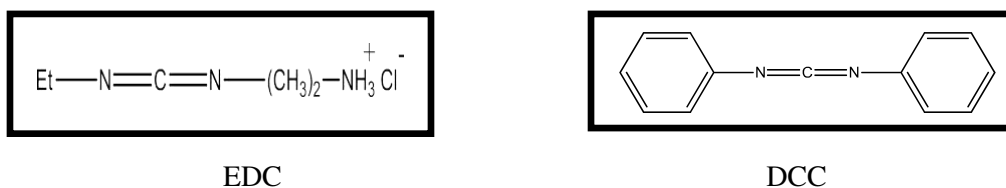


Figure 17 : Structure de DCC et EDC

1.6.4.2 Les anhydrides symétriques:

Les anhydrides symétriques sont généralement préparés en faisant réagir l'acide aminé à coupler avec 0.5 équivalent de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) dans le DCM. La *N,N*-dicyclohexylurée (DCU) formée durant la réaction est filtrée et le solvant est parfois remplacé par du DMF puis l'anhydride est ajouté au second acide aminé (**figure 18**).

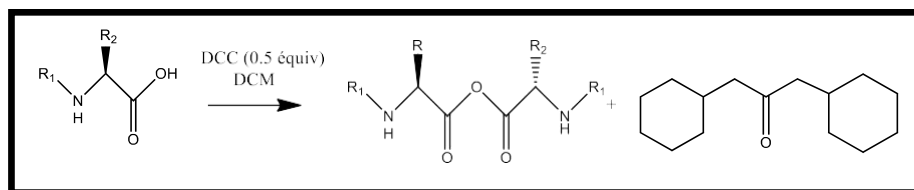


Figure 18 : Formation d'anhydride symétrique

1.6.5 Les esters activés :

Les esters activés d'acides aminés sont des espèces qui sont assez stables pour être stockées mais assez réactives pour réagir avec un groupement amine. Ils sont souvent utilisés en synthèse peptidique et peuvent être préparés, purifiés et stockés. Certains acides aminés sous forme de pentafluorophényle (Pfp) sont commerciaux.

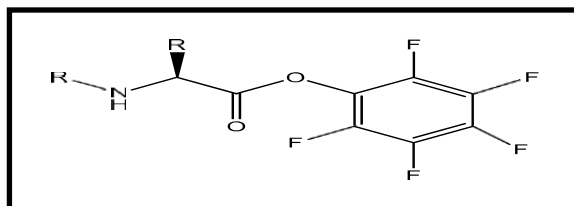


Figure19 : Pentafluorophényle (Pfp)

Les esters activés d'acides aminés sont généralement préparés en utilisant des méthodes standards de formation d'ester comme l'utilisation de DCC avec un phénol substitué (ex : pentafluorophényle) ou une hydroxylamine substituée (ex : HOBt)

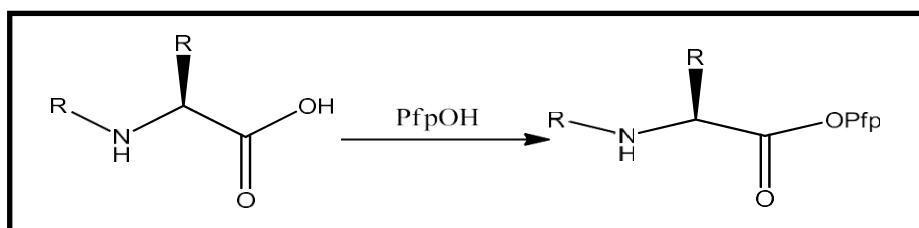


Figure 20 : Synthèse d'ester activé en présence de PfpO

1.6.6 Isocyanates :

Les isocyanates sont populaires pour la formation de liaisons amides. Ils ont été utilisés avec différents partenaires de couplage tels qu'un acide carboxylique, un aromatique riche, un alcène ou un réactif de Grignard. La condensation d'un isocyanate avec un acide carboxylique est un procédé connu depuis longtemps. Cette réaction passe par la formation d'un intermédiaire de type anhydride carboxylique carbamique très instable, et conduit au produit désiré par élimination de CO₂. Tout comme pour la condensation directe d'un acide et d'une amine, des températures très élevées sont nécessaires.

1.7 Les peptides

1.7.1 La liaison amide :

liaison entre deux acides aminés, appelée liaison peptidique²⁷, est formée par une réaction de condensation entre le groupe α -carboxyle d'un acide aminé et le groupe α -amine d'un autre acide aminé donnant lieu à une liaison amide (**figure 21**).

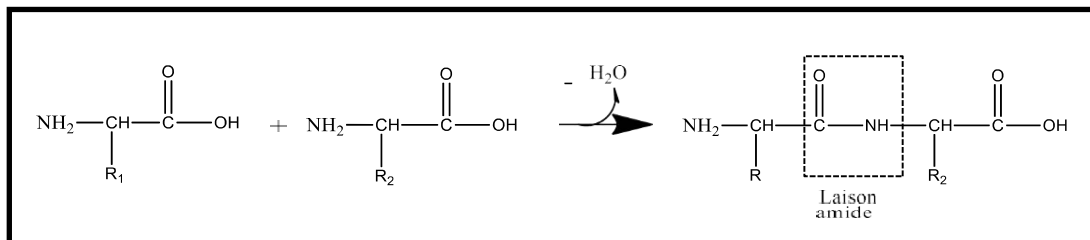


Figure 21 : Formation d'une liaison peptidique.

Lorsqu'on représente une chaîne polypeptidique, l'extrémité amine est placée à gauche et l'extrémité acide carboxylique est placée à droite.

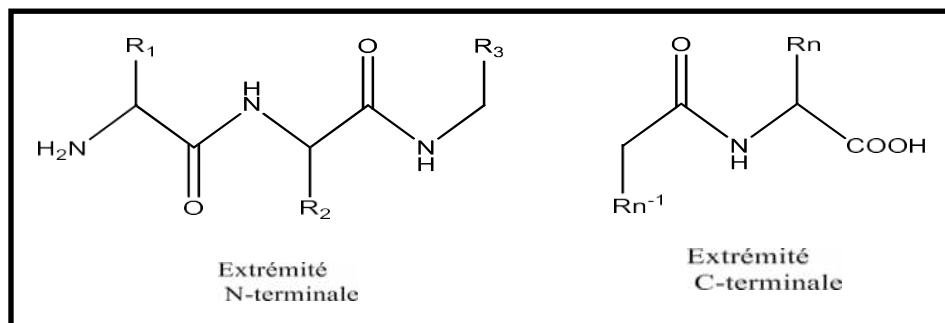


Figure 22: Les extrémités d'une chaîne polypeptidique.

On appelle la chaîne qui comprend les liaisons peptidiques chaîne principale, et les substituants R chaînes latérales.

1.7.2 Propriétés géométriques de la liaison peptidique :

La longueur d'une liaison peptidique est de $1,33 \text{ \AA}$. Elle est donc plus courte qu'une liaison simple ($\text{C-N} : 1,47 \text{ \AA}$) mais plus longue qu'une liaison double ($\text{C=N} : 1,28 \text{ \AA}$).

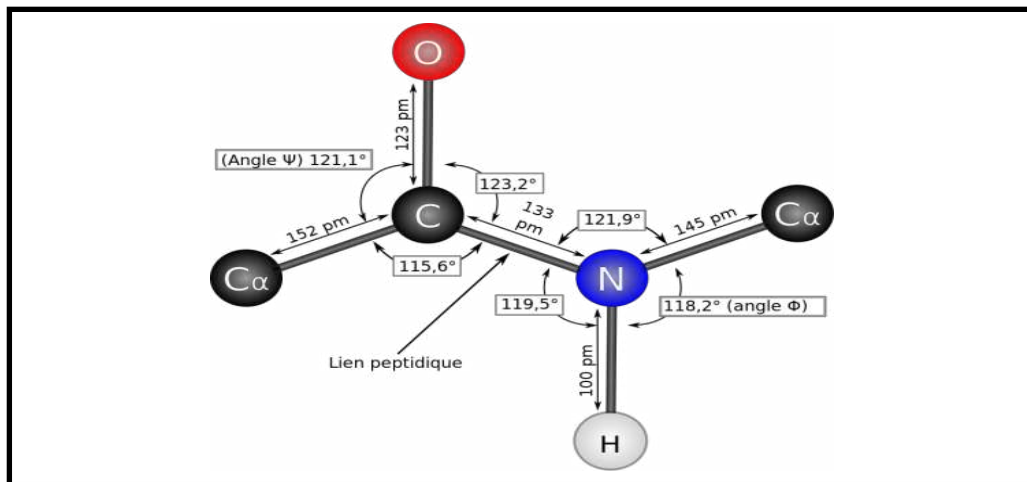


Figure 23 : Schéma de liaison peptidique.

De plus l'absence de libre rotation imposée par cette conjugaison impose deux configurations possibles à la liaison peptidique qui est **cis** ou **trans**.

En général, les liaisons peptidiques sont de la conformation **trans** ou les carbones Cα sont de part et d'autre de la liaison dans le plan peptidique. La conformation **cis** est en effet très défavorisée par l'encombrement stérique des chaînes latérales. Seules les liaisons suivies par un résidu proline présentent $\approx 10\%$ de conformation **cis**.

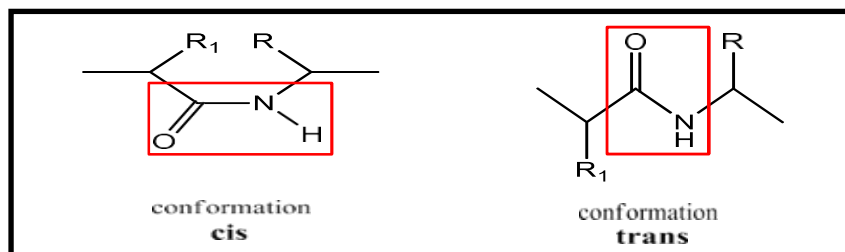


Figure 24 : Configuration cis et trans de la liaison amide.

La structure d'une chaîne peptidique est définie par des angles :

L'angle dièdre oméga (ω) c'est angle de rotation autour d'une liaison C- N, Les deux angles psi (ψ) et phi (ϕ) correspondent respectivement aux angles de rotation entre C_i- C et entre C_i- N

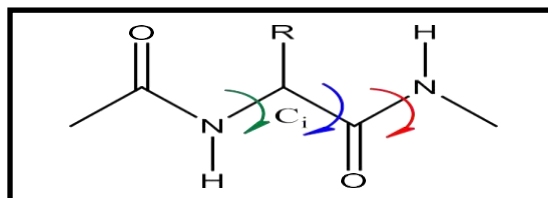


Figure 25: Les trois angles dièdres (ω , ψ , ϕ) d'une liaison peptidique.

1.8 Structure des peptides

1.8.1 Structure primaire :

C'est l'ordre d'enchaînement des différents acides aminés composant la chaîne peptidique qui détermine la structure primaire ou séquence.

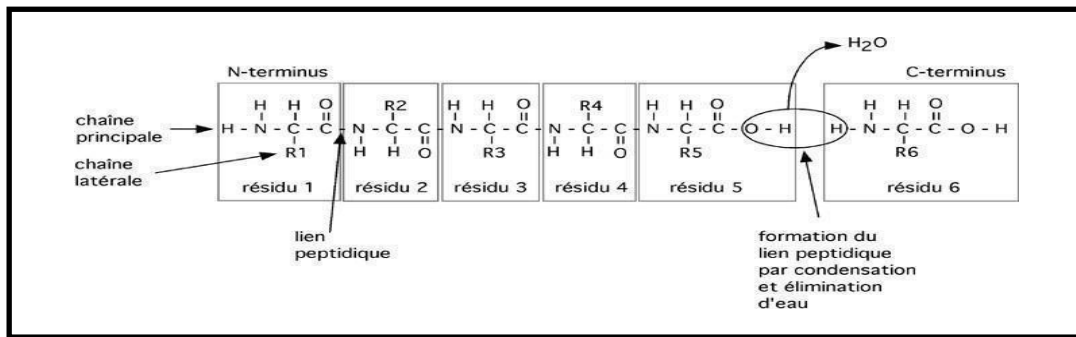


Figure 26 : Structure primaire d'un peptide.

1.8.2 Structure secondaire :

La chaîne d'acides aminés, adopte une structure tridimensionnelle en se pliant et en s'enroulant sur elle-même. Cette structure secondaire est due à la rigidité de la liaison amide mais aussi à la présence de nombreuses interactions : liaisons hydrogène (~20 kJ/mol), liaison de Van der Waals (~4kJ/mol), liaison covalente δ - δ (~150kJ/mol). Il existe deux arrangements importants : l'hélice α et la structure en feuillet plissée (configuration β).

1.8.2.1 L'hélice α :

C'est une structure régulière et relativement compacte (**figure 27**) dont les caractéristiques sont :

- conformation en hélice est maintenue par liaisons hydrogène intramoléculaires entre tous les motifs CO et NH des acides aminés impliqués.
- Les radicaux (R) des résidus sont à l'extérieur de l'hélice, ce qui minimise les encombrements stériques.
- L'hélice ne peut s'établir qu'avec des résidus de la même série (L ou D).
- Les plans des liaisons peptidiques sont parallèles à l'axe de l'hélice et forment les squelettes de l'hélice.

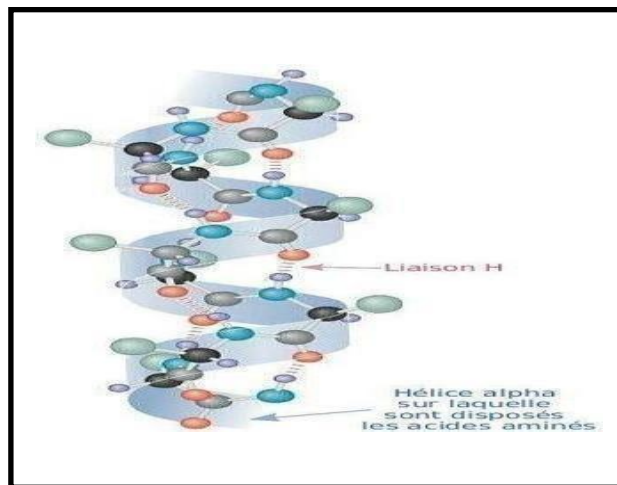


Figure 27 : Structure Hélice α droite.

1.8.2.2 Feuillet β :

Au contraire de l'hélice, le feuillet β , dont le nom provient de l'aspect ondulé de la chaîne polypeptidique étirée comporte des liaisons hydrogènes entre des groupements du squelette provenant de résidus distant les uns des autres dans la séquence linéaire. Dans les feuillets β , deux chaînes sont placées côte à côte et les liaisons hydrogènes se créent entre ces chaînes. Si les deux chaînes peptidiques impliquées dans la formation du feuillet β se déploient dans le même sens du côté N-terminal vers le côté C-terminal le feuillet β est parallèle, a contrario si les deux chaînes peptidiques sont en sens inverse, c'est le feuillet β antiparallèle. Il existe aussi les feuillets β mixtes comportant à la fois des chaînes parallèles et antiparallèles.

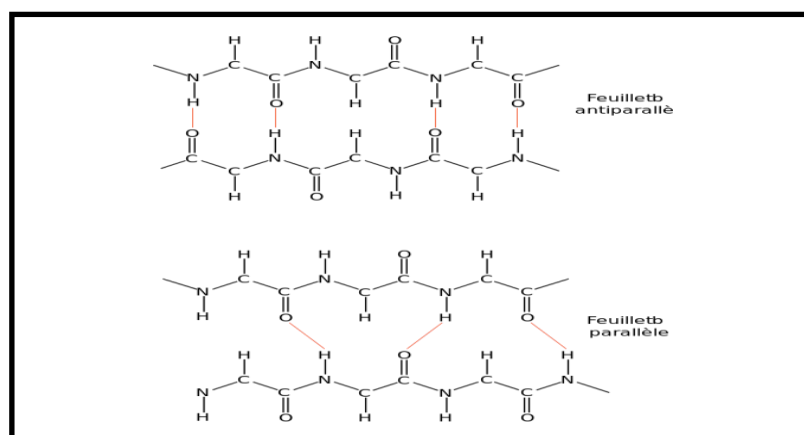


Figure 28 : Structure en feuillet β .

Les feuillets β représentent une structure majeure dans les protéines globulaires, représentent à peu près un quart des structures régulières rencontrées.²⁸

En plus de ces deux arrangements principaux, il en existe d'autres ; les plus importants sont :

1.8.2.3 Les coudes :

Les chaînes polypeptidiques peuvent former des coudes et ainsi changer de direction (**Figure 29**). Ces coudes ne sont pas des structures périodiques. Il s'agit plutôt d'un repliement particulier du squelette carboné localisé à 3 ou 4 résidus consécutifs. Les coudes ont le rôle de connecteur entre des structures régulières comme les hélices ou les feuilletts β . Ils sont souvent présents à la surface des protéines, contiennent des résidus chargés et jouent un rôle important dans les interactions ligand-récepteur^{29,30}.

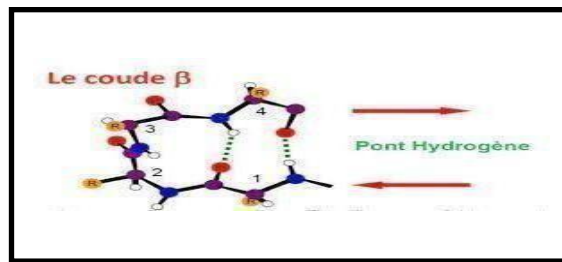


Figure 29 : Coude β .

1.8.3 Structure tertiaire

La structure tertiaire se définit comme étant la structure tridimensionnelle d'une protéine. Elle décrit l'interaction spatiale des structures secondaires entre elles. Un certain nombre d'interactions stabilisent les structures tertiaires : les liaisons disulfures, les liaisons hydrogènes, les ponts salins se forment entre deux acides aminés ionisés, les interactions hydrophobes sont formées entre groupements non polaires.

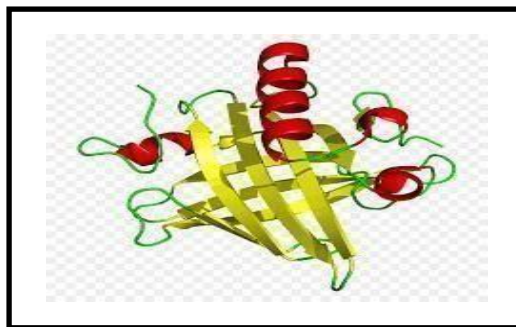


Figure 30 : Structure tertiaire d'une protéine ³¹.

La structure tertiaire d'une protéine est importante car elle permet à celle-ci d'aménager une poche, ou site actif, qui permet, dans le cas des enzymes, la complexation du substrat et l'activation de la réaction. On classe les polypeptides et protéines selon la structure tridimensionnelle en deux classes :

- **Protéines fibreuses :**

Une protéine fibreuse est une protéine insoluble de structure fibreuse. Un autre nom pour les protéines fibreuses est scléroprotéines. Certains exemples de protéines fibreuses sont le collagène, l'élastine, l'actine, la myosine, la kératine, etc. La fonction principale des protéines fibreuses est de former des structures du corps telles que le tissu conjonctif, le cartilage, les ligaments, les vaisseaux sanguins, les poumons, l'utérus, les cheveux, et les ongles. Par conséquent, ces protéines fournissent un soutien structurel et mécanique au corps.

- **Protéines globulaires :**

Une protéine globulaire est une protéine soluble à structure sphérique. Les protéines globulaires jouent un rôle vital dans l'organisme car elles interviennent dans diverses fonctions métaboliques. Certaines protéines globulaires, telles que les enzymes, catalysent des réactions biochimiques...ect.

1.8.4 Structure quaternaire :

Cette structure est le niveau le plus élevé d'organisation des protéines. Elle concerne les protéines constituées de plusieurs chaînes polypeptidiques. L'assemblage de ces sous-unités entre elles par des liaisons faibles constitue la structure quaternaire de la protéine. L'hémoglobine est un exemple de structure quaternaire ; formé par l'association de quatre chaînes polypeptidiques identiques deux à deux : deux chaînes alpha (globines alpha) composées de 141 acides aminés et deux chaînes bêta (globines bêta) de 146 acides aminés.

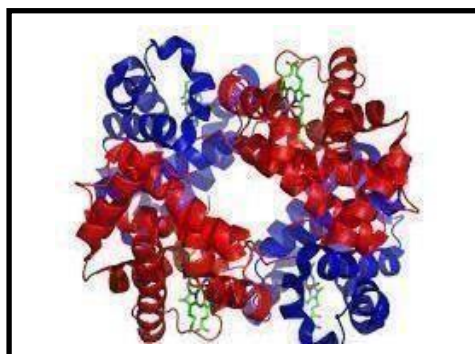


Figure 31 : Structure quaternaire d'une protéine

1.8.5 Synthèse chimique des peptides :

1.8.5.1 Synthèse en phase solide :

Le développement de cette technologie remonte au début des années 60 C'est R. B. Merrifield qui en est le concepteur, Dans l'approche proposée par Merrifield, le premier acide aminé est lié à un support insoluble par une forte liaison (c.-à-d., résistant à tous types de composés chimiques) ; ceci assure que le peptide reste greffé sur le support solide pendant les différentes étapes d'assemblage. A chaque cycle de greffage, l'acide aminé en bout de chaîne est sélectivement déprotégé à chaque fois qu'un résidu supplémentaire est introduit. Chaque réaction est suivie d'une étape de filtration qui permet d'éliminer l'excès de réactifs et les produits secondaires dissous dans le solvant. Une dernière étape de « déprotection » détache le peptide du support.

- **Stratégie de F-moc :**

La stratégie F-moc c'est une synthèse qui se fait de façon itérative avec un groupement fluorénylméthoxycarbonyl (N-Fmoc) protégeant les fonctions amines et évitant les double-Couplages, utilise des déprotections en milieu basique, les chaînes latérales devront être protégées par des groupements non-labiles en présence de base, afin d'assurer l'orthogonalité nécessaire à une déprotection sélective, utilise également des réactifs plus doux.

- **Stratégie Boc :**

Est une stratégie plus ancienne utilise un groupement tertibutyloxycarbonyle pour protéger la fonction amine de l'AA à coupler. Boc est labile en milieu acide et la déprotection crée un carbocation très réactif susceptible de donner des réactions secondaires.

1.8.5.2 La synthèse peptidique en solution :

Un peptide est un polymère d'acides aminés reliés entre eux par une liaison amide Par convention, on écrit les peptides en plaçant à gauche l'extrémité N-terminale et à droite leur extrémité C-terminale. Chaque liaison peptidique est obtenue en quatre étapes :

- déprotection du peptide
- libérant la fonction amine
- activation de l'acide aminé C en intermédiaires réactifs

- couplage entre eux

L'allongement de la chaîne peptidique du côté N-terminal est ainsi réalisé acide aminé par acide aminé (synthèse pas à pas), ce qui permet de limiter la racémisation pendant l'étape d'activation– couplage.

1.8.6 Applications des peptides dans les différents domaines :

1.8.6.1 Domaine cosmétique :

En application cutanée, les peptides exogènes exercent des changements dans les voies complexes régulant l'expression des protéines de la peau afin de prévenir les signes de l'âge. Ils sont le plus souvent utilisés pour déclencher une cascade de signalisation et stimuler la production de collagène et d'élastine. Ces protéines fibreuses présentes dans le derme assurent souplesse et fermeté à la peau mais leur teneur dans la peau tend à diminuer au fil des années. Par ailleurs, certains peptides peuvent aussi booster la production d'acide hyaluronique dans la peau pour une peau hydratée, rebondie et plus lisse.

1.8.6.2 Domaine pharmaceutique :

Les peptides sont utilisés depuis de nombreuses années dans le domaine de la biotechnologie, par exemple pour la production d'anticorps à l'usage des laboratoires de biologie. Ces molécules seront intensivement utilisées dans un futur proche pour d'autres applications et plus particulièrement dans le domaine de l'industrie pharmaceutique. Comme la conception de peptides régulateurs d'activité protéique. L'utilisation de peptides antimicrobiens est promise à un grand avenir, notamment afin de contrer la perte d'efficacité des antibiotiques classiques. Les peptides vecteurs constituent une autre possibilité d'utilisation thérapeutique. Ils sont capables de faire pénétrer des composés thérapeutiques aussi variés que des drogues, des siRNA ou d'autres peptides dans des cellules cibles.

1.8.6.3 Domaine biologique :

Le recevoir des peptides améliore la qualité de vie, prolonge la longévité, active et restaure les organes au niveau cellulaire, et améliore leurs fonctions. Ils régulent l'expression des gènes (gènes tumoraux, gènes de télomères, gènes d'interlocine, gènes de facteurs de transcription) ainsi que la synthèse des protéines. Cependant, il augmente l'âge moyen, réduit l'incidence des tumeurs chez les animaux et réduit la mortalité humaine en maintenant les systèmes endocrinien, neurologique et immunitaire.

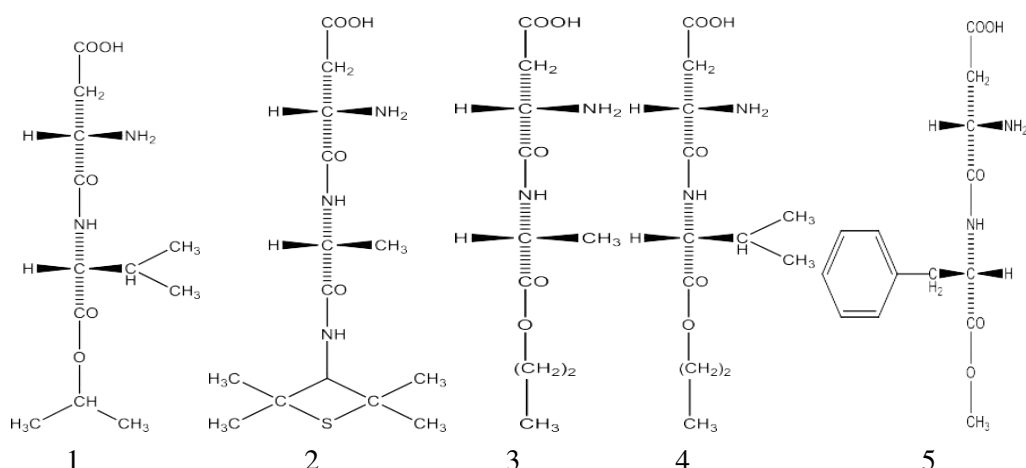
1.8.6.4 Domaine d'alimentation :

Leurs utilisations en alimentation sont très récentes. Il existe de nombreux peptides biologiquement actifs qui sont directement issus de protéines alimentaires. De nombreux dipeptides ont des goûts sucrés avec souvent un arrière-goût amer généralement masqué dans

les produits mis à disposition des consommateurs par l'addition de glycine. D'autres ont des goûts salés, acides, umami, ou amers.

Peptides sucrés :

Les cinq dérivés de dipeptides dont la structure est indiquée ci-dessous ont des pouvoirs sucrants respectivement égaux à 200, 2000, 125, 100 et 170 fois celui du saccharose (1/L-Asp-D-Val-O-isopropyl , 2/alitâme , 3/ L-Asp-D-Ala-O-npropyl , 4/ L-Asp-D-Val-O-npropyl , 5/ aspartame)



• Peptides salés :

Il existe des peptides salés dont le défaut majeur est d'être amers . Parmi ceux-ci l'ornithyl - taurine (**figure 32**), qui donne un goût salé en absence d'ions sodium, ce qui permettrait de par son utilisation de saler les aliments dans les régimes "sans sel".

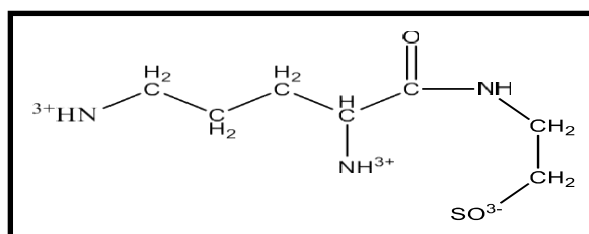


Figure 32 : structure de l'ornithyl-taurine.

• Peptides "alimentaires" à activité biologique :

Les protéines alimentaires peuvent, en cours de digestion, conduire à la libération de peptides actifs. C'est par la corrélation établie entre le régime alimentaire et certaines maladies psychiques comme la psychose schizophrénique, que cette recherche de peptides actifs a été initiée. De très nombreuses relations structure-fonction ont été établies

CHAPITRE 2 : PARTIE EXPERIMENTALE

Les solvants (tetrahydrofurane, acétate d'éthyle, hexane,.....) sont de source Fluka , Riedel-deHaën et Panréac, Sigma-Aldrich , Honeywell, Avocado .

Les produits de départ et les réactifs (Boc-Ala-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Leu-OH, DCCI, Isopropylamine) sont de source sigma-Aldrich et ont été utilisés sans purification .

L'avancement de la réaction a été suivi par chromatographie sur couche mince (CCM) avec des plaques en plastique revêtues de gel de silice en tant que phase stationnaire , 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 la mesure le point de fusion.

L'élimination des solvants a été faite par un évaporateur rotatif de marque Heidolph sous pression réduite.

2.1 Choix de groupement protecteur:

Le tertibutyloxycarbonyle (Boc) est un groupement protecteur de la fonction amine des acides aminés dans la synthèse peptidique. Il est de type uréthane et stable en milieu basique, Son élimination facile et sa solubilité dans la majorité des solvants organiques font de lui un groupement de choix.

2.2 Agent de couplage:

Le N,N'-dicyclohexylcarbodiimide ou DCCI est un composé organique de la famille des carbodiimides . Principalement utilisé comme réactif pour le couplage des acides aminés en synthèse peptidique.

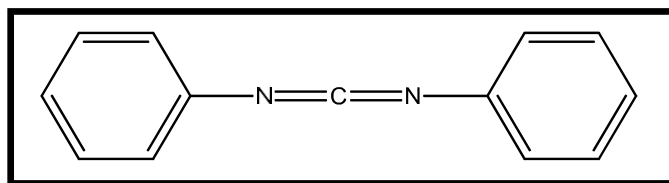


Figure 33 : Structure de DCCI.

2.3 Réaction de synthèse des acides aminés N,C- protégés :



Figure 34 : montage de synthèse.

2.3.1 Synthèse de Boc-Ala-NHiPr :

Dans un ballon de 100ml, on introduit dérivé aminé N-protégé Boc-Ala-OH qu'on fait dissoudre dans le THF.

On maintient le mélange sous agitation à 0°C jusqu'à dissolution totale .On ajoute alors le DCCI.

Après 15 min d'agitation à 0°C on ajoute l'isopropylamine .On laisse le mélange réactionnel sous agitation à 0°C pour 1h00 à 1h30 et entre 48 et 72 h à température ambiante.

On filtre le mélange réactionnel pour se débarrasser de la dicyclohexyle urée (DCU) formée.

On élimine le solvant du filtrat par un évaporateur rotatif sous pression réduite.

L'huile obtenue est cristallisée dans le système THF/Hexane.

Les cristaux blancs du Boc-Ala-NHiPr sont séchés, pesés puis analysés.

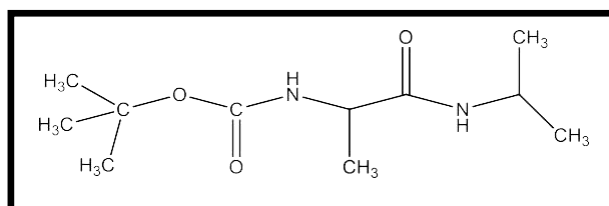


Figure 35 : Formule développée du Boc-Ala-NHiPr.

Caractérisation :

- Boc-Ala-oH : MM = 189.2g/mol.

$$T_f = 87.5^{\circ}\text{C}.$$

$$R_f = 0,75 \text{ (AcOET 50\% /CyHx50\%)}.$$

$$= 0,58 \text{ (AcOET 70\% /CyHx 30\%)}.$$

$$= 0,62 \text{ (AcOET 100\%)}.$$

- Boc-Ala-NHiPr: MM = 230 g/mol.

$$T_f = 165.7^{\circ}\text{C}$$

$$R_{dt} = 59\%$$

$$R_f = 0 \text{ (iPrOH 50\% / hexane 50\%)}.$$

$$= 0,78 \text{ (iPrOH70\% / hexane 30\%)}.$$

2.3.2 Synthèse de Boc-Gly-NHiPr :

Dans un ballon de 100ml, on introduit dérivé aminé N-protégé Boc-Gly-OH qu'on fait dissoudre dans le THF.

On maintient le mélange sous agitation à 0°C jusqu'à dissolution totale .On ajoute alors le DCCI.

Après 15 min d'agitation à 0°C on ajoute l'isopropylamine .On laisse le mélange réactionnel sous agitation à 0°C pour 1h00 à 1h30 et entre 48 et 72 h à température ambiante.

On filtre le mélange réactionnel pour se débarrasser de la DCU formée.

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 blancs du Boc-Gly-NHiPr sont séchés, pesés puis analysés.

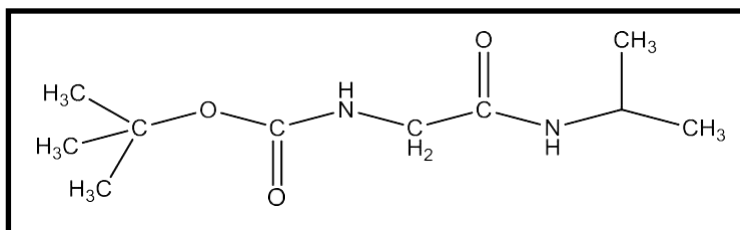


Figure 36 : Formule développée du BOC-Gly-NHiPr.

- BOC-Gly -OH : MM = 175.19 g/mol.

$$T_f = 92.3 \text{ }^{\circ}\text{C}.$$

$$R_f = (\text{AcOET } 50\% / \text{CyHx } 50\%).$$

$$= (\text{AcOET } 70\% / \text{CyHx } 30\%).$$

$$= (\text{AcOET } 100\%).$$

- BOC-Gly-NHiPr : MM = 216 g/mol.

$$T_f = 196 \text{ }^{\circ}\text{C}.$$

$$R_{dt} = 46\%.$$

$$R_f = 0,8 \text{ (iPrOH } 50\% / \text{ hexane } 50\%).$$

$$= 0,75 \text{ (iPrOH } 70\% / \text{ hexane } 30\%).$$

2.3.3 Synthèse de Boc-Leu-NHiPr :

Dans un ballon de 100ml, on introduit dérivé aminé N-protégé Boc-Leu-OH qu'on fait dissoudre dans le THF.

On maintient le mélange sous agitation à 0°C jusqu'à dissolution totale .On ajoute alors le DCCI.

Après 15 min d'agitation à 0°C on ajoute l'isopropylamine .On laisse le mélange réactionnel sous agitation à 0°C pour 1h00 à 1h30 et entre 48 et 72 h à température ambiante.

On filtre le mélange réactionnel pour se débarrasser de la DCU formée.

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 blancs du Boc-Gly-NHiPr sont séchés, pesés puis analysés.

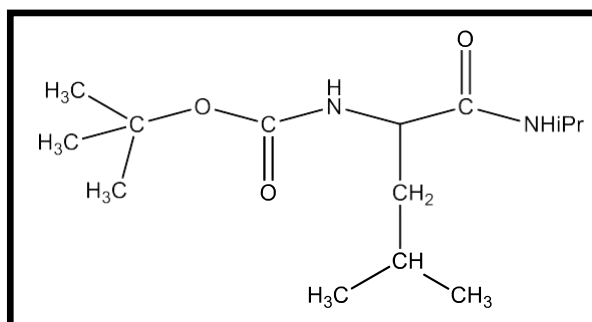


Figure 37 : Formule développée du BOC-Leu-NHiPr.

- BOC-Leu-OH : MM= 231.29 g/mol.

$$T_f = 94,9^{\circ}\text{C}.$$

$$R_f = 0,85(\text{AcOET } 50\% / \text{CyHx } 50\%).$$

$$= 0,67(\text{AcOET } 70\% / \text{CyHx } 30\%).$$

$$= 0,62 (\text{AcOET } 100\%).$$

- BOC-Leu-NHiPr: MM= 272 g/mol.

$$T_f = 131^{\circ}\text{C}.$$

$$R_{dt} = 73\%.$$

$$R_f = 0,94 (\text{iPrOH } 50\% / \text{hexane } 50\%).$$

$$= 0,75 (\text{iPrOH } 70\% / \text{hexane } 30\%).$$

2.4 Méthodes utilisées et techniques d'identification

2.4.1 Chromatographie sur couche mince :

Principe

C'est une technique d'identification qui permet d'identifier par séparation de taches des constituants d'un mélange pour divers objectifs, elle s'effectue généralement sur une fine couche de silice (phase stationnaire) déposée sur un support. Le mélange à étudier est ensuite déposé à l'aide d'un capillaire à environ 1 cm du bord puis placé dans une cuve contenant l'éluant. Le niveau de l'éluant doit être en dessous du produit déposé. La cuve de chromatographie est ensuite refermée par un couvercle. L'éluant migre sur la plaque de silice par capillarité et entraîne les composés du mélange étudié. Si les vitesses de migration des composés sont différentes, ils seront séparés. La plaque de chromatographie est ensuite lue directement si les composés sont visibles, ou placée sous une lumière UV.

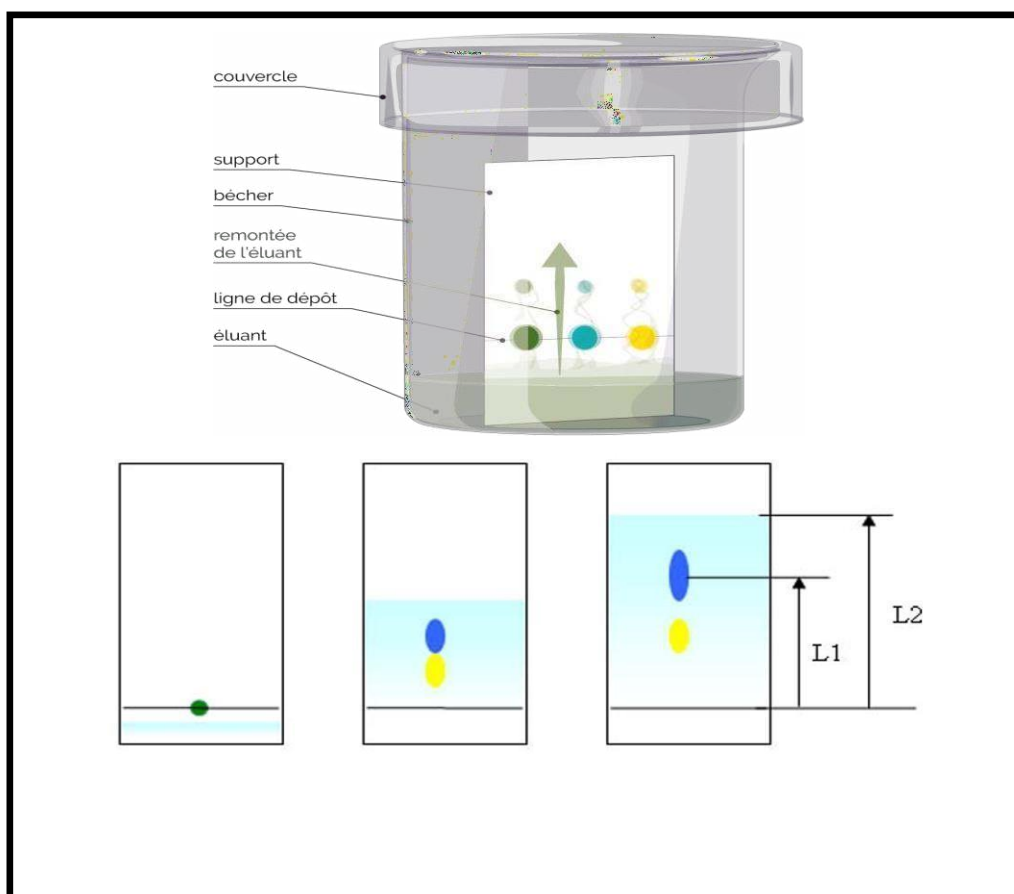


Figure 38 : Chromatographie sur couche mince.

On détermine le rapport frontal par la relation : $R_f = L_1/L_2$

L_1 : La distance parcourue par le soluté.

L_2 : La distance parcourue par le front du solvant.

2.4.2 Mesure du point de fusion :

Le point de fusion est une propriété caractéristique des substances cristallines solides. Il s'agit de la température de passage de l'état solide à l'état liquide. La température de fusion des produits cristallisés a été mesurée par un appareil Stuart Scientific Melting Point Apparatus SMP3.



Figure 39 : Fusion mètre.

2.4.3 La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier :

La spectroscopie infrarouge est une technique d'analyse rapide permettant d'identifier rapidement les fonctions chimiques des molécules présentes dans les matériaux analysés (solides, liquides ou plus rarement gazeux).

Les produits obtenus ont été caractérisés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) à l'aide d'un appareil de marque SCHEMADZU (FTIR-8900).

Les échantillons ont été introduits sous forme de pastille en broyant 1mg de produit dans 250mg de bromure de potassium (KBr).

L'analyse a été effectuée par balayage dans le domaine 400-4500 cm^{-1} .



Figure 40 : Appareille infra rouge.

CHAPITRE 3 RESULTATS ET DISCUSSIONS

La synthèse d'un acide aminé N,C protégé fait appel aux méthodes classiques de synthèse peptidique, en l'occurrence le choix des groupements protecteurs et des agents activants.

Notre choix s'est porté sur la synthèse d'acides aminés de type Boc-Xaa-NHiPr pour qu'il soient prêts pour une synthèse des peptides.

Les acides aminés choisis sont :

- L'alanine sa chaîne latérale est un méthyle. Elle contribue à la formation des globules blancs, elle est donc indispensable au maintien d'une bonne santé.
- La leucine sa chaîne latérale est un isobutyle. Elle est utilisée par le corps pour la construction musculaire et la production d'énergie. C'est l'acide aminé le plus anabolique de tout l'aminogramme.
- 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 41.

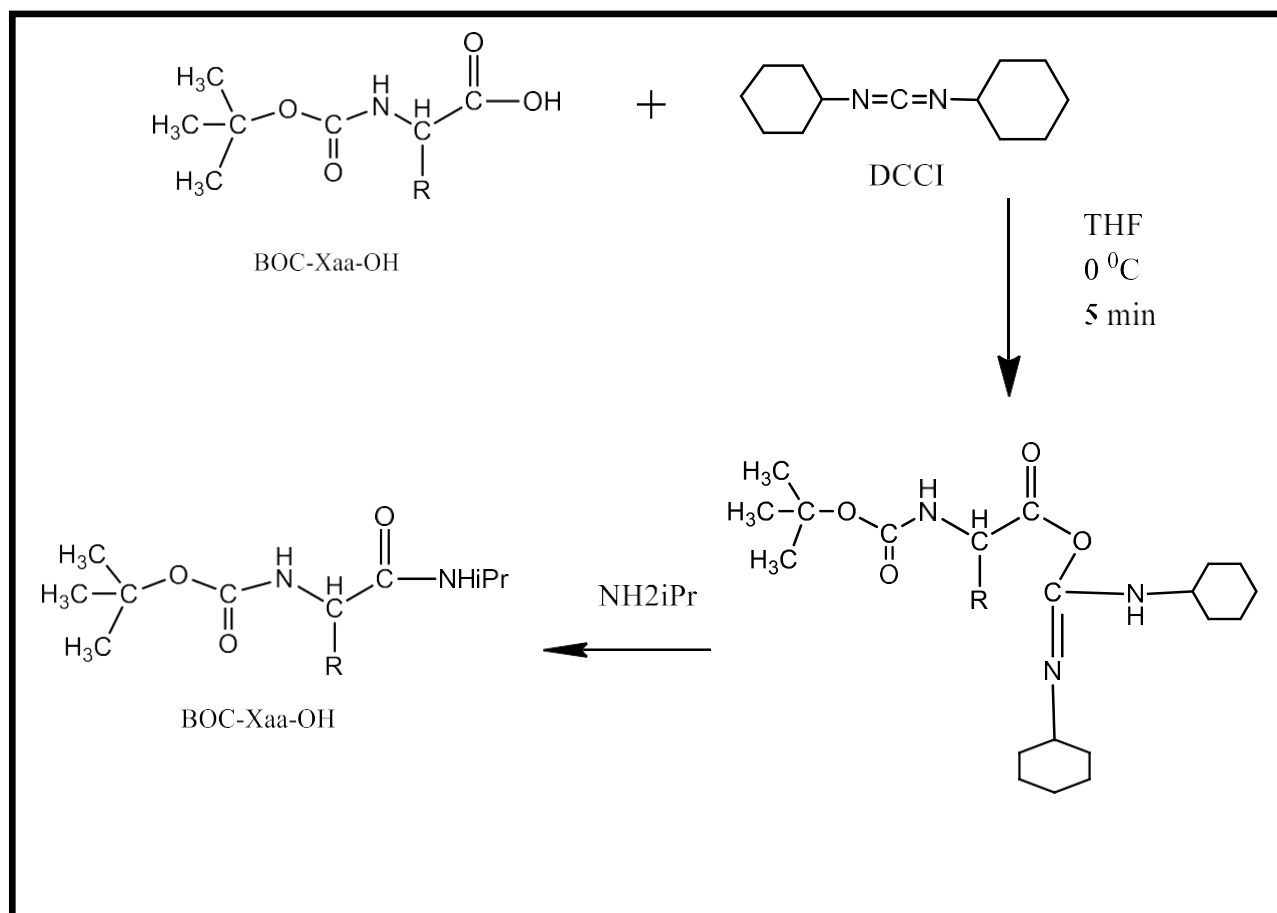
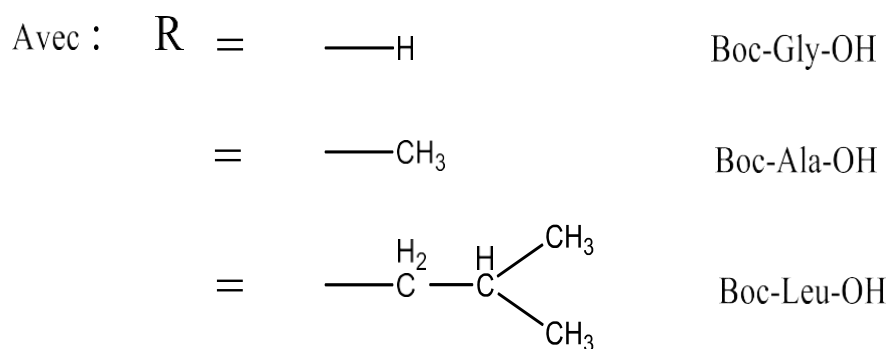


Figure 41 : Schéma général pour la synthèse des acides aminés



3.1 Réaction de synthèse du Boc-Ala-NHiPr :

Nous avons premièrement procédé à la synthèse du Boc-Ala-NHiPr sous forme de cristaux blancs en faisant réagir le Boc-Ala-OH produit commercial, avec l'isopropylamine (NH₂iPr) dans le THF à 0°C en présence de la DCCI, comme agent de couplage. Après filtration du sel formé et élimination du solvant, le Boc-Ala-NH₂iPr obtenu sous forme d'huile est cristallisé dans le système THF/Hx avec un rendement de 59 % en produit pur et d'un point de fusion de 165.7 °C.

La figure 4.2, ci-dessous schématise la réaction de synthèse du Boc-Ala-NHiPr.

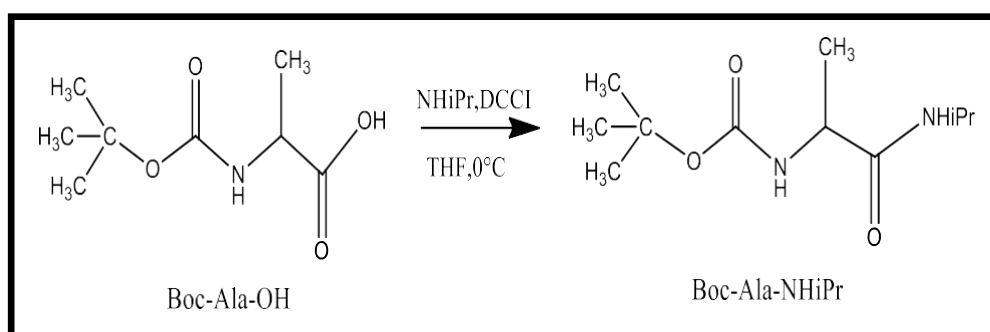


Figure 42 : Réaction de synthèse de Boc-Ala-NHiPr.

Le mécanisme proposé pour la synthèse du Boc-Ala-NHiPr est schématisé dans la (figure43).

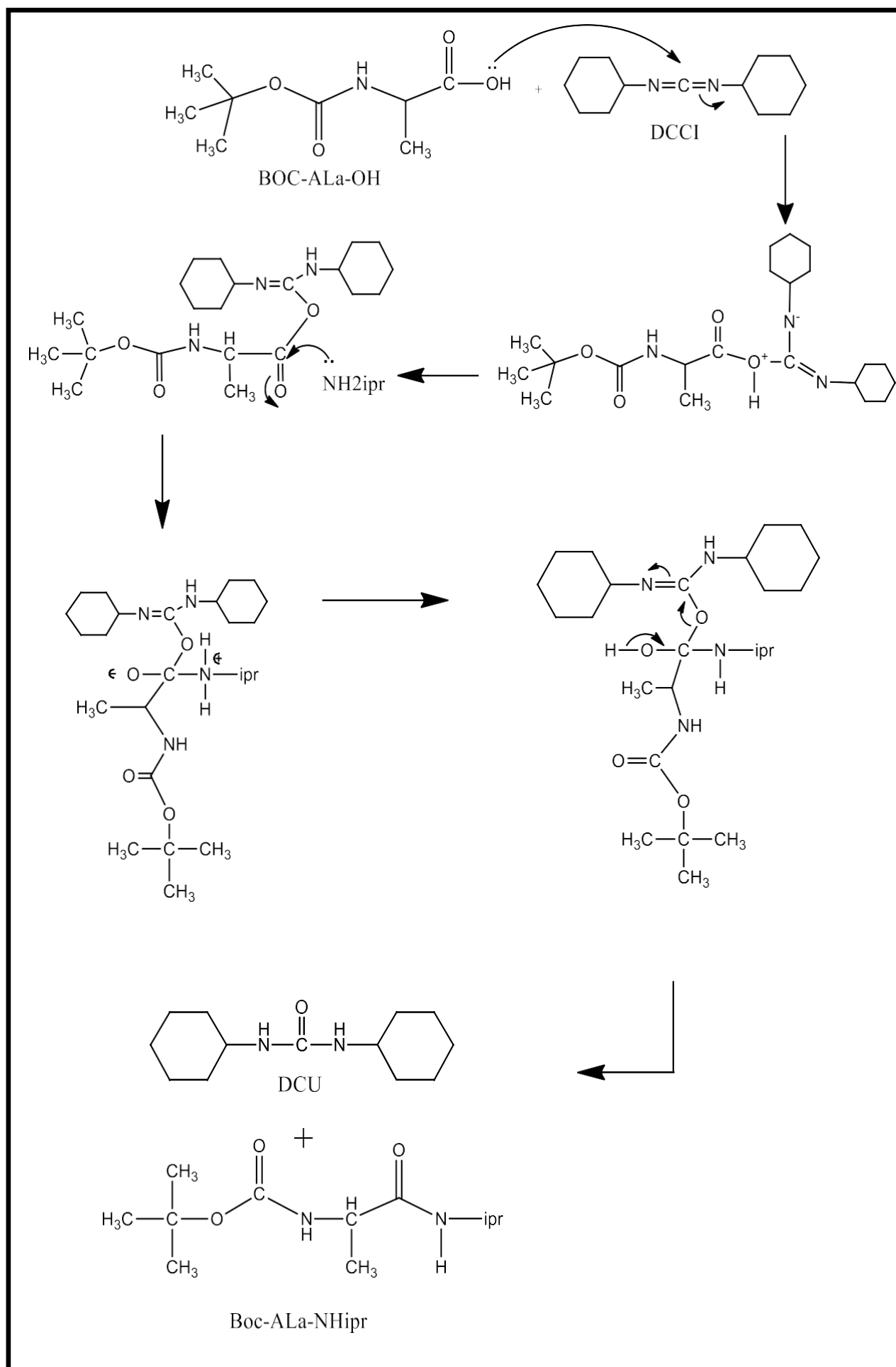


Figure 43 : Mécanisme proposé pour la synthèse du Boc-Ala-NHipr

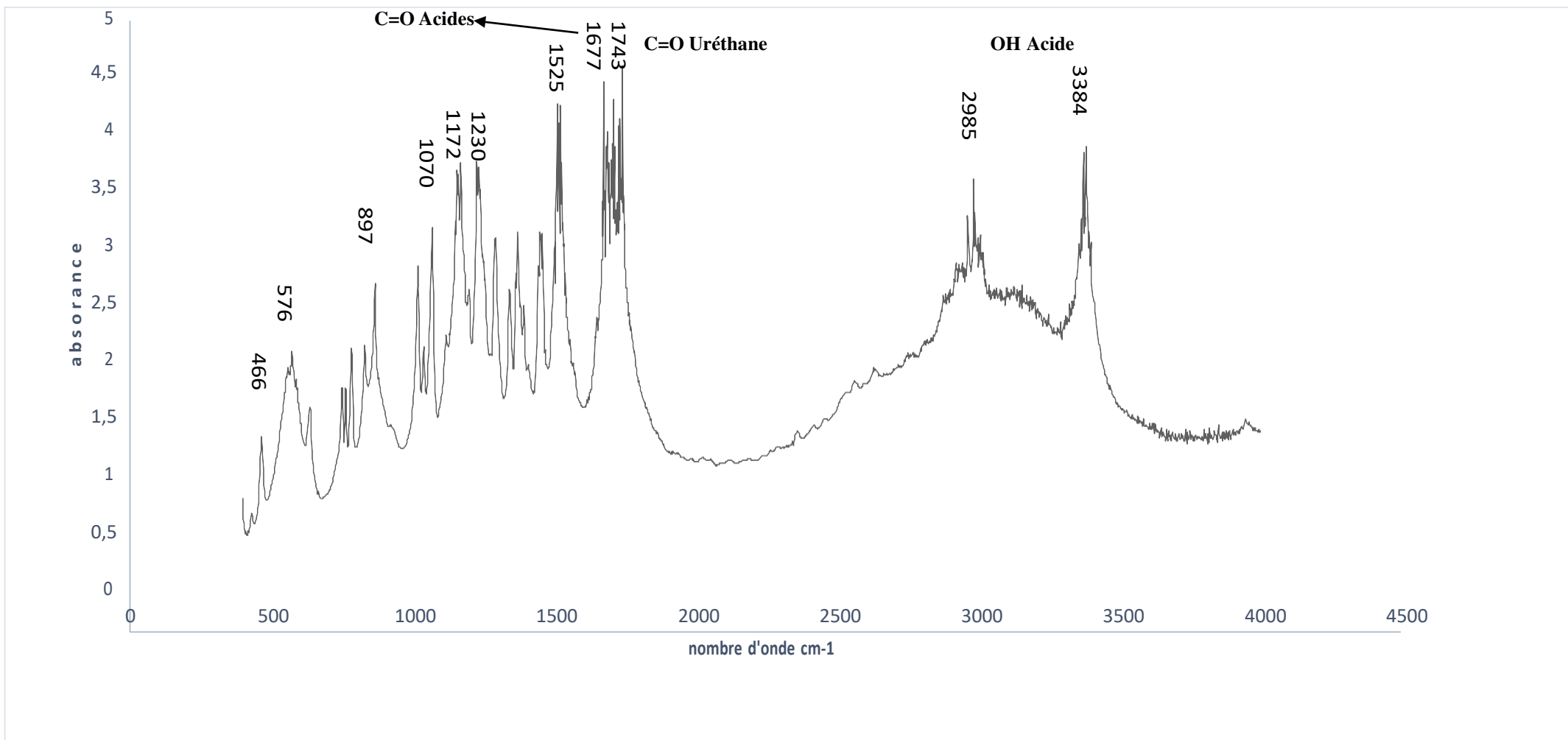


Figure 44 : Spectre FTIR du Boc-Ala-OH.

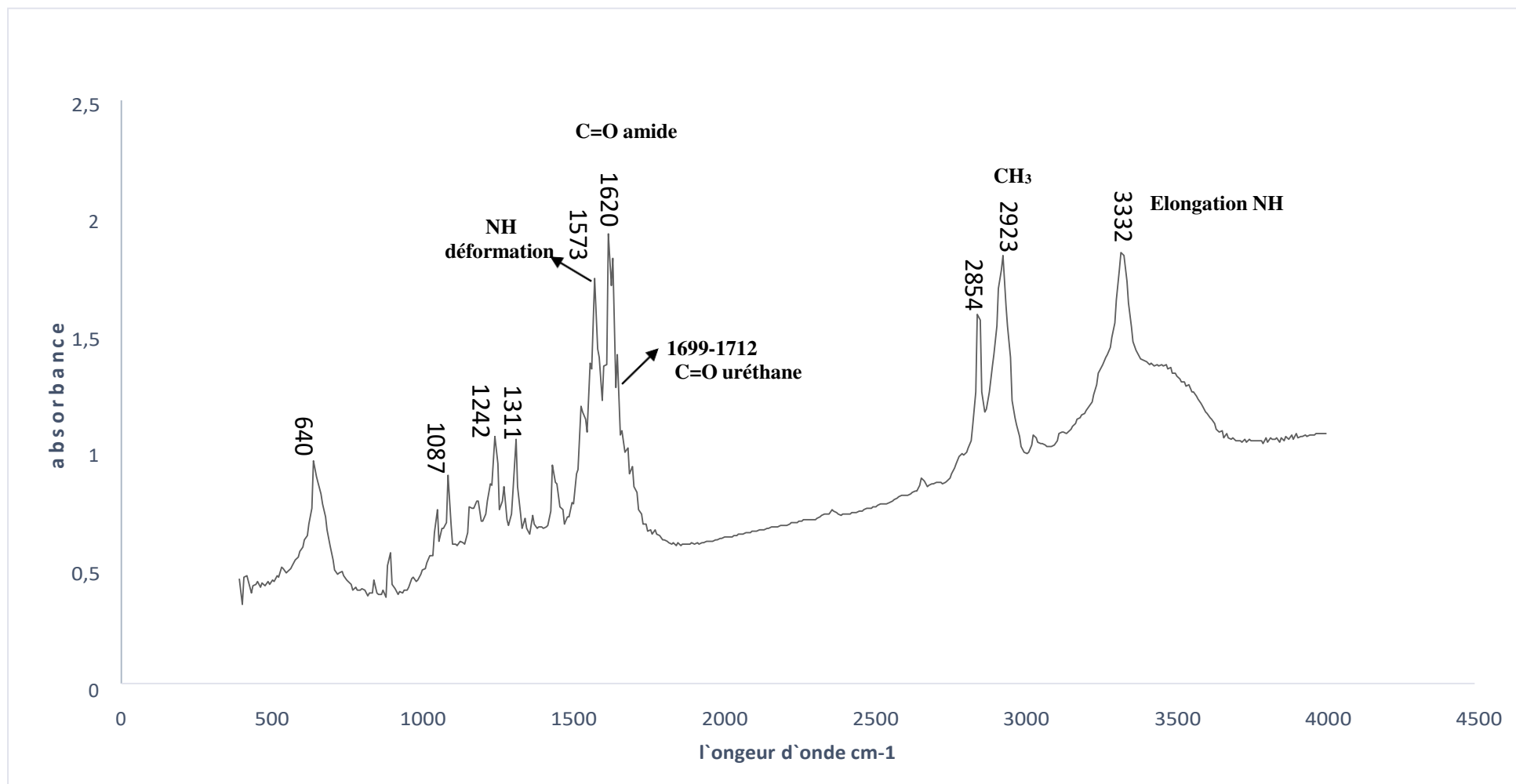


Figure 45 : Spectre FTIR du Boc-Ala-NHiPr.

3.1.1 Caractérisation du Boc-Ala-NHiPr par FTIR:

Le spectre FTIR du Boc-Ala-NHiPr (figure 45), présente une bande à 1620 cm^{-1} caractéristiques des vibrations d'élongation C=O de type amide.

La bande à 3332 cm^{-1} est relative aux vibrations d'élongation NH uréthane et NH amide, celle de 1573 cm^{-1} est attribuée aux vibrations de déformations angulaires CNH uréthanes.

Les bandes enregistrées à 1242 cm^{-1} , 1311 cm^{-1} sont relatives aux vibrations d'élongation C-N et C-O uréthanes.

La bande intense à 1700 cm^{-1} correspondent aux vibrations d'élongation de C=O uréthane.

La bande enregistrée à 2923 cm^{-1} relative aux vibrations d'élongation des CH des méthyles du groupement Boc.

Les bandes à 1087 cm^{-1} et 887 cm^{-1} peuvent être attribuées aux vibrations d'élongation C-O et C- C.

La bande intense à 640 cm^{-1} correspondent aux vibrations déformation C-H.

3.2 Réaction de synthèse du Boc-Gly-NHiPr :

Dans la synthèse du Boc-Gly-NHiPr en faisant réagir le Boc-Gly-OH produit commercial , avec l'isopropylamine (NH₂iPr) dans le THF à 0°C en présence de la DCCI, comme agent de couplage. Après filtration du sel formé et élimination du solvant, le Boc-Gly-NH₂iPr obtenu sous forme d'huile est cristallisé dans le système THF/Hx avec un rendement de 46% en produit pur et d'un point de fusion de 196°C.

La figure, ci-dessous schématise la réaction de synthèse du Boc-Gly-NHiPr.

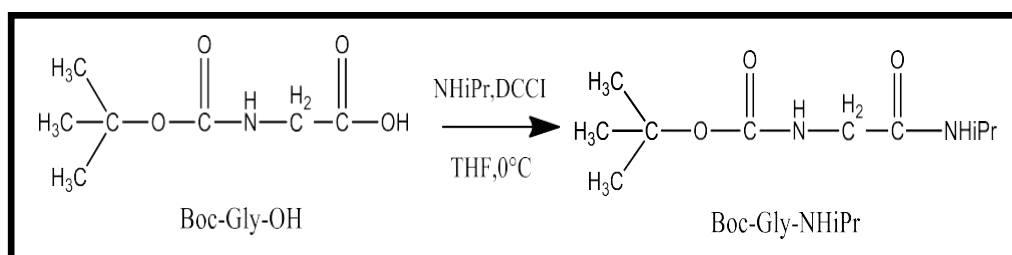


Figure 46 : Réaction de synthèse du Boc-Gly-NHiPr.

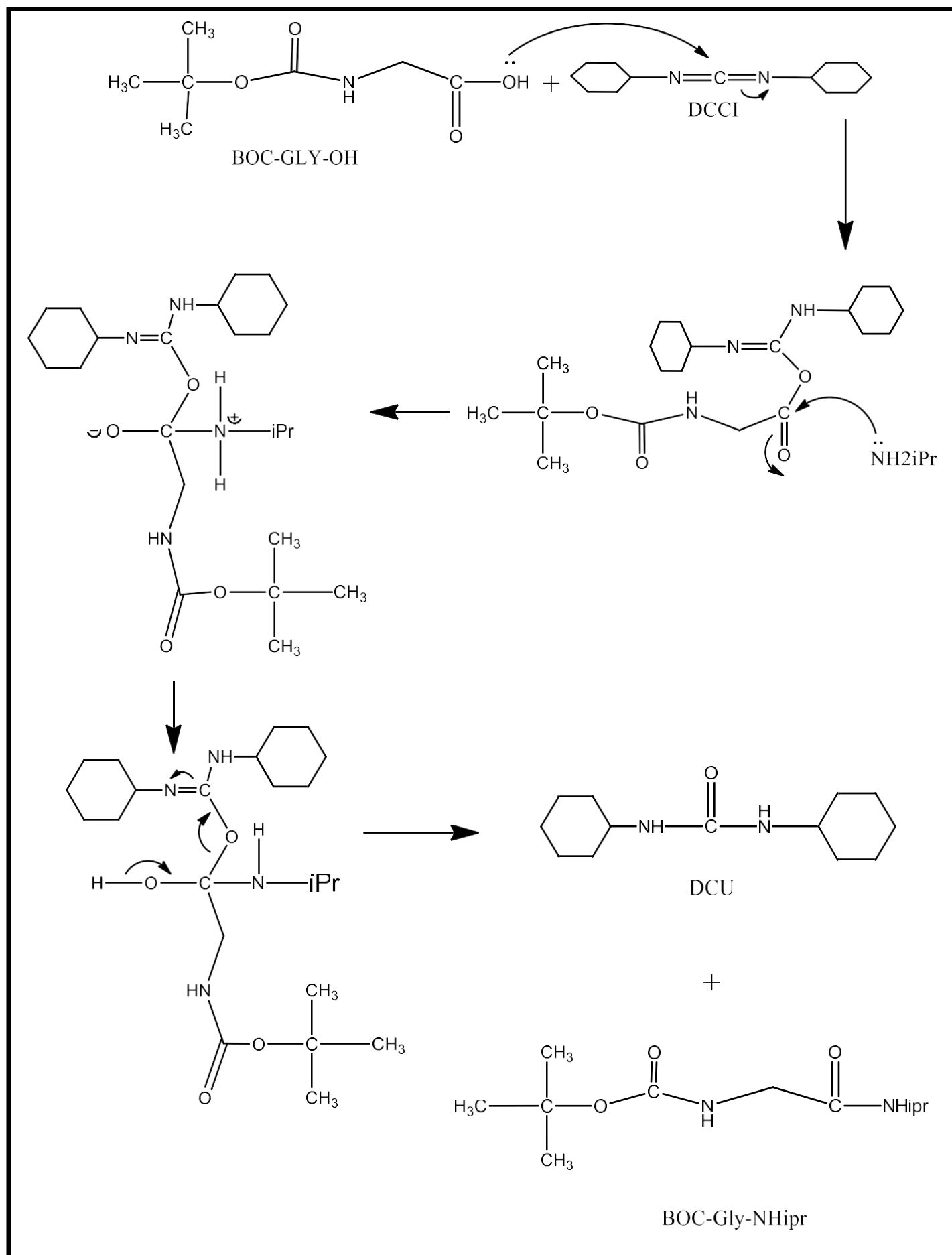


Figure 47 : Mécanisme proposé pour la synthèse du BOC-Gly-NHPr.

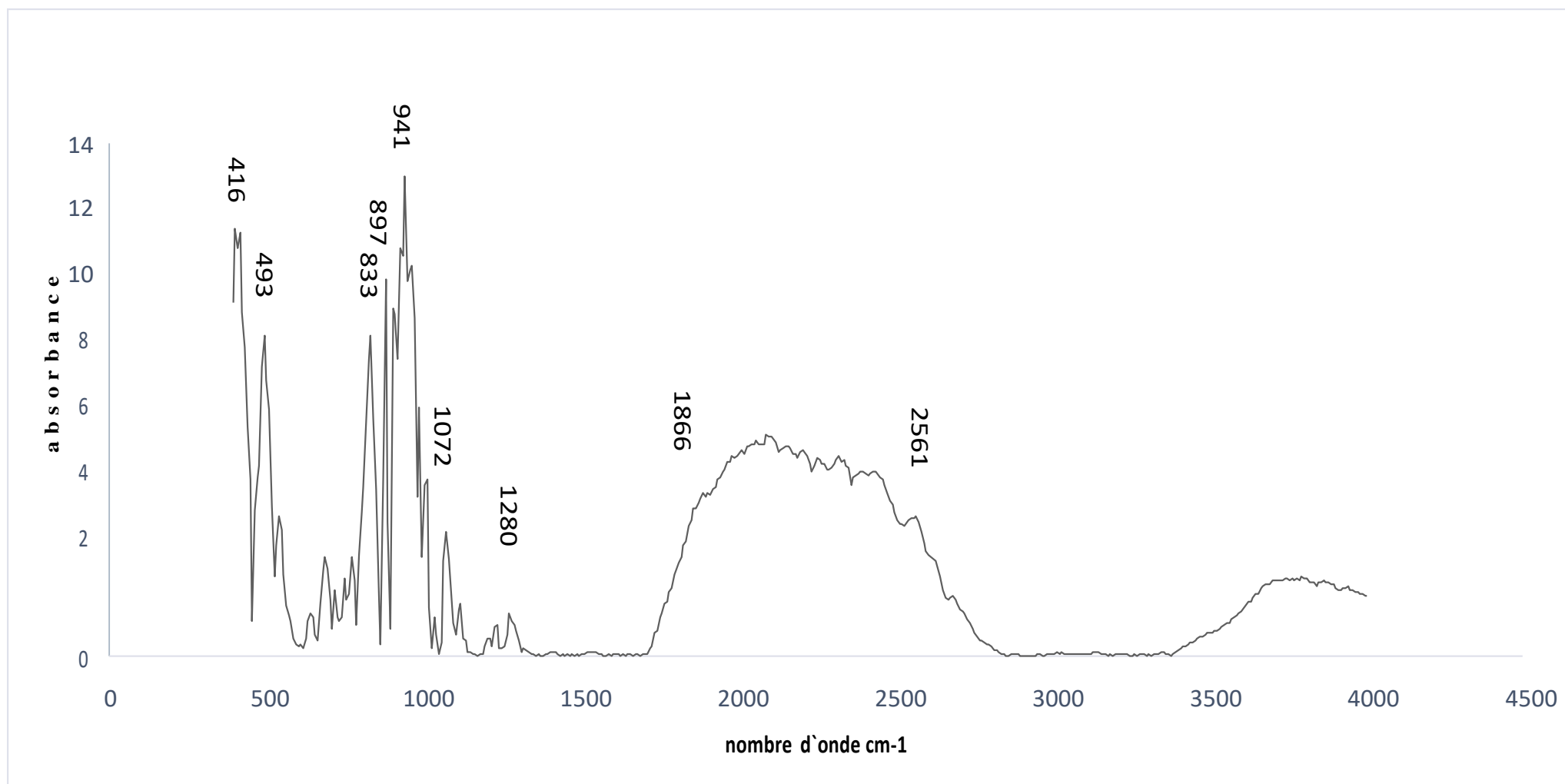


Figure 48 : Spectre FTIR du Boc-Gly-NHiPr.

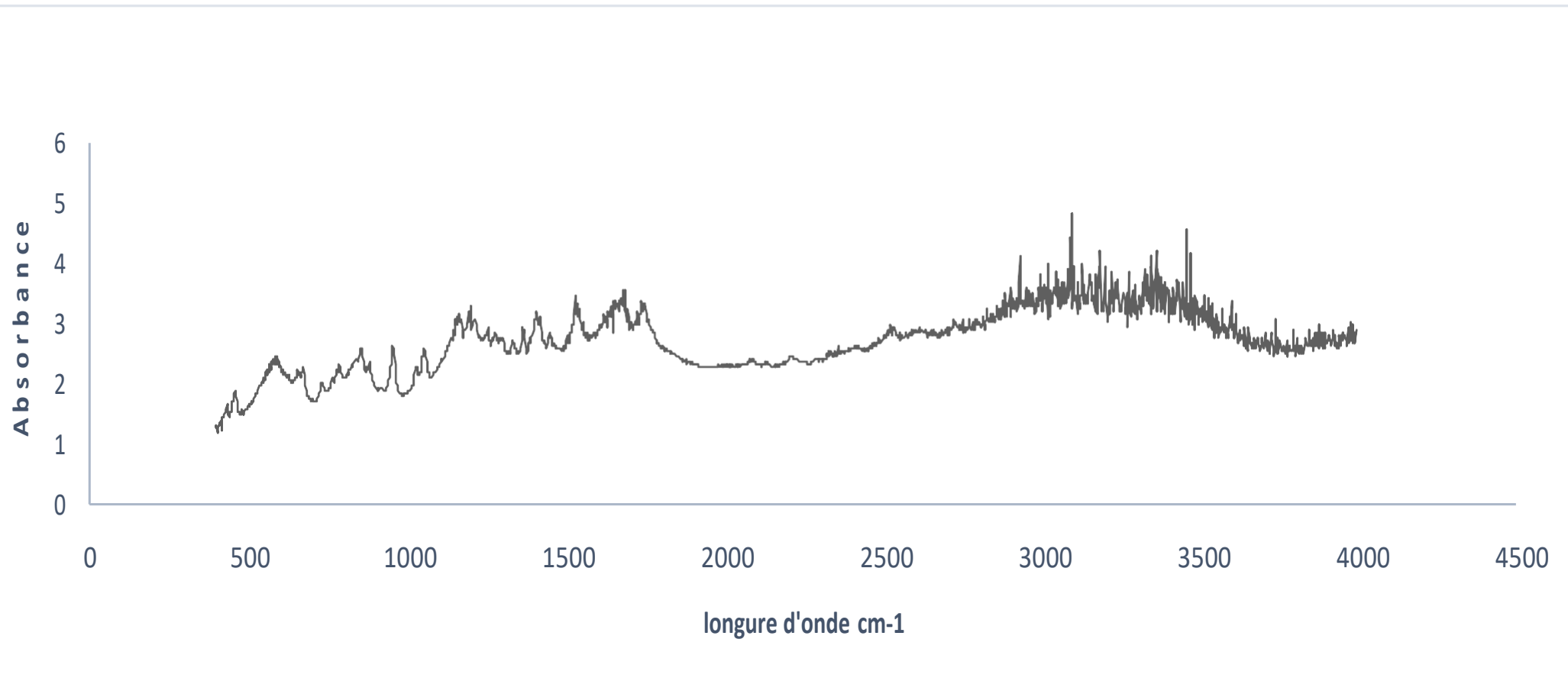


Figure 49 : Spectre FTIR du Boc-Gly-OH.

3.2.1 Caractérisation du Boc-Gly-NHiPr par FTIR :

Le spectre FTIR de BOC-GLY-NHiPr (figure 48) présente des bandes de 1866 cm^{-1} à 2561 cm^{-1} correspondant aux C-O et C-N uréthane.

Les bandes à 941 cm^{-1} et 1280 cm^{-1} sont celles des vibrations d'élongation C-O et C-N, ainsi des bandes à 493 et 416 cm^{-1} qui correspondent aux élongations de CH.

Cependant, les domaines les plus intéressants 1500-2000 cm^{-1} et 3000-3500 cm^{-1} , sont apparus sous forme de lignes droites.

3.3 Réaction de synthèse du Boc-Leu-NHiPr :

Nous avons premièrement procédé à la synthèse du Boc-leu-NHiPr sous forme de cristaux blancs en faisant réagir le Boc-leu-OH produit commercial, avec l'isopropylamine (NH₂iPr) dans le THF à 0°C en présence de la DCCI, comme agent de couplage. Après filtration du sel formé et élimination du solvant, le Boc-leu-NH₂iPr obtenu sous forme d'huile est cristallisé dans le système THF/Hx avec un rendement de 73% en produit pur et d'un point de fusion de 131°C.

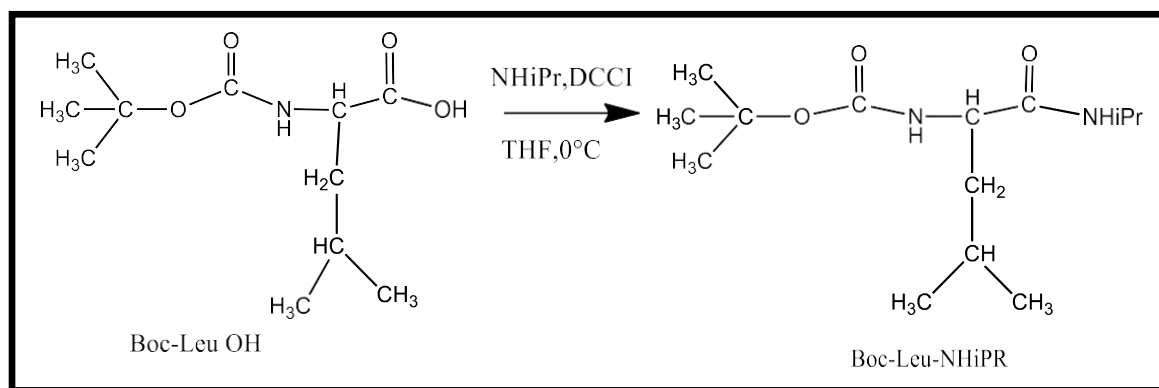


Figure 50 : Réaction de synthèse du Boc-Leu-NHiPr.

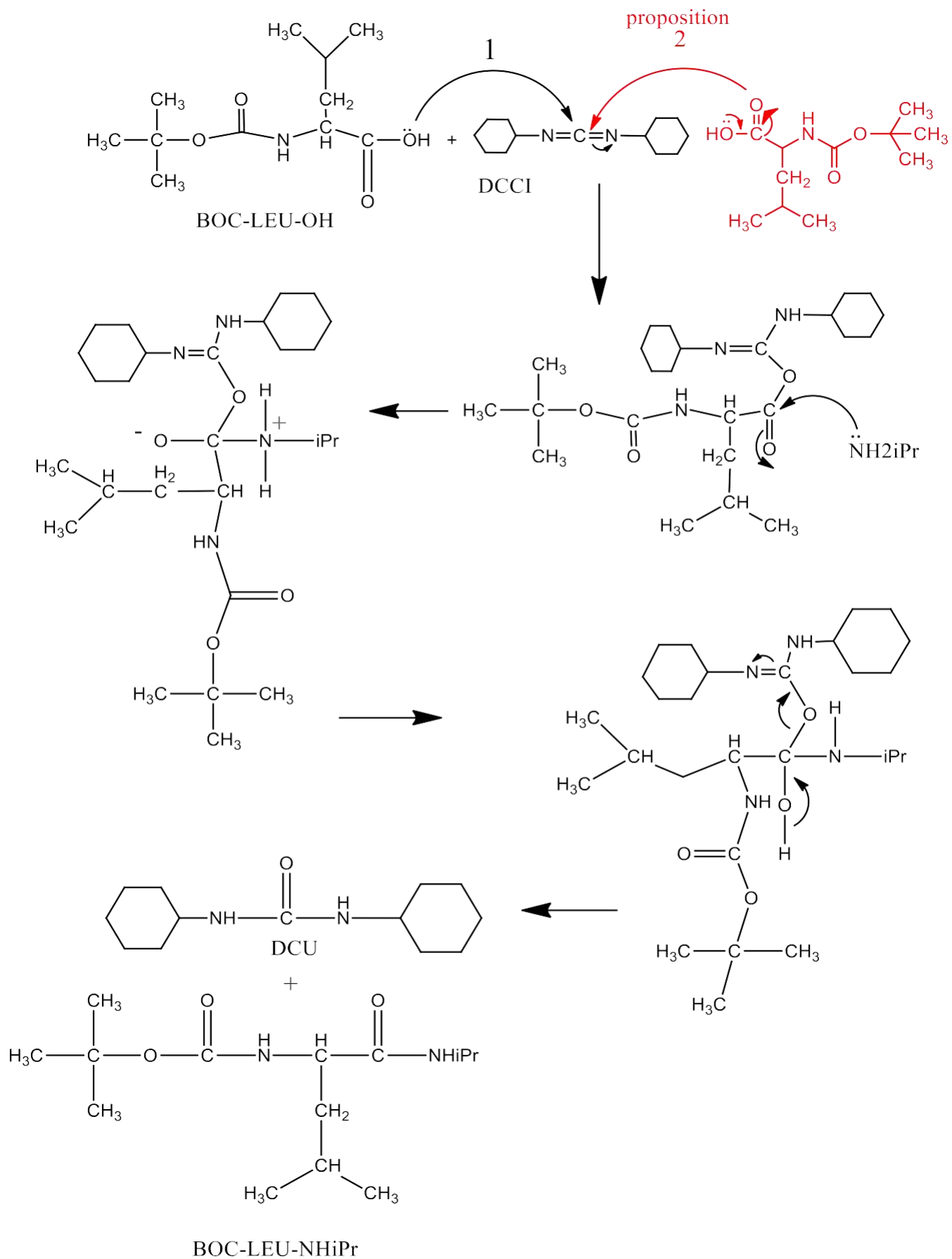


Figure 51 : Mécanisme proposé pour la synthèse du Boc-Leu-OH.

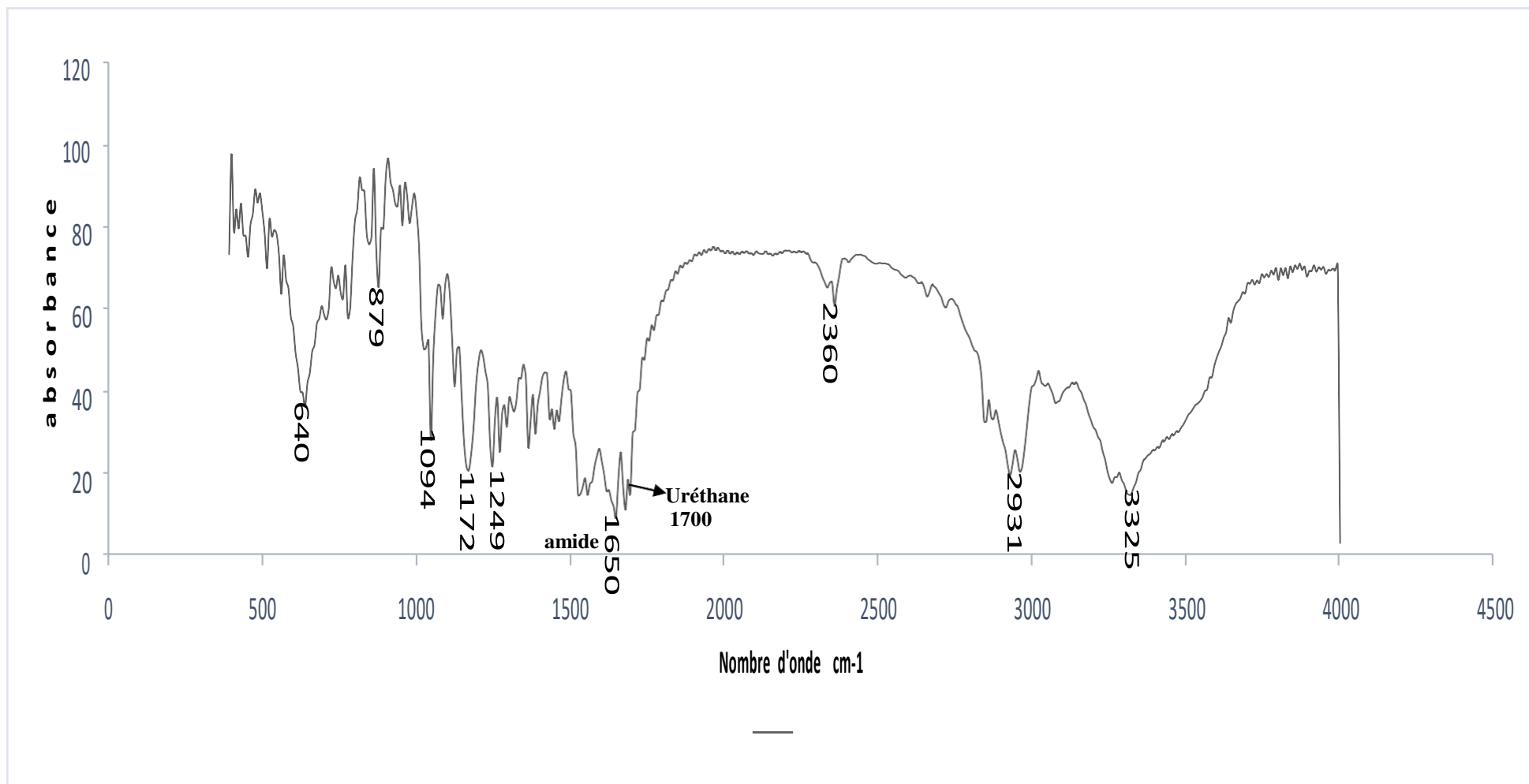


Figure 52: Spectre FTIR du Boc-Leu-NHiPr

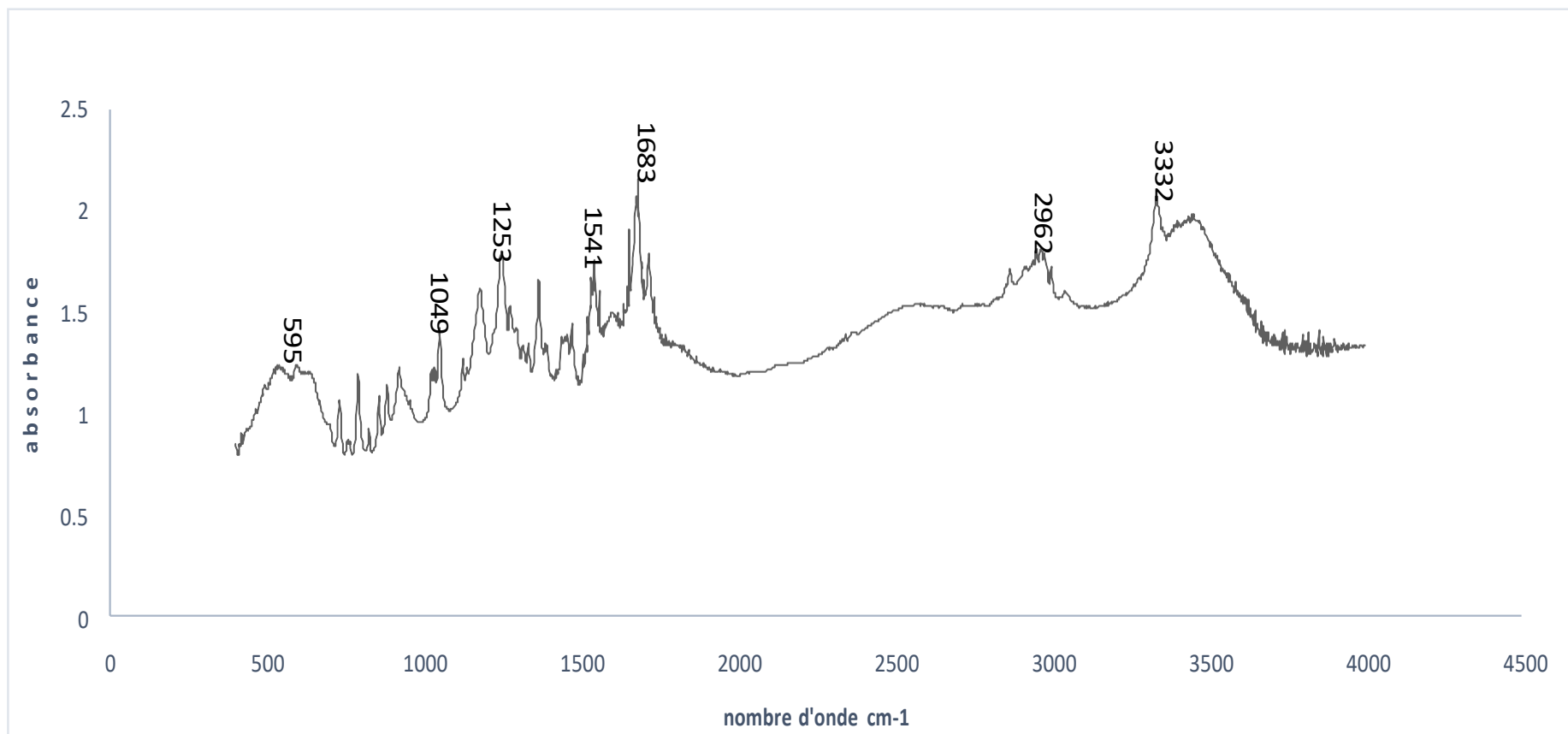


Figure 53 : Spectre FTIR du Boc-Leu-OH

3.3.1 Caractérisation du Boc-Leu-NHiPr par FTIR :

Le spectre FTIR du BOC-Leu-NHiPr (figure 52), présente une bande intense à 1650 cm^{-1} relative aux vibrations d'élongation $\text{C}=\text{O}$ de groupement protecteur Boc.

Les bandes intenses à 3255 cm^{-1} et 3301 cm^{-1} correspondent aux vibrations d'élongation de NH de type uréthane.

Les bandes à 1249 cm^{-1} et 1272 cm^{-1} sont attribuées aux vibrations d'élongation C-N et C-O uréthanes.

La bande intense à 1680 cm^{-1} et 1715 cm^{-1} correspondent aux vibrations d'élongation $\text{C}=\text{O}$ uréthane.

La bande intense à 1600-1630 cm^{-1} attribuée aux vibration d'élongation $\text{C}=\text{O}$ d'amide.

La bande à 2939 cm^{-1} et correspondent aux vibrations d'élongation asymétriques de C-H des groupes méthyles du groupement Boc. Leurs bandes de déformation sont à 1365 cm^{-1} .

La bande intense à 2923 cm^{-1} attribuée aux vibration d'élongation C-H de (CH_2 alcane). La bande intense à 624 cm^{-1} correspondent aux vibrations déformation C-H.

Conclusion

A l'issue de ce travail, nous avons en premier lieu réalisé l'activation de l'acide aminé « Boc-Ala-OH » par un agent de couplage qui est le DCCI juste après nous avons protégé la fonction acide pour qu'il ne réagisse pas de tel sorte nous avons utilisé le groupement protecteur NH_2iPr , l'huile obtenue a été mise dans un système de cristallisation THF/HEX en fin les cristaux obtenus ont un aspect solide blanc bien cristallisé avec un rendement de 59% et une structure finale de Boc-Ala-OH, nous l'avons confirmée par l'analyse FTIR.

En deuxième lieu nous avons suivi le protocole précédente nous avons juste changé d'acide aminé par le Boc-Gly-OH en suivant les mêmes étapes de travail jusqu'à l'obtention de produit final qui est le Boc-Gly-NHiPr sous forme des cristaux blancs avec un rendement de 46%, ses spectres de FTIR ont révélé une parfaite cohérence avec sa structure.

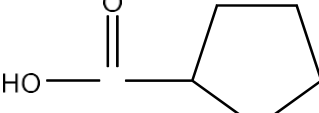
En dernier lieu, nous avons exécuter le même travail qu'on a suivi pour les deux premiers acides aminés avec le Boc-Leu-OH afin de bien atteindre le produit final avec un aspect physique solide blanc cristallisé Boc-Leu-OH, la structure de notre produit a été confirmé par l'examen de spectre FTIR.

Enfin, en perspectives nous projetons de coupler ces acides aminés afin de former un peptide en éliminant le groupement protecteur Boc de réagir avec la partie C-terminale activée d'un autre acide aminé de partie N-terminale protégé.

Appendice

Listes des acides aminés naturels

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

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

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{NH} \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{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \end{array} $	Asn
Glutamine	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \end{array} $	Gln

Références bibliographiques

1. HORTON, H.; MORAN, L.; OCHS, R.; RAWN, J.; SCRIMGEOUR, K., PRINCIPES DE BIOCHIMIE, 1994, DE BOECK-UNIVERSITE, BRUXELLES.
2. IZUMI, Y.; CHIBATA, I.; ITOH, T., ANGEW. CHEM. INT. ED. ENGL., 1978, 17, 176.
3. COPPOLA, G.M.; SCHUSTER, H.F., ASYMMETRIC SYNTHESIS: CONSTRUCTION OF CHIRAL MOLECULES USING AMINO ACIDS, 1987, WILEY-INTERSCIENCE, NEW-YORK.
4. TAHAR M, SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DE RESINES FONCTIONNALISÉES ET ÉTUDE DE LEUR AFFINITÉ VIS-À-VIS DE L'ALBUMINE HUMAINE, SETIF: UNIVERSITÉ FERHAT ABBAS 1, 2015, 144P.
5. BORG J, REEBER A, LES COURS DU PCEM, ELLIPSES, 2004, P3-47.
6. RICQUIER D, MÉTABOLISME DES ACIDES AMINÉS ET CYCLE DE L'URÉE, CHIMIE BIOCHIMIE ET BIOCHIMIE MOLECULAIRE, 1ÈRE ANNÉE SANTÉ, 2ÈME ÉDITION, OMNISCIENCES, 2010, P 407-428.
7. ROSE WC, HAINES WJ, WARNER DT. THE AMINO ACID REQUIREMENTS OF MAN.III. THE RÔLE OF ISOLEUCINE; ADDITIONAL EVIDENCE CONCERNING HISTIDINE. J BIOLCHEM 1951;193:605–12.
8. M. BERGMANN, L. ZERVAS, BER. DTSCH. CHEM. GES. 1932, 65, 1192.DOI:10.1002/CBER.19320650722
9. L. A. CARPINO, J. AM. CHEM. SOC. 1957, 79, 98. DOI:10.1021/JA01558A026
10. R. B. MERRIFIELD, J. AM. CHEM. SOC. 1963, 85, 2149. DOI:10.1021/JA00897A025
11. L. A. CARPINO, G. Y. HAN, J. AM. CHEM. SOC. 1970, 92, 5748.DOI:10.1021/JA00722A043
12. M. BERGMAN, L. ZERVAS, CHEMISCHEBERICHTE, 65, (1932), 1192.
13. L. CARPINO, JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 79, (1957), 98.
14. R SCHWYZER, P. SIEBER, H. KAPPELER, HELVETICA CHIMICA ACTA, 153, (1959), 2622.
15. L. MORODER, A. HALLET, E. WUNSH, O. KELLER, Z. PHYSIOL. CHEM., 357, (1976), 1651.
16. G. B. FIELDS, R. L. NOBLE, INT. J. PEPT. PROTEINRES. 1990, 35, 161.DOI:10.1111/J.1399-3011.1990.TB00939.X
17. L. A. CARPINO, ACC. CHEM. RES. 1987, 20, 401. DOI:10.1021/AR00143A003
18. R. C. SHEPPARD, J. PEPT. SCI. 2003, 9, 545. DOI:10.1002/PSC.479

19. BOSE, D. S.; KUMAR, K. K.; REDDY, A. V. N. SYNTH. COMMUN. 2003, 33, 445.
GREENE, T. W.; WUTS, P. G. M. PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, 3RD ED., JOHN WILEY & SONS, 1999 AND REFERENCES CITED THEREIN.
20. TOM, N. J.; SIMON, W. M.; FROST, H. N.; EWING, M. TETRAHEDRON LETT., 2004, 45, 905.
21. WASSERMAN, H. H.; BERGER, G. D.; CHO, K. R.; TETRAHEDRON LETT., 1982, 23, 465.
22. KUTTAN, A.; NOWSHUDIN, S.; RAO, M. N. A. TETRAHEDRON LETT., 2004, 45, 2663.
23. ROUTIER, S.; SAUGE, L.; AYERBE, N.; COUDERT, G.; MEROUR, J.-Y. TETRAHEDRON LETT., 2002, 43, 589.
24. EL KAZZOULI, S.; KOUBACHI, J.; BERTEINA-RABOIN, S.; MOUADDIB, A.; GUILLAUMET, G. TETRAHEDRON LETT. SOUMIS.
25. C.-D. CHANG, M. WAKI, M. AHMAD, J. MEIENHOFER, E. O. LUNDELL, J. D. HUAG, INT. J. PEPT. PROTEIN RES. 1980, 15, 59.
26. E. ATHERTON, C. J. LOGAN, R. C. SHEPPARD, J. CHEM. SOC. PERKIN TRANS. 1 1981, I, 538.
- DOI:10.1039/P19810000538
27. SUDAKOW, A.; PAPKE, U.; LINDEL, T. CHEM. EUR. J. 2014, 20, 10223
28. W. CHU, Z. TU, E. MCELVEEN, J. XU, M. TAYLOR, R. R. LUEDTKE, R. H. MACH. BIOORG. MED. CHEM. 2005, 13:77
29. I. KUWAJIMA, H. URABE. ORGANIC SYNTHESES, WILEY: NEW YORK. 1993 COLLECT. VIII, 486.
30. J. KLOSA. PRAKT. CHEM., 1962, 19: 45.
31. FISCHER, E.; OTTO, E. BER. DEUTSCH. CHEM. GES. 1903, 36, 2106.
32. GHOSEZ, L.; GEORGE-KOCH, I.; PATINY, L.; HOUTEKIE, M.; BOVY, P.; NSHIMYUMUKIZA, P. PHAN, T. TETRAHEDRON, 1998, 9207-9222.
33. T. CURTIUS. CHEM. BER. 1902, 35: 3226.
34. J. C. SHEEHAN, G. P. HESS, J. AM. CHEM. SOC. 1955, 77: 1067.
35. T. KIMURA, M. TAKAI, Y. MASUI, T. MORIKAWA, S. SAKAKIBARA, BIOPOLYMERS 1981, 20: 1823.
36. MICHAELA PRINZ, SÜLÜNAY PARLAR, GÜLS_AH BAYRAKTAR, VILDAN ALPTÜZÜN, ERCIN ERCIYAS, ADYARY FALLARERO, DANIELA KARLSSON, PIA VUORELA, MALGORZATA BUREK, CAROLA FÖRSTER, EZGI TURUNC, GULIZ ARMAGAN, AYFER YALCIN, CAROLA SCHILLER, KRISTINA LEUNER, MANUEL KRUG, CHRISTOPH A. SOTRIFFER, ULRIKE HOLZGRABE. "1,4-SUBSTITUTED 4-(1H)-PYRIDYLENE-

HYDRAZONE-TYPE INHIBITORS OF ACHE, BUCHE, AND AMYLOID-B AGGREGATION CROSSING THE BLOOD-BRAIN BARRIER", EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 49 603–613. 2013.

37. KABSCH, W.; SANDER, C. DICTIONARY OF PROTEIN SECONDARY STRUCTURE: PATTERN RECOGNITION OF HYDROGEN-BONDED AND GEOMETRICAL FEATURES. BIOPOLYMERS 1983, 22 (12), 2577–2637.

38. HUTCHINSON, E. G.; THORNTON, J. M. A REVISED SET OF POTENTIALS FOR BETA-TURN FORMATION IN PROTEINS. PROTEIN SCI. PUBL. PROTEIN SOC. 1994, 3 (12), 2207–2216.

39. JAMES MILNER-WHITE, E.; POET, R. LOOPS, BULGES, TURNS AND HAIRPINS IN PROTEINS. TRENDS BIOCHEM. SCI. 1987, 12, 189–192.

40. L.A. CURTISS. , C. JONES, G.W. TRUCKS. , K. RAGHAVACHARI. , J.A. POPE. , « GAUSSIAN-1 THEORY OF MOLECULAR ENERGIES FOR SECOND-ROW COMPOUNDS », J. CHEM. PHYS., 93. , 2537– 2545. , 1990.

41. ANON., 2003. COÛT DE RECHERCHE ET DÉVELOPPEMENT DU MÉDICAMENT : LA GRANDE ILLUSION. PRESCRIRE, 23(244), 782-787.