

50376
1983
157

50376
1983
157

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MÉMOIRE POUR L'OBTENTION DU
DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES DE
CHIMIE ORGANIQUE ET MACROMOLECULAIRE

EFFICACITE COMPARATIVE DE DIFFERENTES
TECHNIQUES APPLIQUEES A LA SYNTHESE
D'UN TRI-PEPTIDE



Présenté par :

DIBE el Madani

LE : 30 JUIN 1983

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ

AU NOM DE DIEU CLÉMENT
ET MISÉRICORDIEUX

وَقُلْ رَبِّیْ زِدْنِیْ عِلْمًا

صدق الله اعلم

A mes parents

A mes frères et soeurs

en témoignage de ma profonde affection

INTRODUCTION

La glycosylation des protéines est un domaine d'étude intéressant aussi bien les chimistes organiciens que les biophysiciens ou les biochimistes. Une glycoprotéine est une macromolécule formée d'une partie protéique et d'une partie glycanique reliées entre elles par l'intermédiaire d'un oxygène (O-glycoprotéine) ou d'un azote (N-glycoprotéine). Les glycoprotéines sont impliquées dans plusieurs activités vitales de la cellule (défense, reconnaissance et adhésion cellulaires...). Dans ces molécules, la séquence d'acides aminés constituant la partie protéique est responsable de la conformation, tandis que la partie glycanique est impliquée dans diverses fonctions comme par exemple la reconnaissance cellulaire.

Au laboratoire de biophysique de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, le complexe enzymatique impliqué dans la glycosylation des protéines de la membrane d'oviducte de poule a été isolé et partiellement purifié (1). Des essais de glycosylation de quelques peptides synthétiques au moyen de ce complexe ont été réalisés (2) et ont permis de vérifier et de confirmer les conditions requises pour la N-glycosylation, conditions antérieurement formulées par différents auteurs.

Ces conditions sont au nombre de deux :

a) Nécessité d'une structure primaire du type **Asn-X-Ser(Thr)** , l'asparagine (**Asn**) portant toujours la chaîne glycanique. **X** est un acide aminé quelconque différent de la proline (3).

b) Nécessité d'une structure secondaire en coude β . Pour qu'un peptide se mette sous forme de coude β (Fig. 1), il faut qu'il possède au moins quatre résidus d'acide aminé (ou deux résidus bloqués aux extrémités N- et C- terminales) et qu'il soit dans un milieu qui favorise ce coude β . La glycosylation est directement liée à cette structure secondaire (4, 5).

Pour remplir ces conditions, nous avons pensé synthétiser un hexapeptide cyclique ayant comme séquence linéaire **Asn-Gln-Ser-Asn-Gly-Ser**, , qui posséderait en même temps la séquence primaire et la conformation requises.

La synthèse de ce peptide est la première étape de notre travail, qui consistera ensuite à suivre de près (in vitro) sa glycosylation pour essayer de détecter les différents facteurs qui empêchent la biosynthèse normale des glycoprotéines. Ce mécanisme est important puisque dans de nombreux phénomènes pathologiques, et en particulier lors du cancer, des changements importants au niveau des chaînes glycaniques ont été mis en évidence.

Lorsque nous avons entrepris ce travail, très peu de choses avaient été publiées concernant le couplage des différents acides aminés composant ce peptide. Ayant choisi de réaliser la synthèse en phase homogène (step by step), nous étions donc amené à chercher la méthode de couplage la plus fiable pour faire cette synthèse.

Le travail qui sera présenté ici aura donc comme objectif de comparer des techniques et de choisir la plus efficace pour synthétiser le tripeptide **Asn-Gln-Ser** , qui représente le peptide clef pour notre cyclohexapeptide.

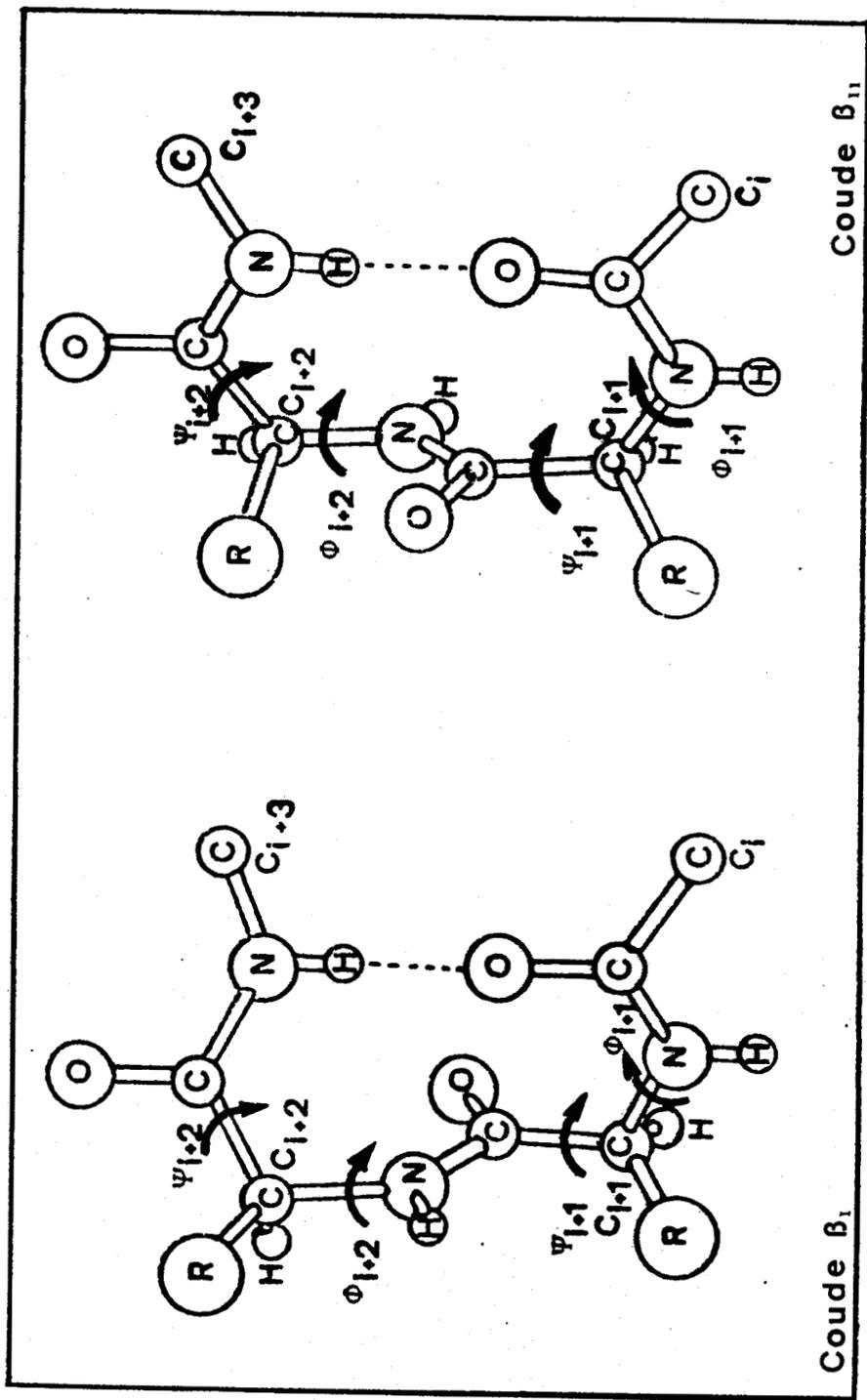


Figure.1. Schéma de 2 coudes β , couramment rencontrés dans les protéines, mis en évidence par cristallographie.

La distance $C_i - C_{i+3}$ doit être inférieure ou égale à $5,7 \text{ \AA}$ pour former une liaison hydrogène qui stabilise le coude.

Les angles ϕ_{i+1} , ψ_{i+1} , ϕ_{i+2} , ψ_{i+2} prennent certaines valeurs particulières.



SOMMAIRE

INTRODUCTION

CHAPITRE I : GENERALITES

- I - Principe de la synthèse peptidique
- II - Protections des fonctions
 - A - Fonction NH_2
 - B - Fonction COOH
 - C - Fonctions latérales
- III - Méthodes de couplage
 - A - Méthodes aux carbodiimides
 - B - Méthode aux anhydrides mixtes
- IV - Voies de synthèse peptidique
- V - Racémisation

CHAPITRE II : PARTIE EXPERIMENTALE

- I - Préparation des dérivés d'acides aminés
- II - Synthèse de dipeptides
 - A - Bpoc-Gln - Ser - OMe
 - B - Z - Gln - Ser(Bzl) OMe
- III - Synthèse du tripeptide
 - Boc - Asn(x) - Gln - Ser - OMe
 - Schéma de la synthèse
 - Description

CHAPITRE III : APPENDICE TECHNIQUE

- I - Techniques de contrôle
- II - Techniques de purification

CONCLUSION

GLOSSAIRE

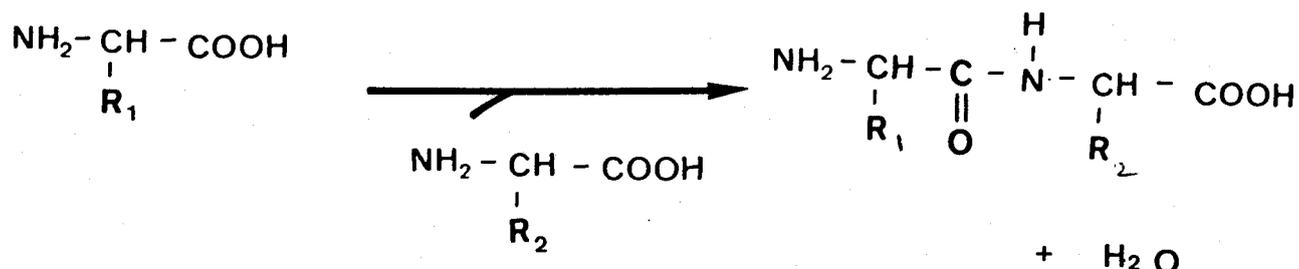
CCM	: Chromatographie sur couche mince
CMA	: Chloroforme - Méthanol - Acide acétique
BAW	: n-Butanol - Acide acétique - Eau
DCHA	: dicyclo-hexylammonium
THF	: Tétrahydrofuranne
TEA	: Triéthylamine
Rf	: Rapport front du produit sur front du solvant
F _p	: Point de fusion
DCCI	: Dicyclohexylcarbodiimide
DCU	: Dicyclohexylurée
DMF	: Diméthylformamide
NMM	: N-méthylmorpholine

CHAPITRE I

GENERALITES

I - PRINCIPE DE LA SYNTHÈSE PEPTIDIQUE :

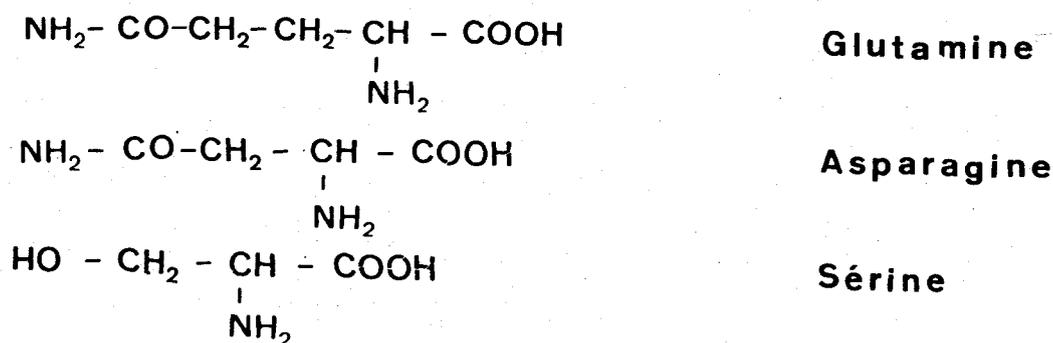
La synthèse peptidique consiste à réunir des acides aminés par des liaisons de type amide selon le schéma réactionnel suivant :



En général, la réaction ne s'arrête pas à un dipeptide, mais conduit à une polycondensation des acides aminés. Pour contrôler ce type de réaction, il est nécessaire de protéger temporairement les sites réactionnels qui ne participent pas à la formation du produit. Le choix des groupes protecteurs, qu'on peut introduire et éliminer sélectivement, est l'un des problèmes essentiels de la synthèse peptidique.

II - PROTECTIONS DES FONCTIONS :

Les acides aminés que nous avons utilisés sont :



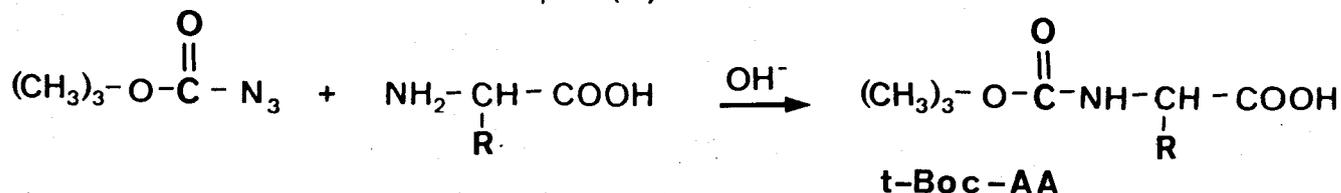
Ces trois acides aminés possèdent tous une fonction carboxylique (COOH), une fonction amine (NH₂) et une fonction latérale qu'on protège généralement.

A - Protection de la fonction amine (NH₂)

Les groupements protecteurs les plus utilisés ici sont de type uréthane.

1 - Groupe tertio-butyloxycarbonyle (t-Boc) :

* Introduction : Une des méthodes est celle utilisant l'action du Boc azide en milieu basique (6)

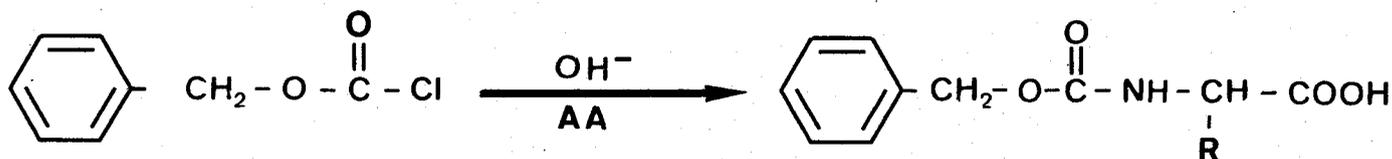


* Déprotection : le t-Boc est éliminé en milieu acide, par exemple par HCl 1N/CH₃COOH, ou par HCl 4N/dioxanne ou bien par le TFA pur ou dilué (MERRIFIELD) (7)

* Particularité : résistant à l'hydrogénation catalytique ; l'élimination du t-Boc n'altère pas la liaison peptidique.

2 - Groupe benzyloxycarbonyle (Z) :

* Introduction : en faisant réagir Z-Cl en milieu basique (8)

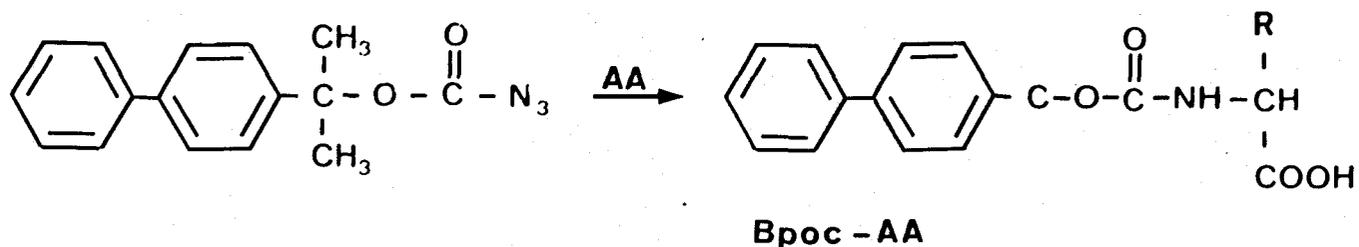


* Déprotection : peut se faire soit par action de HBr/CH₃COOH soit par hydrogénation catalytique (Pd/charbon ou noir de Pd).

* Particularité : le Z est l'un des premiers groupements protecteurs utilisés en synthèse peptidique.

3 - Groupe biphénylisopropylloxycarbonyle (Bpoc) :

* Introduction : le plus souvent par action du Bpoc-azide en milieu basique (9).



* Déprotection : l'élimination du Bpoc se fait facilement par acidolyse, par exemple TFA (0,5 %) dans le chlorure de méthylène ou par l'acide acétique (80 %)

* Particularité : le Bpoc peut amener des empêchements stériques qui diminuent fortement les rendements des réactions de couplage.

B - Protection de la fonction carboxylique

Les groupements protecteurs de la fonction COOH fréquemment utilisés sont du type ester d'alkyle (méthyle, éthyle...) ou ester de benzyle.

- Les esters méthyliques (Ome), éthyliques (OEt) sont préparés par la méthode classique d'estérification par l'alcool correspondant en présence d'acide chlorhydrique anhydre (10) ou de chlorure de thionyle (SOCl₂) (11)

La déprotection se fait par saponification dans l'acétone ou le méthanol à 0°C.

Lors de la saponification des esters de peptides, on peut observer une légère racémisation des acides aminés (12)

- Les esters benzyliques (OBZl) sont obtenus par estérification de l'acide α-aminé par l'alcool benzylique en présence d'un catalyseur acide.

La régénération de la fonction acide peut se faire par saponification ou plus souvent par hydrogénation catalytique (13)

- Les esters tertio-butyliques (OBut) :

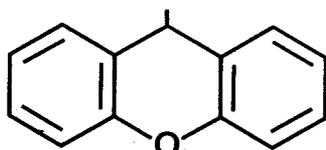
Ce type de blocage est plus récent, fréquemment utilisé. Les esters obtenus sont coupés par les acides chlorhydriques, bromhydriques et par le TFA (14, 15). Ils sont stables à l'hydrogénolyse.

C - Protection des fonctions latérales

Seules les protections de la fonction amide et de la fonction alcool seront traitées ici.

- Protection de la fonction amide :

Il existe plusieurs méthodes pour protéger cette fonction (16), mais on n'a retenu que celle proposée par SHIMONISHI et Coll (17) qui ont utilisé le groupe xanthyle stable à l'hydrogénation catalytique.

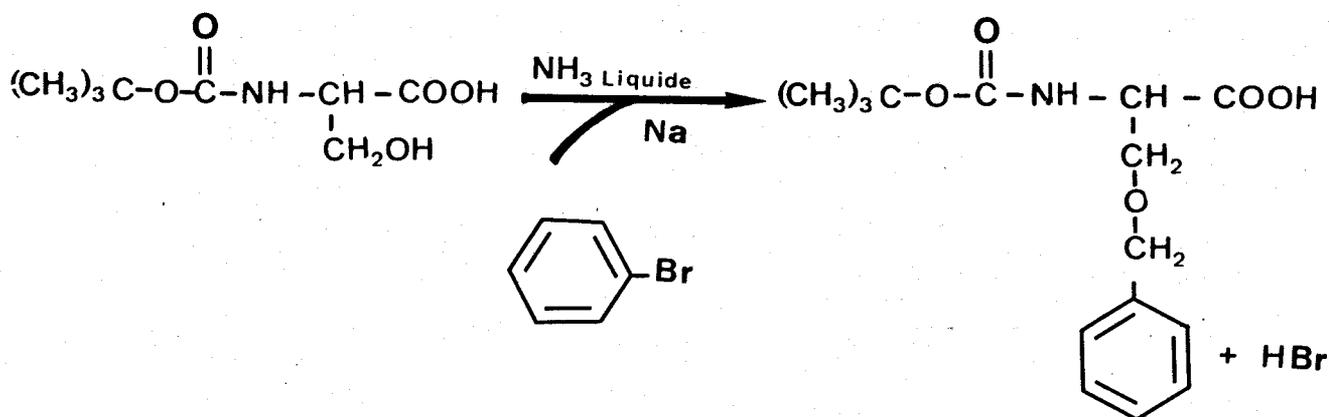


Ce groupe est détaché par des réactifs acides : HBr dans l'acide acétique, HCl 3N dans le dioxanne, Tfa dans le dichlorométhane.

- Protection de la fonction OH :

La réactivité de cette fonction est négligeable devant celle de la fonction amine, on peut donc introduire les acides aminés hydroxylés non protégés. Mais pour éliminer toutes réactions secondaires dues à ce groupement, on préfère le protéger.

Parmi plusieurs groupes protecteurs, on a choisi le dérivé O-benzyl (18) pour bloquer l'OH de la sérine.



La déprotection de cette fonction se fait par hydrogénation catalytique ou par HF ou par HBr/CF₃COOH.

III - METHODES DE COUPLAGE :

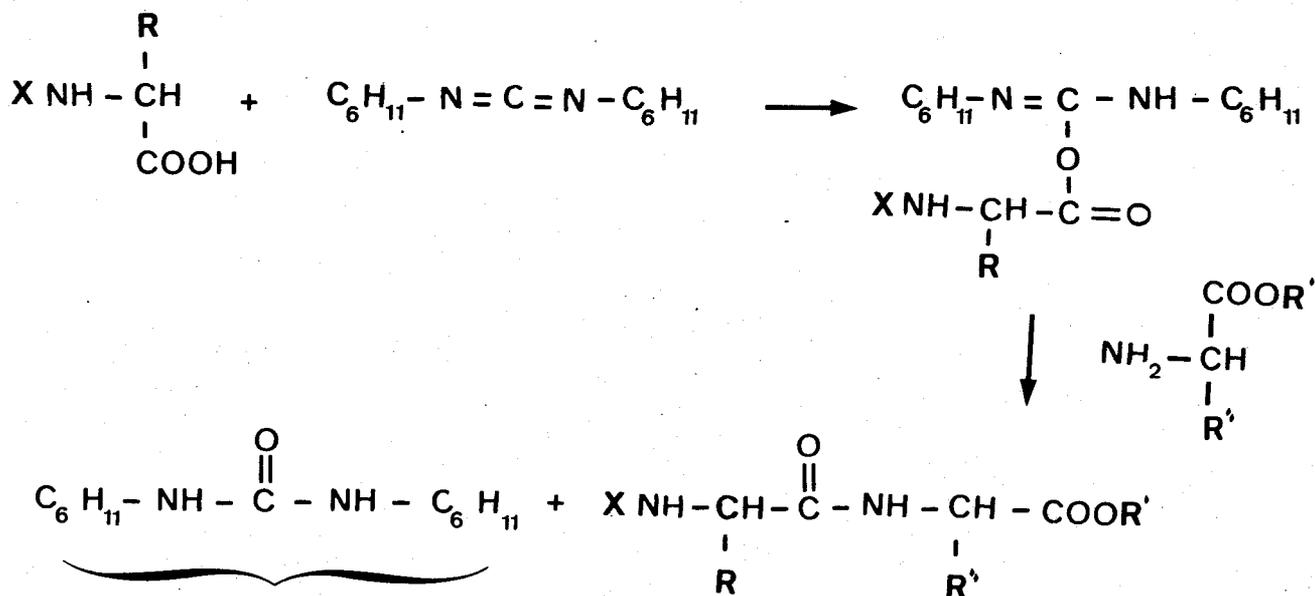
Le couplage entre acides aminés est facilité par l'activation de l'une des deux fonctions formant la liaison amide. L'introduction au niveau du réactif carboxylique d'un substituant électronégatif augmente la charge positive de l'atome de carbone et facilite l'attaque du groupement NH₂ libre de l'autre acide aminé.

A - Méthode aux carbodiimides

La stabilité des carbodiimides, leur réactivité à la température ambiante, les rendements importants et les faibles risques de racémisation ont permis à cette méthode d'être la plus utilisée.

- La N, N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) :

Les acides aminés, convenablement protégés, en solution dans les solvants organiques sont couplés en présence de DCCI (19) selon le schéma réactionnel suivant :



dicyclohexylurée (DCU)

La DCU est très faiblement soluble dans la plupart des solvants organiques.

L'anhydride le plus utilisé est le chloroformide d'isobutyle en raison des bons rendements obtenus (23) (petits peptides) ; on pourra ainsi l'utiliser d'une manière répétitive sans isolement des produits intermédiaires (24).

IV - VOIES DE SYNTHÈSE PEPTIDIQUE :

A l'heure actuelle, il existe deux voies pour la synthèse peptidique : l'une est manuelle (phase homogène) et l'autre automatique (phase solide).

A - Phase homogène :

- Principe : le couplage entre acides aminés se fait manuellement, par étapes discontinues, dans un milieu homogène, à basse température ; l'évolution du couplage est suivie par chromatographie sur couche mince (TLC).

La réaction terminée, le peptide est extrait par un solvant organique et les produits n'ayant pas réagi sont éliminés par des lavages acides et basiques.

- Stratégie de la synthèse : pour notre synthèse on a choisi d'accroître la taille de notre peptide par la méthode qui consiste à ajouter un acide aminé à la fois, qui réagira par son extrémité C-terminale, au lieu de préparer des fragments peptidiques qui seront réunis par la suite.

La première méthode a l'avantage de diminuer les risques de racémisation, malgré les faibles rendements et le nombre élevé de produits secondaires obtenus parfois, ce qui nécessite la mise en place d'une purification intermédiaire efficace.

B - Phase solide (MERRIFIELD) (25) :

Cette méthode de synthèse a l'avantage d'être rapide à cause de son automatisation mais conduit à la formation de sous-produits qui sont

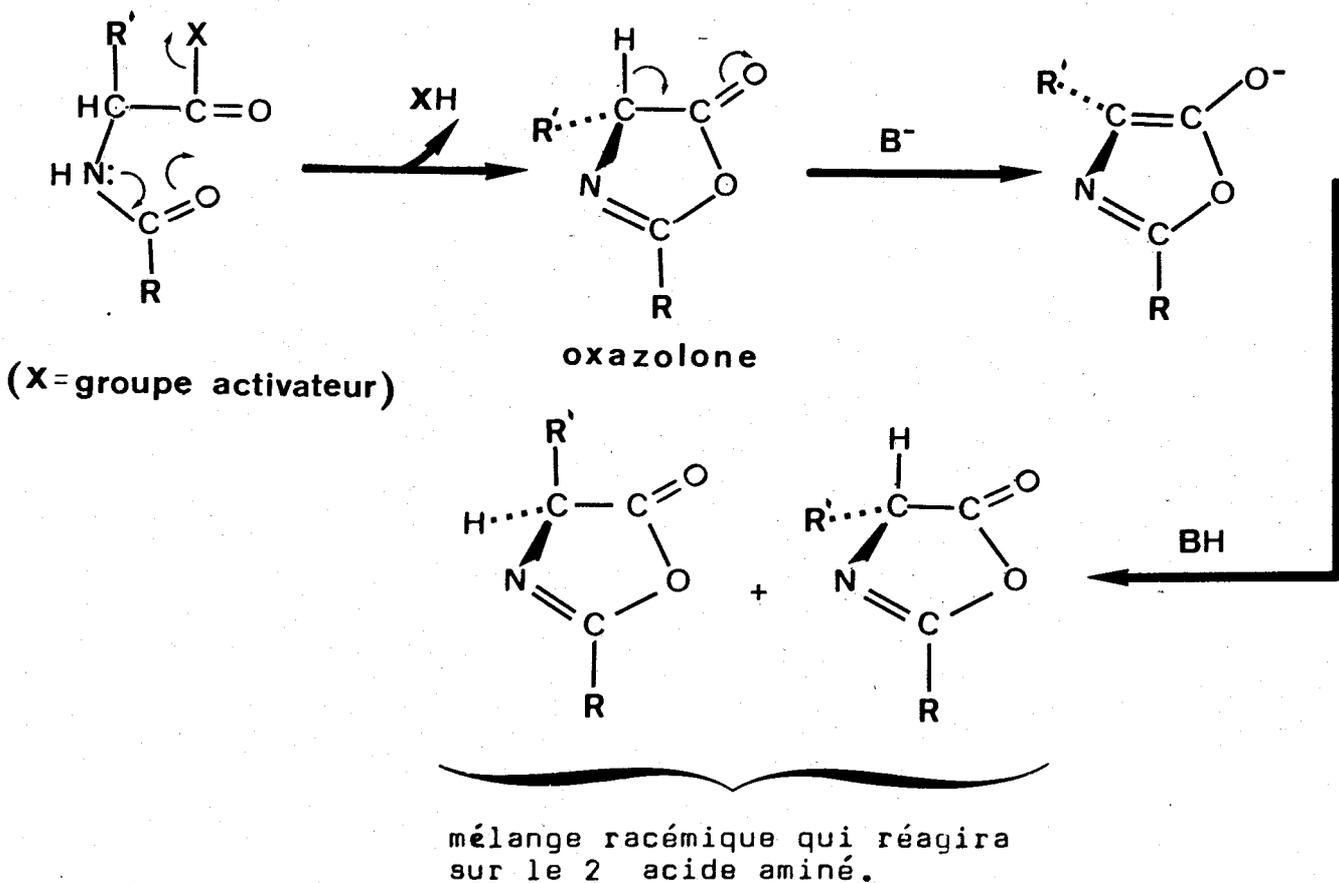
généralement difficiles à purifier.

Les produits purs, obtenus par cette méthode, contiennent souvent une quantité infime de métaux qui perturbent les analyses physiochimiques (RMN et DC) qu'on veut effectuer sur ces produits. C'est pour cela que cette voie de synthèse peptidique n'a pas été retenue pour notre synthèse.

V - PROBLEME DE RACEMISATION :

La configuration du carbone asymétrique, en synthèse peptidique, est l'un des facteurs fondamentaux qui déterminent l'activité biologique. Il est donc indispensable de prendre toutes précautions pour éviter cette racémisation qui peut survenir soit lors des opérations "protection/déprotection" des acides aminés, soit pendant la formation de la liaison peptidique.

- Mécanisme de la racémisation : Le mécanisme le plus couramment admis peut se formuler de la manière suivante :



- La racémisation peut être empêchée par différentes astuces :

- * travail à basse température
- * utilisation de solvants non polaires
- * ajouter des quantités, strictement nécessaires, de base ou d'acide pour effectuer la neutralisation
- * addition d'un inhibiteur de racémisation lors du couplage tel le 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) pour la DCCI.

CHAPITRE II

Partie Experimentale

Dans 10 ml de dioxanne et 10 ml d'eau, on dissout 5,3 g (36 mM) de glutamine ; en agitant la solution, on ajoute de la soude 2 N pour ajuster le pH vers 10,3. On ajoute alors goutte à goutte d'une part de l'azide qu'on vient de préparer, d'autre part de la soude 2 N pour garder le pH à 10,3. Au bout de 24 heures, on élimine l'azide en excès par extraction à l'éther (50 ml). La phase aqueuse dans laquelle est dissous le sel de t-Boc-Gln-OH, est acidifiée par l'acide citrique solide jusqu'à pH=3.

On libère ainsi l'acide de son sel de sodium.

On extrait la phase aqueuse acide 4 fois par 40 ml d'acétate d'éthyle chaque fois. On lave la phase acétate d'éthyle par 10 ml d'eau 2 fois. On sèche sur sulfate de sodium et on évapore le solvant sous vide au rotavapor à une température 40°C.

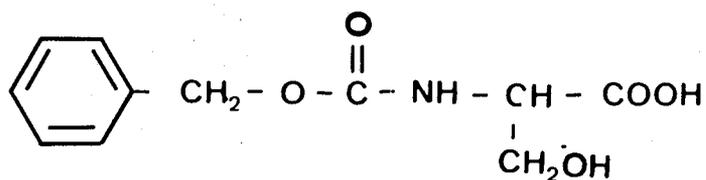
Rendement :

m th. = 8,86 g

R = 76,4 %

m obt. = 6,77 g

B - Préparation de Z-Ser(H)-OH



Dans 100 ml d'eau, on ajoute 6,25 g de l'oxyde de magnésium, pour maintenir la basicité de la solution ; puis on ajoute 5,25 g (49,95 mM) de Sérine. Le mélange est refroidi à 5°C, on ajoute 40 ml d'éther ; ensuite 13,2 g de chloroformiate de benzyle (Z-Cl) sont ajoutés : 1/4 immédiatement, 1/2 après 10 mn et 1/4 après 20 mn. On agite encore au bain de glace.

La réaction est terminée au bout de 3 heures.

On filtre sur Célite, on sépare l'éther, et on lave la phase aqueuse avec 3 x 30 ml d'éther. On libère l'acide aminé Z-Ser-OH de son sel de sodium par l'acidification à froid (0°C) avec l'acide chlorhydrique concentré qu'on ajoute jusqu'à pH=3.

On laisse à 4°C pendant une nuit pour obtenir le produit sous forme d'un précipité qu'on récupère par filtration. Le produit obtenu est séché sur P₂O₅, ensuite purifié par recristallisation à partir de 27,5 ml d'acétate d'éthyle et ensuite à partir de 25 ml d'eau. On obtient des cristaux fins, blancs. Fp=100-105°C

Rendement :

m th = 11,95 g

m obt = 7,6 g

R = 63,6 %

C - Préparation d'ester de méthyle

- HCl, H-Ser-OMe

Dans une solution de 120 ml de méthanol, 4,20 g de L-Sérine sont dissous. On fait buller un courant d'acide chlorhydrique sec pendant 5 à 10 minutes ; la réaction est fortement exothermique. Le mélange est refroidi dans un bain de glace. On laisse agiter à température ambiante 2 à 3 heures, ensuite on rotavapore et on reprend avec 50 ml d'éther. Après une nuit à 4°C, on obtient un précipité qu'on récupère par filtration ; le filtrat est remis à 4°C pour une nouvelle précipitation.

Le produit est purifié par recristallisation à partir de méthanol-éther éthylique (10-70 ml). La pureté de l'ester a été vérifié par chromatographie sur couche mince (CCM),
Fp = 148-150°C

Rendement :

m th = 6,22 g

R = 87 %

m obt = 5,41 g

- HCl, H-Ser-(oBZl)-OMe

Nous sommes partis de 1,06 g de L-Ser-(oBZl)-OH de 30,3 ml de méthanol et on a suivi le même protocole que celui de L-Ser-OH

Rendement :

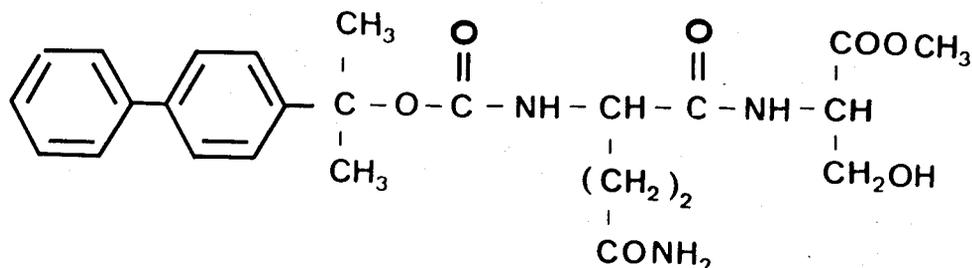
m th = 1,140 g

R = 75 %

m obt = 0,855 g

II - SYNTHÈSE DE DIPEPTIDES :

A - Synthèse de Bpoc-Gln-Ser-OMe



a) Libérer le Bpoc-Gln-OH de son sel de DCHA :

5 g de Bpoc-Gln-OH, DCHA sont dissous dans 40 ml de dichlorométhane (CH_2Cl_2). La solution obtenue est lavée avec 3 x 10 ml de tampon Citrate (0,5 mole d'acide citrique, pH=3,5). Les fractions du tampon Citrate sont rassemblées et lavées avec 10 ml de CH_2Cl_2 . Les phases CH_2Cl_2 rassemblées sont également lavées 3 fois avec 10 ml d'eau ; on relave l'eau avec 10 ml de CH_2Cl_2 . Le produit contenu dans les 60 ml de CH_2Cl_2 est séché sur MgSO_4 et le solvant évaporé sous vide. Le produit obtenu est mis à sécher sur P_2O_5 pendant une nuit.

b) Couplage "anhydride mixte" :

3,05 g de Bpoc-Gln-OH sont dissous dans 20 ml de THF à -5°C , on ajoute 1,15 ml d'iso-butylchloroformiate et 1,35 ml de Triéthylamine (TEA). Après une agitation vigoureuse pendant 4 mn à -5°C , on ajoute 1,46 g d'HCl, H-Ser-OMe et 1,35 ml de TEA.

Extraction :

Au bout d'une nuit, on filtre l'ensemble -Rotavapor. Le résidu obtenu est repris dans 50 ml d'acétate d'éthyle.

On lave avec 1 x 20 ml H₂O, 2 x 20 ml NaHCO₃ 0,5 M, 3 x 20 ml H₂O ;
on seche sur Na₂SO₄ et ensuite rotavapor.

Purification :

- recristallisation :

Après avoir essayé plusieurs couples solvant-précipitant, on n'a pas réussi à recristalliser le produit.

- chromatographie par filtration sur gel :

Après avoir déterminé par chromatographie sur couche mince le solvant à utiliser comme éluant, nous étions confrontés lors du passage du produit à deux difficultés :

Tout d'abord, l'impossibilité de contrôler par UV le passage du produit : cela est dû à l'intense absorption du groupe biphényl attaché au produit, qui masque l'absorption des autres impuretés. Ensuite, la difficulté majeure est telle que les impuretés accompagnent toujours le produit. Pour améliorer le fractionnement, on a essayé de diminuer la concentration du dépôt ; mais, même dans ces conditions, nous n'avons pas pu avoir de séparation effective du produit.

- Après toutes les tentatives infructueuses que nous avons effectuées en vue de purifier notre produit, nous sommes passés à l'étape suivante, qui consiste à débloquer, par coupure du Bpoc, la fonction amine du peptide ; ainsi il a été facile de recristalliser le produit.

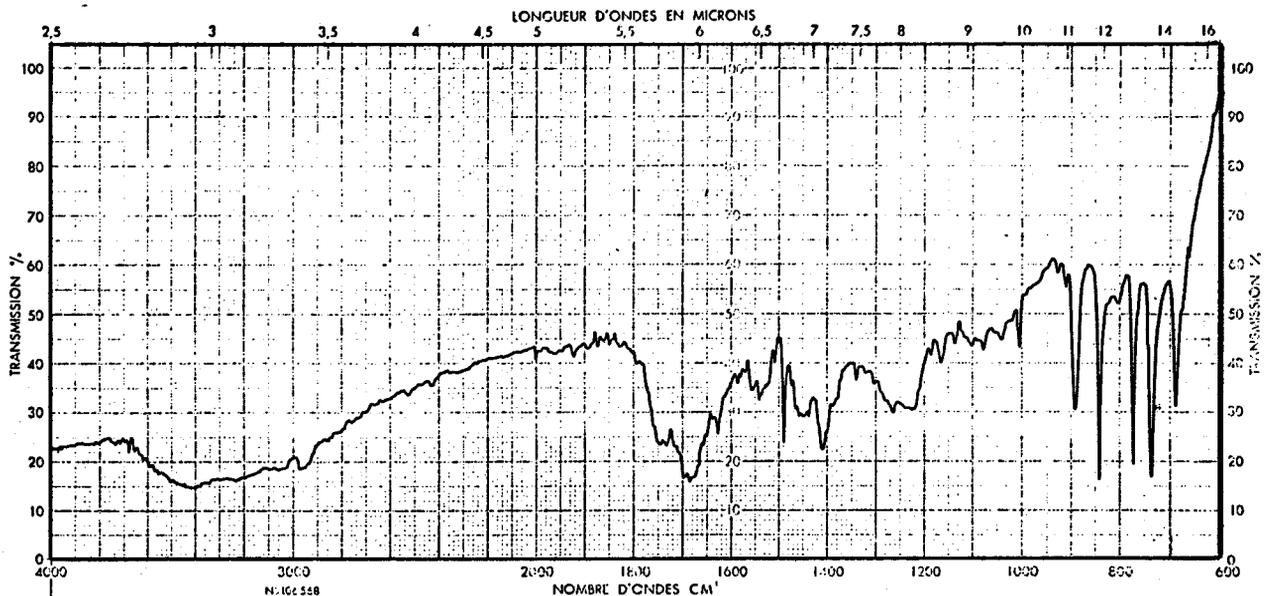
- Coupure du Bpoc : on prépare une solution d'acide acétique dans laquelle on fait buller un courant d'acide chlorhydrique sec jusqu'à saturation.

10 ml de la solution (HCl/acide-acétique) préparée, sont mélangés avec le Bpoc-Gln-Ser-OMe. On laisse agiter pendant une heure à la température ambiante et on évapore l'HCl/acide-acétique.

On dissout dans le méthanol chaud. Après une nuit à 4°C, le produit précipité est récupéré par filtration ; on fait un contrôle par une chromatographie CCM en milieu BAW et un spectre infrarouge.

$$Rf(\text{BAW}) = 0,28$$

Spectre IR obtenu : N°1



Remarque : D'après les chromatographies CCM et le spectre IR, la purification du produit obtenu n'est pas totale. On envisage donc de refaire le couplage mais cette fois avec la DCCI.

c) Couplage à la DCCI :

On dissout 2,27 g (5,9 mM) de Bpoc-Gln-OH dans 14,8 ml de dichlorométhane (10 ml/4mM). On ajoute 0,92 g d'HCl, H-Ser-OMe neutralisé par l'addition de 0,65 ml de N-méthylmorpholine (0,11 ml/1mM)

La solution est refroidie dans un bain de glace (0°C) pendant une demi-heure, on ajoute alors 1,22 g de DCCI. On laisse agiter une heure dans le bain de glace, et ensuite pendant une nuit à la température ambiante.

Extraction :

Après une nuit, on filtre la DCU. Le filtrat est lavé successivement, avec des portions de 15 ml des solutions suivantes : H₂O (une fois), NaHCO₃ 1 M (2 fois), H₂O (une fois), HCl (2 fois), H₂O (3 fois).

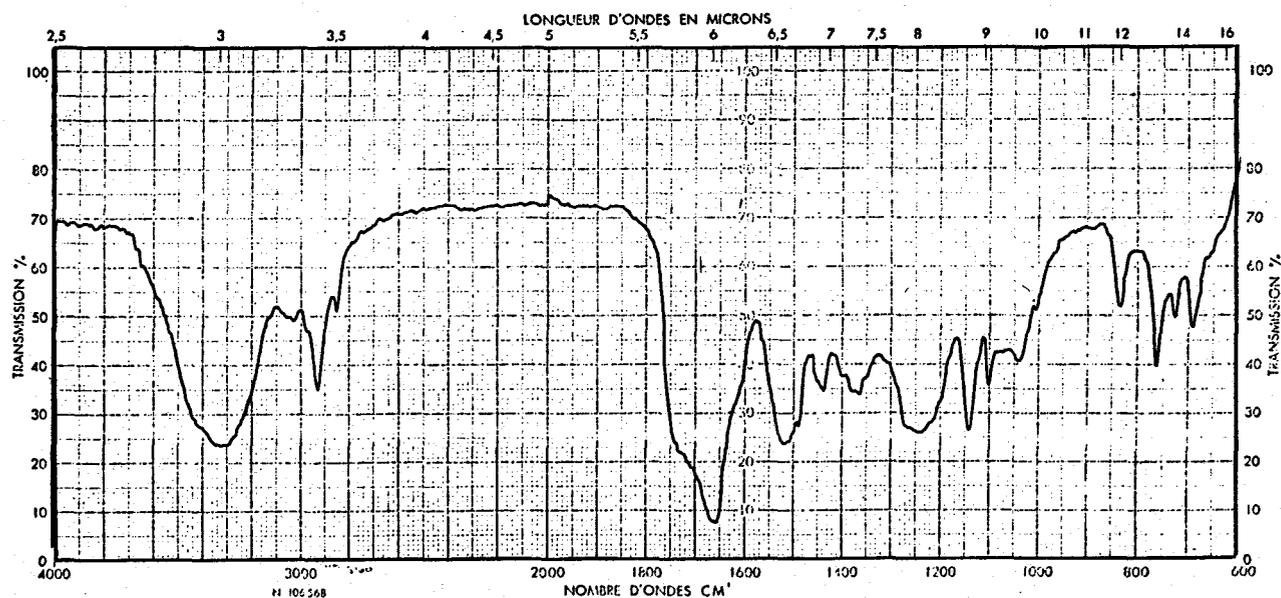
On sèche les phases organiques sur MgSO₄ et on évapore, à une température inférieure à 30°C, tous les solvants organiques.

Purification :

On dissout notre produit dans 5,4 ml d'acétate d'éthyle et on rajoute 27 ml de cyclohexane. Après une nuit à 4°C, on obtient un précipité qu'on récupère par filtration ; on fait une CCM et un spectre IR de ce précipité :

$$R_f(\text{produit}) = 0,16$$

Spectre IR du précipité. N° 2



$$m_{th} = 2,25 \text{ g}$$

$$R = 40 \%$$

$$m_{obt} = 1,18 \text{ g}$$

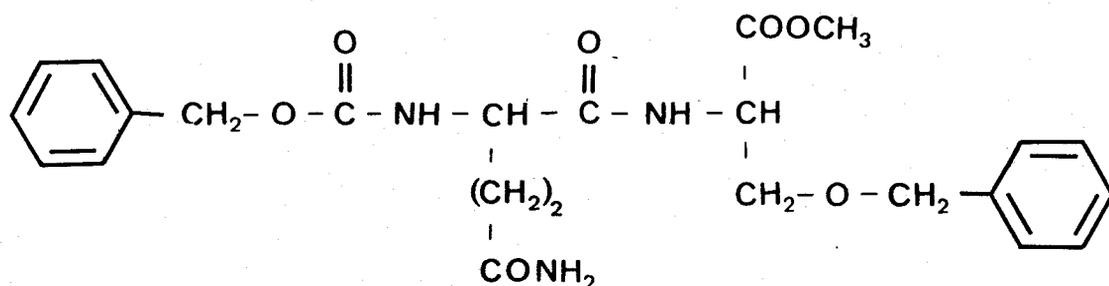
Commentaire :

D'après les CCM effectuées et le spectre IR obtenu, le

précipité contient toujours un peu d'impuretés et de DCU qui sont difficilement éliminées. On a donc attribué cette constatation à la présence de la fonction alcool de la sérine, qui n'était pas protégée.

Aussi, le rendement faible obtenu, nous mène à changer complètement de stratégie ; on a donc envisagé de protéger le (OH) de la sérine et de prendre comme groupe protecteur de la fonction amine le benzyloxycarbonyle (Z).

B - Synthèse de Z-Gln-Ser (Bzl)-OMe-(DCCI)



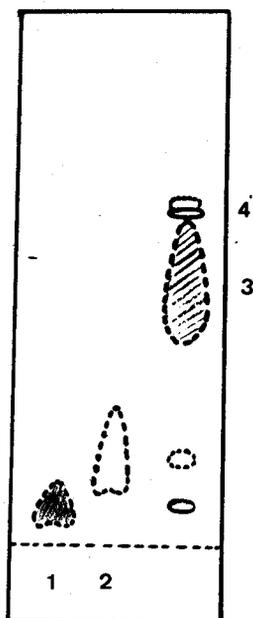
On met en suspension 245,7 mg (1mM) de HCl, H-Ser(BZl)-OMe dans 3 ml de DMF. On y ajoute 0,11 ml de N-méthylmorpholine pour neutraliser. La solution est mise dans un bain de glace. On y ajoute 280,3 mg (1mM) de Z-Gln-OH.

A la solution refroidie, on ajoute 206,3 mg de DCCI.

On laisse tourner une heure au bain de glace, puis la nuit à température ambiante.

Extraction :

Après une nuit, on filtre la DCU et on fait une CCM en milieu chloroforme-méthanol-acide acétique (CMA)



- Ninhydrine positif
- ⋯ UV positif
- ▨ Chlore-amidon positif

- 1 : H-Ser(Bzl)-OMe
- 2 : Z-Gln-OH
- 3 : Z-Gln-Ser(Bzl)-OMe
- 4 : Impureté

On dilue le filtrat avec 3 ml H₂O. On l'extrait avec 3 x 15 ml d'acétate d'éthyle et on fait une CCM de la phase DMF/H₂O et de la phase acétate d'éthyle ; le produit est entièrement passé dans l'acétate d'éthyle.

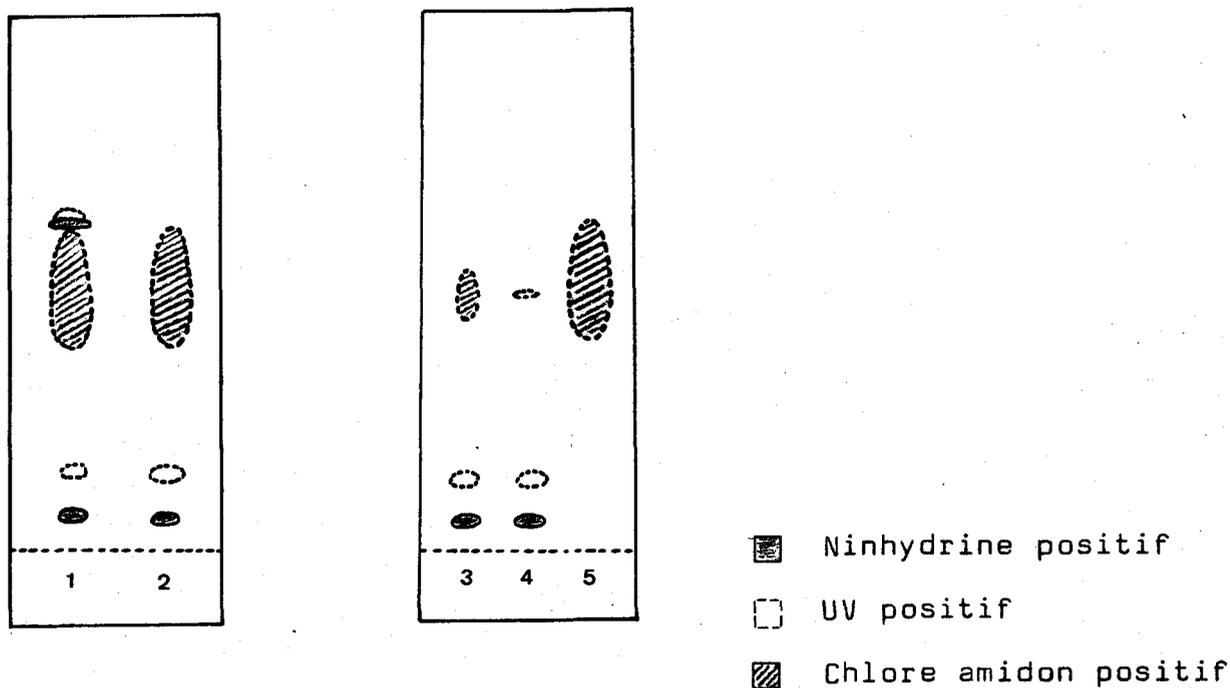
La phase acétate d'éthyle est lavée, successivement, avec des portions de 10 ml des solutions suivantes : H₂O (Une fois), HCl 1N (2 fois), H₂O (une fois), NaHCO₃ 1 M (2 fois), H₂O (2 fois).

On sèche la phase organique sur Na₂SO₄, on évapore le solvant sous vide.

Purification :

Tout d'abord on a réussi à éliminer l'impureté (4) associée au produit en utilisant 5 ml d'acétate d'éthyle et 20 ml d'éther de pétrole. Ensuite, après avoir évaporé le solvant et le précipitant, on a procédé, en 3 étapes, par une précipitation sélective, à la

récupération de tout le produit, ceci en utilisant 15 ml d'acétate d'éthyle et en laissant la solution une nuit à 4°C. Les CCM prises montrent cette étape de purification.



1 : le précipité obtenu après l'extraction et lavage

2 : précipité obtenu après l'Acétate d'éthyle-Ether de Pétrole (5/20 ml)

3 : le premier filtrat obtenu par recristallisation par 15 ml d'acétate d'éthyle

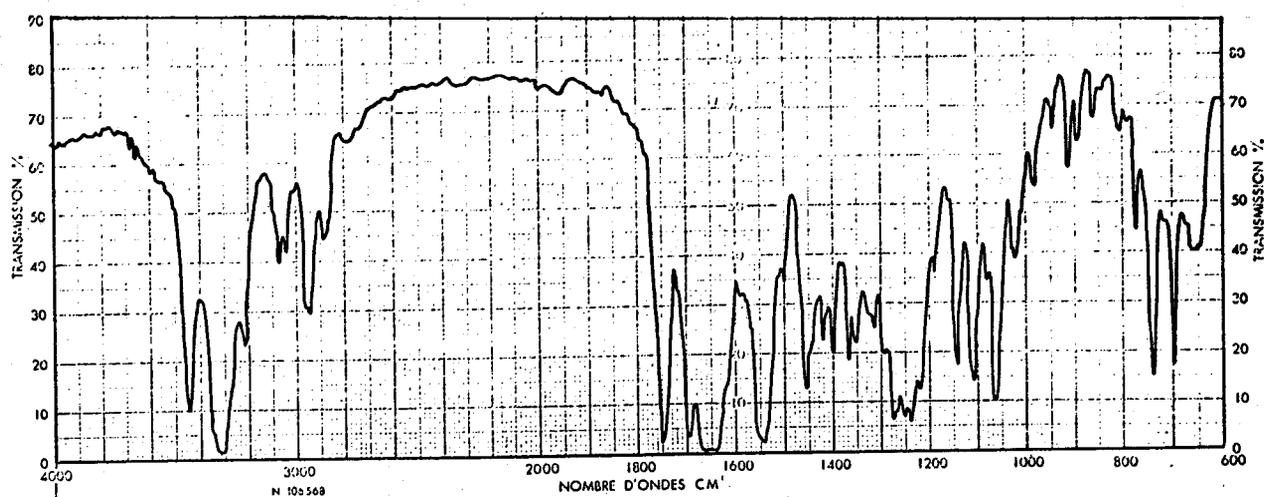
4 : le 3ème filtrat obtenu par recristallisation par 15 ml d'acétate d'éthyle

5 : l'ensemble du produit pur

RF du produit = 0,5

Spectre IR du produit pur

Spectre IR. N° 3



m th = 457 mg

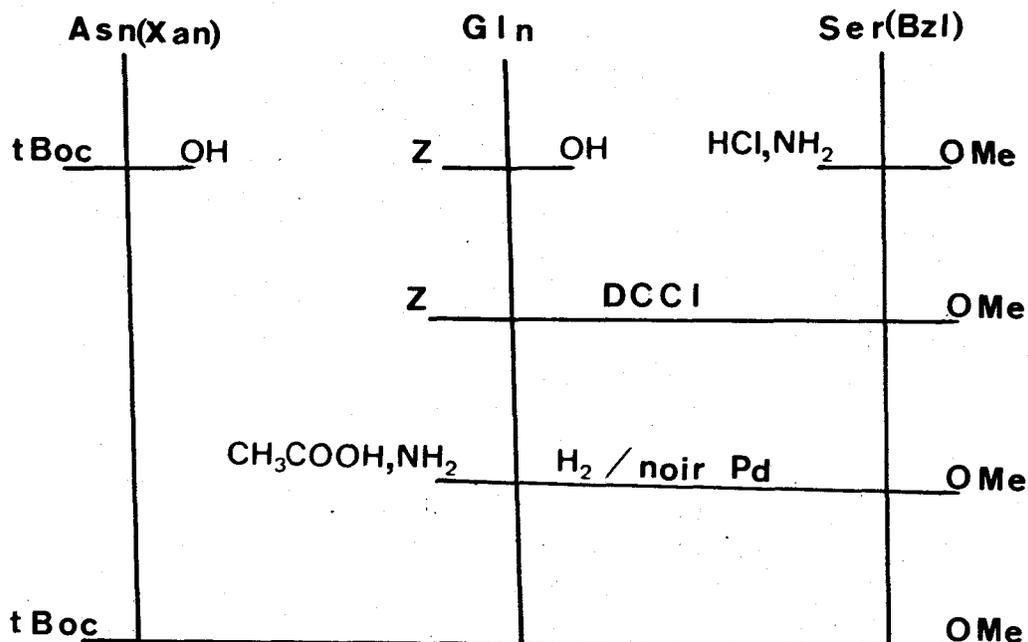
m obt = 356,5 mg

R = 78 %



III - SYNTHESE DU TRIPEPTIDE :

Le schéma de la technique retenue pour la synthèse du tripeptide tBoc-Asn(Xan)-Gln-Ser-OMe est le suivant :



Description de la synthèse :

A - Déprotection (NH₂) du dipeptide : Z-Gln-Ser(BZl)-OMe 246,9 mg

On a libéré la fonction amine en pratiquant une hydrogénéolyse dans le tertio-butanol (45 ml) en présence d'un catalyseur noir de palladium et de quelques gouttes d'acide acétique (0,3 ml).
 Préparation du catalyseur (noir de Pd) : on dissout à chaud 250-300 mg de PdCl₂ dans 20 ml d'HCl concentré et 30 ml d'eau.
 On ajoute de la potasse jusqu'au pH 8-9, on obtient un précipité de Pd (OH)₂. On ajuste le pH vers 5 avec l'acide formique, on obtient une solution transparente (H₂O) et un précipité noir (Pd). On filtre et on lave le précipité à l'eau, puis au méthanol et au t-butanol.
 NE JAMAIS LAISSER LE Pd SECHER, il doit toujours être trempé dans un solvant même lors de filtration ou de lavage.

Le Pd toujours recouvert d'un peu de t-butanol est transvasé, en faisant un trou en-dessous du filtre et rinçage avec du t-butanol, dans la solution à hydrogéner.

Mode opératoire : 246,9 mg de 3-Gln-Ser(Bzl)-OMe sont dissous à chaud dans 45 ml de butanol ; on ajoute alors 0,3 ml d'acide acétique et 250 mg de noir de Pd. En agitant la solution on fait buller l'hydrogène, ceci pendant une heure.

On fait une CCM pour s'assurer de la coupure du Z, ensuite on filtre le Pd et on évapore les solvants.

Rendement :

m th = 191,6 mg

R ≈ 94 %

m obt = 180 mg

B - Couplage avec tBoc-AsN (Xanthyl)-OH :

Une solution de 120 mg (0,33 mM) d'ACOH, H-Gln-Ser-OMe dans 3 ml de DMF est neutralisée par $36 \cdot 10^{-3}$ ml de N-méthylmorpholine. La solution est mise dans un bain de glace, on y ajoute 139,5 mg de Boc-AsN(Xan)-OH.

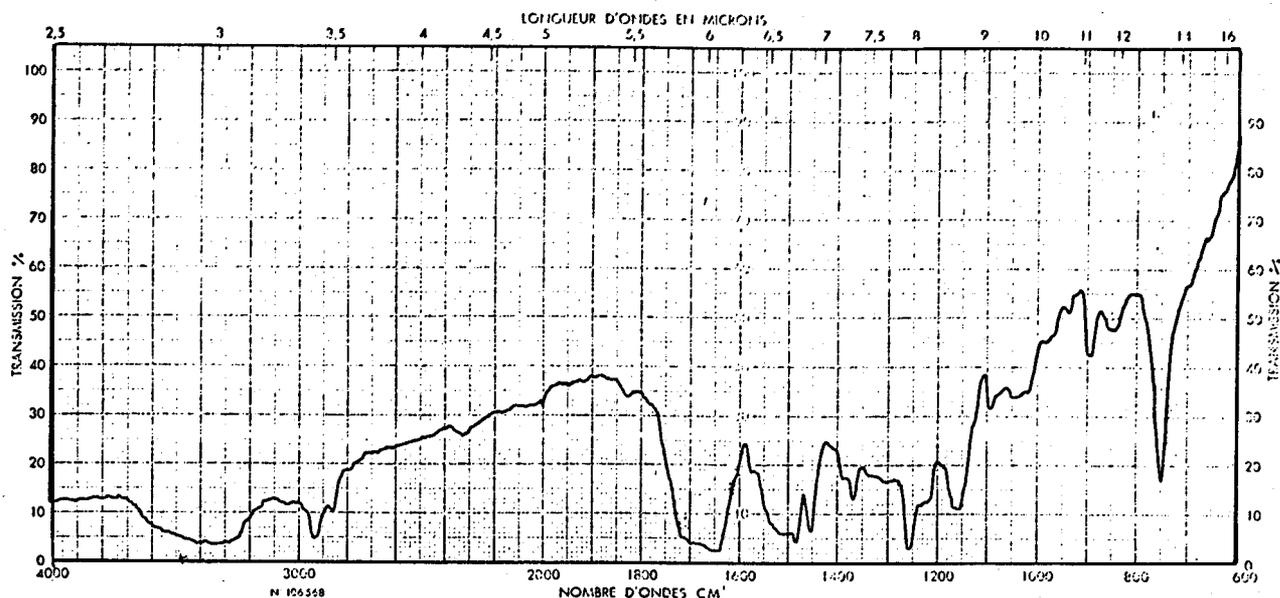
A la solution refroidie, on ajoute 67,6 mg de DCCI.

On laisse agiter une heure au bain de glace, puis la nuit à température ambiante.

Extraction et purification :

Après avoir filtré la DCU, on a essayé de traiter une partie du filtrat obtenu par addition de 20 ml d'eau, ce qui a entraîné une précipitation après une nuit à 4°C. L'analyse du précipité par CCM et par son spectre IR (n° 4) montre qu'il ne s'agit pas d'un produit pur ; il y a encore de la DCU et d'autres produits secondaires.

Spectre IR - N° 4



L'autre partie restant du filtrat, après filtration de DCU, est traitée comme suit : on a évaporé le DMF, utilisant une pompe et sans chauffage excessif ($<40^{\circ}\text{C}$) ; ensuite on a redissous le produit obtenu dans 2 x 25 ml d'acétate d'éthyle ; ce qui n'est pas soluble est éliminé par filtration.

On lave la phase acétate d'éthyle, successivement, avec des fractions de 30 ml des solutions suivantes : H_2O (une fois), NaHCO_3 1M (2 fois), H_2O (une fois), HCl (2 fois), H_2O (3 fois).

On sèche sur MgSO_4 et on fait une CCM et un spectre IR de contrôle.

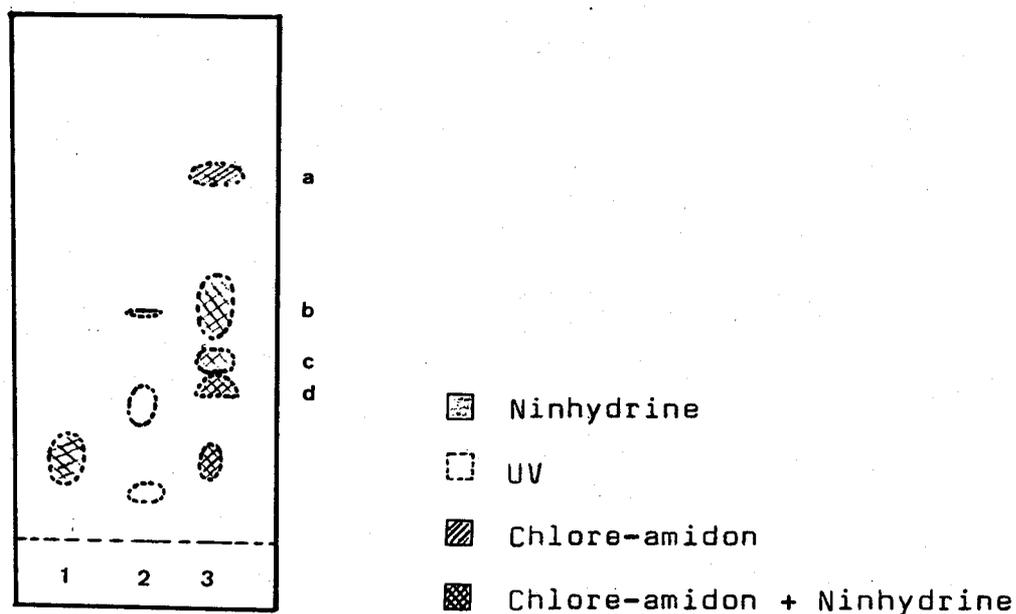
On évapore, à peu près, les 45 ml d'acétate d'éthyle et on reprecipite avec 20 ml d'éther de pétrole.

La CCM du précipité obtenu montre la disparition de la DCU attachée au produit, mais il reste à trouver parmi les nombreuses taches obtenues, celle qui correspondra au produit.

Remarque : le précipité obtenu ici est rassemblé avec celui obtenu par l'autre méthode de synthèse qui part d' HCl , HClN-Ser-OMe obtenu par coupure du Bpoc.

Recherche du RF du produit :

La CCM en milieu CMA du précipité obtenu est la suivante :



1) dépôt de Boc-ASN (X)-OH

$R_F \approx 0,2$ (coloration jaune-verdâtre)

2) dépôt de ce qui est insoluble dans l'acétate d'éthyle

3) dépôt de ce qui précipite par Ac-Eth/Ether de pétrole

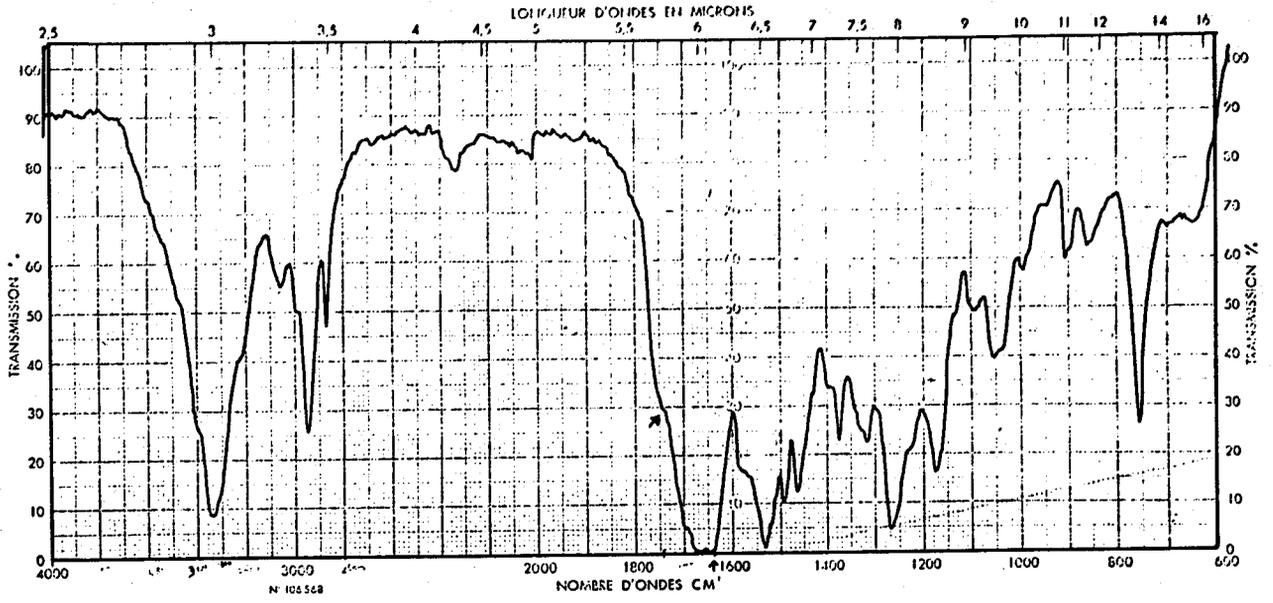
$R_F(a) = 0,7$; $R_F(b) = 0,4$; $R_F(c) = 0,35$;

$R_F(d) = 0,32$

L'insoluble dans l'acétate d'éthyle ne contient pas de peptide car on n'a pas de révélation chlore-amidon positif ; de plus, son spectre IR ne présente pas de bande amide.

Les taches du précipité (3) sont toutes chlore-amidon positif et leur spectre IR (n° 5) présente des bandes amides.

Spectre IR-N° 5



BUS
LILLE

Fractionnement du précipité : chromatographie par filtration sur gel

a) Schéma : voir appendice technique

b) Caractéristique de la colonne utilisée :

Il s'agit d'une colonne "Lobar" remplie avec de la silice de type (Si₆₀ : 25-40 μm).

L'éluant utilisé est le même que celui utilisé en chromatographie

sur couche mince : chloroforme-méthanol-acide acétique (760/40/24)

La quantité de produit déposé, chaque fois, est de l'ordre de 80 mg.

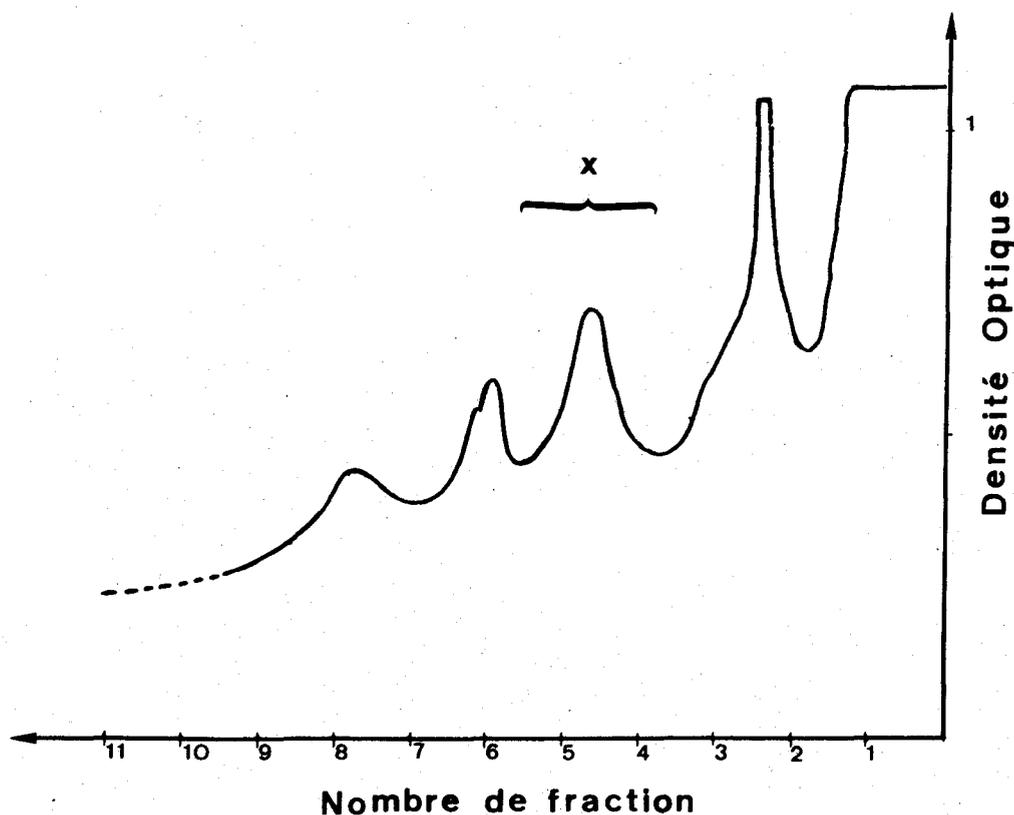
Le débit de la colonne est de 2 ml/minute.

La durée de chaque fractionnement est de l'ordre d'une heure.

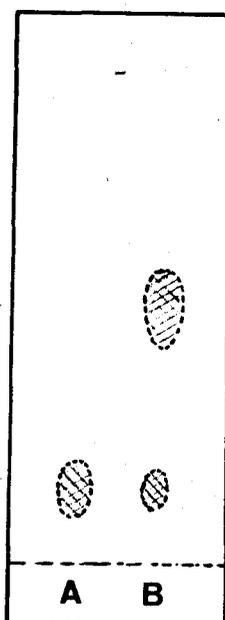
Le fractionnement est suivi par la variation d'absorption (UV)

correspondant au passage des différents produits.

c) Courbe de variation d'absorption lors du fractionnement :



d) Contrôle du fractionnement par CCM :



A : dépôt de Boc-AsN (X)-OH (témoin)

B : dépôt de la fraction **x**

e) Analyse automatique d'acides aminés de la fraction "**x**" :

Cette technique permet de s'assurer de la nature des acides aminés contenus dans la fraction **x**

Résultat : La fraction **x** comprend 3 acides aminés, AsN, Gln et Ser dans les proportions suivantes : 2, 1, 1.

Ce résultat confirme celui obtenu par CCM. On est donc en présence de tripeptide Boc-AsN(X)-Gln-Ser-OMe et un peu de Boc-AsN(X)-OH qui ne perturbera pas la suite de notre synthèse.

Le R_f dans le milieu (CMA : 760/40/24) du Boc-AsN(X)-Gln-Ser-OMe est de l'ordre de 0,4.

CHAPITRE III

Appendice Technique

I - TECHNIQUES DE CONTROLE

Pour contrôler nos réactions chimiques on utilise, le plus souvent, trois techniques à savoir :

A - Chromatographie sur couches minces :

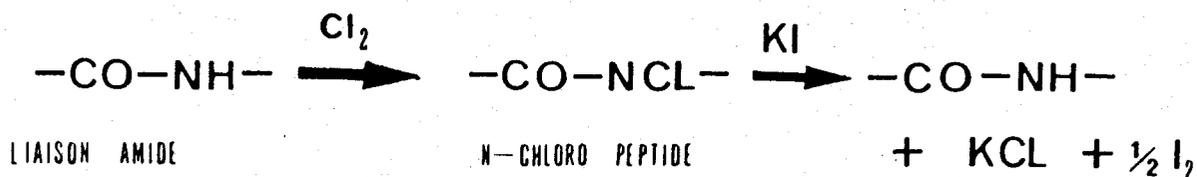
Cette technique permet de suivre l'évolution des réactions de couplage ou de protection et de vérifier la pureté des produits intermédiaires. L'éluant utilisé pour les peptides protégés est le mélange (CMA):chloroforme, méthanol, acide acétique en proportions : 190/10/6. Mais pour les peptides libres et chlorhydrates d'ester, on utilise le mélange (BAW) : n-butanol (40 %), acide acétique (10 %), eau (50 %). Les chromatogrammes sont laissés sécher et ensuite révélés.

On a utilisé trois méthodes de révélation :

1 - Révélation par lumière UV : utilisée quand les produits possèdent des groupements actifs en UV.

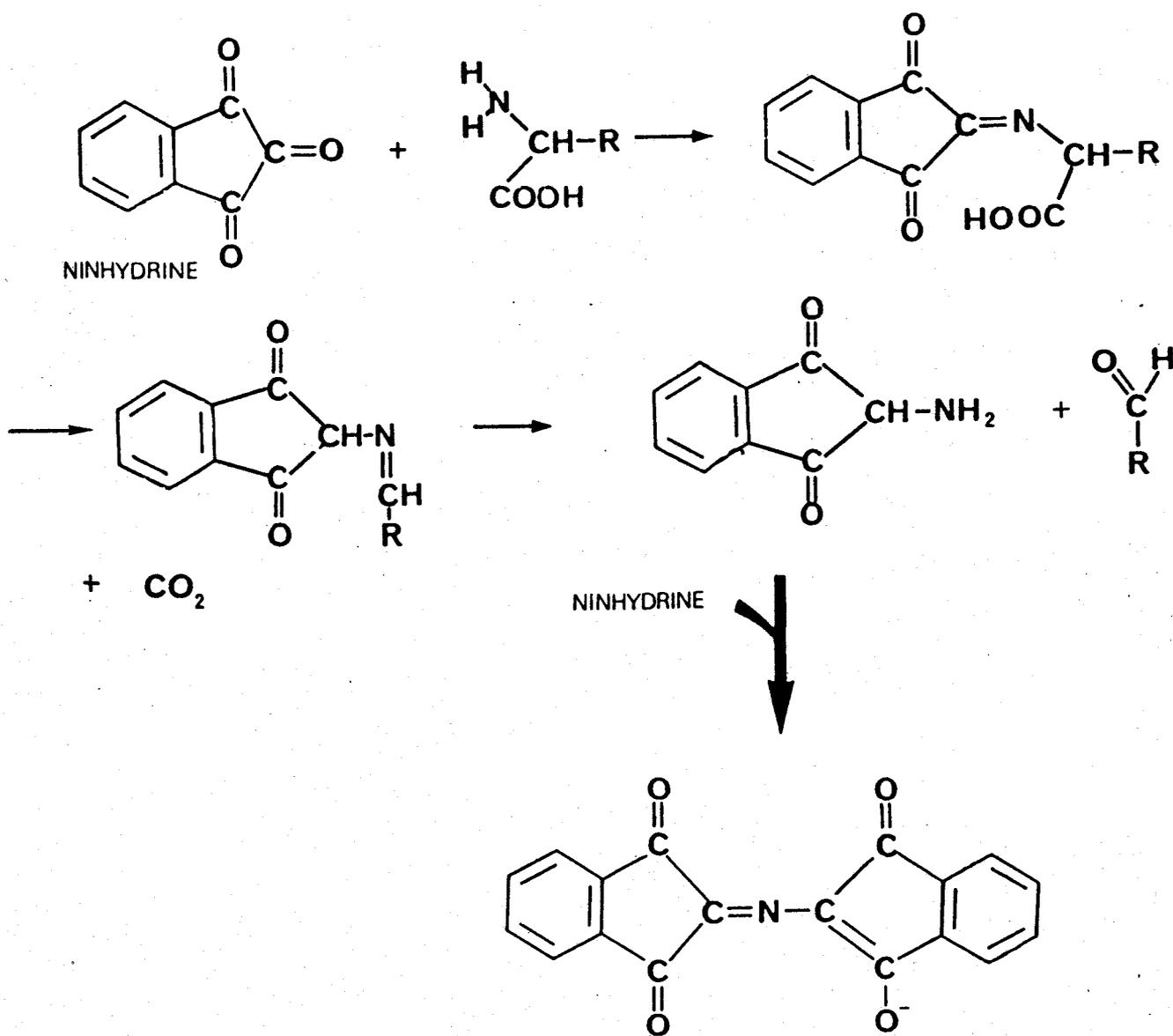
2 - Révélation par la Ninhydrine : on pulvérise ce réactif sur les chromatogrammes qui sont ensuite placés 10 minutes à l'étuve à 110°C. Il se développe une coloration rose pour tous les amino-acides ou peptides à extrémité N-terminale libre, excepté les peptides à proline N-terminale qui eux se colorent en jaune (Fig. 2).

3 - Révélation par le chlore-amidon : d'après Rydon et Smith (26) modifiée par Pan et Dutcher (27), cette méthode est utilisée pour mettre en évidence la présence de liaisons amides qui donnent une coloration bleue au contact de l'iode libre.



Les bandes latérales sont imprégnées par pulvérisation d'une solution d'hypochlorite de sodium diluée au 1/3 (produit commercial contenant 13-14 % de chlore activé). Après ventilation pendant 2 à 3 h, on pulvérise une solution chaude du mélange amidon soluble 1 %, KI 1 %. Il se forme alors des taches bleues sur fond blanc qui virent lentement au marron.

Figure. 2



FORMATION DU POURPRE DE RUHEMAN

B - Spectroscopie infra-rouge :

Cette technique nous sert à contrôler l'existence des fonctions que devrait contenir notre produit, notamment les fonctions amides.

C - Analyse automatique d'acides aminés :

Cette analyse nécessite une hydrolyse totale du produit (peptide ou protéine) : 240 à 450 nanomoles de peptide sont mélangées dans un tube scellé avec 1,5 ml d'HCl 5,6 N. Le mélange est laissé à 110°C pendant 24 heures. On obtient donc une hydrolyse totale de ce peptide. La composition en résidus d'acides aminés est réalisée automatiquement par un appareil Jéol type 5 AH.

II - TECHNIQUES DE PURIFICATION

La purification est l'étape la plus difficile en synthèse peptidique et une même technique de purification n'est en général pas applicable à des produits différents.

Pour nos synthèses, on a utilisé deux techniques de purification :

A - Technique de cristallisation (précipitation) :

C'est la technique la plus utilisée en chimie organique. On emploie un couple (solvant/précipitant) qui permet de reprécipiter, sélectivement, le produit. La difficulté pour cette technique est de trouver le précipitant adéquat qui permettra de cristalliser sélectivement le produit.

B - Technique de chromatographie par filtration sur gel :

C'est la technique de purification la plus efficace.

Elle est, en général, pratiquée pour éliminer les produits secondaires qui précipitent en même temps que le produit.

Pour augmenter la résolution de la colonne, on applique une pression donnée par une pompe intégrée dans le circuit, comme le montre le schéma (Fig. 3). Ainsi, en quelques dizaines de minutes, on peut purifier 50 à 100 mg de produit.

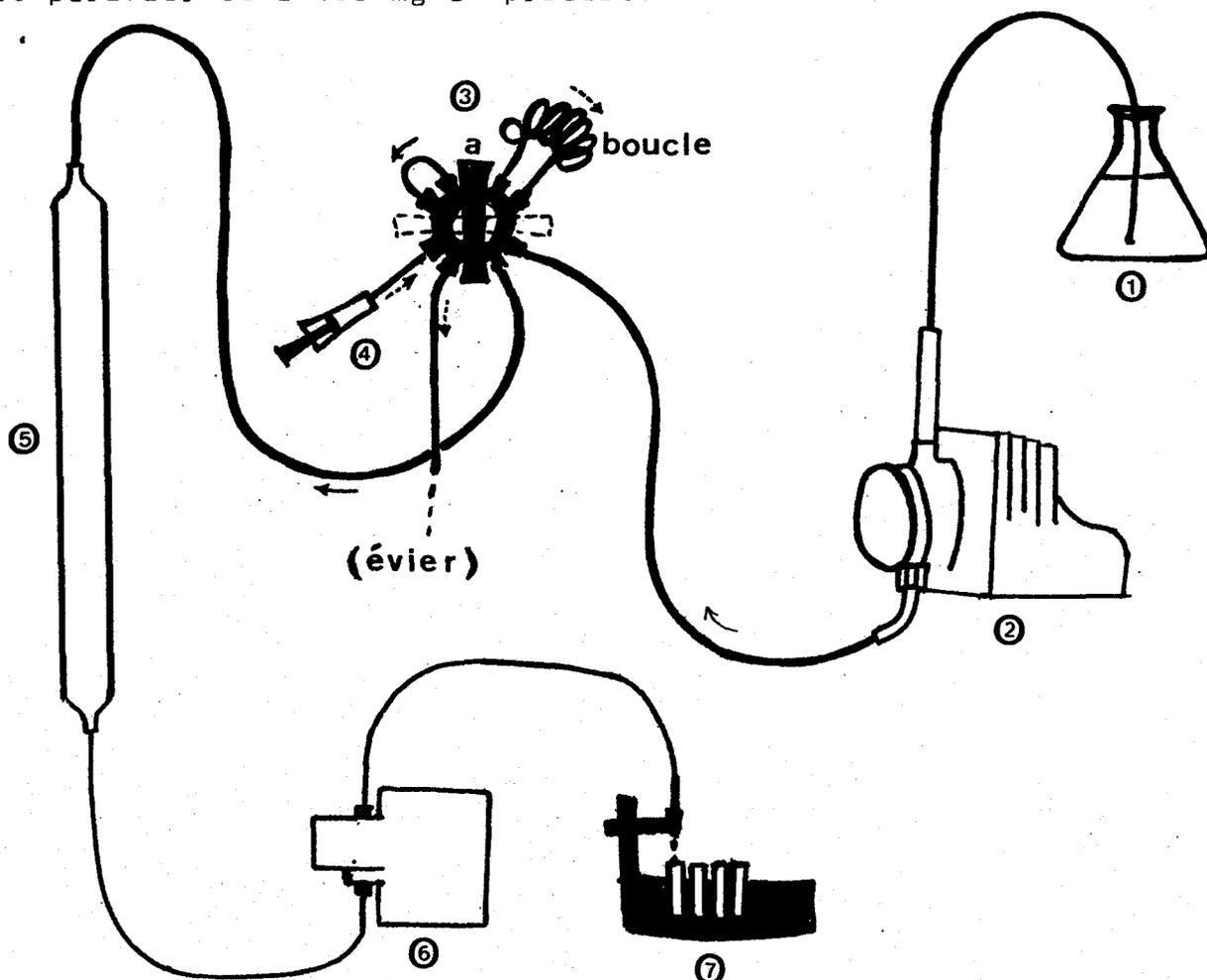


Fig. 3.- Schéma du montage de chromatographie par filtration sur gel qui a été utilisé. Ce montage comprend : l'éluant ① ; une pompe ② ; un régulateur ③ qui comprend un robinet ③ qui régule le passage de l'éluant (position verticale) ou bien celui de l'échantillon (position horizontale) ; un système d'injection ④ ; une colonne remplie avec de la silice ⑤ ; un détecteur ⑥ ; et un collecteur ⑦.

CONCLUSION

CONCLUSION

L'intérêt de ce travail ne réside pas uniquement dans la comparaison des différentes techniques qui peuvent être appliquées à la synthèse d'un tripeptide. Mais il a permis surtout de trouver une technique efficace pour synthétiser le tripeptide Asn-Gln-Ser, qui représente l'étape-clé dans la synthèse du cyclohexapeptide glycosylable par le complexe enzymatique de glycosylation.

Sachant que ce cyclohexapeptide jouera le rôle de substrat enzymatique, il doit donc répondre à toutes les exigences de pureté. La présence de métaux inhibe l'enzyme et fausse les résultats obtenus en RMN. C'est pour cela que nous avons utilisé la synthèse en phase liquide qui est la seule à répondre à ces exigences.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - AUBERT, J.P. ; CHIROUTRE, M. ; KERCKAERT, J.P. ; HELBECQUE, N.
et LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H.
Biochem. Biophys. RES. Commun. (1982), 104, 1550-1559
- 2 - CHIROUTRE, M.
DEA. Chi. Orga. Macro. (1981), 16-18
- 3 - MARSHALL, R.D. et NEUBERGER, A.
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. (1970), 25, 407-478
- 4 - AUBERT, J.P.; HELBECQUE, N. et LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H.
Arch. Biochem. Biophys. (1981), 207, 20-29
- 5 - AUBERT, J.P. ; BISERTE, G. et LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H.
Arch. Biochem. Biophys. (1976), 175, 410-418
- 6 - SCHNABEL, E.
Ann. Chem. (1967), 702, 188-196
- 7 - MERRIFIELD, R.B.
Adv. Enzymol. (1969), 32, 221-296
- 8 - BERGMANN, M. et ZERVAS, L.
Ber. Deut. Chem. Ges. B. (1932), 65, 1192-1201
- 9 - SIEBER, P. et ISELIN, B.
Helv. Chim. Acta. (1968), 51, 622-632
- 10 - IZUMIYA, N. ; S.C. ; FU ; BIRNBAUM, S. M. et GRE, J.P.
J. Biol. Chem. (1953), 205, 221
- 11 - BOISSONNAS, R.A. ; GUTTMANN, S. ; JACQUEMOND, P. A. et WALLER, J.P.
Helv. Chim. Acta. (1955), 38, 1491
- 12 - Mc LAREN, J.A.
Aust. J. Chem. (1958), 11, 360
- 13 - ABDERHALDEN, E. et FODOR, A.
Ber. Deut. Chem. Ges. (1928), 176, 101

- 14 - FUNKEN, G.S. et JOHNSON, W.S.
J. Am. Chem. Soc. (1952), 74, 831-833
- 15 - ANDERSON, G.H. et CALLAHAN, F.M.
J. Am. Chem. Soc. (1960), 82, 3359-3363
- 16 - HUBLAU, P.
Thèse. Doct. Etat. Pharma. (1975) 45-47
- 17 - SHIMONISHI, Y. ; SAKAKIBARA, S. et AKABORI, S.
Bull. Chem. Soc. Jpn. (1962), 35, 1966-1970
- 18 - HRUBY, V.J. et EHLER, K.W.
J. Org. Chem. (1970), 35, 1690
- 19 - SHEEHAN, J.C. et HESS, G.P.
J. Am. Chem. Soc. (1955), 77, 1067-1068
- 20 - SHEEHAN, J.C. ; PRESTON, J. et CRUICKSHANK, P.A.
J. Am. Chem. Soc. (1965), 87, 2492-2493
- 21 - KOENIG, W. et GEIGER, R.
Chem. Ber. (1970), 103, 788-798
- 22 - BOISSONNAS, R.A.
Helv. Chim. Acta. (1951), 34, 874
- 23 - VAUGHAN, J.R. et OSATO, R.L.
J. Am. Chem. Soc. (1952), 74, 676
- 24 - BEYERMAN, H.C.
Ann. Arbor. Chem. Biol. Pept. Proc. (1972), 1, 351-357
- 25 - MERRIFIELD, R.B.
J. Am. Chem. Soc. (1963), 85, 2149-2154
- 26 - RYDON, H.N. ; et SMITH, P.W.G.
Nature. (1952), 169, 922-923
- 27 - PAN, S.C. et DUTCHER, J.D.
Analytical. Chem. (1956) 28, 836-838