

## Liste des abréviations

### A

**ACN** : Acétonitrile

**AcOEt** : Acétate d'éthyle

**AMPA** : acide 2-amino-3-(3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolyl)-propionique

**AMPARs** : Récepteurs AMPA

**APTS** : Acide paratoluenesulfonique

**Ar** : Aryle

**ATP**: Adenosine Triphosphate

### B

**Bn**: Benzyle

**Boc** : *Tert*-butyloxycarbonyle

**(Boc)<sub>2</sub>O**: Dicarbonate de di-*tert*-butyle.

**BOP**: 1-Benzotriazolyl-oxo-tris-diméthylamino-phosphonium hexafluorophosphate

### C

**CCM**: Chromatographie sur couche mince

**Chex** : Cyclohexane

### D

**DCC** : Dicyclohexylcarbodiimide

**DIC** : Diisopropylcarbodiimide

**DIEA** : Diisopropyléthylamine

**DCM**: Dichlorométhane.

**DMAP**: Diméthylaminopyridine

**DMSO**: Diméthylsulfoxyde

**DMF** : Diméthylformamide

### E

**EAATs** : Transporteurs d'acides aminés excitateurs

**EtOH** : Ethanol

**Et** : Ethyl

**Eq** : Equivalent

**ESI** : Ionisation électrospray

**ee** : Excès énantiomérique

## **G**

**GABA** : Acide  $\gamma$ -aminobutyrique

**GluR** : Récepteur du Glutamate

**GluTs** : Transporteurs du Glutamate

## **H**

**HEPES** : Acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonique

**HMPA** : Hexamethylphosphotriamide

**HPLC** : Chromatographie liquide haute performance (ou pression)

**HRMS** : Spectrométrie de masse à haute résolution

## **I**

**iBu** : Isobutyle

**iPr** : Isopropyle

**iGluRs** : Récepteurs Ionotropiques du glutamate

## **K**

**KA** : Acide Kaïnique

**KARs** : Récepteurs de kaïnate

**KHMDS** : Hexamethyldisilazane de potassium

## **L**

**LDA** : Diisopropylamidure de lithium

**LiHMDS** : Hexamethyldisilazane de lithium

## **M**

**MeOH** : Méthanol

**Me** : Méthyle

**mGluRs** : Récepteurs Métabotropiques du glutamate

**MTT** : Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium

**MS** : Spectrométrie de masse (Mass spectrometry)

**M.O** : Micro-ondes

**N**

**NE** : norépinephrine

**NMDA** : Acide N-méthyl-D-aspartique

**NMDARs** : Récepteurs NMDA

**NMM** : N-méthyl morpholine

**P**

**Pf** : 9-phenylfluorenyle

**P<sub>f</sub>** : Point de fusion

**R**

**Rdt** : Rendement

**Rf** : Rapport frontal

**RMN-<sup>13</sup>C** : Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone 13

**RMN-<sup>1</sup>H** : Résonance Magnétique Nucléaire d'Hydrogène

**Rd** : Rapport diastéreoisomérique

**RX**: Rayons X

**S**

**SNC** : Système Nerveux Central

**T**

**TEA** : Triéthylamine

***t*Bu** : *Tert*butyle

**TFA** : Acide Trifluoroacétique

**THF** : Tétrahydrofurane

**tr** : Temps de rétention

**Tr** : Trityle

**TTX** : Tétrodotoxine

**V**

**VGluTs** : Transporteurs vésiculaires du glutamate

**Z**

**Z** : Benzyloxycarbonyle

**Acides aminés:**

**Ala**: Alanine

**Asp** : Acide Aspartique

**Cys** : Cystéine

**Gln** : Glutamine

**Glu** : Acide Glutamique

**Gly** : Glycine

**His**: Histidine

**Phe**: Phénylalanine

**Pro** : Proline

**Ser** : Sérine

**Trp** : Tryptophane

**Val** : Valine

# *Table de Matière*

<b>Liste des abréviations</b>	6
<b>Introduction</b>	14
<b>Chapitre I : Situation Bibliographique</b>	17
<b>I. 1 Introduction</b>	18
<b>I. 2 Propriétés physicochimiques de la L-Théanine :</b>	18
<b>I. 3 L'activité biologique de la L-théanine</b>	20
I. 3. 1 L'absorption et le métabolisme de la L-théanine	20
I. 3. 1. 1 Absorption de la L-théanine dans le tractus gastrointestinal	20
I. 3. 1. 2 Métabolisme de la L-théanine	22
I. 3. 2 Hypertension	23
I. 3. 3 Effet de relaxation	24
I. 3. 4 Activité anti-tumorale	25
I. 3. 5 Effet de la théanine sur le système nerveux central	26
I. 3. 5. 1 Neuroprotection	26
I. 3. 5. 2 Effet de la théanine sur les neurotransmetteurs	27
✓ Norépinephrine	27
✓ Sérotonine	28
✓ Dopamine	28
<b>I. 4 La synapse glutamatergique</b>	29
I. 4. 1 Généralités sur la synapse	29
I. 4. 1. 1. Les différents types de synapses	29
a/ Synapses chimiques	29
a. 1. La synapse inhibitrice	29
a. 2. La synapse excitatrice	30
b/ Synapses électriques	30
I. 4. 2 Structure générale de la synapse glutamatergique	30
I. 4. 3 Transmission synaptique excitatrice « glutamate »	30
I. 4. 4 Les récepteurs du glutamate	31
I. 4. 4. 1. Les récepteurs-canaux « ionotropiques » iGluR	31
I. 4. 4. 1. 1. Les récepteurs NMDA : NMDA-R	33
I. 4. 4. 1. 1. 1 Les agonistes de NMDA-R	33
I. 4. 4. 1. 1. 2 Les antagonistes de NMDA-R	34
a/ Les antagonistes compétitifs	34
b/ Les antagonistes non compétitifs	35
I. 4. 4. 1. 2. Les récepteurs autres que le NMDA-R	36

I. 4.4.1.2.a. Les récepteurs AMPA	37
I. 4.4.1.2.a.1 Les agonistes de AMPA-R	37
I. 4.4.1.2.a.2 Les antagonistes de AMPA-R	38
a/ Antagonistes compétitifs	38
b/ Antagonistes non compétitifs	39
I. 4.4.1.2.b. Les récepteurs Kianate	40
I. 4.4.1.2.b.1 Les agonistes de KA-R	40
I. 4.4.1.2.b.2 Les antagonistes de KA-R	42
I. 4.4.2. Les récepteurs métabotropiques mGluR	43
I. 4.5 Effet de la théanine sur les récepteurs NMDA	44
<b>I. 5 La biosynthèse et l'extraction de la L-théanine</b>	<b>45</b>
I. 5.1 La théanine et le thé	45
I. 5.1.1 Biosynthèse de la L-théanine	47
I. 5.1.2 Extraction du thé	48
I. 5.1.2.1 Méthode d'identification et de détection	48
I. 5.1.2.2 Séparation et isolation	50
<b>I. 6 La synthèse chimioenzymatique de la L-théanine</b>	<b>51</b>
I. 5.2.1 A partir de l'acide glutamique	52
I. 5.2.2 A partir de la glutamine	55
I. 5.2.3 A partir de l'ester méthylique de l'acide glutamique	60
<b>Chapitre II : Résultats et Discussions</b>	<b>62</b>
<b>II. 1 Objectifs</b>	<b>63</b>
<b>II. 2 Synthèse de la théanine</b>	<b>65</b>
II. 2.1 La synthèse chimique de la L-théanine	65
II. 2.1.1 A partir de l'acide pyroglutamique	65
II. 2.1.2 A partir de dérivés de l'acide glutamique	66
II. 2.1.3 A partir du $\gamma$ -ester de l'acide glutamique	68
II. 2.2 Optimisation la synthèse de la théanine	70
II. 2.2.1 Réaction d'amidification	71
II. 2.2.1.a Méthode I	71
II. 2.2.1.b Méthode II	76
II. 2.2.2 Déprotection de la théanine protégée	82
<b>II. 3 Synthèse des analogues 5-N-substitués de la L-théanine</b>	<b>84</b>
II. 3.1 Synthèse des analogues N <sup>5</sup> -alkylés	84
II. 3.2 Synthèse des $\gamma$ dipeptides de l'acide glutamique, analogues de la L-théanine	88
II. 3.2.1 Généralités	88
II. 3.2.2 Stratégies de synthèse	91
a/ Orthogonalité des groupements protecteurs	91
b/ Couplage	91
II. 3.2.3 Hydrolyse des esters des $\gamma$ -dipeptides de l'acide glutamique	93
II. 3.2.4 Hydrogénolyse des dérivés dipeptidiques Z-Glu(Xaa-OH)-OH)	95

<b>II. 4 Synthèse de dipeptides contenant la L-théanine</b>	97
II. 4. 1 Formation de la liaison peptidique	98
II 4. 2 Stratégie de préparation de la série H-5-NEt-Gln-Xaa-OH	99
II. 4. 2. a Couplage	99
II. 4. 2. b Hydrolyse de l'ester OtBu	101
II. 4. 2. c Amidification des composés de type Z-Glu-Xaa-OBn	102
II. 4. 2. d Déprotection finale : Hydrogénation catalytique des Z-Glu(NR)-Xaa-OBn	104
II 4. 2. e Déprotection finale des dipeptides Z-Glu-Xaa-OBn	105
II. 4. 3 Stratégie de préparation de la série : H-Xaa-5-NEt-Gln-OH	107
II. 4. 3. 1 Réaction d'amidification sur le (S)-Boc-Glu-OBn	108
II. 4. 3. 2 Hydrolyse acide des groupements Boc	109
II. 4. 3. 3 Synthèse des dipeptides de la série H-Xaa-Glu(NHEt)-OH ou H-Xaa-Glu(NHPr)-OH	109
II. 4. 2. 1 Hydrogénolyse	110
<b>II. 5 Synthèse stéréosélective de nouveaux dérivés C-4alkylés et C-4-arylés de la L-théanine</b>	113
II. 5. 1 Rappel bibliographique sur la synthèse des dérivés de l'acide glutamique $\gamma$ -substitué	115
II. 5. 1. a. Synthèse à partir du glutamate	115
II. 5. 1. b. Synthèse à partir de l'acide pyroglutamique H-Pyr-OH	117
II. 5. 1. c. Synthèse à partir de la glycine (formation de la liaison (C <sup>2</sup> -C <sup>3</sup> ))	121
II. 5. 2 Stratégies d'obtention des dérivés de la L-théanine substitués en position 4	125
II. 5. 2. 1. A partir de l'acide pyroglutamique optiquement pur	126
II. 5. 2. 1. a. Protection de l'acide L-pyroglutamique	127
II. 5. 2. 1. b. Réaction d'alkylation de (S)-1,2-di- <i>tert</i> -butyloxycarbonyl pyrrolidin-5-one	129
II. 5. 2. 1. c. Ouverture des pyroglutamtes alkylés	136
II. 5. 2. 1. d. Amidification des dérivés 4-arylés de l'acide glutamique	138
II. 5. 2. 1. e. Hydrolyse des groupements protecteurs	139
<b>II. 6 Conclusion</b>	139
<b>Chapitre III : Tests Biologiques</b>	141
<b>III. 1 Introduction</b>	142
<b>III. 2 Les techniques utilisées au sein de l'équipe Stress Oxydant et Neuroprotection</b>	144
<b>III. 3 Etude de la cytotoxicité</b>	144
<b>III. 4 Mesure de variations calciques intracellulaires par la méthode d'imagerie calcique</b>	148
III. 4. 1 Chargement de la sonde calcique fluorescente dans les neurones en culture	148

III 4. 2 Résultats et discussions d'imagerie calcique	150
<b>Conclusion Générale</b>	164
<b>Partie Expérimentale</b>	168

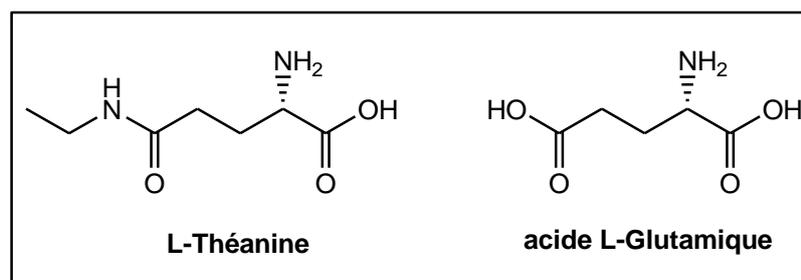
# *Introduction générale*

Clicours.COM

Le cerveau est un véritable organe de communication qui permet, en interagissant avec les autres organes du corps, de donner une réponse rapide et adaptée à un stimulus environnemental ou sensoriel. Le cerveau est la structure biologique la plus complexe connue à ce jour. Le potentiel d'action au niveau de système nerveux central (SNC) provoque la libération des neurotransmetteurs. Selon le neurotransmetteur libéré, la réponse peut être excitatrice ou inhibitrice, le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux central est le glutamate. De nombreux analogues 3 et/ou 4-substitués de l'acide glutamique ont été synthétisés et étudiés de part leurs rôles physiologiques prouvés au sein de la synapse glutamatergique.

Ces travaux de thèse ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration entre les deux laboratoires LSOA Université d'Oran et IBMM dans l'équipe « Stress Oxydant et Neuroprotection » du département « Aminoacides, Peptides et Protéines ».

Ces travaux portent sur la L-Théanine (L-5-N-éthylglutamine) qui est l'un des principaux acides aminés présent dans le thé vert et qui a une structure similaire à celle de l'acide glutamique figure 1. La L-théanine possède la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique. La théanine a été l'objet de beaucoup d'études en raison de ses activités physiologiques et pharmacologiques : elle peut réduire de façon significative la pression artérielle et elle module et inhibe la prolifération des cellules cancérogènes. L-théanine affiche également un large éventail d'actions sur le SNC : on note son influence sur les taux des neurotransmetteurs tels que la sérotonine et la dopamine, ainsi que son effet protecteur du tissu cérébral de la neurotoxicité induite par un niveau élevé du glutamate (seuil excitotoxique). La L-théanine et ses dérivés pourraient donc être des structures intéressantes pour développer de nouveaux outils pharmacologiques nécessaires à l'étude des récepteurs glutamatergiques (métabotropiques et/ ou ionotropiques).



**Fig 1** : La structure chimique de la L-théanine et l'acide L-glutamique.

L'objectif de notre travail consiste donc, premièrement à développer de nouvelles méthodes de synthèse chimique de la théanine optiquement pure, deuxièmement à synthétiser de nouvelles substances analogues de la théanine telles que les 5-N-alkylglutamines, les gammas dipeptides de l'acide glutamique et les dérivés de la L-théanine substitués en position 4 et optiquement purs.

Avant d'exploiter nos résultats expérimentaux concernant la synthèse de la théanine et de dérivés correspondants, nous présentons dans un premier chapitre une revue bibliographique consacrée d'une part aux différentes modes de synthèse de la L-théanine et, d'autre part, à la description de ses propriétés biologiques notamment au sein de la synapse glutamatergique.

Dans un deuxième chapitre nous rappelons brièvement quelques principes de la synthèse peptidique et la synthèse stéréosélective de dérivés d'acide glutamique qui ont fait l'objet de nombreuses publications et de thèses au sein du laboratoire, puis nous détaillons les différentes stratégies de synthèse adoptées pour obtenir les nouveaux analogues structuraux de la théanine.

Dans le troisième chapitre, nous présentons et expliquons les différentes techniques d'électrophysiologie qui ont été utilisées afin d'évaluer l'activité biologique des molécules synthétisées, ainsi que les résultats obtenus.

# *Chapitre I*

## **Situation bibliographique**

### I. 1 Introduction :

Le thé est une substance végétale qui vient essentiellement de la Chine, on l'emploie communément comme boisson. Une simple tasse de thé est un mélange complexe de plus de 500 substances actives. Les différences liées à la nature du thé et la durée d'infusion entraînent une variabilité extrême de la composition de la boisson. Les principaux composants organiques du thé sont des protéines, des lipides, des sucres, certains polyphénols (catéchines) et des acides aminés.



Il est désormais fort bien établi que la consommation de thé, qu'il soit vert ou noir, fournit à l'organisme des antioxydants protecteurs. Mais ce qui est beaucoup moins connu du grand public, est la présence d'un acide aminé, appelé L-Théanine, qui s'avère être d'une grande utilité contre toutes les baisses de moral, et qui a été isolée par des scientifiques japonais dans le milieu du siècle dernier.

La L-Théanine est un acide aminé connu pour être présent principalement dans les feuilles de thé, il représente de 1 à 2 % du poids total des feuilles. La L-Théanine possède de nombreuses activités physiologiques et psychologiques. L'activité de la Théanine sur le cerveau a montré une réduction du stress mental et physique et produit un effet relaxant. La L-Théanine a également des affinités avec certains récepteurs de la synapse glutamatergique.

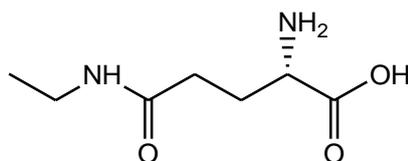
En raison de son bon goût et ses effets physiologiques favorables sur le système nerveux central des mammifères, nous nous sommes intéressés à cette molécule cible au sein du Département des Acides aminés, Peptides et Protéine (DAPP) et de l'équipe Stress Oxydant et Neuroprotection. La Théanine pourrait être un nouvel additif alimentaire, et plusieurs études sur sa production ont été réalisées.

### I. 2 Propriétés physicochimiques de la L-Théanine :

La L-Théanine ou (L) 5-N-éthylglutamine dont la structure est représentée dans la (Figure I. 1) est un acide aminé naturel que l'on trouve essentiellement dans les feuilles du thé (*Camellia sinensis* et d'autres genres de *Camellia*). Sa première découverte date de 1949 par Sakato<sup>1</sup>. La seule autre source naturelle de Théanine est celle des champignons *Xerocomus*<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Y. Sakato, *J. Agric. Chem. Soc. Japan*, **1950**, 23, 262- 267.

<sup>2</sup> J. Casimir, J. Jadot, M. Renard, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1960**, 39, 462- 468.



**Fig I. 1** Structure de la L-Théanine.

La Théanine de formule brute  $C_7H_{14}N_2O_3$  et de masse molaire  $174.2g\ mol^{-1}$  se présente sous forme de cristaux incolores avec une température de fusion de  $217-218^\circ C$ . Le tableau 1 résume les propriétés physiques de la L-Théanine.

Propriétés	Description
Formule moléculaire	$C_7H_{14}N_2O_3$
Masse molaire	$174.2g\ mol^{-1}$
Point de fusion	$217-218^\circ C$
Aspect	Solide Cristallin
Solubilité	Soluble dans l'eau et insoluble dans tous les solvants organiques
Stabilité	Stable dans les conditions acides, instable dans les conditions alcalines
Saveur	Goût Umami

**Tableau 1** : Propriétés physicochimiques de la Théanine.

La Théanine est stable dans les conditions acides ; en milieu basique on note une hydrolyse de la théanine en acide glutamique et en éthylamine dans un tampon de 0.1% d'acétate de triéthylammonium.

Ce chapitre d'étude bibliographique est composé de trois parties :

- Dans un premier temps, nous présenterons le métabolisme et le transport de la Théanine chez les êtres humains puis ses propriétés biologiques en nous intéressant à son activité au niveau du système nerveux central.
- Dans un second temps, nous présenterons le fonctionnement de la synapse glutamatergique et plus précisément celui des récepteurs NMDA cible de la Théanine.
- La dernière partie résumera les principales et les plus importantes méthodologies mises en œuvre pour accéder à la L-Théanine.

### I. 3 L'activité biologique de la L-Théanine :

L'intérêt pour cette substance est parti de l'observation contradictoire que le thé vert, malgré sa forte concentration en caféine, avait de nombreux effets biologiques et physiologiques comme, par exemple, une action favorable sur les ondes électriques de type alpha, un effet sur la libération et la concentration de certains neurotransmetteurs, une action antistress.

Notre objectif dans ce travail de thèse est de préparer de nouveaux outils pour l'étude du système nerveux central et plus précisément étudier la modulation des récepteurs NMDA. Elle peut servir également de complément alimentaire. De plus c'est un acide aminé qui a la capacité de passer la barrière hématoencéphalique. Ainsi son absorption et son métabolisme doivent être étudiés en détail.

#### I. 3.1 L'absorption et le métabolisme de la L-Théanine :

##### I. 3.1.1 Absorption de la Théanine dans le tractus gastro-intestinal :

La Théanine a une structure similaire à celle de la glutamine donc elle pourrait être absorbée via les systèmes de transport communs à la glutamine dans l'intestin.

Deux mécanismes de transport de la glutamine dans la membrane de la bordure en brosse intestinale sont décrits : l'un par le co-transporteur dépendant du sodium et le deuxième par le co-transporteur indépendant du sodium<sup>3 4 5</sup>. Le transport de la Glutamine dépendant du sodium pourrait être un processus électrogénique : c'est le système de transport majoritaire des acides aminés possédant une chaîne *polaire*<sup>6 7 8 9</sup>. Kitaoka et al<sup>10</sup> ont présenté un processus électrique pour déterminer le mode d'absorption de la Théanine dans le tractus gastro-intestinal, et en particulier son transport au travers de la membrane à bordure en brosse. Cette étude est basée sur l'enregistrement des changements de la différence de potentiel électrique transmurale ( $\Delta PD$ ) in vitro en utilisant des sacs éversés préparés à partir de l'iléon

<sup>3</sup> N. M. Bradford, T. Murata, *Chem. Pharm. Bull.*, **1986**, 34, 3053-3057.

<sup>4</sup> H. M. Said, K. Van Voorhis, F. K. Ghishan, N. Abumurad, W. Nylander, R. Redha, *Am. J. Physiol.*, **1989**, 256, 240-245.

<sup>5</sup> K. Van Voorhis, H. M. Said, F. K. Ghishan, N. Abumurad, *Biochim. Biophys. Acta*, **1989**, 978, 51-55.

<sup>6</sup> M. Abe, T. Hoshi, A. Tajima, *J. Physiol.*, **1987**, 394, 481-499.

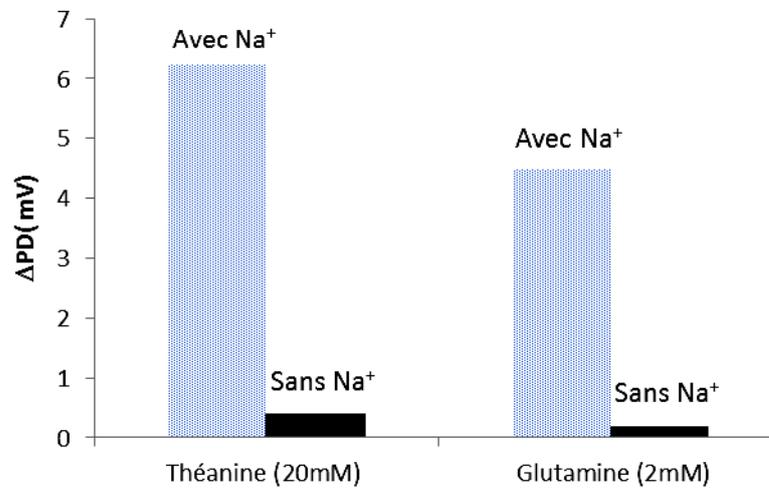
<sup>7</sup> J. R. Del Castillo, R. Muniz, *Am. J. Physiol.*, **1991**, 261, 1030-1036.

<sup>8</sup> H. Hayashi, T. Hoshi, *Jpn. J. Physiol.*, **1992**, 42, 561-575.

<sup>9</sup> V. Ganapathy, M. Brandsch, F. H. Leibach, in "Physiology of the Gastrointestinal tract", 3<sup>rd</sup> Ed, ed. By I. R. Johnson, Raven Press, New York, **1994**, pp. 1773-1820.

<sup>10</sup> S. Kitaoka, H. Hayashi, H. Yokogoshi, Y. Suzuki, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1996**, 60 (11), 1768-1771.

de cochon d'Inde, induit par la Théanine et la glutamine ou uniquement la théanine coadministrée, avec et sans  $\text{Na}^+$ . Les résultats obtenus sont représentés dans la (Figure I. 2).



**Fig I. 2 :** La  $\Delta\text{PD}$  induite par la Théanine et la Glutamine avec et sans  $\text{Na}^+$ .

La variation de la différence de potentiel électrique de la Théanine est beaucoup plus faible lorsque la Théanine est appliquée en présence de la glutamine qu'en son absence. Les auteurs ont observé qu'une fois que le  $\text{Na}^+$  est éliminé, la variation de la différence de potentiel ( $\Delta\text{PD}$ ) induite par la Théanine et la glutamine est très diminuée. Ceci indique que les réponses potentielles de la Théanine et de la glutamine dépendent de la présence de  $\text{Na}^+$ . Ces résultats suggèrent que l'absorption intestinale de la Théanine et de la glutamine se fait par un co-transporteur commun dépendant du sodium dans la membrane de la bordure en brosse.

En général, chaque acide aminé de circulation est amené au cerveau par l'intermédiaire d'un système de transport comme:

- Le système « L » qui a une affinité préférentielle pour les acides aminés neutres analogues à la leucine.
- Le système « A » ou système de transport préférant l'alanine.
- Le système « ASC »<sup>11 12 13</sup>, système de transport des acides aminés neutres. Les substrats préférés pour ce système comprennent la sérine; et la cystéine.

Le dosage des acides aminés transportés et de la Théanine dans le cerveau après 2 heures d'administration intragastrique de la Théanine à des rats mâles Wistar à différentes

<sup>11</sup> H. N. Christensen, *Biochem. Pharmacol*, **1979**, 28, 1989-1992.

<sup>12</sup> H. Sershen, A. Lajtha, *J. Neurochem*, **1979**, 32, 719-726.

<sup>13</sup> L. A. Wade, H. M. Brady, *J. Neurochem*, **1981**, 37, 730-734.

concentrations (0, 1000, 2000, 4000 mg/Kg de poids corporel) a montré que les concentrations de Théanine augmentent d'une manière dépendant de la concentration administrée. Au contraire les concentrations des acides aminés neutres tels que la phénylalanine, le tryptophane, la thréonine, qui sont transportés au cerveau par le système « L » diminuent de façon significative dans le cas de forte dose de Théanine administrée. Les concentrations des autres acides aminés tels que l'alanine, la sérine, la glycine, l'acide aspartique et l'acide glutamique sont inchangées après administration de la Théanine. Ces résultats montrent que la théanine est transportée au cerveau au travers de la barrière hémato-encéphalique via le système de transport « L » préférant Leucine<sup>14</sup>.

### I. 3. 1. 2 Métabolisme de la Théanine :

D'après une étude bibliographique, le devenir métabolique de la Théanine après son administration par voie orale n'a pas été souvent décrit.

En 1966, Asatoor<sup>15</sup> a rapporté que, lorsque la L-Théanine est administrée à des rats, une certaine quantité d'éthylamine est détectée dans l'urine. Ces résultats lui permettaient de conclure à l'époque que la L-Théanine pourrait être métabolisée en L-glutamate et éthylamine dans le corps de rat mais il n'a pas pu préciser quel organe était responsable de ce métabolisme.

Plus récemment en 1999, Unno et al<sup>16</sup>, ont vérifié si l'hydrolyse de la Théanine pouvait avoir lieu dans le plasma ou /et le système urinaire. Un dosage de la Théanine et d'éthylamine est effectué par HPLC après une administration orale de la Théanine uniquement à des rats. La concentration en éthylamine dans le plasma sanguin est bien inférieure à celle de la Théanine, la majeure partie de l'éthylamine est immédiatement excrétée dans les urines. Par conséquent, il semble que le site de dégradation partielle de la Théanine soit dans le rein, mais pas dans le cerveau. Maintenant, il est désormais prouvé que la Théanine subit une dégradation enzymatique après son administration dans le tractus intestinal par une enzyme rénale glutaminase phosphate indépendante. Pour une meilleure évaluation de l'ingestion de la Théanine, il est nécessaire d'observer les effets non seulement d'une dose unique mais aussi de son ingestion à long terme. Une enquête plus approfondie est nécessaire pour élucider les effets in vivo de la théanine et de ses métabolites.

<sup>14</sup>H. Yokogoshi, M. Kobayashi, M. Mochizuki, T. Terashima, *Neurochem. Res.*, **1998**, 23, 671– 677.

<sup>15</sup>A.M. Asatoor, *Nature*, **1966**, 210, 1358–1360.

<sup>16</sup>T. Unno, Y. Suzuki, T. Kakuda, T. Hayakawa, H. Tsuge, *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 1593–1596.

### I. 3. 2 Hypertension:

La pression artérielle est particulièrement affectée par l'administration de divers composants du thé vert tels que les catéchines<sup>17</sup>, la caféine<sup>18</sup> et le GABA, acide gamma-aminobutyrique<sup>19</sup>. Il est connu que la régulation de la pression artérielle est très dépendante des neurones catécholaminergiques et sérotoninergiques dans le cerveau et la périphérie<sup>20 21 22 23</sup>, Par conséquent, l'ingestion des précurseurs qui interviennent dans la synthèse des neurotransmetteurs tels que la tyrosine et le tryptophane modifient la modulation de la pression artérielle.

La première étude de l'effet de la Théanine sur la pression artérielle et le niveau de l'acide-5-hydroxyindole acétique (5-HIAA) date de 1995. Une diminution significative de la pression artérielle a été observée quand les rats spontanément hypertendus (RSH) subissent une injection à des doses élevées (1500 et 2000 mg/Kg), par contre chez les rats Wistar Kyoto (WKY) aucune modification de la pression artérielle n'a été observée même avec une injection de 2000 mg/Kg de Théanine. La concentration de l'acide-5-hydroxyindole acétique (5-HIAA) et de la sérotonine au niveau du cerveau avait significativement diminuée par l'administration de la Théanine à la fois chez les rats WKY et RSH<sup>24</sup>.

L'acide glutamique et la glutamine n'ont eu aucun effet hypertenseur ; seule la 5-N-méthyl glutamine GMA réduit considérablement la pression sanguine chez les rats RSH.

L'objectif de Rogers et al<sup>25</sup> est d'étudier l'effet de la Théanine et de la caféine sur la pression artérielle, seuls puis co-administrés. Les résultats observés montrent que la caféine augmente la pression systolique et diastolique, mais que la Théanine possède un effet antagoniste de cette augmentation. La tension artérielle systolique et la pression artérielle diastolique étaient significativement plus élevées après l'administration de la caféine seule puis après le mélange caféine plus Théanine à des quantités équivalentes, et en dernier la Théanine seule.

<sup>17</sup> Y. Hara, F. Tono-Oka, *J. Jpn. Soc. Nutr. Food. sci.*, **1990**, 43, 345-348.

<sup>18</sup> A. H. Neims, R W. Borstel, in « Nutrition and the Brain » ed. by Wurtman R J. Wurtman J J. Raven Press, New York, **1983**, pp 1-30.

<sup>19</sup> H. C. Stanton, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **1963**, 143, 195-204.

<sup>20</sup> D. M. Kuhn, W. A. Wolf, W. Lovenberg, *Hypertension*, **1980**, 2, 243-155

<sup>21</sup> J. P. Chalmers, *Circ. Res.* **1975**, 36, 469-480.

<sup>22</sup> P. A. Zwieten, *Prog. Pharmacol.*, **1975**, 1, 1-63.

<sup>23</sup> A. F. Sved, J. D. Fernstrom, R. J. Wurtman, *Proc Natl Acad Sci. US A.* **1979**, 76, 351 1-3514.

<sup>24</sup> H. Yokogoshi, Y. Kato, Y. Sagesaka, T. Matsuura, T. Kakuda, N. Takeuchi, *Biosci Biotechnol Biochem.* **1995**, 59, 615-618.

<sup>25</sup> P. J. Rogers, J. E. Smith, S. V. Heatherley, C. W. Pleydell-Pearce, *Psychopharmacology.* **2008**, 195, 569-577.

Chez des adultes l'ingestion de 200mg de Théanine atténue de façon significative la réponse de la pression sanguine provoquée par un stress psychologique. Ces résultats indiquent que la L-Théanine réduit la pression artérielle non seulement pour des rats spontanément hypertendus mais aussi pour les êtres humains ayant un risque d'hypertension. La grosse différence est la dose : de faibles quantités pour les êtres humains (3.2 mg/Kg de poids corporel) comparées à celles appliquées pour les rats hypertendus (2000 mg/Kg de poids corporel). L'explication proposée par Kobayashi et al, est que la L-Théanine pourrait avoir des effets anti-stress en inhibant l'excitation des neurones corticaux<sup>26</sup>.

Trois hypothèses ont été proposées pour expliquer l'effet antihypertenseur de la Théanine :

- La Théanine pourrait agir d'une façon directe sur le métabolisme de neurotransmetteurs (synthèse et dégradation) ayant un effet sur la tension artérielle tels que la sérotonine et l'acide-5-hydroxyindole acétique 5-HIAA ou affecterait d'autres facteurs qui régulent le renouvellement de la sérotonine comme l'insuline<sup>27 28</sup>.
- La Théanine réduirait la tension artérielle par l'inhibition de l'effet hypertenseur de la caféine<sup>29</sup>.
- La Théanine aurait un effet anti-stress au sein du système nerveux.

Ces différentes hypothèses doivent être confirmées en étudiant plus précisément quel est le rôle de la Théanine et c'est un des objectifs des travaux de cette thèse.

### I. 3. 3 Effet de relaxation:

Depuis les temps anciens, il est dit que la consommation du thé vert apporte la détente. La Théanine non seulement donne la saveur et le goût du thé vert, mais produit également un effet de détente et de relaxation chez les êtres humains<sup>30, 31</sup>. En général, les animaux et les humains génèrent toujours une impulsion électrique très faible sur la surface du cerveau, appelée ondes cérébrales. Les ondes cérébrales sont classées en quatre catégories, les ondes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\theta$ , en fonction de leurs fréquences. Chaque onde cérébrale est liée à des conditions

<sup>26</sup> A. Yoto, M. Motoki, S. Murao, H. Yokogoshi, *Journal of Physiological Anthropology*, 2012, 31, 28-37.

<sup>27</sup> J. D. Fernstrom, R. J. Wurtman, *Metabolism*, 1972, 21, 337-342.

<sup>28</sup> J. D. Fernstrom, R. J. Wurtman, *Science*, 1971, 174, 1023-1025.

<sup>29</sup> J. E. James, *Psychosom Med*, 2004, 66, 63-71.

<sup>30</sup> A. C. Nobre, A. Rao, G. N. Owen, *Asia Pac J Clin Nutr*. 2008, 17, 167-168.

<sup>31</sup> R. Mason, *Altern. Complementary Ther*, 2001, 7, 91-95.

mentales individuelles, la génération des ondes  $\alpha$  est considérée comme un indice de relaxation.

La réponse mentale à la Théanine pourrait varier avec le niveau d'anxiété. Dans le but d'expliquer cet effet de la Théanine, un test bénévole a été réalisé sur 8 étudiants de 18 à 22 ans classés en deux groupes : un groupe présentant une anxiété élevée et le deuxième une anxiété faible. Ces étudiants ont pris une solution de Théanine par voie orale une fois par semaine à une heure fixe dans la journée pendant 2 mois, puis les ondes cérébrales ont été mesurées et analysées pendant 60 minutes après la prise. Les résultats montrent qu'une dose de 200 mg de Théanine dans 100 ml de H<sub>2</sub>O produit des ondes cérébrales de type  $\alpha$  dans les régions occipitales et pariétales du cerveau. En conclusion, la Théanine induit un état de relaxation chez les êtres humains<sup>32</sup>.

### I. 3. 4 Activité anti-tumorale

En général, l'activité thérapeutique de la Théanine devient plus importante en présence de l'agent antitumoral spécifique dans la tumeur<sup>33</sup>. La Théanine augmente l'activité antitumorale de l'adriamycine (ADR) pour inhiber la croissance du sarcome de l'ovaire M5076<sup>34 35</sup>, elle peut aussi diminuer la toxicité induite par l'idarubicin (IDA) et augmenter son activité antitumorale<sup>36</sup>.

Ainsi la Théanine à une concentration de 400  $\mu$ M pourrait supprimer environ 50% de l'invasion des cellules de l'hépatome AH109A chez le rat, et inhiber leur croissance in vivo<sup>37</sup>.

La Théanine a une activité inhibitrice de nombreux cancers humains. Il a été démontré que l'application de la Théanine (400 $\mu$ g/ mL) sur des cellules cancéreuses d'un être humain pouvait inhiber leur croissance avec des pourcentages variant d'une cellule à une autre. L'activité inhibitrice de la Théanine sur les cellules de cancer du foie HepG2 est de l'ordre de 58.8%, 65.1 % pour les cellules MCF-7 du sein, 77.1% pour les cellules du colon HT29, et un pourcentage de 89.3% pour les cellules de la prostate PC-3<sup>38</sup>. L'administration de Théanine

---

<sup>32</sup> L. R. Juneja, D. C. Chu, T. Okubo, Y. Nagato, H. Yokogoshi, *Trends Food Sci. Technol*, **1999**, 10, 199–204.

<sup>33</sup> S. Tomomi, S. Yasuyuki, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2003**, 1653, 47– 59.

<sup>34</sup> S. Yasuyuki, S. Tomomi, M. Atsuo, N. Yasuo, H. Sadao, *Cancer Letters*, **1996**, 105, 203-209.

<sup>35</sup> S. Tomomi, S. Yasuyuki, *Cancer Letters*, **1998**, 133, 19-26.

<sup>36</sup> S. Yasuyuki, S. Tomomi, S. Takashi, *Cancer Letters*, **2000**, 158, 119-124.

<sup>37</sup> Z. Guoying, M. Yutaka, Y. Kazumi, *Biosci Biotechnol Biochem*, **2002**, 66,711–716.

<sup>38</sup> M. Friedman, B. E. Mackey, H. J. Kim, I. S. Lee, K. R. Lee, S. U. Lee, E. Kozukue, N. Kozukue, *J Agric Food Chem*, **2007**, 55, 243–253.

stoppe le développement du cancer du poumon humain A549 et la leucémie des cellules K562 in vitro et ex vivo<sup>39</sup>.

### **I. 3. 5 Effet de la Théanine sur le Système Nerveux Central :**

Les études de l'activité biologique de la Théanine ont mis en évidence de multiples effets pharmacologiques sur différents systèmes neurochimiques tels que, l'inhibition de la toxicité neuronale du glutamate par blocage de son transporteur, l'augmentation du taux de libération de différents neurotransmetteurs dans le cerveau, ainsi son effet neuroprotecteur sur les multiples sous-types de récepteurs du glutamate dans l'hippocampe.

#### **I. 3. 5. 1 Neuroprotection :**

Nous allons aborder l'effet neuroprotecteur potentiel de la Théanine qui contre la mort cellulaire induite par le glutamate (Seuil excitotoxique) dans les neurones corticaux de rat en culture<sup>40</sup>.

Cet effet a été mesuré dans la région CA1 de l'hippocampe des gerbilles. Les neurones de la région CA1 d'hippocampe de gerbilles prétraitées par la Théanine (500 mM) ont été pour la plupart conservés de la mort neuronale ischémique a été empêchée de façon significative. Cet effet neuroprotecteur est dépendant de la dose : environ 60% de survie avec 125 mM de Théanine et 90% de survie avec 500 mM de Théanine<sup>41</sup>.

Ainsi, l'administration de la Théanine montre une protection contre l'ischémie cérébrale focale induite par l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCA), sans affecter la circulation sanguine cérébrale, et la température du cerveau<sup>42</sup>. Ces résultats suggèrent que la Théanine peut être cliniquement utile pour la prévention de l'infarctus cérébral.

Les mêmes chercheurs ont montré que l'injection de Théanine empêche de manière significative la déficience de la mémoire spatiale et la mort des cellules neuronales induite par une ischémie cérébrale répétée<sup>43</sup>.

Toutes ces données expérimentales sont en accord avec l'hypothèse que l'effet neuroprotecteur de la Théanine s'explique principalement par un effet antagoniste des

---

<sup>39</sup>L. Qian, D. Huiying, L. Jinling, Y. Kazumi, Z. Guoying, *Cytotechnology*, **2009**, 59, 211–217.

<sup>40</sup>A. Nozawa, K. Umezawa, K. Kobayashi, M. Kawahara, K. Muramoto, T. Kakuda, Y. Kuroda, *Soc. Neurosci*, **1998**, 6, 382. (Abstract).

<sup>41</sup>T. Kakuda, H. Yanase, K. Utsunomiya, A. Nozawa, T. Unno, K. Kataoka, *Neurosci Lett*, **2000**, 289, 189 -192.

<sup>42</sup>N. Egashira, K. Hayakawa, K. Mishima, H. Kimura, K. Iwasaki, M. Fujiwara, *Neuroscience Lett*, **2004**, 58-61.

<sup>43</sup>N. Egashira, N. Ishigami, F. Pu, K. Mishima, K. Iwasaki, K. Orito, R. Oishi, M. Fujiwara, *Phytother. Res*, **2008**, 22, 65– 68.

récepteurs au glutamate. Et pourtant, nous montrerons au travers de nos travaux que la Théanine présente un effet agoniste et co-agoniste sur les récepteurs NMDA (tous les tests et les résultats obtenus seront détaillés dans le troisième chapitre de ce manuscrit).

### **I. 3. 5. 2 Effet de la Théanine sur les Neurotransmetteurs :**

Le système nerveux central et plus précisément les synapses sont des systèmes très complexes.

Un neurotransmetteur ou un neuromédiateur est une substance chimique neuroactive : c'est la classe la plus commune de messagers chimiques dans le système nerveux. Un neurotransmetteur est libéré par le neurone présynaptique et s'accumule sur les terminaisons postsynaptiques. Suite à son interaction avec un récepteur transmembranaire spécifique, l'influx nerveux est transmis<sup>44</sup>.

#### ✓ Norépinephrine<sup>45</sup>:

Il y a une trentaine d'année, Kimura et al ont étudié l'effet de la Théanine, sur la concentration en norépinephrine (NE) dans le cerveau de rats, avec ou sans co-administration de caféine et l'ont comparé à celui de la glutamine. La dose de L-Théanine et de glutamine administrée est de 10 mmole/kg, ce qui est suffisant pour réduire l'effet convulsif induit par la caféine<sup>46</sup>. Une diminution du taux de NE est observée quand la Théanine est administrée, par contre aucun changement n'est observé suite à l'administration de glutamine ou de caféine.

Quand les rats sont prétraités avec de la pargyline, qui est un inhibiteur de la monoamine oxydase ou du métabolisme des catécholamines à l'intérieur des terminaisons nerveuses présynaptiques, la Théanine augmente de manière significative la concentration en NE par rapport au témoin, mais elle n'augmente pas la concentration de NE quand elle est co-administrée avec de la caféine (tableau 2).

---

<sup>44</sup> Werman, R. *Comp. Biochem. Physiol.* **1966**,18: 745–766.

<sup>45</sup> R. Kimura, T. Murata, *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, 34, 3053-3057.

<sup>46</sup> R. Kimura, T. Murata, *Chem. Pharm. Bull.* **1971**, 19, 1257.

Produit administré	Concentration de NE ( $\mu\text{g/g}$ en poids humide)	
	Témoin	Prétraité avec pargyline
Contrôle	$0.555 \pm 0.0169$	$0.739 \pm 0.0183$
Théanine	$0.504 \pm 0.0082$	$0.816 \pm 0.0294$
Caféine	$0.590 \pm 0.0235$	$0.842 \pm 0.0369$
Glutamine	$0.558 \pm 0.0159$	NC
Théanine + caféine	$0.594 \pm 0.0074$	$0.847 \pm 0.0236$

**Tableau 2:** La variation de la concentration de NE avec l'administration de différents produits.

✓ Sérotonine <sup>47</sup>:

Il y a quinze ans Yokogoshi et al prouvent que le taux de sérotonine dans le cerveau est régulé par la concentration en tryptophane. L'administration de Théanine augmente significativement la concentration cérébrale en tryptophane, tandis qu'elle diminue de manière significative la concentration en sérotonine et en acide 5-hydroxyindole acétique (5-HIAA) dans le cerveau.

Les auteurs ont aussi montré que la diminution de sérotonine induite par l'administration de Théanine était causée à la fois par la diminution de sa synthèse et par l'augmentation de sa dégradation dans le cerveau.

✓ Dopamine <sup>48</sup>:

A la même époque des travaux de la même équipe montrent que la Théanine pourrait affecter le métabolisme et ou la libération d'autres neurotransmetteurs tels que la dopamine. L'administration de Théanine provoque des augmentations significatives de concentration de dopamine dans le cerveau, notamment dans le striatum, l'hypothalamus, et l'hippocampe.

L'administration directe de la Théanine dans le striatum du cerveau par micro-injection a provoqué une augmentation de la libération de dopamine d'une manière dépendante de la dose.

<sup>47</sup> H. Yokogoshi, M. Mochizuki, K. Saitoh, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1998**, 62, 816-817.

<sup>48</sup> H. Yokogoshi, M. Kobayashi, M. Mochizuki, T. Terashima, *Neurochemical Research*, **1998**, 23, 667-673.

#### **I. 4. La Synapse glutamatergique :**

Au sein de l'équipe Stress Oxydant et Neuroprotection nous travaillons essentiellement sur la synapse glutamatergique et donc nous allons développer ici les travaux les plus récents à ce sujet. Ainsi la question que nous nous sommes posée en fonction des travaux décrits dans la littérature est de savoir comment agissait cet analogue très proche d'un des neuromédiateurs le plus connu et le plus abondant : le glutamate.

##### **I. 4. 1 Généralités sur la synapse :**

La synapse définit la zone de contact fonctionnel entre un neurone et une deuxième cellule, neuronale ou non. La majorité des synapses fonctionne à l'aide de médiateur chimique, et très peu de synapses utilisent la conduction électrique<sup>49</sup>.

##### **I. 4. 1. 1 Les différents types de synapses :**

La dichotomie observée entre synapse chimique et synapse électrique est basée sur le fait qu'il y ait ou non libération de neurotransmetteur.

##### **a Synapses chimiques :**

Les synapses chimiques représentent la majorité des synapses du système nerveux. Elle se compose de la terminaison axonale, de la fente synaptique et de la zone postsynaptique. D'un point de vue fonctionnel, elle assure la conversion du message électrique en message chimique, neurotransmetteur, permettant ainsi sa transmission à un autre neurone. L'information électrique va du corps cellulaire à l'axone, vers la cellule voisine. Un potentiel d'action induit la libération de neurotransmetteur au niveau de la fente synaptique. Celui-ci se fixe alors sur des récepteurs postsynaptiques induisant la dépolarisation de l'élément postsynaptique. Suivant la nature du neurotransmetteur, on distingue 3 catégories de synapses chimiques.

##### **a. 1 La synapse inhibitrice :**

Elle implique l'acide gamma-aminobutyrique (GABA), principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC, ou la glycine.

---

<sup>49</sup> Encyclopédie historique des neurosciences: Du neurone à l'émergence de la pensée, F. Clarac, P.Buser, JP. Ternaux, D. Wolton, **2008**

### a. 2 La synapse excitatrice :

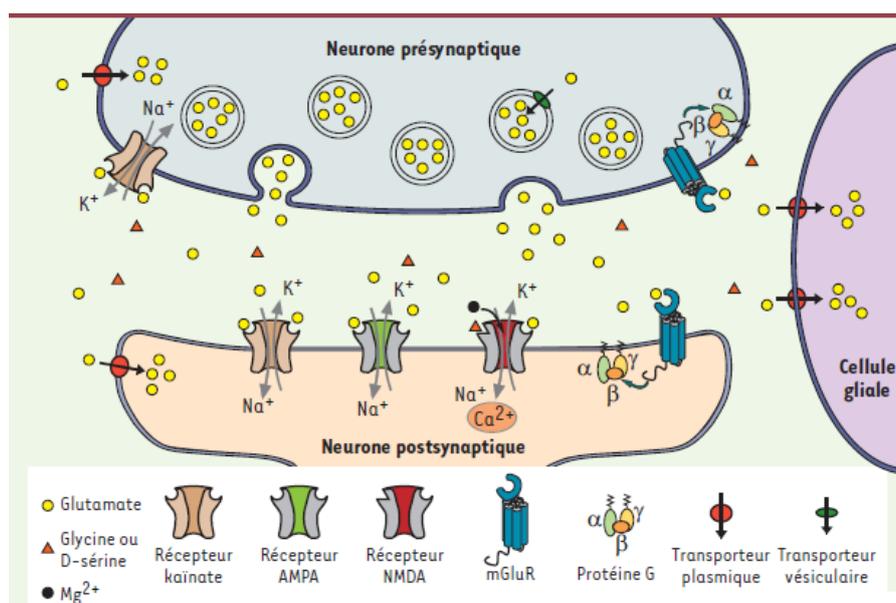
Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur majeur du SNC. 50% des synapses du SNC sont glutamatergiques. Il existe également des synapses excitatrices à ATP ou à sérotonine.

### b Synapses électriques :

Dans ce type de synapse, les membranes des deux neurones sont reliées par un assemblage protéique permettant à leurs cytoplasmes de communiquer : la jonction communicante.

## I. 4. 2 Structure générale de la synapse glutamatergique :

Les synapses glutamatergiques sont constituées d'un élément présynaptique, d'un élément postsynaptique et d'une fente synaptique. Les deux éléments pré- et postsynaptiques présentent une spécialisation fonctionnelle (Figure I. 4).



**Fig I. 4**<sup>50</sup>: la synapse glutamatergique.

## I. 4. 3 Transmission synaptique excitatrice « glutamate » :

Le glutamate est libéré dans la fente synaptique. La concentration de Glu dans la fente dépend de sa concentration dans les vésicules au niveau de la membrane plasmique du neurone présynaptique. Sur la membrane plasmique de l'élément postsynaptique, la liaison du

<sup>50</sup> M.Gielen, *Medecine/Sciences*, 2010, 26, 65-72.

glutamate à un de ses récepteurs (AMPA, NMDA, Kainate, mGlu) le fait passer d'un état inactif à un état actif. Cette interaction ligand-récepteur est à l'origine de la transmission synaptique excitatrice.

Par ailleurs, il existe sur la membrane présynaptique des récepteurs au glutamate qui modulent la libération du neurotransmetteur lorsqu'ils sont activés. L'activation des récepteurs Kainates présynaptiques réduit considérablement la libération de glutamate<sup>51 52</sup>. Un autre groupe de récepteurs présynaptiques du glutamate est également à l'origine d'une modulation de la libération de neurotransmetteur. Ces récepteurs dits métabotropiques (mGluR) et appartenant aux groupes II et III inhibent la libération de glutamate<sup>53 54</sup>.

La fin de la transmission synaptique excitatrice s'opère en premier lieu par diffusion du glutamate de ses récepteurs et en second lieu par l'activité des transporteurs (EAAT) qui assurent la redistribution (clearance) du glutamate synaptique. Le transport du glutamate s'effectue essentiellement au niveau astrocytaire. Dans l'hippocampe on rencontre surtout les transporteurs EAAT2 et EAAT1 sur les astrocytes et le transporteur EAAT3 sur les neurones<sup>55</sup>.

#### I. 4.4 Les récepteurs du glutamate :

Les approches pharmacologiques et moléculaires ont permis de classer les récepteurs du glutamate<sup>56</sup> en se basant sur leurs modalités de transduction. Deux types de récepteurs ont été identifiés: les récepteurs ionotropiques **iGluR** (Echangeurs d'ions dits récepteurs canaux) et les récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G, **mGluR**. La première sous-unité d'un récepteur ionotropique au glutamate a été clonée en 1989<sup>57</sup>, suivie du clonage du premier récepteur métabotropique en 1991<sup>58</sup>.

##### I. 4.4.1 Les récepteurs-canaux « ionotropiques » : iGluR

Les iGluR sont des récepteurs canaux transmembranaires impliqués dans la transmission synaptique rapide. La liaison du glutamate induit un changement de

<sup>51</sup> M. Vignes, V. R. J. Clarke, M. J. Parry, D. Bleakman, D. Lodge, P. L. Ornstein, G. L. Collingridge, *Neuropharmacology*, **1998**, 37, 1269-1277.

<sup>52</sup> A. Contractor, G. T. Swanson, A. Sailer, S. O'Gorman, S. F. Heinemann, *J Neurosci*, **2000**, 20, 8269-8278.

<sup>53</sup> M. Vignes, V. R. J. Clarke., C. H. Davies, A. Chambers, D. E. Jane, J. C. Watkins, G. L. Collingridge, *Neuropharmacology*, **1995**, 34, 973 -982.

<sup>54</sup> R. W. Gereau, P. J. Conn, *J Neurosci*, **1995**, 15, 6879-6889.

<sup>55</sup> N. C. Danbolt, *Prog Neurobiol*, **2001**, 65, 1-105.

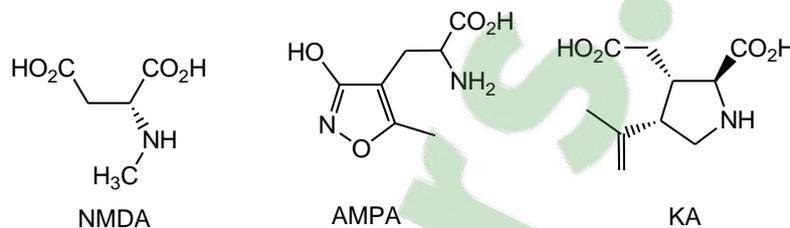
<sup>56</sup> S. Nakanishi, *Science*, **1992**, 258, 597-603.

<sup>57</sup> M. Hollman, A. O'Shea-Greenfield, S. W. Rogers, S. Hienemann, *Nature*, **1989**, 342, 643-648.

<sup>58</sup> M. Masu, Y. Tanabe, K. Tsuchida, R. Shigemoto, S. Nakanishi, *Nature*, **1991**, 349, 760-765.

conformation du récepteur-canal, qui passe alors d'un état fermé à un état ouvert. Il devient ainsi perméable aux cations, principalement au sodium ( $\text{Na}^+$ ), au potassium ( $\text{K}^+$ ) et dans certains cas au  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>59 60</sup>. Ces récepteurs canaux sont des complexes hétérotétramériques de sous-unités combinées<sup>61</sup>. Les trois principaux types de récepteurs-canaux activés par le glutamate ont été nommés d'après leur agoniste le plus sélectif. On distingue trois principales classes de récepteurs présents dans cette famille

- les récepteurs NMDA (l'acide N-méthyl-D-aspartatique),
- les récepteurs AMPA (l'acide  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoazolepropionique)
- les récepteurs Kainates KA (2-carboxy méthyl-4-isopropenylpyrrolidine)<sup>62</sup> (Figure I. 5).



**Fig I. 5 :** Les agonistes sélectifs des récepteurs ionotropiques iGluR.

Ces récepteurs se différencient par leurs propriétés cinétiques, leur perméabilité au calcium et leur modulation par des composés endogènes autres que le glutamate. L'utilisation d'antagonistes sélectifs de ces différents récepteurs permet d'étudier l'implication de chacun d'entre eux dans les réponses synaptiques médiées par le glutamate endogène. Les récepteurs AMPA et NMDA sont localisés sur de très nombreux neurones et sont responsables de la majorité des courants postsynaptiques glutamatergiques. Les récepteurs Kainates ont un rôle encore mal compris. Ils pourraient toutefois générer certains courants postsynaptiques excitateurs et intervenir au niveau présynaptique en régulant la libération de neurotransmetteurs.

<sup>59</sup> N. Burnashev, *Current Opinion in Neurobiology*, **1996**, 6, 311–317.

<sup>60</sup> K. L. Magleby, *Trends in neurosciences*, **2004**, 27, 231–233.

<sup>61</sup> C. Rosenmund, *Science*. 1998, 280, 1596–1599.

<sup>62</sup> S. F. Traynelis, L. P. Wollmuth, C. J. McBain, F. S. Menniti, K. M. Vance, K. K. Ogden, K. B. Hansen, H. Yuan, S. J. Myers, R. Dingledine, *Pharmacological reviews*, **2010**, 62, 405–496.

### I. 4. 4. 1. 1 les récepteurs NMDA : NMDA-R

Les NMDA-R sont des récepteurs qui ont beaucoup été étudiés ces dernières années car ils sont impliqués dans de nombreux phénomènes physiologiques et pathologiques. Ce sont des récepteurs perméables aux ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et surtout au  $\text{Ca}^{2+}$ . Les NMDA-R possèdent une pharmacologie unique ; il existe au total sept sous-unités protéiques différentes agencées en domaines NR1, NR2A-D et NR3A-B. Un récepteur NMDA fonctionnel comprend une sous-unité obligatoire NR1 et s'associe avec trois sous-unités NR2 et/ou NR3<sup>63</sup> <sup>64</sup> (Figure I. 6).

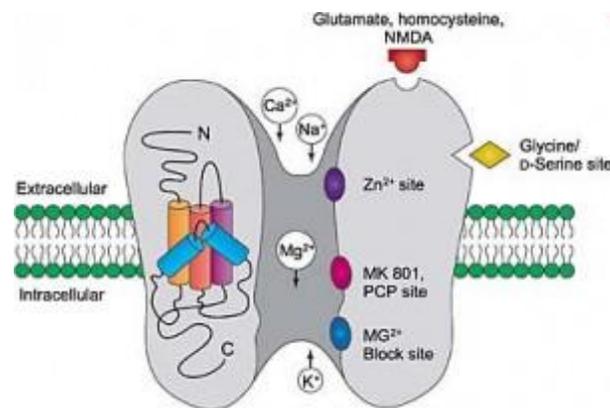


Fig I. 6 : Représentation schématique du récepteur NMDA.

#### I. 4. 4. 1. 1. 1 Les Agonistes des NMDA-R:

A la différence des autres récepteurs ionotropiques du glutamate, l'activation du récepteur NMDA et donc l'ouverture du canal, nécessite obligatoirement la présence de deux agonistes, le glutamate (liant les sous-unités GluN2<sup>65</sup>) et la glycine (liant les sous-unités GluN1<sup>66</sup>). L'activation des récepteurs NMDA peut donc être envisagée sur le site de fixation du glutamate ou sur celui de la glycine grâce aux agonistes. Le site de reconnaissance du glutamate peut fixer l'acide N-méthyl-(D)-aspartique (NMDA), et d'autres comme le (2S)-amino(3-hydroxy-1,2-oxazol-5-yl)-éthanoïque ou acide Iboténique, l'acide L-homocystéique et l'acide quinoléique qui restent de bons agonistes des récepteurs NMDA. La glycine évidemment mais aussi la D-sérine<sup>67</sup> sont les principaux ligands endogènes du site glycine

<sup>63</sup> S. Cull-Candy, S. Brickley, M. Farrant, *Current opinion in neurobiology*, **2001**, 11, 327–335.

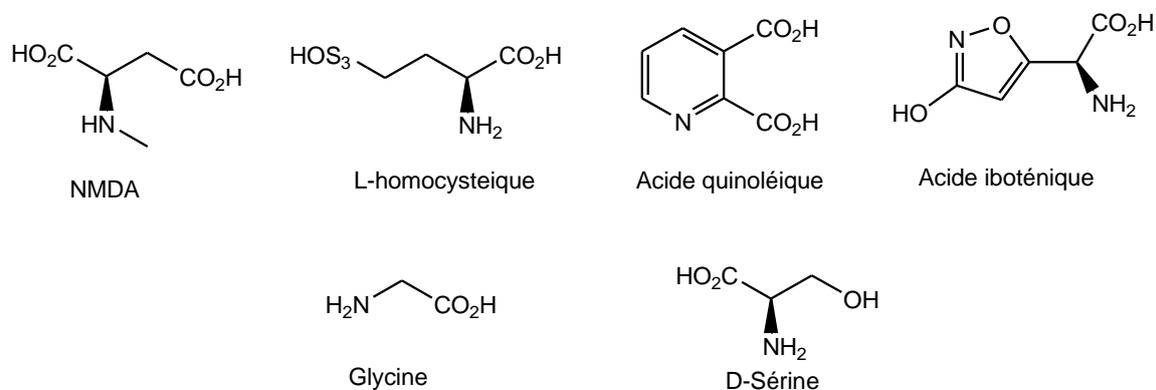
<sup>64</sup> R. C. Carroll, R. S. Zukin, *Trends in neurosciences*, **2002**, 25, 571–577.

<sup>65</sup> A. Kuryatov, B. Laube, H. betz, J. Kuhse, *Neuron*, **1994**, 12, 1291-1300.

<sup>66</sup> B. Laube, H. Hirai, M. Sturgess, H. Betz, J. Kuhse, *Neuron*, **1997**, 18, 493-503.

<sup>67</sup> J. P. Mothet, L. Pollegioni, G. Ouanounou, M. Martineau, P. Fossier, G. Baux, *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* **2005**, 102, 5606–5611.

(Figure I. 7). Comme on peut le constater par la nature des agonistes, les acides aminés de série D ont également une activité spécifique. Il conviendra donc dans l'étude de l'activité de nos composés de tester les molécules de série D<sup>68</sup>.



**Fig I. 7 :** Agonistes des NMDA-R

#### I. 4. 4. 1. 1. 2 Les antagonistes des NMDA-R:

Les antagonistes des récepteurs NMDA sont classés en deux catégories: les compétitifs et les non-compétitifs.

##### a/ Les antagonistes compétitifs :

Cette classe d'antagonistes est caractérisée par leur structure moléculaire : la majorité d'entre eux sont des aminoacides phosphoniques, dans lesquels les deux groupements phosphonique et carboxylique sont séparés par quatre ou six atomes<sup>69 70</sup>. Le composé CGS19755 (l'acide 4-phosphonométhyl pipéridine-2-carboxylique) et ses analogues (R)-CPP, ensuite l'acide (2R)-4-(3-phosphonoprop-1-yl) pipérazine-2-carboxylique et le (R)-CCPene, enfin l'acide (2R)-4-(3-phosphonoprop-2-(E)-en-1-yl) pipérazine-2-carboxylique (Figure I. 8) sont des antagonistes sélectifs des récepteurs NMDA.

L'acide aminé (R)-AP5 présente également une inhibition de la potentialisation à long terme dans l'hippocampe<sup>71</sup>. Son analogue (R)-AP7 est utilisé comme antagoniste de faible sélectivité vis-à-vis des différentes sous unités NR2 des récepteurs NMDA<sup>72</sup>.

<sup>68</sup> J. P. Mothet, S. H. Snyder, *Amino Acids*, **2012**, 43, 1809-1810.

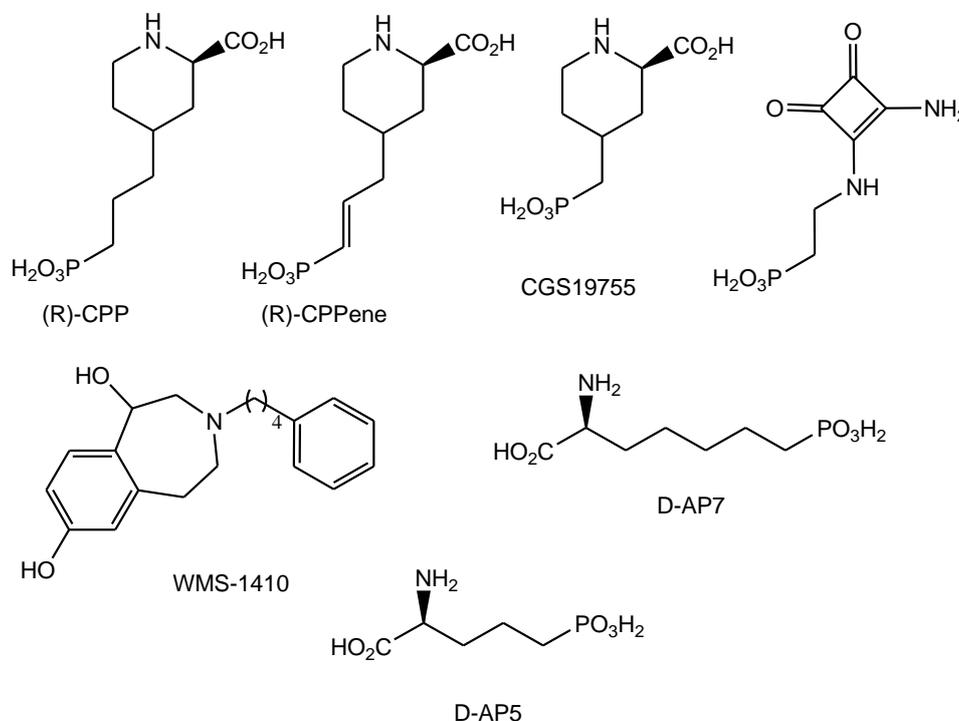
<sup>69</sup> J. Lehmann, J. Schneider, S. Mcpherson, D. E. Murphy, P. Bernard, C. Tsai, D.A. Bennet, G. Pastor, D. J. Steele, C. Boehm, D. L. Cheney, J. M. Liebermann, M. Williams, P. L. Wood, *J Pharmacol Exp Ther*, **1987**, 240, 737- 746.

<sup>70</sup> J. Wehbe, V. Rolland, A. Fruchier, M. L. Roumestant, J. Martinez, *Tetrahedron Asym*, **2004**, 15, 851-858.

<sup>71</sup> S. Davis, S. P. Butcher, R. G. Morris, *Journal of Neuroscience*. **1992**, 12, 21-34.

<sup>72</sup> B. Feng, R. M. Morleyb, D. E. Janeb, D. T. Monaghana, *Neuropharmacology*. **2005**, 48, 354-359.

L'acide [2-2[(2-amino-3,4-dioxo-1-cyclobutène-1-yl)amino]éthyl]phosphonique et le composé 3-(4-phenylbutyl)-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine-1,7-diol (WMS-1410) ont également montré un effet antagoniste avec pour ce dernier une affinité très sélective vis à vis de la sous-unité NR2B<sup>73</sup>.



**Fig I. 8:** Antagonistes compétitifs des récepteurs NMDA.

### b/ Les antagonistes non compétitifs des NMDA-R :

Les antagonistes non compétitifs sont des substances qui se fixent sur un autre site que celui des antagonistes compétitifs d'un récepteur. Dans le cas du récepteur NMDA, ces antagonistes se fixent à l'intérieur du canal ionique. De nombreux composés cycliques ont été trouvés pour leur effet antagoniste non compétitif envers les récepteurs NMDA ; c'est le cas de la Kétamine, de la phénylcyclidine (PCP) et la Mémantine. La mémantine est utilisée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer<sup>74</sup>.

La dizocilpine (MK-801) est le meilleur et le plus puissant des antagonistes décrits dans la littérature. Il bloque totalement l'ouverture du canal<sup>75</sup>.

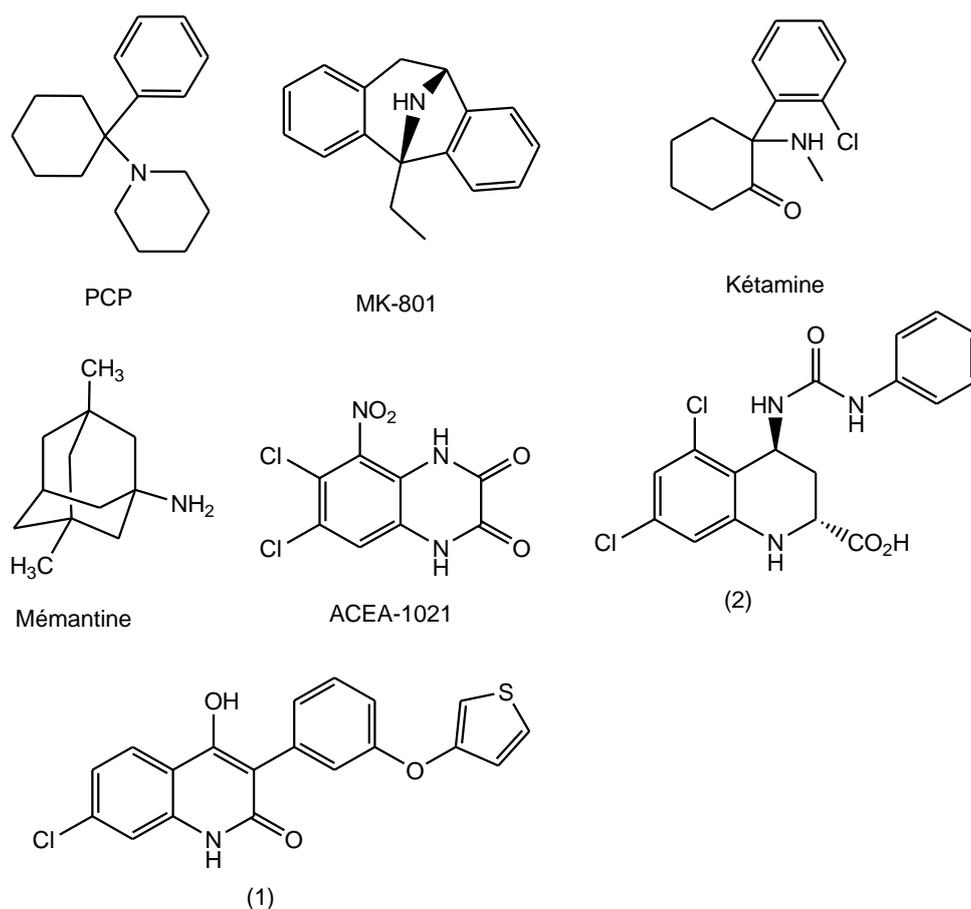
<sup>73</sup> B. Tewes, B. Frehland, D. Schepmann, K-U. Schmidtke, T. Winckler, B. Wunsch. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 8005-8015.

<sup>74</sup> A. Banerjee, D. Schepmann, J. Kohler, E-U. Wurthwein, B. Wunsch, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 7855-7867.

<sup>75</sup> E. H. F. Wong, J. A. Kemp, T. Priestly, A. R. Knight, G. N. Woodruff, L. L. Iversen, *Proc Natl, Acad Sci USA*, **1986**, 83, 7101-7108.

Il est important de souligner l'existence d'un site interne spécifique d'un ion  $Mg^{2+}$  au sein du récepteur NMDA. La fixation du  $Mg^{2+}$  diminue de façon conséquente l'influx ionique. Le  $Mg^{2+}$  se comporte donc comme un antagoniste non compétitif.

En ce qui concerne le site glycine, le premier antagoniste décrit est le dichlorokynurénate<sup>76</sup>. Des analogues de ce composé ont été synthétisés comme la 5,6-dichloro-4-nitroquinoxaline-2,3-dione (ACEA-1021)<sup>77</sup>, la 3-aryl-4-hydroxyquinolin-2(1H)-one (1)<sup>78</sup> et la 4-amido-2-carboxytétrahydroquinoline (2) (Figure I. 9)<sup>79</sup>.



**Fig I. 9** : Structure de quelques antagonistes non compétitifs des récepteurs NMDA.

<sup>76</sup> J.N. Kew, A. Koester, J. L. Moreau, F. Jenck, A. M. Ouagazzal, V. Mutel, J. G. Richards, G. Trube, G. Fischer, A. Montkowski, W. Hundt, R. K. Reinscheid, M. Pauly-Evers, J. A. Kemp, H. Bluethmann, *J Neurosci*, **2000**, 20, 4037-4049.

<sup>77</sup> B. D. Kretschmer, U. Kratzer, K. Breithecker, M. Koch, *Eur. J. Pharmacol*, **1997**, 331, 109- 116.

<sup>78</sup> J.J Kulagowski, R. Baker, N. R. Curtis, P. D. Leeson, I. M. Mawer, A. M. Moseley, M. P. Ridgill, M. Rowley, I. Stansfield, A. C. Foster, S. Grimwood, R. G. Hill , J. A. kemp, G. R. Marshall, K. L. Saywell, M. D. Tricklebank, , *J. Med. Chem*, **1994**, 37, 1402-1405.

<sup>79</sup> P. D. Leeson, R.W. Carling, , K. W. Moore, A. M. Moseley, J. D. Smith, G. Stevenson, T. Chan, R. Baker, A. C. Foster, S. Grimwood, J. Kemp, G. R. Marshall, K. Hoogsteen, *J. Med. Chem*, **1992**, 35, 1954-1968.

**I. 4. 4. 1. 2 Les récepteurs autres que le NMDA-R :**

Les récepteurs non NMDA ou récepteurs AMPA et KA ont des propriétés pharmacologiques voisines mais différentes par rapport à celles des récepteurs NMDA.

**I. 4. 4. 1. 2. a Les récepteurs AMPA :**

Les AMPA-R sont les acteurs majeurs de la transmission synaptique rapide. Quatre sous-unités différentes appartiennent à la classe des récepteurs AMPA : GluA1-4. Comme pour le récepteur NMDA, la combinaison de ces quatre sous-unités est nécessaire à la formation d'un canal fonctionnel. Le récepteur AMPA est perméable aux ions Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et occasionnellement aux ions Ca<sup>2+</sup>. Si la sous-unité GluA2 est absente ou non éditée, alors le récepteur AMPA se révèle perméable au Ca<sup>2+</sup>. GluA2 et GluA4 possèdent un long domaine C-terminal intracellulaire. La cristallisation du récepteur AMPA a permis de mettre en évidence que la liaison du ligand modifie la structure tridimensionnelle du récepteur, permettant l'ouverture du canal.

**I. 4. 4. 1. 2. a. 1 Les agonistes des AMPA-R:**

Les récepteurs AMPA sont activés par les molécules comportant un groupement isoxazole comme l'AMPA, le trifluoro-AMPA, le 4-AHCP, l'acide [<sup>3</sup>H] 2-amino-3-(3-carboxy-5-méthyl-4-isoxazolyl) propanoïque et la (*S*)-5-chloro-6-azawillardine (Figure I. 10).

D'autres analogues de l'AMPA, ayant différents substituants en position 5 du cycle isoxazole, ont été synthétisés et employés comme agonistes de récepteurs AMPA, comme le (*5S*)-CIPA et le (*S*)-phényl-AMPA (*S*)-APPA. L'énantiomère (*R*)-APPA est un antagoniste non compétitif.

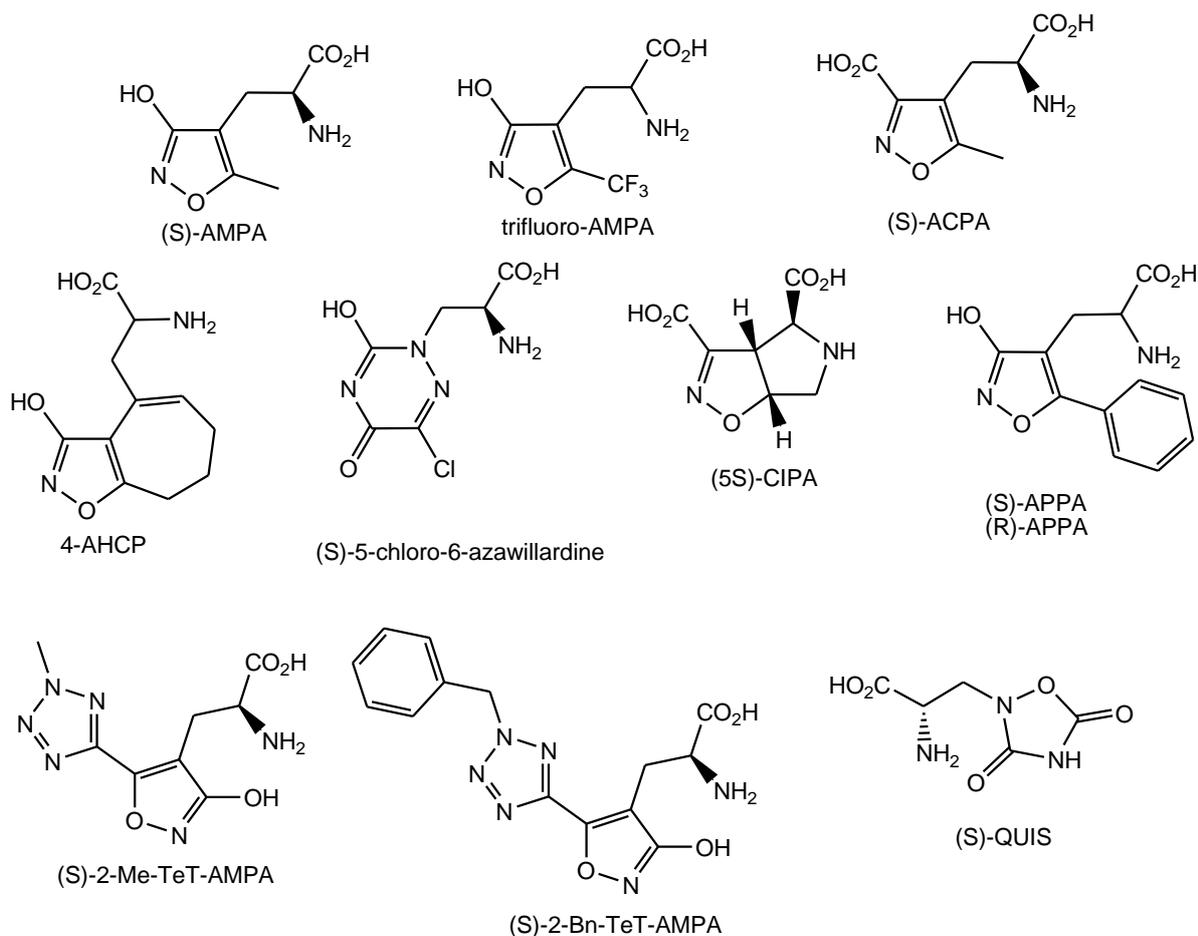
Les dérivés tétrazoliques substitués tels que les composés (*S*)-2-Me-TeT-AMPA<sup>80</sup> et (*S*)-2-Bn-TeT-AMPA<sup>81</sup> ont été caractérisés comme ligands sélectifs des sous-unités GluR (1-4) des AMPA-R. L'acide (*L*)-Quisqualique (QUIS) (Figure I. 10) peut agir de manière efficace en tant qu'agoniste non spécifique des récepteurs AMPA<sup>82</sup>

---

<sup>80</sup> S. B. Vogensen, R. P. Clausen, J. R. Greenwood, T. N. Johansen, D. S. Pickering, B. Nielsen, B. Ebert, P. Krosggaard-Larsen. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 3438-3442.

<sup>81</sup> S. B. Vogensen, K. Frydenvang, J. R. Greenwood, G. Postorino, B. Nielsen, D. S. Pickering, B. Ebert, U. Bolcho, X. J. Egebjerg, M. Gajhede, J. S. Kastrop, T. N. Johansen, R. P. Clausen, P. Krosggaard-Larsen, *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 2408-2414.

<sup>82</sup> E. K. Michaelis, *Progress in Neurobiology.* **1998**, 54, 369-415.



**Fig I. 10** : Les agonistes du récepteur AMPA.

#### I. 4. 4. 1. 2. a. 2 Les Antagonistes de récepteurs AMPA :

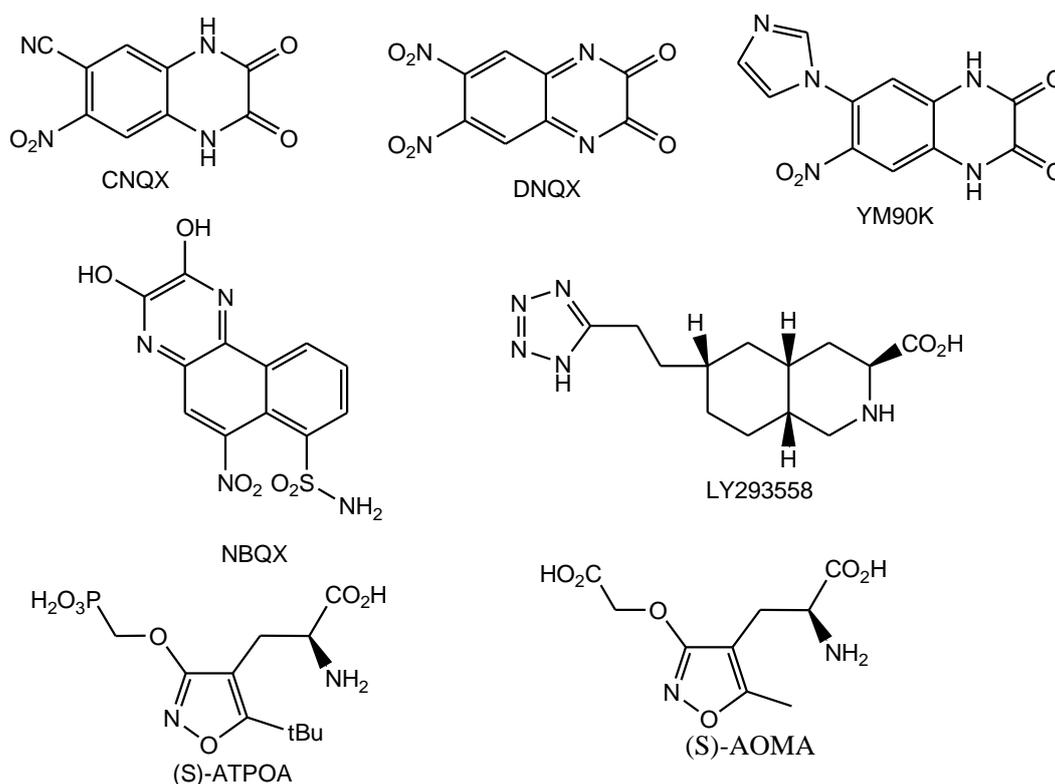
##### a/ Antagonistes compétitifs :

Les premiers antagonistes compétitifs utilisés sur le récepteur AMPA sont le 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) et le 6,7-dinitro-quinoxaline-2,3-dione (DNQX)<sup>83</sup>. Cependant, ils possèdent aussi une affinité pour le site glycine du récepteur NMDA. D'autres composés synthétisés à partir de ces derniers se révèlent beaucoup plus sélectifs comme le 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo (F) quinoxaline (NBQX) et le 1,4,7,8,9,10-hexahydro-9-méthyl-6-nitropyrido(3,4-f)-quinoxaline-2,3-dione (PNQX). En se basant sur la structure quinoxalinedione, un certain nombre de composés a été développé, comme par

<sup>83</sup>J. Drejer, T. honore, *Neurosci Lett*, **1988**, 87, 104-108.

exemple le 6-(1H-imidazol-yl)-7-nitro-2,3(1H, 4H)-quinoxalinedione hydrochloride YM90K, qui est très puissant comme antagoniste des récepteurs AMPA<sup>84</sup>.

Un autre groupe d'antagonistes de l'AMPA a été décrit, comme par exemple le composé tricyclique LY293558 qui a ainsi des effets antagonistes significatifs sur les récepteurs KA<sup>85</sup>, le composé (*S*)-AMOA<sup>86</sup> et le (*S*)-ATPO (Figure I. 11)<sup>87</sup>.



**Fig I. 11** : Antagonistes compétitifs du récepteur AMPA.

### **b/ Antagonistes non compétitifs de récepteurs AMPA :**

Les récepteurs AMPA disposent d'un site de régulation par certaines benzodiazépines. Le 1-(4-aminophenyl)-4-méthyl-7,8-méthylènedioxy-5H-2,3-benzodiazépine (GYKI 52466) se présente comme un antagoniste non compétitif du récepteur sur ce site<sup>88</sup>. Un autre composé

<sup>84</sup> J. Ohmori, S. Sakamoto, H. Kubota, M. Shimizu-Sasamata, M. Okada, S. Kawasaki, K. Hidaka, J. Togami, T. Furuya, K. Murase, *J Med Chem*, **1997**, 40, 826-833.

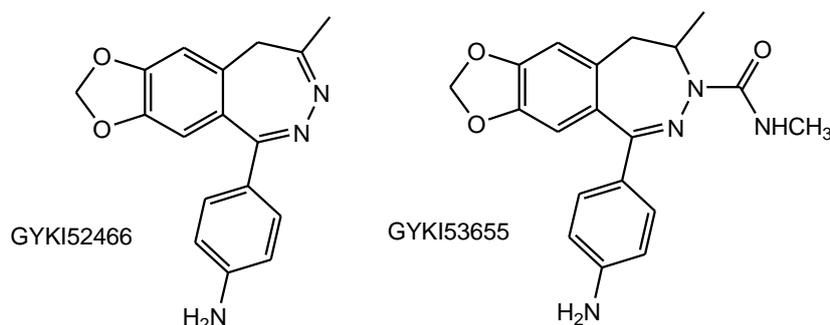
<sup>85</sup> P. L. Ornstein, M. B. Arnold, N. K. Augenstein, D. Lodge, J. D. Leander, D. D. Schoepp, *J med chem*, **1993**, 36, 2046 - 2048

<sup>86</sup> P. Wahl, B. Nielsen, P. Krogsgaard-Larsen, J. J. Hansen, A. Schousboe, R. Miledi, *J. Neurosci. Res.* **1992**, 33, 392 - 397.

<sup>87</sup> E. H. Moller, J. Egebjerg, L. Brehm, T. B. Stensbol, T. N. Johansen, U. Madsen, P. Krogsgaard-Larsen, *Chirality*, **1999**, 11, 752- 759.

<sup>88</sup> S. Solyom, I. Tarnawa, *Curr Pharm Des*, **2002**, 8, 913-939.

de cette famille le GYKI53655 (Figure I. 12) a été caractérisé comme étant un antagoniste non compétitif sélectif et puissant du récepteur AMPA.



**Fig I. 12 :** Les antagonistes non compétitifs de AMPA-R.

#### I. 4. 4. 1. 2. b Les récepteurs Kainates :

Le Kainate est un analogue cyclique du glutamate. Ces récepteurs sont constitués de cinq sous-unités différentes GluR5, GluR6, GluR7, KA1 et KA2<sup>89 90 91</sup>. Deux familles de récepteurs Kainates sont identifiées.

La première famille est constituée de récepteurs tétramériques dont les sous-unités KA doivent obligatoirement se combiner avec les autres membres de la famille (GluR5-7) pour constituer un canal fonctionnel. En absence des sous-unités GluR5-7, l'expression membranaire des récepteurs ne peut pas se faire<sup>92</sup>.

La deuxième famille est constituée d'un récepteur fonctionnel uniquement composé de GluR5-7.

A l'image des récepteurs AMPA, les récepteurs KA sont perméables aux ions Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup>.

##### I. 4. 4. 1. 2. b. 1 Les agonistes de KA-R :

Le kainate, l'agoniste standard, possède une grande affinité mais une faible sélectivité pour les récepteurs KA-R. Le kainate interagit fortement avec les récepteurs AMPA. Il est cependant fréquemment utilisé comme agoniste des récepteurs AMPA car il ne les désensibilise pas.

<sup>89</sup> P. H. Seeburg, *Trends Neurosci*, **1993**, 16, 359-365.

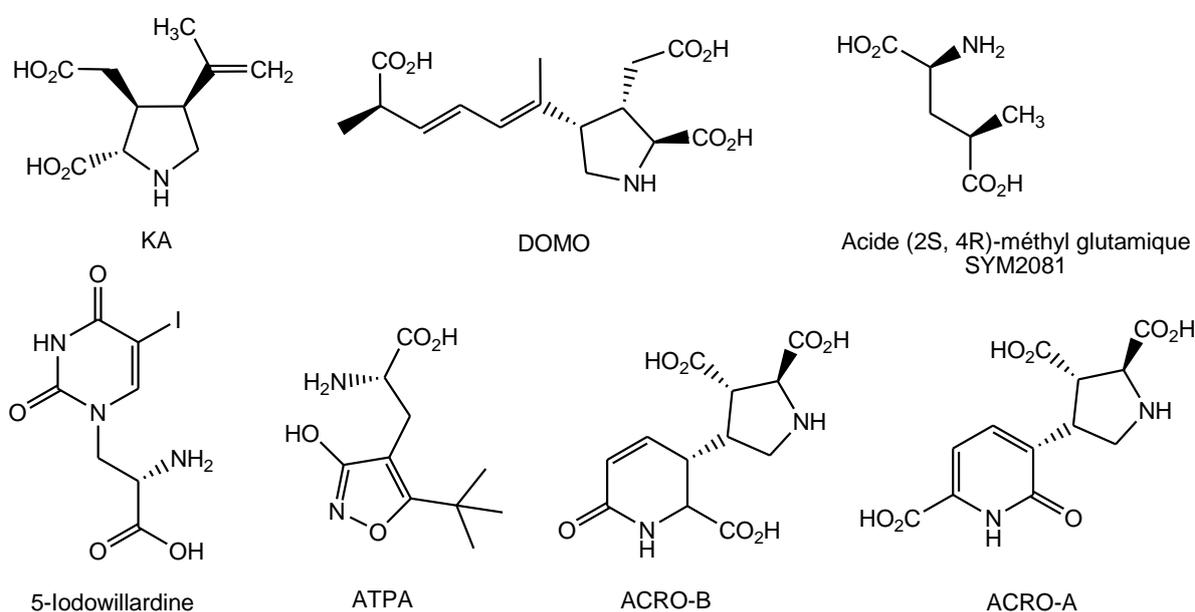
<sup>90</sup> M. Hollman, S. Heinemann, *Annu. Rev. Neurosci*, **1994**, 17, 31-.

<sup>91</sup> B. Bettler, C. Mulle, *Neuropharmacology*, **1995**, 34, 123-.

<sup>92</sup> F. J. Gallyas, S. M. Ball, E. Molnar, *J Neurochem*, **2003**, 86, 1414-1427.

L'acide domoïque (DOMO) et les acides Acroméliques (ACRO A et B) sont des agonistes plus puissants pour les récepteurs KA mais avec une faible sélectivité et dans ce contexte il active aussi les récepteurs AMPA. L'ATPA et la (S)-5-iodowillardine sont de bons agonistes sélectifs des récepteurs KA possédant la sous-unité GluR-5<sup>93</sup>. L'acide (2S, 4R) méthyl glutamique (SYM2081) (Figure I. 13) quant à lui se révèle être un bon agoniste de récepteurs comprenant la sous unité GluR6<sup>94</sup>. Notre équipe a travaillé sur la synthèse énantiosélective de l'analogue 4-méthylglutamate<sup>95</sup>.

Ces récepteurs présentent une faible affinité pour le glutamate et une très faible affinité pour l'AMPA.



**Fig I. 13:** Structures de quelques agonistes des KA-R.

<sup>93</sup> A. Alt, B. Weiss, A. M. Ogden, J. L. Knauss, J. Oler, K. Ho, T. H. Large, D. Bleakman, *Neuropharmacology*, **2004**, 46, 793 -806.

<sup>94</sup> L. Bunch, T. Gefflaut, S. Alaux, E. Sagot, B. Nielsen, D. S. Pickering, *Eur. J. Pharmacol*, **2009**, 609, 1-4.

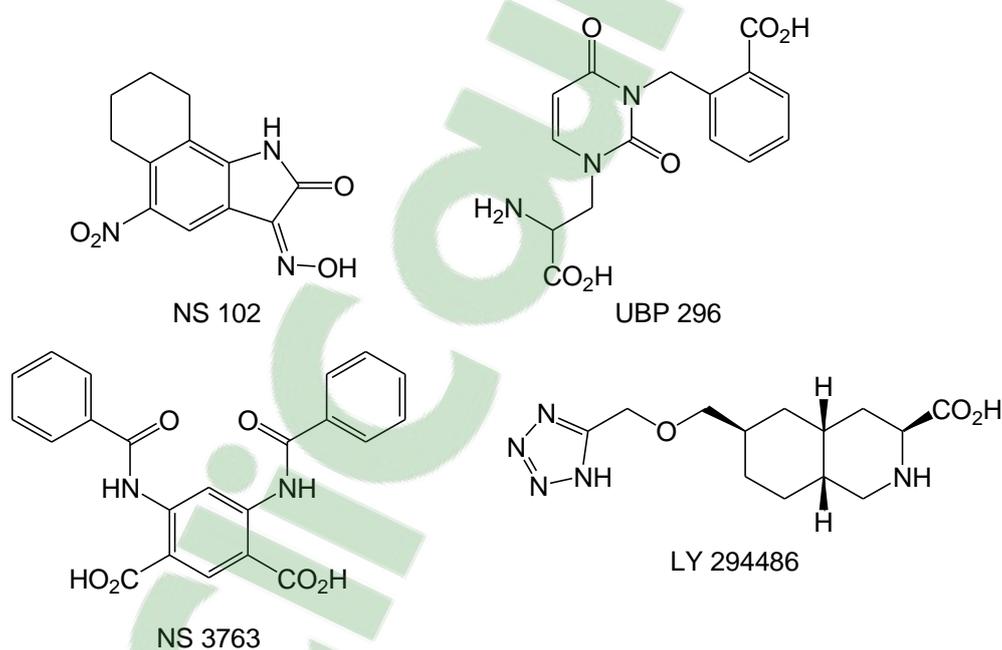
<sup>95</sup> J. Wehbe, V. Rolland, M. L. Roumestant, J. Martinez, *Tetrahedron Asym*, **2003**, 14, 1123-1126.

### I. 4. 4. 1. 2. b. 2 Les antagonistes du KA-R:

La caractérisation pharmacologique des récepteurs KA a depuis longtemps souffert du manque d'agonistes sélectifs ; la majorité des ligands bloque à la fois les récepteurs kaïnate et AMPA (CNQX, DNQX, NBQX).

Des antagonistes compétitifs plus sélectifs ont été synthétisés. Le composé (*R, S*)-3-(2-carboxybenzyl)willardine (UBP296) possède une plus grande affinité pour les récepteurs portant la sous-unité GluR5 que ceux comprenant la GluR6<sup>96</sup>. Le NS102 montre un effet antagoniste pour les sous unités GluR5 et GluR6 des récepteurs Kaïnate et une certaine affinité pour les récepteurs AMPA.

D'autres ligands sélectifs des récepteurs Kaïnate ont été décrits dans la littérature, on peut citer le LY 294486 qui a une activité antagoniste et une certaine sélectivité envers le GluR5, et l'acide 5-carboxy-2,4-di-benzamidobenzoïque (NS3763) (Figure I. 14) antagoniste non compétitif qui présente lui aussi une sélectivité pour les récepteurs Kaïnate possédant la sous-unité GluR5<sup>97</sup>



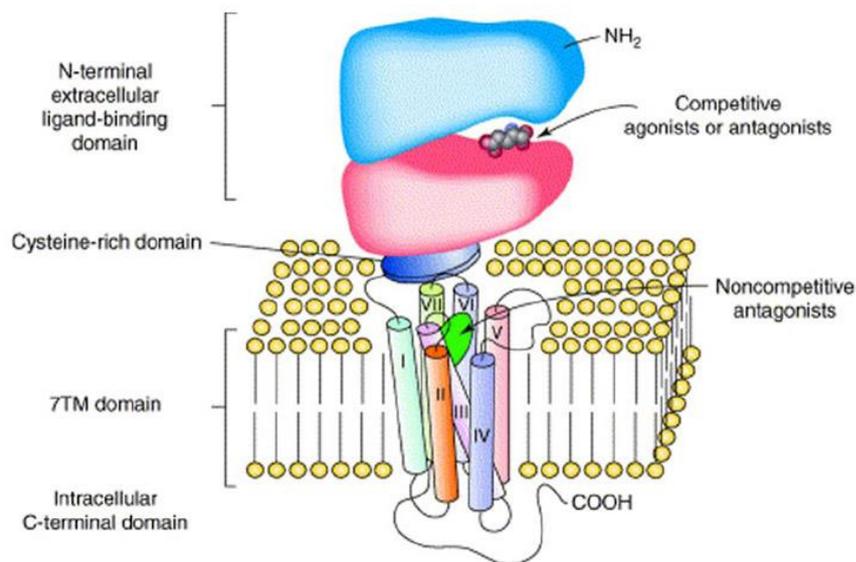
**Fig I. 14** : Des antagonistes du récepteur Kainate.

<sup>96</sup> J. C. More, R. Nistico, N. P. Dolman, V. R. Clarke, A. J. Alt, A. M. Ogden, F. P. Buelens, H. M. Troop, E. E. Kelland, F. Pilato, D. Bleakman, Z. A. Bortolotto, G. L. Collingridge, D. E. Jane, *Neuropharmacology*, **2004**, 47, 46-64.

<sup>97</sup> J. K. Christensen, T. Varming, P. K. Ahring, T. D. Jorgensen, E. O. Nielsen, *J Pharmacol Exp Ther*, **2004**, 309, 1003-1010.

### I. 4. 4. 2 Les récepteurs métabotropiques mGluR:

Les récepteurs métabotropiques se distinguent des récepteurs ionotropiques par le fait que leur activation ne produit pas l'ouverture directe d'un canal ionique, mais l'activation d'une protéine G. Les protéines G sont des protéines membranaires qui participent aux voies de transduction des signaux, en recevant les signaux d'un récepteur membranaire et en les transmettant à un effecteur. Le récepteur est formé d'une ou plusieurs sous-unités, présentant une structure à sept hélices  $\alpha$  transmembranaires. L'extrémité N-terminale de la protéine est extracellulaire et contient le site de liaison au glutamate. L'extrémité C-terminale est intracellulaire (Figure I. 15). Huit membres de cette famille ont été identifiés (mGlu<sub>1</sub> à mGlu<sub>8</sub>). Ces récepteurs sont classés en trois groupes en fonction de leur homologie de séquence en acide aminés, du type de cascade réactionnelle aux seconds messagers et de leur pharmacologie.

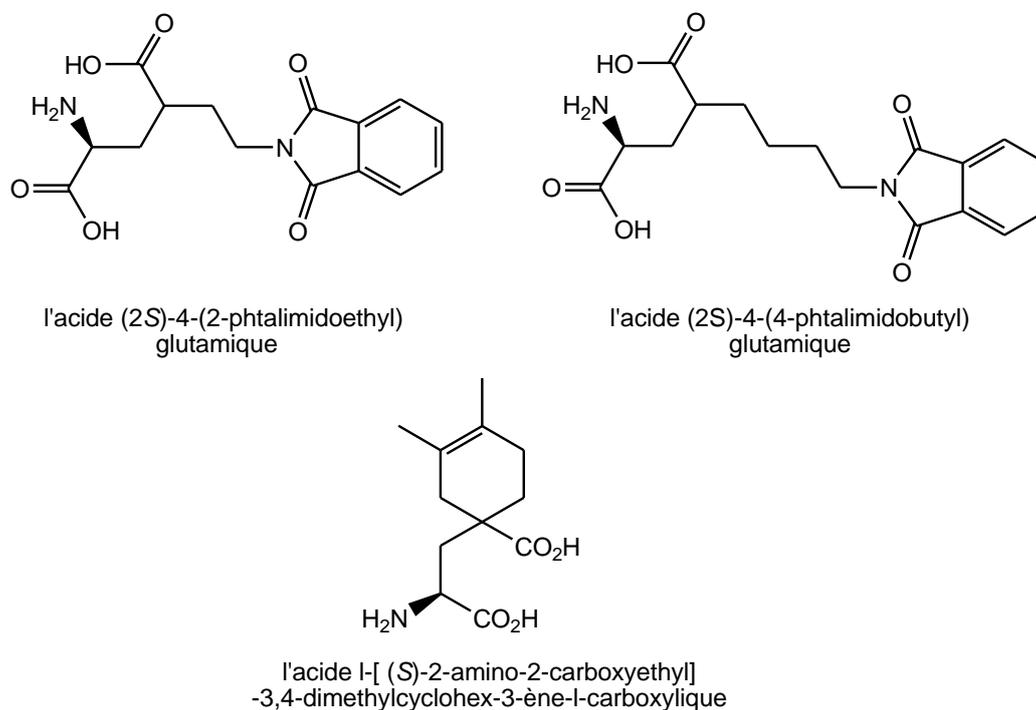


**Fig I. 15 :** Représentation schématique d'un récepteur métabotropique du glutamate<sup>98</sup>.

Engagé dans la recherche de nouvelles molécules capables d'activer, de bloquer, ou moduler des sous-types de récepteurs du glutamate, notre équipe de recherche a examiné il y a quelques années, la synthèse de divers analogues du glutamate substitués en position 4 tels que : l'acide (2*S*)-4-(2-phthalimidoethyl) glutamique, l'acide (2*S*)-4-(4-phthalimidobutyl) glutamique, et l'acide 1-[(*S*)-2-amino-2-carboxyéthyl]-3,4-diméthylcyclohex-3-ène-1-

<sup>98</sup> [www.123bio.net/revues/kainate/f5.html](http://www.123bio.net/revues/kainate/f5.html).

carboxylique (Figure I. 16). Ces composés ont présenté une activité modérée en tant qu'antagonistes des récepteurs métabotropiques du groupe I<sup>99</sup>.



**Fig I. 16 :** La structure de quelques antagonistes de *mGluRs*.

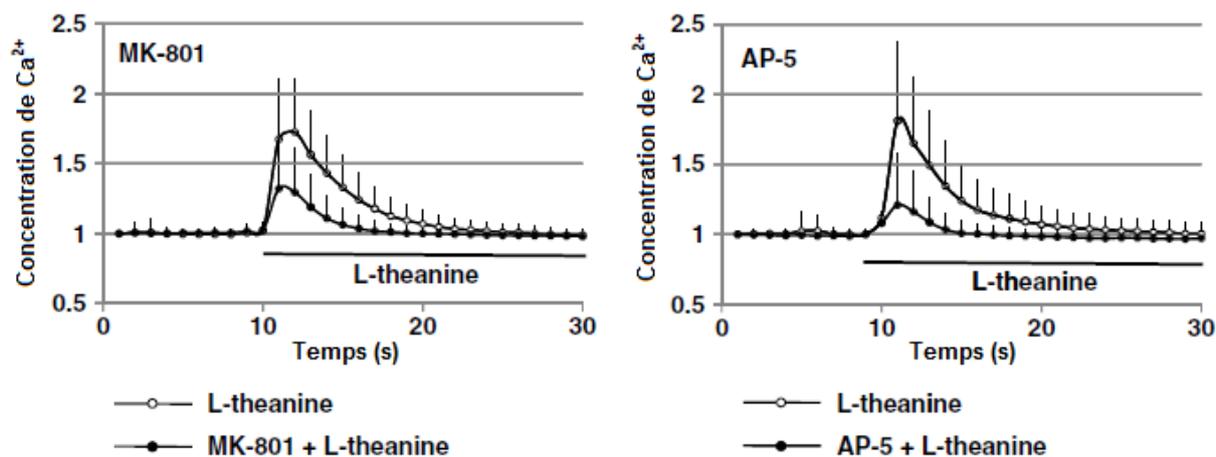
#### I. 4. 5 Effet de la Théanine sur les récepteurs NMDA :

De nombreux articles avancent des hypothèses au sujet de l'activité de la théanine sur les récepteurs NMDA : elle agirait en tant qu'antagoniste de NMDA-R.

Très récemment pour déterminer si la Théanine agit en tant qu'agoniste ou antagoniste, Wakabayashi et al<sup>100</sup>, ont mesuré le Ca<sup>2+</sup> intracellulaire des neurones en culture utilisant Fluo-3 comme indicateur. L'application d'une solution de Théanine à une concentration de 1µM augmente de manière significative la concentration de Ca<sup>2+</sup> dans les neurones corticaux en culture. En outre, l'application à la fois le MK-801 un antagoniste du canal ionique de récepteurs NMDA ou de l'AP-5 antagoniste du site glutamate du NMDA-R diminue la concentration de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire induite par la Théanine (Figure I. 17).

<sup>99</sup> J. M. Receveur, J. Guiramand, M. Récasens, M. L. Roumestant, Ph. Viallefont, J. Martinez, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 127–132.

<sup>100</sup> C. Wakabayashi, T. Numakawa, M. Ninomiya, S. Chiba, H. Kunugi, *Psychopharmacology*, **2012**, 219, 1099–1109.



**Fig I. 17 :** Effet de la Théanine, Théanine+MK-801, et Théanine +AP-5 sur la  $[Ca^{2+}]$  intracellulaire.

Dans ce projet, nous nous sommes focalisés sur l'évaluation de l'activité de la théanine sur les récepteurs NMDA utilisant les techniques de neurophysiologie par la mesure de calcium intracellulaire sur des neurones d'hippocampe en culture. Les expériences et les résultats obtenus avec toutes les discussions seront présentés par la suite dans un troisième chapitre.

### I. 5 La biosynthèse et l'extraction de la L-théanine :

Les synthèses de la L-théanine décrites dans la littérature peuvent être discutées en trois parties : l'extraction du thé, la synthèse enzymatique mise en œuvre par des enzymes recombinantes et bactériennes, et la synthèse chimique stéréosélective. Ces deux méthodes ont été très développées ces dernières années.

#### 5. 1 La Théanine et le thé :

La Théanine a été découverte par Sakato comme étant l'acide aminé libre le plus abondant de theaceae<sup>1</sup> et elle représente environ 50% des acides aminés libres présents dans le thé. Nagata et Sakai<sup>101</sup> ont montré que la L-théanine se trouve dans 23 espèces de *Camellia*, sa présence semble être limitée au genre *Camellia*, surtout aux plantes productrices de thé, *Camellia. sinensis* var. *sinensis* et *Camellia. sinensis* var. *assamica*. La L-Théanine est caractérisée par son goût umami<sup>102</sup>.

<sup>101</sup> T. Nagata, S. Sakai, *Jpn. J. Breed.*, **1984**, 34, 459 - 467.

<sup>102</sup> D. A. Balentine, M. E. Harbowy, H. N. Graham, ed. by Spiller GA. CRC Press, Boca Raton, **1998**, pp. 35-72

La Théanine dans le thé est majoritairement de série « L », de petites quantités de l'isomère « D » ont également été trouvées dans les feuilles de thé (tableau 3) selon leur origine; chacun des énantiomères purs et le mélange racémique de Théanine ont un goût sucré similaire<sup>103</sup>.

Nom du thé	Type de thé	Origine du thé	D-théanine (%)	Quantité totale (en g de Théanine/100g de feuilles de thé séchées)
Fleur africain	Noir	Kenya	0.54	1.30
Assam FOP	Noir	Inde	0.49	1.05
Ceylan cassé	Noir	Sri Lanka	2.30	1.32
Ceylan Pekoe	Noir	Sri Lanka	0.34	2.20
Cerise Blend FOP	Noir	Inde	0.21	2.04
Darjeeling FOP	Noir	Inde	0.45	1.45
Earl Grey	Noir	Chine	0.42	1.07
Formosa Oolong	Demi-vert	Taiwan	12.7	0.60
Géorgian FOP	Noir	Géorgie	0.46	1.16
Gunpowder	vert	Chine	2.20	1.78
Jasmine Fop	Demi-vert	Chine	0.45	1.72
Keemun FOP	Noir	Chine	0.65	1.12
Lapsange Souchong	Noir	Chine	1.04	0.82
Lemon Blend	Noir	Inde	2.70	1.26
Rosen	Noir	Chine	2.46	1.03
Sencha	Vert	Japon	2.20	1.05
Yunnan	Noir	Chine	1.79	2.38

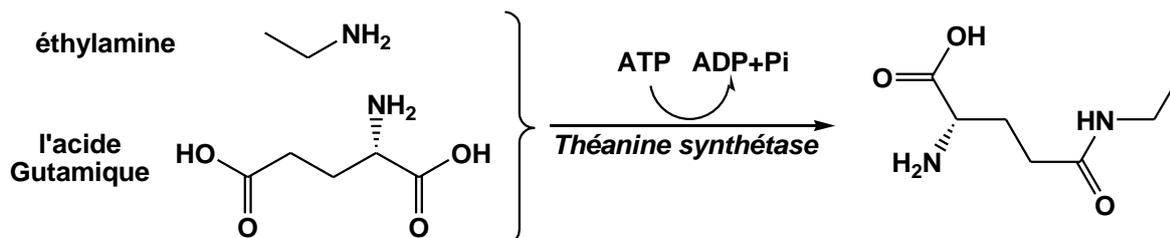
**Tableau 3 :** Etude comparée des différentes origines du thé et de leur composition.

Avant d'exploiter les différentes méthodes qui ont été décrites dans la littérature pour identifier et isoler la Théanine nous aborderons brièvement la biosynthèse de la Théanine au niveau de la plante de thé.

<sup>103</sup> K. H. Ekborg-Ott, A. Taylor, D. W. Armstrong, *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 353–363.

### I.5.1.1 Biosynthèse de la L-Théanine :

Dans le thé, la Théanine est biosynthétisée à partir de l'acide glutamique et d'éthylamine par l'enzyme *théanine synthétase* [EC6.3.1.6] qui possède une forte affinité pour l'éthylamine comparée à l'ammoniac (Figure I. 18)<sup>104</sup>. Cependant, la *théanine synthétase* ne peut pas être utilisée pour produire la Théanine à l'échelle industrielle car l'enzyme est instable dans les conditions opératoires (milieu alcalin) d'amidification in vitro.



**Fig I. 18:** La biosynthèse de la Théanine dans la plante du thé.

Pour étudier la biosynthèse de la théanine au niveau de la plante de thé, de nombreux scientifiques ont examiné l'incorporation de composés radioactifs. En 1967, l'assimilation du  $^{14}\text{CO}_2$  par les feuilles de thé a été mise en évidence ; une certaine radioactivité a été retrouvée dans l'acide glutamique, mais uniquement une faible radioactivité a été obtenue dans la théanine après 50 heures d'exposition au  $^{14}\text{CO}_2$ <sup>105</sup>. Les auteurs en ont déduit que peut être la Théanine n'était pas biosynthétisée à partir de l'acide glutamique.

Une année plus tard en 1968, Konishi a montré que la L-Théanine se décompose (hydrolyse) en acide glutamique et éthylamine ; ces résultats lui permettent d'expliquer les taux élevés de radioactivités présents dans l'acide glutamique et l'éthylamine<sup>106</sup>.

Le L-glutamate, l'éthylamine, l'ATP, les systèmes de production d'ATP, le  $\text{Mg}^{2+}$  et la lumière sont nécessaires pour la production de Théanine dans la plante du thé<sup>107 108</sup>.

L'éthylamine semblait être produite à partir de L-alanine, qui est générée par l'*alanine décarboxylase* (ADC) dans la plante du thé<sup>109</sup>.

<sup>104</sup> W. W, Deng, S. Ogita, H. Ashihara, *Phytochem Lett*, **2008**, 1, 115–119.

<sup>105</sup> S. Konishi, Z. Kasai, *Research Institute for Food Science, Kyoto University*, **1967**, pp 439-443.

<sup>106</sup> S. Konishi, Z. Kasai, N. D. Zasshi, *Soil Science and Plant Nutrition*, **1968**, 14, 5, 209-210,

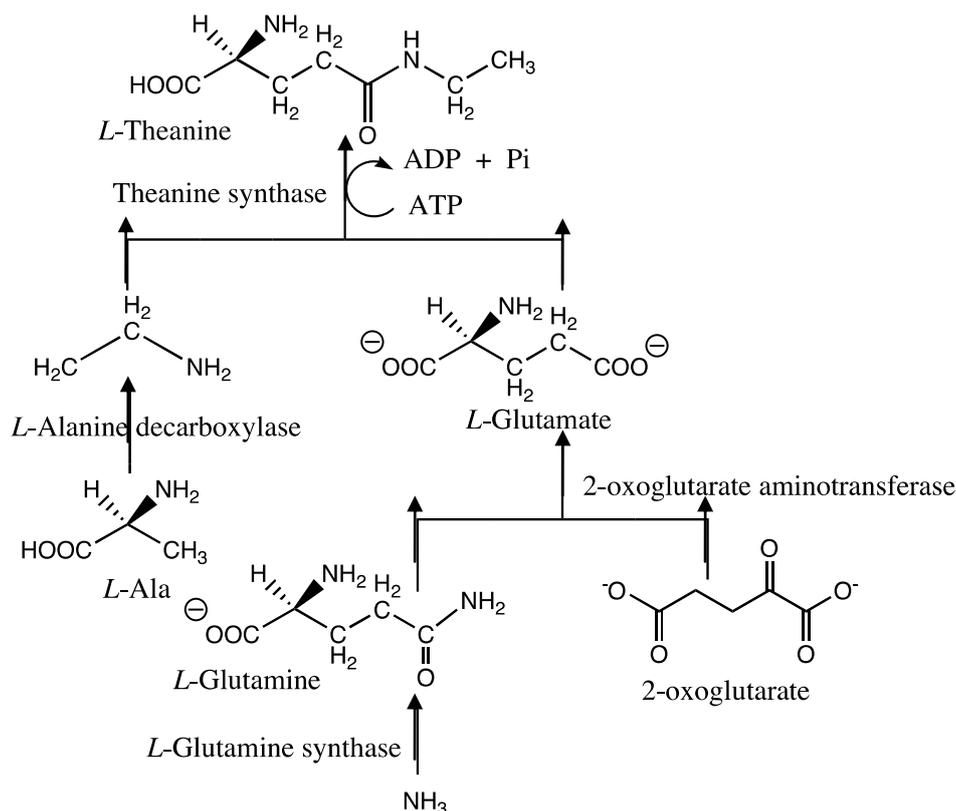
<sup>107</sup> K. Sasaoka, M. Kito, Y. Onishi, *Agric. Biol. Chem.* **1965**, 29, 984–88.

<sup>108</sup> P.J. Largeta, A. D. Jones, B. C. Dacombeb, *Journal of Chromatography A*, **1998**, 799, 309–320.

<sup>109</sup> T. Takeo, *Phytochemistry*, **1978**, 17, 313–14.

L'incorporation de  $N^{15}$  grâce à  $N^{15}$  du sulfate d'ammonium,  $N^{15}$  du glutamate,  $N^{15}$  de l'alanine et de la  $C^{14}$  éthylamine indique que tous les organes de la plante de thé sont capables de synthétiser la Théanine à partir de tous ces composés.

La biosynthèse de la Théanine dans les racines de thé a été proposée par Takeo et al en 1987 comme indiqué dans la (Figure I. 19).



**Fig I. 19** : Biosynthèse de la L-Théanine dans les racines de thé.

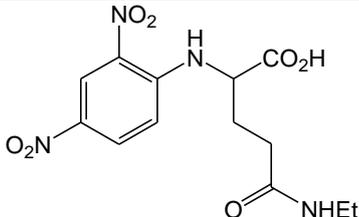
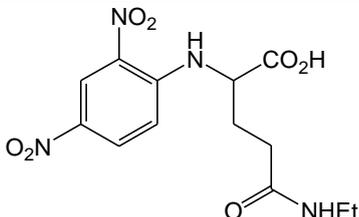
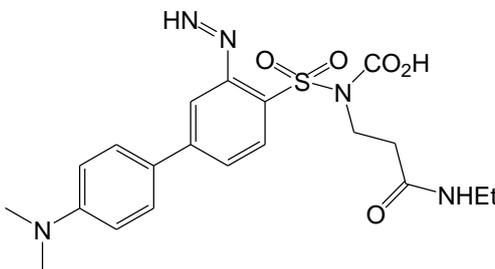
### I. 5. 1. 2 Extraction du thé :

#### I. 5. 1. 2. 1 Méthode d'identification et de détection :

Plusieurs méthodes analytiques ont été développées pour l'identification et la quantification de la théanine. Ces méthodes peuvent être également utilisées pour déterminer sa concentration, son taux d'isolation et aussi sa pureté dans les produits finaux.

L'analyse de la Théanine a été principalement effectuée par des techniques chromatographiques telles que la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), l'électrophorèse capillaire (CE) et la chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC).

Le tableau 4 suivant résume quelques méthodes d'identification de la Théanine décrites dans la littérature. De nombreux réactifs chromophores de marquage sont utilisés dans le but d'optimiser et faciliter la détection de la Théanine qui n'absorbe pas à l'UV.

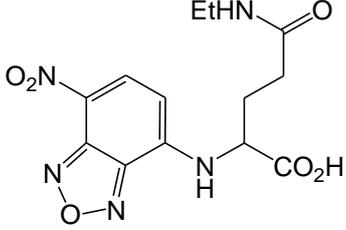
Réactifs de dérivatisation	Dérivés de la Théanine	Méthode de détection	Réf biblio
Réactif de Sanger, le 2,4-dinitro fluorobenzène (DNFB)		Chromatographie capillaire électrocinétique avec un détecteur UV à 360nm	Li et al <sup>110</sup>
Réactif de Sanger, le 2,4-dinitro fluorobenzène (DNFB)		Chromatographie capillaire électrocinétique avec un détecteur à photodiodes à 200-280 nm	Hsiao et al <sup>111</sup>
Chlorure de dabsyle, chlorure de 4-((4-diméthylamino)phényl) diazenylbenzène-1-sulfonyle		Chromatographie (HPLC) couplée à un détecteur à 425 nm.	Syu et al <sup>112</sup>
NC	NC	Chromatographie (HPLC) sur une colonne C16-amide avec un détecteur UV à 210, 280 nm.	Peng et al <sup>113</sup>

<sup>110</sup> P. Li, X. C. Wan, Z. Z. Zhang, J. Li, Z. J. Shen, *J Chromatogr B*, **2005**, 819, 81–84.

<sup>111</sup> H. Y. Hsiao, R. L. C. Chen, T. J. Cheng, *Food Chem*, **2010**, 120, 632 – 636.

<sup>112</sup> K. Y. Syu, C. L. Lin, H. C. Huang, J. K. Lin, *J Agric Food Chem*, **2008**, 56, 7637–7643.

<sup>113</sup> L. Peng, X. Song, X. Shi, J. Li, C. Ye, *J Food Compos Anal*, **2008**, 21, 559–563.

4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole,		Isotachophorèse capillaire en mode anionique avec détection de conductivité directe	Kvasncka et al <sup>114</sup> , Ding et al <sup>115</sup>
NC	NC	Electrophorèse capillaire à l'aide d'une colonne capillaire en silice fondue couplée à un détecteur à barrettes de diodes à 214 nm	Chen et al <sup>116</sup>

**Tableau 4 :** Les différentes méthodes d'identification et de détection de la Théanine dans la plante du thé.

#### I. 5. 1. 2. 2 Séparation et isolation :

La quantité de la Théanine dans le thé change selon les différents types de ce dernier. De plus pour un thé bien déterminé, la quantité de Théanine dépend du degré de fermentation.

De nombreuses expériences ont été tentées pour isoler la Théanine du thé mais ces méthodes sont encore très limitées. Par exemple, Zhang<sup>117</sup> et al ont isolé la Théanine du thé en 4 étapes ; d'abord ils ont extrait les catéchines avec de l'acétate d'éthyle ensuite la Théanine est extraite avec de l'eau à 50°C. La purification a lieu sur une colonne échangeuse de cations pour donner un extrait contenant 50% de Théanine. Finalement cet extrait est purifié par HPLC à phase inverse C18 et une phase mobile contenant de l'acide formique tamponné à un pH=3. La pureté finale de la théanine dans cette procédure est de l'ordre de 98% mais avec un rendement global très faible 2.53mg kg<sup>-1</sup> de plante verte. Les coûts de production sont élevés et l'échelle est limitée.

<sup>114</sup> F. Kvasnicka, J. Krátká, *Cent Eur J Chem*, **2006**, 4, 216 –222.

<sup>115</sup> Y. Ding, H. Yu, S. Mou, *J Chromatogr A*, **2002**, 982, 237 –244.

<sup>116</sup> C. N. Chen, C. M. Liang, J. R. Lai, Y. J. Tsai, J. S. Tsay, J. K. Lin, *J Agric Food Chem*, **2003**, 51, 7495 – 7503.

<sup>117</sup> Y. Zhang, B. Chen, Z. Huang, Z. Shi, *J Liq Chromatogr Relat Technol*, **2004**, 27, 875 –884.

En 2007, Lachova et al<sup>118</sup>, ont utilisé la technologie des polymères à empreinte moléculaire (MIP) pour isoler sélectivement la L-Théanine à partir d'extrait de thé vert. Le polymère MIP a été préparé selon la méthode de Reddy et al<sup>119</sup>. Deux polymères MIP1 et MIP2 ont été préparés à partir de Nylon-6 (2.0 g) et la L-Théanine (0.8 g pour MIP1 et 1.2 g pour MIP2) puis ont été traités. Ces polymères sont caractérisés par leur capacité à être chargés en Théanine. Dans cette méthode les auteurs ont introduit ces polymères dans un extrait de thé. Ces polymères se chargent en L-Théanine selon une procédure un peu longue non détaillée ici. L'extrait est filtré puis lavé avec de l'eau pour récupérer la Théanine, qui est par la suite purifiée par HPLC. Le rendement de cette technique est très satisfaisant : 880mg Kg<sup>-1</sup> du poids humide.

Ces dernières années un certain nombre de brevets ont développé l'extraction de la Théanine. Ekamayake et Li<sup>120</sup> ont réussi à extraire la Théanine sans utiliser de solvants organiques. L'extrait des feuilles de thé à l'eau chaude est passé à travers une colonne préparative d'une phase solide de polyamide. La procédure a donné la Théanine contaminée par des impuretés telles que les saccharides, des polyphénols dont la caféine (catéchines). Les auteurs ne précisent pas les rendements.

Baudouin et al<sup>121</sup>, ont décrit dans un brevet une autre technique d'extraction de la Théanine: dans un premier temps ils ont récupéré l'extrait aqueux du thé noir, puis ce dernier est filtré et séché pour obtenir un solide riche en Théanine. Le précipité a ensuite été dissous de nouveau dans l'eau et purifié par fractionnement en utilisant la chromatographie d'échange de cations Diaion UBK550. Cependant, la pureté finale de la théanine et le rendement sont relativement faibles (440 mg kg<sup>-1</sup> de feuilles séchées). Cette procédure d'isolation de la théanine est compliquée et longue.

### **I. 5. 2 La synthèse chimioenzymatique de la L-Théanine :**

La L-Théanine est produite par voie enzymatique, cette méthode est la plus utilisée à l'échelle industrielle. Elle met en œuvre des enzymes ayant une activité similaire à celle de la *théanine synthetase*<sup>122 123</sup>. La synthèse enzymatique de la L-Théanine peut s'effectuer à partir

---

<sup>118</sup> M. Lachová, J. Lehotay, G. Karasová, I. Skacàni, D. W. Armstrong, *J Liq Chromatogr Relat Technol*, **2007**, 30, 2045 –2058.

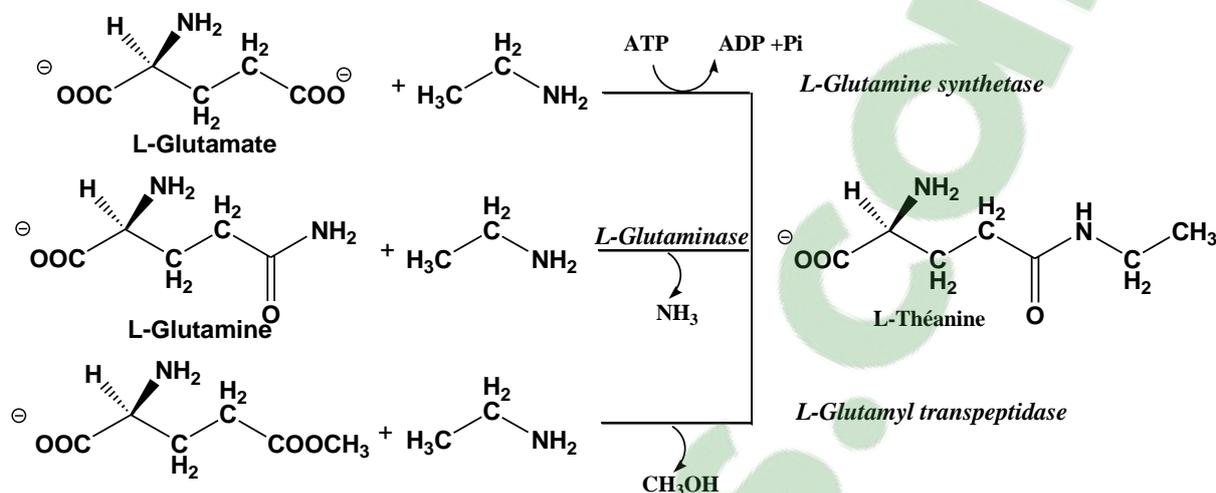
<sup>119</sup> P. S. Reddy, T. Kobayashi, N. Fujii, *Chem Lett*, **1999**, 28, 293 -294.

<sup>120</sup> A. Ekamayake, J. J. Li, US Patent 689910, **2007**.

<sup>121</sup> S. X. Baudouin, European Patent EP2144868 (A1), **2010**.

<sup>122</sup> K. Sasaoka, M. Kito, Y. Onishi, *Agric. Biol. Chem*, **1964**, 28, 318-324.

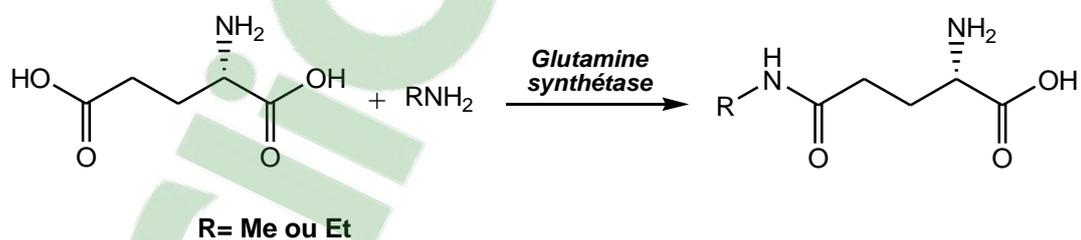
de trois substrats : l'acide L-glutamique (Glu), la L-glutamine (Gln) et l'ester  $\gamma$ -méthylique de l'acide L-glutamique (H-Glu(OCH<sub>3</sub>)-OH) avec les enzymes bactériennes glutamine synthétase [GS, ES 6.3.1.2], glutaminase [EC 3.5.1.2], et  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase [GGT, EC2.3.2.2] respectivement (Figure I. 19)<sup>124</sup>.



**Fig I. 19** : Synthèse enzymatique de la L-Théanine par les enzymes bactériennes.

### I. 5. 2. 1 A partir de l'acide glutamique :

En 1986 Tachiki et al<sup>125</sup>, ont décrit la synthèse de la Théanine et la (L) 5-N-méthyl glutamine en utilisant l'acide glutamique et le chlorhydrate d'éthylamine ou de méthylamine en tant que substrats en présence de la glutamine synthetase bactérienne (GS) et d'une quantité catalytique d'autres substrats : de l'ATP, du fructose et des cellules de levure de boulanger (schéma 2). Cette méthode s'inspire de la production de glutamine à partir d'acide glutamique, et d'ammoniaque par fermentation en utilisant une levure de boulanger<sup>126 127</sup>.



**Schéma 2.**

<sup>123</sup> K. Sasaoka, M. Kito, Y. Onishi, *Agric. Biol. Chem.*, **1964**, 28, 325-330.

<sup>124</sup> F. Zhang, Q. Z. Zheng, Q. C. Jiao, J. Z. Liu, G. H. Zhao, *Amino Acids*, **2010**, 39, 1177-1182.

<sup>125</sup> T. Tachiki, H. Suzuki, S. Wakisaka, T. Yano, T. Tochikura, *J Gen Appl Microbiol*, **1986**, 32, 545-548.

<sup>126</sup> T. Tachiki, H. Suzuki, S. Wakisaka, T. Yano, T. Tochikura, *J Gen Appl Microbiol*, **1983**, 29, 355-363.

<sup>127</sup> S. Wakisaka, Y. Oshima, M. Ogawa, T. Tochikura, T. Tachiki, *Appl Environ Microbiol*, **1998**, 64, 2952-2957

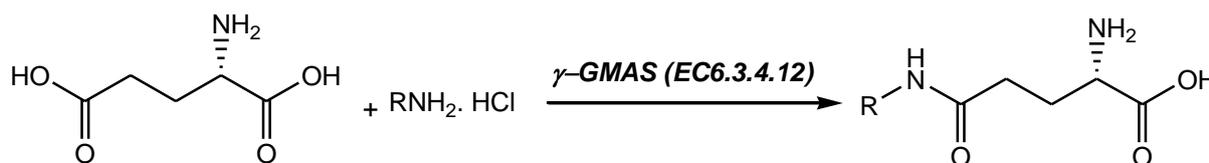
La glutamine synthetase (GS) de *pseudomonas taetrolens* Y-30, catalyse la synthèse de la théanine (170 mM) à un pH optimum de 8,5 dans un mélange contenant du  $Mn^{+2}$  comme cofacteur, 200 mM de glutamate de sodium et 1200 mM d'éthylamine (un rapport 1/6) en 48h<sup>128</sup> (schéma 3).



Schéma 3.

La glutamine synthétase d'*Escherichia coli* modifiée par une adénylylation possède une activité catalytique 30 fois plus importante que celle de *P. taetrolens* Y-30 vis-à-vis de la synthèse de la L-Théanine<sup>129</sup>.

Les enzymes  $\gamma$ -glutamylamide synthetase de *pseudomonas* ont montré une activité catalytique similaire à celle de la GS dans la synthèse de la L-théanine. Des réactions de gamma amidation de l'acide glutamique avec le chlorhydrate d'éthylamine ont été effectuées en mettant en œuvre deux différents enzymes :  $\gamma$ -glutamylméthylamide synthetases  $\gamma$ -GMAS (EC6.3.4.12)<sup>130</sup> (schéma 4) et la  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase  $\gamma$ -GCS (EC6.3.2.2)<sup>131</sup> (schéma 5).



R= Me ou Et

Schéma 4.

<sup>128</sup> S. Yamamoto, M. Wakayama, T. Tachiki, *Biosci, Biotechnol, Biochem*, **2005**, 69. 784 -789.

<sup>129</sup> S. Yamamoto, M. Wakayama, T. Tachiki, *Biosci, Biotechnol, Biochem*, **2006**, 70. 500 - 507.

<sup>130</sup> S. Yamamoto, M. Wakayama, T. Tachiki, *Biosci, Biotechnol, Biochem*, **2007**, 71, 545-552.

<sup>131</sup> K. Miyake, S. Kakita, *Biosci, Biotechnol, Biochem*, **2009**, 73. 2677- 2683.

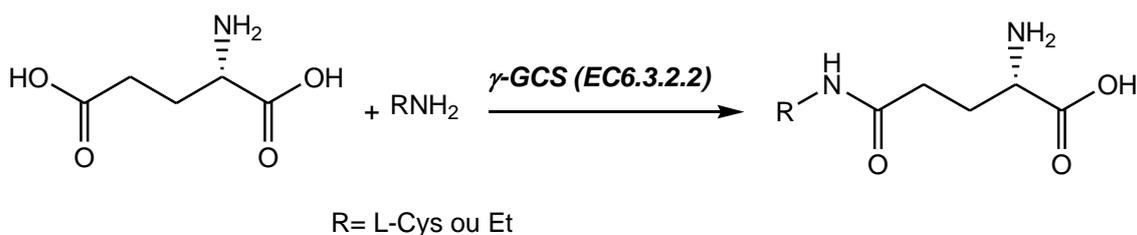


Schéma 5.

Les supports sont très utilisés dans la technologie d'immobilisation cellulaire. Les nanofibres ont plusieurs avantages: leur grande surface spécifique qui augmente la surface d'énergie potentielle, l'amélioration du taux de transfert de masse et l'efficacité catalytique des cellules immobilisées. Les membranes nanofibres présentent une porosité importante, et sont plus faciles à séparer au cours du processus catalytique, à recycler et à ré-utiliser avec un taux de production élevé<sup>132</sup>.

Très récemment une autre enzyme *P. nitroreducens* LY a été immobilisée avec succès dans des nanofibres par filage électrostatique de mélanges aqueux de bactéries et d'alcool polyvinylique (PVA). L'activité de ces cellules immobilisées a été évaluée pour la synthèse de la Théanine. La production de la Théanine par ce nouveau procédé est de 10.74 g/L avec un taux de conversion du glutamate de sodium de 20.55%<sup>133 134</sup> (schéma 6).



Schéma 6.

Avec toutes les modifications apportées sur les procédés utilisant la *glutamine synthétase*, la production de Théanine reste insatisfaisante car l'enzyme réagit très peu avec l'éthylamine. De plus le contrôle du pH du mélange réactionnel est délicat.

<sup>132</sup>S. Klein, J. Kuhn, R. Avrahami, S. Tarre, M. Beliaevski, M. Green, E. Zussman, *Biomacromolecules*, **2009**, 10,1751–1756.

<sup>133</sup>B. Liu, P. Li, C. L. Zhang, Y. Wang, Y. S. Zhao, *Process Biochemistry*, **2010**, 45, 1330-1333.

<sup>134</sup>B. Liu, L. Ge, C. Zhang, Y. Zhao, P. Lia, *J Sci Food Agric*, **2012**, 92, 2274–2280.

### I. 5. 2. 2 A partir de la glutamine :

Abelian et al<sup>135</sup> ; ont été les premiers en 1993 à développer une méthode enzymatique de production de la L-Théanine à partir de la glutamine et de l'éthylamine utilisant les cellules *nitroreducens pseudomonas* IFO 12694 immobilisées. L'immobilisation de ces cellules a été effectuée avec un gel de polyacrylamide ou de k-carraghénane par la méthode de Sato<sup>136</sup> et Tosa<sup>137</sup>. La L-Théanine est obtenue avec un rendement de 96%, en faisant réagir 0.3 M de glutamine et 0.7 M d'éthylamine (un rapport de 1/2.4) à un pH de 9.5 (schéma 7).

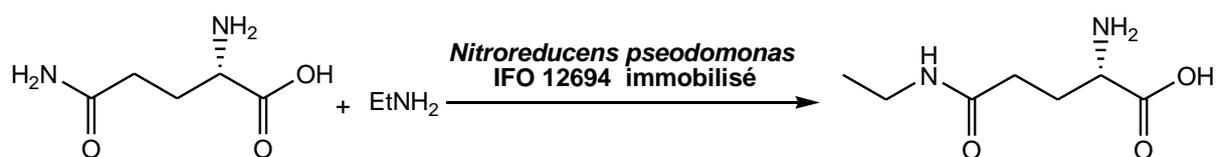


Schéma 7.

La *glutaminase* [EC 3.5.1.2] est une enzyme qui hydrolyse la glutamine en acide glutamique et en ammoniacque. La *glutaminase* possède une activité catalytique similaire à celle de la *glutamyltransferase*. Takashi et al<sup>138</sup>, ont montré que la *glutaminase de Pseudomonas nitroreducens* IFO 12694 catalyse la réaction de transfert de la glutamine et de l'éthylamine ou de la méthylamine pour produire la Théanine ou le  $\gamma$ -méthylamide de l'acide glutamique ( $\gamma$ -GMA) (schéma 8). En partant de 0.7 M de glutamine, 1.5 M d'éthylamine ou de méthylamine (un rapport 1/2) et 0.5 unit/ml d'enzyme, la Théanine et  $\gamma$ -GMA sont obtenus avec des concentrations de 270 mM et 250 mM respectivement après 7 heures de réaction<sup>139</sup>.



Schéma 8.

<sup>135</sup> V. H. Abelian, T. Okubo, M. M. Shamsian, K. Mutoh, D. C. Chu, M. Kim, T. Yamamoto, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1993**, 57, (3), 481-483.

<sup>136</sup> T. Sato, Y. Nishida, T. Tosa, I. Chibata, *Biochim. Biophys. Acta*, **1979**, 570, 179-186.

<sup>137</sup> T. Tosa, T. Sato, T. Mori, Y. Mauto, I. Chibata, *Biotechnol and Bioeng.*, **1973**, 15, 69-84.

<sup>138</sup> T. Tachiki, T. Yamada, M. Ueda, Y. Naemura, N. Imamura, Y. Hamada, J. Shiode, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1996**, 60, 1160-1164.

<sup>139</sup> T. Tachiki, T. Yamada, K. Mizuno, M. Ueda, J. Shiode, H. Fukami, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1998**, 62, 1279-1283.

Plus tard en 2002, Suzuki et al<sup>140</sup>, ont développé pour la première fois une synthèse enzymatique efficace de la L-Théanine avec une  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase GGT bactérienne (*Escherichia coli* K-12). Le taux de conversion de la glutamine en L-Théanine est de 60% avec les conditions optimales (200 mM de Gln, 1.5 M d'éthylamine et 0.4 unités/ml de GGT).

L'enzyme GGT produite à partir d'une souche nouvellement isolée, *Bacillus subtilis* SK11.004 à partir de crevettes fermentées s'est révélée être un catalyseur efficace pour la synthèse enzymatique de la Théanine. La réaction de transfert entre la glutamine (20 mM) en tant que donneur et le chlorhydrate d'éthylamine (50 mM) comme accepteur (avec un rapport 1/2.5) mettant en œuvre l'enzyme GGT (0,06 U ml<sup>-1</sup>) à un pH de 10 conduit à la production de la Théanine (18,9 mM). Le taux de conversion de la glutamine allant jusqu'à 94% avec une quantité catalytique d'enzyme et seules des traces de sous-produits ont été observées (schéma 9)<sup>141</sup>.



**Schéma 9.**

Toutefois, lorsque la glutamine est utilisée comme donneur dans la réaction enzymatique de  $\gamma$ -transpeptidation par l'enzyme GGT, on observe une certaine compétition entre l'éthylamine et le groupe  $\alpha$ -amino libre de la glutamine, ce qui conduit à la formation du sous-produit dipeptidique Glu-Gln (schéma 10).

Cette réaction d'autotranspeptidation est le facteur principal de la diminution du rendement en théanine.

<sup>140</sup> H. Suzuki, S. Izuka, N. Miyakawa, H. Kumagai, *Enzyme and Microbial Technology*, **2002**, 31, 884-889.

<sup>141</sup> Y. Shuai, T. Zhang, B. M. Jiang, *J Sci Food Agric*, **2010**, 90, 2563-2567.

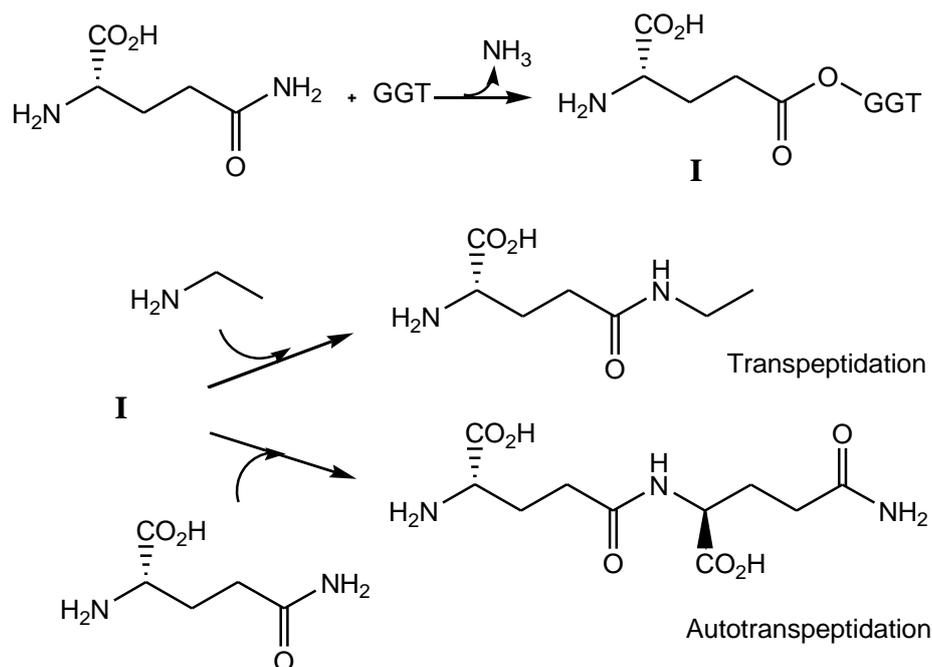
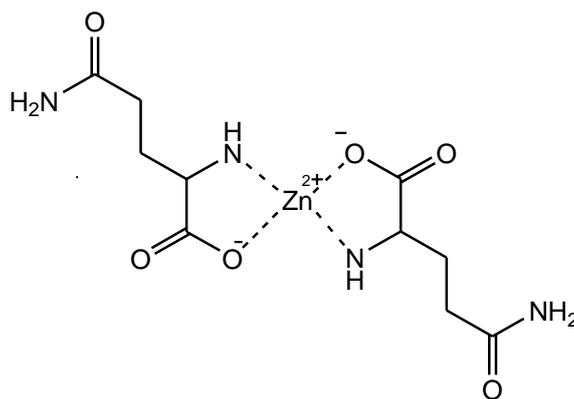


Schéma 10.

On peut éviter la réaction d'autotranspeptidation avec un grand excès d'éthylamine par rapport à la glutamine. Cependant cette concentration élevée d'éthylamine inhibe l'activité de la GGT.

Wang et al<sup>142</sup>, ont utilisé le complexe de L-glutamine  $-\text{Zn}$  ( $\text{Zn}(\text{Gln})_2$ ) (Figure I. 20) comme donneur dans la réaction enzymatique de  $\gamma$ -transpeptidation, dans lequel les  $\alpha$ -amino et  $\alpha$ -carboxy libres de la glutamine sont chélatés par le Zn. Avec cette technique de chélation aucune réaction d'autotranspeptidation n'a été observée. Le taux de conversion du complexe Zn de la glutamine dans cette procédure était de l'ordre de 64%. Une augmentation de 16.9% par rapport au taux de conversion de la glutamine non chélatée (64%) en tant que donneur est obtenue.

<sup>142</sup> H.Q. Wang, Z. Y. Z. Zhou, Y. Sun, P. Wei, P. Ouyang, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **2012**, 17, 1135-1139.



**Fig I. 20 :** Chélation de la glutamine par le Zn.

L'utilisation de tous ces procédés chimioenzymatiques présentent cependant des inconvénients pour une application industrielle tels que: la faible stabilité des enzymes dans les conditions opérationnelles appliquées tel que le pH élevé du milieu réactionnel et leur réutilisation limitée. L'immobilisation des enzymes est la technique la plus efficace pour contourner ces problèmes. Plusieurs procédures d'immobilisation ont été décrites dans la littérature ces dernières années. L'immobilisation sur silice mésoporeuse (MPS) est une technique applicable aux procédés enzymatiques avec succès<sup>143 144</sup>.

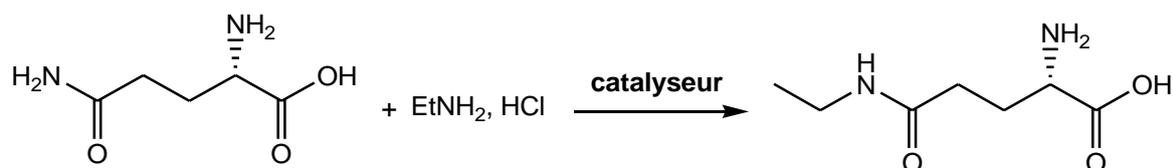
Yokoyama et al<sup>145</sup>, ont réussi à immobiliser la *glutaminase* isolée à partir de *P. nitroreducens* IFO 12694 sur des matériaux mésoporeux. Deux matériaux mésoporeux ont été préparés par la méthode de Kapoor et al<sup>146</sup> : silice mésoporeuse (TMPS) et zirconium-silice mésoporeuse (Zr-TMPS). Les conditions d'immobilisation ont été estimées à 1mg de *glutaminase* par 100 mg de chaque support. Ces conjugués sont désignés par Gln/Zr-TMPS et Gln/TMPS, ceux-ci ont été mis en suspension avec 20 mmole de glutamine dans 10 mL de solution de tampon contient 200 mmole de chlorhydrate d'éthylamine (rapport 1/10) (schéma 11).

<sup>143</sup> S. Hudson, J. Cooney, E. Magner, *Angew Chem Int Ed.* **2008**, 47, 8582–8594.

<sup>144</sup> M. Hartmann, D. Jung, *J Mater Chem*, **2010**, 20, 844–857 References there in.

<sup>145</sup> T. Yokoyama, R. Ishii, T. Itoh, K. Kitahata, S. Matsuura, T. Tsunoda, S. Hamakawa, T. Hanaoka, H. Nanbu, F. Mizukami, *Mater. Lett.* **2011**, 65, 67-69.

<sup>146</sup> M. P. Kapoor, A. Vinu, W. Fujii, T. Kimura, Q. Yang, Y. Kasama, *Micropor Mesopor Mater*, **2010**, 128, 187–193.



Catalyseur: *Glutaminase*, Glu/TMPS , Glu/Zr-TMPS

### Schéma 11.

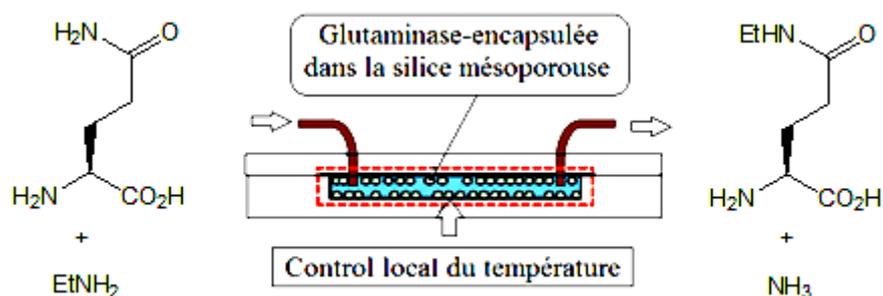
Les taux de conversion de la glutamine en Théanine sont de l'ordre de 53% et 62% pour Glu/ Z-TMPS et Glu/TMPS respectivement, et celui de la réaction effectuée avec seulement la *glutaminase* non immobilisée est de 58% (Tableau 5). Même si les rendements sont identiques, la différence essentielle est que les enzymes supportées sont réutilisées avec succès, et le biocatalyseur Zr/TPMS est le plus efficace et utilisable pour la production industrielle de la Théanine.

Catalyseur		Conversion (%)
<i>Glutaminase</i>		58
Glu/TMPS	1er application	62
	2ème application	34
Glu/Zr-TMPS	1er application	53
	2ème application	51

**Tableau 5:** Activité et taux de conversion de différents catalyseurs.

Matsuura et al<sup>147</sup>, ont décrit une synthèse de la Théanine dans un flux de type micro-réacteur contenant un composite mésoporeux silice-*glutaminase* (de *Pseudomonas nitroreducens IFO 12694*) et en flux continu avec une solution de glutamine 20 mM et 100 mM d'éthylamine (rapport 1/5) à pH 10,2 et 30 °C pendant 30 minutes. L'activité enzymatique a été améliorée car les auteurs ont la possibilité avec ce procédé de contrôler localement la température et le pH de la réaction (Figure I. 21) et d'éviter l'inactivation de l'enzyme.

<sup>147</sup> S. I. Matsuura, T. Yokoyama, R. Ishii, T. Itoh, E. Tomon, S. Hamakawa, T. Tsunoda, F. Mizukami, H. Nanbu, T. Hanaoka, *Chem. Commun*, **2012**, 48, 7058–7060.



**Fig I. 21** : Présentation de la synthèse de Théanine sur un micro-réacteur.

Avec la même technique d'immobilisation sur la silice mésoporeuse Itoh et al<sup>148</sup>, ont réussi la même année à produire la L-Théanine utilisant la *glutaminase* encapsulée dans du carbone revêtu de silice mésoporeuse (*gln/carbon/SBA-15*). Le taux de conversion est de l'ordre de 50% après 4h à 25°C.

### I. 5. 2. 3 A partir de l'ester méthylique de l'acide glutamique :

De gros progrès en termes de rendement ont été décrits récemment. De nouveaux substrats autres que la glutamine et l'acide glutamique ont été utilisés.

Le  $\gamma$ -méthyl ester de l'acide glutamique (H-Glu(OCH<sub>3</sub>)-OH) a été utilisé avec l'enzyme  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase immobilisée (GGT) isolée à partir de cellules *Escherichia coli*. Les résultats obtenus montrent que l'activité de (GGT) avec ce substrat est 1.2 fois beaucoup plus important qu'avec la glutamine. Les cellules immobilisées (GGT) ont été réutilisés 10 fois avec une moyenne de conversion de 69% du (H-Glu(OCH<sub>3</sub>)-OH) dans les conditions réactionnelles suivantes : 300 mM de l'acide glutamique  $\gamma$ -méthyl ester, 3M d'éthylamine (un rapport 1/10), 0.1g/mL de cellule immobilisée (GGT) à un pH=10 et 50°C (schéma 12)<sup>149</sup>.



**Schéma 12.**

<sup>148</sup> T. Itoh, Y. Hoshikawa, S. I. Matsuura, J. Mizuguchi, H. Arafune, T. Hanaoka, F. Mizukami, A. Hayashi, H. Nishihara, T. Kyotani, *Biochemical Engineering Journal*, **2012**, 68, 207–214.

<sup>149</sup> F. Zhang, Q. Z. Zheng, Q. C. Jiao, J. Z. Liu, G. H. Zhao, *Amino Acids*. **2010**, 39,1177–1182.

Les rendements de la synthèse chimioenzymatique en Théanine ne dépassent pas 70% avec l'utilisation de différents substrats, enzymes bactériennes, non bactériennes et immobilisées ou non. Même avec la possibilité de réutilisation des enzymes, cette méthode est très coûteuse à cause des difficultés de purification de la Théanine, qui a une polarité très similaire aux substrats, dans tous les procédés décrits dans la littérature.

Un des objectifs de nos travaux est de développer des méthodes de synthèse facile et moins coûteuse de la Théanine optiquement pure et avec des moyens de purification faciles.

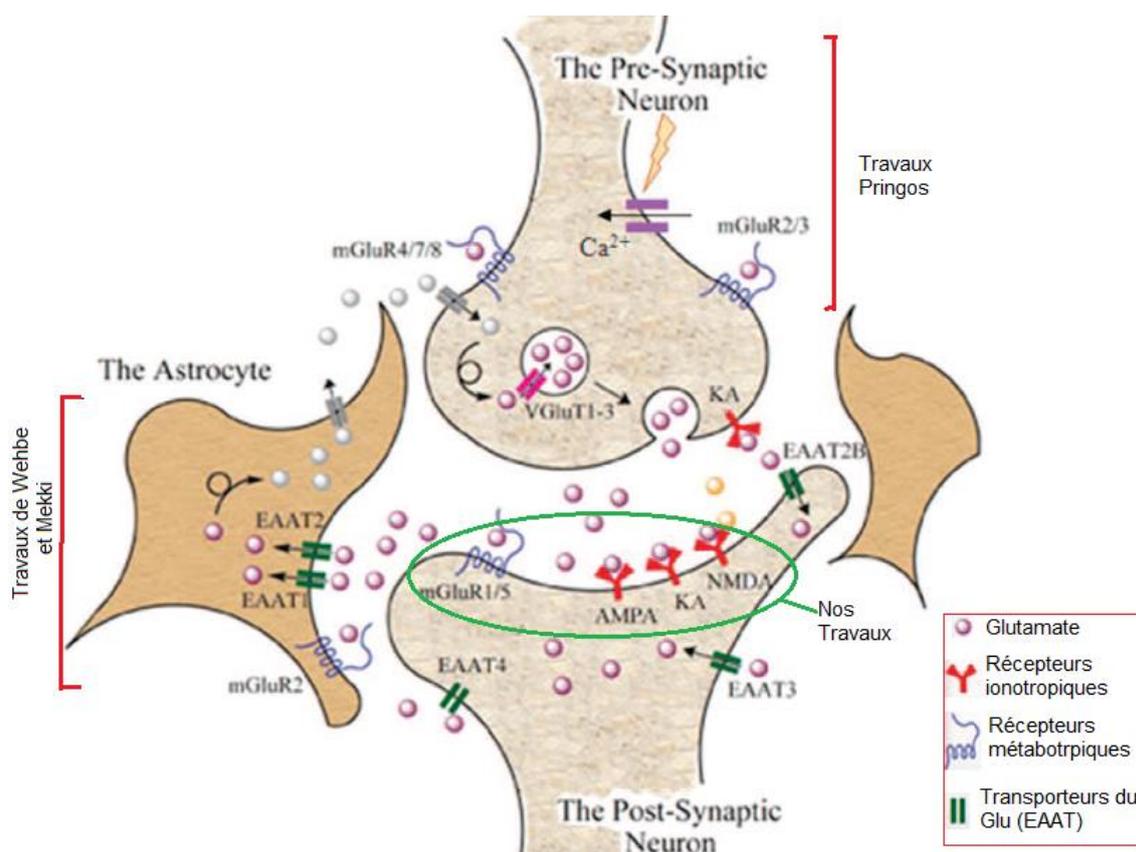
## *Chapitre II*

# **Résultats et discussions**

ClicCourts.com

## II. 1 Objectifs :

Notre groupe de recherche s'intéresse depuis plusieurs années à la modulation de la transmission neuronale (Figure II. 1). E. Pringos<sup>150</sup>, a focalisé ses travaux sur l'activation ou le blocage des canaux calciques voltage-dépendants en tant que régulateur de la libération du glutamate au niveau présynaptique. J. Wehbe<sup>151</sup> et S. Mekki<sup>152</sup> se sont intéressés à la synthèse de nouveaux inhibiteurs des transporteurs du glutamate (EAATs). Nos travaux aujourd'hui sont centrés sur les récepteurs glutamatergiques qui sont situés au niveau post-synaptique. La théanine est un acide aminé d'une structure similaire à celle de l'acide glutamique, le neurotransmetteur majoritaire du SNC. La théanine traverse aisément la barrière hématoencéphalique et présente des effets tranquillisants et neuroprotecteur.



**Fig II. 1** : Représentation schématique de la synapse et des différents récepteurs et transporteurs du glutamate.

<sup>150</sup> E. Pringos, Thèse de doctorat, **2010**.

<sup>151</sup> J. Wehbe, Thèse de doctorat, **2002**.

<sup>152</sup> S. Mekki, Thèse de doctorat, **2011**.

La théanine et ses dérivés sont donc les molécules cibles de nos travaux de synthèses régio et stéréosélectives.

Après avoir été isolée par extraction et caractérisée la Théanine a été mise à la disposition du public après plusieurs années de recherche et est vendue sous le nom de Sunthéanine<sup>®</sup>. Ce produit commercial est synthétisé selon le procédé développé par Tachiki et al<sup>153</sup> par l'entreprise japonaise Taiyo Kagaku, Co., LTD., dont le siège social est à Yokkaichi, au Japon.

A travers les études bibliographiques menées dans le chapitre précédent, nous avons décrit que la production de la Théanine peut être effectuée par l'extraction du thé ou par des processus catalysés par des enzymes bactériennes immobilisées ou non. La Théanine a été également produite par synthèse chimique et c'est l'objectif que nous nous sommes fixés afin d'optimiser les rendements et abaisser les coûts de synthèse mais également de synthétiser de nouveaux outils, optiquement purs pour la compréhension de la synapse glutamatergique.

Nos travaux de synthèse réalisés au cours de ce projet sont organisés en quatre parties :

- Tous d'abord nous avons développé et optimisé deux nouvelles méthodes de synthèse chimique de la Théanine optiquement pure en utilisant des dérivés commerciaux de l'acide glutamique comme produits de départ.
- Ensuite, nous nous sommes engagés dans la synthèse d'analogues de la L-Théanine en changeant la nature de la position 5 sur l'azote (éthyle dans la théanine) par des groupements alkyles divers et variés puis par des acides aminés pour obtenir des dipeptides  $\gamma$ -glutamylés
- La Théanine étant un acide aminé libre non protéinogène, elle n'est pas donc intégrée ni dans des peptides ni dans des protéines. Dans le but d'élargir l'éventail d'applications de la Théanine et d'obtenir des composés qui pourraient avoir un certain intérêt biologique, nous avons synthétisé des dipeptides contenant la Théanine. Deux séries de dipeptides ont été préparées par deux stratégies différentes.

<sup>153</sup> T. Tachiki, H. Suzuki, S. Wakisaka, T. yano, T. Tochikura, *J. Gen. Appl. Microbiol*, **1983**, 29, 355-363.

- ✓ Soit la Théanine sera à l'extrémité N terminale du dipeptide : H-5-NEt-Gln-Xaa-OH. Dans ce cas-là, le dipeptide de l'acide glutamique est synthétisé puis l'amidification est réalisée.
- ✓ Soit elle sera à l'extrémité C terminale ; H-Xaa-5-NEt-Gln-OH, où la Théanine est synthétisé en premier temps puis intégrée dans la synthèse de dipeptides.
- Enfin en se référant à l'expertise de notre équipe de recherche en synthèse stéréo et régiosélective, qui a développé la synthèse d'analogues du glutamate ou d'aspartate substitués en position  $\gamma$  ou/et  $\beta$  par différents groupements (alkylés, arylés, hydroxylés et également acides phosphoniques), nous présentons une nouvelle synthèse régio et stéréosélective des dérivés C4-arylés ou alkylés de la Théanine à partir des acides glutamique et pyroglutamique.

## II. 2 Synthèse de la Théanine:

Avant de présenter les différentes méthodes optimisées de la synthèse de la Théanine développées dans ce projet, nous allons faire un point bibliographique sur quelques stratégies de synthèse de la Théanine décrite dans la littérature.

### II. 2. 1 La synthèse chimique de la L- Théanine :

Les différentes synthèses de la Théanine ont toutes pour point commun la mise en jeu des dérivés de l'acide glutamique ou de l'acide pyroglutamique.

#### II. 2. 1. 1 A partir de l'acide pyroglutamique :

La première synthèse de la Théanine a été décrite par Lichtenstein en 1942. Ce dernier a fait réagir l'acide pyroglutamique (acide 2-pyrrolidone-5-carboxylique) avec une solution aqueuse d'éthylamine à 37°C pendant 20 jours (schéma 1). Après recristallisation du brut réactionnel, la Théanine est obtenue avec un rendement de 11%<sup>154</sup>.

---

<sup>154</sup>N. Lichtenstein, *J. Am. Chem. Soc.*, **1942**, 61, 1021-1022.

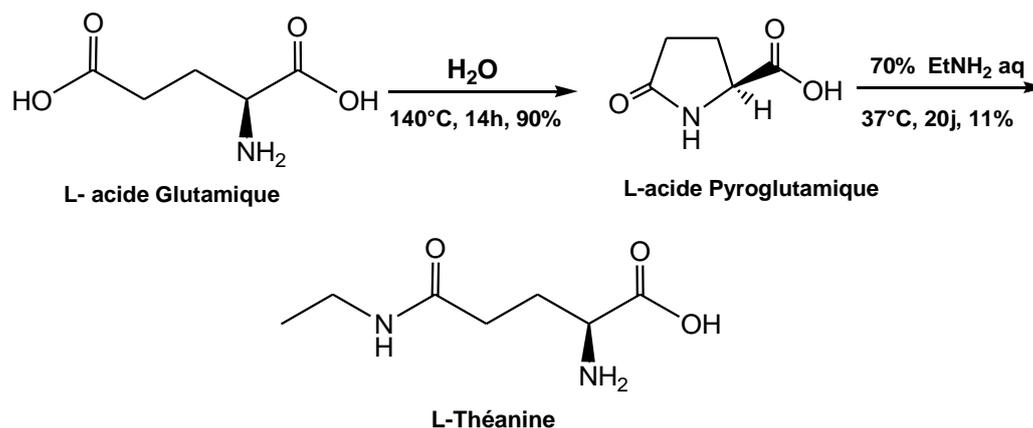


Schéma 1.

En 2003, Li et al<sup>155</sup> ont optimisé la méthode de Lichtenstein ; l'acide L-pyroglutamique et l'éthylamine anhydre sont mis en réaction à 60-100°C et sous atmosphère inerte à 6-12 MPa, cela permet de diminuer le temps de la réaction à 20h et d'augmenter considérablement le rendement de la réaction à 38%.

### II. 2. 1. 2 A partir de dérivés de l'acide glutamique :

Furuyama<sup>156</sup> et al, décrivent en 1964 une nouvelle voie de synthèse de la Théanine par une réaction de transamidification de la  $\gamma$ -N-méthyl glutamine (H-Gln(NCH<sub>3</sub>)-OH) par l'éthylamine en présence du sulfure de carbone. La Théanine est alors obtenue avec un faible rendement de l'ordre de 23% après 10 j de réaction (schéma 2).

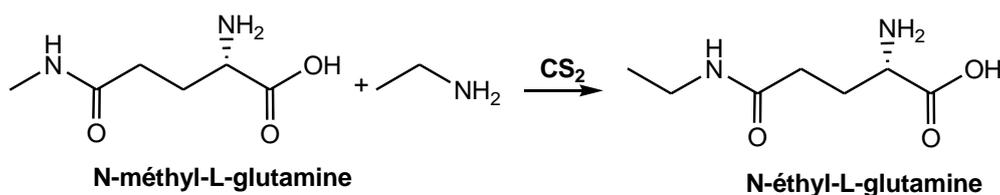


Schéma 2.

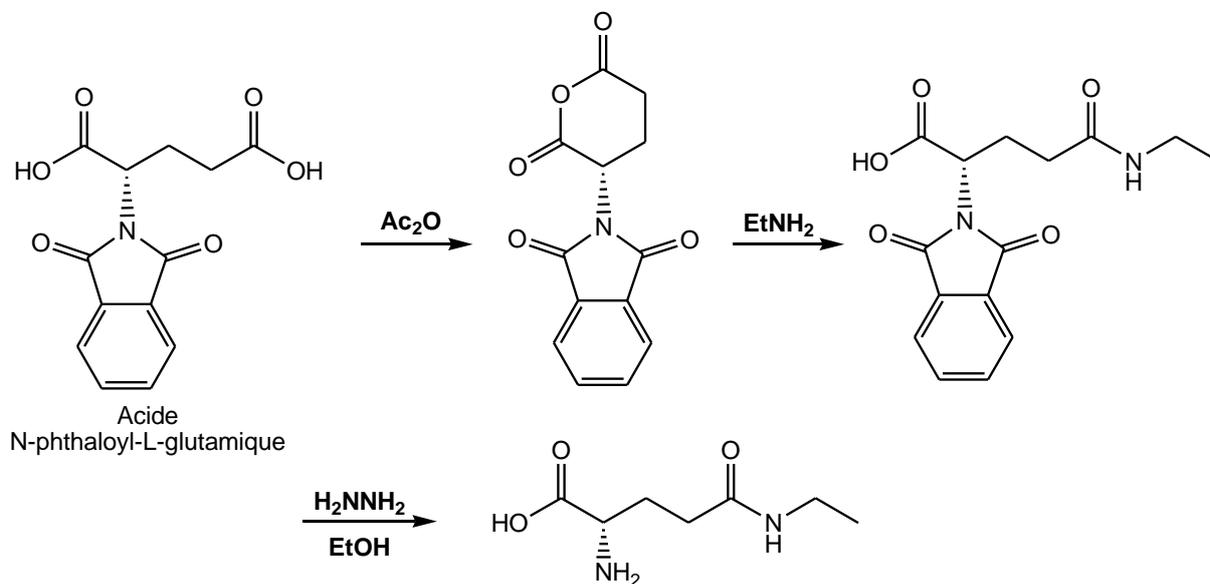
Plus récemment, en 2004, la Théanine a été synthétisée en trois étapes par Haining et al<sup>157</sup>. Le produit commercial N-phthaloyl-L-acide glutamique subit une réaction de cyclisation avec l'acide acétique fraîchement distillé, l'anhydride correspondant réagit avec l'éthylamine. La Théanine est obtenue après hydrolyse du groupement protecteur phthaloyl par une réaction

<sup>155</sup> L. Yan, W. X. fen, L. Feng, C. Haofeng, L. Xueling, H. Caihuan, W. Jinglu, *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*, **2003**,1415599.

<sup>156</sup>T. Furuyama, T. Yamashita, S. Senoh, *Chem Lett*, **1964**, 37, 1078.

<sup>157</sup> H. Gu, Y. Jiang, J. Wang, *Organic Preparations and Procedures International*, **2004**,36, 2, 182-185.

d'hydrazinolyse. Le rendement de la réaction était très satisfaisant de l'ordre de 70% (schéma 3).



**Schéma 3.**

Pour cette première synthèse efficace de la Théanine, il est évident que la protection de la fonction amine de l'acide glutamique soit indispensable.

Plus récemment la (*S*) 2-[N-((1-benzylpyrrolidin-2-) carbonyl) amino] benzophenone, a également été employée comme protection de l'azote mais également en tant qu'auxiliaire chiral. La première étape dans cette stratégie, est une réaction de condensation de cet auxiliaire (configuration *S*) avec l'acide L-glutamique suivie par une complexation avec le NiCl<sub>2</sub> pour former le complexe de l'acide glutamique de la base Schiff du nickel. Le complexe de l'acide glutamique est ensuite traité par une solution d'éthylamine utilisant l'agent de couplage N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIC) pour obtenir l'amide correspondant. Enfin, l'hydrolyse de ce complexe a conduit à la L-Théanine avec un rendement de 70%<sup>158</sup> (schéma 4). Dans ce cas l'amine est doublement protégée par l'auxiliaire chiral et par chélation avec le Ni.

<sup>158</sup> X. L. Zhang, J. D. Zhou, F. Cao, Z. J. Li, Y. Y. P. Wei, *Huaxue Shiji*, **2009**, 31(12), 964-966.

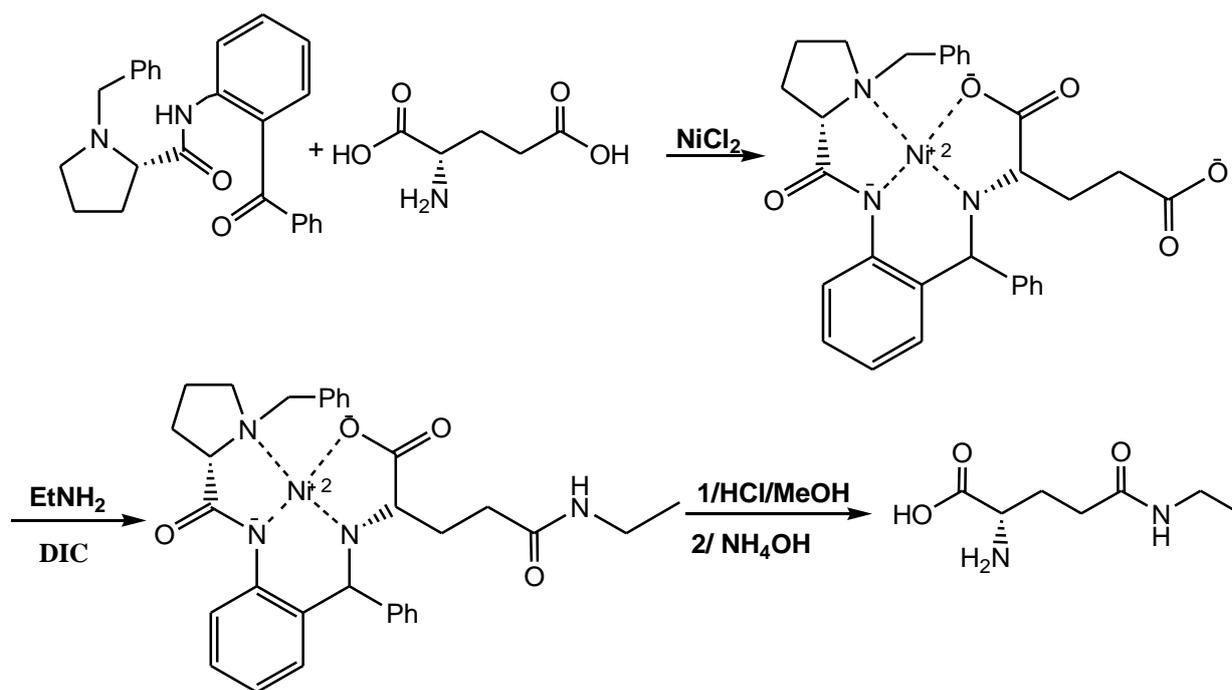


Schéma 4.

### II. 2. 1. 3 A partir du $\gamma$ -ester de l'acide glutamique:

Dans ce contexte et pour la première fois Kawagishi et al<sup>159</sup>, ont développé une synthèse de la Théanine en trois étapes et à grande échelle en utilisant l'ester L- $\gamma$ -benzyle du glutamate (H-Glu-(OBn)-OH) comme produit de départ. La fonction amine de ce dernier est protégée par un groupement trityle. L'acide glutamique protégé subit une réaction d'amidification par une solution aqueuse d'éthylamine. Après la réaction de déprotection du groupement trityle en milieu acide, la Théanine est obtenue avec un rendement global de l'ordre de 34% (schéma 5), mais c'est la première synthèse à grande échelle décrite dans la littérature.

<sup>159</sup> H. Kawagishi and K. Sugiyama, *Biosci. Biotech. Biochem.* **1992**, 56, (4), 689.

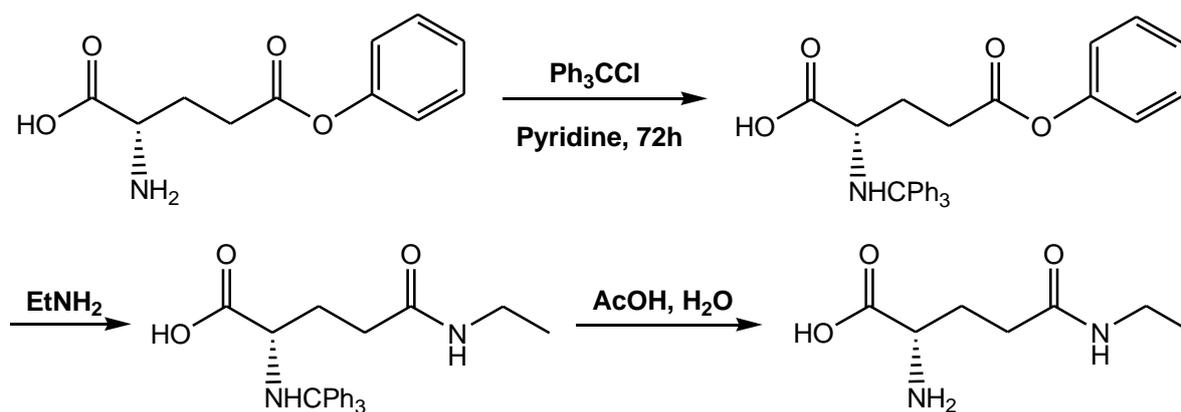


Schéma 5.

En 2008, Lee et al<sup>160</sup>, décrivent un procédé économique de préparation de la 5-N-éthylglutamine avec un moyen de purification simplifié. La fonction amine de l'ester  $\gamma$ -L-méthyl-glutamate est protégée par un groupement phtalyle avant de subir une réaction d'amidification par une solution d'éthylamine. Le groupement phtalyle est hydrolysé en milieu acide pour obtenir la Théanine avec un rendement de 89% après recristallisation (schéma 6).

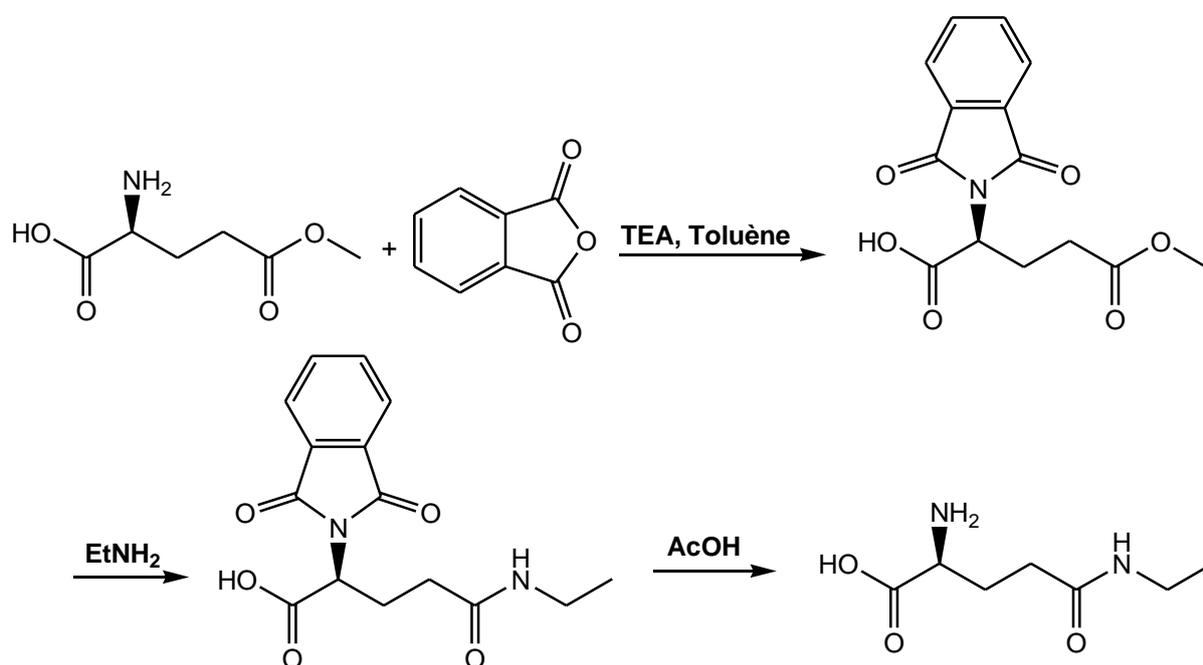


Schéma 6.

<sup>160</sup> H. S. Lee, H. C. Kim, J. H. Song, US2008/0234508 A1. 2008.

Plus récemment en 2012, Tonegawa et al<sup>161</sup> présentent une stratégie de synthèse de la L-théanine toujours à partir le  $\gamma$ - L-méthyl-glutamate mais cette fois-ci la fonction amine est protégée sous forme imine (base de Schiff) avec l'acétylacétone. Après une réaction d'amidification la fonction amine de la théanine est déprotégée par l'acide acétique. La Théanine est obtenue après une cristallisation avec un rendement de 91% (schéma 7).

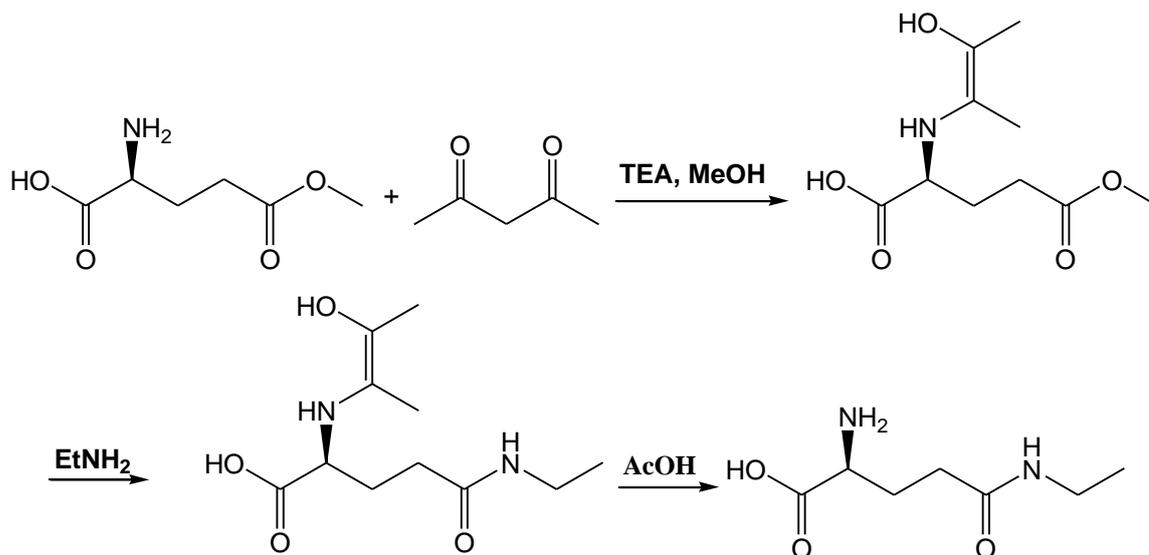


Schéma 7.

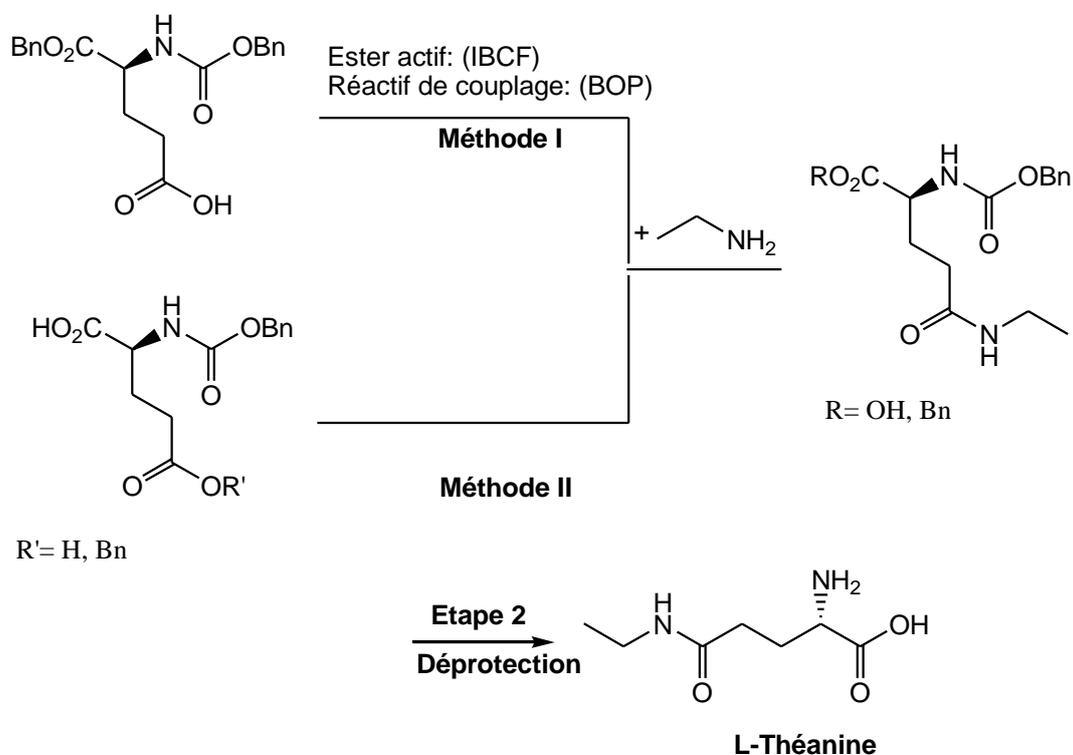
La synthèse chimique de la Théanine a été très étudiée ces dernières années. Les travaux de Tonegawa ci-dessus sont postérieurs aux nôtres et présentent de très bons rendements (91%). Les synthèses chimioenzymatiques n'excèdent pas 70% de rendement avec des problèmes de purification. La majorité des synthèses chimiques décrites dans littérature est effectuée à partir de l'acide glutamique ou de ses dérivés cycliques protégés. La synthèse chimique reste la moins coûteuse grâce à des techniques de purification simples qui sont des lavages acido-basique et/ou des recristallisations. Dans ce contexte notre projet s'est focalisé sur le développement de nouvelles méthodes de synthèse chimique de la Théanine à partir de dérivés commerciaux de l'acide glutamique protégé.

## II. 2. 2 Optimisation la synthèse de la Théanine :

Réaliser la synthèse de la L-Théanine optiquement pure dans un minimum d'étapes était notre premier objectif.

<sup>161</sup> F. Tonegawa, K. Ueda. US008178722B2. 2012.

Deux méthodes de synthèse ont été mises au point en partant de l'acide glutamique protégé en deux étapes seulement : une réaction d'amidification de l'acide glutamique protégé et une réaction de déprotection (Figure II. 1).



**Fig II. 1 :** Stratégie de synthèse de la L-Théanine

### II. 2. 2. 1 Réaction d'amidification:

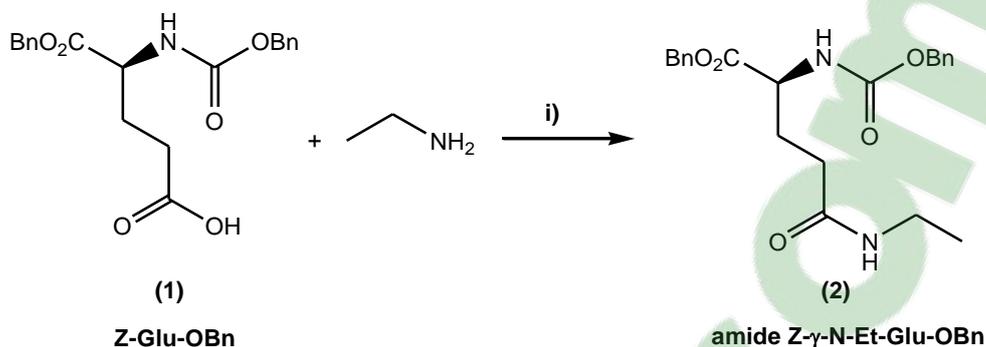
L'approche classique de formation d'une liaison amide est la condensation d'une amine avec un acide carboxylique. Cette condensation n'est cependant pas aisée amenant dans une première étape à une simple neutralisation sous forme de carboxylate d'ammonium.

L'activation de la fonction acide est nécessaire soit par le remplacement du groupement hydroxyle par un substituant électro-attracteur, un chlorure d'acide ou un anhydride, soit avec l'aide d'un agent de couplage, utilisé en synthèse peptidique.

#### II. 2. 2. 1. a Méthode I :

La première approche qu'on a mise en place est l'activation de la fonction carboxylique du produit commercial (S) Z-Glu-OBn (schéma 8) par l'introduction d'un agent

de couplage, cette technique est la plus couramment utilisée dans la synthèse de produits peptidiques ou d'acides aminés modifiés à intérêt pharmaceutiques<sup>162</sup>.



i): base, réactif de couplage, THF, 2-3h

### Schéma 8.

Plusieurs agents de couplage ont été décrits dans la littérature pour former la liaison amide. Avant de mettre en œuvre notre stratégie, nous avons procédé à quelques essais préliminaires afin de vérifier l'importance de la nature de l'agent de couplage. Nous avons testé de nombreux réactifs tels que (Dicyclohexylcarbodiimide **DCC**, Diisopropylcarbodiimide **DIC**, chlorure d'oxalyle, chlorure de thionyle). Les deux réactifs qui ont donné les meilleurs résultats sont issus de deux familles différentes et vont être comparées :

- les anhydrides mixtes comme l'isobutyl chloroformate **IBCF**<sup>163</sup>
- les réactifs de couplage comme le réactif de Castro<sup>164, 165</sup> « **BOP** » (Benzotriazol-1-yl-oxy)tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate).

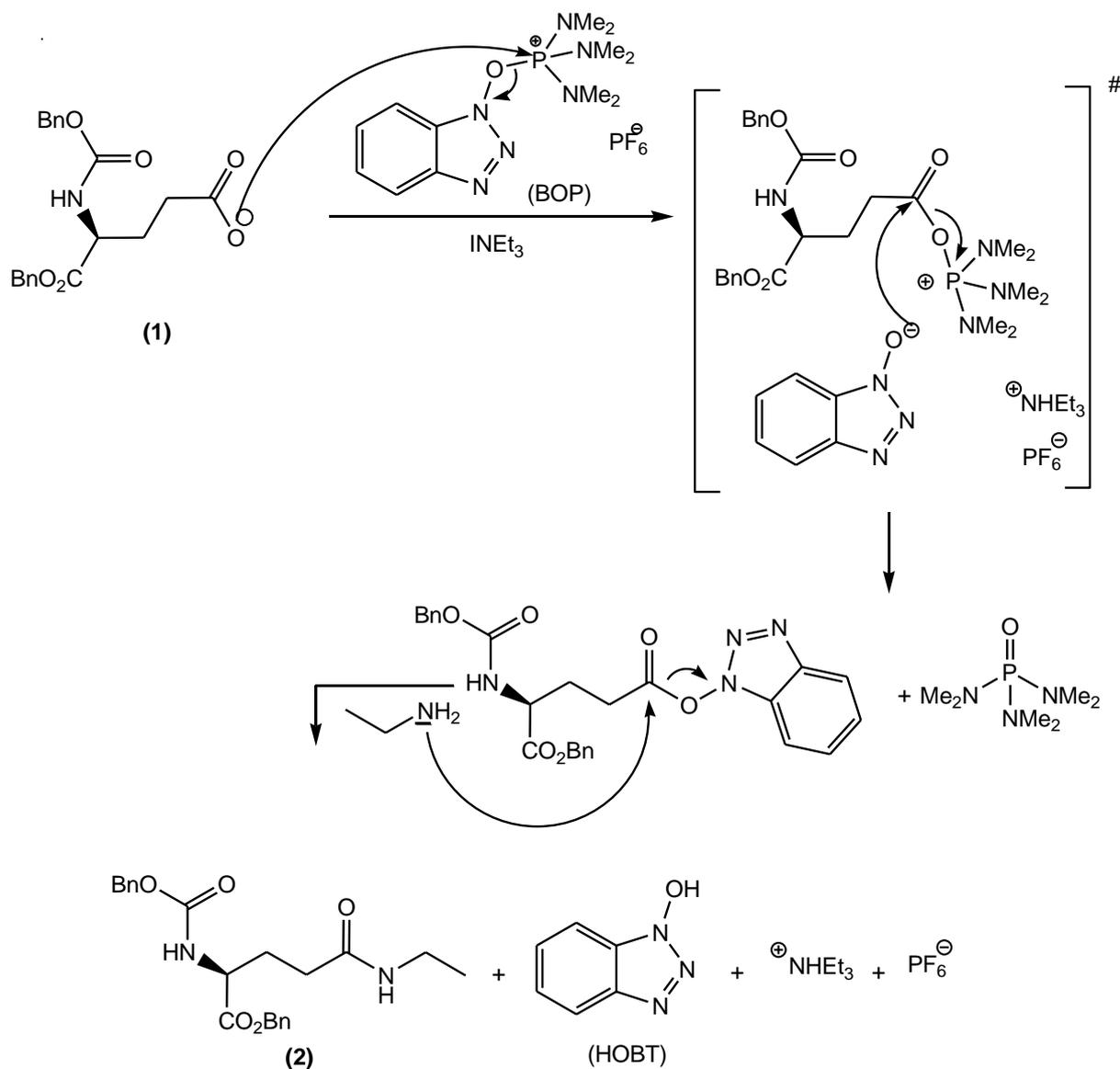
Le mécanisme de formation de la liaison amide par l'utilisation du réactif de Castro et de la triéthylamine en quantités équimolaires est rappelé ci-dessous (Figure II. 2).

<sup>162</sup> S. D. Roughley, A. M. Jordan, *J. Med. Chem.*, **2011**, 54, 3451–3479.

<sup>163</sup> A. Chaudhary, M. Girgis, M. Prashad, B. Hu, D. Har, O. Repic, T. J. Blacklock. *Tetrahedron Lett*, **2003**, 44, 5543-5546.

<sup>164</sup> B. Castro, J. R. Dormoy, B. Dourtoglou, G. Evin, C. Selve, J. C. Ziegler, *Synthesis*, **1976**, 751.

<sup>165</sup> B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron Lett*, **1975**, 1219.



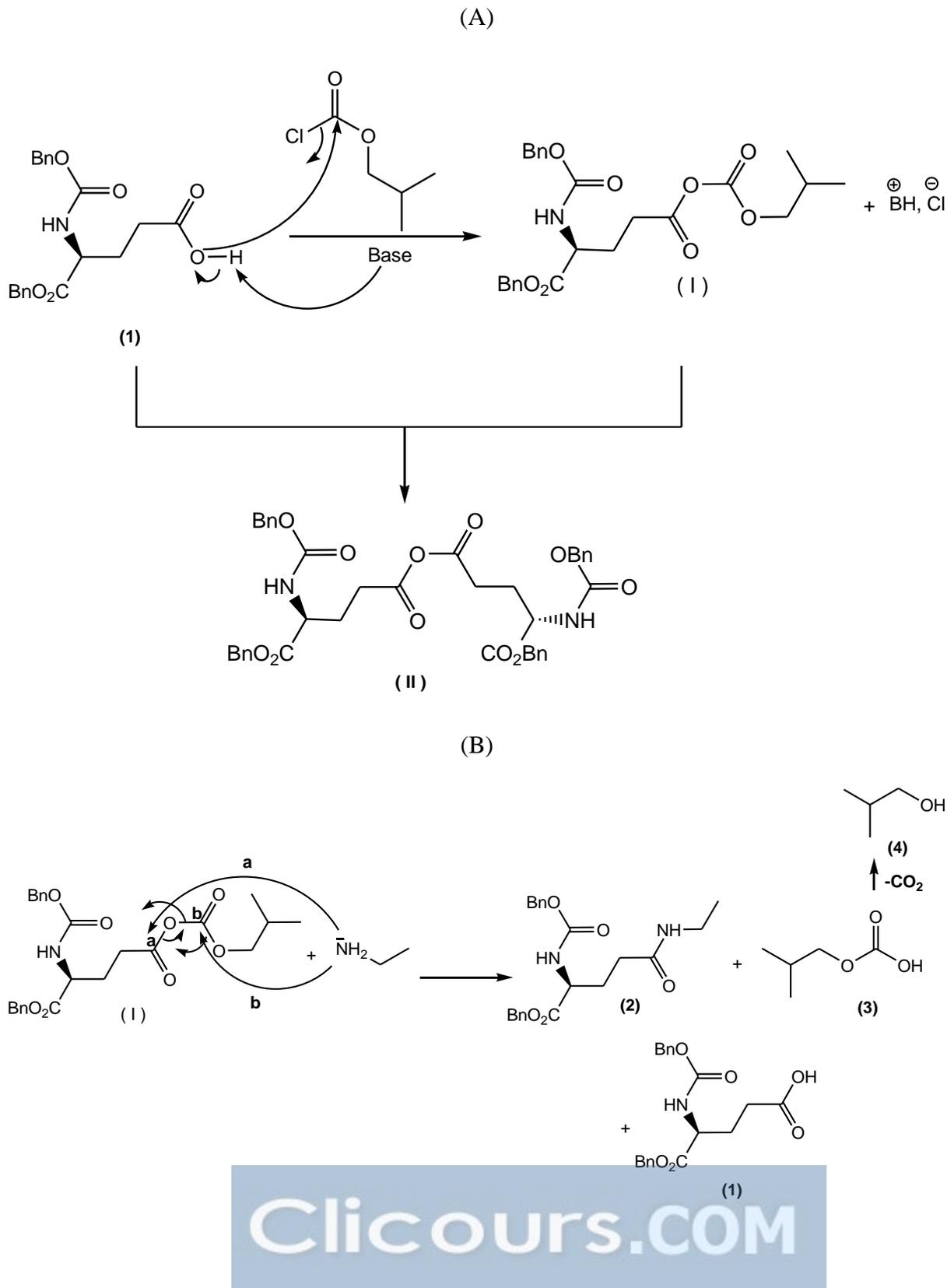
**Fig II. 2 :** Mécanisme de la formation de la liaison amide impliquant l'utilisation du réactif de Castro (BOP)<sup>166 167</sup>.

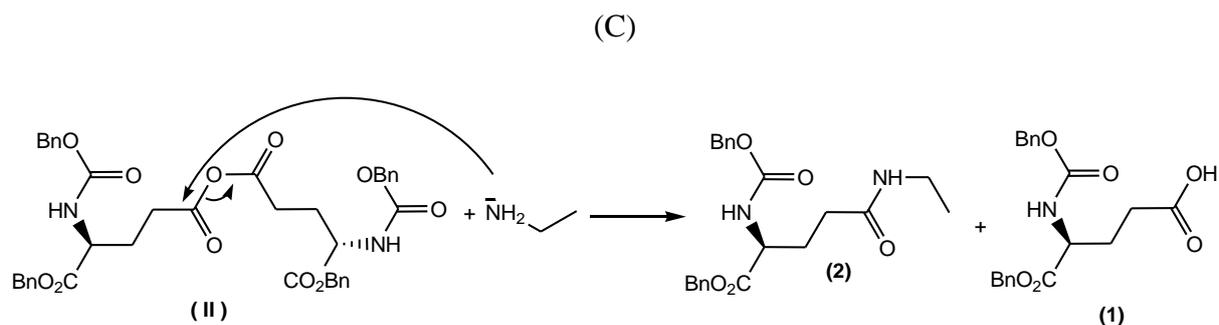
La première synthèse avec l'IBCF en quantité équimolaire a donné un mélange de produits : le suivi de la réaction par LC/MS a prouvé la formation de l'anhydride symétrique (**II**) en plus de celle de l'anhydride mixte (**I**) (Figure II. 3 A). D'un point de vue mécanistique, l'attaque nucléophile de l'éthylamine se fait sur deux sites de l'anhydride mixte (**I**) : le carboxyle (a) aboutissant aux produits **2** et **3**, et le carboxyle (b) aboutissant au produit **3** et au produit de départ (Figure II. 3 B). Ainsi la réaction de l'anhydride symétrique avec

<sup>166</sup> S. Y. Han, Y. A. Kim, *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 2447-2467.

<sup>167</sup> C. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 10827-1852.

l'éthylamine conduit à la formation du produit 2 et à la récupération du produit de départ (Figure II. 3 C).





**Fig II. 3:** Mécanisme de la formation de la liaison amide impliquant l'utilisation de l'anhydride mixte IBCF.

Dans le but d'améliorer cette étape d'amidification nous avons fait varier la quantité d'IBCF, après plusieurs essais nous avons constaté qu'avec un excès d'IBCF la formation de l'anhydride symétrique est complètement éliminée.

Les différents rendements obtenus en faisant varier la nature du réactif de couplage et/ou la base sont récapitulés dans le tableau ci-dessous.

Entrées	Bases	Réactifs de couplage	Rapport molaire, base/réactif de couplage	Rdt, %
1	NMM	IBCF	2eq/3eq	65
2	NMM	IBCF	2eq/1eq	30
3	DIEA	BOP	2.5eq/2eq	25
4	TEA	BOP	2.5eq/2eq	28
5	TEA	BOP	3eq/1.2eq	85

**Tableau 1 :** L'effet de l'agent de couplage sur la réaction d'amidification de Z-Glu-OBn.

Les rendements indiqués sont ceux obtenus après purification du produit attendu (2) Z-5-NEt-Gln-OBn. La conversion de Z-Glu-OBn (1) était de 100% dans la majorité des cas (entrées 1, 3, 4 et 5).

Comme nous l'avons montré auparavant le nombre d'équivalent de l'IBCF joue un rôle important sur le rendement de la réaction ; la quantité optimale pour activer la totalité de produit de départ est de 3eq (entrée 1).

Avec une quantité de 2eq de réactif BOP les réactions sont totales ; les rendements plus faibles (entrées 3 et 4) viennent de la difficulté de purification : une partie des produits est perdue lors des lavages acido-basiques indispensables. Les meilleurs résultats 85% sont obtenus avec un rapport base/ réactif de couplage 3eq / 1.2 eq.

En comparant les deux réactifs de couplages BOP et IBCF :

- avec 1.2 eq de BOP le rendement en Théanine protégée (**2**) s'élève à 85% avec une activation totale du Z-Glu-OBn (**1**) (entrée 5),
- avec l'IBCF le rendement s'élève à 30% et 68% avec un 1eq et 3eq respectivement.

### II. 2. 2. 1. b/ Méthode II :

La synthèse de la (L) Théanine à partir d'un ester O-R' en position  $\gamma$  de l'acide glutamique tels que H-Glu-(OBn)-OH et le H-Glu-(OCH<sub>3</sub>)-OH a été décrite dans la littérature<sup>159 161</sup> comme nous l'avons mentionné au début du chapitre. Le point le plus important dans ces synthèses c'est qu'il faut absolument protéger la fonction amine en position  $\alpha$ .

Nos expériences de synthèse ont été effectuées à partir de deux produits commerciaux le (S) Z-Glu-(OCH<sub>3</sub>)-OH et le (S) Z-Glu-(OBn)-OH et une solution d'éthylamine (2M dans le THF) et conduisent à la (L) Z-Théanine (**7**) (schéma 9). A température ambiante et avec 6 éq d'éthylamine les rendements de conversion sont de 56% dans le cas de (L) Z-Glu-(OCH<sub>3</sub>)-OH et 29% dans le cas de (L) Z-Glu-(OBn)-OH et ce après 72h de réaction (Figure II. 4).

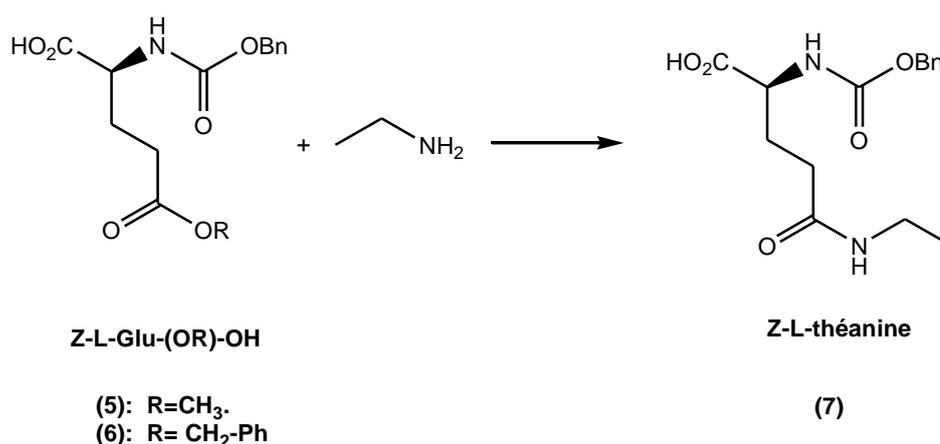


Schéma 9.

La fonction acide libre de Z-Glu-(OCH<sub>3</sub>)-OH ou Z-Glu-(OBn)-OH reste intouchable elle n'intervient pas dans cette réaction ; seule la protonation de l'éthylamine peut être observée (schéma 10).

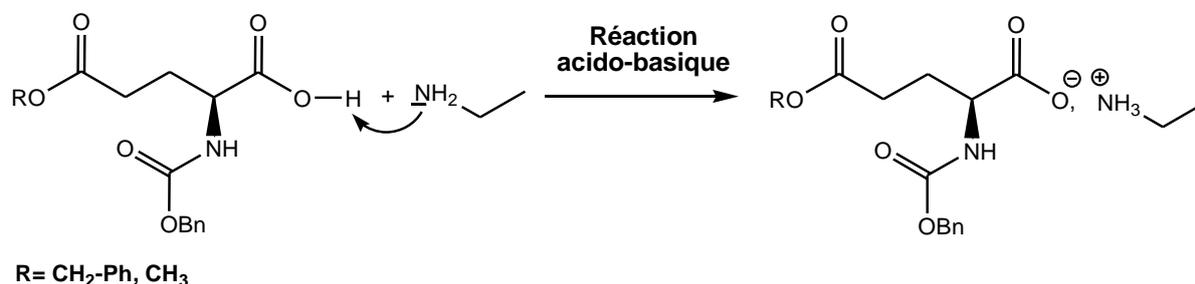
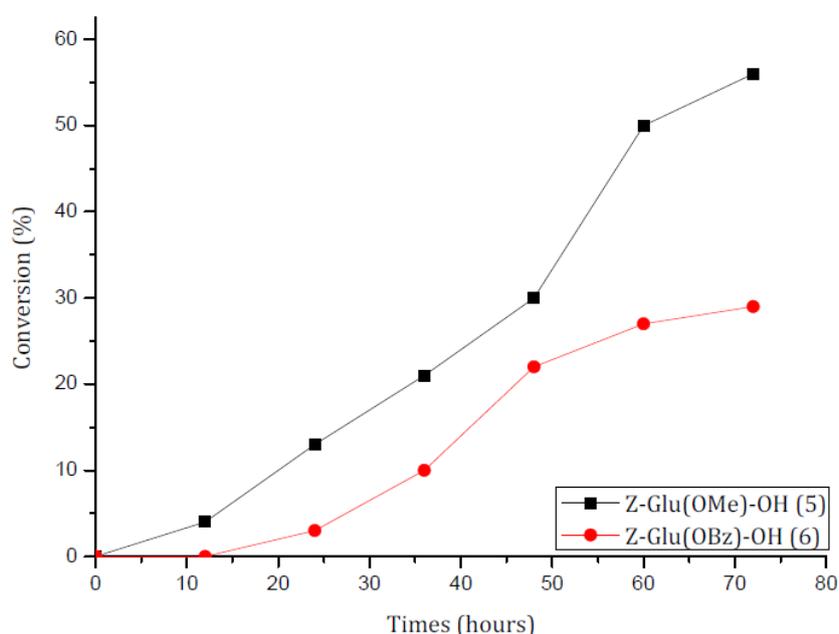


Schéma 10.



**Fig II. 4 :** Le taux de conversion des composés **5** et **6** en fonction du temps à température ambiante.

La réaction d'amidification des composés **5** et **6** est très lente à température ambiante, comme le montre le suivi de l'évolution de cette réaction par HPLC (Fig II.4).

Afin d'améliorer les rendements de la réaction : en chauffant à 60°C, l'éthylamine s'évapore après 24 heures (Téb° de l'éthylamine=29°C). Le mélange réactionnel est alors par du THF et chauffé à 40, 60 et 80 °C : les conversions de composés **5** et **6** ont été améliorés de façon significative. L'inconvénient est qu'avec la durée on observe la formation d'un produit d'hydrolyse le (L) Z-Glu-OH (**8**) (schéma 11). Le suivi de la réaction par HPLC nous a

prouvé que ce dernier est obtenu par l'hydrolyse de la (L) Z-Théanine formée au cours de la réaction, les résultats sont résumés dans le tableau 2 :

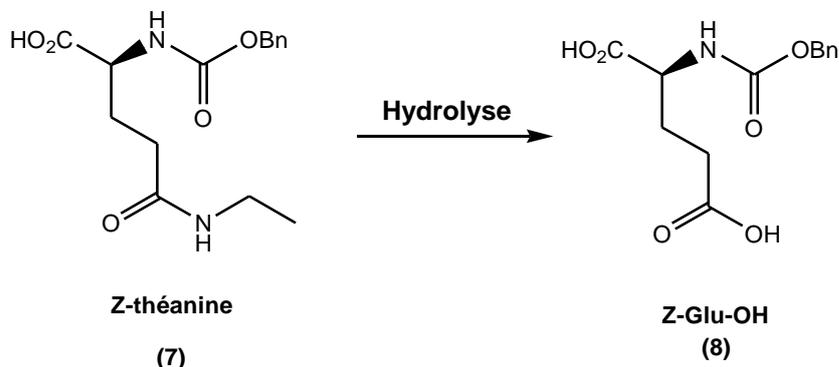


Schéma 11.

Entrées	Z-Glu-(OR)-OH R=	Temps de la réaction (h)	Température (°C)	Rdt de conversion (%)	Hydrolyse de la Z-théanine (%)
1	-CH <sub>2</sub> -Ph	72	RT	29	0
2	-CH <sub>2</sub> -Ph	24	60	49	12
3	-CH <sub>2</sub> -Ph	36	60	63	56
4	-CH <sub>2</sub> -Ph	24	Reflux (80)	83	37
5	-CH <sub>2</sub> -Ph	36	Reflux (80)	91	71
6	-CH <sub>3</sub>	72	RT	56	0
7	-CH <sub>3</sub>	24	60	48	19
8	-CH <sub>3</sub>	36	60	56	54
9	-CH <sub>3</sub>	24	Reflux (80)	70	23
10	-CH <sub>3</sub>	36	Reflux (80)	75	65

**Tableau 2** : Les résultats d'amidification de Z-Glu-(OCH<sub>3</sub>)-OH et Z-Glu-(OBn)-OH par chauffage classique.

Une conversion de 75% pour le (S) Z-Glu-(OCH<sub>3</sub>)-OH (**5**) et 91% de et le (S) Z-Glu-(OBn)-OH (**6**) est obtenue après 36 heures de réaction à 80°C, mais avec un pourcentage de produit d'hydrolyse (S) Z-Glu-OH (**8**) de 65% dans le premier cas et 71% pour le deuxième cas (entrées 5 et 10) ; en comparant ces résultats avec les conversions obtenues à température ambiante (entrées 1 et 6) on note effectivement une amélioration du taux de conversion mais avec un pourcentage très élevé de produit d'hydrolyse (**8**). Ce phénomène d'hydrolyse de la

Z-Théanine s'explique par le fait que le THF utilisé n'est pas anhydre et que la Théanine est instable en milieu basique aqueux.

Pour confirmer l'hypothèse proposée la réaction a été réalisée à haute température et sans solvant par une autre méthode d'activation que le chauffage classique : nous avons optimisé le procédé par activation sous micro-ondes.

Le principe de l'activation micro-onde repose sur la propriété de certains matériaux liquides ou solides de transformer une énergie électromagnétique en chaleur. Les micro-ondes produisent le chauffage par interactions avec les molécules du milieu réactionnel. Le chauffage peut donc se faire au cœur du milieu, contrairement au chauffage par transfert de chaleur (bain d'huile) qui produit des « effets de paroi », c'est-à-dire que la chaleur est bien plus importante le long des parois proches de la source de chaleur qu'au centre du réacteur. Le chauffage se fait alors par convection de la chaleur de l'extérieur du réacteur vers l'intérieur.

L'optimisation des réactions d'amidification de composés (S) Z-Glu-(OCH<sub>3</sub>)-OH (**5**) et (S) Z-Glu-(OBn)-OH (**6**) par chauffage aux micro-ondes a été effectuée sous plusieurs conditions. Quelle que soit la nature du produit de départ, le temps de la réaction, température de chauffage et la quantité d'éthylamine, les conversions n'ont pas été totales. La réaction atteint un seuil et les composés **5** et **6** ne sont plus consommés. Cependant aucun produit d'hydrolyse (Z-Glu-OH) (**8**) n'est observé. .

Le tableau 3 résume les résultats les plus représentatifs de la réaction d'amidification par activation micro-ondes, avec l'étude détaillée de l'effet de la température (Ex : puissance du Micro-onde = 400W => 40°C) et du temps de réaction.

Entrées	Z-Glu-(OR)-OH R= -CH <sub>2</sub> -Ph (6) R= -CH <sub>3</sub> (5)	Temps de réaction (h)	Température (°C)	Conversion Rdt (%)	Hydrolyse de Z-Théanine (% Z-Glu-OH (8))
1	(6)	72	T.A	29	0
2	(6)	4	40	16	0
3	(6)	4	60	42	0
4	(6)	4	80	66	0
5	(5)	72	T.A	56	0
6	(5)	4	40	16	0
7	(5)	4	60	55	0
8	(5)	4	80	78	0

**Tableau 3:** Résultats d'optimisation de la réaction d'amidification sous micro-ondes.

Les rendements ont été bien améliorés ; les meilleurs résultats ont été obtenus à une puissance de 800W (équivalent à une température de 80°C) et après seulement 4h de réaction. La (L) Z-Théanine a été obtenue avec un rendement de 66% en partant de l'ester (S) Z-Glu-(OBn)-OH (6) et avec 78% dans le cas de l'ester méthylique (S) Z-Glu-(OCH<sub>3</sub>)-OH (5) (entrées 4 et 8) respectivement. Au-delà de 4h de réaction aucune évolution n'a été observée. Cette synthèse inédite de la (L)-Z-Théanine, par micro-onde est 20 fois plus rapide que dans le cas d'un chauffage classique et la formation du (L) Z-Glu-OH est évitée.

La synthèse énantio-sélective de la L-Théanine et un point primordial, donc après avoir mis en point les conditions optimisées de la synthèse de la (L) Z-Théanine nous avons par la suite contrôlé la pureté énantiomérique du produit synthétisé afin de vérifier que la procédure d'activation au micro-ondes n'était pas racémisante. Pour cela nous avons synthétisé l'énantiomère (D) Z-Théanine (9) en partant de l'ester (R) Z-Glu-(OCH<sub>3</sub>)-OH selon les conditions mises au point (entrée 8). La (D) Z-Théanine a été obtenue avec le même rendement que celui de la (L) Z-Théanine 78% (schéma 12).

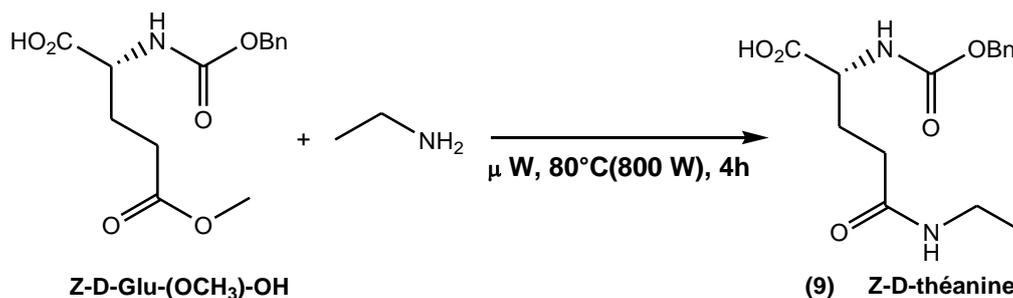
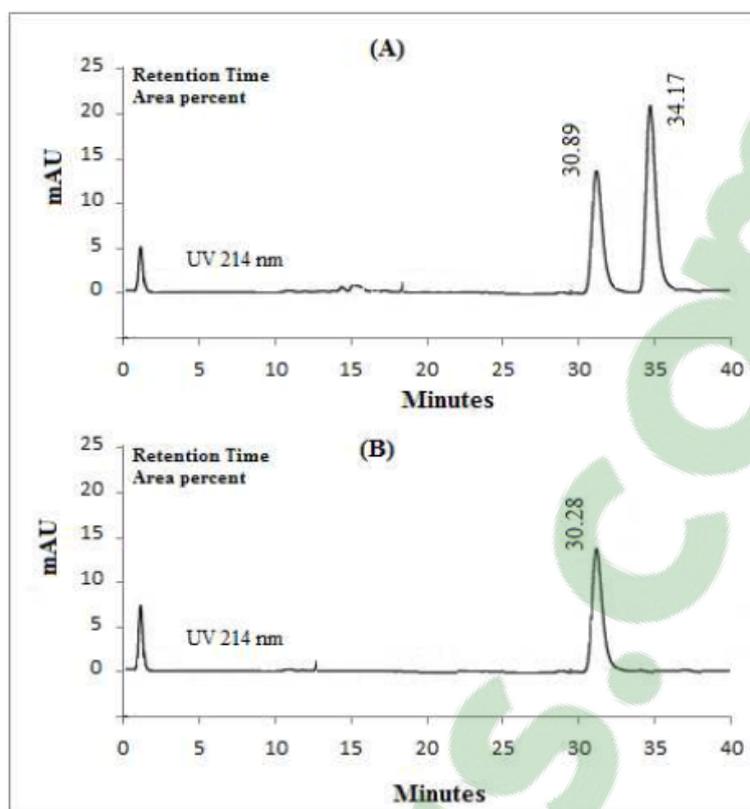


Schéma 12.

La pureté énantiomérique a été contrôlée en premier temps par la mesure de pouvoir rotatoire de chaque énantiomère séparément et dans un deuxième temps par analyse HPLC chirale.

Après avoir essayé plusieurs colonnes, la colonne chiralcel-OD a donné les meilleurs résultats de séparation : la (L) Z-Théanine et la (D) Z-théanine résultant de la synthèse énantiosélective ont été injectés ensemble (Figure II. 5-A) puis uniquement la (L) Z-Théanine (Figure II. 5-B). L'élution a été effectuée avec un mélange isocratique H<sub>2</sub>O/ACN (87/13) et un débit de 0.6 ml/min ; la séparation est effectuée en 45min. Le chromatogramme B prouve que la (L) Z-Théanine est le seul énantiomère formé.

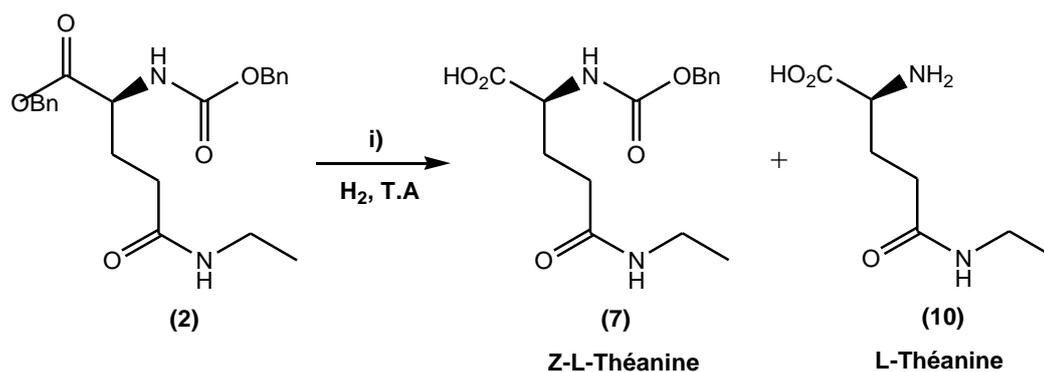
**Fig. II 5:**

**A** Chromatogramme d'HPLC chirale de mélange des deux énantiomères synthétisés séparément « L » et « D » Z-Théanine (co-élution).

**B** Chromatogramme d'HPLC chirale de l'énantiomère (L)-Z-Théanine.

### II. 2. 2. 2 Déprotection de la Théanine protégée :

L'étape finale de cette synthèse de la L-Théanine est une réaction d'hydrolyse des groupements protecteurs, l'ester benzylique et le groupement Z sont hydrolysés en milieu basique ou par hydrogénolyse catalytique. Pour optimiser les conditions opératoires nous avons réalisé plusieurs tests en faisant varier le solvant, le catalyseur et la quantité de ce dernier. Les réactions ont été effectuées à température ambiante et sous atmosphère d'hydrogène (schéma 13).



i): catalyseur, solvant.

Schéma 13.

Les différents résultats de cette étape d'hydrogénolyse sont récapitulés ci-dessous (tableau 4) :

Entrées	Solvants	Catalyseur	Quantité de Catalyseur	Temps (h)	Produit obtenu et le Rdt (%)
1	AcOEt	Pd/C	10%	26	Produit (7), 100
2	AcOEt	Pd/C	20%	22	Produit (7), 100
3	EtOH	Pd/C	20%	22	Produit (7), 100
4	THF	Pd/C	20%	24	Produit (7), 100
5	THF	Pd/C+ goutte d'Acide acétique	20%	18	Produit (7), 100
6	THF	Pd(OH) <sub>2</sub> /C	10%	22	Produit (10), 100
7	THF	Pd(OH) <sub>2</sub> /C	20%	8	Produit (10), 100

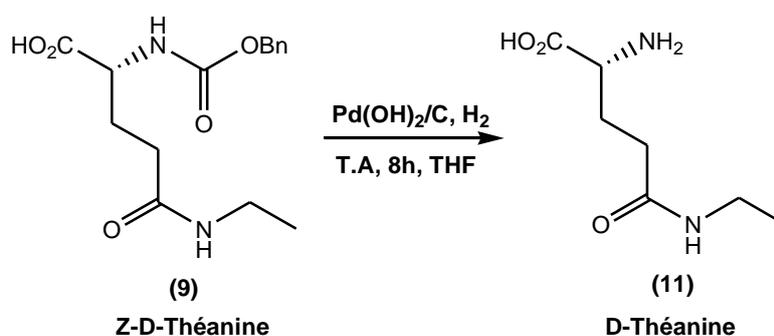
Tableau 4 : Résultats d'hydrogénolyse de la L-Théanine protégée.

Les résultats de cette étape de déprotection montrent que la nature du catalyseur influe sur l'évolution des réactions: avec le palladium sur charbon (Pd/C) seul l'ester benzylique a été hydrolysé sans toucher à la protection Z de l'amine (entrées 1, 2, 3, 4) même si le milieu réactionnel est acidifié avec de l'acide acétique (entrée 5). La Théanine (10) est majoritairement formée si on utilise l'hydroxyde de palladium (Pd(OH)<sub>2</sub>) comme catalyseur ; dans le cas où la réaction est effectuée dans le THF la conversion du composé (2) en L-théanine (10) est totale après 22 heures de réaction (entrée 6).

A noter que on peut réduire le temps réactionnel à seulement 8 heures si on utilise 20% en poids du catalyseur (entrée 7).

Ces résultats prouvent l'efficacité du  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$  en tant que catalyseur, c'est pourquoi nous l'avons utilisé dans toutes les réactions d'hydrogénolyse. Il nous a semblé pertinent d'utiliser le THF anhydre comme solvant pour effectuer cette réaction.

Par la suite nous avons effectué la réaction de déprotection de l'énantiomère (D) Z-Théanine avec les conditions optimisées précédemment (schéma 14).



**Schéma 14.**

Les méthodes optimisées dans ce chapitre seront exploitées dans les chapitres suivants.

### II. 3 Synthèses des analogues 5-N-substitués de la L-Théanine :

Après la mise au point de ces deux nouvelles méthodes de synthèse de la Théanine (L et D) optiquement pures nous nous sommes engagés dans la synthèse de ses dérivés 5-N-substitués.

#### II. 3. 1 Synthèses des analogues N<sup>5</sup>-alkylés :

Comme annoncé dans les objectifs de nos travaux nous allons détailler la synthèse d'analogues N-alkylés de la glutamine totalement nouveaux, jamais synthétisés ni décrits dans la littérature. Au lieu de l'éthylamine, une série d'amines diverses et variées ont été utilisées en appliquant le protocole de la synthèse de la Théanine à l'aide de l'IBCF comme agent de couplage (schéma 15).

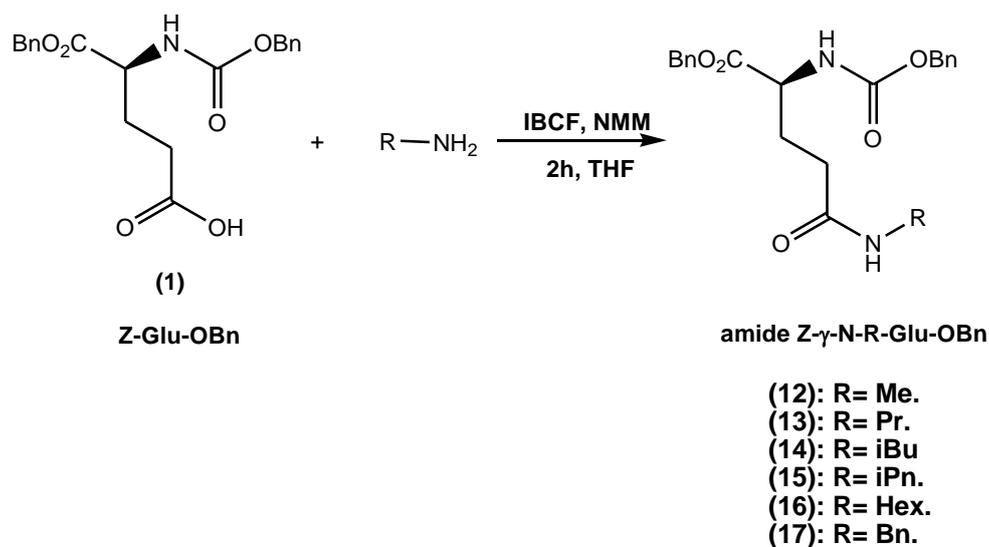


Schéma 15.

Les analogues N-alkylés de la L-théanine ont été obtenus avec de bons rendements comme indiqué dans le tableau 5 suivant :

amine (-R)	Produit	Rdt (%)
Méthyle= Me	12	56
Propyle = Pr	13	28
Isobutyle = iBu	14	78
Isopentyle = iPn	15	83
Hexyle = Hex	16	82
Benzyle = Bn	17	86

**Tableau 5:** Les rendements de chaque analogue N-alkylé de glutamine.

Avec la propylamine, le rendement de la réaction est beaucoup plus faible à cause de la formation d'un produit majoritaire di-amidifié (L-Z-1,5-N,N-dipropyl-Gln) amide ou (S)-1,5-dioxo-1,5-bis(propylamino)pentan-2-yl)carbamate de benzyle (**18**) (schéma 16).

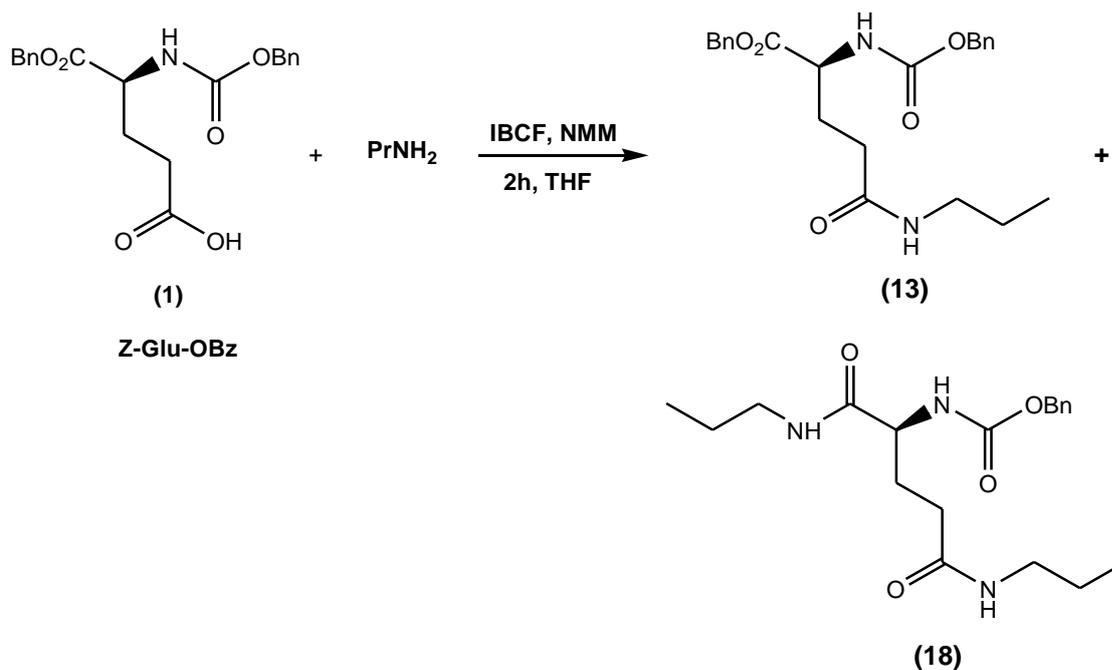


Schéma 16.

Ainsi la synthèse du composé (13) Z-γ-NPr-Gln-OBn a du être optimisée :

- En changeant le réactif de coupage IBCF par le réactif BOP le composé (13) est obtenu avec un rendement de 95%.
- En parallèle la réaction d'amidification du (S) Z-Glu-(OCH<sub>3</sub>)-OH avec la propylamine pure en chauffant à 60°C par micro-onde pendant 1h conduit à la formation de l'amide (L) Z-γ-N-Pr-Gln-OH (19) (schéma 17) avec une conversion de 100%.

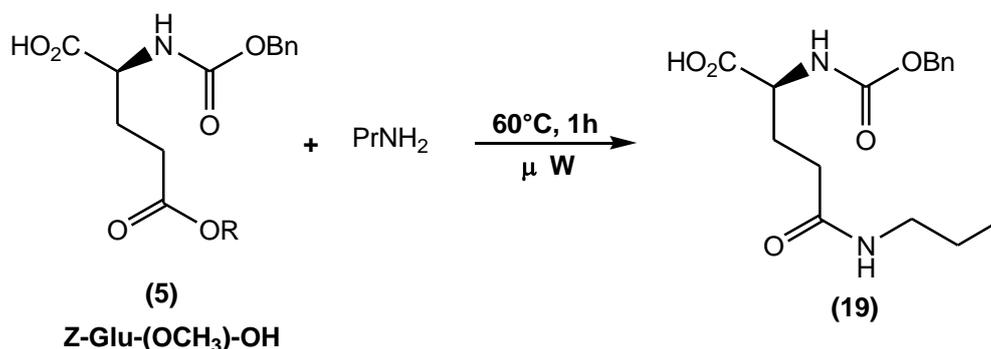


Schéma 17.

Les dérivés N-alkylé protégés de la L-Glutamine (produits 12-19) ont été déprotégés de façon quantitative pour aboutir aux produits finaux N-alkylés de la Glutamine. La pureté chimique et optique a été confirmée par des analyses spectroscopiques RMN du <sup>1</sup>H et du <sup>13</sup>C,

de l'HPLC et de la LC-MS et par la mesure du pouvoir rotatoire. On déplore cependant le manque de solubilité de ces analogues  $\gamma$ -N-alkyl glutamines : uniquement dans un milieu acide sous forme de sel de trifluoroacétate ou dans un mélange eau/DMSO. Tous ces produits ont été testés pour leur activité biologique au sein de la synapse glutamatergique vis-à-vis de leur toxicité tout d'abord et de leur activité sur les récepteurs NMDA ensuite (schémas 18 et 19).

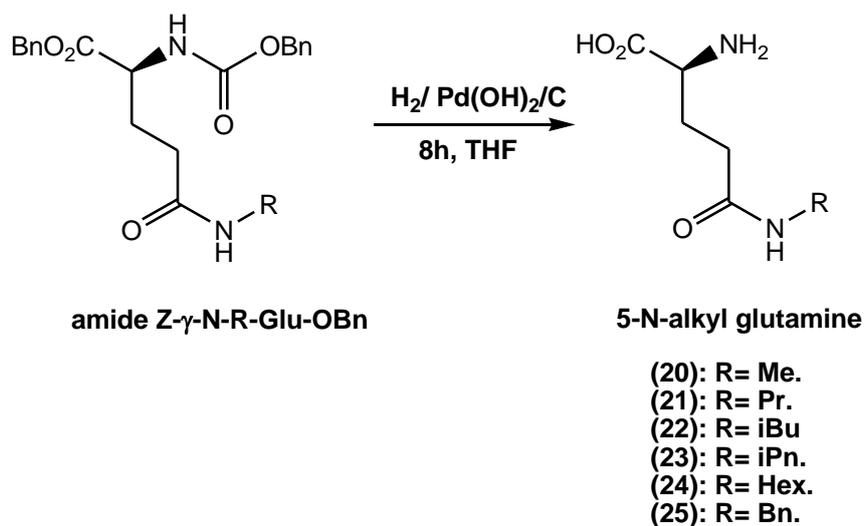


Schéma 18.

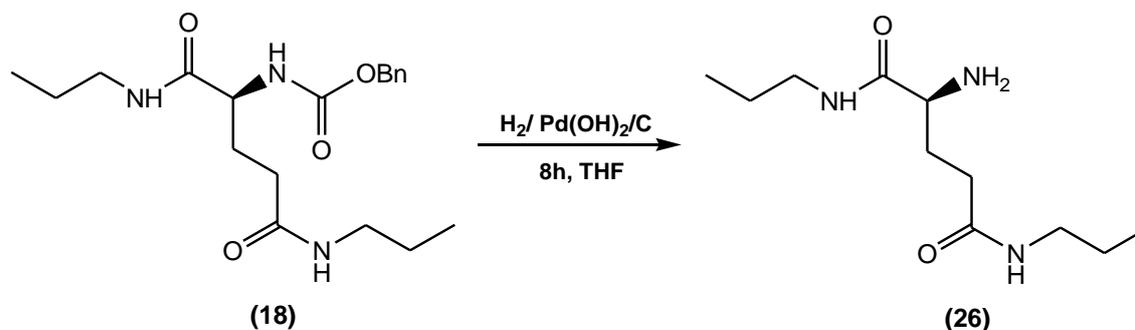
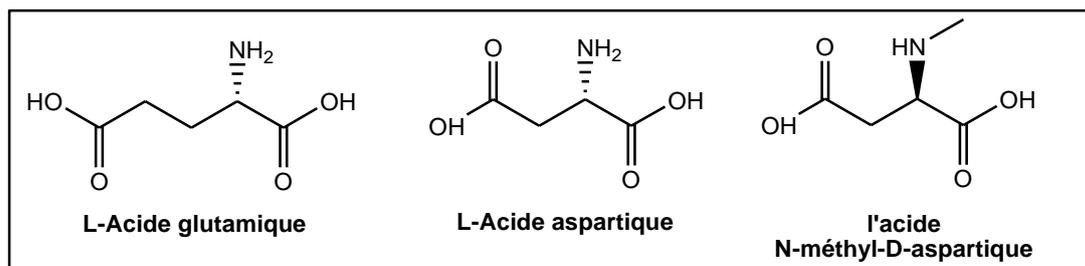


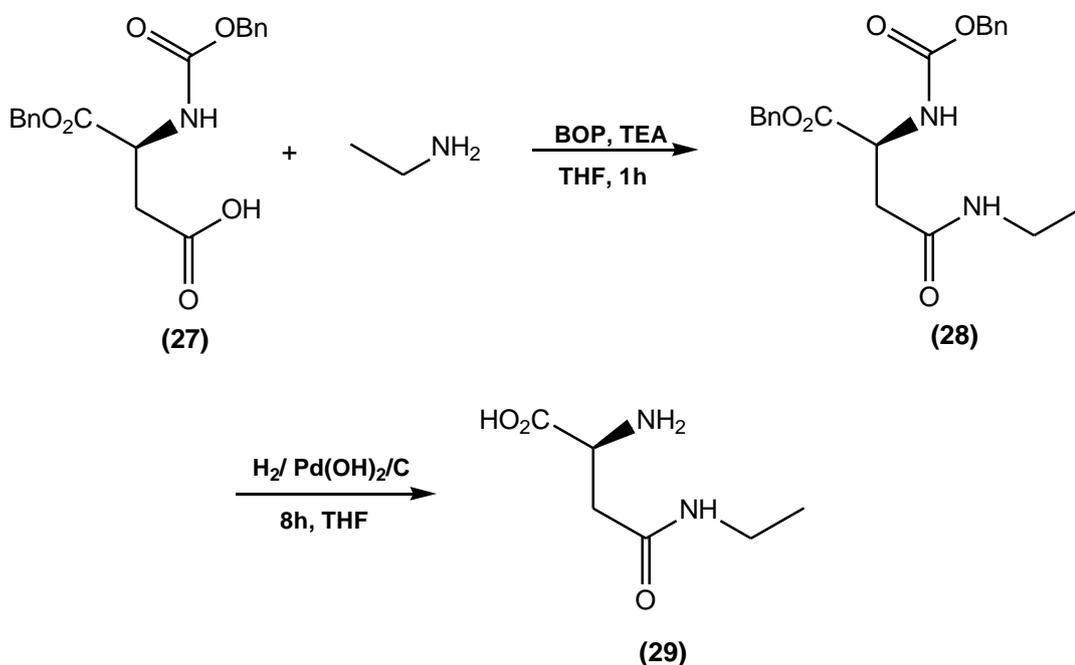
Schéma 19.

Parmi les acides aminés qui ont eu un effet sur le SNC, l'acide aspartique, l'homologue inférieur du glutamate est aussi représenté. Par exemple le N-méthyl-D-aspartate est l'agoniste spécifique des récepteurs NMDA (Figure II. 6).



**Fig II. 6.** La structure chimique de l'acide Asp, Glu et le NMDA.

Nous avons voulu savoir si un groupement méthylène en moins dans la chaîne latérale de la théanine jouait un rôle sur son activité et travailler avec l'asparagine 4-N-alkylée. La réaction d'amidification de la fonction acide de la chaîne latérale de l'acide aspartique a été réalisée selon la stratégie mise au point dans la 1<sup>er</sup> méthode de synthèse de la Théanine à l'aide du réactif d'activation BOP. L'acide aspartique était protégé par le groupement benzyloxycarbonyle (Z) sur la fonction amine en  $\alpha$  et par un ester benzylique sur la fonction acide, (L) Z-Asp-OBn (**27**). Le produit (**28**), (L) Z-NEt-Asn-OBn est obtenu avec un rendement de 86%. L'étape d'amidification est suivie par une hydrogénolyse quantitative et donne l'amide (L)  $\beta$ -NEt-Asn-OH (**29**) (schéma 20).



**Schéma 20.**

### II. 3. 2 Synthèses des $\gamma$ dipeptides de l'acide glutamique, analogues de la L-Théanine :

#### II. 3. 2. 1 Généralités :

Les premiers tests biologiques réalisés sur chaque analogue 5-N-alkylé de la L-Glutamine ont montré une activité agoniste du récepteur NMDA. Cette activité sera détaillée dans le chapitre suivant. En s'appuyant donc sur l'hypothèse que la nature du substituant en position  $\gamma$  de l'acide glutamique a un rôle important sur l'activité des produits obtenus nous avons décidé de nous orienter vers les  $\gamma$ -glutamyl dipeptides.

Cette série de  $\gamma$  glutamyl dipeptides est tout d'abord plus soluble dans l'eau que les dérivés 5-N-alkylGln décrits ci-dessus. De plus, et cela a été une de nos motivations pour les préparer, les dérivés dipeptidiques en  $\gamma$  de l'acide glutamique améliorent le goût des aminoacides amers<sup>168</sup>. Ils peuvent augmenter la valeur nutritionnelle d'un acide aminé, non seulement dans l'alimentation en tant que complément mais également d'un point de vue thérapeutique<sup>169</sup>.

De plus des  $\gamma$ -glutamyl dipeptides (H-Glu(Xaa-OH)-OH) sont présents dans certaines cellules et produits alimentaires. Par exemple le dipeptide  $\gamma$ -glutamyl-aurine (**30**) a été retrouvé dans la parathyroïde et dans le cerveau des mammifères et ses effets au niveau du SNC ont été décrits ces dernières années<sup>170</sup>.

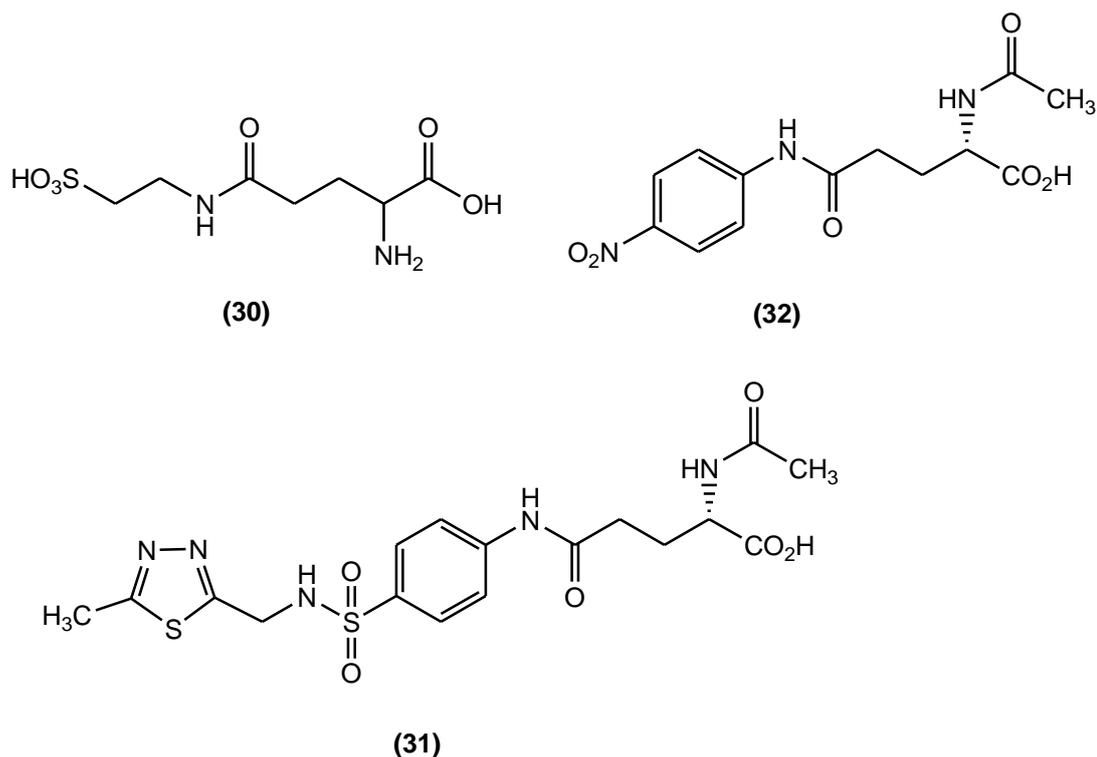
Certains dérivés  $\gamma$ -L-glutamyl N-acétylé en  $\alpha$  semblent être efficaces pour la délivrance de médicament spécifique au rein tels que le dérivé N-acétyl-L- $\gamma$ -glutamylsulfamoylthiadiazole (**31**) ou le dérivé N-acétyl-L- $\gamma$ -glutamyl-p-nitroaniline (**32**)<sup>171</sup> (Figure II. 7).

<sup>168</sup> C. Suzuki, V. Kajimoto, H. Kumagai . *J Agric Food Chem*, **2002**, 50, 313–318.

<sup>169</sup> A. Sabry, A. El Sayed, S. Fujimoto, C. Yamada, H. Suzuki, *Biotechnol Lett* , **2010**, 32, 1877–1881.

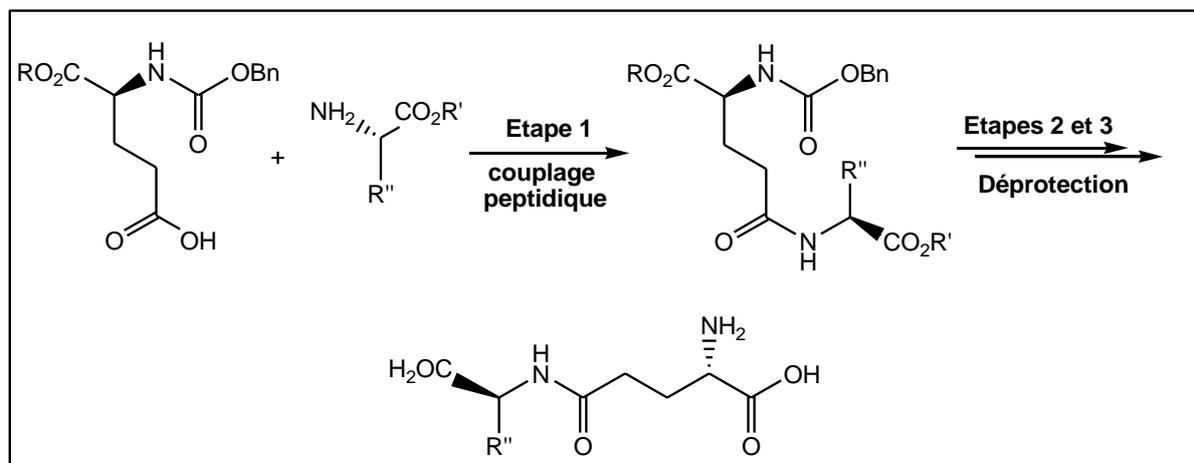
<sup>170</sup> S. Bittner, T. Win, R. Gupta, *Amino Acids*, **2005**, 28, 343–356

<sup>171</sup> T. Murakami, K. Kohno, R. Yumoto, Y. Higashi, N. Yata, *J. Pharm, Pharmacol*, **1998**, 50, 459-465.



**Figure II. 7 :** Structures de quelques dérivés gamma dipeptidiques

Pour cette partie du projet le but est de synthétiser et de développer de nouvelles molécules et de nouveaux outils qui comme nous l'envisageons, permettront de comprendre la synapse glutamatergique et notamment la modulation des récepteurs NMDA. Pour cela nous avons effectué la synthèse d'une série de  $\gamma$ -dipeptides de l'acide glutamique, analogues de la L-Théanine, en remplaçant l'éthylamine par des acides aminés selon la stratégie décrite ci-dessous (schéma 21).



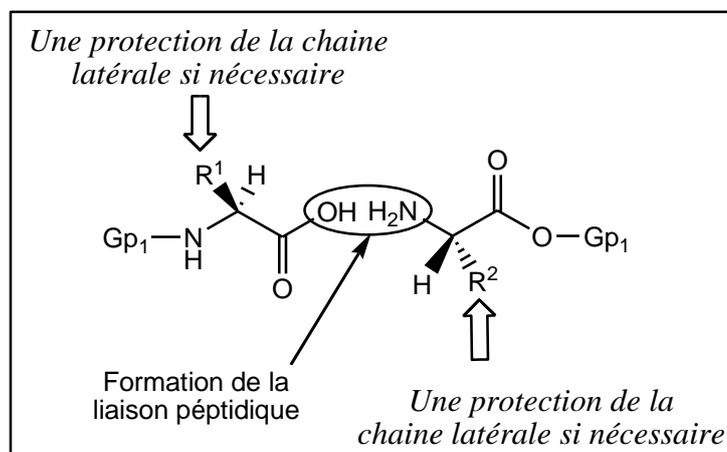
**Schéma 21.**

La synthèse de ces dipeptides fait appel à des méthodes classiques utilisées pour la synthèse peptidique. Avant de présenter les résultats pour la synthèse des dérivés  $\gamma$ -dipeptidiques de l'acide glutamique plus spécifiquement, nous allons faire quelques rappels au sujet de l'orthogonalité des groupements protecteurs, des méthodes d'activation. Le problème de l'épimérisation ne se pose que partiellement ici et sera détaillé ultérieurement pour la synthèse d'autres séries de dipeptides.

### II. 3. 2. 2 Stratégies de synthèse :

#### a-Orthogonalité des groupements protecteurs :

Dans la synthèse peptidique, pour former un seul dipeptide il faut éviter les réactions non désirées, donc il faut absolument protéger les fonctions amine et acide des deux acides aminés qui n'interviennent pas dans la formation de la liaison peptidique. Pour les acides aminés qui possèdent des chaînes latérales polaires tels que : les acides aspartique, glutamique, lysine, arginine et sérine etc... Il est nécessaire de protéger les fonctions latérales de ces acides aminés pour éliminer le risque de couplage sur ces mêmes chaînes latérales (Figure II. 8).



**Fig II. 8:** Représentation schématique des protections orthogonales.

#### b- Couplage :

La première étape est une activation de l'acide carboxylique en  $\gamma$  ( $pK_a = 4.25$ ) qui est un acide plus faible que celui en  $\alpha$  ( $pK_a = 2.19$ ). Après une étude bibliographique<sup>172</sup>, la

<sup>172</sup> R. V. Pattabiraman, J. W. Bode, *Nature*, **2011**, 480, 471-479.

réaction peut être effectuée grâce à différents modes d'activations : les anhydrides mixtes sont très utilisés comme réactifs de couplage.

Ainsi la réaction de couplage du produit commercial (*S*) Z-Glu-*O**t*Bu, avec une série d'acides aminés (Tableau 6), est effectuée en utilisant l'éthyl chloroformate dans un milieu légèrement basique avec de la N-méthyl morpholine NMM (pH = 8-8.5) afin de neutraliser le chlorhydrate formé puis libérer la nucléophilie de l'amine de l'aminooester. Les composés **33-40** sont obtenus après 5 heures de réaction à température ambiante avec des rendements satisfaisants (entre 75 – 93%) après une purification par chromatographie sur gel de silice (schéma 22).

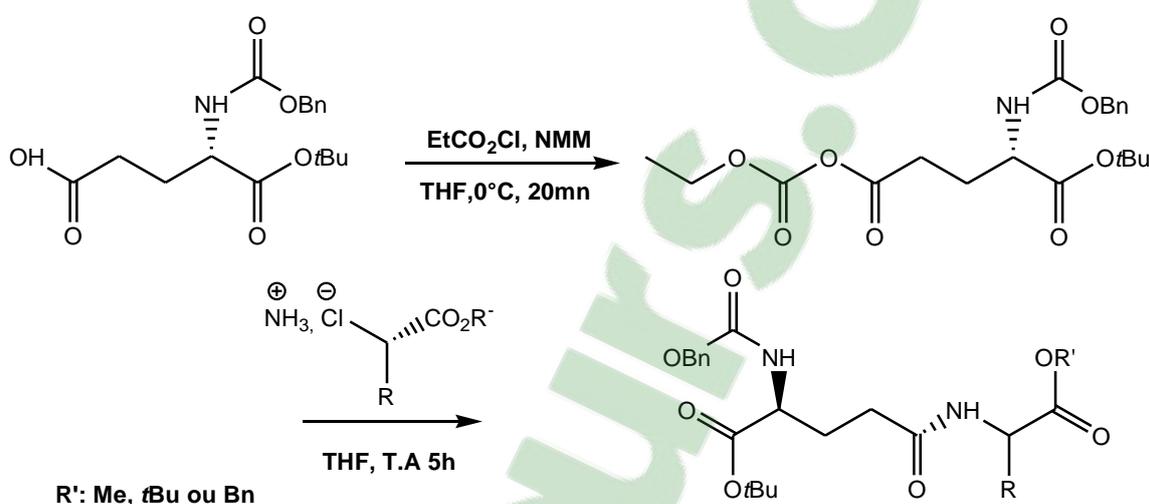


Schéma 22.

Nous avons utilisé 8 acides aminés. Le tableau 7 suivant résume les rendements et les différents  $\gamma$ -dipeptides de l'acide glutamique synthétisé.

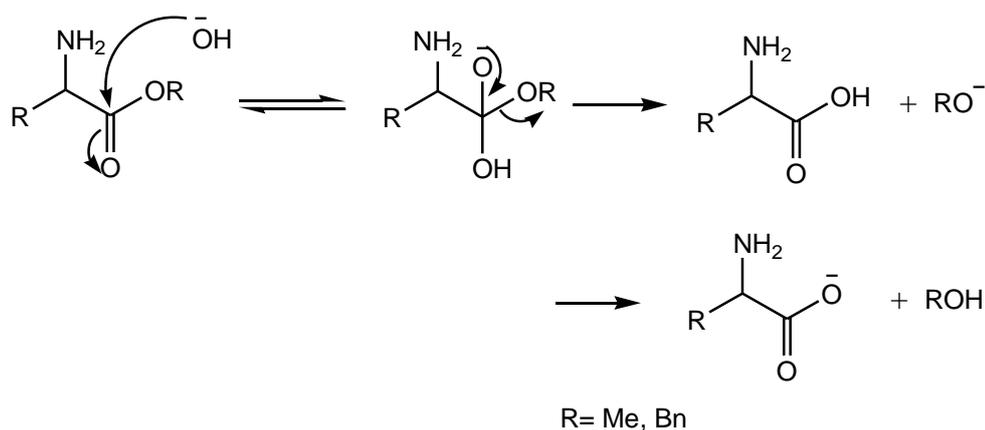
Acide aminé	Produit	Rendement %
H-Gly-OMe, HCl	<b>(33):</b> Z-(L)-Glu(Gly-OMe)- <i>O</i> <i>t</i> Bu	80
(L) H-Ala-OMe, HCl	<b>(34):</b> Z-(L)-Glu((L)-Ala-OMe)- <i>O</i> <i>t</i> Bu	84
(L) H-Val-OMe, HCl	<b>(35):</b> Z-(L)-Glu((L)-Val-OMe)- <i>O</i> <i>t</i> Bu	81
(L) H-Phe-OMe, HCl	<b>(36):</b> Z-(L)-Glu((L)-Phe-OMe)- <i>O</i> <i>t</i> Bu	91
(L) H-Pro-OBn, HCl	<b>(37):</b> Z-(L)-Glu((L)-Pro-OBn)- <i>O</i> <i>t</i> Bu	89
(L) H-His-OMe, HCl	<b>(38):</b> Z-(L)-Glu((L)-His-OMe)- <i>O</i> <i>t</i> Bu	75
(L) H-Trp- <i>O</i> <i>t</i> Bu, HCl	<b>(39):</b> Z-(L)-Glu((L)-Trp- <i>O</i> <i>t</i> Bu)- <i>O</i> <i>t</i> Bu	93
(L) H-Glu-(OMe)-OMe, HCl	<b>(40):</b> Z-(L)-Glu((L)-Glu-(OMe)-OMe)- <i>O</i> <i>t</i> Bu	78

**Tableau 6 :** Les rendements de synthèse différents des  $\gamma$ -dipeptides 33-40.**II. 3. 2. 3 / Hydrolyse des esters des  $\gamma$ -dipeptides de l'acide glutamique :**

En réalisant les expériences de déprotection des esters méthyliques en milieu basique nous nous sommes aperçus que les esters *tert*-butylique et benzylique étaient eux aussi partiellement hydrolysés.

L'hydrolyse de l'ester *tert*-butylique est réalisée généralement en milieu acide (acide trifluoroacétique TFA ou HCl) et l'ester benzylique par hydrogénolyse. Ainsi afin de diminuer le nombre d'étapes de déprotections nous avons choisi les conditions basiques pour l'hydrolyse des esters *tert*-butylique, méthylique et benzylique.

En général la réaction d'hydrolyse des esters en milieu basique a lieu selon le mécanisme présenté dans le schéma 23 suivant.

**Schéma 23.**

La déprotection de l'ester *tert*-butylique en milieu basique est beaucoup moins courante. La base *tert*-butylate (*tBuO*<sup>-</sup>) est très forte (pKa=17) et n'est pas formée. Nous avons proposé un mécanisme de déprotection de l'ester *tert*-butylique en milieu basique par le biais d'un mécanisme concerté supposé (schéma 24).

La réaction d'hydrolyse des composés (33-40) a été réalisée en milieu biphasique, avec une solution basique de NaOH aqueuse (2N) dans du THF (4mL). La réaction a été chauffée à 60°C et suivie par HPLC pendant 6h (schéma 25). Après plusieurs extractions les dérivés Z-(L)-Glu((L)-Xaa-OH)-OH (41-48) ont été obtenus avec de bons rendements (tableau 8).

En effet, le clivage de ces groupements baso-labiles dans des conditions alcalines peut donc entrainer un certain pourcentage de racémisation. L'analyse de ces dipeptides par l'HPLC analytique et RMN du  $^1\text{H}$ , nous a montré qu'aucune racémisation n'a été observée lors de cette étape de déprotection.

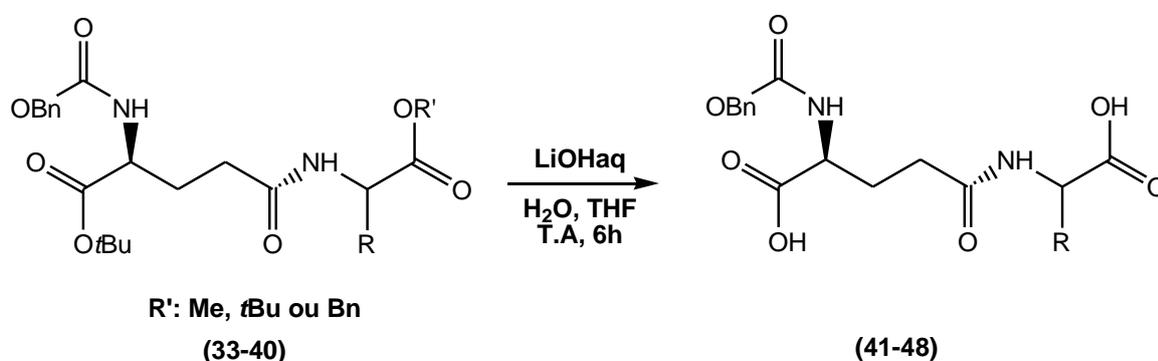


Schéma 25.

Entrées	Produit	Rdt (%)
1	<b>(41)</b> Z-(L)-Glu(Gly-OH)-OH	63
2	<b>(42)</b> Z-(L)-Glu((L)-Ala-OH)-OH	75
3	<b>(43)</b> Z-(L)-Glu((L)-Val-OH)-OH	78
4	<b>(44)</b> Z-(L)-Glu((L)-Phe-OH)-OH	94
5	<b>(45)</b> Z-(L)-Glu((L)-Pro-OH)-OH	83
6	<b>(46)</b> Z-(L)-Glu((L)-His-OH)-OH	52
7	<b>(47)</b> Z-(L)-Glu((L)-Trp-OH)-OH	89
8	<b>(48)</b> Z-(L)-Glu((L)-Glu-OH)-OH	58

Tableau 8: Les rendements des dipeptides 41-48.

La réaction d'hydrolyse des esters est totale, mais les rendements fluctuent d'un dipeptide à un autre selon leur hydrophobicité. Les produits **41**, **46** et **48** sont obtenus avec des rendements moindres, du fait de leur grande solubilité dans l'eau et de leur extraction délicate.

#### III. 3. 2. 4 /Hydrogénolyse des dérivés dipeptidiques Z-Glu(Xaa-OH)-OH (41-48) :

La réaction d'hydrogénation catalytique des dérivés **41** à **48** a lieu dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, en présence d'une quantité catalytique de

$\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$  et sous atmosphère d'hydrogène, dans le THF comme solvant et à température ambiante (schéma 26).

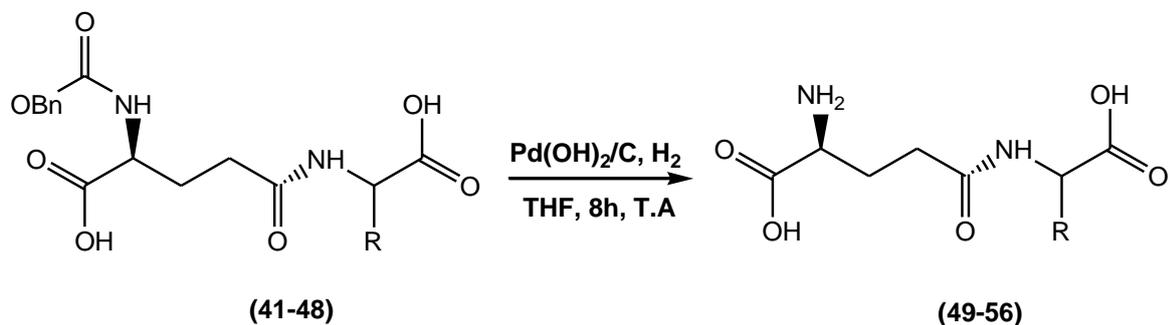
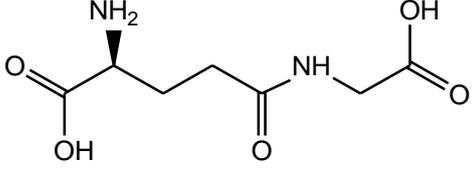
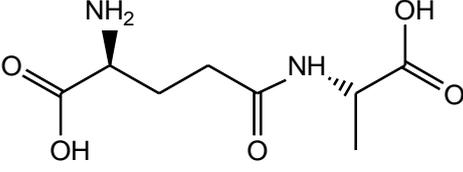
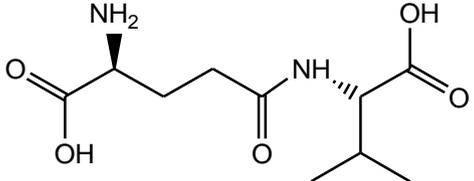
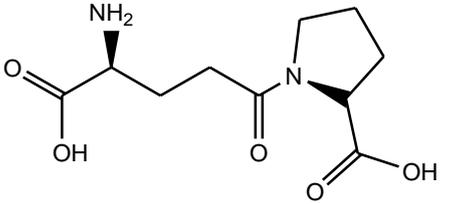
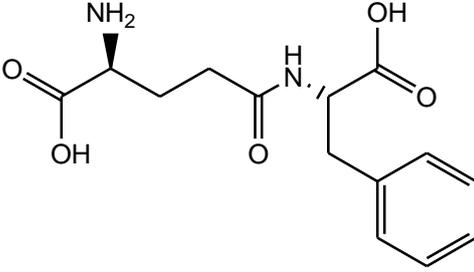
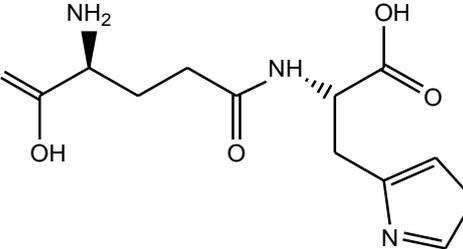
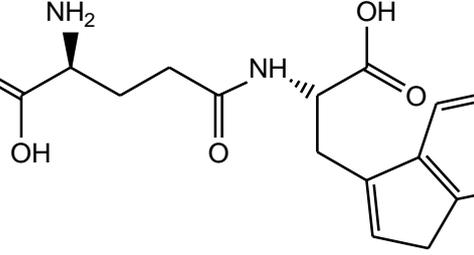
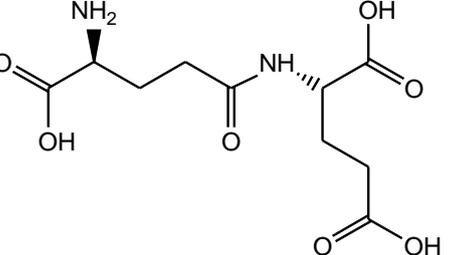


Schéma 26.

Après 8 heures d'agitation à température ambiante, les réactions sont arrêtées et les produits sont obtenus après une filtration sur célite avec des rendements satisfaisants (tableau 10). La pureté chimique de ces produits est confirmée par les analyses RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , et par HRMS de chaque dipeptide.

 <p>(49): H-(L)-Glu((L)-Gly-OH)-OH, Rdt= 89%</p>	 <p>(50): H-(L)-Glu((L)-Ala-OH)-OH, Rdt= 93%</p>
 <p>(51): H-(L)-Glu((L)-Val-OH)-OH, Rdt= 96%</p>	 <p>(52): H-(L)-Glu((L)-Pro-OH)-OH, Rdt= 87%</p>
 <p>(53): H-(L)-Glu((L)-Phe-OH)-OH, Rdt= 92%</p>	 <p>(54): H-(L)-Glu((L)-His-OH)-OH, Rdt= 84%</p>
 <p>(55): H-(L)-Glu((L)-Trp-OH)-OH, Rdt= 89%</p>	 <p>(56): H-(L)-Glu((L)-Glu-OH)-OH, Rdt= 91%</p>

**Tableau 10:** Les  $\gamma$  dipeptides de l'acide glutamique et les rendements obtenus.

Cette voie de synthèse nous a permis d'obtenir rapidement et efficacement les différents analogues **49-56** qui seront évalués pour leur activité biologique en tant qu'agonistes ou co-agonistes des récepteurs NMDA par la technique de l'électrophysiologie qui sera présentée ultérieurement.

D'après les premiers résultats biologiques nous avons constaté que chaque  $\gamma$ -dipeptide de l'acide glutamique possède des propriétés biologiques totalement différentes selon la nature du deuxième acide aminé.

Ces dipeptides seraient stables *in vivo*, car même les glutaminases sont incapables d'hydrolyser la liaison peptidique en position  $\gamma$  de l'acide glutamique.

#### **II. 4 Synthèse des dipeptides contenant la L-Théanine :**

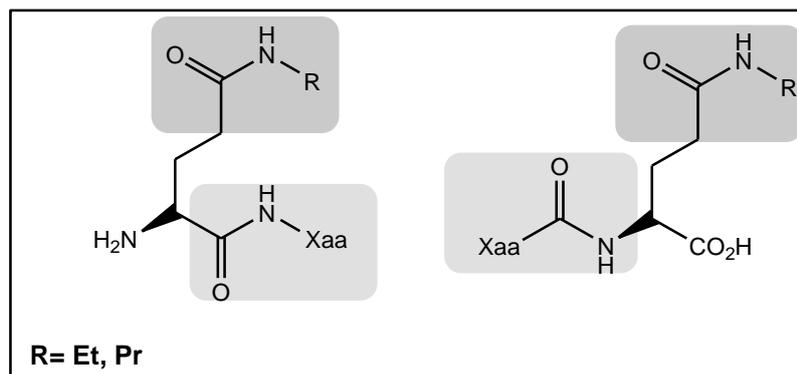
Comme nous l'avons déjà mentionné, la Théanine se trouve uniquement sous forme libre. Dans la nature elle n'est donc pas intégrée ni dans des peptides ni dans des protéines. Cette partie des travaux de thèse consiste à l'intégration de la Théanine dans des dipeptides toujours dans le but de trouver de nouveaux outils pour l'étude de la synapse glutamatergique et les comparer avec la série de  $\gamma$ -glutamyl dipeptides précédemment synthétisée.

Deux séries de dipeptides contenant la L-Théanine ont été préparées :

- Soit la Théanine sera à l'extrémité N terminale du dipeptide : H-5-NEt-Gln-Xaa-OH.
- Soit elle sera à l'extrémité C terminale : H-Xaa-5NEt-Gln-OH.

D'après les résultats biologiques préliminaires nous avons découvert que le dérivé 5-N-propyl glutamine possédait une activité plus importante que la Théanine elle-même pour l'effet agoniste vis-à-vis des récepteurs NMDA.

Deux autres séries de dipeptides contiendront la 5-NPr-Gln en lieu et place de la 5-NEt-Gln, la préparation de la NPr-Gln ayant été optimisée précédemment (Figure II. 9).

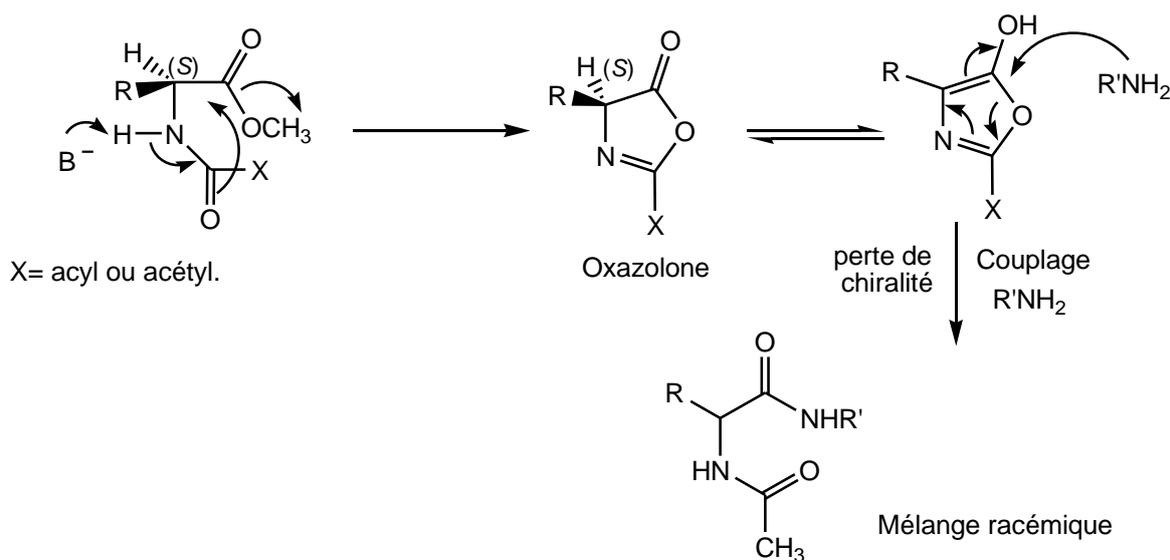


**Fig II. 9 :** Représentation des structures des dipeptides contenant la Théanine ou la 5-NPr-Gln.

#### II. 4. 1/ Formation de la liaison peptidique :

A la différence du chapitre précédent où le couplage était réalisé sur la chaîne latérale du Glu, nous devons prendre en compte ici un autre paramètre qui est l'épimérisation.

L'activation de l'extrémité C terminale du peptide peut entraîner un certain taux d'épimérisation. En effet, l'activation permet la formation d'une oxazolone (schéma 27). La racémisation dépend de la nature des groupements protecteurs des amines. Par exemple les acétyls ou les acyls en règle générale sont plus racémisants que les carbamates (groupements Fmoc, Boc ou Z). Les fonctions uréthanes diminuent l'électrophilie du carbonyle par effet mésomère donneur et diminuent ainsi la formation d'oxazolone.



**Schéma 27.**

Dans le cas d'un couplage avec un deuxième acide aminé optiquement pur à la place de R'NH<sub>2</sub>, la formation de diastéréoisomères est observée.

## II. 4. 2 Stratégie de préparation de la série : H-5-NEt-Gln-Xaa-OH

### II. 4. 2 a Couplage

Notre choix s'est porté sur 4 acides aminés (la glycine, la valine, la proline et la phénylalanine). Le choix était assez aléatoire et ces 4 acides aminés correctement protégés étaient disponibles au laboratoire. Ces acides aminés sont de diverse structures : un est très contraint (Pro) et un autre très flexible (Gly) et ils sont « hydrophobiquement » différents.

Pour arriver à ces dipeptides nous avons suivi une stratégie en 4 étapes : l'acide glutamique (*S*) Z-Glu-(*O**t*Bu)-OH est couplé à l'ester benzylique des 4 acides aminés précédemment cités. Les groupements protecteurs des extrémités N et C doivent être baso stables pour pouvoir subir la réaction d'amidification et surtout orthogonales à la protection de la chaîne latérale de l'acide glutamique de départ. Après l'obtention des dipeptides correspondant, l'ester *tert*-butylique est hydrolysé, et la chaîne latérale de l'acide glutamique est amidifiée. Enfin une hydrogénation catalytique mène aux composés finaux (schéma 28).

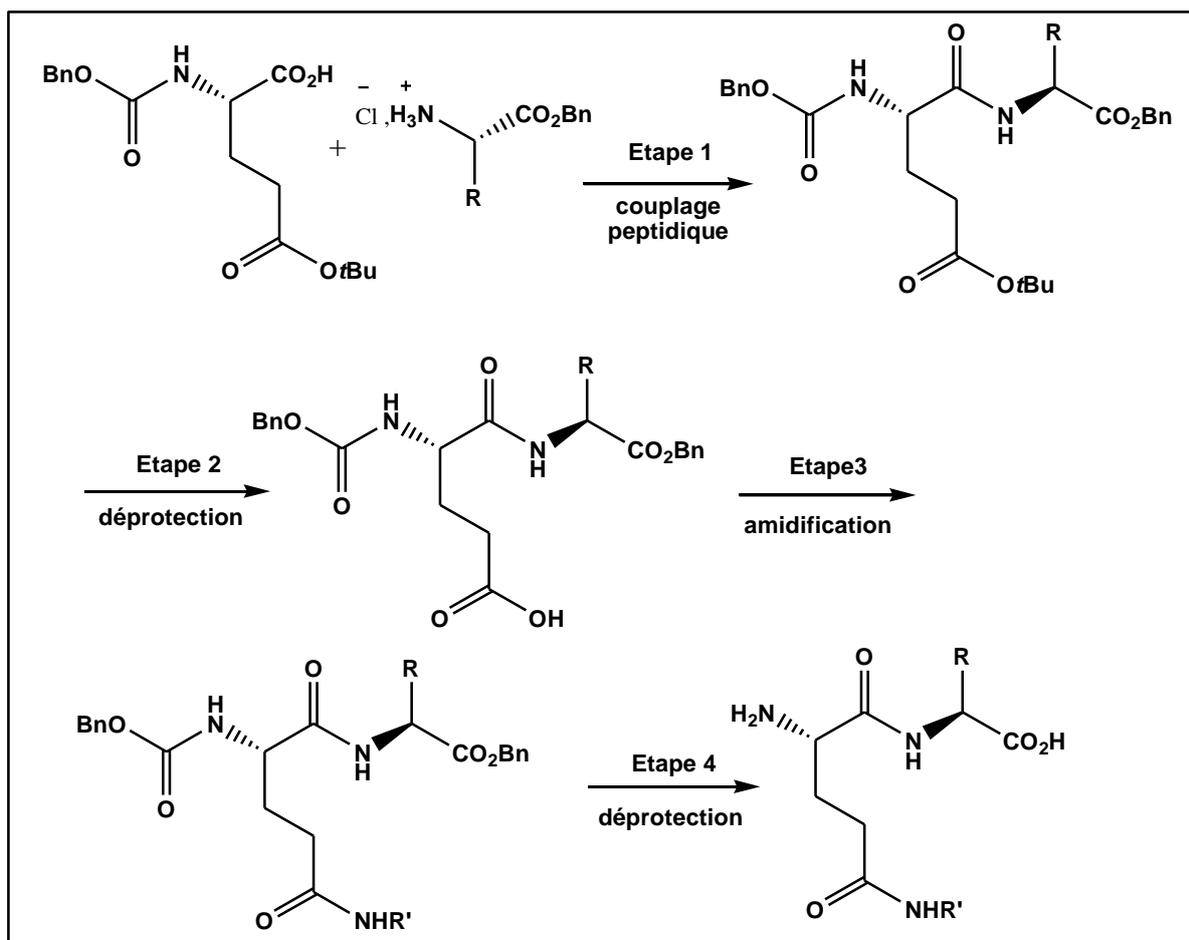


Schéma 28.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, il existe diverses méthodes d'activation de l'acide. Dans cette partie, nous avons essentiellement utilisé le réactif hexafluorophosphate de benzotriazoloyloxytris(diméthylamino) phosphonium BOP<sup>3</sup> (schéma 29), le taux de conversion est total mais les rendements finaux ne sont pas quantitatifs. Une perte d'une certaine quantité de composé est observée au cours des traitements et purifications. Le tableau 11 résume les dérivés dipeptidiques obtenus ainsi que le rendement de chacun d'eux.

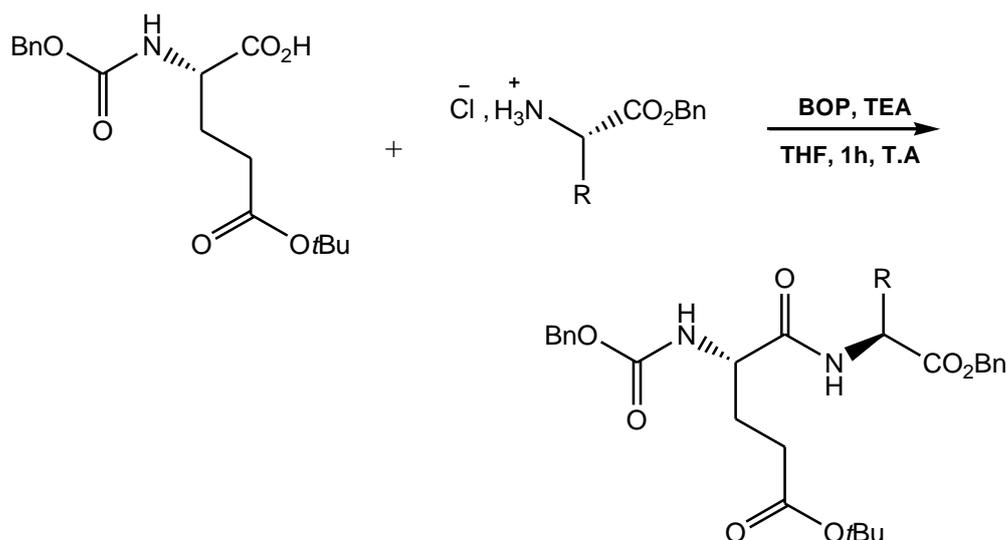


Schéma 29.

Entrées	Produit	Rdt (%)
1	<b>57</b> Z-(L)-Glu-(OtBu)-Gly-OBn	92
2	<b>58</b> Z-(L)-Glu-(OtBu)-(L)-Val-OBn	96
3	<b>59</b> Z-(L)-Glu-(OtBu)-(L)-Pro-OBn	88
4	<b>60</b> Z-(L)-Glu-(OtBu)-(L)-Phe-OBn	98

Tableau 11 : Les rendements des dipeptides 57 à 60.

Au cours d'un couplage peptidique la pureté chimique d'une part mais aussi la pureté optique doivent être vérifiées. Selon les analyses HPLC et <sup>1</sup>H RMN les produits sont purs et aucune racémisation n'a été observée.

#### II. 4. 2. b/ Hydrolyse de l'ester OtBu :

Après la synthèse des dipeptides de l'acide glutamique **57 à 60**, la deuxième étape de notre schéma synthétique consiste en la déprotection de l'ester *tert*-butylique dans les conditions conventionnelles, c'est-à-dire en milieu acide. Quand la réaction a été effectuée en milieu acide (1M) de TFA dans DCM à température ambiante la réaction de déprotection a été très lente (3 jours) et n'est pas totale. Avec une concentration plus élevée (4M TFA dans DCM), la durée de l'hydrolyse a pu être réduite à 4h et la déprotection est totale (schéma 30). Cette réaction a lieu selon le mécanisme présenté dans le schéma 31.

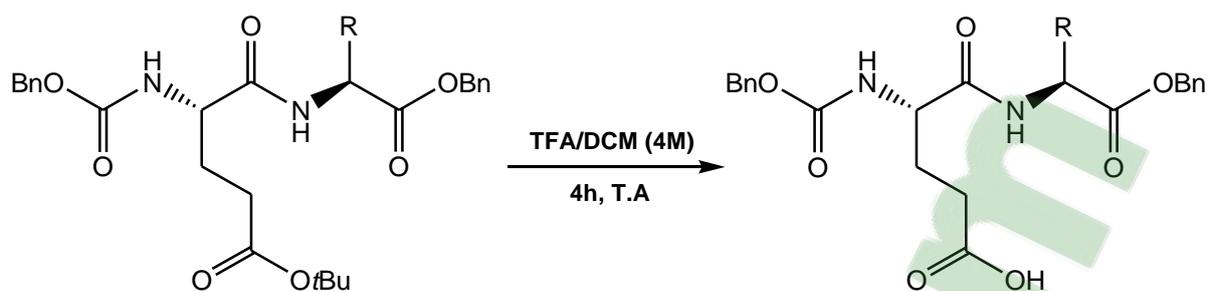


Schéma 30.

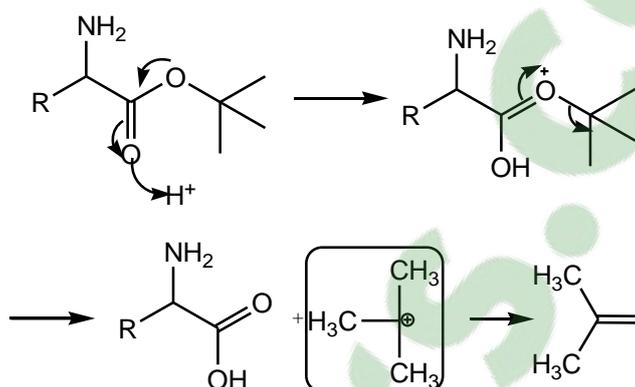


Schéma 31.

Les dipeptide (**61** – **64**) sont obtenus avec des rendements quantitatifs après simple évaporation du milieu réactionnel et co-évaporation du TFA résiduel avec du toluène (tableau 12).

Entrées	Produit	Rdt (%)
1	<b>61</b> Z-Glu-Gly-OBn	99
2	<b>62</b> Z-Glu-Val-OBn	98
3	<b>63</b> Z-Glu-Pro-OBn	92
4	<b>64</b> Z-Glu-Phe-OBn	100

Tableau 12 : Les rendements de dipeptides 61 à 64.

#### II. 4. 2. c /Amidification des composés 61-64 de type Z-Glu-Xaa-OBn:

Ces nouveaux dipeptides **61-64** avec une fonction acide libre en position  $\gamma$  de l'acide glutamique ont été amidifiés dans les conditions habituelles, avec l'agent de couplage BOP, soit avec l'éthylamine pour obtenir les dipeptides contenant la Théanine, soit avec la propylamine pour obtenir une autre série de dipeptides contenant l'analogue de la Théanine la

5-N-propylglutamine (schéma 32). Les produits **65-72** ont été obtenus avec de bons rendements après plusieurs lavages acido-basiques.

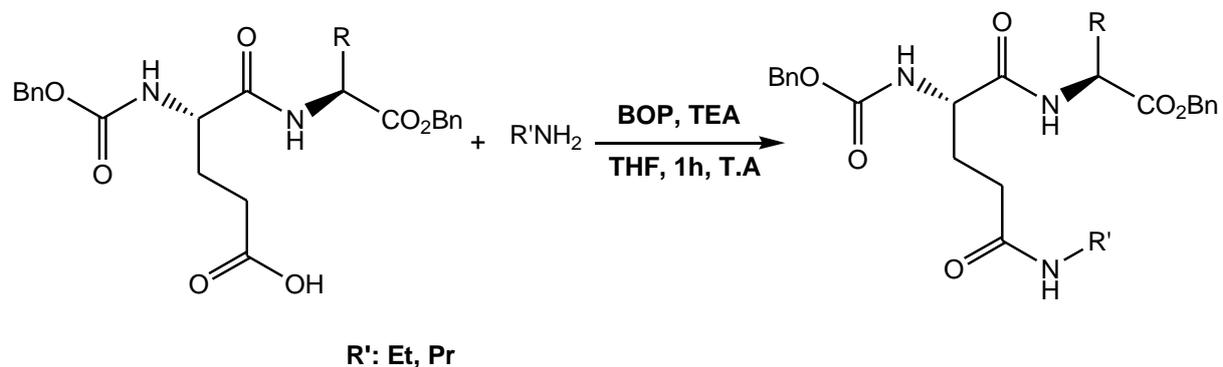
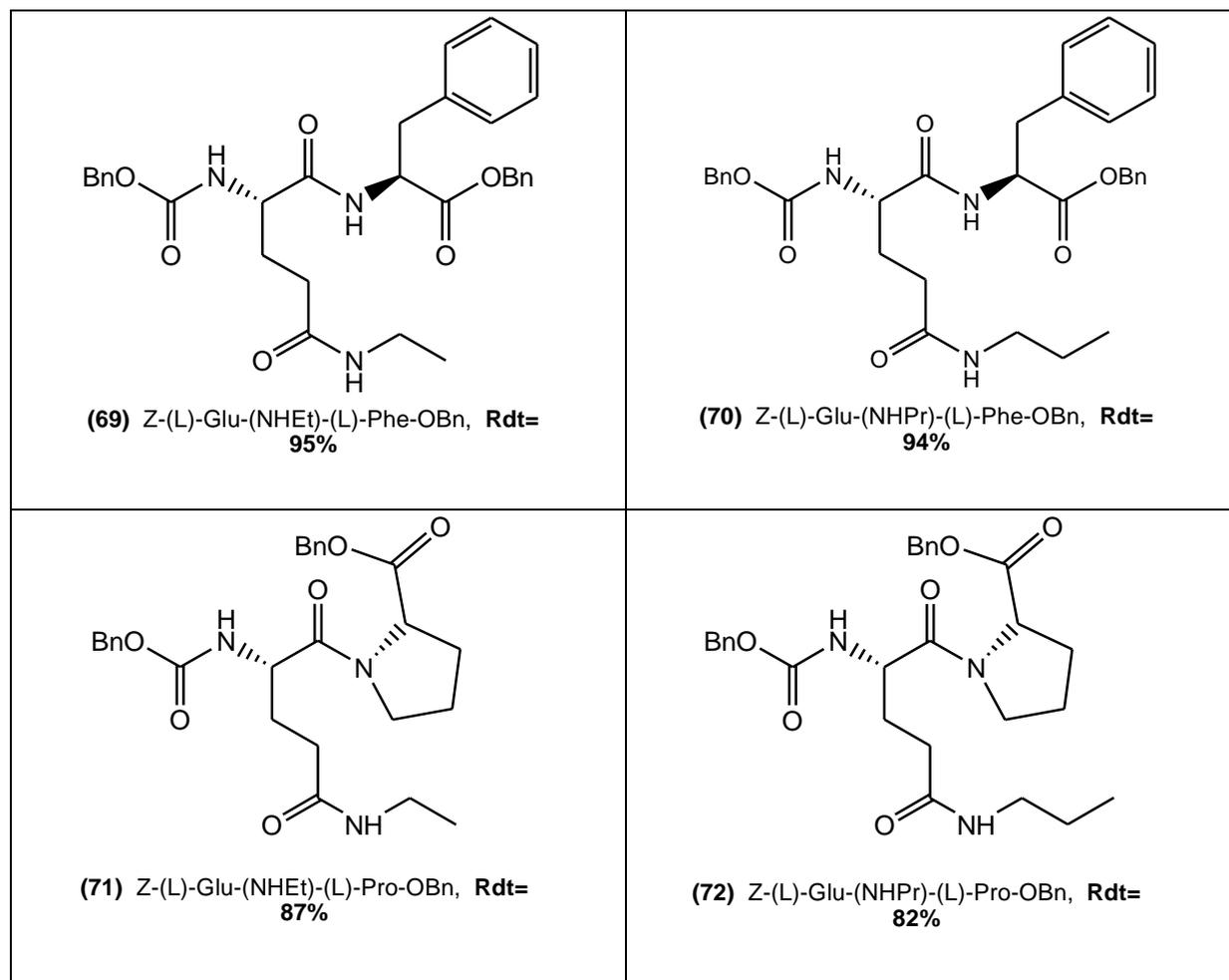


Schéma 32.

Les différents produits de la réaction d'amidification des dérivés **61-64** obtenus sont regroupés dans le tableau suivant :

<p><b>(65)</b> Z-(L)-Glu-(NHEt)-Gly-OBn, <b>Rdt=93%</b></p>	<p><b>(66)</b> Z-(L)-Glu-(NHPr)-Gly-OBn, <b>Rdt=95%</b></p>
<p><b>(67)</b> Z-(L)-Glu-(NHEt)-(L)-Val-OBn, <b>Rdt= 90%</b></p>	<p><b>(68)</b> Z-(L)-Glu-(NHPr)-(L)-Val-OBn, <b>Rdt=93%</b></p>



**Tableau 13:** Les structures et les rendements de dipeptides 65-72.

#### II. 4. 1. c/ Déprotection finale : Hydrogénation catalytique des Z-Gln(NR)-Xaa-OBn:

La réaction d'hydrogénolyse des groupements benzyloxycarboxyle (Z) et ester benzylique des différents dipeptides **65-72** et **61-64** est réalisée selon les mêmes conditions que celles mises au point précédemment. Les Z-dipeptides sont introduits dans une solution de THF en présence d'une quantité catalytique 20% de masse d'hydroxyde de palladium activé sur charbon Pd(OH)<sub>2</sub>/C. Ces réactions d'hydrogénolyses mènent aux produits finaux après filtration sur célite (schéma 33).

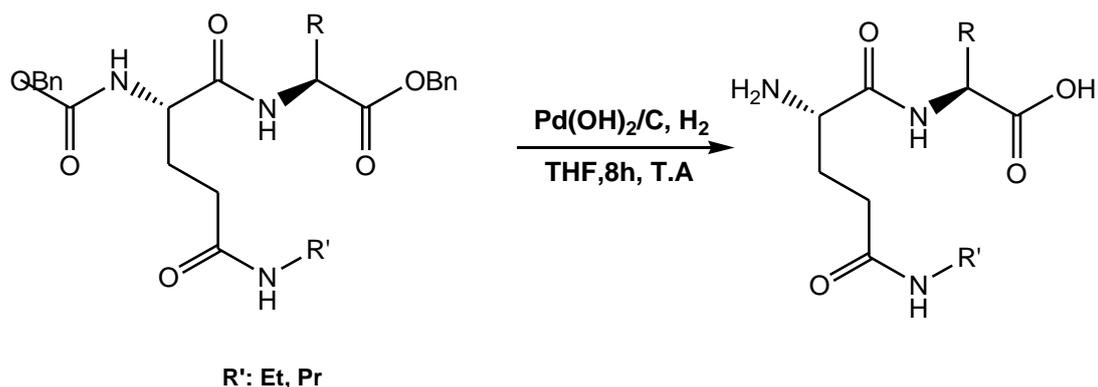


Schéma 33.

Les dipeptides avec la L-Théanine ou la L-5-N-propylglutamine du côté N terminal ont été obtenus avec des rendements variables. Nous avons constaté également que les réactions d'hydrolyse des groupements protecteurs étaient totales mais les rendements et le temps de la réaction varient selon la nature de l'acide aminé et la solubilité de chaque dipeptide.

Par exemple, dans le cas de la glycine qui est la moins encombrée, les rendements sont les meilleurs (Tableau13).

#### II. 4. 2 e Déprotection finale des dipeptides Z-Glu-Xaa-OBn :

Afin de pouvoir comparer l'influence des dérivés de la Théanine et son dérivé sur l'activité biologique ciblée, nous avons également préparé et caractérisé les dipeptides classiques avec l'acide glutamique en partant des dipeptides (58-61) (schéma 34). Les résultats en terme de synthèse sont rassemblés dans le tableau 14.

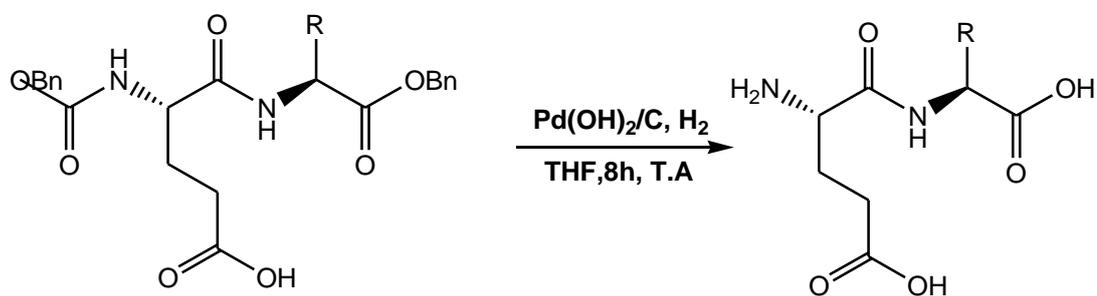


Schéma 34.

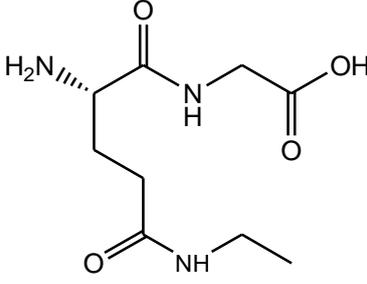
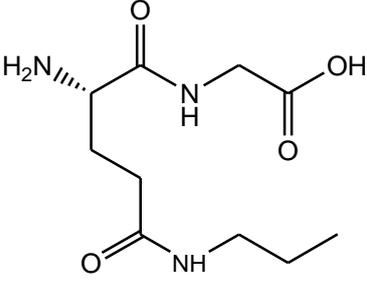
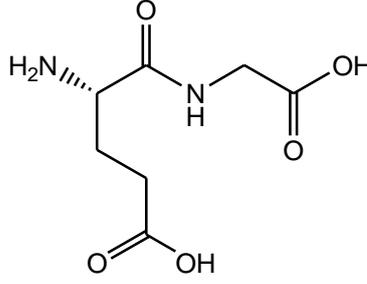
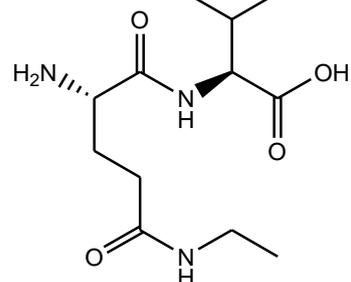
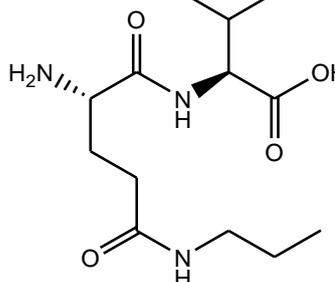
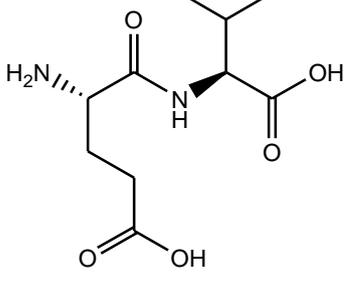
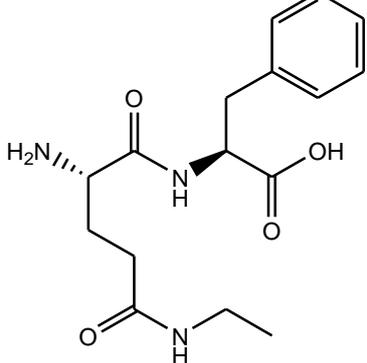
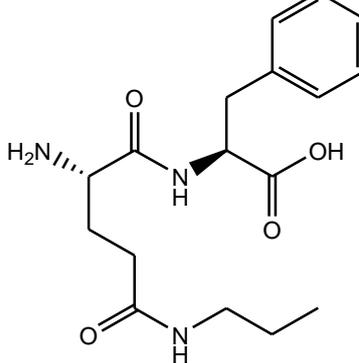
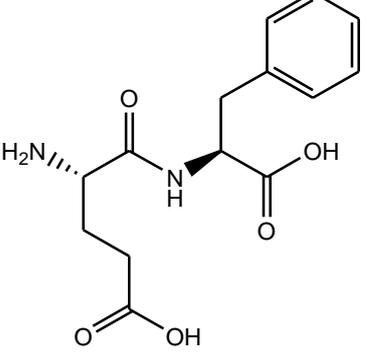
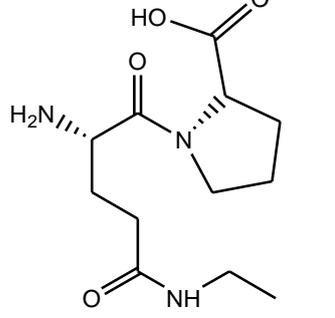
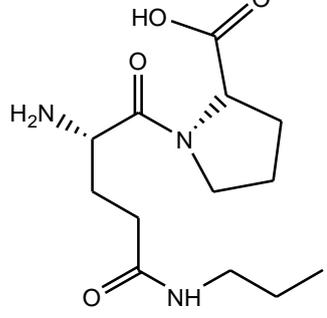
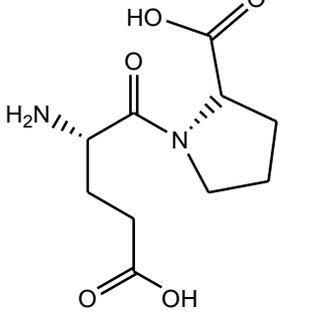
 <p><b>(73)</b> H-(L)-Glu-(NH-Et)-Gly-OH Rdt= 99%</p>	 <p><b>(74)</b> H-(L)-Glu-(NH-Pr)-Gly-OH Rdt= 95%</p>	 <p><b>(75)</b> H-(L)-Glu-Gly-OH Rdt= 98%</p>
 <p><b>(76)</b> H-(L)-Glu-(NH-Et)-(L)-Val-OH Rdt= 92%</p>	 <p><b>(77)</b> H-(L)-Glu-(NH-Pr)-(L)-Val-OH Rdt= 91%</p>	 <p><b>(78)</b> H-(L)-Glu-(L)-Val-OH Rdt= 98%</p>
 <p><b>(79)</b> H-(L)-Glu-(NH-Et)-(L)-Phe-OH Rdt= 92%</p>	 <p><b>(80)</b> H-(L)-Glu-(NH-Pr)-(L)-Phe-OH Rdt= 89%</p>	 <p><b>(81)</b> H-(L)-Glu-(L)-Phe-OH Rdt= 98%</p>
 <p><b>(82)</b> H-(L)-Glu-(NH-Et)-(L)-Pro-OH Rdt= 88%</p>	 <p><b>(83)</b> H-(L)-Glu-(NH-Et)-(L)-Pro-OH Rdt= 93%</p>	 <p><b>(84)</b> H-(L)-Glu-(L)-Pro-OH Rdt= 95%</p>

Tableau 14 : Résultats de la réaction de déprotection.

Ces dipeptides n'ont pas été décrits dans la littérature ; leur synthèse et l'étude de leur effet sur la synapse glutamatergique seront évaluées pour la première fois dans ce projet.

La pureté de ces produits finaux a été vérifiée par l'RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , mesure du pouvoir rotatoire et analyse HRMS.

Par la suite ces dipeptides seront testés au niveau de la synapse glutamatergique, et on déterminera si l'incorporation de la Théanine ou de la 5-N-propylglutamine à la place de l'acide glutamique va influencer sur l'activité biologique de chaque dipeptide.

Après avoir obtenu la série de dipeptides contenant la L-Théanine et la L-5-N-propylglutamine positionnées du côté N-term du dipeptide, nous avons souhaité par la suite accéder à la dernière série de dipeptides contenant la L-Théanine ou la L-5-N-propylglutamine positionnées du côté C-Term du dipeptide.

#### **II. 4. 3/ Stratégie de préparation de la série : H-Xaa-5-NEt-Gln-OH**

Dans ce cas-là, la synthèse de dipeptides où la Théanine est située en C-term a été réalisée par l'incorporation de la Théanine protégée. Selon les produits accessibles au laboratoire nous avons exploité une stratégie différente à celle suivie dans la synthèse de la série des dipeptides H-Gln(NR)-Xaa-OBn.

La stratégie de synthèse conduisant à ces dipeptides est décrite dans le (schéma 35), les fonctions amine et acide en  $\alpha$  de l'acide glutamique sont protégées respectivement par un groupement Boc et un ester benzylique. Dans une première étape l'acide glutamique est amidifié sur l'acide en position  $\gamma$ , soit avec l'éthylamine soit avec la propylamine par des méthodes optimisées et décrites dans les chapitres précédents.

Le groupement Boc est hydrolysé en milieu acide, puis le trifluoroacétate de chaque dérivé est couplé avec des acides aminés N-benzyloxycarbonylés (Z-Xaa-OH). Les dipeptides correspondants avec la Théanine ou les analogues avec la 5-N-propylglutamine sont obtenus après hydrolyse des groupements protecteurs.

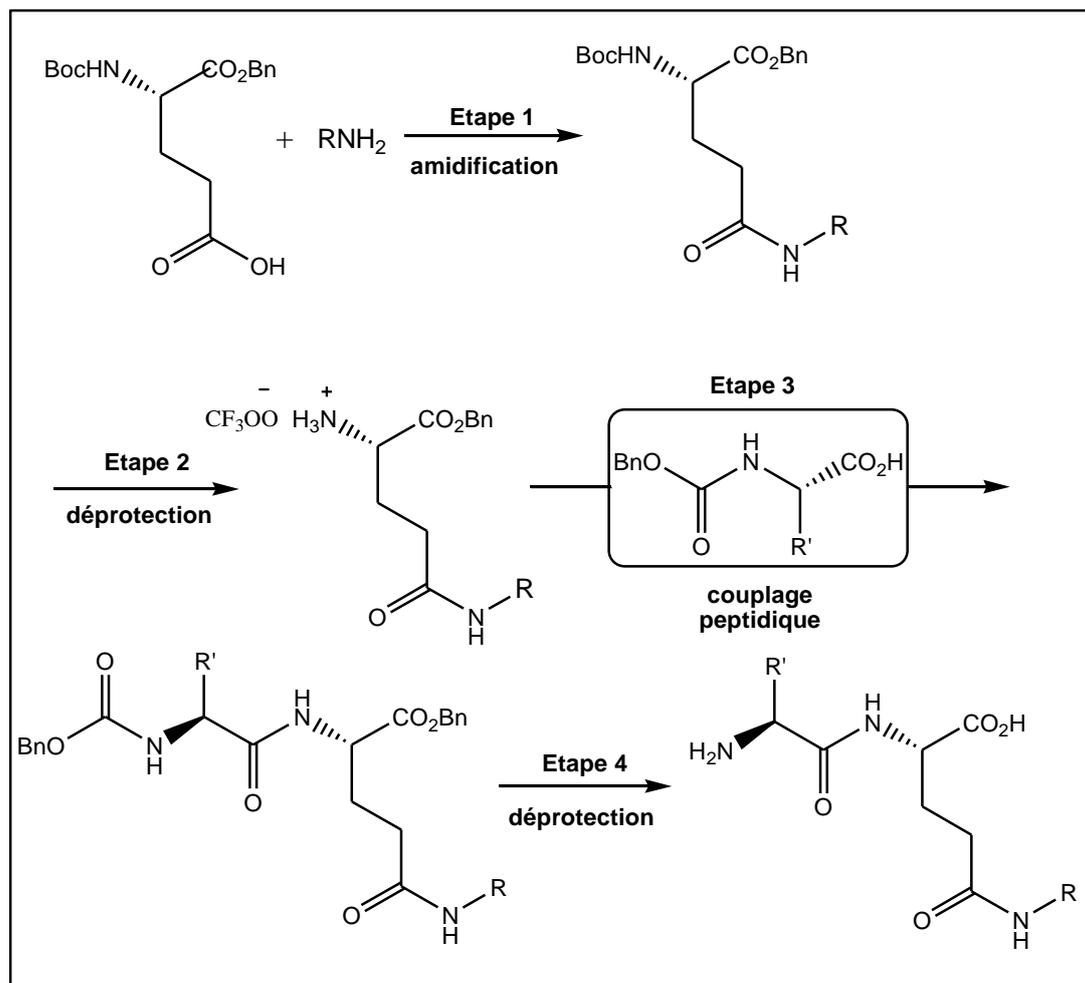


Schéma 35.

Pour cette dernière série notre choix d'acide aminé s'est porté sur la glycine, la valine et la phénylalanine.

#### II. 4. 3. 1/ Réaction d'amidification sur le (S) Boc-Glu-OBn : synthèse de **86** et **87** :

Comme nous l'avons signalé précédemment, la réaction d'amidification est effectuée avec des rendements excellents en utilisant le réactif BOP et la base faible TEA qui tamponne le milieu. Le (L) Boc-Glu-OBn (**85**) réagit avec l'éthylamine ou la propylamine. Les produits **86** et **87** ont été obtenus avec un rendement de 95% et 97% respectivement (schéma 36).

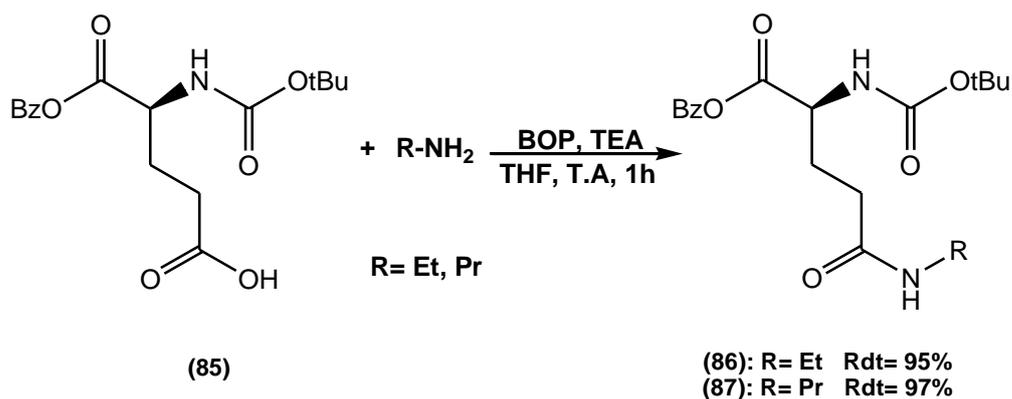


Schéma 36.

### II. 4. 3. 2/ Hydrolyse acide des groupements Boc des produits 86 et 87:

L'étape suivante a consisté en la déprotection du groupement Boc dans des conditions conventionnelles, c'est-à-dire en présence d'une solution à 20% de TFA dans du dichlorométhane à température ambiante pendant deux heures (schéma 37).

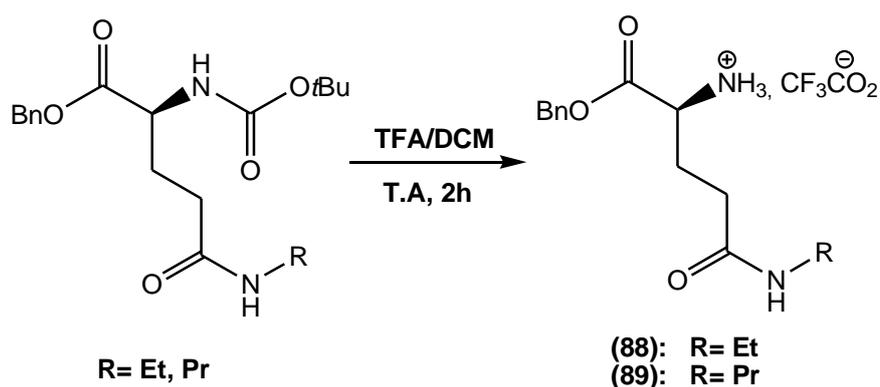


Schéma 37.

Chaque dipeptide **88** et **89** est ainsi obtenu sous forme de sels trifluoroacétate d'ammonium avec un rendement quantitatif après simple évaporation à sec du milieu réactionnel et co-évaporation du TFA résiduel avec du cyclohexane et ensuite avec du toluène.

### III. 4. 2. 3/ Synthèse des dipeptides de la série H-Xaa-Glu(NH<sub>2</sub>)-OH ou H-Xaa-Glu(NHPr)-OH :

Les sels trifluoroacétate obtenus sont couplés en présence de réactif BOP avec la Z-Gly-OH, la Z-Val-OH et la Z-Phe-OH pour conduire aux dipeptides correspondants après une purification par une chromatographie sur colonne de gel de silice (schéma 38).

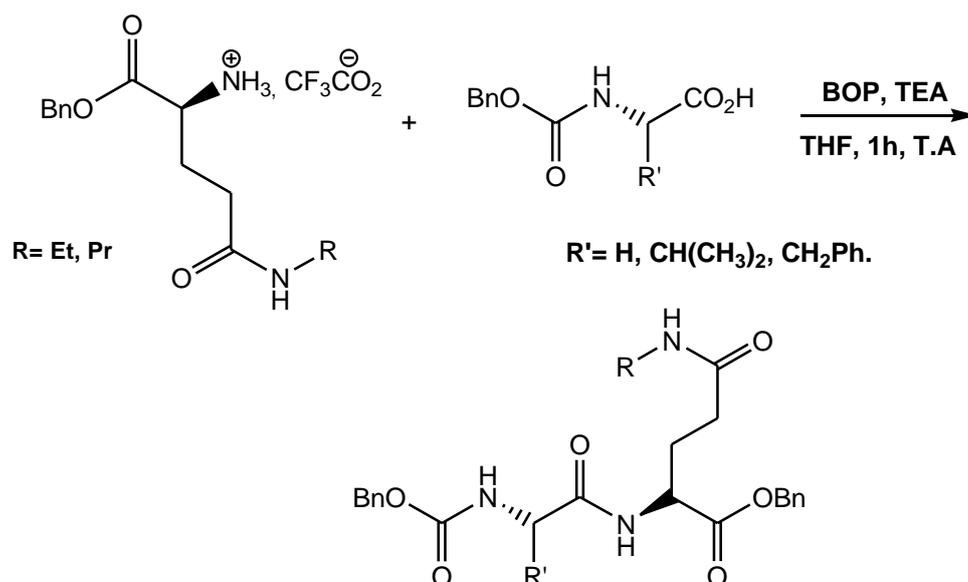


Schéma 38.

Le tableau suivant résume les différents dipeptides obtenus avec le rendement de chacun.

R	R'	Produit		Rdt (%)
Et	H	<b>90</b>	Z-Gly-(L)-Glu-(NHEt)-OBn	<b>69</b>
Et	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<b>91</b>	Z-(L)-Val-(L)-Glu-(NHEt)-OBn	<b>54</b>
Et	CH <sub>2</sub> Ph	<b>92</b>	Z-(L)-Phe-(L)-Glu-(NHEt)-OBn	<b>44</b>
Pr	H	<b>93</b>	Z-Gly-(L)-Glu-(NHPr)-OBn	<b>65</b>
Pr	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<b>94</b>	Z-(L)-Val-(L)-Glu-(NHPr)-OBn	<b>56</b>
Pr	CH <sub>2</sub> Ph	<b>95</b>	Z-(L)-Phe-(L)-Glu-(NHPr)-OBn	<b>50</b>

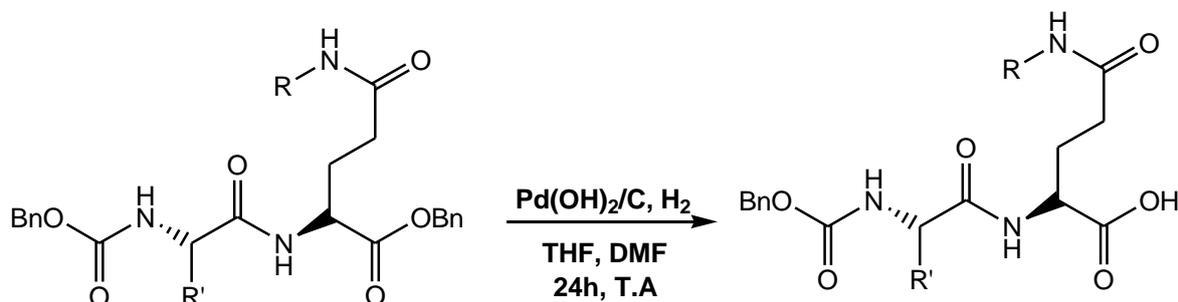
Tableau 15: Les rendements en dipeptides 90-95.

Les rendements de cette étape ont été plus faibles que ceux des dipeptides synthétisés précédemment. Ces faibles rendements pourraient être expliqués par le fait que la Théanine est difficile à coupler et qu'il aurait fallu appliquer certainement la stratégie précédente : synthétiser le dipeptide puis effectuer la réaction d'amidification. Il est important de noter qu'aucune réaction secondaire n'a eu lieu et que les produits de départ peuvent être récupérés.

### III. 4. 2. 3/ Hydrogénolyse des produits 90-95:

La réaction d'hydrogénation catalytique des composés **90** à **95** a été effectuée dans un mélange de solvant THF/DMF et en présence d'une quantité catalytique de Pd(OH)<sub>2</sub>/C :

l'hydrogénation catalytique est très lente et n'a pas été totale. Les analyses effectuées par spectrométrie de masse, par RMN et par HPLC ont montré que seul l'ester benzylique avait été hydrolysé (schéma 39).

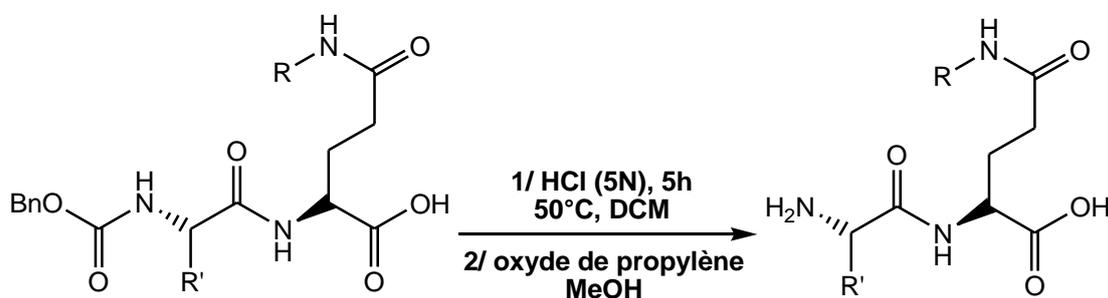


R= Et, Pr

R'= H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Ph.

Schéma 39.

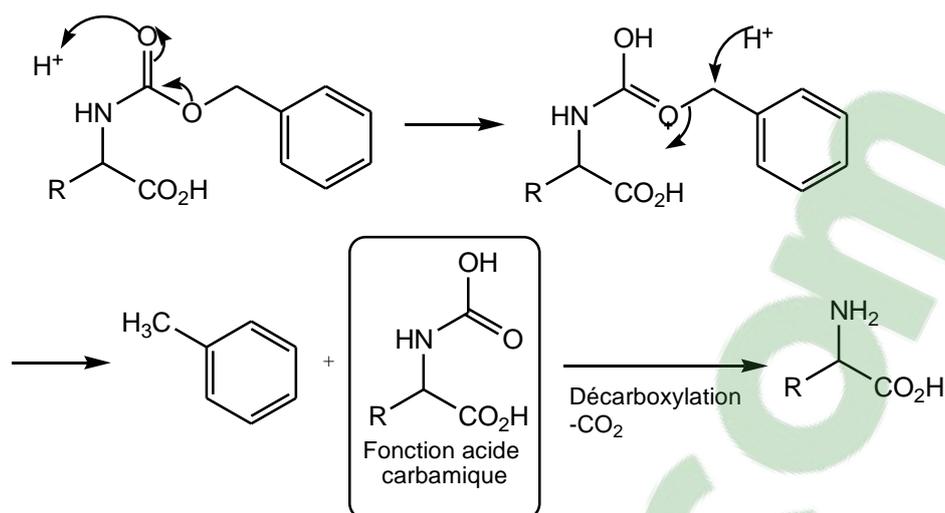
Pour des raisons de stabilité de la Théanine et de la 5-N-propyl-Gln il est impossible d'appliquer des conditions basiques pour déprotéger l'amine N term ; ainsi une hydrolyse de du groupement Z par l'acide chlorhydrique a été tentée et l'optimisation de cette réaction a été nécessaire. La température du milieu réactionnel, la concentration en acide chlorhydrique ainsi que le temps de réaction ont été étudiés. Le substrat (Z-dipeptide) est placé sous agitation pendant 5 heures dans une solution d'acide chlorhydrique 5N dans du DCM à 50°C (schéma 40) selon le mécanisme présenté dans le schéma 41. Les chlorhydrates de chaque dipeptide sont obtenus avec des rendements très satisfaisants, et conduisent aux dipeptides libres après action d'un excès d'oxyde de propylène dans le méthanol.



R= Et, Pr

R'= H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Ph.

Schéma 40.



Les différents dipeptides sont présentés dans le tableau ci-dessous :

R	R'	Produit		Rdt (%)
Et	H	<b>96</b>	H-Gly-(L)-Glu-(NH <sub>2</sub> Et)-OH	<b>89</b>
Et	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<b>97</b>	H-(L)-Val-(L)-Glu-(NH <sub>2</sub> Et)-OH	<b>84</b>
Et	CH <sub>2</sub> Ph	<b>98</b>	H-(L)-Phe-(L)-Glu-(NH <sub>2</sub> Et)-OH	<b>72</b>
Pr	H	<b>99</b>	H-Gly-(L)-Glu-(NHPr)-OH	<b>91</b>
Pr	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<b>100</b>	H-(L)-Val-(L)-Glu-(NHPr)-OH	<b>83</b>
Pr	CH <sub>2</sub> Ph	<b>101</b>	H-(L)-Phe-(L)-Glu-(NHPr)-OH	<b>87</b>

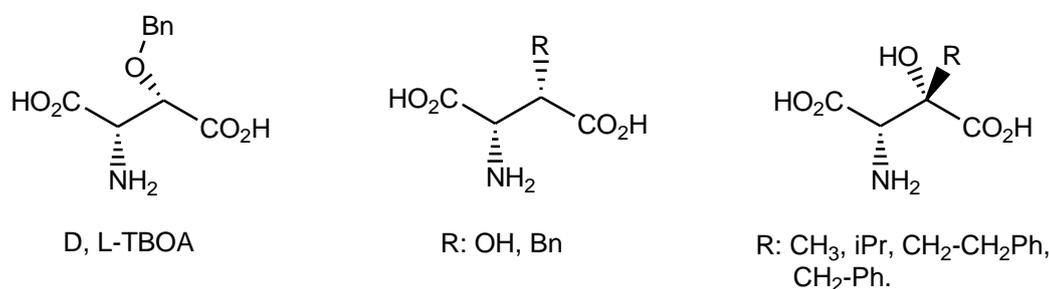
**Tableau 16:** Les rendements en dipeptides 96 -101.

Ces dipeptides ont été synthétisés dans le but de déterminer si, mis à part la Théanine, le dipeptide va jouer un rôle important dans l'activité biologique vis-à-vis de la synapse glutamatergique et des récepteurs ionotropiques et/ou métabotropiques que ce soit en terme de blocage (antagoniste) comme en terme d'activation (agoniste). L'activité de ces produits va être évaluée dans la suite de ce projet.

## II. 5 Synthèse stéréosélective de nouveaux dérivés C4-arylés et C4-alkylés de la L-Théanine :

Plusieurs dérivés de l'acide glutamique substitués en position 4 sont des produits naturels<sup>173</sup> et ont été préparés dans le but d'étudier les relations structure-activité des effets excitateurs sur le système nerveux<sup>174</sup>.

Afin de développer des nouvelles molécules capables d'activer, bloquer, ou moduler les récepteurs ionotropiques et métabotropiques du Glu ou des transporteurs d'acides aminés excitateurs (EAATs), notre équipe de recherche travaille depuis plusieurs années sur la synthèse et l'évaluation biologique de divers analogues du glutamate substitués en position 3 ou 4<sup>175 176</sup> et divers analogues d'aspartate substitués en position 3<sup>177</sup> (Figure II. 10).



**Fig II. 10 :** Des dérivés d'acide aspartique  $\beta$ -Substitués, inhibiteurs de EAATs.

Le DL- thréo- $\beta$ -benzyloxyaspartate (DL-TBOA) fait partie des plus puissants bloqueurs du transport du Glu chez les être humains (EAAT1 et EAAT2)<sup>178</sup>. Les dérivés  $\beta$ -méthyl- $\beta$ -hydroxyaspartates,  $\beta$ -phényléthyl- $\beta$ -hydroxyaspartates énantiomériquement purs ont présenté des effets inhibiteurs modérés sur le transport du glutamate. Mekki et al<sup>179</sup>, ont réalisé une synthèse courte, régiospécifique et stéréosélective de L- $\beta$ -thréo-benzyl- $\beta$ -hydroxyaspartate. Cette nouvelle cible mime de L- $\beta$ -thréo-OH-Asp et de L- $\beta$ -thréo-benzyl-Asp qui sont les plus puissants bloqueurs synthétisés connus à ce jour.

<sup>173</sup> (a) K.. I. Tanaka, S. Yoshifuji, Y. Nitta, *Chem. Phan. Bull*, **1986**, 34, 3879.

(b) M. R. Attwood, M. G. Cam, S. Jordan, *Tetrahedron Lett*, **1990**, 31, 283.

(c) J. Ezquerra, C. Pedregal, I. Mic, C. Nbjera, *Tetrahedron Asym*, **1994**, 5, 921.

<sup>174</sup> Y. S. Hon, Y. C. Chang, M. Gong, *Heterocycles*, **1990**, 31, 191.

<sup>175</sup> H. Brauner-Osborne, B. Nielsen, T. B. Stensbøl, T. N. Johansen, N. Skjærbæk, P. Krosggaard-Larsen, *European Journal of Pharmacology*, **1997**, 335, R1-R3.

<sup>176</sup> R. J. Bridges, M. P. Kavanaugh, R. Chamberlin, *Curr.Pharm. Des.* **1999**, 5, 363.

<sup>177</sup> C. S. Esslinger, S. Agarwal, J. Gerdes, P. A. Wilson, E. S. Davis, A. N. Awes, E. O'Brien, T. Mavencamp, H. P. Koch, D. J. Poulsen, J. F. Rhoderick, A. R. Chamberlin, M. P. Kavanaugh, R. Bridges, *J. Neuropharmacology*, **2005**, 49, 850-861.

<sup>178</sup> K. Shimamoto, B. Lebrun, Y. Yasuda-Kamatani, M. Sakaitani, Y. Shigeri, N. Yumoto, T. Nakajima, *Mol Pharmacol*, 1998, 53, 195-201.

<sup>179</sup> S. Mekki, S. Bellahouel, N. Vanthuyne, M. Rolland, A. Derdour, J. Martinez, V. Rolland, *Tetrahedron Asymmetry*, **2012**, 23, 94-99.

Les dérivés C3 et/ou C4 alkylés du glutamate sont aussi connu comme des bloqueurs d'EAAs. L'évaluation biologique de l'acide (2S, 3R)-3-méthyl glutamique a montré que ce dernier possède un effet inhibiteur important sur le transport du glutamate<sup>180</sup>.

Dans le prolongement de ces études nous avons décidé d'appliquer notre expertise dans les synthèses régio et stéréosélectives pour l'obtention de dérivés C4-alkylés et/ou arylés de la L-Théanine

Il est à noter qu'aucune alkylation directe de la Théanine, comme de la glutamine (Gln) n'a été décrite dans la littérature du fait essentiellement de leur instabilité.

Les premiers tests d'alkylation ont été effectués sur la Théanine protégée directement.

La réaction d'alkylation de la Théanine protégée par l'ester *tert*-butylique ou méthylique et par le groupement carboxybenzyle « Z » est réalisée en milieu basique hexaméthylidisilazane de lithium (LiHMDS) pour former l'énolate et du bromure de benzyle dans du THF anhydre. La réaction est effectuée dans un milieu très anhydre et sous atmosphère d'argon à une température de -78°C mais malheureusement aucun produit n'a été obtenu (schéma 42) et le produit de départ a été récupéré.

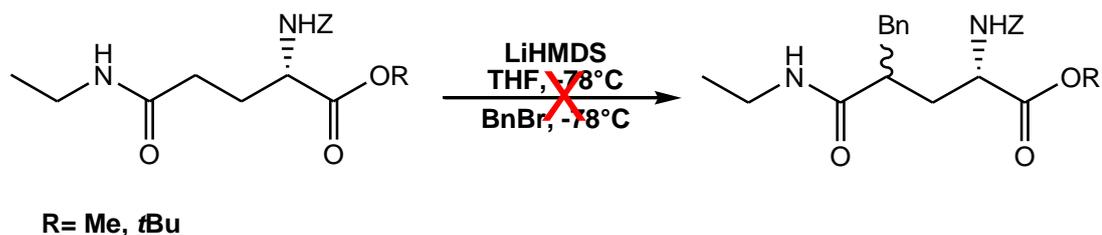


Schéma 42.

Avec une base plus forte diisopropylamidure de lithium (LDA), en changeant la température de la réaction (température ambiante) et en utilisant la Théanine méthyl ester, les réactions d'alkylations directes sont également infructueuses (schéma 43).

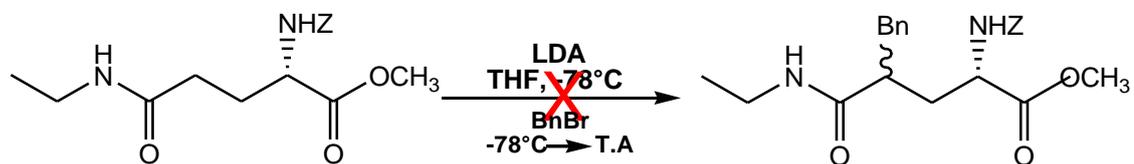


Schéma 43.

Clicours.COM

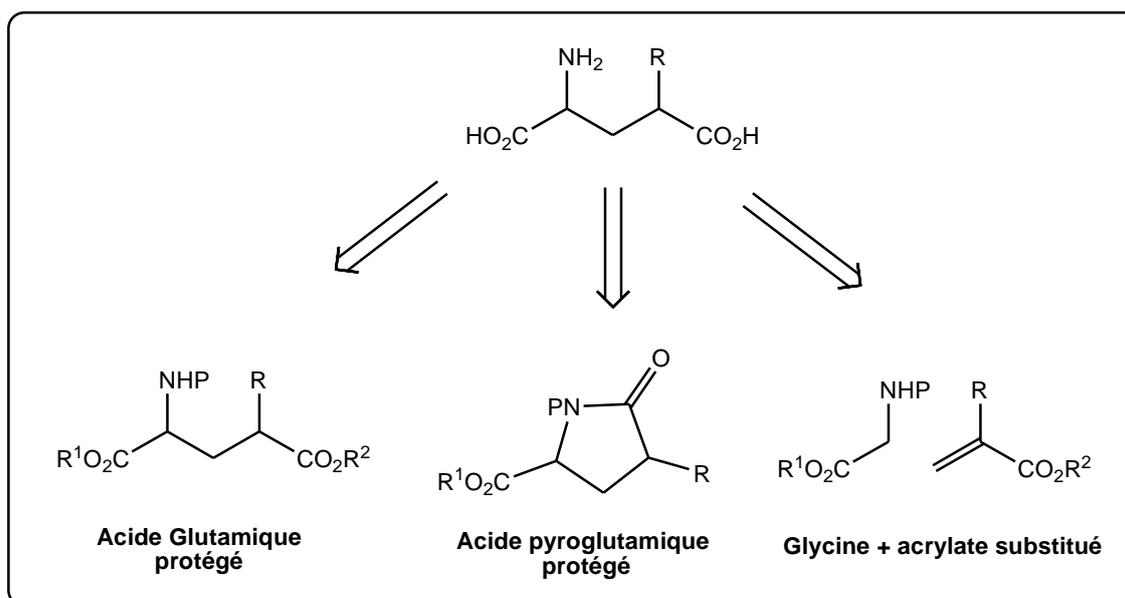
<sup>180</sup> J. Wehbe, T. Kassem, V. Rolland, M. Rolland, M. Tabcheh, M. L. Roumestant, J. Martinez, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 1938–1942.

Donc nous avons envisagé une autre voie de synthèse et notre choix s'est porté sur un autre synthon de départ : l'acide glutamique.

Avant d'exposer les différentes expériences effectuées, nous allons faire une brève étude bibliographique sur les synthèses des dérivés C-4 alkylés de l'acide glutamique décrites dans la littérature et notamment les synthèses développées au laboratoire.

### II. 5. 1/ Rappel bibliographique sur la synthèse des dérivés de l'acide glutamique $\gamma$ -substitué :

Dans un premier temps nous présentons un aperçu des principales méthodes de synthèse permettant la préparation stéréosélective des analogues du glutamate substitués en position 4. Les principales voies d'accès aux analogues du glutamate substitué en 4 sont ; l'alkylation directe du glutamate protégé, de son analogue cyclique l'acide pyroglutamique (H-Pyr-OH), ou bien la création de la liaison C2-C3 à partir de la glycine et de l'acrylate substitué (Figure II. 10).



**Fig II. 10** : Principales voies de synthèse chimique de dérivés 4-substitués de Glu.

#### II. 5. 1. a/ Synthèse à partir du glutamate :

Bosco et al<sup>181</sup>, ont synthétisé les 4-méthyl-Glu et 4-benzyl-Glu en partant de l'acide glutamique protégé et avec LiHMDS comme base forte (schéma 44). Les rendements ont été de l'ordre de 21% dans le cas du dérivé benzylé et de 28% dans le cas du dérivé méthylé.

<sup>181</sup> M. Del Bosco, A. N.C. Johnstone,; G. Bazza, S. Lopatriello, M. North, *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 8545-8554.

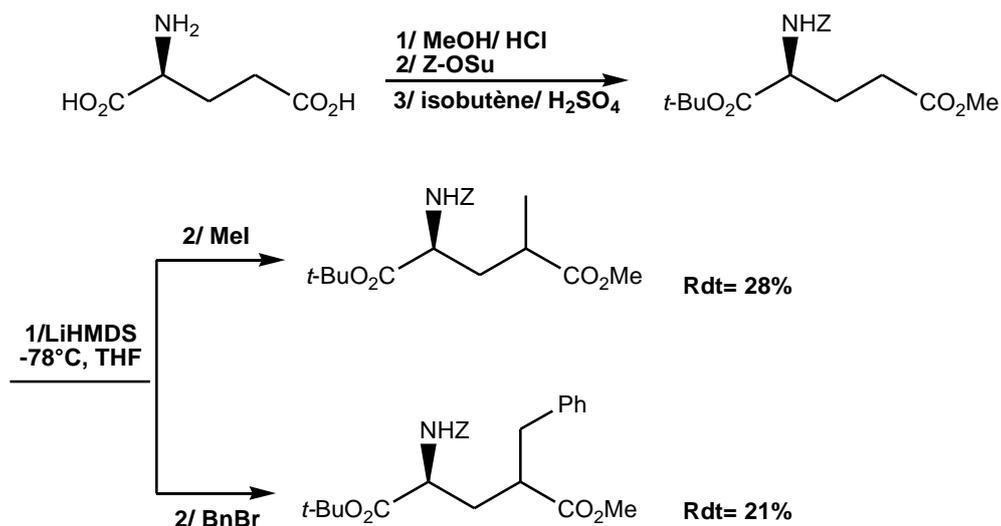


Schéma 44.

Gu et al, ont utilisé les esters « D » et « L » glutamates de méthyle ou d'éthyle protégés par un groupement p-nitrobenzyle sur leur fonction amine ; ces derniers ont été traités avec l'amidure de bis(triméthylsilyl) de lithium dans du THF et à  $-78^\circ\text{C}$ , puis avec des halogénures d'alkyles (schéma 45). Les produits *thréo*-4-substitués de l'acide glutamique sont obtenus avec des rendements moyens variant de 39% à 65% selon la nature de l'alkyle et avec une diastéréosélectivité très importante (de l'ordre de 99% dans le cas du méthyle)<sup>182</sup>.

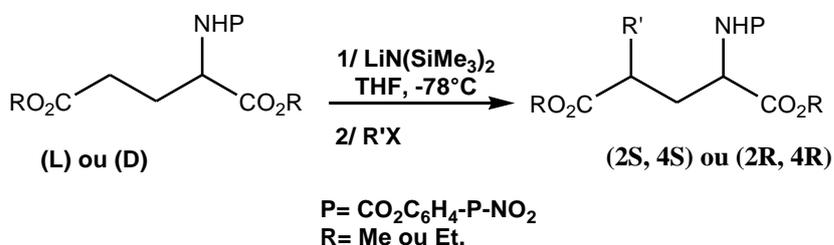


Schéma 45.

Les dérivés 4-allyl-Glu ont été synthétisés par alkylation des dérivés N-Z ou N-Boc du glutamate en présence de LiHMDS comme base forte et des halogénures d'allyle en tant qu'agents alkylants. La stéréosélectivité est élevée : les isomères *anti* ont été obtenus majoritairement (schéma 46)<sup>183</sup>.

<sup>182</sup> Z. Q. Gu, D. P. Hesson, *Tetrahedron Asym.*, **1995**, 6, 2101-2104.

<sup>183</sup> S. Hanessian, R. Margarita, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 5887-5890.

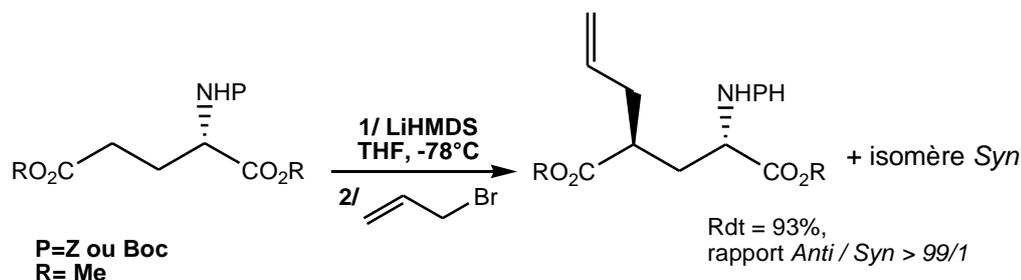


Schéma 46.

Auparavant Baldwin et al avaient obtenu une faible diastéréosélectivité pour la synthèse du dérivé de l'acide glutamique 4-hydroxyalkyl par une réaction d'aldolisation de l'acide glutamique protégé en présence d'isopropylcyclohexylamide de lithium (LiCA)<sup>184</sup> (schéma 47) avec une série d'aldéhydes. Les rendements varient entre 10% et 95% selon la nature de l'électrophile. Les auteurs ont réussi à séparer les diastéréoisomères.

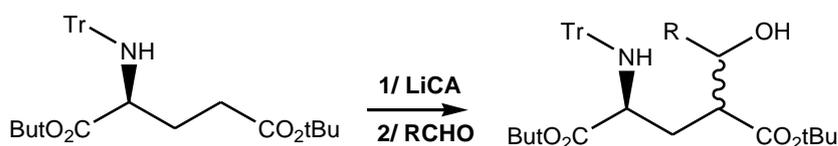


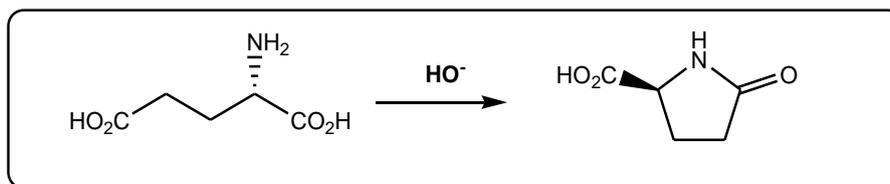
Schéma 47.

Pour une meilleure stéréosélectivité plusieurs facteurs entrent en jeu : il semblerait que l'amine dusse être préférentiellement protégée par des groupements encombrants tels que le 9-phénylfluorényl (Pf), le *p*-nitrobenzoyl ou des carbamates (Z, Boc). Dans les conditions fortement basiques, il faut éviter l'épimérisation du C-2 : la nature des groupements protecteurs est primordiale. La nature de la base influence aussi la stéréosélectivité de l'alkylation, une base plus encombrée et moins forte que le LDA comme KHMDS ou LiHMDS, semble préférable.

### II. 5. 1. b/ Synthèse à partir de l'acide pyroglutamique H-Pyr-OH:

L'acide pyroglutamique est l'analogue cyclique de l'acide glutamique. Ce dernier est obtenu suite à par une cyclisation de l'acide glutamique en milieu basique (Figure II. 11).

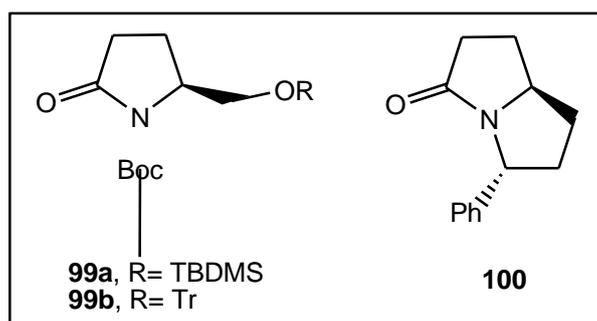
<sup>184</sup> J. E. Baldwin, M. North, A. Flinn, M. G. Moloney, *Tetrahedron*, **1989**, 45, 1453.



**Fig II. 11:** Formation de H-Pyr-OH.

Ainsi l'acide pyroglutamique est déjà protégé sur le N et sur le C en  $\gamma$ .

Il y a quelques années Katoh et al ont décrit la synthèse d'énolates de lactames à partir de formes diversement modifiés de l'acide pyroglutamique : la fonction carboxylique a été ensuite réduite en alcool, l'amine est également protégée par des carbamates encombrants **99a**, **b**<sup>185</sup>. D'autres auteurs décrivent des dérivés O-N-acétal **100**<sup>186</sup> (Figure II. 12). La stéréochimie du C2 est ainsi conservée et ce dernier peut ensuite assurer l'induction asymétrique pour une alkylation potentielle en C4.



**Fig II. 12.**

Ainsi la déprotonation du C4 des pyroglutamates protégées par (LDA) ou le (LiHMDS) dans le THF, suivie d'une réaction d'aldolisation permettent d'obtenir les dérivés de pyroglutamate substitués sur le C4, après une hydrolyse des groupements protecteurs en milieu acide (schéma 48)<sup>187</sup>.

<sup>185</sup> T. Katoh, Y. Nagata, Y. Kobayashi, R. Arai, J. Minami, S. Terashima, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 5743

<sup>186</sup> (a) D. Griffart-Brunet, N. Langlois, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 119.

(b) C. Herdeis, H. P. Hubmann, H. Lotter, *Tetrahedron Asym.* **1994**, 5, 119.

<sup>187</sup> J. E. Baldwin, T. Miranda, M. Moloney, T. Hokelek, *Tetrahedron*, **1989**, 45, 7459.

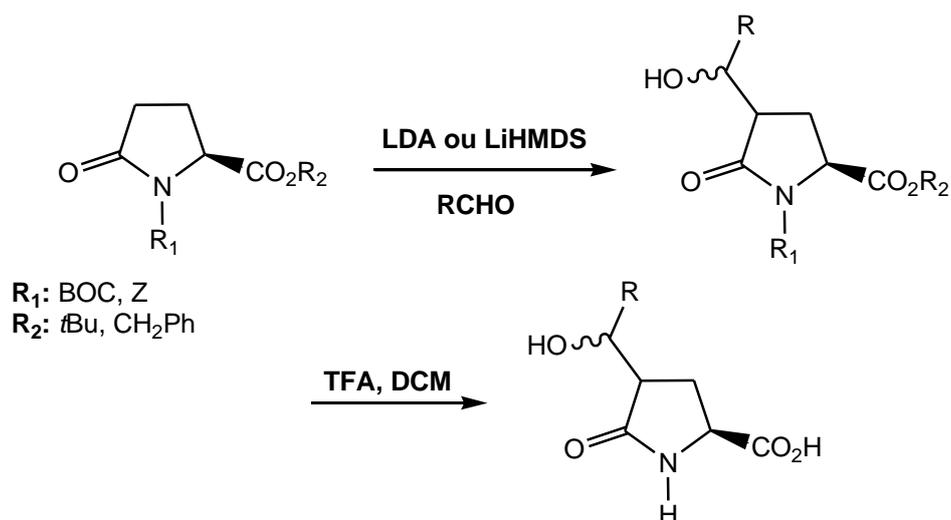
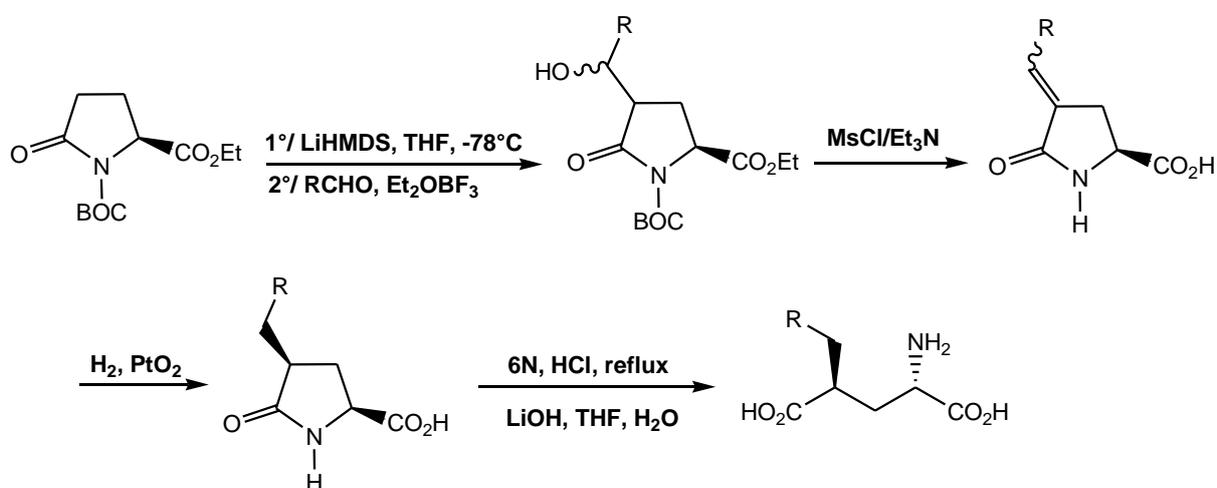


Schéma 48.

Une série de composés 4-alkylidène ayant la configuration (2*S*, 4*R*) a ainsi pu être préparée par une déshydratation sélective et quantitative d'un mélange racémique de produits d'aldolisation, ces derniers ont été obtenus avec d'excellents rendements (Les valeurs exactes ne sont pas données) sous forme de mélange racémique (schéma 49)<sup>188</sup>

Schéma 49: Synthèse de dérivés (2*S*, 4*R*)-4-alkyl-Glu.

Moody et al,<sup>189</sup> ont décrit une méthode de synthèse de dérivés 4-alkylés de l'acide glutamique optiquement purs. La réaction du (*S*, *E*)-di-*tert*-butyl 4-ethylidène-5-oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylate avec un organomagnésien suivie d'une réduction permet

<sup>188</sup> A. Escribano, J. Ezquerro, C. Pedregal, A. Rubio, B. Yruretagoyena, S. R. Baker, R. A. Wright, G. B. Johnson, D. D. Schoepp, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, 8, 765-770.

<sup>189</sup> C. M. Moody, D. W. Young, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 3519-3530.

d'accéder à une série de 4-alkyl-Glu de configuration (2S, 4S). La configuration a été confirmée par analyse spectroscopique RMN (NOEs) (schéma 50).

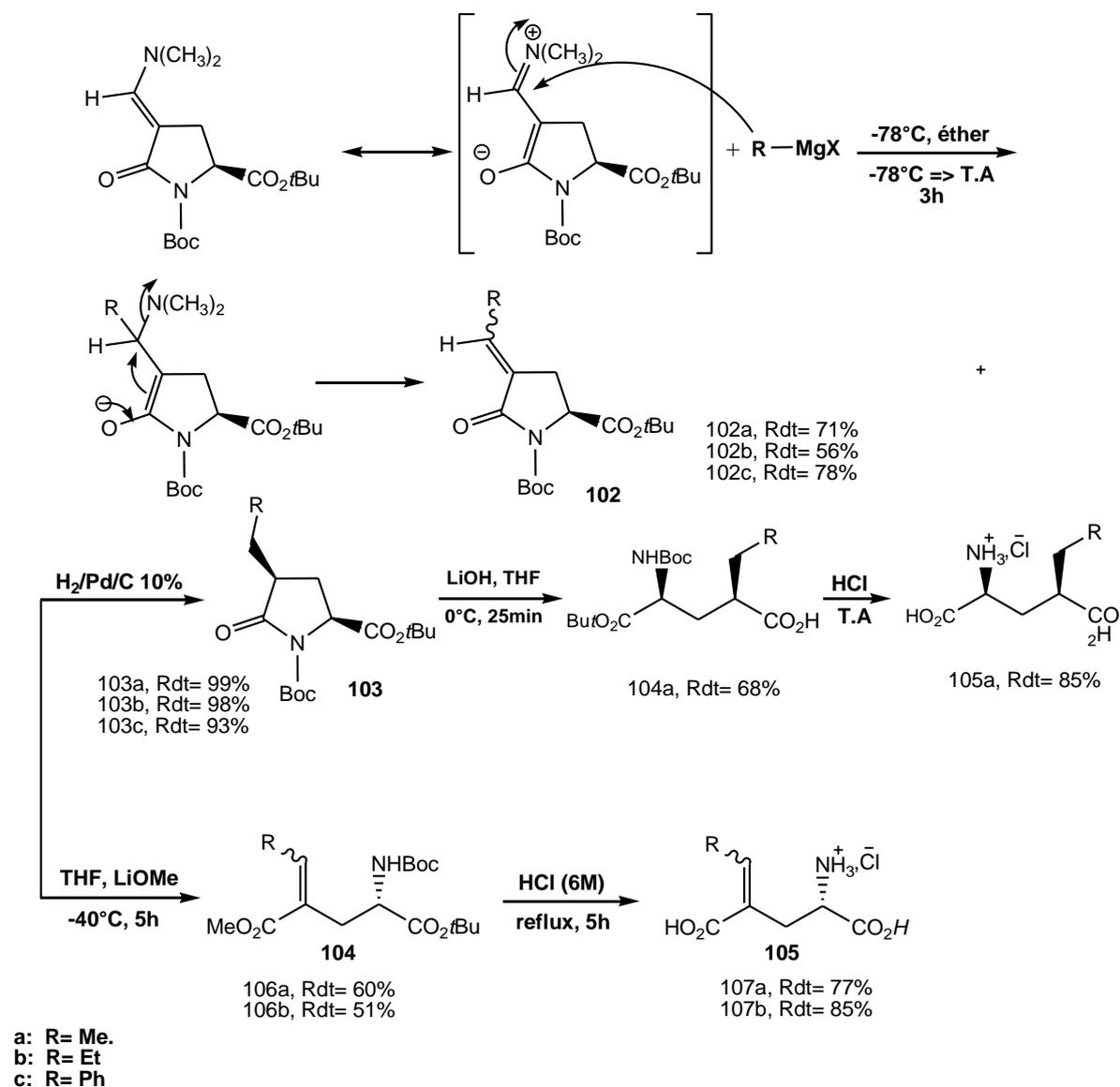


Schéma 50.

En résumé, le lactame de l'acide pyroglutamique est généralement protégé par un Boc, le carboxylate peut être protégé sous forme d'un ester méthylique, benzylique ou *tert*-butylique. La présence de ces groupements favorise la substitution en position 4 sur la face la moins encombrée. Ainsi le dérivé *trans* est obtenu majoritairement et mène, après l'hydrolyse, à l'analogue du Glu de configuration absolue (2S, 4R). Il faut noter que seuls des électrophiles actifs (mou) ont été utilisés pour l'alkylation directe soit de Glu soit de Pyr.

### II. 5. 1. c/ Synthèse à partir de glycine (Formation de la liaison C<sup>2</sup>- C<sup>3</sup>) :

La condensation de la glycine protégée (Gly) sur un acrylate substitué a permis d'accéder à des analogues de Glu substitués en position 3 (schéma51)<sup>190 191</sup>.

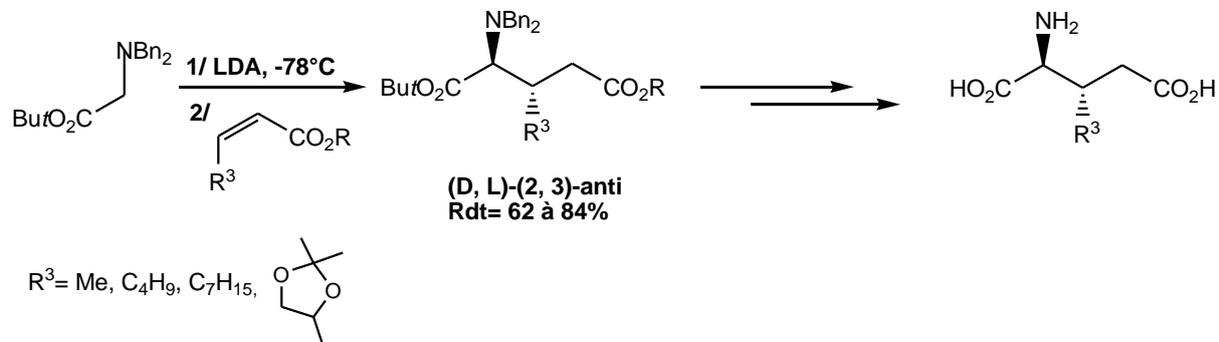


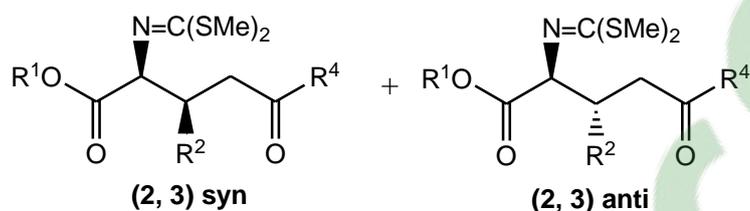
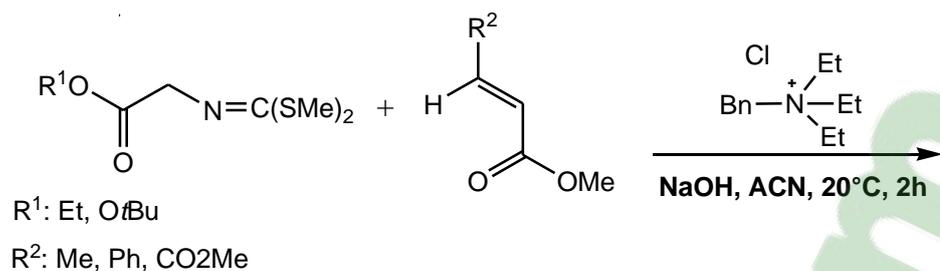
Schéma 51.

La glycine activée sous forme d'imine a aussi été utilisée en tant que réactif pour la synthèse d'analogues du Glu (schéma 52)<sup>192</sup>. Ces réactions ont été réalisées en présence de chlorure de benzyltriéthylammonium et de NaOH, la sélectivité était plus au moins importante et les différents diastéréoisomères sont séparés par chromatographie sur colonne de gel de silice.

<sup>190</sup> M. Yamaguchi, K. Torisu, T. Minami, *Chem. Lett.*, **1990**, 19, 377-380.

<sup>191</sup> M. Nomura, S. Hashimoto, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 143-146.

<sup>192</sup> C. Alvarez-Ibarra, A. G. Csaky, M. Moroto, M. L. Quiroga, *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 6700.



$R^1$ =Et, 108 a: $R^2$ = Me	Rdt= 50% (anti:syn=100:0)
108 b: $R^2$ = Ph	Rdt= 95% (anti:syn=90:10)
108 c: $R^2$ = CO <sub>2</sub> Me	Rdt= 85% (anti:syn=80:20)
$R^1$ = <i>t</i> Bu, 109 a: $R^2$ = Me	Rdt= 90% (anti:syn=100:0)
109 b: $R^2$ = Ph	Rdt= 85% (anti:syn=95:5)
109 c: $R^2$ = CO <sub>2</sub> Me	Rdt= 85% (anti:syn=85:15)

Schéma 52.

Récemment, d'autres stratégies ont été mises en point par notre équipe afin d'accéder aux dérivés 3 ou 4-alkyl glutamates optiquement purs. Wehbe et al.<sup>193, 194</sup>, ont utilisé l'inducteur chiral 2-hydroxypinane-3-one. La diastéréosélectivité de cette réaction est cependant très faible car l'approche de l'acrylate peut se faire suivant ses deux faces, par contre la sélectivité de l'énolate est relativement bonne et permet un bon contrôle de la configuration du carbone 2 (schéma 53). Les deux diastéréoisomères (**110** et **111**) sont obtenus avec un rendement de 75% avec un rapport diastéréoisomérique de 56 :44 déterminé par l'HPLC analytique, et sont facilement séparés par chromatographie sur colonne de gel de silice.

<sup>193</sup> J. Wehbe, V. Rolland, M.L. Roumestant, J. Martinez, *Tetrahedron: Asym*, **2003**, *14*, 1123-1126.

<sup>194</sup> J. Wehbe, V. Rolland, A. Fruchier, M.L. Roumestant, J. Martinez, *Tetrahedron: Asym*, **2004**, *15*, 851-858.

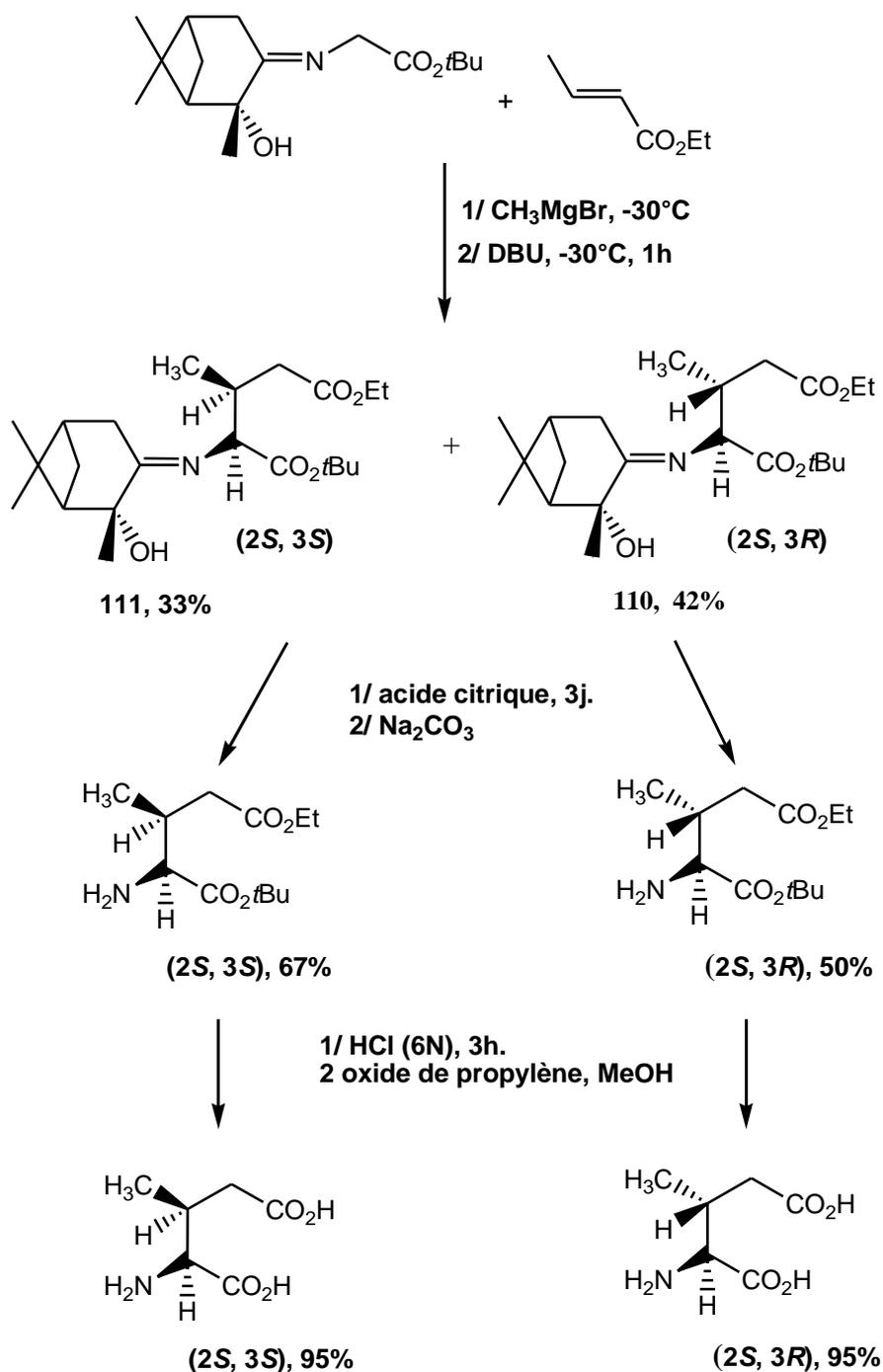


Schéma 53.

D'autres méthodes au caractère moins général ont été développées pour accéder à des analogues de l'acide glutamique telles que les méthodes chimio-enzymatiques qui permettent de préparer d'analogues du glutamique avec une stéréosélectivité importante. Cette méthode est basée sur l'utilisation de l'aspartate aminotransférase (AAT) pour la conversion

stéréosélective d'acides céto-glutariques (KG) substitués facilement préparés par synthèse chimique en analogues de l'acide glutamique substitués (schéma 54)<sup>195 196 197</sup>.

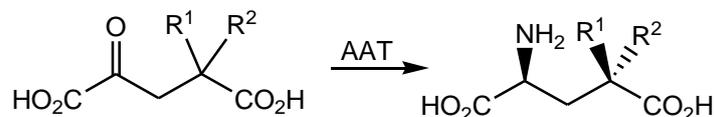


Schéma 54.

L'AAT est une enzyme de large utilisation permettant la préparation d'une variété d'analogues de l'acide glutamique 4-substitué tels que les deux isomères L-4-hydroxy-Glu<sup>198</sup>, le L-2,4-syn-4-alkyl-Glu<sup>199</sup>. Malheureusement, l'AAT est inactive vis à vis des dérivés substitués en position 3, à l'exception de l'analogue 3-méthyl-Glu.

En 2007, une aminotransférase spécifique des acides aminés « branchés » (Leucine, Isoleucine... etc ) a été utilisée pour synthétiser plusieurs dérivés de l'acide glutamique substitués en position 3 et 4 par une transamination des dérivés de l'acide céto-glutarique correspondant (schéma 55)<sup>200</sup>. Les rendements varient de 59% à 98% et avec une sélectivité plus élevée que celle obtenue avec l'enzyme AAT.

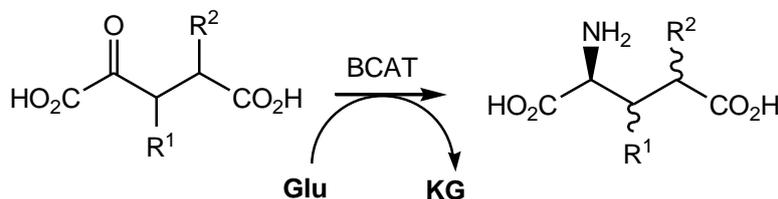


Schéma 55.

La synthèse des dérivés 3-et/ou 4-substitué de l'acide glutamique décrite dans la littérature donne généralement des mélanges de diastéréoisomères; ces isomères sont séparés dans quelque cas par des HPLC chirales et dans d'autre cas les chercheurs ont réussi uniquement à déterminer les pourcentages de chacun d'entre eux par RMN du 1H ou par l'HPLC analytique.

<sup>195</sup> V. Helaine, J. Rossi, T. Gefflaut, S. Alaux, J. Bolte, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, 343, 692-697.

<sup>196</sup> X. Gu, M. Xian, S. Roy-Faure, J. Bolte, D. J. Aitken, T. Gefflaut, *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 193-196.

<sup>197</sup> S. Faure, A. A. Jensen, V. Maurat, X. Gu, E. Sagot, D. J. Aitken, J. Bolte, T. Gefflaut, L. Bunch, *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 6532-6538.

<sup>198</sup> N. Passerat, J. Bolte, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 1277-1280.

<sup>199</sup> S. Alaux, M. Kusk, E. Sagot, J. Bolte, A. A. Jensen, H. Brauner-Osborne, T. Gefflaut, L. Bunch, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 7980-7992.

<sup>200</sup> M. Xian, S. Alaux, E. Sagot, T. Gefflaut, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 7560-7566.

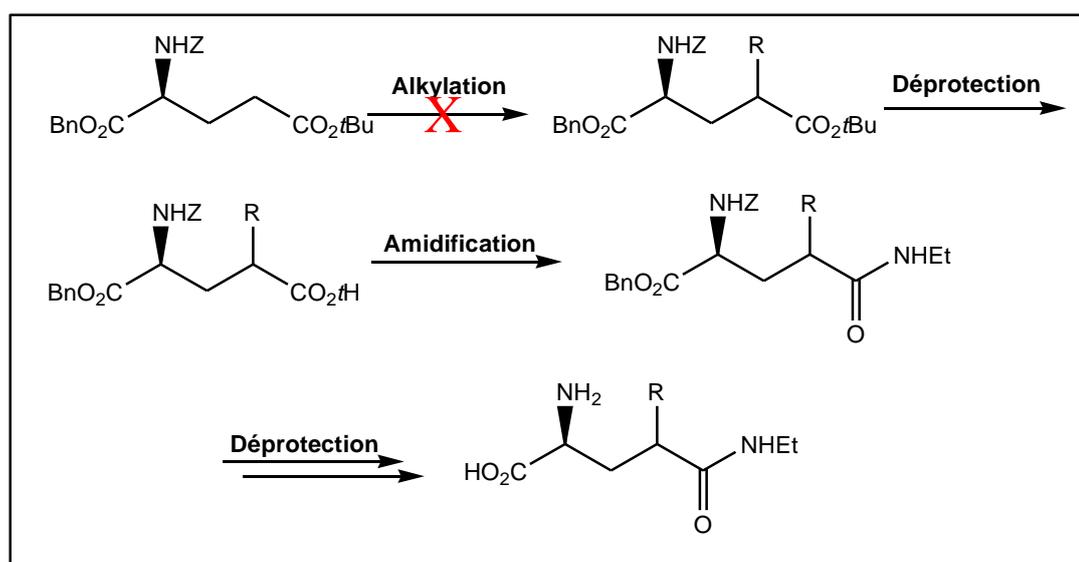
## II. 5. 2/ Stratégies synthétiques pour accéder aux dérivés de la L-Théanine substitués en position 4 :

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent de nombreux travaux ont été développés pour la synthèse d'analogues de l'acide glutamique.

Pour diminuer au maximum le nombre d'étapes et obtenir une stéréosélectivité optimale nous avons pris comme manipulation de référence la publication de Bosco et al<sup>32</sup>. Le synthon de départ pour préparer les dérivés cibles optiquement purs est l'acide glutamique protégé Z-Glu-(OtBu)-OBn.

L'étape clé est l'étape d'alkylation ; s'en suit l'hydrolyse en milieu acide de l'ester *tert*-butylique de la position carboxylique en  $\gamma$ , afin de pouvoir procéder ensuite à l'étape d'amidification en milieu basique tout en conservant les groupements protecteurs. L'étape finale est l'hydrolyse de ces groupes protecteurs. Alors que Bosco et al<sup>32</sup> décrivait la synthèse des dérivés de l'acide glutamique substitués en position 4, la réaction d'alkylation de l'énolate de lithium de (*S*) Z-Glu(OMe)-OtBu avec l'iodure de méthyle a conduit à deux diastéréoisomères avec un rapport de 3 :1 et un rendement total de 21%. Cependant un seul diastéréoisomère est obtenu dans le cas d'alkylation avec un bromure de benzyle mais avec un rendement faible de 28%.

Tous les essais d'alkylation que nous avons effectués ont été infructueux et le produit de départ (*S*) Z-Glu-(OtBu)-OBn fut récupéré dans sa totalité (Figure II. 13).



**FigII. 13:** Stratégie de synthèse de la Théanine alkylée à partir de l'acide glutamique protégé

Cette réaction d'alkylation du (*S*) Z-Glu-(*O*tBu)-OBn s'est effectuée en milieu basique notre premier choix s'est porté sur le LiHMDS comme base et le THF comme solvant. L'énolate de lithium généré est mis en réaction avec le bromure de benzyle. Les changements de paramètres tels que la nature de la base, la température ou encore l'agent alkylant (iodure de méthyle) moins encombré ne nous ont pas permis d'alkyler le dérivé du Glu en C4 (schéma 56).

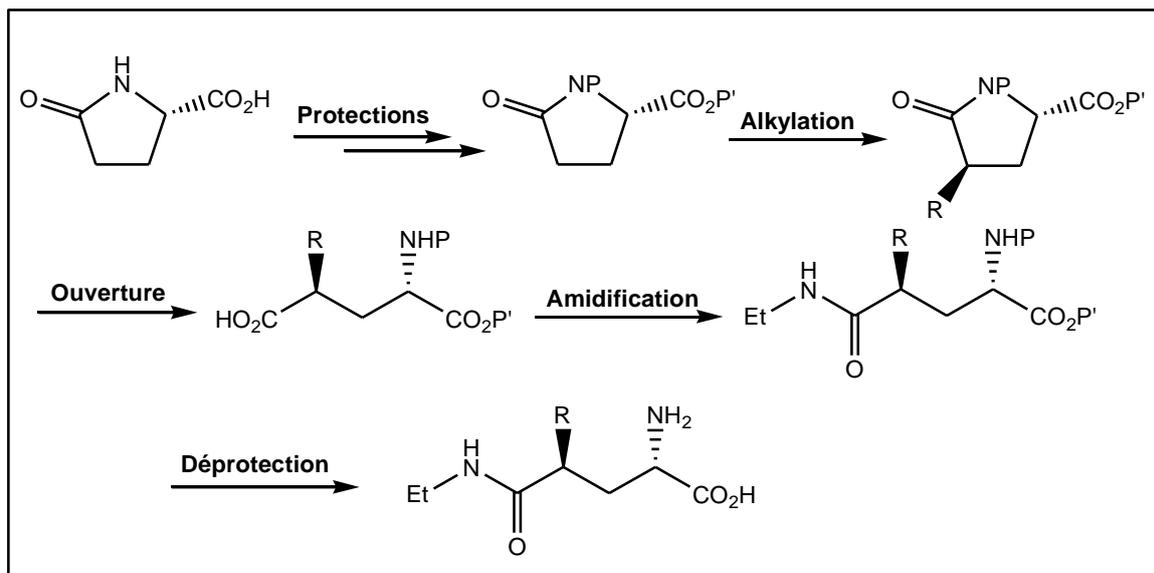


Schéma 56.

Nous avons expliqué cet échec de l'alkylation par la taille volumineuse de l'électrophile et la flexibilité de la liaison C3-C4. Même en changeant l'agent alkylant par l'iodure de méthyle ou en utilisant une base plus forte telle que le LDA, aucune méthylation n'a été observée.

### II. 5. 2. 1/ A partir de l'acide pyroglutamique optiquement pur:

Devant cette succession d'échecs, nous avons alors envisagé l'utilisation de l'acide L-pyroglutamique, précurseur beaucoup plus contraint que l'acide glutamique. La stratégie adoptée comporte 5 étapes. Dans la première étape, l'acide (*S*)-pyroglutamique commercial correctement protégé subit une alkylation avec différents agents alkylants. Le pyroglutamate substitué subit ensuite une ouverture du cycle lactame puis une réaction d'amidification. La dernière étape de cette stratégie est une hydrolyse des différents groupements protecteurs pour obtenir les différents dérivés substitués en position 4 de la L-Théanine (Figure II. 14).



**Fig II. 14:** Stratégie de synthèse des dérivés C4-substitués de la L-Théanine.

### II. 5. 2. 1. a/ Protection de l'acide L-pyroglutamique :

Le choix des groupements protecteurs est très important, l'ester *tert*-butylique est le *tert*-butoxycarbonyle (Boc) sont facilement hydrolysables en milieu acide doux, libérant la fonction carboxylique et la fonction amine à la fin de la synthèse sans contamination du produit d'arrivée et sont stables dans les conditions basiques.

L'ester *tert*-butylique a donc été choisi afin de faciliter la suite de la synthèse, l'ester benzyle ou méthylique étant moins stables dans les conditions alcalines.

Tous d'abord, nous avons protégé l'acide pyroglutamique (acide 2-carboxylique-5-oxopyrrolidine) par un excès de  $\text{Boc}_2\text{O}$ . Le suivi de cette réaction par HPLC et LC/MS nous a montré la formation d'un mélange de produits : N-protégé (**112**) (Boc-Pyr-OH), C-protégé (**113**) H-Pyr-O*t*Bu et le (**114**) (Boc-Pyr-O*t*Bu) (schéma 57), la séparation de ces trois produits est un peu difficile est peut s'effectuer uniquement par colonne de gel de silice.

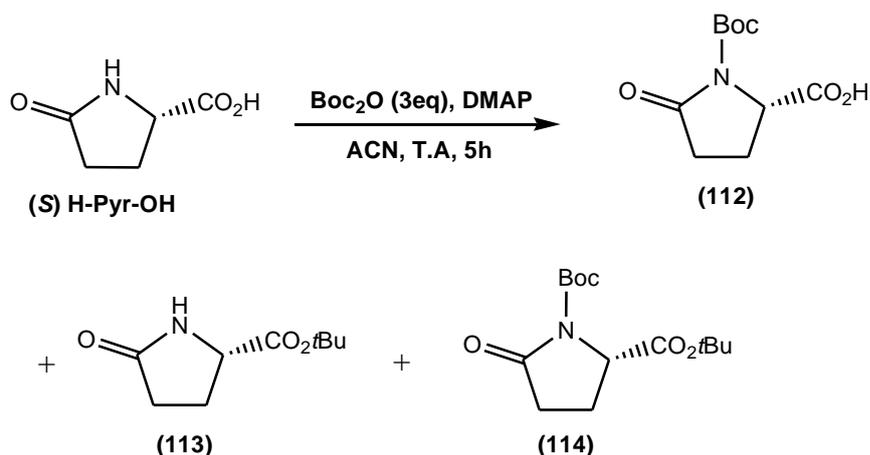


Schéma 57.

Afin d'augmenter le rendement en composé **114**, nous avons décidé de procéder en plusieurs étapes chacune étant quasiment quantitative.

La fonction acide est protégée temporairement sous forme d'ester benzyle.

Cette réaction d'estérification de l'acide (*S*) pyroglutamique en ester benzyle est effectuée avec le chlorure de benzyle en présence d'un excès de triéthylamine TEA dans le toluène à 60°C pendant 4 heures. Le (*S*) pyroglutamate de benzyle (**115**) est obtenu avec un rendement de 85% après des lavages acido-basiques. La protection de la fonction amine secondaire du composé **101** par un groupement Boc est réalisée en présence de dicarbonate de di-*tert*-butyle  $\text{Boc}_2\text{O}$  et une quantité catalytique de 4-diméthylaminopyridine DMAP dans de l'acétonitrile et conduit au produit désiré (*S*) Boc-Pyr-OBn (**116**) avec un très bon rendement de 98% après des lavages acido-basiques suivis d'une filtration sur gel de silice (schéma 58).

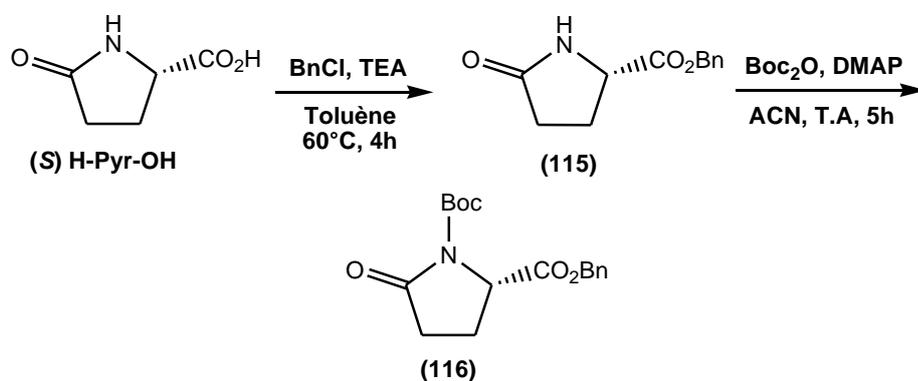


Schéma 58.

L'ester benzylique est alors hydrolysé par hydrogénolyse  $H_2/Pd/C$  dans l'acétate d'éthyle ; le produit (*S*) Boc-Pyr-OH (**117**) est obtenu avec un rendement quantitatif. Ce dernier subit une réaction de protection de la fonction carboxylique par un ester *tert*-butylique en présence d'un excès de dicarbonate de di-*tert*-butyle (3eq) et une quantité catalytique de DMAP dans l'acétonitrile et sous argon à température ambiante. Le composé (*S*) Boc-Pyr-*Or*Bu (**118**) est obtenu avec un rendement de l'ordre de 91% après une purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant :  $EtO_2/AcOEt$  ; 8/2) (schéma 59).

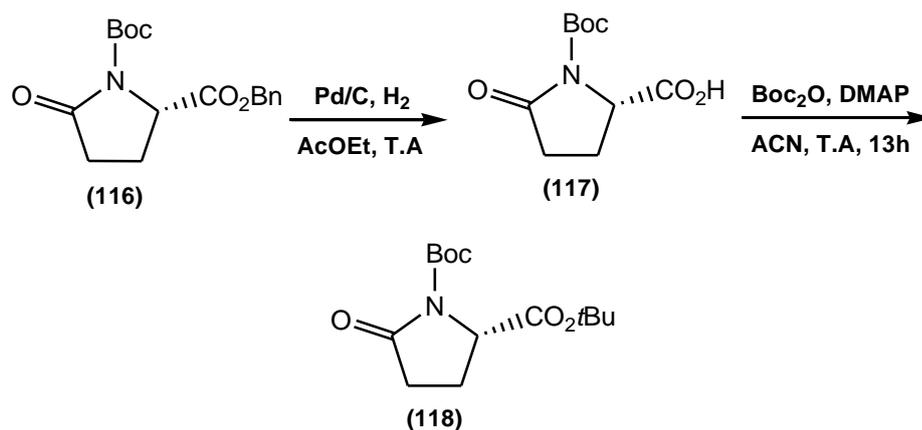


Schéma 59.

Le produit (*S*)-1,2-di-*tert*-butylloxycarbonyl pyrrolidin-5-one, **118** est obtenu avec un rendement global de 90%.

### II. 5. 2. 1. b/ Réaction d'alkylation du (*S*)-1,2-di-*tert*-butylloxycarbonyl pyrrolidin-5-one (**118**) :

Au cours de cette réaction d'alkylation, étape clé de la stratégie, la base utilisée est le Bis (triméthylsilyl) amidure de lithium ou l'hexaméthylidisilazane de lithium ( $LiHMDS$ ), l'encombrement de cette base fait qu'elle ne réagit jamais en nucléophile mais toujours en tant que base avec les hydrogènes labiles. Cette déprotonation s'effectue selon un état de transition comportant un cycle à six chaînons (**119**) relativement stable (schéma 60).

Ainsi la régiosélectivité totale de la réaction d'alkylation sur le C4 est expliquée par l'encombrement du chélate de Li et de l'inaccessibilité de l'H sur le C2 (à cause de la position des groupements protecteurs et de la contrainte stérique du cycle lactame).

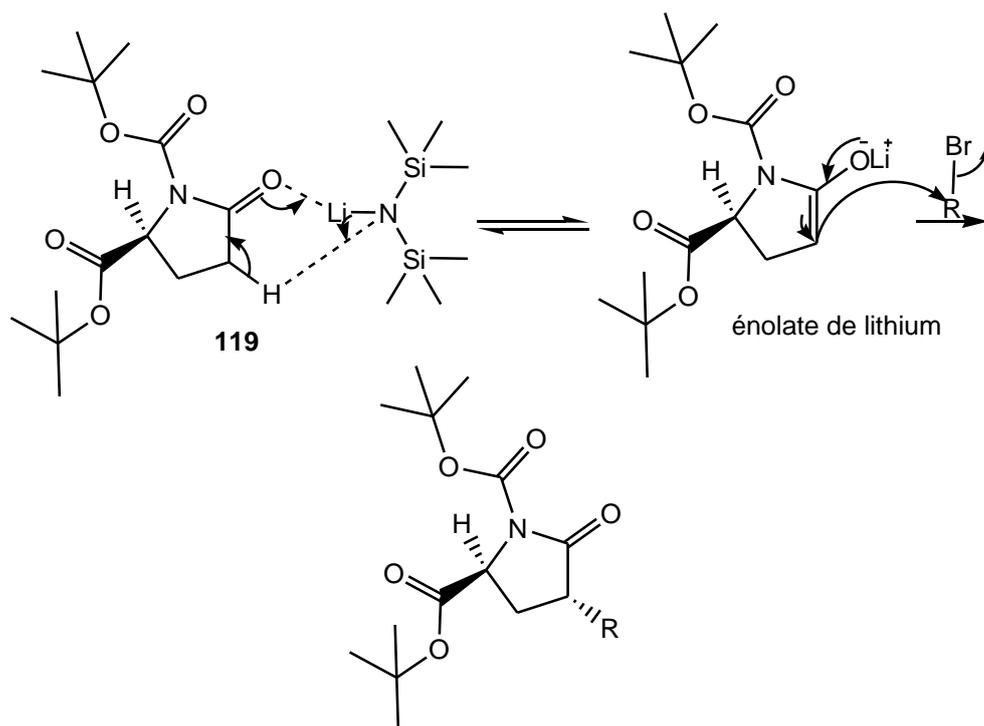


Schéma 60.

Kim et al<sup>201</sup>, ont trouvé que l'utilisation de ce type de base (amidure de lithium) dans le THF comme solvant à basse température permet la formation d'agrégats de lithium. L'ajout de l'hexaméthylphosphoramide HMPA au mélange réactionnel inhibe la formation de ces agrégats et améliore la stéréosélectivité de la réaction d'alkylation. Mekki et al<sup>202</sup>, très récemment ont confirmé la pertinence de l'utilisation de l'HMPA ou l'HMPT dans ces réactions d'alkylation.

Suite à sa formation (1h), la substitution de l'énolate du (S)-1,2-di-*tert*-butyloxycarbonyl pyrrolidin-5-one (**118**) sur différents dérivés de bromure de benzyle est effectuée à -78°C. Après traitement du mélange réactionnel, l'analyse du brut par HPLC et LC/MS nous a prouvé la formation des produits attendus. L'analyse spectroscopique par RMN du <sup>1</sup>H du produit après sa purification sur colonne de gel de silice nous a permis de confirmer l'obtention d'un seul diastéréoisomère. Le rendement de cette réaction est de l'ordre de 58%, le produit de départ est en partie récupéré et peut faire l'objet d'une nouvelle alkylation. Ce rendement est bien meilleur que celui obtenu par Bosco et al selon la stratégie précédemment décrite.

<sup>201</sup> Y. J. Kim, A. Streitwieser, *Org Lett*, **2002**, 4, 573-575.

<sup>202</sup> S. Mekki, S. Bellahouel, N. Vanthuyne, M. Rolland, A. Derdour, J. Martinez, V. Rolland, *Tetrahedron Asym.*, **2012**, 23, 94-99.

Nous constatons que cette étape clé est régio et stéréosélective : un seul diastéréoisomère est obtenu avec des rendements satisfaisants (schéma 61).

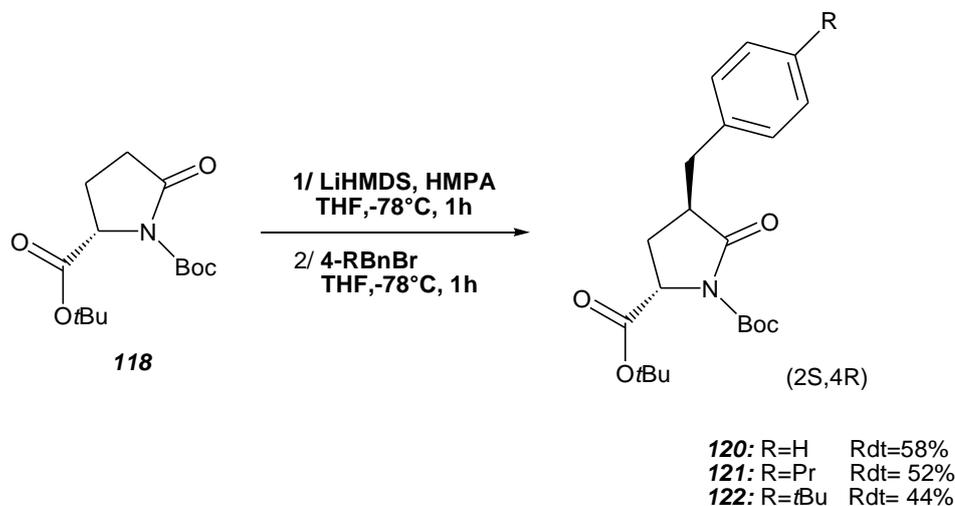
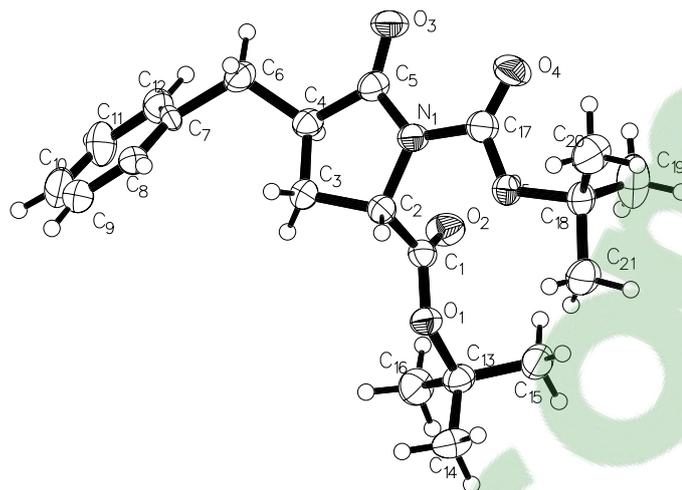


Schéma 61.

La seule méthode d'analyse qui pouvait confirmer cette régio et stéréosélectivité était l'analyse par diffraction des RX.

A cette étape de notre travail, il était indispensable pour confirmer la configuration absolue du C-4 d'entreprendre des essais de cristallisation avec les composés **120**, **121** et **122** afin d'effectuer une analyse par diffraction des RX. Cette étape de recristallisation a été très laborieuse et seul le composé **120** a pu recristalliser dans un mélange de solvant (AcOEt/CHX) et la persévérance a payé. Les analyses de diffraction des RX ont été réalisées par notre collaborateur cristallographe M. Rolland. La stéréochimie de tous les centres asymétriques présents sur la molécule a ainsi pu être donnée avec certitude en se basant sur la stéréochimie connue pour le carbone C-2 du composé **120** (Figure II. 15).



**Fig II. 15.** Vue Ortep du composé **120** (2S, 4R)<sup>203</sup>.

La régiosélectivité et la configuration (2S, 4R) du composé **120** ont été ainsi confirmées par l'analyse par diffraction des rayons X corrélée à l'analyse RMN à 600 MHz du produit recristallisé.

Une étude plus approfondie et comparative de spectre obtenu par RMN du <sup>1</sup>H à 600 MHz du composé **120** et avec la RMN de composés similaires (**123** et **124**) décrits dans la littérature est détaillée dans les tableaux suivants<sup>204</sup>.

Le point sur lequel on base notre étude comparative est la présence ou l'absence de couplage entre le H-2 et le H-4. Dans le cas du produit **124** où les deux hydrogènes se trouvent du même côté du cycle (cis), la valeur du couplage allylique est très faible < 0.5 Hz (tableau 16) au contraire dans le cas où les deux hydrogènes se trouvent en trans l'un par rapport à l'autre, ce couplage allylique n'est pas observé (cas des composés **120** et **123**) (Figure II. 16).

<sup>203</sup> F. Sebih, S. Bellahouel, M. Rolland, A. Derdour, J. Martinez, V. Rolland, *Tetrahedron Asym*, **2014**, 25, 690-696.

<sup>204</sup> J. Wehbe, V. Rolland, A. Fruchier, M. L. Roumestant, J. Martinez. *Tetrahedron: Asym*, **2004**, 15, 851-858.

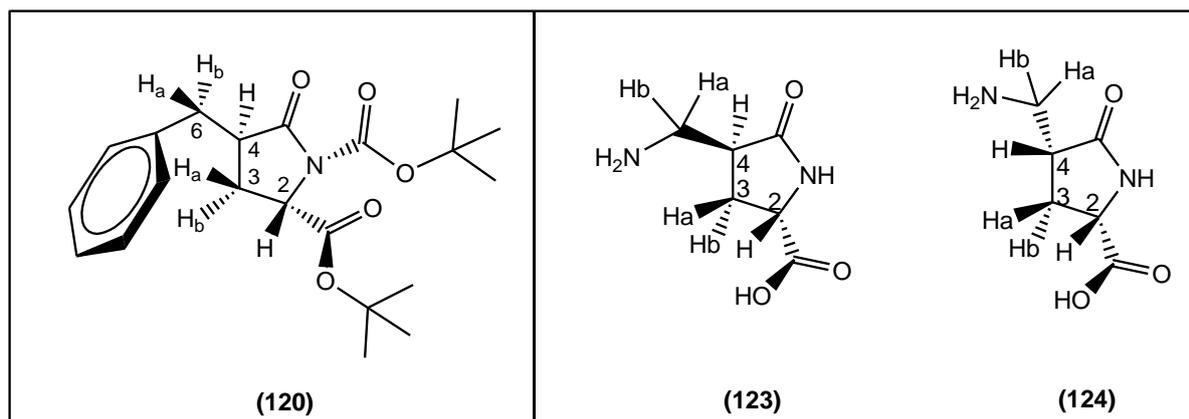


Fig II. 16. La régio et la stéréosélectivité des produits 120, 123, 124.

	ppm (CDCl <sub>3</sub> )	ppm (CD <sub>3</sub> OD)		Constante de couplage (Hz)	120	123 <sup>204</sup>	124 <sup>204</sup>
	120	123 <sup>204</sup>	124 <sup>204</sup>				
δ (H <sub>2</sub> )	4.27	4.257	4.343	<sup>3</sup> J (H <sub>2</sub> -H <sub>3a</sub> )	2.1	1.7	8.3
δ (H <sub>3a</sub> )	2.01	2.282	2.783	<sup>3</sup> J (H <sub>2</sub> -H <sub>3b</sub> )	9.2	9.5	7.7
δ (H <sub>3b</sub> )	1.96	2.534	1.918	<sup>4</sup> J (H <sub>2</sub> -H <sub>4</sub> )	-	-	<0.5
				<sup>2</sup> J (H <sub>3a</sub> -H <sub>3b</sub> )	13.2	13.3	12.9
δ (H <sub>4</sub> )	2.91	2.872	2.897	<sup>3</sup> J (H <sub>3a</sub> -H <sub>4</sub> )	11.2	10.5	8.6
				<sup>3</sup> J (H <sub>3b</sub> -H <sub>4</sub> )	8.9	8.6	9.5
δ (H <sub>6a</sub> )	3.26	3.233	3.244	<sup>3</sup> J (H <sub>4</sub> -H <sub>6a</sub> )	9,3	8.3	8.1
δ (H <sub>6b</sub> )	2.68	3.135	3.143	<sup>3</sup> J (H <sub>4</sub> -H <sub>6b</sub> )	4.3	6.9	6.9
				<sup>2</sup> J (H <sub>6a</sub> -H <sub>6b</sub> )	14	12.9	12.8

Tableau 16. Les déplacements chimiques (ppm / TMS) et les constantes de couplage (Hz) du composé 120 (2S, 4R) comparés à ceux de 123 et 124<sup>204</sup>.

Après de nombreux essais infructueux de recristallisation des composés **121** et **122**, leur analyse RMN à 600 MHz a été corrélée à celle du composé **120** (tableau 17). Nous avons pu ainsi déduire que les composés **121** et **122** étaient eux aussi de configuration (2S, 4R) (Figure II. 17).

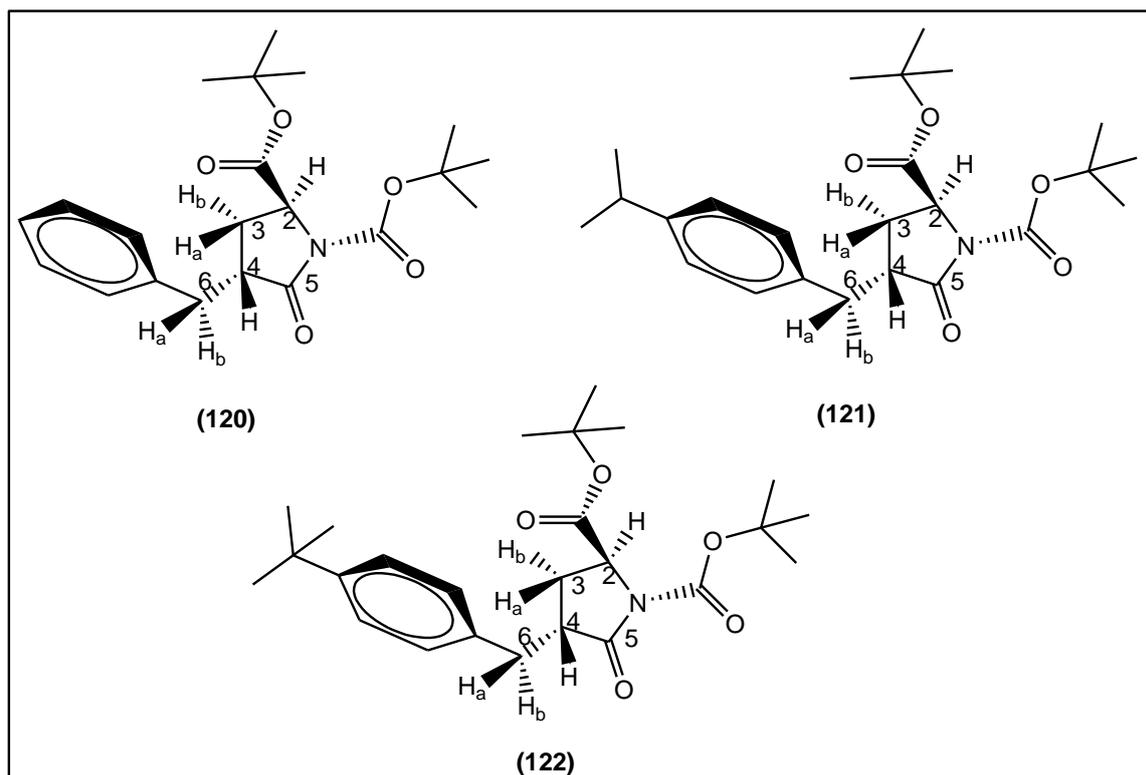


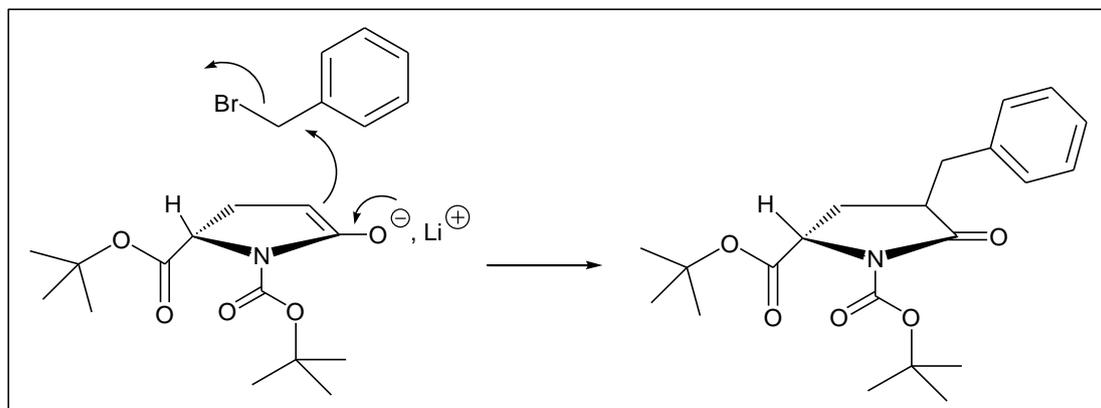
Fig II. 17. La structure des composés 120, 121 et 122.

	ppm (CDCl <sub>3</sub> )			Constante de couplage (Hz)	120	121	122
	120	121	122				
$\delta$ (H <sub>2</sub> )	4.27	4.34	4.34	<sup>3</sup> J (H <sub>2</sub> -H <sub>3a</sub> )	2.1	2.1	2.1
$\delta$ (H <sub>3a</sub> )	2.01	2.03	2.04	<sup>3</sup> J (H <sub>2</sub> -H <sub>3b</sub> )	9.2	9.3	9.4
$\delta$ (H <sub>3b</sub> )	1.96	1.97	1.98	<sup>4</sup> J (H <sub>2</sub> -H <sub>4</sub> )	-	-	-
				<sup>2</sup> J (H <sub>3a</sub> -H <sub>3b</sub> )	13.2	13.3	13.3
$\delta$ (H <sub>4</sub> )	2.91	2.87	2.9	<sup>3</sup> J (H <sub>3a</sub> -H <sub>4</sub> )	11.2	11.1	11.1
				<sup>3</sup> J (H <sub>3b</sub> -H <sub>4</sub> )	8.9	8.8	8.8
$\delta$ (H <sub>6a</sub> )	3.26	3.22	3.22	<sup>3</sup> J (H <sub>4</sub> -H <sub>6a</sub> )	9.3	9.4	9.1
$\delta$ (H <sub>6b</sub> )	2.68	2.65	2.65	<sup>3</sup> J (H <sub>4</sub> -H <sub>6b</sub> )	4.3	4.3	4.3
				<sup>2</sup> J (H <sub>6a</sub> -H <sub>6b</sub> )	14.0	14.0	14.2

**Tableau 17 :** Les déplacements chimiques (ppm / TMS) et les constantes de couplage (Hz) des composés 121 et 122 (2S, 4R) comparés à ceux du composé 120.

Les trois facteurs majeurs, hors la nature de la base, peuvent ici expliquer l'excellente diastéréosélectivité observée lors de cette étape. D'une part, la configuration (S) du carbone C-2 de l'acide pyroglutamique. D'autre part, une gêne stérique liée à la nature des

groupements protecteurs et de l'électrophile utilisé. L'addition d'électrophile sur l'énolate de lithium du (*S*)-1,2-di-*tert*-butyloxycarbonyl pyrrolidin-5-one a lieu en anti des groupements protecteurs N-Boc et *O**t*Bu (Figure II. 18).

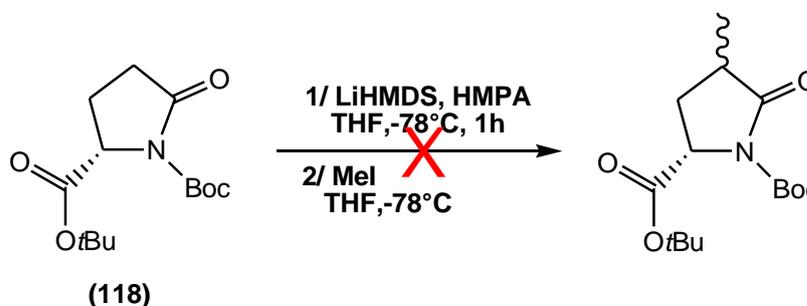


**Fig II. 18 :** Mécanisme d'addition de l'électrophile sur l'énolate de lithium.

D'autres analyses et caractérisations sont venues compléter l'interprétation de la structure de ces nouveaux composés comme les analyses par HPLC chirale avec deux types de colonne dans deux systèmes de solvant différents ; chiralcel OD-RH dans (ACN/ H<sub>2</sub>O) et avec chiralpak AD-H dans (hexane/isopropanol) et la mesure de pouvoir rotatoire.

Après la mise au point la synthèse des dérivés arylés et la confirmation de leur configuration (2*S*, 4*R*), nous avons voulu par la suite réaliser la synthèse de dérivés alkylés.

Les premiers tests d'alkylation ont été effectués avec l'iodure de méthyle dans les mêmes conditions expérimentales que celles optimisées précédemment. Malheureusement aucun produit n'a été formé ; le composé **118** a été récupéré dans sa totalité (schéma 62). La nature de la base ne semble pas être mise en cause.



**Schéma 62.**

Le triflate de méthyle (trifluorométhanesulfonate de méthyle)<sup>205</sup>, est connu comme étant meilleur électrophile. Avec les mêmes conditions expérimentales, la réaction de condensation de Boc-Pyr-*Ot*Bu (**118**) avec le triflate de méthyle conduit à la formation de plusieurs produits (2*S*, 4*R*)-1,2-di-*tert*-butyloxycarbonyl-4-méthyl pyrrolidin-5-one **125**, (2*S*, 4*S*)-1,2-di-*tert*-butyloxycarbonyl-4-méthyl pyrrolidin-5-one **126**, (2*S*)-1,2-di-*tert*-butyloxycarbonyl-4-di-méthyl pyrrolidin-5-one **127** (schéma 63).

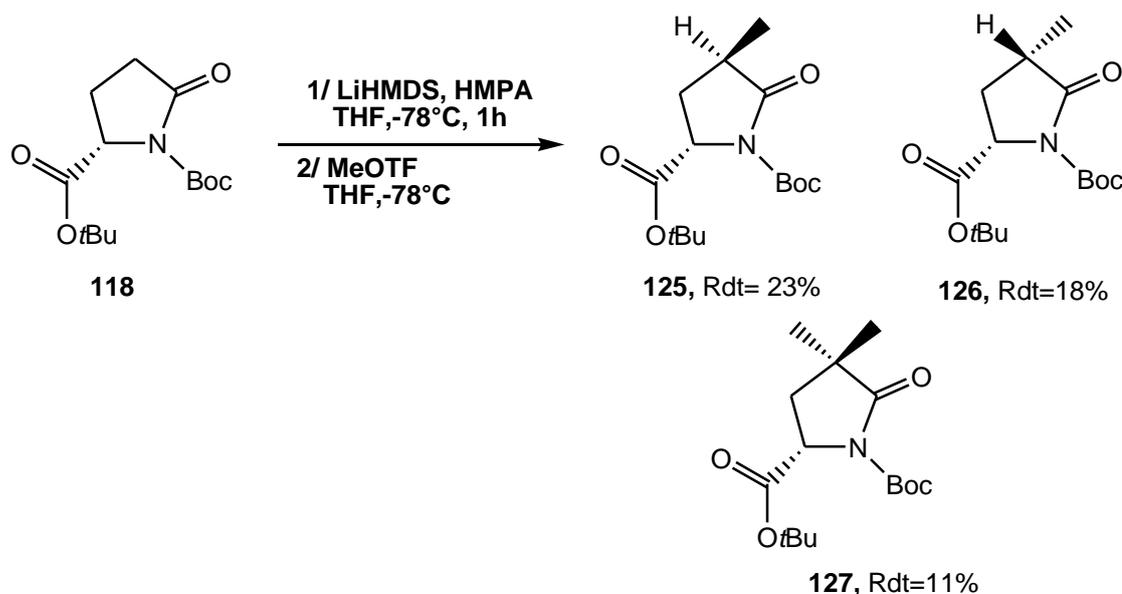


Schéma 63.

L'analyse du brut réactionnel par la LC/MS nous confirme que la réaction a conduit à la formation du produit dialkylé **127** qui possède une masse définie par  $m/z$  ( $[M+H^+]=314.2$ ) avec un pourcentage de 11% évalué par HPLC et RMN.

La RMN du proton nous montre la présence de deux diastéréoisomères avec un rendement de 41% (23%, 18%) et un excès diastéréoisomérique de l'ordre de 12%. Ces diastéréoisomères sont détectés par RMN mais ne sont pas séparés en HPLC analytique.

### II. 5. 2. 1. c/ L'ouverture des produits **120** à **122** :

Dans la stratégie de synthèse que nous avons envisagée, la troisième étape est l'ouverture de cycle pyroglutamate substitué.

<sup>205</sup> B. R. Bates, R. S. Taylor, *J Org Chem*, **1993**, 58, 4469-4470.

Après une étude bibliographique<sup>206 207</sup>, la réaction d'hydrolyse de la fonction lactame peut être réalisée par différentes méthodes. Lichtenstein<sup>5</sup>, décrit en 1942 une stratégie d'ouverture du lactame par l'éthylamine avec un très faible rendement et pour une durée très longue de 20 jours.

Les essais d'ouverture du composé **120** avec une solution d'éthylamine à température ambiante, par chauffage classique à 50-60°C, ou une activation par utilisation de micro-onde ont été réalisés, mais aucune réaction n'a eu lieu.

Pour ouvrir des lactames comme les composés **120**, **121** et **122**, nous nous sommes alors tournés vers des conditions conventionnelles décrites dans la littérature<sup>208</sup>. Le produit **128** est obtenu avec un rendement de 80% par action de lithine 2M dans du THF à température ambiante pendant 30 min. Cependant le composé **128** issu de l'ouverture, subit à notre grande surprise, une hydrolyse partielle de l'ester *Or*Bu a été également observée comme nous l'avions déjà décrit dans un chapitre précédent (page 93) (schéma 64).

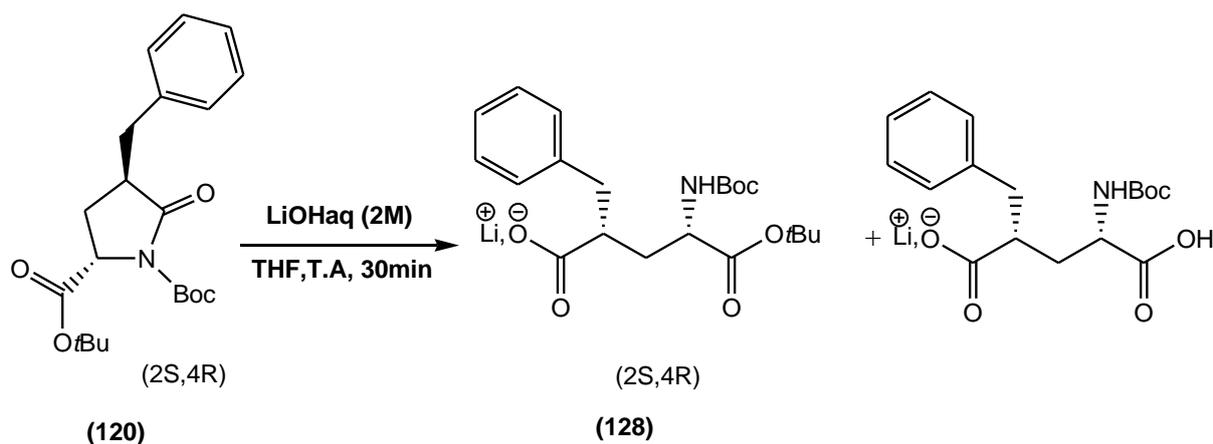


Schéma 64.

Afin d'éviter cette déprotection secondaire, une étape d'optimisation a été nécessaire. Différents paramètres expérimentaux tels que, la température, le temps de la réaction et surtout la concentration de la solution de LiOH utilisée ont été explorés.

En suivant la réaction par HPLC analytique, les conditions optimales trouvées sont : une solution de LiOH (1M) est ajoutée à une solution de produit à ouvrir dans le THF à

<sup>206</sup> G. Deguest, L. Bischoff, C. Fruit, F. Marsais, *Tetrahedron Asym*, **2006**, 17, 2120-2125.

<sup>207</sup> J. Ezquerra, C. Pedregal, B. Yruretagoyena, A. Rubio, M. C. Carreno, A. Escribano, J. L. G. Ruano, *J. Org. Chem*, **1995**, 60, 2925-2930.

<sup>208</sup> E. James, Jr. Traver, M. K. Terranova, M. M. Joullié, *Tetrahedron Asym*, **2004**, 60, 10277-10284.

-10°C ; après 10 min de réaction on augmente la température à -5°C pendant une heure. Des lavages acido-basiques conduisent aux produits **128**, **129** et **130** avec des rendements quantitatifs (schéma 65).

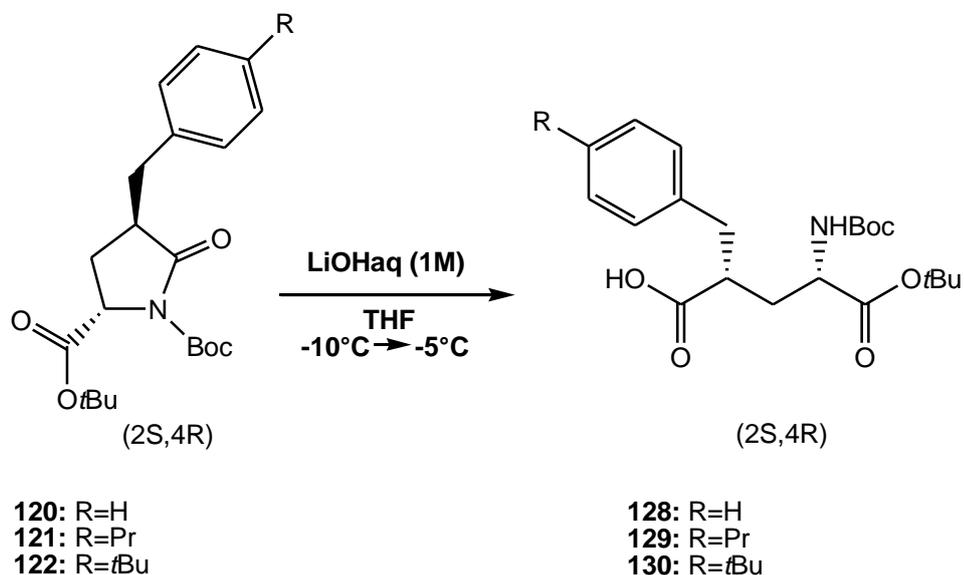


Schéma 65.

### II. 5. 2. 1. d/ L'amidification des produits 128 à 130 :

Les différents dérivés de l'acide glutamique protégés et substitués en C4 subissent l'amidification de la fonction carboxylique en  $\gamma$  avec l'éthylamine avec la méthode optimisée utilisant le BOP comme agent de couplage (schéma 66).

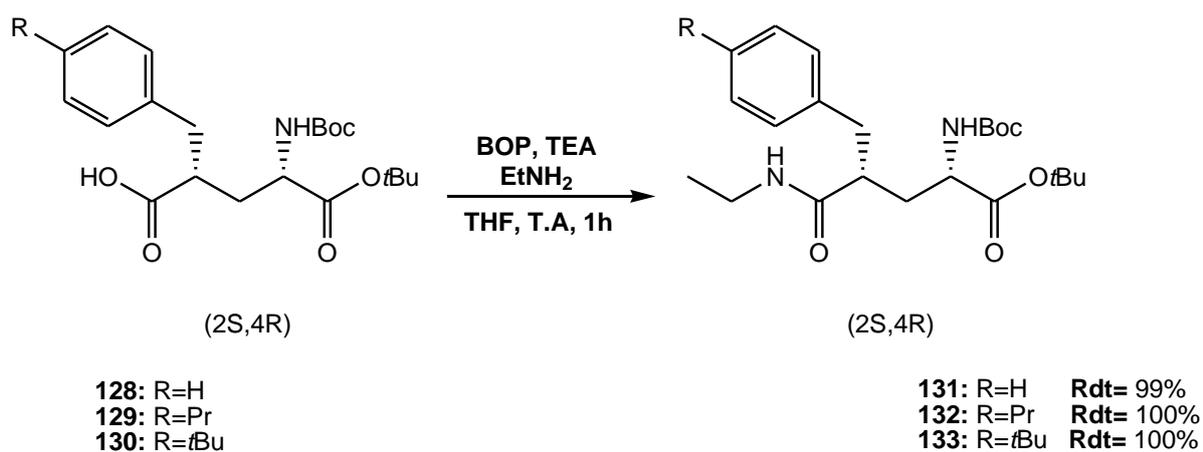
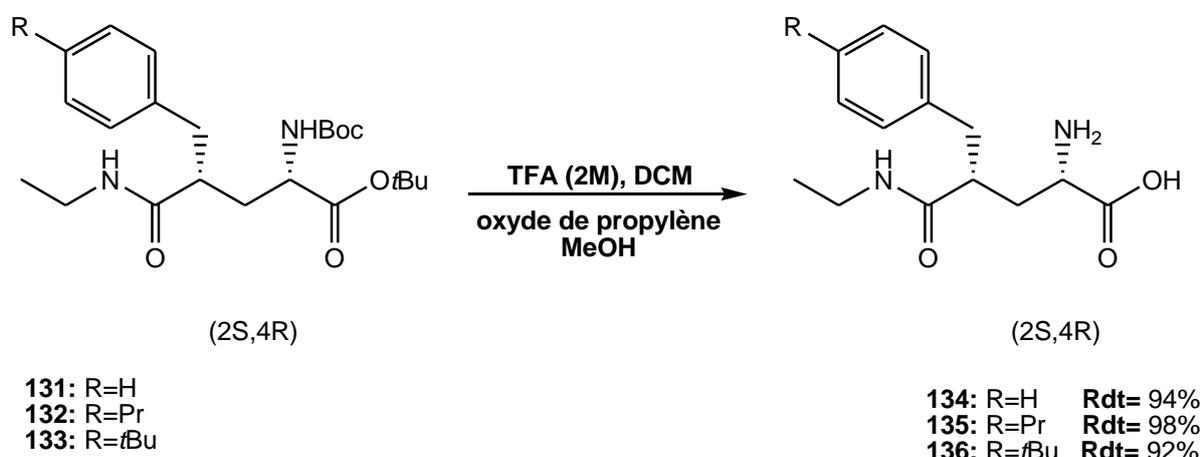


Schéma 66.

Les produits **131** - **133** ont été récupérés avec de très bons rendements après une purification par des lavages acido-basiques sans purification supplémentaire. La pureté chimique et optique de ces produits est confirmée par HPLC, RMN du  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ainsi que par la mesure de pouvoir rotatoire de chaque produit.

### II. 5. 2. 1. e/ Hydrolyse des groupements protecteurs:

La réaction de déprotection du groupement Boc de la fonction amine et l'ester *tert*-butylique des différents dérivés C4-arylés de la L-Théanine a été effectuée dans des conditions conventionnelles (TFA 2M dans du dichlorométhane) à température ambiante pendant 2 heures (schéma 67).



**Schéma 67.**

Les trifluoroacétates des acides (2S, 4R)-2-amino-4-aryle-5-oxo-5-aminoéthyl pentanoïques sont ainsi obtenus avec d'excellents rendements après simple évaporation à sec du milieu réactionnel puis des co-évaporations du TFA résiduel avec du toluène. Les aminoacides libres **134** à **136** sont obtenus par l'action d'un excès d'oxyde de propylène dans le méthanol sur les chlorhydrates des aminoacides correspondants.

### II. 6 Conclusion :

Nous avons donc développé et optimisé avec succès deux nouvelles méthodes de synthèse de la « L » et « D » théanine optiquement pures avec de très bons rendements et seulement deux étapes. Dans ce contexte et pour la première fois la théanine a été synthétisée utilisant l'activation par micro-onde. L'analyse des produits obtenus par RMN et par HPLC chirale nous a montré qu'aucune racémisation n'a eu lieu dans ces synthèses.

Plusieurs séries d'analogues substitués sur l'azote amidique de la L-théanine ainsi que des dipeptides contenant la L-théanine ont été synthétisés en adaptant des stratégies classiques de la synthèse peptidique.

La synthèse stéréo et régiosélective de dérivés arylés en position 4 de la théanine a également été réalisée avec une régio et stéréo sélectivité totale, un seul diastéréoisomère est obtenu même si les rendements restent très similaire à ceux obtenus dans la littérature.

Les analyses des RX des dérivés 4-arylé de la théanine protégés, quand les cristaux ont pu être obtenus, puis les études de ses spectres RMN  $^1\text{H}$  à 600MHz nous ont permis de déterminer la configuration absolue du carbone 4.

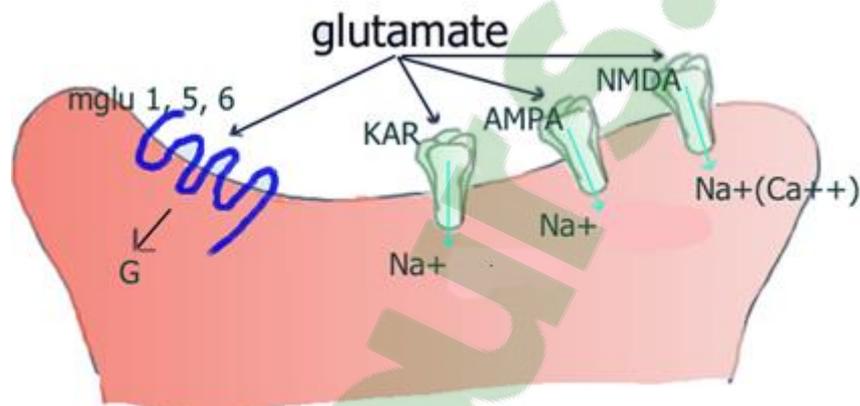
Dans ce chapitre nous avons donc réussi à synthétiser de nombreuses nouvelles molécules optiquement pures. Certaines vont être présentées dans le chapitre suivant quant à leur activité biologique sur la synapse glutamatergique.

## *Chapitre III*

# **Tests Biologiques**

### III. 1 Introduction :

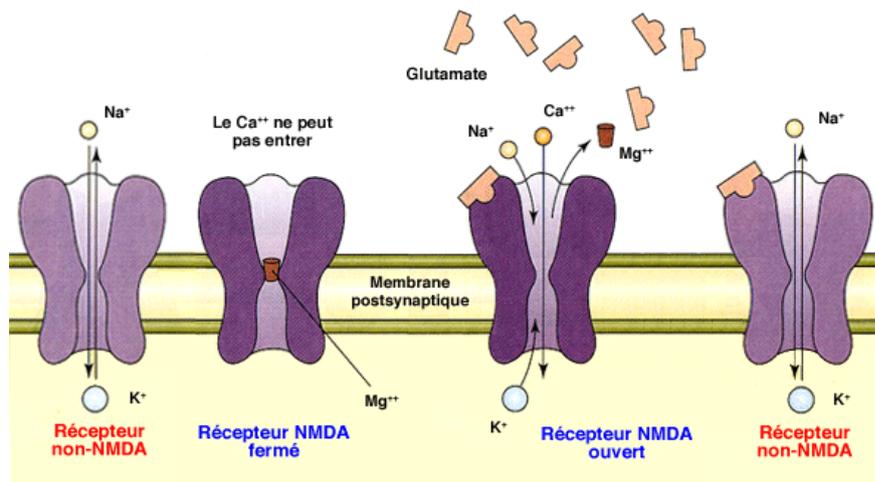
Un très grande part de notre projet concerne l'évaluation biologique de nos produits synthétisés et présentés auparavant. Notre groupe de recherche s'intéresse depuis plusieurs années à la synapse glutamatergique et aux conséquences de ses dysfonctionnements tant au niveau physiologique comme l'influence sur la mémoire et l'apprentissage mais incluant aussi la neurotoxicité et les désordres psychiatriques. Eclaircir le fonctionnement de la transmission synaptique est donc fondamental. Les travaux antérieur de notre équipe ont déjà été décrits précédemment et publiés. Comme indiqué ce travail est l'étude de nouveaux outils synthétisés, la théanine et ses dérivés, sur les récepteurs glutamatergiques ; ionotropiques (NMDA, AMPA et KA) et métabotropiques (mGlu-R) situés au niveau postsynaptique d'une synapse (Figure III. 1).



**Fig III. 1 :** Représentation schématique des récepteurs ionotropiques et métabotropiques au niveau de la postsynaptique<sup>209</sup>.

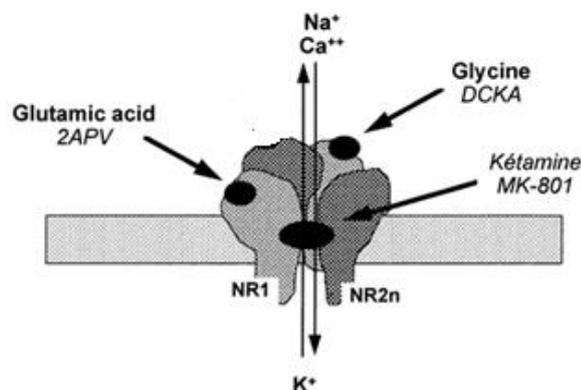
Récemment, en 2012, et à l'aide des techniques d'électrophysiologie par la mesure de calcium intracellulaire, Wakabayashi et al<sup>98</sup> ont montré que, tout comme le N-Méthyl-D-Aspartate, la théanine possédait un effet sur les récepteurs NMDA en tant qu'agoniste. Théoriquement, un changement de la concentration intracellulaire en ions calcium  $[Ca^{+2}]_i$  signifie l'activation d'un récepteur perméable aux ions et donc l'ouverture du canal. D'une façon générale, le récepteur NMDA est l'unique récepteur parmi les récepteurs ionotropiques qui soit perméable aux ions de  $Ca^{+2}$  (Figure III. 2).

<sup>209</sup> [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/33/Synapse\\_glutamatergique.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/33/Synapse_glutamatergique.png).



**Fig III. 2 :** Représentation schématique de l'activation des récepteurs ionotropiques<sup>210</sup>.

Pour revenir à la pharmacologie du récepteur NMDA, deux différents sites de liaison ont été identifiés ; un pour l'acide glutamique ou un agoniste sélectif, dont l'occupation simultanée active le récepteur et provoque ainsi l'ouverture du canal ionique, et un pour la glycine, un co-agoniste de ce récepteur (Figure III. 3).



**Fig III. 3 :** Représentation du récepteur NMDA<sup>211</sup>.

Notre objectif principal est donc d'éclaircir et d'approfondir quelle est l'activité de la théanine et de ses nombreux analogues synthétisés sur les récepteurs NMDA.

Je tiens à préciser que, au sein de notre groupe de recherche Stress Oxydant et Neuroprotection, j'ai moi-même effectué les tests biologiques, réalisé les analyses statistiques correspondantes et interprété les résultats que vous retrouverez dans cette partie après avoir été formée par le Pr. Michel Vignes.

<sup>210</sup> <http://www.vetopsy.fr/neurologie/neurotransmetteurs/images/recepteur-NMDA.gif>.

<sup>211</sup> [http://mhsrvweb.medhyg.ch/revues/images/69930216\\_image4.gif](http://mhsrvweb.medhyg.ch/revues/images/69930216_image4.gif)

### III. 2 Les techniques utilisées au sein de l'équipe Stress Oxydant et Neuroprotection:

Dans le but d'étudier la cytotoxicité de la Théanine et de ses analogues synthétisés vis à vis des cellules nerveuses, nous avons évalué la survie cellulaire grâce à la méthode colorimétrique au MTT (bromure de 3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl-tétrazolium).

En parallèle des techniques d'électrophysiologie ont été appliquées afin de pouvoir étudier le flux d'ions calcium dans les cellules neuronales d'hippocampe cultivées, qui sont riches en récepteurs NMDA. La mesure quantitative de la concentration de calcium intracellulaire est effectuée grâce à l'imagerie calcique afin de déterminer l'effet agoniste, co-agoniste ou antagoniste des produits testés: cette technique est basée sur la mesure des variations de fluorescence d'un indicateur d'ions calcium. Ces indicateurs mesurent la concentration de calcium par le biais des changements produits au niveau des spectres de fluorescence quand les ions calcium sont complexés. Le Fura-2 est un agent chélatant fluorescent UV-sensible fréquemment utilisé qui se lie au calcium.

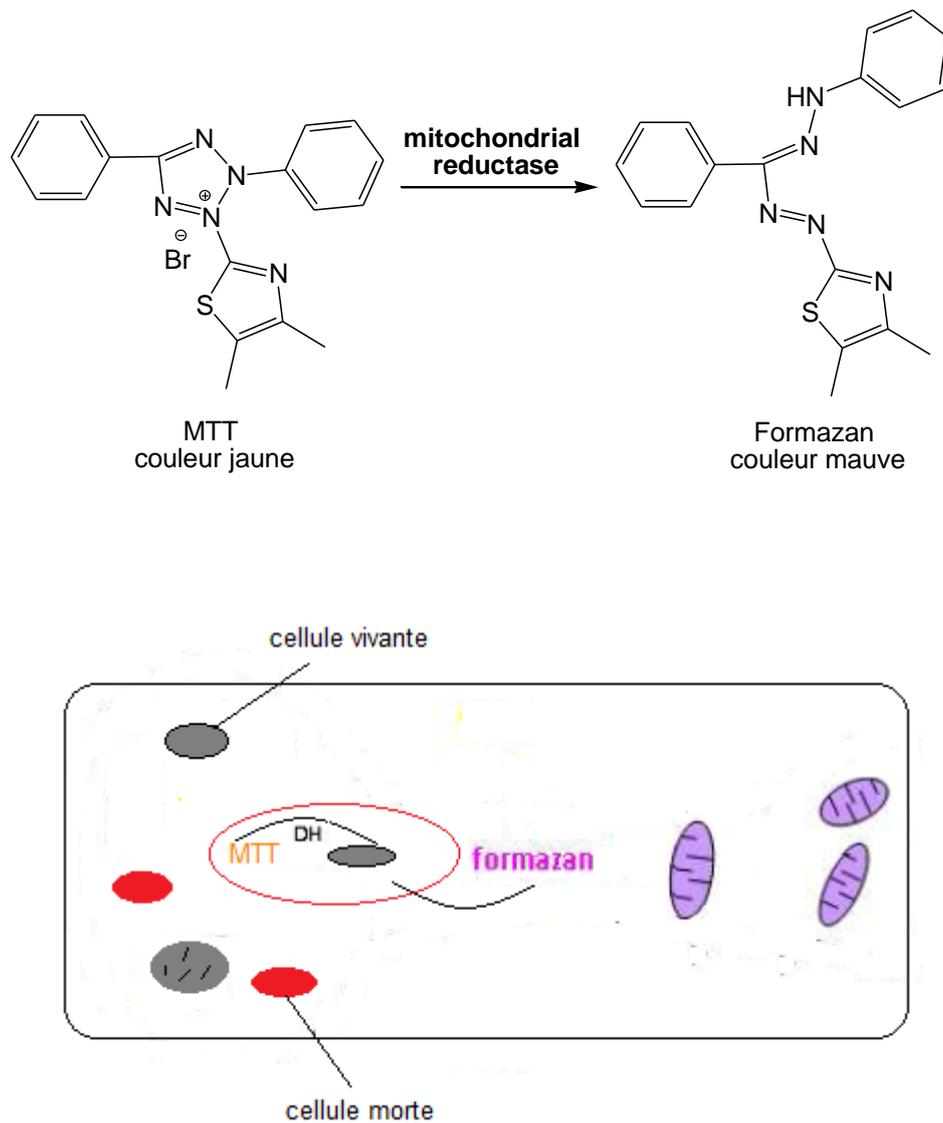
### III. 3 Etude de la cytotoxicité :

Les cultures de neurones d'hippocampe de rat sont traitées par plusieurs analogues synthétisés de la Théanine et du MTT. Les neurones sont incubés pendant 24h à température ambiante.

Le sel de tétrazolium MTT est un colorant jaune qui permet de quantifier l'activité respiratoire mitochondriale<sup>212</sup>. En effet, le MTT pénètre dans les cellules vivantes, et en particulier dans les mitochondries où il est transformé en cristaux de formazan de couleur violette (Figure III. 4).

Clicours.COM

<sup>212</sup> T. Mosmann, *Journal of Immunological Methods*, **1983**, 65, 55-63.



**Fig III. 4 :** Réaction et représentation schématique de la transformation du MTT en formazan.

Cette transformation provoque la lyse des cellules et la solubilisation des cristaux de formazan. Un simple dosage de la densité optique DO à 550 nm d'une culture permet de connaître la quantité relative de cellules vivantes et actives métaboliquement. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à une base correspondant à la valeur de DO obtenue dans des puits contrôles n'ayant subi aucun traitement. Pour toutes les expériences de MTT, les résultats sont exprimés de la façon suivante : moyenne  $\pm$  écart standard à la moyenne, chaque condition est effectuée en répété au moins sur trois cultures indépendantes.

### III. 3. 1 Résultats de tests MTT de la théanine et quelques analogues synthétisés:

Tous les composés préparés et décrits n'ont pas été testés quand à leur effet toxique potentiel. La mesure de la toxicité est effectuée sur des cultures d'hippocampe réalisées au laboratoire. Seuls la Théanine et ses analogues N-alkylés (composés BS42, BS43, BS68, BS71, BS77) (schéma 1) ont été étudiés.

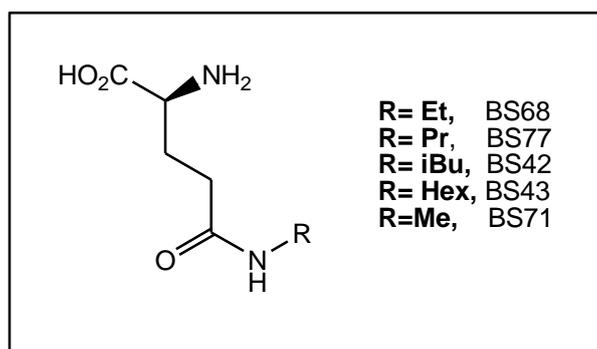


Schéma 1.

Les effets directs de la Théanine (BS 68, composé **10**), la 5-N-méthylglutamine (BS 71, composé **20**), la 5-N-propylglutamine (BS 77, composé **21**), la 5-N-butylglutamine (BS 42, composé **22**), la 5-N-hexylglutamine (BS43, composé **24**), et le NMDA à une concentration de 100  $\mu$ M sont représentés dans la (Figure III. 5).

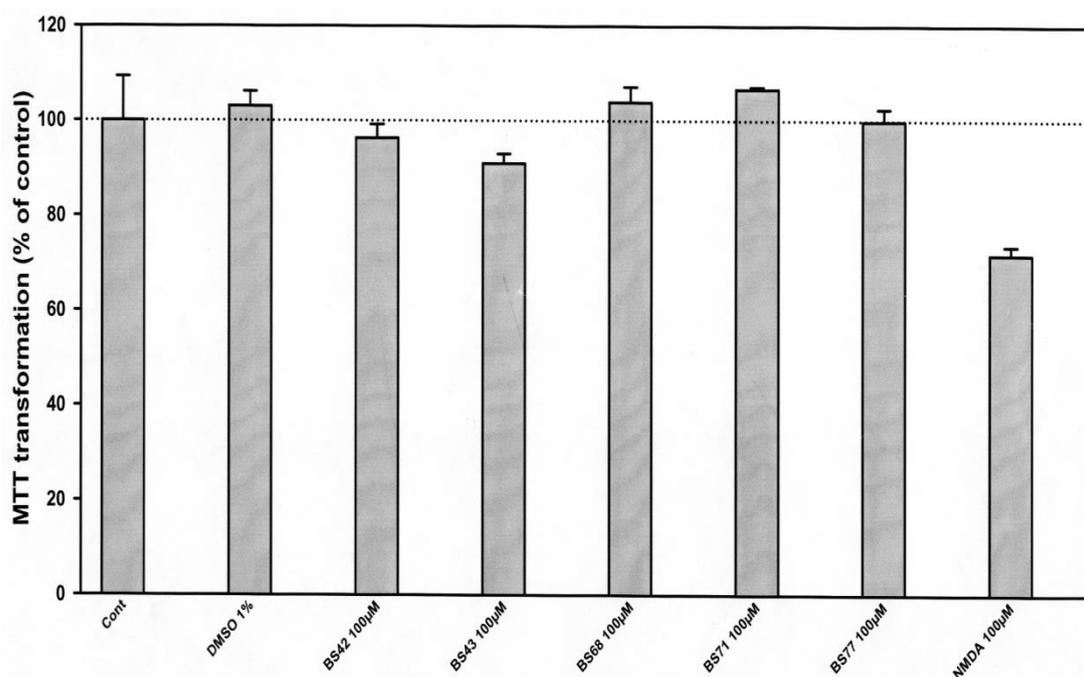
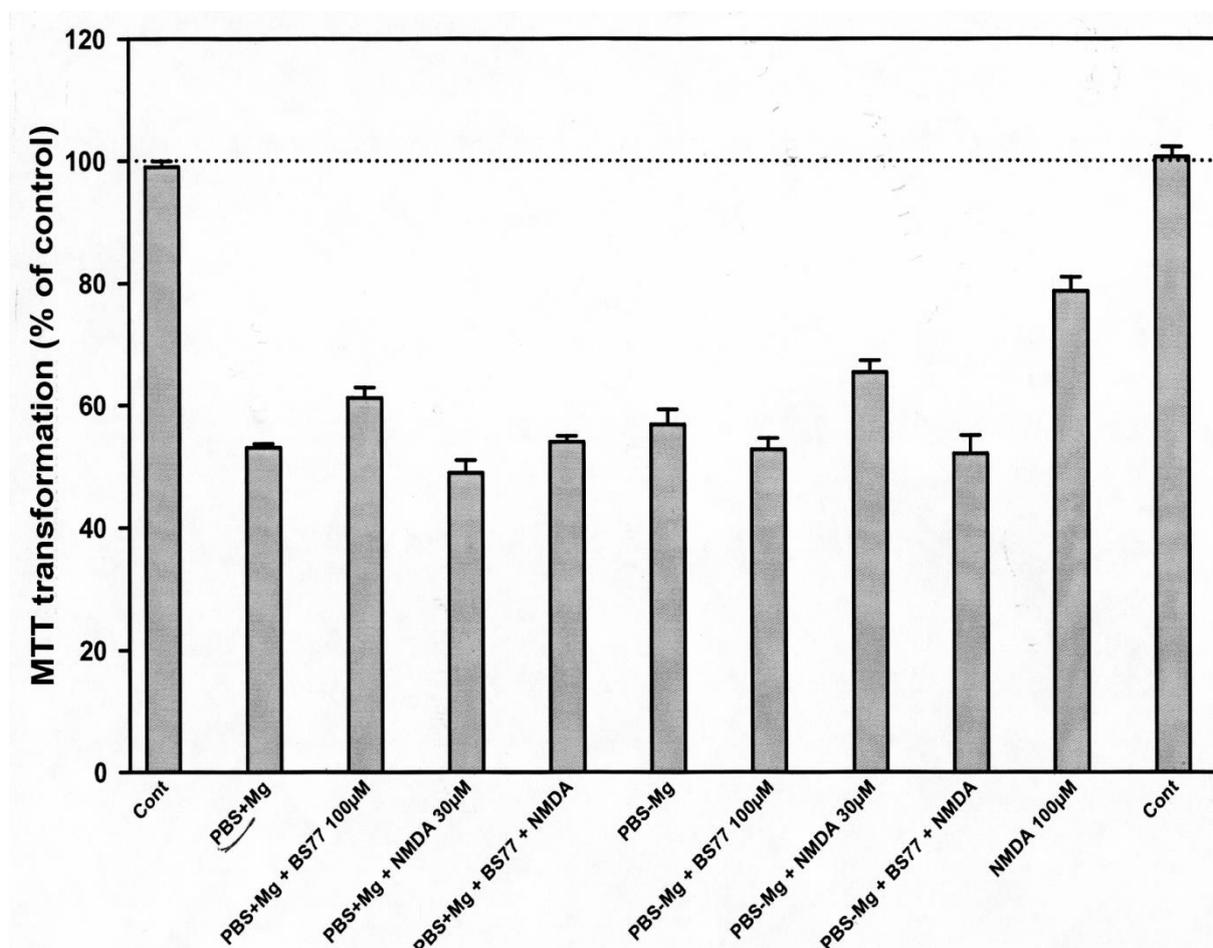


Fig III. 5 : Tests MTT sur la théanine (BS68) et quelques analogues N-alkylés.

Le taux de transformation du MTT en formazan représente la quantité relative de cellules vivantes (activité respiratoire mitochondriale d'un contrôle : 100%). D'après les résultats obtenus les composés BS68 (+), BS77 (+), et BS71 (+) ont presque des taux de transformation du MTT identiques au contrôle de l'ordre de 100%. Ces 3 composés ne sont donc pas toxiques. Cependant, lorsque les cellules sont traitées avec le BS42 (+) et le BS43 (+) les taux de transformation du MTT diminuent indiquant que ces deux composés sont légèrement toxiques (entre 3 et 10% d'après les histogrammes de la Figure III-5). Cela pourrait être dû à la longueur de la chaîne alkyl qui rendrait les composés plus hydrophobes. Quand les cellules sont traitées avec du NMDA, l'agoniste spécifique de récepteur NMDA-R, cette diminution est plus marquée et est de l'ordre de 25%. En effet à cette dose élevée de 100 $\mu$ M, le NMDA est en partie cytotoxique sur cultures d'hippocampe.

Les tests de viabilité suivants consistent à évaluer l'influence du tampon phosphate (PBS) et de la présence de Magnésium qui sont en compétition avec le calcium sur les récepteurs NMDA et provoqueraient une cytotoxicité.



**Fig III. 6 :** tests MTT sur la NPropylGln (+/- Mg<sup>2+</sup> +/- BS77 +/- NMDA).

Le taux de MTT en présence du tampon PBS + Mg est de l'ordre de 55% (entrée 2 de l'histogramme de la Figure III-6). Lorsque l'on rajoute au mélange précédent de la N-PropylGln (mélange PBS + Mg + BS77 (+)) le taux augmente à 62% (entrée 3 de l'histogramme de la Figure III-6). La N-Propyl Glutamine régènerait en partie la viabilité cellulaire, et serait donc neuroprotectrice au même titre que la théanine.

Dans le cas d'un mélange de PBS + Mg + NMDA (30  $\mu$ M) le pourcentage de la transformation de MTT est de l'ordre de 50%. Ainsi une récupération de viabilité cellulaire presque de 10% a été observée après ajout de BS77 (+) (entrées 4 et 5 de l'histogramme de la Figure III-6).

L'hyperactivation du récepteur NMDA par des neurotransmetteurs excitateurs ou des excitotoxines comme le NMDA (N-méthyl-D-aspartate) provoquent une entrée massive dans la cellule d'ions calcium. Le  $Ca^{2+}$  active à son tour un certain nombre d'enzymes, ces enzymes dégradent alors les structures cellulaires. Le NMDA à forte dose induit une excitotoxicité donc une morte neuronale (Apoptose). Ainsi la 5-N-propylglutamine BS77 (+), présente une activité inhibitrice de la toxicité neuronale induite par le NMDA à une concentration de 100  $\mu$ M (neuroprotection).

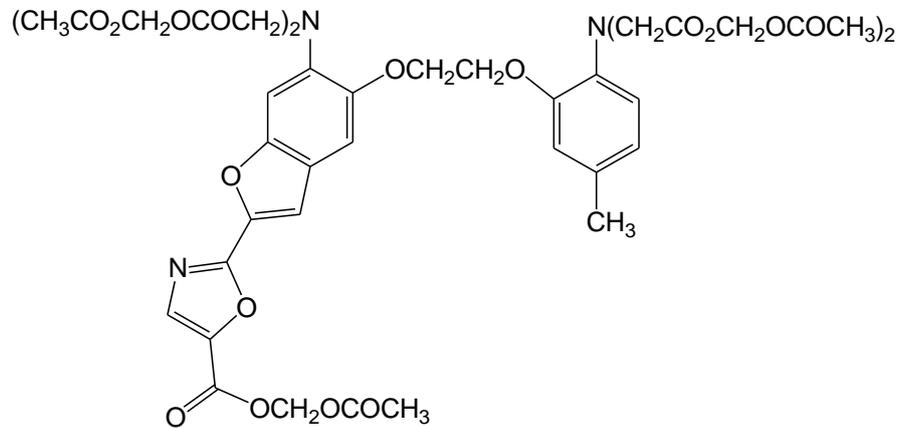
### **III. 4 Mesure de variations calciques intracellulaires par la méthode d'imagerie calcique:**

Le calcium étant un second messager impliqué dans de nombreux mécanismes cellulaires, un suivi en temps réel de la concentration en calcium intracellulaire ( $[Ca]_i$ ) peut être un indicateur précis d'un effet biologique s'opérant au niveau membranaire. En ce sens, le suivi des variations de ( $[Ca]_i$ ) a été choisi pour évaluer les conséquences cellulaires d'une administration de la Théanine ou de ses dérivés synthétisés sur les cultures de cellules neuronales d'hippocampe.

#### **III. 4. 1 Chargement de la sonde calcique fluorescente dans les neurones en culture :**

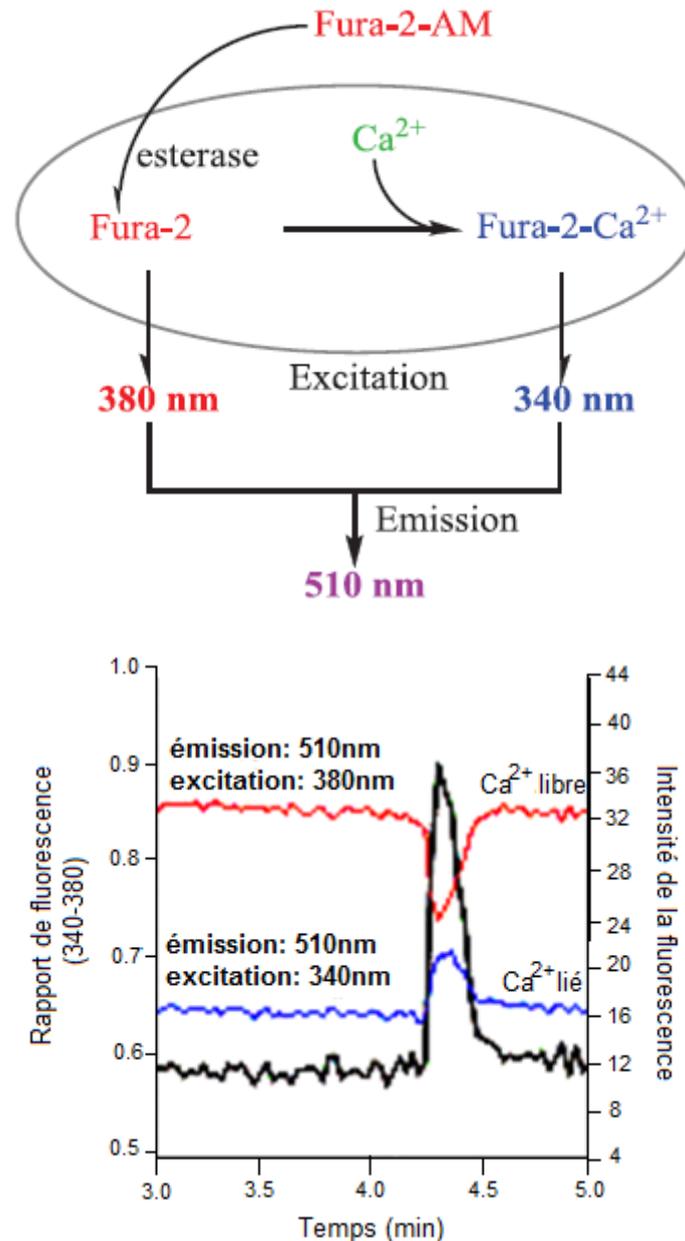
Les neurones en culture sont incubés à 37°C dans 2.5  $\mu$ M de Fura-2 sous sa forme acetoxyméthyl ester (Figure III. 7). La sonde calcique, qui est un puissant chélateur de calcium, est fortement lipophile. Incubée avec des cellules, elle va s'incorporer aux membranes lipidiques, puis être libérée et piégée dans leur cytosol. Le Fura-2-AM ne se lie pas au calcium ; cependant, une fois entré dans les cellules sa partie acétoxyméthylester est

hydrolysée par les estérases intracellulaires et c'est le fura-2 libre qui se lie aux ions calcium. Toute variation du taux de calcium cytosolique se traduira ensuite par une augmentation de fluorescence de la sonde. Le rapport des intensités fluorescentes entre Fura-2 libre et le complexe Fura-2-calcium permet l'évaluation des changements de concentration en calcium.



**Fig III. 7 :** Structure du Fura-2-AM (acétoxyméthylester).

Quand le calcium se lie au Fura-2, le maximum d'excitation fluorescente de l'indicateur est décalé de 363 nm (sans calcium) à 335 nm (saturé en calcium), dans le violet, pendant que le maximum d'émission de fluorescence reste à environ 510 nm. L'indicateur est habituellement excité à 340 nm et à 380 nm respectivement et le rapport des intensités fluorescentes à ces deux excitations est utilisé dans le calcul des concentrations intracellulaires (Figure III. 8). La fluorescence du Fura-2 est recueillie par vidéo-microscopie.



**Fig III. 8 :** Principe d'excitation du Fura-2 et la mesure de calcium intracellulaire.

Les mesures sont effectuées sur  $n$  cellules provenant au minimum de 3 cultures indépendantes.

### III. 4. 2 Résultats et discussions d'imagerie calcique :

Nous avons d'abord évalué l'activité biologique potentielle de la Théanine sous ses deux configurations « L et D » (L-BS-68 (10) et D-BS68 (11)) (schéma 2) avec une concentration de 10  $\mu$ M, en mesurant leur effet sur la concentration intracellulaire de calcium dans un milieu sans magnésium (Figure III. 9 A et B). La L-théanine provoque une

augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$ , et la D-Théanine montre un effet beaucoup plus important que celui de la L-Théanine. Ces premiers résultats montrent que la Théanine posséderait un effet agoniste vis-à-vis d'un des récepteurs glutamatergiques.

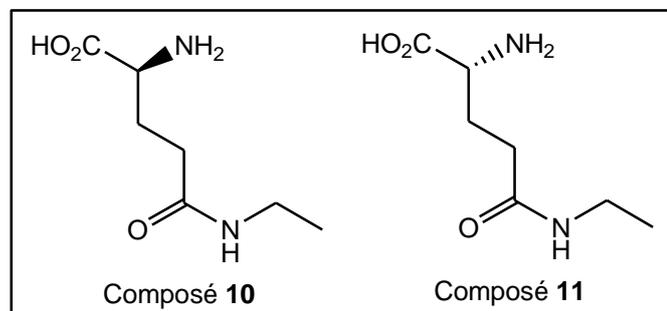
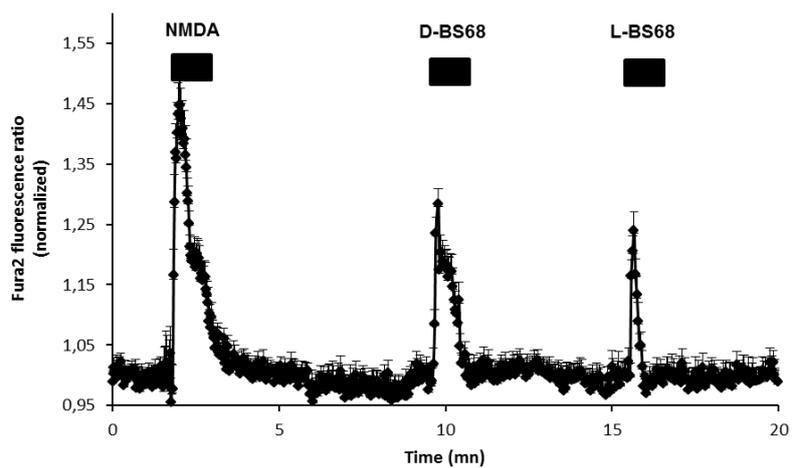


Schéma 2.

(A)



(B)

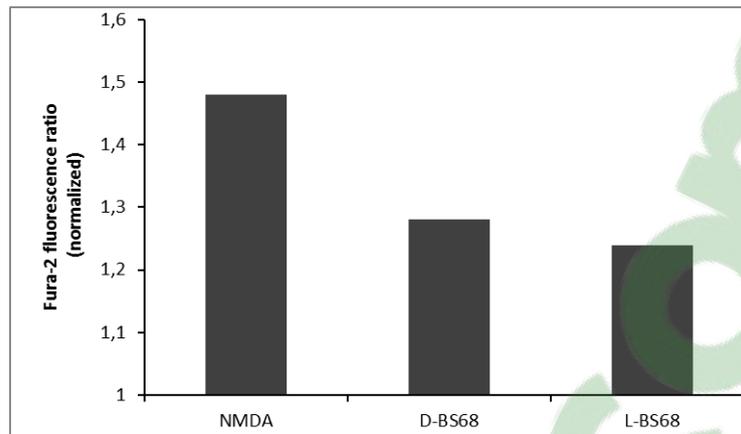


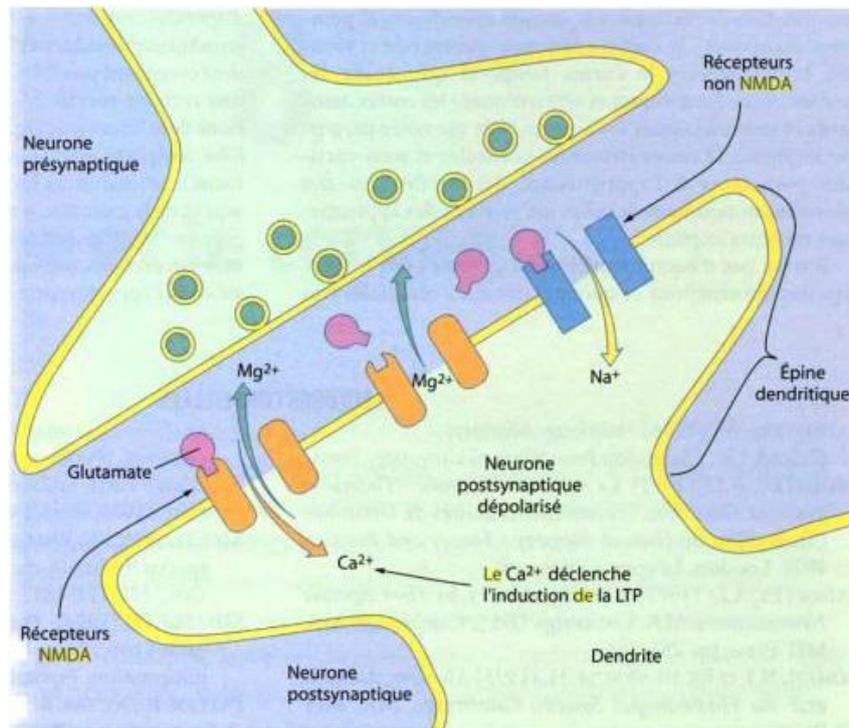
Fig III. 9 :

(A) : Résultats obtenus en Fura-2 pour les composés (*L*) et (*D*) BS68 dans des milieux sans  $Mg^{2+}$ .

(B) : Histogrammes récapitulant les différents résultats.

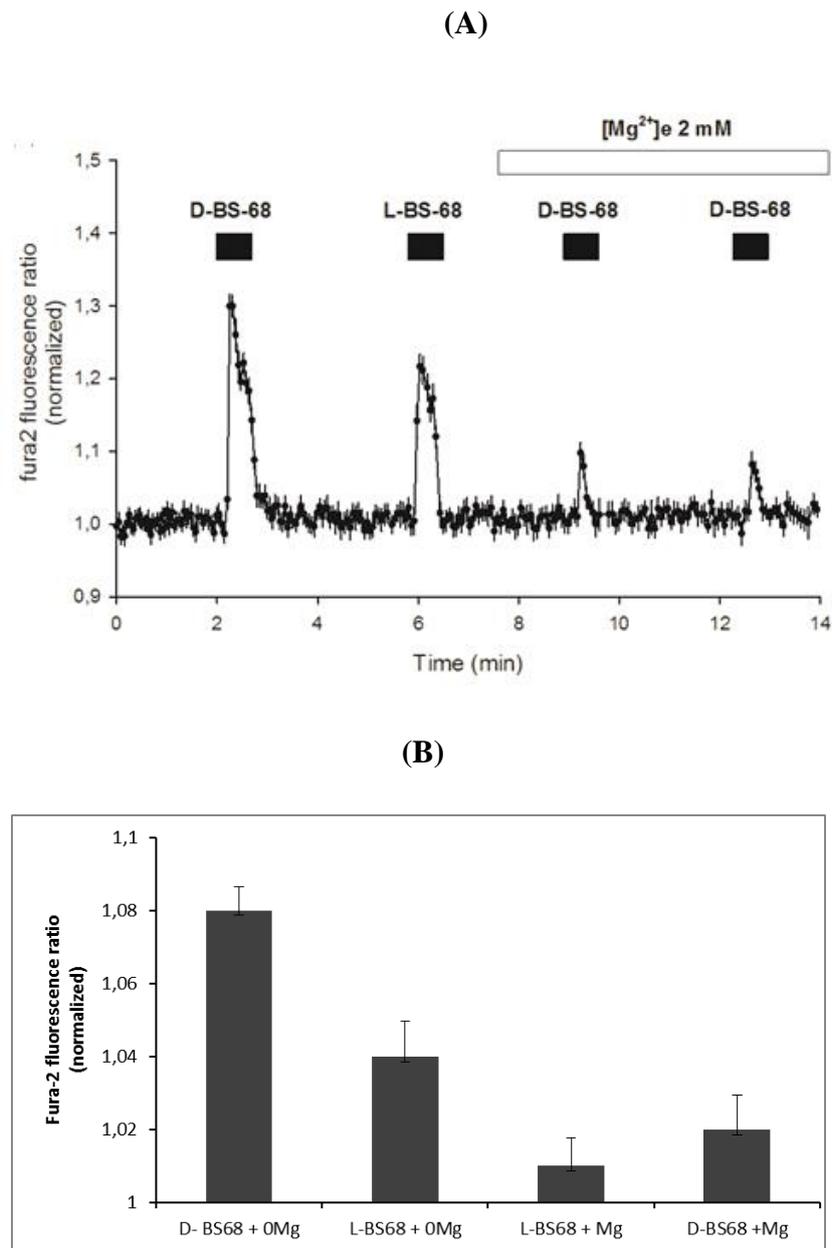
Les récepteurs NMDA sont normalement bloqués par les ions magnésium ( $Mg^{2+}$ ). Les ions  $Mg^{2+}$  ne peuvent être expulsés des récepteurs NMDA que lorsque le glutamate se lie à ses récepteurs et que la membrane du neurone est dépolarisée ; en d'autres termes, l'activation des récepteurs NMDA dépend à la fois d'un neurotransmetteur et d'un voltage qui éjectent les ions  $Mg^{2+}$  et libèrent le canal ionique pour que les ions calcium puissent pénétrer dans la cellule (Figure III.10)<sup>213</sup>.

<sup>213</sup> M. S. Gazzaniga, G. R. Mangun, Neurosciences cognitives : la biologie de l'esprit, Paris : De Boeck Université, 2000, 287.



**Fig III. 10 :** le rôle du  $Mg^{2+}$  dans le fonctionnement du récepteur NMDA.

Dans le but de déterminer sur quel récepteur la Théanine agit exactement et doser sa sélectivité, cette expérience a été renouvelée mais cette fois-ci dans des milieux avec et sans magnésium extracellulaire (Figure III. 11 (A) et (B)). La concentration de calcium intracellulaire induit par l'application de la Théanine « L et D » est diminuée de façon significative dans les milieux avec magnésium. Cela nous permet de prouver que la Théanine a un effet agoniste sur les récepteurs NMDA.



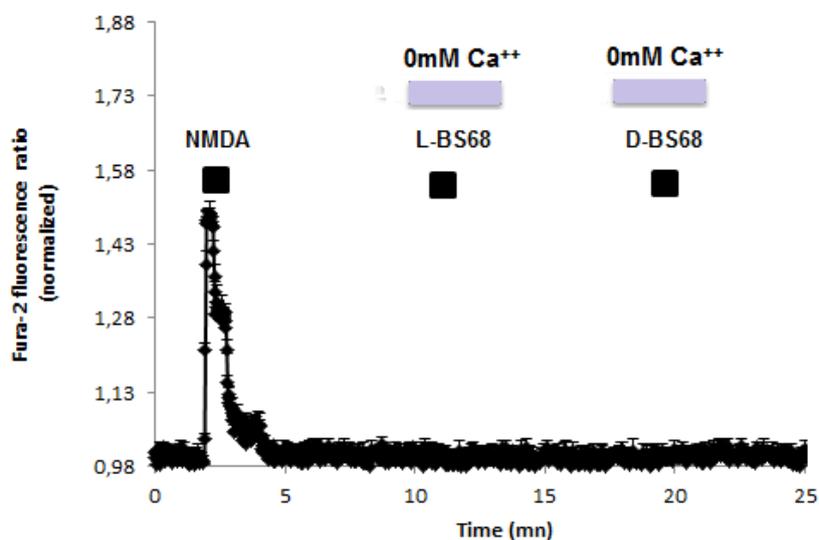
**Fig III. 11 :**

**(A) :** Résultats obtenus en Fura-2 pour les composés (*L*) et (*D*) BS-68 dans les différentes conditions (avec et sans  $Mg^{2+}$ ).

**(B) :** Histogramme récapitulant les différents résultats.

Ces résultats préliminaires nous ne permettent pas de déterminer l'effet exact de la théanine sur les récepteurs glutamatergiques. Il était nécessaire d'effectuer toute une série de tests complémentaires pour voir si la théanine avait un effet ou pas sur les récepteurs AMPA et/ou les récepteurs métabotropiques.

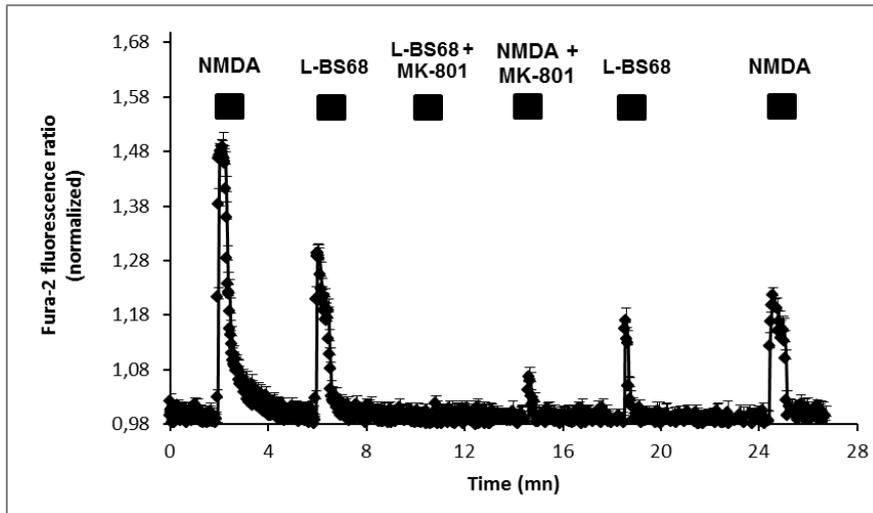
Pour l'étude de l'effet de la Théanine (*L* et *D*) sur les récepteurs métabotropiques, les neurones sont stimulés par ces deux produits toujours à une concentration de 10  $\mu\text{M}$  dans un milieu sans calcium extracellulaire afin de vider les stocks intracellulaires de calcium (Figure III. 12). Aucune variation de la concentration de calcium intracellulaire n'a été observée. Théoriquement, dans ce cas-là, une augmentation transitoire de calcium s'effectue par l'intermédiaire des récepteurs métabotropiques mGluR du glutamate. Ce résultat suggère que la Théanine (*L* et *D*) ne possède aucune activité sur les récepteurs mGluR.



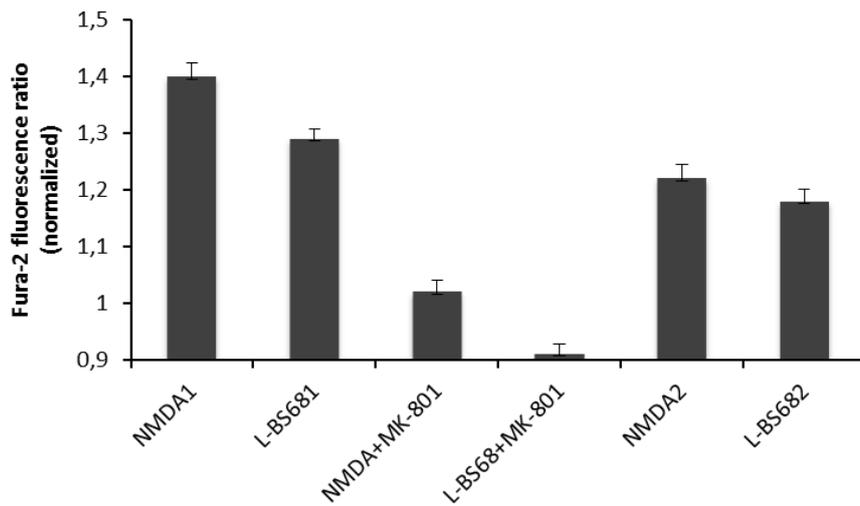
**Fig III. 12 :** Résultats obtenus en Fura-2 pour les composés (10) et (11) perfusés avec un tampon sans  $\text{Ca}^{2+}$ .

Pour l'effet potentiel de la théanine sur les récepteurs AMPA « AMPA-R », nous avons effectué deux stimulations ; une fois uniquement par la Théanine (*L* ou *D*), puis après blocage des NMDA-R à l'aide du MK-801 qui est un antagoniste non compétitif, et qui se lie à l'intérieur du canal ionique du récepteur. Enfin une nouvelle stimulation par la théanine (*L* ou *D*) est effectuée. Les résultats obtenus montrent que l'addition de MK-801 à une concentration de 25  $\mu\text{M}$  supprime complètement l'activité de la (*L*) Théanine (Figure III. 13 A et B) et son énantiomère (*D*) (Figure III. 14 A et B).

(A)



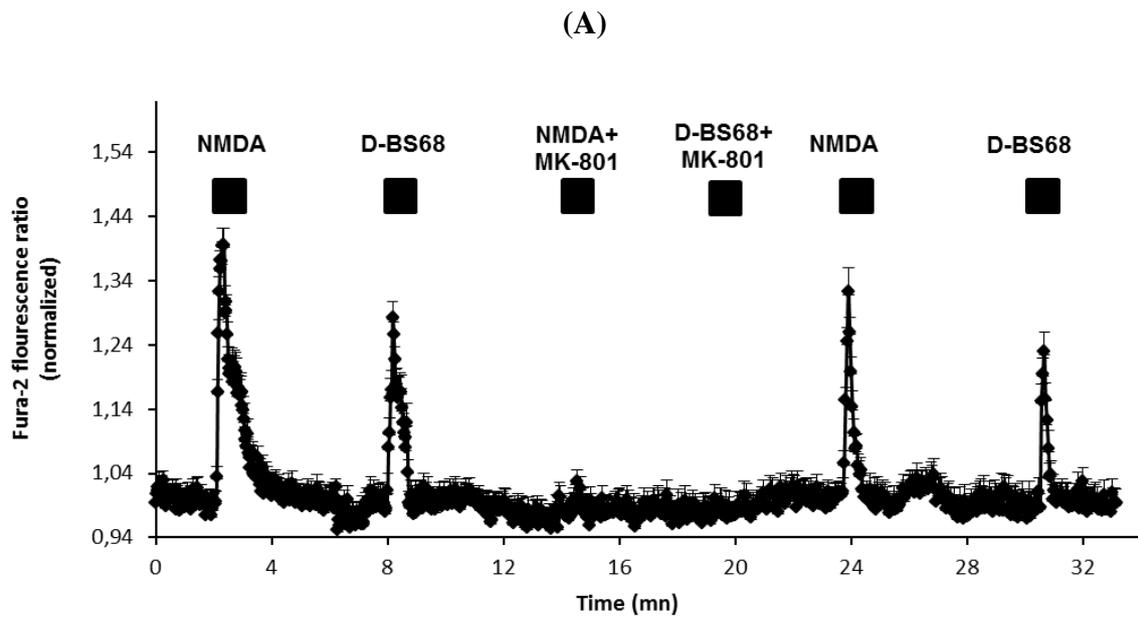
(B)



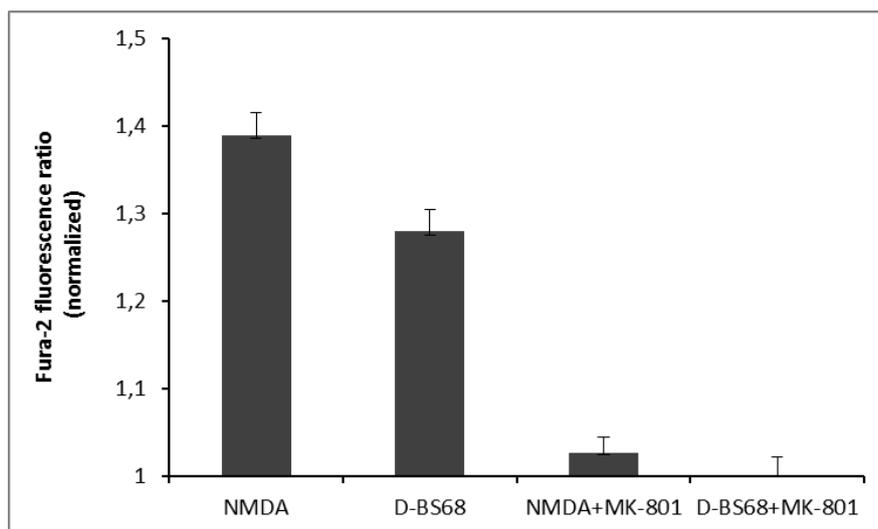
**Fig III. 13 :**

(A) : Les résultats obtenus en Fura-2 pour la (L) Théanine et le NMDA tout seul puis avec l'antagoniste non compétitif le MK-801 à une concentration de 25  $\mu$ M.

(B) : Histogramme récapitulant les différents résultats.



(B)



**Fig III. 14 :**

(A) : Les résultats obtenus en Fura-2 pour la (D) Théanine et le NMDA tout seul puis avec l'antagoniste non compétitif le MK-801 à une concentration de 25  $\mu$ M.

(B) : Histogramme récapitulant les différents résultats.

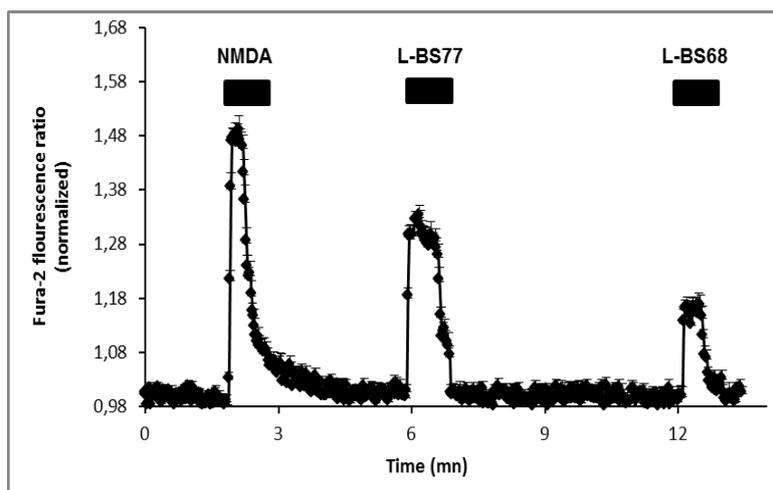
A l'aide des résultats de toutes ces expériences nous avons réussi avec succès à montrer que la Théanine a un effet uniquement sur les récepteurs NMDA (sélectivité) en tant qu'agoniste et que l'énantiomère « *D* » est plus actif que l'énantiomère « *L* ».

Actuellement des études complémentaires sont en cours au sein de l'équipe pour évaluer l'effet de la Théanine sur le site co-agoniste glycine du récepteur NMDA.

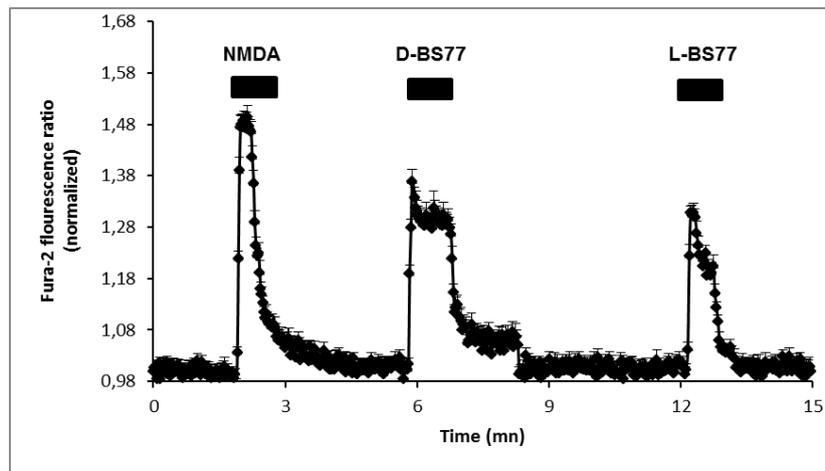
Après avoir mis au point et optimisé tous ces tests avec la Théanine, nous avons étudié l'activité des autres produits synthétisés.

Nous avons testé les analogues N-alkylés de la Théanine. Le dérivé 5-N-propylglutamine L-BS77 (**21**) a montré une activité en tant qu'agoniste des récepteurs NMDA beaucoup plus importante que celle de la Théanine elle-même (Figure III. 15 A et C), et que l'énantiomère (*D*) plus actif que l'énantiomère (*L*) (Figure III. 15 B et C).

(A)



(B)



(C)

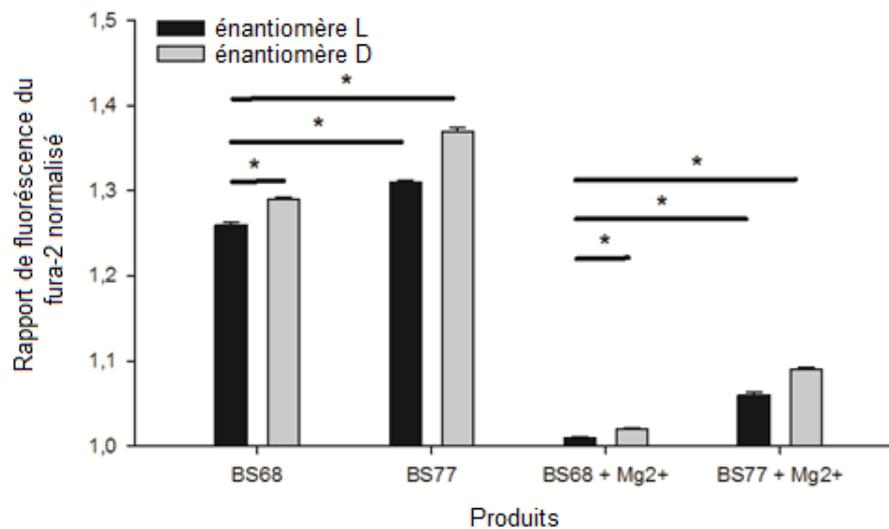


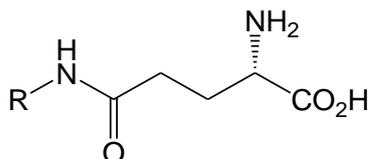
Fig III. 15 :

(A) : Résultats obtenus en Fura-2 des composés L-BS-77 et L-BS-68 perfusés avec un tampon sans  $Mg^{2+}$ .

(B) : Résultats obtenus en Fura-2 des composés les BS-77 (L et D) perfusés avec un tampon sans  $Mg^{2+}$ .

(C) : Histogramme récapitulatif présent la différence entre (BS-68 L et D) et (BS-77 L et D) dans des tampons sans et avec  $Mg^{2+}$ .

La stimulation des cultures de neurone avec des analogues (*L*)-5-N-alkylés de la Théanine (Figure III. 16) dans différents conditions ; des tampons avec et sans  $Mg^{2+}$ , des tampons sans  $Ca^{2+}$ , et en présence de l'antagoniste non compétitif du NMDA-R, le MK-801, est effectuée. Les résultats obtenus (Tableau 1) suggèrent que ces analogues (*L*)-5-N-alkylés de la théanine possèdent un effet agoniste sur uniquement les récepteurs NMDA, et aucun effet n'a été observé sur les autres récepteurs glutamatergiques (les « AMPA-R » ou mGlu-R).



**Fig III. 16** : Structure des dérivés N-alkylés de la Théanine.

Produits	R-	Activité
<b>20</b>	Méthyle	Agoniste (+)
<b>10</b>	Ethyle	Agoniste (+++)
<b>21</b>	Propyle	Agoniste (++++)
<b>22</b>	Isobutyle	Agoniste (++)
<b>23</b>	Isopentyle	Agoniste (++)
<b>24</b>	Hexyle	Agoniste (++)
<b>25</b>	Benzyle	Agoniste (++)

**Tableau 1** : L'activité des dérivés N-alkylés de la Théanine sur les NMDA-R.

L'activité de ses analogues N-alkylés est quasi identique à celle de la Théanine. Une différence notable existe cependant selon la nature du groupement alkyle. Actuellement, il y a pas d'explication plausible à ces résultats très intéressants si ce n'est l'hydrophobicité des composés plus marquée pour les dérivés 5-N-alkylGln possédant une longue chaîne.

Quand la cristallisation des récepteurs NMDA aura été effectuée, des études de modélisation seront nécessaires pour interpréter le mécanisme d'action sur ces récepteurs.

Avec le dérivé  $\gamma$ -N-PropylGlu (*D*) et (*L*) (BS77) nous avons donc synthétisé facilement et découvert un composé potentiellement très intéressant. Les tests sont poursuivis pour affiner son mode d'action, comme co-agoniste des NMDA-R et son effet sur la potentialisation à long terme (LTP) qui influe sur l'apprentissage et la mémorisation, et pourquoi pas dans l'optique d'un futur médicament potentiel non toxique, neuroprotecteur et anxiolytique.

Par la suite nous avons évalué l'activité des dipeptides en gamma de l'acide glutamique (Figure III. 17) en imagerie calcique à l'aide du Fura-2, pour essayer de comprendre leur effet sur les récepteurs glutamatergiques d'une façon générale.

Cette série de produits a révélé une activité très importante selon la nature du deuxième acide aminé de ces  $\gamma$ -dipeptides. L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans le tableau 2.

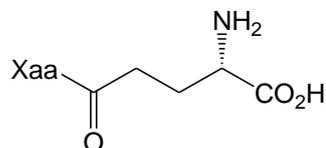
Seul le  $\gamma$ -dipeptide **52** H-(L)-Glu((L)-Trp-OH)-OH ne possède aucune activité sur les récepteurs glutamatergiques (iGlu-R, mGluR) même à une concentration de 20  $\mu$ M. Ce résultat peut être expliqué par la taille volumineuse du tryptophane qui empêche n'importe quel type de contact entre le dipeptide et le récepteur.

Quand les neurones sont stimulés par le produit **50** H-(L)-Glu((L)-Phe-OH)-OH à une concentration de 10  $\mu$ M aucun changement de la concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  n'a été observé. Cependant si on augmente la concentration du composé **50** à 20  $\mu$ M, une variation importante de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  est observée. Cette augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  est totalement supprimée par l'utilisation de différents antagonistes compétitifs NMDA-R comme (AP-5) et non compétitif comme (MK-801). Ces résultats nous permettent de conclure quant à son effet agoniste vis-à-vis uniquement du récepteur NMDA mais avec une concentration de 20  $\mu$ M.

Les  $\gamma$ -dipeptides **49** H-(L)-Glu((L)-Pro-OH)-OH et **51** H-(L)-Glu((L)-His-OH)-OH qui ont une structure presque similaire, possèdent également une activité biologique très similaire : ces deux  $\gamma$ -dipeptides ont un effet agoniste très faible sur les récepteurs NMDA comparé à celui des autres dipeptides.

Le  $\gamma$ -dipeptide **47** H-(L)-Glu((L)-Ala-OH)-OH présente une activité importante en tant qu'agoniste contrairement au produit **48** H-(L)-Glu((L)-Val-OH)-OH qui a une activité agoniste d'ordre beaucoup plus faible .

Seuls deux  $\gamma$ -dipeptides le **46** H-(L)-Glu((L)-Gly-OH)-OH et le **53** H-(L)-Glu((L)-Glu-OH)-OH ont montré un effet à la fois sur les récepteurs NMDA et sur les récepteurs métabotropiques du glutamate.



**Fig III. 17** : La structure des  $\gamma$ -dipeptides de l'acide glutamique.

Produits	Acide aminé		Activité sur les Récepteurs	
			Métabotrope	NMDA
<b>46</b>	Glycine	10 $\mu$ M	Agoniste	Très agoniste
<b>47</b>	Alanine	10 $\mu$ M	Aucun effet	Très agoniste
<b>48</b>	Valine	10 $\mu$ M	Aucun effet	agoniste
<b>49</b>	Proline	10 $\mu$ M	Aucun effet	Faible agoniste
<b>51</b>	Histamine	10 $\mu$ M	Aucun effet	Faible agoniste
<b>50</b>	Phénylalanine	10 $\mu$ M	Aucun effet	Aucun effet
		20 $\mu$ M	Aucun effet	agoniste
<b>52</b>	Tryptophane	10 $\mu$ M	Aucun effet	Aucun effet
		20 $\mu$ M	Aucun effet	Aucun effet
<b>53</b>	Glutamique	10 $\mu$ M	Agoniste	Très Agoniste

**Tableau 2** : Effet des  $\gamma$ -dipeptides de l'acide glutamique sur les récepteurs glutamatergiques.

Dans le but d'approfondir ces études, celles de modélisation devront par la suite être réalisées. Le docking pourrait nous permettre de comprendre ce qui fait qu'un dipeptide aurait une activité agoniste ou aucune activité vis-à-vis des récepteurs NMDA, et pourquoi d'autres dipeptides ont un effet à la fois sur les récepteurs NMDA et les récepteurs métabotropiques du glutamate.

Tous les résultats obtenus suggèrent que nos produits révèlent la présence d'un site activateur dans les récepteurs NMDA (agoniste ou / et co-agoniste).

# *Conclusion Générale*

Clicours.COM

L'ensemble des travaux effectués pendant ma thèse, présentée dans ce manuscrit, avait pour but la synthèse de nouveaux outils analogues du glutamate, principal neurotransmetteur du système nerveux central. Ces nouveaux outils sont la théanine et ses dérivés. Au-delà de la synthèse mes travaux ont consisté également à évaluer par la suite leur activité vis-à-vis des récepteurs ionotropiques (NMDA) de la synapse glutamatergique.

Avant de présenter les différentes synthèses effectuées, le chapitre 1 est une revue bibliographique sur la théanine, son extraction des feuilles de thé vert, son activité biologique. Cette dernière est très diversifiée et pour des raisons historiques liées à l'expertise de l'équipe Stress oxydant et neuroprotection, nous nous sommes focalisés sur les effets neuroprotecteurs et anxiolytiques en rappelant le fonctionnement de la synapse glutamatergique et en étudiant plus précisément les récepteurs ionotropiques.

Dans un deuxième chapitre nous décrivons et discutons de nos travaux :

- en tout premier, nous avons mis au point avec succès la synthèse de la L et la D Théanine optiquement pures en utilisant l'irradiation micro-ondes. La théanine et ses analogues N-alkylés ont aussi été synthétisés avec succès par des réactions d'amidification de l'acide glutamique N et C protégés par l'action d'agents de couplages.

Ces dérivés N-alkylés de la glutamine ont été testés *in vitro* sur des neurones d'hippocampe en culture en utilisant la technique d'imagerie calcique. La théanine et son analogue 5-N-propylglutamine ont montré une activité agoniste sur les récepteurs ionotropiques NMDA, et nous avons donc créé de nouveaux neuroprotecteurs potentiels : leur caractérisation complète et leurs effets biologiques font actuellement l'objet d'une publication.

Fort de ces succès et résultats encourageants, nous nous sommes ensuite engagés dans la synthèse de dipeptides en incorporant les acides aminés modifiés, dérivés de la théanine précédemment décrits toujours dans l'optique de trouver de nouveaux outils pour cibler spécifiquement certains récepteurs. Pour cela, nous avons optimisé la synthèse de plusieurs séries de dipeptides utilisant les méthodes classiques de synthèse peptidique. Une série de gamma dipeptides de l'acide glutamique a été obtenue en remplaçant l'éthylamine par des acides aminés C protégés ; une deuxième série de dipeptides correspond à l'intégration de la

L-Théanine ou de la L-N-Propylglutamine soit du côté N-terminal du dipeptide soit du côté C-terminal et ce en vérifiant toujours la pureté optique des composés synthétisés.

Enfin toujours dans le but d'obtenir des outils diversifiés, le dernier axe de ces travaux est la synthèse stéréosélective de dérivés de la théanine substitués en C4 soit par des groupements alkyls soit par des groupements aryls. L'originalité de la méthode décrite pour la première fois dans ces travaux consiste en l'emploi d'un acide glutamique N et C protégé contraint qui est le (L) acide pyroglutamique ((*S*)-Boc-Pyr-*O*tBu). Après de nombreux essais d'optimisation la méthylation n'est ni régio, ni stéréosélective et les rendements sont faibles. La benzoylation par contre s'est avérée être beaucoup plus efficace : même si les rendements sont moyens la régio et la stéréosélectivité sont totales. Un seul diastéréoisomère est obtenu ; après de nombreuses tentatives de recristallisation, nous avons pu obtenir des cristaux et les analyses RX ont permis de confirmer la configuration absolue du nouveau centre stéréogénique (C4) et d'expliquer la stéréospécificité de la réaction. Elle est induite à la fois par la configuration (2*S*) de l'acide pyroglutamique de départ, par l'encombrement des groupements protecteurs Boc et *O*tBu et par celui des agents alkylants benzylés. Ces nouveaux dérivés de la théanine et leur caractérisation structurale font également l'objet d'une publication et ces travaux ont été présentés par communication orale lors du 5<sup>ème</sup> colloque international de chimie hétérocyclique (CICH5-2013).

L'évaluation biologique de la plupart de nos produits synthétisés a montré une activité importante vis-vis les récepteurs glutamatergiques et plus précisément vis à vis du récepteur NMDA en tant qu'agoniste et/ou co-agoniste. C'est le cas des analogues N-alkylés de la Théanine. Certains dipeptides ont montré une activité sur d'autres récepteurs de la synapse glutamatergique (les récepteurs métabotropiques) et cela dépend de la nature de l'acide aminé couplé avec les dérivés de théanine. Les techniques utilisées sont basées sur de l'électrophysiologie par la méthode d'imagerie calcium : les tests sont réalisés sur des cultures de neurones d'hippocampe et le calcium intracellulaire est mesuré grâce à la fluorescence de son complexant Fura-2. En se plaçant dans différentes conditions, notamment en bloquant les récepteurs NMDA à l'aide d'un antagoniste spécifique (MK 801), nous avons pu mettre en évidence que les dérivés L-5-N-alkylglutamine possèdent une activité agoniste importante vis-à-vis des récepteurs NMDA. Des tests complémentaires doivent être réalisés afin d'affiner la nature du site agoniste. A cause du temps, tous les composés synthétisés n'ont pu être testés mais tous ces résultats préliminaires sont très encourageants.

Des tests sur la toxicité de nos composés ont été également réalisés (viabilité tests MTT) et prouvent que nous sommes en présence de composés actifs non toxiques, futurs médicaments potentiels (anxiolytiques et neuroprotecteurs).

La théanine et ses dérivés sont de petites molécules polyfonctionnelles et optiquement pures difficile donc à synthétiser. Les résultats biologiques nous indiquent que nous sommes sur la bonne voie en focalisant nos travaux sur la théanine et ses dérivés.

Nos perspectives sont par la suite de développer de nouveaux analogues avec des stratégies de synthèse beaucoup plus simples et moins coûteuse, comme réduire le nombre d'étapes, pour aller vers des synthèses à grande échelle.

Des études de modélisation moléculaire sur les récepteurs NMDA pourraient nous permettre de comprendre plus précisément les relations structures-activités des composés synthétisés.

# *Partie Expérimentale*

### ***I) Appareillages Et Techniques***

#### **➤ Chromatographies analytiques et préparatives**

Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur plaque de Silice Merck 60F<sub>254</sub> ou d'alumine. Les composés sont soit visualisés par la lumière ultra-violette (254 nm), soit par vaporisation d'une solution éthanolique de ninhydrine à 1% ou d'acide phosphomolybdique (25g dans 100 mL d'éthanol) puis les plaques sont chauffées. Les chromatographies sur colonne de gel de silice ont été réalisées avec de la silice Merck-Kieselgel 60 (230-400 mesh).

#### **➤ Biotage Isolera™ & four**

L'Isolera est un système de purification par flash chromatographie sur colonne de gel de silice ; l'appareillage comprenant les éléments suivants ; un ordinateur muni d'un écran tactile, un collecteur de fraction pour recueillir les fractions dans une grande variété de supports de collecte, un module de pompes pour diriger l'écoulement de liquide à travers le système avec un débit qui peut être modifié et un détecteur UV interne.

#### **➤ Chromatographies liquides haute pression/performance (HPLC)**

##### **- Analytique :**

Les analyses par chromatographie liquide haute pression/performance (HPLC) ont été effectuées sur un appareil Waters Enpower Pro (colonne C18 Chromolith SpeedRod 50 x 4.6 mm, détection UV à 214 nm). Un gradient linéaire d'acétonitrile dans l'eau contenant 0.1% de TFA est utilisé de 0 à 100% en 4 minutes avec un débit de 3 mL/min.

##### **- Chirale :**

Deux appareils ont été utilisés

Le premier est un appareillage Beckman 126 avec un détecteur UV utilisant les colonnes chirales :

- Chiralcel-OD 250 x 4.6 mm ID contenant de la Cellulose tris (3,5-diméthylphenylcarbamate) comme absorbant sur du gel de silice de 5µm.

- Chiralcel-OD-RH, et l'éluant (H<sub>2</sub>O/ACN) avec 0.1% de TFA.

Le deuxième est un appareillage Merck D-7000 manager doté d'une pompe Merck-Lachrom L-7100, d'un four Merck-Lachrom L-7360, d'un détecteur UV Merck-Lachrom L-7400 et d'un polarimètre Jasco OR-1590. La colonne utilisée est de type Chiralpak AD-H avec comme éluant un mélange Hexane/isopropanol.

➤ **Spectrométrie de masse**

Les spectres de masse LC/MS ont été réalisés sur un spectromètre Micromass Platform II est équipé d'une source d'ionisation par électrospray (ESI). Les spectres de masses hautes résolutions (HRMS) ont été réalisées avec un spectromètre Micromass Q-ToF équipé d'une source d'ionisation par électrospray (ESI) en utilisant l'acide orthophorique en tant qu'étalon interne. Les analyses ont été effectuées dans le laboratoire de mesures physiques de l'Université de Montpellier II et la plateforme d'analyses chimiques (PAC) du pôle Chimie Balard.

➤ **Résonance magnétique nucléaire (RMN)**

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton (RMN  $^1\text{H}$ ) ont été réalisés à température ambiante sur des appareils Bruker Advance 200 MHz, 300 MHz ou 600MHz. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont reportés en parties par million (ppm) à partir de celui du tétraméthylsilane (TMS) avec la résonance du solvant comme étalon interne. Les déplacements chimiques sont indiqués rapport au signal de solvant résiduel ( $\text{CDCl}_3$  fixé à 7.26 ppm,  $\text{DMSO-d}_6$  fixé à 2.50 ppm,  $\text{D}_2\text{O}$  à 4.79 ppm). Les constantes de couplages ( $J$ ) sont données en hertz (Hz). La multiplicité des signaux observés est indiquée par une lettre minuscule : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), dd (doublet dédoublé), m (multiplet). Les spectres de résonance magnétique nucléaire du carbone (RMN  $^{13}\text{C}$ ) ont été réalisés à température ambiante sur des appareils Bruker Advance 300 MHz. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont reportés en partie par million (ppm) à partir de celui du tétraméthylsilane avec la résonance du solvant comme étalon interne.

➤ **Point de fusion**

Les points de fusion ( $P_f$ ) non corrigés ont été mesurés en capillaire sur un appareil Büchi 510.

➤ **Polarimètre**

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés avec un polarimètre Perkin-Elmer 241, à température T=20°C et avec une lampe de sodium à 589 nm et une cuve de 1 cm de longueur et sont notés  $[\alpha]_D^{20}$  (C en g/100mL, solvant).

➤ **Micro-ondes**

Les réactions menées sous irradiation micro-ondes ont été effectuées avec un four à micro-ondes dédié à la synthèse Biotage Initiator Microwave Synthesizer produisant un rayonnement contrôlé à 2450 MHz (paramètre fixed hold-time activé).

## *II) Solvants et réactifs*

Les solvants employés ont été séchés ou distillés sur des desséchants spécifiques avant utilisation, si nécessaire. Les dérivés d'acides aminés et tous les réactifs et les solvants ont été fournis par Merck, Fluka, Sigma-Aldrich, Bachem, ACROS, Novabiochem.

## *III) Modes opératoires généraux*

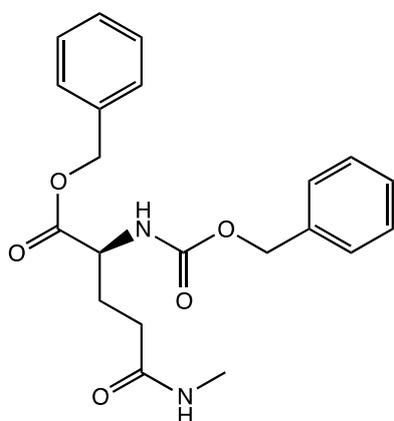
### **I. Synthèse de la D et L 5-N-éthylglutamine (D et L-Théanine) et ses analogues N-alkylés**

➤ ***A-Procédure générale de la synthèse de la théanine et ses dérivés N-alkylés protégés :***

A une solution de (S) ou (R) Z-Glu-OBn (1 éqt, 1 mmole, 387 mg) dans du THF (10 mL) sont successivement ajoutés la NMM (2 éqts, 2 mmoles, 0.18mL) et l'IBCF (2 éqts, 2 mmole, 0.28 mL). Après 10 min d'agitation à -20°C, l'amine (3 éqts, 3 mmoles) est ajoutée et la

température est augmentée jusqu'à T.A. pendant 5h. Le THF est évaporé sous pression réduite. Le brut réactionnel est extrait par du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mL) lavé avec de l'acide citrique 1N (3x30 ml), puis par de l'eau jusqu'à neutralité, la phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , concentrée sous pression réduite ; l'huile obtenue est purifiée par chromatographie (sur le système Isolera<sup>TM</sup> avec comme éluant un mélange AcOEt /éther diéthylique (vol/vol : 7/3).

1°- (L) Z-5-N-Me-Gln-OBn: (S) 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-(méthylamino)-5-oxopentanoate de benzyle.



Produit 12

$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$

Masse molaire :  $384.43\text{g mol}^{-1}$

Solide blanc

Rdt = 56%

$P_f = 89-95^\circ\text{C}$

$t_r = 2.18\text{ min}$

$R_f = 0.24$  (AcOEt /Et<sub>2</sub>O, 7/3)

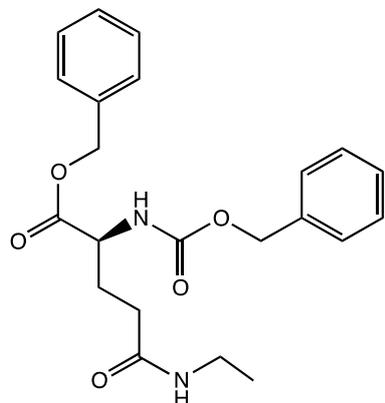
$[\alpha]_D^{20} : -39.0$  (c = 1g/100mL,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )

MS ( $\text{ES}^+$ )  $m/z$ : 385.1 ( $\text{M} + \text{H}^+$ ), 407.0 ( $\text{M} + \text{Na}^+$ )

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta_H$  (ppm) 2.13 (m, 4H,  $\text{H}_3 + \text{H}_4$ ), 2.68 (d, 3H,  $\text{CH}_3\text{-NH}$ ,  $^3J = 4.54\text{ Hz}$ ), 4.29 (m, 1H,  $\text{H}_2$ ), 5.06 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Ph}$  (Z)), 5.09 (s, 2H, O- $\text{CH}_2\text{-Ph}$  (OBn)), 5.64 (m, 2H, 2 x  $\text{NH}$ ), 7.23 (m, 10H, 2 x  $\text{C}_6\text{H}_5$ ).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta_C$  (ppm) 26.38, 28.68, 67.08, 67.32, 128.11, 128.23, 128.43, 128.55, 128.67, 135.19, 136.16, 156.28, 171.77, 172.34.

2°- Z-5-N-Et-Gln-OBn : 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-(éthylamino)-5-oxopentanoate de benzyle.

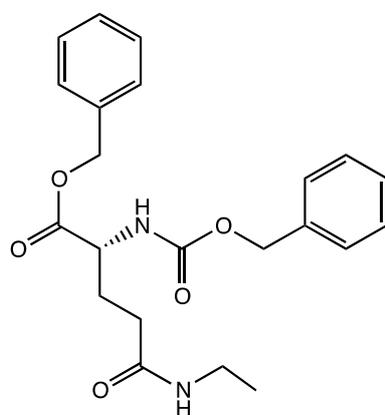


Produit 2  
(S)

$C_{22}H_{26}N_2O_5$

Masse molaire :  $398.45 \text{ g mol}^{-1}$

Solide blanc



Produit 2'  
(R)

Rdt = 65%

**Produit 2 :**

$[\alpha]_D^{20}$ : -36.0 (c = 1g/100 mL,  $CH_2Cl_2$ )

**HPLC Chirale (analytique) :** Chiralcel-OD (60/40)  $H_2O/ACN$ , 1.0 mL/min, 30 min, 214 nm,  $t_r$  = 21.2 min

**Produit 2' :**

$[\alpha]_D^{20}$ : +35.6 (c = 1g/100 mL,  $CH_2Cl_2$ )

**HPLC Chirale (analytique) :** Chiralcel-OD (60/40)  $H_2O/ACN$ , 1.0 mL/min, 30 min, 214 nm,  $t_r$  = 23.28 min

$P_f$  = 87-90°C

$t_r$  = 2.19 min

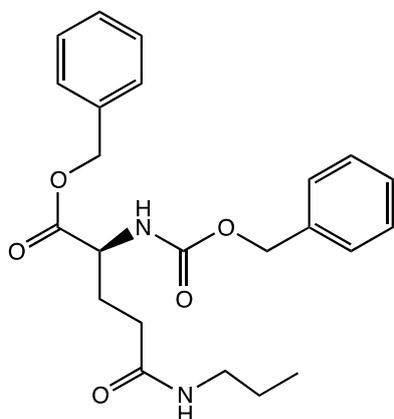
$R_f = 0.26$  (AcOEt /Et<sub>2</sub>O, 7/3)

MS (ES<sup>+</sup>)  $m/z$ : 399.1 (M+ H)<sup>+</sup>, 421.1 (M+ Na)<sup>+</sup>, 819.4 (2M+ Na)<sup>+</sup>.

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta_H$  (ppm) 1.07 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.25 Hz), 2.02 (m, 4H, H<sub>3</sub>&H<sub>4</sub>), 3.21 (m, 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 4.36 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 5.07 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 5.14 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-Ph (OBn)), 5.74 (m, 2H, 2 x NH), 7.32 (m, 10H, 2 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta_C$  (ppm) 14.75, 28.49, 32.44, 34.47, 53.67, 67.06, 67.30, 128.1, 128.2, 128.4, 128.54, 128.56, 135.24, 136.20, 156.32, 171.59, 171.84.

3°- **Z-5-N-Pr-Gln-OBn** : 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-(propylamino)-5-oxopentanoate de benzyle



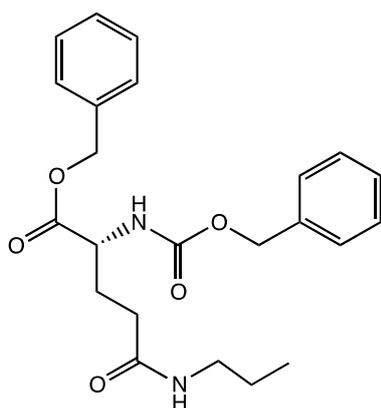
Produit 13

(S)

C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Masse molaire : 412.48g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc



Produit 13'

(R)

Rdt = 28%

Produit **13** :

$[\alpha]_D^{20}$  : -31.4 (c = 1g/100 mL, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

Clicours.COM

**HPLC Chirale (analytique) :** Chiralcel-OD (60/40) H<sub>2</sub>O/ACN, 0.6 mL/min, 30 min, 214nm, t<sub>r</sub>=18.13 min

**Produit 13' :**

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +31.4 (c = 1g/100mL, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**HPLC Chirale (analytique) :** Chiralcel-OD (60/40) H<sub>2</sub>O/ACN, 0.6 mL/min, 30 min, 214nm, t<sub>r</sub>=20.7 min

P<sub>f</sub> = 91-95°C

t<sub>r</sub> = 2.28 min

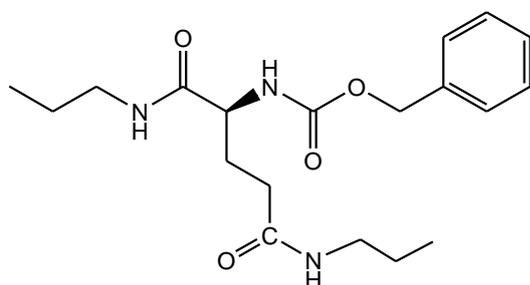
R<sub>f</sub> = 0.26 (AcOEt /Et<sub>2</sub>O, 7/3)

**MS (ES<sup>+</sup>) m/z:** 413.3 (MH)<sup>+</sup>, 435.2 (M+Na)<sup>+</sup>, 369.2 (MH-CO<sub>2</sub>)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 0.84 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz), 1.64 (m, 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.08 (m, 4H, H<sub>3</sub>&H<sub>4</sub>), 3.24 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 4.20 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 5.12 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 5.18 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-Ph (OBn)), 5.82 (d, 1H, NH (Z), <sup>2</sup>J = 7.83 Hz), 6.41 (s, 1H, NH (Pr)), 7.32 (m, 10H, 2 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 12.81, 23.2, 28.55, 32.8, 41.3, 53.7, 67.03, 67.3, 128.09, 128.20, 128.39, 128.53, 128.66, 135.24, 136.20, 156.34, 170.93, 171.83.

**4°- L-Z-1,5-N,N-diPr-Gln amide: (S)-1,5-dioxo-1,5-bis(propylamino)pentan-2-yl) carbamate de benzyle**



Produit 18

C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Masse molaire : 363.45g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc

Rdt = 43%

P<sub>f</sub> = 99-105°C

t<sub>r</sub> = 1.86 min

$R_f = 0.14$  (AcOEt /Et<sub>2</sub>O, 7/3)

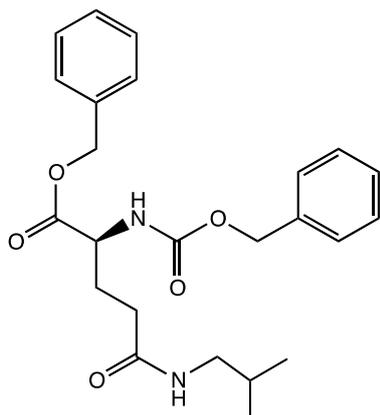
$[\alpha]_D^{20} : -40.0$  (c = 1g/100 mL, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

MS (ES<sup>+</sup>)  $m/z$ : 364.2 (M+ H)<sup>+</sup>, 749.5 (2M+Na)<sup>+</sup>.

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta_H$  (ppm) 0.80 (t, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz), 1.40 (m, 4H, 2 x CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.08 (m, 4H, H<sub>3</sub>&H<sub>4</sub>), 3.09 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>-NH), 4.05 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 4.99 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 5.90 (m, 1H, NHCO), 6.15 et 6.72 (m, 2H, 2 x CH<sub>2</sub>-NH), 7.2 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta_C$  (ppm) 10.33, 21.72, 28.42, 31.71, 40.24, 40.42, 53.26, 64.94, 65.75, 126.99, 127.14, 127.51, 135.13, 155.37, 170.18, 171.68.

**5°- L-Z-5-N-isobutyl-Gln-OBn: (S) 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-(isobutylamino)-5-oxopentanoate de benzyle**



Produit 14

C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Masse molaire : 426.51 g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc

Rdt = 78%

P<sub>f</sub> = 88-92°C

t<sub>r</sub> = 2.39 min

$R_f = 0.31$  (AcOEt /Et<sub>2</sub>O, 7/3)

$[\alpha]_D^{20} : -27.2$  (c = 1g/100 mL, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

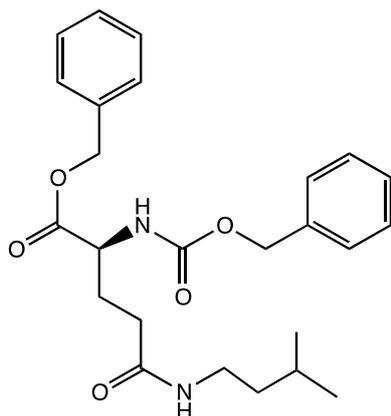
MS (ES<sup>+</sup>)  $m/z$ : 427.1 (M+ H)<sup>+</sup>, 465.1 (M+Na)<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta_H$  (ppm) 0.81 (d, 6H, 2 x CH<sub>3</sub> (iBu), <sup>3</sup>J = 6.66 Hz), 1.78 (m, 2H, H<sub>3</sub>), 2.14 (m, 3H, CH (iBu) & H<sub>4</sub>), 2.96 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-NH, <sup>3</sup>J = 6.35 Hz), 4.32 (m, 1H, H<sub>2</sub>),

5.02 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 5.08 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (OBn)), 5.67 (d, 1H, NH-CO, <sup>2</sup>J = 7.78 Hz), 5.78 (s, 1H, CH<sub>2</sub>-NH-CO), 7.32 (m, 10H, 2 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ<sub>C</sub> (ppm) 19.97, 28.43, 28.7, 32.52, 46.99, 53.65, 67.09, 67.33, 128.12, 128.22, 128.41, 128.54, 128.67, 135.21, 136.17, 157.47, 171.76, 171.83.

**6° - L-Z-5-N-isopentyl-Gln-OBn: (S) 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-(isopentylamino)-5-oxopentanoate de benzyle**



Produit 15

C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Masse molaire : 440.3 g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc

**Rdt** = 83%

**P<sub>f</sub>** = 75-78°C

**t<sub>r</sub>** = 2.07 min

**R<sub>f</sub>** = 0.34 (AcOEt /Et<sub>2</sub>O, 7/3)

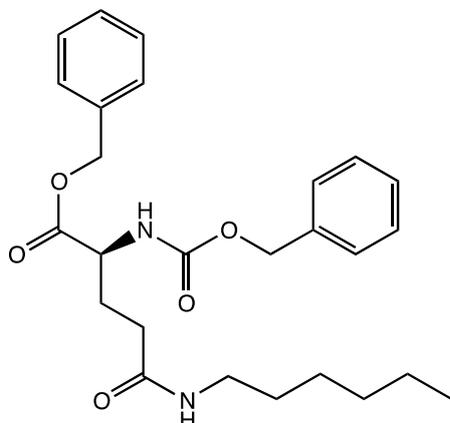
**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>**: -22.8(c = 1g/100 mL, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 441.2 (M+ H)<sup>+</sup>, 463.2 (M+Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ<sub>H</sub> (ppm) 0.79 (d, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH, <sup>3</sup>J = 6.60 Hz), 1.23 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 1.48 (m, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-), 1.89 (m, 2H, H<sub>3</sub>), 2.08 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 3.11 (td, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH, <sup>3</sup>J = 6.33 Hz, <sup>3</sup>J = 7.51 Hz), 4.28 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 5.00 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 5.06 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (OBn)), 5.70 (m, 2H, 2 x NH-CO), 7.20 (m, 10H, 2 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ<sub>C</sub> (ppm) 21.86, 25.25, 27.94, 29.12, 31.62, 37.38, 37.79, 51.59, 66.46, 66.70, 127.49, 127.61, 127.79, 127.94, 128.07, 134.67, 135.64, 154.51, 171.09, 171.29.

7°- L-Z-5-N-hexyl-Gln-OBn : (S) 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-(hexylamino)-5-oxopentanoate de benzyle



Produit 16

C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Masse molaire : 454.56g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc

Rdt = 82%

P<sub>f</sub> = 80°C

t<sub>r</sub> = 2.07 min

R<sub>f</sub> = 0.46 (AcOEt /Et<sub>2</sub>O, 7/3)

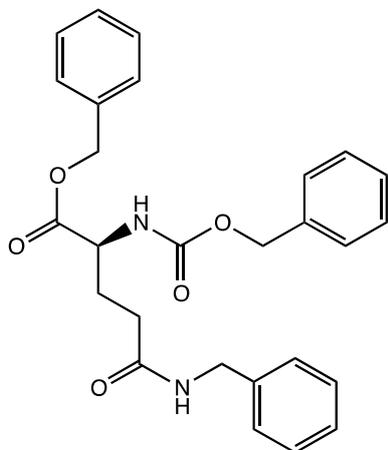
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -15.3 (c = 1g/100 mL, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

MS (ES<sup>+</sup>) m/z: 455.2 (M+ H)<sup>+</sup>, 477.1 (M+Na)<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ<sub>H</sub> (ppm) 0.76 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 6.77 Hz), 1.17 (s, 6H, CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-), 1.35 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 1.89 (m, 2H, H<sub>3</sub>), 2.09 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 3.08 (td, 2H, CH<sub>2</sub>-NH, <sup>3</sup>J = 9.17 Hz, <sup>3</sup>J = 6.71 Hz), 4.28 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 5.00 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 5.05 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (OBn)), 5.67 (m, 2H, 2 x NH-CO), 7.20 (m, 10H, 2 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ<sub>C</sub> (ppm) 11.85, 20.26, 24.50, 26.45, 27.31, 29.29, 30.30, 37.31, 51.50, 64.89, 65.13, 125.91, 126.02, 126.22, 126.36, 126.48, 133.06, 134.03, 154.16, 169.45, 169.66.

**8°- L-Z-5-N-Bn-Gln-OBn: (S) 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-(benzylamino)-5-oxopentanoate de benzyle**



Produit 17

$C_{27}H_{28}N_2O_5$

Masse molaire :  $460.2 \text{ g mol}^{-1}$

Solide blanc

**Rdt** = 86%

**P<sub>f</sub>** = 103-105°C

**t<sub>r</sub>** = 2.07 min

**R<sub>f</sub>** = 0.4 (AcOEt /Et<sub>2</sub>O, 7/3)

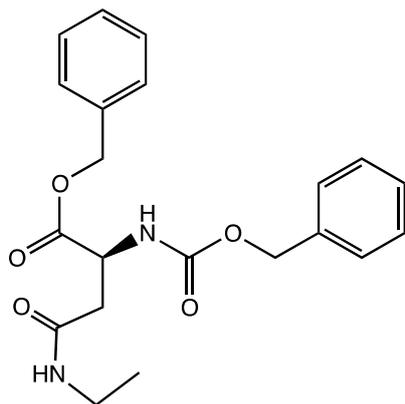
**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>**: -25.7 (c = 1g/100 mL, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 461.1 (M+ H)<sup>+</sup>, 483.2 (M+Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ<sub>H</sub> (ppm) 2.04 (m, 4H, H<sub>3</sub>&H<sub>4</sub>), 4.29 (m, 3H, H<sub>2</sub> & CH<sub>2</sub>-NH), 4.99 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 5.06 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (OBzl)), 5.60 (d, 1H, NHCO, <sup>3</sup>J=7.38 Hz), 5.93 (s, 1H, NHCO), 7.17-7.24 (m, 15H, 3 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ<sub>C</sub> (ppm) 27.12, 30.84, 42.24, 52.13, 65.63, 65.87, 126.06, 126.36, 126.66, 126.75, 126.97, 127.07, 127.20, 127.24, 133.73, 134.70, 136.65, 154.82, 170.11, 170.31.

**9°- L-Z-4-N-Et-Asn-OBn: (S) 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-4-(ethylamino)-4-oxobutanoate de benzyle**

Produit 28C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Masse molaire : 384.43g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc

**Rdt** = 86%**P<sub>f</sub>** = 88-90°C**t<sub>r</sub>** = 2.07 min**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>**: -35.0 (c = 1g/100 mL, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 385.1 (M+ H)<sup>+</sup>, 407.2 (M+Na)<sup>+</sup>

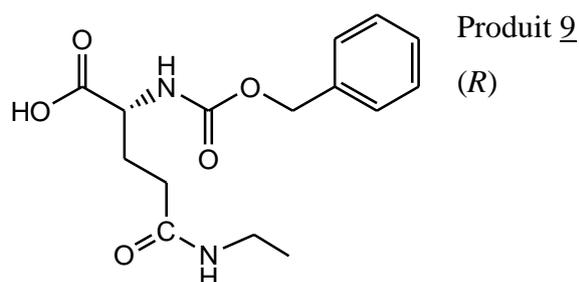
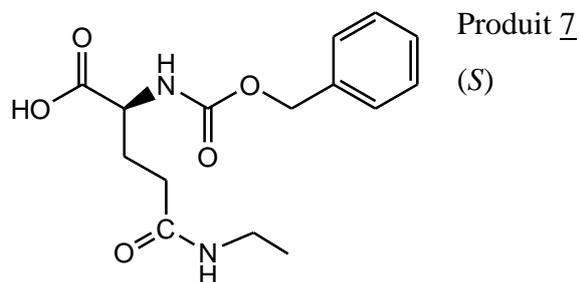
**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ<sub>H</sub> (ppm) 0.97 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.25 Hz), 2.57 (dd, 1H, H<sub>3a</sub>, <sup>2</sup>J = 15.51 Hz, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz), 2.80 (dd, 1H, H<sub>3b</sub>, <sup>2</sup>J = 15.51 Hz, <sup>3</sup>J = 5.4 Hz), 3.10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 4.50 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 5.02 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 5.10 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (OBn)), 5.45 (m, 1H, NHCO), 6.04 (s, 1H, NHCO), 7.17-7.24 (m, 10H, 2 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ<sub>C</sub> (ppm) 16.17, , 36.15, 39.26, 52.39, 68.69, 69.25, 129.66, 129.82, 129.90, 130.05, 130.21, 130.27, 137.04, 138.13, 158.02, 171.02, 172.68.

### **B- Procédure générale de synthèse de la Z-théanine par micro-onde:**

Le réactif (*L* et *D*) Z-Glu(OCH<sub>3</sub>)-OH (1eq, 2 mmoles) a été mis dans un réacteur à micro-onde d'un volume de (0.5 à 2.0 mL), une solution d'éthylamine dans le THF 2M ou de la propylamine (6eq, 12 mmoles) a ensuite été ajoutée. Le réacteur est fermé par une capsule et chauffé sous irradiation du micro-onde à 80°C pendant 4 heures. A la fin de la réaction la suspension est dissoute dans de l'Acétate d'éthyle et lavée deux fois avec d'une solution concentrée de NH<sub>4</sub>Cl ; la phase organique est ensuite séchée sur MgSO<sub>4</sub>, et concentrée sous pression réduite. Le résidu est solubilisé dans un mélange eau/ACN ; les produits sont obtenus après une lyophilisation de ce dernier.

1°- Z-5-N-Et-Gln-OH : l'acide 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-(éthylamino) oxopentanoïque :



$C_{15}H_{20}N_2O_5$

Masse molaire :  $308.3 \text{ g mol}^{-1}$

Solide blanc

Rdt = 78%

**Produit 7 :**

$[\alpha]_D^{20}$ : -11.0 (c = 1g/100 mL, MeOH)

**HPLC Chirale (analytique) :** Chiralcel-OD (87/13) H<sub>2</sub>O/ACN, 0.6 mL/min, 45 min, 214 nm,  $t_r$  = 30.28 min

**Produit 9 :**

$[\alpha]_D^{20}$ : 11.0 (c = 1g/100 mL, MeOH)

**HPLC Chirale (analytique) :** Chiralcel-OD (87/13) H<sub>2</sub>O/ACN, 0.6 mL/min, 45 min, 214 nm,  $t_r$  = 34.17 min

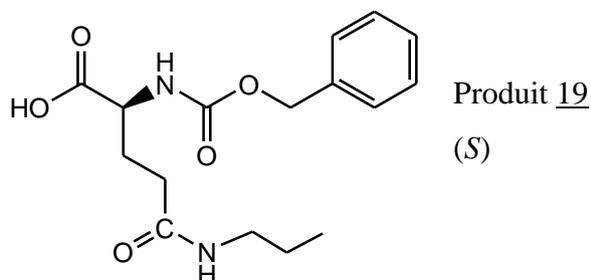
$t_r$  = 1.42 min

**MS (ES<sup>+</sup>) m/z:** 309.2 (M+ H)<sup>+</sup>, 331.1 (M+ Na)<sup>+</sup>.

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO (d<sub>6</sub>)) :**  $\delta_H$  (ppm) 1.02 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.3 Hz), 2.08 (m, 2H, H<sub>3</sub>), 2.17 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 3.24 (q, 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.3 Hz), 4.43 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 5.02 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 7.28 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO ( $d_6$ )) :  $\delta_C$  (ppm) 14.27, 25.73, 33.36, 37.22, 53.51, 67.6, 128.1, 128.31, 128.42, 135.09, 156.2, 171.59, 171.84.

2°- **Z-5-N-Pr-Gln-OH** : l'acide 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-(propylamino) oxopentanoïque :



$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$

Masse molaire : 322.4 g mol $^{-1}$

Solide blanc

Rdt = 100%

$[\alpha]_D^{20}$ : 2.5 (c = 1g/100 mL, DMSO)

$t_r$  = 1.53 min

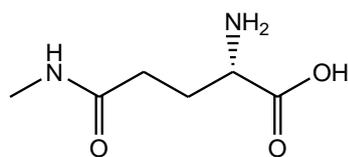
MS ( $\text{ES}^+$ )  $m/z$ : 323.2 ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$ , 345.1 ( $\text{M} + \text{Na}$ ) $^+$ .

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO ( $d_6$ )) :  $\delta_H$  (ppm) 0.88 (t, 3H,  $\underline{\text{CH}}_3\text{-CH}_2$ ,  $^3J = 7.47$  Hz), 1.54 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{-}\underline{\text{CH}}_2\text{-CH}_2$ ), 1.90 (m, 2H,  $\text{H}_3$ ), 2.07 (m, 2H,  $\text{H}_4$ ), 2.97 (t, 2H,  $\underline{\text{CH}}_2\text{-NH}$ ,  $^3J = 7.09$  Hz), 3.71 (m, 1H,  $\text{H}_2$ ), 5.01 (s, 2H,  $\underline{\text{CH}}_2\text{-Ph}$  (Z)), 7.28 (m, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ).

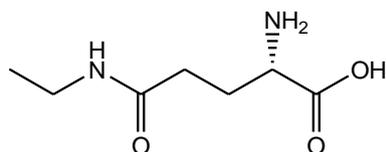
RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO ( $d_6$ )) :  $\delta_C$  (ppm) 11.32, 22.31, 28.75, 32.10, 40.27, 55.19, 65.04, 127.54, 127.63, 128.27, 137.21, 155.42, 172.05, 174.18.

### C- Procédure générale de déprotection des groupements OBn et Z :

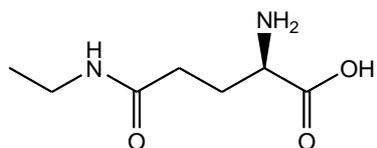
A une solution de dérivés protégés en C-term par un ester benzylique et /ou en N-term par un groupement benzyloxycarbonyle (Z) dans le THF, on ajoute de l'hydroxyde de palladium activé sur charbon ( $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ ) 20% en masse). Le mélange réactionnel est placé dans un ballon monocol sous atmosphère d'hydrogène à l'aide d'un ballon de baudruche. La réaction d'hydrolyse est suivie par HPLC jusqu'à disparition totale des dérivés protégés ; le THF est évaporé puis le résidu obtenu est solubilisé dans de l'eau, puis filtré sur célite et le Pd/C est rincé à l'éthanol. Le filtrat est évaporé sous pression réduite, le produit est obtenu après lyophilisation.

**1°- (L) 5-N-méthylglutamine :**Produit 20 $C_6H_{12}N_2O_3$ Masse molaire :  $160.17\text{g mol}^{-1}$ 

Solide blanc

**Rdt** = 98%**P<sub>f</sub>** = 190-195°C**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>** : +6.1 (c = 1g/100 mL, H<sub>2</sub>O)**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 161.1 (M+ H)<sup>+</sup>**HRMS** = 161.0879 g/mol (Masse calculée = 161.0881 g/mol).**RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O)** :  $\delta_H$  (ppm) 2.05 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 2.38 (m, 2H, H<sub>3</sub>), 2.76 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-NH), 3.58 (t, 1H, H<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 6.95 Hz).**RMN<sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O)**:  $\delta_C$  (ppm) 25.94, 28.33, 31.86, 54.64, 175.47, 175.77.**2°- 5-N-éthylglutamine ou Théanine:**Produit 10

(S)

 $C_7H_{14}N_2O_3$ Masse molaire :  $174.2\text{g mol}^{-1}$ Produit 11

(R)

Solide blanc

**Rdt** = quantitatif**P<sub>f</sub>** = 215-219°C**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>**-produit 10 : +8.4 (1g/100 mL, H<sub>2</sub>O)**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>** litt : + 8.1 (c=5, H<sub>2</sub>O)**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>**-produit 11 : - 8.3 (1g/100 mL, H<sub>2</sub>O)

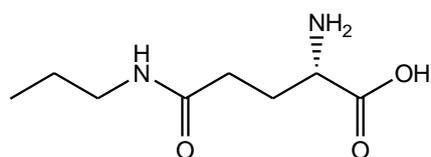
**MS (ES<sup>+</sup>) *m/z*:** 175.1 (M+ H)<sup>+</sup>, 197.1 (M+Na)<sup>+</sup>

**HRMS** = 175.1039 g/mol (Masse calculée = 175.1038 g/mol).

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ<sub>H</sub> (ppm) 1.08 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.32 Hz), 2.01 (m, 2H, H<sub>3</sub>), 2.37 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 3.17 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-NH, <sup>3</sup>J = 7.32 Hz), 3.74 (t, 1H, H<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 6.16 Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ<sub>C</sub> (ppm) 13.41, 26.54, 31.73, 34.57, 53.65, 173.95, 174.29.

### 3°- 5-N-propylglutamine:

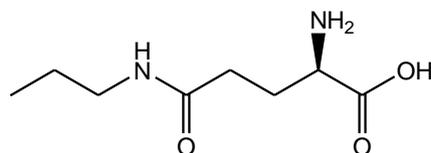


Produit 21

(S)

C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Masse molaire : 188.22g mol<sup>-1</sup>



Produit 21'

(R)

Solide blanc

**Rdt** = 96%

**P<sub>f</sub>** = 215-219°C

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** -produit 21 : +13.9 (1g/100mL, H<sub>2</sub>O).

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** -produit 21' : -14.0 (1g/100mL, H<sub>2</sub>O)

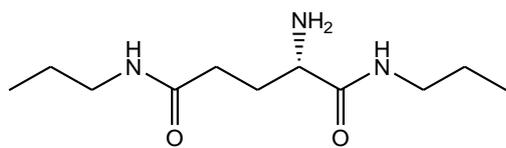
**MS (ES<sup>+</sup>) *m/z*:** 189.2 (M+ H)<sup>+</sup>

**HRMS** = 189.1239 g/mol (Masse calculée = 189.1239 g/mol).

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ<sub>H</sub> (ppm) 0.82 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.43 Hz), 1.45 (td, 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.24 Hz, <sup>3</sup>J = 6.96 Hz), 2.05 (m, 2H, H<sub>3</sub>), 2.31 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 3.08 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-NH, <sup>3</sup>J = 6.96 Hz), 3.64 (t, 1H, H<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ<sub>C</sub> (ppm) 10.63, 21.79, 27.21, 31.83, 41.33, 54.43, 174.75, 175.04.

Clicours.COM

3°- (*L*)  $N^1, N^5$ -dipropyl-glutadiamide: (*S*) 2-amino- $N^1, N^5$ -dipropylpentanediamideProduit 28 $C_{12}H_{25}N_3O_2$ Masse molaire : 229.32g mol<sup>-1</sup>

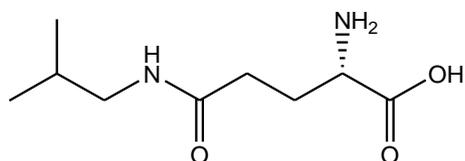
Solide blanc

Rdt = 86%

 $P_f = 220-223^\circ\text{C}$ MS (ES<sup>+</sup>)  $m/z$ : 230.1 (M+H)<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta_H$  (ppm) 0.83 (t, 6H, 2 x  $\underline{\text{CH}_3}$ -CH<sub>2</sub>), <sup>3</sup> $J = 7.24$  Hz), 1.46 (m, 4H, 2 x CH<sub>3</sub>- $\underline{\text{CH}_2}$ ), 1.82 (m, 2H, H<sub>3</sub>), 2.22 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 3.08 (t, 4H, 2 x  $\underline{\text{CH}_2}$ -NH), <sup>3</sup> $J = 6.93$  Hz), 3.08 (t, 1H, H<sub>2</sub>, <sup>3</sup> $J = 6.14$  Hz).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta_C$  (ppm) 9.11, 9.16, 20.31, 20.35, 29.20, 30.61, 39.61, 39.73, 52.79, 173.81, 175.12.

4°- (*L*) 5-N-isobutylglutamine:Produit 22 $C_9H_{18}N_2O_3$ Masse molaire : 202.25g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc

Rdt = 99%

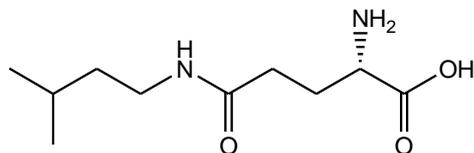
 $P_f = 209-212^\circ\text{C}$  $[\alpha]_D^{20}$ : 12.3 (c = 1g/100 mL, H<sub>2</sub>O)MS (ES<sup>+</sup>)  $m/z$ : 203.2 (M+H)<sup>+</sup>, 226.2 (M+Na)<sup>+</sup>

HRMS = 203.1393 g/mol (Masse calculée = 203.1396 g/mol).

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta_H$  (ppm) 0.87 (d, 6H, 2 x CH<sub>3</sub> (iBu), <sup>3</sup> $J = 6.71$  Hz), 1.76 (dt, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>- $\underline{\text{CH}}$  (iBu), <sup>3</sup> $J = 6.87$  Hz, <sup>3</sup> $J = 6.71$  Hz), 2.05 (m, 2H, H<sub>3</sub>), 2.37 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 3.01 (d, 2H,  $\underline{\text{CH}_2}$ -NH, <sup>3</sup> $J = 6.87$  Hz), 3.60 (t, 1H, H<sub>2</sub>, <sup>3</sup> $J = 6.86$  Hz).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):**  $\delta_{\text{C}}$  (ppm) 19.30, 27.54, 27.81, 31.89, 46.95, 54.53, 174.89, 175.55.

**5°- (L) 5-N-isopentylglutamine:**



Produit 23

$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$

Masse molaire :  $216.28\text{ g mol}^{-1}$

Solide blanc

$P_f = 207\text{-}210^\circ\text{C}$

**Rdt** = 96%

$[\alpha]_D^{20}$ : +6.2 (c = 1g/100 mL,  $\text{H}_2\text{O}$ + 10% TFA)

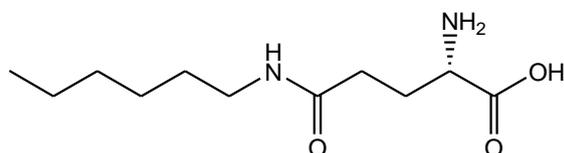
**MS ( $\text{ES}^+$ )  $m/z$ :** 217.2 (M + H) $^+$ , 437.4 (2M + H) $^+$

**HRMS** = 217.1541 g/mol (Masse calculée = 217.1552 g/mol).

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ + 10% TFA):**  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) 0.88 (d, 6H, 2 x  $\text{CH}_3$ ,  $^3J = 6.61$  Hz), 1.38 (td, 2H,  $\underline{\text{CH}_2}\text{-CH}_2$ ,  $^3J = 7.20$  Hz,  $^3J = 7.03$  Hz), 1.59 (dt, 1H,  $(\text{CH}_3)_2\text{-CH-CH}_2$ ,  $^3J = 7.03$  Hz,  $^3J = 6.61$  Hz), 2.15 (m, 2H,  $\text{H}_3$ ), 2.42 (m, 2H,  $\text{H}_4$ ), 3.20 (t, 2H,  $\underline{\text{CH}_2}\text{-NH}$ ,  $^3J = 7.20$  Hz), 3.94 (t, 1H,  $\text{H}_2$ ,  $^3J = 6.30$  Hz).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 10% TFA):**  $\delta_{\text{C}}$  (ppm) 21.54, 25.05, 25.72, 31.18, 37.07, 37.84, 51.97, 171.26, 173.73.

**6°- (L) 5-N-hexylglutamine:**



Produit 24

$\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$

Masse molaire :  $230.3\text{ g mol}^{-1}$

Solide blanc

**Rdt** quantitatif

$P_f = 201\text{-}204^\circ\text{C}$

$[\alpha]_D^{20}$ : +12.1 (c = 1g/100 mL,  $\text{H}_2\text{O}$ +10% TFA)

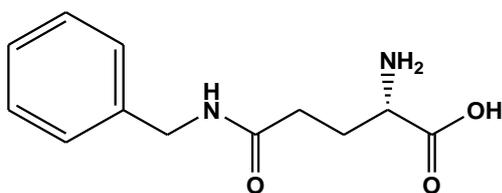
**MS ( $\text{ES}^+$ )  $m/z$ :** 231.3 (M + H) $^+$ , 253.2 (M + Na) $^+$

**HRMS** = 231.1693 g/mol (Masse calculée = 231.1709 g/mol).

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O, 10% TFA)** : δ<sub>H</sub> (ppm) 0.81 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz), 1.23 (s, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 1.45 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 2.20 (m, 2H, H<sub>3</sub>), 2.44 (t, 2H, H<sub>4</sub>, <sup>3</sup>J = 7.72 Hz), 3.13 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH, <sup>3</sup>J = 6.85 Hz), 4.06 (t, 1H, H<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 6.44 Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, D<sub>2</sub>O, 10% TFA)**: δ<sub>C</sub> (ppm) 13.56, 21.92, 25.72, 25.85, 28.17, 30.69, 31.28, 40.05, 52.56, 171.39, 173.85.

**7°- (L) 5-N-benzylglutamine:**



Produit 25

C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Masse molaire : 236. 27g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc

**Rdt** = 99%

**P<sub>f</sub>** = 220-222°C

**tr** = 0.94 min

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>**: +5.9 (c = 1g/100 mL, H<sub>2</sub>O+ 10% TFA)

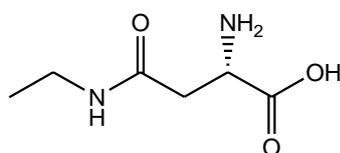
**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 237.2 (M + H)<sup>+</sup>, 260.2 (M + Na)<sup>+</sup>, 473.4(2M + H)<sup>+</sup>

**HRMS** = 237.1213 g/mol (Masse calculée = 231.1239 g/mol).

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O+10% TFA)**: δ<sub>H</sub> (ppm) 2.19 (m, 2H, H<sub>3</sub>), 2.46 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 4.04 (t, 1H, H<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 6.49 Hz), 4.31 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-NH). 7.24-7.36 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O+10% TFA)**: δ<sub>C</sub> (ppm) 25.85, 30.92, 42.57, 52.98, 127.27, 127.51, 128.83, 138.52, 171.34, 174.29.

**8°-(L)-4-N-Et-Asn: acide (S)-2-amino-4-(éthylamino)-4-oxobutanoïque**



Produit 29

C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Masse molaire : 160. 17g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc

**Rdt** = 97%

**P<sub>f</sub>** = 195-198°C

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>**: +5.7 (c = 1g/100 mL, H<sub>2</sub>O)

**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 161.2 (M+ H)<sup>+</sup>, 183.2 (M+ Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O + 5% TFA)** : δ<sub>H</sub> (ppm) 1.10 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.31 Hz), 2.58 (dd, 1H, H<sub>3a</sub>, <sup>3</sup>J = 8.75 Hz, <sup>2</sup>J = 15.70 Hz), 2.76 (dd, 1H, H<sub>3b</sub>, <sup>3</sup>J = 4.19 Hz, <sup>2</sup>J = 15.42 Hz), 3.19 (q, 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.27 Hz), 3.80 (dd, 1H, H<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 8.75 Hz, <sup>3</sup>J = 4.19 Hz).

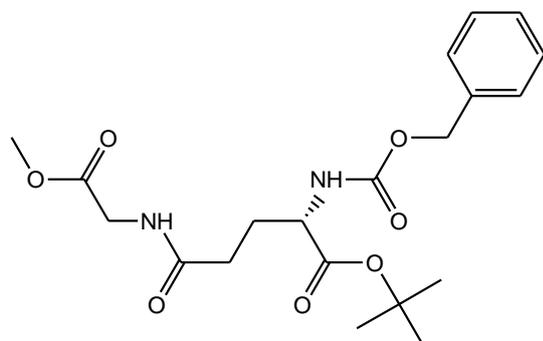
**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O + 5% TFA)** : δ<sub>C</sub> (ppm) 15.67, 36.73, 40.27, 54.70, 174.48, 179.28.

## II - Synthèse des γ dipeptides de l'acide glutamique :

### A - Procédure générale de la synthèse des dipeptides Z-Glu(Xaa-OMe)-OtBu:

A une solution de (S) Z-Glu-OtBu (674 mg, 2 mmoles, 1 éqt) dans du THF (10 mL), la NMM (0.36 mL, 4 mmoles, 2 éqts) et l'IBCF (0.56mL, 4 mmoles, 2 éqts) sont ajoutés sous argon et à -20°C pendant 10 min ; puis le chlorhydrate de l'ester méthylique d'acide aminé (S) Cl<sup>-</sup>, <sup>+</sup>H<sub>3</sub>N-Xaa-OMe (2 mmoles, 1éqt) est ajouté. La réaction est laissée à 0°C pendant 30 min, puis à température ambiante pendant 6h. Le solvant est ensuite évaporé et le brut ainsi obtenu est extrait avec de l'AcOEt. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu obtenu est purifié sur colonne de gel de silice.

### 1° - Dipeptide Z-(L)-Glu(Gly-OMe)-OtBu (33):



Produit 33

C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

Masse molaire : 408. 4g mol<sup>-1</sup>

Huile

**Rdt** = 80%

**t<sub>r</sub>** = 1.98 min

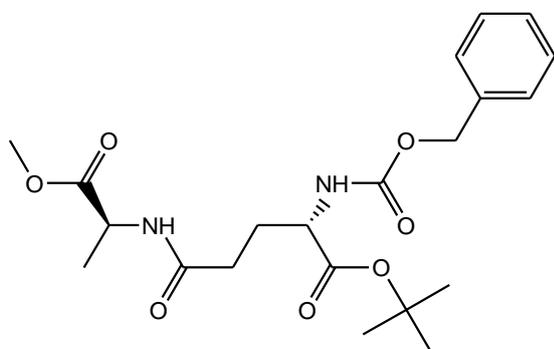
$R_f = 0.58$  (AcOEt/CHX; 7/3)

**MS (ES<sup>+</sup>)  $m/z$ :** 409.1 (M+H)<sup>+</sup>, 431.1 (M+Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) :**  $\delta_H$  (ppm) 1.39 (s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub> (tBu)), 1.73 (m, 1H, H <sub>$\beta$ a (Glu)), 1.93 (m, 1H, H <sub>$\beta$ b (Glu)), 2.31 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)), 3.74 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) 3.8 (s, 2H, H<sub>2</sub> (Gly)), 3.94 (m, 1H, H<sub>2</sub> (Glu)), 5.04 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 7.36 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.64 (s, 2H, NHCO).</sub></sub>

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) :**  $\delta_C$  (ppm) 26.48, 28.05, 30.43, 52.97, 54.22, 65.87, 81.11, 128.17, 128.29, 128.80, 137.44, 156.58, 168.55, 171.75, 174.13.

**2° - Dipeptide Z-(L)-Glu(-L)-Ala-OMe)-OtBu (34):**



Produit 34

C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

Masse molaire : 422. 5g mol<sup>-1</sup>

Huile

**Rdt** = 84%

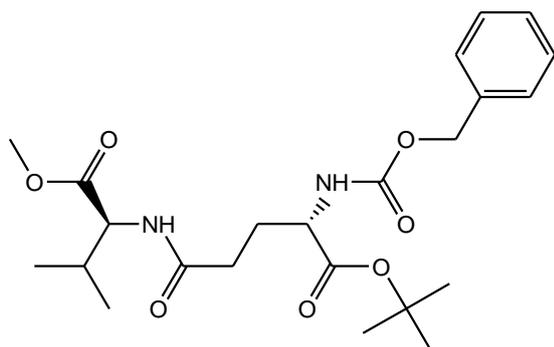
**t<sub>r</sub>** = 2.06 min

$R_f = 0.52$  (AcOEt/CHX; 7/3)

**MS (ES<sup>+</sup>)  $m/z$ :** 423.0 (M+H)<sup>+</sup>, 445.1 (M+Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, MeOD) :**  $\delta_H$  (ppm) 1.46 (s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub> (tBu)), 1.54 (d, 3H, CH<sub>3</sub> (Ala), <sup>3</sup>J = 7.21 Hz), 1.94 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 2.2 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.49 (t, 2H, H<sub>4</sub>, <sup>3</sup>J = 7.48 Hz), 3.92 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.08 (q, H, H<sub>2</sub> (Ala), <sup>3</sup>J = 7.21 Hz), 4.11 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 9.27 Hz, <sup>3</sup>J = 5.16 Hz), 5.08 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 7.32 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, MeOD) :**  $\delta_C$  (ppm) 14.75, 26.41, 26.79, 29.72, 52.29, 54.16, 66.2, 81.49, 127.41, 127.59, 128.06, 136.83, 157.26, 170.02, 171.59, 175.30.

**3°- Dipeptide Z-(L)-Glu((L)-Val-OMe)-OtBu (35):**Produit 35 $C_{23}H_{34}N_2O_7$ Masse molaire : 450. 5g mol<sup>-1</sup>

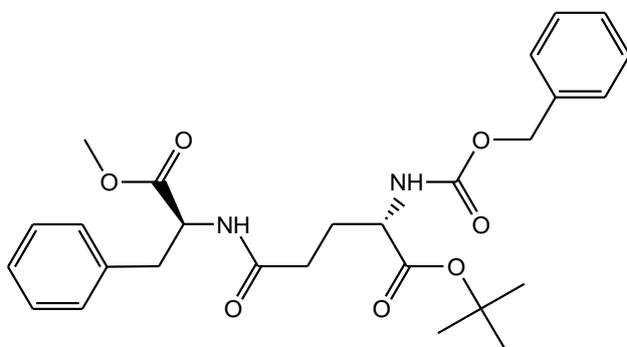
Solide blanc

Rdt = 81%

P<sub>f</sub> = 68-71°Ct<sub>r</sub> = 2.12 minR<sub>f</sub> = 0.42 (AcOEt/CHX; 6/4)MS (ES<sup>+</sup>) m/z: 451.1 (M+ H)<sup>+</sup>, 473.2 (M+Na)<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ<sub>H</sub> (ppm) 1.08, 1.1 (dd, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH (Val), <sup>3</sup>J = 6.93 Hz, <sup>3</sup>J = 5.16 Hz), 1.40 (s, 9H, OtBu), 1.88 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 2.11 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.38 (m, 3H, H<sub>4</sub> (Glu), & H<sub>3</sub> (Val)), 3.76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.88 (d, 1H, H<sub>2</sub> (Val), <sup>3</sup>J = 4.3 Hz), 4.23 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 9.92 Hz, <sup>3</sup>J = 4.97 Hz), 5.04 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 7.26-7.32 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ<sub>C</sub> (ppm) 18.28, 27.94, 29.86, 29.90, 52.93, 53.65, 58.59, 67.09, 77.21, 82.88, 128.11, 128.20, 128.53, 156.05, 168.76, 171.42, 177.15.

**4°- Dipeptide Z-(L)-Glu(-(L)-Phe-OMe)-OtBu (36):**Produit 36 $C_{27}H_{34}N_2O_7$ Masse molaire : 498. 5g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc

Rdt = 91%

$P_f = 80-83^\circ\text{C}$

$t_r = 2.43 \text{ min}$

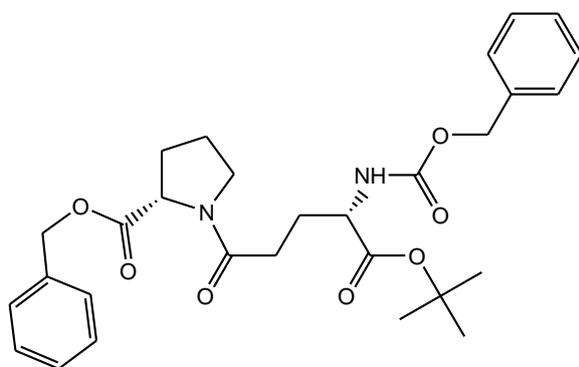
$R_f = 0.38$  (AcOEt/CHX; 4/6)

**MS (ES<sup>+</sup>)  $m/z$ :** 499.2 (M+ H)<sup>+</sup>, 522.3 (M+Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, MeOD) :**  $\delta_H$  (ppm) 1.35 (s, 9H, OtBu), 1.80 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 1.99 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.30 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)), 3.07 (dd, 1H, H<sub>3a</sub> (Phe), <sup>3</sup>J = 7.47 Hz, <sup>2</sup>J = 14.42 Hz), 3.15 (dd, 1H, H<sub>3b</sub> (Phe), <sup>3</sup>J = 6.10 Hz, <sup>2</sup>J = 14.42 Hz), 3.71 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.00 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 5.26 Hz, <sup>3</sup>J = 9.16 Hz), 4.23 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Phe), <sup>3</sup>J = 7.47 Hz, <sup>3</sup>J = 6.10 Hz), 4.99 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 7.15-7.32 (m, 10H, 2 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, MeOD) :**  $\delta_C$  (ppm) 26.41, 26.79, 29.72, 36.01, 52.18, 53.79, 54.16, 66.20, 81.49, 127.41, 127.59, 128.06, 128.74, 129.00, 129.06, 133.87, 136.90, 157.25, 169.05, 171.51, 174.88.

**5° - Dipeptide Z-(L)-Glu((L)-Pro-OBn)-OtBu (37):**



Produit 37

C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

Masse molaire : 524.3g mol<sup>-1</sup>

Huile

**Rdt = 89%**

$t_r = 2.56 \text{ min}$

$R_f = 0.41$  (AcOEt/CHX; 4/6)

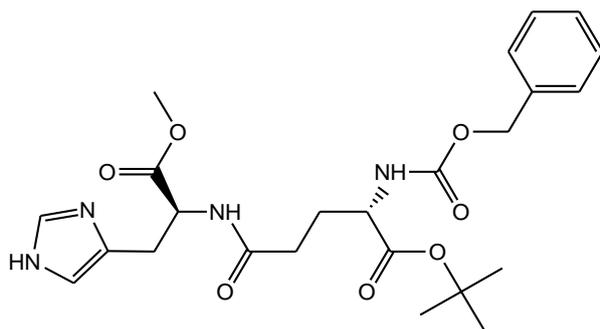
**MS (ES<sup>+</sup>)  $m/z$ :** 525.1 (M+ H)<sup>+</sup>, 547.1 (M+Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, MeOD) :**  $\delta_H$  (ppm) 1.41 (s, 9H, OtBu), 1.90 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 2.08 (m, 3H, H<sub>3b</sub> (Glu) & H<sub>4</sub> (Glu)), 2.40 (m, 4H, H<sub>3</sub> & H<sub>4</sub> (Pro)), 3.36 (m, 2H, H<sub>5</sub> (Pro)), 3.98 (dd,

1H, H<sub>2</sub> (Pro), <sup>3</sup>J = 7.42 Hz, <sup>3</sup>J = 6.16 Hz), 4.09 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 5.26 Hz, <sup>3</sup>J = 9.16 Hz), 5.08 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 5.28 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (OBzl)), 7.27-7.40 (m, 10H, 2 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, MeOD) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 23.07, 26.42, 26.79, 27.91, 29.74, 45.76, 54.16, 59.38, 66.20, 68.00, 81.49, 127.41, 127.59, 128.06, 128.29, 128.33, 128.43, 134.96, 157.13, 168.59, 171.59, 174.90.

**6° - Dipeptide Z-(L)-Glu((L)-His-OMe)-OtBu (38):**



Produit 38

C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>

Masse molaire : 488. 5g mol<sup>-1</sup>

Huile

**Rdt** = 75%

**t<sub>r</sub>** = 1.6 min

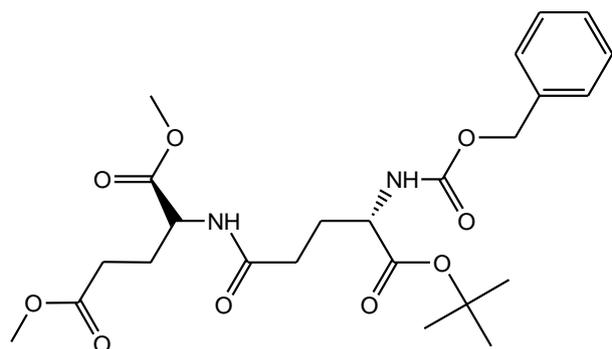
**R<sub>f</sub>** = 0.33 (AcOEt/CHX; 7/3)

**MS (ES<sup>+</sup>) m/z:** 489.1 (M+ H)<sup>+</sup>, 511.0 (M+Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, MeOD) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 1.42 (s, 9H, OtBu), 1.90 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 2.09 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.40 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)) <sup>3</sup>J = 7.47 Hz), 3.40 (dd, 1H, H<sub>3a</sub> (His), <sup>3</sup>J = 6.97 Hz, <sup>2</sup>J = 15.68 Hz), 3.49 (dd, 1H, H<sub>3b</sub> (His), <sup>3</sup>J = 6.97 Hz, <sup>2</sup>J = 15.68 Hz), 3.87 (s, 1H, OCH<sub>3</sub>), 4.10 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 5.22 Hz, <sup>3</sup>J = 9.14 Hz), 4.48 (t, 1H, H<sub>2</sub> (His), <sup>3</sup>J = 6.97 Hz), 5.10 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 7.29-7.36 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.25 (s, 1H, NC=CH (imid)), 8.93 (s, 1H, NHCH=N (imid)).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, MeOD) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 25.07, 26.41, 26.80, 29.73, 51.59, 52.77, 54.17, 66.21, 81.51, 118.36, 126.99, 127.41, 127.60, 128.06, 134.55, 136.82, 157.26, 167.97, 171.59, 174.89.

**7°- Dipeptide Z-(L)-Glu[-(L)-Glu-(OMe)-OMe]-OtBu (40):**



Produit 40

$C_{24}H_{34}N_2O_9$

Masse molaire :  $494.5 \text{ g mol}^{-1}$

Huile

**Rdt** = 78%.

**t<sub>r</sub>** = 2.0 min.

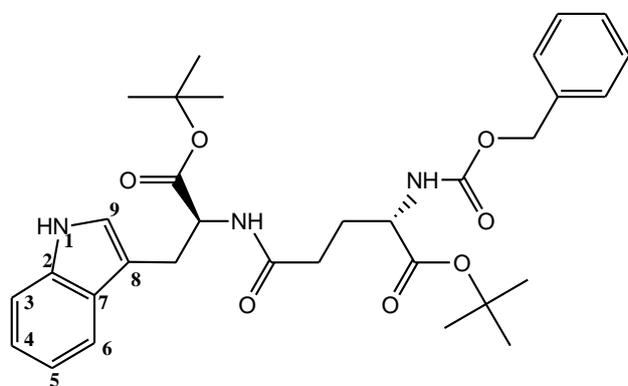
**R<sub>f</sub>** = 0.61 (AcOEt/CHX; 7/3)

**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 495.3 (M+ H)<sup>+</sup>, 517.2 (M+Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, MeOD)** :  $\delta_H$  (ppm) 1.48 (s, 9H, OtBu), 1.92 (m, 2H, 2x H<sub>3a</sub> (2xGlu)), 2.15 (m, 2H, 2x H<sub>3b</sub> (2xGlu)), 2.21 (m, 4H, H<sub>4</sub> (2xGlu)), 3.47, 3.51 (s, 2x3H, 2xOCH<sub>3</sub>), 3.90 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 9.40 Hz, <sup>3</sup>J = 4.27 Hz), 4.27 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 5.29 Hz, <sup>3</sup>J = 8.95 Hz), 4.95 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 7.09-7.18 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, MeOD)** :  $\delta_C$  (ppm) 26.21, 26.89, 27.01, 29.61, 31.44, 50.88, 51.46, 51.61, 54.29, 66.25, 66.56, 81.49, 127.51, 127.66, 128.12, 136.83, 157.19, 171.56, 172.25, 173.29, 173.49.

**8°- Dipeptide Z-(L)-Glu((L)-Trp-OtBu)-OtBu (39):**



Produit 39

$C_{32}H_{41}N_3O_7$

Masse molaire :  $579.3 \text{ g mol}^{-1}$

Huile

**Rdt** = 93%

$t_r = 2.6$  min

$R_f = 0.43$  (AcOEt/CHX; 3/7)

MS ( $ES^+$ )  $m/z$ : 580.2 ( $M+H$ )<sup>+</sup>, 602.3 ( $M+Na$ )<sup>+</sup>

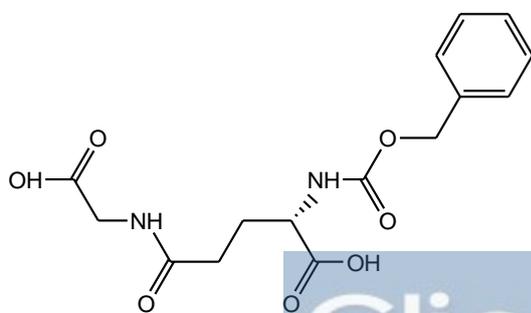
RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, MeOD) :  $\delta_H$  (ppm) 1.39, 1.44 (s, 2x9H, 2x OtBu), 1.87 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 2.08 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.30 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 7.50 Hz), 3.35 (m, 2H, H<sub>3</sub> (Trp)), 4.09 (m, 1H, H<sub>2</sub> (Trp)), 4.11 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 5.22 Hz, <sup>3</sup>J = 9.14 Hz), 5.08 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 7.06 (m, 2H, H<sub>4</sub>&H<sub>5</sub> (Trp)), 7.19 (s, 1H, H<sub>9</sub> (Trp)), 7.26-7.40 (m, 6H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> & H<sub>6</sub> (Trp)). 7.52-7.58 (d, 1H, H<sub>3</sub> (Trp), <sup>3</sup>J = 7.47 Hz).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, MeOD) :  $\delta_C$  (ppm) 26.43, 26.61, 26.79, 29.76, 53.69, 54.17, 66.21, 81.49, 83.60, 106.56, 111.22, 117.64, 118.86, 121.53, 123.98, 127.41, 127.59, 128.05, 136.96, 157.01, 168.13, 171.62, 175.00.

### B- Stratégie générale de saponification des esters méthylique, *tertiobutylique* et benzylique :

A une solution de différents dipeptides protégés (0.6 mmole) dans du THF (4 mL) on ajoute une solution de soude NaOH (80 mg, 2 M). Le mélange réactionnel est chauffé à 60°C. La réaction est suivie par HPLC jusqu'à l'hydrolyse totale des esters. A la fin de la réaction, le brut est lavé 3 fois avec de l'AcOEt, la phase aqueuse est acidifiée avec une solution d'HCl (3N) jusqu'à un pH égal à 2. Le mélange est extrait 3 fois avec de l'AcOEt, les phases organiques sont récupérées est séchées sur MgSO<sub>4</sub> anhydre puis évaporées sous pression réduite pour donner les  $\gamma$  dipeptides Z-(L)-Glu((L)-Xaa-OH)-OH.

#### 1°- Z-(L)-Glu(Gly-OH)-OH (41):



Produit 41

C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

Masse molaire : 338.1 g mol<sup>-1</sup>

Huile

Rdt = 63%

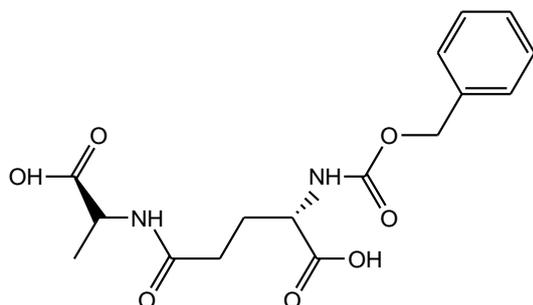
$t_r = 1.21$  min

**MS (ES<sup>+</sup>) *m/z*:** 339.2 (M+ H)<sup>+</sup>, 361.3 (M+Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 1.93 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 2.15 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.43 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu), <sup>3</sup>*J* = 7.34 Hz), 3.6 (s, 2H, H<sub>2</sub> (Gly)), 4.16 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>*J* = 5.00 Hz, <sup>3</sup>*J* = 9.18 Hz), 5.09 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 7.36-7.43 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 26.11, 30.07, 41.06, 53.72, 67.24, 127.61, 128.33, 128.72, 136.28, 157.92, 171.78, 176.14, 177.75.

**2°- Z-(L)-Glu((L)-Ala-OH)-OH (42):**



Produit 42

C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

Masse molaire : 352.3 g mol<sup>-1</sup>

Solide jaune

**Rdt** = 75%

**t<sub>r</sub>** = 1.3 min

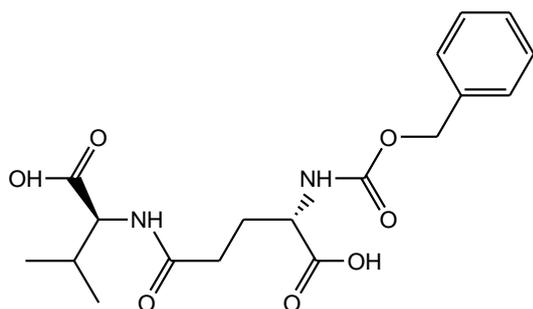
**P<sub>f</sub>** = 98-102 °C

**MS (ES<sup>+</sup>) *m/z*:** 353.0 (M+ H)<sup>+</sup>, 375.1 (M+Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O) :** δ (ppm) 1.58 (d, 3H, H<sub>3</sub> (Ala), <sup>3</sup>*J* = 7.26 Hz), 2.05 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 2.26 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.56 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu), <sup>3</sup>*J* = 7.31 Hz), 3.94 (q, H, H<sub>2</sub> (Ala), <sup>3</sup>*J* = 7.26 Hz), 4.28 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>*J* = 9.16 Hz, <sup>3</sup>*J* = 4.92 Hz), 5.08 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 7.47-7.55 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 15.87, 26.09, 30.07, 50.08, 53.70, 67.08, 127.60, 128.34, 128.73, 136.30, 157.97, 175.07, 176.14, 177.26.

**3°- Z-(L)-Glu((L)-Val-OH)-OH (43):**



Produit 43

$C_{18}H_{24}N_2O_7$

Masse molaire :  $380.4 \text{ g mol}^{-1}$

Solide blanc

Rdt = 78%

$P_f = 115\text{-}118^\circ\text{C}$

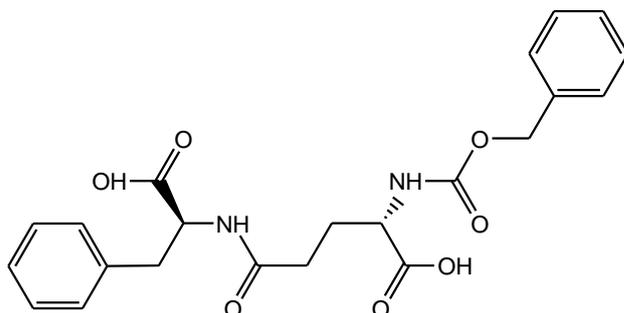
$t_r = 1.44 \text{ min}$

MS ( $ES^+$ )  $m/z$ : 381.1 ( $M+H$ )<sup>+</sup>, 403.1 ( $M+Na$ )<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O) :  $\delta_H$  (ppm) 1.10 (d, 6H, 2xCH<sub>3</sub> (Val), <sup>3</sup>J = 7.02 Hz), 1.95 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 2.14 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.29 (m, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH (Val), 2.45 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 7.34 Hz), 3.64 (d, 1H, H<sub>2</sub> (Val), <sup>3</sup>J = 4.37 Hz), 4.26 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 5.03 Hz, <sup>3</sup>J = 9.16 Hz), 5.10 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 7.32 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O) :  $\delta_C$  (ppm) 16.60, 17.80, 26.15, 29.02, 30.11, 53.80, 59.99, 67.06, 127.60, 128.33, 128.73, 136.27, 158.19, 173.78, 176.12, 177.29.

**4°- Z-(L)-Glu((L)-Phe-OH)-OH (44):**



Produit 44

$C_{22}H_{24}N_2O_7$

Masse molaire :  $428.4 \text{ g mol}^{-1}$

Huile

Rdt = 94%

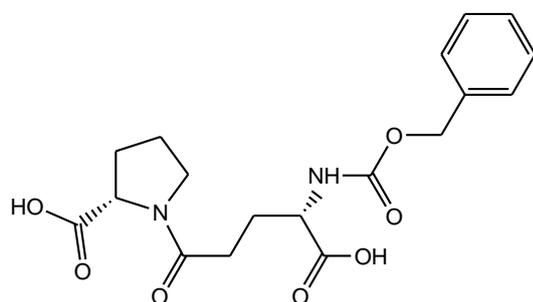
$t_r = 1.75 \text{ min}$

MS ( $ES^+$ )  $m/z$ : 429.1 ( $M+H$ )<sup>+</sup>, 451.2 ( $M+Na$ )<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, MeOD) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 1.95 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 2.15 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.46 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 7.49 Hz), 3.12 (dd, 1H, H<sub>3a</sub> (Phe), <sup>3</sup>J = 7.91 Hz, <sup>2</sup>J = 14.42 Hz), 3.29 (dd, 1H, H<sub>3b</sub> (Phe), <sup>3</sup>J = 5.26 Hz, <sup>2</sup>J = 14.42 Hz), 4.04 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Phe), <sup>3</sup>J = 5.26 Hz, <sup>3</sup>J = 7.91 Hz), 4.18 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 9.17 Hz, <sup>3</sup>J = 4.99 Hz), 5.11 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 7.30-7.45 (m, 10H, 2 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, MeOD) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 26.09, 30.07, 36.17, 53.70, 55.68, 67.07, 127.60, 127.70, 128.33, 128.73, 129.09, 129.32, 134.86, 136.28, 158.04, 173.48, 176.16, 177.24.

**5° - Z-(L)-Glu(-(L)-Pro-OH)-OH (45):**



Produit 45

C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

Masse molaire : 378. 5g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc

**Rdt** = 83%

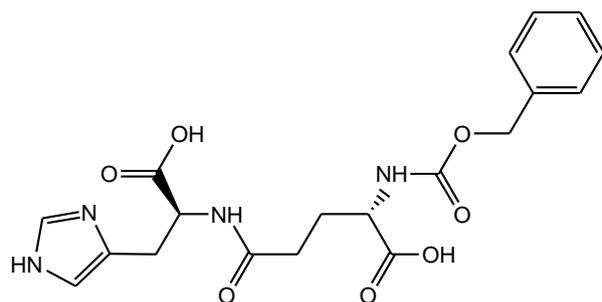
**P<sub>f</sub>** = 98-104°C

**t<sub>r</sub>** = 1.46 min

**MS (ES<sup>+</sup>) m/z:** 379.2 (M+ H)<sup>+</sup>, 401.2 (M+Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 2.04 (m, 5H, H<sub>3</sub> (Glu), H<sub>4</sub> (Pro), H<sub>3b</sub> (Pro)), 2.34 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Pro)), 2.45 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 7.32 Hz), 3.36 (m, 2H, H<sub>5</sub> (Pro)), 4.14 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Pro), <sup>3</sup>J = 8.74 Hz, <sup>3</sup>J = 6.23 Hz), 4.19 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 5.06 Hz, <sup>3</sup>J = 9.36 Hz), 5.10 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 7.34-7.40 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 23.65, 26.03, 28.83, 30.03, 46.04, 53.59, 60.97, 67.09, 127.59, 128.34, 128.73, 136.30, 157.97, 174.24, 175.99, 177.20.

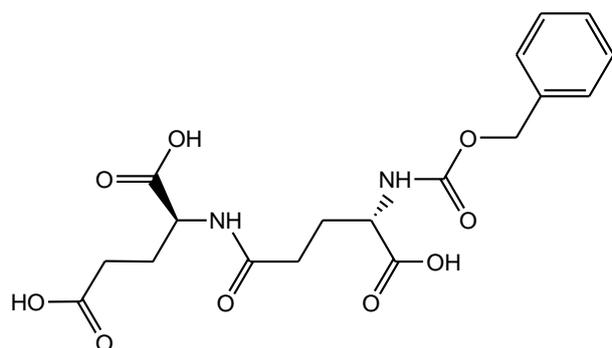
**6° - Z-(L)-Glu((L)-His-OH)-OH (46):**Produit 46 $C_{19}H_{22}N_4O_7$ Masse molaire : 418. 3g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc

**Rdt** = 52%**P<sub>f</sub>** = 90-95°C**t<sub>r</sub>** = 1.00 min**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 419.1 (M+ H)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O)** : δ<sub>H</sub> (ppm) 1.87 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 2.07 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.36 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 7.47 Hz), 3.29 (m, 2H, H<sub>3</sub> (His)), 4.01 (m, 2H, H<sub>2</sub> (Glu)&H<sub>2</sub> (His)), 5.10 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 7.29-7.36 (m, 6H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, NC=CH (imid.)), 8.59 (s, 1H, NHCH=N (imid.)).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O)** : δ<sub>C</sub> (ppm) 25.67, 27.10, 31.12, 53.48, 55.35, 66.86, 117.62, 127.34, 127.53, 128.23, 128.68, 133.88, 136.38, 157.81, 172.47, 178.32, 178.51.

**7° - Z-(L)-Glu((L)-Glu-(OH))-OH (48):**Produit 48 $C_{18}H_{22}N_2O_9$ Masse molaire : 410. 4 g mol<sup>-1</sup>

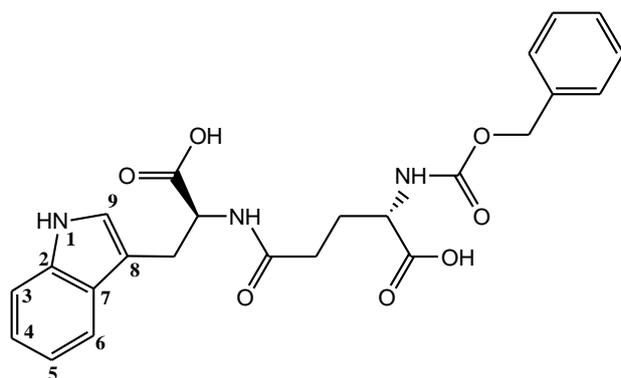
Huile.

**Rdt** = 58%**t<sub>r</sub>** = 1.12 min**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 411.1 (M+ H)<sup>+</sup>, 433.2 (M+Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 1.94 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu<sub>1</sub>)), 2.15 (m, 3H, H<sub>3b</sub> (Glu<sub>1</sub>)&H<sub>3</sub> (Glu<sub>2</sub>)), 2.44 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu<sub>1</sub>), <sup>3</sup>J = 7.33 Hz), 2.56 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu<sub>2</sub>), <sup>3</sup>J = 7.49 Hz), 3.83 (t, 1H, H<sub>2</sub> (Glu<sub>2</sub>), <sup>3</sup>J = 6.43 Hz), 4.17 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu<sub>1</sub>), <sup>3</sup>J = 4.99 Hz, <sup>3</sup>J = 9.19 Hz), 5.09 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 7.35-7.44 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 25.33, 26.06, 29.77, 30.04, 53.55, 53.62, 67.08, 127.60, 128.33, 128.72, 136.27, 157.95, 173.45, 176.02, 176.75, 177.20.

**8°- Z-(L)-Glu((L)-Trp-OH)-OH (47):**



Produit 47

C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>

Masse molaire : 467.2 g mol<sup>-1</sup>

Huile rosée

Rdt = 89%

tr = 1.75 min

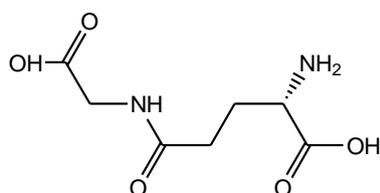
MS (ES<sup>+</sup>) m/z: 468.1 (M+ H)<sup>+</sup>, 490.2 (M+Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 1.74 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 1.94 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.28 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 7.50 Hz), 3.01 (dd, 1H, H<sub>3b</sub> (Trp), <sup>3</sup>J = 8.97 Hz, <sup>2</sup>J = 15.08 Hz), 3.31 (dd, 1H, H<sub>3a</sub> (Trp), <sup>3</sup>J = 5.06 Hz, <sup>2</sup>J = 15.08 Hz), 4.11 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Trp), <sup>3</sup>J = 5.06 Hz, <sup>3</sup>J = 8.97 Hz), 4.72 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 5.31 Hz, <sup>3</sup>J = 8.1 Hz), 5.01 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 6.96-7.06 (m, 2H, H<sub>4</sub> & H<sub>5</sub> (indole)), 7.21 (s, 1H, H<sub>9</sub> (indole)), 7.27-7.40 (m, 6H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> & H<sub>6</sub> (indole)), 7.47 (d, 1H, H<sub>3</sub> (indole), <sup>3</sup>J = 7.75 Hz), 7.59 (s, 1H, NH (indole)).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 26.89, 27.34, 30.86, 53.78, 54.89, 65.84, 109.38, 111.81, 118.85, 121.43, 124.75, 127.66, 128.13, 128.26, 128.82, 136.79, 137.45, 156.56, 171.15, 174.13, 174.44.

**C- Hydrogénolyse des dipeptides (41) à (48) :**

Les composés (41) à (48) sont hydrogénolysés selon la méthode décrite précédemment : dans ce chapitre partie (I) synthèse de la *D* et *L* 5-N-éthylglutamine (*D* et *L*-Théanine) et ses analogues N-alkylés, (page 182).

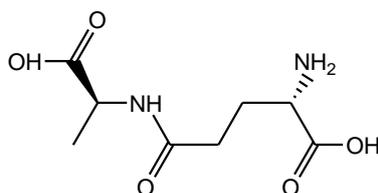
**1°- H-(L)-Glu(Gly-OH)-OH (49):**Produit 49 $C_7H_{12}N_2O_5$ Masse molaire : 204.2 g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc

**Rdt** = 89%**P<sub>f</sub>** = 110-113°C**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 205.2 (M+ H)<sup>+</sup>**HRMS** = 205.0824 g/mol (Masse calculée = 205.0824 g/mol).

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O)** : δ (ppm) 2.14 (m, 2H, H<sub>3</sub> (Glu)), 2.48 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 7.34 Hz), 3.72 (t, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 5.99 Hz), 3.78 (s, 2H, H<sub>2</sub> (Gly)).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O)** : δ<sub>C</sub> (ppm) 27.07, 31.70, 43.41, 54.51, 174.82, 175.50, 176.92.

**2°- (L)-Glu((L)-Ala-OH)-OH (50):**Produit 50 $C_8H_{14}N_2O_5$ Masse molaire : 218.2 g mol<sup>-1</sup>

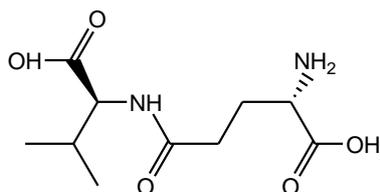
Solide blanc

**Rdt** = 93%**P<sub>f</sub>** = 119-125 °C**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 219.0 (M+ H)<sup>+</sup>, 241.1 (M+Na)<sup>+</sup>**HRMS** = 219.0978 g/mol (Masse calculée = 219.0981 g/mol).

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :**  $\delta$  (ppm) 1.35 (d, 3H,  $\text{H}_3$  (Ala),  $^3J = 7.25$  Hz), 2.09 (m, 2H,  $\text{H}_3$  (Glu)), 2.44 (t, 2H,  $\text{H}_4$  (Glu),  $^3J = 7.68$  Hz), 3.65 (t, 1H,  $\text{H}_2$  (Glu),  $^3J = 6.16$  Hz), 3.94 (q, H,  $\text{H}_2$  (Ala),  $^3J = 7.25$  Hz).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :**  $\delta_{\text{C}}$  (ppm) 17.22, 27.72, 31.94, 51.13, 54.75, 174.36, 176.86, 180.47.

**3°- (L)-Glu((L)-Val-OH)-OH (51):**



Produit 51

$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5$

Masse molaire :  $246.3 \text{ g mol}^{-1}$

Solide blanc

**Rdt** = 96%

**P<sub>f</sub>** = 120-125°C

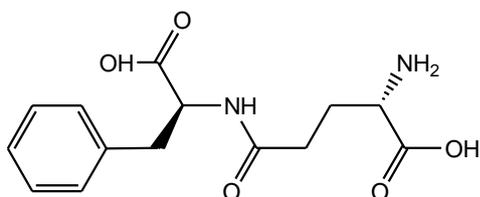
**MS (ES<sup>+</sup>) *m/z*:** 247.2 ( $\text{M} + \text{H}$ )<sup>+</sup>

**HRMS** = 247.1302 g/mol (Masse calculée = 247.1294 g/mol).

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :**  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) 0.90, 0.91 (2d, 6H,  $\text{H}_{4a}$  (Val),  $\text{H}_{4b}$  (Val),  $^3J = 7.03$  Hz,  $^3J = 8.99$  Hz), 2.11 (m, 3H,  $\text{H}_3$  (Glu),  $\text{H}_3$  (Val)), 2.49 (t, 2H,  $\text{H}_4$  (Glu),  $^3J = 7.34$  Hz), 3.71 (dd, 1H,  $\text{H}_2$  (Glu),  $^3J = 9.12$  Hz,  $^3J = 5.37$  Hz), 4.04 (d, 1H,  $\text{H}_2$  (Val),  $^3J = 5.73$  Hz).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :**  $\delta_{\text{C}}$  (ppm) 17.30, 18.88, 27.03, 30.16, 31.87, 54.48, 61.07, 174.57, 174.98, 178.95.

**4°- (L)-Glu((L)-Phe-OH)-OH (53):**



Produit 53

$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_7$

Masse molaire :  $294.3 \text{ g mol}^{-1}$

Solide blanc

**Rdt** = 92%

**P<sub>f</sub>** = 133-138°C

$t_r = 0.975$  min

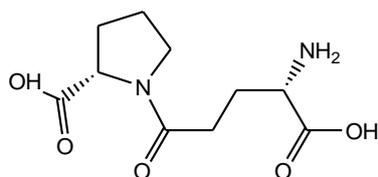
**MS (ES<sup>+</sup>)  $m/z$ :** 295.0 (M+ H)<sup>+</sup>

**HRMS** = 295.1292 g/mol (Masse calculée = 295.1294 g/mol).

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O+10%TFA) :**  $\delta_H$  (ppm) 2.04 (m, 2H, H<sub>3</sub> (Glu)), 2.45 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu), <sup>3</sup> $J$  = 7.49 Hz), 3.02 (dd, 1H, H<sub>3a</sub> (Phe), <sup>3</sup> $J$  = 7.94 Hz, <sup>2</sup> $J$  = 14.52 Hz), 3.19 (dd, 1H, H<sub>3b</sub> (Phe), <sup>3</sup> $J$  = 5.23 Hz, <sup>2</sup> $J$  = 14.52 Hz), 3.70 (t, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup> $J$  = 7.1 Hz), 3.91 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Phe), <sup>3</sup> $J$  = 7.94 Hz, <sup>3</sup> $J$  = 5.23 Hz), 7.21-7.35 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O+10%TFA) :**  $\delta_C$  (ppm) 25.06, 30.26, 36.08, 51.60, 53.51, 126.64, 128.18, 128.70, 135.98, 170.57, 173.34, 174.15.

**5°- (L)-Glu((L)-Pro-OH)-OH (52):**



Produit 52

C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Masse molaire : 244. 5g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc.

**Rdt** = 87%

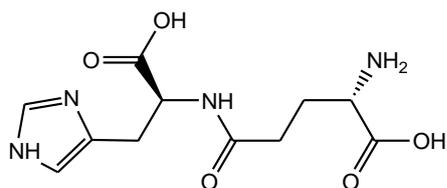
**P<sub>f</sub>**=117-122°C

**MS (ES<sup>+</sup>)  $m/z$ :** 245.1 (M+ H)<sup>+</sup>, 267.3 (M+Na)<sup>+</sup>

**HRMS** = 245.1135 g/mol (Masse calculée = 245.1137 g/mol).

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O+ 10%TFA) :**  $\delta_H$  (ppm) 2.00 (m, 3H, H<sub>3</sub> (Glu) & H<sub>3a</sub> (Pro)), 2.26 (m, 3H, H<sub>3b</sub> (Pro) & H<sub>4</sub> (Pro)), 2.66 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu), <sup>3</sup> $J$  = 7.28 Hz), 3.62 (m, 2H, H<sub>5</sub> (Pro)), 4.09 (t, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup> $J$  = 6.45 Hz), 4.41 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Pro), <sup>3</sup> $J$  = 4.06 Hz, <sup>3</sup> $J$  = 8.59 Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O) :**  $\delta_C$  (ppm) 24.21, 24.81, 29.14, 29.65, 47.71, 52.34, 59.26, 171.67, 172.72, 176.39.

**6° - (L)-Glu((L)-His-OH)-OH (54):**Produit 54 $C_{11}H_{16}N_4O_5$ Masse molaire : 284.3 g mol<sup>-1</sup>

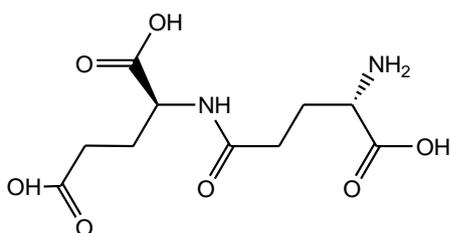
Solide blanc

Rdt = 84%

 $P_f = 130-134^\circ\text{C}$ MS (ES<sup>+</sup>)  $m/z$ : 307.1 (M+ Na)<sup>+</sup>HRMS = 307.1021 g/mol (Masse calculée = 307.1018 g/mol), (M+Na)<sup>+</sup>.

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O) : δ (ppm) 1.40 (m, 2H, H<sub>3</sub> (Glu)), 1.76 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 7.45 Hz), 2.40 (dd, 1H, H<sub>3a</sub> (His), <sup>3</sup>J = 8.56 Hz, <sup>2</sup>J = 15.56 Hz), 2.56 (dd, 1H, H<sub>3b</sub> (His), <sup>3</sup>J = 5.24 Hz, <sup>2</sup>J = 15.56 Hz), 3.29 (t, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 6.48 Hz), 3.96 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (His), <sup>3</sup>J = 5.24 Hz, <sup>3</sup>J = 8.56 Hz), 6.50 (s, 1H, NH-CH=C (imid.)), 7.81 (s, 1H, NH-CH=N (imid.)).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O) : δ<sub>C</sub> (ppm) 24.24, 25.02, 29.73, 50.56, 50.94, 115.78, 127.87, 132.45, 169.90, 171.90, 172.82.

**7° - (L)-Glu((L)-Glu-OH)-OH (56):**Produit 56 $C_{10}H_{16}N_2O_7$ Masse molaire: 276.2 g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc

Rdt = 91%

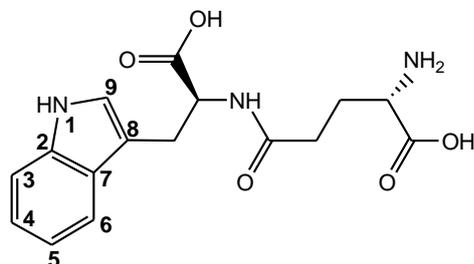
 $P_f = 98-102^\circ\text{C}$ MS (ES<sup>+</sup>)  $m/z$ : 277.1 (M+ H)<sup>+</sup>

HRMS = 277.1041 g/mol (Masse calculée = 277.1036 g/mol).

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O) : δ<sub>H</sub> (ppm) 2.05 (m, 4H, H<sub>3</sub> (Glu<sub>1</sub>) & H<sub>3</sub> (Glu<sub>2</sub>)), 2.35 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu<sub>1</sub>)), 2.45 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu<sub>2</sub>)), 3.67-3.73 (m, 2H, H<sub>2</sub> (Glu<sub>1</sub>) & H<sub>2</sub> (Glu<sub>2</sub>)).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta_{\text{C}}$  (ppm) 25.55, 26.08, 30.14, 30.74, 53.88, 53.98, 173.80, 173.86, 177.22, 177.56.

**8°-(L)-Glu((L)-Trp-OH)-OH (55):**



Produit 55

$\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_7$

Masse molaire :  $498.5 \text{ g mol}^{-1}$

Solide marron

Rdt = 93%

$t_{\text{r}}$  = 1.085 min

$P_{\text{f}}$  = 114-119°C

MS ( $\text{ES}^+$ )  $m/z$ : 334.0 ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$

HRMS = 334.1400 g/mol (Masse calculée = 334.1403 g/mol).

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO } d_6$ ) :  $\delta$  (ppm) 1.96 (m, 1H,  $\text{H}_{3a}$  (Glu)), 2.10 (dd, 2H,  $\text{H}_4$  (Glu),  $^3J = 5.44 \text{ Hz}$ ,  $^3J = 10.74 \text{ Hz}$ ), 2.28 (m, 1H,  $\text{H}_{3b}$  (Glu)), 3.05 (dd, 1H,  $\text{H}_{3b}$  (Trp),  $^3J = 8.97 \text{ Hz}$ ,  $^2J = 15.08 \text{ Hz}$ ), 3.32 (dd, 1H,  $\text{H}_{3a}$  (Trp),  $^3J = 5.06 \text{ Hz}$ ,  $^2J = 15.08 \text{ Hz}$ ), 4.11 (dd, 1H,  $\text{H}_2$  (Trp),  $^3J = 5.06 \text{ Hz}$ ,  $^3J = 8.97 \text{ Hz}$ ), 4.72 (dd, 1H,  $\text{H}_2$  (Glu),  $^3J = 4.41 \text{ Hz}$ ,  $^3J = 8.78 \text{ Hz}$ ), 6.97-7.06 (m, 2H,  $\text{H}_4$  &  $\text{H}_5$  (indole)), 7.22 (s, 1H,  $\text{H}_9$  (indole)), 7.35 (d, 1H,  $\text{H}_6$  (indole),  $^3J = 8.01 \text{ Hz}$ ), 7.58 (d, 1H,  $\text{H}_3$  (indole),  $^3J = 7.76 \text{ Hz}$ ), 7.87 (s, 1H, NH (indole)).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO } d_6$ ) :  $\delta_{\text{C}}$  (ppm) 25.25, 29.71, 27.41, 54.93, 55.73, 109.53, 111.83, 118.80, 118.87, 121.40, 127.73, 136.82, 171.18, 175.17, 177.51.

**III - Synthèse des dipeptides contenant la (L)-Théanine ou la 5-N-(L)-propylglutamine:**

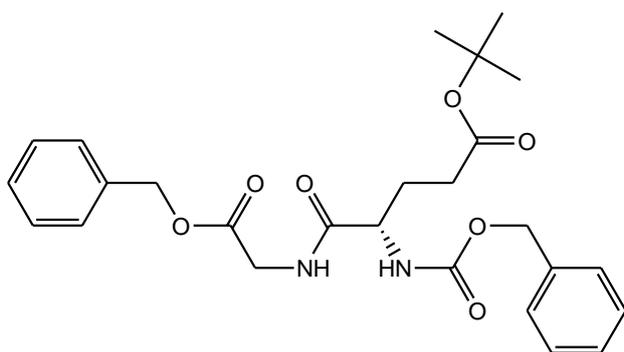
**III. A. La (L)-Théanine ou la 5-N-(L)-propylglutamine positionnée en N-Term:**

➤ **Stratégie générale de synthèse des dipeptides Z-(L)-Glu(OtBu)-(L)-Xaa-OBn :**

A une solution de (S) Z-Glu-OtBu (674 mg, 2mmoles, 1eq) dans 15 mL de THF sont additionnés, sous agitation, l'ester benzylique du chlorhydrate de l'acide aminé (S)  $\text{Cl}^- \text{H}_3\text{N}^+$ -

Xaa-OBn (2 mmoles, 1eq), du réactif de couplage BOP (1.066 g, 2.4 mmoles, 1.2eq) et de la TEA (0.83mL, 6mmoles, 3eq). Après 1h d'agitation à 20°C, le solvant est évaporé sous vide. Le brut réactionnel obtenu est solubilisé dans de l'AcOEt puis est lavé avec une solution de NaHCO<sub>3</sub> 1M (3x 20mL) puis une solution d'acide citrique à 10% (3x 20mL) et enfin avec de l'eau (2x20mL) ; la phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, puis concentrée sous vide pour obtenir le dipeptide pur.

**1°- Z-(L)-Glu-(OtBu)-Gly-OBn (57)**



Produit 57

C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

Masse molaire : 484. 5g mol<sup>-1</sup>

Huile incolore

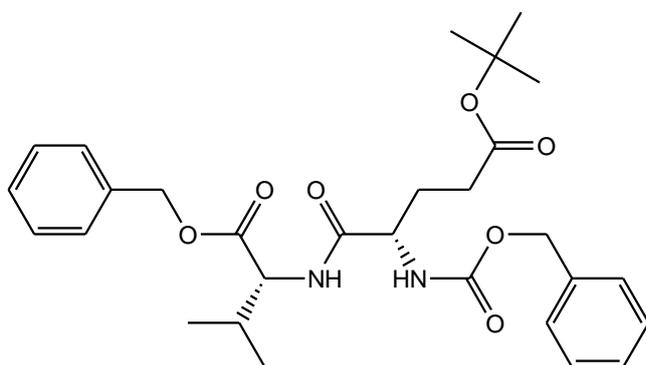
**Rdt** = 92%

**t<sub>r</sub>** = 2.48 min

**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 485.1 (M+ H)<sup>+</sup>, 507.3 (M+Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ<sub>H</sub> (ppm) 1.34 (s, 9H, *t*Bu), 1.86 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 2.02 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.30 (dd, 2H, H<sub>4</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 6.95 Hz, <sup>3</sup>J = 12.35 Hz), 3.97 (s, 2H, H<sub>2</sub> (Gly)), 4.26 (m, 1H, H<sub>2</sub> (Glu)), 4.99 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 5.09 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (OBn)), 5.64 (m, 2H, 2xNH), 7.22-7.34 (m, 10H, 2 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ<sub>C</sub> (ppm) 24.20, 26.80, 28.28, 28.56, 46.48, 50.88, 58.44, 66.43, 127.28, 127.48, 127.59, 127.75, 127.87, 127.96, 134.79, 135.54, 155.91, 170.24, 170.84, 176.19.

**2°- Z-(L)-Glu-(OtBu)-(L)-Val-OBn (58):**Produit 58 $C_{29}H_{38}N_2O_7$ Masse molaire : 526. 6g mol<sup>-1</sup>

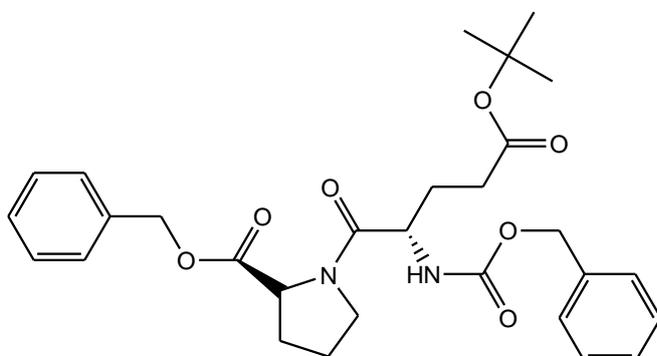
Poudre blanche

Rdt = 96%

 $t_r = 2.97$  minMS (ES<sup>+</sup>)  $m/z$ : 527.1 (M+ H)<sup>+</sup>, 549.0 (M+Na)<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta_H$  (ppm) 0.79, 0.83 (2d, 6H, H<sub>4</sub> (Val), <sup>3</sup>J = 6.90 Hz), 1.37 (s, 9H, (OtBu)), 1.85 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 1.97 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.13 (m, 1H, H<sub>3</sub> (Val)), 2.32 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)), 4.21 (d, 1H, H<sub>2</sub> (Val), <sup>3</sup>J = 6.41 Hz), 4.47 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 4.69 Hz, <sup>3</sup>J = 8.67 Hz), 5.03 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 5.11 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (OBn)), 5.61 (d, 1H, NH-Z, <sup>3</sup>J = 7.45 Hz), 6.91(s, 1H, NHCO), 7.19-7.27 (m, 10H, 2 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta_C$  (ppm) 17.46, 19.00, 28.04, 30.90, 31.71, 54.06, 57.36, 67.04, 77.22, 81.14, 128.01, 128.13, 128.40, 128.44, 128.51, 128.59, 135.31, 136.23, 156.16, 171.37, 171.43, 173.14.

**3°- Z-(L)-Glu-(OtBu)-(L)-Pro-OBn (59):**Produit 59 $C_{29}H_{36}N_2O_7$ Masse molaire : 524. 6g mol<sup>-1</sup>

Huile incolore

Rdt = 88%

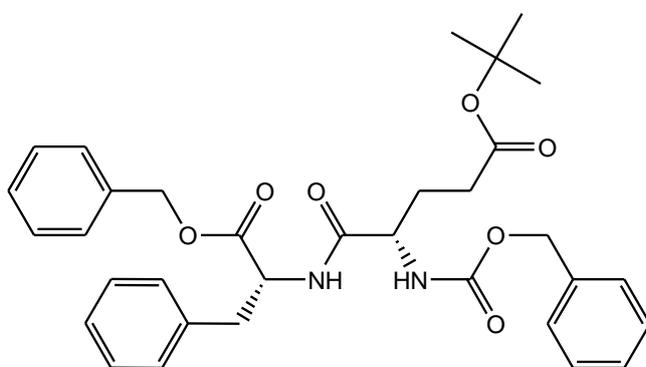
 $t_r = 2.91$  min

**MS (ES<sup>+</sup>) *m/z*:** 525.2 (M+ H)<sup>+</sup>, 547.2 (M+Na)<sup>+</sup>, 469.2 (MH-CO<sub>2</sub>)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 1.35 (s, 9H, (O*t*Bu)), 1.63 - 1.88 (m, 4H, H<sub>3</sub> (Glu) & H<sub>3</sub> (Pro)), 2.08 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Pro)), 2.26 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)), 3.64 (m, 2H, H<sub>5</sub> (Pro)), 4.47 (m, 2H, H<sub>2</sub> (Pro) & H<sub>2</sub> (Glu)), 4.98 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 5.06 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (OBn)), 5.64 (m, 2H, NH-Z, NHCO), 7.20-7.26 (m, 10H, 2 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 23.28, 26.14, 26.47, 27.21, 29.03, 44.78, 45.36, 50.05, 57.31, 63.53, 78.99, 126.38, 126.47, 126.56, 126.69, 126.87, 126.95, 133.88, 134.74, 154.23, 168.97, 169.93, 170.58.

**4°- Z-(L)-Glu-(O*t*Bu)-(L)-Phe-OBn (60):**



Produit 60

C<sub>33</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

Masse molaire : 574. 7g mol<sup>-1</sup>

Poudre blanche

**Rdt** = 98%

**P<sub>f</sub>** = 89-92°C

**t<sub>r</sub>** = 3.11 min

**MS (ES<sup>+</sup>) *m/z*:** 575.2 (M+ H)<sup>+</sup>, 597.2 (M+Na)<sup>+</sup>, 519.2 (MH-*t*Bu)<sup>+</sup>

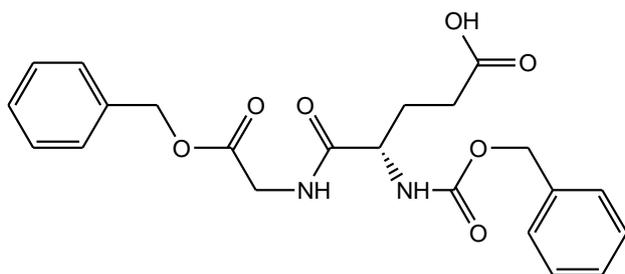
**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 1.33 (s, 9H, (O*t*Bu)), 1.72 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 1.91 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.21 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)), 3.01 (m, 2H, H<sub>3</sub> (Phe)), 4.11 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Phe), <sup>3</sup>J = 3.97 Hz, <sup>3</sup>J = 9.11 Hz), 4.78 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 4.24 Hz, <sup>3</sup>J = 8.87 Hz), 4.98 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 5.03 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (OBn)), 5.61 (m, 1H, NH-Z), 6.95-7.28 (m, 16H, 3 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> & NHCO).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 26.45, 26.52, 29.98, 36.17, 51.82, 52.35, 65.40, 79.40, 65.68, 125.48, 126.42, 126.55, 126.93, 126.97, 127.01, 127.71, 133.48, 134.03, 134.64, 153.67, 169.50, 171.22, 171.97.

➤ **Hydrolyse des esters *tert*-butyliques en milieu acide:**

A une solution du composé à déprotéger (1 eq) dans du DCM, le TFA est ajouté goutte à goutte afin d'obtenir une solution de TFA 4M. Le milieu est agité à température ambiante pendant 4h. Après évaporation à sec du milieu réactionnel, celui-ci est repris plusieurs fois dans du cyclohexane puis du toluène pour co-évaporer le TFA résiduel. Le produit est généralement obtenu sous forme de poudre ou d'huile jaune.

**1°- Z-(L)-Glu-Gly-OBn(61):**



Produit 61

$C_{22}H_{24}N_2O_7$

Masse molaire :  $428.4 \text{ g mol}^{-1}$

Solide blanc

**Rdt** = 99%

**P<sub>f</sub>** = 89-91°C

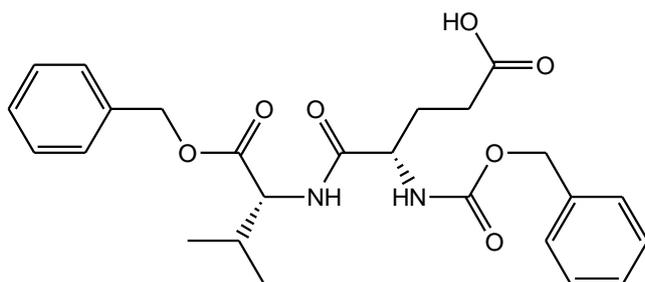
**t<sub>r</sub>** = 1.9 min

**MS (ES<sup>+</sup>) m/z:** 429.2 (M+ H)<sup>+</sup>, 451.3 (M+Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 1.91 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 2.10 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.45 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)), 4.02 (m, 2H, H<sub>2</sub> (Gly)), 4.49 (m, 1H, H<sub>2</sub> (Glu)), 5.06 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 5.12 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (OBn)), 5.87 (s, 1H, NH-Z), 7.24-7.35 (m, 11H, 2 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> & NHCO).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 27.08, 28.64, 40.42, 52.73, 66.48, 127.17, 127.41, 127.52, 127.71, 127.80, 134.07, 134.98, 155.83, 168.98, 171.51, 175.47.

**2°- Z-(L)-Glu-(L)-Val-OBn (61):**



Produit 61

$C_{25}H_{30}N_2O_7$

Masse molaire :  $470.5 \text{ g mol}^{-1}$

Poudre blanche

**Rdt** > 98%

**P<sub>f</sub>** = 82 - 86°C

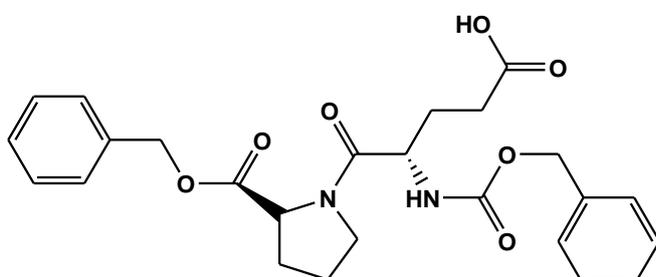
**t<sub>r</sub>** = 2.35 min

**MS (ES<sup>+</sup>) m/z:** 471.0 (M+ H)<sup>+</sup>, 493.0 (M+Na)<sup>+</sup>.

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :**  $\delta_H$  (ppm) 0.80, 0.83 (2d, 6H, H<sub>4</sub> (Val),  $^3J = 6.90 \text{ Hz}$ ), 1.82 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 1.97 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.10 (m, 1H, H<sub>3</sub> (Val)), 2.36 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)), 4.34 (d, 1H, H<sub>2</sub> (Val),  $^3J = 6.48 \text{ Hz}$ ), 4.44 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu),  $^3J = 4.71 \text{ Hz}$ ,  $^3J = 8.65 \text{ Hz}$ ), 4.99 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 5.05 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (OBn)), 5.84 (d, 1H, NH-Z,  $^3J = 7.48 \text{ Hz}$ ), 7.17-7.24 (m, 11H, 2xC<sub>6</sub>H<sub>5</sub> & NHCO).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :**  $\delta_C$  (ppm) 17.37, 18.87, 27.78, 29.62, 30.58, 53.39, 57.38, 66.92, 66.99, 127.79, 127.96, 128.20, 128.24, 128.29, 128.37, 135.02, 135.73, 156.32, 171.38, 171.67, 176.06.

**3°- Z-(L)-Glu-(L)-Pro-OBn (63):**



Produit 63

$C_{25}H_{28}N_2O_7$

Masse molaire :  $468.5 \text{ g mol}^{-1}$

Huile jaune

**Rdt** = 92%

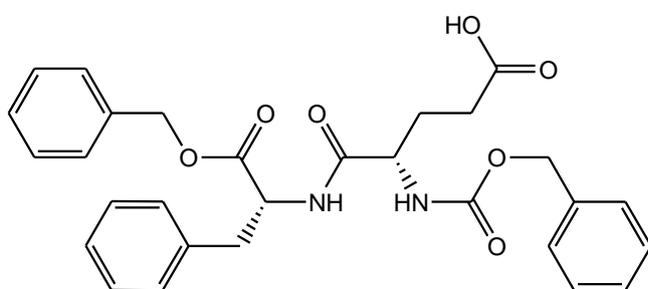
**t<sub>r</sub>** = 2.18 min

**MS (ES<sup>+</sup>) *m/z*:** 469.1 (M+ H)<sup>+</sup>, 491.2 (M+Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 1.67-1.86 (m, 4H, H<sub>3</sub> (Glu) & H<sub>4</sub> (Glu)), 2.08 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Pro)), 2.33 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)), 3.63 (m, 2H, H<sub>5</sub> (Pro)), 4.49 (m, 1H, H<sub>2</sub> (Pro)), 4.52 (m, 1H, H<sub>2</sub> (Glu)), 4.96 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 5.03 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (OBn)), 5.89 (m, 2H, NH-Z), 7.18-7.26 (m, 11H, 2 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> & NHCO).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 26.25, 26.33, 29.82, 39.59, 52.44, 65.28, 65.43, 79.20, 126.29, 126.41, 126.65, 126.78, 126.90, 133.48, 134.51, 154.64, 167.84, 170.29, 171.09.

**4°- Z-(L)-Glu-(L)-Phe-OBn (64):**



Produit 64

C<sub>29</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

Masse molaire : 518.6g mol<sup>-1</sup>

Poudre blanche

**Rdt** = 100%

**P<sub>f</sub>** = 114-120°C

**t<sub>r</sub>** = 2.51 min

**MS (ES<sup>+</sup>) *m/z*:** 519.2 (M+ H)<sup>+</sup>, 541.3 (M+Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, MeOD) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 1.80 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 1.93 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.26 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)), 2.93 (dd, 1H, H<sub>3b</sub> (Phe), <sup>3</sup>J = 7.71 Hz, <sup>2</sup>J = 13.33 Hz), 3.09 (dd, 1H, H<sub>3a</sub> (Phe), <sup>3</sup>J = 5.75 Hz, <sup>2</sup>J = 13.33 Hz), 4.12 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Phe), <sup>3</sup>J = 5.75 Hz, <sup>3</sup>J = 7.71 Hz), 4.67 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 4.99 Hz, <sup>3</sup>J = 9.17 Hz), 5.02 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 5.06 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (OBn)), 7.10-7.28 (m, 15H, 3 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

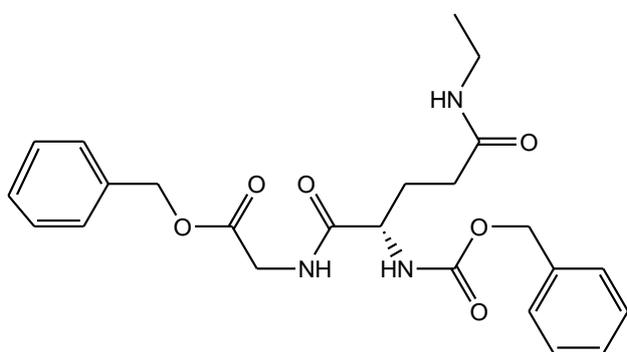
**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, MeOD) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 29.09, 31.49, 38.58, 55.88, 56.18, 67.89, 68.64, 128.32, 129.26, 129.45, 129.80, 129.90, 129.94, 129.99, 130.22, 130.76, 137.36, 138.13, 138.44, 158.66, 172.94, 174.56, 176.94.

➤ **Réaction d'amidification de 61 à 64 :**

Les dipeptides (**61-64**) (1eq) sous forme de sels de TFA sont mis en solution dans du THF avec l'éthylamine  $\text{EtNH}_2$  ou la n-propylamine  $\text{PrNH}_2$  (1eq), le réactif de couplage BOP (1.2eq) et la TEA (3eq). Le mélange est agité sous argon à température ambiante. Après 1h de réaction le solvant est évaporé sous pression réduite. L'AcOEt est ajouté, la phase organique est lavée deux fois à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 0.1N puis avec une solution aqueuse saturée de  $\text{NaHCO}_3$ . La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre puis évaporée à sec sous pression réduite.

**1° - Z-(L)-Glu-(NH<sub>Et</sub>)-Gly-OBn (65):**

	Nombre d'équivalents	Nombre de moles	Quantité
Z-Glu-Gly-OBn	1eq	0.5 mmole	214 mg
EtNH <sub>2</sub>	1eq	0.5 mmole	0.25 mL
BOP	1.2eq	0.6 mmole	266 mg
TEA	3eq	1.5 mmole	0.21 mL



Produit 65

$\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_6$

Masse molaire :  $455.5 \text{ g mol}^{-1}$

Solide blanc

**Rdt** = 93%

**P<sub>f</sub>** = 95-99°C

**t<sub>r</sub>** = 1.92 min

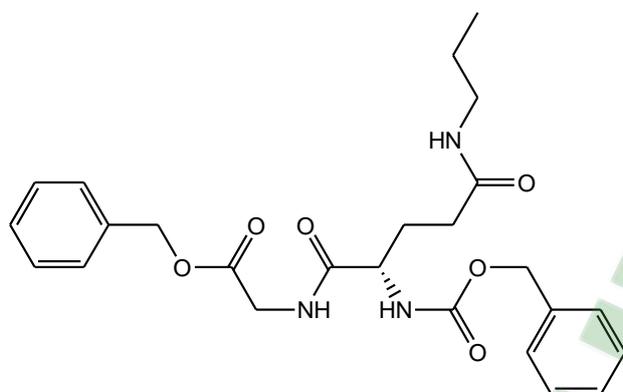
**MS (ES<sup>+</sup>) m/z:** 456.3 (M+ H)<sup>+</sup>, 478.3 (M+Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, MeOD) :**  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) 1.00 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ,  $^3J = 7.15 \text{ Hz}$ ), 1.97 (m, 2H, H<sub>3</sub> (Glu)), 2.23 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu),  $^3J = 6.52 \text{ Hz}$ ), 3.13 (q, 2H,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-NH}$ ,  $^3J = 7.15 \text{ Hz}$ ), 3.91 (m, 2H, H<sub>2</sub> (Gly)), 4.22 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu),  $^3J = 9.15 \text{ Hz}$ ,  $^3J = 4.97 \text{ Hz}$ ), 4.98 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Ph}$  (Z)), 5.05 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Ph}$  (OBn)), 7.21-7.33 (m, 10H, 2 x  $\text{C}_6\text{H}_5$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, MeOD) :  $\delta_{\text{C}}$  (ppm) 14.63, 29.06, 29.70, 32.39, 34.49, 41.28, 54.25, 66.93, 67.14, 127.95, 128.12, 128.35, 128.51, 128.63, 135.20, 136.30, 156.42, 169.73, 172.11, 172.70.

2° - Z-(L)-Glu-(NHPr)-Gly-OBn (66):

	Nombre d'équivalent	Nombre de mole	Quantité
Z-Glu-Gly-OBzl	1eq	0.4 mmole	171 mg
PrNH <sub>2</sub>	1eq	0.4 mmole	35 $\mu\text{L}$
BOP	1.2eq	0.48 mmole	213 mg
TEA	3eq	1.2 mmole	0.17 mL



Produit 66

$\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_6$

Masse molaire : 469. 2g mol<sup>-1</sup>

Huile incolore

Rdt = 95%

P<sub>f</sub> = 83-88°C

t<sub>r</sub> = 2.05 min

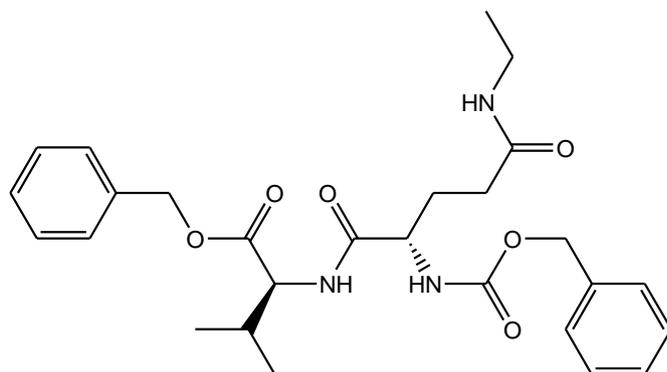
MS (ES<sup>+</sup>) m/z: 470.3 (M+ H)<sup>+</sup>, 492.4 (M+Na)<sup>+</sup>

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, MeOD) :  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) 0.79 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ,  $^3J = 7.30$  Hz), 1.37 (m, 2H,  $\text{CH}_3$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 1.97 (m, 2H, H<sub>3</sub> (Glu)), 2.23 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu),  $^3J = 6.50$  Hz), 3.13 (q, 2H,  $\text{CH}_2$ -NH,  $^3J = 6.25$  Hz), 3.87 (d, 1H, H<sub>2a</sub> (Gly),  $^2J = 16.18$  Hz), 4.00 (d, 1H, H<sub>2b</sub> (Gly),  $^2J = 16.18$  Hz), 4.22 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu),  $^3J = 9.2$  Hz,  $^3J = 5.03$  Hz), 4.97 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ -Ph (Z)), 5.03 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ -Ph (OBn)), 7.22-7.32 (m, 10H, 2 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, MeOD) :  $\delta_{\text{C}}$  (ppm) 10.26, 21.54, 27.94, 31.25, 40.13, 40.24, 53.14, 65.77, 65.97, 126.78, 126.96, 127.18, 127.35, 127.48, 134.06, 135.16, 155.30, 168.60, 171.05, 171.70.

**3°- Z-(L)-Glu-(NH<sub>Et</sub>)-(L)-Val-OBn (67):**

	Nombre d'équivalent	Nombre de mole	Quantité
Z-Glu-Val-OBn	1eq	0.42 mmole	200 mg
EtNH <sub>2</sub>	1eq	0.42 mmole	0.21 mL
BOP	1.2eq	0.51mmole	223 mg
TEA	3eq	1.26 mmole	0.18 mL

Produit 67C<sub>27</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Masse molaire : 497. 6g mol<sup>-1</sup>

Poudre blanche

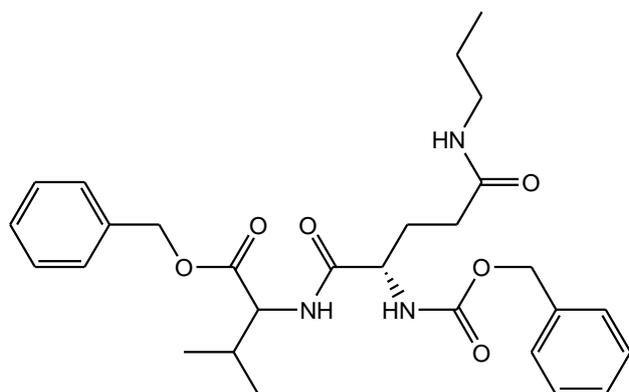
**Rdt** = 90%**P<sub>f</sub>** = 82 - 86°C**t<sub>r</sub>** = 2.38 min**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 498.2 (M+ H)<sup>+</sup>, 520.1 (M+Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, MeOD)** : δ<sub>H</sub> (ppm) 0.90, 0.92 (2d, 6H, H<sub>4</sub> (Val), <sup>3</sup>J = 6.90 Hz), 1.10 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-NH, <sup>3</sup>J = 7.25 Hz), 1.87 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 2.02 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.17 (m, 1H, H<sub>3</sub> (Val)), 2.26 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 7.06 Hz), 3.18 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-NH, <sup>3</sup>J = 7.25 Hz), 4.22 (d, 1H, H<sub>2</sub> (Val), <sup>3</sup>J = 6.48 Hz), 4.39 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 5.71 Hz, <sup>3</sup>J = 9.65 Hz), 5.07 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 5.15 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (OBn)), 7.31-7.36 (m, 10H, 2 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ<sub>C</sub> (ppm) 14.81, 18.52, 19.49, 29.63, 31.77, 33.25, 35.41, 55.74, 59.53, 67.83, 68.03, 129.01, 129.16, 129.54, 129.61, 129.68, 129.72, 137.27, 138.24, 158.45, 172.89, 174.89, 174.92.

**4°- Z-(L)-Glu-(NHPr)-(L)-Val-OBn (68):**

	Nombre d'équivalent	Nombre de mole	Quantité
<i>Z-Glu-Val-OBn</i>	1eq	0.7 mmole	329 mg
<i>PrNH<sub>2</sub></i>	1eq	0.7 mmole	58 $\mu$ L
<i>BOP</i>	1.2eq	0.84 mmole	372 mg
<i>TEA</i>	3eq	2.1 mmole	0.3 mL

Produit 68 $C_{28}H_{37}N_3O_6$ Masse molaire : 511.6g mol<sup>-1</sup>

Poudre blanche

Rdt = 93%

 $P_f = 90 - 96^\circ\text{C}$  $t_r = 2.49 \text{ min}$ MS (ES<sup>+</sup>)  $m/z$ : 512.2 (M+ H)<sup>+</sup>, 534.1 (M+Na)<sup>+</sup>

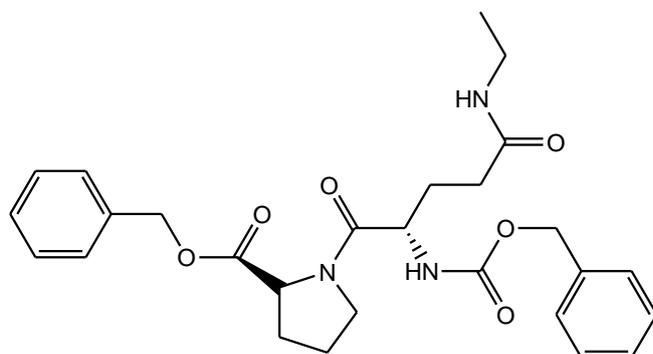
RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, MeOD) :  $\delta_H$  (ppm) 0.90 (m, 9H, H<sub>4</sub> (Val) &  $\underline{\text{CH}_3\text{-CH}_2}$ ), 1.48 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{-}\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_2}$ ), 1.87 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 2.03 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.16 (m, 1H, H<sub>3</sub> (Val)), 2.25 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 7.06 Hz), 3.10 (t, 2H,  $\underline{\text{CH}_2\text{-NH}}$ , <sup>3</sup>J = 6.35 Hz), 4.20 (d, 1H, H<sub>2</sub> (Val), <sup>3</sup>J = 6.13 Hz), 4.37 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 5.81 Hz, <sup>3</sup>J = 8.98 Hz), 5.06 (s, 2H,  $\underline{\text{CH}_2\text{-Ph}}$  (Z)), 5.16 (s, 2H,  $\underline{\text{CH}_2\text{-Ph}}$  (OBn)), 7.29-7.36 (m, 10H, 2 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta_C$  (ppm) 11.77, 18.40, 19.48, 23.61, 29.45, 31.80, 33.10, 42.29, 55.66, 59.45, 67.74, 67.93, 128.92, 129.07, 129.44, 129.51, 129.59, 129.62, 137.19, 138.15, 158.37, 172.80, 174.72, 175.01.

5°- *Z*-(*L*)-Glu-(NH<sub>2</sub>Et)-(*L*)-Pro-OBn (71):

Clicours.COM

	Nombre d'équivalent	Nombre de mole	Quantité
<i>Z-Glu-Pro-OBn</i>	1eq	0.5 mmole	234 mg
<i>EtNH<sub>2</sub></i>	1eq	0.5 mmole	0.20mL
<i>BOP</i>	1.2eq	0.6 mmole	265.2 mg
<i>TEA</i>	3eq	1.5 mmole	0.21 mL

Produit 71C<sub>27</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Masse molaire : 495. 2g mol<sup>-1</sup>

Huile incolore

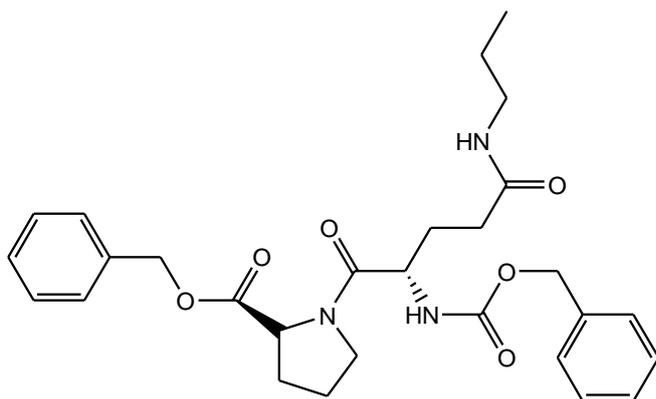
**Rdt** = 87%**t<sub>r</sub>** = 2.12 min**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 496.1 (M+ H)<sup>+</sup>, 518.2 (M+Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ<sub>H</sub> (ppm) 1.10 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.15 Hz), 1.76-1.97 (m, 4H, H<sub>3</sub> (Glu) & H<sub>3</sub> (Pro)), 2.17 (m, 4H, H<sub>4</sub> (Glu) & H<sub>4</sub> (Pro)), 3.24 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-NH, <sup>3</sup>J = 7.15 Hz), 3.64 (m, 2H, H<sub>5</sub> (Pro)), 4.46 (m, 1H, H<sub>2</sub> (Pro)), 4.55 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 5.15 Hz, <sup>3</sup>J = 9.06 Hz), 5.04 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 5.12 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (OBn)), 5.76 (m, 2H, NH (Z)), 6.18 (s, 1H, CH<sub>2</sub>-NH), 7.18-7.26 (m, 11H, 2 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> & NHCO).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ<sub>C</sub> (ppm) 15.18, 25.35, 29.40, 29.55, 32.28, 34.80, 47.38, 51.92, 59.35, 67.34, 67.43, 128.40, 128.56, 128.79, 128.92, 129.01, 135.87, 136.70, 170.83, 172.30, 172.44.

**6° - Z-(L)-Glu-(NHPr)-(L)-Pro-OBn (72)**

	Nombre d'équivalent	Nombre de mole	Quantité
<i>Z-Glu-Pro-OBzl</i>	1eq	0.52 mmole	243 mg
<i>PrNH<sub>2</sub></i>	1eq	0.52 mmole	43 μL
<i>BOP</i>	1.2eq	0.63 mmole	278 mg
<i>TEA</i>	3eq	1.56 mmole	0.22 mL

Produit 72 $C_{28}H_{35}N_3O_6$ Masse molaire : 509. 3g mol<sup>-1</sup>

Huile incolore

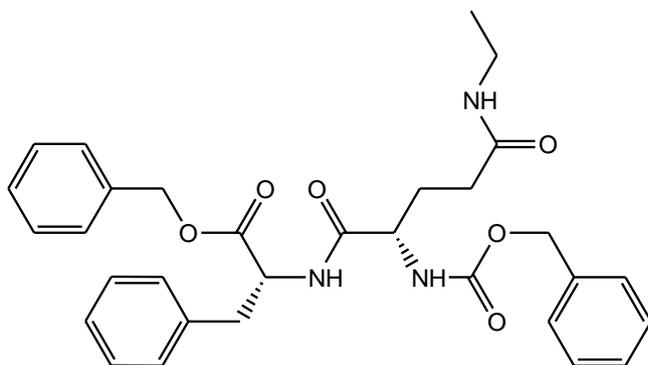
**Rdt** = 82%**t<sub>r</sub>** = 2.31 min**MS (ES<sup>+</sup>) m/z:** 510.2 (M+ H)<sup>+</sup>, 533.3 (M+Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 0.82 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.30Hz), 1.41 (m, 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.70-1.94 (m, 4H, H<sub>3</sub> (Glu) & H<sub>3</sub> (Pro)), 2.12 (m, 4H, H<sub>4</sub> (Glu) & H<sub>4</sub> (Pro)), 3.08 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 3.60 (m, 2H, H<sub>5</sub> (Pro)), 4.41 (m, 1H, H<sub>2</sub> (Pro)), 4.48 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J=4.98Hz, <sup>3</sup>J=8.86Hz), 4.98 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 5.08 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (OBn)), 5.84 (m, 2H, NH (Z)), 6.24 (s, 1H, CH<sub>2</sub>-NH), 7.19-7.23 (m, 11H, 2 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> & NHCO).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 11.44, 22.78, 24.93, 28.96, 31.83, 41.32, 46.97, 51.59, 58.95, 66.87, 66.91, 66.98, 127.98, 128.12, 128.36, 128.49, 128.59, 135.47, 136.33, 156.35, 170.52, 171.91, 172.22.

**7° - Z-(L)-Glu-(NH<sub>2</sub>Et)-(L)-Phe-OBn (69):**

	Nombre d'équivalent	Nombre de mole	Quantité
<i>Z-Glu-Phe-OBn</i>	1eq	0.48 mmole	250 mg
<i>EtNH<sub>2</sub></i>	1eq	0.48 mmole	0.24 mL
<i>BOP</i>	1.2eq	0.58 mmole	257 mg
<i>TEA</i>	3eq	1.44 mmole	0.21 mL

Produit 69 $C_{31}H_{35}N_3O_6$ Masse molaire : 545. 6g mol<sup>-1</sup>

Poudre blanche

Rdt = 95%

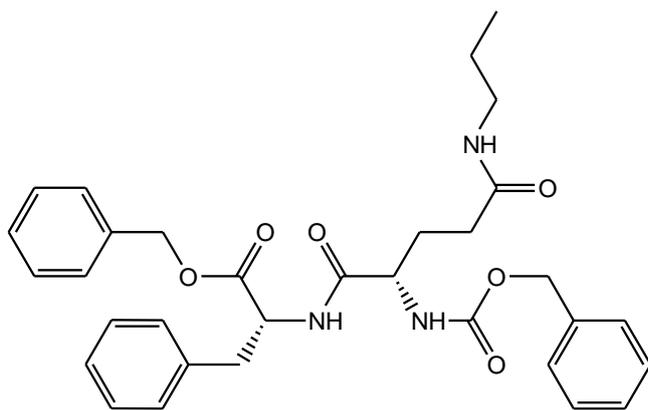
 $P_f = 114-120^\circ\text{C}$  $t_r = 2.52 \text{ min}$ MS (ES<sup>+</sup>)  $m/z$ : 546.1 (M+ H)<sup>+</sup>, 568.1 (M+Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :**  $\delta_H$  (ppm) 0.98 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.21 Hz), 1.89 (m, 2H, H<sub>3</sub> (Glu)), 2.10 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)), 2.93 (dd, 1H, H<sub>3b</sub> (Phe), <sup>3</sup>J = 7.04 Hz, <sup>2</sup>J = 13.84 Hz), 3.02 (dd, 1H, H<sub>3a</sub> (Phe), <sup>3</sup>J = 5.76 Hz, <sup>2</sup>J = 13.84 Hz), 3.12 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-NH, <sup>3</sup>J = 7.21 Hz), 4.12 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Phe), <sup>3</sup>J = 5.76 Hz, <sup>3</sup>J = 7.04 Hz), 4.77 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 5.09 Hz, <sup>3</sup>J = 9.17 Hz), 4.96 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 5.02 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (OBn)), 5.98 (m, 2H, NH(Z) & CH<sub>2</sub>-NH), 7.00-7.24 (m, 16H, 2 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> & NHCO).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :**  $\delta_C$  (ppm) 12.59, 26.98, 30.34, 32.41, 35.66, 51.50, 51.97, 64.85, 65.20, 124.97, 125.89, 126.05, 126.44, 126.51, 126.52, 127.20, 133.04, 133.74, 134.24, 154.15, 169.22, 169.32, 170.46.

**8° - Z-(L)-Glu-(NHPr)-(L)-Phe-OBn (70):**

	Nombre d'équivalent	Nombre de mole	Quantité
<i>Z-Glu-Phe-OBn</i>	1eq	0.58 mmole	300 mg
<i>PrNH<sub>2</sub></i>	1eq	0.58 mmole	48 $\mu\text{L}$
<i>BOP</i>	1.2eq	0.7 mmole	308 mg
<i>TEA</i>	3eq	1.74 mmole	0.24 mL

Produit 70 $C_{32}H_{37}N_3O_6$ Masse molaire : 559. 7g mol<sup>-1</sup>

Poudre blanche

Rdt = 94%

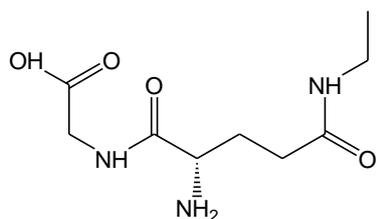
P<sub>f</sub> = 109-112°Ct<sub>r</sub> = 2.64 minMS (ES<sup>+</sup>) m/z: 560.1 (M+ H)<sup>+</sup>, 582.0 (M+Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 0.81(t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.28 Hz), 1.36 (m, 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.90 (m, 2H, H<sub>3</sub> (Glu)), 2.11 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)), 3.03 (m, 4H, H<sub>3</sub> (Phe) & CH<sub>2</sub>NH), 4.11 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Phe), <sup>3</sup>J = 5.86 Hz, <sup>3</sup>J = 7.14 Hz), 4.77 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 5.11 Hz, <sup>3</sup>J = 9.08 Hz), 4.97 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (Z)), 5.03 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph (OBn)), 5.95 (m, 2H, NH (Z), CH<sub>2</sub>NH), 6.99-7.33 (m, 16H, 3 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> & NHCO).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 11.59, 22.53, 29.24, 32.38, 37.74, 41.58, 53.55, 53.84, 66.92, 67.46, 127.05, 127.97, 128.12, 128.52, 128.61, 129.28, 135.12, 135.8, 136.32, 156.22, 171.04, 171.39, 172.60.

➤ **Hydrogénolyse des produits 65 à 72:**

Les hydrogénolyses sont réalisées dans les mêmes conditions expérimentales que celles décrites dans ce chapitre partie **I. B** page 182.

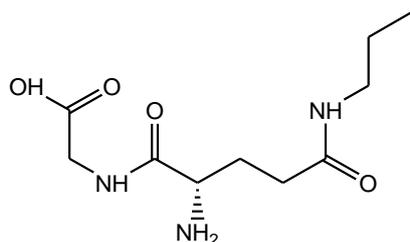
**1°- H-(L)-Glu-(NH<sub>Et</sub>)-Gly-OH (73):**Produit 73C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Masse molaire : 231.2g mol<sup>-1</sup>

Poudre blanche

**Rdt** = 99%**P<sub>f</sub>** = 112-115°C**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>**: -19.2 (c = 1g/100mL, H<sub>2</sub>O +10% de TFA)**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 232.2 (M+ H)<sup>+</sup>**HRMS** = 232.1455 g/mol (Masse calculée = 232.1448 g/mol)

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O)** : δ<sub>H</sub> (ppm) 1.00 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.32 Hz), 1.98 (m, 2H, H<sub>3</sub> (Glu)), 2.27 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)), 3.09 (q, 2H, CH<sub>2</sub>NH, <sup>3</sup>J = 7.32 Hz), 3.71 (m, 2H, H<sub>2</sub> (Gly)), 3.82 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 9.11 Hz, <sup>3</sup>J = 5.07 Hz)

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O)** : δ<sub>C</sub> (ppm) 13.34, 27.79, 30.11, 34.15, 43.22, 53.17, 171.47, 174.13, 176.19.

**2°- H-(L)-Glu-(NHPr)-Gly-OH (74):**Produit 74C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Masse molaire : 245.3g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc

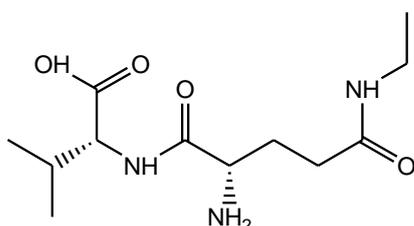
**Rdt** = 95%**P<sub>f</sub>** = 104-109°C**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>**: -17.4 (c = 1g/100mL, H<sub>2</sub>O +10% de TFA)**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 246.2 (M+ H)<sup>+</sup>

**HRMS** = 246.1512 g/mol (Masse calculée = 246.1507 g/mol)

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O)** : δ<sub>H</sub> (ppm) 0.77 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.43 Hz), 1.39 (m, 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.01 (m, 2H, H<sub>3</sub> (Glu)), 2.30 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)), 3.02 (t, 2H, CH<sub>2</sub>NH, <sup>3</sup>J = 6.94 Hz), 3.70 (m, 2H, H<sub>2</sub> (Gly)), 3.81 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 9.16 Hz, <sup>3</sup>J = 4.87 Hz)

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O)** : δ<sub>C</sub> (ppm) 10.56, 21.69, 27.36, 31.07, 41.25, 43.25, 53.00, 170.45, 174.12, 176.11.

**3°- H-(L)-Glu-(NHEt)-(L)-Val-OH (76):**



Produit 76

C<sub>12</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Masse molaire : 273.3g mol<sup>-1</sup>

Poudre blanche

**Rdt** = 92%

**P<sub>f</sub>** = 112 - 116°C

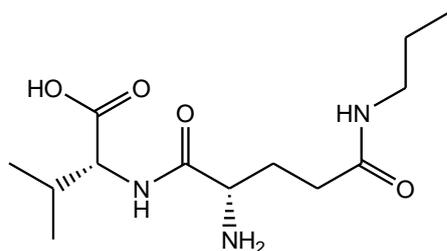
**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>**: -21.3 (c = 1g/100mL, H<sub>2</sub>O +10% de TFA)

**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 274.2 (M+ H)<sup>+</sup>

**HRMS** = 274.1765 g/mol (Masse calculée = 274.1767 g/mol)

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O + 10% TFA)** : δ<sub>H</sub> (ppm) 0.86, 0.88 (2d, 6H, 2 x CH<sub>3</sub> (Val), <sup>3</sup>J = 6.55 Hz), 0.98 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.21 Hz), 2.10 (m, 3H, H<sub>3</sub> (Glu), H<sub>3</sub> (Val)), 2.33 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 7.37 Hz), 3.08 (q, 2H, CH<sub>2</sub>NH, <sup>3</sup>J = 7.21 Hz), 4.05 (t, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 6.46 Hz), 4.21 (d, 1H, H<sub>2</sub> (Val), <sup>3</sup>J = 5.38 Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O +10% TFA)** : δ<sub>C</sub> (ppm) 14.27, 19.03, 28.06, 30.88, 32.63, 37.22, 52.01, 59.56, 169.01, 173.36, 174.56.

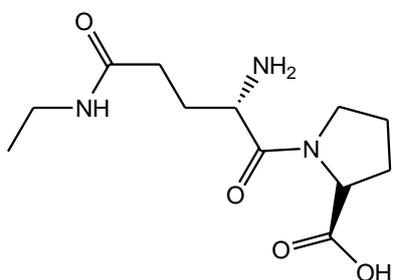
**4°- H-(L)-Glu-(NHPr)-(L)-Val-OH (77):**Produit 77 $C_{13}H_{25}N_3O_4$ Masse molaire : 287. 4g mol<sup>-1</sup>

Poudre blanche

**Rdt** = 91%**P<sub>f</sub>** = 104 - 109°C**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>**: -18.9 (c = 1g/100mL, H<sub>2</sub>O +10% de TFA)**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 288.3 (M+ H)<sup>+</sup>**HRMS** = 288.1921 g/mol (Masse calculée = 288.1896 g/mol)

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O + 10% TFA)** : δ<sub>H</sub> (ppm) 0.78 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 6.60 Hz), 0.86, 0.88 (2d, 6H, 2 x CH<sub>3</sub> (Val), <sup>3</sup>J = 6.50 Hz), 1.39 (m, 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.09 (m, 3H, H<sub>3</sub> (Glu) & H<sub>3</sub> (Val)), 2.35 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 7.32 Hz), 3.03 (t, 2H, CH<sub>2</sub>NH, <sup>3</sup>J = 6.80 Hz), 4.07 (t, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 6.40 Hz), 4.22 (d, 1H, H<sub>2</sub> (Val), <sup>3</sup>J = 5.32 Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O +10% TFA)** : δ<sub>C</sub> (ppm) 11.47, 18.08, 19.11, 22.60, 27.88, 30.56, 31.57, 42.23, 53.19, 59.62, 170.30, 174.79, 175.56.

**5°- H-(L)-Glu-(NHEt)-(L)-Pro-OH (82):**Produit 82 $C_{29}H_{36}N_2O_7$ Masse molaire : 271.3g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc

**Rdt** = 88%**P<sub>f</sub>** = 102 - 106°C**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>**: -7.2 (c = 1g/100mL, H<sub>2</sub>O +10% de TFA)

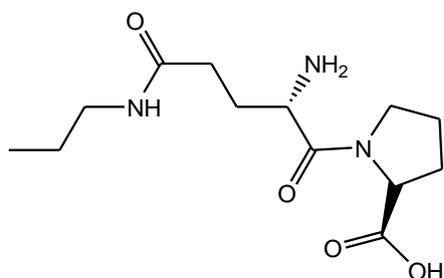
**MS (ES<sup>+</sup>) *m/z*:** 272.1 (M+ H)<sup>+</sup>

**HRMS** = 272.1272 g/mol (Masse calculée = 272.1289 g/mol)

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O + 10% TFA) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 1.15 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>*J* = 7.53 Hz), 1.77 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Pro)), 1.97 (m, 2H, H<sub>3</sub> (Glu)), 2.14 (m, 2H, H<sub>3</sub> (Pro)), 2.27 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)), 3.08 (q, 2H, CH<sub>2</sub>NH, <sup>3</sup>*J* = 7.53 Hz), 3.45 (m, 2H, H<sub>5</sub> (Pro)), 4.16 (m, 1H, H<sub>2</sub> (Pro)), 4.34 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>*J* = 5.15 Hz, <sup>3</sup>*J* = 9.06 Hz),

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O + 20% TFA) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 14.27, 24.97, 28.54, 29.45, 32.63, 37.22, 46.14, 50.42, 62.01, 169.61, 173.24, 173.36.

**6°- H-(L)-Glu-(NHPr)-(L)-Pro-OH (83):**



Produit 83

C<sub>13</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Masse molaire : 285.3g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc

**Rdt** = 93%

**P<sub>f</sub>** = 115 - 120°C

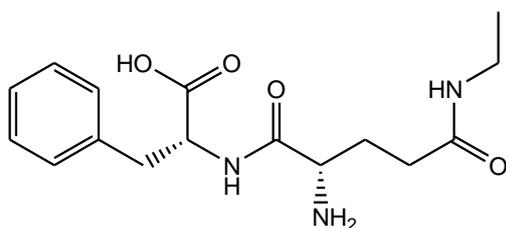
**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>**: -5.9 (c = 1g/100mL, H<sub>2</sub>O +10% de TFA)

**MS (ES<sup>+</sup>) *m/z*:** 286.2 (M+ H)<sup>+</sup>

**HRMS** = 286.1757 g/mol (Masse calculée = 286.1767 g/mol)

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O + 10% TFA) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 0.87 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>*J* = 7.36 Hz), 1.48 (m, 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.05 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Pro)), 2.21 (m, 2H, H<sub>3</sub> (Glu)), 2.35 (m, 2H, H<sub>3</sub> (Pro)), 2.48 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu), <sup>3</sup>*J* = 6.84 Hz), 3.13 (t, 2H, CH<sub>2</sub>NH, <sup>3</sup>*J* = 6.81 Hz), 3.65 (m, 1H, H<sub>5a</sub> (Pro)), 3.72 (m, 1H, H<sub>5b</sub> (Pro)), 4.41 (m, 1H, H<sub>2</sub> (Pro)), 4.51 (t, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>*J* = 6.95 Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O + 20% TFA) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 10.62, 21.77, 24.62, 25.76, 28.82, 30.28, 41.34, 47.80, 51.09, 59.53, 167.87, 173.85, 175.53.

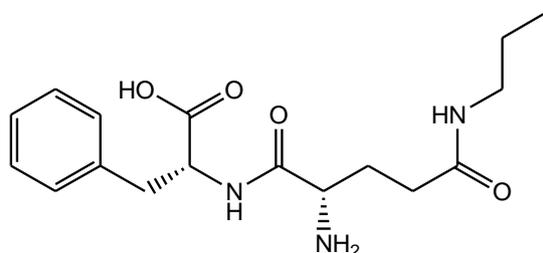
**7°- H-(L)-Glu-(NHEt)-(L)-Phe-OH (79):**Produit 79C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Masse molaire : 321.4g mol<sup>-1</sup>

Solide jaune

**Rdt** = 92%**P<sub>f</sub>** = 120-123°C**t<sub>r</sub>** = 1.15 min**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>**: -9.7 (c = 1g/100mL, H<sub>2</sub>O +10% de TFA)**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 322.2 (M+ H)<sup>+</sup>**HRMS** = 322.1741 g/mol (Masse calculée = 322.1767 g/mol)

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O + 10% TFA)** : δ<sub>H</sub> (ppm) 0.97 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.33 Hz), 1.96 (m, 2H, H<sub>3</sub> (Glu)), 2.17 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 7.01 Hz), 2.99 (dd, 1H, H<sub>3a</sub> (Phe), <sup>3</sup>J = 7.08 Hz, <sup>2</sup>J = 13.91 Hz), 3.08 (q, 2H, CH<sub>2</sub>NH, <sup>3</sup>J = 7.33 Hz), 3.15 (dd, 1H, H<sub>3b</sub> (Phe), <sup>3</sup>J = 5.76 Hz, <sup>2</sup>J = 13.91 Hz), 3.88 (t, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 7.02 Hz), 4.61 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Phe), <sup>3</sup>J = 5.76 Hz, <sup>3</sup>J = 7.08 Hz), 7.16-7.24 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O + 10% TFA)** : δ<sub>C</sub> (ppm) 13.95, 27.03, 31.09, 35.23, 36.67, 53.11, 54.91, 127.91, 129.53, 129.81, 137.03, 169.65, 174.19, 174.90.

**8°- H-(L)-Glu-(NHPr)-(L)-Phe-OH (80):**Produit 80C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Masse molaire : 335.4g mol<sup>-1</sup>

Solide jaune

**Rdt** = 89%**P<sub>f</sub>** = 118-122°C

$t_r = 1.27$  min

$[\alpha]_D^{20}$ : -8.5 (c = 1g/100mL, H<sub>2</sub>O +10% de TFA)

MS (ES<sup>+</sup>) m/z: 336.2 (M+ H)<sup>+</sup>

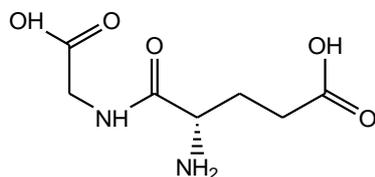
HRMS = 336.1910 g/mol (Masse calculée = 336.1923 g/mol)

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O + 10% TFA) :  $\delta_H$  (ppm) 0.81 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.20 Hz), 1.42 (m, 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.04 (m, 2H, H<sub>3</sub> (Glu)), 2.22 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 6.98 Hz), 2.82 (t, 2H, CH<sub>2</sub>NH, <sup>3</sup>J = 7.09 Hz), 2.99 (dd, 1H, H<sub>3a</sub> (Phe), <sup>3</sup>J = 7.11 Hz, <sup>2</sup>J = 13.89 Hz), 3.09 (dd, 1H, H<sub>3b</sub> (Phe), <sup>3</sup>J = 5.81 Hz, <sup>2</sup>J = 13.89 Hz), 3.76 (t, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 6.98 Hz), 4.45 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Phe), <sup>3</sup>J = 5.81 Hz, <sup>3</sup>J = 7.11 Hz), 7.06-7.21 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O + 10% TFA) :  $\delta_C$  (ppm) 11.48, 22.73, 27.64, 31.47, 37.12, 42.30, 53.41, 55.38, 128.14, 129.62, 130.14, 137.43, 169.88, 174.77, 175.19.

➤ Synthèse des dipeptides contenant la Théanine positionnée en C-Term:

1° - H-(L)-Glu-Gly-OH (75):



Produit 75

C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Masse molaire : 204.2g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc

Rdt = 98%

P<sub>f</sub> = 117-121°C

$[\alpha]_D^{20}$ : -22.5 (c = 1g/100mL, H<sub>2</sub>O +10% de TFA)

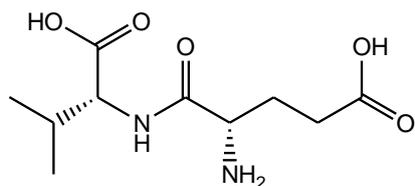
MS (ES<sup>+</sup>) m/z: 205.2 (M+ H)<sup>+</sup>, 227.2 (M+Na)<sup>+</sup>

HRMS = 205.1400 g/mol (Masse calculée = 205.1403 g/mol)

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O+10% TFA) :  $\delta_H$  (ppm) 2.07 (m, 2H, H<sub>3</sub> (Glu)), 2.46 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)), 3.92 (s, 2H, H<sub>2</sub> (Gly)), 4.01 (t, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 7.21 Hz)

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O+ 10% TFA) :  $\delta_C$  (ppm) 25.72, 28.53, 41.01, 52.34, 169.59, 172.59, 175.99.

**2°- H-(L)-Glu-(OH)-(L)-Val-OH (78):**



Produit 78

$C_{10}H_{18}N_2O_5$

Masse molaire : 246. 3g mol<sup>-1</sup>

Poudre blanche

**Rdt** = 98%

**P<sub>f</sub>** = 119 - 125°C

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>**: -24.6 (c = 1g/100mL, H<sub>2</sub>O +10% de TFA)

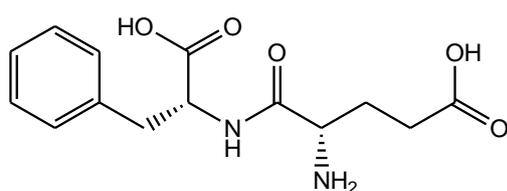
**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 247.1 (M+ H)<sup>+</sup>

**HRMS** = 247.1268 g/mol (Masse calculée = 247.1294 g/mol)

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O + 20% TFA)** : δ<sub>H</sub> (ppm) 0.63, 0.66 (2d, 6H, 2 x CH<sub>3</sub> (Val), <sup>3</sup>J = 6.60 Hz), 1.88 (m, 2H, H<sub>3</sub> (Glu)), 2.28 (t, 2H, H<sub>3</sub> (Val), <sup>3</sup>J = 7.35 Hz), 3.87 (t, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 6.45 Hz), 3.98 (d, 1H, H<sub>2</sub> (Val), <sup>3</sup>J = 5.44 Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O +20% TFA)** : δ<sub>C</sub> (ppm) 14.99, 15.98, 23.83, 26.74, 27.57, 50.06, 56.57, 167.18, 172.34, 174.01.

**3°- H-(L)-Glu-(OH)-(L)-Phe-OH (81):**



Produit 81

$C_{14}H_{18}N_2O_5$

Masse molaire : 294.3g mol<sup>-1</sup>

Solide jaune

**Rdt** = 98%

**P<sub>f</sub>** = 131-135°C

**t<sub>r</sub>** = 1.02 min

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>**: -12.2 (c = 1g/100ml, H<sub>2</sub>O +10% de TFA)

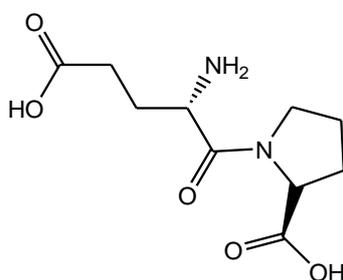
**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 295.1 (M+ H)<sup>+</sup>

**HRMS** = 295.1284 g/mol (Masse calculée = 295.1294 g/mol)

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O + 10% TFA) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 1.87 (m, 2H, H<sub>3</sub> (Glu)), 2.23 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 7.48 Hz), 2.87 (dd, 1H, H<sub>3a</sub> (Phe), <sup>3</sup>J = 7.76 Hz, <sup>2</sup>J = 14.07 Hz), 3.03 (dd, 1H, H<sub>3b</sub> (Phe), <sup>3</sup>J = 5.67 Hz, <sup>2</sup>J = 14.07 Hz), 3.79 (t, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 6.42 Hz), 4.47 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Phe), <sup>3</sup>J = 5.67 Hz, <sup>3</sup>J = 7.76 Hz), 7.05-7.17 (m, 5H, H<sub>aromatique</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O + 10% TFA) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 25.71, 28.64, 35.95, 52.03, 54.13, 127.11, 128.63, 128.97, 136.22, 168.77, 173.95, 175.87.

**4°- H-(L)-Glu-(OH)-(L)-Pro-OH (84):**



Produit 84

C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Masse molaire : 244.2g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc

**Rdt** = 95%

**P<sub>f</sub>** = 128 - 131°C

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>**: -10.1 (c = 1g/100mL, H<sub>2</sub>O +10% de TFA)

**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 245.1 (M+ H)<sup>+</sup>

**HRMS** = 245.1128 g/mol (Masse calculée = 245.1197 g/mol)

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O + 5% TFA ) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 1.98 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Pro)), 2.15 (m, 2H, H<sub>3</sub> (Glu)), 2.28 (m, 2H, H<sub>3</sub> (Pro)), 2.57 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 6.95 Hz), 3.61 (m, 1H, H<sub>5a</sub> (Pro)), 3.64 (m, 1H, H<sub>5b</sub> (Pro)), 4.37-4.41 (m, 2H, H<sub>2</sub> (Pro), H<sub>2</sub> (Glu)).

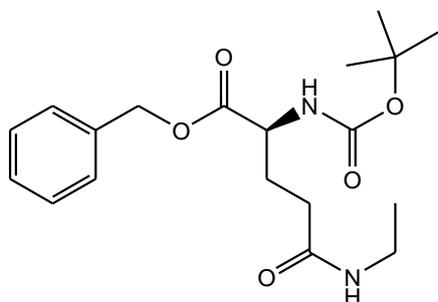
**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O + 5% TFA) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 24.63, 24.84, 28.47, 28.75, 47.72, 50.86, 59.62, 167.90, 175.30, 176.21.

### III. B . La (L)-Théanine ou la 5-N-(L)-propylglutamine positionnée en C-Term:

#### ➤ 1° - Stratégie générale de synthèse de Boc-(L)-Glu-(NHR)-OBn:

A une solution de (S) Boc-Glu-OBn (674mg, 2mmoles, 1eq) dans du THF (10mL), la triéthylamine TEA (0.83mL, 6mmoles, 3eq), le réactif BOP (1061 mg, 2.4mmoles, 1.2eq), et la n-propylamine ou l'éthylamine (2 moles, 1eq) sont additionnés successivement sous atmosphère d'argon. Après 1h d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé sous pression réduite puis le résidu huileux est dissous dans de l'AcOEt, est lavé avec une solution de NaHCO<sub>3</sub>, puis une solution d'acide citrique 10% et à la fin avec une solution saturée de NH<sub>4</sub>Cl. Le produit pur est obtenu après évaporation de l'AcOEt sous pression réduite à sec.

#### a - Boc-(L)-Glu-(EtNH)-OBn (86):

Produit **86**C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Masse molaire : 364.4g mol<sup>-1</sup>

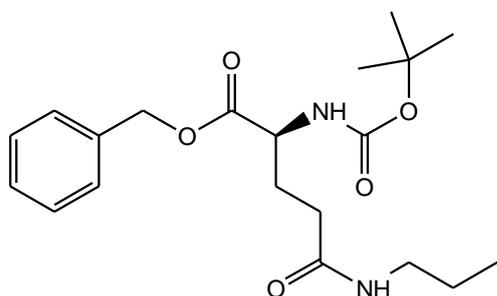
Huile jaune

Rdt = 95%

t<sub>r</sub> = 1.96 minMS (ES<sup>+</sup>) m/z: 365.3 (M+ H)<sup>+</sup>, 387.2 (M+ Na)<sup>+</sup>, 265.2 (MH-Boc)<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ<sub>H</sub> (ppm) 1.01 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.25 Hz), 1.33 (s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub> (Boc)), 1.89 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 2.05 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.13 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)), 3.15 (q, 2H, CH<sub>2</sub>NH, <sup>3</sup>J = 7.25 Hz), 4.22 (m, 1H, H<sub>2</sub> (Glu)), 5.07 (dd, 2H, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, <sup>2</sup>J = 11.5 Hz), 5.51 (d, 1H, NHCO (Boc), <sup>3</sup>J = 7.97 Hz), 6.24 (s, 1H, CH<sub>2</sub>NH), 7.20 -7.25 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ<sub>C</sub> (ppm) 14.65, 28.27, 28.46, 32.52, 34.40, 53.32, 67.07, 79.93, 128.28, 128.40, 128.58, 135.34, 155.84, 171.92, 172.23.

**b - Boc-(L)-Glu-(PrNH)-OBn (87):**Produit 87 $C_{20}H_{30}N_2O_5$ Masse molaire :  $378.2 \text{ g mol}^{-1}$ 

Solide rose

Rdt = 97%

 $t_r = 2.011 \text{ min}$  $P_f = 69-73^\circ\text{C}$ MS (ES<sup>+</sup>)  $m/z$ : 379.3 (M+ H)<sup>+</sup>, 401.2 (M+ Na)<sup>+</sup>, 279.2 (MH-Boc)<sup>+</sup>

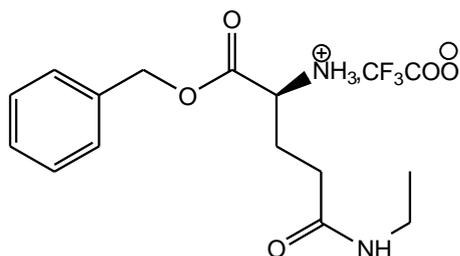
RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta_H$  (ppm) 0.84 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.40 Hz), 1.36 (s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub> (Boc)), 1.42 (m, 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.89 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 2.08 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.13 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)), 3.12 (t, 2H, CH<sub>2</sub>NH, <sup>3</sup>J = 6.70 Hz), 4.25 (m, 1H, H<sub>2</sub> (Glu)), 5.10 (dd, 2H, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, <sup>2</sup>J = 12.1 Hz), 5.28 (d, 1H, NHCO (Boc), <sup>3</sup>J = 7.88 Hz), 5.89 (s, 1H, CH<sub>2</sub>NH), 7.20 -7.29 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta_C$  (ppm) 11.15, 22.74, 28.27, 29.00, 32.67, 41.33, 53.13, 67.20, 80.12, 128.39, 128.49, 128.62, 135.28, 171.80, 172.15.

➤ 2°- Synthèse du sel de TFA de H-(L)-Glu-(NHR)-OBn : Hydrolyse du groupement protecteur Boc.

A une solution de (S) Boc-Glu-(NHR)-OBn (1eq) dans du DCM anhydre, placée sous agitation et à température ambiante, est additionné du TFA afin d'obtenir une solution de TFA à 50% dans le DCM. Après 1 heure d'agitation à température ambiante. Le milieu est repris dans du toluène puis évaporé sous pression réduite. Cette opération est répétée plusieurs fois avec du toluène et deux fois avec de l'éther. Le sel de TFA de H-Glu-(NHR)-OBn est obtenu avec des rendements quantitatifs.

**a - H-(L)-Glu-(EtNH)-OBn (88):**



Produit 88

$C_{14}H_{21}N_2O_3, CF_3CO_2H$

Masse molaire :  $264.34+114g\ mol^{-1}$

Huile incolore

Rdt = 100%

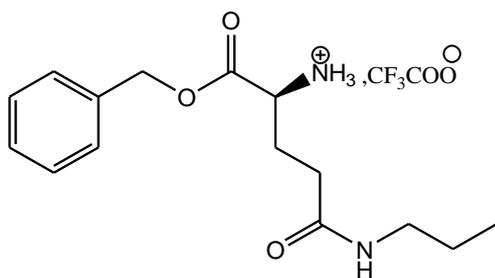
$t_r = 1.17\ min$

MS (ES<sup>+</sup>)  $m/z$ : 265.0 (M+ H)<sup>+</sup>, 287.2 (M+ Na)<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, MeOD) :  $\delta_H$  (ppm) 0.99 (t, 3H,  $\underline{CH_3}$ -CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.28 Hz), 2.08 (m, 2H, H<sub>3</sub> (Glu)), 2.30 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 7.12 Hz), 3.07 (q, 2H,  $\underline{CH_2}$ NH, <sup>3</sup>J = 7.28 Hz), 4.06 (t, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 6.24 Hz), 5.17 (s, 2H,  $\underline{CH_2}$ C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.25 - 7.32 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, MeOD) :  $\delta_C$  (ppm) 14.74, 27.26, 32.32, 35.43, 53.77, 69.27, 112.31, 116.23, 120.11, 123.90, 129.78, 129.83, 129.87, 136.41, 162.23, 162.68, 163.62, 170.23, 173.71.

**b - H-(L)-Glu-(PrNH)-OBn (89):**



Produit 89

$C_{15}H_{22}N_2O_3, CF_3CO_2H$

Masse molaire :  $278.4+114g\ mol^{-1}$

Huile incolore

Rdt = 100%

$t_r = 1.26\ min$

MS (ES<sup>+</sup>)  $m/z$ : 279.1 (M+ H)<sup>+</sup>, 301.2 (M+ Na)<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, MeOD) :  $\delta_H$  (ppm) 0.90 (t, 3H,  $\underline{CH_3}$ -CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.38 Hz), 1.48 (m, 2H, CH<sub>3</sub>- $\underline{CH_2}$ -CH<sub>2</sub>), 1.86 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 2.11 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.25 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)),

3.17 (t, 2H,  $\underline{\text{CH}_2\text{NH}}$ ,  $^3J = 6.76$  Hz), 3.96 (dd, 1H,  $\text{H}_2$  (Glu),  $^3J = 4.94$  Hz,  $^3J = 8.83$  Hz), 5.15 (s, 2H,  $\underline{\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5}$ ), 7.27 -7.36 (m, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ).

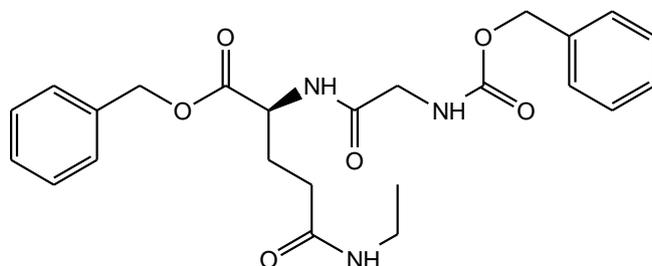
**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, MeOD) :**  $\delta_{\text{C}}$  (ppm) 11.36, 22.80, 30.34, 32.80, 41.19, 53.84, 66.80, 112.31, 116.23, 120.11, 123.90, 128.36, 128.44, 128.63, 135.59, 162.23, 162.68, 163.62, 172.06, 175.48.

➤ **3° - Synthèse des dipeptides Z-(L)-Xaa-(L)-Glu-(NHR)-OBn:**

Le sel de TFA de H-(L)-Glu-(NHR)-OBn (1eq) est dissous dans du THF anhydre. Sont rajoutés à cette solution l'acide aminé (S) Z-Xaa-OH (1eq), le réactif de couplage BOP (1.2eq) et la TEA (3eq). Le milieu réactionnel est placé sous argon à température ambiante et laissé sous agitation pendant 2h. A la fin de la réaction, le THF est évaporé et le résidu est repris par l'AcOEt, la phase organique est lavée deux fois à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 0.1N puis avec une solution saturée en  $\text{NaHCO}_3$ , la phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre, puis évaporée à sec. Le brut réactionnel obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice avec comme éluant DCM/EtOH (92/8).

**a - Z-Gly-(L)-Glu-(EtNH)-OBn (90):**

	Nombre d'équivalent	Nombre de mole	Quantité
H-Glu-(EtNH)-OBn. TFA	1eq	0.4 mmole	151 mg
Z-Gly-OH	1eq	0.4 mmole	84 mg
BOP	1.2eq	0.48 mmole	212 mg
TEA	3eq	1.2 mmole	0.17 mL



Produit 90

$\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_6$

Masse molaire :  $455.2\text{g mol}^{-1}$

Poudre blanche

**Rdt** = 69%

**R<sub>f</sub>** = 0.2 (DCM/EtOH, 92/8)

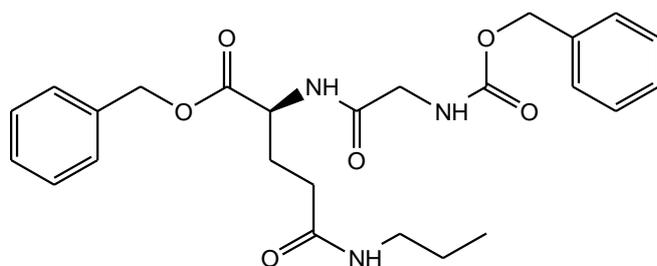
$t_r = 1.87$  min $P_f = 97-102^\circ\text{C}$ MS ( $\text{ES}^+$ )  $m/z$ : 456.3 ( $\text{M} + \text{H}$ )<sup>+</sup>, 478.1 ( $\text{M} + \text{Na}$ )<sup>+</sup>

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) 0.99 (t, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ,  $^3J = 7.05$  Hz), 1.86 (m, 1H,  $\text{H}_{3\text{a}}$  (Glu)), 1.98 (m, 1H,  $\text{H}_{3\text{b}}$  (Glu)), 2.12 (m, 2H,  $\text{H}_4$  (Glu)), 3.12 (q, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ,  $^3J = 7.05$  Hz), 3.79 (s, 2H,  $\text{H}_2$  (Gly)), 4.48 (m, 1H,  $\text{H}_2$  (Glu)), 5.02 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$  (Z)), 5.09 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$  (OBn)), 5.48 (s, 1H,  $\text{NHCO}$  (Gln)), 5.86 (s, 1H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 7.16 -7.28 (m, 11H, 2 x  $\text{C}_6\text{H}_5$  &  $\text{NHCO}$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta_{\text{C}}$  (ppm) 14.16, 27.21, 31.73, 33.99, 43.76, 51.54, 66.65, 66.82, 127.52, 127.73, 127.81, 128.06, 128.16, 13.74, 135.71, 156.10, 168.97, 171.08, 171.33.

**b - Z-Gly-(L)-Glu-(PrNH)-OBn (93):**

	Nombre d'équivalent	Nombre de mole	Quantité
<i>H-Glu-(PrNH)-OBn. TFA</i>	1eq	0.5 mmole	196 mg
<i>Z-Gly-OH</i>	1eq	0.5 mmole	104 mg
<i>BOP</i>	1.2eq	0.6 mmole	266 mg
<i>TEA</i>	3eq	1.5 mmole	0.21mL

Produit 93 $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4$ Masse molaire : 469.2  $\text{g mol}^{-1}$ 

Solide blanc

Rdt = 65%

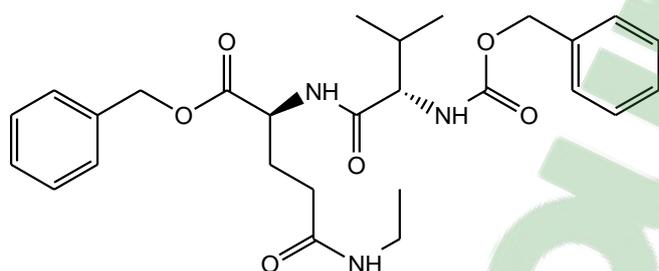
 $R_f = 0.24$  (DCM/EtOH, 92/8) $t_r = 1.95$  min $P_f = 110-113^\circ\text{C}$ MS ( $\text{ES}^+$ )  $m/z$ : 470.3 ( $\text{M} + \text{H}$ )<sup>+</sup>, 492.1 ( $\text{M} + \text{Na}$ )<sup>+</sup>

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, MeOD) :**  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) 0.69 (t, 3H,  $\underline{\text{CH}}_3\text{-CH}_2$ ,  $^3J = 7.42$  Hz), 1.28 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{-}\underline{\text{CH}}_2\text{-CH}_2$ ), 1.83 (m, 1H,  $\text{H}_{3\text{a}}$  (Glu)), 1.98 (m, 1H,  $\text{H}_{3\text{b}}$  (Glu)), 2.09 (m, 2H,  $\text{H}_4$  (Glu)), 3.12 (t, 2H,  $\underline{\text{CH}}_2\text{NH}$ ,  $^3J = 6.63$  Hz), 3.63 (s, 2H,  $\text{H}_2$  (Gly)), 4.30 (m, 1H,  $\text{H}_2$  (Glu)), 4.90 (s, 2H,  $\underline{\text{CH}}_2\text{C}_6\text{H}_5$  (Z)), 4.95 (s, 2H,  $\underline{\text{CH}}_2\text{C}_6\text{H}_5$  (OBn)), 7.08 -7.14 (m, 10H, 2 x  $\text{C}_6\text{H}_5$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, MeOD) :**  $\delta_{\text{C}}$  (ppm) 10.42, 22.20, 27.11, 31.67, 40.89, 41.03, 43.47, 51.86, 66.49, 66.68, 126.63, 127.49, 127.68, 127.84, 127.96, 128.13, 128.23, 135.76, 136.70, 157.68, 170.96, 171.48, 173.08.

**c - Z-(L)-Val-(L)-Glu-(EtNH)-OBn (91):**

	Nombre d'équivalent	Nombre de mole	Quantité
<i>H-Glu-(EtNH)-OBn. TFA</i>	1eq	0.53 mmole	200 mg
<i>Z-Val-OH</i>	1eq	0.53 mmole	133 mg
<i>BOP</i>	1.2eq	0.64 mmole	283 mg
<i>TEA</i>	3eq	1.6 mmole	0.23 mL



Produit 91

$\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_6$

Masse molaire :  $497.3\text{g mol}^{-1}$

Solide blanc

**Rdt** = 54%

**R<sub>f</sub>** = 0.33 (DCM/EtOH, 92/8)

**t<sub>r</sub>** = 2.07 min

**P<sub>f</sub>** = 92- 97°C

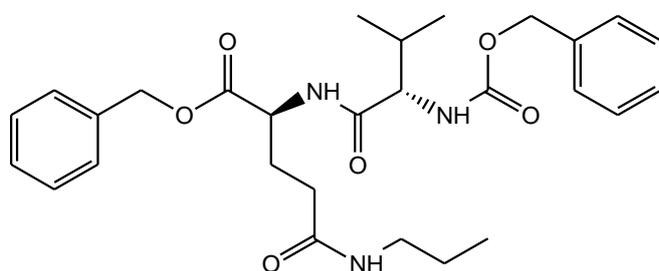
**MS (ES<sup>+</sup>) m/z:** 498.3 (M+ H)<sup>+</sup>, 520.1 (M+ Na)<sup>+</sup>

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :**  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) 0.89-0.93 (2d, 6H,  $\text{H}_{\underline{\text{H}}-\gamma}$ ,  $^3J = 6.84$  Hz,  $^3J = 6.77$  Hz), 1.07 (t, 3H,  $\underline{\text{CH}}_3\text{-CH}_2$ ,  $^3J = 7.28$  Hz), 1.92 (m, 1H,  $\text{H}_{3\text{a}}$  (Glu)), 2.05 (m, 2H,  $\text{H}_{3\text{b}}$  (Glu) &  $\text{H}_{3\text{a}}$  (Val)), 2.14 (m, 2H,  $\text{H}_4$  (Glu)), 3.20 (q, 2H,  $\underline{\text{CH}}_2\text{NH}$ ,  $^3J = 7.28$  Hz), 4.04 (d, 1H,  $\text{H}_2$  (Val),  $^3J = 7.13$  Hz), 4.51 (m, 1H,  $\text{H}_2$  (Glu)), 5.06 (s, 2H,  $\underline{\text{CH}}_2\text{C}_6\text{H}_5$  (Z)), 5.13 (s, 2H,  $\underline{\text{CH}}_2\text{C}_6\text{H}_5$  (OBn)), 5.47 (s, 1H,  $\underline{\text{NH}}\text{CO}$  (Z)), 5.97 (s, 1H,  $\underline{\text{CH}}_2\text{NH}$ ), 7.19 -7.31 (m, 11H, 2 x  $\text{C}_6\text{H}_5$  &  $\underline{\text{NH}}\text{CO}$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :**  $\delta_{\text{C}}$  (ppm) 14.65, 17.76, 19.08, 27.43, 29.62, 31.30, 32.25, 34.50, 52.19, 60.29, 67.00, 67.28, 127.96, 128.16, 128.41, 128.50, 128.53, 128.61, 135.17, 136.19, 156.43, 171.40, 171.61, 171.86.

**d - Z-(L)-Val-(L)-Glu-(PrNH)-OBn (94):**

	Nombre d'équivalent	Nombre de mole	Quantité
<i>H-Glu-(PrNH)-OBn. TFA</i>	1eq	0.59 mmole	230 mg
<i>Z-Val-OH</i>	1eq	0.59 mmole	148 mg
<i>BOP</i>	1.2eq	0.7 mmole	310 mg
<i>TEA</i>	3eq	1.8 mmole	0.25 mL



Produit 94

$\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_6$

Masse molaire :  $511.3 \text{ g mol}^{-1}$

Solide blanc

**Rdt** = 56%

**R<sub>f</sub>** = 0.39 (DCM/EtOH, 92/8)

**t<sub>r</sub>** = 2.16 min

**P<sub>f</sub>** = 94- 98°C

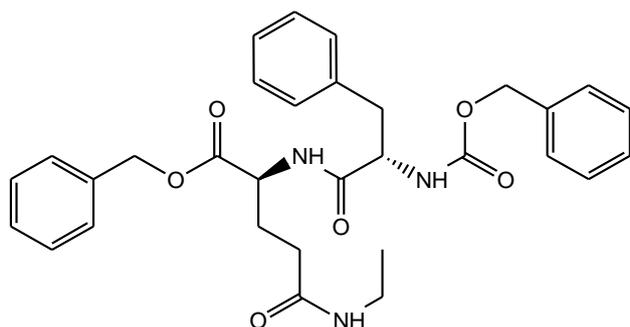
**MS (ES<sup>+</sup>) m/z:** 512.3 (M+ H)<sup>+</sup>, 534.3 (M+ Na)<sup>+</sup>

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO  $d_6$ ) :**  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) 0.81 (t, 3H,  $\underline{\text{CH}}_3\text{-CH}_2$ ,  $^3J = 6.15 \text{ Hz}$ ), 0.83-0.85 (2d, 6H, H<sub>4</sub> (Glu),  $^3J = 7.04 \text{ Hz}$ ,  $^3J = 6.97 \text{ Hz}$ ), 2.14 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{-}\underline{\text{CH}}_2\text{-CH}_2$ ), 1.81 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 1.99 (m, 2H, H<sub>3b</sub> (Glu) & H<sub>3</sub> (Val)), 2.17 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)), 2.97 (t, 2H,  $\underline{\text{CH}}_2\text{NH}$ ,  $^3J = 6.83 \text{ Hz}$ ), 3.90 (d, 1H, H<sub>2</sub> (Val),  $^3J = 6.93 \text{ Hz}$ ), 4.30 (m, 1H, H<sub>2</sub> (Glu)), 5.02 (s, 2H,  $\underline{\text{CH}}_2\text{C}_6\text{H}_5$  (Z)), 5.11 (s, 2H,  $\underline{\text{CH}}_2\text{C}_6\text{H}_5$  (OBn)), 7.29 -7.35 (m, 10H, 2 x  $\text{C}_6\text{H}_5$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO  $d_6$ ) :**  $\delta_{\text{C}}$  (ppm) 11.84, 18.54, 19.57, 22.82, 27.20, 30.85, 31.90, 52.17, 60.21, 65.82, 66.40, 128.09, 128.22, 128.33, 128.50, 128.79, 128.84, 136.32, 137.51, 156.58, 171.38, 171.94, 172.06.

**e - Z-(L)-Phe-(L)-Glu-(EtNH)-OBn (92):**

	Nombre d'équivalent	Nombre de mole	Quantité
<i>H-Glu-(EtNH)-OBn. TFA</i>	1eq	0.79 mmole	300 mg
<i>Z-Phe-OH</i>	1eq	0.79 mmole	236 mg
<i>BOP</i>	1.2eq	0.95 mmole	420 mg
<i>TEA</i>	3eq	2.4 mmole	0.34 mL

Produit 92C<sub>31</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Masse molaire : 545.3g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc

**Rdt** = 44%**R<sub>f</sub>** = 0.48 (DCM/EtOH, 92/8)**t<sub>r</sub>** = 2.22 min**P<sub>f</sub>** = 99- 103°C**MS (ES<sup>+</sup>) m/z:** 546.3 (M+ H)<sup>+</sup>, 568.3 (M+ Na)<sup>+</sup>

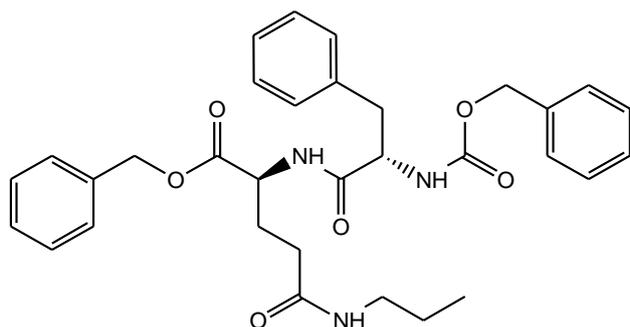
**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 1.07 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.28 Hz), 1.89 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 1.99 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.12 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)), 3.04 (q, 2H, CH<sub>2</sub>NH, <sup>3</sup>J = 7.28 Hz), 3.19 (m, 2H, H<sub>3</sub> (Phe)), 4.41 (m, 1H, H<sub>2</sub> (Phe)), 4.50 (m, 1H, H<sub>2</sub> (Glu)), 5.03 (s, 2H, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (Z)), 5.12 (s, 2H, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (OBn)), 5.34 (s, 1H, NHCO (Z)), 5.95 (s, 1H, CH<sub>2</sub>NH), 7.15 -7.32 (m, 16H, 3 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> & NHCO).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 14.65, 22.71, 29.63, 32.09, 34.43, 52.02, 56.22, 66.97, 67.32, 127.03, 127.96, 128.18, 128.38, 128.53, 128.65, 129.31, 129.47, 135.18, 135.48, 136.06, 171.18, 171.26, 171.70.

Clicours.COM

**f - Z-(L)-Phe-(L)-Glu-(PrNH)-OBn (95):**

	Nombre d'équivalent	Nombre de mole	Quantité
<i>H-Glu-(PrNH)-OBn. TFA</i>	1eq	0.79 mmole	300 mg
<i>Z-Phe-OH</i>	1eq	0.79 mmole	236 mg
<i>BOP</i>	1.2eq	0.95 mmole	420 mg
<i>TEA</i>	3eq	2.4 mmole	0.34 mL

Produit 95C<sub>32</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Masse molaire : 559.3g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc

**Rdt** = 50%**R<sub>f</sub>** = 0.54 (DCM/EtOH, 92/8)**t<sub>r</sub>** = 2.31 min**P<sub>f</sub>** = 110-115°C**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 560.3 (M+ H)<sup>+</sup>, 582.1 (M+ Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>)** : δ<sub>H</sub> (ppm) 0.81 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.39 Hz), 1.94 (m, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.84 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 2.03 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.19 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)), 2.70 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Phe)), 2.97 (m, 3H, CH<sub>2</sub>NH, H<sub>3b</sub> (Phe)), 4.29 (m, 2H, H<sub>2</sub> (Phe) & H<sub>2</sub> (Glu)), 4.92 (s, 2H, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (Z)), 5.12 (s, 2H, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (OBn)), 7.27 -7.35 (m, 15H, 3 x C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

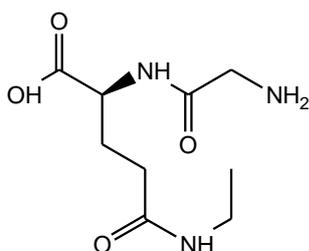
**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO d<sub>6</sub>)** : δ<sub>C</sub> (ppm) 11.86, 22.83, 27.23, 31.96, 37.84, 52.33, 56.31, 65.64, 66.44, 126.70, 127.90, 128.14, 128.27, 128.46, 128.50, 128.74, 128.86, 129.61, 136.36, 137.44, 138.58, 156.33, 171.35, 172.08, 172.50.

➤ **4°- Synthèse de H-(L)-Xaa-(L)-Glu-(NHR)-OH: hydrolyse des groupements protecteurs**

A une solution du composé devant être déprotégé dans du DCM est ajoutée goutte à goutte de l'HCl (5N) afin d'obtenir une solution d'HCl 2M. Le milieu est chauffé à 50°C

pendant 5h. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le solide qui en résulte correspond au chlorhydrate de dipeptide. Celui-ci est dissous dans un minimum de MeOH, un excès d'oxyde de propylène est ajouté. Le précipité qui se forme est ensuite filtré, lavé plusieurs fois à l'éther et séché sous vide.

**a - H-Gly-(L)-Glu-(EtNH)-OH (96):**



Produit 96

$C_9H_{17}N_3O_4$

Masse molaire :  $231.2 \text{ g mol}^{-1}$

Solide blanc

**Rdt** = 89%

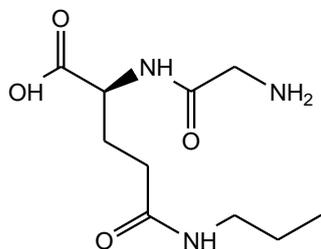
**P<sub>f</sub>** = 122-126°C

**MS (ES<sup>+</sup>) m/z:** 232.2 (M+ H)<sup>+</sup>, 254.3 (M+ Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O) :**  $\delta_H$  (ppm) 1.07 (t, 3H,  $\underline{CH}_3$ -CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.27 Hz), 2.02 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 2.21 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.31 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)), 3.16 (q, 2H,  $\underline{CH}_2$ NH, <sup>3</sup>J = 7.27 Hz), 3.86 (s, 2H, H<sub>2</sub> (Gly)), 4.42 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>J = 4.98 Hz, <sup>3</sup>J = 8.39 Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O) :**  $\delta_C$  (ppm) 13.88, 27.33, 32.41, 34.96, 40.80, 52.65, 167.52, 174.93, 175.08.

**b - H-Gly-(L)-Glu-(PrNH)-OH (99):**



Produit 99

$C_{10}H_{19}N_3O_4$

Masse molaire :  $245.3 \text{ g mol}^{-1}$

Solide blanc

**Rdt** = 91%

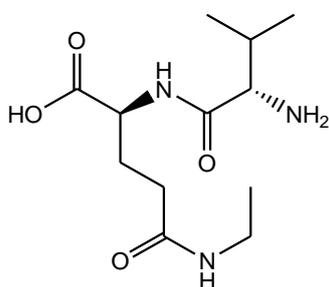
**P<sub>f</sub>** = 122 -130°C

**MS (ES<sup>+</sup>) *m/z*:** 246.3 (M+ H)<sup>+</sup>, 268.1 (M+ Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 0.76 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>*J* = 7.42 Hz), 1.38 (m, 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.84 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 2.03 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.20 (t, 2H, H<sub>4</sub> (Glu), <sup>3</sup>*J* = 7.64 Hz), 3.01 (t, 2H, CH<sub>2</sub>NH, <sup>3</sup>*J* = 6.94 Hz), 3.76 (s, 2H, H<sub>2</sub> (Gly)), 4.14 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>*J* = 4.84 Hz, <sup>3</sup>*J* = 8.61 Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 10.58, 21.74, 27.58, 32.22, 40.40, 41.19, 54.13, 166.61, 175.02, 177.08.

**c - H-(L)-Val-(L)-Glu-(EtNH)-OH (97):**



Produit 97

C<sub>12</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Masse molaire : 273.2g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc

**Rdt** = 84%

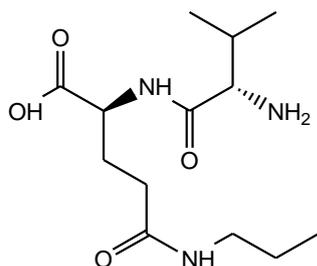
**P<sub>f</sub>** = 102- 107°C

**MS (ES<sup>+</sup>) *m/z*:** 274.4 (M+ H)<sup>+</sup>, 297.2 (M+ Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O + 10%TFA) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 0.85-0.88 (2d, 6H, 2 x CH<sub>3</sub> (Val), <sup>3</sup>*J* = 6.80 Hz, <sup>3</sup>*J* = 6.80 Hz), 0.93 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>*J* = 7.32 Hz), 1.85 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 2.04 (m, 2H, H<sub>3b</sub> (Glu) & H<sub>3</sub> (Val)), 2.17 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)), 3.01 (q, 2H, CH<sub>2</sub>NH, <sup>3</sup>*J* = 7.32 Hz), 3.68 (d, 1H, H<sub>2</sub> (Val), <sup>3</sup>*J* = 6.88 Hz), 4.24 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>*J* = 4.91 Hz, <sup>3</sup>*J* = 8.67 Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O + 10%TFA) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 13.04, 16.60, 17.35, 26.24, 29.92, 34.42, 34.42, 52.11, 58.42, 169.16, 174.13, 174.40.

**d - H-(L)-Val-(L)-Glu-(PrNH)-OH (100):**



Produit 100

$C_{13}H_{25}N_3O_4$

Masse molaire :  $287.2 \text{ g mol}^{-1}$

Solide jaune

**Rdt** = 83%

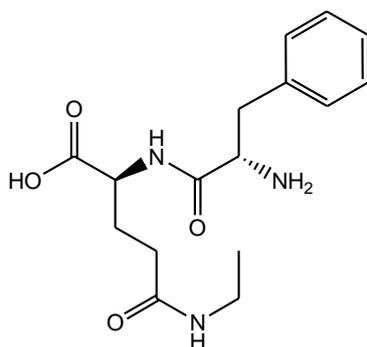
**P<sub>f</sub>** = 111- 114°C

**MS (ES<sup>+</sup>) m/z:** 288.3 (M+ H)<sup>+</sup>, 310.1 (M+ Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O + 10%TFA) :**  $\delta_H$  (ppm) 0.81 (t, 3H,  $\underline{CH_3}$ -CH<sub>2</sub>,  $^3J = 6.75$  Hz), 0.82-0.85 (2d, 6H, 2 x CH<sub>3</sub> (Val),  $^3J = 5.44$  Hz,  $^3J = 5.62$  Hz), 1.37 (m, 2H, CH<sub>3</sub>- $\underline{CH_2}$ -CH<sub>2</sub>), 1.83 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 1.99 (m, 2H, H<sub>3b</sub> (Glu) & H<sub>3</sub> (Val)), 2.17 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)), 2.97 (t, 2H,  $\underline{CH_2}$ NH,  $^3J = 7.09$  Hz), 4.01 (d, 1H, H<sub>2</sub> (Val),  $^3J = 6.93$  Hz), 4.28 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu),  $^3J = 4.84$  Hz,  $^3J = 8.71$  Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O + 10%TFA) :**  $\delta_C$  (ppm) 11.69, 18.95, 23.10, 31.17, 33.36, 42.70, 53.08, 58.27, 169.50, 173.47, 173.62.

**e - H-(L)-Phe-(L)-Glu-(EtNH)-OH (98):**



Produit 98

$C_{16}H_{23}N_3O_4$

Masse molaire :  $321.4 \text{ g mol}^{-1}$

Solide blanc

**Rdt** = 72%

**t<sub>r</sub>** = 1.02 min

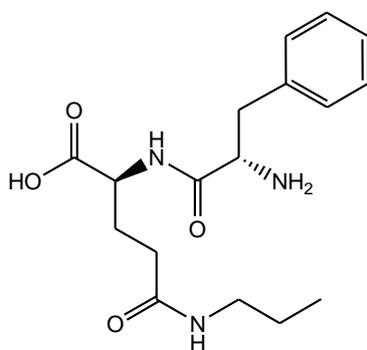
**P<sub>f</sub>** = 109- 113°C

**MS (ES<sup>+</sup>) *m/z*:** 322.2 (M+ H)<sup>+</sup>, 344.3 (M+ Na)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O + 10% TFA) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 1.09 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>*J* = 7.57 Hz), 1.91 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 1.98 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.09 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)), 2.92 (dd, 1H, H<sub>3a</sub> (Phe), <sup>3</sup>*J* = 6.98 Hz, <sup>2</sup>*J* = 12.36 Hz), 3.05 (q, 2H, CH<sub>2</sub>NH, <sup>3</sup>*J* = 7.57 Hz), 3.17 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Phe), <sup>3</sup>*J* = 6.32 Hz, <sup>2</sup>*J* = 12.36 Hz), 4.19 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Phe), <sup>3</sup>*J* = 6.98 Hz, <sup>3</sup>*J* = 6.32 Hz), 4.46 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>*J* = 4.88 Hz, <sup>2</sup>*J* = 8.38 Hz), 7.05 -7.24 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 14.27, 25.73, 33.36, 37.22, 39.88, 53.08, 53.78, 128.09, 128.54, 129.20, 136.53, 169.75, 173.36, 173.47.

**f - H-(L)-Phe-(L)-Glu-(PrNH)-OH (101):**



Produit 101

C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Masse molaire : 335.3g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc

**Rdt** = 87%

**t<sub>r</sub>** = 1.09 min

**P<sub>f</sub>** = 118-123°C

**MS (ES<sup>+</sup>) *m/z*:** 322.2 (M+ H)<sup>+</sup>, 344.3 (M+ Na)<sup>+</sup>

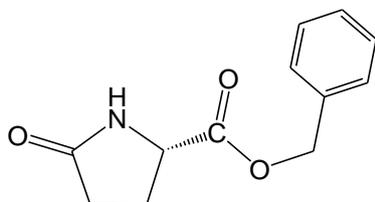
**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O + 10% TFA) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 0.97 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>*J* = 7.28 Hz), 1.61 (m, 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.04 (m, 1H, H<sub>3a</sub> (Glu)), 2.07 (m, 1H, H<sub>3b</sub> (Glu)), 2.18 (m, 2H, H<sub>4</sub> (Glu)), 2.96 (dd, 1H, H<sub>3a</sub> (Phe), <sup>3</sup>*J* = 7.02 Hz, <sup>2</sup>*J* = 12.12 Hz), 3.18 (m, 3H, H<sub>3b</sub> (Phe) & CH<sub>2</sub>NH), 4.09 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Phe), <sup>3</sup>*J* = 7.02 Hz, <sup>3</sup>*J* = 6.39 Hz), 4.42 (dd, 1H, H<sub>2</sub> (Glu), <sup>3</sup>*J* = 4.93 Hz, <sup>2</sup>*J* = 8.41 Hz), 7.08 -7.25(m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 11.69, 23.10, 25.73, 33.36, 39.88, 42.70, 53.08, 53.78, 127.50, 127.86, 128.20, 135.93, 169.89, 173.33, 173.59.

## IV - Synthèse des dérivés C-4 benzylés de la L-Théanine :

## ➤ A- Synthèse du (S)- 5-oxopyrrolidin-2 carboxylate de benzyl (115) : Protection de l'acide pyroglutamique (S) en H-Pyr-OBn.

L'acide (S)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylique (1eq, 62 mmoles, 8g) est solubilisé dans 30mL de toluène. Le mélange est chauffé à 80°C jusqu'à l'homogénéisation du milieu réactionnel puis la température est baissée à 60°C ; le chlorure de benzyle (1.2eq, 55 mmoles, 6.06mL) et la TEA (3eq, 138 mmoles, 19.2 mL) sont ajoutés successivement. Après 4heures de réaction, le mélange est concentré sous pression réduite ; le brut est repris dans l'AcOEt est extraite 3 fois avec une solution saturée de NH<sub>4</sub>Cl puis une solution d'acide citrique de 10% et l'H<sub>2</sub>O. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis concentrée sous vide et à sec pour obtenir le produit pur sous forme d'huile.

Produit 115C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>Masse molaire : 219.2g mol<sup>-1</sup>

huile

Rdt = 85%

t<sub>r</sub> = 1.47 min

Rf = 0,35 (AcOEt/EP : 60/40)

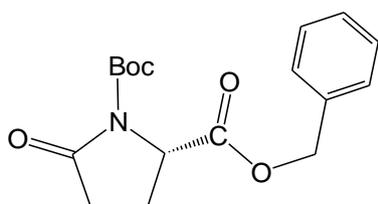
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -1.1 (1g/100mL, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)MS (ES<sup>+</sup>) m/z: 220.2 (M+ H)<sup>+</sup>, 261.1 (M+Na)+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 439.2 (2M+H)<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ<sub>H</sub> (ppm) 2.19 (m, 2H, H<sub>3</sub>), 2.35 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 4.25 (dd, 1H, H<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 4.90 Hz, <sup>3</sup>J = 8.25 Hz), 5.16 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (OBn)), 7.28 -7.34 (m, 6H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> & NHCO).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ<sub>C</sub> (ppm) 25.17, 29.73, 56.04, 67.59, 128.72, 128.95, 129.08, 135.68, 172.49, 178.85.

➤ **B - Synthèse de (S)-N-tert-butyloxycarbonyl-2-benzyloxycarbonyl pyrrolidin-5-one (116) : Boc-(L)-Pyr-OBn:**

Le produit (**1g**) (S) H-Pyr-OBn (1eq, 18.28 mmoles, 4 g) est introduit dans un ballon bicol. On ajoute une quantité catalytique de DMAP (0.3eq, 5.33 mmole, 654 mg) dissoute dans de l'ACN (15mL) puis goutte à goutte une solution de Boc<sub>2</sub>O (2eq, 36.56 mmoles, 8g) dans de l'ACN à l'aide d'une ampoule à brome. La réaction est laissée sous atmosphère d'argon à température ambiante pendant 5h. Après évaporation de l'ACN sous pression réduite, le brut obtenu est dilué dans de l'AcOEt et lavé 3 fois avec une solution d'acide citrique 10%, puis 3 fois avec une solution de NH<sub>4</sub>Cl saturé et enfin 3 fois avec de l'H<sub>2</sub>O. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée à sec. Le résidu est élué par chromatographie sur gel de silice (éluant : éther) pour donner le produit Boc-Pyr-OBn (**116**) avec un rendement de 98%.



Produit 116

C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>

Masse molaire : 319.2g mol<sup>-1</sup>

Poudre blanche

**Rdt** = 98%

**t<sub>r</sub>** = 2.13 min

**R<sub>f</sub>** = 0,72 (AcOEt/Et<sub>2</sub>O, 3/7)

**P<sub>f</sub>** = 81-84°C

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = -3.5 (1g/100mL, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

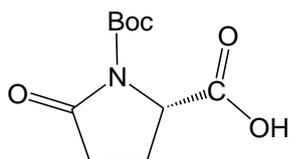
**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 320.3 (M+ H)<sup>+</sup>, 342.3 (M+Na)<sup>+</sup>, 221.2 (MH- Boc)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ<sub>H</sub> (ppm) 1.12 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (Boc)), 2.14 (m, 2H, H<sub>3</sub>), 2.30 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 4.24 (dd, 1H, H<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 4.92 Hz, <sup>3</sup>J = 8.28 Hz), 5.16 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (OBn)), 7.25 -7.31 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ<sub>C</sub> (ppm) 25.17, 29.73, 31.04, 56.04, 67.59, 81.12, 128.72, 128.95, 129.08, 135.68, 151.2, 168.72, 174.49.

➤ **C - Synthèse de (S)-1-tert-butyloxycarbonyl pyrrolidin-5-one (117) :**

Le produit (L) Boc-Pyr-OBn (**116**) est dissous dans de l'AcOEt en présence d'une quantité catalytique de Pd/C (10% en poids, 200 mg) ; la réaction a lieu sous atmosphère d'hydrogène à température ambiante pendant une nuit. La réaction est arrêtée et filtrée sur célite. Le produit est obtenu après évaporation du solvant sous pression réduite.



Produit 117

$C_{10}H_{15}NO_5$

Masse molaire :  $229.2 \text{ g mol}^{-1}$

huile incolore

**Rdt** = 100%

$t_r$  = 1.03 min

$[\alpha]_D^{20} = -2.7$  (1g/100mL,  $CH_2Cl_2$ )

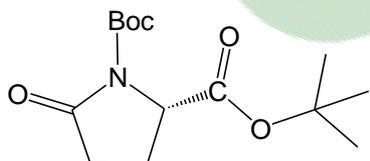
**MS (ES<sup>+</sup>) m/z:** 230.2 (M+ H)<sup>+</sup>, 247.4 (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>, 130.0 (MH- Boc)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :**  $\delta_H$  (ppm) 1.37 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (Boc)), 2.05 (m, 1H, H<sub>3a</sub>), 2.28 (m, 1H, H<sub>3b</sub>), 2.51 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 4.56 (dd, 1H, H<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 4.96 Hz, <sup>3</sup>J = 9.08 Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :**  $\delta_C$  (ppm) 21.44, 27.85, 31.2, 58.88, 84.10, 149.33, 174.35, 175.56.

➤ **D - Synthèse de (S)-1,2-di-tert-butyloxycarbonyl pyrrolidin-5-one (118) :**

A une solution de (L) Boc-Pyr-OH (1eq, 7.16mmoles, 1.64g) et d'une quantité catalytique de DMAP (0.3eq, 2.84mmoles, 348mg) dans de l'ACN (15mL) est additionné le Boc<sub>2</sub>O (3eq, 21.48 mmole, 4.68 g) dissous dans l'ACN à l'aide d'une ampoule à brome. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation et sous atmosphère d'argon pendant 13 heures à température ambiante. L'ACN est évaporé, le brut réactionnel est purifié sur colonne de gel de silice (EtO<sub>2</sub>/AcOEt, 8/2). Une huile jaune est obtenue avec un rendement de (91%).



Produit 118

$C_{14}H_{23}NO_5$

Masse molaire :  $285.2 \text{ g mol}^{-1}$

Huile jaune

**Rdt** = 91%

**t<sub>r</sub>** = 1.93 min

**R<sub>f</sub>** = 0.72 (EtO<sub>2</sub>/AcOEt, 8/2)

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = -3.8 (1g/100mL, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

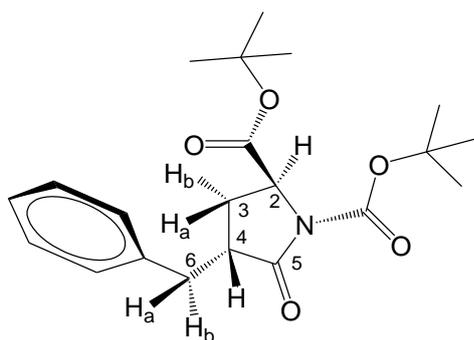
**MS (ES<sup>+</sup>) m/z:** 286.2 (M+ H)<sup>+</sup>, 308.2 (M+Na)<sup>+</sup>, 186.3 (MH- Boc)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 1.29 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (Boc)), 1.30 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (OtBu)), 1.79 (m, 1H, H<sub>3a</sub>), 2.13 (m, 1H, H<sub>3b</sub>), 2.32 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 4.29 (dd, 1H, H<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 2.57 Hz, <sup>3</sup>J = 9.31 Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 22.21, 28.49, 28.52, 31.70, 60.19, 82.77, 83.72, 149.88, 171.06, 174.25.

➤ **Synthèse des dérivés C-4-alkylés du pyroglutamate : Procédure générale d'alkylation :**

A une solution de (*L*) Boc-Pyr-OtBu (1eq, 1.2g, 4.2mmoles) dans du THF anhydre (15mL), placée sous agitation, sous argon et à -78°C est additionnée goutte à goutte une solution de LiHMDS 1.0 M dans du THF (1.2eq, 3.6mL, 5mmole) et d'HMPA (1.2eq, 1.28mL, 5mmole) à l'aide d'une seringue. Au bout de 45 minutes, l'agent alkylant (1eq, 4.2mmole) est ajoutée goutte à goutte. Après 1 heure de réaction une solution de NH<sub>4</sub>Cl saturée est additionnée au milieu et le mélange réactionnel revient à température ambiante. Les deux phases obtenues sont séparées et la phase aqueuse est alors extraite plusieurs fois avec de l'AcOEt. Les phases organiques sont récupérées et lavées encore deux fois avec une solution saturée de NH<sub>4</sub>Cl puis séchées sur MgSO<sub>4</sub>. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant AcOEt : CHX, 1 :4).

1° - (2*S*,4*R*)-1,2-di-*tert*-butyloxycarbonyl-4-benzyl pyrrolidin-5-one (120) :Produit 120 $C_{21}H_{29}NO_5$ Masse molaire :  $375.2 \text{ g mol}^{-1}$ 

Poudre blanche

**Rdt** = 58%**t<sub>r</sub>** = 2.64 min**R<sub>f</sub>** = 0.3 (éluant AcOEt : CHX, 1 :4)

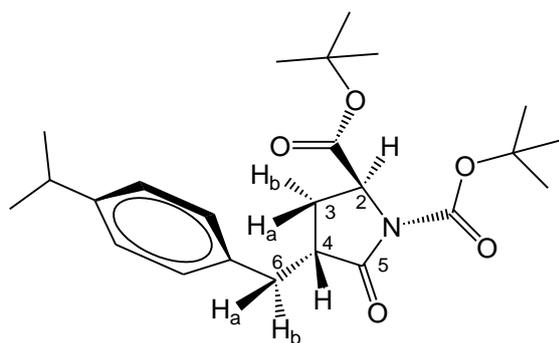
**HPLC Chirale (analytique)** : - Chiralcel-OD-RH (80/20) H<sub>2</sub>O/ACN, 1mL/min, 30 min, 214 nm, t<sub>R</sub> = 21.18min.

- Chiralpak AD-H (75/25) hexane/isopropanol, 1mL/min, 45 min, 214 nm, t<sub>R</sub> = 32.67 min.

**P<sub>f</sub>** = 75-79°C**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = -4.00 (1g/100mL, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 379.4 (M+ H)<sup>+</sup>, 398.3 (M+Na)<sup>+</sup>, 276.3 (MH- Boc)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ<sub>H</sub> (ppm) 1.44 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (OtBu)), 1.51 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (Boc)), 1.96 (ddd, 1H, H<sub>3b</sub>, <sup>3</sup>J<sub>(H3b-H2)</sub> = 9.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>(H3b, H4)</sub> = 11.2 Hz, <sup>2</sup>J<sub>(H3b, H3a)</sub> = 13.2 Hz), 2.01 (ddd, 1H, H<sub>3a</sub>, <sup>3</sup>J<sub>(H3a-H2)</sub> = 2.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>(H3a, H4)</sub> = 8.9 Hz, <sup>2</sup>J<sub>(H3a, H3b)</sub> = 13.2 Hz), 2.68 (dd, 1H, H<sub>6b</sub>, <sup>3</sup>J<sub>(H6b-H4)</sub> = 9.3 Hz, <sup>2</sup>J<sub>(H6b, H6a)</sub> = 14.0 Hz), 2.91 (dtd, 1H, H<sub>4</sub>, <sup>3</sup>J<sub>(H4-Ha)</sub> = 4.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>(H4, Hb)</sub> = 9.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>(H4-H3a)</sub> = 8.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>(H4, H3b)</sub> = 11.2 Hz), 3.26 (dd, 1H, H<sub>6a</sub>, <sup>3</sup>J<sub>(H6a-H4)</sub> = 4.3 Hz, <sup>2</sup>J<sub>(H6a, H6b)</sub> = 14.0 Hz), 4.27 (dd, 1H, H<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>(H2-H3a)</sub> = 2.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>(H2, H3b)</sub> = 9.2 Hz), 7.17-7.29 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ<sub>C</sub> (ppm) 27.57, 36.17, 43.26, 57.66, 82.10, 83.26, 126.38, 128.65, 129.03, 138.35, 149.35, 170.21, 174.43.

2° - (2*S*,4*R*)-1,2-di-*tert*-butyloxycarbonyl-4-(4-isopropylbenzyl) pyrrolidin-5-one (121) :Produit 121 $C_{24}H_{35}NO_5$ Masse molaire : 417.3g mol<sup>-1</sup>

Poudre blanche

**Rdt** = 52%**t<sub>r</sub>** = 3.02 min**R<sub>f</sub>** = 0.52

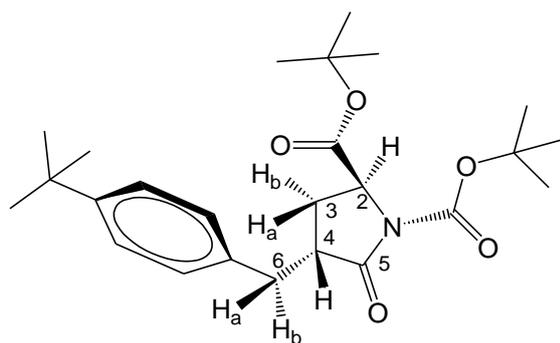
**HPLC Chirale (analytique) :** - Chiralcel-OD-RH (65/35) H<sub>2</sub>O/ACN, 1mL/min, 30 min, 214 nm, t<sub>R</sub> = 14.87 min.

- Chiralpak AD-H (90/10) hexane/isopropanol, 1mL/min, 30 min, 214 nm, t<sub>R</sub> = 23.54 min.

**P<sub>f</sub>** = 59-62°C**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = -3.4 (1g/100mL, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)**MS (ES<sup>+</sup>) m/z:** 418.3 (M+ H)<sup>+</sup>, 440.3 (M+Na)<sup>+</sup>, 318.3 (MH- Boc)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 1.23(d, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz), 1.44 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (OtBu)), 1.51 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (Boc)), 1.97 (ddd, 1H, H<sub>3b</sub>, <sup>3</sup>J<sub>(H3b-H2)</sub> = 9.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>(H3b, H4)</sub> = 11.1 Hz, <sup>2</sup>J<sub>(H3b, H3a)</sub> = 13.3 Hz), 2.03 (ddd, 1H, H<sub>3a</sub>, <sup>3</sup>J<sub>(H3a-H2)</sub> = 2.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>(H3a, H4)</sub> = 8.8 Hz, <sup>2</sup>J<sub>(H3a, H3b)</sub> = 13.3 Hz), 2.65 (dd, 1H, H<sub>6b</sub>, <sup>3</sup>J<sub>(H6b-H4)</sub> = 9.4 Hz, <sup>2</sup>J<sub>(H6b, H6a)</sub> = 14.1 Hz), 2.87 (dtd, 1H, H<sub>4</sub>, <sup>3</sup>J<sub>(H4-H6a)</sub> = 4.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>(H4, H6b)</sub> = 9.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>(H4-H3a)</sub> = 8.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>(H4, H3b)</sub> = 11.1 Hz), 2.9 (d, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz), 3.22 (dd, 1H, H<sub>6a</sub>, <sup>3</sup>J<sub>(H6a-H4)</sub> = 4.3 Hz, <sup>2</sup>J<sub>(H6a, H6b)</sub> = 14.0 Hz), 4.34 (dd, 1H, H<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>(H2-H3a)</sub> = 2.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>(H2, H3b)</sub> = 9.3 Hz), 7.09, 7.15 (2d, 4H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, <sup>3</sup>J = 8.1 Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 23.99, 27.94, 33.68, 35.64, 43.32, 57.76, 82.25, 83.25, 126.66, 128.93, 135.55, 147.14, 149.43, 170.34, 174.64.

3° - (2*S*,4*R*)-1,2-di-tert-butyloxycarbonyl-4-(4-tertbutylbenzyl) pyrrolidin-5-one (122) :Produit 122C<sub>25</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>5</sub>Masse molaire : 431.3g mol<sup>-1</sup>

Poudre blanche

Rdt = 44%

t<sub>r</sub> = 3.13 minR<sub>f</sub> = 0.58

**HPLC Chirale (analytique) :** - Chiralcel-OD-RH (65/35) H<sub>2</sub>O/ACN, 1mL/min, 30 min, 214 nm, t<sub>R</sub> = 12.43 min.

- Chiralpak AD-H (95/5) hexane/isopropanol, 1mL/min, 45 min, 214 nm, t<sub>R</sub> = 35.41 min.

P<sub>f</sub> = 50-54°C[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -2.9 (1g/100mL, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)MS (ES<sup>+</sup>) m/z: 432.3 (M+ H)<sup>+</sup>, 454.2 (M+Na)<sup>+</sup>, 332.3 (MH- Boc)<sup>+</sup>

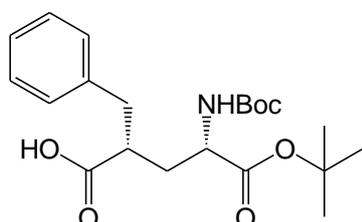
**RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 1.3 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.43 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (OtBu)), 1.50 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (Boc)), 1.98 (ddd, 1H, H<sub>3b</sub>, <sup>3</sup>J<sub>(H3b-H2)</sub> = 9.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>(H3b, H4)</sub> = 11.1 Hz, <sup>2</sup>J<sub>(H3b, H3a)</sub> = 13.3 Hz), 2.04 (ddd, 1H, H<sub>3a</sub>, <sup>3</sup>J<sub>(H3a-H2)</sub> = 2.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>(H3a, H4)</sub> = 8.8 Hz, <sup>2</sup>J<sub>(H3a, H3b)</sub> = 13.3 Hz), 2.65 (dd, 1H, H<sub>6b</sub>, <sup>3</sup>J<sub>(H6b-H4)</sub> = 9.4 Hz, <sup>2</sup>J<sub>(H6b, Ha)</sub> = 14.2 Hz), 2.9 (dtd, 1H, H<sub>4</sub>, <sup>3</sup>J<sub>(H4-H6a)</sub> = 4.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>(H4, H6b)</sub> = 9.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>(H4-H3a)</sub> = 9.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>(H4, H3b)</sub> = 11.1 Hz), 3.22 (dd, 1H, H<sub>6a</sub>, <sup>3</sup>J<sub>(H6a-H4)</sub> = 4.3 Hz, <sup>2</sup>J<sub>(H6a, H6b)</sub> = 14.2 Hz), 4.34 (dd, 1H, H<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>(H2-H3a)</sub> = 2.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>(H2, H3b)</sub> = 9.4 Hz), 7.1, 7.3 (dd, 4H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, <sup>3</sup>J = 7.9 Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 27.91, 28.00, 31.32, 34.37, 35.79, 43.23, 57.72, 82.22, 83.22, 125.47, 128.62, 135.15, 149.40, 170.30, 174.60.

➤ **Mode opératoire générale d'ouverture du pyroglutamate alkylé :**

Les différents pyroglutamates alkylés (**120-122**) optiquement purs (1eq, 1mmole) sont dissous dans 4 mL de THF et une solution aqueuse de LiOH (1M, 3 mL). Le mélange réactionnel est agité 10 min à -10°C puis pendant 1h à -5°C. La réaction est arrêtée par l'ajout de 6 mL d'AcOEt. Les deux phases sont séparées. La phase organique est lavée trois fois par une solution d'acide citrique 10%, puis séchée sur MgSO<sub>4</sub> est évaporée sous pression réduite pour obtenir les produits purs.

**1°- Acide (2R,4S)-2-benzyl-5-tert-butoxy-4-(amino(tert-butoxycarbonyl))-5-oxo-pentanoïque (128) :**



Produit 128

C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>6</sub>

Masse molaire : 393.5g mol<sup>-1</sup>

Liquide incolore

**Rdt** = 95%

**t<sub>r</sub>** = 2.37 min

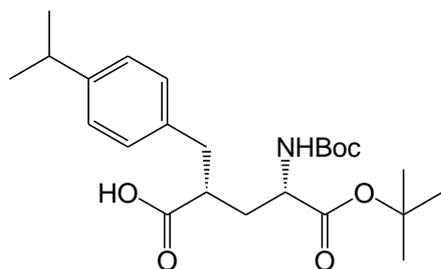
**R<sub>f</sub>** = 0.43 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 96/4)

**MS (ES<sup>+</sup>) m/z:** 394.4 (M+ H)<sup>+</sup>, 406.4 (M+Na)<sup>+</sup>, 294.4 (MH- Boc)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, MeOD) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 1.42 (s, 18H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (OtBu), (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (Boc)), 1.71 (m, 1H, H<sub>3b</sub>), 2.10 (m, 1H, H<sub>3a</sub>), 2.79(m, 1H, CH<sub>2</sub>-Ph), 2.91 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 4.00 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 7.16 - 7.25 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, MeOD) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 28.26, 28.77, 34.51, 39.79, 45.47, 54.33, 80.53, 82.74, 127.55, 129.47, 130.12, 140.24, 158.02, 173.35, 178.23.

**2°- Acide (2*R*,4*S*)-2-(4-isopropylbenzyl)- 5-*tert*-butoxy-4-(amino(*tert*-butoxycarbonyl))-5-oxo-pentanoïque (129) :**



Produit 129

C<sub>24</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>6</sub>

Masse molaire : 435.3g mol<sup>-1</sup>

Liquide incolore

**Rdt** = 98%

**t<sub>r</sub>** = 2.72 min

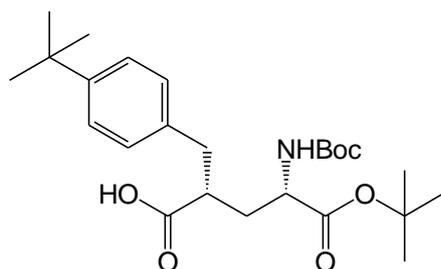
**R<sub>f</sub>** = 0.29 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 98/2)

**MS (ES<sup>+</sup>) m/z:** 436.4 (M+ H)<sup>+</sup>, 458.3 (M+Na)<sup>+</sup>, 336.2 (MH- Boc)<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, MeOD) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 1.22 (d, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz), 1.42 (s, 18H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (OtBu), (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (Boc)), 1.73 (m, 1H, H<sub>3b</sub>), 2.11 (m, 1H, H<sub>3a</sub>), 2.75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph), 2.85 (m, 2H, H<sub>2</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH-Ph), 4.03 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 7.17-7.21 (2d, 4H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, <sup>3</sup>J = 7.9 Hz).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, MeOD) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 24.60, 28.34, 28.84, 34.39, 35.05, 39.42, 45.47, 54.34, 80.54, 82.24, 127.49, 130.14, 137.54, 148.24, 157.96, 173.32, 178.41.

**3°- Acide (2*R*,4*S*)-2-(4-*tert*butylbenzyl)- 5-*tert*-butoxy-4-(amino(*tert*-butoxycarbonyl))-5-oxo-pentanoïque (130) :**



Produit 130

C<sub>25</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>6</sub>

Masse molaire : 449.3g mol<sup>-1</sup>

Liquide incolore

**Rdt** = 98%

**t<sub>r</sub>** = 2.82 min

**R<sub>f</sub>** = 0.35 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 98/2)

**MS (ES<sup>+</sup>) m/z:** 450.4 (M+ H)<sup>+</sup>, 472.3 (M+Na)<sup>+</sup>, 350.4 (MH- Boc)<sup>+</sup>

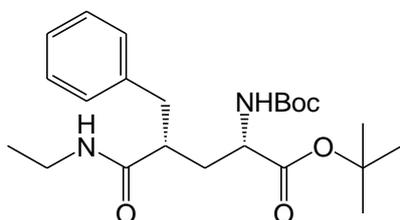
**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, MeOD) :**  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) 1.29 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.43 (s, 18H,  $(\text{CH}_3)_3$  (OtBu),  $(\text{CH}_3)_3$  (Boc)), 1.90 (m, 1H,  $\text{H}_{3\text{b}}$ ), 2.10 (m, 1H,  $\text{H}_{3\text{a}}$ ), 2.75 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -Ph), 2.95 (m, 1H,  $\text{H}_2$ ), 4.02 (m, 1H,  $\text{H}_4$ ), 7.13, 7.36 (2d, 4H,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ,  $^3J = 7.88$  Hz).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, MeOD) :**  $\delta_{\text{C}}$  (ppm) 28.25, 28.64, 31.84, 34.29, 35.20, 45.35, 54.28, 80.01, 82.81, 126.33, 129.48, 136.71, 149.93, 173.10, 178.06.

➤ **Procédure générale d'amidification des produits (128-130):**

A une solution du produit (128-130) (1eq, 200mg) dans du THF anhydre (6 mL), le BOP (1.2eq), la TEA (3eq) et une solution d'éthylamine dans du THF anhydre 2M (1eq) sont ajoutés. Après 1heure, sous agitation à température ambiante, de l'AcOEt est ajouté au milieu en quantité suffisante, la phase organique est lavée deux fois à l'aide d'une solution d'acide citrique 10%, puis avec une solution saturée en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et enfin avec une solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$ . La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre, puis évaporée à sec pour obtenir le produit pur.

**1°- (2S,4R) -2-(amino(*tert*-butoxycarbonyl)) -4-benzyl-5-oxo-5-aminoéthyl pentanoate de *tert*butyle (131) :**



Produit 131

$\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_5$

Masse molaire :  $420.3\text{ g mol}^{-1}$

Solide blanc

**Rdt** > 99%

**$t_{\text{r}}$**  = 2.32 min

**$R_{\text{f}}$**  = 0.48 (Cyclohexane/AcOEt, 6/4)

**$P_{\text{f}}$**  = 75-79°C

**$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$**  = 2.40 (1g/100mL,  $\text{CHCl}_3$ )

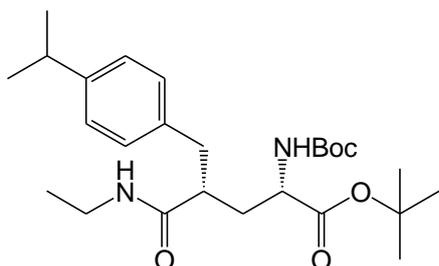
**MS ( $\text{ES}^+$ )  $m/z$ :** 421.3 ( $\text{M} + \text{H}$ )<sup>+</sup>, 443.4 ( $\text{M} + \text{Na}$ )<sup>+</sup>, 321.3 ( $\text{MH} - \text{Boc}$ )<sup>+</sup>

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :**  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) 1.04 (t, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}$ ,  $^3J = 7.15$  Hz), 1.42 (s, 18H,  $(\text{CH}_3)_3$  (OtBu),  $(\text{CH}_3)_3$  (Boc)), 1.59 (m, 1H,  $\text{H}_{3\text{b}}$ ), 2.17 (m, 1H,  $\text{H}_{3\text{a}}$ ), 2.41 (m, 1H,  $\text{H}_4$ ),

2.60 (dd, 1H, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>-Ph, <sup>3</sup>J<sub>(Hb, H2)</sub> = 13.48 Hz, <sup>2</sup>J<sub>(Hb, Ha)</sub> = 4.3 Hz), 3.00 (dd, 1H, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>-Ph, <sup>3</sup>J<sub>(Ha, H2)</sub> = 7.9 Hz, <sup>2</sup>J<sub>(Ha, Hb)</sub> = 4.3 Hz), 3.22 (q, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>NH, <sup>3</sup>J = 7.15 Hz), 4.12 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 5.12 (m, 1H, CH<sub>2</sub>NH), 6.63 (m, 1H, NHBoc), 7.16-7.20 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ<sub>C</sub> (ppm) 14.63, 27.95, 28.28, 29.57, 34.24, 37.28, 38.52, 44.89, 52.59, 80.11, 82.10, 126.23, 128.36, 128.93, 139.63, 156.62, 171.46, 173.62.

2° - (2S,4R) -2-(amino(*tert*-butoxycarbonyl)) -4-(4-isopropylbenzyl)-5-oxo-5-aminoéthyl pentanoate de *tert*butyle (132) :



Produit 132

C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Masse molaire : 462.6g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc

Rdt = 100%

t<sub>r</sub> = 2.69 min

R<sub>f</sub> = 0.61 (Cyclohexane/AcOEt, 6/4)

P<sub>f</sub> = 68-72°C

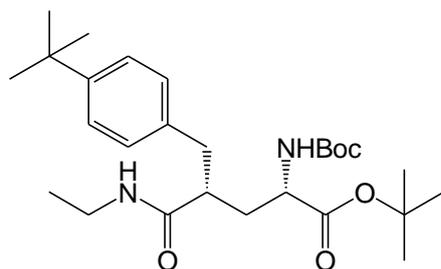
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = 2.34 (1g/100mL, CHCl<sub>3</sub>)

MS (ES<sup>+</sup>) m/z: 463.5 (M+ H)<sup>+</sup>, 485.4 (M+Na)<sup>+</sup>, 363.4 (MH- Boc)<sup>+</sup>

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ<sub>H</sub> (ppm) 1.02 (t, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>NH, <sup>3</sup>J = 7.28 Hz), 1.22 (d, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz), 1.42 (s, 18H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (OtBu), (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (Boc)), 1.59 (m, 1H, H<sub>3b</sub>), 2.17 (m, 1H, H<sub>3a</sub>), 2.36 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 2.58 (dd, 1H, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>-Ph, <sup>3</sup>J<sub>(Hb, H2)</sub> = 13.37 Hz, <sup>2</sup>J<sub>(Hb, Ha)</sub> = 6.8 Hz), 2.84 (m, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH-Ph), 2.95 (dd, 1H, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>-Ph, <sup>3</sup>J<sub>(Ha, H2)</sub> = 15.53 Hz, <sup>2</sup>J<sub>(Ha, Hb)</sub> = 6.8 Hz), 3.21 (q, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>NH, <sup>3</sup>J = 7.28 Hz), 4.13 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 5.12 (m, 1H, CH<sub>2</sub>NH), 6.52 (m, 1H, NHBoc), 7.17-7.21 (2d, 4H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, <sup>3</sup>J = 7.9 Hz).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ<sub>C</sub> (ppm) 14.63, 23.98, 24.05, 27.96, 33.7, 34.22, 45.18, 52.65, 80.06, 82.34, 126.40, 128.82, 136.83, 146.77, 156.23, 171.54, 173.76.

3°- (2*S*,4*R*)-2-(amino(*tert*butoxycarbonyl))-4-(4-*tert*butylbenzyl)-5-oxo-5-aminoéthyl pentanoate de *tert*butyle (133) :



Produit 133

$C_{27}H_{44}N_2O_5$

Masse molaire :  $476.6 \text{ g mol}^{-1}$

Solide blanc

Rdt = 100%

tr = 2.77 min

$R_f$  = 0.67 (Cyclohexane/AcOEt, 6/4)

$P_f$  = 60-68°C

$[\alpha]_D^{20} = 2.2$  (1g/100mL,  $CHCl_3$ )

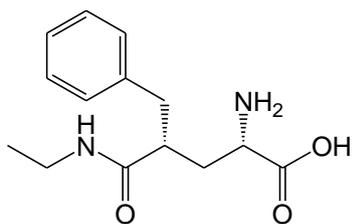
MS ( $ES^+$ )  $m/z$ : 477.5 ( $M+H$ )<sup>+</sup>, 499.5 ( $M+Na$ )<sup>+</sup>, 377.3 ( $MH-Boc$ )<sup>+</sup>

RMN  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta_H$  (ppm) 1.02 (t, 3H,  $\underline{CH_3}CH_2NH$ ,  $^3J = 7.24$  Hz), 1.27 (s, 9H,  $C(\underline{CH_3})_2$ ), 1.43 (s, 18H,  $(\underline{CH_3})_3$  (*Ot*Bu),  $(\underline{CH_3})_3$  (Boc)), 1.57 (m, 1H,  $H_{3b}$ ), 2.20 (m, 1H,  $H_{3a}$ ), 2.37 (m, 1H,  $H_4$ ), 2.59 (dd, 1H,  $CH_aH_b-Ph$ ,  $^3J_{(H_b, H_2)} = 13.74$  Hz,  $^2J_{(H_b, H_a)} = 7.9$  Hz), 2.96 (dd, 1H,  $CH_aH_b-Ph$ ,  $^3J_{(H_a, H_2)} = 15.58$  Hz,  $^2J_{(H_a, H_b)} = 7.9$  Hz), 3.22 (q, 2H,  $CH_3CH_2NH$ ,  $^3J = 7.24$  Hz), 4.09 (m, 1H,  $H_2$ ), 5.09 (m, 1H,  $CH_2NH$ ), 6.50 (m, 1H, NHBoc), 7.05, 7.26 (2d, 4H,  $C_6H_4$ ,  $^3J = 8.18$  Hz).

RMN  $^{13}C$  (75 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta_C$  (ppm) 14.63, 27.96, 28.30, 31.37, 34.21, 34.36, 36.89, 38.14, 45.29, 51.28, 80.05, 82.31, 125.26, 128.55, 136.33, 149.01, 156.98, 171.56, 173.75.

➤ **Procédure générale de la réaction de déprotection des dérivés protégés (131-133):**

L'énantiomère pur des dérivés C-4-aryl de la théanine protégés (131-133) (60 mg) sont ajoutés à une solution de TFA / DCM (4 mL, 2M). Après 2 h d'agitation à température ambiante, le mélange réactionnel est concentré par évaporation rotative sous pression réduite. Le résidu est ensuite lavé avec de l'Et<sub>2</sub>O pour donner les produits (134-136) avec des rendements quantitatifs.

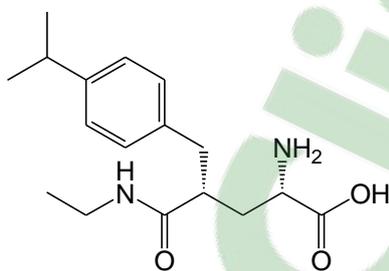
**1° - Acide (2S,4R) -2-amino-4-benzyl-5-oxo-5-aminoéthyl pentanoïque (134) :**Produit 134 $C_{14}H_{20}N_2O_3$ Masse molaire :  $264.1 \text{ g mol}^{-1}$ 

Solide blanc

**Rdt** = 100%**t<sub>r</sub>** = 1.08 min**R<sub>f</sub>** = 0.16 (Et<sub>2</sub>O/AcOEt, 4/6)**P<sub>f</sub>** = 97-101°C**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = 1.30 (1g/100mL, MeOH)**MS (ES<sup>+</sup>) m/z**: 265.3 (M+ H)<sup>+</sup>, 287.3 (M+Na)<sup>+</sup>, 220.2 (M- CO<sub>2</sub>)<sup>+</sup>**HRMS** = 265.1548 g/mol (Masse calculée = 265.1552 g/mol).

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, MeOD) :** δ<sub>H</sub> (ppm) 0.97 (t, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>NH, <sup>3</sup>J = 7.3 Hz), 1.96 (m, 1H, H<sub>3b</sub>), 2.33 (m, 1H, H<sub>3a</sub>), 2.92 (m, 3H, H<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>NH), 3.10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph), 3.9 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 7.26 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, MeOD) :** δ<sub>C</sub> (ppm) 14.39, 33.68, 35.05, 39.24, 46.49, 52.48, 127.50, 129.34, 130.00, 139.73, 172.33, 175.73.

**2° - Acide (2S,4R)-2-amino-4-(4-isopropylbenzyl)-5-oxo-5-aminoéthyl pentanoïque (135) :**Produit 135 $C_{17}H_{26}N_2O_5$ Masse molaire :  $306.4 \text{ g mol}^{-1}$ 

Solide blanc

**Rdt** = 100%**tr** = 1.58 min**R<sub>f</sub>** = 0.24 (Et<sub>2</sub>O/AcOEt, 4/6)

$P_f = 82-87^\circ\text{C}$

$[\alpha]_D^{20} = 1.12$  (1g/100mL, MeOH)

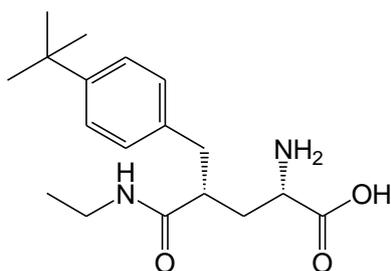
**MS (ES<sup>+</sup>)  $m/z$ :** 307.3 (M+ H)<sup>+</sup>, 329.4 (M+Na)<sup>+</sup>, 262.3 (M- CO<sub>2</sub>)<sup>+</sup>

**HRMS** = 307.2025 g/mol (Masse calculée = 307.2022 g/mol).

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, MeOD) :**  $\delta_H$  (ppm) 0.89 (t, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>NH, <sup>3</sup>J = 7.25 Hz), 1.20 (d, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz), 1.97 (m, 1H, H<sub>3b</sub>), 2.24 (m, 1H, H<sub>3a</sub>), 2.9 (m, 4H, H<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>NH, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH-Ph), 3.04 (m, 1H, CH<sub>3</sub>H<sub>b</sub>-Ph), 3.17 (m, 1H, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>-Ph), 3.76 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 7.12-7.18 (m, 4H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, MeOD) :**  $\delta_C$  (ppm) 13.87, 23.79, 33.68, 34.35, 34.43, 38.21, 46.22, 53.05, 126.67, 129.44, 136.78, 147.59, 173.12, 175.98.

**3°- Acide (2S,4R)-2-amino-4-(4-tertbutylbenzyl)-5-oxo-5-aminoéthyl pentanoïque (136) :**



Produit 136

C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Masse molaire : 320.4g mol<sup>-1</sup>

Solide blanc

**Rdt** = 100%

**t<sub>r</sub>** = 1.71 min

**R<sub>f</sub>** = 0.27 (Et<sub>2</sub>O/AcOEt, 4/6)

$P_f = 74-79^\circ\text{C}$

$[\alpha]_D^{20} = 0.9$  (1g/100mL, MeOH)

**MS (ES<sup>+</sup>)  $m/z$ :** 321.3 (M+ H)<sup>+</sup>, 343.5 (M+Na)<sup>+</sup>, 276.3 (M- CO<sub>2</sub>)<sup>+</sup>

**HRMS** = 321.2174 g/mol (Masse calculée = 321.2178 g/mol).

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, MeOD) :**  $\delta_H$  (ppm) 0.87 (t, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>NH, <sup>3</sup>J = 7.25 Hz), 1.26 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.92 (m, 1H, H<sub>3b</sub>), 2.25 (m, 1H, H<sub>3a</sub>), 2.81 (m, 3H, H<sub>4</sub>, C<sub>3</sub>HC<sub>H<sub>2</sub></sub>NH), 2.98 (m, 1H,

CH<sub>3</sub>H<sub>b</sub>-Ph), 3.12 (m, 1H, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>-Ph), 3.75 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 7.10-7.28 (2d, 4H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, <sup>3</sup>J = 8.13 Hz).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, MeOD) : δ<sub>C</sub> (ppm) 14.66, 14.71, 31.87, 33.88, 35.21, 35.25, 39.28, 46.58, 52.57, 126.38, 129.89, 136.77, 150.60, 172.22, 175.94.

### L'étude de la stabilité de la théanine en milieu basique:

La théanine est soumise à des solutions de soude (NaOH) ou de lithine (LiOH) à différents pH (3, 7 et 11) Figure 1; les proportions du pyroglutamate formé après 4h sont décrites dans le tableau 1.

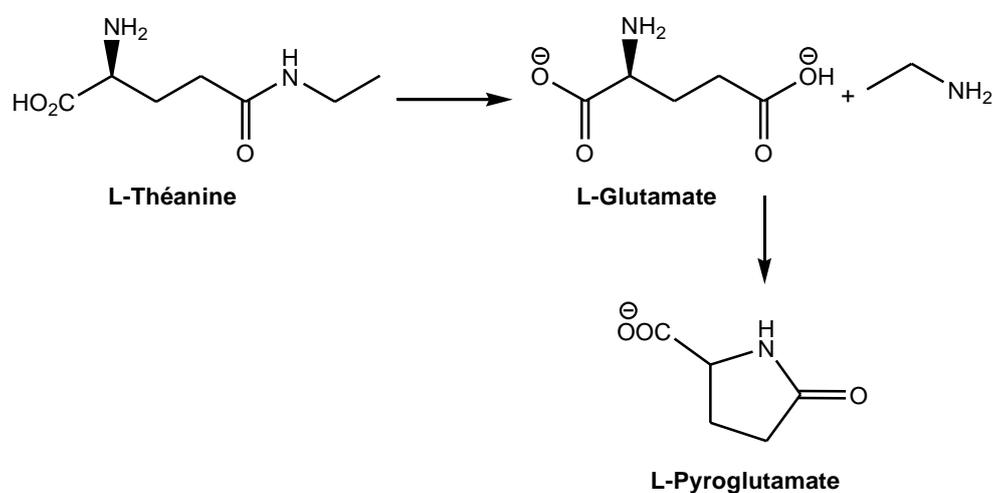


Fig 1 : Hydrolyse de la L- théanine en milieu alcalin.

Conditions expérimentales	pH	% du L-pyroglutamate (H-Pyr-OH)
NaOH 1N	9	48
NaOH 2N	11	63
NaOH 3N	< 11	97
LiOH 1N	8-9	32
LiOH 2N	10	55
LiOH 3N	10-11	80

Tableau 1

Clicours.COM

***IV)Activité Biologique:***

**A. Préparation des cultures de cellules d'hippocampe de rat**

Les cultures sont réalisées selon une méthode adaptée des travaux de Weiss. Les hippocampes sont prélevés sur des fœtus de rats Sprague-Dawley (centre d'élevage Depré) à 18 jours embryonnaires (E18). Le prélèvement des cerveaux et la dissection des hippocampes s'effectuent dans des conditions stériles, sous hotte à flux laminaire. Les hippocampes sont disséqués, après avoir préalablement ôté les méninges des hémisphères cérébraux. Tout d'abord, les hippocampes sont incubés pendant 12 minutes dans le Versène (chélateur de  $\text{Ca}^{2+}$  induisant une diminution des interactions cellulaires) (Invitrogen). Puis, après deux rinçages dans du tampon phosphate salin spécial (PBS spécial : PBS 1X modifié sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  supplémenté avec 100 U/mL de pénicilline, 100  $\mu\text{g/mL}$  de streptomycine et 33 mM de glucose), les cellules sont dissociées mécaniquement, à l'aide de pipettes de verre rétrécies et rodées à la flamme ; la dissociation est réalisée dans le milieu de culture défini, le DMEM-F12 supplémenté avec 33 mM de glucose, 100 U/mL de pénicilline, 100  $\mu\text{g/mL}$  de streptomycine, 2 mM de glutamine, 13 mM de  $\text{NaHCO}_3$ , 5 mM d'HEPES, 87  $\mu\text{M}$  d'insuline, 50  $\mu\text{g/mL}$  de transferrine, 20 nM de progestérone, 1 pM de  $\beta$ -oestradiol, 3 nM de 3,5,3'-triiodothyronine, 100  $\mu\text{M}$  de putrescine et 46 nM de séléniate de sodium. La suspension cellulaire est centrifugée à 400 g pendant 4 minutes, puis suspendue à nouveau dans le milieu de culture. La densité des cellules vivantes est ensuite déterminée par comptage sur une cellule de Thoma d'une aliquote de la suspension, en présence de bleu trypan, un colorant des cellules mortes. Avant l'ensemencement, les puits de cultures ont été préalablement traités pendant au moins deux heures avec de la poly-L-lysine (Sigma) (7,5  $\mu\text{g/mL}$ ), puis après élimination de la poly-L-lysine, rincés une fois avec 0,5 mL de PBS spécial et puis incubés pendant 2 h supplémentaires avec du DMEM-F12 contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco). Après aspiration du milieu précédent, le milieu défini est alors ajouté dans les puits et les cellules y sontensemencées. Pour les expériences d'électrophysiologie et d'imagerie, les cellules sontensemencées sur des lamelles rectangulaires (1  $\text{cm}^2$ ) préalablement traitées avec de la poly-L-lysine et du DMEM-F12 contenant du SVF. Ces lamelles sont en verre (Polylabo) pour les mesures de calcium intracellulaire, Elles sont disposées, à raison de 4 par puits, dans des puits de culture rectangulaires (NUNC) de 7,8  $\text{cm}^2$  contenant 2 mL de milieu de culture dans lesquels environ  $2 \times 10^6$  cellules sontensemencées. Les cultures sont maintenues dans un incubateur à 37°C, dans une atmosphère contenant 5%

de CO<sub>2</sub> sans aucun changement du milieu de culture jusqu'au jour de la manipulation, sauf pour certaines expériences particulières de survie cellulaire (MTT).

**B. Dosage de la survie cellulaire grâce au MTT :**

Pour la mesure de toxicité, chaque puits est rincé à l'aide de 500 µL de tampon Krebs (124 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 26 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM de MgSO<sub>4</sub>, 2 mM de CaCl<sub>2</sub>, 10 mM de D-glucose et 10 mM d'HEPES), puis 50 µL de MTT à 2.5 mg/mL sont ajoutés, les boîtes sont alors remises à l'incubateur pendant 20 à 30 min. La solution de MTT est ensuite aspirée et remplacée par 200 µL de DMSO, ce qui provoque la lyse des cellules et la solubilisation des cristaux de formazan. La densité optique (DO) est alors lue après dilution des échantillons, si nécessaire. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à une base correspondant à la valeur de DO obtenu dans des puits contrôles n'ayant subi aucun traitement. Pour toutes les expériences de MTT, les résultats sont exprimés de la façon suivante: moyenne ± écart standard à la moyenne, chaque condition est effectuée en triplicat et répétée au moins sur trois cultures indépendantes.

**C. Mesure de calcium intracellulaire par spectrofluorimétrie à l'aide du Fura-2:**

la mesure de la variation de calcium intracellulaire est réalisée par spectrofluorimétrie à l'aide du Fura-2. Chaque lame de verre est incubée à 37°C pendant 30 minutes dans un tampon dit 'de charge' (Krebs contenant 1 µM de Fura-2-AM et 0,02 % d'acide pluronique F127, un détergeant qui facilite la pénétration du Fura-2-AM). Après incorporation du Fura-2, la lame est déposée sur une mini-cuve, périfusée en permanence par du tampon Krebs saturé sous O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95/5). Les différentes drogues sont ajoutées *via* la périfusion. Les images de fluorescence sont acquises grâce à une caméra CCD (Hamamatsu) et transmises à l'ordinateur, puis analysées grâce au logiciel AquaCosmos 2.5 (Hamamatsu). Les régions d'intérêt sont sélectionnées et correspondent aux cellules contenant du Fura-2. Les variations du calcium intracellulaire obtenues sont ensuite analysées, et les résultats sont exprimés en moyennes plus ou moins l'écart type de chaque rapport de fluorescence ; ces valeurs étant normalisées au rapport de fluorescence basal enregistré 3 à 5 minutes avant l'application des drogues. Les mesures sont effectuées sur *n* cellules provenant au minimum de 3 cultures indépendantes.

**Titre De La Thèse :** La théanine et ses dérivés : synthèse stéréosélective et évaluation biologique sur la synapse glutamatergique.

**Année :** 2014

**Auteur :** SEBIH Fatiha

**Lieu :** Université D'Oran

**Résumé :**

La L-Théanine (L-5-N-éthylglutamine) est un acide aminé présent dans le thé vert et qui a une structure similaire à celle de l'acide glutamique, le neurotransmetteur majoritaire du système nerveux central, SNC. La L-théanine possède la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique en plus de ses nombreuses activités physiologiques et pharmacologiques, anxiolytique et relaxante.

La théanine et ses dérivés sont donc considérés comme des outils indispensables pour la compréhension de la synapse glutamatergique plus précisément. nous avons synthétisé la théanine énantiomériquement pure (L et D). Nous avons développé deux nouvelles méthodes de synthèse de la théanine optiquement pure. Ensuite nous avons décrit la préparation des dérivés 5-N-alkylés de la théanine et les dipeptides  $\gamma$ -glutamique en tant qu'analogues 5-N-substitués de la théanine. Dans le but d'élargir l'éventail d'applications de la Théanine ayant un intérêt biologique, nous avons synthétisé des dipeptides contenant la Théanine. Nous présentons également un accès aux dérivés 4-arylés de la théanine, via une alkylation régio et stéréosélective de l'acide pyroglutamique jamais décrit dans la littérature. L'analyse rigoureuse des intermédiaires réactionnels et des produits finaux par les RX, la RMN  $^1\text{H}$  à 600 MHz et l'HRMS a prouvé l'obtention d'un seul diastéréoisomère (2*S*, 4*R*)-4-aryle théanine

Les résultats des tests biologiques, utilisant la technique de l'imagerie calcique, montrent que les deux énantiomères L et D de la théanine possède un effet agoniste vis-à-vis les récepteurs NMDA et que cet effet est beaucoup plus important dans le cas de l'énantiomère (D). Parmi les analogues 5-N-alkylés de la théanine ayant un effet agoniste spécifique des récepteurs NMDA, la 5-N-Propyl-Gln (L et D) montre une activité en tant qu'agoniste beaucoup plus importante que la théanine même (naturelle ou synthétique) et aucun effet n'a été observé sur les récepteurs AMPA et métabotropiques. La L-théanine et ses dérivés pourraient donc être des structures intéressantes pour développer de nouveaux outils pharmacologiques nécessaires à l'étude des récepteurs glutamatergiques (métabotropiques et/ ou ionotropiques).