



Filière Technologies du vivant

Orientation Chimie analytique

Travail de bachelor Diplôme 2023

Grégory Friche

La voie verte vers la synthèse peptidique

-  *Professeur*
Dr. Marc Mathieu
-  *Expert*
Dr. Montserrat Ferrer
-  *Date de la remise du rapport*
18.08.2023

Filière / Studiengang TEVI	Année académique / Studienjahr 2022-23	No TB / Nr. BA CA/2023/41
Mandant / Auftraggeber X HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Etablissement partenaire Partnerinstitution	Etudiant / Student Friche Grégory Professeur / Dozent Dr Marc Mathieu	Lieu d'exécution / Ausführungsort X HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Etablissement partenaire Partnerinstitution
Travail confidentiel / vertrauliche Arbeit <input type="checkbox"/> oui / ja X non / nein	Expert / Experte (données complètes) Dr Montserrat Ferrer (TBC)	

Titre

Le verdissement de la synthèse des peptides

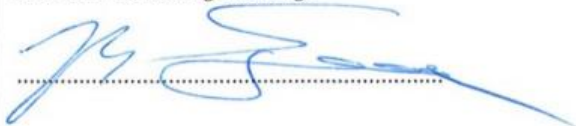
Description

Pour la synthèse des peptides, les réactions de couplage et de déprotection sont couramment effectuées dans le dichlorométhane et le DMF, qui possèdent tous deux de sérieux problèmes de toxicité et génèrent des déchets de solvants importants. Le carbonate de propylène, qui s'est révélé être un solvant aprotique polaire vert est proposé pour remplacer le dichlorométhane et le DMF pour la synthèse de peptides en phase solide. Ce travail appliquera la synthèse peptidique en phase solide à l'aide d'acides aminés protégés par Fmoc sur une résine ChemMatrix pour préparer des peptides antimicrobiens biologiquement actifs. Les synthèses seront réalisées avec des groupes de protection des chaînes latérales type Boc pour l'élaboration d'un set de pentapeptides; l'épimérisation, le contrôle UV et les rendements chimiques seront comparés à ceux obtenus avec des solvants conventionnels.

Objectifs / Ziele

- SPPS de 3 pentapeptides par chimie conventionnelle & alternative selon DOI: 10.1039/c7gc00247e
- Contrôle des étapes par quantification UV du dibenzofulvène
- Interprétation des données par LCMS
- Rendements chimiques

Signature ou visa / Unterschrift oder Visum

Responsable de l'orientation /
Leiter der Vertiefungsrichtung:

¹ Etudiant / Student:


Délais / Termine

Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags:
01.05.2023Fin des travaux de diplôme dans les laboratoires de
l'école / Ende der Diplomarbeiten in den Labors der
Schule:
14.07.2023, 16 :15Remise du rapport final / Abgabe des Schlussberichts:
18.08.2023Expositions / Ausstellungen der Diplomarbeiten:
25.08.2023 – HEI
28.08.2023 – Monthey
31.08.2023 – VispDéfense orale / Mündliche Verfechtung:
Semaine/Woche 36 (04-07.09.2023)

La voie verte vers la synthèse peptidique



Diplômant/e Grégory Friche



Objectif du projet

Le but de ce travail était de développer une nouvelle méthode de synthèse peptidique durable, centrée sur la partie analytique, intégrant dosages UV, chromatographie et contrôles colorimétriques à chaque étape pour assurer la qualité du peptide final.

Méthodes | Expériences | Résultats

Durant ce travail pratique, la méthode de synthèse par voie verte a été développée au moyen de plusieurs essais dans lesquels les paramètres étaient analysés séquentiellement (solvants, réactifs de couplage, supports solides, solvants de déprotection). Au bout d'une petite dizaine de tests, la méthode optimale utilisant le propylène carbonate comme solvant principal, la pipéridine comme base ainsi que l'EDC comme activateur a été approuvée. Des test UV ainsi que colorimétriques ont été effectués pour valider le bon déroulement de la synthèse à chaque étape. A la suite de cela, un nouveau peptide intégral anti-microbien; l'analogue de l'Enopeptine A, a été effectué. L'assemblage manuel fut concluant, c'est pourquoi il a été proposé d'optimiser la méthode en la rendant automatisable, une méthode semi-automatique a été mis en place. Les étapes manuelles restantes sont en cours d'optimisation. A ce stade, certains réactifs de couplage et de déprotection ne peuvent pas être substitués par des réactifs plus durables. Le solvant appliqué reste néanmoins le produit chimique dominant à toutes les étapes de cette synthèse.

Travail de diplôme
| édition 2023 |



Filière
Technologies du Vivant

Domaine d'application
Chimie analytique

Professeur responsable
Marc Mathieu
Marc.mathieu@hevs.ch

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon professeur, le Dr. Marc Mathieu qui m'a suivi tout au long de ce projet. Le temps précieux qu'il m'a accordé a été d'une importance capitale pour la réalisation de ce projet. Ses conseils et son encadrement avisé ont joué un rôle fondamental dans ma démarche académique.

Ensuite, j'aimerais également adresser mes remerciements au personnel du laboratoire, Vanessa Gaillard et Stéphane Baeriswyl pour leur disponibilité et leurs conseils qui m'ont permis de réaliser mon travail de Bachelor dans les meilleures conditions.

J'aimerais aussi remercier Dr. Montserrat Ferrer, qui a fourni une colonne pour l'analyse HPLC-MS. Cette colonne sera utile pour comparer les résultats obtenus avec la colonne qui est utilisée en ce moment.

Abréviations :

a.a	Acide aminé
ACN	Acétonitrile
Ala	Alanine
Ala ^{Me}	Méthyl-Alanine
Boc	Tert-butoxycarbonyl
DCM	Dichlorométhane
DIC	N,N'-diméthylaminopyridine
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	N,N-diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EtOH	Ethanol
Fmoc	Fluorénylméthoxycarbonyl
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HOBT	1-Hydroxy-6-chloro-benzotriazole
EDC	N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide
MeOH	Méthanol
MS	Spectrométrie de masse
N-Me-Ala	N-méthylalanine
NMP	1-méthyl-2-pyrrolidone
Oxyma	2-cyano-2-(hydroxyimino)acétate d'éthyle
Phe	Phénylalanine
Pro	Proline
Pro-NH ₂	4-amino-proline
Ser	Sérine
SPPS	Synthèse peptidique en phase solide
tBu	Tert-butyle
TFA	Acide trifluoroacétique
TIC	Total Ion Chromatogram
TIS	Triisopropylsilane
U-HPLC	Chromatographie en phase liquide à ultra haute performance

Table des matières

1.	Introduction	1
1.1	Le propylène carbonate	3
1.2	Dosage du Dibenzofulvène	3
1.3	Critère d'un solvant vert	4
1.4	Objectif du travail	4
1.5	Durabilité	5
1.6	Peptides synthétisés	6
2.	Matériel et Méthodes	7
2.1.	Matériel	7
2.1.1	Produits	7
2.1.2	Matériel	10
2.1.3	Appareils	11
2.2	Méthodes	12
2.2.1	Synthèse peptidique	12
2.2.2	Déprotection	12
2.2.3	Clivage	13
2.2.4	Purification	13
2.2.5	Cyclisation	13
2.2.6	Méthode U-HPLC-MS	13
2.2.7	Méthode HPLC Préparative	14
2.2.8	Méthode PurePep Chorus de Gyros	14
2.2.9	Dosage du dibenzofulvène	14
2.2.10	Test des amines libres (Test TNBS)	14
3.	Résultats et Discussions	16
3.1	Alternative à la pipéridine	17
3.2	Pourquoi utiliser la ChemMatrix comme résine « verte »	17
3.3	Dosage du dibenzofulvène	18
4.	Conclusion et Perspectives	29
5.	Bibliographie	30
6.	Figures	31
7.	Tableaux	32
8.	Annexes	32

1. Introduction

La chimie verte, aussi connue sous le nom de chimie durable est un domaine qui a pour but de concevoir et développer des procédés et produits chimiques permettant de réduire, voire d'éliminer l'utilisation de substances dangereuses.

Avec le temps, l'image de la chimie auprès du public s'est dégradée progressivement due aux catastrophes et ses conséquences biologiques sur l'environnement.

Pour la synthèse peptidique en phase solide, la chimie verte est également appliquée pour rendre les processus de production de peptides plus durables et respectueux pour l'environnement.

En chimie verte, il existe douze principes qui se lient autour des aspects environnemental, sécurité et économique.¹

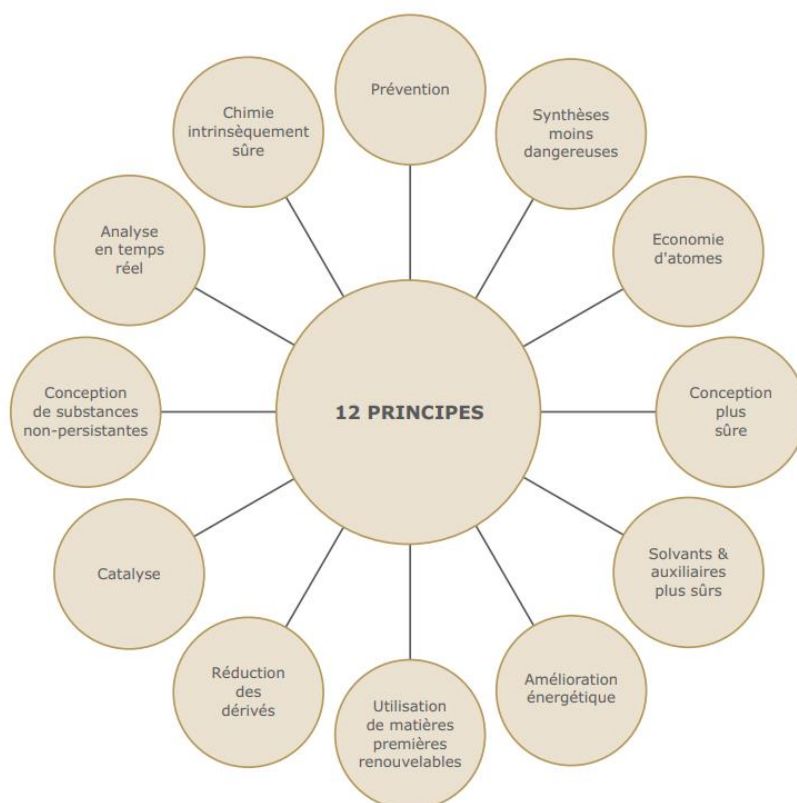


Figure 1: les douze principes de la chimie verte

En respectant un maximum ces douze différents points, cela mène à une chimie durable et bénéfique pour nous les humains, mais aussi pour l'environnement.

La synthèse peptidique en phase solide (SPPS) est une méthode couramment utilisée pour la fabrication de peptides. Elle repose sur l'utilisation de résines solides fonctionnalisées insolubles sur lesquelles on va y assembler des acides aminés pour former un peptide allant de C-terminus au N-terminus. Chaque acide aminé est préalablement activé à l'aide d'HOBt et d'EDC pour permettre le couplage à l'acide aminé fixé préalablement à la résine, auquel on lui a retiré son Fmoc à l'aide de pipéridine 20% dans le propylène carbonate.

L'utilisation de solvants verts pour la synthèse peptidique a beaucoup d'avantages, comme l'impact environnemental plus faible ou lors de son élimination, celle-ci est plus simple et demande moins d'énergie.

La chimie verte utilisée pour la SPPS reste tout de même limitée. On ne peut pas réinventer la chimie. Certes, celle-ci peut être modifiée pour diminuer les effets néfastes engendrés sur la nature mais cela reste compliqué de passer à une chimie verte totale dans ce domaine.²

Les peptides sont des composés importants dans l'industrie de la pharmaceutique. Ils peuvent être fournis à la fois comme des médicaments mais aussi des composés de bases pour la préparation de divers produits pharmaceutiques.³

Dans le monde actuel, l'utilisation d'antibiotiques est exagérée, ce qui a permis à certaines bactéries de devenir résistantes à ceux-ci. A force de développer de nouveaux antibiotiques pour parvenir à combattre ces bactéries, cela a mené à l'apparition de bactéries multirésistantes.

L'augmentation des infections causées par ces dernières, couplée à la faible disponibilité de nouveaux antibiotiques sur le marché ces derniers temps s'est avérée dangereuse pour notre système de santé.⁴

Il a donc fallu trouver une alternative aux antibiotiques pour combattre ces bactéries multirésistantes. Il existe des pathogènes dans la nature qui empêchent la croissance de ces bactéries, ce sont les bactériophages. Leur moyen de combattre ces bactéries sont les peptides. L'énopéptine A, un peptide antimicrobien, qui a été isolé lors d'une culture de streptomyces est utilisé pour combattre les bactéries multirésistantes.⁵

Pour ce travail pratique, l'analogue de l'Enopéptine A a donc été synthétisé par voie de synthèse verte.

1.1 Le propylène carbonate

Le solvant vert utilisé pour cette synthèse est le propylène carbonate, un ester carbonate cyclique. C'est un solvant polaire aprotique incolore et inodore.

Il est synthétisé par carbonatation de l'oxyde de propylène et du dioxyde de carbone.⁶

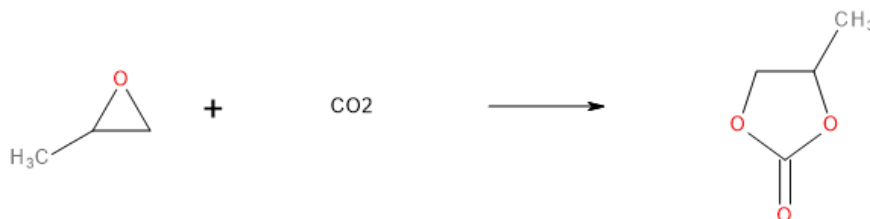


Figure 2 : Synthèse du propylène carbonate par carbonatation de l'oxyde de propylène

Ce procédé est encourageant pour l'avenir car la production de ce solvant consomme du dioxyde de carbone, qui est en abondance sur la planète.

1.2 Dosage du Dibenzofulvène

Pour doser le dibenzofulvène, le Fmoc est retiré de l'acide aminé à l'aide de pipéridine, ce qui nous donne un acide aminé déprotégé fixé à la résine ainsi qu'une molécule de dibenzofulvène.⁷

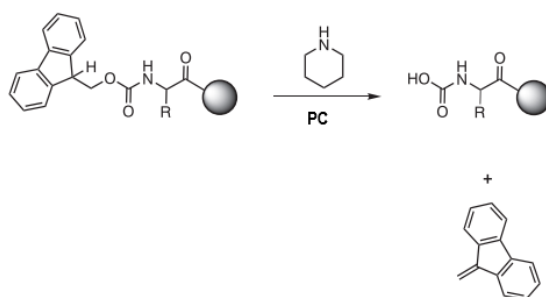


Figure 3 : Formation du dibenzofulvène lors de la déprotection d'un a.a protégé par un Fmoc à l'aide de pipéridine 20% dans PC

Une fois que le dibenzofulvène est séparé de l'a.a, il est récupéré par les eaux de lavages, et peut être mesuré et dosé par spectrophotométrie à 301nm. Voir méthode 2.2.9

1.3 Critère d'un solvant vert

Il n'existe pas vraiment de critères pour dire qu'un solvant est « vert », cependant, il est possible de déterminer quel solvant sera plus ou moins vert par rapport à un autre. Un solvant vert fait référence à un solvant qui est respectueux de l'environnement et qui possède des caractéristiques qui réduisent son impact sur la santé humaine et l'écosystème. Il est non-toxique pour l'humain, les animaux et l'environnement. Il devrait être biodégradable et renouvelable avec un impact sur l'empreinte carbone faible. Cela veut dire qu'il peut être produit à partir de sources renouvelables ou de produits déjà utilisés auparavant. Il ne contribue pas à la pollution de l'eau et de l'air. Il possède une faible odeur et génère moins de déchets dangereux lors de son utilisation et de son élimination.⁶

1.4 Objectif du travail

Les objectifs de ce travail étaient :

- Synthétiser un pentapeptide par chimie conventionnelle et par chimie verte
- Contrôler chaque étape de couplage par quantification UV du dibenzofulvène
- Interpréter les données recueillies lors de l'analyse LC-MS
- Comparer les rendements chimiques entre la voie de synthèse conventionnelle et la voie de synthèse verte

11 semaines ont été mises à disposition pour parvenir à réaliser ce travail, du 1^{er} mai 2023 au 14 juillet 2023.

1.5 Durabilité



Objectif numéro 12 du développement durable : *Etablir des modes de consommation et de production durable.*

Dans le monde actuel, la population consomme plus de ressources que ce que l'écosystème ne peut fournir. Il est donc impératif de modifier ce mode de consommation et de production.

Cet objectif du développement durable est celui qui correspond le mieux au sujet du travail de Bachelor présenté dans ce rapport. En effet, la synthèse de peptide est une méthode qui demande beaucoup de réactifs et de solvants nocifs pour l'humain et l'environnement. En modifiant sa voie de synthèse par des méthodes dites « vertes » et en adaptant les quantités de solvants et réactifs utilisés, cela impliquera un grand impact lors de la production à grande échelle. Lors de la synthèse peptidique, les volumes de solvants et réactifs utilisés sont bien trop élevés par rapport à ce qui pourrait être utilisé. Cela est dû au fait qu'il faut assurer un bon rendement lors de la synthèse.

Lors du traitement des déchets, en utilisant un solvant vert, cela demande moins d'énergie lors du traitement. La plupart des solvants verts utilisés ne sont pas toxiques pour l'environnement. Les coûts seront nettement moins élevés pour cette étape.

Réussir à utiliser un minimum de réactifs et de solvants lors de la synthèse tout en obtenant la même quantité de produit, afin d'arriver à une chimie plus verte en changeant les réactifs et solvants correspond à l'objectif numéro 12 du développement durable.

Certes, ces modifications prennent beaucoup de temps à être appliquées, mais en modifiant ne serait-ce qu'un paramètre, le résultat au niveau du bilan écologique serait meilleur. Le but est donc de réussir à verdir la globalité de la synthèse peptidique ainsi que sa quantité de production en s'adaptant à la demande.⁸

1.6 Peptides synthétisés

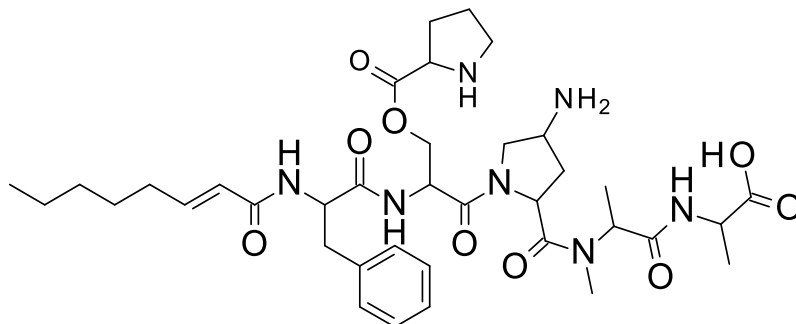


Figure 4 : $C_8H_{14}O_2$ -FS(P)P^{NH₂}A^{Me}A-CO₂H linéaire

M= 741.9g/mol

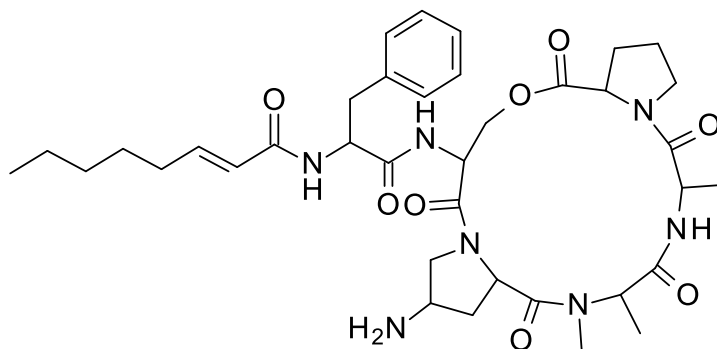


Figure 5 : Analogue de l'Enopeptine A

M=723.9g/mol

















Une fois l'Enopeptine A cyclisée, celle-ci perd une molécule d'eau (18g/mol)

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel

2.1.1 Produits

Tableau 1: Tableau des produits utilisés pour ce travail

Produits	Fournisseur	N° Article	N°Lot	N°CAS	Dangers
Diméthylformamide (DMF)	Fischer Scientific	D/3848/PB17	2224100	68-12-2	 
Triisopropylosilane 98%	Sigma-Aldrich	233781	STBK2945	6485-79-6	 
Acide trifluoro-acétique	Sigma-Aldrich	T6508	STBK6059	76-05-1	 
HBTU	aapptec	CXZ020	9952815	94790-37-1	
6-CI-HOBT	aapptec	CXZ096	9950025	26198-19-6	
HATU	aapptec	CXZ025	9952845	148893-10-1	 
N,N-Diisopropyléthylamine	Acros Organics	115225000	A0377235	7087-68-5	  
Acide picrylsulfonique	Sigma-Aldrich	P2297	SLCGZ3A	2508-19-2	  













DMAP	aapptec	CXZO19	9950270	1122-58-3	
Propylène carbonate	Sigma-Aldrich	310328	102579225	108-32-7	
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide	Sigma-Aldrich	39391	BCBH8815V	1892-57-5	
Anhydride acétique	Sigma-Aldrich	320102	STBJ0483	108-24-7	  
Acetonitrile pour LC-MS	J.T. Baker	9821	2203201810	75-05-8	 
Eau pour LC-MS	J.T. Baker	9825	2107609811	7732-18-5	-
Pipéridine 99% extra pure	Acros Organics	147180010	A0433205	110-89-4	  
DMSO	Sigma Aldrich	472301	4102270163	67-68-5	

Tableau 2 : Tableau des produits utilisés pour ce travail préparés dans le laboratoire peptide de la HES-SO

Produits	Fournisseur	N° Article	N°Lot	N°CAS	Symboles
10% pipérazine dans EtOH/NMP 1/9	Préparer en laboratoire HEVS	-	-		
Dichlorométhane (DCM)	Laboratoire HEVS	-	-	75-09-2	
Oxyma/DMF	Laboratoire HEVS	-	-	-	
DIC/DMF 0.5M	Laboratoire HEVS	-	-	-	

Tableau 3 : Acides aminés et résines utilisés pour la synthèse de peptide pour ce travail

Produits	Fournisseur	N° Article	N°Lot	N°CAS
Résine Fmoc-Ala-Wang	Bachem	4027342	00051000025524	-
Fmoc-N-Me-Ala-OH	Bachem	4038888	00051000013859	84000-07-7
Fmoc-L-Pro(4-NHBoc)-OH	Iris Biotech	FAA3210.005	2158026	221352-74-5
Fmoc-Ser-OH x H ₂ O	Bachem	4044985	1066860	73724-45-5
Fmoc-Phe-OH	Bachem	4100450	01001000020712	35661-40-6
Acide 2-Octénoïque 85%	Sigma-Aldrich	O5209	STBC7341V	1871-67-6
Boc-Pro-OH	Bachem	4000220	1068213	15761-39-4
Résine HMPB ChemMatrix	Sigma-Aldrich	727741	BCBZ9110	-
Fmoc-Pro-OH	aapptec	AFP101	9950693	71989-31-6
Fmoc-Ala-OH	aapptec	AFA101	9950752	35661-39-3

2.1.2 Matériel

- Erlenmeyer à vide
- Pinces/noix
- Pompe à vide
- Petite colonne frittée avec robinet
- Balance analytique Mettler Toledo XSR204
- Micropipettes Eppendorf et Gilson
- Agitateur Multi Reax Heidolph
- Lyophilisateur Christ Alpha 2-4 LDplus
- Centrifugeuse Eppendorf Centrifuge 5702 R
- Falcons
- Spectrophotomètre biochrom Libra S12

2.1.3 Appareils

- Système HPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II :
 - Pompe : 1290 Flexible Pump DEBA300125
 - Passeur d'échantillon : DEBA901810
 - Détecteur DAD : DAD DEBAW02459
- Détecteur de masse Agilent Technologies InfinityLab LC/MSD :
 - LC/MSD XT SG1730P011
- Colonne ACQUITY UPLC Peptide CSH C18:
 - Colonne 130Å, 1.7µm 2.1 mm x 50mm, 1/pkg
 - Part No. 186006936
 - Ser. No. : 01683115918417
- Système HPLC Préparative Agilent 1260 Infinity II
- Colonne XSelect Peptide CSH C18:
 - Prep Column, 130 Å, 5 µm, 19mm x 250mm
 - Part. N°186007031
 - Ser. N°19613114111202
 - VWD 1260: G7114A: Ser.N° DEACX20153
 - Prep Bin Pump 1260: G7161A Ser. N° DEAGM00537
 - Prep ALS/FC 1290: G7158B

2.2 Méthodes

2.2.1 Synthèse peptidique

Procédures générales pour la synthèse peptidique en phase solide dans le PC pour une concentration de 0.05mmol

Activation de la résine ChemMatrix HMPB / Estérification

Prélever 0.05mmol (0.44mmol/g, 113.6mg) de résine ChemMatrix.

Laver avec 3x5mL de PC.

Laisser gonfler dans 3.5mL de PC pendant 1h.

Dans un tube falcon, dissoudre **3 éq.** (de la résine) **d'acide aminé** dans un minimum de PC.

Dissoudre **3 éq** (de la résine) d'**HOBT** (0.15mmol, 25.4mg) dans un minimum de PC.

Mélanger a.a et HOBT et agiter qq minutes.

Dans un tube falcon, préparer **0.1 éq** (de la résine) de **DMAP** (0.005mmol, 0.6mg) dans un minimum de PC.

Préparer **3 éq** (de la résine) d'**EDC** (0.15mmol, 26µL) dans un minimum de PC.

Ajouter la solution d'**EDC** au mélange et ensuite ajouter le **DMAP**.

Agiter la solution pendant **2-3h**.

Capping

Ajouter ensuite **2éq** (de la résine) **d'anhydride acétique** et de **pyridine** (capping de la résine sur les sites qui n'ont pas réagi avec le premier a.a).

Agiter pendant **30min**.

Rincer avec 3x5mL de PC.⁹

Couplage :

Dans deux tubes falcons 15mL séparés, préparer : **3 éq. d'acide aminé** (0.15mmol) avec 2mL de PC, **3 éq. HOBT** (0.15mmol, 25.4mg) dans 2mL de PC, dissoudre les 2 poudres (ajouter 40µL de DMSO si ça ne se dissout pas). Rassembler les deux solutions et agiter pendant 1 minute.

Ajouter **3 éq. EDC** (0.15mmol, 26µL). Laisser réagir pendant 3min tout en agitant.⁹

Ajouter la solution de couplage à la résine et laisser réagir pendant 1h.

Répéter le couplage une seconde fois.

Laver la résine avec 3x5mL de PC.¹⁰

2.2.2 Déprotection

Faire 2 déprotections (10min et 20min) avec une solution fraîchement préparée de 20% pipéridine dans PC.

Laver la résine avec 3x5mL de PC.

2.2.3 Clivage

Une fois la déprotection finale faite, bien sécher la résine.
 Cliver avec TFA/TIS/H₂O 95/2.5/2.5 pendant 2h.
 Précipiter dans de l'éther froid (2x30min à -18°C).
 Laisser sécher le précipité et solubiliser une petite partie dans 200uL d'un mélange 1/1 H₂O/ACN. Injecter pour l'analyse MS.

2.2.4 Purification

Dissoudre le peptide dans 600μL de DMSO.
 Ajouter 600uL d'ACN 0.1%TFA et 2800uL d'H₂O milliQ 0.1%TFA.
 Injecter sur l'HPLC préparative.
 Voir *Tableau 5* ci-dessous

2.2.5 Cyclisation

Cycliser pendant 24h à température ambiante avec une concentration de 0.5umol/mL de peptide purifié dans les solvants DCM/MeOH 4/1 avec 5éq de BOP-Cl et 5 éq. de DMAP.

Prélever à des temps d'intervalles différents (voir disponibilité) 40μL dans un tube de 15mL pour observer l'évolution de la cyclisation.
 Evaporer le solvant sous flux d'azote.
 Dissoudre dans 80uL de solvant H₂O 0.1%TFA/ ACN 0.1%TFA 1/1
 Injecter 1μL sur U-HPLC-MS.

2.2.6 Méthode U-HPLC-MS

Tableau 4: Méthode U-HPLC-MS

Temps [min]	H ₂ O + 0.3%TFA [%]	ACN + 0.3%TFA [%]	Débit [mL/min]
0	95	5	0.62
0.1	95	5	0.62
4.1	5	95	0.62
6.9	5	95	0.62
7	95	5	0.62

T°C colonne : 30°C
 Volume d'injection : 1μL
 Détection : 214nm
 SCAN : 300-1600 m/z

2.2.7 Méthode HPLC Préparative

Tableau 5 : Méthode HPLC Préparative

Temps [min]	H ₂ O + 0.3%TFA [%]	ACN + 0.3%TFA [%]	Débit [mL/min]
0	84	16	30.0
25	59	41	30.0
26	2	98	30.0
30	2	98	30.0

T°C colonne : T°C ambiante
 Volume d'injection : 7.8 mL
 Détection : 214nm

2.2.8 Méthode PurePep Chorus de Gyros

Voir annexe 1

2.2.9 Dosage du dibenzofulvène

Récupérer toute la pipéridine ainsi que le PC utilisé pour le rinçage lors de l'étape de déprotection dans un ballon jaugé 50mL.
 Jauger au trait de jauge avec de l'éthanol.
 Procéder à une analyse UV au spectrophotomètre aux conditions suivantes :

Longueur d'onde : 301nm
 Coefficient d'absorption molaire : 8021 L*mol⁻¹*cm⁻¹

Déterminer la concentration en dibenzofulvène à l'aide la loi de Beer-Lambert : $A = \epsilon \cdot C \cdot L$

2.2.10 Test des amines libres (Test TNBS)

Ce test sert à savoir si le couplage de l'acide aminé a bien fonctionné. Normalement, après le couplage, il ne devrait plus y avoir présence d'amines libres, car celles-ci sont liées au nouvel acide aminé.

Prélever quelques grains de résine bien rincés au PC après le couplage, les placer dans un tube en verre, ajouter 1mL de PC, 1-2 gouttes de pipéridine et 1-2 gouttes d'acide picrylsulfonique
 Agiter 1 minute

Si les perles deviennent rouges, cela signifie qu'il y a présence d'amines libres et celle-ci ont réagi avec l'acide aminé. Si les grains restent jaunes-oranges, il n'y a pas d'amines libres et le couplage a donc bien fonctionné.

Voir toutes les méthodes développées dans le cahier de laboratoire si nécessaire.

Méthode n°5 Synthèses peptidiques manuelles vertes

Peptide: Ac.Oct-FSPPA

Test 11

Vortex (Falcon)

20% pipéridine
dans PC

Position	Résidu	Masse à peser (mg)	Pesée réelle (mg)	Equiv	HOBT 3 éq. 101.6mg	EDC 3 éq. 104uL	Dépro 10min 20min		Lavages (3x5mL)			Couplage 1h	Lavages (3x5mL)		
									PC				PC		
0	Résine HMPB ChemMatrix	454.5		1	-	-	-	-			SWELLING 1h	-	-	-	-
1	Fmoc-Ala-OH	186.8		3	Protocole activation de la résine										
2	Fmoc-N-Me-Ala-OH	195.2		3										-	-
2	Fmoc-N-Me-Ala-OH	195.2		3			-	-	-	-	-			-	-
3	Fmoc-Pro(NH2)-OH	271.5		3			-	-	-	-	-			-	-
3	Fmoc-Pro(NH2)-OH	271.5		3			-	-	-	-	-			-	-
3	Fmoc-Pro(NH2)-OH	271.5		3			-	-	-	-	-			-	-
4	Fmoc-Ser-OH x H2O	207.2		3			-	-	-	-	-			-	-
4	Fmoc-Ser-OH x H2O	207.2		3			-	-	-	-	-			-	-
5	Fmoc-Phe-OH	232.5		3			-	-	-	-	-			-	-
5	Fmoc-Phe-OH	232.5		3			-	-	-	-	-			-	-
6	Acide Octénoïque	85.3		3			-	-	-	-	-			-	-
6	Acide Octénoïque	85.3		3			-	-	-	-	-			-	-
7	Boc-Pro-OH	129.2		3	DMAP		Esterification		-	-	-			-	-
7	Boc-Pro-OH	129.2		3	DMAP		Esterification		-	-	-			-	-
Dépro + Wash final							-	-						-	-

Echelle 0.2mmol

Résine HMPB ChemMatrix 0.44mmol/g

Figure 6 : Exemple de procédure à suivre pour la synthèse peptidique manuelle (SPPS)

A l'aide de la procédure de la Figure 6, il est possible d'effectuer étape par étape la synthèse du peptide sans oublier ou répéter une étape. C'est un petit mode opératoire utilisé fréquemment lors de la SPPS.

3. Résultats et Discussions

Tableau 6 : Résumé des différents paramètres appliqués lors de la synthèse peptidique

Concentration [mmol]	Peptide	Test n°	Solvant	Résine	Déprotection	Activateurs	Contrôle UV	Synthèse	Remarques
0,05	PGA	Contrôle 2	DMF/DCM	Ala-Wang	Pipérazine 10%	DIC/Oxyma	Dosage fulvène complet	OK	
0,05	PGA	Test 2	PC	Ala-Wang	Pipérazine 10%	DIC/Oxyma	Dosage fulvène complet	OK	La résine ne gonfle pas voir pas beaucoup dans PC
0,05	PGA	Test 3	PC	Ala-Wang	Pipérazine 10% (PC)	DIC/Oxyma	Dosage fulvène complet	OK	Peu de déprotection dans PC
0,05	PGA	Contrôle 2 (Test 4)	DMF/DCM	Ala-Wang	Pipérazine 10%	DIC/Oxyma	Dosage fulvène complet	OK	
0,05	PGA	Test 5	PC	Ala-Wang	Pipérazine 10% (PC)	HATU/ HBTU/ DIEA (PC)	-	PAS OK	Pas de gonflement de la résine, peu de déprotection, pas de solubilisation de l'a.a dans la solution d'activation et pas miscible avec DIEA (PC)
0,1	FSPAA	Test 6	DMF/DCM	Ala-Wang	Pipérazine 10%	DIC/Oxyma (PC)	Dosage fulvène complet	OK	
0,1	FSPAA	Test 7	PC	Ala-Wang	Pipérazine 10% (PC)	DIC/Oxyma (PC)	-	PAS OK	a.a ne se dissout pas dans PC avec DIC/Oxyma
0,05	FSPAA	Test 8	PC	ChemMatrix	Pipéridine 20% (PC)	HOBT/ EDC (PC)	Dosage fulvène complet	OK	
0,05	FSPAA	Test 9	PC	ChemMatrix	Pipéridine 20% (PC)	HOBT/ EDC (PC)	Dosage fulvène complet	OK	
0,05	Oct.FSPPA (linéaire)	Test 10	PC	ChemMatrix	Pipéridine 20% (PC)	HOBT/ EDC (PC)	Dosage fulvène complet	OK	Pas de cyclisation, trop peu de peptide (0.05mmol)
0,2	Oct.FSPPA (cyclique)	Test 11	PC	ChemMatrix	Pipéridine 20% (PC)	HOBT/ EDC (PC)	-	OK	Cyclisation dans DMF/EtOH 4/1
0,1	Oct.FSPPA (linéaire)	Test 12	PC	ChemMatrix	Pipéridine 20% (PC)	HOBT/ EDC (PC)	-	PAS OK	Synthèse automatique avec appareil Chorus, mauvaise masse obtenue, réacteur trop grand, résine pas complètement immergée (mL)
0,025	Oct.-FSPPA (linéaire)	Test	PC	ChemMatrix	Pipéridine 20% (PC)	HOBT/ EDC (PC)	Dosage fulvène complet	OK	Synthèse automatique avec appareil Chorus, apparition de la bonne masse, rendement très faible

Le tableau récapitulatif ci-dessus représente toutes les synthèses et analyses faites durant ce travail pratique. Il montre quels peptides ont été synthétisés avec quelle concentration, ainsi que les paramètres appliqués à la synthèse de ces peptides.

3.1 Alternative à la pipéridine

La pipéridine est un produit qui est couramment utilisé en synthèse peptidique. En raison de son odeur forte et désagréable ainsi que de ses propriétés toxiques, il serait intéressant de trouver une alternative à ce produit. Un dérivé de la pipéridine, la 3-méthylpipéridine et la 4-méthylpipéridine possèderaient la même efficacité que la pipéridine avec un effet catalyseur sur la déprotection du groupe Fmoc et une meilleure sélectivité pour la 4-méthylpipéridine. La 4-méthylpipéridine serait aussi compatible avec d'autres réactifs couramment utilisés en synthèse peptidique, ce qui faciliterait son intégration dans certains protocoles existants.¹¹

3.2 Pourquoi utiliser la ChemMatrix comme résine « verte »

La ChemMatrix est une résine solide. Elle est considérée comme « verte » en raison de ses avantages environnementaux par rapport à d'autres résines utilisées dans la synthèse peptidique.

Comme la chimie verte vise à minimiser l'utilisation de solvants toxiques ou dangereux, la synthèse en utilisant la ChemMatrix peut être effectuée avec des solvants bien moins nocifs et toxiques. Cela réduit les risques pour la santé humaine et pour l'environnement.^{12,13}

3.3 Dosage du dibenzofulvène

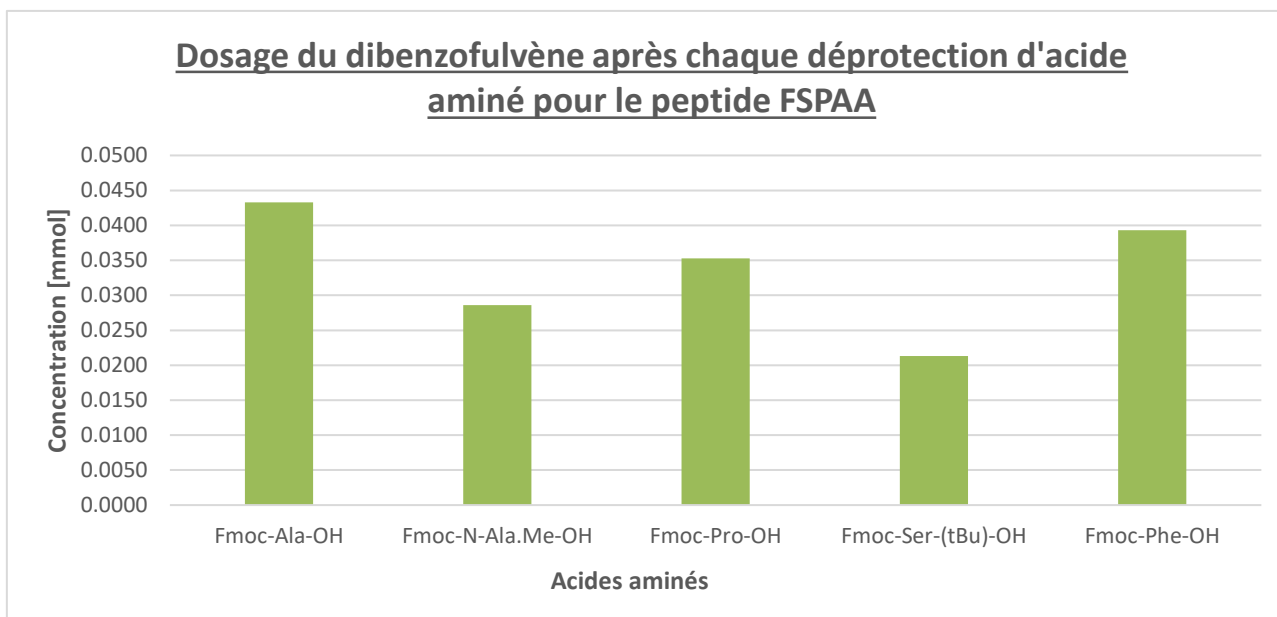


Figure 7 : Dosage du dibenzofulvène par spectrophotomètre à 301nm

Un contrôle par dosage UV du dibenzofulvène a été fait lors de la synthèse du peptide FSPAA (test 9 du *Tableau 6*) afin de s'assurer de l'efficacité de la déprotection avant chaque couplage. On remarque ici que la majorité du Fmoc est bien retiré. Le nombre de mmol théorique pour cette synthèse était de 0.05mmol. Il faut savoir qu'entre chaque étape, le rendement diminue considérablement. Pour le dosage de la phénylalanine, celui-ci n'est pas représentatif car sa concentration est trop élevée. On suppose une absorbance de cet a.a à 301nm en plus du dibenzofulvène, ce qui augmenterait donc la concentration.⁷

Une fois que tous les paramètres ont été validés pour la synthèse peptidique et qu'ils ont fonctionné, une première synthèse du peptide $C_8H_{14}O_2$ -FS(P) $P^{NH_2}A^{Me}A-CO_2H$ linéaire a été réalisée. Le chromatogramme de la *Figure 8* ci-dessous représente le pic du peptide linéaire synthétisé.



Figure 8 : Chromatogramme du peptide $C_8H_{14}O_2-FS(P)P^{NH_2}A^{Me}A-CO_2H$ linéaire par voie de synthèse verte, $t_r=2.3min$

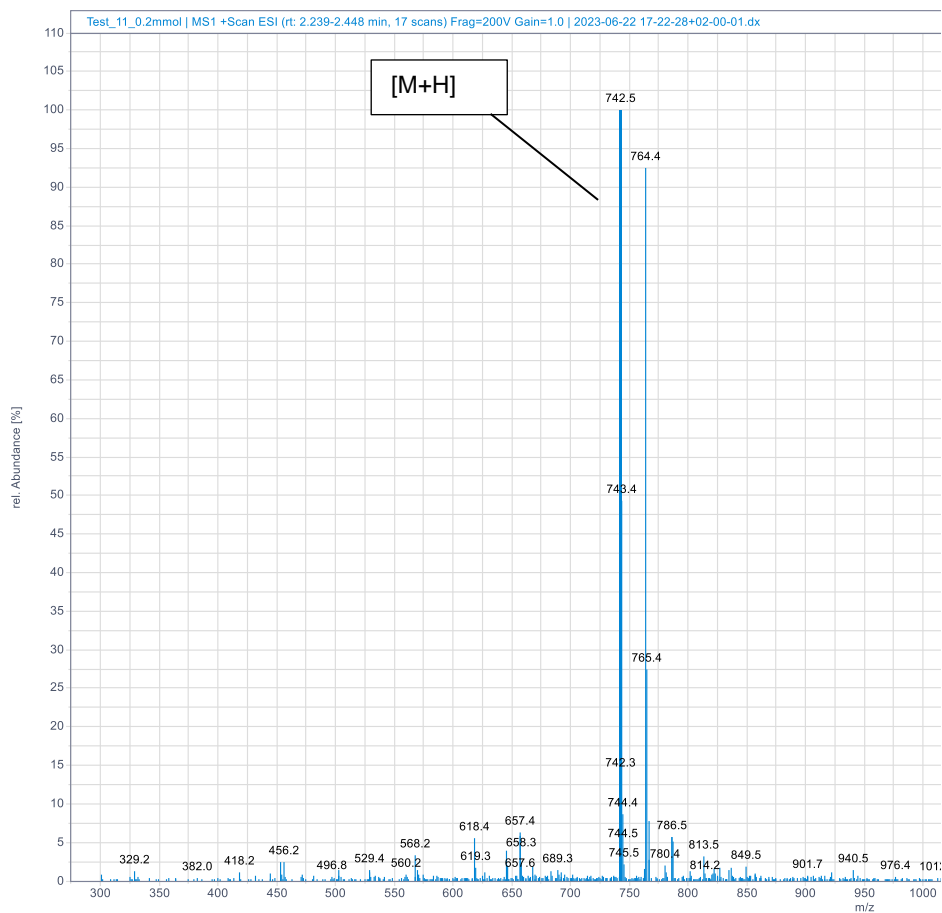


Figure 9 : Spectre de masse $[M+H]^+$ du peptide $C_8H_{14}O_2-FS(P)P^{NH_2}A^{Me}A-CO_2H$ linéaire par voie de synthèse verte

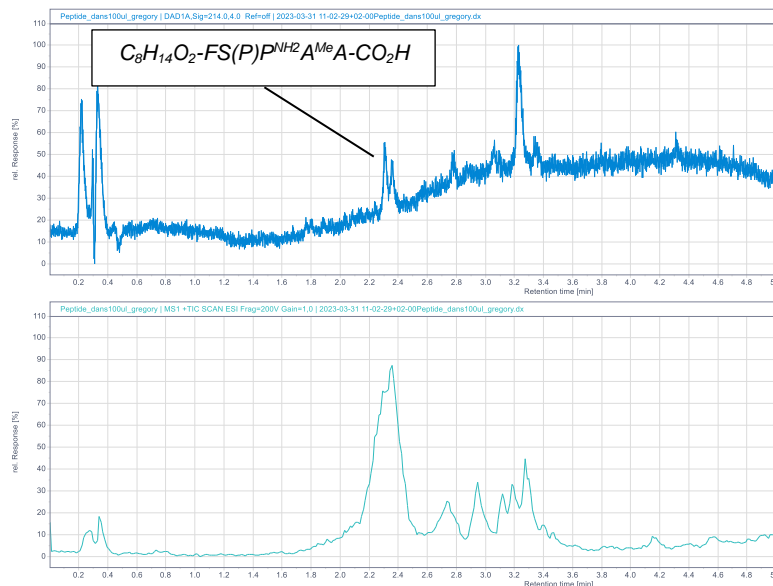


Figure 10 : Chromatogramme du peptide $C_8H_{14}O_2-FS(P)P^{NH_2}A^{Me}A-CO_2H$ linéaire par voie de synthèse conventionnelle. Peptide synthétisé durant les travaux pratiques PLTAC du 6^{ème} semestre $t_r=2.3min$

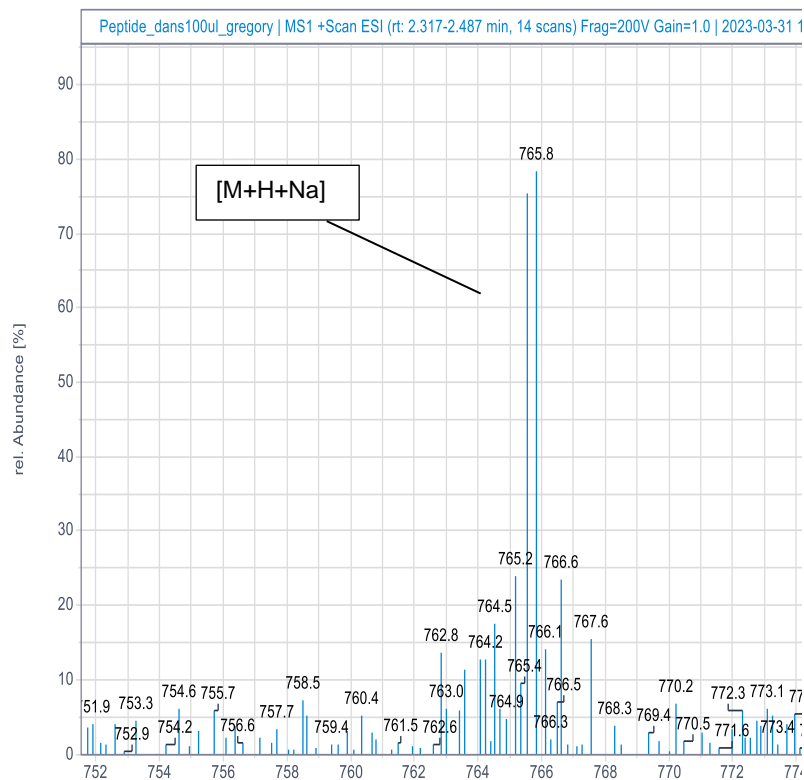


Figure 11 Spectre de masse $[M+H]^+$ du peptide $C_8H_{14}O_2-FS(P)P^{NH_2}A^{Me}A-CO_2H$ linéaire par voie de synthèse conventionnelle

En comparant la *Figure 8* et la *Figure 10*, on constate que les peptides linéaires possèdent le même temps de rétention (2.3min) pour les deux méthodes de synthèse. Leur masse détectée est aussi similaire, 742 g/mol pour $[M+H]^+$ ou 764g/mol pour $[M+H+Na]^+$. Cela démontre que la voie de synthèse par chimie verte peut être utilisée. Le solvant et les réactifs utilisés pour cette synthèse n'affectent pas le peptide synthétisé. Sur la *Figure 10*, la ligne de base n'est pas très lisse car la cellule du détecteur a été abîmée suite aux nombres importants d'analyses effectuées. La pièce a été changée et le problème a été résolu. Sur les *Figures 8 et 10*, le peptide final n'est pas pur. On remarque l'apparition d'autres produits secondaires synthétisés. Ces produits secondaires sont sûrement le résultat d'un mauvais couplage, ou d'une mauvaise déprotection lors de la synthèse. Ils sont donc synthétisés en parallèle du bon peptide lors de la SPPS. C'est pourquoi ils apparaissent sur le chromatogramme.

Cette première analyse par HPLC-MS sert de contrôle pour savoir si le produit synthétisé est le bon. A la suite de ce contrôle, une purification par HPLC préparative est effectuée. Les spectres des *Figures 12-13* ci-dessous confirment qu'il s'agit bien du peptide linéaire synthétisé.

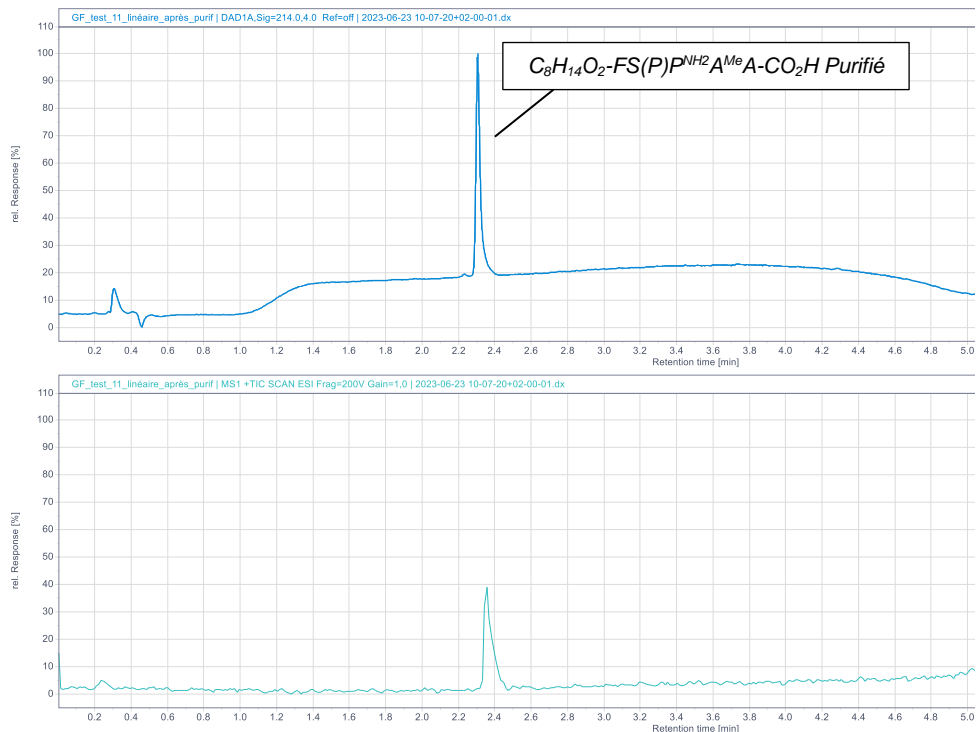


Figure 12 : Chromatogramme du peptide $C_8H_{14}O_2$ -FS(P) $P^{NH_2}A^{Me}A$ -CO₂H linéaire purifié, $t_r = 2.3$ min

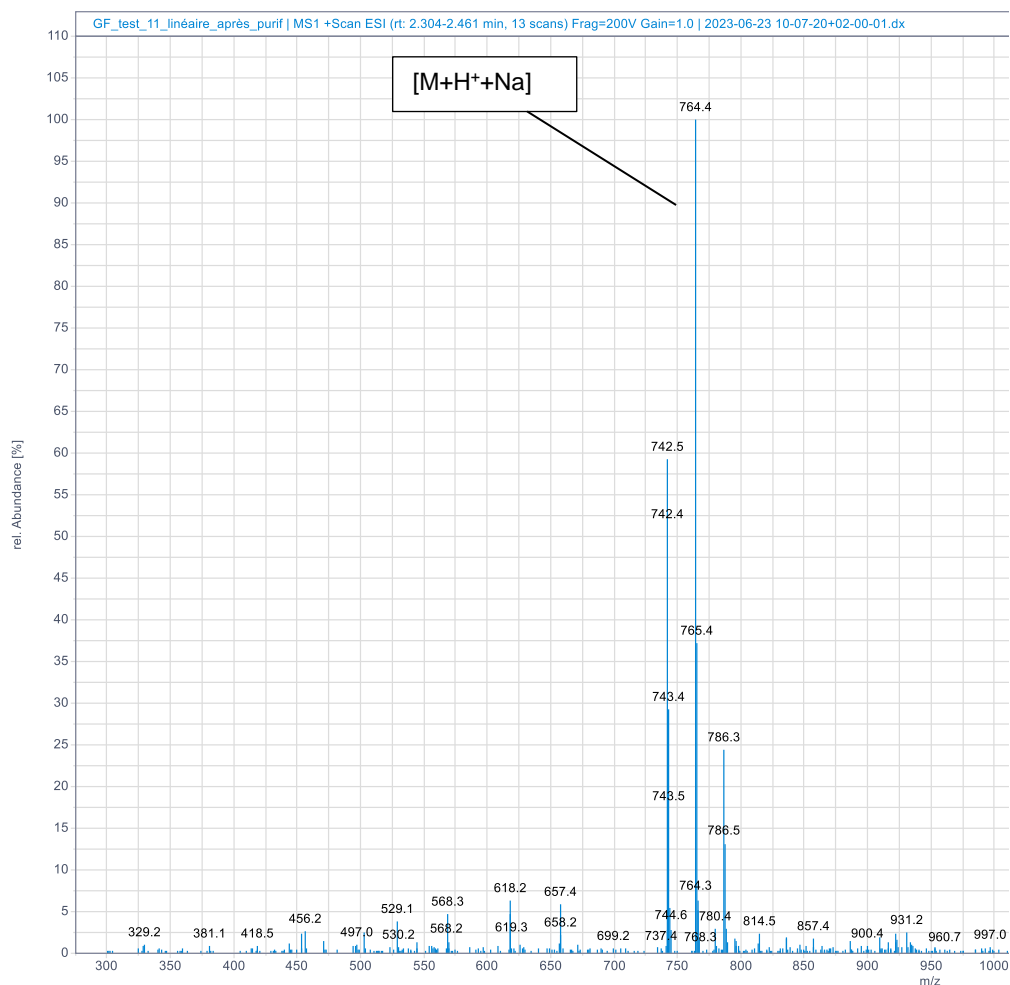


Figure 13 : Spectre de masse $[M+H+Na]$ du peptide $C_8H_{14}O_2-FS(P)P^{NH_2}A^{Me}A-CO_2H$ linéaire purifié

Une fois que le peptide linéaire a bien été purifié, celui-ci va être cyclisé durant 24h pour obtenir l'analogue de l'Enopeptine A, un peptide antimicrobien.

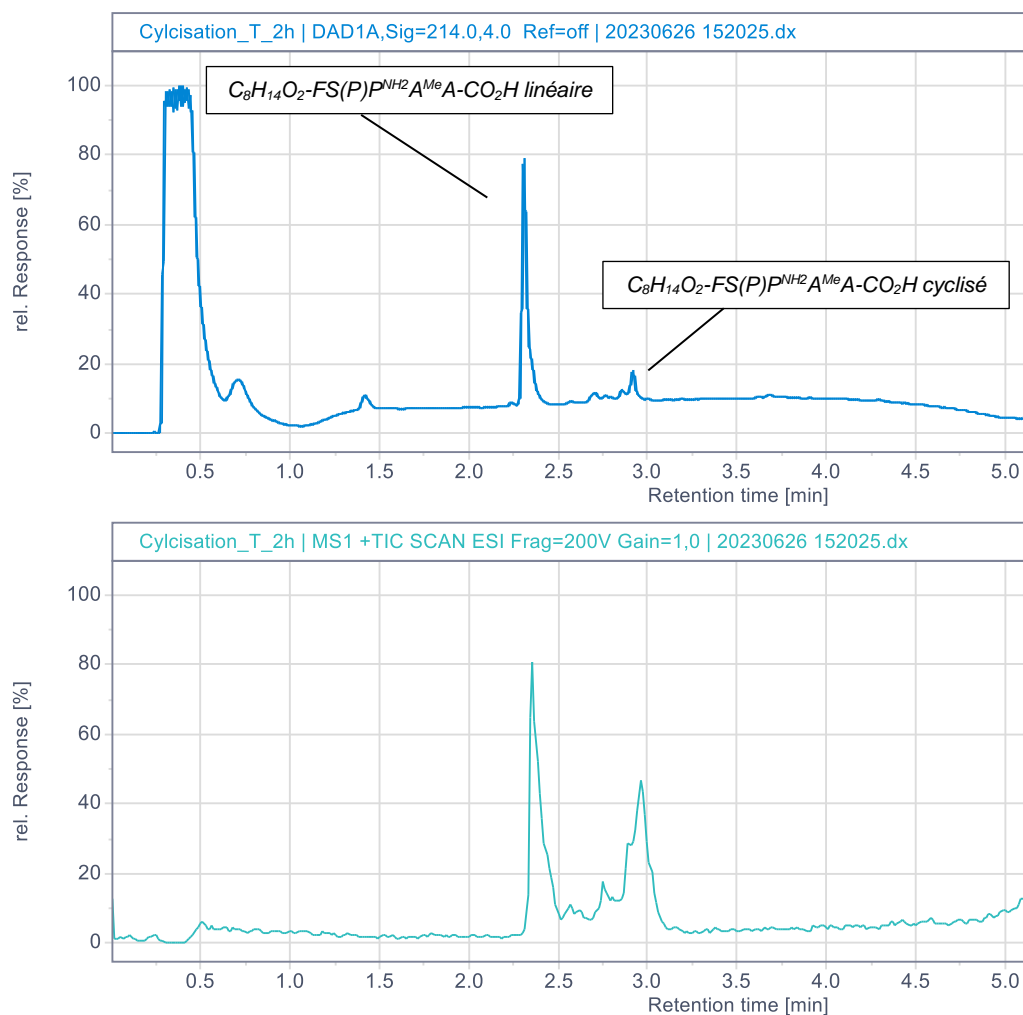


Figure 14 : Cyclisation du peptide $C_8H_{14}O_2$ -FS(P) $P^{NH_2}A^{Me}$ A-CO₂H linéaire purifié, t=2h

Après 2h de réaction, on remarque l'apparition de l'analogue de l'Enopeptine A. Celle-ci est faible, mais le TIC confirme bien sa présence à $t_r=2.9$ min. Le spectre de masse sur la Figure 15 ci-dessous confirme la présence du peptide cyclique. Le temps de rétention du peptide cyclisé (l'analogue de l'Enopeptine A) est plus long car sa structure est plus complexe ce qui va influencer les interactions avec la phase stationnaire de la colonne, ainsi que son adsorption. L'analogue de l'Enopeptine A possède des groupes fonctionnels plus polaires ainsi que des structures tridimensionnelles qui favorisent les interactions avec la phase stationnaire. Trois analyses ont été faites durant la réaction de cyclisation de 24h. Trois aliquots ont été prélevés à $t=2h$, $t=20h$ et $t=24h$. Une analyse par HPLC-MS a été faite pour chacun des aliquots.

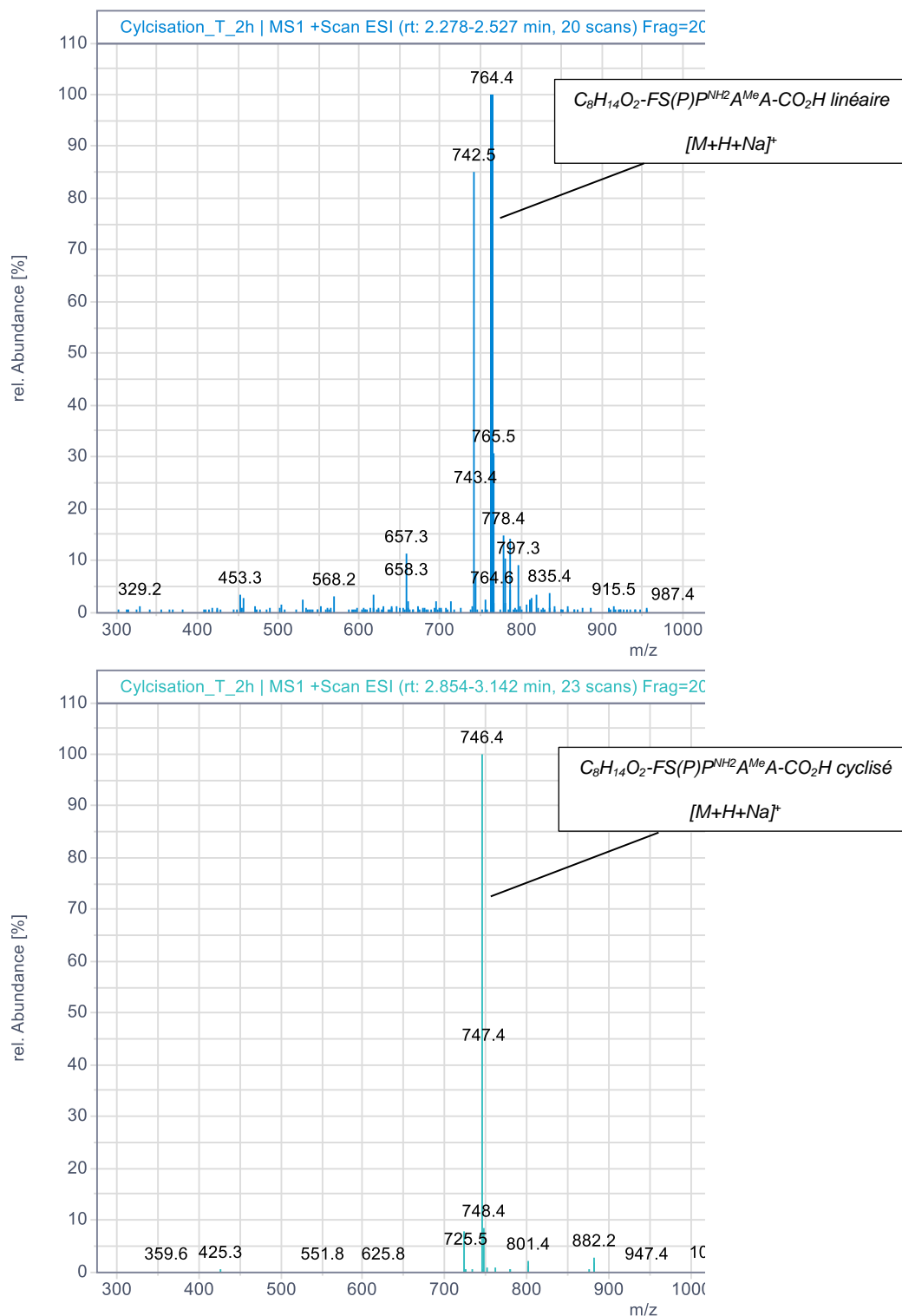


Figure 15 : Spectre de masse de la cyclisation du peptide $C_8H_{14}O_2-FS(P)P^{NH_2}A^{Me}A-CO_2H$ linéaire purifié, $t=2h$

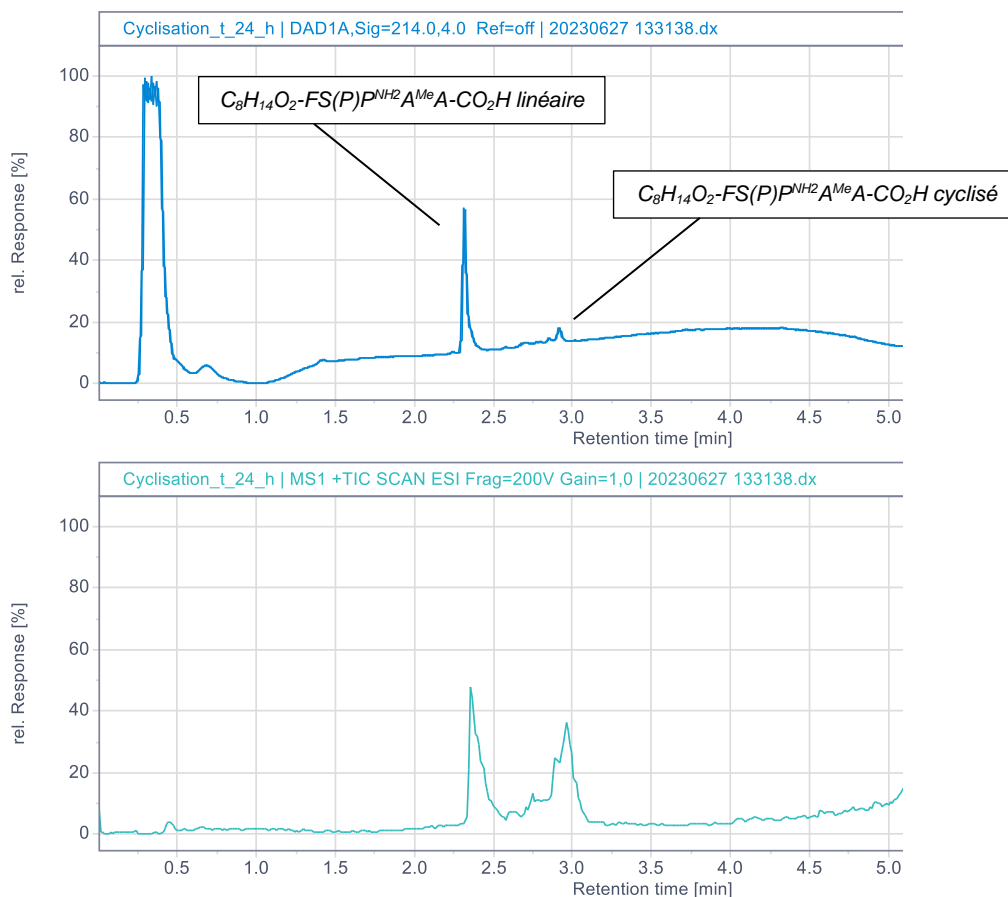


Figure 16 : Cyclisation du peptide $C_8H_{14}O_2$ -FS(P) $P^{NH_2}A^{Me}$ A-CO₂H linéaire purifié, t=24h

A t=24h, l'intensité du peptide linéaire purifié a diminué, ce qui est concluant car cela signifie que la cyclisation se déroule bien. On remarque sur le TIC que l'intensité du peptide cyclisé est quasi similaire à celui du peptide linéaire.

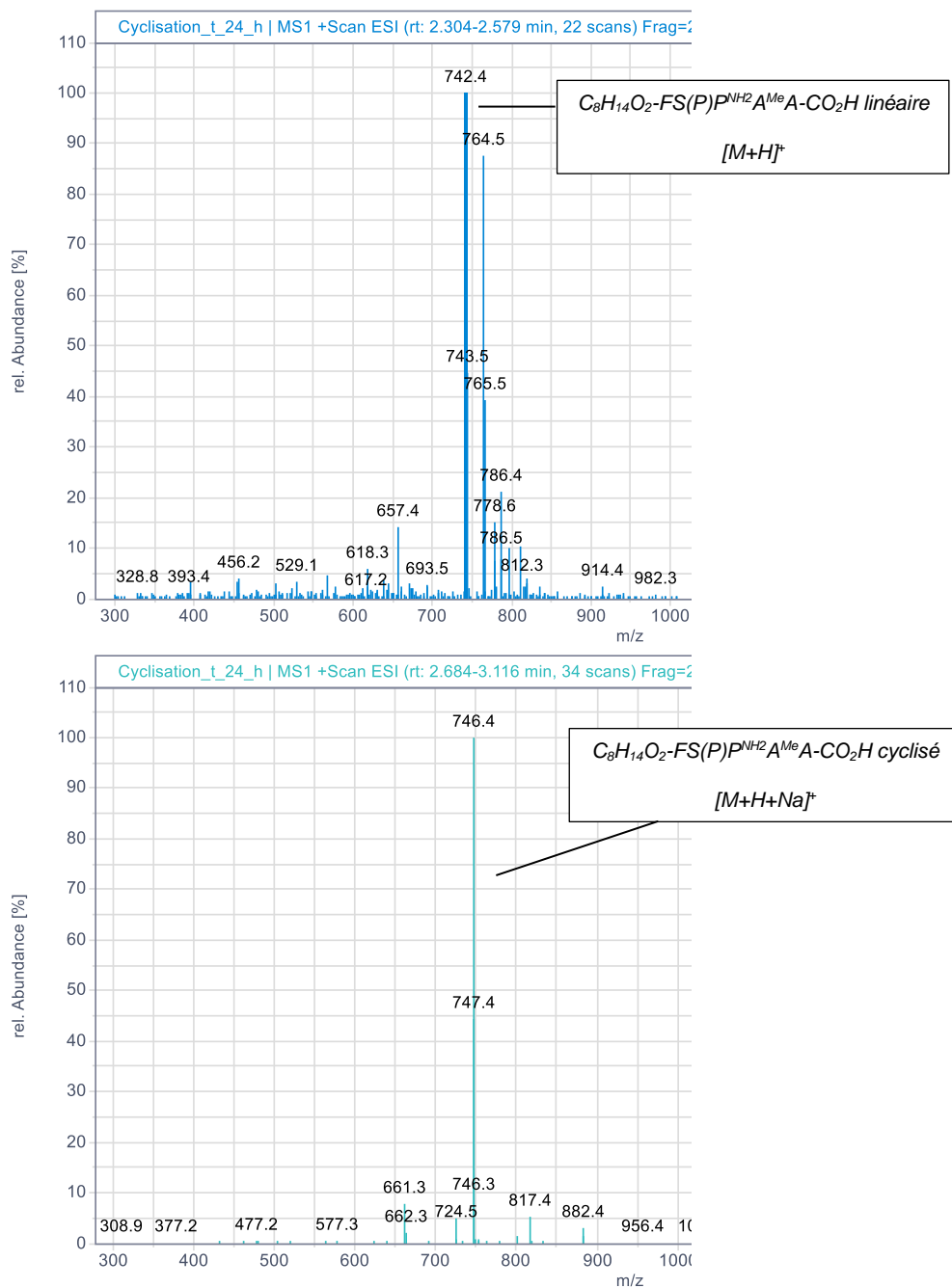


Figure 17 : Spectre de masse de la cyclisation du peptide $C_8H_{14}O_2-FS(P)P^{NH_2}A^{Me}A-CO_2H$ linéaire purifié, $t=2h$

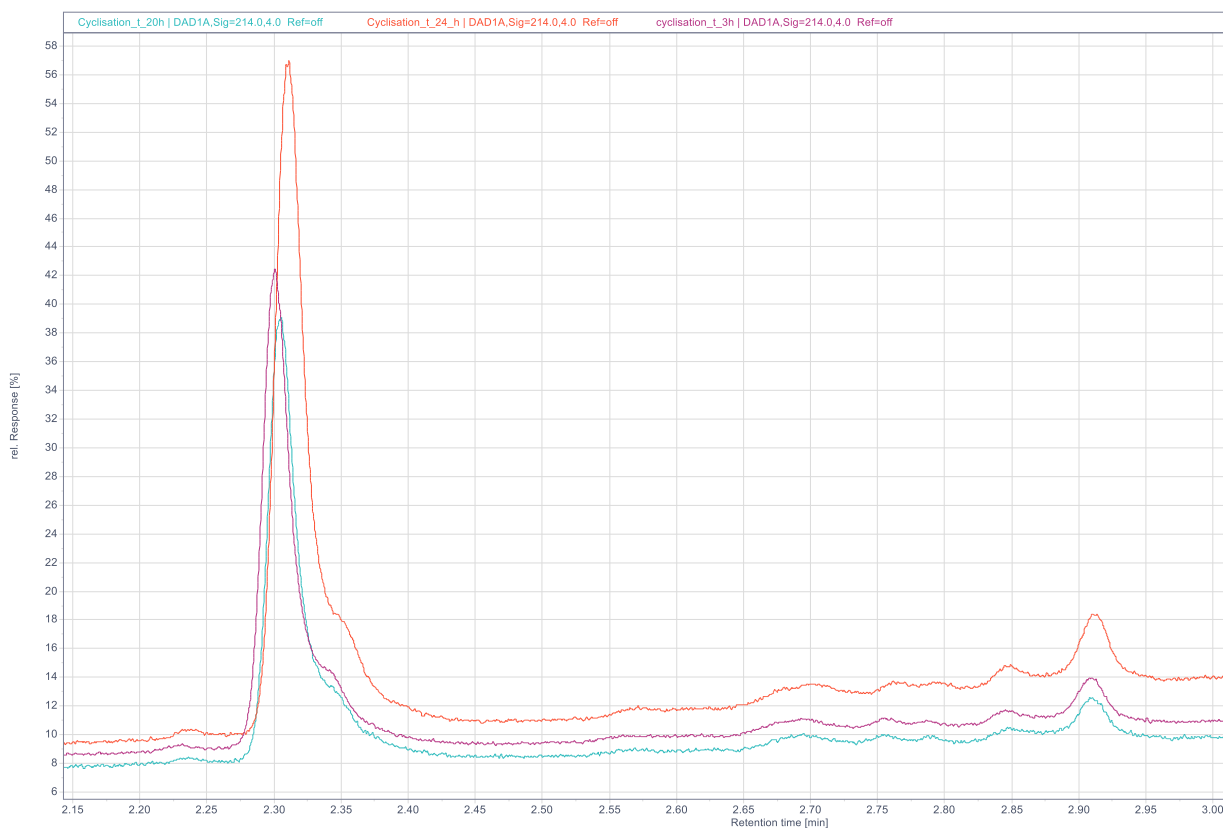


Figure 18 : Overlay des trois chromatogrammes @214nm lors de la cyclisation de l'énopéptine A linéaire à t=3h(Violet), t=20h (Vert) et t=24h (Orange)

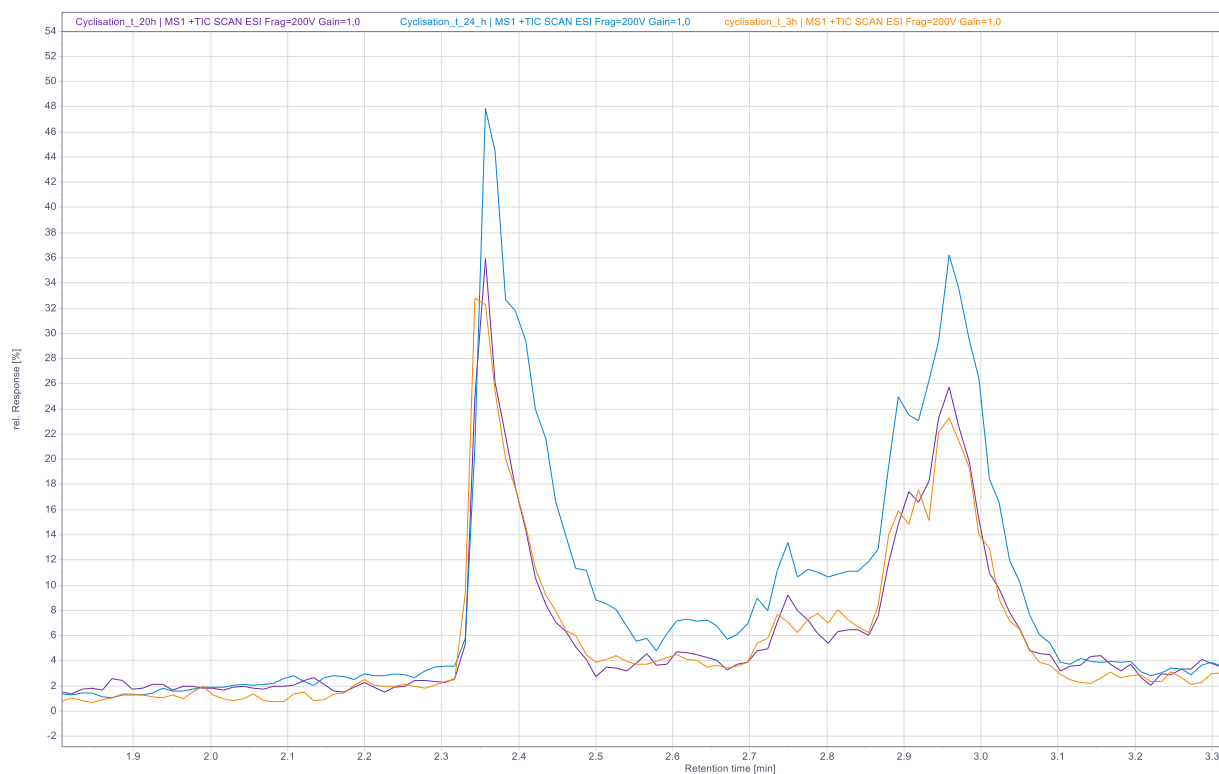


Figure 19 : Overlay des TIC des trois chromatogrammes lors de la cyclisation de l'énopéptine A linéaire à t=3h(Orange), t=20h (Violet) et t=24h (Bleu)

Suite à l'évaporation du solvant durant la cyclisation, l'intensité des pics n'est pas quantitative. On remarque sur le chromatogramme de la *Figure 18* que l'intensité du spectre DAD à $t=20h$ (courbe verte) pour le peptide cyclisé est plus faible que celui à $t=3h$ (courbe violette). La concentration du peptide a été modifiée tout d'abord à cause des prélèvements fait à tous les temps de temps et de plus, avec l'agitation, le solvant s'évapore et la concentration change. C'est le même cas pour le spectre du peptide linéaire. Cela confirme l'hypothèse du changement de concentration en raison des prélèvements et de l'évaporation qui ont eu lieu. On remarque tout de même que la cyclisation a fonctionné. Les spectres de masses le confirment. On retrouve la masse du peptide linéaire (742g/mol) ($M+H^+$) ainsi que la masse du peptide cyclique (746g/mol) ($M+H^++Na$). Le rendement n'a pas pu être calculé dû à la faible quantité de peptide linéaire synthétisé.

4. Conclusion et Perspectives

En conclusion, les objectifs de ce travail ont été accomplis dans le temps imparti. La synthèse du peptide selon la voie « verte » a nécessité de nombreux tests pour résoudre certains problèmes, comme la solubilité des acides aminés dans le PC, ou la précipitation de certaines solutions fraîchement préparées. Cependant, en ajustant méthodiquement les paramètres expérimentaux et en persévérant, les obstacles ont été surmontés. Le succès de la synthèse de l'analogue de l'Enopeptine A par la voie « verte » témoigne de l'efficacité de cette approche et souligne l'importance de la détermination scientifique. Les enseignements tirés de cette expérience seront précieux pour guider les futures recherches vers des méthodes de synthèse peptidique encore plus respectueuses pour l'environnement.

Ce projet ouvre des perspectives prometteuses, représentant une approche relativement nouvelle au sein du domaine de la chimie des peptides. Son importance réside non seulement dans les résultats obtenus, mais également dans son potentiel à façonner l'avenir. En adoptant cette voie novatrice et plus respectueuse de l'environnement, il contribue de manière significative à la recherche de solutions durables. Cette démarche, en harmonie avec les impératifs écologiques actuels, incarne une avancée pour un avenir chimique plus responsable et écologique.

Une première tentative de synthèse automatique a été entreprise, mais les résultats n'ont pas été concluants. En raison de contraintes temporelles, il n'a pas été possible de pousser l'optimisation de cette méthode. C'est pourquoi la décision a été prise de privilégier une approche de synthèse semi-automatique dans un premier temps. Les résultats obtenus avec cette méthode se sont révélés plus convaincants. Il serait pertinent d'envisager une optimisation de cet aspect à l'avenir, afin d'accélérer le processus de synthèse peptidique. (Voir *annexe 1*)

5. Bibliographie

1. solvantsverts_fr.pdf.
2. Rasmussen, J. H., Pawlas, J., Ludemann-Hombourger, O. & Rekaï, E. D. OLIGONUCLEOTIDES&PEPTIDES Industry perspective. *Chim. Oggi* **37**, (2019).
3. Lawrenson, S. B., Arav, R. & North, M. The greening of peptide synthesis. *Green Chem.* **19**, 1685–1691 (2017).
4. Osada, H., Yano, T., Koshino, H. & Isono, K. Enopeptin A, a novel depsipeptide antibiotic with anti-bacteriophage activity. *J. Antibiot. (Tokyo)* **44**, 1463–1466 (1991).
5. pipette_1-2020-014_Simone-Hargraves_Gilbert-Greub_Niolas-Jacquier_Peptides-antimicrobiens-une-alternative-aux-antibiotiques.pdf.
6. *Solvants verts: fondements, santé, sécurité, environnement et substitution*. (Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail, 2020).
7. Journal of Peptide Science - 2017 - Eissler - Substitution determination of Fmoc-substituted resins at different.pdf.
8. <https://www.eda.admin.ch/agenda2030/fr/home/agenda-2030/die-17-ziele-fuer-eine-nachhaltige-entwicklung/ziel-12-fuer-nachhaltige-konsum-und-produktionsmuster-sorgen.html>.
9. <https://www.peptide.com/resources/solid-phase-peptide-synthesis/monitoring-of-peptide-coupling-and-capping/>.
10. <https://www.peptide.com/resources/solid-phase-peptide-synthesis/standard-coupling-procedures/>.
11. Hachmann, J. & Lebl, M. Alternative to Piperidine in Fmoc Solid-Phase Synthesis. *J. Comb. Chem.* **8**, 149–149 (2006).
12. García-Martín, F. *et al.* ChemMatrix, a Poly(ethylene glycol)-Based Support for the Solid-Phase Synthesis of Complex Peptides. *J. Comb. Chem.* **8**, 213–220 (2006).
13. Lawrenson, S. B., Arav, R. & North, M. The greening of peptide synthesis. *Green Chem.* **19**, 1685–1691 (2017).
14. Singh, G. S. & Pandeya, S. N. 2. Natural products in discovery of potential and safer antibacterial agents.
15. Goodreid, J. D. *et al.* Development and Characterization of Potent Cyclic Acyldepsipeptide Analogues with Increased Antimicrobial Activity. *J. Med. Chem.* **59**, 624–646 (2016).

16. Hinzen, B. *et al.* Medicinal Chemistry Optimization of Acyldepsipeptides of the Enopeptin Class Antibiotics. *ChemMedChem* **1**, 689–693 (2006).
17. ChemistryOpen - 2020 - Amadi-Kamalu - Investigation of Parameters that Affect Resin Swelling in Green Solvents.pdf.
18. <https://www.peptide.com/resources/solid-phase-peptide-synthesis/standard-coupling-procedures/>.
19. . Anciens travaux de diplômés de 2016-2022 sous la responsabilité du Dr. Marc Mathieu

6. Figures

Figure 1: les douze principes de la chimie verte	1
Figure 2 : Synthèse du propylène carbonate par carbonatation de l'oxyde de propylène	3
Figure 3 : Formation du dibenzofulvène lors de la déprotection d'un a.a protégé par un Fmoc à l'aide de pipéridine 20% dans PC	3
Figure 4 : C ₈ H ₁₄ O ₂ -FS(P)P ^{NH₂} A ^{Me} A-CO ₂ H linéaire	6
Figure 5 : Analogue de l'Enopeptine A.....	6
Figure 6 : Exemple de procédure à suivre pour la synthèse peptidique manuelle (SPPS)	15
Figure 7 : Dosage du dibenzofulvène par spectrophotomètre à 301nm....	18
Figure 8 : Chromatogramme du peptide C ₈ H ₁₄ O ₂ -FS(P)P ^{NH₂} A ^{Me} A-CO ₂ H linéaire par voie de synthèse verte, tr=2.3min	19
Figure 9 : Spectre de masse [M+H] ⁺ du peptide C ₈ H ₁₄ O ₂ -FS(P)P ^{NH₂} A ^{Me} A-CO ₂ H linéaire par voie de synthèse verte	19
Figure 10 : Chromatogramme du peptide C ₈ H ₁₄ O ₂ -FS(P)P ^{NH₂} A ^{Me} A-CO ₂ H linéaire par voie de synthèse conventionnelle. Peptide synthétisé durant les travaux pratiques PLTAC du 6 ^{ème} semestre tr=2.3min	20
Figure 11 Spectre de masse [M+H] ⁺ du peptide C ₈ H ₁₄ O ₂ -FS(P)P ^{NH₂} A ^{Me} A-CO ₂ H linéaire par voie de synthèse conventionnelle	20
Figure 12 : Chromatogramme du peptide C ₈ H ₁₄ O ₂ -FS(P)P ^{NH₂} A ^{Me} A-CO ₂ H linéaire purifié, tr= 2.3min.....	21
Figure 13 :Spectre de masse [M+H+Na] du peptide C ₈ H ₁₄ O ₂ -FS(P)P ^{NH₂} A ^{Me} A-CO ₂ H linéaire purifié.....	22
Figure 14 : Cyclisation du peptide C ₈ H ₁₄ O ₂ -FS(P)P ^{NH₂} A ^{Me} A-CO ₂ H linéaire purifié, t=2h	23
Figure 15 : Spectre de masse de la cyclisation du peptide C ₈ H ₁₄ O ₂ -FS(P)P ^{NH₂} A ^{Me} A-CO ₂ H linéaire purifié, t=2h.....	24
Figure 16 : Cyclisation du peptide C ₈ H ₁₄ O ₂ -FS(P)P ^{NH₂} A ^{Me} A-CO ₂ H linéaire purifié, t=24h	25
Figure 17 : Spectre de masse de la cyclisation du peptide C ₈ H ₁₄ O ₂ -FS(P)P ^{NH₂} A ^{Me} A-CO ₂ H linéaire purifié, t=2h.....	26
Figure 18 : Overlay des trois chromatogrammes @214nm lors de la cyclisation de l'énopeptine A linéaire à t=3h(Violet), t=20h (Vert) et t=24h (Orange).....	27

Figure 19 : Overlay des TIC des trois chromatogrammes lors de la cyclisation de l'énopeptine A linéaire à t=3h(Orange), t=20h (Violet) et t=24h (Bleu)27

7. Tableaux

Tableau 1: Tableau des produits utilisés pour ce travail	7
Tableau 2 : Tableau des produits utilisés pour ce travail préparés dans le laboratoire peptide de la HES-SO	9
Tableau 3 : Acides aminés et résines utilisés pour la synthèse de peptide pour ce travail	10
Tableau 4: Méthode U-HPLC-MS	13
Tableau 5 : Méthode HPLC Préparative	14
Tableau 6 : Résumé des différents paramètres appliqués lors de la synthèse peptidique	16

8. Annexes

Annexe 1 : Méthode PurePep Chorus de Gyros	33
Annexe 2 : Spectre du peptide $C_8H_{14}O_2$ -FS(P) $P^{NH_2}A^{Me}A$ -CO ₂ H linéaire synthétisé par la méthode semi-automatique.....	34
Annexe 3 : Spectre de masse du peptide $C_8H_{14}O_2$ -FS(P) $P^{NH_2}A^{Me}A$ -CO ₂ H linéaire synthétisé par la méthode semi-automatique	35
Annexe 4 : Dosage UV du dibenzofulvène fait par l'appareil PurePep Chorus de Gyros pour chacun des couplages	36

Méthode semi-automatique:

Swelling de la résine ChemMatrix HMPB-Ala:

Etape	Opération	Solvent	Volume [mL]	Temps
1	Swelling	PC	6.00	1h

Couplage Fmoc-Ala^{Me}-OH

Etape	Opération	Solvent	Volume [mL]	Temps
1	Déprotection	20% pipéridine	6.00	2x15min
2	Rinçage	PC	6.00	3x1min
3	Couplage	a.a	6.00	1h
4	Rinçage	PC	6.00	3x1min

Triple Couplage Fmoc-Pro^{(NH₂)-OH}

Etape	Opération	Solvent	Volume [mL]	Temps
1	Déprotection	20% pipéridine	6.00	2x15min
2	Rinçage	PC	6.00	3x1min
3	Couplage	a.a	6.00	1h
4	Rinçage	PC	6.00	3x1min
5	Couplage	a.a	6.00	1h
6	Rinçages	PC	6.00	3x1min
7	Couplage	a.a	6.00	1h
8	Rinçage	PC	6.00	3x1min

Couplage Fmoc-Ser x H₂O

Etape	Opération	Solvent	Volume [mL]	Temps
1	Déprotection	20% pipéridine	6.00	2x15min
2	Rinçage	PC	6.00	3x1min
3	Couplage	a.a	6.00	1h
4	Rinçage	PC	6.00	3x1min

Couplage Fmoc-Phe-OH

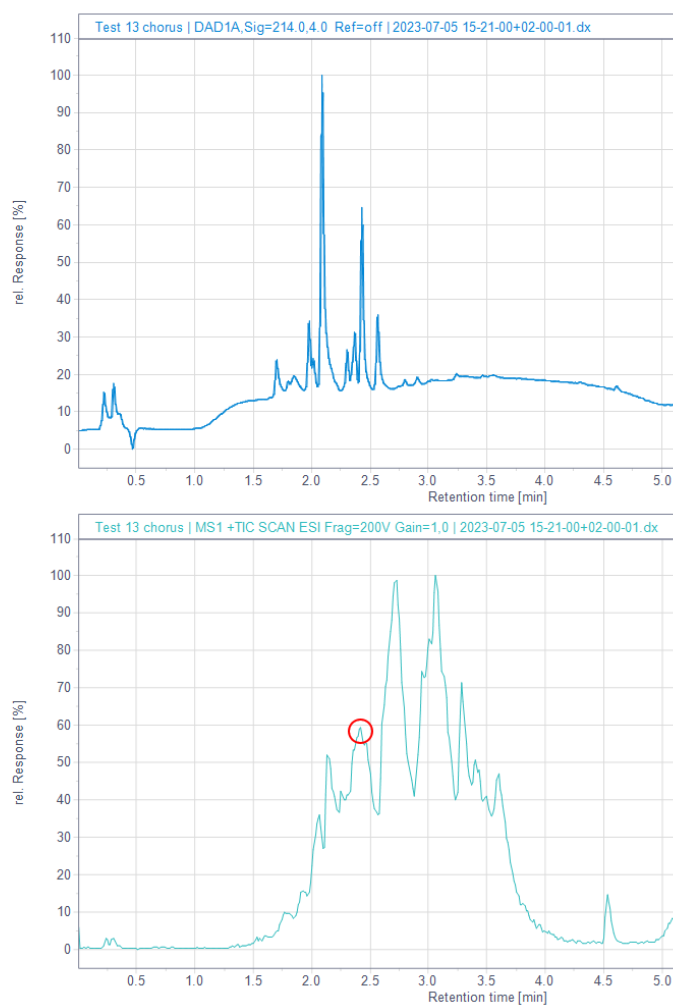
Etape	Opération	Solvent	Volume [mL]	Temps
1	Déprotection	20% pipéridine	6.00	2x15min
2	Rinçage	PC	6.00	3x1min
3	Couplage	a.a	6.00	1h
4	Rinçage	PC	6.00	3x1min

Couplage acide octénoïque

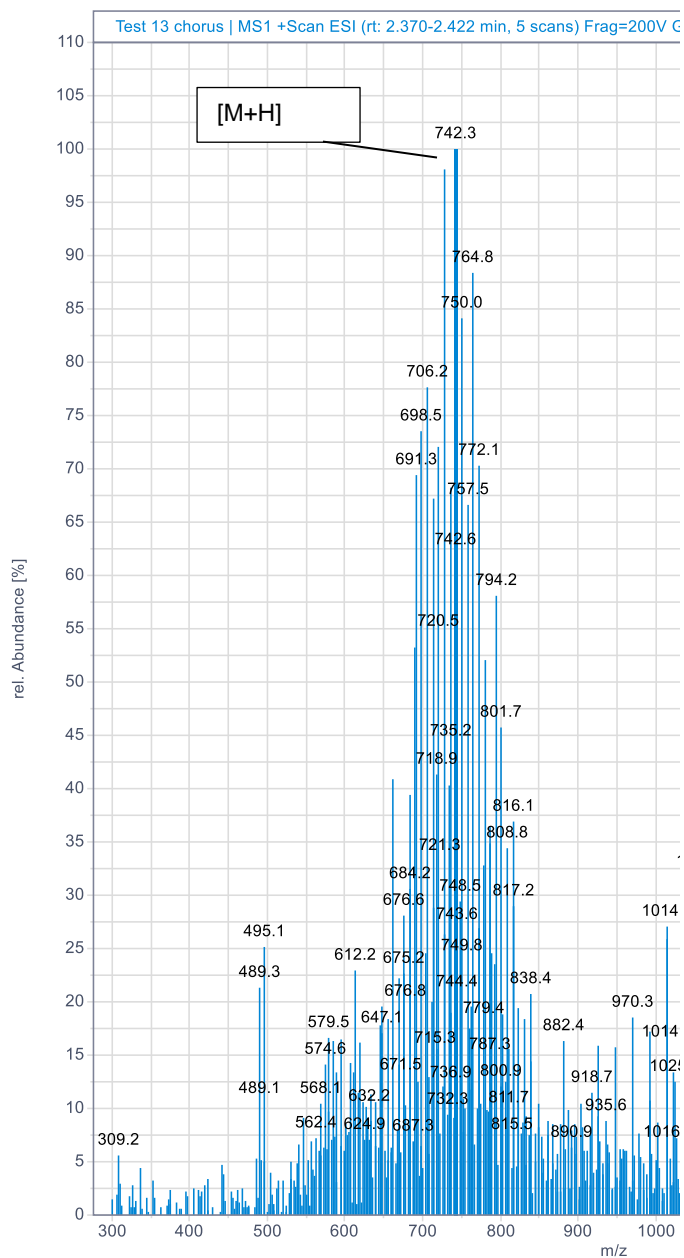
Etape	Opération	Solvent	Volume [mL]	Temps
1	Déprotection	20% pipéridine	6.00	2x15min
2	Rinçage	PC	6.00	3x1min
3	Couplage	a.a	6.00	1h
4	Rinçage	PC	6.00	3x1min

Le Boc pro est ensuite couplé manuellement selon la méthode d'estérification

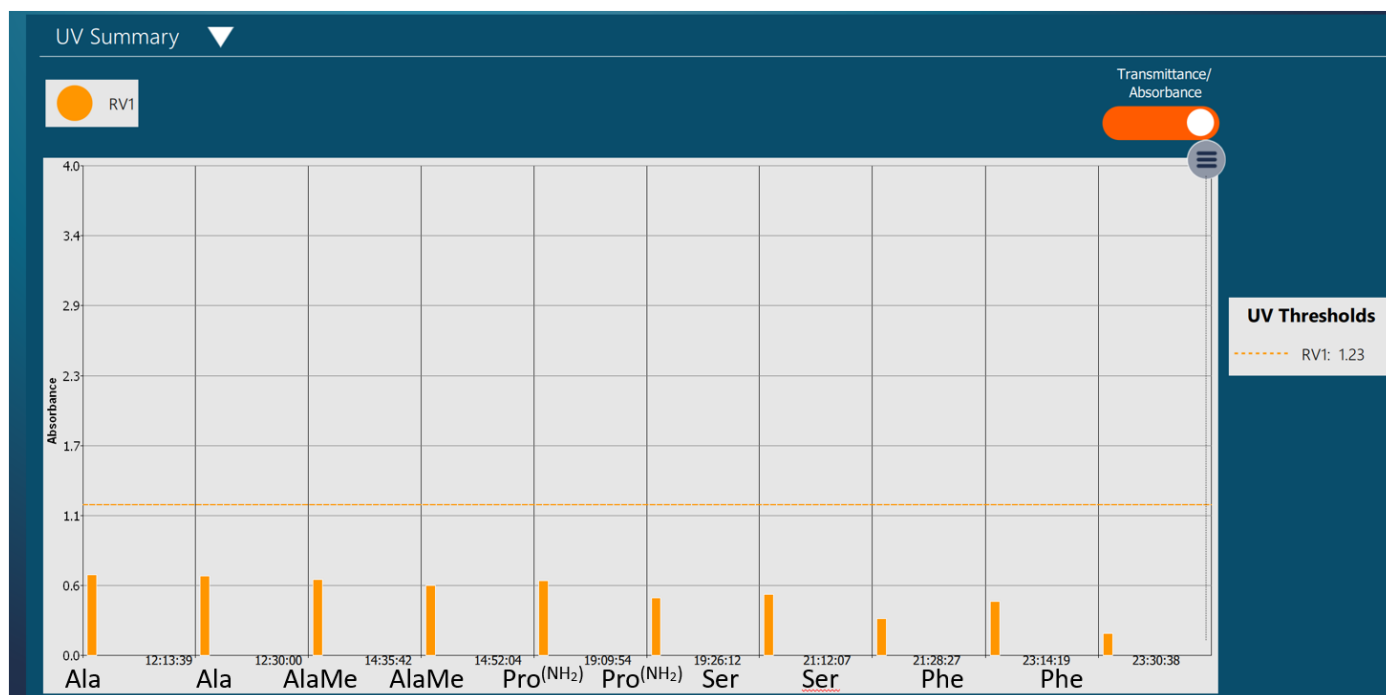
Annexe 1 : Méthode PurePep Chorus de Gyros



Annexe 2 : Spectre du peptide $C_8H_{14}O_2$ -FS(P) $P^{NH_2}A^{Me}$ A-CO₂H linéaire synthétisé par la méthode semi-automatique



Annexe 3 : Spectre de masse du peptide $C_8H_{14}O_2$ -FS(P) $P^{NH_2}A^{Me}$ -CO₂H linéaire synthétisé par la méthode semi-automatique



Annexe 4 : Dosage UV du dibenzofulvène fait par l'appareil PurePep Chorus de Gyros pour chacun des couplages