



HAL
open science

Conception de modèles de fibres amyloïdes et d'inhibiteurs de la fibrillogénèse

Myriam Ouberaï

► **To cite this version:**

Myriam Ouberaï. Conception de modèles de fibres amyloïdes et d'inhibiteurs de la fibrillogénèse. Chimie. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT: . tel-00361444

HAL Id: tel-00361444

<https://theses.hal.science/tel-00361444>

Submitted on 15 Feb 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Joseph Fourier
Grenoble I – Science, Technologie, Santé

THESE

Présentée par

Myriam OUBERAÏ

Pour l'obtention du titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Spécialité : Chimie-Biologie

Conception de modèles de fibres amyloïdes et d'inhibiteurs de la fibrillogénèse

Soutenue publiquement le 2 Décembre 2008, devant le jury composé de :

Dr. Anthony W. COLEMAN, CNRS UMR 5086, Lyon
Pr. Pascal DUMY, CNRS UMR 5250, Grenoble
Dr. Jean GAGNON, CNRS UMR 5163, Grenoble
Pr. Julian GARCIA, CNRS UMR 5250, Grenoble
Dr. Gilles GUICHARD, CNRS UPR 9021, Strasbourg

Rapporteur
Membre invité
Président
Examineur
Rapporteur

Université Joseph Fourier
Grenoble I – Science, Technologie, Santé

THESE

Présentée par

Myriam OUBERAÏ

Pour l'obtention du titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Spécialité : Chimie-Biologie

Conception de modèles de fibres amyloïdes et d'inhibiteurs de la fibrillogénèse

Soutenue publiquement le 2 Décembre 2008, devant le jury composé de :

Dr. Anthony W. COLEMAN, CNRS UMR 5086, Lyon
Pr. Pascal DUMY, CNRS UMR 5250, Grenoble
Dr. Jean GAGNON, CNRS UMR 5163, Grenoble
Pr. Julian GARCIA, CNRS UMR 5250, Grenoble
Dr. Gilles GUICHARD, CNRS UPR 9021, Strasbourg

Rapporteur
Membre invité
Président
Examineur
Rapporteur

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Pascal Dumy, directeur du Département de Chimie Moléculaire, responsable de l'équipe « Ingénierie et Interactions Biomoléculaires » pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour son aide et ses précieux conseils.

Je remercie tout particulièrement le Professeur Julian Garcia, mon directeur de thèse, pour m'avoir encadrée, conseillée et fait confiance.

Je souhaite remercier les personnes qui ont jugé ce travail et ont formé le jury lors de ma soutenance :

- Dr. Anthony W. Coleman, Directeur de Recherche à l'Institut de Biologie et de Chimie des Protéines de Lyon
- Dr. Gilles Guichard, Directeur de Recherche à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Strasbourg
- Dr. Jean Gagnon, Directeur de Recherche du Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes de Grenoble

Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr. Gunnar Dolphin pour sa grande disponibilité et son aide précieuse à la réalisation de ces travaux.

Je remercie le Dr. Martine Demeunynck avec qui j'ai réalisé mon stage de Master Recherche et qui m'a ensuite apporté conseils et soutien avec une grande générosité. Je lui exprime toute ma reconnaissance pour son aide ainsi que pour sa gentillesse au quotidien.

Je remercie aussi le Dr. Sabine Chierici avec qui il m'a été particulièrement agréable de travailler et les stagiaires de Licence et Master qui ont participé à ces travaux : Delphine, Caroline, Estelle, Céline, Maud, Anne, Valentine et Emilie.

Merci à Isabelle Paintrand du CERMAV de Grenoble pour la réalisation des images de microscopie électronique et Sonia Ortega pour m'avoir formée à la microscopie à force atomique.

Je remercie les membres de l'équipe « Ingénierie et Interactions Biomoléculaires » pour leur aide et leur bonne humeur. Je remercie tout particulièrement les étudiants : Stéphanie, Amandine, Corinne, Ludivine, Joséphine, Mathilde, Sophie, Babeth, Martin, Sumana, Nabil, Walid avec qui j'ai commencé cette aventure au labo et Vincent, mon copain de palliasso. Bien sur je ne peux oublier mes compères Pierre, Marie-Laure, Mathieu, Julien et notre petite dernière Isabelle pour leur bonne humeur quotidienne.

Pour finir je veux dédier ces travaux à mes proches : tout d'abord à mes parents, Mohamed et Geneviève, pour leur confiance et leur soutien précieux, à ma sœur, Sabrina, qui comme moi a tourné une page en cette année 2008. Enfin, je remercie tendrement Lyess qui m'a accompagnée à Grenoble et m'a toujours encouragée et soutenue.

Tables des matières

Avant-propos.....	4
Abréviations.....	5
Liste des acides aminés naturels.....	7
INTRODUCTION.....	9
I. Projet de recherche	11
II. L'amylose	12
II.1. Description et caractérisation de l'amylose.....	12
II.2. Structures des fibres	14
II.3. Mécanisme de formation des fibres.....	16
II.4. Toxicité des dépôts amyloïdes	18
II.4.1. Agents toxiques des amyloses	18
II.4.2. Maladie d'Alzheimer.....	19
II.4.3. Stratégies thérapeutiques	21
PARTIE A.....	23
A. Modèles de fibres amyloïdes	25
A.1. Molécules modèles de fibres amyloïdes.....	25
A.1.1. Fragments peptidiques.....	25
A.1.2. Mutagenèse dirigée.....	27
A.1.3. Solubiliser la protéine amyloïde et conception de novo	30
A.1.4. Peptides « switch » et « coiled coil ».....	34
A.2. Conception de molécules modèles de fibres amyloïdes	37
A.3. Stratégie de synthèse des édifices peptidiques	42
A.4. Synthèse des édifices peptidiques	45
A.4.1. Synthèse des précurseurs décapeptides cycliques	45
A.4.2. Synthèse des précurseurs peptidiques A β	47
A.4.3. Synthèse par lien éther d'oxime des édifices peptidiques	49
* Synthèse des composés 2Loop 18 et 2Lin 19.....	49
* Synthèse du composé 4Loop 20	51
A.5. Etude des édifices modèles de fibres amyloïdes	53
A.5.1. Caractérisation des édifices peptidiques.....	53
A.5.2. Modélisation moléculaire des édifices peptidiques et modèles de fibres proposés	60
A.5.3. Mécanisme proposé pour le repliement des édifices	65
A.5.4. Mode d'interaction de la Thioflavine T	66
A.6. Outil de criblage à haut débit	68
A.7. Bilan.....	69
PARTIE B.....	71
B. Inhibiteurs de la fibrillogénèse	73
B.1. Inhibiteurs de la formation des fibres.....	73
B.1.1. Inhibiteurs peptidiques	73
B.1.2. Inhibiteurs non peptidiques	76
* Colorants sulfatés	78
* Polyphénols	78
* Hétérocycles aromatiques.....	79
* Porphyrines et benzothiazoles	80
* Autres composés.....	80
B.2. Conception des inhibiteurs	82
B.3. Stratégie de synthèse des inhibiteurs.....	87
B.4. Synthèse des inhibiteurs	92
B.4.1. Synthèse des précurseurs décapeptides cycliques	92
* Synthèse du cyclodécapeptide présentant quatre groupements alcynes	92
* Synthèse des cyclodécapeptides présentant deux groupements alcynes.....	93
* Synthèse du cyclodécapeptide présentant un groupement alcyne	93

★	Synthèse du cyclodécapeptide présentant deux groupements azotures	94
B.4.2.	Synthèses des ligands	95
★	Synthèse du dérivé azoture de la tacrine 38.....	96
★	Synthèse du peptide A β ₁₆₋₂₁	96
★	Synthèse du dérivé du curcumin 44 fonctionnalisé par un azoture.....	97
★	Synthèse du dérivé du curcumin 45 fonctionnalisé par un alcyne	98
★	Synthèse du dérivé pyrazole du curcumin 48	99
B.4.3.	Synthèses des assemblages multimériques	100
★	Synthèse des assemblages de la Tacrine.....	101
★	Synthèse des assemblages A β ₁₆₋₂₁	104
★	Synthèse des assemblages du Curcumin.....	106
B.4.4.	Caractérisation par RMN à deux dimensions du composé C4Tac 50.....	108
B.5.	Inhibition de la formation des fibres amyloïdes	110
B.5.1.	Inhibition de la formation des fibres par les assemblages de la Tacrine et de la Quinacrine..	112
B.5.2.	Inhibition de la formation des fibres par les assemblages du Curcumin.....	119
B.5.3.	Inhibition de la formation des fibres par les assemblages du peptide A β ₁₆₋₂₁	125
B.6.	Inhibition de l'Acétylcholinestérase.....	129
B.7.	Bilan	131

CONCLUSION..... 133

PARTIE EXPERIMENTALE 139

I.	Protocole de synthèse	141
I.1.	Materials and equipments.....	141
I.1.1.	Reagents and solvents.....	141
I.1.2.	RP-HPLC	141
I.1.3.	NMR and mass spectrometry	141
I.2.	General procedures for the syntheses of peptides	142
I.2.1.	Syntheses of linear protected peptides by SPPS	142
I.2.2.	Cleavage of the resin	143
I.2.3.	Cyclization reaction of linear peptides in solution	143
I.2.4.	Cleavage of Dde protecting group.....	143
I.3.	Syntheses of models	144
I.3.1.	Syntheses of cyclic decapeptides.....	144
I.3.2.	Syntheses of A β fragments.....	148
I.3.3.	Syntheses of models	150
I.4.	Syntheses of inhibitors	152
I.4.1.	Syntheses of cyclic decapeptides.....	152
I.4.2.	Syntheses of ligands	157
I.4.3.	Syntheses of multimeric compounds.....	163
II.	Caractérisation des édifices peptidiques	168
II.1.	Circular dichroism spectroscopy	168
II.2.	Fluorescence measurements	168
II.3.	Congo Red binding	168
II.4.	Transmission electron microscopy	168
II.5.	Molecular modelling	169
III.	Protocole des expériences d'inhibition <i>in vitro</i>	169
III.1.	Preparation of A β ₄₀ peptide stock solution.....	169
III.2.	Preparation of inhibitor stock solutions.....	169
III.3.	Fibril formation measurement of A β ₄₀	169
III.4.	Fibril formation measurement with preformed fibrils	169
III.5.	Fluorescence spectroscopy	170
III.6.	Atomic force microscopy	170
III.7.	Acetylcholinestérase inhibition study.....	170

ANNEXES.....	171
ANNEXE I	173
ANNEXE II.....	187
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	201

Avant-propos

Ce travail a été réalisé sous la direction du Pr. Julian Garcia au sein du laboratoire « Ingénierie et Interactions Biomoléculaires », CNRS UMR 5250, Département de Chimie Moléculaire, Université Joseph Fourier, Grenoble.

Ce travail a donné lieu aux publications suivantes :

Dolphin, G. T., Chierici, S., Ouberai, M., Dumy, P., and Garcia, J. A multimeric Quinacrine conjugate as a potential inhibitor of Alzheimer's β -amyloid fibril formation, *ChemBioChem* **2008**, 9, 952-963.

Dolphin, G. T., Ouberai, M., Dumy, P., and Garcia, J. Designed amyloid β -peptide fibril – A tool for high-throughput screening of fibril inhibitors, *ChemMedChem* **2007**, 2, 1613-1623.

Communications orales à des congrès :

Ouberai, M., Dolphin, G. T., Chierici, S., Deumenynck, M., Dumy, P., and Garcia, J. Design of amyloid fibril models and inhibitors of fibrillogenesis. *Conférence du Groupe Français des Peptides et Protéines (GFPP) sur les Ligations Chimiques*, **26-27 Mars 2008**, Lille, France.

Ouberai, M., Dolphin, G. T., Chierici, S., Deumenynck, M., Dumy, P., and Garcia, J. Alzheimer: Recherche de Molécules Thérapeutiques. *12^{ème} Rencontres en Chimie Organique Biologique (RECOB 12)*, **16-20 Mars 2008**, Aussois, France.

Ouberai, M., Dolphin, G. T., Chierici, S., Deumenynck, M., Dumy, P., and Garcia, J. Alzheimer: Recherche de Molécules Thérapeutiques. *Journée annuelle de l'école doctorale Chimie et Science du Vivant*, **12 Juin 2007**, Grenoble, France.

Communications par poster à des congrès :

Ouberai, M., Dolphin, G. T., Chierici, S., Deumenynck, M., Dumy, P., and Garcia, J. Alzheimer: search of new therapeutic molecules. *3rd Systemic Amyloidoses in Europe - EURAMY meeting. Internal Symposium and meeting on "Systemic Amyloidoses and Related Issues"*, **15-16 Février 2008**, Berlin, Germany.

Ouberai, M., Dolphin, G. T., Chierici, S., Deumenynck, M., Dumy, P., and Garcia, J. "Alzheimer : modèle de fibres amyloïdes, recherche de molécules thérapeutiques". *Journée scientifique cluster chimie Rhône-Alpes "Molécules bioactives : Isolement, Synthèse, Propriétés"*, **26 Avril 2007**, Lyon, France.

Abréviations

A β	Peptide β amyloïde, A β ₄₀ /A β ₄₂
Ac	Acétyl
AChE	Acétylcholinestérase
Acm	Acétamidométhyle
AcOH	Acide acétique
AcOEt	Acétate d'éthyle
AcONa	Acétate de sodium
ADDLs	A β derived diffusible ligands
AFM	Atomic Force Microscopy
APP	Amyloid Precursor Protein
ATC	Acétylthiocholine
Boc	<i>Tertio</i> -butyloxycarbonyl
CD	Circular Dichroism
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
COSY	Correlated spectroscopy
CuAAC	Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition
DCM	Dichlorométhane
Dde	1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidène)éthyle
DIAD	diisopropyl azodicarboxylate
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
Dmab	<i>N,N</i> -diméthyl-éthylènediamine
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTNB	Acide 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoïque)
éq.	Equivalent molaire
ESI	Electrospray Ionisation
EtOAc	Acétate d'éthyle
Et ₂ O	Ether diéthylique
EtOH	Ethanol
Fmoc	9-Fluorénylméthoxyloxycarbonyl
GAGs	Glycosaminoglycanes
HBTU	2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium hexafluorophosphate
IAPP	Islet amyloid polypeptide
IC ₅₀	Concentration inhibant de 50 % un paramètre
IR	Infra-Rouge
MeOH	Méthanol
MET	Microscopy electron transmission
NMP	<i>N</i> -Méthylpyrrolidone
NMDA	<i>N</i> -Méthyl-D-aspartate
NOE	Nuclear overhauser effect
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
PBS	Phosphate Buffer Saline
Pmc	2,2,5,7,8-Pentaméthyl-chromane-6-sulfonyle
ppm	Partie par million
PrP	Prion protein
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate
RAFT	Regioselectively Addressable Functionalized Template
RC/CR	Rouge Congo

RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RP-HPLC	Reverse Phase–High Performance Liquid Chromatography
r.t.	Room temperature
RT	Retention Time
RX	Rayon X
SASRIN	Super Acid Sensitive Resin
SM	Spectrométrie de masse
SPPS	Synthèse peptidique sur phase solide
SS-NMR	Solide state nuclear magnetic resonance
t.a.	Température ambiante
TASP	Template Assembled Synthetic Protein
TBDMS	<i>Tert</i> -butyldiméthylsilyle
<i>t</i> Bu	<i>Tertio</i> -butyl
<i>t</i> BuOH	<i>Tert</i> -butanol
TFA	Acide trifluoroacétique
TFE	Acide trifluoroéthanol
THF	Tétrahydrofurane
ThT	Thioflavine T
TIS	Triisopropylsilane
TOCSY	Total correlated spectroscopy
TNBS	Acide trinitrobenzènesulfonique
t_r	Temps de rétention
TRIS	<i>Tris</i> (hydroxyméthyl)aminométhane
Trt	Triphénylméthyl (ou trityl)
TTR	Transthyréine
UV	Ultraviolet

Listes des acides aminés naturels

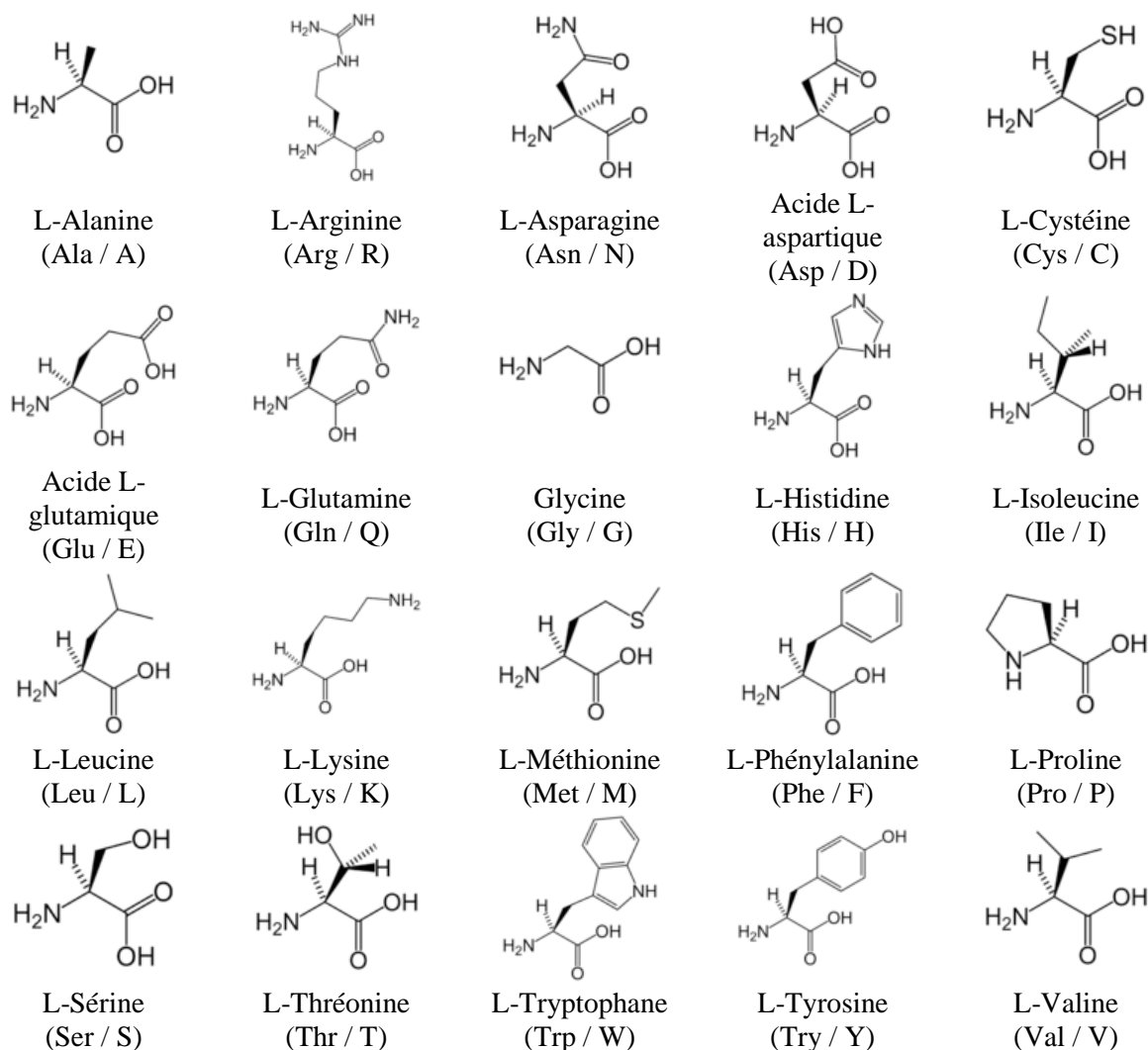


Figure I : Structures des 20 acides aminés naturels (codes à trois et une lettres).¹

Le code à une lettre utilise une lettre majuscule pour les acides aminés de la série naturelle de configuration L et une lettre minuscule pour les acides aminés non naturels de configuration D.

¹ Vollhardt, K. P. C.; Schore, N. E. Acide aminés, peptides, protéines et acides nucléiques. *Traité de Chimie Organique* ed. De Boeck & Larcier, Paris. **1999**, 1158-1159.

INTRODUCTION

I. Projet de recherche

Le repliement anormal des peptides et protéines conduisant à la formation de dépôts riches en feuillets β croisés est la cause de nombreuses pathologies regroupées sous le terme d'amyloses. Les protéines amyloïdes responsables de ces pathologies n'ont pas de relations structurales et fonctionnelles communes. Cependant, lors de leur agrégation en fibres amyloïdes, elles sont à l'origine d'une toxicité dans différents tissus.

La compréhension du phénomène de repliement des peptides et protéines amyloïdes est un vaste domaine de recherche qui n'a pas encore conduit à la caractérisation complète des déterminants biologiques et physico-chimiques de ce processus. C'est pourquoi, la construction de molécules modèles est l'une des approches proposées afin de caractériser le repliement des protéines amyloïdes.

Mes travaux de thèse ont consisté, dans un premier temps, à la synthèse et à la caractérisation de molécules modèles des fibres amyloïdes, **PARTIE A** (Figure 1). Notre approche repose sur la synthèse d'édifices peptidiques basés sur la présentation de fragments du peptide β amyloïde sur un châssis décapeptide cyclique. La formation de fibres amyloïdes par ces édifices a été ensuite caractérisée par différentes études physico-chimiques.

Parmi les stratégies thérapeutiques développées pour combattre les amyloses, la conception d'inhibiteurs de la formation de fibres a été largement étudiée ces dernières années. De nombreuses molécules de structures très diverses ont montré leurs potentiels comme agents thérapeutiques.

La deuxième partie de mes travaux de thèse a consisté à la synthèse d'inhibiteurs de la fibrillogénèse par la présentation de plusieurs molécules sur le châssis moléculaire, **PARTIE B** (Figure 1). Nous avons ensuite réalisé l'étude de l'activité de ces composés sur la formation des fibres du peptide β amyloïde afin de valider l'efficacité de notre approche.

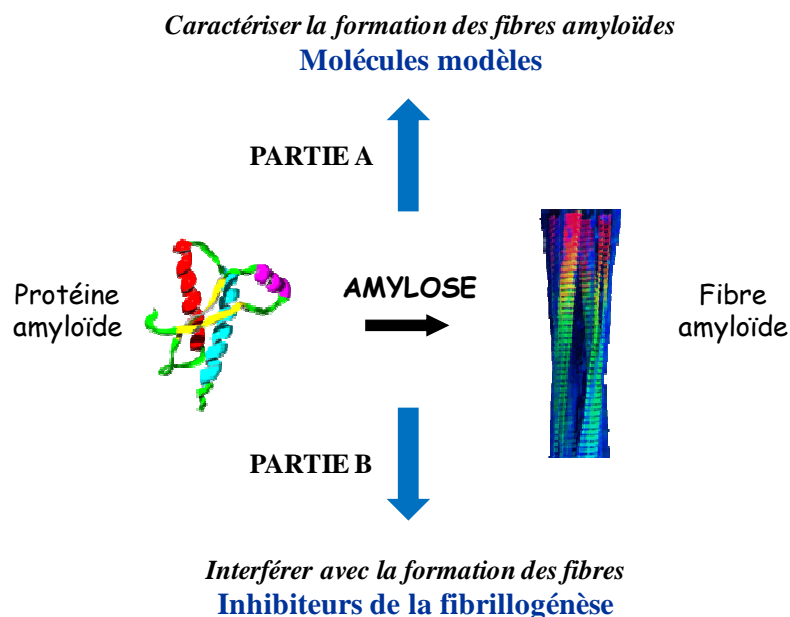


Figure 1 : Schéma illustrant le projet de recherche

II. L'amylose

II.1. Description et caractérisation de l'amylose

L'amylose peut se décrire comme la voie finale commune de l'agrégation pathologique de plus de vingt protéines ou peptides appartenant à des familles dénuées de relations fonctionnelles ou structurales.²

C'est au XIX^{ème} siècle que le terme « amylose » fut créé par Rudolf Virchow mais ce n'est que récemment que l'analyse biochimique a permis de découvrir la diversité des protéines impliquées dans ce processus biologique.² Aujourd'hui, l'amylose ou amyloïdose désigne la lésion histologique ou dépôt amyloïde.

La plupart des amyloses sont associées avec la conversion d'une protéine ou peptide dans son état fonctionnel soluble à un état d'agrégation hautement organisé en fibres. Ces structures sont décrites comme dépôts ou plaques amyloïdes quand elles sont localisées dans le milieu extracellulaire et en termes d'inclusions intracellulaires quand elles se retrouvent dans le milieu intracellulaire.

Les pathologies associées avec la formation de plaques amyloïdes ou d'inclusions intracellulaires peuvent être regroupées en plusieurs catégories en fonction du tissu dans lequel le dépôt est localisé (Tableau 1).

Pathologies	Peptides ou protéines	Nombres de résidus	Structures à l'état natif
Maladies neurodégénératives			
<i>Alzheimer</i>	Peptides β amyloïdes, $A\beta$	40 ou 42	Non structurée
<i>Encéphalopathie spongiforme</i>	Protéine Prion, PrP	253	Partiellement structurée en hélice α
<i>Maladie de Parkinson</i> <i>Démence à corps de Lewy</i>	α -synucléine	140	Non structurée
<i>Maladie de Huntington</i>	Huntingtin polyglutamique	3144	Non structurée
Amyloses non neuropathiques systémiques			
<i>Amylose AL</i>	Chaîne légère de l'immunoglobuline, Ig	~ 90	Feuillet β
<i>Amylose AA</i>	Protéine sérum amyloïde A	76-104	Hélice α
<i>Amylose systémique sénile</i>	Transthyrétine, TTR	127	Feuillet β
<i>Amylose de l'hémodialyse</i>	β 2-microglobuline	99	Feuillet β
<i>Amylose du Lysozyme</i>	Mutant du Lysozyme	130	Hélice α et feuillet β
Amyloses non neuropathiques localisées			
<i>Diabète de type II</i>	Amyline ou polypeptide amyloïde islet, IAPP	37	Non structuré
<i>Amylose au point d'injection</i>	Insuline	21+30	Hélice α

Tableau 1 : Exemples de pathologies humaines associées aux dépôts amyloïdes³

² Grateau, G.; Verine, J.; Delpech, M.; Ries, M. Les amyloses, un modèle de maladie du repliement des protéines. *Med. Sci. (Paris)* **2005**, 21, 627-633.

³ Chiti, F.; Dobson, C. M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* **2006**, 75, 333-366.

On parle de maladies neurodégénératives quand l'agrégation a lieu dans le cerveau, d'amyloses non neuropathiques localisées quand elle se produit dans un seul tissu autre que le cerveau et d'amyloses non neuropathiques systémiques quand elle a lieu dans de multiples tissus. Parmi ces pathologies certaines sont sporadiques, d'autres héréditaires ou transmissibles.³

Les fibres qui constituent les plaques amyloïdes sont caractérisées par trois grandes propriétés physico-chimiques.

- Apparence en microscopie électronique à transmission (MET) et à force atomique (AFM) : les fibres sont rectilignes, non ramifiées et d'environ 10 nm de diamètre.⁴
- Propriétés tinctoriales. Les fibres ont la propriété d'interagir avec certains colorants :
 - avec le Rouge Congo, RC (Figure 2) : déplacement de son maximum d'absorption de 500 nm vers 530-540 nm et apparition d'une biréfringence verte au microscope à lumière polarisée.⁵

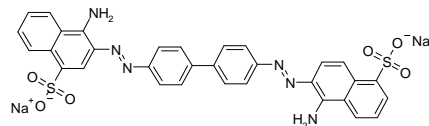


Figure 2 : Structure du Rouge Congo

- avec la Thioflavine T, ThT (Figure 3) : émission de fluorescence à 480 nm après excitation à 440 nm.⁶

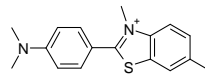


Figure 3 : Structure de la Thioflavine T

Ces composés sont spécifiques des fibres amyloïdes même si leur mode d'interaction n'est pas clairement défini.

- Motif en diffraction des rayons X : les fibres présentent une structure commune de feuillet β croisés colinéaires à l'axe de la fibre.⁷

Les protéines qui forment des fibres amyloïdes de caractéristiques physico-chimiques similaires ne présentent cependant pas d'homologie de séquence, ni de structures tridimensionnelles communes.

⁴ Cohen, A.S.; Shirahama, T.; Skinner, M. Electron Microscopy of Amyloid. In: J. R. Harris, Editor, *Electron Microscopy of Proteins*, Academic Press, New York, **1982**, pp. 165-205.

⁵ Klunk, W. E.; Jacob, R. F.; Mason, R. P. Quantifying amyloid by congo red spectral shift assay. *Methods Enzymol.* **1999**, 309, 285-305. Puchtler, H.; Sweat, F. Congo red as a stain for fluorescence microscopy of amyloid. *J. Histochem. Cytochem.* **1965**, 13, 693-694.

⁶ a) LeVine, H., 3rd. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* **1993**, 2, 404-410. b) LeVine, H., 3rd. Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods Enzymol.* **1999**, 309, 274-284.

⁷ Eanes, E. D.; Glenner, G. G. X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J. Histochem. Cytochem.* **1968**, 16, 673-677.

II.2. Structures des fibres

Pendant de nombreuses années, les seules informations structurales sur les fibres amyloïdes provenaient de techniques comme la microscopie électronique, plus récemment la microscopie à force atomique et la diffraction des rayons X. En effet, la caractérisation de la structure au niveau atomique est complexe car la fibre n'est pas cristallisable et sa solubilité limitée empêche son étude par RMN du liquide à haute résolution. La situation a fortement changé récemment avec les progrès faits en RMN du solide (SS-NMR) ou la formation de cristaux à partir de petits fragments peptidiques.⁸

L'étude par microscopie révèle que les fibres sont généralement constituées de 2 à 6 protofilaments de 2 à 5 nm de diamètre chacun (Figure 4, a)).⁹ Ces protofilaments se torsadent pour former une fibre de 7 à 13 nm d'épaisseur (Figure 4, b)).⁹

Les études par diffraction des rayons X ont montré que dans le protofilament les peptides ou protéines sont organisés de manière à ce que les chaînes polypeptidiques forment des brins β perpendiculaires à l'axe de la fibre (Figure 4, c)).¹⁰

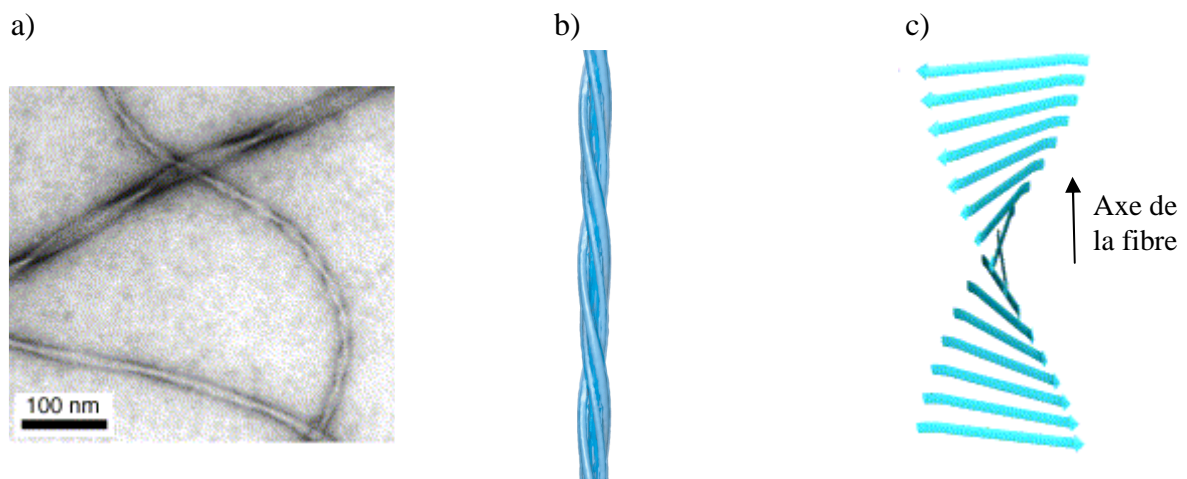


Figure 4 : (a) Image en MET de fibres du peptide β amyloïde¹¹; (b) Représentation d'une fibre amyloïde composé de 4 protofilaments torsadés¹²; (c) Représentation de la structure en feuillet β twisté¹¹

Malgré ces caractéristiques communes, un certain polymorphisme des fibres est souvent observé en microscopie.¹³

⁸ a) Makin, O. S.; Atkins, E.; Sikorski, P.; Johansson, J.; Serpell, L. C. Molecular basis for amyloid fibril formation and stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102, 315-320. b) Nelson, R.; Sawaya, M. R.; Balbirnie, M.; Madsen, A. O.; Riek, C.; Grothe, R.; Eisenberg, D. Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* **2005**, 435, 773-778.

⁹ Serpell, L. C.; Sunde, M.; Benson, M. D.; Tennent, G. A.; Pepys, M. B.; Fraser, P. E. The protofilament substructure of amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.* **2000**, 300, 1033-1039.

¹⁰ Sunde, M.; Blake, C. The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Adv Protein Chem* **1997**, 50, 123-159.

¹¹ Tycko, R. Progress towards a molecular-level structural understanding of amyloid fibrils. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, 14, 96-103.

¹² Makin, O. S.; Serpell, L. C. Structures for amyloid fibrils. *FEBS J.* **2005**, 272, 5950-5961.

¹³ a) Kodali, R.; Wetzel, R. Polymorphism in the intermediates and products of amyloid assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, 17, 48-57. b) Petkova, A. T.; Leapman, R. D.; Guo, Z.; Yau, W. M.; Mattson, M. P.; Tycko, R. Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Science* **2005**, 307, 262-265.

Au niveau moléculaire, l'équipe de Tycko a grandement participé à la détermination de la structure de la fibre du peptide β amyloïde par l'utilisation de la SS-NMR, ainsi que des données de la MET et de la modélisation moléculaire.^{14,15}

Dans cette proposition de structure, chaque peptide $A\beta_{40}$ contribue à former une paire de brins β , perpendiculaires à l'axe de la fibre, composés des résidus 12 à 24 (ruban rouge) et 30 à 40 (ruban bleu) connectés par une boucle formée par les résidus 25 à 29 (Figure 5).

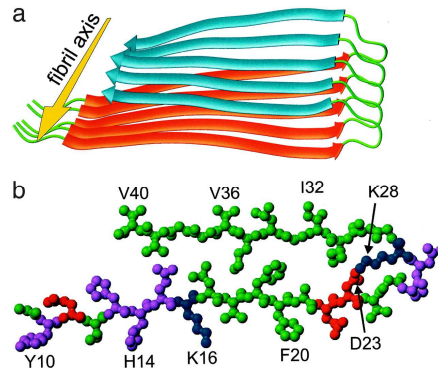


Figure 5 : Modèle structurelle des feuillettes β croisés parallèles formés par le peptide $A\beta_{40}$. (a) modèle ruban ; (b) modèle atomique (vert : hydrophobe ; magenta : polaire ; rouge : chargé négativement ; bleu : chargé positivement)¹⁴

Plusieurs possibilités de contacts entre les chaînes latérales des résidus ont été proposées selon l'orientation des brins β , dont celle représentée dans la figure 5.^{14,15} Les acides aminés D23 et K28 forment un pont salin à l'intérieur de la boucle et les acides aminés L17, F19, A21, I31, M35 et V39 créent un cœur hydrophobe. Les chaînes latérales des résidus A30, I32, L34, V36 et V40 constituent une face hydrophobe (bleu).

Les peptides $A\beta_{40}$ repliés dans cette structure brin β -boucle-brin β s'empilent les uns sur les autres par l'intermédiaire de liaisons hydrogène pour former les feuillettes β croisés parallèles et colinéaires à l'axe de la fibre. L'édifice formé interagit sur lui-même, par la face hydrophobe, selon une symétrie C_{2x} ou C_{2z} , toutes deux probables, pour constituer le protofilament (Figure 6).¹⁵ Les dimensions du protofilament ainsi formé sont en accord avec celles mesurées par microscopie.

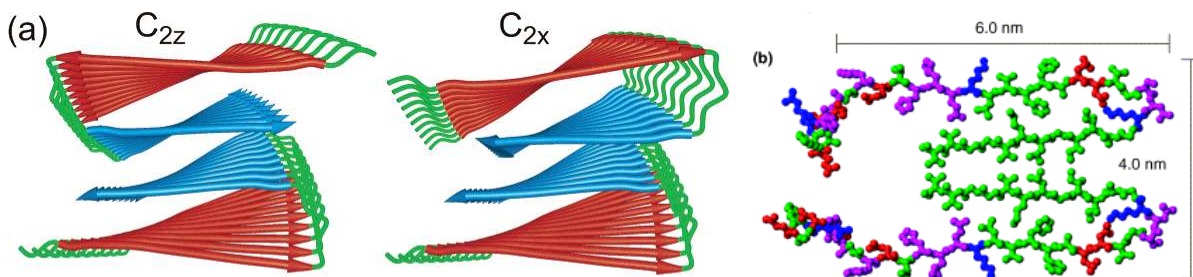


Figure 6 : Modèle structurelle de la fibre amyloïde formé par le peptide $A\beta_{40}$ proposé par Tycko et col.^{14,15} (a) modèle ruban, arrangement des feuillettes β croisés dans une symétrie C_{2z} et C_{2x} ; (b) modèle atomique de la structure C_{2x} (vert : hydrophobe ; magenta : polaire ; rouge : chargé négativement ; bleu : chargé positivement)

¹⁴ Petkova, A. T.; Ishii, Y.; Balbach, J. J.; Antzutkin, O. N.; Leapman, R. D.; Delaglio, F.; Tycko, R. A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, 16742-16747.

¹⁵ Petkova, A. T.; Yau, W. M.; Tycko, R. Experimental constraints on quaternary structure in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Biochemistry* **2006**, 45, 498-512.

Des structures atomiques ont été également proposées pour d'autres protéines amyloïdes, par des études en RMN du solide ou diffraction des rayons X, comme la structure de la partie C-terminale de la protéine du prion,¹⁶ ou de la protéine amyline.¹⁷

II.3. Mécanisme de formation des fibres

Il est largement accepté que la formation des fibres amyloïdes est réalisée selon un mécanisme de type nucléation dépendant « nucleated growth ».¹⁸ Le mécanisme commence par une phase de latence suivie d'une formation rapide des fibres de type exponentiel.

La phase de latence est considérée comme le temps nécessaire à la constitution d'un nucléus ou noyau. Une fois le nucléus formé l'élongation de la fibre s'opère rapidement par l'association de monomères ou d'oligomères à ce noyau. Même si pendant le temps de latence les fibres ne sont pas encore formées, cette étape est considérée comme très importante, de par la formation d'une variété d'oligomères dont des espèces non fibrillaires, riches en feuillets β , appelés protofibres.^{19,20,21}

La diversité des peptides et protéines amyloïdes implique qu'il n'existe pas un mécanisme unique de formation des espèces oligomériques. Ces dernières peuvent se former entre peptides ou protéines non structurées, entre protéines globulaires partiellement structurées ou dans leurs structures natives. La représentation schématique, proposée par Chiti et Dobson, des différentes voies en fonction des états conformationnels des protéines amyloïdes est présentée dans la figure 7.³

Quelque soit l'état conformationnel initial de la protéine, il existe un équilibre entre l'état fonctionnel et la formation d'oligomères, non amyloïdogéniques, qui se structurent ensuite en feuillet β pour former les protofibres. Ces protofibres s'organisent ensuite pour former le protofilament.

¹⁶ Ritter, C.; Maddelein, M. L.; Siemer, A. B.; Luhrs, T.; Ernst, M.; Meier, B. H.; Saupe, S. J.; Riek, R. Correlation of structural elements and infectivity of the HET-s prion. *Nature* **2005**, 435, 844-848.

¹⁷ Kajava, A. V.; Aebi, U.; Steven, A. C. The parallel superpleated beta-structure as a model for amyloid fibrils of human amylin. *J. Mol. Biol.* **2005**, 348, 247-252.

¹⁸ a) Pedersen, J. S.; Christensen, G.; Otzen, D. E. Modulation of S6 fibrillation by unfolding rates and gatekeeper residues. *J. Mol. Biol.* **2004**, 341, 575-588. b) Serio, T. R.; Cashikar, A. G.; Kowal, A. S.; Sawicki, G. J.; Moslehi, J. J.; Serpell, L.; Arnsdorf, M. F.; Lindquist, S. L. Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science* **2000**, 289, 1317-1321.

¹⁹ Harper, J. D.; Wong, S. S.; Lieber, C. M.; Lansbury, P. T. Observation of metastable Abeta amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem. Biol.* **1997**, 4, 119-125.

²⁰ Walsh, D. M.; Lomakin, A.; Benedek, G. B.; Condron, M. M.; Teplow, D. B. Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 22364-22372.

²¹ Walsh, D. M.; Hartley, D. M.; Kusumoto, Y.; Fezoui, Y.; Condron, M. M.; Lomakin, A.; Benedek, G. B.; Selkoe, D. J.; Teplow, D. B. Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 25945-25952.

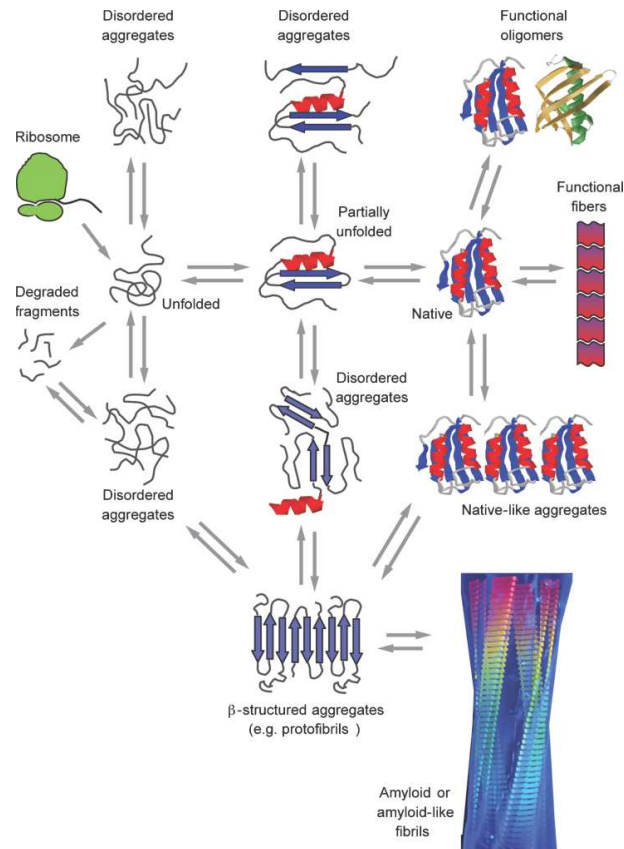


Figure 7 : Représentation schématique des différentes voies de formation des fibres³

Cependant, les mécanismes moléculaires ainsi que les facteurs déterminants à la formation de structures riches en feuillets β ne sont pas clairement connus. Le repliement des peptides et protéines amyloïdes fait l'objet de nombreuses études que nous présenterons plus en détail dans la partie **A**.

Les peptides β amyloïdes, $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$ ($A\beta$), existent sous forme de monomères non structurés en équilibre rapide avec des oligomères solubles.²² Ceux-ci sont composés de 2 à 6 peptides relativement désorganisés et sont les précurseurs des protofibrilles. Les protofibrilles de l' $A\beta$ interagissent avec la ThT et le RC, sont riches en feuillets β et sont sous la forme d'espèces sphériques formées d'environ 20 peptides.^{21,23}

Des espèces oligomériques sphériques riches en feuillets β ont été aussi observées pour d'autres protéines comme l' α -synucléine,²⁴ l'amyline,²³ la transthyréine,²⁵ ou la β 2-microglobuline.²⁶

²² Bitan, G.; Kirkitadze, M. D.; Lomakin, A.; Vollers, S. S.; Benedek, G. B.; Teplow, D. B. Amyloid beta - protein (Abeta) assembly: Abeta 40 and Abeta 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100, 330-335.

²³ Kaye, R.; Sokolov, Y.; Edmonds, B.; McIntire, T. M.; Milton, S. C.; Hall, J. E.; Glabe, C. G. Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 46363-46366.

²⁴ Conway, K. A.; Harper, J. D.; Lansbury, P. T., Jr. Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry* **2000**, 39, 2552-2563.

²⁵ Quintas, A.; Vaz, D. C.; Cardoso, I.; Saraiva, M. J.; Brito, R. M. Tetramer dissociation and monomer partial unfolding precedes protofibril formation in amyloidogenic transthyretin variants. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 27207-27213.

²⁶ Gosal, W. S.; Morten, I. J.; Hewitt, E. W.; Smith, D. A.; Thomson, N. H.; Radford, S. E. Competing pathways determine fibril morphology in the self-assembly of beta2-microglobulin into amyloid. *J. Mol. Biol.* **2005**, 351, 850-864.

II.4. Toxicité des dépôts amyloïdes

II.4.1. Agents toxiques des amyloses

La présence des dépôts amyloïdes dans les tissus les a naturellement désignés comme la cause principale de différentes pathologies. Cette hypothèse a été renforcée par différentes observations comme la toxicité neuronale *in vitro* des peptides A β .^{27,28}

En effet, les dépôts des peptides A β sont responsables d'une dépolarisation membranaire et d'une altération des potentiels d'actions des neurones.²⁹ De plus, l'injection de fibres d'A β dans le cortex cérébral de singes a induit une perte des neurones ainsi qu'une activation microgliale.³⁰

Cependant, il est devenu de plus en plus évident que les espèces responsables de la toxicité ne sont pas les fibres mais les oligomères solubles des peptides A β .^{29,31} Ces intermédiaires solubles non fibrillaires, ADDLs pour A β Derived Diffusible Ligands, ont été caractérisés comme étant les neurotoxines responsables de la mort cellulaire en se liant à la surface des neurones.³²

De même, les espèces non fibrillaires de la transthyréine se sont révélées être toxiques en absence de fibres.³³

La toxicité dans les différents tissus semble donc être la conversion d'une protéine dans son état natif et soluble en des formes oligomériques et fibrillaires. Chiti et Dobson proposent que la toxicité des agrégats pré-fibrillaires résulte de leurs états non structurés.³ En effet, la génération d'une population d'espèces oligomériques dans un état conformationnel non natif conduit à la présentation de groupements à la surface des agrégats ; ces derniers sont habituellement enfouis dans une structure globulaire ou dispersés dans un état non structuré. Cet état conduirait par exemple à une mauvaise interaction avec certains composants cellulaires comme les membranes ou avec certaines protéines qui interviennent dans des processus vitaux pour la cellule.

²⁷ Lorenzo, A.; Yankner, B. A. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, 91, 12243-12247.

²⁸ Pike, C. J.; Walencewicz, A. J.; Glabe, C. G.; Cotman, C. W. In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res.* **1991**, 563, 311-314.

²⁹ Hartley, D. M.; Walsh, D. M.; Ye, C. P.; Diehl, T.; Vasquez, S.; Vassilev, P. M.; Teplow, D. B.; Selkoe, D. J. Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J. Neurosci.* **1999**, 19, 8876-8884.

³⁰ Geula, C.; Wu, C. K.; Saroff, D.; Lorenzo, A.; Yuan, M.; Yankner, B. A. Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. *Nat. Med.* **1998**, 4, 827-831.

³¹ a) Lue, L. F.; Kuo, Y. M.; Roher, A. E.; Brachova, L.; Shen, Y.; Sue, L.; Beach, T.; Kurth, J. H.; Rydel, R. E.; Rogers, J. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **1999**, 155, 853-862. b) McLean, C. A.; Cherny, R. A.; Fraser, F. W.; Fuller, S. J.; Smith, M. J.; Beyreuther, K.; Bush, A. I.; Masters, C. L. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **1999**, 46, 860-866. c) Wang, J.; Dickson, D. W.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp. Neurol.* **1999**, 158, 328-337.

³² Lambert, M. P.; Barlow, A. K.; Chromy, B. A.; Edwards, C.; Freed, R.; Liosatos, M.; Morgan, T. E.; Rozovsky, I.; Trommer, B.; Viola, K. L.; Wals, P.; Zhang, C.; Finch, C. E.; Krafft, G. A.; Klein, W. L. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, 95, 6448-6453.

³³ Sousa, M. M.; Cardoso, I.; Fernandes, R.; Guimaraes, A.; Saraiva, M. J. Deposition of transthyretin in early stages of familial amyloidotic polyneuropathy: evidence for toxicity of nonfibrillar aggregates. *Am. J. Pathol.* **2001**, 159, 1993-2000.

II.4.2. Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une forme de démence qui touche environ 900 000 personnes en France et plus de 150 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année.³⁴ D'ici à 2020, on estime que 30 millions de personnes seront affectées par cette maladie à travers le monde et d'ici à 2050, ce chiffre pourrait bien passer à 45 millions. La maladie peut se présenter sous deux formes, la forme sporadique et la forme héréditaire ; la première touche la population des personnes de plus de 70 ans et la seconde, beaucoup plus rare, se déclare plus précocement vers la quarantaine. Les symptômes de la maladie sont les pertes de mémoire, un esprit de plus en plus confus, des difficultés de jugement, des modifications de la personnalité, une désorientation et une perte des capacités du langage.

C'est le neuropsychiatre Aloïs Alzheimer qui identifia les deux types de lésions caractéristiques de cette maladie : les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires (Figure 8).³⁵

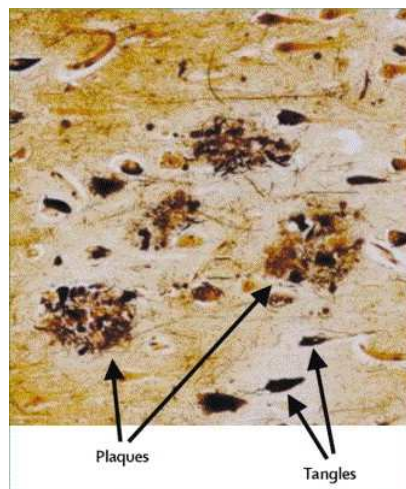


Figure 8 : Coupe d'un cortex cérébral de la maladie d'Alzheimer avec les plaques séniles (plaques) et les dégénérescences neurofibrillaires (tangles)³⁶

Les plaques séniles sont majoritairement constituées des peptides $A\beta$, $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$, produits par la coupure protéolytique de la protéine transmembranaire APP (Amyloid Precursor Protein).³⁷ L'APP est une glycoprotéine exprimée dans de nombreuses cellules dont le gène est situé sur le chromosome 21. Les enzymes responsables de la coupure et impliquées dans la voie amyloïde sont les enzymes β - et γ -sécrétases (Figure 9).³⁸

³⁴ Ligue Européenne Contre la Maladie d'Alzheimer, <http://www.maladiealzheimer.fr/index.htm>

³⁵ Alzheimer, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und phychish-Gerichtliche Medizin, (Berlin)* **1907**, 64, 146-148.

³⁶ Blennow, K.; de Leon, M. J.; Zetterberg, H. Alzheimer's disease. *Lancet* **2006**, 368, 387-403.

³⁷ Hardy, J.; Selkoe, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **2002**, 297, 353-356.

³⁸ Vassar, R.; Bennett, B. D.; Babu-Khan, S.; Kahn, S.; Mendiaz, E. A.; Denis, P.; Teplow, D. B.; Ross, S.; Amarante, P.; Loeloff, R.; Luo, Y.; Fisher, S.; Fuller, J.; Edenson, S.; Lile, J.; Jarosinski, M. A.; Biere, A. L.; Curran, E.; Burgess, T.; Louis, J. C.; Collins, F.; Treanor, J.; Rogers, G.; Citron, M. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **1999**, 286, 735-741.

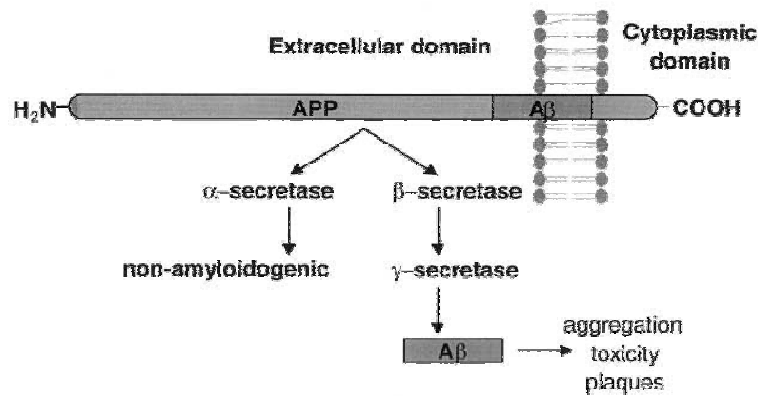


Figure 9 : Processus protéolytique de l'APP par les sécrétases³⁹

La coupure par la γ -sécrétase conduit à la production de plusieurs peptides A β de 39 à 43 résidus. Même si le peptide A β ₄₀ est produit majoritairement, le peptide A β ₄₂ est le composant principal des plaques séniles.⁴⁰

Les dépôts amyloïdes sont systématiquement associés à une variété de macromolécules. En effet, on peut identifier des composantes de la matrice extracellulaire telles que l'ubiquitaire glycoprotéine composant-P amyloïde ainsi que des glycosaminoglycanes (GAGs) et des protéoglycanes. Les GAGs sont un groupe de polysaccharides constitués de la répétition d'unités disaccharidiques tels que les kératanes, dermatanes ou héparanes sulfates. Les protéoglycanes résultent de la liaison covalente entre les chaînes glycosaminoglycanes et une protéine. Les héparanes sulfates protéoglycanes tels que l'agrine, le perlecane et la laminine sont les molécules majoritairement retrouvées dans les plaques amyloïdes. Tout comme les GAGs, elles sont impliquées dans la fibrillogénèse. En effet, il a été montré que le perlecane accélère la formation des fibres du peptide A β et contribue à renforcer sa toxicité.⁴¹ De plus, ces composés se lient aux plaques leur conférant ainsi une résistance à la protéolyse.⁴²

La dégénérescence neuronale serait le résultat du déséquilibre entre la production et la clairance des peptides A β . Celui-ci entraînerait alors une série de processus regroupés sous le terme de cascade amyloïde. Ces processus sont composés entre autre de l'activation microgliales et astrocytaires, de la perturbation de l'homéostasie d'ions et du stress oxydatif.³⁷

En plus des plaques amyloïdes, des dégénérescences neurofibrillaires sont impliquées dans la maladie d'Alzheimer. Les dégénérescences neurofibrillaires sont constituées de la protéine Tau hyperphosphorylée.⁴³ La protéine Tau est une protéine

³⁹ Clippingdale, A. B.; Wade, J. D.; Barrow, C. J. The amyloid-beta peptide and its role in Alzheimer's disease. *J. Pept. Sci.* **2001**, 7, 227-249.

⁴⁰ Iwatsubo, T.; Odaka, A.; Suzuki, N.; Mizusawa, H.; Nukina, N.; Ihara, Y. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* **1994**, 13, 45-53.

⁴¹ Castillo, G. M.; Ngo, C.; Cummings, J.; Wight, T. N.; Snow, A. D. Perlecan binds to the beta-amyloid proteins (A beta) of Alzheimer's disease, accelerates A beta fibril formation, and maintains A beta fibril stability. *J. Neurochem.* **1997**, 69, 2452-2465.

⁴² a) Kisilevsky, R. Proteoglycans, glycosaminoglycans, amyloid-enhancing factor, and amyloid deposition. *J. Intern. Med.* **1992**, 232, 515-516. b) van Horssen, J.; Wesseling, P.; van den Heuvel, L. P.; de Waal, R. M.; Verbeek, M. M. Heparan sulphate proteoglycans in Alzheimer's disease and amyloid-related disorders. *Lancet Neurol.* **2003**, 2, 482-492.

⁴³ Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Tung, Y. C.; Quinlan, M.; Wisniewski, H. M.; Binder, L. I. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, 83, 4913-4917. Nukina, N.; Ihara, Y. One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *J. Biochem.* **1986**, 99, 1541-1544.

axonale qui lie les microtubules afin de favoriser leur assemblage et leur stabilité. L'hyperphosphorylation de la protéine Tau et l'agrégation sous forme de neurofibrilles intracellulaires ont pour conséquence le désassemblage des microtubules qui compromet les fonctions neuronales et synaptiques.⁴⁴ Cependant, l'implication de la protéine Tau dans la maladie n'est pas clairement identifiée.

II.4.3. Stratégies thérapeutiques

A ce jour, il n'existe aucun traitement guérissant la maladie d'Alzheimer, ni même permettant d'arrêter son évolution. Les médicaments actuellement commercialisés permettent d'atténuer les symptômes et sont principalement composés d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase et d'antagonistes du récepteur *N*-méthyl-D-aspartate (NMDA).⁴⁵

Le premier traitement atténue les troubles cognitifs ainsi que ceux de la mémoire par augmentation de la transmission cholinergique. Son but est de combattre les effets de la dégénérescence des neurones cholinergiques dans l'hippocampe et le néocortex. L'augmentation de la disponibilité du neurotransmetteur acétylcholine est réalisée par inhibition de l'enzyme de dégradation dans l'espace synaptique, l'acétylcholinestérase. Les inhibiteurs d'acétylcholinestérase commercialisés sont le donepezil, la rivastigmine et la galanthamine.

Le glutamate, neurotransmetteur, et son récepteur NMDA jouent un rôle important dans les processus d'apprentissage et de mémoire. Dans la maladie d'Alzheimer, une activité excessive des récepteurs glutaminergiques NMDA entraîne une destruction des cellules nerveuses.⁴⁶ La memantine est un antagoniste non compétitif du récepteur qui freine l'excitation glutaminergique et induit un effet neuroprotecteur.⁴⁷

Les traitements symptomatiques présentés précédemment n'interviennent pas directement dans la cascade amyloïde. Afin d'interférer avec cette voie, une seconde stratégie thérapeutique consiste à développer des médicaments qui empêchent la production ou l'agrégation du peptide A β ou qui éliminent les dépôts amyloïdes.

Une première approche consiste donc à développer des inhibiteurs des enzymes de coupures de la protéine APP, β - et γ -sécrétases. L'inhibition de la β -sécrétase réduit significativement la quantité de peptides A β dans le cerveau de souris transgéniques.⁴⁸ De même, des inhibiteurs de la γ -sécrétase ont été développés et une molécule est actuellement

⁴⁴ Iqbal, K.; Alonso Adel, C.; Chen, S.; Chohan, M. O.; El-Akkad, E.; Gong, C. X.; Khatoon, S.; Li, B.; Liu, F.; Rahman, A.; Tanimukai, H.; Grundke-Iqbal, I. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1739, 198-210.

⁴⁵ Lleo, A.; Greenberg, S. M.; Growdon, J. H. Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Med.* **2006**, 57, 513-533.

⁴⁶ Michaelis, E. K. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. Neurobiol.* **1998**, 54, 369-415.

⁴⁷ Areosa, S. A.; Sherriff, F.; McShane, R. Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev.* **2005**, CD003154.

⁴⁸ Chang, W. P.; Koelsch, G.; Wong, S.; Downs, D.; Da, H.; Weerasena, V.; Gordon, B.; Devasamudram, T.; Bilcer, G.; Ghosh, A. K.; Tang, J. In vivo inhibition of A β production by memapsin 2 (beta-secretase) inhibitors. *J. Neurochem.* **2004**, 89, 1409-1416.

en étude clinique.⁴⁹ Enfin, une autre approche réside dans la stimulation de la voie non amyloïde, qui vise à augmenter l'activité normale de l' α -sécrétase afin d'éviter la production du peptide A β .⁵⁰

Une seconde approche vise à détruire les plaques amyloïdes par l'immunothérapie. Cette approche a été développée après l'observation que des anticorps monoclonaux dirigés contre le peptide A β_{42} inhibent non seulement son agrégation *in vitro* mais peuvent aussi solubiliser les dépôts amyloïdes.⁵¹ L'effet est attribué à l'interaction des anticorps avec les fibres qui induirait une clairance par activation microgliale.⁵² Le vaccin AN1792 composé d'agrégats de peptides A β_{42} a été ainsi étudié par des essais cliniques. Cependant, ces essais ont dû être arrêtés en phase II à cause du développement de cas d'encéphalite.⁵³ De nouveaux vaccins composés de fragments N-terminaux de peptides A β ont ensuite été conçus et sont actuellement en étude clinique.⁵⁴

Enfin, une troisième approche consiste à l'élaboration de molécules qui interfèrent avec le processus de formation de fibres. La conception d'inhibiteurs de la fibrillogénèse est l'un des sujets de ces travaux et va être développée plus en détails dans la partie **B**.

⁴⁹ Siemers, E.; Skinner, M.; Dean, R. A.; Gonzales, C.; Satterwhite, J.; Farlow, M.; Ness, D.; May, P. C. Safety, tolerability, and changes in amyloid beta concentrations after administration of a gamma-secretase inhibitor in volunteers. *Clin. Neuropharmacol.* **2005**, 28, 126-132.

⁵⁰ Etcheberrigaray, R.; Tan, M.; Dewachter, I.; Kuiperi, C.; Van der Auwera, I.; Wera, S.; Qiao, L.; Bank, B.; Nelson, T. J.; Kozikowski, A. P.; Van Leuven, F.; Alkon, D. L. Therapeutic effects of PKC activators in Alzheimer's disease transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101, 11141-11146.

⁵¹ Solomon, B.; Koppel, R.; Hanan, E.; Katzav, T. Monoclonal antibodies inhibit in vitro fibrillar aggregation of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 93, 452-455.

⁵² Schenk, D.; Hagen, M.; Seubert, P. Current progress in beta-amyloid immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* **2004**, 16, 599-606.

⁵³ Orgogozo, J. M.; Gilman, S.; Dartigues, J. F.; Laurent, B.; Puel, M.; Kirby, L. C.; Jouanny, P.; Dubois, B.; Eisner, L.; Flitman, S.; Michel, B. F.; Boada, M.; Frank, A.; Hock, C. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* **2003**, 61, 46-54.

⁵⁴ Schenk, D.; Hagen, M.; Seubert, P. Current progress in beta-amyloid immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* **2004**, 16, 599-606.

PARTIE A

A. Modèles de fibres amyloïdes

Dans certaines conditions encore mal connues, des peptides et protéines solubles se replient en feuillets β croisés et s'assemblent pour former des fibres. Les protéines, précurseurs de fibres amyloïdes, ne présentent pas de tailles, de séquences ou de structures tridimensionnelles communes alors que les fibres matures ont de nombreuses analogies en termes de structure secondaire, de morphologie et d'interaction avec certains colorants. Cependant, du fait de la rapidité du phénomène et de la solubilité limitée des fibres, nous ne disposons pas à l'heure actuelle de données structurales à haute résolution. De plus, les interactions mises en jeu dans le repliement ne sont pas clairement définies.

Afin de déterminer les principes physico-chimiques sous-jacents au repliement et à l'assemblage en fibre, des molécules modèles de fibres amyloïdes ont été développées. Les approches pour construire ces modèles se basent, entre autre, sur des études du repliement de fragments peptidiques ou en fonctions de mutations de la séquence ou utilisent enfin la conception *de novo* et les systèmes peptidiques « switch » et « coiled coil ».

Nous allons dans le paragraphe suivant donner quelques exemples de molécules modèles utilisées pour étudier le repliement des protéines amyloïdes. Puis, nous présenterons la synthèse des molécules modèles de fibres amyloïdes que nous avons développées ainsi que leurs caractérisations par différentes techniques physico-chimiques et modélisation moléculaire.

A.1. Molécules modèles de fibres amyloïdes

A.1.1. Fragments peptidiques

Parmi les peptides et protéines amyloïdes, le peptide β amyloïde est l'un des plus étudiés du fait du nombre relativement peu élevé de résidus (40 à 42) et de son implication dans la maladie d'Alzheimer. Les premiers travaux ont cherché à définir la longueur minimale du peptide nécessaire à la formation de fibres ainsi que les conditions d'agrégations.

En 1987, les travaux de Gorevic et al. ont permis d'identifier le fragment $A\beta_{19-28}$ comme la séquence minimale que doit conserver le peptide $A\beta$ pour la formation de fibres amyloïdes.⁵⁵ Ce fragment présente les mêmes caractéristiques en microscopie électronique ainsi qu'en diffraction des rayons X que le peptide natif. La partie centrale du peptide $A\beta$ est alors désigné comme élément crucial pour la formation de fibres.

Par la suite, la longueur de la partie C-terminale a été étudiée ainsi que l'influence de différents facteurs comme la variation du pH.⁵⁶ Les fragments $A\beta_{1-28}$ à $A\beta_{1-42}$ forment des fibres et sont insolubles à pH acide (3,5-6,5). Les peptides les plus longs, $A\beta_{1-42}$ à $A\beta_{1-52}$, sont quant à eux insolubles à la fois à pH acide et à pH physiologique. La partie C-terminale du peptide $A\beta$ joue un rôle dans la solubilité et dans le processus d'agrégations.

⁵⁵ Gorevic, P. D.; Castano, E. M.; Sarma, R.; Frangione, B. Ten to fourteen residue peptides of Alzheimer's disease protein are sufficient for amyloid fibril formation and its characteristic x-ray diffraction pattern. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, 147, 854-862.

⁵⁶ Burdick, D.; Soreghan, B.; Kwon, M.; Kosmoski, J.; Knauer, M.; Henschen, A.; Yates, J.; Cotman, C.; Glabe, C. Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 546-554.

L'implication de la partie *N*-terminale du peptide A β sur la cinétique de formation des fibres a été également étudiée.⁵⁷ En effet, il est montré que si les 17 premiers acides aminés de cette région sont éliminés, la formation de fibres est amplifiée.

D'après les travaux de Tjernberg et al., les résidus 16 à 20, KLVFF, sont nécessaires à l'interaction entre les peptides A β .⁵⁸ Des études par modélisation moléculaire montre que l'interaction entre ces résidus et la région homologue (A β ₁₇₋₂₁ et/ou A β ₁₈₋₂₂) se fait via la formation d'un feuillet β antiparallèle. Cependant, ce pentapeptide seul ne permet pas la formation de fibres.

Par la suite, la même équipe a montré que le peptide A β ₁₄₋₂₃ est le plus petit fragment nécessaire à la formation des fibres.⁵⁹ Par modélisation moléculaire, les résidus chargés forment des paires d'ions (ponts salins entre His-Asp et Glu-Lys) et les résidus hydrophobes de cette région constituent un cœur hydrophobe qui stabilise le feuillet β antiparallèle. Les interactions électrostatiques, hydrophobes et π stacking sont désignées comme essentielles à la formation des fibres puisque des tétrapeptides tels que KFFE et KVVE forment des fibres.⁶⁰

Enfin, les travaux de Yankner et al., indiquent que le fragment 25-35 du peptide A β possède les mêmes effets neurotrophique et neurotoxique que le peptide natif.⁶¹ Les parties *N*- et *C*-terminales de ce fragment sont nécessaires à la formation de fibres et à la neurotoxicité.⁶²

Dans le cas du polypeptide amyline humain, hIAPP (37 résidus), le segment impliqué dans la reconnaissance moléculaire est le fragment hIAPP₁₁₋₂₀ et les pentapeptides hIAPP₁₄₋₁₈, NFVLH, et hIAPP₁₅₋₁₉ FLVHS sont les plus petits segments capables de former des fibres.⁶³ La présence des résidus aromatiques dans ces séquences met en évidence, une fois de plus, l'importance des interactions π stacking dans la formation de fibres. Cependant, différentes morphologies des fibres sont observées entre les fragments hIAPP₂₃₋₂₇ FGAIL et hIAPP₂₂₋₂₇ NFGAIL.⁶⁴

Les différents fragments structurés en feuillet β de la protéine β 2-microglobuline (99 résidus) ont été étudiés pour leur propension à former des fibres.⁶⁵ Parmi eux, deux fragments forment des fibres dont le peptide de séquence 59 à 71, DWSFYLLYYTEFT. Les auteurs

⁵⁷ Pike, C. J.; Overman, M. J.; Cotman, C. W. Amino-terminal deletions enhance aggregation of beta-amyloid peptides in vitro. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 23895-23898.

⁵⁸ a) Tjernberg, L. O.; Naslund, J.; Lindqvist, F.; Johansson, J.; Karlstrom, A. R.; Thyberg, J.; Terenius, L.; Nordstedt, C. Arrest of beta-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 8545-8548. b) Tjernberg, L. O.; Lilliehook, C.; Callaway, D. J.; Naslund, J.; Hahne, S.; Thyberg, J.; Terenius, L.; Nordstedt, C. Controlling amyloid beta-peptide fibril formation with protease-stable ligands. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 12601-12605.

⁵⁹ Tjernberg, L. O.; Callaway, D. J.; Tjernberg, A.; Hahne, S.; Lilliehook, C.; Terenius, L.; Thyberg, J.; Nordstedt, C. A molecular model of Alzheimer amyloid beta-peptide fibril formation. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 12619-12625.

⁶⁰ Tjernberg, L.; Hosia, W.; Bark, N.; Thyberg, J.; Johansson, J. Charge attraction and beta propensity are necessary for amyloid fibril formation from tetrapeptides. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 43243-43246.

⁶¹ Yankner, B. A.; Duffy, L. K.; Kirschner, D. A. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* **1990**, 250, 279-282.

⁶² Pike, C. J.; Walencewicz-Wasserman, A. J.; Kosmoski, J.; Cribbs, D. H.; Glabe, C. G.; Cotman, C. W. Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J. Neurochem.* **1995**, 64, 253-265.

⁶³ Mazar, Y.; Gilead, S.; Benhar, I.; Gazit, E. Identification and characterization of a novel molecular-recognition and self-assembly domain within the islet amyloid polypeptide. *J. Mol. Biol.* **2002**, 322, 1013-1024.

⁶⁴ Tenidis, K.; Waldner, M.; Bernhagen, J.; Fischle, W.; Bergmann, M.; Weber, M.; Merkle, M. L.; Voelter, W.; Brunner, H.; Kapurniotu, A. Identification of a penta- and hexapeptide of islet amyloid polypeptide (IAPP) with amyloidogenic and cytotoxic properties. *J. Mol. Biol.* **2000**, 295, 1055-1071.

⁶⁵ Jones, S.; Manning, J.; Kad, N. M.; Radford, S. E. Amyloid-forming peptides from beta2-microglobulin-Insights into the mechanism of fibril formation in vitro. *J. Mol. Biol.* **2003**, 325, 249-257.

concluent que les nombreux résidus aromatiques de la séquence ainsi que des interactions électrostatiques sont des éléments déterminants pour l'assemblage en fibres.

A.1.2. Mutagenèse dirigée

Dans le but de déterminer le rôle des acides aminés dans le repliement et dans la formation des fibres de nombreuses études de mutagenèse dirigée ont été réalisées.

Lors de ces études, il a été montré que la partie centrale hydrophobe du peptide A β est déterminante dans le processus de repliement et d'agrégation.

La mutation systématique de tous les résidus des peptides A β ₁₂₋₂₆ et A β ₁₅₋₂₃ par une proline désigne le fragment 17-23 (LVFFAED) comme le cœur central hydrophobe du peptide A β .⁶⁶ En effet, les mutations de cette séquence ont pour effet une diminution de la formation de fibres et une augmentation de la solubilité. Le résidu proline ne permettant pas la formation de liaisons hydrogène, ces résidus sont donc impliqués dans le cœur nécessaire à la formation du feuillet β . Par contre, la mutation par une alanine des résidus L17, V18 et F20 n'a aucun effet sur la formation des fibres contrairement à la mutation du résidu F19.

De même, la mutation des résidus hydrophobes du fragment A β ₁₀₋₄₃ par des résidus hydrophiles diminue la fibrillogénèse.⁶⁷

D'après les travaux de Esler et al., le fragment A β ₁₀₋₃₅-NH₂ forme des fibres similaires au peptide natif.⁶⁸ La mutation F19T de ce fragment empêche la formation de fibres due principalement aux modifications de la nature stérique et de la polarité de la chaîne latérale.

Les résidus de la partie hydrophobe du peptide A β , A β ₃₀₋₃₆, sont également essentiels pour la formation des fibres.

En effet, la mutation des résidus I31 et I32 du fragment A β ₂₅₋₃₅ réduit l'agrégation ainsi que la mutation du résidu M35 par les résidus leucine, lysine ou tyrosine.⁶² L'amidation en position C-terminale du peptide A β ₂₅₋₃₅ empêche la formation du feuillet β et des fibres.⁶⁹ La partie C-terminale participe, selon les auteurs, à une interaction électrostatique avec le résidu K28 qui stabilise le feuillet β .

L'étude du peptide A β ₄₀ montre que la mutation des résidus G33L34M35 par V33A34A35 diminue l'agrégation ainsi que la mutation de M35 par les résidus Glu, Gln, Ser ou Leu.⁷⁰ Par contre la mutation du résidu M35 par une méthionine oxydée n'a pas d'effet sur l'agrégation. Dans une autre étude, l'effet inverse est montré, l'oxydation du résidu M35 en M35^{ox} réduit significativement la formation des fibres amyloïdes.⁷¹

L'équipe de Wetzel suggère que les parties N- et C-terminales du peptide A β ₄₀, A β ₁₋₁₄ et A β ₃₇₋₄₀, sont peu impliquées dans le repliement du peptide A β et sont relativement

⁶⁶ Wood, S. J.; Wetzel, R.; Martin, J. D.; Hurler, M. R. Prolines and amyloidogenicity in fragments of the Alzheimer's peptide beta/A4. *Biochemistry* **1995**, 34, 724-730.

⁶⁷ Hilbich, C.; Kisters-Woike, B.; Reed, J.; Masters, C. L.; Beyreuther, K. Substitutions of hydrophobic amino acids reduce the amyloidogenicity of Alzheimer's disease beta A4 peptides. *J. Mol. Biol.* **1992**, 228, 460-473.

⁶⁸ Esler, W. P.; Stimson, E. R.; Ghilardi, J. R.; Lu, Y. A.; Felix, A. M.; Vinters, H. V.; Mantyh, P. W.; Lee, J. P.; Maggio, J. E. Point substitution in the central hydrophobic cluster of a human beta-amyloid congener disrupts peptide folding and abolishes plaque competence. *Biochemistry* **1996**, 35, 13914-13921.

⁶⁹ Terzi, E.; Holzemann, G.; Seelig, J. Reversible random coil-beta-sheet transition of the Alzheimer beta-amyloid fragment (25-35). *Biochemistry* **1994**, 33, 1345-1350.

⁷⁰ Dobeli, H.; Draeger, N.; Huber, G.; Jakob, P.; Schmidt, D.; Seilheimer, B.; Stuber, D.; Wipf, B.; Zulauf, M. A biotechnological method provides access to aggregation competent monomeric Alzheimer's 1-42 residue amyloid peptide. *Biotechnology (N Y)* **1995**, 13, 988-993.

⁷¹ Hou, L.; Kang, I.; Marchant, R. E.; Zagorski, M. G. Methionine 35 oxidation reduces fibril assembly of the amyloid abeta-(1-42) peptide of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 40173-40176.

flexibles.⁷² Par contre les séquences A β ₁₅₋₂₁, QKLVFF, A β ₂₄₋₂₈, VGSNK, et A β ₃₁₋₃₆, IIGLMV, sont très sensibles à la mutation par une proline confirmant ainsi leur rôle dans la formation du feuillet β . Ces résidus font partie du cœur hautement structuré en brin β -boucle-brin β du peptide lorsqu'il est sous forme de fibres (Figure 10).⁷² Par ailleurs, il a été montré que les derniers résidus de la partie C-terminale sont plus impliqués dans la cinétique de fibrillogénèse plutôt que dans la stabilité des fibres.⁷³



Figure 10 : Modèle du protofilament du peptide A β ₄₀ proposée par l'équipe de Wetzel⁷²

D'après le modèle de repliement proposé, le peptide β amyloïde doit subir une inversion d'orientation des chaînes latérales de manière à ce que la séquence du cœur forme les feuillets β croisés par interaction entre les peptides. Cependant, les contacts entre les chaînes latérales et leurs orientations nécessitent d'être établis. Pour cela, une étude par mutagenèse dirigée a été réalisée ensuite avec un résidu cystéine.⁷⁴ Le peptide A β contenant un pont disulfure entre les deux brins β du même peptide (Leu17Cys/Leu34Cys) s'assemble en fibres dans une morphologie similaire au peptide natif. Il est déduit de cette étude que les chaînes latérales des résidus L17 et L34 interagissent ensemble à l'intérieure du cœur hydrophobe (Figure 11).

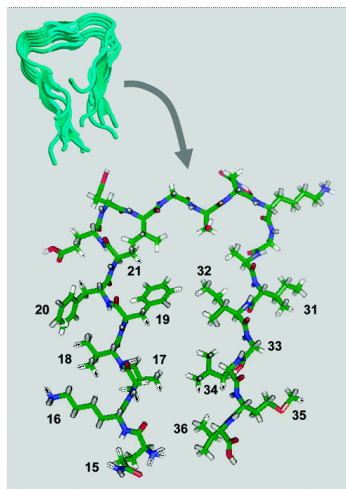


Figure 11 : Modélisation moléculaire du peptide A β ₁₅₋₃₆⁷⁴

⁷² Williams, A. D.; Portelius, E.; Kheterpal, I.; Guo, J. T.; Cook, K. D.; Xu, Y.; Wetzel, R. Mapping abeta amyloid fibril secondary structure using scanning proline mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **2004**, 335, 833-842.

⁷³ Jarrett, J. T.; Berger, E. P.; Lansbury, P. T., Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **1993**, 32, 4693-4697.

⁷⁴ Shivaprasad, S.; Wetzel, R. An intersheet packing interaction in A beta fibrils mapped by disulfide cross-linking. *Biochemistry* **2004**, 43, 15310-15317.

L'équipe de Wetzel a ensuite étudié la mutation de résidus du peptide $A\beta_{40}$ par un résidu cystéine afin de déterminer l'orientation des chaînes latérales.⁷⁵ La cystéine est utilisée, par le biais de son site d'alkylation, pour étudier l'accessibilité des chaînes latérales dans la fibre. Cette étude confirme la flexibilité de la partie *N*-terminale et la rigidité des régions 16-21 et 31-36. Un modèle d'interactions entre les chaînes latérales de la structure brin β -boucle-brin β est proposé pour lequel les résidus 20 et 35 sont projetés à l'extérieur de la boucle et les résidus 17 et 34 à l'intérieure (Figure 12).

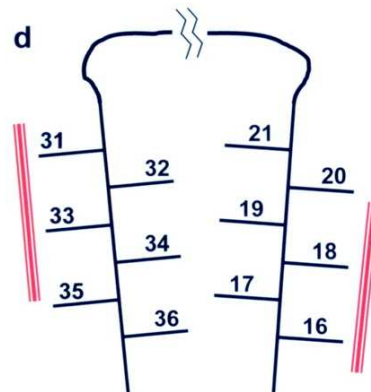


Figure 12 : Modèle schématique des interactions entre les chaînes latérales du peptide $A\beta_{40}$ ⁷⁵

D'autre part, la formation de liaisons hydrogène par le fragment $A\beta_{16-20}$ est cruciale à la formation des fibres. En effet, lorsque la liaison peptidique est remplacé alternativement par une liaison ester, la formation de fibres n'a pas lieu.⁷⁶

Dans le but d'étudier la spécificité de la formation de fibres, des études sur des stéréoisomères du peptide $A\beta$, L- $A\beta$ et D- $A\beta$, ont été réalisées.⁷⁷ L'association du peptide soluble de configuration L ou D sur des fibres formées par les peptides L- $A\beta$ ou D- $A\beta$ est stéréosélective. Les interactions spécifiques entre le squelette peptidique et entre les chaînes latérales sont, d'après les auteurs, aussi importantes que les interactions hydrophobes.

Des études sur d'autres peptides et protéines amyloïdes ont été également réalisées pour déterminer la relation entre les résidus de la séquence et le repliement.

La mutation Ala/Phe dans le fragment NFGAILSS du peptide amyline montre une réduction de la formation de fibres.⁷⁸ Le résidu phénylalanine par l'interaction π stacking qu'il induit joue un rôle déterminant dans le processus de formation des fibres.

La mutation de fragments du polypeptide amyline humain montre que la substitution du résidu phénylalanine par une leucine n'a pas d'effet sur le processus de formation des fibres alors que la mutation par une alanine ralentit le processus.⁷⁹ Ce résultat indique que la taille, l'hydrophobicité et la propension d'un résidu à former un feuillet β sont des facteurs plus importants que les interactions aromatiques. Par ailleurs, le mutant F15L/F23L/Y37L du

⁷⁵ Shivaprasad, S.; Wetzel, R. Scanning cysteine mutagenesis analysis of Abeta-(1-40) amyloid fibrils. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 993-1000.

⁷⁶ Gordon, D. J.; Meredith, S. C. Probing the role of backbone hydrogen bonding in beta-amyloid fibrils with inhibitor peptides containing ester bonds at alternate positions. *Biochemistry* **2003**, 42, 475-485.

⁷⁷ Esler, W. P.; Stimson, E. R.; Fishman, J. B.; Ghilardi, J. R.; Vinters, H. V.; Mantyh, P. W.; Maggio, J. E. Stereochemical specificity of Alzheimer's disease beta-peptide assembly. *Biopolymers* **1999**, 49, 505-514.

⁷⁸ Azriel, R.; Gazit, E. Analysis of the minimal amyloid-forming fragment of the islet amyloid polypeptide. An experimental support for the key role of the phenylalanine residue in amyloid formation. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 34156-34161.

⁷⁹ Tracz, S. M.; Abedini, A.; Driscoll, M.; Raleigh, D. P. Role of aromatic interactions in amyloid formation by peptides derived from human Amylin. *Biochemistry* **2004**, 43, 15901-15908.

peptide amyline a été évalué sur sa capacité à former des fibres amyloïdes.⁸⁰ Le peptide muté forme des fibres similaires au peptide natif mais la vitesse de fibrillogénèse est ralentie. Ces travaux montrent que si les résidus aromatiques ne sont pas absolument nécessaires pour la formation de fibres, ils jouent tout de même un rôle déterminant notamment sur la cinétique de formation.

A.1.3. Solubiliser la protéine amyloïde et conception *de novo*

La rapidité d'agrégation et la solubilité limitée des peptides et protéines amyloïdes ont conduit à l'étude du processus de repliement de fragments hydrosolubles. L'approche décrite par l'équipe de Oliveberg, consiste à l'introduction des résidus 29 à 42 de la partie C-terminale du peptide β amyloïde dans une protéine ribosomale S6 (101 résidus).⁸¹ La construction du modèle repose sur l'homologie entre la séquence de l'A β et de la protéine ribosomale ainsi que la présence d'une région structurée en deux brins β séparés par une boucle dans la protéine. Le mutant, S6-Alz, forme un complexe soluble, tétramère, lorsqu'il est replié en feuillet β .

Ce mutant caractérisé par rayons X, s'assemble en tétramère par formation de feuillet β intermoléculaires antiparallèles mettant en jeu les résidus du peptide A β (Figure 13). De plus, ce complexe lie la thioflavine T et le rouge congo et forme des fibres caractérisées par microscopie électronique.

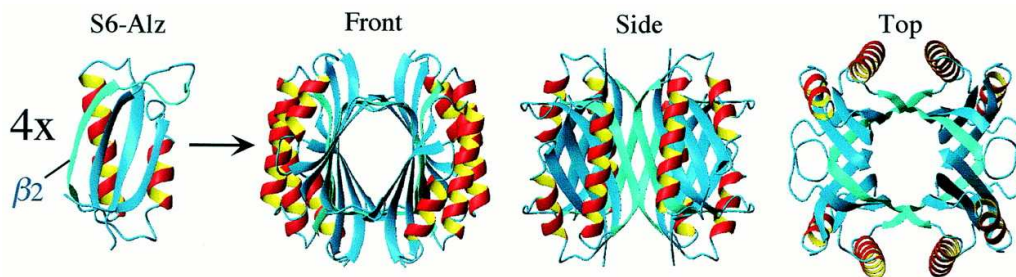


Figure 13 : Structure du tétramère S6-Alz⁸¹

Ces résultats confirment que la partie C-terminale du peptide A β est importante dans le repliement en feuillet β grâce à la création d'interactions hydrophobes.

La conception *de novo* pour construire des molécules modèles de fibres est apparue du fait de la grande diversité de séquences des peptides et protéines amyloïdes. En effet, elle s'est développée après le constat que la répétition alternée de deux résidus, un hydrophobe, leucine, et l'autre hydrophile, lysine, dans une séquence permet au peptide de replier en feuillet β .⁸² La périodicité de résidus polaires et apolaires est alors désignée comme aussi déterminante dans la structuration secondaire des peptides que les propriétés intrinsèques des acides aminés.⁸³

⁸⁰ Marek, P.; Abedini, A.; Song, B.; Kanungo, M.; Johnson, M. E.; Gupta, R.; Zaman, W.; Wong, S. S.; Raleigh, D. P. Aromatic interactions are not required for amyloid fibril formation by islet amyloid polypeptide but do influence the rate of fibril formation and fibril morphology. *Biochemistry* **2007**, 46, 3255-3261.

⁸¹ Otzen, D. E.; Kristensen, O.; Oliveberg, M. Designed protein tetramer zipped together with a hydrophobic Alzheimer homology: a structural clue to amyloid assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97, 9907-9912.

⁸² Brack, A.; Orgel, L. E. Beta structures of alternating polypeptides and their possible prebiotic significance. *Nature* **1975**, 256, 383-387.

⁸³ Xiong, H.; Buckwalter, B. L.; Shieh, H. M.; Hecht, M. H. Periodicity of polar and nonpolar amino acids is the major determinant of secondary structure in self-assembling oligomeric peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, 92, 6349-6353.

fibres et les conditions expérimentales nécessaires au repliement et à la formation d'un feuillet β .⁸⁶

Le peptidomimétique est constitué de deux segments peptidiques composés des résidus Val et Thr alternés, séparés par un gabarit dibenzofurane pour pré-organiser le peptide en deux brins β (peptidomimétique 1, Figure 16). Les résidus Val et Thr sont introduit pour leur forte propension à former un feuillet β , et la Thr pour augmenter la solubilité des structures en solution. Un groupement *N,N*-diméthyl-éthylènediamine (dmda) est introduit en position C-terminale afin d'augmenter la solubilité de l'assemblage dans une large gamme de pH (jusqu'à pH 10).

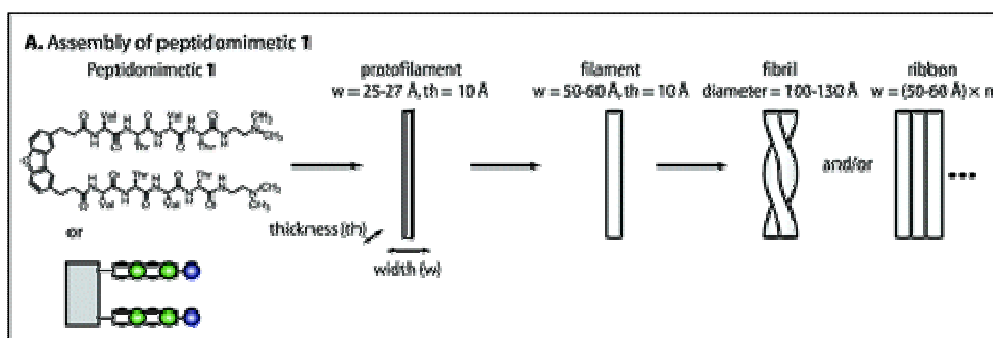


Figure 16 : Schéma du peptidomimétique⁸⁷

Le peptidomimétique s'assemble en structures quaternaires polymorphes riches en feuillets β tels que des protofilaments, des fibres et des rubans.

L'étude de la formation du feuillet β par dichroïsme circulaire (CD) est réalisée en fonction du pH et de la force ionique. Dans la gamme de pH 3-6, après 24 heures, le peptide ne se structure pas. L'ajout de NaCl, permet la formation du feuillet β ainsi que l'augmentation du pH à 7. Lorsque l'étude est réalisée au même pH, pH 5,7, en faisant varier la nature du tampon, il y a formation du feuillet β dans le tampon phosphate et non dans le tampon acétate.

De plus, une différence dans la morphologie des structures est observée selon le pH d'incubation. A pH 4,8 des fibres composées de deux filaments sont observées et à pH 5,7 des rubans. A pH ≥ 7 des structures hétérogènes sont observées dont des structures en forme de "baguettes".

D'après les auteurs, les différents comportements sont dus principalement aux variations du pH et à la force ionique. En effet, la neutralisation de la charge du groupement ammonium du dmda est à l'origine de la formation des différentes structures.

Enfin, il est observé qu'en fonction du temps et des conditions expérimentales, la population des différentes structures varie.

Deux modèles de repliement et de formation des fibres sont proposés (Figure 17).⁸⁷

⁸⁶ Lashuel, H. A.; LaBrenz, S. R.; Woo, L.; Serpell, L. C.; Kelly, J. W. Protofilaments, filaments, ribbons, and fibrils from peptidomimetic self-assembly: implications for amyloid fibril formation and materials science. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5262-5277.

⁸⁷ Deechongkit, S.; Powers, E. T.; You, S. L.; Kelly, J. W. Controlling the morphology of cross beta-sheet assemblies by rational design. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 8562-8570.

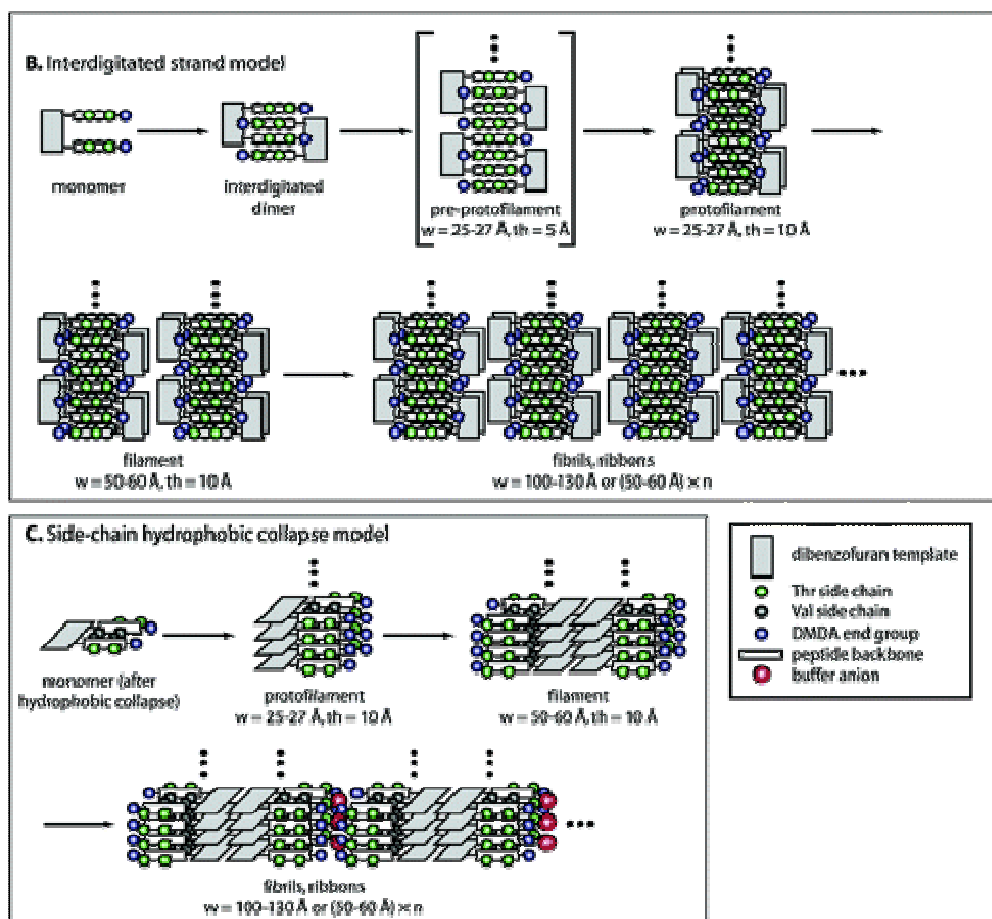


Figure 17 : Modèles de repliement du peptidomimétique⁸⁷

Le premier modèle (Interdigitated strand model, Figure 17) consiste à la création de liaisons hydrogène intermoléculaires entre deux peptidomimétique (dimère) formant quatre brins β . L'association des dimères conduit à la formation de pré-protofilaments stabilisés par liaisons hydrogène. Les chaînes latérales des résidus, perpendiculaires au feuillet β , créent une face hydrophile et une face hydrophobe. Deux pré-protofilaments s'associent par leur face hydrophobe pour former le protofilament qui s'organise ensuite en filament.

Le deuxième modèle (Side-chain hydrophobic collapse model, Figure 17) consiste en la formation d'interactions hydrophobes intramolécules, cœur hydrophobe, qui stabilisent la structure. Les liaisons hydrogène intermoléculaires parallèles à l'axe de la fibre conduisent à l'élongation du protofilament. Les filaments sont formés par les interactions entre les cycles dibenzofuranes des protofilaments et la fibre par l'association des filaments.

Dans le premier modèle, les liaisons hydrogène sont à l'origine de la formation de fibres et stabilisent la structure alors que dans le deuxième modèle se sont les interactions hydrophobes. La synthèse d'analogues modifiés par la nature du gabarit liant les deux peptides et par la nature des acides aminés suggère que le deuxième modèle correspond le mieux aux différents comportements des peptidomimétique.⁸⁷ La formation des fibres semble guidée par les interactions hydrophobes intramolécules qui s'empilent dans la structure brin β -boucle-brin β .

A.1.4. Peptides « switch » et « coiled coil »

Les approches que nous allons décrire dans ce paragraphe consiste à utiliser des peptides modèles pour lesquels la transition vers une forme amyloïdogénique est induite par la variation de certaines conditions de pH, de température ou en fonction de la nature des ions.

Le premier système, décrit par l'équipe de Mutter, consiste à l'incorporation de « switch » moléculaires dans une séquence peptidique pour contrôler les transitions conformationnelles et l'auto-assemblage des peptides.⁸⁸ Ce concept nommé, *in situ nascendi* (ISN), décrit l'état structural dans lequel se trouve le peptide au départ de la transition conformationnel. Un polypeptide, nommé peptide « switch », assemblé par synthèse chimique, est composé d'un peptide cible, P, d'un élément « switch », S, et d'une unité d'induction conformationnelle, σ (Figure 18). L'élément σ est inducteur d'un changement conformationnel vers des structures en hélice α ou feuillet β .

Les éléments « switch », S, sont composés d'unité de depsipeptide ou de pseudoproline. Ces éléments par un changement de pH ou par un processus enzymatique conduisent à une migration X \rightarrow N acétyle pour former une liaison peptidique entre l'unité σ et le peptide cible P (Figure 18).

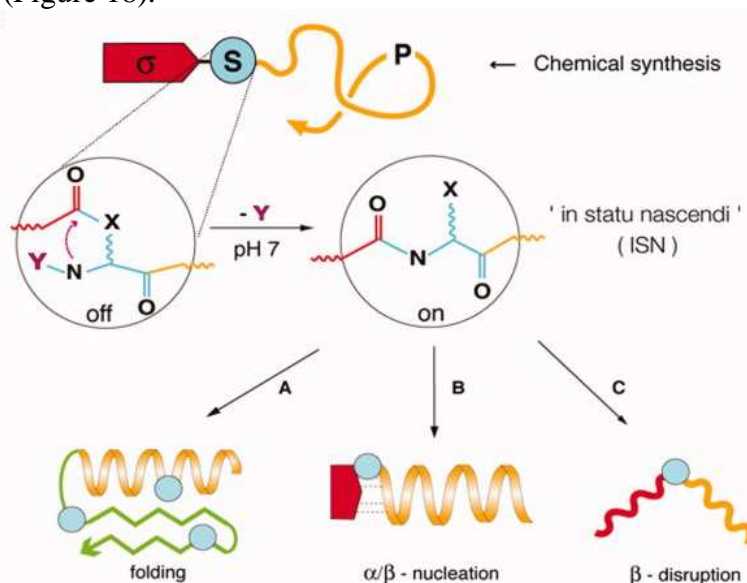


Figure 18 : Transitions conformationnelles induites par le concept de *in situ nascendi*⁸⁸

La formation de cette liaison permet le passage d'un état généralement non structuré, S_{off} à un état replié, S_{on} . Cette approche permet d'identifier les sites impliqués dans le changement conformationnel (A), de déclencher de manière contrôlée la nucléation (B), ou de perturber une structure secondaire ou tertiaire (C).

La perturbation d'une structure amyloïde a été réalisée avec un élément inducteur d'hélice α lié à la séquence du peptide $A\beta_{14-25}$.⁸⁹ En effet, le passage à l'état S_{on} conduit à la déstabilisation des structures riches en feuillets β de cette séquence.

⁸⁸ Tuchscherer, G.; Chandravarkar, A.; Camus, M. S.; Berard, J.; Murat, K.; Schmid, A.; Mimna, R.; Lashuel, H. A.; Mutter, M. Switch-peptides as folding precursors in self-assembling peptides and amyloid fibrillogenesis. *Biopolymers* **2007**, 88, 239-252.

⁸⁹ Mimna, R.; Camus, M. S.; Schmid, A.; Tuchscherer, G.; Lashuel, H. A.; Mutter, M. Disruption of amyloid-derived peptide assemblies through the controlled induction of a beta-sheet to alpha-helix transformation: application of the switch concept. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2007**, 46, 2681-2684.

Le deuxième système permet l'étude des changements conformationnels de peptides « α helical coiled coil », ⁹⁰ selon les séquences et les conditions expérimentales. Les protéines et peptides « coiled coil » consistent en des chaînes peptidiques structurées en hélices α qui interagissent entre elles par le biais d'interactions hydrophobes et électrostatiques. La séquence primaire de chaque hélice est caractérisée par une périodicité de 7 résidus, notés (a-b-c-d-e-f-g)_n (Figure 19). Les acides aminés sont organisés de manière à créer une zone d'interactions hydrophobes (a et d, résidus jaunes) et des interactions électrostatiques (e et g, résidus rouges) entre deux hélices α . Les résidus b, c et f sont des résidus polaires.

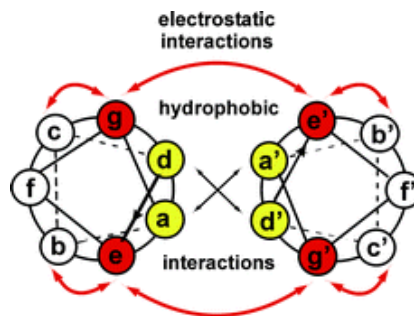


Figure 19 : Représentation d'un dimère α -helical coiled coil⁹¹

Selon cette approche, la transition conformationnelle vers la formation de fibres amyloïdes d'un peptide structuré en hélice α a été étudiée par l'équipe de Kammerer.⁹² Le peptide, cc β , est composé de 17 acides aminés avec une alternance de résidus hydrophobes et hydrophiles en mode binaire. Le peptide, cc β , change de conformation en fonction de la température. En effet, à 37°C le peptide après un temps de latence se replie en feuillet β . Des fibres, formées de filaments de 50 à 80 Å de diamètre, sont observées en microscopie électronique. Les auteurs montrent que la cinétique de formation de fibres est sensible à la fois à la température mais aussi à la force ionique.

L'introduction de résidus méthionines, dans la séquence du peptide, n'affecte pas la formation de fibres et a pour conséquence une accélération de la cinétique.⁹³ Par contre, dans le cas où la méthionine est oxydée, il n'y a pas de formation de fibres. Ainsi, d'après les auteurs, certaines interactions hydrophobes sont particulièrement déterminantes à la formation de fibres. De plus, ils indiquent que de nombreux facteurs influencent la formation de fibres comme la barrière cinétique entre les états dissociés et oligomériques, la propension des résidus à former une structure secondaire en feuillet β et particulièrement l'hydrophobicité et la charge de la séquence.

Un autre modèle développé par Pagel et al. consiste, de même, en un peptide de 26 acides aminés organisés dans une conformation en hélice α .⁹⁴ L'introduction de résidus histidines dans la séquence a permis une étude de la transition vers la formation de fibres

⁹⁰ Mason, J. M.; Arndt, K. M. Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem* **2004**, 5, 170-176.

⁹¹ Pagel, K.; Vagt, T.; Kokschi, B. Directing the secondary structure of polypeptides at will: from helices to amyloids and back again? *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 3843-3850.

⁹² Kammerer, R. A.; Kostrewa, D.; Zurdo, J.; Detken, A.; Garcia-Echeverria, C.; Green, J. D.; Muller, S. A.; Meier, B. H.; Winkler, F. K.; Dobson, C. M.; Steinmetz, M. O. Exploring amyloid formation by a de novo design. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101, 4435-4440.

⁹³ Steinmetz, M. O.; Gattin, Z.; Verel, R.; Ciani, B.; Stromer, T.; Green, J. M.; Tittmann, P.; Schulze-Briese, C.; Gross, H.; van Gunsteren, W. F.; Meier, B. H.; Serpell, L. C.; Muller, S. A.; Kammerer, R. A. Atomic models of de novo designed cc beta-Met amyloid-like fibrils. *J. Mol. Biol.* **2008**, 376, 898-912.

⁹⁴ Pagel, K.; Vagt, T.; Kohajda, T.; Kokschi, B. From alpha-helix to beta-sheet--a reversible metal ion induced peptide secondary structure switch. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 2500-2502.

amyloïdes en fonction des métaux de transitions comme Zn^{2+} et Cu^{2+} .⁹⁵ Selon l'ion et la position des résidus histidines dans la séquence, la formation des fibres est favorisée ou inhibée. Ces résultats montrent que les métaux de transitions et la position de leur coordination dans la séquence du peptide peuvent influencer fortement le repliement.

⁹⁵ Pagel, K.; Seri, T.; von Berlepsch, H.; Griebel, J.; Kirmse, R.; Bottcher, C.; Koksche, B. How metal ions affect amyloid formation: Cu^{2+} - and Zn^{2+} -sensitive peptides. *Chembiochem* **2008**, 9, 531-536.

A.2. Conception de molécules modèles de fibres amyloïdes

Nous avons pu voir que différentes approches ont été utilisées pour comprendre le mécanisme d'assemblage et les déterminants moléculaires à l'origine du processus de la formation des fibres. D'après les études précédentes, il a été démontré que les interactions hydrophobes entre les peptides amyloïdes jouent un rôle de premier plan. Le peptide β amyloïde se replie dans la structure brin β -boucle-brin β dans laquelle les deux parties hydrophobes $A\beta_{15-21}$ et $A\beta_{31-36}$ sont essentielles. On sait également qu'une association par des interactions hydrophobes entre quatre brins β est nécessaire à la fibrillogénèse d'après la structure proposée par Tycko (paragraphe II.2, Figure 6).¹⁴

Nous nous sommes appuyés sur ces résultats pour développer des molécules modèles de fibres amyloïdes. Notre approche consiste à la synthèse d'édifices peptidiques qui sont composés de fragments du peptide $A\beta$ liés à un châssis moléculaire.

Le châssis moléculaire utilisé est un décapeptide cyclique ou gabarit RAFT (Regioselectively Addressable Functionalized Template) développé à la fin des années 1980 sous le nom de TASP (Template Assembled Synthetic Protein) par l'équipe de Mutter.⁹⁶ Ce châssis est utilisé pour la construction de systèmes moléculaires capables de mimer les propriétés fonctionnelles des protéines. L'introduction de résidus lysines dans la séquence a permis, par la suite, de fonctionnaliser régiosélectivement le gabarit.⁹⁷

Depuis une trentaine d'années, ce châssis moléculaire permet la conception d'architectures multivalentes⁹⁸ pour diverses applications^{99,100} telles que des vecteurs pour la thérapie anticancéreuse et l'imagerie tumorale,^{101,102} des vaccins synthétiques anti-tumoraux,¹⁰³ ou des structures modèles mimant des protéines d'intérêts comme les canaux ioniques,¹⁰⁴ ou le CMH de classe I.¹⁰⁵

La séquence du décapeptide cyclique $c[-\text{Pro-Gly-Lys-Lys-Lys-}]_2$ est inspirée de celle de la Gramicidine S, antibiotique de structure cyclodécapeptidique symétrique : $c[-\text{DPhe-Pro-}$

⁹⁶ a) Mutter, M.; Altmann, K. H.; Tuchscherer, G.; Vuilleumier, S. Strategies for the de novo design of proteins. *Tetrahedron* **1988**, 44, 771-85. b) Dumy, P.; Favrot, M.-C.; Boturn, D.; Coll, J.-L. Synthesis and characterization of novel systems for guidance and vectorization of compounds having a therapeutic activity. Brevet PCT/FR2003/002773 WO 2004/02894, 19 septembre 2003.

⁹⁷ Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Cervigni, S.; Sila, U.; Sun, X.; Mutter, M. A convenient synthesis of cyclic peptides as regioselectively addressable functionalized templates (RAFT). *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 1255-1258.

⁹⁸ Garanger, E.; Boturn, D.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. Chemoselectively addressable template: a valuable tool for the engineering of molecular conjugates. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 2402-2410.

⁹⁹ Singh, Y.; Dolphin, G. T.; Razkin, J.; Dumy, P. Synthetic Peptide templates for molecular recognition: recent advances and applications. *Chembiochem* **2006**, 7, 1298-1314.

¹⁰⁰ Boturn, D.; Defrancq, E.; Dolphin, G. T.; Garcia, J.; Labbe, P.; Renaudet, O.; Dumy, P. RAFT Nano-constructs: surfing to biological applications. *J. Pept. Sci.* **2008**, 14, 224-240.

¹⁰¹ Boturn, D.; Coll, J. L.; Garanger, E.; Favrot, M. C.; Dumy, P. Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 5730-5739.

¹⁰² Foillard S. Synthèse de nouveaux vecteurs peptidiques pour la thérapie anticancéreuse et l'imagerie tumorale. 200 p. Thèse : *Chimie-biologie* Université Joseph Fourier, **2008**.

¹⁰³ Grigalevicius, S.; Chierici, S.; Renaudet, O.; Lo-Man, R.; Deriaud, E.; Leclerc, C.; Dumy, P. Chemoselective assembly and immunological evaluation of multiepitopic glycoconjugates bearing clustered Tn antigen as synthetic anticancer vaccines. *Bioconjug Chem* **2005**, 16, 1149-1159.

¹⁰⁴ Futaki, S. Peptide ion channels: design and creation of function. *Biopolymers* **1998**, 47, 75-81.

¹⁰⁵ Tuchscherer, G.; Servis, C.; Corradin, G.; Blum, U.; Rivier, J.; Mutter, M. Total chemical synthesis, characterization, and immunological properties of an MHC class I model using the TASP concept for protein de novo design. *Protein Sci.* **1992**, 1, 1377-1386.

Val-Orn-Leu-]₂.⁹⁷ Des études par RMN et RX ont montré que le cyclodécapeptide est composé d'un feuillet β antiparallèle reliés par deux coudes –Pro-Gly- (coudes de type II) qui stabilise la conformation du cyclodécapeptide en solution (Figure 20).¹⁰⁶

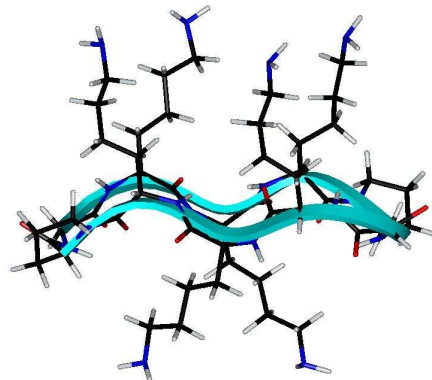


Figure 20 : Modélisation moléculaire du décapeptide cyclique

De par la mobilité conformationnelle réduite du cyclodécapeptide, les chaînes latérales des six résidus lysines de la partie centrale se trouvent orientées de part et d'autre du plan moyen du cycle. Les quatre résidus lysines au voisinage des deux coudes ont leurs chaînes latérales qui s'orientent du même côté du plan moyen du cycle tandis que les deux résidus lysines centraux ont leurs chaînes latérales qui s'orientent vers le côté opposé.

Les études par diffraction des rayons X ont permis d'accéder aux paramètres de taille du gabarit avec environ 10 Å de long et 5 à 6 Å de large.¹⁰⁶ La distance qui sépare les atomes des chaînes latérales des résidus centraux sont compris entre 4 et 12 Å. Ces distances donnent un ordre de grandeur du degré de liberté réduit des chaînes latérales.

Le châssis moléculaire présente deux faces fonctionnalisables de manière indépendante avec jusqu'à six sites d'ancrage de molécules par la présentation des fonctions amines des chaînes latérales de résidus lysines (ϵNH_2). La ligation des différentes molécules est réalisée au moyen de groupes protecteurs orthogonaux de la fonction amine. Il est possible de moduler le nombre de sites d'ancrage sur chacune des deux faces en remplaçant les résidus lysines par d'autres résidus tels que des alanines ou arginines.

De par ces propriétés, nous avons utilisé le cyclodécapeptide pour présenter dans une espace restreint et selon une orientation définie des peptides amyloïdes. En effet, la pré-organisation des fragments peptidiques dans l'espace et l'augmentation de la concentration locale favorisera le repliement et la formation de fibres.

Le fragment amyloïde choisi correspond à la séquence $\text{A}\beta_{16-37}$ car il contient, comme nous l'avons vu précédemment, les résidus fortement impliqués dans la formation du feuillet β croisé (Figure 21). Les résidus de ce fragment sont majoritairement hydrophobes et la charge totale du peptide $\text{A}\beta_{16-37}$ à pH = 6,5-7 est nulle (pI calculé en ligne sur le site <http://isoelectric.ovh.org>). Afin d'augmenter la solubilité et de limiter les phénomènes d'agrégations incontrôlés, trois mutations ont été introduites dans la séquence pour obtenir une charge globale nette positive. Nous avons remplacé Glu22 et Val24 par des résidus

¹⁰⁶ a) Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Esposito, G.; Nicula, S.; Mutter, M. Solution structure of regioselectively addressable functionalized templates: an NMR and restrained molecular dynamics investigation. *Biopolymers* **1996**, 39, 297-308. b) Peluso, S.; Ruckle, T.; Lehmann, C.; Mutter, M.; Peggion, C.; Crisma, M. Crystal structure of a synthetic cyclodecapeptide for template-assembled synthetic protein design. *ChemBiochem* **2001**, 2, 432-437. c) Peng, Z. H. Solid phase synthesis and NMR conformational studies on cyclic decapeptide template molecule. *Biopolymers* **1999**, 49, 565-574.

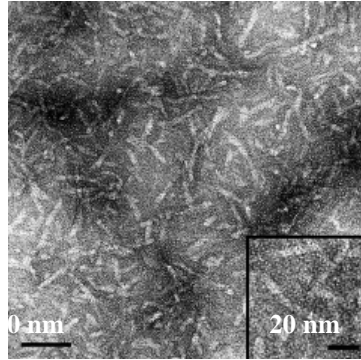


Figure 23 : Microscopie électronique des protofilaments de l'édifice ($A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24}$)₄¹⁰⁷

La modélisation moléculaire montre que l'édifice constitue la coupe transversale du protofilament (Figure 24). Chaque fragment du peptide amyloïde se replie en boucle de type brin β -boucle-brin β (respectivement rubans bleu, vert et rouge) et forme un feuillet β croisé parallèle avec un autre fragment replié colinéaire au protofilament. Les dimensions de l'édifice correspondent alors à celles des protofilaments observés en microscopie électronique. Lors du repliement, les chaînes latérales des résidus lysines créent une face hydrophile (bleu) et les résidus hydrophobes forment un cœur hydrophobe (rouge). Nous donnerons plus de détails sur la modélisation de la structure de l'assemblage dans le paragraphe A.5.2.

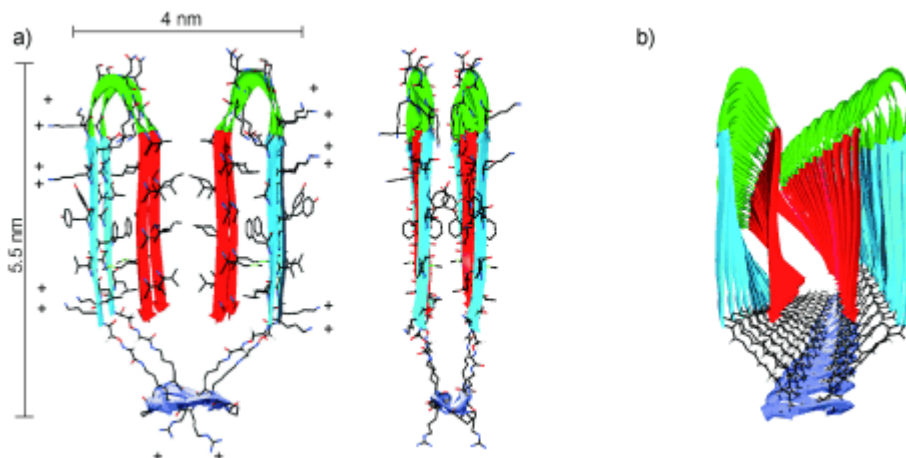


Figure 24 : Modélisation moléculaire de l'assemblage ($A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24}$)₄; a) vue selon la coupe transversale et selon l'axe du protofilament ; b) structure du protofilament¹⁰⁷

L'édifice ($A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24}$)₄ lors de son auto-assemblage présente ainsi toutes les caractéristiques physico-chimiques des fibres amyloïdes. De plus, le repliement de l'édifice est initié dès l'ajout de tampon phosphate pH 7,1 sans temps de latence contrairement au peptide β amyloïde natif. L'augmentation de la concentration en phosphate augmente la vitesse de formation de fibres. Par contre, l'ajout de tampon TRIS pH 7,1 ne conduit pas au repliement de l'édifice.

A partir de ces résultats, il nous a paru nécessaire de préciser deux points importants :

- Quel est le rôle exact joué par la boucle ? La formation du feuillet β croisé passe-t-elle nécessairement par le repliement en boucle ?

A.3. Stratégie de synthèse des édifices peptidiques

Les structures des quatre édifices synthétisés sont présentées en figure 26. Les deux premiers composés **19** et **21**, ($A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24}$)₄, consistent en deux ou quatre peptides linéaires, $A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24}$, liés au cyclodécapeptide par lien éther d'oxime. Dans le cadre de ces travaux, nous avons utilisé le composé **21** qui a été précédemment synthétisé au laboratoire et sa synthèse est décrite dans les travaux de Dolphin et al.¹⁰⁷

Les composés **18** et **20** consistent en deux ou quatre peptides cyclisés par pont disulfure, $GGC(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})C$, liés au cyclodécapeptide par lien éther d'oxime (C : résidu cystéine impliqué dans un pont disulfure). La cyclisation a été réalisée via un pont disulfure entre deux résidus cystéines positionnés en position N- et C-terminales. Afin de garder une bonne réactivité lors de la formation du lien éther d'oxime deux résidus glycines ont été introduits en position N-terminale comme bras espaceur. Les cyclodécapeptides présentent sur l'autre face des résidus arginines afin de solubiliser les assemblages.

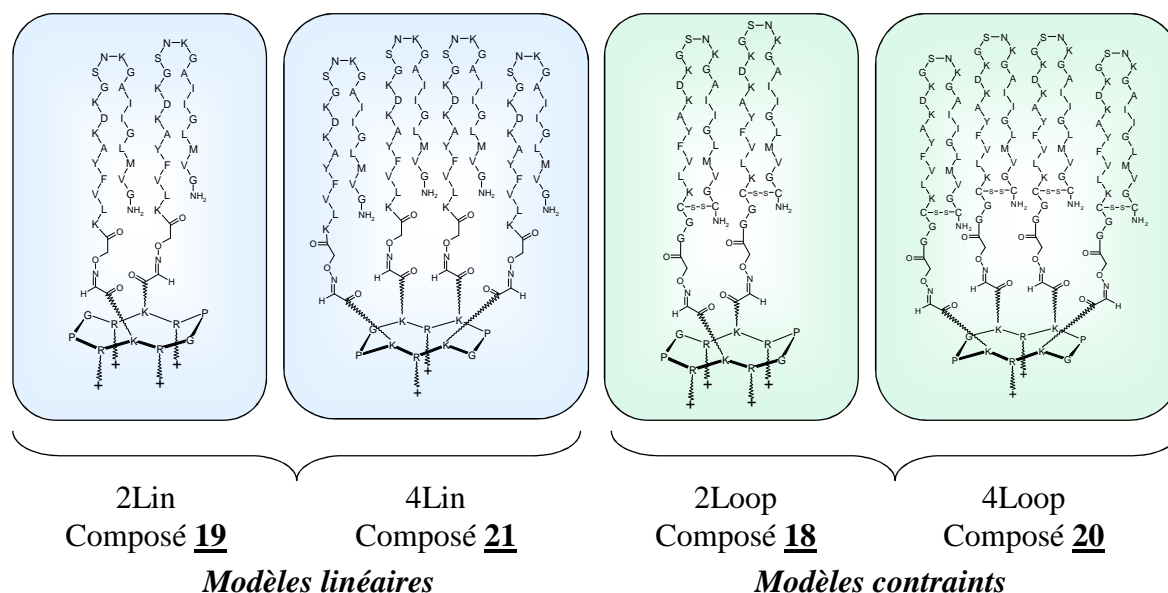


Figure 26 : Schéma des édifices synthétisés

Nous avons ainsi réalisé la construction de tous les édifices par lien éther d'oxime. La formation de ce lien comme les nombreuses méthodes chimiosélectives permettent la conjugaison de diverses biomolécules et la construction de conjugués complexes de hauts poids moléculaires. Les différentes méthodes chimiosélectives comprennent principalement la formation des liaisons disulfures et thioethers, la formation des liaisons éther d'oxime, hydrazones et thiosemicarbazones, les cycloadditions, la ligation native ou la ligation de Staudinger.¹⁰⁸

Ces méthodes reposent sur l'assemblage convergent de fragments polyfonctionnels déprotégés de différentes natures portant l'un et l'autre des fonctions chimiques présentant une réactivité réciproque et spécifique. La formation de la liaison chimiosélective s'opère

¹⁰⁸ a) Langenhan, J. M.; Thorson, J. S. Recent carbohydrate-based chemoselective ligation applications. *Curr. Org. Synth.* **2005**, 2, 59-81. b) Kent, S. Total chemical synthesis of enzymes. *J. Pept. Sci.* **2003**, 9, 574-593, c) Lemieux, G. A.; Bertozzi, C. R. Chemoselective ligation reactions with proteins, oligosaccharides and cells. *Trends Biotechnol.* **1998**, 16, 506-513.

principalement en milieu aqueux sans réactifs de couplage. La ligation de deux synthons déprotégés permet de contourner les problèmes rencontrés lors de synthèses classiques (faible solubilité et purification difficile de fragments protégés) et de simplifier considérablement les stratégies de synthèse.

Parmi les réactions chimiosélectives, nous avons choisi le lien éther d'oxime car il s'avère particulièrement approprié pour l'assemblage des peptides amyloïdes qui sont des séquences très sensibles aux conditions expérimentales. Ainsi nous pourrions manipuler le fragment A β déprotégé et dans des conditions douces.

De plus, il a été largement montré que ce lien offre une bonne chimiosélectivité et a permis la conjugaison de diverses molécules avec une grande efficacité. En effet, la conjugaison par lien oxime a permis la synthèse d'une large gamme de constructions moléculaires telles que des bibliothèques de petites molécules,¹⁰⁹ des peptides cycliques,¹¹⁰ des oligonucléotides cycliques,¹¹¹ des glycopeptides,¹¹² des conjugués peptide-oligonucléotides,¹¹³ des mîmes de surface cellulaire,¹¹⁴ des vecteurs peptidiques pour la cancérologie,^{98,101} des protéines,¹¹⁵ et des conjugués glycopeptide-oligonucléotides.¹¹⁶

Afin de former le lien éther d'oxime les fragments amyloïdes et les cyclodécapeptides ont été fonctionnalisés avec des groupements oxyamines ou aldéhydes glyoxyliques.

Les composés **18** et **19** ont été préparés à partir d'un intermédiaire commun qui est le décapeptide cyclique **6** fonctionnalisé par deux aldéhydes glyoxyliques (Figure 27). Les peptides A β ₁₆₋₃₇Y₂₀K₂₂K₂₄ **17** et GGC(A β ₁₆₋₃₇Y₂₀K₂₂K₂₄)C **16** sont fonctionnalisés par une oxyamine.

¹⁰⁹ Su, S.; Acquilano, D. E.; Arumugasamy, J.; Beeler, A. B.; Eastwood, E. L.; Giguere, J. R.; Lan, P.; Lei, X.; Min, G. K.; Yeager, A. R.; Zhou, Y.; Panek, J. S.; Snyder, J. K.; Schaus, S. E.; Porco, J. A., Jr. Convergent synthesis of a complex oxime library using chemical domain shuffling. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2751-2754.

¹¹⁰ Roberts, K. D.; Lambert, J. N.; Ede, N. J.; Bray, A. M. Preparation of cyclic peptide libraries using intramolecular oxime formation. *J. Pept. Sci.* **2004**, *10*, 659-665.

¹¹¹ Edupuganti, O. P.; Defrancq, E.; Dumy, P. Head-to-tail oxime cyclization of oligodeoxynucleotides for the efficient synthesis of circular DNA analogues. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8708-8710.

¹¹² Hang, H. C.; Bertozzi, C. R. Chemoselective approaches to glycoprotein assembly. *Acc Chem Res* **2001**, *34*, 727-736.

¹¹³ Forget, D.; Boturyn, D.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Dumy, P. Highly efficient synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates: chemoselective oxime and thiazolidine formation. *Chemistry* **2001**, *7*, 3976-3984.

¹¹⁴ Chen, X.; Lee, G. S.; Zettl, A.; Bertozzi, C. R. Biomimetic engineering of carbon nanotubes by using cell surface mucin mimics. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2004**, *43*, 6111-6116.

¹¹⁵ Kochendoerfer, G. G.; Kent, S. B. Chemical protein synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 665-671.

¹¹⁶ Singh, Y.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. Preparation of a multitopic glycopeptide-oligonucleotide conjugate. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1359-1362.

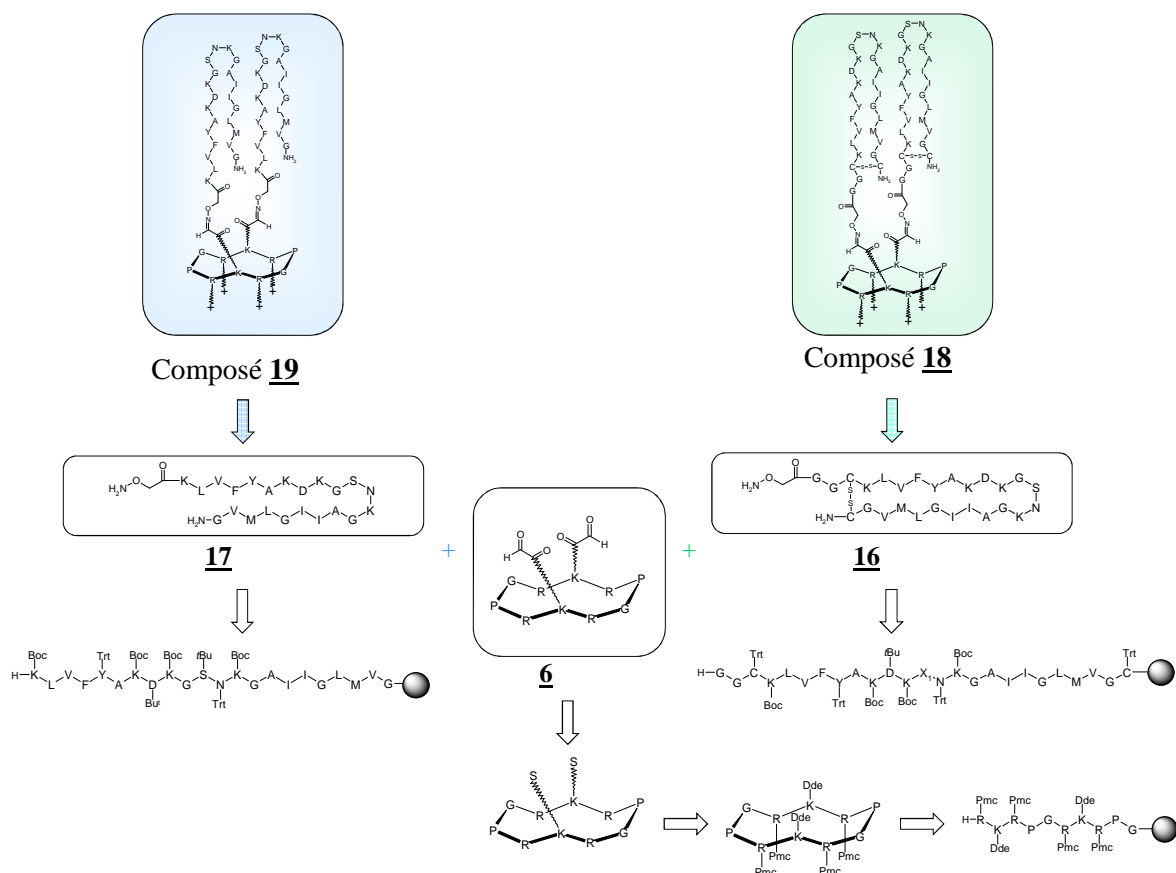


Figure 27 : Schéma rétro-synthétique des composés **18** et **19**

Pour la synthèse du composé **20**, le décapeptide cyclique **11** est fonctionnalisé par quatre aldéhydes glyoxyliques et a été synthétisé selon la même voie de synthèse que le peptide **6** (Figure 28).

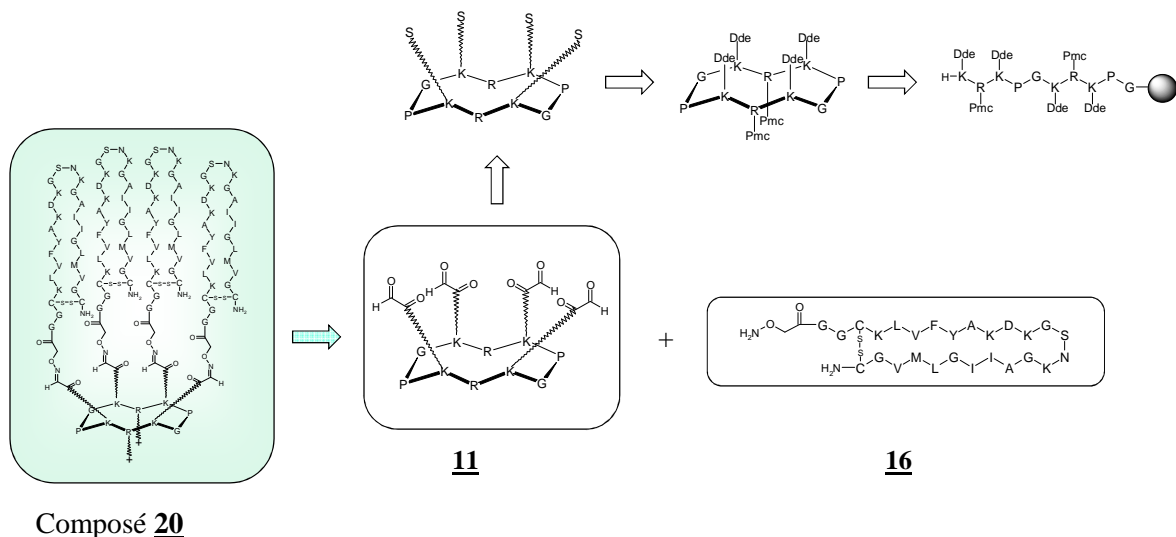


Figure 28 : Schéma rétro-synthétique du composé **20**

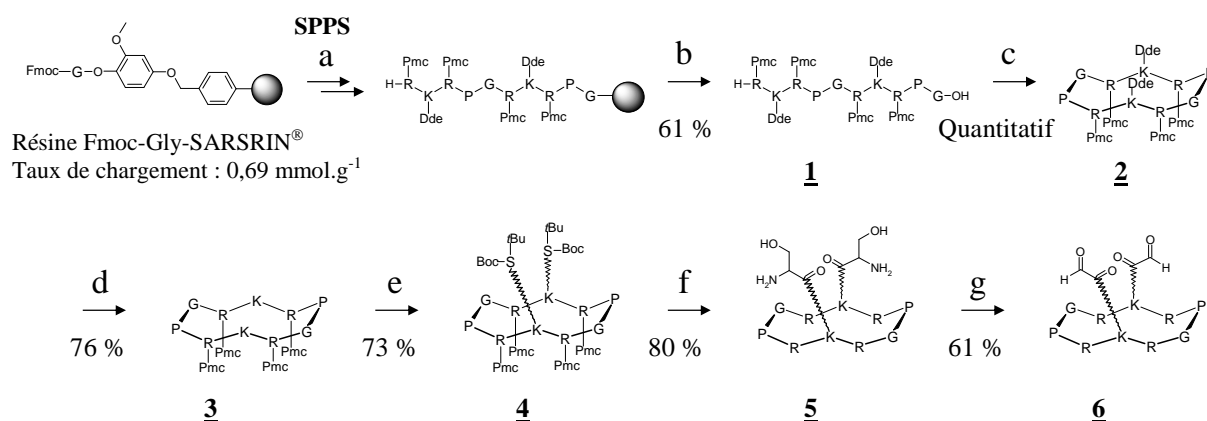
Les peptides linéaires, précurseurs des décapeptides cycliques, sont assemblés via la Synthèse Peptidique sur Phase Solide, SPPS,¹¹⁷ en stratégie Fmoc/*t*Bu. Les décapeptides sont ensuite cyclisés en solution et fonctionnalisés afin de permettre leur assemblage par lien éther d'oxime (Figure 27 et Figure 28).

Les peptides, GGC(Aβ₁₆₋₃₇Y₂₀K₂₂K₂₄)C **16** et Aβ₁₆₋₃₇Y₂₀K₂₂K₂₄ **17** sont assemblés par synthèse peptidique sur phase solide en stratégie Fmoc/*t*Bu. La formation du pont disulfure dans le cas du peptide **16** et la fonctionnalisation avec l'oxyamine dans le cas des deux peptides sont effectués sur le support avant le décrochage du peptide de la résine.

A.4. Synthèse des édifices peptidiques

A.4.1. Synthèse des précurseurs décapeptides cycliques

Les décapeptides cycliques **6** et **11** requièrent une synthèse mixte en phase solide et en solution (Figure 29 et Figure 30).



Réactifs : (a) SPPS : i) Pipéridine/DMF (1/4) ; ii) Fmoc-Xaa-OH (2 éq.), PyBOP (2 éq.), DIEPA (3-4 éq.), DMF ; (b) i) Pipéridine/DMF (1/4) ; ii) TFA/CH₂Cl₂ (1/99) ; (c) PyBOP (1,2 éq.), DIPEA (3-4 éq.), DMF (0,5 10⁻³ M) ; (d) Hydrazine/DMF (2/98) ; (e) Boc-Ser(*t*Bu)-OH (3 éq.), PyBOP (3 éq.), DIEPA (5 éq.), DMF (10⁻² M) ; (f) TFA/H₂O/TIS (95/2,5/2,5) ; (g) NaIO₄ (10 éq./site), CH₃CN/H₂O (1/1)

Figure 29 : Schéma d'obtention du décapeptide cyclique **6**

La synthèse du peptide linéaire est réalisée sur une résine Fmoc-Gly-Sasrin® (taux de chargement de la résine : 0,69 mmol.g⁻¹). Les acides aminés sont incorporés lors de la SPPS en stratégie Fmoc/*t*Bu. La synthèse du peptide est initiée à partir d'un résidu glycine achirale de façon à éviter les phénomènes d'épimérisation qui peuvent se produire lors de l'étape de cyclisation.

L'élongation du peptide sur la résine est réalisée dans les conditions classiques de synthèse peptidique en présence de l'acide aminé, Fmoc-Xaa-OH et de l'agent activateur, PyBOP®, en excès (2 éq. d'acides aminés et d'agents de couplage). La réaction s'effectue en présence d'une base la *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA) (3-4 éq.) dans le diméthylformamide (DMF).

¹¹⁷ Merrifield, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154.

Les cycles de déprotection du groupement Fmoc de la partie *N*-terminale sont effectués avec une solution de 20 % de pipéridine dans le DMF afin de réaliser le couplage de l'acide aminé suivant.

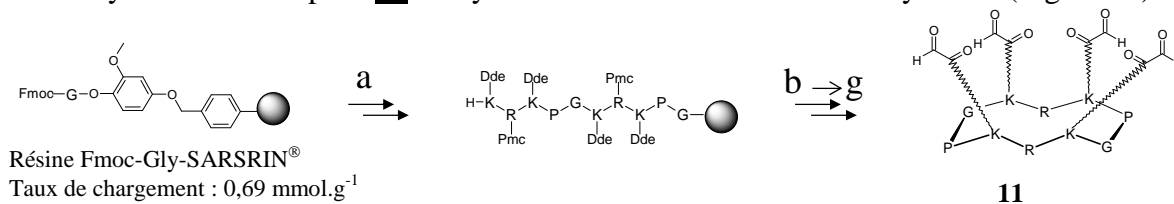
Après les couplages des différents acides aminés et l'élimination du dernier groupement Fmoc, la séparation du peptide linéaire du support solide s'effectue en conditions douces (1 % de l'acide trifluoroacétique (TFA) dans le CH₂Cl₂) permettant de garder les groupements protecteurs Pmc et Dde. Le peptide **1** est obtenu avec un rendement brut de 61 %. La cyclisation intramolécule entre les deux extrémités déprotégées du peptide **1** est réalisée à pH 8-9 dans des conditions de haute dilution (0,5 10⁻³ M) dans le DMF en présence d'agent activateur PyBOP pour obtenir le peptide cyclique **2** avec un rendement brut quantitatif. Ces conditions de dilution permettent de limiter les phénomènes d'oligomérisation et de favoriser la réaction de cyclisation intramolécule.

La fonctionnalisation des chaînes latérales des résidus lysines par des motifs aldéhydes requiert dans un premier temps la déprotection des groupements protecteurs Dde en présence d'hydrazine à 2 % dans le DMF. Le décapeptide cyclique **3** est alors obtenu avec un rendement brut de 75 %. L'introduction des résidus sérines, précurseurs des fonctions aldéhydes, sur les fonctions amines des chaînes latérales des lysines est réalisée par couplage peptidique avec l'acide aminé protégé Boc-Ser(*t*Bu)-OH pour obtenir le peptide **4**. La formation de la liaison peptidique est réalisée dans les conditions classiques de synthèse peptidique. L'acide aminé et le PyBOP sont introduits dans le milieu réactionnel en léger excès à raison de 1,5 éq. par fonction amine libre. Le peptide **4** est obtenu avec un rendement brut de 73 %.

Les groupements Boc, *t*Bu et Pmc des résidus sérines et arginines sont ensuite simultanément éliminés en milieu acide au moyen de TFA. Les agents nucléophiles, H₂O et TIS (Triisopropylsilane), sont utilisés afin de piéger les carbocations libérés. La solution est évaporée et le peptide **5** est obtenu avec un rendement brut de 80 %.

L'oxydation de la fonction 1,2-aminoalcool de chaque résidu sérine est enfin réalisée en présence d'un excès de périodate de sodium (~ 10 éq. / résidu sérine) pendant 20 minutes. Les sels d'iode (NaIO₄ en excès et NaIO₃ formés) ainsi que le formaldéhyde libéré par la coupure oxydante sont éliminés lors de la purification par CLHP semi-préparative du milieu réactionnel. Le composé **6**, comportant deux motifs aldéhydes glyoxyliques, est obtenu avec un rendement après purification de 61 %. Le peptide **6** ainsi que tous les intermédiaires réactionnels ont été caractérisés par CLHP et spectrométrie de masse electrospray, mode positif (*cf* Partie Expérimentale).

Le décapeptide cyclique **11**, présentant quatre aldéhydes glyoxyliques, intermédiaire dans la synthèse du composé **20** est synthétisé selon la même voie de synthèse (Figure 30).



Réactifs : (a) SPPS : i) Pipéridine/DMF (1/4) ; ii) Fmoc-Xaa-OH (2 éq.), PyBOP (2 éq.), DIEPA (3-4 éq.), DMF ; (b) i) Pipéridine/DMF (1/4) ; ii) TFA/CH₂Cl₂ (1/99) ; (c) PyBOP (1,2 éq.), DIPEA (3-4 éq.), DMF (0,5 10⁻³ M) ; (d) Hydrazine/DMF (2/98) ; (e) Boc-Ser(*t*Bu)-OH (4,4 éq.), PyBOP (4,4 éq.), DIEPA (6 éq.), DMF (10⁻² M) ; (f) TFA/H₂O/TIS (95/2,5/2,5) ; (g) NaIO₄ (10 éq./site), CH₃CN/H₂O (1/1)

Figure 30 : Schéma d'obtention du décapeptide cyclique **11**

Le peptide linéaire est obtenu par synthèse automatisée (348 Ω Syntheizer, Advance Chem Tech) sur support solide en stratégie Fmoc/tBu sur la résine Fmoc-Gly-Sasrin[®] (0,69 mmol.g⁻¹). La fonctionnalisation pour obtenir le cyclodécapeptide **11** est réalisée en solution. Les différents intermédiaires et le peptide **11** ont été caractérisés par CLHP et spectrométrie de masse electrospray (*cf* Partie Expérimentale).

A.4.2. Synthèse des précurseurs peptidiques A β

Les peptides A β ₁₆₋₃₇Y₂₀K₂₂K₂₄ **17** et GGC(A β ₁₆₋₃₇Y₂₀K₂₂K₂₄)C **16** sont synthétisés et fonctionnalisés sur support solide. La dernière étape consiste au décrochage des peptides de la résine et à leur purification avant l'étape de formation du lien éther d'oxime.

La réalisation de toutes les étapes sur la résine permet de limiter les problèmes d'agrégation des peptides rencontrés lors de leur manipulation en solution. En effet, les peptides amyloïdes mêmes mutés sont sensibles aux conditions comme la manipulation en milieu concentré, en présence de sels, de solvants ou de réactifs qui peuvent conduire à leur précipitation. Par exemple, le peptide précipite lorsqu'il est mis en présence de périodate de sodium empêchant ainsi certaines stratégies de synthèse.

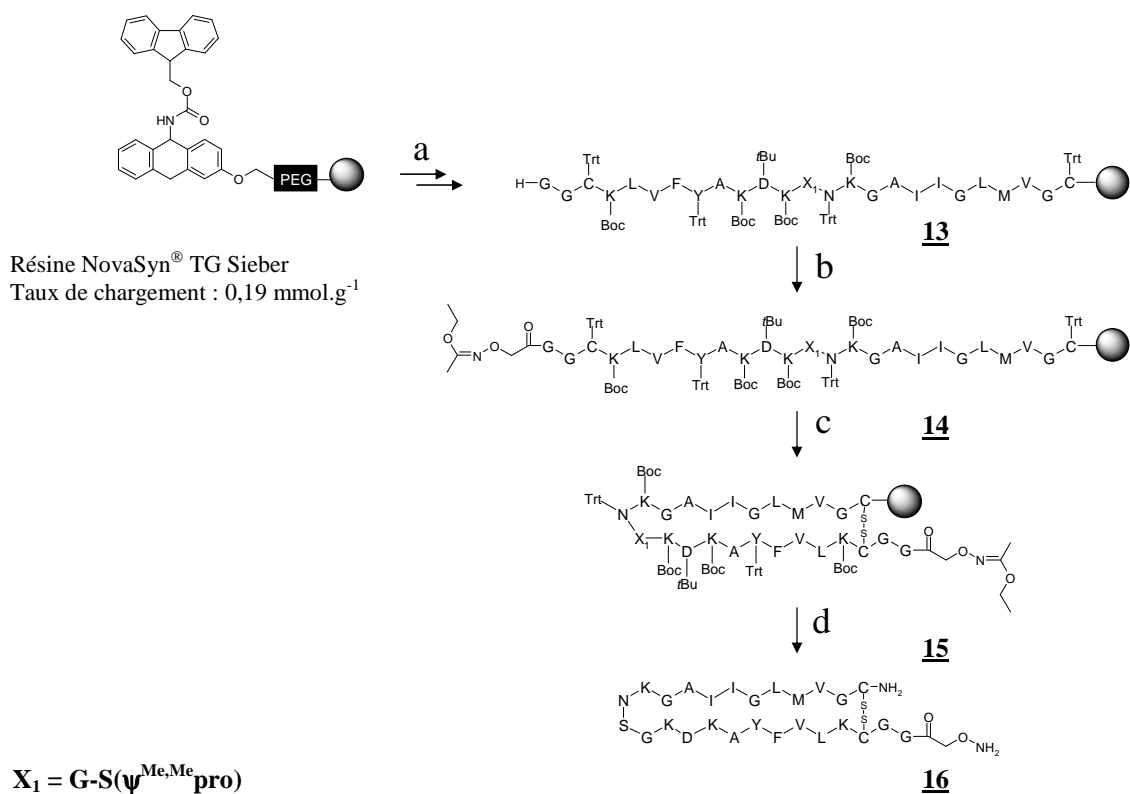
Dans le cadre de ces travaux, nous avons utilisé le peptide A β ₁₆₋₃₇Y₂₀K₂₂K₂₄ **17**, précédemment synthétisé au laboratoire.¹⁰⁷

La synthèse du peptide GGC(A β ₁₆₋₃₇Y₂₀K₂₂K₂₄)C, peptide **16** est décrite dans la figure 31. Le peptide **13** a été synthétisé sur support solide en synthèse automatisée (Applied Biosystems ABI 433A) sur une résine NovaSyn[®] TG Sieber (0,19 mmol.g⁻¹). Cette résine a été choisie car elle permet de libérer le peptide fonctionnalisé par une fonction amide en position C-terminale. De plus, le décrochage du peptide de la résine s'effectue en condition douces avec une solution contenant 1 % de TFA pour obtenir le peptide protégé en solution.¹¹⁸ Cette stratégie permet la fonctionnalisation par l'oxyamine aussi bien sur le support qu'en solution.

L'élongation du peptide est réalisée en présence de 10 éq. de Fmoc-Xaa-OH, 10 éq. de HBTU et 20 éq. de DIEPA dans la *N*-méthylpyrrolidone (NMP). Le temps de couplage a été augmenté à 1 heure par rapport à la procédure classique du fait de la séquence difficile. Un dipeptide contenant un résidu pseudoproline, X₁, a été introduit dans la séquence afin de limiter les phénomènes agrégations.¹¹⁹ Ce dipeptide, Fmoc-Gly-Ser(ψ ^{Me,Me}pro)-OH, contient une pseudoproline formée à partir du résidu serine qui est régénéré lors du traitement en milieu acide.

¹¹⁸ Sieber, P. A new acid-labile anchor group for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides by the Fmoc method. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 2107-2110.

¹¹⁹ Mutter, M.; Nefzi, A.; Sato, T.; Sun, X.; Wahl, F.; Woehr, T. Pseudo-prolines (psi Pro) for accessing "inaccessible" peptides. *Pept. Res.* **1995**, 8, 145-153.



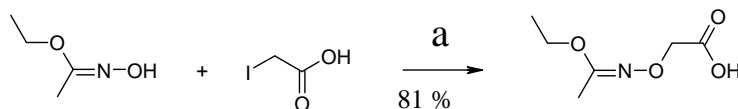
Réactifs : (a) SPPS : i) Pipéridine/NMP (1/4) ; ii) Fmoc-Xaa-OH (10 éq.), HBTU (10 éq.), DIEPA (20 éq.), NMP ; (b) i) Pipéridine/NMP (1/4) ; ii) acide 2-(1-éthoxyéthylidèneaminoxy)acétique **12** (2 éq.), PyBOP (2 éq.), DIPEA (3-4 éq.), DMF ; (c) I₂ (20 éq.), DMF; (d) TFA/H₂O/TIS (95/2,5/2,5), NH₄I (10 éq.)

Figure 31 : Schéma de la voie de synthèse du peptide **16**

Le couplage de l'acide 2-(1-éthoxyéthylidèneaminoxy)acétique **12** sur le peptide **13** est réalisé dans les conditions de couplage classique pour obtenir le peptide **14**.

La fonction oxyamine est le plus souvent introduite par l'intermédiaire de l'acide 2-aminoxyacétique protégé par un groupement Boc. Cependant, l'utilisation de ce précurseur en excès pour les couplages sur résine peut conduire à une réaction secondaire. En effet, l'azote de la fonction oxyamine peut subir une *N*-acylation lorsqu'il est engagé dans le couplage. Afin de contourner ce problème nous avons choisi d'utiliser le groupement 1-éthoxyéthylidène en protection de la fonction oxyamine. La synthèse de ce composé ainsi que son utilisation en SPPS ont été décrites récemment.¹²⁰

L'acide 2-(1-éthoxyéthylidèneaminoxy)acétique **12** est préparé à partir de l'éthyle *N*-hydroxyacétimidate et de l'acide iodoacétique en condition basique (Figure 32).



Réactifs : (a) NaOH, H₂O

Figure 32 : Schéma de synthèse de l'acide 2-(1-éthoxyéthylidèneaminoxy)acétique **12**

Le peptide **15** est obtenu à partir du peptide **14** par formation du pont disulfure en présence d'un excès de diode (20 éq.) dans le DMF. En effet, ce réactif est communément

¹²⁰ Foillard, S.; Rasmussen, M. O.; Razkin, J.; Boturyn, D.; Dumy, P. 1-Ethoxyethylidene, a new group for the stepwise SPPS of aminoxyacetic acid containing peptides. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 983-991.

utilisé pour la formation de pont disulfure entre deux résidus cystéines protégés par les groupements S-Trt et S-Acm.¹²¹ Ce réactif permet la déprotection sélective de ces groupements et l'oxydation in situ.

La formation des intermédiaires **13**, **14** et **15** a été contrôlée par élimination des groupements protecteurs et décrochage des peptides d'un échantillon de résine en milieu acide.

Le peptide **16** est obtenu par décrochage de la résine et élimination des groupements protecteurs en condition acide. Nous avons ajouté dans la solution de déprotection le sel NH₄I afin de réduire la méthionine sulfoxide qui aurait pu se former lors de la synthèse. Ce réactif permet de réduire sélectivement la méthionine sans réduire le pont disulfure.¹²² Par ailleurs, nous avons réalisé toutes les étapes de synthèse sur la résine sous argon afin de minimiser cette oxydation.

Le peptide **16**, purifié par CLHP semi-préparative, est obtenu avec un rendement total de 8 %.

A.4.3. Synthèse par lien éther d'oxime des édifices peptidiques

Les composés **18**, **19**, **20** et **21** sont obtenus par l'assemblage des décapeptides cycliques fonctionnalisés par les aldéhydes glyoxyliques et des fragments peptidiques Aβ fonctionnalisés par les oxyamines.

Le mécanisme de formation de la liaison éther d'oxime à partir d'un dérivé carbonyle et d'un éther oxyamine fait intervenir deux étapes (Figure 33).¹²³ L'addition du composé nucléophile sur le carbonyle conduit à la formation d'un intermédiaire carbinolamine qui se déshydrate pour donner l'éther d'oxime. Dans notre stratégie de synthèse, le composé carbonyle est un α-oxo aldéhyde glyoxylique, permettant la formation d'une liaison éther d'oxime glyoxylique particulièrement stable et très majoritairement de configuration *E*.^{102,124}

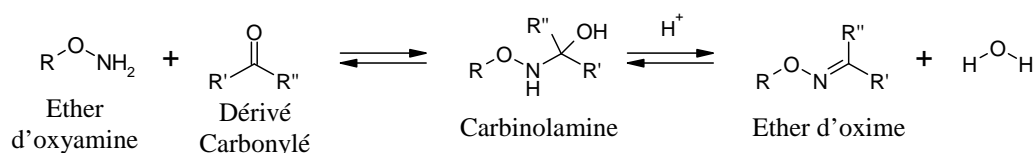


Figure 33 : Mécanisme de formation de la liaison éther d'oxime

★ Synthèse des composés 2Loop **18** et 2Lin **19**

La formation du lien éther d'oxime est généralement effectuée en milieu aqueux. Cependant, les concentrations importantes des peptides, la température et les temps de réactions peuvent conduire à l'agrégation des peptides amyloïdes en milieux aqueux. Afin de limiter les risques d'agrégations, nous choisis de réaliser la ligation dans le diméthylsulfoxyde (DMSO).

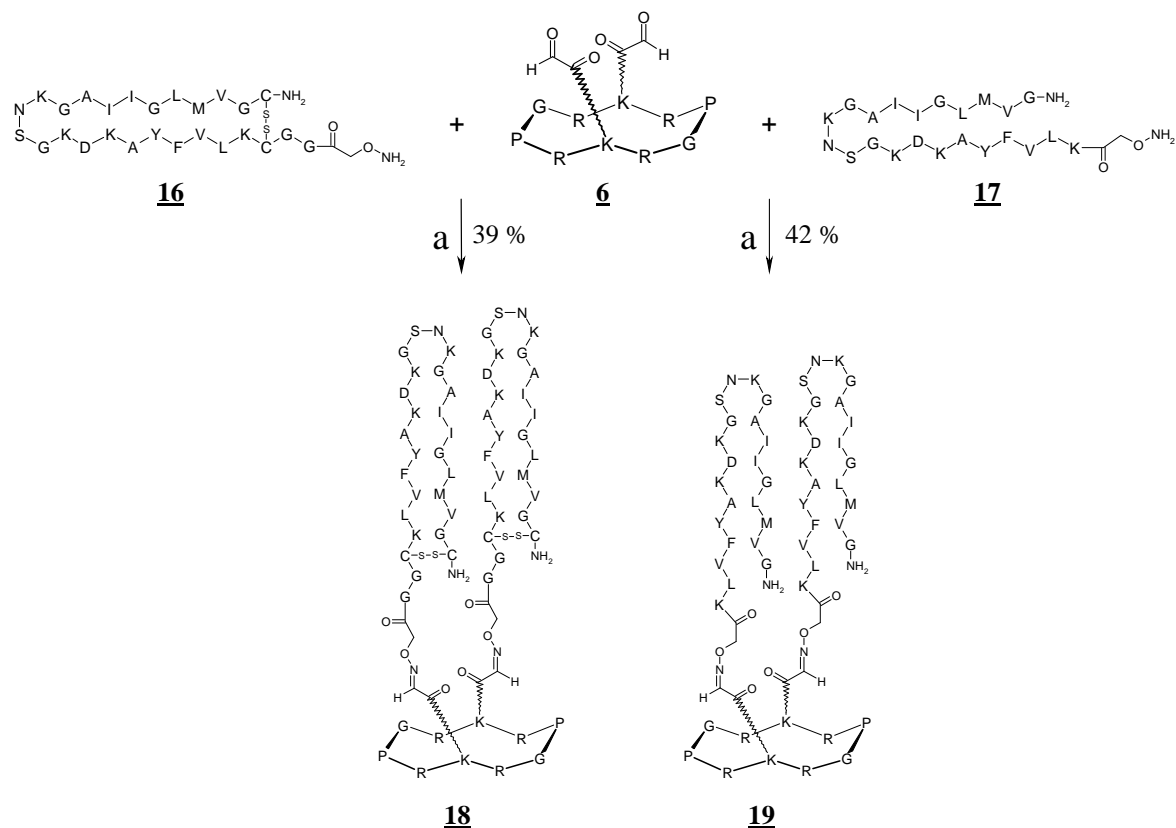
¹²¹ Kamber, B.; Hartmann, A.; Eisler, K.; Riniker, B.; Rink, H.; Sieber, P.; Rittel, W. The synthesis of cystine peptides by iodine oxidation of S-tritylcysteine and S-acetamidomethylcysteine peptides. *Helv. Chim. Acta* **1980**, *63*, 899-915.

¹²² Yajima, H.; Fujii, N.; Funakoshi, S.; Watanabe, T.; Murayama, E.; Otaka, A. New strategy for the chemical synthesis of proteins. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 805-819.

¹²³ Jencks, W. P. Mechanism of oxime and semicarbazone formation. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 475-481.

¹²⁴ Garanger, E. Conception, synthèse et caractérisation de nouveaux systèmes de guidage et de vectorisation pour la cancérologie. 280 p. Thèse : *Chimie-biologie* Université Joseph Fourier, **2005**.

La réaction est réalisée en utilisant un léger excès de peptides **16** et **17** (~ 1,1 éq./site aldéhyde) (Figure 34). La réaction est complète au bout de 24 heures pour le peptide **18** et 7 heures pour le peptide **19**.



Réactifs : (a) DMSO, 40°C

Figure 34 : Schéma de la voie de synthèse des peptides **18** et **19**

Les conjugués formés sont purifiés directement par CLHP semi-préparative afin d'obtenir les peptides **18** et **19** avec un rendement de 39 % et 42 % respectivement. Ces deux peptides ont été caractérisés par CLHP et spectrométrie de masse electrospray en mode positif (Figure 35).

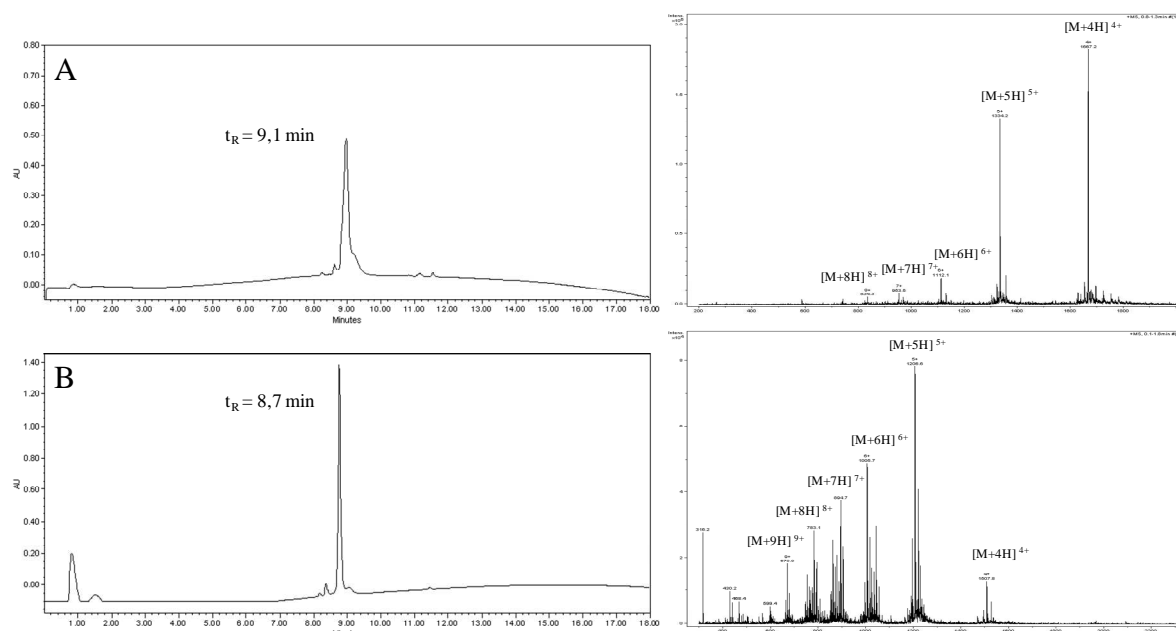
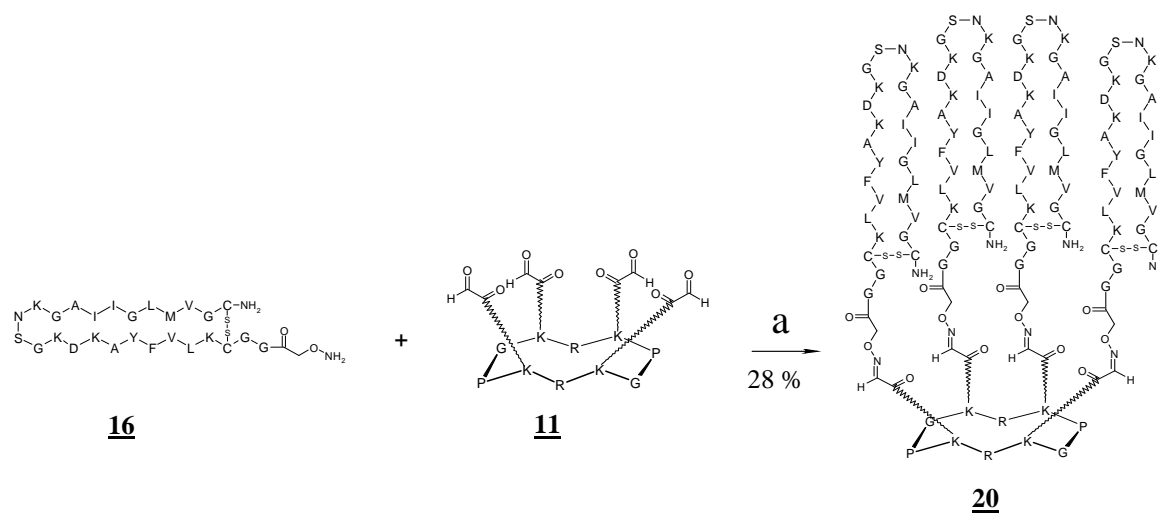


Figure 35 : Chromatogrammes CLHP et spectres de masse ESI : (A) composé **18** ; (B) composé **19**

★ Synthèse du composé **4Loop 20**

Le composé **20** a été synthétisé dans les mêmes conditions réactionnelles que les composés **18** et **19**. La réaction est réalisée en utilisant le décapeptide cyclique **11** fonctionnalisé par quatre aldéhydes glyoxyliques et le peptide **16** en excès (~ 2,5 éq./site aldéhyde). La réaction est complète au bout de 32 heures et le peptide **20** est purifié par CLHP semi-préparative.



Réactifs : (a) DMSO, 40°C

Figure 36 : Schéma de la voie de synthèse du peptide **20**

Le peptide **20** est obtenu avec un rendement de 28 % et a été caractérisé par spectrométrie de masse electrospray en mode positif (Figure 37).

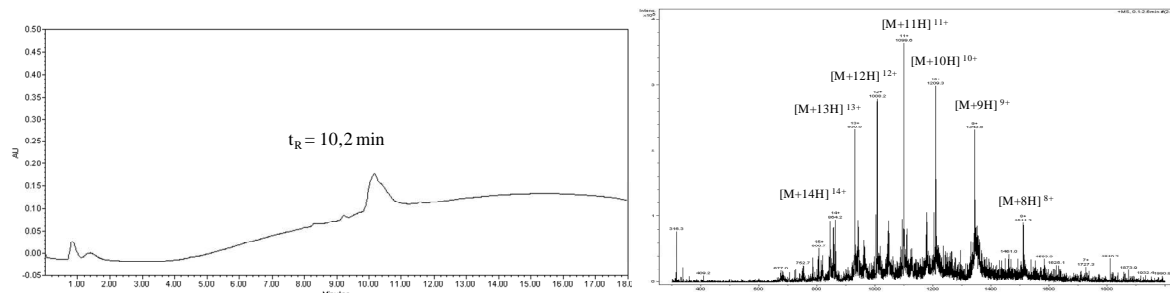


Figure 37 : Chromatogramme CLHP et spectre de masse ESI du composé 20

A.5. Etude des édifices modèles de fibres amyloïdes

La formation des fibres amyloïdes par les quatre édifices peptidiques, présentés dans la figure 38, a été caractérisée par plusieurs techniques physico-chimiques. Nous avons tout d'abord suivi la structuration en feuillet β en dichroïsme circulaire puis nous avons confirmé la formation de feuillets β croisés par interaction avec la thioflavine T et le rouge congo.

Enfin nous avons visualisé les fibres en microscopie électronique. Nous ne présenterons pas la caractérisation complète du composé **21** qui a été réalisée précédemment au laboratoire.¹⁰⁷

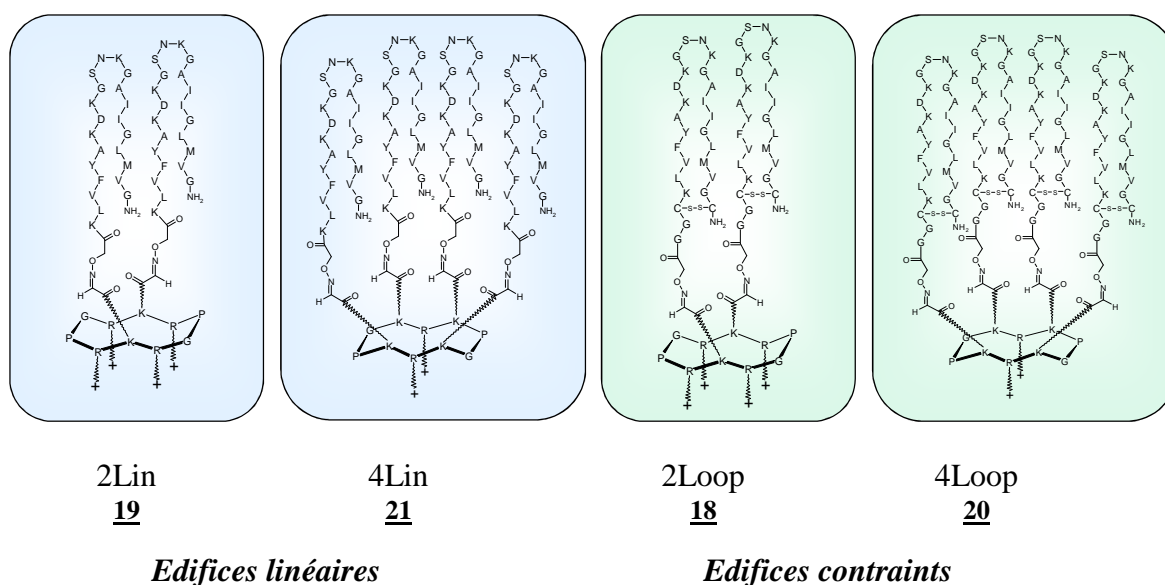


Figure 38 : Edifices peptidiques étudiés

A.5.1. Caractérisation des édifices peptidiques

Nous avons, dans un premier temps, étudié le repliement en feuillet β des édifices peptidiques par dichroïsme circulaire dans 20 mM de tampon phosphate de sodium pH 7,1 à 21 °C.

Dans l'eau, les composés 2Lin **19** et 2Loop **18** présentent un spectre CD caractéristique d'une structure désordonnée (effet Cotton négatif à 195 nm) (Figure 39).

Par contre, le composé 4Loop **20** absorbe à 195 et 206 nm ce qui indique qu'il est déjà partiellement structuré dans une conformation non amyloïdogénique.

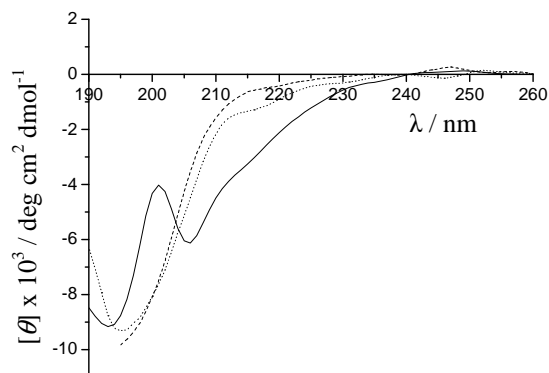


Figure 39 : Spectres de dichroïsme circulaire dans l'eau du composé 2Lin 19 (---), composé 2Loop 18 (...) et composé 4Loop 20 (—), 21°C

Les édifices se structurent en feuillet β lors de l'ajout du tampon phosphate de sodium (Figure 40).

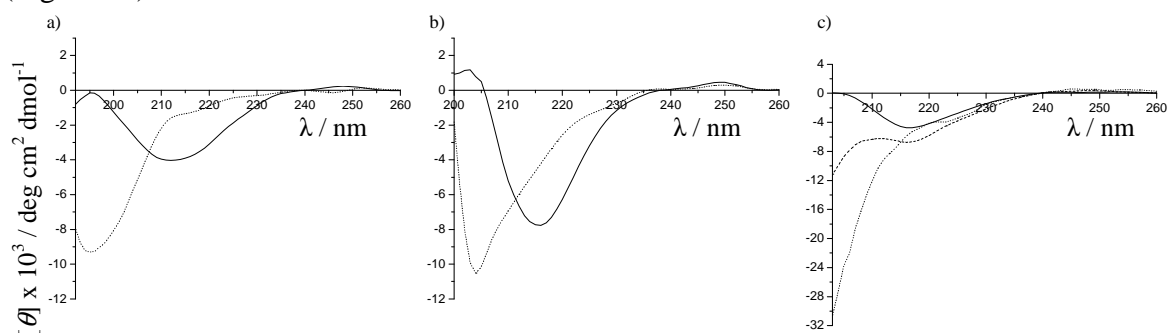


Figure 40 : Spectres de dichroïsme circulaire des composés dans l'eau (...) et dans 20 mM phosphate de sodium pH 7,1, 21 °C : a) composé 2Loop 18 10 μ M t = 1 h (—) ; b) composé 4Loop 20 10 μ M t = 15 min (—) ; c) composé 2Lin 19 25 μ M t = 96 h (---), t = 17 jours (—)

En effet, nous observons l'évolution du signal négatif à 195 nm vers un signal positif autour de 200 nm. De plus, il apparaît un signal négatif à 214 nm pour les composés 2Loop 18 et 4Loop 20 et un signal négatif à 217 nm pour le composé 2Lin 19. Cette évolution des signaux est caractéristique d'une structuration en feuillet β .

Cependant, il est à noter que la cinétique n'est pas la même pour tous les composés. Dans le cas de l'édifice 4Loop 20, la structuration en feuillet β est très rapide avec apparition des signaux caractéristiques dès 15 minutes alors que pour le composé 2Loop 18 un temps minimum de 1 heure est nécessaire. Par contre, pour le composé 2Lin 19, on peut observer l'apparition du signal négatif à 217 nm mais seulement après 96 heures.

Afin de confirmer la formation de feuillets β croisés, nous avons ensuite étudié l'interaction des édifices avec la thioflavine T.

Les composés ont été incubés en présence de 10 μ M de ThT dans 20 mM de tampon phosphate de sodium pH 7,1 à 21°C. Le spectre d'émission de la ThT a été enregistré par excitation à 440 nm après 1 heure d'incubation (Figure 41).

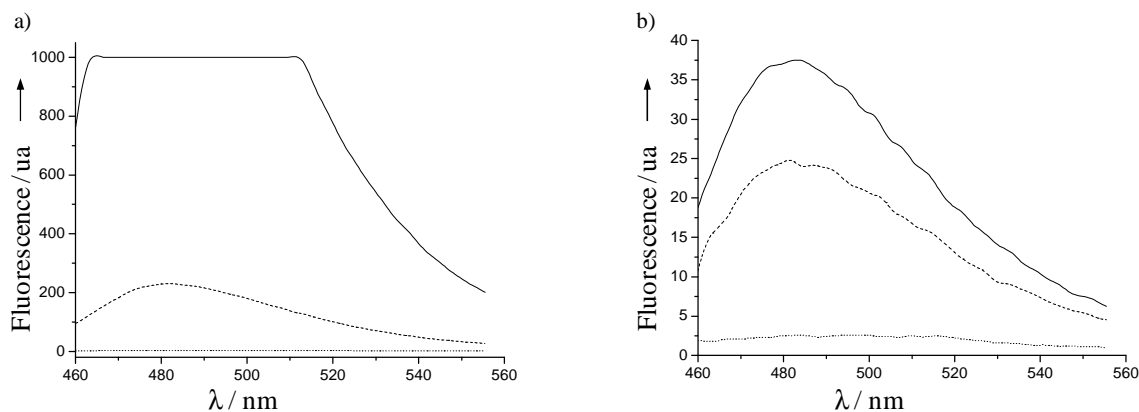


Figure 41 : Spectres de fluorescence de la ThT (excitation 440 nm) seule (...) et après 1 h d'incubation dans 20 mM de phosphate de sodium pH 7,1 : a) composé 2Lin 19 25 μM (---), composé 4Lin 21 12,5 μM (—) ; b) composé 2Loop 18 25 μM (---), composé 4Loop 20 25 μM (—)

Tous les composés interagissent avec la ThT. Cette interaction est visualisée par l'augmentation du signal d'émission de fluorescence à 480 nm par rapport au signal de la ThT seule.

Cependant, une différence d'intensité d'émission est observée dans le cas des composés 2Lin 19 et 4Lin 21 par rapport aux composés 2Loop 18 et 4Loop 20. En effet, celle-ci est 10 à 50 fois plus élevée pour les composés linéaires par rapport aux composés contraints.

Par ailleurs, pour le composé 2Lin 19 une émission de fluorescence de la ThT est observée alors que d'après l'étude par dichroïsme circulaire il ne semble pas être structuré en feuillet β après une heure.

Ces différents résultats suggèrent que le mode d'interaction de la ThT diffère selon les édifices et nous permettrons dans le paragraphe A.5.4 de proposer un mode d'interaction de la ThT avec les composés.

L'interaction avec le rouge congo a ensuite été étudiée par U.V. Les composés ont été incubés en présence de 1 μM de rouge congo dans 10 mM de tampon phosphate de sodium pH 7,1. Les spectres d'absorptions ont été enregistrés après 1 heure d'incubation à 21°C (Figure 42).

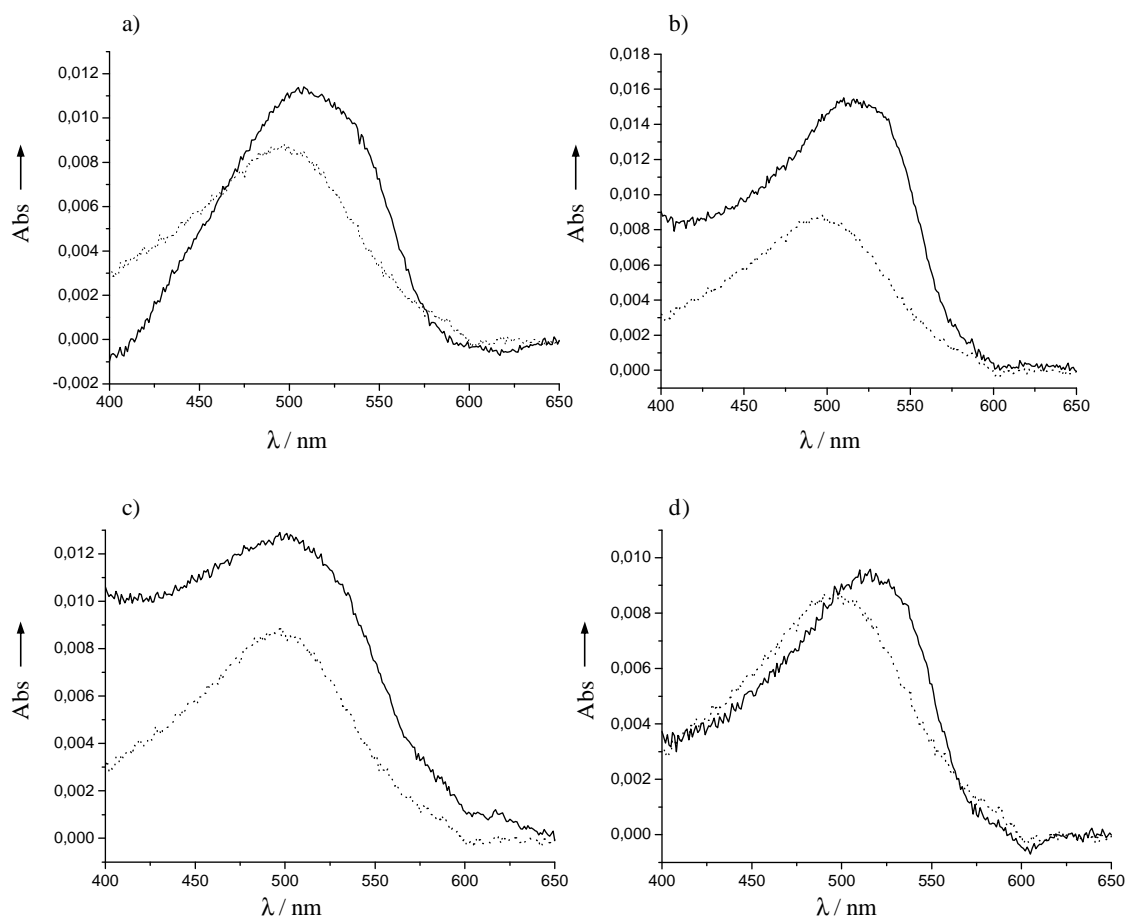


Figure 42 : Spectre U.V. du rouge congo (1 μM) dans 10 mM de phosphate de sodium pH 7,1 (...) et en présence des composés (10 μM) après 1 h d'incubation dans 10 mM de phosphate de sodium pH 7,1 à 21°C (—) : a) composé 2Lin 19 ; b) composé 4Lin 21 ; c) composé 2Loop 18 ; d) composé 4Loop 20

Tous les composés interagissent avec le rouge congo. Cette interaction est visualisée par les effets hyperchrome et bathochrome de l'absorbance du rouge congo vers 530 nm.

Cependant, les signaux d'absorptions observés suggèrent un mode d'interaction du rouge congo différent selon les édifices. De plus, comme pour la ThT, nous constatons une interaction entre le composé 2Lin 19 et le rouge congo après une heure d'incubation dans le tampon phosphate.

Nous avons enfin confirmé la formation de fibres amyloïdes par microscopie électronique à transmission (MET).

Le composé 2Loop 18 (25 μM) a tout d'abord été incubé pendant 6 heures dans 20 mM de phosphate de sodium pH 7,1 à 21°C. Les images de microscopie montrent la présence de nombreux protofilaments de 5 à 6 nm de diamètre (Figure 43). Ces protofilaments ont en moyenne une longueur de 50 nm et ne semblent pas interagir entre eux.

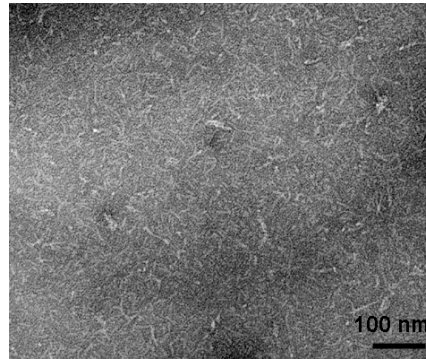


Figure 43 : Microscopie électronique du composé 2Loop 18 (25 µM) après incubation dans 20 mM de tampon phosphate de sodium pH 7,1 à 21°C pendant 6 h

Tous les composés ont été ensuite incubés pendant 40 heures dans 20 mM de tampon phosphate de sodium pH 7,1 à 21°C (Figure 44). Le peptide A β ₄₀, que nous avons synthétisé au laboratoire (Cf Annexe I), a été incubé dans les mêmes conditions comme témoin.

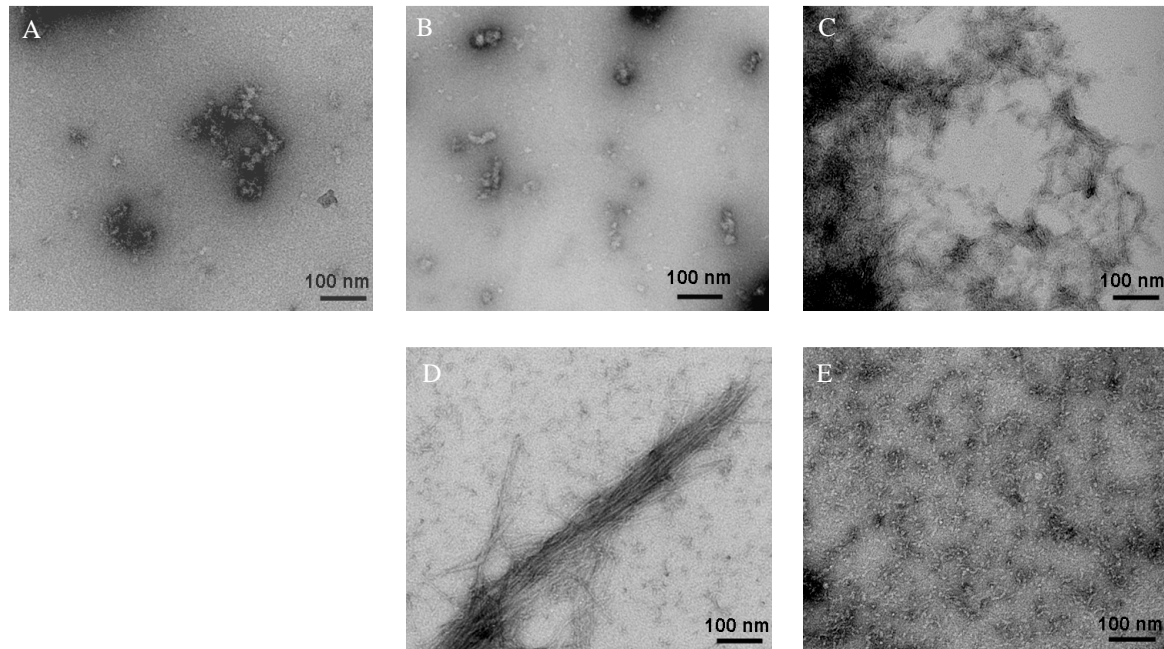


Figure 44 : Microscopie électronique des composés après incubation pendant 40 h dans 20 mM de tampon phosphate de sodium pH 7,1 à 21°C : (A) A β ₄₀ 50 µM ; (B) composé 2Lin 19 25 µM ; (C) composé 4Lin 21 6,5 µM ; (D) composé 2Loop 18 25 µM ; (E) composé 4Loop 20 25 µM

De nombreux protofilaments sont visibles pour les composés 4Lin 21, 2Loop 18 et 4Loop 20. En effet, comme cela a été montré précédemment pour les composés 4Lin 21 et 2Loop 18, des protofilaments de 5 à 6 nm de diamètres sont observés pour le composé 4Loop 20.

Toutefois l'organisation entre les protofilaments est différente d'un composé à l'autre. Dans le cas du composé 4Lin 21, les protofilaments forment majoritairement des agrégats. Pour le composé 2Loop 18, des protofilaments jusqu'à 1 µm de long s'agencent en faisceaux d'environ 80 nm de large. Le composé 2Loop 18 est donc capable après une durée d'incubation plus longue de former de très longs protofilaments qui interagissent entre eux même s'ils ne s'organisent pas en fibres.

Les protofilaments, dans le cas du composé 4Loop 20, sont courts avec en moyenne moins de 50 nm de long et ne semblent pas s'associer entre eux.

Enfin, dans le cas du composé 2Lin **19**, comme pour le peptide A β ₄₀, des agrégats sont observés au lieu de protofilaments au même temps d'incubation.

Afin de confirmer que le composé 2Lin **19** forme des fibres nous avons visualisé par microscopie les échantillons après 71 heures et 7 jours d'incubation dans 20 mM de tampon phosphate de sodium pH 7,1 à 21°C (Figure 45).

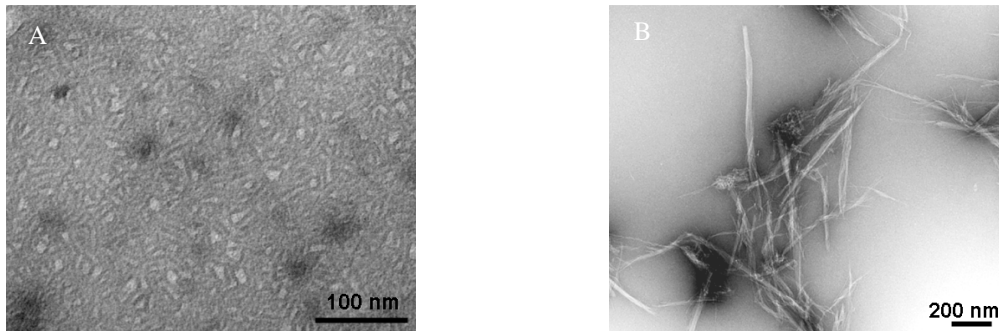


Figure 45 : Microscopie électronique du composé 2Lin **19 25 μ M après incubation dans 20 mM de tampon phosphate de sodium pH 7,1 à 21°C pendant : (A) 71 h ; (B) 7 jours**

Après 71 heures d'incubation dans le tampon, le composé 2Lin **19** forme de très nombreux courts protofilaments d'environ 5 nm de diamètre. Lorsque la durée d'incubation est de 7 jours, on peut alors observer de nombreuses fibres torsadées et longues, jusqu'à 800 nm de long et 30 nm de diamètre en moyenne. Ces fibres résultent de l'association entre, en moyenne, 6 protofilaments de 5 à 6 nm de diamètre.

De nombreux travaux de la littérature ont mis en évidence le rôle primordial des conditions expérimentales dans le processus de formation des fibres. En effet, il apparaît clairement que la force ionique, le pH, la nature des ions ou la température peuvent modifier de façon significative la fibrillogénèse.^{86,125,126} Si l'on étudie le composé 4Lin **21** dans un tampon acétate on observe, par dichroïsme circulaire, un comportement différent à celui dans le tampon phosphate.

Cette expérience est reportée sur la figure 46 pour laquelle le composé 4Lin **21** (5 μ M) a été placé dans 2 mM de tampon acétate de sodium et 2 mM de tampon phosphate de sodium à pH 5,4. Nous remarquons que ce composé dans cette étude est déjà structuré dans l'eau puisque l'on observe un signal à 214 nm.

¹²⁵ a) Klement, K.; Wieligmann, K.; Meinhardt, J.; Hortschansky, P.; Richter, W.; Fandrich, M. Effect of different salt ions on the propensity of aggregation and on the structure of Alzheimer's abeta(1-40) amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.* **2007**, 373, 1321-1333. b) Sikkink, L. A.; Ramirez-Alvarado, M. Salts enhance both protein stability and amyloid formation of an immunoglobulin light chain. *Biophys. Chem.* **2008**, 135, 25-31.

¹²⁶ Munishkina, L. A.; Henriques, J.; Uversky, V. N.; Fink, A. L. Role of protein-water interactions and electrostatics in alpha-synuclein fibril formation. *Biochemistry* **2004**, 43, 3289-3300.

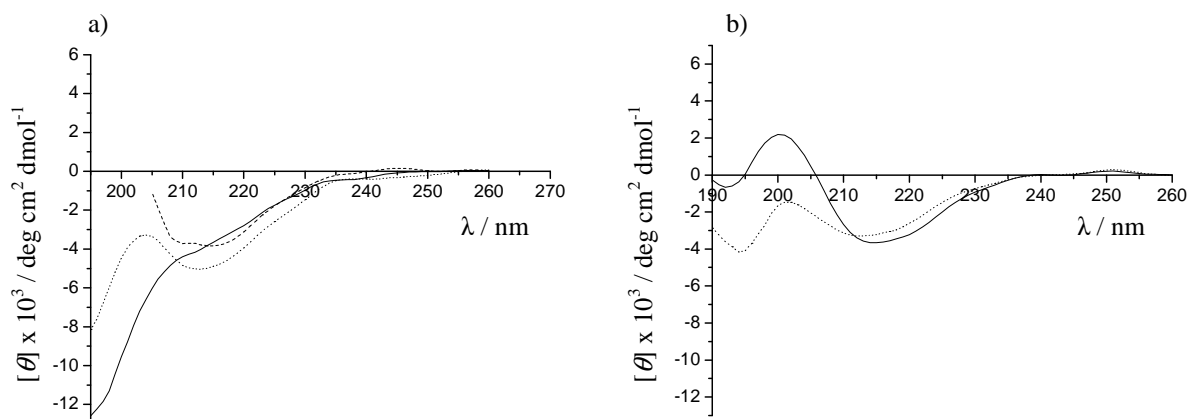


Figure 46 : Spectres de dichroïsme circulaire du composé 4Lin 21 (5 μM) à 21 $^{\circ}\text{C}$: a) (...) dans l'eau ; (—) 1 h d'incubation dans 2 mM tampon acétate de sodium ; (---) 19 h d'incubation dans 50 mM tampon acétate de sodium. b) (...) dans l'eau ; (—) 1 h d'incubation 2 mM de tampon phosphate de sodium

Après 1 heure d'incubation dans 2 mM de tampon acétate de sodium nous observons une déstructuration du composé (Figure 46, a)). Après 72 heures aucune évolution n'est observée. Par contre, si on augmente la concentration en tampon acétate à 50 mM, après 19 heures d'incubation la bande à 195 nm disparaît au profit d'un signal à 208 et 217 nm.

La même expérience réalisée avec le tampon phosphate de sodium montre, après 1 heure d'incubation, un spectre caractéristique du feuillet β avec un signal positif à 200 nm et un signal négatif à 217 nm (Figure 46, b)).

Nous avons ensuite vérifié que ces conditions permettent la formation de protofilaments. Les échantillons du composé 4Lin 21 (5 μM) en présence des deux tampons ont été visualisés par microscopie après 75 heures d'incubation à 21 $^{\circ}\text{C}$ (Figure 47).

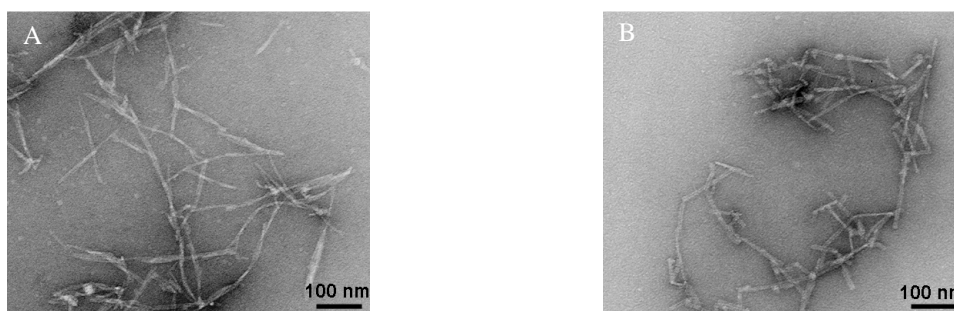


Figure 47 : Microscopie électronique des échantillons d'agrégations du composé 4Lin 21 après incubation pendant 75 h, pH 5,4 à 21 $^{\circ}\text{C}$ dans (A) 2 mM de tampon phosphate ; (B) 50 mM de tampon acétate

Dans ces deux conditions, de nombreux protofilaments et fibres sont observés avec des morphologies comparables. Ces fibres d'un diamètre moyen de 10 et 12 nm résultent de l'interaction entre deux protofilaments de 5 à 6 nm de diamètre comme le montre la Figure 48. Des fibres plus épaisses de 20 à 25 nm de diamètre sont aussi observées.

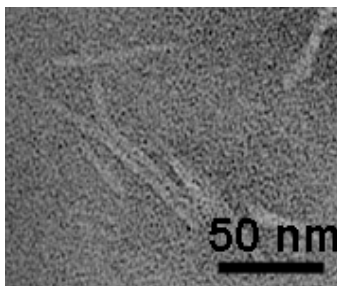


Figure 48: Microscopie électronique de l'échantillon d'agrégation du composé 4Lin 21 après incubation pendant 75 h, pH 5,4 à 21°C dans 2 mM de tampon phosphate

D'après ces résultats, nous constatons que parmi les facteurs qui sont impliqués dans le repliement et la formation du protofilament la nature des ions dans le milieu est déterminante.

Deux phénomènes permettent d'expliquer le rôle des ions dans le repliement des protéines : la neutralisation des charges et l'effet Hofmeister.

Les anions peuvent neutraliser les charges positives des résidus lysines de la séquence du peptide $A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24}$ qui créent des répulsions électrostatiques entre les boucles empêchant ainsi la formation des feuillets β croisés. Ce mécanisme serait le plus probable compte tenu des faibles concentrations en tampon phosphate utilisées (2 mM). De plus, des études antérieures ont montré que les anions divalents sont plus performants pour déclencher le processus de fibrillogénèse.¹⁰⁷

Les anions peuvent également interagir directement avec les molécules d'eau ce qui se traduit par un renforcement des interactions hydrophobes par augmentation de la tension de surface de l'eau. Ce phénomène connu sous le nom d'effet « salting out » ou effet Hofmeister est plutôt mis en avant pour des concentrations plus élevées en ions (>10 mM).^{126,127} Cet effet permettrait d'expliquer l'évolution vers la formation des protofilaments observée dans 50 mM de tampon acétate.

On peut évidemment considérer une action commune de ces deux phénomènes dans le processus de fibrillogénèse.

Pour conclure, nous avons montré par différentes techniques que tous les édifices mimant les comportements physico-chimiques des fibres amyloïdes :

- repliement en feuillet β ;
- interaction avec la thioflavine T et le rouge congo ;
- formation de protofilaments de 5 à 6 nm de diamètre.

A.5.2. Modélisation moléculaire des édifices peptidiques et modèles de fibres proposés

Nous avons réalisé une étude par modélisation moléculaire de chaque édifice peptidique. Cette modélisation nous permettra de prévoir la façon dont les molécules s'organisent entre elles pour créer un protofilament et de proposer un mécanisme de repliement et de formation du protofilament.

Les peptides sont construits à l'aide du logiciel Insight/Discover puis minimisés en tenant compte, d'une part des dimensions mesurées par microscopie électronique et d'autre part, des données structurales obtenues par le groupe de Tycko par RMN du solide.^{14,15}

¹²⁷ Zhang, Y.; Cremer, P. S. Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 658-663.

Cette approche, déjà utilisée au laboratoire par Dolphin et al., a permis de proposer un modèle de protofilament pour le composé 4Lin **21**.¹⁰⁷ Celui-ci constitue la coupe transversale du protofilament comme représenté sur la figure 49.

Chaque fragment du peptide amyloïde se replie en boucle de type brin β -boucle-brin β et les chaînes latérales des acides aminés s'organisent perpendiculairement à l'axe du protofilament.

Dans ce modèle, les résidus L17, F19 et A21 se replient à l'intérieur de la boucle pour faire face aux résidus I31 et M35. Ils forment ainsi une poche hydrophobe intra-brins représentée en bleu dans la Figure 49. Notons que D23 et K28 constituent un pont salin au niveau de la boucle.

Les boucles ainsi créées interagissent entre elles par l'intermédiaire des acides aminés A30, I32, L34 et V36 pour former les interactions hydrophobes inter-brins, en rose sur la figure 49 qui créent un cœur hydrophobe au centre de l'assemblage. L'élongation du protofilament est réalisée par les liaisons hydrogène qui se créent entre les deux boucles le long du squelette peptidique pour former les feuillettes β croisés parallèles et colinéaires au protofilament. La structure tertiaire de l'assemblage présente un axe de symétrie C2 perpendiculaire à l'axe de la fibre.

Ce modèle est en accord avec les mesures des protofilaments effectuées par microscopie (diamètre entre 4 et 5 nm) et les résultats de la littérature.¹⁴ Signalons que d'autres modèles de repliement du peptide $A\beta_{40}$ ont été proposés mais ils diffèrent essentiellement par l'orientation de la partie C-terminale du brin β (résidus 30 à 37) ce qui, dans notre cas, ne modifierait ni la conformation globale de la molécule, ni la formation de deux zones hydrophobes.^{15,75}

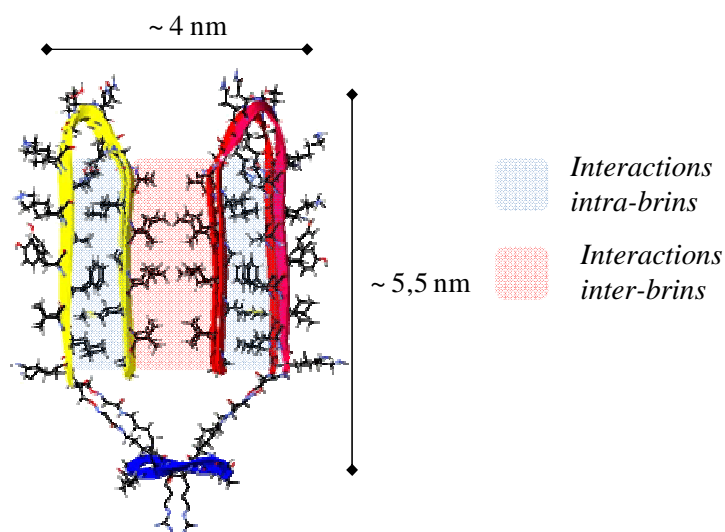


Figure 49 : Modélisation moléculaire du composé 4Lin **21**

Dans le cas du composé 2Loop **18**, nous avons introduit par l'intermédiaire du pont disulfure une pré-organisation conformationnelle supplémentaire qui est le repliement du peptide en boucle.

Notons que cette cyclisation peut avoir des conséquences importantes sur la morphologie et les caractéristiques physico-chimiques des fibres. En effet Wetzel et al. ont montré que la position du pont disulfure dans les doubles mutants C17/C34, C17/C35 et C17/C36 du peptide $A\beta_{40}$ induit des modifications de la vitesse d'élongation en fibre et du rendement de la fluorescence de la ThT.⁷⁴ Par contre, tous ces mutants forment des fibres similaires au peptide natif. Dans notre cas, les résidus cystéines ont été rajoutés aux deux

extrémités du peptide de façon à conserver intact la séquence peptidique du composé 4Lin **21**. Une étude comparative par modélisation entre la boucle du composé 4Lin **21** et celle du composé 2Loop **18** montre des variations de la partie C-terminale pouvant expliquer les différences observées dans la morphologie des fibres ou dans la fluorescence de la ThT (Figure 50).

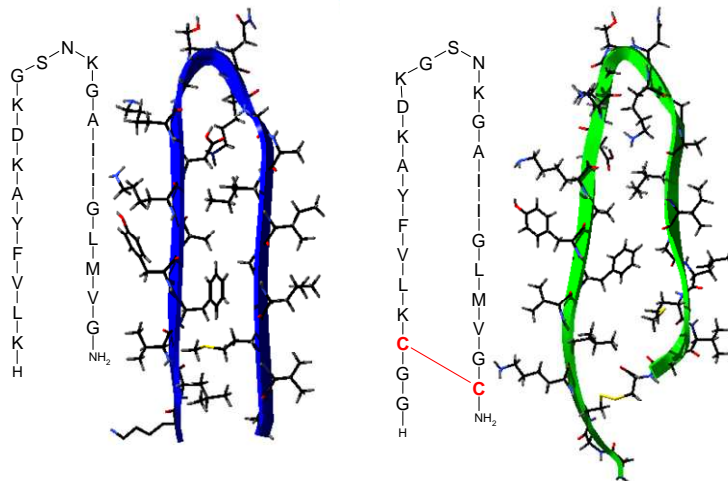


Figure 50 : Modélisation des boucles : (a) boucle des édifices 2Lin/4Lin ; (b) boucles des édifices 2Loop/4Loop

Le composé 2Loop **18** présente en microscopie un diamètre de fibre comparable au composé 4Lin **21** (5-6 nm). En faisant l'hypothèse que la structure globale ainsi que l'orientation des brins sont préservées nous pouvons envisager deux modes d'associations des édifices lors de la polymérisation. Ces deux variations résultent du positionnement des boucles par rapport au cyclodécapeptide.

La première structure consiste au repliement des fragments amyloïdes pour former les interactions hydrophobes intra-brins et inter-brins dans un même édifice peptidique correspondant à la coupe transversale du protofilament (Figure 51). La formation des liaisons hydrogène est ensuite réalisée par interaction entre les édifices pour l'élongation du protofilament. Les résultats obtenus par modélisation moléculaire montrent très clairement une gêne stérique induite par le cyclodécapeptide qui empêche le positionnement correct des édifices pour former les liaisons hydrogène des feuilletts β croisés parallèles nécessaires à la polymérisation.

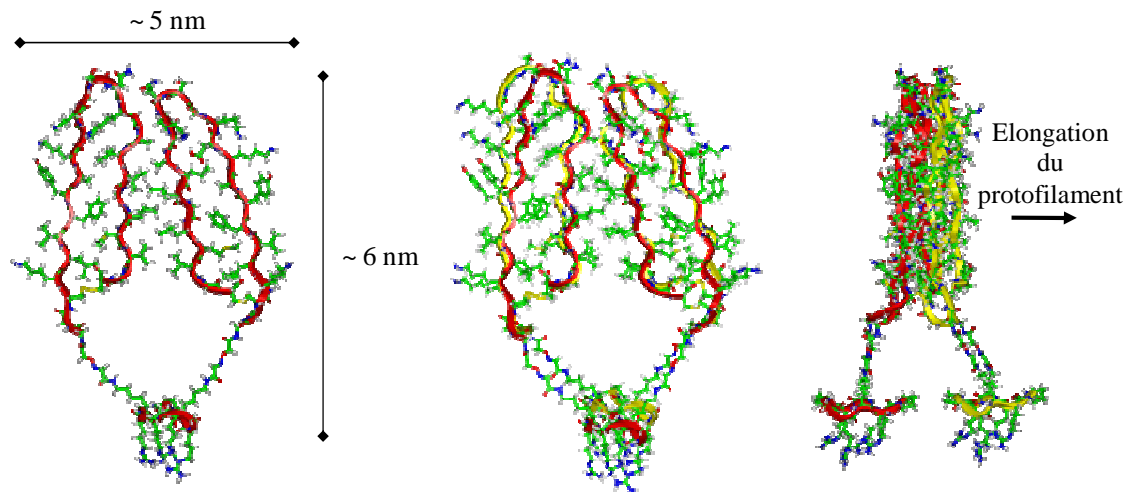


Figure 51 : Première structure du protofilament proposée pour le composé 2Loop 18

La deuxième structure consiste au repliement des fragments amyloïdes pour former les interactions hydrophobes intra-brins et les liaisons hydrogène dans un même édifice peptidique. Les interactions hydrophobes inter-brins et la formation du cœur hydrophobe résultent alors de l'association entre deux molécules (Figure 52). L'élongation du protofilament résulte ensuite de l'association par liaisons hydrogène des édifices qui se créent de façon colinéaire à l'axe du protofilament. Cette structure, en accord avec celle proposée pour le composé 4Lin 21, permet la création de feuillets β croisés parallèles.

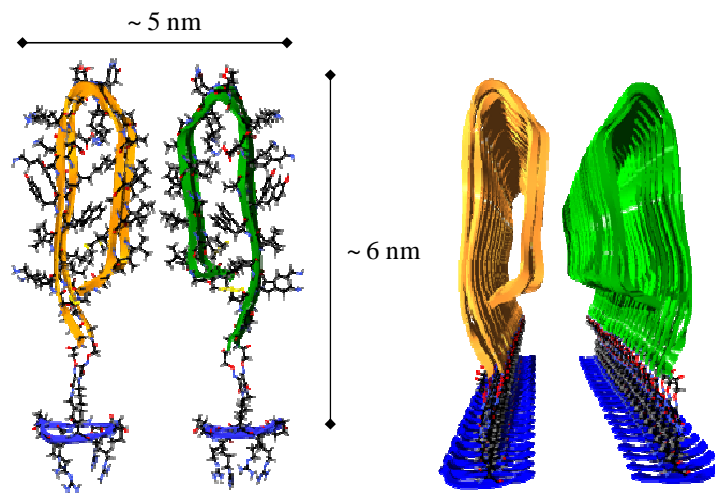


Figure 52 : Deuxième structure du protofilament proposée pour le composé 2Loop 18

Nous avons alors envisagé la possibilité d'une élongation par création de feuillets β croisés antiparallèles comme représentée sur la figure 53. Nous excluons ce modèle car il ne respecte pas les dimensions mesurées par la microscopie. En effet, le diamètre du protofilament serait le double de ce qui est attendu. De plus, comme précédemment, le cyclodécapeptide induit une gêne stérique qui empêche l'élongation du protofilament.

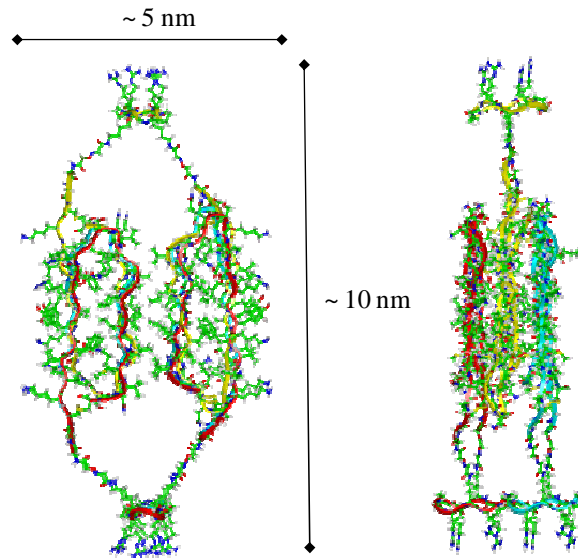


Figure 53 : Modélisation du protofilament pour le composé 2Loop 18 pour la formation de feuillets β croisés antiparallèles

Pour le composé 2Lin 19, nous proposons, en accord avec la structure de l'édifice 2Loop 18 et les mesures en microscopie, l'arrangement présenté en figure 54.

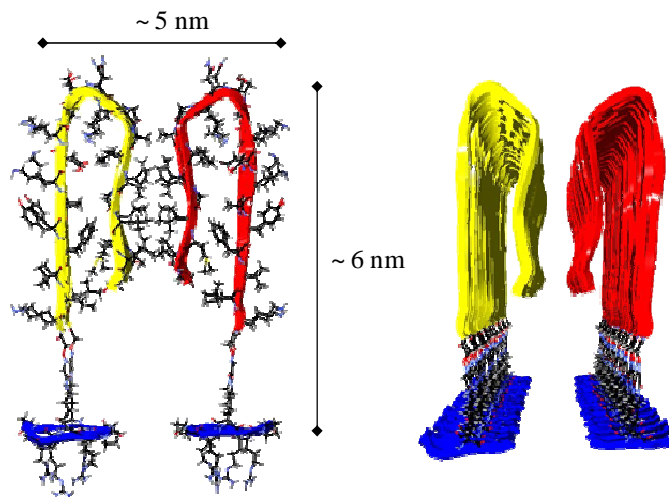


Figure 54 : Structure proposée du protofilament pour le composé 2Lin 19

De même, le composé 4Loop 20 s'assemble pour former les protofilaments, en accord avec la microscopie et les précédentes structures, comme représenté dans la figure 55.

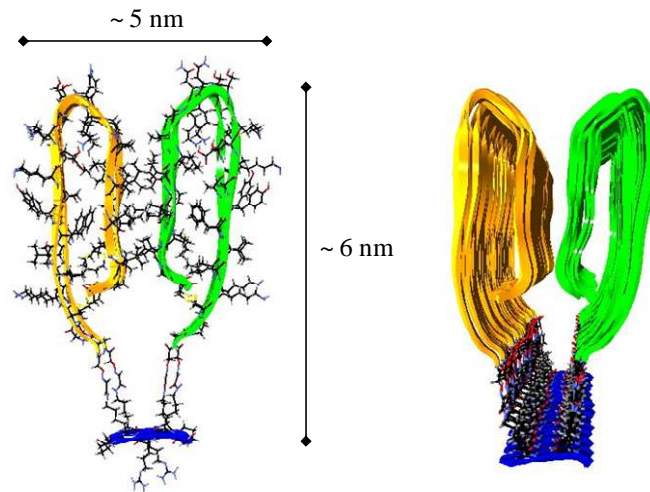


Figure 55 : Structure proposée du protofilament du composé 4Loop 20

L'étude par modélisation moléculaire nous confirme donc que tous les édifices peuvent former un protofilament de 5 à 6 nm de diamètre par la formation de feuillets β croisés parallèles.

D'après ces résultats, il est possible d'énoncer plusieurs conclusions :

- la formation d'un protofilament de 5 à 6 nm de diamètre résulte de l'interaction entre quatre fragments peptidiques portés par le même cyclodécapeptide (4Lin et 4Loop) ou qui résulte de l'association de deux molécules (2Lin et 2Loop) ;
- dans tous les cas, le repliement en boucle est nécessaire pour la formation du protofilament ;
- les interactions hydrophobes intra-brins et inter-brins s'organisent perpendiculairement à l'axe du protofilament et forment un cœur hydrophobe ;
- les édifices forment des feuillets β croisés parallèles et colinéaires à l'axe du protofilament ;
- le pont disulfure dans les composés contraints peut avoir un impact sur la morphologie des fibres et sur l'interaction avec la thioflavine T.

A.5.3. Mécanisme proposé pour le repliement des édifices

Nous avons observé de nombreuses différences selon les édifices dans le processus de repliement et de formation des protofilaments.

L'étude par microscopie électronique nous a tout d'abord montré que les édifices 2Lin 19, 2Loop 18, 4Lin 21 et 4Loop 20 s'associent tous pour former des protofilaments dont les diamètres ne sont pas inférieurs à 5 nm. Comme nous l'avons vu précédemment, cela implique que l'unité de base du protofilament est composée de quatre brins β associés par des interactions hydrophobes.

Par ailleurs, la structuration en feuillet β est réalisée, dans le cas du composé 2Loop 18, en 1 heure alors que pour le composé 2Lin 19, 96 heures sont nécessaires (Figure 40). De plus, nous avons visualisé des protofilaments après 6 heures pour le composé 2Loop 18, alors qu'il est nécessaire d'attendre 71 heures pour le composé 2Lin 19 (Figure 43 et Figure 45).

Ces résultats démontrent que dans le cas des édifices à deux fragments (2Lin/2Loop), la pré-organisation en boucle permet d'accélérer la formation des protofilaments car elle favorise la structure brin β -boucle-brin β . En effet, cette pré-organisation permet de présenter

une face hydrophobe qui va interagir avec celle d'un deuxième édifice (interactions hydrophobes inter-brins).

D'après ces résultats, nous proposons un mécanisme de repliement des édifices conduisant à la formation du protofilament qui tient compte des principes suivants :

- repliement en structure boucle de type brin β -boucle-brin β ;
- interactions entre au minimum quatre brins β amyloïdes pour former un cœur hydrophobe au centre du protofilament ;
- élongation du protofilament par formation de feuillettes β croisés parallèles.

Ce processus est schématisé dans la figure 56.

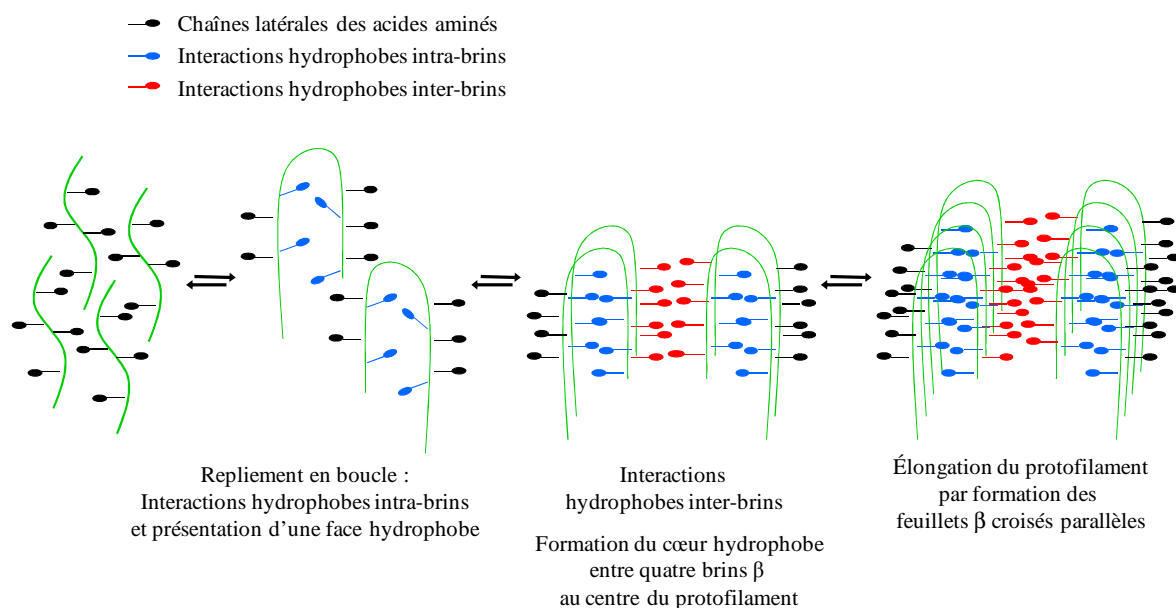


Figure 56 : Mécanisme de repliement des édifices pour la formation du protofilament

Le processus est tout d'abord initié par le repliement du peptide en boucle et la mise en place d'interactions intra-brins hydrophobes (bleu) entre les chaînes latérales. Ce repliement permet de présenter une zone hydrophobe qui conduit à l'association avec un autre peptide replié par des interactions hydrophobes inter-brins (rouge). Il y a alors formation d'un cœur hydrophobe entre les quatre brins β au centre de l'assemblage. L'élongation du protofilament résulte ensuite de l'auto-association de cette structure par la création des feuillettes β croisés parallèles.

A.5.4. Mode d'interaction de la Thioflavine T

Nous avons constaté précédemment que la fluorescence de la ThT en présence des édifices peptidiques n'a pas la même intensité.

La thioflavine T est l'un des colorants avec le rouge congo le plus utilisé pour l'identification de dépôts amyloïdes. Cependant, malgré sa grande utilisation, le mécanisme d'émission de fluorescence de la ThT et le mode d'interaction avec les fibres ne sont pas à ce jour clairement élucidés.

La ThT est formée de deux cycles, benzothiazole et benzaminique, en libre rotation autour de la liaison C-C. La rotation libre entre ces deux cycles entrainerait une extinction de

la fluorescence par relaxation non radiative.¹²⁸ Par contre, lorsque la ThT est en interaction avec les fibres, la rotation des cycles autour de la liaison n'est plus possible augmentant ainsi le rendement de fluorescence.

Le mode d'interaction entre la ThT et les fibres est le sujet de nombreuses hypothèses. Par exemple, Krebs et al. propose que l'interaction de la ThT ait lieu le long de l'axe de la fibre dans les « sillons » formés par les chaînes latérales des résidus lors de la formation du feuillet β (Figure 57).¹²⁹ Ce lieu d'interaction est organisé le long du protofilament perpendiculairement au feuillet β . La distance dans les « sillons » est comprise entre 6,5 et 6,95 Å. La ThT mesure 6,1 Å le long de son petit axe, 15,2 Å le long de son grand axe et son épaisseur est de 4,3 Å. La ThT se lierait dans les « sillons » avec son petit axe perpendiculaire à l'axe de la fibre empilée entre les chaînes latérales des résidus. C'est cette interaction avec les chaînes latérales qui empêche la libre rotation entre les deux cycles de la ThT et augmente ainsi le rendement de fluorescence.

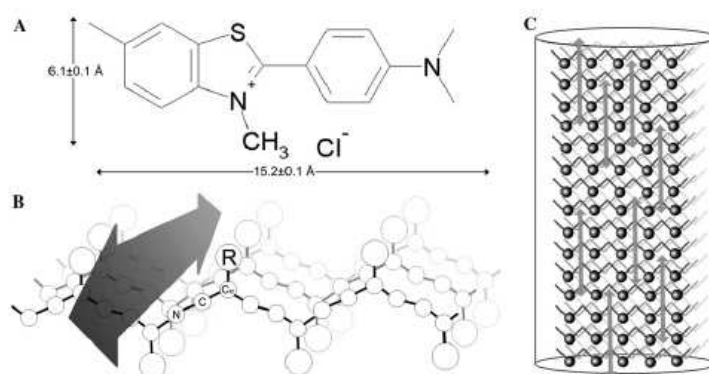


Figure 57 : Mode d'interaction proposé de la ThT avec les fibres amyloïdes

Pour Groenning et al. la ThT se lie sous forme d'un dimère dans la cavité central de la fibre ou à l'interface entre les protofibres.¹³⁰

Dans notre étude, nous avons observé une intensité de fluorescence supérieure pour les édifices avec les fragments linéaires (2Lin/4Lin) comparé à leurs équivalents bouclés (2Loop/4Loop). Les études par modélisation moléculaire n'ont pas montré de différences significatives dans la géométrie des sillons formés pour les surfaces externes des brins β . Il est donc difficile de concevoir une interaction de la ThT entre les chaînes latérales des résidus situés à l'extérieur des boucles. Par contre, il paraît plus logique de supposer que la ThT se positionne à l'intérieur du cœur hydrophobe des boucles (Figure 58). Dans le cas des composés linéaires la flexibilité des brins β , non contraints par le pont disulfure permet plus facilement d'accommoder la ThT dans une conformation optimale pour l'émission de la fluorescence. Une telle optimisation est moins évidente pour les composés bouclés. Ce mode de fixation permet d'expliquer pourquoi la molécule 2Lin répond positivement à la ThT alors que son spectre CD ne correspond pas à celui d'un feuillet β . En effet, la ThT peut venir interagir avec la zone à l'intérieur de la zone hydrophobe formée par les brins β sans qu'il n'y ait pour autant structuration en feuillet β (Figure 58).

¹²⁸ Stsiapura, V. I.; Maskevich, A. A.; Kuzmitsky, V. A.; Turoverov, K. K.; Kuznetsova, I. M. Computational study of thioflavin T torsional relaxation in the excited state. *J. Phys. Chem. A* **2007**, 111, 4829-4835.

¹²⁹ Krebs, M. R.; Bromley, E. H.; Donald, A. M. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J. Struct. Biol.* **2005**, 149, 30-37.

¹³⁰ Groenning, M.; Norrman, M.; Flink, J. M.; van de Weert, M.; Bukrinsky, J. T.; Schluckebier, G.; Frokjaer, S. Binding mode of Thioflavin T in insulin amyloid fibrils. *J. Struct. Biol.* **2007**, 159, 483-497.

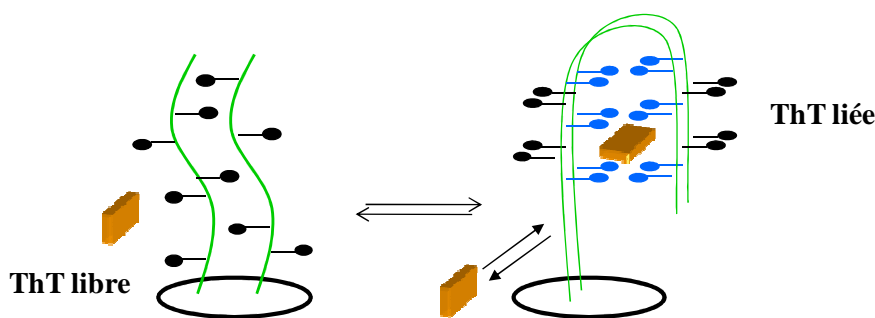


Figure 58 : Mode d'interaction de la ThT

A.6. Outil de criblage à haut débit

Nous avons vu précédemment que les molécules modèles conçues ont pour but principal de déterminer les caractéristiques qui guident le processus d'assemblage en fibre et sont donc considérées comme des modèles structuraux ou d'étude du repliement.

Au vue de la rapidité de formation des fibres, par l'ajout de tampon phosphate, de l'édifice $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$, 4Lin **21**, il a semblé intéressant de l'utiliser comme outil afin d'identifier de manière rapide et fiable des inhibiteurs de la formation des fibres amyloïdes. Nous avons ainsi réalisé une étude de l'activité d'un certain nombre d'inhibiteurs connus de la formation de fibres β amyloïdes pour valider l'utilisation de l'édifice $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ comme outil de criblage à haut débit (Cf Annexe I).¹³¹

La méthode consiste à incuber 5 μ M du composé 4Lin **21** et 10 μ M de ThT dans une microplaque 96 puits avec un potentiel inhibiteur dans une gamme de concentration de 0,01 μ M à 100 μ M. La formation des fibres est initiée par l'ajout de 5 mM de tampon phosphate pH 7,1 et la fluorescence est lue par un lecteur microplaque de fluorescence toute les minutes pendant 60 minutes. Le signal de fluorescence à 485 nm augmente de manière exponentielle et dans le cas d'une inhibition une diminution du maximum de fluorescence est observée.

La bonne corrélation entre les activités d'inhibition obtenues avec le composé 4Lin **21** et celles décrites dans la littérature nous a permis de valider l'utilisation de l'édifice $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ comme outil de criblage à haut débit (Cf Annexe I). Sa qualité a été évaluée par le calcul du facteur Z qui caractérise la différence entre une réponse positive et négative. Nous l'avons évalué à $0,84 \pm 0,03$ qui le qualifie de très bon outil de criblage à haut débit.

Enfin, cette étude a permis de faire un classement de l'activité des inhibiteurs selon les IC_{50} déterminées.

¹³¹ Dolphin, G. T.; Ouberai, M.; Dumy, P.; Garcia, J. Designed amyloid beta peptide fibril - a tool for high-throughput screening of fibril inhibitors. *ChemMedChem* **2007**, 2, 1613-1623.

A.7. Bilan

Le repliement anormal de peptides et protéines se traduisant par la formation de fibres amyloïdes est à l'origine de nombreuses pathologies regroupées sous le terme d'amyloses. Ces protéines qui n'ont pas de relations fonctionnelles et structurales communes se replient en feuillets β croisés pour former des fibres avec de nombreuses caractéristiques similaires. La structure des fibres au niveau atomique ainsi que le mécanisme de repliement ne sont pas à ce jour clairement élucidés de par leur solubilité limitée et la rapidité d'agrégation.

Afin de déterminer les principes physico-chimiques qui guident ce repliement de nombreuses molécules modèles de fibres amyloïdes ont été conçues selon plusieurs approches. Ces approches consistent, entre autre, à la caractérisation de courts fragments de protéines amyloïdes, à l'étude de la fibrillogénèse en fonction de mutations, à la conception de peptides *de novo* ou l'utilisation de peptides « switch » et « coiled coil ». Ces modèles ont permis de montrer l'importance des interactions hydrophobes entre les chaînes latérales des résidus qui forment un cœur hydrophobe essentiel à la formation des fibres.

Au cours de ce travail, nous avons synthétisé quatre molécules modèles de fibres amyloïdes par la synthèse d'édifices peptidiques nommés 2Lin **19**, 4Lin **21**, 2Loop **18** et 4Loop **20**. Pour cela, nous avons lié sur un cyclodécapeptide deux ou quatre exemplaires d'un segment muté, linéaire ou cyclisé, du peptide β amyloïde. Le but est de pré-organiser les fragments amyloïdes pour faciliter le repliement.

Les édifices ont été construits par la formation du lien chimiosélectif éther d'oxime entre les fragments amyloïdes et les cyclodécapeptides totalement déprotégés. Cette méthode a permis la synthèse des édifices avec un minimum d'étapes de purification et de manipulations en solution de ces séquences sensibles aux conditions expérimentales.

Nous avons montré, par différentes techniques physico-chimiques, que tous les édifices s'assemblent en fibres amyloïdes lors de leur incubation dans un tampon phosphate de sodium. Ils se structurent en feuillets β croisés et forment des protofilaments de 5 à 6 nm de diamètre. A l'aide de la modélisation moléculaire, nous avons déterminé que tous les édifices adoptent une structure boucle de type brin β -boucle-brin β pour créer un cœur hydrophobe entre quatre brins β au centre du protofilament. Ces processus de repliement sont nécessaires pour initier l'assemblage en protofilament par la mise en place de feuillets β croisés parallèles. Les modèles de protofilaments proposés sont en accord avec des travaux de la littérature.

De plus, nous avons vu que les conditions expérimentales et notamment la nature des anions ont une influence significative sur le processus de fibrillogénèse. Même si leur mécanisme d'action n'est pas clairement défini, ils semblent être à l'origine du processus par neutralisation des charges ou effet « salting out ».

Par ailleurs, nous avons proposé, en accord avec de précédents travaux, que la ThT interagit dans les « sillons » formés par les chaînes latérales des résidus à l'intérieure de la structure brin β -boucle-brin β .

Enfin, nous avons montré l'intérêt de l'utilisation de l'un des édifices comme outil de criblage à haut débit performant pour l'identification de molécules cibles inhibant le processus de formation des fibres.

PARTIE B

B. Inhibiteurs de la fibrillogénèse

De nombreuses stratégies thérapeutiques sont actuellement en développement pour cibler différents processus de la maladie d'Alzheimer. Parmi ces derniers, la formation des fibres amyloïdes est largement acceptée comme étant impliquée dans la neurotoxicité même si les agents responsables et le mécanisme ne sont pas clairement connus. Ainsi, la prévention de la polymérisation du peptide A β est devenue un vaste domaine de recherche qui a conduit au développement de nombreux inhibiteurs de la formation des fibres.

Cette approche est basée sur la découverte, dans les années 90, de molécules comme le rouge congo qui, en interagissant spécifiquement avec les fibres amyloïdes, empêchent leur formation. Depuis, dans la littérature, de nombreuses molécules ont été décrites comme des inhibiteurs de la formation des fibres amyloïdes. Ces molécules sont de deux types : des peptides de séquences semblables à celle du peptide amyloïde et des composés non peptidiques avec parmi eux des pharmacophores le plus souvent aromatiques.

Nous nous sommes donc intéressés à la conception d'inhibiteurs de la fibrillogénèse comme stratégie thérapeutique contre les amyloses. Nous avons pour cela ciblé la formation des fibres du peptide A β qui est l'une des séquences amyloïdes les plus étudiées. Les inhibiteurs conçus reposent sur la présentation de molécules aromatiques et/ou hydrophobes sur un châssis moléculaire. Les assemblages synthétisés ont été ensuite évalués sur la formation des fibres du peptide A β_{40} par des expériences *in vitro*. Enfin, deux des assemblages ont été évalués en tant qu'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, autre cible de la maladie d'Alzheimer.

B.1. Inhibiteurs de la formation des fibres

B.1.1. Inhibiteurs peptidiques

Les inhibiteurs peptidiques de fibres amyloïdes se sont développés après l'identification des régions impliquées dans l'interaction entre les peptides A β . En effet, il est apparu que certains peptides, par leurs interactions avec ces régions, interfèrent avec le processus de formation de fibres. Ces inhibiteurs peptidiques sont communément appelés peptides « briseurs de feuillets β » (β sheet breaker peptide). Nous allons, dans cette partie, donner quelques exemples des approches utilisées pour concevoir ces inhibiteurs.

La séquence A β_{16-20} , KLVFF, identifiée comme une région de forte interaction entre les peptides A β a permis à l'équipe de Tjernberg de développer l'un des premiers peptides « briseurs de feuillets β ». ⁵⁸ En effet, le peptide AcQKLVFFNH₂, incubé avec une quantité équimolaire du peptide A β_{40} empêche la formation de fibres.

L'équipe de Findeis a ensuite décrit la synthèse d'une série de peptides dérivés des régions du peptide A β sur lesquels diverses modifications ont été introduites comme des mutations, l'ajout de pharmacophores ou l'utilisation d'acides aminés D. ¹³² Le dérivé choly-LVFFA-OH, qui consiste en un dérivé du cholestérol lié au fragment peptidique,

¹³² Findeis, M. A.; Musso, G. M.; Arico-Muendel, C. C.; Benjamin, H. W.; Hundal, A. M.; Lee, J. J.; Chin, J.; Kelley, M.; Wakefield, J.; Hayward, N. J.; Molineaux, S. M. Modified-peptide inhibitors of amyloid beta-peptide polymerization. *Biochemistry* **1999**, 38, 6791-6800.

s'est montré être un très bon inhibiteur avec une IC_{50} inférieure à 5 μM et une diminution de la neurotoxicité.

L'équipe de Chalifour a développé des inhibiteurs peptidiques basés sur l'utilisation d'acides aminés D.¹³³ En effet, le peptide D-KLVFFA réduit de manière significative la formation des fibres du peptide L-A β_{40} à un ratio de 1 pour 1. Comme cela a été montré précédemment, ce fragment permet une reconnaissance avec le peptide A β par homologie de séquence.⁵⁸ La présence d'acides aminés D empêche par son interaction avec le peptide A β la formation d'une structure riche en feuillet β . Par ailleurs, les peptides qui incluent des acides aminés D dans leur séquence réduisent de manière significative la neurotoxicité des peptides A β .

L'équipe de Ghanta propose d'associer un élément de reconnaissance, peptide de séquence A β_{15-25} avec un oligomère du résidu lysine choisi pour sa charge et sa polarité.¹³⁴ Cependant, ce peptide n'empêche pas la formation de fibres de l'A β_{39} . Par contre, il diminue la neurotoxicité suggérant que la prévention de l'agrégation n'est pas obligatoire pour un effet neuroprotecteur. Une étude réalisée par la suite montre que les peptides KLVFF avec en position C-terminale un élément perturbateur anionique, KLVFFEEEEEE, et cationique, KLVFFKKKK, réduisent la neurotoxicité alors qu'un élément neutre, KLVFFSSSS, est inefficace.¹³⁵ D'après les auteurs, ces inhibiteurs ne préviennent pas la formation de fibres amyloïdes mais augmentent la vitesse d'agrégation réduisant alors la quantité des oligomères solubles toxiques.

La même équipe a ensuite étudié l'effet du résidu arginine sur l'agrégation du peptide A β .¹³⁶ En effet, le résidu arginine considéré dans la série de Hofmeister comme chaotrope est utilisé pour supprimer l'agrégation de protéines dans les processus de repliement.^{137,138} Les auteurs ont étudié l'influence du résidu arginine seul ou incorporé dans l'élément perturbateur : si le résidu arginine est chaotrope cela implique que son effet dépend de son interaction avec le peptide. Cependant, bien que le résidu arginine soit considéré comme chaotrope, il est connu qu'il augmente la tension de surface en solution aqueuse et stabilise certaines protéines.¹³⁹ Dans ces travaux le peptide KLVFFRRRRR amplifie l'agrégation du peptide A β et la tension de surface. D'après les auteurs, les résidus arginines de ce peptide ne peuvent pas interagir avec le peptide A β et ainsi l'effet «salting out» prédominant, conduit à l'augmentation des interactions hydrophobes et à l'agrégation.

¹³³ Chalifour, R. J.; McLaughlin, R. W.; Lavoie, L.; Morissette, C.; Tremblay, N.; Boule, M.; Sarazin, P.; Stea, D.; Lacombe, D.; Tremblay, P.; Gervais, F. Stereoselective interactions of peptide inhibitors with the beta-amyloid peptide. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 34874-34881.

¹³⁴ Ghanta, J.; Shen, C. L.; Kiessling, L. L.; Murphy, R. M. A strategy for designing inhibitors of beta-amyloid toxicity. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 29525-29528.

¹³⁵ Lowe, T. L.; Strzelec, A.; Kiessling, L. L.; Murphy, R. M. Structure-function relationships for inhibitors of beta-amyloid toxicity containing the recognition sequence KLVFF. *Biochemistry* **2001**, 40, 7882-7889.

¹³⁶ Gibson, T. J.; Murphy, R. M. Design of peptidyl compounds that affect beta-amyloid aggregation: importance of surface tension and context. *Biochemistry* **2005**, 44, 8898-8907.

¹³⁷ Cacace, M. G.; Landau, E. M.; Ramsden, J. J. The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena. *Q. Rev. Biophys.* **1997**, 30, 241-277.

¹³⁸ a) Arakawa, T.; Tsumoto, K. The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: not facilitate refolding, but suppress aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 304, 148-152. b) Xie, Q.; Guo, T.; Lu, J.; Zhou, H. M. The guanidine like effects of arginine on aminoacylase and salt-induced molten globule state. *Int J. Biochem. Cell Biol* **2004**, 36, 296-306.

¹³⁹ a) Kita, Y.; Arakawa, T.; Lin, T. Y.; Timasheff, S. N. Contribution of the surface free energy perturbation to protein-solvent interactions. *Biochemistry* **1994**, 33, 15178-15189. b) Tsumoto, K.; Umetsu, M.; Kumagai, I.; Ejima, D.; Philo, J. S.; Arakawa, T. Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnol Prog* **2004**, 20, 1301-1308.

Les acides aminés *N*-méthylés ont été largement utilisés pour la conception de peptides « briseurs de feuillets β ». Ces acides aminés déstabilisent le feuillet β en empêchant la formation de liaisons hydrogène et induisent une gêne stérique pour l'interaction entre les peptides amyloïdes.¹⁴⁰ L'équipe de Hughes utilise des dérivés de l'A β ₂₅₋₃₅ *N*-méthylés comme stratégie pour inhiber la formation des fibres de l'A β ₂₅₋₃₅.¹⁴¹ En effet, le peptide A β ₂₅₋₃₅ *N*-méthylé sur la position Gly-33 prévient la formation des fibres et réduit la toxicité des fibres préformées.

L'équipe de Gordon montre que le peptide NH₂-K(Me-L)V(Me-F)F(Me-A)E-CONH₂ inhibe la formation des fibres amyloïdes et désassemble les fibres préformées.¹⁴² Ce peptide présente par l'arrangement des acides aminés *N*-méthylés deux faces : une face d'interaction avec le peptide A β et une face qui empêche l'interaction entre les peptides A β .

L'introduction du résidu proline dans la séquence du peptide inhibiteur est une autre approche qui est développée par l'équipe de Soto.¹⁴³ Le résidu proline est choisi pour sa capacité à former des coudes ce qui le rend incompatible avec la formation du feuillet β . Le peptide LPFFD (iA β 5) réduit de plus de 50 % la formation des fibres du peptide A β pour un ratio 10/1 (LPFFD/A β). Ce peptide injecté dans un modèle animal de la maladie d'Alzheimer induit une diminution de plus de 60 % du dépôt amyloïde. Enfin, le peptide iA β 5 augmente la survie neuronale et passe la barrière hémato-encéphalique.¹⁴⁴

Afin de déterminer le mode d'interaction en solution d'un peptide inhibiteur avec l'A β , l'équipe de Rzepecki a développé un peptide hybride soluble en milieu aqueux contenant deux ligands aminopyrazole pour la formation de liaisons hydrogène. Ce peptide hybride interagit de manière spécifique avec la région KLVFF par formation de liaisons hydrogène et interactions hydrophobes entre le noyau aminopyrazole et les résidus Phe.¹⁴⁵

L'équipe de Sato développe un inhibiteur spécifique par complémentarité de la séquence IxGxMxG de la partie C-terminale du peptide A β .¹⁴⁶ L'approche est basée sur la formation de « sillons » à la surface du feuillet β créés par la présence des résidus Gly-33 et Gly-37 et de l'alternance IxGxMxG qui stabilisent la structure lorsque le peptide est replié. Une série de peptides, avec une alternance de résidus glycines et phénylalanines (GxF/BxGxF/B) ou d'autres résidus (B) comme la leucine ou la tyrosine, est synthétisée pour interagir avec les « sillons » du feuillet β . Différents peptides de cette série réduisent

¹⁴⁰ Tonelli, A. The effects of isolated *N*-methylated residues on the conformational characteristics of polypeptides. *Biopolymers* **1976**, 15, 1615-1622.

¹⁴¹ Hughes, E.; Burke, R. M.; Doig, A. J. Inhibition of toxicity in the beta-amyloid peptide fragment beta - (25-35) using *N*-methylated derivatives: a general strategy to prevent amyloid formation. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 25109-25115.

¹⁴² Gordon, D. J.; Sciarretta, K. L.; Meredith, S. C. Inhibition of beta-amyloid(40) fibrillogenesis and disassembly of beta-amyloid(40) fibrils by short beta-amyloid congeners containing *N*-methyl amino acids at alternate residues. *Biochemistry* **2001**, 40, 8237-8245.

¹⁴³ Soto, C.; Kindy, M. S.; Baumann, M.; Frangione, B. Inhibition of Alzheimer's amyloidosis by peptides that prevent beta-sheet conformation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 226, 672-680.

¹⁴⁴ Permann, B.; Adessi, C.; Saborio, G. P.; Fraga, S.; Frossard, M. J.; Van Dorpe, J.; Dewachter, I.; Banks, W. A.; Van Leuven, F.; Soto, C. Reduction of amyloid load and cerebral damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by treatment with a beta-sheet breaker peptide. *FASEB J.* **2002**, 16, 860-862.

¹⁴⁵ Rzepecki, P.; Schrader, T. beta-Sheet ligands in action: KLVFF recognition by aminopyrazole hybrid receptors in water. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 3016-3025.

¹⁴⁶ Sato, T.; Kienlen-Campard, P.; Ahmed, M.; Liu, W.; Li, H.; Elliott, J. I.; Aimoto, S.; Constantinescu, S. N.; Octave, J. N.; Smith, S. O. Inhibitors of amyloid toxicity based on beta-sheet packing of Abeta40 and Abeta42. *Biochemistry* **2006**, 45, 5503-5516.

significativement l'agrégation du peptide $A\beta_{40}$ et la neurotoxicité. Une étude par RMN du solide montre que le peptide, $NH_3^+RGTFEGKF-CONH_2$, interagit avec les résidus de la partie C-terminale en accord avec la stratégie développée (Figure 59).

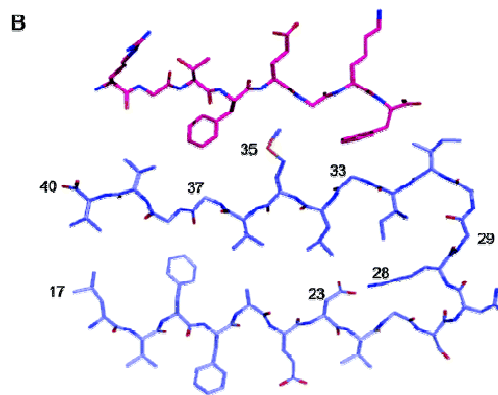


Figure 59 : Interaction proposée entre le peptide $A\beta_{40}$ et le peptide $NH_3^+RGTFEGKF-CONH_2$ ¹⁴⁶

Enfin, l'équipe de Austen a conçu une série de peptides pour cibler spécifiquement les oligomères solubles responsables de la toxicité.¹⁴⁷ Le peptide RGKLVFFGR basé sur la séquence $A\beta_{16-20}$ inhibe spécifiquement la formation des oligomères mis en évidence par des expériences ELISA et de chromatographie d'exclusion. Ce peptide est alors le seul de la série à diminuer la toxicité de l' $A\beta$.

B.1.2. Inhibiteurs non peptidiques

Ces dernières années, de nombreuses molécules issues de différentes classes chimiques ont été évaluées contre la formation de fibres amyloïdes.

Ces molécules possèdent en général une activité biologique et leur propriété par exemple anti-oxydante ou leur facilité à traverser la barrière hémato-encéphalique, a conduit à leur évaluation contre la formation des fibres. D'autres composés sont issus de criblages et ont souvent en commun d'être des molécules aromatiques ou hydrophobes.

Nous allons présenter dans ce paragraphe des exemples de molécules représentatives des principales grandes classes d'inhibiteurs de la formation de fibres (Tableau 2).

¹⁴⁷ Austen, B. M.; Paleologou, K. E.; Ali, S. A.; Qureshi, M. M.; Allsop, D.; El-Agnaf, O. M. Designing peptide inhibitors for oligomerization and toxicity of Alzheimer's beta-amyloid peptide. *Biochemistry* **2008**, 47, 1984-1992.

Classe	Composés	Structure
Dérivés sulfatés	Rouge Congo	
	Chlorazol Black E	
Polyphénols	4'-iodo-4'-déoxydoxorubicine	
	Tétracycline	
	Doxycycline	
	Rifampicine	
	Acide nordihydroguaiaretique	
	Curcumin	
Hétérocycle aromatique	Bleu de méthylène	
	Thionine	
	Acridine orange	
Porphyrine	Chlorure d'Hémine	
Benzothiazole	Thioflavine T	
	Basic blue 41	
Autres	Nicotine	
	Acide lipoiq	

Tableau 2 : Structure de la thioflavine T et d'inhibiteurs de la formation de fibres

★ Colorants sulfatés

En 1994, Lorenzo et al. décrivent que le colorant sulfaté rouge congo se lie aux peptides A β et empêche la formation des fibres du peptide A β ₄₀.²⁷ De plus, le rouge congo inhibe la neurotoxicité induite par les peptides A β . Il est alors apparu que les molécules capables d'interagir avec le peptide amyloïde empêchent la formation de fibres et préviennent la neurotoxicité. Le chlorazol black E, dérivé sulfaté de structure très proche du rouge congo, est décrit comme un puissant inhibiteur de fibres avec une IC₅₀ évaluée à 0,3 μ M.¹⁴⁸

★ Polyphénols

De très nombreux inhibiteurs de la formation de fibres sont issus de la famille des polyphénols et possèdent très souvent une forte activité. En effet, cette famille regroupe entre autre des inhibiteurs comme la 4'-iodo-4'-déoxydoxorubicine (IDX), la rifampicine, l'acide nordihydroguaiarétique, la myricétine, le curcumin ou la dopamine. De plus, les polyphénols par leur propriété antioxydante ont très souvent montré une activité de prévention de la toxicité des fibres.

Le point de départ fut l'observation que la 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicine (IDX), anthracycline possédant une activité anti-tumorale, permet une amélioration des signes cliniques chez des patients atteints d'amyloses AL et une résorption du dépôt amyloïdes.¹⁴⁹ En effet, IDX possède une forte affinité pour cinq types naturels de fibres amyloïdes dont les fibres issues du peptide A β et réduit d'autre part, le dépôt des fibres de l'insuline.¹⁴⁹ De plus, le traitement de hamsters Syrian avec des homogénats de cerveaux infectés avec la forme du prion PrP^{Sc} co-incubé avec IDX diminue les symptômes et augmente la survie des animaux infectés.¹⁵⁰

Les molécules comme la tétracycline et la doxycycline inhibent la formation de fibres amyloïdes et désassemblent les fibres préformées.¹⁵¹ Ces molécules diminuent aussi la résistance de l'A β ₄₂ à la digestion par la trypsine. L'activité de ces molécules est attribuée à une certaine analogie structurale avec des molécules comme le rouge congo.¹⁵¹ En effet, elles possèdent un cœur hydrophobe formé par des groupes aromatiques permettant des interactions avec les résidus hydrophobes des peptides amyloïdes. Elles possèdent, de plus, des substituants polaires qui peuvent former des liaisons hydrogène avec des résidus spécifiques de la séquence du peptide A β .

La rifampicine et ses analogues ont été également évalués. Les molécules possédant la structure naphthohydroquinone ou naphthoquinone inhibent la formation de fibres ainsi que leur neurotoxicité à des concentrations de l'ordre du micro-molaire. La diminution de

¹⁴⁸ Taniguchi, S.; Suzuki, N.; Masuda, M.; Hisanaga, S.; Iwatsubo, T.; Goedert, M.; Hasegawa, M. Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 7614-7623.

¹⁴⁹ Merlini, G.; Ascari, E.; Amboldi, N.; Bellotti, V.; Arbustini, E.; Perfetti, V.; Ferrari, M.; Zorzoli, I.; Marinone, M. G.; Garini, P.; et al. Interaction of the anthracycline 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin with amyloid fibrils: inhibition of amyloidogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, 92, 2959-2963.

¹⁵⁰ Tagliavini, F.; McArthur, R. A.; Canciani, B.; Giaccone, G.; Porro, M.; Bugiani, M.; Lievens, P. M.; Bugiani, O.; Peri, E.; Dall'Ara, P.; Rocchi, M.; Poli, G.; Forloni, G.; Bandiera, T.; Varasi, M.; Suarato, A.; Cassutti, P.; Cervini, M. A.; Lanssen, J.; Salmona, M.; Post, C. Effectiveness of anthracycline against experimental prion disease in Syrian hamsters. *Science* **1997**, 276, 1119-1122.

¹⁵¹ Forloni, G.; Colombo, L.; Girola, L.; Tagliavini, F.; Salmona, M. Anti-amyloidogenic activity of tetracyclines: studies in vitro. *FEBS Lett.* **2001**, 487, 404-407.

la toxicité est attribuée à la propriété de piègeurs de radicaux libres de ce type de structure.¹⁵²

L'acide nordihydroguaiaretique (NDGA) est un autre polyphénol, puissant inhibiteur de la formation de fibres. En effet, l'IC₅₀ de cette molécule de 0,14 µM sur la polymérisation des fibres de l'Aβ₄₀ lui confère une activité supérieure à d'autres polyphénols comme la rifampicine ou la myricétine (0,29 µM).¹⁵³ Cependant, son activité de déstabilisation des fibres n'est pas clairement établie. D'après les travaux de Ono et al., le NDGA déstabilise les fibres formées de l'Aβ₄₀ et de l'Aβ₄₂ même à une concentration de 0,1 µM, visualisée par la diminution de la fluorescence de la ThT.¹⁵⁴ Les travaux de Moss et al. suggèrent que le NDGA déplace seulement la ThT de son site d'interaction entraînant ainsi une diminution de la fluorescence.¹⁵⁵ En effet, une étude par microscopie électronique et chromatographie d'exclusion confirme la présence de fibres amyloïdes.

L'équipe de Ono a montré par la suite que le curcumin possède, comme le NDGA, une très bonne activité inhibitrice sur la formation de fibres amyloïdes avec une IC₅₀ évaluée à 0,19 µM.¹⁵⁶ Le curcumin est l'un des composants du curry jaune très utilisé en Inde. Il est connu pour ses propriétés de puissant piègeur de radicaux libres, son activité anti-inflammatoire et comme potentiel agent anticancéreux.¹⁵⁷ Lim et al. ont mis en évidence que le curcumin réduit les dommages oxydatifs et diminuent la présence de dépôts amyloïdes chez un modèle de souris transgénique de la maladie d'Alzheimer.¹⁵⁸

L'équipe de Yang a ensuite réalisé une étude *in vitro* et *in vivo* de l'activité du curcumin. Les résultats obtenus renforcent son utilisation en tant qu'agent thérapeutique de la maladie d'Alzheimer.¹⁵⁹ En effet, le curcumin en plus d'inhiber la formation de fibres (IC₅₀ = 0,8 µM), déstabilise les fibres formées (IC₅₀ = 1 µM) et traverse la barrière hémato-encéphalique pour interagir et supprimer l'accumulation de dépôts amyloïdes chez la souris.

★ Hétérocycles aromatiques

Dans la famille des hétérocycles aromatiques, une série de phénothiazines a été évaluée sur l'inhibition de l'agrégation de la protéine Tau. Dans cette série, le bleu de

¹⁵² Tomiyama, T.; Shoji, A.; Kataoka, K.; Suwa, Y.; Asano, S.; Kaneko, H.; Endo, N. Inhibition of amyloid beta protein aggregation and neurotoxicity by rifampicin. Its possible function as a hydroxyl radical scavenger. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 6839-6844.

¹⁵³ Ono, K.; Yoshiike, Y.; Takashima, A.; Hasegawa, K.; Naiki, H.; Yamada, M. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2003**, 87, 172-181.

¹⁵⁴ Ono, K.; Hasegawa, K.; Yoshiike, Y.; Takashima, A.; Yamada, M.; Naiki, H. Nordihydroguaiaretic acid potently breaks down pre-formed Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *J. Neurochem.* **2002**, 81, 434-440.

¹⁵⁵ Moss, M. A.; Varvel, N. H.; Nichols, M. R.; Reed, D. K.; Rosenberry, T. L. Nordihydroguaiaretic acid does not disaggregate beta-amyloid(1-40) protofibrils but does inhibit growth arising from direct protofibril association. *Mol. Pharmacol.* **2004**, 66, 592-600.

¹⁵⁶ Ono, K.; Hasegawa, K.; Naiki, H.; Yamada, M. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *J. Neurosci. Res* **2004**, 75, 742-750.

¹⁵⁷ Pereira, M. A.; Grubbs, C. J.; Barnes, L. H.; Li, H.; Olson, G. R.; Eto, I.; Juliana, M.; Whitaker, L. M.; Kelloff, G. J.; Steele, V. E.; Lubet, R. A. Effects of the phytochemicals, curcumin and quercetin, upon azoxymethane-induced colon cancer and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary cancer in rats. *Carcinogenesis* **1996**, 17, 1305-1311.

¹⁵⁸ Lim, G. P.; Chu, T.; Yang, F.; Beech, W.; Frautschy, S. A.; Cole, G. M. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J. Neurosci.* **2001**, 21, 8370-8377.

¹⁵⁹ Yang, F.; Lim, G. P.; Begum, A. N.; Ubeda, O. J.; Simmons, M. R.; Ambegaokar, S. S.; Chen, P. P.; Kaye, R.; Glabe, C. G.; Frautschy, S. A.; Cole, G. M. Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 5892-5901.

méthylène empêche l'interaction entre les protéines Tau et inhibe la formation de dépôts amyloïdes avec une activité de l'ordre du micro-molaire.¹⁶⁰ Très récemment, lors de l'évaluation en phase clinique II, il est démontré qu'il permet une diminution de la progression de la maladie d'Alzheimer.¹⁶¹

En plus d'être des inhibiteurs de l'agrégation de la protéine Tau, le bleu de méthylène et la thionine sont aussi de puissants inhibiteurs de la formation des fibres du peptide A β avec des activités inférieures au micro-molaire.¹⁴⁸

Enfin l'acridine orange inhibe la formation de la protéine amyline humaine et des acridines diversement substituées inhibent la formation des fibres du lysozyme.¹⁶² La nature aromatique et la planéité des acridines sont désignées comme des éléments déterminants à l'inhibition des fibres amyloïdes.

★ Porphyrines et benzothiazoles

Parmi les autres classes d'inhibiteurs, les porphyrines sont des molécules connues pour leur activité contre la formation de fibres. En effet, les molécules chlorure d'hémine et hématine sont de forts inhibiteurs de la formation de fibres du peptide A β ₄₀ et A β ₄₂, IC₅₀ = 1 μ M, et atténuent la neurotoxicité.¹⁶³

Les benzothiazoles, classe de molécules dont fait partie la thioflavine T, ont été surtout développés comme agents d'imagerie des dépôts amyloïdes.¹⁶⁴ Le 2-(4'-méthylaminophenyl)benzothiazole (BTA-1), dérivé non chargé de la thioflavine T possède une très forte affinité avec les fibres β amyloïdes et une bonne distribution dans le cerveau.¹⁶⁵ Le basic blue 41, autre benzothiazole, possède une forte activité d'inhibition de la formation des fibres β amyloïdes de l'ordre du micro-molaire.^{131,148}

★ Autres composés

La nicotine a été largement étudiée comme agent thérapeutique potentiel de la maladie d'Alzheimer. En effet, en 1994, il est suggéré que les fumeurs de cigarettes sont moins atteints par la maladie d'Alzheimer.¹⁶⁶ L'effet bénéfique de la nicotine serait attribué à son effet neuroprotecteur contre la toxicité de l'A β par la stimulation des récepteurs nicotiques chez les patients atteints de la maladie.¹⁶⁷ L'équipe de Zagorski

¹⁶⁰ Wischik, C. M.; Edwards, P. C.; Lai, R. Y.; Roth, M.; Harrington, C. R. Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 93, 11213-11218.

¹⁶¹ International Conference on Alzheimer's disease (ICAD), 26-31 July 2008, Chicago, USA.

¹⁶² Gazova, Z.; Bellova, A.; Daxnerova, Z.; Imrich, J.; Kristian, P.; Tomascikova, J.; Bagelova, J.; Fedunova, D.; Antalík, M. Acridine derivatives inhibit lysozyme aggregation. *Eur Biophys. J.* **2008**, 37, 1261-1270.

¹⁶³ Howlett, D.; Cutler, P.; Heales, S.; Camilleri, P. Hemin and related porphyrins inhibit beta-amyloid aggregation. *FEBS Lett.* **1997**, 417, 249-251.

¹⁶⁴ Zhuang, Z. P.; Kung, M. P.; Hou, C.; Skovronsky, D. M.; Gur, T. L.; Plossl, K.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M.; Kung, H. F. Radioiodinated styrylbenzenes and thioflavins as probes for amyloid aggregates. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 1905-1914.

¹⁶⁵ Klunk, W. E.; Wang, Y.; Huang, G. F.; Debnath, M. L.; Holt, D. P.; Shao, L.; Hamilton, R. L.; Ikonovic, M. D.; DeKosky, S. T.; Mathis, C. A. The binding of 2-(4'-methylaminophenyl)benzothiazole to postmortem brain homogenates is dominated by the amyloid component. *J. Neurosci.* **2003**, 23, 2086-2092.

¹⁶⁶ a) Lerner, A.; Koss, E.; Debanne, S.; Rowland, D.; Smyth, K.; Friedland, R. Smoking and oestrogen-replacement therapy as protective factors for Alzheimer's disease. *Lancet* **1997**, 349, 403-404. b) Ulrich, J.; Johansson-Locher, G.; Seiler, W. O.; Stahelin, H. B. Does smoking protect from Alzheimer's disease? Alzheimer-type changes in 301 unselected brains from patients with known smoking history. *Acta Neuropathol.* **1997**, 94, 450-454.

¹⁶⁷ a) Kihara, T.; Shimohama, S.; Sawada, H.; Kimura, J.; Kume, T.; Kochiyama, H.; Maeda, T.; Akaike, A. Nicotinic receptor stimulation protects neurons against beta-amyloid toxicity. *Ann. Neurol.* **1997**, 42, 159-163. b) Zamani, M. R.; Allen, Y. S.; Owen, G. P.; Gray, J. A. Nicotine modulates the neurotoxic effect of beta-amyloid protein(25-35) in hippocampal cultures. *Neuroreport* **1997**, 8, 513-517.

montre que la nicotine inhibe la formation des fibres du peptide β amyloïde basé sur des études par CD, UV et RMN.¹⁶⁸ L'équipe de Ono décrit ensuite que la nicotine déstabilise les fibres *in vitro* à une concentration supérieure à 10 mM.¹⁶⁹

L'acide lipoïque (LA) est une molécule non aromatique qui a montré une activité contre la formation de fibres. En effet, Zhang et al. ont montré que LA protège les neurones corticales contre la toxicité de H₂O₂ et de l'A β ₂₁₋₃₅.¹⁷⁰ L'acide lipoïque possède également une activité de l'ordre du micro-molaire pour l'inhibition des fibres β amyloïdes.¹⁷¹

Dans le but de mimer les effets de certaines composantes extracellulaires, dont les GAGs impliqués dans la maladie d'Alzheimer,^{42b} des molécules comme le 3-aminopropane sulfonate ont été développées. Ce composé, actuellement en phase clinique III, possède la propriété de se lier à l'A β et d'empêcher ainsi son agrégation.¹⁷²

Enfin, de nombreuses molécules de structures très diverses ont montré une activité d'inhibition de la formation de fibres. Parmi ces molécules, nous pouvons citer des cyclodextrines,¹⁷³ des anticorps,¹⁷⁴ des saccharides sulfatés,¹⁷⁵ l'antibiotique amphotéricine B,¹⁷⁶ des composés à longue chaîne carbonée comme le hexadecyl-N-méthylpiperidium,¹⁷⁷ ou de petites molécules aromatiques tels que le distilbene disulfonique,¹⁷⁸ des dérivés de 2-pyridone,¹⁷⁹ et l'aminanisole.¹⁸⁰

¹⁶⁸ a) Salomon, A. R.; Marcinowski, K. J.; Friedland, R. P.; Zagorski, M. G. Nicotine inhibits amyloid formation by the beta-peptide. *Biochemistry* **1996**, 35, 13568-13578. b) Zeng, H.; Zhang, Y.; Peng, L.; Shao, H.; Menon, N. K.; Yang, J.; Salomon, A. R.; Freidland, R. P.; Zagorski, M. G. Nicotine and amyloid formation. *Biol. Psychiatry* **2001**, 49, 248-257.

¹⁶⁹ Ono, K.; Hasegawa, K.; Yamada, M.; Naiki, H. Nicotine breaks down preformed Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Biol. Psychiatry* **2002**, 52, 880-886.

¹⁷⁰ Zhang, L.; Xing, G. Q.; Barker, J. L.; Chang, Y.; Maric, D.; Ma, W.; Li, B. S.; Rubinow, D. R. Alpha-lipoic acid protects rat cortical neurons against cell death induced by amyloid and hydrogen peroxide through the Akt signalling pathway. *Neurosci. Lett.* **2001**, 312, 125-128.

¹⁷¹ Ono, K.; Hirohata, M.; Yamada, M. Alpha-lipoic acid exhibits anti-amyloidogenicity for beta-amyloid fibrils in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 341, 1046-1052.

¹⁷² LeVine, H., 3rd. Small molecule inhibitors of Abeta assembly. *Amyloid* **2007**, 14, 185-197.

¹⁷³ Camilleri, P.; Haskins, N. J.; Howlett, D. R. beta-Cyclodextrin interacts with the Alzheimer amyloid beta-A4 peptide. *FEBS Lett.* **1994**, 341, 256-258.

¹⁷⁴ Solomon, B.; Koppel, R.; Frankel, D.; Hanan-Aharon, E. Disaggregation of Alzheimer beta-amyloid by site-directed mAb. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94, 4109-4112.

¹⁷⁵ Fraser, P. E.; Darabie, A. A.; McLaurin, J. A. Amyloid-beta interactions with chondroitin sulfate-derived monosaccharides and disaccharides. implications for drug development. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 6412-6419.

¹⁷⁶ Hartsel, S. C.; Weiland, T. R. Amphotericin B binds to amyloid fibrils and delays their formation: a therapeutic mechanism? *Biochemistry* **2003**, 42, 6228-6233.

¹⁷⁷ Wood, S. J.; MacKenzie, L.; Maleeff, B.; Hurle, M. R.; Wetzel, R. Selective inhibition of Abeta fibril formation. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 4086-4092.

¹⁷⁸ Xia, Z.; Tauskela, J.; Small, D. L. Disulfonic stilbenes prevent beta-amyloid (25-35) neuronal toxicity in rat cortical cultures. *Neurosci. Lett.* **2003**, 340, 53-56.

¹⁷⁹ Aberg, V.; Norman, F.; Chorell, E.; Westermark, A.; Olofsson, A.; Sauer-Eriksson, A. E.; Almqvist, F. Microwave-assisted decarboxylation of bicyclic 2-pyridone scaffolds and identification of Abeta-peptide aggregation inhibitors. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 2817-2823.

¹⁸⁰ De Felice, F. G.; Vieira, M. N.; Saraiva, L. M.; Figueroa-Villar, J. D.; Garcia-Abreu, J.; Liu, R.; Chang, L.; Klein, W. L.; Ferreira, S. T. Targeting the neurotoxic species in Alzheimer's disease: inhibitors of Abeta oligomerization. *FASEB J.* **2004**, 18, 1366-1372.

B.2. Conception des inhibiteurs

Au vue des structures très diverses qui empêchent la formation de fibres, il est difficile d'établir un rationnel et de définir des relations structure-activité. Cependant, deux approches émergent de ces exemples pour la conception d'inhibiteurs.

Une première approche consiste à utiliser des peptides analogues des séquences amyloïdes dans lesquels est introduit une perturbation afin d'empêcher leur auto-association. L'élément perturbateur peut être une partie de la séquence (coude, inversion configuration...) ou une molécule non peptidique qui introduit une gêne conformationnelle ou stérique.

La deuxième approche consiste à utiliser un composé non peptidique comme élément de reconnaissance qui, comme nous l'avons vu précédemment, est très souvent de type aromatique et/ou hydrophobe. Ce composé est à la fois l'élément de reconnaissance avec la séquence ou la structure amyloïde mais aussi l'élément qui empêche la polymérisation.

Ces approches consistent donc à combiner un élément de forte affinité, de reconnaissance avec la protéine ou le peptide amyloïde, avec un élément qui va interférer avec la formation d'une structure ordonnée.

Les travaux de Graef et col. illustrent très bien cette approche.¹⁸¹ En effet, les auteurs insistent sur la difficulté de bloquer les interactions entre les protéines du fait de la surface de contact importante et du peu de « hotspot » présents qui interagissent spécifiquement avec une molécule. De plus, ils mettent en avant la grande flexibilité des protéines pour s'accommoder de petites molécules. Il est alors peu probable pour de petites structures d'empêcher l'agrégation des peptides amyloïdes du fait de la gêne stérique limitée qu'elles induisent. Conscient de cette difficulté, ils ont ainsi synthétisé une molécule bifonctionnelle, SLF-CR, composée du rouge congo (CR) et d'un ligand (SLF) d'une chaperonne de la famille des peptidyl-prolyl isomérases, FKBP (Figure 60). Le rouge congo est l'élément de reconnaissance avec le peptide A β et le ligand SLF lorsqu'il est lié à la chaperonne volumineuse, est l'élément perturbateur à la polymérisation par gêne stérique.

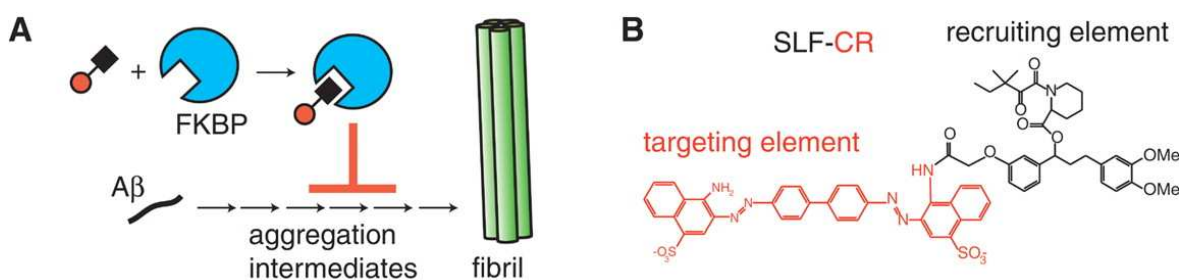


Figure 60 : A) Modèle du concept d'inhibition par l'interaction avec une chaperonne (FKBP) ; B) Structure d'une molécule bifonctionnelle SLF-CR¹⁸¹

L'une des molécules bifonctionnelles SLF-Benz-CR incubée en présence de la chaperonne et du peptide A β présente une IC₅₀ évaluée à 50 nM qui est 40 fois inférieure à celle du rouge congo seul. De plus, cette molécule présente un effet neuroprotecteur de la toxicité du peptide A β ₄₂. Ainsi, cette stratégie a permis la conception d'un puissant inhibiteur de la formation des fibres très prometteur en tant qu'agent thérapeutique de la maladie d'Alzheimer.

¹⁸¹ Gestwicki, J. E.; Crabtree, G. R.; Graef, I. A. Harnessing chaperones to generate small-molecule inhibitors of amyloid beta aggregation. *Science* **2004**, 306, 865-869.

Même si les mécanismes d'interaction avec le peptide β amyloïde et les inhibiteurs ne sont pas clairement élucidés, il semble que l'interaction prédominante est très souvent de nature hydrophobe et/ou aromatique.^{182,183} L'interaction entre ces composés et le peptide β amyloïde peut se situer dans la zone de la séquence contenant les résidus phénylalanines 19 et 20, les résidus isoleucines 31, 32 et les leucines 17, 34. Ces résidus sont très fortement impliqués dans le processus de formation de fibres. Il semble donc que plus l'affinité d'un composé pour ces zones hydrophobes ou aromatiques sera importante meilleure sera l'activité inhibitrice.

Une des approches envisagées pour augmenter l'affinité est la présentation multimérique d'un même composé pour augmenter la zone de contact avec le peptide β amyloïde et ainsi interférer dans le processus de repliement et de formation de fibres.

L'approche multimérique dans le cas de protéines amyloïdes a été introduite par May et al.¹⁸⁴ En effet, la forme bivalente d'un ligand acridine inhibe la conversion pathologique du prion dans un modèle cellulaire avec une activité nettement supérieure à la forme monomérique. Un deuxième exemple est l'inhibition de la protéine tau par la forme multimérique de thiocarbocyanine avec une activité quatre fois supérieure à la forme monomérique.¹⁸⁵

Chafekar et al. ont décrit la conception d'un tétramère de la séquence $A\beta_{16-20}$, KLVFF, comme puissant inhibiteur de la formation de fibres du peptide β amyloïde.¹⁸⁶ Le tétramère du peptide KLVFF (K_4) a été conçu par ligation native sur un dendrimère cystéine C_4 (Figure 61). L'étude de l'inhibition de la formation des fibres montre que le dérivé K_4 présente la même activité à une concentration 20 fois inférieure au dérivé monomérique K_1 .

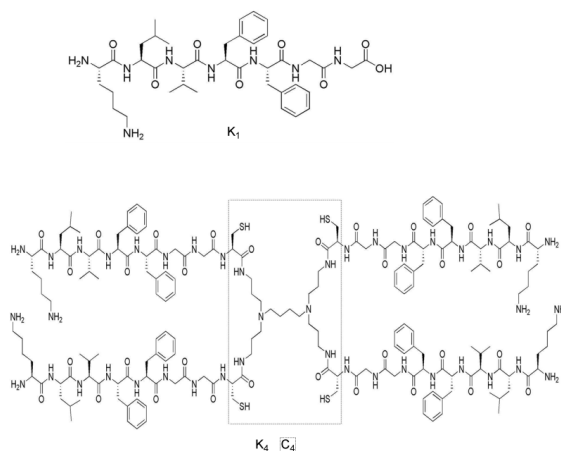


Figure 61 : Structure du tétramère K_4 ¹⁸⁶

¹⁸² Porat, Y.; Abramowitz, A.; Gazit, E. Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chem Biol Drug Des* **2006**, 67, 27-37.

¹⁸³ Talaga, P. Beta-amyloid aggregation inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: dream or reality? *Mini-Rev. Med. Chem.* **2001**, 1, 175-186.

¹⁸⁴ May, B. C.; Fafarman, A. T.; Hong, S. B.; Rogers, M.; Deady, L. W.; Prusiner, S. B.; Cohen, F. E. Potent inhibition of scrapie prion replication in cultured cells by bis-acridines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100, 3416-3421.

¹⁸⁵ Honson, N. S.; Jensen, J. R.; Darby, M. V.; Kuret, J. Potent inhibition of tau fibrillization with a multivalent ligand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, 363, 229-234.

¹⁸⁶ Chafekar, S. M.; Malda, H.; Merckx, M.; Meijer, E. W.; Viertl, D.; Lashuel, H. A.; Baas, F.; Scheper, W. Branched KLVFF tetramers strongly potentiate inhibition of beta-amyloid aggregation. *Chembiochem* **2007**, 8, 1857-1864.

Nous nous sommes donc appuyés sur ces différentes stratégies pour concevoir des inhibiteurs de la polymérisation du peptide β amyloïde. Notre approche consiste à utiliser le cyclodécapeptide comme châssis moléculaire pour présenter plusieurs exemplaires d'un composé de nature hydrophobe et/ou aromatique (Figure 62). Le but est de créer une zone à caractère hydrophobe suffisamment importante pour interagir avec le peptide β amyloïde.

En effet, le châssis moléculaire permet par sa rigidité conformationnelle de présenter sur une face deux ou quatre molécules dans un domaine de l'espace restreint créant une zone d'interaction importante avec le peptide $A\beta$. Ainsi cet élément de forte interaction sera associé, de par la nature de l'assemblage, avec un élément perturbateur à la formation de la fibre. L'assemblage assure ainsi une double fonction : augmentation de l'affinité pour le peptide $A\beta$ et gêne à son auto-association.

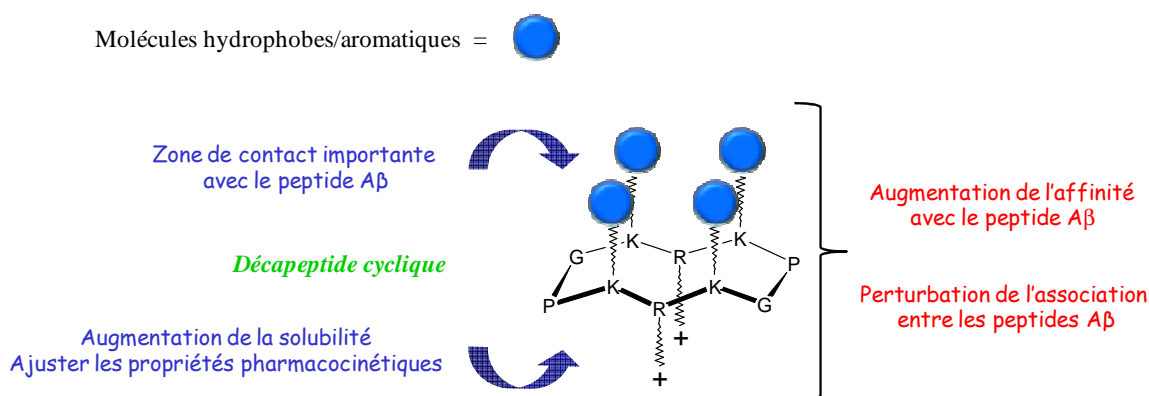


Figure 62 : Conception des inhibiteurs

Un des atouts de cette approche est de pouvoir moduler par la suite les propriétés de l'assemblage en modifiant la nature des acides aminés du cyclodécapeptide. En effet, la présentation de deux ou quatre molécules aromatiques et/ou hydrophobes sur l'une des faces peut rendre l'assemblage très peu soluble dans les milieux aqueux. L'introduction dans la séquence du cyclodécapeptide de résidus arginines permet de solubiliser l'assemblage grâce aux groupements guanidinium.

Par la suite, l'introduction de résidus lysines permettra de fonctionnaliser une face avec des composés qui moduleront les propriétés pharmacocinétiques. En effet, l'une des modulations majeures pourra être la ligation d'une molécule permettant le passage à travers les barrières biologiques. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, la cible se trouvant dans le cerveau, le composé devra nécessairement traverser la barrière hémato-encéphalique. Le passage à travers la barrière est très souvent un frein au développement de nombreuses molécules thérapeutiques de taille trop importante ou peu lipophiles qui ne sont pas transportées via un processus passif. Cependant, des stratégies permettant de délivrer les molécules dans le cerveau existent ou sont en cours de développement. Une de ces approches consiste au transport vésiculaire via le ciblage par exemple des récepteurs à transferrine, à hormones ou à l'utilisation de « cell penetrating peptide ».¹⁸⁷ De nombreux composés ont été conçus comme des conjugués entre la daunomycine et un anticorps monoclonal (OX-26) sous forme d'un immunoliposome.¹⁸⁸ La conjugaison de la doxorubicine avec deux peptides (D-penetratin et SynB1) a permis une meilleure

¹⁸⁷ Smith, M. W.; Gumbleton, M. Endocytosis at the blood-brain barrier: from basic understanding to drug delivery strategies. *J. Drug Target.* **2006**, 14, 191-214.

¹⁸⁸ Huwyler, J.; Yang, J.; Pardridge, W. M. Receptor mediated delivery of daunomycin using immunoliposomes: pharmacokinetics and tissue distribution in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, 282, 1541-1546.

distribution dans le cerveau.¹⁸⁹ Une autre stratégie consiste à lier l'acide docosahénoïque (DHA), acide gras naturel constitué de 22 carbones. Le DHA a été précédemment lié à différentes molécules thérapeutiques comme les anticancéreux paclitaxel et le docetaxel pour faciliter leur passage à travers la barrière hématoencéphalique.¹⁹⁰

Dans le cadre de ces travaux, nous avons synthétisé quatre types d'assemblages construits à partir de molécules à caractère aromatique et/ou hydrophobe que nous nommerons ligands (Figure 63).

Le premier assemblage, C4Quin, consiste en quatre molécules d'un dérivé de la quinacrine liées au cyclodécapeptide (C pour châssis moléculaire ; Quin pour Quinacrine).¹⁹¹ Les dérivés de la famille des acridines dont fait partie la quinacrine ont été étudiés comme inhibiteurs de la conversion pathologique du prion.¹⁹² Il semble donc intéressant d'étudier la quinacrine en tant qu'inhibiteur de la polymérisation du peptide β amyloïde afin d'évaluer son activité sur une autre séquence amyloïde.

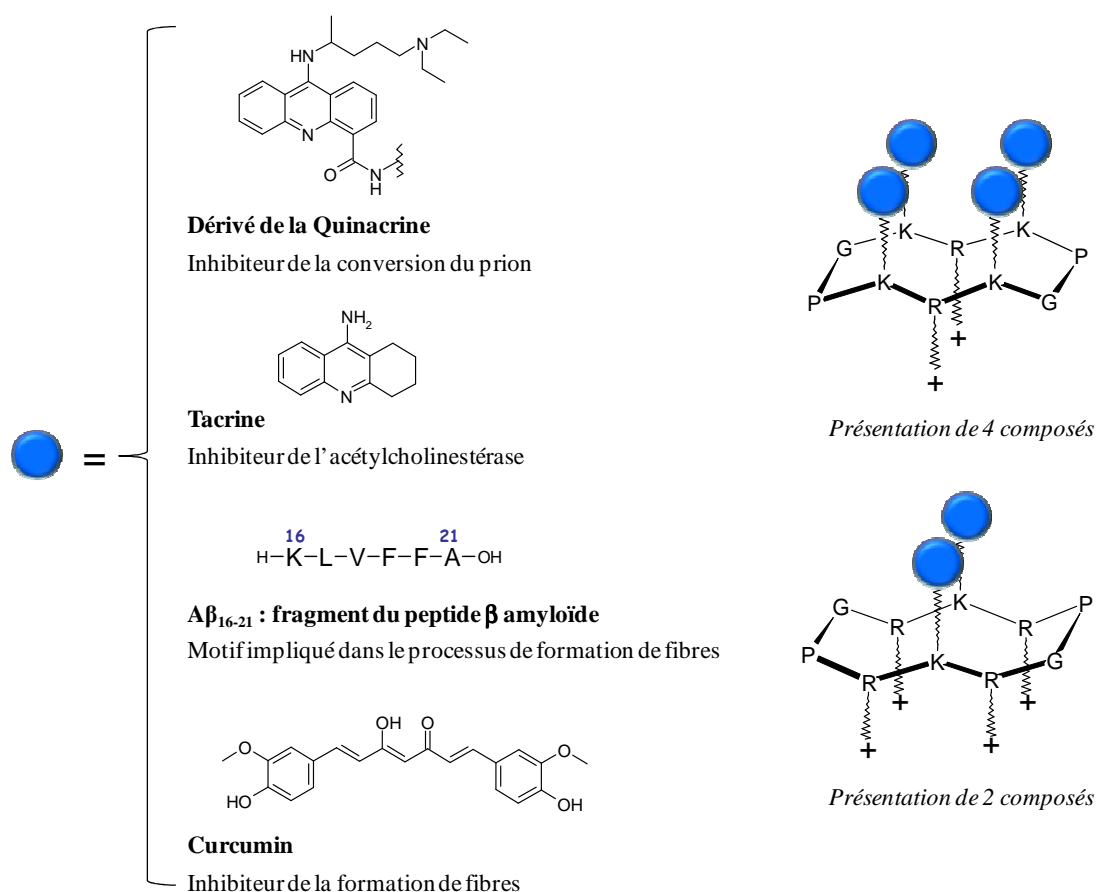


Figure 63 : Schéma des molécules utilisées pour la présentation multimérique

¹⁸⁹ Rousselle, C.; Clair, P.; Lefauconnier, J. M.; Kaczorek, M.; Scherrmann, J. M.; Tamsamani, J. New advances in the transport of doxorubicin through the blood-brain barrier by a peptide vector-mediated strategy. *Mol. Pharmacol.* **2000**, 57, 679-686.

¹⁹⁰ Bradley, M. O.; Shashoua, V. E.; Webb, N. L.; Swindell, C. S. Compositions comprising conjugates of cis-docosahexaenoic acid and Taxotere. *PCT Int. Appl.* **1997**, 44 pp.

¹⁹¹ Dolphin, G. T.; Chierici, S.; Ouberai, M.; Dumy, P.; Garcia, J. A multimeric quinacrine conjugate as a potential inhibitor of Alzheimer's beta-amyloid fibril formation. *Chembiochem* **2008**, 9, 952-963.

¹⁹² Korth, C.; May, B. C.; Cohen, F. E.; Prusiner, S. B. Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, 98, 9836-9841.

Le deuxième assemblage, C2Tac ou C4Tac, consiste en deux ou quatre molécules de tacrine liées au cyclodécapeptide (Tac pour tacrine). La tacrine commercialisée sous le nom de Cognex[®] est un médicament qui a reçu une autorisation de mise sur le marché pour le traitement palliatif de la maladie d'Alzheimer. C'est un inhibiteur non compétitif et réversible de l'acétylcholinestérase, enzyme qui régule la disponibilité dans l'espace synaptique du neurotransmetteur acétylcholine. La tacrine augmente ainsi la quantité synaptique d'acétylcholine conduisant à une meilleure transmission cholinergique. Cependant, sa commercialisation a dû être arrêtée du fait de sa forte toxicité hépatique.

Le troisième assemblage, C2A β_{16-21} , correspond à deux fragments A β_{16-21} , KLVFFA, lié au cyclodécapeptide. Le peptide A β_{16-21} est un fragment du cœur hydrophobe du peptide A β et est un élément crucial pour la formation des fibres amyloïdes.^{66,67,68} Il constituera ainsi un bon élément de reconnaissance.⁵⁸

La quatrième présentation, C2Cur, correspond à deux dérivés du curcumin liés au cyclodécapeptide (Cur pour Curcumin). Le curcumin est, comme nous l'avons vu précédemment, un puissant inhibiteur de la formation des fibres amyloïdes et possède de nombreuses propriétés dont celle d'être un antioxydant.

Les assemblages multimériques sont construits par ligations chimiosélectives entre les cyclodécapeptides et ligands fonctionnalisés par des groupements présentant une réactivité réciproque et spécifique. Les ligations sont réalisées par la formation du lien éther d'oxime ou lien triazole par la cycloaddition 1,3-dipolaire azoture-alcyne catalysé par le cuivre (I) (Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition, CuAAC) (Figure 64). Ces deux ligations chimiosélectives sont réalisées entre les précurseurs totalement déprotégés.

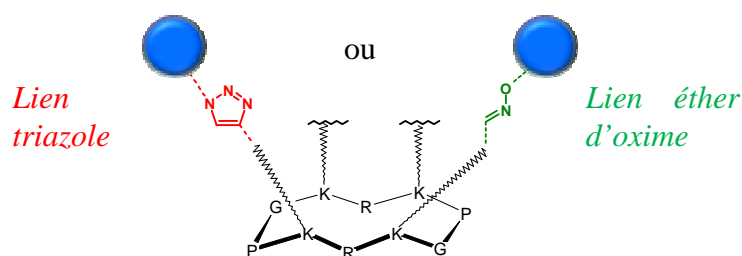


Figure 64 : Schéma des liens pour la synthèse des assemblages

Le composé C4Quin est préparé par formation d'un lien éther d'oxime entre le dérivé de la quinacrine fonctionnalisé par une oxyamine et le cyclodécapeptide fonctionnalisé par quatre aldéhydes glyoxyliques.

Les assemblages C2Tac, C4Tac, C2A β_{16-21} et C2Cur sont construits par cycloaddition entre les cyclodécapeptides et les ligands fonctionnalisés par des groupements azotures ou alcynes. La fonctionnalisation par un groupement azoture ou alcyne a été déterminée en fonction de la facilité d'introduction sur les molécules.

Enfin, plusieurs témoins ont été synthétisés pour valider notre approche comme un cyclodécapeptide présentant un seul dérivé de la tacrine et de la quinacrine, un dérivé triazole de la tacrine et du peptide A β_{16-21} et des témoins cyclodécapeptides.

B.3. Stratégie de synthèse des inhibiteurs

L'assemblage C4Quin **49** est construit par formation d'un lien éther d'oxime entre le cyclodécapeptide **22** fonctionnalisé par quatre aldéhydes glyoxyliques et la 4-[(aminoxypyramino)carbonyl]-9-[(4-diéthylamino-1-méthylbutyl)amino]acridine **34** (Figure 65). Le cyclodécapeptide **22** est obtenu par synthèse sur support solide et fonctionnalisation en solution selon une stratégie proche de celle décrite pour le cyclodécapeptide **11** (partie A.4.1). Le composé **34** est obtenu à partir de l'acide 9,10-dihydro-9-oxoacridan-4-oïque selon une voie de synthèse basée sur les travaux de Atwell et al.¹⁹³ La synthèse complète du composé C4Quin **49** est décrite dans la publication de Dolphin et al. présentée en Annexe II.¹⁹¹

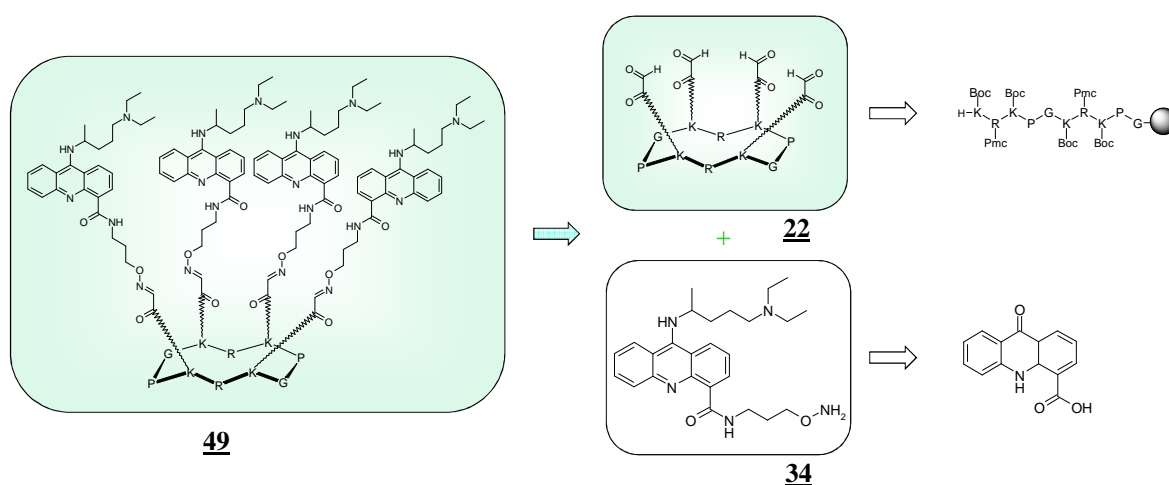


Figure 65 : Schéma rétro-synthétique du composé C4Quin **49**

Les assemblages multimériques C4Tac, C2Tac, C2Cur et C2A β_{16-21} sont obtenus par la cycloaddition 1,3-dipolaire azoture-alcyne catalysé par le cuivre (I).

Cette réaction permet la formation d'un cycle 1,2,3-triazole (triazole) par la cycloaddition entre un groupement alcyne et un groupement azoture et appartient à un ensemble de réactions regroupées sous le terme de « Click Chemistry » introduit en 2001 par Sharpless.¹⁹⁴ Les réactions de Click Chemistry remplissent un certain nombre de critères notamment être modulables, avoir des rendements élevés et être stéréospécifique. La Click Chemistry permet la formation d'une liaison C-X-C et comprend notamment la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire, la formation du lien éther d'oxime, d'hydrazones ou des réactions d'époxydation.¹⁹⁴

La cycloaddition 1,3-dipolaire, découverte un début du XX^{ème} siècle, a été le sujet de recherches intensives qui ont conduit à sa description en 1963 par Huisgen.¹⁹⁵ Cependant, le potentiel de cette réaction était limité par un manque de sélectivité avec la

¹⁹³ Atwell, G. J.; Cain, B. F.; Baguley, B. C.; Finlay, G. J.; Denny, W. A. Potential antitumor agents. 43. Synthesis and biological activity of dibasic 9-aminoacridine-4-carboxamides, a new class of antitumor agent. *J. Med. Chem.* **1984**, 27, 1481-1485.

¹⁹⁴ a) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2001**, 40, 2004-2021. b) Manetsch, R.; Krasinski, A.; Radic, Z.; Rauschel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K. B.; Kolb, H. C. In situ click chemistry: enzyme inhibitors made to their own specifications. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 12809-12818.

¹⁹⁵ Huisgen, R. 1,3-Dipolar cycloadditions. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **1963**, 75, 604-637.

formation d'un mélange de 1,4- et 1,5-régioisomères, des conditions de chauffages élevées ainsi que des temps de réactions longs (Figure 66).

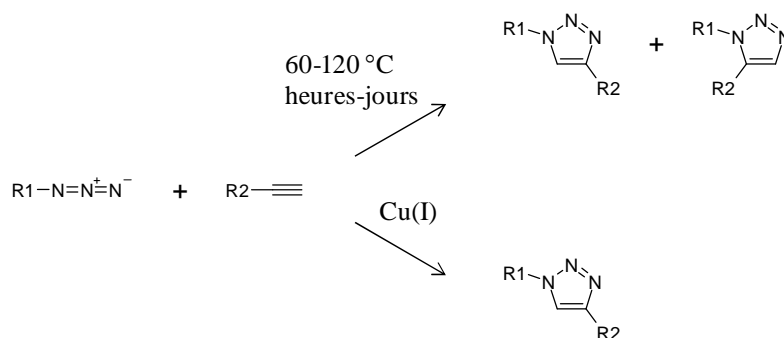


Figure 66 : La cycloaddition 1,3-dipolaire entre alcyne et azoture

En 2002, deux groupes ont indépendamment décrit l'utilisation de sels de cuivre (I) capables d'accélérer la réaction et de former sélectivement un seul régioisomère, le régioisomère 1,4-disubstitué.¹⁹⁶

Les principaux avantages de cette réaction sont les suivants :

- elle est peu affectée par les propriétés électroniques et stériques des substituants attachés au groupe réactif, alcyne ou azoture ;
- elle est peu affectée par la présence d'eau ou d'autres groupements réactifs évitant la présence de groupements protecteurs.

En outre, le cycle triazole possède de nombreuses caractéristiques très utiles en chimie médicinale. Le cycle triazole est stable à l'hydrolyse acide ou basique et en conditions d'oxydation ou de réduction.¹⁹⁷ De plus, cet hétérocycle possède un fort moment dipolaire (5,2-5,6 Debye) et peut participer à la formation de liaisons hydrogène ou aux interactions dipôle-dipôle ou π stacking.^{198,199} Enfin, ce cycle est relativement résistant aux dégradations métaboliques.¹⁹⁹

Un cycle catalytique de la cycloaddition par le cuivre a été proposé par des calculs théoriques et des études cinétiques.²⁰⁰ Ce cycle catalytique met en jeu la formation d'un complexe π -alcyne-cuivre qui diminue le pKa du proton de l'alcyne de 10 unités permettant la formation d'un acétylure de cuivre. La régiosélectivité s'explique par la coordination de l'alcyne et de l'azoture au cuivre avant la formation de la liaison C-C.

¹⁹⁶ a) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2002**, 41, 2596-2599. b) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057-3064.

¹⁹⁷ Tron, G. C.; Pirali, T.; Billington, R. A.; Canonico, P. L.; Sorba, G.; Genazzani, A. A. Click chemistry reactions in medicinal chemistry: applications of the 1,3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes. *Med. Res. Rev.* **2008**, 28, 278-308.

¹⁹⁸ Bourne, Y.; Kolb, H. C.; Radic, Z.; Sharpless, K. B.; Taylor, P.; Marchot, P. Freeze-frame inhibitor captures acetylcholinesterase in a unique conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101, 1449-1454.

¹⁹⁹ a) Tornøe, C. W.; Sanderson, S. J.; Mottram, J. C.; Coombs, G. H.; Meldal, M. Combinatorial library of peptidotriazoles: identification of [1,2,3]-triazole inhibitors against a recombinant *Leishmania mexicana* cysteine protease. *J. Comb. Chem.* **2004**, 6, 312-324. b) Whiting, M.; Muldoon, J.; Lin, Y. C.; Silverman, S. M.; Lindstrom, W.; Olson, A. J.; Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B.; Elder, J. H.; Fokin, V. V. Inhibitors of HIV-1 protease by using in situ click chemistry. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2006**, 45, 1435-1439.

²⁰⁰ Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 210-216.

La CuAAC a permis ces dernières années l'assemblage de très nombreuses molécules polyfonctionnelles déprotégées et a trouvé de très nombreuses applications en chimie médicinale, en biologie moléculaire et en science des matériaux.^{197,201} En effet, son utilisation couvre les domaines de la synthèse de librairie de petites molécules à la synthèse de bioconjugués (sucre, peptide, lipides, bases nucléotidiques...) et à l'immobilisation de ligands sur des supports solides.

La synthèse de peptidomimétiques est notamment l'une de ses grandes applications par l'insertion du cycle triazole dans la chaîne peptidique ou la formation de conjugués avec d'autres types de molécules.²⁰²

Nous avons donc choisi cette réaction afin de réaliser les différents assemblages entre les peptides et les molécules organiques. En effet, les méthodes d'introduction de groupement alcyne ou azoture sur une chaîne peptidique ont largement été décrites dans la littérature.²⁰² Nous avons donc fonctionnalisé les molécules organiques, tacrine et curcumin, avec un groupement alcyne ou azoture en fonction de la stratégie de synthèse la plus accessible et nous avons ensuite adapté la synthèse du cyclodécapeptide.

Les composés C4Tac **50** et C2Tac **51** résultent de la cycloaddition entre un précurseur commun, la 9-[(2-azidoéthyl)amino]-1,2,3,4-tétrahydroacridine **38** et un cyclodécapeptide fonctionnalisé par deux groupements alcynes **25** dans le cas du composé C2Tac et quatre groupements alcynes **23** dans le cas du composé C4Tac (Figure 67). La fonctionnalisation de la tacrine par un groupement azoture a été décrite dans la littérature et sa synthèse est réalisée à partir de l'acide anthranilique et de la cyclohexanone.

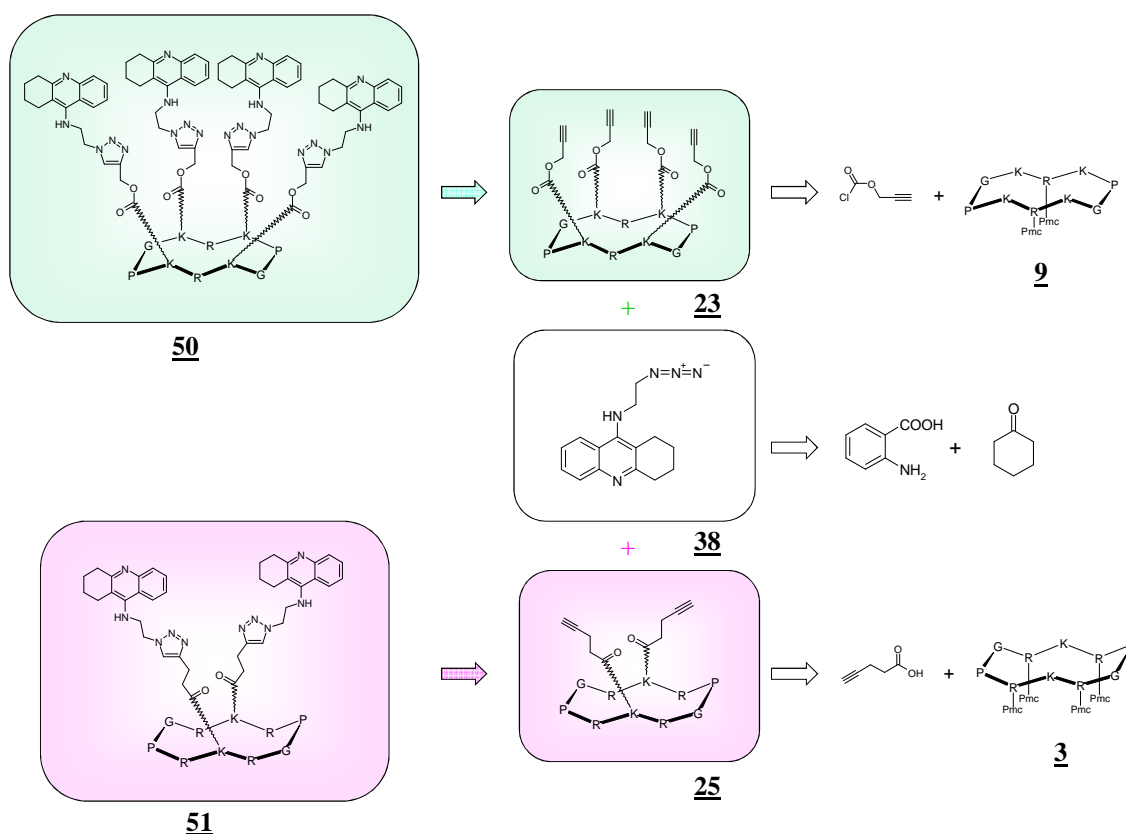


Figure 67 : Schéma rétro-synthétique des composés C4Tac **50** et C2Tac **51**

²⁰¹ Wu, P.; Fokin, V. V. Catalytic azide-alkyne cycloaddition: reactivity and applications. *Aldrichimica Acta* **2007**, 40, 7-17.

²⁰² Angell, Y. L.; Burgess, K. Peptidomimetics via copper-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 1674-1689.

Les cyclodécapeptides ont été fonctionnalisés par des groupements alcynes selon deux méthodes. La synthèse du composé **23** résulte de la condensation du chloroformiate de propargyle sur les fonctions ϵ -NH₂ des résidus lysines du cyclodécapeptide **9**. Le composé **25** résulte du couplage entre les fonctions ϵ -NH₂ des résidus lysines du cyclodécapeptide **3** et de l'acide pent-4-ynoïque en conditions classiques de couplage peptidique comme décrit dans le paragraphe A.4.1.

Le composé C2A β ₁₆₋₂₁ **54** est obtenu par la cycloaddition entre le cyclodécapeptide **31** fonctionnalisé par deux groupements azotures et le fragment A β ₁₆₋₂₁ fonctionnalisé en position N-terminale par un groupement alcynes **40** (Figure 68).

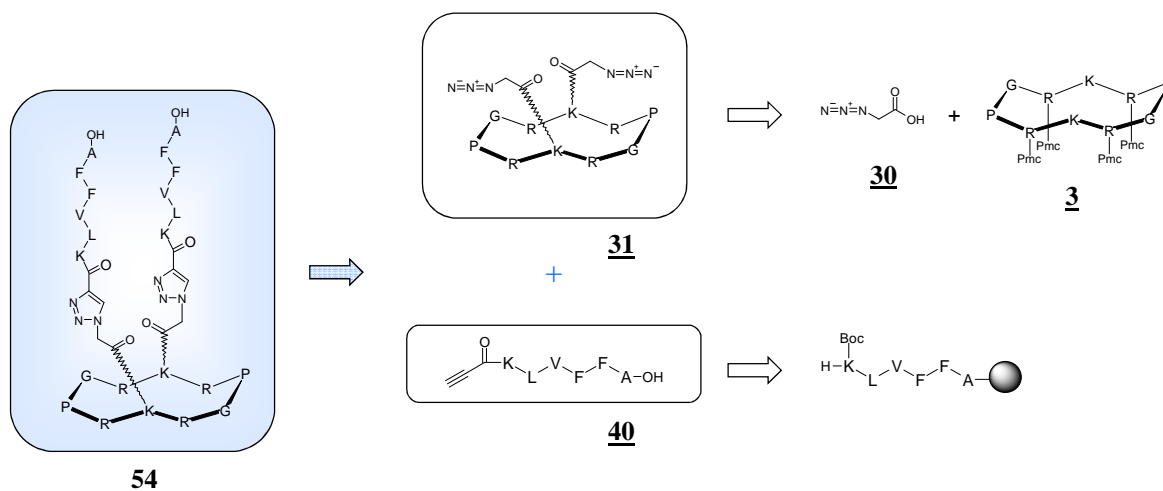


Figure 68 : Schéma rétro-synthétique du composé C2A β ₁₆₋₂₁ **54**

La fonctionnalisation par le groupement azoture est réalisée par le couplage peptidique en conditions classiques de l'acide azidoacétique **30** sur les fonctions ϵ -NH₂ des résidus lysines du cyclodécapeptide **3**. Le fragment A β ₁₆₋₂₁ est synthétisé sur support solide en stratégie Fmoc/*t*Bu. Le groupement alcyne est introduit lors de la dernière étape en position N-terminale par couplage sur support de l'acide propiolique.

La synthèse du composé C2Cur a été réalisée par trois stratégies de synthèse selon la fonctionnalisation du curcumin par un groupement alcyne ou azoture et selon la position d'accrochage du groupement sur le curcumin.

La première stratégie consiste à fonctionnaliser le curcumin par un groupement azoture, composé **44**, pour accéder au composé C2Cur **56** (Figure 69). L'intermédiaire **43** est obtenu par l'introduction du substituant bromopropyle sur une des positions phénoliques du curcumin monoprotégé par une réaction de Mistunobu. Le cyclodécapeptide **24** fonctionnalisé par deux groupements alcynes est obtenu par la condensation du chloroformiate de propargyle sur fonctions ϵ -NH₂ des résidus lysines du cyclodécapeptide **3**.

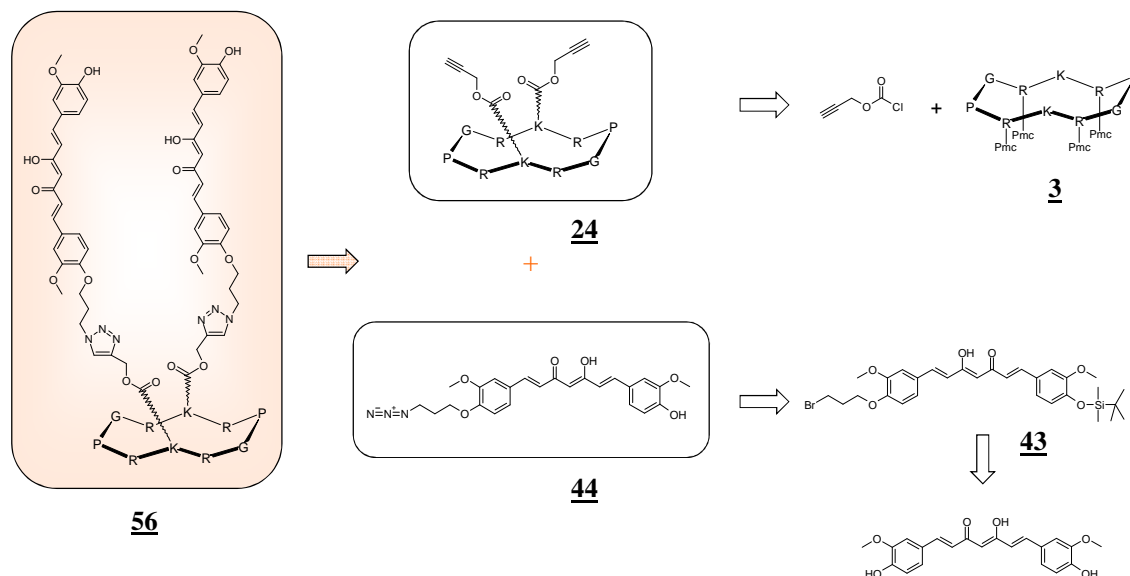


Figure 69 : Schéma rétro-synthétique du composé C2Cur 56

Les deux stratégies de synthèse suivantes consistent en la fonctionnalisation du curcumine par un groupement alcyne et le cyclodécapeptide par deux groupements azotures, cyclodécapeptide 31 (Figure 70). La première stratégie consiste toujours à fonctionnaliser sur l'un des alcools phénoliques, composé 45, alors que la deuxième stratégie permet par la formation d'un dérivé pyrazole du curcumine substitué par un alcyne, composé 48, de présenter les deux groupements phénoliques libres.

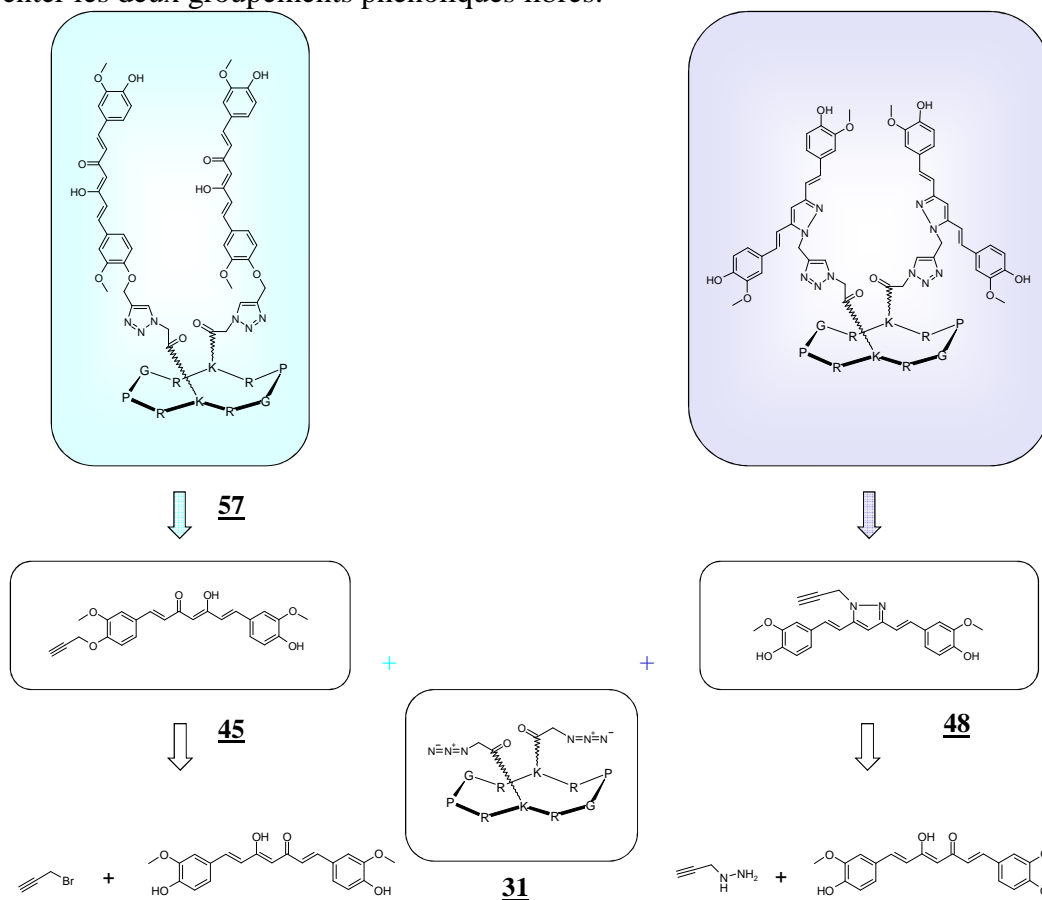


Figure 70 : Schéma rétro-synthétique du composé C2Cur 57 et du dérivé pyrazole du curcumine 48

Le premier dérivé du curcumin synthétisé, le 5-hydroxy-7-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-1-[3-méthoxyphényl-4-(prop-2-ynoxy)]-1,4,6-heptatrièn-3-one **45**, résulte de la mono-condensation du substituant bromopropyne sur le curcumin et correspond au précurseur du composé C2Cur **57**.

Le deuxième dérivé, 4-((1E,1'E)-2-(5-(4-hydroxy-3-méthoxystyryl)-1-prop-2-ynyl)-pyrazol-3-yl)vinyl)-2-méthoxyphénol **48**, est synthétisé par condensation de la 3-propynyl-hydrazine **47** sur le curcumin. Cependant, la condensation de ce synthon sur le cyclodécapeptide n'a pas été réalisée au cours de ces travaux et sera effectuée ultérieurement.

Les conditions de cycloaddition pour la synthèse des assemblages ont dû être adaptées, notamment en raison de problèmes de solubilité pour les dérivés du curcumin et du fragment peptidique A β ₁₆₋₂₁.

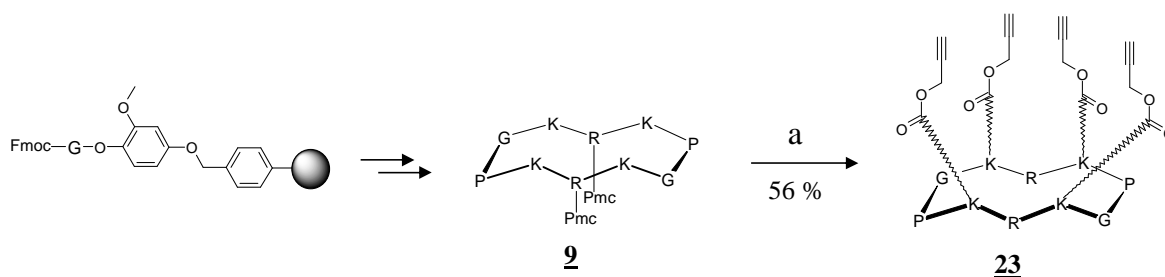
B.4. Synthèse des inhibiteurs

B.4.1. Synthèse des précurseurs décapeptides cycliques

La synthèse des cyclodécapeptides requière une synthèse mixte en phase solide et en solution. Nous avons synthétisé cinq cyclodécapeptides en fonction du nombre de groupements alcynes ou azotures présents et du précurseur du groupement introduit. Les cyclodécapeptides présentant les fonctions amines ϵ -NH₂ des résidus lysines déprotégés sont les intermédiaires clés pour la condensation des précurseurs des groupements alcynes ou azotures.

★ Synthèse du cyclodécapeptide présentant quatre groupements alcynes

Le cyclodécapeptide **23** est obtenu par condensation du chloroformiate de propargyle sur le cyclodécapeptide **9**. La synthèse du cyclodécapeptide **9** a été décrite dans le paragraphe A.4.1. Le chloroformiate de propargyle est introduit à raison de 3,5 équivalents par fonction ϵ -NH₂ dans le mélange réactionnel contenant le cyclodécapeptide **9** en solution dans un mélange pyridine/DMF. De par l'instabilité des chlorures d'acyles, un excès de réactif ainsi qu'un abaissement de la température à 0°C ont été nécessaires.



Réactifs : (a) i) Chloroformiate de propargyle (3,5 éq./site), pyridine/DMF (1/1), 0°C à t.a., 2 h ; ii) TFA/H₂O (9/1)

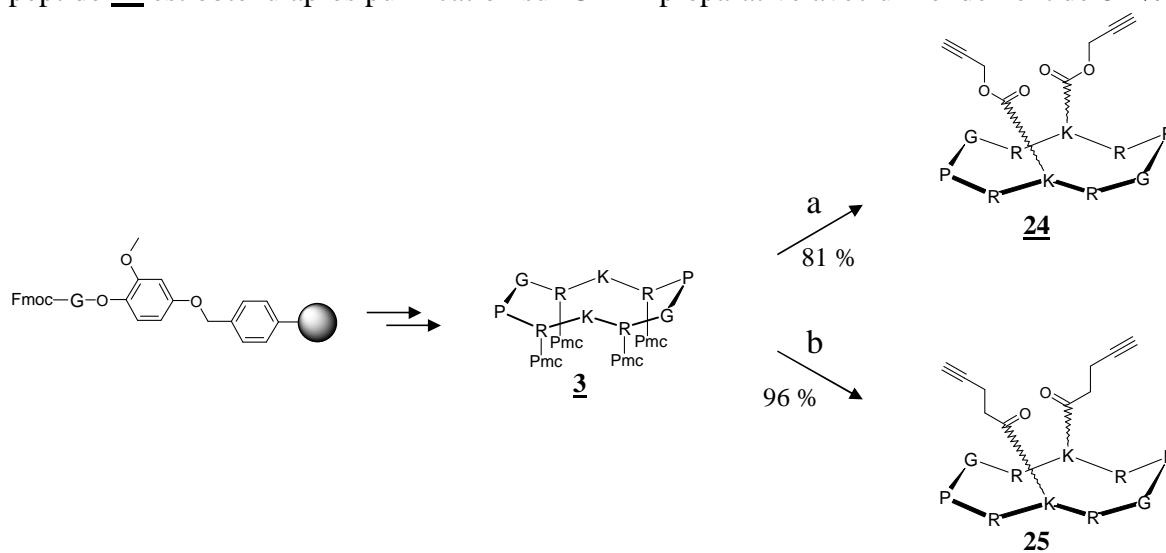
Figure 71 : Schéma d'obtention du cyclodécapeptide **23**

Après élimination des groupements Pmc en condition acide et purification par CLHP préparative, le cyclodécapeptide **23** est obtenu avec un rendement de 56 %.

★ Synthèse des cyclodécapeptides présentant deux groupements alcynes

Le cyclodécapeptide **24** est obtenu par une voie de synthèse similaire à la synthèse du cyclodécapeptide **23** par condensation du chloroformiate de propargyle sur le cyclodécapeptide **3** (Figure 72). La synthèse du cyclodécapeptide **3** a été décrite dans le paragraphe A.4.1.

Un total de 15 équivalents de chloroformiate de propargyle par fonction ε -NH₂ a été introduit dans le mélange réactionnel pour que la réaction soit totale. Comme précédemment, la dernière étape consiste en l'élimination des groupements Pmc, et le peptide **24** est obtenu après purification sur CLHP préparative avec un rendement de 81 %.



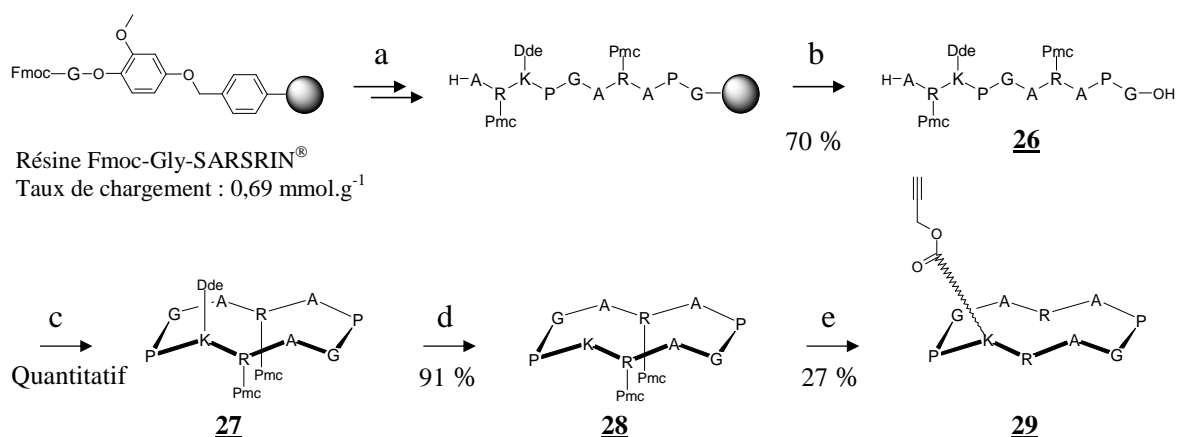
Réactifs : (a) i) Chloroformiate de propargyle (15 éq./site), pyridine/DMF (1/1), 0°C à t.a., 1 h ; ii) TFA/H₂O (9/1) ; (b) i) acide pent-4-ynoïque (1,1 éq./site), PyBOP (1,1 éq./site), DIPEA, DMF (10⁻² M), 4 h ; ii) TFA/H₂O (9/1)

Figure 72 : Schéma d'obtention des cyclodécapeptides **24** et **25**

Le cyclodécapeptide **25** est obtenu par couplage de l'acide pent-4-ynoïque sur le cyclodécapeptide **3** dans les conditions classiques de couplage peptidique (Figure 72). Nous avons en effet modifié la stratégie de synthèse afin d'obtenir un lien amide au lieu d'un lien carbamate. Le peptide **25** est obtenu après élimination des groupements Pmc avec un rendement brut de 96 %.

★ Synthèse du cyclodécapeptide présentant un groupement alcyne

Afin de construire un cyclodécapeptide présentant un seul dérivé de tacrine, nous avons synthétisé le cyclodécapeptide **29** présentant un groupement alcyne. Une seule lysine est introduite dans la séquence du cyclodécapeptide et les trois autres lysines sont remplacées par des résidus alanines. La synthèse a été réalisée comme précédemment selon une stratégie mixte sur support solide et en solution (Figure 73).



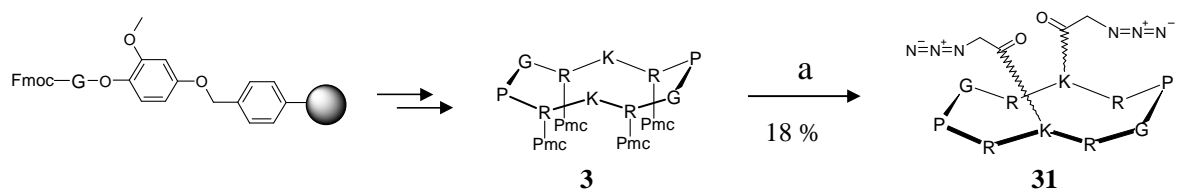
Réactifs : (a) SPPS : i) Pipéridine/DMF (1/4) ; ii) Fmoc-Xaa-OH (2 éq.), PyBOP (2 éq.), DIEPA (3-4 éq.), DMF ; (b) i) Pipéridine/DMF (1:4) ; ii) TFA/CH₂Cl₂ (1/99) ; (c) PyBOP (1,2 éq.), DIPEA (3-4 éq.), DMF (0,5 10⁻³ M) ; (d) Hydrazine/DMF (2/98) ; (e) i) chloroformiate de propargyle (10 éq.), pyridine/DMF (1/1), 0°C à t.a., 1 h ; ii) TFA/H₂O (9/1)

Figure 73 : Schéma d'obtention du cyclodécapeptide 29

Le peptide linéaire est synthétisé sur support solide puis décroché de la résine en milieu acide. Le peptide obtenu est cyclisé en solution et le groupement Dde est éliminé afin d'obtenir l'intermédiaire **28**. Le groupement alcyne est introduit par réaction du chloroformiate de propargyle sur la fonction ε-NH₂ du résidu lysine. Le peptide **29** est obtenu après élimination des groupements Pmc et purification par CLHP préparative.

★ Synthèse du cyclodécapeptide présentant deux groupements azotures

La synthèse du cyclodécapeptide **31** est réalisée par couplage de l'acide azidoacétique **30** sur le cyclodécapeptide **3** en condition classique de couplage peptidique (Figure 74).



Réactifs : (a) i) acide azidoacétique **30** (2,2 éq.), PyBOP (2,2 éq.), DIPEA, DMF (10⁻² M), 2 h ; ii) TFA/H₂O (9/1)

Figure 74 : Schéma d'obtention du cyclodécapeptide 31

Le peptide **31** après élimination des groupements Pmc et purification par CLHP préparative est obtenu avec un rendement de 18 %. Ce faible rendement est dû principalement à la perte importante du produit lors de sa purification de par son profil CLHP (Figure 75).

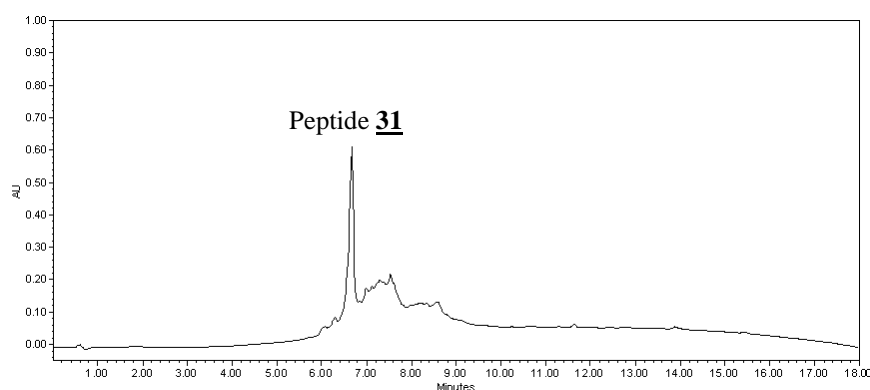
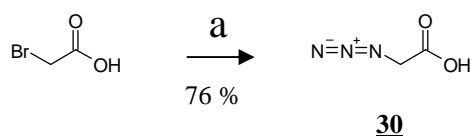


Figure 75 : Chromatogramme CLHP du cyclodécapeptide **31**

L'acide azidoacétique **30** est obtenu par substitution nucléophile du brome de l'acide bromoacétique par l'azoture de sodium dans un mélange H₂O/DMSO (Figure 76).²⁰³



Réactifs : (a) NaN₃ (2 éq.), H₂O/DMSO (1/1), t.a., 1 nuit

Figure 76 : Schéma d'obtention de l'acide azidoacétique **30**

Ce composé obtenu avec 76 % de rendement doit être séché longtemps sous vide afin d'éliminer le DMSO et a été caractérisé par RMN ¹H et ¹³C.

Nous avons enfin réalisé la synthèse de deux cyclodécapeptides de références présentant sur une face deux ou quatre lysines acétylées (Figure 77). La synthèse du composé C4K **32** est réalisée par acétylation dans une solution Ac₂O/pyridine/DMF (2/3/7) du cyclodécapeptide **9** puis déprotection des groupements Pmc en milieu acide (K pour lysine). Le composé C2K **33** est synthétisé selon la même voie de synthèse à partir du cyclodécapeptide **3**.

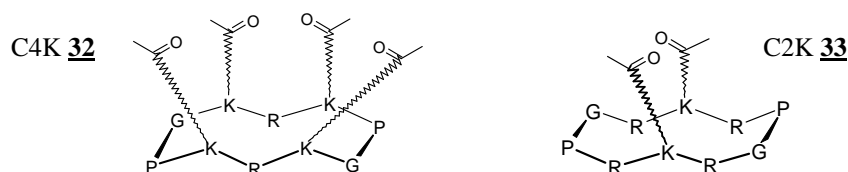


Figure 77 : Structure des composés C4K **32** et C2K **33**

B.4.2. Synthèses des ligands

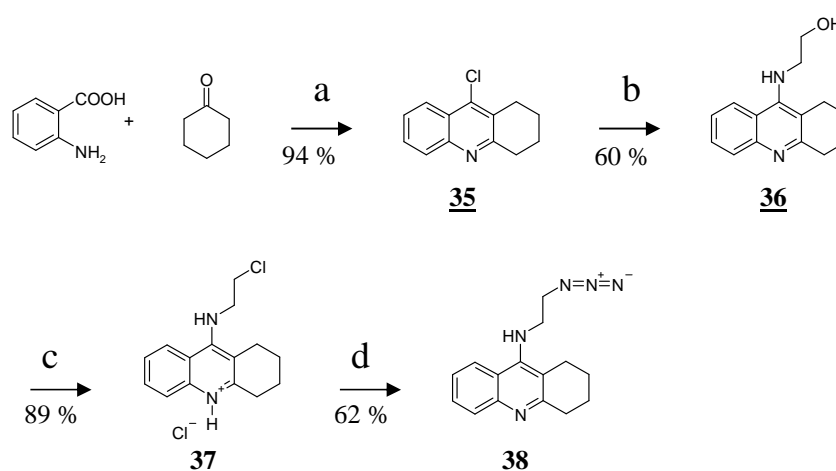
La fonctionnalisation des molécules par un groupement alcyne ou azoture est réalisée selon des stratégies de synthèses décrites dans la littérature que nous avons adaptées selon les composés désirés.

²⁰³ Khoukhi, N.; Vaultier, M.; Carrie, R. Synthesis and reactivity of methyl .gamma.-azidobutyrate and ethyl .delta.-azidovalerate and of the corresponding acid chlorides as useful reagents for the aminoalkylation. *Tetrahedron* **1987**, 43, 1811-1822.

★ Synthèse du dérivé azoture de la tacrine **38**

La 9-[(2-azidoéthyl)amino]-1,2,3,4-tétrahydroacridine **38** est obtenu selon la voie de synthèse décrite par Lewis et al. (Figure 78).²⁰⁴

La première étape consiste à synthétiser la 9-chloro-1,2,3,4-tétrahydroacridine **35** à partir de l'acide anthranilique et de la cyclohexanone. Cette réaction décrite par Hu et al. permet la formation en une étape de ce dérivé par chauffage à reflux des deux précurseurs dans l'oxychlorure de phosphore.²⁰⁵ En effet, la tétrahydroacridone n'est pas isolée. Une substitution par un chlore est réalisée *in situ* par l'oxychlorure de phosphore. La substitution du chlore par la fonction amine de l'éthanolamine permet ensuite d'obtenir la 9-[(2-hydroxyéthyl)amino]-1,2,3,4-tétrahydroacridine **36** avec un rendement de 60 %. Afin d'éliminer l'éthanolamine en excès, nous avons réalisé un lavage de la phase organique avec une solution aqueuse contenant 10 % de NaHCO₃. Cette étape de lavage a conduit à la perte d'une partie du produit **36** dans la phase aqueuse.



Réactifs : (a) POCl₃, 0°C à 100°C, 2 h ; (b) éthanolamine (5 éq.), 1-pentanol, 140°C, 6 h ; (c) SOCl₂, 50°C, 30 min ; (d) NaN₃ (2 éq.), CH₃OH/H₂O (1/1), 90°C, 8 h

Figure 78 : Schéma d'obtention de la 9-[(2-azidoéthyl)amino]-1,2,3,4-tétrahydroacridine **38**

Le chlorhydrate de la 9-[(2-chloroéthyl)amino]-1,2,3,4-tétrahydroacridine **37** est obtenu après traitement du dérivé **36** dans le chlorure de thionyle.

Enfin, la dernière étape consiste à la substitution nucléophile du chlore du composé **37** par le groupement azoture. Cette étape est réalisée en présence d'azoture de sodium et chauffage du milieu réactionnel à 90°C. La 9-[(2-azidoéthyl)amino]-1,2,3,4-tétrahydroacridine **38** est obtenu, après purification sur colonne de silice, avec un rendement de 62 % sur la dernière étape.

★ Synthèse du peptide Aβ₁₆₋₂₁

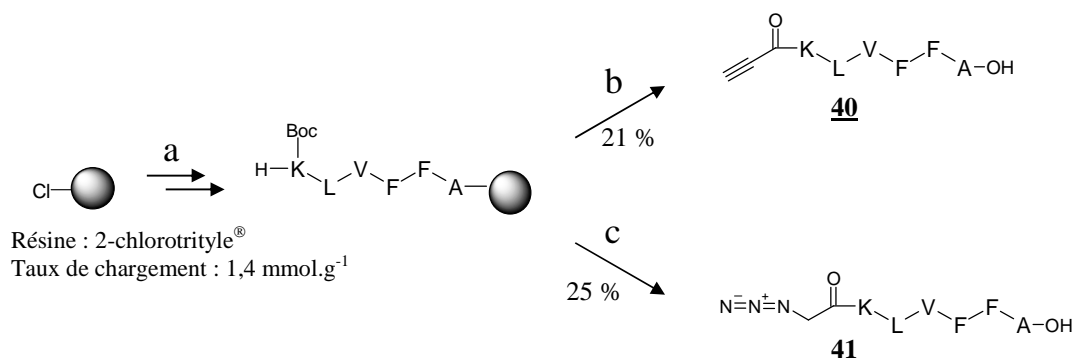
Le fragment Aβ₁₆₋₂₁ est fonctionnalisé selon la méthode décrite par Franke et al.²⁰⁶ Le peptide est synthétisé sur support solide sur la résine 2-chlorotrityle[®] puis la position N-

²⁰⁴ Lewis, W. G.; Green, L. G.; Grynszpan, F.; Radic, Z.; Carlier, P. R.; Taylor, P.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click chemistry in situ: acetylcholinesterase as a reaction vessel for the selective assembly of a femtomolar inhibitor from an array of building blocks. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2002**, 41, 1053-1057.

²⁰⁵ Hu, M.-K.; Lu, C.-F. A facile synthesis of bis-tacrine isosteres. *Tetrahedron Lett* **2000**, 41, 1815-1818.

²⁰⁶ Franke, R.; Doll, C.; Eichler, J. Peptide ligation through click chemistry for the generation of assembled and scaffolded peptides. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 4479-4482.

terminale est acylée par l'acide propiolique par couplage peptidique (Figure 79). Après décrochage de la résine du peptide et élimination du groupement Boc en milieu acide le peptide **40** est obtenu après purification par CLHP semi-préparative avec un rendement total de 21 %.



Réactifs : (a) SPPS : i) Pipéridine/DMF (1/4) ; ii) Fmoc-Xaa-OH (2 éq.), PyBOP (2 éq.), DIEPA (3-4 éq.), DMF ; (b) i) Pipéridine/DMF (1/4) ; ii) acide propiolique (3 éq.), PyBOP (3 éq.), DIPEA (3-4 éq.), DMF ; iii) TFA/H₂O (9/1) ; (c) i) Pipéridine/DMF (1:4) ; ii) acide azidoacétique **30** (5 éq.), PyBOP (5 éq.), DIPEA (3-4 éq.), DMF ; iii) TFA/H₂O (9/1)

Figure 79 : Schéma d'obtention du peptide Aβ₁₆₋₂₁ **40** et **41**

Le peptide **41** est obtenu selon la même stratégie par couplage de l'acide azidoacétique **30** sur la position N-terminale du peptide fixé sur la résine, décrochage du peptide de la résine et élimination du groupement Boc en milieu acide (Figure 79).

Les faibles rendements obtenus pour ces peptides sont dus, principalement, à des problèmes de solubilité lors de la purification.

★ Synthèse du dérivé du curcumin **44** fonctionnalisé par un azoture

Afin de lier le curcumin au cyclodécapeptide, nous devons le fonctionnaliser par un groupement azoture ou alcyne. Le curcumin possède trois positions réactives, les deux alcools de type phénolique et un méthylène actif.

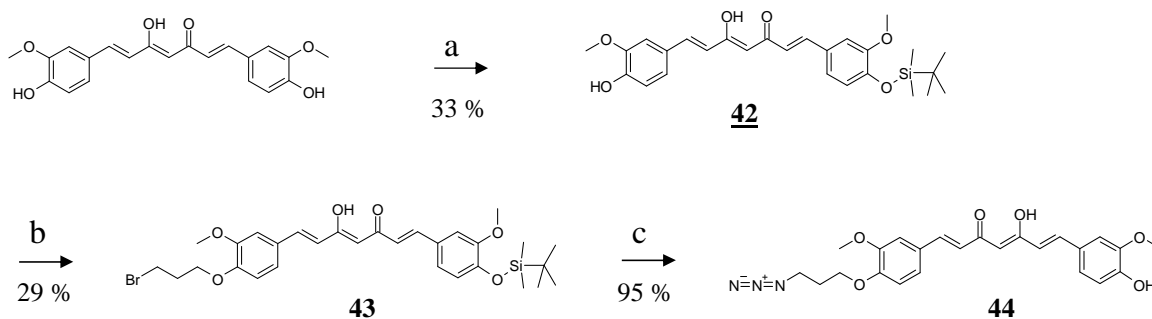
Nous avons dans un premier temps fonctionnalisé l'un des deux alcools par un groupement azoture. Afin d'introduire le groupement, nous nous sommes inspirés de travaux décrivant la fonctionnalisation du curcumin par une chaîne alkyle fluorée.²⁰⁷ En effet, le but est d'introduire une chaîne alkyle comportant un halogène afin de le substituer par un azoture lors de la dernière étape. Pour cela, nous avons réalisé une réaction de Mitsunobu,²⁰⁸ afin d'éviter la formation de dimères du curcumin par l'utilisation d'une chaîne alkyle dihalogénée en milieu basique.

La voie de synthèse utilise comme précurseur de départ le curcumin (Figure 80). Un des deux alcools phénoliques est protégé par un groupement *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS), groupement protecteur connu des fonctions alcools et phénols. Le but est de « dé-symétriser » le curcumin pour réaliser la réaction de Mitsunobu avec un excès de réactif. Pour cela, nous avons fait réagir le chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle en présence

²⁰⁷ Ryu, E. K.; Choe, Y. S.; Lee, K. H.; Choi, Y.; Kim, B. T. Curcumin and dehydrozingerone derivatives: synthesis, radiolabeling, and evaluation for beta-amyloid plaque imaging. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 6111-6119.

²⁰⁸ Mitsunobu, O. The use of diethyl azodicarboxylate and triphenylphosphine in synthesis and transformation of natural products. *Synthesis* **1981**, 1, 1-28.

d'imidazole dans le DMF.²⁰⁹ Afin de protéger une seule des deux positions, nous avons introduit dans le milieu réactionnel 1 équivalent de TBDMSCl à 0°C. Une étape de purification sur colonne de silice a été nécessaire pour éliminer le curcumin qui n'avait pas réagi ainsi que le produit bis-protégé formé. Le dérivé **42** a été obtenu avec un rendement de 33 %.



Réactifs : (a) Chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (1 éq.), imidazole (2 éq.), DMF anhydre, 0°C, 3 h ; (b) bromopropanol (3 éq.), DIAD (4 éq.), triphénylphosphine (4 éq.), THF distillé, 0° à t.a., 6 h ; (c) NaN₃ (14 éq.), DMF anhydre, de 80°C à t.a., 2 h

Figure 80 : Schéma d'obtention du 1-[4-(3-azidopropoxy)-3-méthoxyphényl]-5-hydroxy-7-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-1,4,6-heptatriène-3-one **44**

Une réaction de Mitsunobu a été ensuite réalisée afin d'introduire le substituant bromopropyle sur la position phénolique. Le diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) et le triphénylsilane ont été utilisés comme réactifs en présence de bromopropanol dans du THF distillé. Cependant, dans ces conditions la réaction ne fut pas totale et une purification sur colonne de silice a été réalisée pour isoler le dérivé du curcumin **43** avec un rendement de 29 %.

Nous avons enfin réalisé la substitution nucléophile du brome par l'azoture de sodium en excès dans le DMF anhydre. Après agitation pendant 2 heures à 80°C et élimination du DMF, des lavages à l'eau de la phase organique ont été effectués pour éliminer l'excès d'azoture de sodium. Les analyses en spectrométrie de masse et en RMN ¹H ont permis d'identifier la 1-[4-(3-azidopropoxy)-3-méthoxyphényl]-5-hydroxy-7-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-1,4,6-heptatriène-3-one **44**. En plus de la substitution du brome par l'azoture, ces conditions ont conduit à la déprotection du groupement TBDMS. Ce résultat est surprenant car l'azoture de sodium n'est pas un réactif de déprotection connu et utilisé des groupes éthers de silyle.²¹⁰ Le composé **44** est obtenu avec un rendement de 95 % sur cette dernière étape.

★ Synthèse du dérivé du curcumin **45** fonctionnalisé par un alcyne

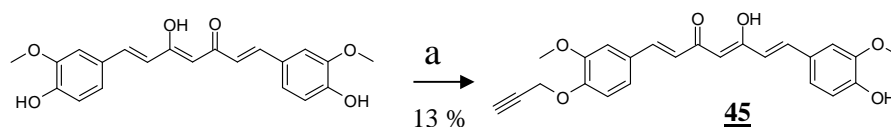
Afin de fonctionnaliser le curcumin par un groupement alcyne nous avons introduit une chaîne propyne sur l'un des deux alcools phénoliques. Cette voie de synthèse, décrite par Shi et al., consiste en une étherification de l'alcool phénolique par l'action du 3-bromoprop-1-yne en milieu basique.²¹¹ Le composé **45** est obtenu, dans ces travaux, avec

²⁰⁹ Kendall, P. M.; Johnson, J. V.; Cook, C. E. Synthetic route to an aromatic analog of strigol. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 1421-1424.

²¹⁰ Green, T. W. and Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis* (3rd ed.) **1999**, Wiley, New York, 133-141

²¹¹ Shi, W.; Dolai, S.; Rizk, S.; Hussain, A.; Tariq, H.; Averick, S.; L'Amoreaux, W.; El Idrissi, A.; Banerjee, P.; Raja, K. Synthesis of monofunctional curcumin derivatives, clicked curcumin dimer, and a PAMAM dendrimer curcumin conjugate for therapeutic applications. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5461-5464.

un rendement de 47 %. La difficulté de cette voie de synthèse réside dans le contrôle de l'éthérisation d'un seul alcool de par la présence de trois positions réactives en milieu basique. La « dé-symétrisation » du curcumin est réalisée par l'utilisation de 1,2 équivalents de 3-bromoprop-1-yne avec le bicarbonate de potassium.



Réactifs : (a) 3-bromoprop-1-yne (1.2 équ.), K₂CO₃ (1 équ.), DMF, t.a., 48 h

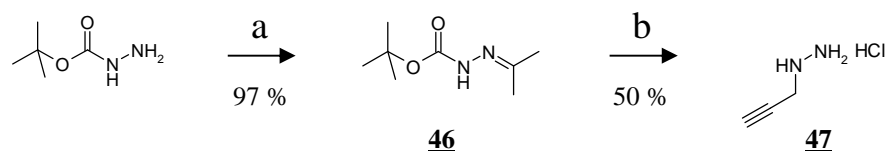
Figure 81 : Schéma d'obtention de la 5-hydroxy-7-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-1-[3-méthoxyphényl-4-(prop-2-ynyloxy)]-1,4,6-heptatrièn-3-one **45**

Nous avons répété le protocole et l'avancement de la réaction a été suivi par CLHP. Après 48 heures de réaction on observe le composé **45** légèrement majoritaire ainsi que le produit de bis-substitution et surtout du produit de départ en grande proportion. La purification sur colonne de silice s'est révélée difficile du fait de la faible différence de polarité entre les trois produits. Une purification par CLHP semi-préparative a été alors effectuée pour isoler le composé **45** avec un rendement de 13 %. L'optimisation de cette voie de synthèse, notamment de l'étape de purification, serait nécessaire afin d'obtenir le composé avec un meilleur rendement.

★ Synthèse du dérivé pyrazole du curcumin **48**

La troisième approche utilisée pour fonctionnaliser le curcumin consiste à synthétiser un dérivé pyrazole du curcumin pour laisser libre les deux alcools phénoliques. En effet, nous nous sommes appuyés sur les travaux de Narlawar et al. qui décrivent la synthèse d'une série de dérivés de pyrazoles et isoxazoles du curcumin.²¹² Ces dérivés se sont révélés être des inhibiteurs des fibres de l'Aβ₄₂ ainsi que de l'agrégation de la protéine Tau 10 à 100 fois plus actifs que le curcumin. Il nous a donc semblé intéressant de fonctionnaliser le curcumin au niveau du groupement β dicétone et de laisser libre les deux positions phénoliques pour comparer l'activité avec les molécules précédentes. Nous avons appliqué cette synthèse pour fonctionnaliser le curcumin par un groupement alcyne. La synthèse du composé **48** résulte de la condensation de la prop-2-ynylhydrazine **47** sur le curcumin (Figure 83).

Le chlorhydrate de la prop-2-ynylhydrazine **47** a été synthétisé comme décrit par les travaux de Meyer (Figure 82).²¹³



Réactifs : (a) MgSO₄, AcOH, acétone, reflux, 1 h ; (b) i) 3-bromoprop-1-yne (3 équ.), KOH (2 équ.), Bu₄NHSO₄ (0.2 équ.), toluène, 80°C, 8 h ; ii) HCl 2N, THF, reflux, 3 h

Figure 82 : Schéma d'obtention de la prop-2-ynylhydrazine **47**

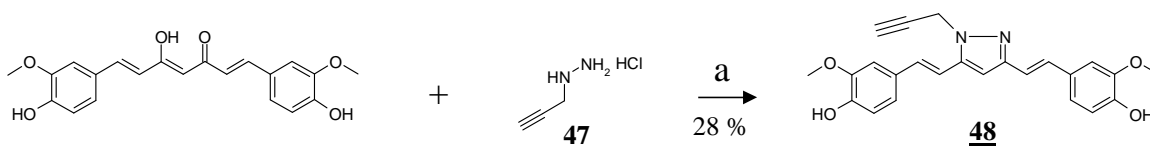
²¹² Narlawar, R.; Pickhardt, M.; Leuchtenberger, S.; Baumann, K.; Krause, S.; Dyrks, T.; Weggen, S.; Mandelkow, E.; Schmidt, B. Curcumin-derived pyrazoles and isoxazoles: Swiss army knives or blunt tools for Alzheimer's disease? *ChemMedChem* **2008**, 3, 165-172.

²¹³ Meyer, K. G. Simple preparation of monoalkylhydrazines. *Synlett* **2004**, 13, 2355-2356.

Dans ces travaux, une série d'hydrazines alkylées est préparée à partir du *tert*-butyl carbazate. La première étape consiste à former le *tert*-butylisopropylidène carbazate **46** à partir du réactif commercial *tert*-butyl carbazate par condensation de l'acétone. Cette étape est nécessaire pour présenter un seul site d'alkylation pour la substitution nucléophile.

L'alkylation est réalisée par substitution nucléophile du brome du 3-bromoprop-1-yne en milieu basique et en présence d'un agent de transfert de phase dans le toluène à reflux. Après élimination du toluène, l'hydrolyse du groupement Boc et de l'hydrazone est directement réalisée dans une solution HCl 2N dans le THF. Afin d'éliminer l'hydrazine formée par la déprotection du composé **46** qui n'a pas réagi, un séchage de l'huile obtenue est réalisé. Le chlorhydrate de la prop-2-ynylhydrazine **47** est obtenu avec un rendement de 50 %.

La synthèse du composé **48** est réalisée par condensation du chlorhydrate de la prop-2-ynylhydrazine **47** sur le curcumine en milieu acide et à reflux du méthanol (Figure 83).



Réactifs : (a) MeOH/AcOH (9/1), reflux, 72 h

Figure 83 : Schéma d'obtention de 4-((1E,1'E)-2-(5-(4-hydroxy-3-méthoxystyryl)-1-prop-2-ynyl)pyrazol-3-yl)vinyl-2-méthoxyphénol, **48**

Les conditions de réaction ont été adaptées de la synthèse des dérivés pyrazoles *N*-substitués du curcumine décrite par Narlawar et al. En effet, un excès du chlorhydrate de la prop-2-ynylhydrazine **47** a été ajouté et la réaction a été agitée à reflux du méthanol pendant 72 heures pour obtenir majoritairement le composé **48**. Après une étape de purification sur colonne de silice, le composé **48** est obtenu avec un rendement de 27 %. Le faible rendement de cette réaction s'explique principalement par la solubilité limitée du produit qui a conduit à sa perte lors de l'étape de purification.

B.4.3. Synthèses des assemblages multimériques

Tous les assemblages ont été réalisés par la cycloaddition 1,3-dipolaire azoture-alcyne catalysée par le cuivre (I). Dans la littérature les conditions de la CuAAC sont nombreuses et varient en fonction de la source de cuivre (I), des solvants utilisés, de la présence d'additifs et de l'utilisation des microondes. De nombreuses revues décrivent ces conditions que nous avons résumées dans le paragraphe suivant de manière non exhaustive.²¹⁴

En effet, le cuivre (I) peut être introduit directement dans le milieu sous forme de sels de cuivre (I) comme CuI, CuBr ou Cu(CH₃CN)₄PF₆ avec des quantités de 0,02 à 3 équivalents. Ces sels de cuivre (I) sont souvent utilisés sous atmosphère inerte et avec des bases telles que la DIEPA ou la 2,6-lutidine qui stabilisent l'état d'oxydation du cuivre et évitent la formation de produits secondaires. Le métal cuivre, Cu(0), peut être introduit dans le milieu réactionnel et le cuivre (I) est généré *in situ* dans le milieu. Il est introduit

²¹⁴ a) Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H. Cu(I)-catalyzed alkyne-azide click cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 1, 51-68. b) Meldal, M.; Tornøe, C. W. Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 2952-3015.

sous forme de copeaux de cuivre ou de poudre. Les temps de réaction sont toutefois plus longs et il est nécessaire d'ajouter une plus grande quantité de cuivre. Enfin, du cuivre à l'état d'oxydation (II) peut être introduit sous forme de CuSO_4 accompagné d'un réducteur tel que l'ascorbate de sodium qui génère *in situ* le cuivre (I). Cette source de cuivre (I) ne nécessite pas la manipulation sous atmosphère inerte et est l'une des sources les plus efficaces et les plus utilisées. Des ligands peuvent être introduits afin d'accélérer la réaction et stabiliser le cuivre (I), tels que le tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl]amine (TBTA) ou le sulfate de bathophénantroline.

En plus de l'eau, de nombreux solvants organiques peuvent être utilisés. Ce sont des solvants alcooliques comme le *tert*-butanol, le méthanol, l'éthanol mais aussi le DMF, le THF et le DMSO. Bien que la CuAAC ne nécessite pas de chauffage additionnel pour être efficace, l'utilisation des microondes peut diminuer de manière considérable les temps de réaction et limiter la formation de produits secondaires.

Pour la synthèse des assemblages, les conditions de CuAAC ont été optimisées principalement pour diminuer les temps de réaction et pour limiter les problèmes de solubilité et de précipitation des réactifs ou des produits formés. En effet, les précurseurs ne sont pas solubles en milieu aqueux et la formation d'un assemblage multimérique nécessite des temps de réaction longs et peut être problématique. En effet, il a été observé dans le cas de calixarènes fonctionnalisés par quatre groupements alcynes que la proximité des groupes alcynes sature par chélation le cuivre (I) et la CuAAC n'a pas eu lieu même à des températures élevées.²¹⁵

Pour certains assemblages, une grande quantité de cuivre (I) a été introduite sous la forme de CuSO_4 ou de métal cuivre. Des solvants tels que le DMSO ou le TFE ont été utilisés et les températures des réactions ont été augmentés soit par chauffage classique soit par l'utilisation des microondes.

★ Synthèse des assemblages de la Tacrine

Quatre assemblages ont été synthétisés à partir du dérivé de la tacrine, les assemblages nommés C4Tac, C2Tac, C1Tac et la tacrine fonctionnalisée avec un triazole. La synthèse par CuAAC des trois premiers assemblages a été réalisée avec comme source de cuivre (I) du métal cuivre sous forme de copeaux en présence d'ascorbate de sodium.

De l'ascorbate de sodium a été ajouté dans le milieu réactionnel afin de diminuer les temps de réactions. En effet, lors de la mise au point des conditions de réaction, nous avons remarqué que l'ajout d'ascorbate de sodium en quantité catalytique accélère la vitesse de réaction. L'ajout d'ascorbate de sodium dans le milieu réactionnel pour diminuer les temps de réaction a été décrit précédemment par Turner et al.²¹⁶ L'ajout de 3 équivalents d'ascorbate de sodium avec du CuI a permis une diminution du temps de réaction de 4 à 6 heures.

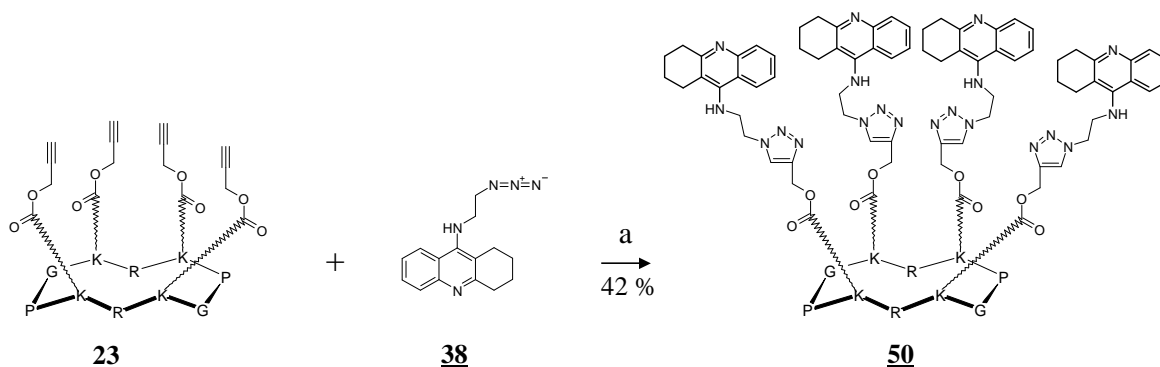
Les cyclodécapeptides et la 9-[(2-azidoéthyl)amino]-1,2,3,4-tétrahydroacridine **38** étant solubles en milieu aqueux nous avons utilisé un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ ou un mélange $\text{H}_2\text{O}/t\text{BuOH}$.

Le composé C4Tac **50** a été synthétisé à partir du cyclodécapeptide **23** et la 9-[(2-azidoéthyl)amino]-1,2,3,4-tétrahydroacridine **38** (Figure 84). Le dérivé de la tacrine **38** a été introduit en léger excès (1,2 éq./ site). Des copeaux de cuivre et 0,2 équivalent d'ascorbate de sodium ont été utilisés comme source de cuivre (I) dans un mélange

²¹⁵ Ryu, E. H.; Zhao, Y. Efficient synthesis of water-soluble calixarenes using click chemistry. *Org. Lett.* **2005**, 7, 1035-1037.

²¹⁶ Turner, R. A.; Oliver, A. G.; Lokey, R. S. Click chemistry as a macrocyclization tool in the solid-phase synthesis of small cyclic peptides. *Org. Lett.* **2007**, 9, 5011-5014.

H₂O/CH₃CN. Le milieu réactionnel est chauffé à 40°C et l'avancement de la réaction a été suivi par CLHP. Dans ces conditions, la réaction est totale au bout de 6 heures avec formation du composé C4Tac **50**.



Réactifs : (a) copeaux de cuivre, ascorbate de sodium (0,2 éq.), H₂O/CH₃CN (1/1), 40°C, 6 h

Figure 84 : Schéma d'obtention du composé C4Tac **50**

Afin d'éliminer l'excès de tacrine **38** le milieu réactionnel est filtré, lyophilisé et le résidu obtenu est précipité et lavé à l'éther diéthylique. Le précipité obtenu est ensuite purifié par CLHP semi-préparative afin d'obtenir le composé C4Tac **50** avec 42 % de rendement. Le composé a été caractérisé par CLHP et spectrométrie de masse (Figure 85).

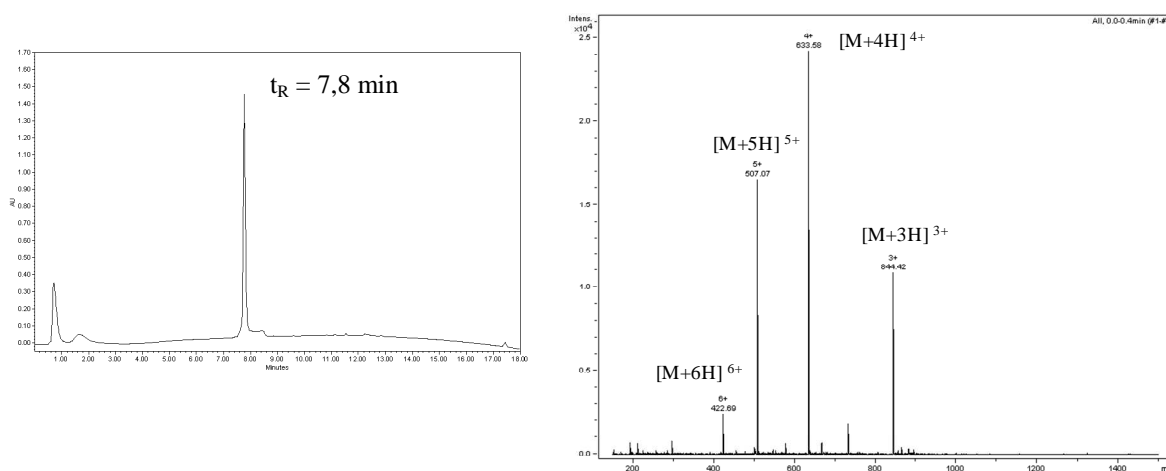
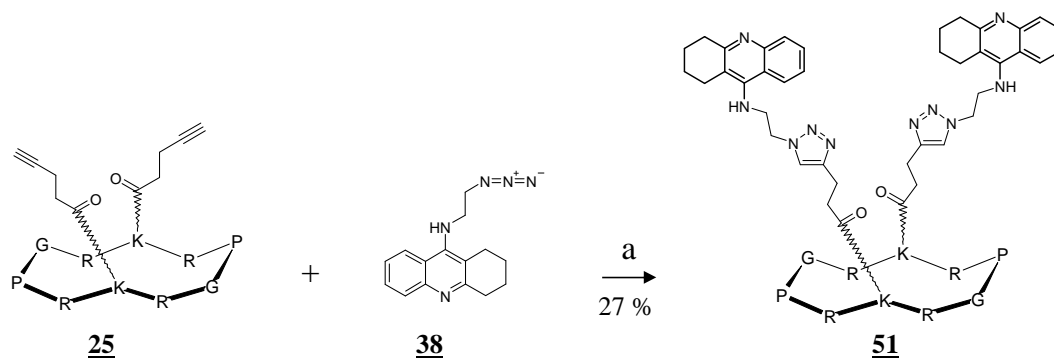


Figure 85 : Chromatogramme CLHP et spectre de masse ESI du composé C4Tac **50**

Le composé C2Tac **51** est synthétisé à partir du cyclodécapeptide **25** et de la 9-[(2-azidoéthyl)amino]-1,2,3,4-tétrahydroacridine **38** (Figure 86). Les conditions de réaction sont les mêmes que pour le composé C4Tac **50**.



Réactifs : (a) copeaux de cuivre, ascorbate de sodium (0,2 éq.), H₂O/CH₃CN (1/1), t.a., 29 h

Figure 86 : Schéma d'obtention du composé C2Tac **51**

Le traitement du milieu réactionnel a été réalisé comme pour le composé C4Tac **50** afin d'éliminer la tacrine **38** en excès. Le composé C2Tac **51** est obtenu après purification par CLHP semi-préparative avec un rendement de 27 %. Il a été caractérisé par spectrométrie de masse ESI (Figure 87). Le faible rendement s'explique par l'étape de purification. En effet, le composé **51** présente un profil CLHP de pic large et semble être retenu sur la colonne.

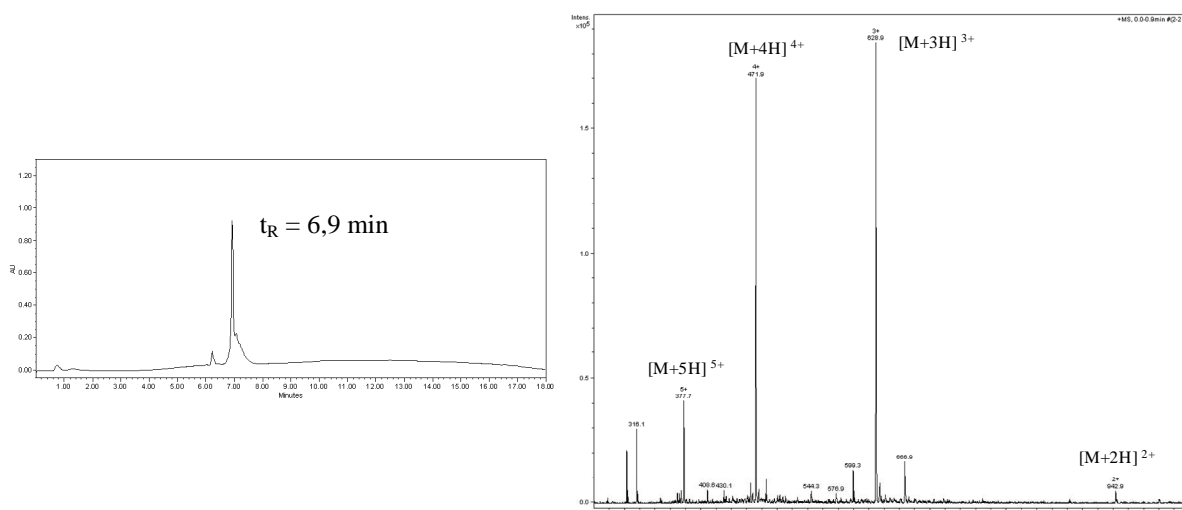
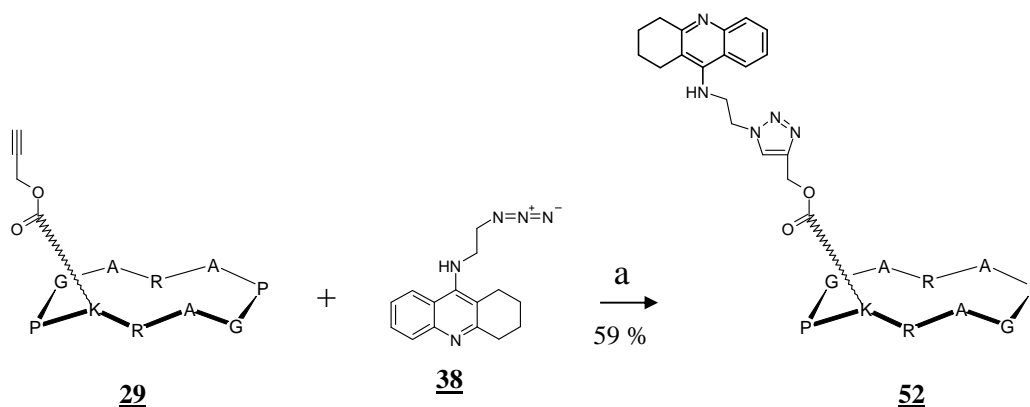


Figure 87 : Chromatogramme CLHP et spectre de masse ESI du composé **51**

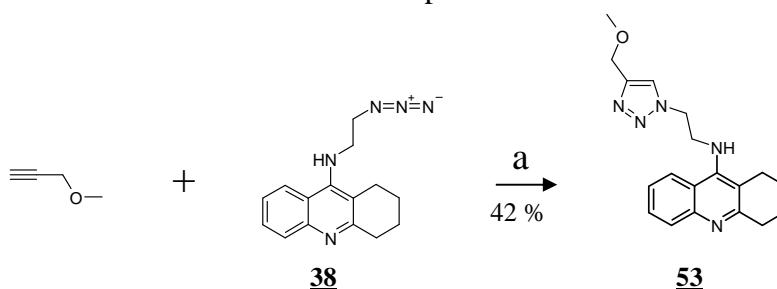
Le composé C1Tac **52** a été synthétisé à partir du cyclodécapeptide **29** et de la 9-[(2-azidoéthyl)amino]-1,2,3,4-tétrahydroacridine **38** (Figure 88). Les conditions de la CuAAC sont les mêmes que précédemment et le composé **52** est obtenu après purification par CLHP préparative avec un rendement de 59 %. Il a été caractérisé par spectrométrie de masse ESI.



Réactifs : (a) copeaux de cuivre, ascorbate de sodium (0,2 éq.), H₂O/CH₃CN (1/1), 40°C, 24 h

Figure 88 : Schéma d'obtention du composé C1Tac **52**

Le composé **53** a été synthétisé par CuAAC à partir du dérivé de la tacrine **38** et du 3-méthoxyprop-1-yne (Figure 89). Nous avons utilisé comme source de cuivre (I) 0,1 équivalent de CuSO₄ en présence de 0,2 équivalent d'ascorbate de sodium dans un mélange H₂O/*t*BuOH. Le milieu réactionnel est placé dans un microonde domestique.



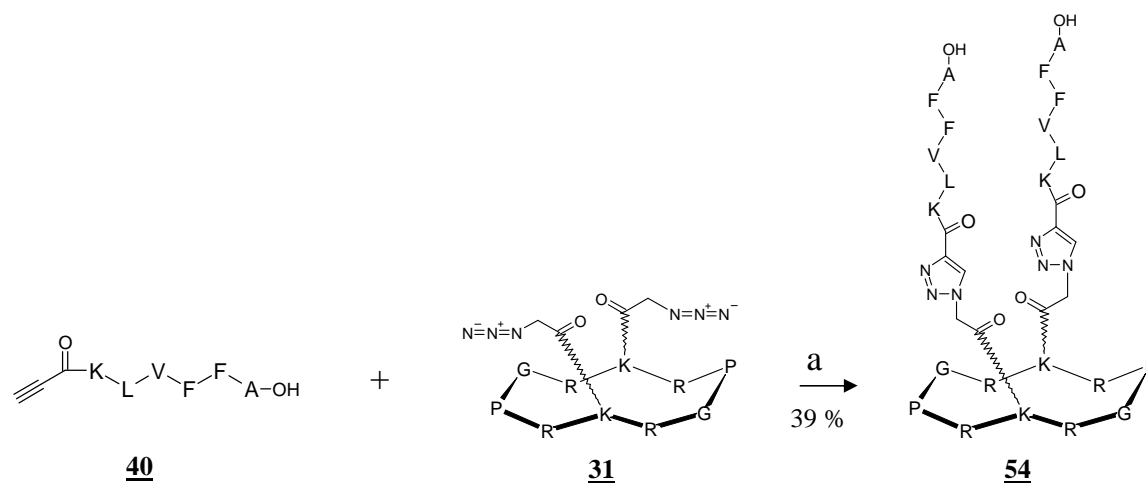
Réactifs : (a) CuSO₄ (0,1 éq.), ascorbate de sodium (0,2 éq.), H₂O/*t*BuOH (1/2), microonde domestique, 10 mn

Figure 89 : Schéma d'obtention du composé **53**

Après 10 minutes, une analyse par CLHP montre la disparition totale du produit de départ au profit du produit **53**. Après purification par CLHP préparative du milieu réactionnel, le composé **53** est obtenu avec un rendement de 42 %.

* Synthèse des assemblages Aβ₁₆₋₂₁

Le composé C2Aβ₁₆₋₂₁ **54** a été synthétisé par CuAAC entre le cyclodécapeptide **31** et le peptide Aβ₁₆₋₂₁ **40** (Figure 90). La source de cuivre (I) utilisée est le sulfate de cuivre avec le réducteur ascorbate de sodium. Nous avons utilisé d'autres sources de cuivre (I) pour cette réaction comme le métal cuivre ou du CuI en présence de 2,6-lutidine et de DIPEA. Cependant, dans ces deux conditions la réaction n'est pas totale. Les solvants ont été adaptés à la manipulation du peptide Aβ₁₆₋₂₁ **40**. En effet, dans un mélange H₂O/*t*BuOH (1/1), le milieu réactionnel forme rapidement un gel et la réaction n'évolue plus. L'ajout de TFE a limité la formation du gel et le chauffage par microondes a permis la formation du composé C2Aβ₁₆₋₂₁ **54** en 20 minutes.



Réactifs : (a) CuSO_4 (0,02 éq.), ascorbate de sodium (0,05 éq.), $\text{H}_2\text{O}/t\text{BuOH}/\text{TFE}$ (1/1/1), microonde domestique, 20 mn

Figure 90 : Schéma d'obtention du composé **54**

Le milieu réactionnel a été directement purifié par CLHP semi-préparative sur phase inverse C5 afin d'éviter une rétention importante du composé sur la colonne. Le composé $\text{C2A}\beta_{16-21}$ **54** a été obtenu avec un rendement de 39 % et a été caractérisé par spectrométrie de masse ESI.

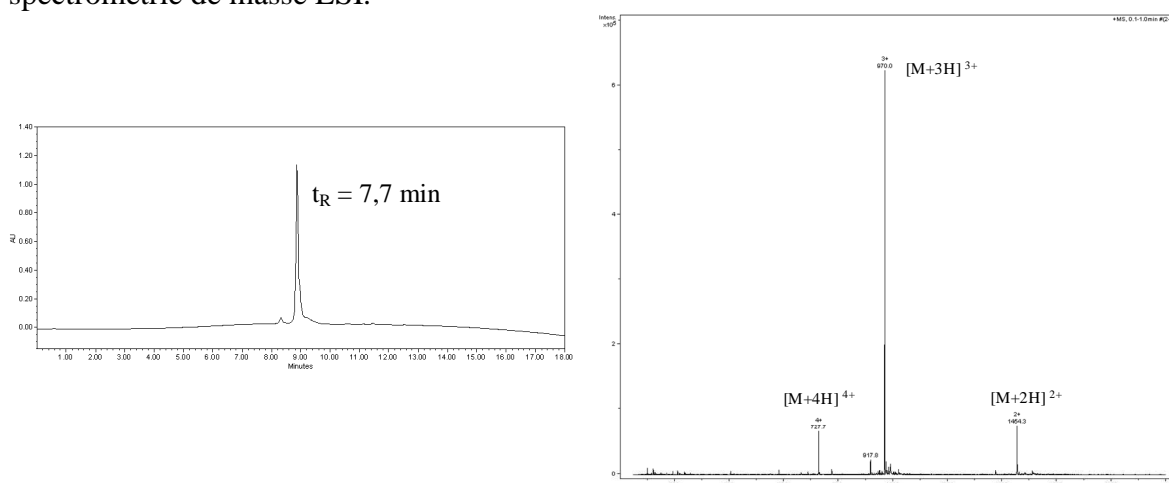
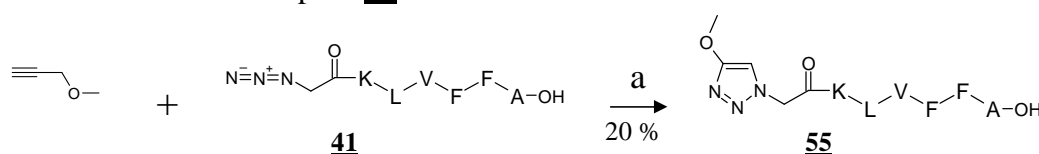


Figure 91 : Chromatogramme CLHP et spectre de masse ESI du composé **54**

Un analogue du peptide $\text{A}\beta_{16-21}$ fonctionnalisé par un triazole **55** a été synthétisé à partir du peptide $\text{A}\beta_{16-21}$ **41** et du 3-méthoxy-1-propyne (Figure 92). Cependant, la présence du réactif 3-méthoxy-1-propyne a entraîné la précipitation du peptide **41** dans le milieu réactionnel malgré la présence de TFE. Après 20 heures à 40°C l'injection du surnageant montre la formation du composé **55**.



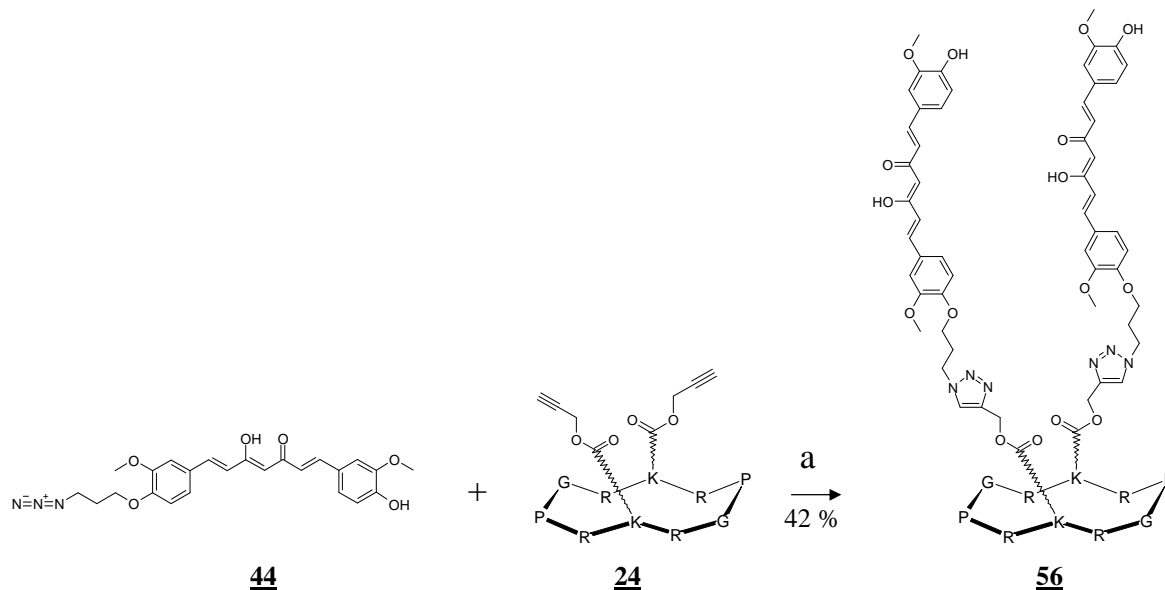
Réactifs : (a) CuSO_4 (0,5 éq.), ascorbate de sodium (1 éq.), $\text{H}_2\text{O}/t\text{BuOH}/\text{TFE}$ (1/15/30), 40°C , 20 h

Figure 92 : Schéma d'obtention du composé **55**

La purification du milieu réactionnel permet d'obtenir le peptide **55** avec un rendement de 20 %.

★ Synthèse des assemblages du Curcumin

Deux assemblages du curcumin ont été réalisés par CuAAC. Le premier assemblage C2Cur **56**, a été synthétisé à partir du cyclodécapeptide **24** et du composé **44** (Figure 93). La source de cuivre (I) utilisée est le métal cuivre en présence du réducteur ascorbate de sodium dans un mélange H₂O/*t*BuOH/CH₃CN (1/1/1) à 40°C. Dans ces conditions, nous observons la formation d'un précipité. L'avancement de la réaction suivi par HPLC montre la disparition des produits de départ au profit du composé **56** qui apparaît sur le chromatogramme sous forme d'un pic large (Figure 94).



Réactifs : (a) copeaux de cuivre, ascorbate de sodium (5 éq.), H₂O/*t*BuOH/CH₃CN (1/1/1), 40°C, 72 h

Figure 93 : Schéma d'obtention du composé C2Cur **56**

La masse du composé **56** a été indentifiée par spectrométrie de masse accompagnée d'un adduit TFA (+114). La purification du milieu réactionnel par CLHP semi-préparative permet d'obtenir le composé **56** avec 42 % de rendement.

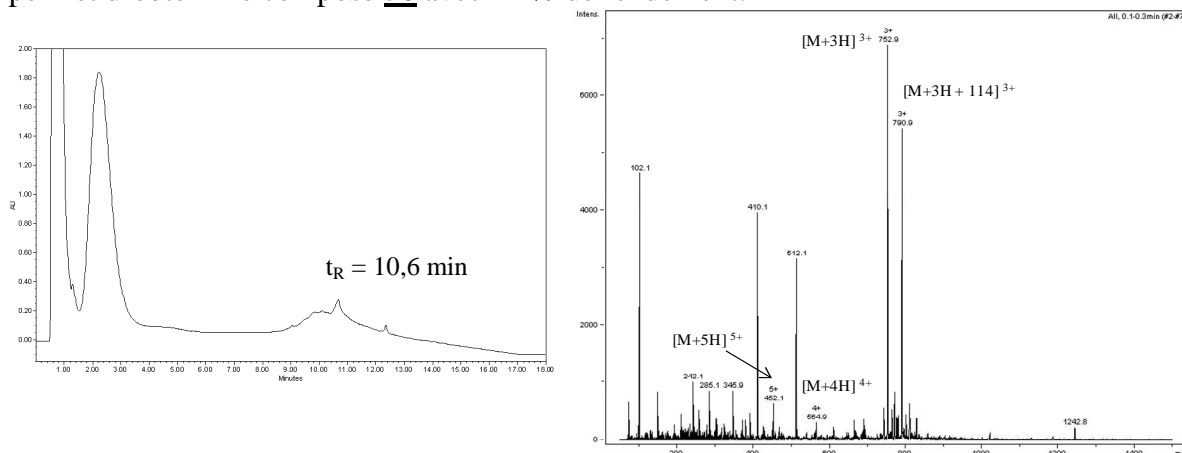
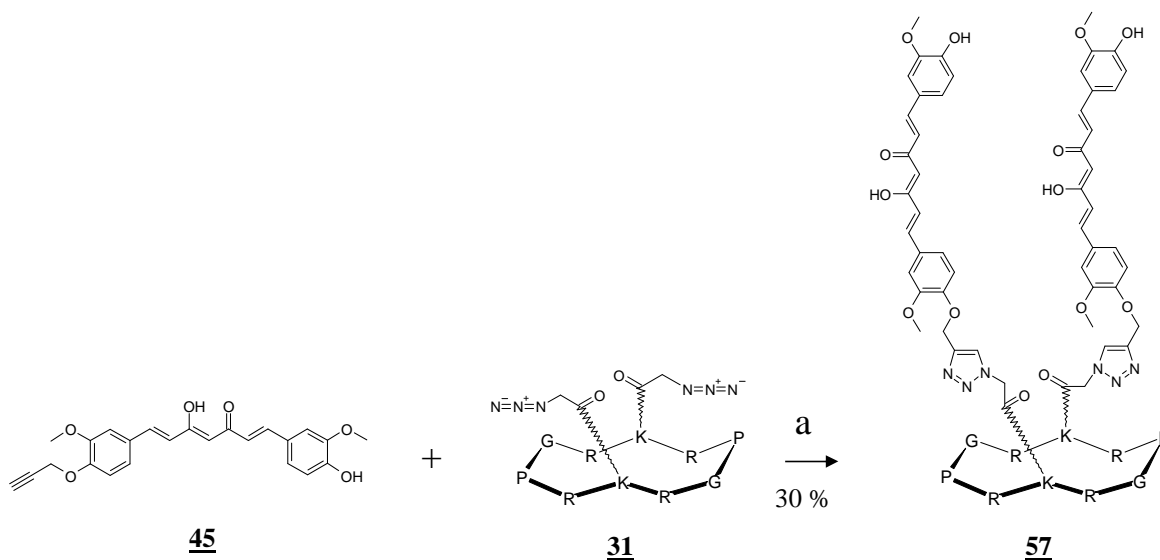


Figure 94 : Chromatogramme CLHP et spectre de masse ESI du composé C2Cur **56**

Le second assemblage C2Cur **57** a été synthétisé à partir du cyclodécapeptide **31** et du composé **45** (Figure 95). Nous avons, comme précédemment, utilisé comme source de cuivre (I) des copeaux de cuivre avec de l'ascorbate de sodium. En effet, les essais en présence de sulfate de cuivre et d'ascorbate de sodium conduisent à la précipitation des synthons de départ. Nous avons toutefois utilisé moins d'ascorbate de sodium (0,1 équivalent) et afin de limiter les phénomènes d'agrégation et de solubiliser le dérivé du curcumin **45** du DMSO et de TFE ont été utilisés comme co-solvants. Le milieu réactionnel est chauffé à 60°C et après 7 heures nous n'observons plus de produits de départ en CLHP.



Réactifs : (a) copeaux de cuivre, ascorbate de sodium (0,1 éq.), DMSO/H₂O/TFE (2/1/1), 60°C, 7 h

Figure 95 : Schéma d'obtention du composé C2Cur **57**

Cependant, le produit **57** identifié par spectrométrie de masse apparaît sur le chromatogramme sous forme d'un pic large. On observe comme pour le composé C2Cur **56** des signaux en spectrométrie de masse correspondants à un et deux adduits TFA (Figure 96). La purification du milieu réactionnel par CLHP semi-préparative sur phase inverse C5 permet d'obtenir le composé C2Cur **57** avec 30 % de rendement.

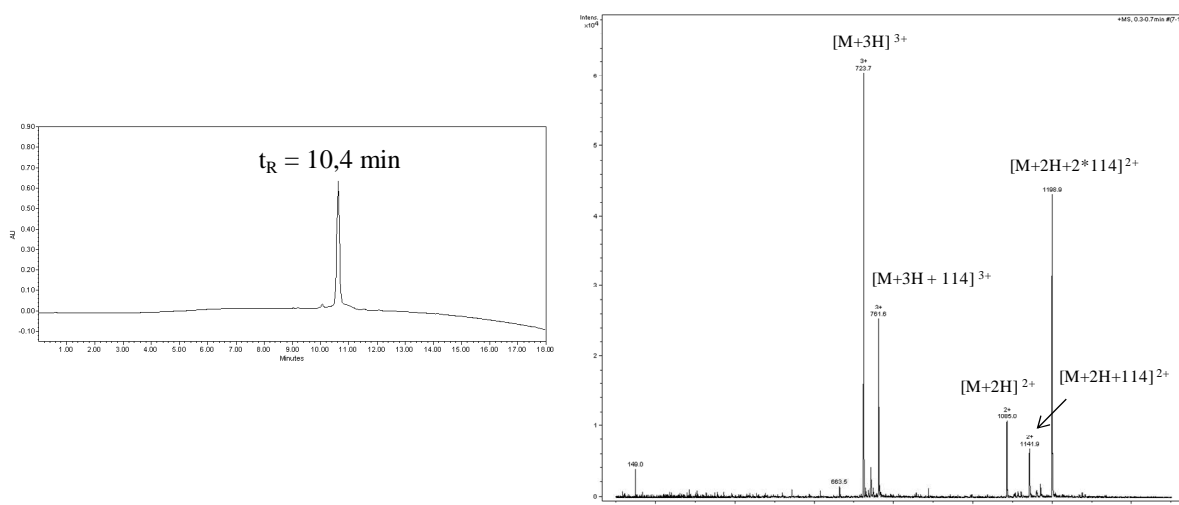


Figure 96 : Chromatogramme CLHP et spectre de masse ESI du composé C2Cur **57**

B.4.4. Caractérisation par RMN à deux dimensions du composé C4Tac 50

Le composé C4Tac **50** a été caractérisé par RMN-¹H afin, notamment, de préciser la régiosélectivité de la réaction de cycloaddition. Nous avons utilisé la numérotation présentée dans la figure 97 pour l'attribution des protons de la molécule.

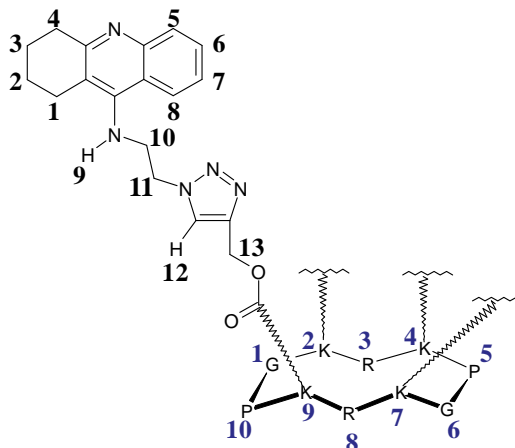


Figure 97 : Structure du composé C4Tac avec la numérotation utilisée pour l'attribution

Le peptide a été attribué à partir des spectres NOESY²¹⁷, TOCSY²¹⁸, COSY²¹⁹ et en suivant la méthode séquentielle²²⁰ représentée sur la figure 98.

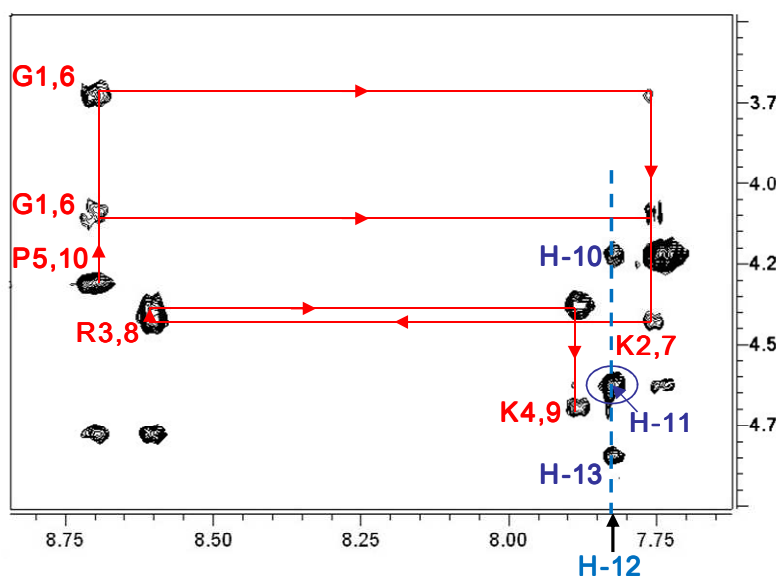


Figure 98 : Spectre NOESY représentant un agrandissement de la zone des NH/H α . L'attribution séquentielle du cyclodécapeptide est signalée par les lignes rouges. Le proton H-12 corrèle avec H-10,11 et 13

²¹⁷ Jeener, J., Meier, B. H., Bachmann, P., and Ernst, R. R. Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy, *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4546-4553.

²¹⁸ Braunschweiler, L., and Ernst, R. R. Coherence transfer by isotropic mixing: Application to proton correlation spectroscopy, *J. Magn. Reson.* **1983**, *53*, 521-528.

²¹⁹ Piantini, U., Sørensen, O. W., and Ernst, R. R. () Multiple quantum filters for elucidating NMR coupling networks, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6800-6801.

²²⁰ Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. **1986**, John Wiley and Sons, New York.

Nous pouvons noter que cette molécule possède un pseudo axe de symétrie C4 qui rend tous les dérivés de la tacrine chimiquement équivalents ainsi qu'un pseudo axe de symétrie C2 au niveau du cyclodécapeptide.

La mise en évidence d'un NOE entre le proton H-12 et les protons H-11 permet de confirmer la formation majoritaire du régioisomère 1,4 pour le triazole. Cette corrélation est encadrée sur la figure 98 qui représente le spectre NOESY. Nous n'avons pas observé de NOE entre H-13 et H-11 supposant une proportion du régioisomère 1,5 inférieure à 5%.

Les déplacements chimiques du composé C4Tac **50** sont donnés dans le tableau 3.

a)

	NH	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	NH ζ
G 1,6	8,65	4,13-3,74	\emptyset	\emptyset	\emptyset	\emptyset	\emptyset
K 2,7	7,75	4,44	1,68	1,21	1,38	2,91	6,80
R 3,8	8,90	4,39	1,87-1,75	1,58	3,19	\emptyset	7,80
K 4,9	7,87	4,71	1,73-1,55	1,29	1,38	2,96	6,80
P 5,10	\emptyset	4,32	2,28-2,10	2,00-1,94	3,82-3,64	\emptyset	\emptyset

b)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
2,30	1,76	1,76	2,75	7,74	7,29	7,58	7,38	6,79	4,24	4,64	7,83	4,86

Tableau 3 : Attribution des protons de la molécule C4Tac **50 : (a) protons du cyclodécapeptide ; (b) protons du dérivé de la tacrine**

B.5. Inhibition de la formation des fibres amyloïdes

Les peptides A β ne sont pas pathogènes lorsqu'ils sont sous forme de monomères non structurés. Cependant, lorsqu'ils s'organisent en fibres, ils deviennent toxiques pour les cellules neuronales. Ainsi, inhiber la conversion des peptides A β de la forme monomérique à la forme de fibres est l'une des stratégies thérapeutiques développées pour combattre la maladie d'Alzheimer, mais aussi d'autres amyloses.

La formation de fibres amyloïdes peut être caractérisée par plusieurs méthodes et techniques tels que la microscopie,¹⁹ la biréfringence⁵ ou fluorescence⁶ de colorants, la diffusion de la lumière,²⁰ ou la toxicité cellulaire.²²¹ Des expériences *in vitro* ont ainsi été mises au point afin d'évaluer l'activité de molécules sur l'inhibition de leur formation.

Nous avons utilisé deux types d'expériences *in vitro* pour évaluer l'activité inhibitrice de nos composés sur la formation des fibres, adaptées des travaux décrits par Jarrett et Lansbury : des expériences dites de nucléation et des expériences d'élongation.^{73,222}

La première expérience décrite dans la figure 99 est l'expérience dite de nucléation. La cinétique de formation des fibres à partir du peptide A β_{40} a une allure sigmoïdale et peut être suivie par l'augmentation du signal de fluorescence de la thioflavine T en fonction du temps. La ThT est introduite directement dans l'échantillon de polymérisation permettant une lecture de l'ensemble de l'échantillon et de s'affranchir des problèmes de reproductibilité dus aux prélèvements d'aliqots en milieu non homogène. Par ailleurs, la ThT est connue pour peu interférer avec le phénomène de formation de fibres.^{6,133}

Le processus de formation de fibre est initié par la dissolution du peptide A β_{40} sous forme de monomère dans un tampon approprié. Pendant une période de 2 à 6 jours qui dépend de la concentration en peptide A β_{40} , des conditions d'agitations ou de la température d'incubation, le signal de fluorescence n'augmente pas. Cette période, appelée temps de latence, correspond à la formation d'oligomères solubles, non amyloïdogéniques, qui n'induisent pas d'émission de fluorescence de la ThT.

Une fois le nucléus formé, l'élongation de la fibre est rapide, de l'ordre de 24 heures. L'augmentation nette du signal de fluorescence de la ThT continue jusqu'à ce que tout le peptide non polymérisé dans l'échantillon soit consommé. Un plateau est alors observé et correspond au maximum de polymérisation (y).

²²¹Shearman, M. S.; Ragan, C. I.; Iversen, L. L. Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, 91, 1470-1474.

²²²Jarrett, J. T.; Lansbury, P. T., Jr. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* **1993**, 73, 1055-1058.

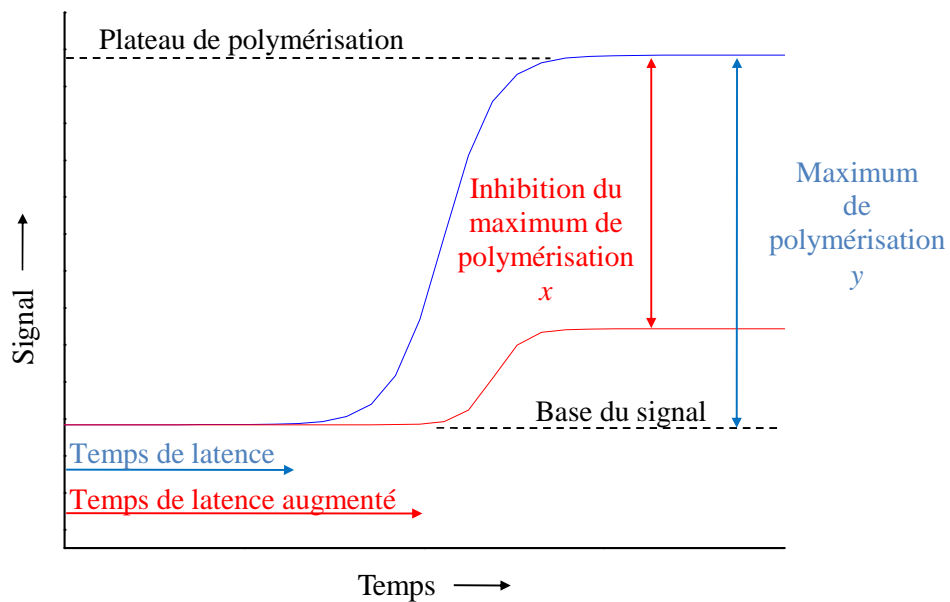


Figure 99 : Schéma de l'expérience de nucléation de fibres, bleu : sans inhibiteur ; rouge : avec un inhibiteur

Pour évaluer l'effet d'un inhibiteur, le temps de latence et le maximum de polymérisation sont les principales caractéristiques prises en compte. Un composé qui interfère avec le processus de nucléation va augmenter le temps de latence. L'inhibiteur peut aussi diminuer la vitesse d'élongation et réduire la quantité de peptide polymérisé à la fin du processus. L'activité inhibitrice est exprimée par le rapport de l'inhibition du maximum de polymérisation (x) sur le maximum de polymérisation sans inhibiteur (y). Plus le rapport x/y sera élevé, plus le composé aura une activité d'inhibition importante sur la polymérisation.

La deuxième expérience utilisée dans nos travaux consiste en l'élongation des fibres à partir d'amorces de fibres. L'ajout dans l'échantillon de l'expérience de nucléation d'une petite quantité de fibres préformées (environ 10 %) amorce immédiatement l'élongation supprimant le temps de latence. La formation de fibres suit alors un modèle cinétique du premier ordre.²²³

Ces expériences ont été réalisées avec le peptide $A\beta_{40}$ obtenu par synthèse automatisée et purifié par CLHP en phase inverse C5 au laboratoire (Cf Annexe I).¹³¹

Lors de cette étude nous avons utilisé également la microscopie à force atomique, AFM, (mode contact intermittent dit « tapping ») pour visualiser la présence ou non des fibres et leur morphologie.

²²³ Naiki, H.; Gejyo, F. Kinetic analysis of amyloid fibril formation. *Methods Enzymol.* **1999**, 309(Amyloid, Prions, and Other Protein Aggregates), 305-318.

B.5.1. Inhibition de la formation des fibres par les assemblages de la Tacrine et de la Quinacrine

Nous avons dans premier temps évalué l'activité du composé C4Tac **50** sur la polymérisation du peptide A β ₄₀ par l'expérience de nucléation. Le peptide A β ₄₀ est placé dans les puits d'une microplaque à la concentration de 50 μ M. Le composé C4Tac **50**, solubilisé dans un mélange H₂O/DMSO (1/1), est introduit dans les puits à différentes concentrations. La ThT est introduite dans le milieu à la concentration de 10 μ M et la polymérisation est initiée par l'ajout de 50 mM de phosphate de sodium et de 100 mM de NaCl, pH 7,4. L'augmentation du signal de fluorescence de la ThT est lue à 485 nm après excitation à 440 nm. Pour chaque série d'expériences des puits témoins sont réalisés dans lesquels le peptide A β ₄₀ est étudié dans les mêmes conditions mais en absence d'inhibiteur potentiel. Afin de vérifier la fiabilité des expériences, une série de puits est consacrée à un inhibiteur connu comme le NDGA, la rifampicine ou le curcumin.

Les résultats de l'inhibition de la formation de fibre du peptide A β ₄₀ par le composé C4Tac **50** sont présentés dans la figure 100. Nous avons incubé à 37°C le peptide A β ₄₀ avec 1, 5, 10, 50 et 100 μ M du composé C4Tac **50** en triplicata sur une durée d'environ 15 jours. Les courbes présentées sont la moyenne des valeurs de fluorescence obtenues sur les trois puits et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type.

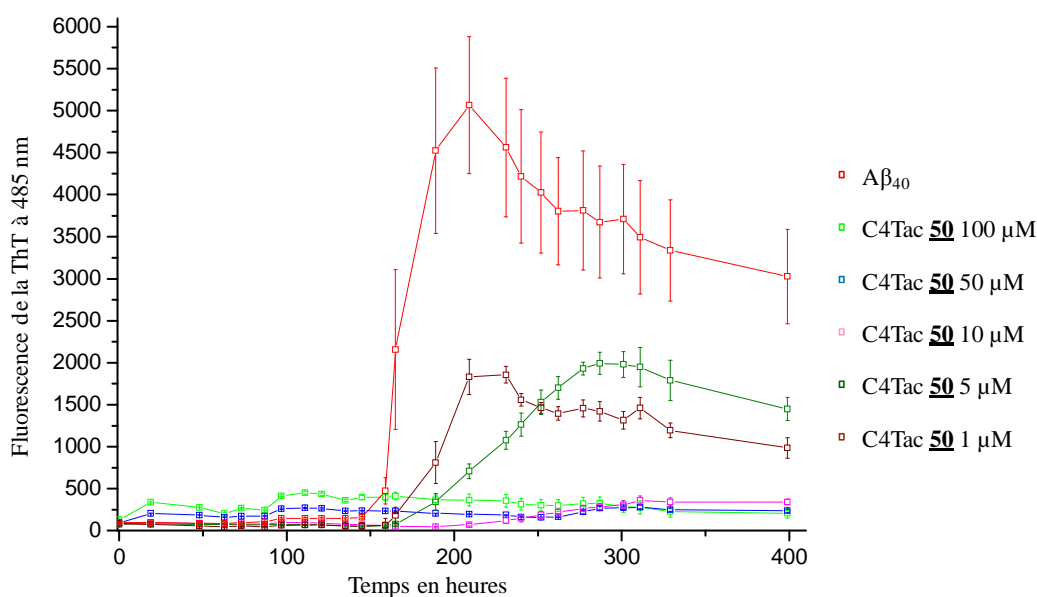


Figure 100 : Inhibition de la formation de fibres du peptide A β ₄₀ (50 μ M) avec le composé C4Tac **50 suivie par fluorescence de la ThT (10 μ M) à 485 nm**

Comme décrit précédemment, la formation de fibres à partir du peptide A β ₄₀ sans inhibiteur suit une courbe de type sigmoïdale avec un temps de latence d'environ 5 jours, une augmentation de la fluorescence sur une durée de 24 à 48 heures et enfin un plateau. Le plateau correspond à un maximum de fluorescence suivie d'une diminution du signal qui est observée de manière générale dans toutes les expériences.

Lorsque le peptide A β ₄₀ est incubé avec 10, 50 et 100 μ M de composé C4Tac **50** une inhibition du signal supérieure à 90 % est observée (Figure 101). Pour les concentrations de 1 et 5 μ M, l'inhibition est de l'ordre de 60 %. On constate, de plus, d'après la figure 100 que le composé ralentit l'élongation et tend à augmenter le temps de latence.

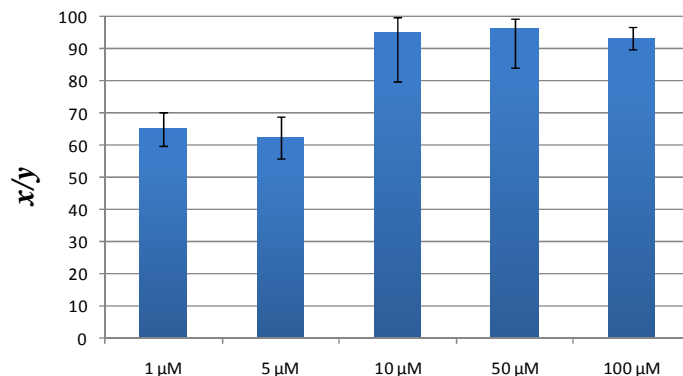


Figure 101 : Effet (x/y) du composé C4Tac 50 sur la formation des fibres du peptide Aβ₄₀

Les expériences de nucléation suivantes ont été réalisées avec les autres assemblages de la tacrine dans les mêmes conditions que précédemment.

Le composé C2Tac 51 à la concentration de 100 μM inhibe 70 % de la fluorescence de la ThT et environ 30 % du signal à 20 μM (Figure 102). Par contre, il ne modifie pas de manière significative le temps de latence.

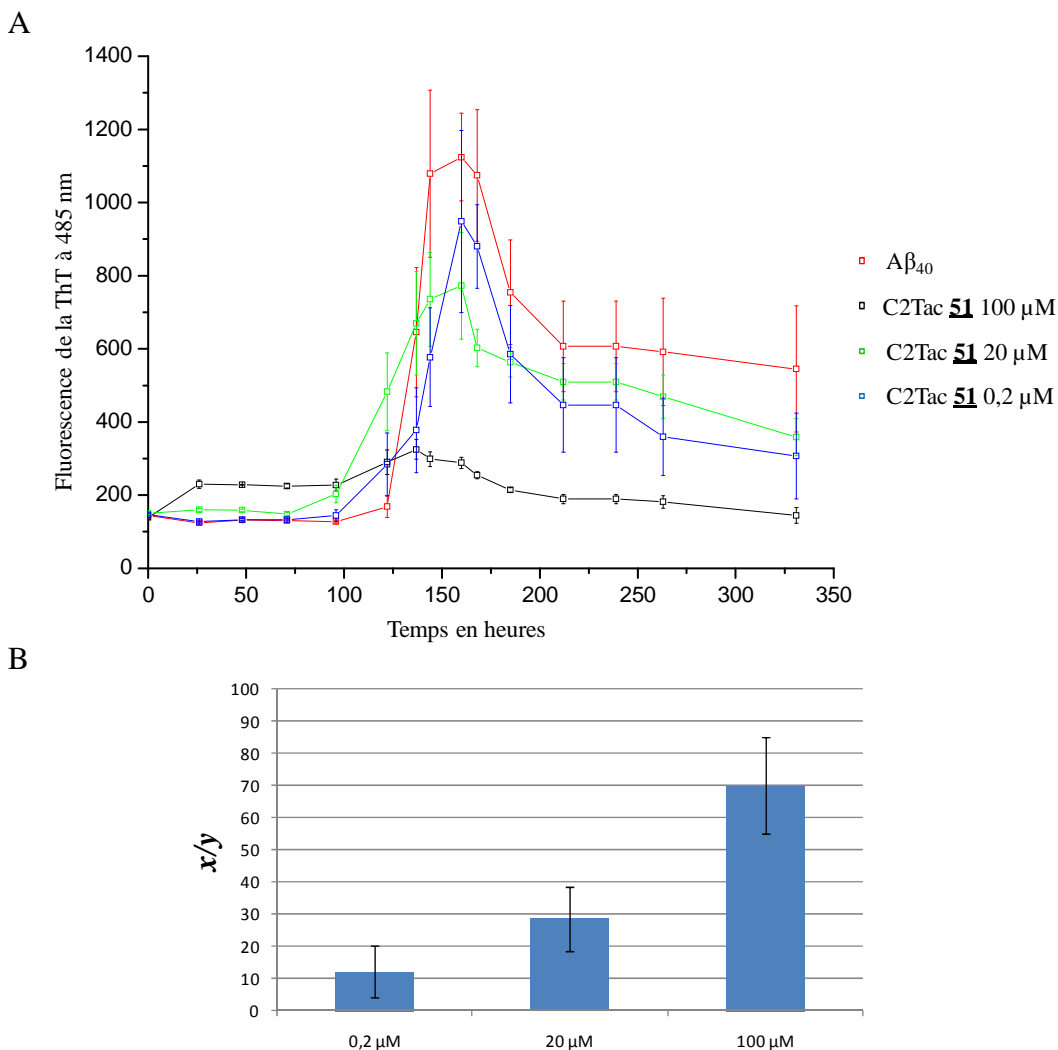


Figure 102 : (A) Etude de l'inhibition de la formation de fibres du peptide Aβ₄₀ (50 μM) avec le composé C2Tac 51 suivie par fluorescence de la ThT (10 μM) à 485 nm. (B) Effet (x/y) du composé C2Tac 51 sur la formation des fibres du peptide Aβ₄₀

Pour le composé C1Tac **52** on constate que quelque soit la concentration, de 4 à 400 μM , il y a moins de 30 % d'inhibition du signal (Figure 103).

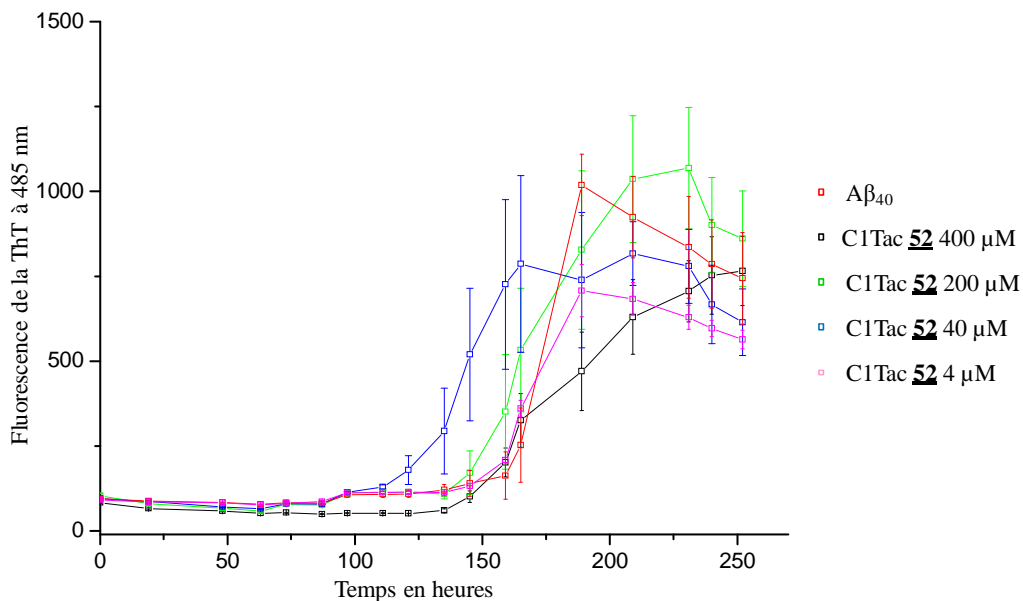


Figure 103 : Etude de l'inhibition de la formation de fibres du peptide Aβ₄₀ (50 μM) avec le composé C1Tac **52** suivie par fluorescence de la ThT (10 μM) à 485 nm

Dans le cas du dérivé de la tacrine (Tac) **53** une inhibition du signal inférieure à 5 % est observée pour les concentrations de 1 à 400 μM (Figure 104).

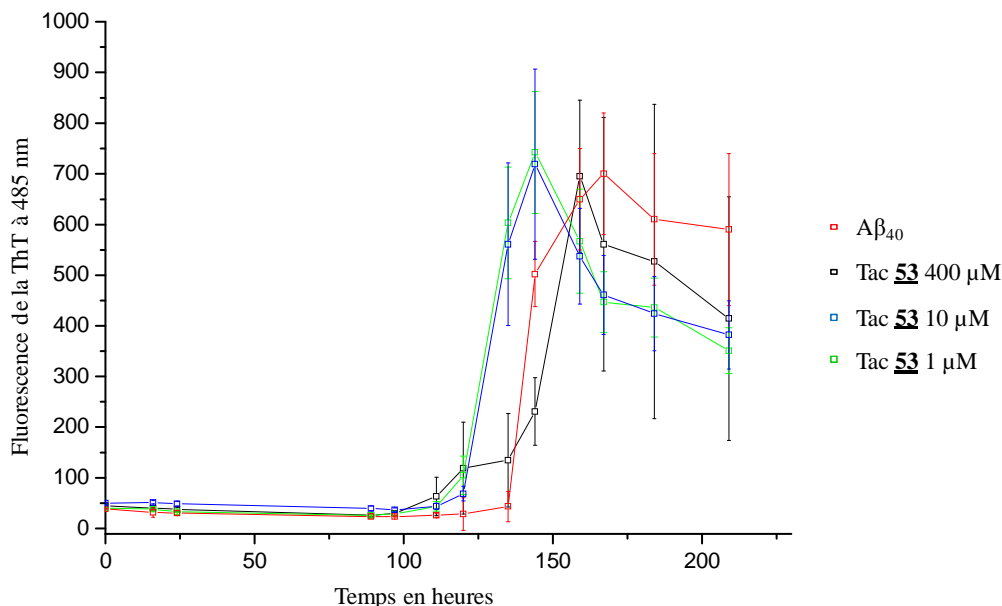


Figure 104 : Etude de l'inhibition de la formation de fibres du peptide Aβ₄₀ (50 μM) avec le composé Tac **53** suivie par fluorescence de la ThT (10 μM) à 485 nm

Enfin pour les cyclodécapeptides de référence on peut constater qu'il y a peu d'inhibition de la fluorescence de la ThT.

Pour le composé C2K **33** on observe un maximum d'inhibition de 15 % à 50 μM . Toutefois, on peut observer une augmentation du temps de latence pour la concentration de 50 μM (Figure 105).

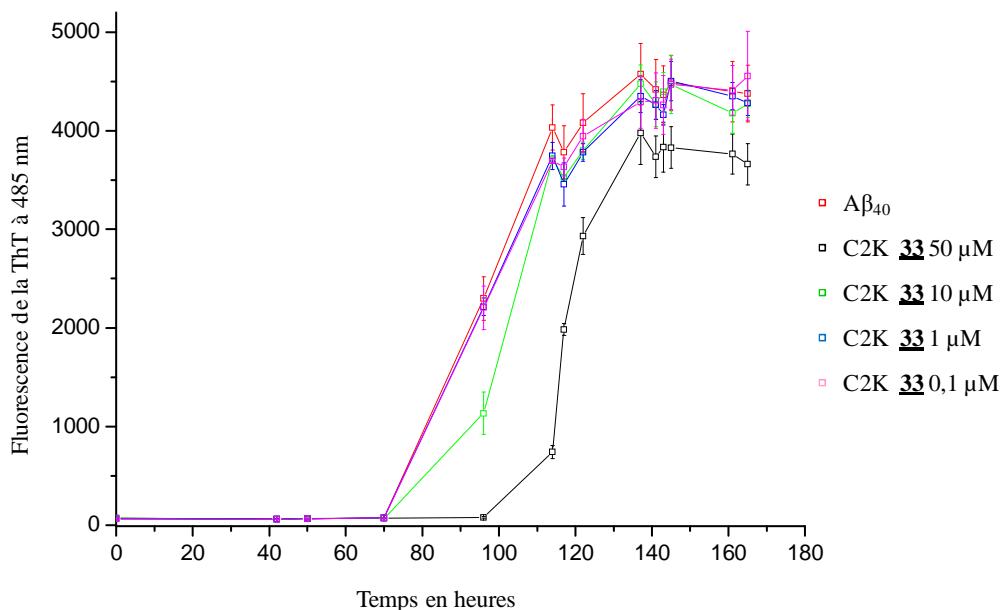


Figure 105 : Etude de l'inhibition de la formation de fibres du peptide Aβ₄₀ (50 μM) avec le composé C2K **33** suivie par fluorescence de la ThT (10 μM) à 485 nm

Pour le cyclodécapeptide C4K **32** on observe une inhibition du signal de 25 % à 100 et 200 μM mais le temps de latence n'est pas affecté. (Figure 106).

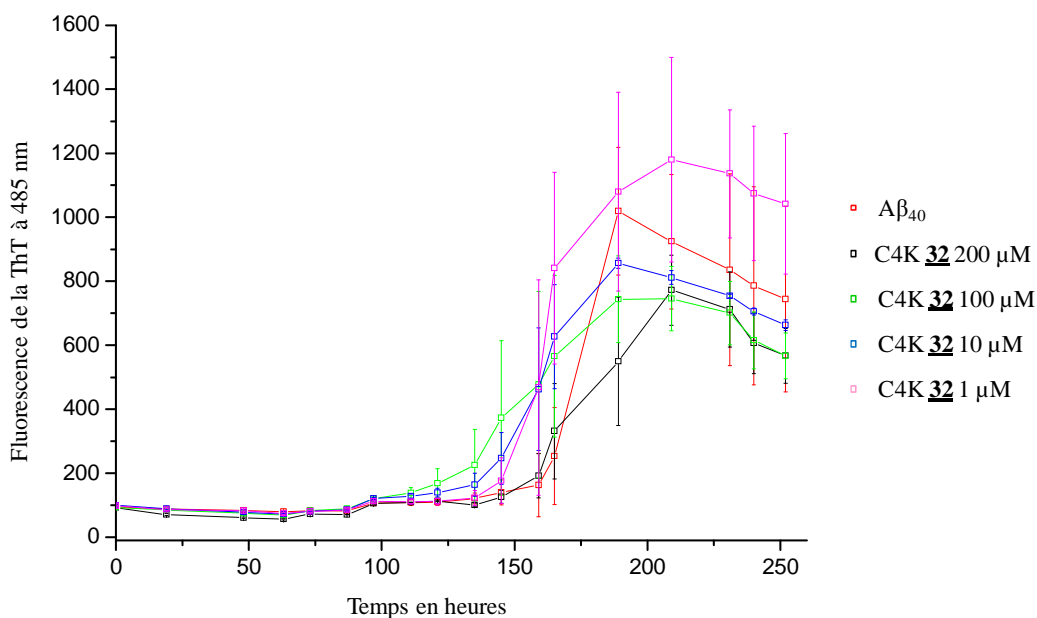


Figure 106 : Etude de l'inhibition de la formation de fibres du peptide Aβ₄₀ (50 μM) avec le composé C4K **32** suivie par fluorescence de la ThT (10 μM) à 485 nm

Afin de confirmer l'altération de la formation de fibres nous avons visualisé par AFM les échantillons d'agrégation de l'Aβ₄₀ en présence des composés C4Tac **50**, C1Tac **52**, Tac **53**, C2K **33** et C4K **32** (Figure 107).

Les échantillons sont réalisés dans les mêmes conditions que précédemment et nous les visualisons après 12 jours d'incubation à 37 °C.

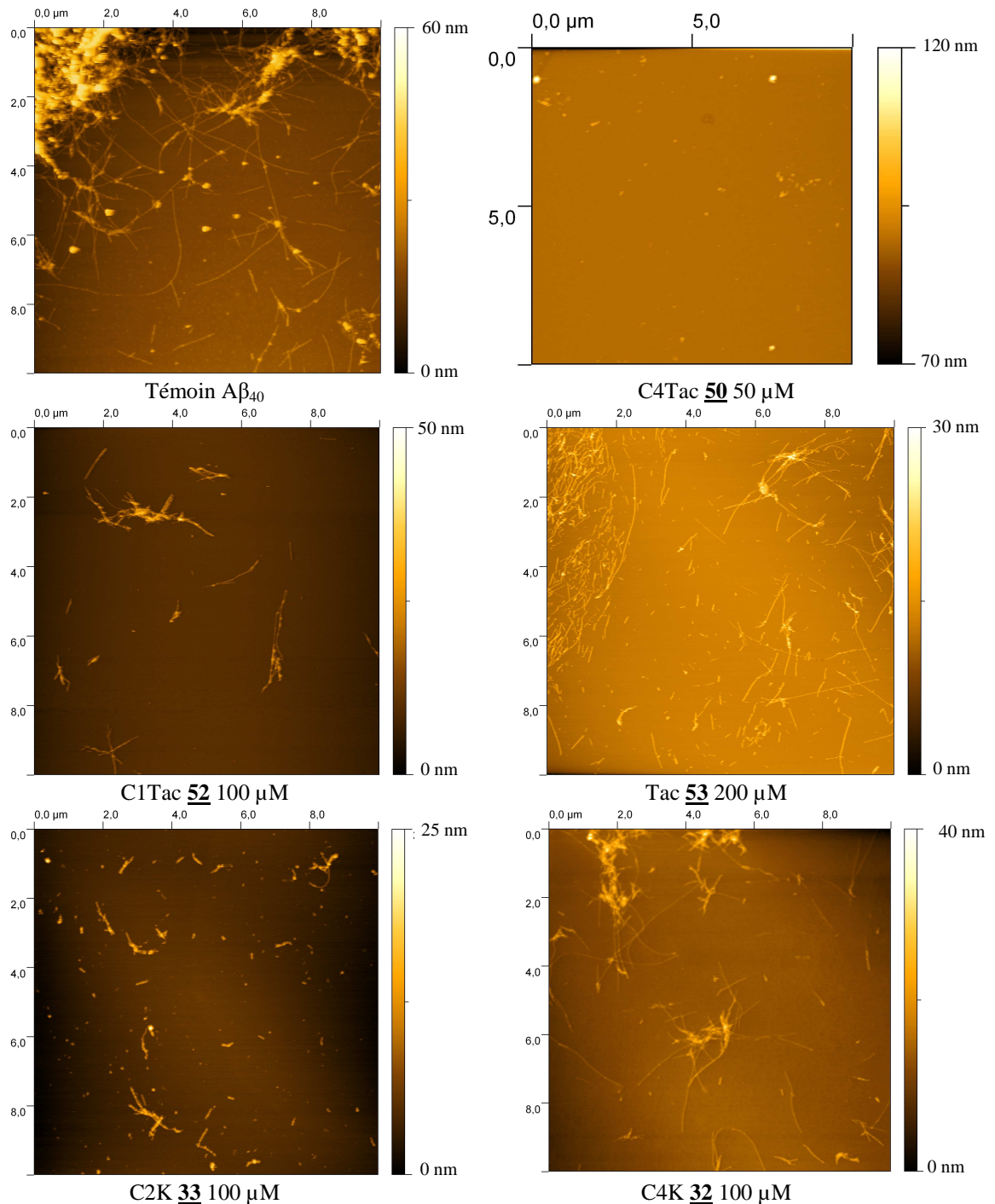


Figure 107 : Images AFM des fibres de l' $A\beta_{40}$ (50 μM) en présence des composés après incubation à 37°C pendant 12 jours

Nous n'observons pas de fibres dans l'échantillon où le composé C4Tac 50 est présent à 50 μM . Par contre, pour les échantillons en présence de C1Tac 52, Tac 53, C2K 33 et C4K 32 à des concentrations égales ou supérieures à 100 μM , nous observons des fibres. Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par la fluorescence de la thioflavine T. Toutefois, on peut noter que pour les composés C1Tac 52 et C2K 33 les fibres observées sont de taille plus réduite.

Nous avons résumé les activités inhibitrices des assemblages de la tacrine dans le tableau 4. Le composé C4Tac **50**, en défaut par rapport au peptide A β ₄₀, présente la meilleure activité avec une inhibition de 90 % à 10 μ M. Le composé C2Tac **51** à une concentration dix fois supérieure ne conduit qu'à 70 % d'inhibition. L'activité d'inhibition estimée, pour le composé C4Tac **50**, est inférieure à 1 μ M et est comprise entre 20 et 100 μ M pour le composé C2Tac **51**. Les composés C1Tac **52**, Tac **53** et les cyclodécapeptides **32** et **33** présentent une faible activité inhibitrice même en large excès par rapport au peptide A β ₄₀ (IC₅₀>100 μ M).

Composés, I	C4Tac 50	C2Tac 51	C1Tac 52	Tac 53	C2K 33	C4K 32
Concentration μ M	10	100	400	400	50	200
Rapport (A β ₄₀ /I)	1/0,2	1/2	1/8	1/8	1/1	1/4
% d'inhibition	90	70	30	5	15	25
IC ₅₀ (μ M) estimée	IC ₅₀ <1	20<IC ₅₀ <100	IC ₅₀ >100	IC ₅₀ >100	IC ₅₀ >100	IC ₅₀ >100

Tableau 4 : Activités inhibitrices des assemblages de la tacrine

Nous avons réalisé ensuite des expériences d'élongation de fibres de l'A β ₄₀ en présence d'une partie de ces composés. Nous avons pour cela ajouté 10 % de fibres préformées (5 μ M), qui sert d'amorce, aux échantillons de l'expérience de nucléation. L'augmentation du signal de fluorescence de la ThT à 485 nm est immédiatement suivie après l'ajout des fibres préformées dans les échantillons sur une durée de 23 heures (Figure 108).

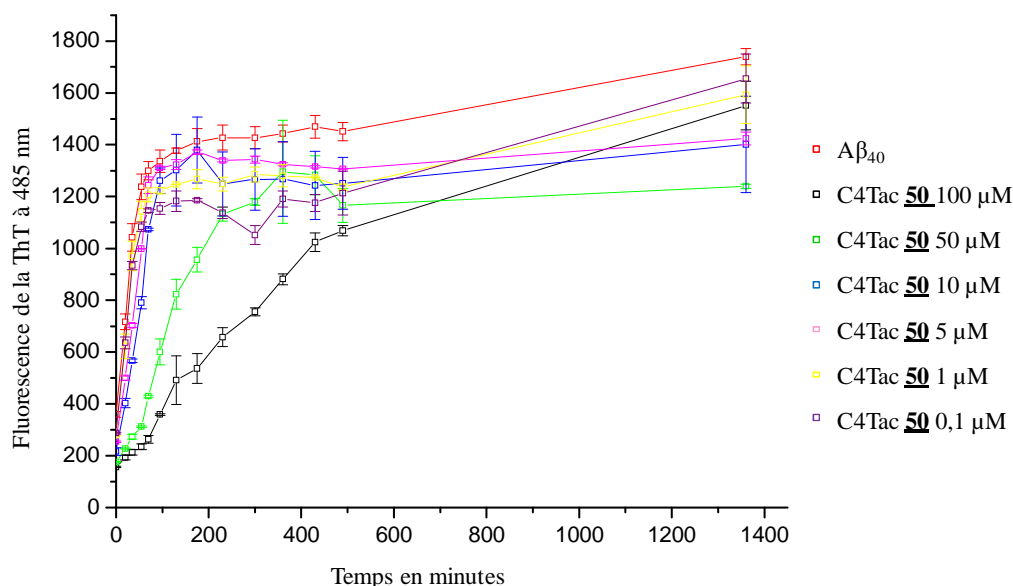


Figure 108 : Etude de l'inhibition de l'élongation de fibres du peptide A β ₄₀ (50 μ M) en présence de 5 μ M de fibres préformées avec le composé C4Tac **50** suivie par fluorescence de la ThT (10 μ M) à 485 nm

Le composé C4Tac **50** ralentit le processus d'élongation à forte concentration, 50 et 100 μ M, mais ne diminue pas la quantité totale de fibres formées. En effet, nous observons une diminution de la pente des deux courbes, mais dans tous les cas, on arrive à un plateau

comparable à celui obtenu avec le témoin A β ₄₀ sans inhibiteur. Ce résultat indique que le composé C4Tac **50** vient perturber l'association du monomère sur l'amorce mais ne l'empêche pas. Les composés C1Tac **52**, Tac **53**, C4K **32** et C2K **33** évalués dans les mêmes conditions, ne présentent pas une activité inhibitrice sur l'élongation des fibres ni ne ralentissent le processus.

L'étude de l'inhibition de la formation des fibres du peptide A β ₄₀ par ces deux expériences pour le composé C4Quin **49** ne va pas être détaillée et est présentée dans l'Annexe II.¹⁹¹ Le composé C4Quin **49** augmente le temps de latence et inhibe la polymérisation des fibres de l'A β ₄₀ avec une IC₅₀ évaluée à 20 μ M pour l'expérience de nucléation. De plus, il empêche l'élongation des fibres en réduisant à la fois la vitesse et le maximum de polymérisation (IC₅₀ = 2 μ M). Les dérivés monomériques de la quinacrine sont quant à eux peu actifs (IC₅₀ > 100 μ M). Enfin, le composé C4Quin **49** ne déstabilise pas les fibres préformées du peptide A β .

D'après ces résultats, nous pouvons conclure que les composés C4Tac **50**, C2Tac **51** et C4Quin **49** sont des inhibiteurs de la formation de fibres et que leur activité résulte de la présentation multimérique des dérivés de la tacrine et de la quinacrine sur le cyclodécapeptide.

En effet, les dérivés monomériques ainsi que les cyclodécapeptides ont peu d'effets sur la formation de fibres. De plus, l'assemblage qui présente quatre dérivés de la tacrine est plus actif que celui en présentant deux. La présentation de quatre dérivés de la tacrine et de la quinacrine se traduit donc par une interaction plus forte avec le peptide β amyloïde lors du processus de formation de fibres. Cette interaction probablement de type hydrophobe perturbe alors son auto-association du fait d'une gêne créée par l'assemblage.

Nous pouvons de plus postuler d'après ces expériences, que le composé C4Tac **50** est plus particulièrement actif au début du processus de formation des fibres. Il interagirait plus spécifiquement avec les formes monomériques et oligomériques, empêchant ainsi la formation du nucléus. En effet, il a été montré que les molécules qui augmentent le temps de latence sont impliquées dans une interaction avec le peptide A β qui stabilise une conformation non amyloïdogénique.²²⁴

La molécule C4Quin **49** présente, en plus de l'activité inhibitrice de la nucléation, une activité sur l'élongation des fibres. L'inhibition de l'élongation implique une interaction avec le monomère ou avec le peptide structuré en feuillets β croisés.²²⁴

La perturbation de l'association entre les peptides A β résulte probablement d'une gêne stérique mais nous ne pouvons pas négliger la présence des résidus arginines présentés par le cyclodécapeptide. En effet, comme nous l'avons signalé précédemment, le résidu arginine peut supprimer l'agrégation de protéines dans les processus de repliement du fait de son effet chaotrope.¹³⁶⁻¹³⁹ Ceci peut expliquer le léger effet d'inhibition sur la formation des fibres observé pour les cyclodécapeptides C2K **33** et C4K **32** et particulièrement pour le composé C2K **33** qui présente quatre résidus arginines.

²²⁴ Bartolini, M.; Bertucci, C.; Bolognesi, M. L.; Cavalli, A.; Melchiorre, C.; Andrisano, V. Insight into the kinetic of amyloid beta (1-42) peptide self-aggregation: elucidation of inhibitors' mechanism of action. *Chembiochem* **2007**, 8, 2152-2161.

B.5.2. Inhibition de la formation des fibres par les assemblages du Curcumin

L'activité inhibitrice du composé C2Cur **56** a été évaluée comme décrit précédemment sur la polymérisation des fibres du peptide A β ₄₀ (Figure 109). D'après les courbes obtenues, nous pouvons constater que le composé C2Cur **56** inhibe de plus de 80 % la fluorescence de la ThT pour les concentrations de 4, 10 et 50 μ M. Pour les concentrations de 0,1 et 0,04 μ M nous observons une inhibition du signal de 50 % et 37 % respectivement et de 9 % pour 0,01 μ M (Figure 109).

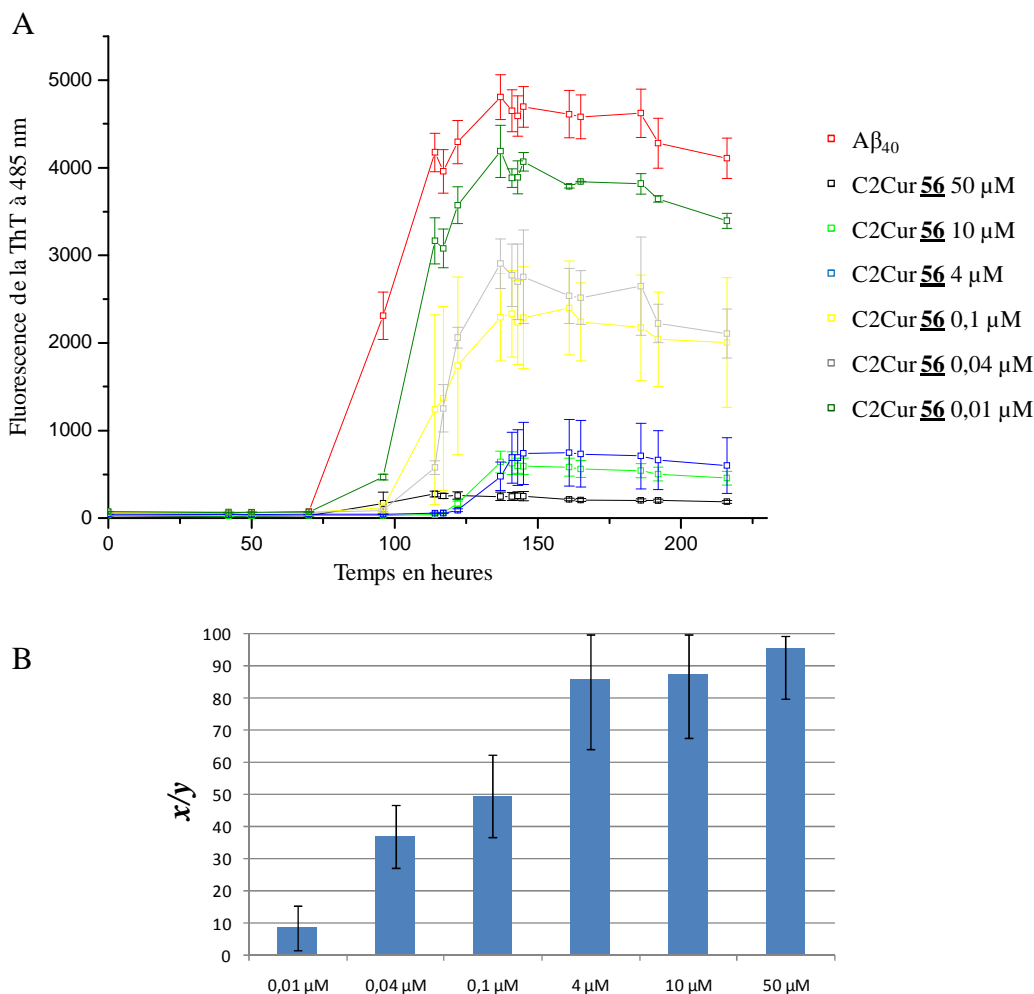


Figure 109 : (A) Etude de l'inhibition de la formation de fibres du peptide A β ₄₀ (50 μ M) avec le composé C2Cur **56** suivie par fluorescence de la ThT (10 μ M) à 485 nm. (B) Effet (x/y) du composé C2Cur **56** sur la formation des fibres du peptide A β ₄₀

Le composé C2Cur **56** augmente la phase de latence ce qui indique qu'il interagit avec les oligomères formés lors du processus de formation de fibres.

Nous avons ensuite évalué le curcumin sur la polymérisation de l'A β ₄₀, dans nos conditions, afin de comparer son activité au composé C2Cur **56** (Figure 110). En effet, comme nous l'avons décrit précédemment, le curcumin est un inhibiteur connu de la formation des fibres et nous servira ainsi de référence.

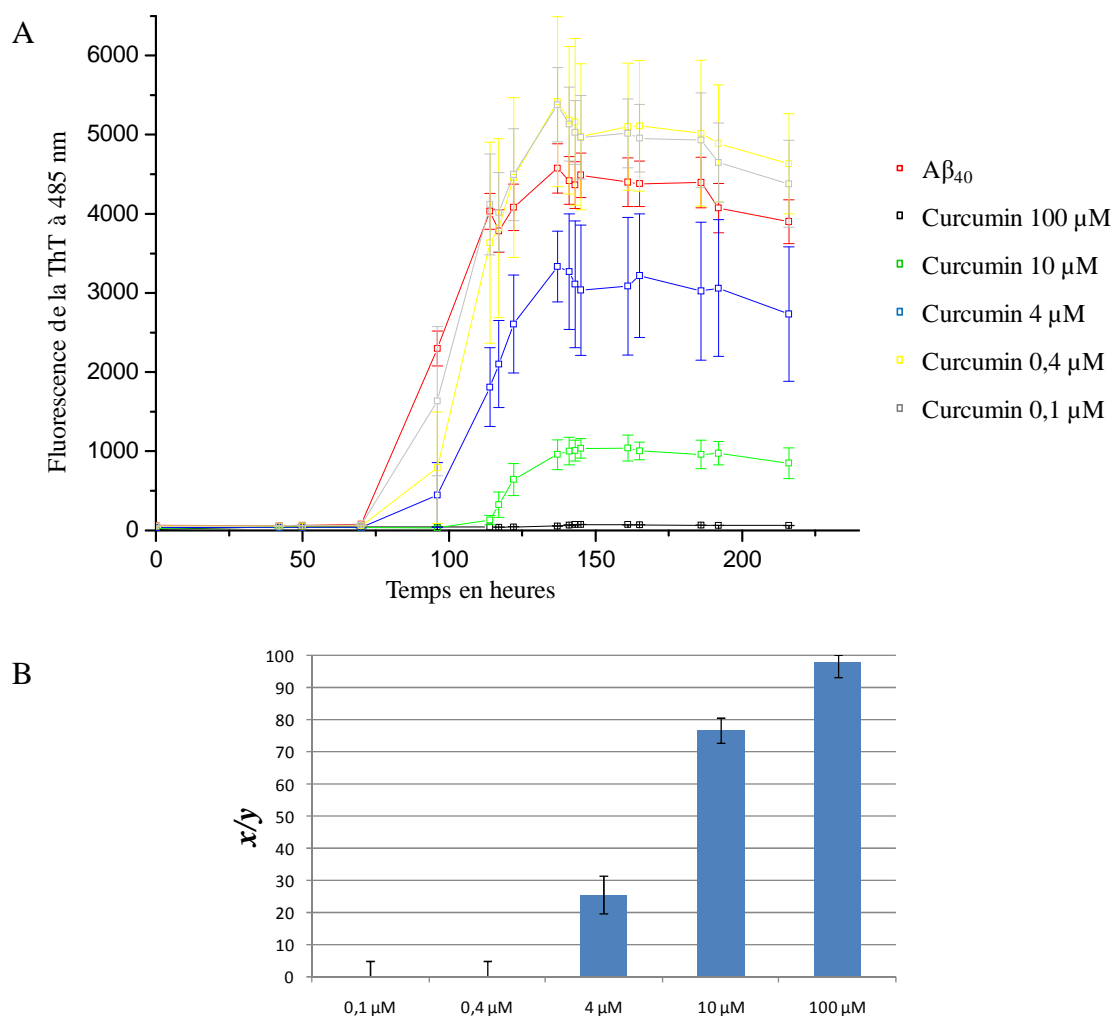


Figure 110 : (A) Etude de l'inhibition de la formation de fibres du peptide $A\beta_{40}$ (50 μM) avec le curcumin suivie par fluorescence de la ThT (10 μM) à 485 nm. (B) Effet (x/y) du curcumin sur la formation des fibres du peptide $A\beta_{40}$

Le curcumin inhibe le signal de fluorescence à plus de 70 % pour les fortes concentrations (10 et 100 μM) et augmente le temps de latence. Par contre, pour 4 μM , l'inhibition du signal est inférieure à 30 % et aucune inhibition n'est observée pour 0,4 et 0,1 μM .

Pour le deuxième composé C2Cur **57** nous constatons qu'il interfère avec la formation de fibres puisqu'une inhibition du signal de plus de 90 % pour la concentration de 100 μM est observée (Figure 111). L'inhibition est encore significative pour les concentrations de 4 et 10 μM puisqu'elle s'élève à plus de 50 %. Enfin à 0,1 et 1 μM l'inhibition est comprise entre 30 et 40 %. Une augmentation du temps de latence est aussi observée.

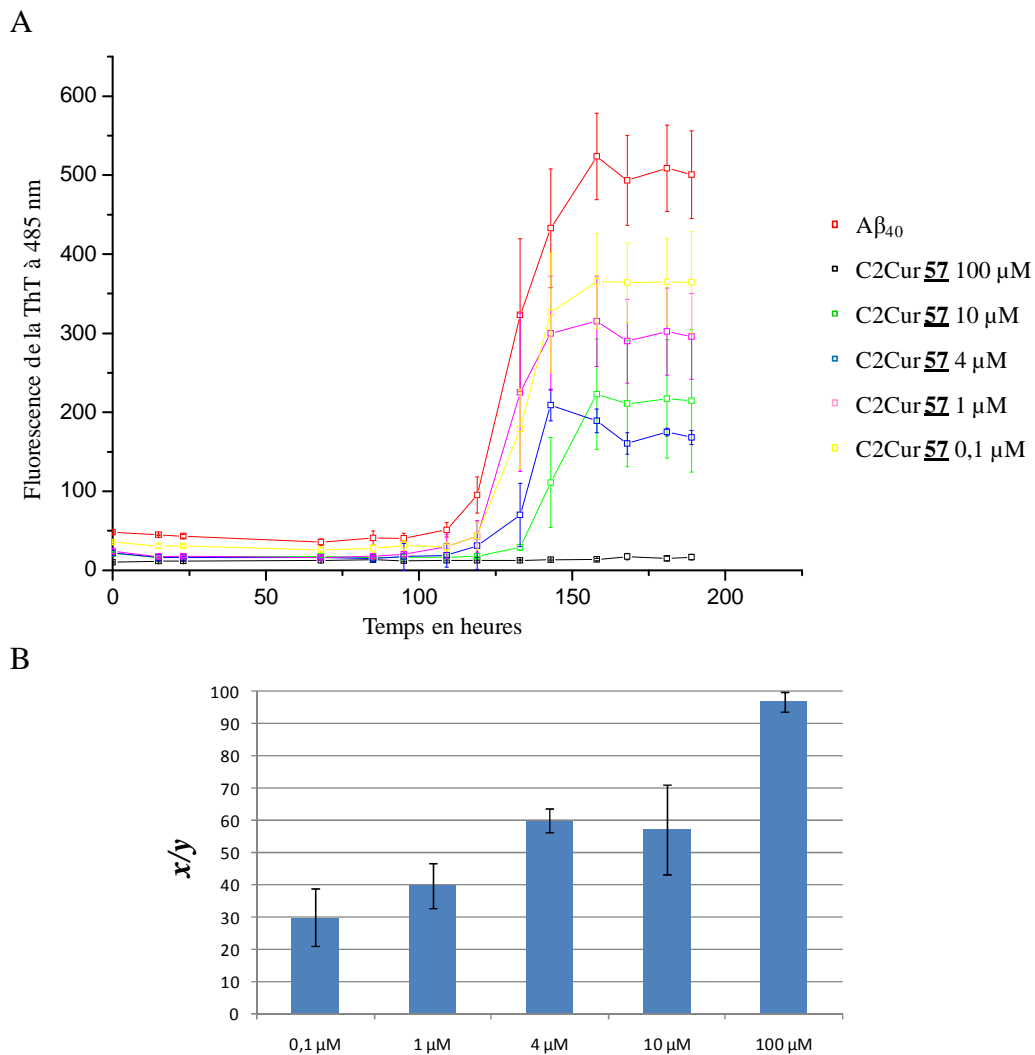


Figure 111 : (A) Etude de l'inhibition de la formation de fibres du peptide $A\beta_{40}$ (50 μM) avec le composé C2Cur 57 suivie par fluorescence de la ThT (10 μM) à 485 nm. (B) Effet (x/y) du composé C2Cur 57 sur la formation des fibres du peptide $A\beta_{40}$

Nous avons comme précédemment évalué l'effet du curcumin sur la polymérisation de l' $A\beta_{40}$ les conditions de cette expérience (Figure 112). Nous constatons que le curcumin inhibe la formation des fibres à plus de 90 % pour la concentration de 100 μM (Figure 112). A la concentration de 10 μM , 45 % d'inhibition est observée et aucune inhibition n'est observée pour 1 μM .

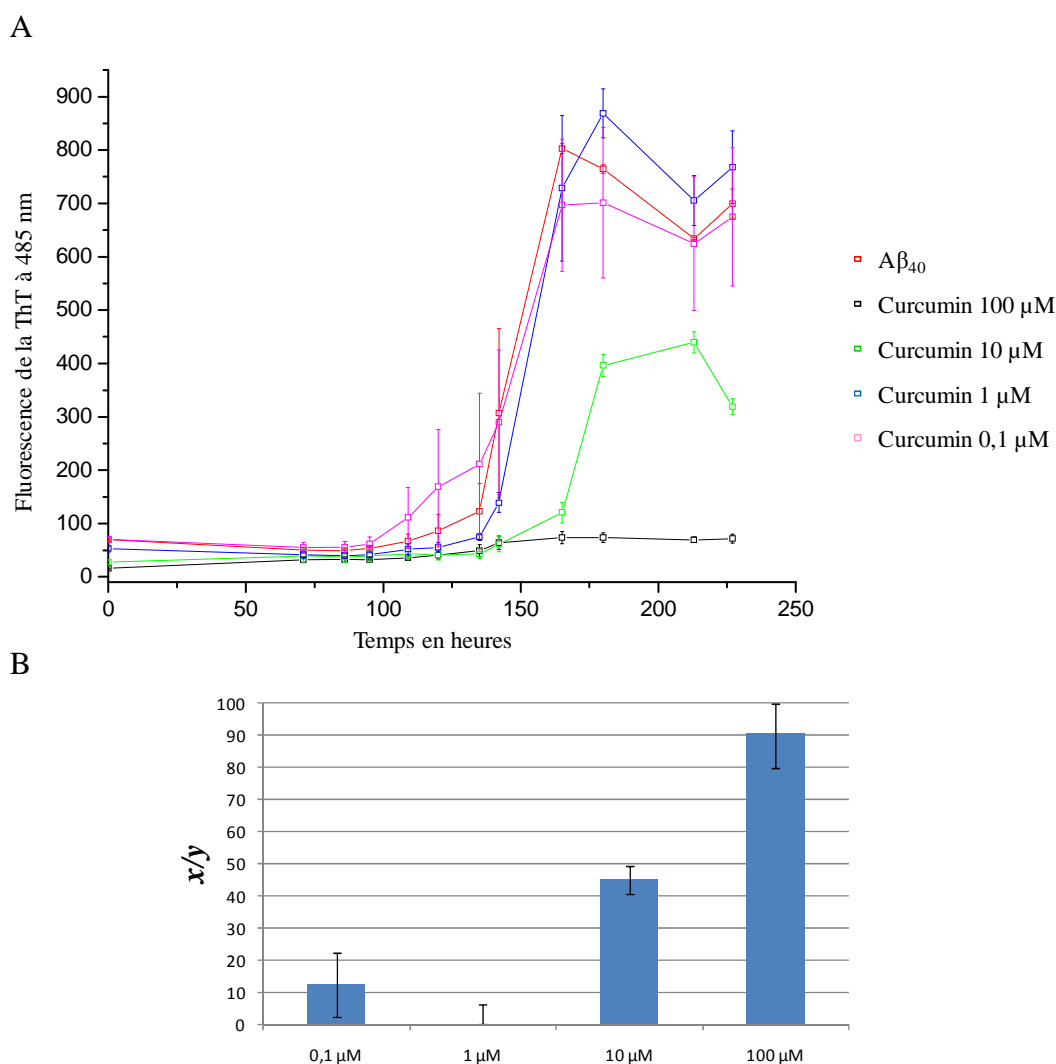


Figure 112 : (A) Etude de l'inhibition de la formation de fibres du peptide $A\beta_{40}$ (50 μM) avec le curcumin suivie par fluorescence de la ThT (10 μM) à 485 nm. (B) Effet du composé (x/y) curcumin sur la formation des fibres du peptide $A\beta_{40}$

Nous avons résumé les activités inhibitrices des assemblages du curcumin dans le tableau 5.

Composés, I	C2Cur 56	Curcumin		C2Cur 57	Curcumin	
Concentration μM	0,1	4	0,1	0,1	10	0,1
Rapport ($A\beta_{40}/I$)	1/0,002	1/0,08	1/0,002	1/0,002	1/0,2	1/0,002
% d'inhibition	50	26	0	30	45	13
IC_{50} (μM) estimée	$IC_{50} \approx 0,1$	$4 < IC_{50} < 10$		$1 < IC_{50} < 4$	$IC_{50} \approx 10$	

Tableau 5 : Activités inhibitrices des assemblages du curcumin

Le composé C2Cur **56** est le plus actif avec une inhibition significative à un faible ratio avec le peptide $A\beta_{40}$ (1/0,002) et une IC_{50} estimée à 0,1 μM . Cette activité est à comparer à celle du curcumin qui dans nos conditions, au même ratio, ne présente pas ou peu d'activité inhibitrice. Le composé C2Cur **56** est ainsi au moins 10 fois plus actif que le curcumin d'après les IC_{50} estimées. Nous observons par contre que le composé C2Cur **57** présente une activité inférieure à celle du composé C2Cur **56** même si elle reste supérieure à celle du curcumin. Cette différence peut s'expliquer par la longueur de la chaîne entre le

cyclodécapeptide et le curcumin, plus longue pour le composé C2Cur 56. Il en résulte probablement une meilleure interaction avec le peptide A β .

Afin de confirmer l'altération de la formation de fibres nous avons visualisé par AFM les échantillons d'agrégation de l'A β_{40} en présence des différents composés (Figure 113).

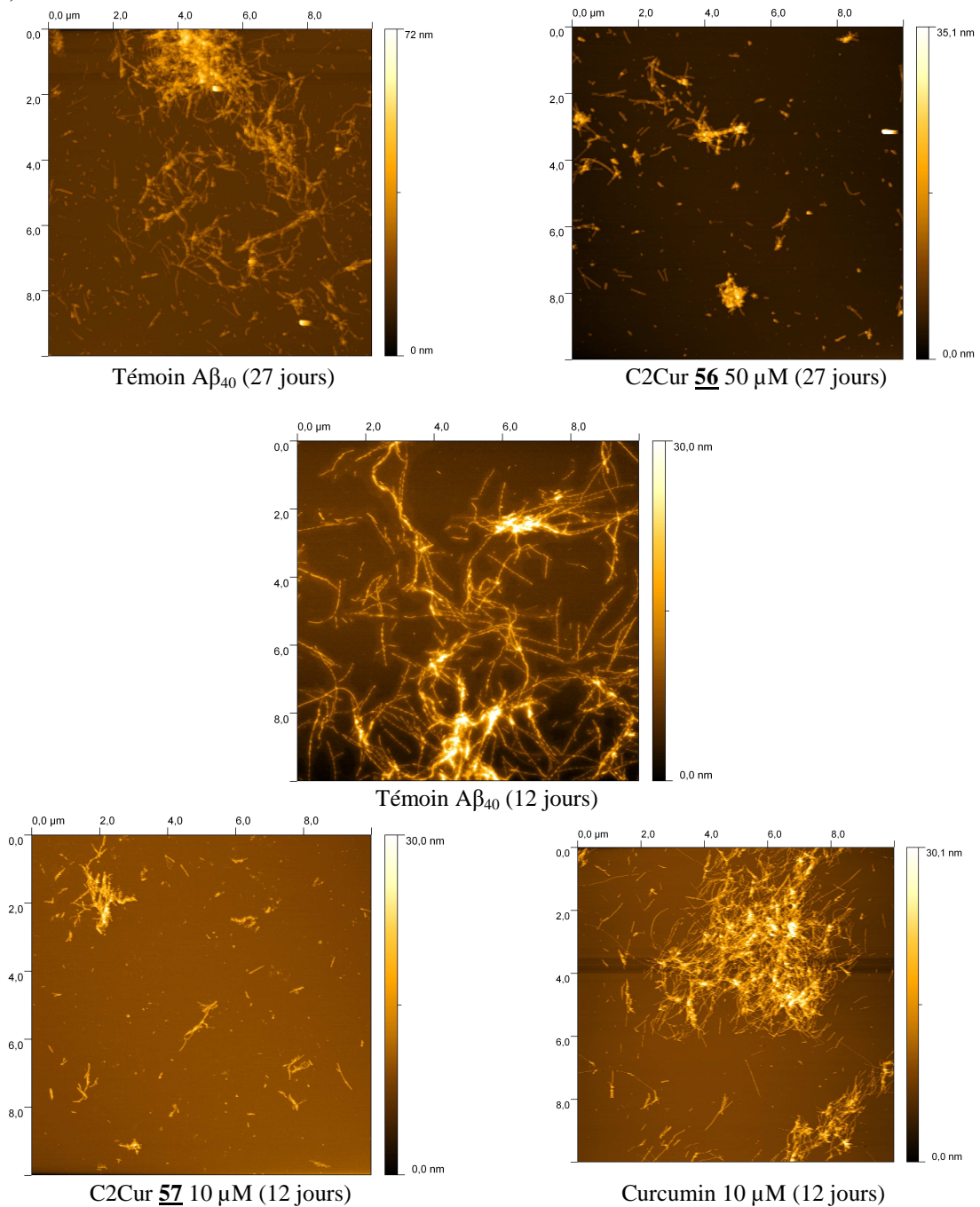
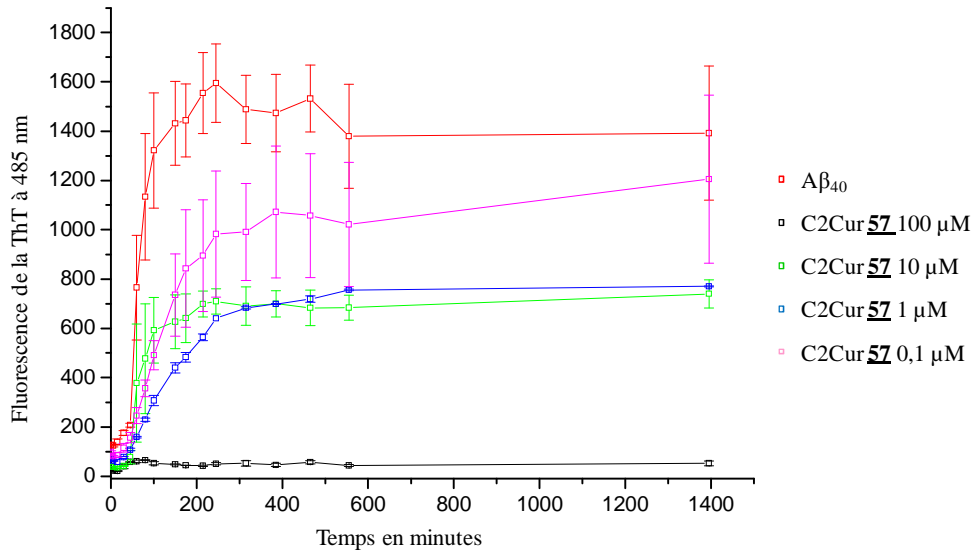


Figure 113 : Images AFM des fibres de l'A β_{40} (50 μ M) en présence des composés après incubation à 37°C

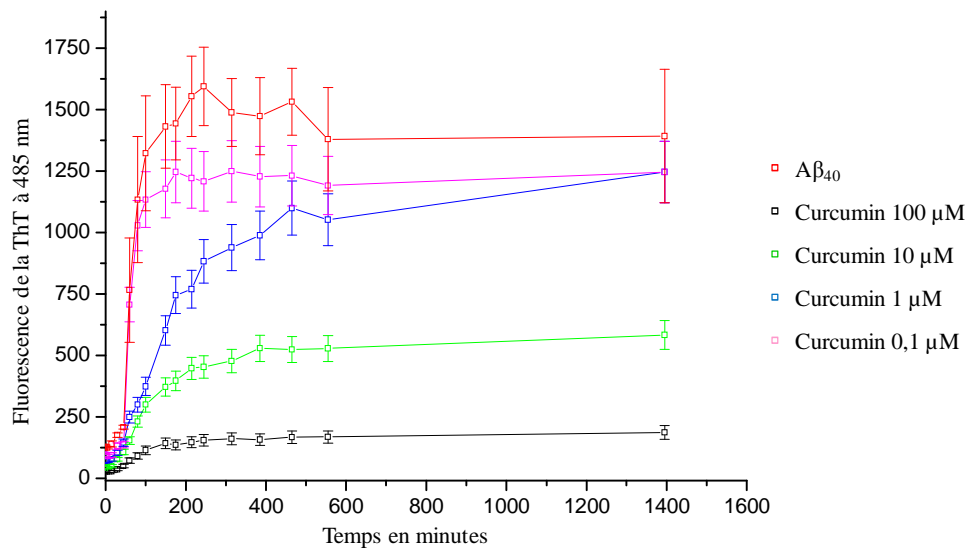
D'après les images obtenues, nous pouvons confirmer que les composés C2Cur altèrent la formation des fibres puisque des fibres fragmentées moins longues que celles des échantillons témoins sont observées.

Nous avons réalisé ensuite les expériences d'élongation de fibres de l' $A\beta_{40}$ en présence du composé C2Cur 57 et du curcumin (Figure 114).

A



B



C

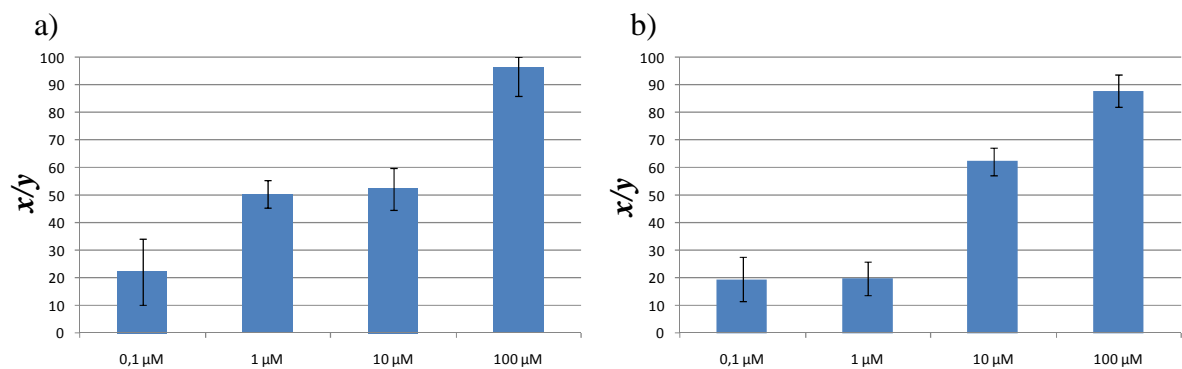


Figure 114 : (A) Etude de l'inhibition de l'élongation de fibres du peptide $A\beta_{40}$ (50 μM) en présence de 5 μM de fibres préformées suivie par fluorescence de la ThT (10 μM) à 485 nm avec : (A) le composé C2Cur 57. (B) le curcumin. (C) Effet des composés (x/y) sur l'élongation des fibres du peptide $A\beta_{40}$: (a) C2Cur 57 ; (b) curcumin

Le composé C2Cur **57** empêche l'élongation des fibres avec une bonne activité puisque une inhibition du signal de 90 % est observée pour 100 μM et d'environ 50 % pour 1 et 10 μM . Par contre, pour le curcumin l'effet est plus faible avec seulement 20 % d'inhibition à 1 μM .

D'après ces résultats, nous pouvons conclure que les composés C2Cur sont plus efficaces que le curcumin pour l'inhibition de la formation des fibres. Par ailleurs, ils sont actifs à la fois sur la nucléation et sur l'élongation de fibres. Les polyphénols, classe de composés à laquelle appartient le curcumin, sont connus pour leur forte activité d'inhibition de la formation de fibres. Dans nos travaux, nous n'évaluons pas la même activité pour le curcumin que celles décrites dans la littérature qui sont meilleures ($\text{IC}_{50} < 1 \mu\text{M}$).^{156,159} Cette différence d'activité peut s'expliquer par les nombreuses méthodes d'études et les diverses conditions expérimentales qui sont utilisés pour évaluer l'inhibition telles la qualité et la concentration du peptide A β , la nature des tampons (force ionique), la température ou l'agitation.

Nous avons pu voir que les composés C2Cur augmentent le temps latence indiquant qu'ils interfèrent dans le processus de nucléation probablement par interaction avec les formes non amyloïdogéniques.

Par ailleurs, le composé C2Cur **57** empêche le processus d'élongation. En effet, contrairement au composé C4Tac **50**, il bloque le processus en présence d'amorces de fibres. Il est donc plus efficace pour empêcher l'association entre les monomères et l'amorce que le composé C4Tac **50**.

Afin de comprendre le mécanisme d'interaction avec le peptide A β , il faut considérer, d'après Porat et al., la présence de deux cycles polyphénoliques séparés par une chaîne de deux à six atomes.¹⁸² En effet, le curcumin, comme le rouge congo, adopterait une conformation capable d'interagir spécifiquement avec les peptides amyloïdes lors de leur repliement en feuillets β croisés. Cette interaction empêche ensuite l'association entre les peptides A β pour l'élongation en fibres. De plus, il est indiqué que les polyphénols sont plus actifs dans la phase d'élongation plutôt que dans la phase de nucléation appuyant l'hypothèse d'une interaction avec les formes amyloïdogéniques.¹⁸²

D'après ces résultats, on peut toujours postuler que le cyclodécapeptide joue aussi un rôle dans le mécanisme d'inhibition en gênant l'association entre les peptides A β . L'activité des composés C2Cur est ainsi renforcée par la présence du cyclodécapeptide.

Enfin, nous avons constaté que la longueur de la chaîne carbonée pour la présentation du curcumin sur le cyclodécapeptide à un effet sur l'activité de l'assemblage. Ce résultat montre l'importance de l'orientation dans l'espace du curcumin pour son interaction avec le peptide A β . Il sera donc intéressant d'évaluer par la suite le composé C2Cur préparé à partir du dérivé du curcumin **48** pour étudier l'effet de la présentation des deux cycles phénoliques sur l'inhibition.

B.5.3. Inhibition de la formation des fibres par les assemblages du peptide A β_{16-21}

Nous avons réalisé l'expérience de nucléation de l'A β_{40} avec le composé C2A β_{16-21} **54** dans les conditions décrites précédemment. On constate une forte inhibition du signal de l'ordre de 90 % pour 1 et 4 μM et qui reste significative (40 à 50 %) pour 0,04 et 0,1 μM (Figure 115). On observe également une légère augmentation du temps de latence. On estime d'après ces résultats une IC_{50} de l'ordre de 0,07 μM pour ce composé.

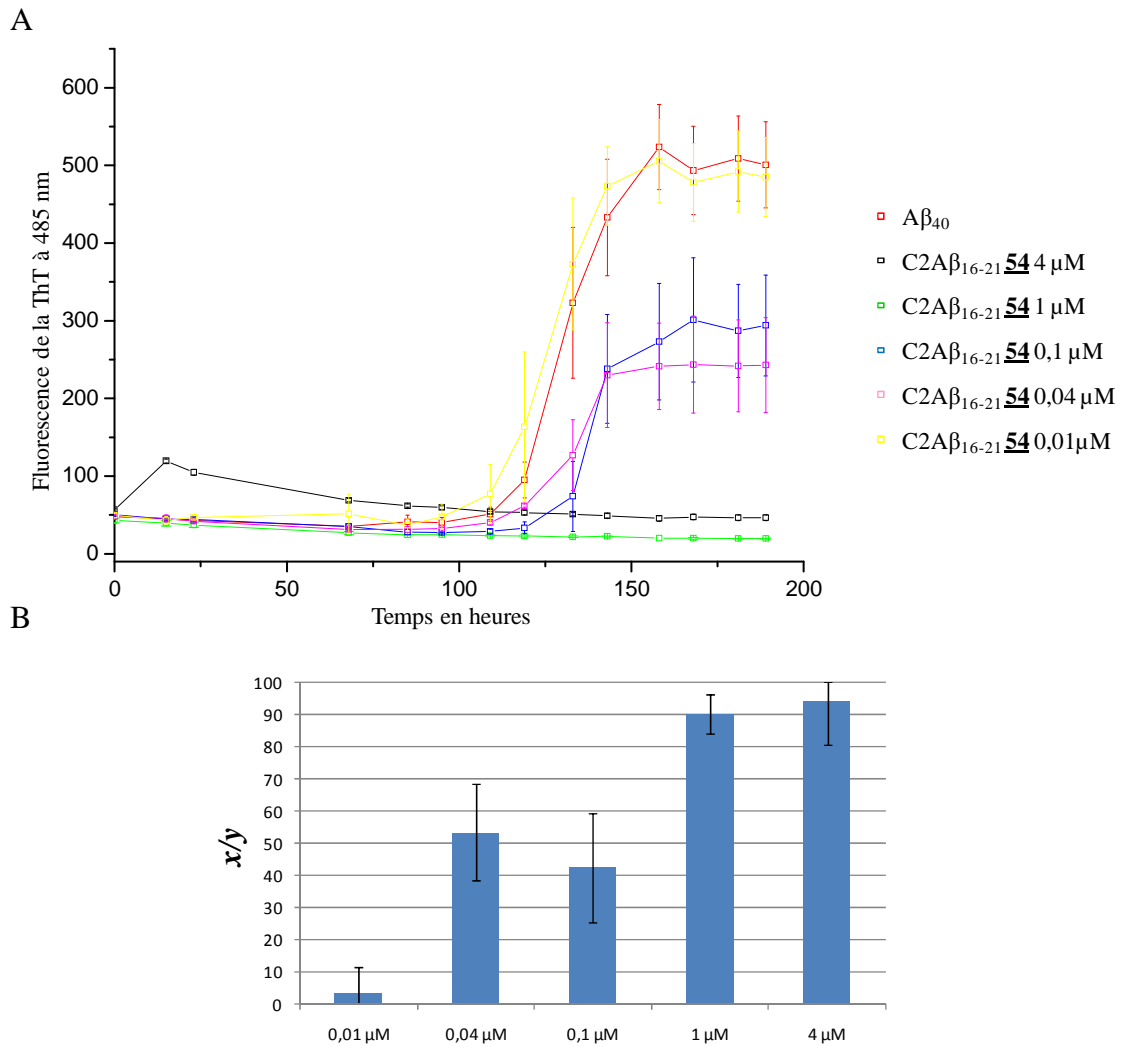


Figure 115 : (A) Etude de l'inhibition de la formation de fibres du peptide $A\beta_{40}$ (50 μM) avec le composé $C2A\beta_{16-21}$ 54 suivie par fluorescence de la ThT (10 μM) à 485 nm. (B) Effet (x/y) du composé $C2A\beta_{16-21}$ 54 sur la formation des fibres du peptide $A\beta_{40}$

Par ailleurs, nous avons constaté une émission de fluorescence immédiate à forte concentration en $C2A\beta_{16-21}$ 54. Il est possible que dans ces conditions, on assiste à une auto-association de l'inhibiteur ou à une agrégation du peptide $A\beta_{40}$.

Nous n'observons pas d'activité inhibitrice avec le peptide témoin $A\beta_{16-21}$ 55 (Figure 116). On constate également qu'à forte concentration (100 μM), comme pour le composé $C2A\beta_{16-21}$ 54, il y a immédiatement émission de fluorescence.

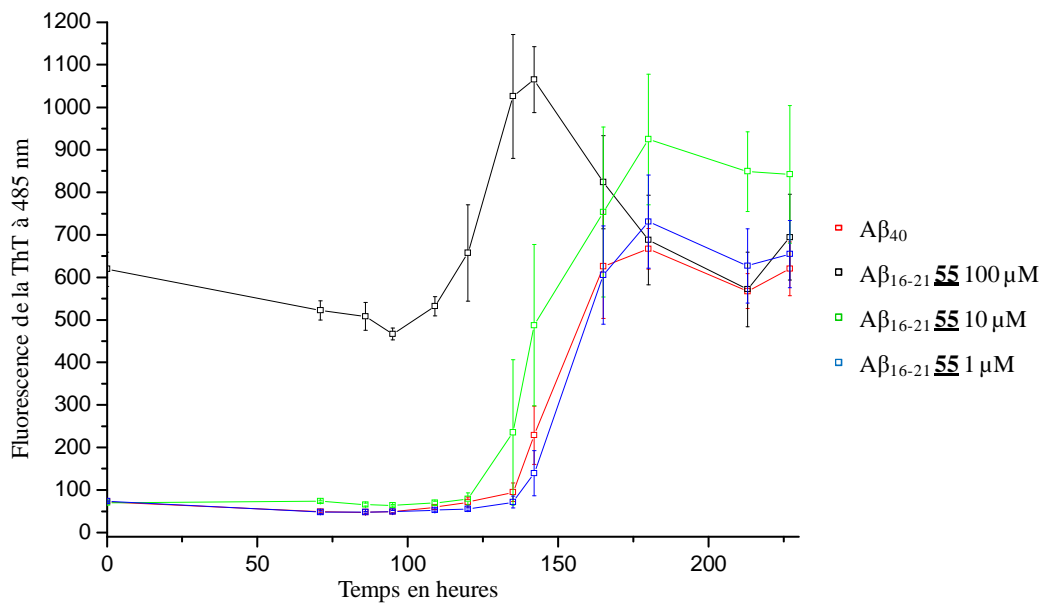


Figure 116 : Etude de l'inhibition de la formation de fibres du peptide Aβ₄₀ (50 μM) avec le composé Aβ₁₆₋₂₁ **55** suivie par fluorescence de la ThT (10 μM) à 485 nm

Afin de vérifier ces résultats, nous avons visualisé les échantillons par AFM après 12 jours d'incubation à 37°C (Figure 117).

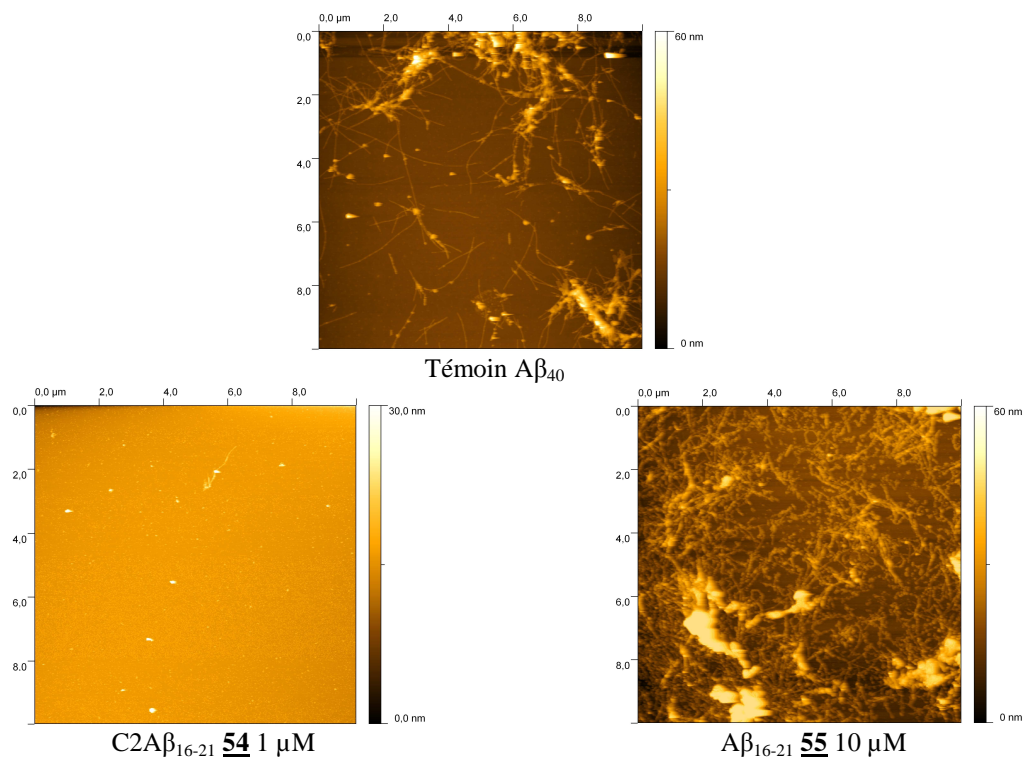


Figure 117 : Images AFM des fibres de l'Aβ₄₀ (50 μM) en présence des composés après incubation à 37°C pendant 12 jours

Les images montrent que pour l'échantillon avec le composé C2Aβ₁₆₋₂₁ **54** à 1 μM, aucune fibre n'est observée par rapport à l'échantillon témoin. Par contre, on constate pour

le composé $A\beta_{16-21}$ **55** à $10 \mu\text{M}$, la présence de très nombreuses fibres confirmant que le peptide seul n'inhibe pas la formation de fibres.

Nous avons ensuite réalisé l'expérience d'élongation de fibres avec le composé $C2A\beta_{16-21}$ **54**. Nous observons le même comportement que précédemment, à savoir un signal de fluorescence très important dès l'ajout dans le milieu du composé aux concentrations supérieures à $10 \mu\text{M}$. Par contre, à $0,1$ et $1 \mu\text{M}$, le composé ralentit le processus d'élongation et réduit le signal de l'ordre de 45 % (Figure 118).

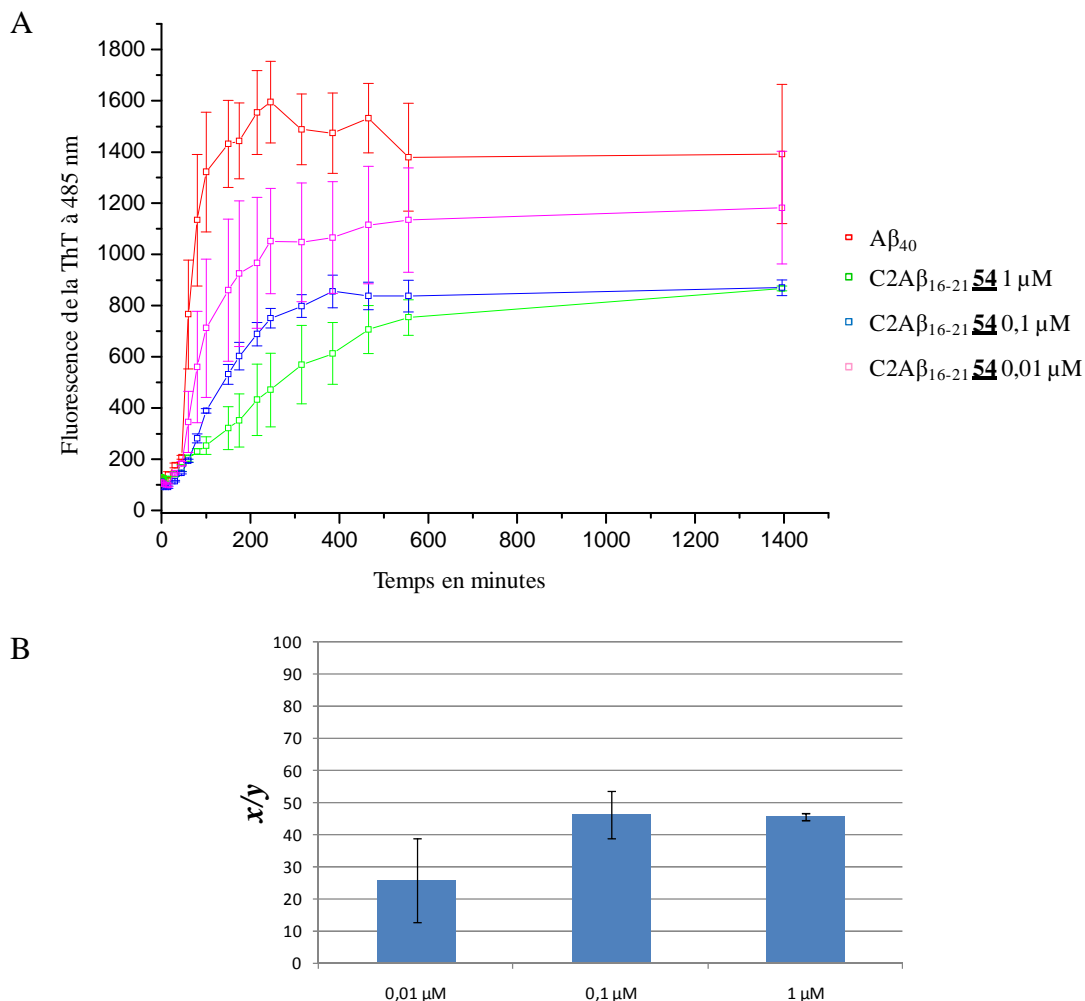


Figure 118 : (A) Etude de l'inhibition de l'élongation de fibres du peptide $A\beta_{40}$ ($50 \mu\text{M}$) en présence de $5 \mu\text{M}$ de fibres préformées avec le composé $C2A\beta_{16-21}$ **54 suivie par fluorescence de la ThT ($10 \mu\text{M}$) à 485 nm . (B) Effet (x/y) du composé $C2A\beta_{16-21}$ **54** sur l'élongation des fibres du peptide $A\beta_{40}$**

Le composé $C2A\beta_{16-21}$ **54** peut être donc considéré comme un puissant peptide « briseur de feuillets β ». En effet, nous pouvons postuler que le mécanisme d'inhibition résulte de l'interaction entre l'élément de reconnaissance, KLVFFA, et le peptide $A\beta$. Le cyclodécapeptide joue alors le rôle d'élément perturbateur pour l'association des peptides $A\beta$ entre eux. Le composé $C2A\beta_{16-21}$ **54** est parmi tous les assemblages synthétisés le plus actif. Cette activité peut être reliée à une meilleure interaction avec le peptide $A\beta$.

B.6. Inhibition de l'Acétylcholinestérase

Dans ce paragraphe, nous allons présenter l'étude de l'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) par les assemblages de la tacrine. En effet, l'une des approches thérapeutiques de plus en plus développée consiste à cibler plusieurs processus pathogènes de la maladie d'Alzheimer à l'aide d'une seule molécule.²²⁵

Les assemblages C4Tac **50** et C2Tac **51** possédant une activité inhibitrice de la formation des fibres amyloïdes et de l'AChE montreraient leur intérêt comme agent thérapeutique multicible de cette pathologie.

Nous avons donc réalisé des expériences *in vitro* d'inhibition de l'acétylcholinestérase, isolée d'*Electrophorus electricus*, par les composés C4Tac **50**, C2Tac **51**, C1Tac **52** et la tacrine selon la méthode décrite par Ellman et al.²²⁶

Cette méthode permet d'évaluer l'activité enzymatique par un dosage colorimétrique. L'acétylthiocholine (ATC), utilisée en tant que substrat de l'AChE, libère lors de son hydrolyse un groupement thiolate. Le groupement thiolate réagit alors avec l'acide 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoïque) (DTNB) présent dans le milieu pour libérer l'acide 2-nitro-5-mercaptobenzoïque absorbant à 412 nm. L'activité de l'enzyme est quantifiée par la mesure de l'absorbance dès l'ajout du substrat ATC et du DTNB dans le milieu contenant l'AChE et le composé étudié.

Nous avons réalisé l'étude de l'activité de l'acétylcholinestérase pour des concentrations de C4Tac **50** de 0,005 μM à 1 μM en triplicata dans une microplaque 96 puits (Figure 119). L'activité de l'AChE est très fortement inhibée pour les concentrations de 0,5 et 1 μM et nous évaluons une IC_{50} de 42 ± 7 nM.

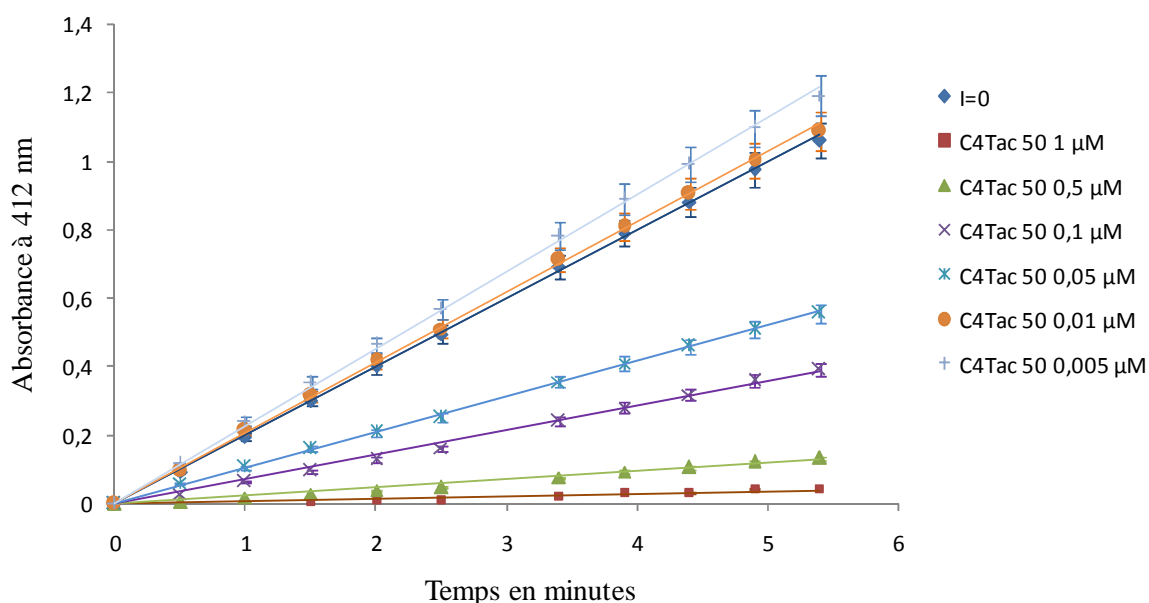


Figure 119 : Etude de l'inhibition de l'acétylcholinestérase du composé C4Tac **50**

²²⁵ Zhang, H. Y. One-compound-multiple-targets strategy to combat Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* **2005**, 579, 5260-5264.

²²⁶ Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V., Jr.; Feather-Stone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, 7, 88-95.

Les mêmes expériences ont été réalisées pour les composés C2Tac **51**, C1Tac **52** et la tacrine. Les activités inhibitrices sont reportées dans le tableau 6.

Composés	C4Tac 50	C2Tac 51	C1Tac 52	Tacrine	
IC ₅₀ (nM)	42 ± 7	57 ± 13	185 ± 18	58 ± 3	180 ± 20 ²²⁷

Tableau 6 : Activités inhibitrices des assemblages de la tacrine évaluées pour une concentration en ATC = 450 µM

D'après les valeurs d'IC₅₀ obtenues, nous constatons que les activités des composés C4Tac **50** et C2Tac **51** sont comparables à celle de la tacrine. Ces composés se classent donc parmi les forts inhibiteurs de l'acétylcholinestérase même si la présentation multimérique de la tacrine sur le cyclodécapeptide n'augmente pas l'activité d'inhibition.

Par contre, la présentation d'au moins deux molécules de tacrine sur le cyclodécapeptide est nécessaire pour garder une activité équivalente à la tacrine puisque le composé C1Tac **52** présente une IC₅₀ environ 4 fois supérieure.

De par la double activité d'inhibition de l'acétylcholinestérase et de la formation des fibres amyloïdes, nous avons montré que le composé C4Tac **50** est potentiellement un agent thérapeutique multicible de la maladie d'Alzheimer.

²²⁷ Marco-Contelles, J.; Leon, R.; de Los Rios, C.; Guglietta, A.; Terencio, J.; Lopez, M. G.; Garcia, A. G.; Villarroja, M. Novel multipotent tacrine-dihydropyridine hybrids with improved acetylcholinesterase inhibitory and neuroprotective activities as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 7607-7610.

B.7. Bilan

La prévention de la polymérisation du peptide β amyloïde est une stratégie thérapeutique de la maladie d'Alzheimer qui a été largement développée ces dernières années. De nombreuses molécules appartenant à des familles chimiquement différentes ont montré leurs activités d'inhibitions de la formation des fibres amyloïdes. Même s'il est difficile d'établir des relations structure-activité, ces molécules de structures très diverses sont majoritairement à caractère hydrophobe et/ou aromatique.

Une des approches développées pour la conception d'inhibiteurs de la fibrillogénèse consiste à associer un élément de reconnaissance du peptide β amyloïde avec un élément qui va perturber son auto-association en fibres. L'élément de reconnaissance peut être un peptide, généralement un fragment de la séquence amyloïde, ou une molécule non peptidique le plus souvent à caractère hydrophobe. L'élément perturbateur doit être capable d'induire une gêne suffisamment importante à l'association des peptides amyloïdes.

Dans ce but, nous avons conçu des inhibiteurs de la fibrillogénèse par la présentation multimérique de composés à caractère hydrophobe sur un châssis décapeptide cyclique. Notre approche consiste à augmenter l'interaction avec le peptide $A\beta$ par la création d'une zone de contact importante. Cet assemblage très encombrant induira ainsi une gêne à l'auto-association en fibres.

Les composés C4Tac, C2Tac, C4Quin, C2Cur et C2A β_{16-21} ont été synthétisés par deux méthodes chimiosélectives, la formation du lien éther d'oxime et la cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre I. Pour cela, les synthons ont été fonctionnalisés par les groupements présentant une réactivité réciproque et spécifique, aldéhyde et oxyamine ou alcyne et azoture. Ces méthodes nous ont permis d'accéder aux composés désirés avec des rendements satisfaisants même si certaines étapes de synthèses nécessiteraient d'être optimisées.

Nous avons évalué les activités inhibitrices de ces composés sur la formation des fibres du peptide $A\beta_{40}$. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de nucléation et d'élongation des fibres suivies par la fluorescence de la thioflavine T et par microscopie à force atomique.

Nous avons montré que tous les assemblages multimériques inhibent la fibrillogénèse. Parmi eux, les composés C4Tac, C2Cur et C2A β_{16-21} présentent les meilleures activités avec des IC_{50} estimées inférieures ou égales à 1 μ M et inférieures à celle du curcumin, l'un des plus puissants inhibiteurs de la formation des fibres du peptide β amyloïde.

Nous avons montré que cette activité résulte de la présentation multimérique des composés sur le cyclodécapeptide. En effet, pour les composés C4Tac et C4Quin, les dérivés monomériques de la tacrine ou de la quinacrine ainsi que les cyclodécapeptides ne sont pas actifs.

Par ailleurs, le composé C2A β_{16-21} est actif alors que le fragment $A\beta_{16-21}$, élément de reconnaissance entre les peptides β amyloïdes, n'empêche pas la formation de fibres. Ce composé présente la meilleure activité ($IC_{50} \approx 70$ nM) et peut être considéré comme un peptide « briseur de feuillets β » de par la gêne induite par l'assemblage.

Enfin, les composés C2Cur sont des inhibiteurs beaucoup plus efficaces que le curcumin. Nous pouvons remarquer que la longueur de la chaîne entre le curcumin et le cyclodécapeptide a une influence sur l'activité.

Ces résultats confirment donc que plus l'interaction avec le peptide A β est importante et optimisée, meilleure sera l'activité inhibitrice si elle est associée avec un fort élément perturbateur à la formation des fibres amyloïdes. L'approche que nous avons développée est donc prometteuse pour concevoir de puissants inhibiteurs de la formation des fibres amyloïdes.

Pour finir, nous avons évalué l'activité inhibitrice du composé C4Tac sur l'acétylcholinestérase, autre cible thérapeutique de la maladie d'Alzheimer. Nous avons montré que ce composé est un fort inhibiteur avec une IC₅₀ évaluée à 42 nM équivalente à celle de la tacrine, inhibiteur connu de l'acétylcholinestérase. La double activité de ce composé fait de lui potentiellement un meilleur agent thérapeutique de la maladie d'Alzheimer.

CONCLUSION

Nos travaux ont consisté, dans un premier temps, à concevoir et à caractériser des molécules modèles des fibres amyloïdes. Pour cela, nous avons synthétisé quatre édifices peptidiques nommés 2Lin, 4Lin, 2Loop et 4Loop présentant deux ou quatre fragments du peptide β amyloïde mutés, linéaires (Lin) ou cyclisés (Loop), sur un châssis décapeptide cyclique. Le but étant de pré-organiser et de faciliter le repliement pour comprendre le processus de fibrillogénèse.

La synthèse des précurseurs a été réalisée selon une stratégie mixte sur support solide et en solution. Les cyclodécapeptides et les fragments amyloïdes totalement déprotégés ont été assemblés par la ligation chimiosélective éther d'oxime. Cette méthode a montré son efficacité pour la conjugaison de séquences amyloïdes sur le cyclodécapeptide et nous a permis d'obtenir ces composés avec un minimum d'étapes de purification.

Des travaux antérieurs, réalisés au laboratoire, ont montré que le composé 4Lin se replie en boucle de type brin β -boucle-brin β pour former des protofilaments constitués de feuillet β croisés parallèles. Ainsi, les composés 2Lin, 2Loop et 4Loop ont été conçus pour préciser le rôle de la boucle et des fragments amyloïdes dans le processus de repliement. Tous les édifices se structurent en feuillet β , interagissent avec la thioflavine T et le rouge congo et forment des protofilaments de 5 à 6 nm de diamètre.

La formation des protofilaments pour les composés 4Lin, 2Loop et 4Loop est initiée immédiatement après l'ajout de tampon phosphate contrairement au composé 2Lin. A l'aide de la modélisation moléculaire, nous avons montré que, dans un premier temps, les fragments amyloïdes se replient en boucle pour interagir entre eux et créer un cœur hydrophobe. Il s'en suit alors la formation des feuillet β croisés parallèles qui permet l'élongation du protofilament.

La rapidité de formation des fibres du composé 4Lin nous a permis de développer un outil de criblage pour l'identification de molécules cibles qui inhibent la fibrillogénèse.

Par ailleurs, nous avons remarqué que les conditions expérimentales peuvent modifier de manière significative la cinétique et la morphologie des fibres. Par exemple, l'initiation du repliement est étroitement liée à la nature des ions présents dans le milieu comme cela a été montré précédemment pour d'autres peptides amyloïdes. Des études préliminaires avec l'édifice 4Lin ont mis en évidence le rôle particulièrement important joué par les anions. Cependant, leur mécanisme d'action n'est pas clairement défini. En effet, ils peuvent déclencher le repliement, soit par neutralisation des charges du peptide, soit par effet « salting out » soit par addition concertée des deux phénomènes. Pour définir précisément les conditions physico-chimiques qui influencent la fibrillogénèse et notamment le rôle des ions, des études plus approfondies pourront être réalisées. L'avantage des modèles que nous avons développés est de pouvoir réaliser ces expériences dans des temps plus raisonnables que pour le peptide naturel.

Nos travaux ont montré que l'on peut agir de manière contrôlée sur le processus de fibrillogénèse, l'accélérer ou le ralentir. Par ce fait, nous pourrions stabiliser les conformations amyloïdes intermédiaires et réaliser des études par RMN à haute résolution.

Enfin, ces édifices sont des outils très intéressants pour comprendre les modes d'interactions avec des molécules comme la thioflavine T, le rouge congo ou les inhibiteurs de la formation des fibres.

La deuxième partie de mes travaux de thèse a consisté à synthétiser des inhibiteurs de la fibrillogénèse par la présentation de plusieurs composés à caractère aromatique et hydrophobe sur le cyclodécapeptide. Ces molécules sont la tacrine, commercialisée comme inhibiteur de l'acétylcholinestérase, un dérivé de la quinacrine qui empêche la conversion du prion, le curcumin, un des plus puissants inhibiteurs de la fibrillogénèse et le peptide $A\beta_{16-21}$, motif de reconnaissance entre les peptides β amyloïdes. Notre approche permet de créer, sur

une face du cyclodécapeptide, une zone à caractère hydrophobe suffisamment importante pour interagir avec le peptide A β . La polymérisation en fibres sera alors perturbée de par la nature de l'assemblage.

La synthèse des assemblages multimériques C4Tac, C2Tac, C4Quin, C2Cur et C2A β ₁₆₋₂₁ a été réalisée par deux méthodes chimiosélectives, formation du lien éther d'oxime et cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre I. Pour cela, les synthons ont été fonctionnalisés par les groupements présentant une réactivité réciproque et spécifique aldéhyde et oxyamine ou azoture et alcyne. Les ligations ont été ensuite effectuées entre les précurseurs déprotégés. Ces méthodes nous ont permis d'accéder aux composés désirés avec des rendements satisfaisants. Cependant, la fonctionnalisation des synthons et la ligation des assemblages se sont avérées, dans certains cas, délicates du fait de leur manque de solubilité. C'est pourquoi certaines voies de synthèse devront être optimisées afin d'obtenir les assemblages avec de meilleurs rendements globaux.

Nous avons étudié l'activité inhibitrice des molécules sur la formation des fibres du peptide β amyloïde afin de valider l'efficacité de notre approche. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de polymérisation du peptide A β ₄₀ suivie par la fluorescence de la thioflavine T et par microscopie à force atomique. Tous les composés empêchent la formation des fibres et les assemblages C4Tac, C2Cur et C2A β ₁₆₋₂₁ sont efficaces même à de faibles ratios avec le peptide A β . Les activités estimées, pour ces derniers, permettent de les classer parmi les forts inhibiteurs de la formation des fibres ($IC_{50} \leq 1 \mu M$). Les dérivés monomériques se sont, quant à eux, avérés peu efficaces démontrant ainsi l'importance de créer une zone d'interaction significative avec le peptide A β . Cependant, une expérience de déstabilisation réalisée avec le composé C4Quin montre qu'il n'est pas capable de désagréger les fibres préformées.

D'après ces expériences, certains des assemblages peuvent interférer aussi bien avec la formation d'oligomères qu'avec le peptide replié en feuillets β . Bien que le mécanisme d'action des inhibiteurs reste à définir, il résulte probablement d'interactions de nature hydrophobe avec le peptide A β associés à une gêne stérique qui empêche la polymérisation ou à un effet des résidus arginines sur le repliement.

Ces travaux ont permis de montrer l'efficacité de notre approche pour interférer avec l'auto-association des peptides amyloïdes. Celle-ci est très prometteuse pour concevoir de puissants inhibiteurs de la formation des fibres amyloïdes.

Nous savons que la présentation des molécules sur le cyclodécapeptide (longueur de la chaîne, point d'ancrage) peut influencer de façon significative l'activité. Pour les assemblages C2Cur, nous avons conçu un synthon avec un point d'ancrage situé sur la partie centrale de la molécule de façon à préserver les noyaux phénoliques. Il serait intéressant de réaliser la ligation sur le cyclodécapeptide et d'évaluer son activité. De plus, nous pourrions tester la capacité des assemblages à déstabiliser les fibres formées.

Dans le cas particulier de la maladie d'Alzheimer, l'approche qui semble actuellement la plus prometteuse consiste à cibler plusieurs processus pathogènes par une même molécule. Nous avons montré que le composé C4Tac répond à ce critère de par sa double activité inhibitrice des fibres amyloïdes et de l'acétylcholinestérase. Il serait alors nécessaire de fonctionnaliser cet assemblage avec des vecteurs qui permettraient son passage à travers la barrière hémato-encéphalique (acide docosahexaénoïque...).

Cependant, la mise en évidence d'une activité inhibitrice de la formation des fibres doit être nécessairement accompagnée d'un effet neuroprotecteur. C'est dans cette optique que certaines de ces molécules sont actuellement évaluées contre la toxicité des peptides A β .

Enfin, l'approche que nous avons développée permet d'interférer de manière efficace avec la fibrillogénèse. Il serait donc logique de supposer que ce type de molécule serait

également actif pour lutter contre d'autres protéines amylogènes qui ont en commun ce processus de formation des fibres. Par conséquent, nous pourrions évaluer l'activité inhibitrice de ces molécules sur la fibrillogénèse d'autres protéines amyloïdes comme la transthyréline, l'amyline ou le lysozyme.

Pour conclure, ces travaux apportent une nouvelle approche prometteuse pour étudier le processus de repliement des protéines et peptides amyloïdes et pour construire des inhibiteurs encore plus performants.

PARTIE EXPERIMENALE

I. Protocole de synthèse

La partie expérimentale du manuscrit est décrite en anglais afin de permettre son utilisation par tous les utilisateurs du laboratoire, y compris les collaborateurs étrangers. Il constitue par ailleurs un outil pour la rédaction des publications relatant nos travaux.

I.1. Materials and equipments

I.1.1. Reagents and solvents

Protected amino acids were obtained from Activo tec (Cambridge, UK), Bachem Biochimie SARL (Voisins-les-Bretonneux, France), France Biochem SA (Meudon, France), Merck Eurolab (Fontenay-sous-Bois, France) or Calbiochem-Novabiochem (Merck Biosciences – VWR, Limonest, France). PyBOP[®] was purchased from Calbiochem-Novabiochem. Fmoc-Gly-SASRIN[®] was obtained from Bachem Biochimie SARL, 2-chlorotrylchloride[®] resin from Advanced ChemTech Europe and NovaSyn[®] TG Sieber resin from Calbiochem-Novabiochem. Other reagents and solvents were obtained from Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and Acros (Noisy-le-Grand, France).

I.1.2. RP-HPLC

RP-HPLC analyses and RP-HPLC purifications were performed on Waters equipment consisting of a Waters 600E controller, a Waters 2487 Dual absorbance detector and a Waters In-Line Degasser. The analytical column used was the Nucleosil[®] C18, particles size 3 μm , pore size 120 \AA , 30 x 4 mm^2 was operated at 1.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ with linear gradient programs in 15 min run time.

For RP-HPLC purifications three columns were used:

- preparative Delta-PakTM, C18 particles size 15 μm , pore size 300 \AA , 200 x 25 mm^2 , was operated at 22 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ with linear gradient programs in 30 min run time;
- semi preparative Nucleosil[®] 100-7, C18 particles size 7 μm , pore size 100 \AA , 250 x 10 mm^2 , was operated at 5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ with linear gradient programs in 30 min run time;
- semi preparative Discovery[®] BIO Wide Pore, C5 particles size 10 μm , pore size 300 \AA , 25 $\text{cm} \times 10 \text{ mm}$, was operated at 5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ with linear gradient programs in 30 min run time.

UV monitoring was performed most of the time at 214 nm and 250 nm. Solvent A consisting of H_2O containing 0.1 % TFA and solvent B of CH_3CN containing 9.9 % H_2O and 0.1 % TFA. Water was of Milli-Q quality and was obtained after filtration of distilled water through a Milli-Q[®] cartridge system. CH_3CN and TFA were of HPLC use quality.

I.1.3. NMR and mass spectrometry

NMR spectra were recorded on BRUKER Avance 300 and U⁺ 500 Varian spectrometers. Chemical shifts are expressed in ppm and calculated taking the solvent peak as an internal reference. Coupling constants are in Hz and signals are described using the usual abbreviations: br. (broad), s (singlet), d (doublet), dd (double doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet)...

Electron spray ionization (ESI-MS) mass spectra were obtained on an Esquire 3000 (Bruker).

Compound C4Tac **50** was dissolved in a mixture of 95% H₂O and 5% ²H₂O to a final concentration of 1 mM at 25 °C. A set of two dimensional spectra, including TOCSY,²¹⁸ DQFCOSY,²¹⁹ and NOESY,²¹⁷ spectra, were acquired with a 1.5 s steady-state recovery time and mixing times (*tm*) of 60 ms for TOCSY and 250 ms for NOESY. Water suppression was achieved by appending an excitation-sculpting module²²⁸ to the nonselective detection pulse and with selective Gaussian shaped pulses of 3 ms. Acquisitions were performed over a spectral width of 10 ppm in both dimensions, with a matrix size of 1024-2048 data points in *t*₂ and 256-512 points in *t*₁, and 32-128 scans/*t*₁. All spectra were referenced with external TSP-*d*4. Data processing and analysis were performed using Felix (version 2001, Accelrys, CA).

I.2. General procedures for the syntheses of peptides

I.2.1. Syntheses of linear protected peptides by SPPS

Assembly of linear protected peptides was performed manually by solid-phase peptide synthesis (SPPS) using the standard 9-fluorenylmethoxycarbonyl/tertobutyl (Fmoc/*t*-Bu) protection strategy. Device consisted in a glass reaction vessel fitted with a sintered glass frit. The latter allowed elimination of excess reagents and solvents under compressed air. Before use, the vessel was treated for 4 hr with (CH₃)₂SiCl₂ as lubricant to prevent resin beads from sticking to the glass inner wall during the synthesis. It was then carefully washed with CH₂Cl₂ until complete acid trace clearance. At the beginning of the synthesis and after each ether washing, the resin was washed and swollen with DCM (2x20 mL.g⁻¹ resin x 15 min) and DMF (1x20 mL.g⁻¹ resin x 15 min).

Coupling reactions were performed using, relative to the resin loading, 2 eq. of N^α-Fmoc-protected amino acid in situ activated with 2 eq. PyBOP and 3-4 eq. DIPEA in DMF (10mL.g⁻¹ resin) for 30 min. The resin was then washed with DMF (4x10mL.g⁻¹ resin x 1 min) and DCM (2x10 mL.g⁻¹ resin x 1 min). TNBS tests were performed to check the completeness of amino acid coupling reaction.

TNBS test required:

- a solution of 1 % trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) in DMF;
- a solution of DIEPA/DMF (1/9).

Four drops of each solution were added to a small quantity of resin beads in a tube. The mixture was left at r.t. for 1 min. Remaining of free amino functions resulted in a bright orange-red coloration of the resin beads (positive test).

N^α-Fmoc-protecting groups were removed by treatment with piperidine/DMF (1/4) (10 mL.g⁻¹ resin x 5, 10, 10 min) and the resin was further washed with DMF (5x20 mL.g⁻¹ resin x 1 min). The completeness of deprotection was checked by UV measurement. Indeed, Fmoc groups releasing afforded dibenzofulvene whose adduct with piperidine absorbs light in the UV range ($\lambda = 299$ nm, $\epsilon = 7800$ M⁻¹. cm⁻¹). Cleavage and washing solutions were thus together collected and the volume of the solution was adjusted to a known value (*V*) with MeOH. Absorbance of this solution at 299 nm gave the number of Fmoc protecting groups released from the cleavage according to the Beer-Lambert relation: $n_{\text{Fmoc}} = A_{299\text{nm}} \cdot V / \epsilon_{299\text{nm}} \cdot l$ (*l*: length of optical path). This method was commonly used for the following of SPPS and to determine, in an indirect manner, the loading of the resin.

²²⁸ Hwang, T. L.; Shaka, A. J. Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary waveforms and pulsed field gradients, *J. Magn. Reson.* **1995**, 112, 275-279.

Automated syntheses of peptide are performed on 348 Ω Syntheizer (Advance Chem Tech) or on ABI 433 A1 Synthesizer (Applied Biosystems), on the “plateau synthèse” of NanoBio, using standard solid phase methods.

1.2.2. Cleavage of the resin

SASRIN[®] or 2-chlorotrytritylchloride[®] resins were washed with DCM (3x20 mL.g⁻¹ resin x 1 min.) and were treated with a solution of TFA/DCM 1/99 during 3x10 min. The combined washings were concentrated under reduced pressure and the crude peptide was obtained by precipitation with diethyl ether.

Molecular weights of compounds were calculated as TFA salts (one TFA (114 g.mol⁻¹) by free amine).

1.2.3. Cyclization reaction of linear peptides in solution

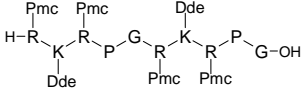
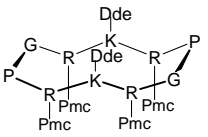
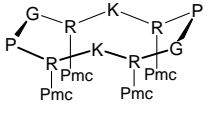
C- and N-termini deprotected linear peptides were dissolved in DMF (0.5 mmol.L⁻¹) and the PH of solution was adjusted to 8-9 by addition of DIPEA. PyBOP (1.2 eq.) was added and the solution is stirred at r.t. for at least 1 hr. The solvent was removed under reduced pressure and the crude peptide was obtained by precipitation and washing with diethyl ether.

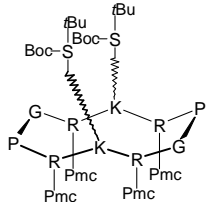
1.2.4. Cleavage of Dde protecting group

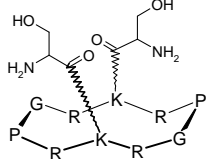
Dde cleavage reaction was performed using a solution of 2 % of hydrazine in DMF. The mixture was stirred at r.t. for 2 hr. The solvent was removed under reduced pressure and the crude peptide was obtained by precipitation and washing with diethyl ether.

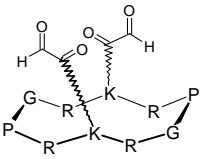
I.3. Syntheses of models

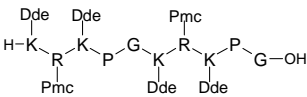
I.3.1. Syntheses of cyclic decapeptides

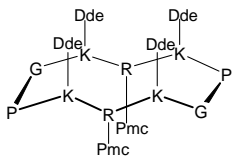
<p>H-R(Pmc)-K(Dde)-R(Pmc)-P-G-R(Pmc)-K(Dde)-R(Pmc)-P-G-OH</p> 	<p style="text-align: center;"><u>1</u></p> <p>Yield: 61 % (566 mg, $2.08 \cdot 10^{-4}$ mol) RP-HPLC: RT = 11.3 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 40-100 % B in 15 min) MS (ESI-MS, positive mode): C₁₂₆H₁₉₀N₂₄O₂₇S₄ M_{calcd} = 2599.3 g.mol⁻¹ M_{exp} = 2599.3 g.mol⁻¹</p>
<p>The linear decapeptide <u>1</u> was assembled on Fmoc-Gly-Sasrin[®] resin (500 mg, 0.69 mmol.g^{-1}) using the procedure I.2.1. The peptide was released from the resin following protocol I.2.2. The free linear protected <u>1</u> peptide was obtained as a white solid powder after precipitation and washing in diethyl ether. The crude material <u>1</u> was used without additional purification.</p>	
<p>c[-R(Pmc)-K(Dde)-R(Pmc)-P-G-R(Pmc)-K(Dde)-R(Pmc)-P-G-]</p> 	<p style="text-align: center;"><u>2</u></p> <p>Yield: Quantitative (412 mg, $1.59 \cdot 10^{-4}$ mol) RP-HPLC: RT = 16.7 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 40-100 % B in 15 min) MS (ESI-MS, positive mode): C₁₂₆H₁₈₈N₂₄O₂₆S₄ M_{calcd} = 2581.3 g.mol⁻¹ M_{exp} = 2581.4 g.mol⁻¹</p>
<p>The cyclization reaction was carried out as described in protocol I.2.3 using the crude linear peptide <u>1</u> (415 mg, $1.59 \cdot 10^{-4}$ mol). The crude product <u>2</u> was obtained as a white solid powder after precipitation and washing in diethyl ether.</p>	
<p>c[-R(Pmc)-K-R(Pmc)-P-G-R(Pmc)-K-R(Pmc)-P-G-]</p> 	<p style="text-align: center;"><u>3</u></p> <p>Yield: 76 % (272 mg, $1.21 \cdot 10^{-4}$ mol) RP-HPLC: RT = 10.1 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 40-100 % B in 15 min) MS (ESI-MS, positive mode): C₁₀₆H₁₆₄N₂₄O₂₂S₄ M_{calcd} = 2253.1 g.mol⁻¹ M_{exp} = 2253.6 g.mol⁻¹</p>
<p>Dde protecting groups were removed from the cyclic peptide <u>2</u> (412 mg, $1.59 \cdot 10^{-4}$ mol) using the protocol I.2.4. The crude product <u>3</u> was obtained as a white solid powder after precipitation and washing in diethyl ether.</p>	

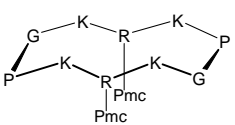
c[-R(Pmc)-K(BocS(<i>t</i> Bu))-R(Pmc)-P-G-R(Pmc)-K(BocS(<i>t</i> Bu))-R(Pmc)-P-G-]	<u>4</u>
	<p>Yield: 73 % (242 mg, $8.83 \cdot 10^{-5}$ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 17.3 min (C_{18}, 214 and 250 nm, 40-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): $C_{130}H_{206}N_{26}O_{30}S_4$ $M_{\text{calcd}} = 2739.4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_{\text{exp}} = 2739.8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$</p>
<p>To a solution of compound 3 (272 mg, $1.21 \cdot 10^{-4}$ mol) in DMF ($0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), were added Boc-Ser(<i>t</i>Bu)-OH (95 mg, $3.63 \cdot 10^{-4}$ mol), PyBOP (189 mg, $3.63 \cdot 10^{-4}$ mol) and DIPEA to adjust the pH to 8-9. The reaction was stirred for 1 hr at r.t. and then concentrated under reduced pressure. The crude product 4 was obtained as a white solid powder after precipitation and washing in diethyl ether.</p>	

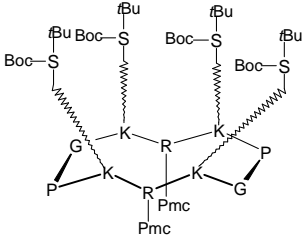
c[-R-K(S)-R-P-G-R-K(S)-R-P-G-]	<u>5</u>
	<p>Yield: 80 % (145 mg, $7.08 \cdot 10^{-5}$ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 4.9 min (C_{18}, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): $C_{56}H_{102}N_{26}O_{14}$ $M_{\text{calcd}} = 1362.8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_{\text{exp}} = 1362.5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$</p>
<p>Boc, <i>t</i>Bu and Pmc protecting groups were removed from the peptide 4 (242 mg, $8.83 \cdot 10^{-5}$ mol) using a solution of TFA/TIS/H_2O 95/2.5/2.5. Precipitation and work-up diethyl ether afforded peptide 5 as white solid powder.</p>	

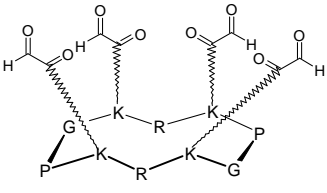
c[-R-K(CO-CHO)-R-P-G-R-K(CO-CHO)-R-P-G-]	<u>6</u>
	<p>Yield: 61 % (21 mg, $1.19 \cdot 10^{-5}$ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 5.0 min (C_{18}, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): $C_{54}H_{92}N_{24}O_{14}$ $M_{\text{calcd}} = 1300.7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_{\text{exp}} = 1300.4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$</p>
<p>To a solution of compound 5 (5 mg, $2.44 \cdot 10^{-6}$ mol) in H_2O/CH_3CN (1/1) ($0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was added $NaIO_4$ (10 mg, $4.88 \cdot 10^{-5}$ mol). The reaction was stirred for 20 min at r.t. and purified by RP-HPLC (5-100 % B in 30 min). This procedure was done 8 times to afford compound 6 as a white powder.</p>	

H-K(Dde)-R(Pmc)-K(Dde)-P-G-K(Dde)-R(Pmc)-K(Dde)-P-G-OH	<u>7</u>
	<p>Yield: 62 % (530 mg, $2.16 \cdot 10^{-4}$ mol)</p> <p>RP-HPLC RT = 8.2 min (C_{18}, 214 and 250 nm, 40-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): $C_{118}H_{178}N_{20}O_{25}S_2$ $M_{calcd} = 2340.9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_{exp} = 2340.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$</p>
<p>The linear decapeptide <u>7</u> was automatically assembled (348 Ω peptide synthesizer) on Fmoc-Gly-Sasrin[®] resin (500 mg, 0.69 mmol.g⁻¹) using the procedure I.2.1. The peptide was released from the resin following protocol I.2.2. The free linear protected peptide <u>7</u> was obtained as a white solid powder after precipitation and washing in diethyl ether. The crude material <u>7</u> was used without additional purification.</p>	

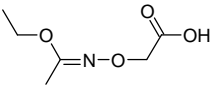
c[-K(Dde)-R(Pmc)-K(Dde)-P-G-K(Dde)-R(Pmc)-K(Dde)-P-G-]	<u>8</u>
	<p>Yield: 93 % (469 mg, $2.02 \cdot 10^{-4}$ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 11.1 min (C_{18}, 214 and 250 nm, 40-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): $C_{118}H_{176}N_{20}O_{24}S_2$ $M_{calcd} = 2322.9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_{exp} = 2322.5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$</p>
<p>The cyclization reaction was carried out as described in protocol I.2.3 using the crude linear peptide <u>7</u> (530 mg, $2.16 \cdot 10^{-4}$ mol). The crude product <u>8</u> was obtained as a white solid powder after precipitation and washing in diethyl ether.</p>	

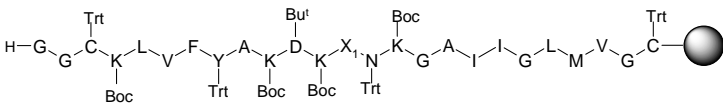
c[-K-R(Pmc)-K-P-G-K-R(Pmc)-K-P-G-]	<u>9</u>
	<p>Yield: Quantitative (336 mg, $2.02 \cdot 10^{-4}$ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 9.8 min (C_{18}, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): $C_{78}H_{128}N_{20}O_{16}S_2$ $M_{calcd} = 1664.9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_{exp} = 1665.6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$</p>
<p>Dde protecting groups were removed from the cyclic peptide <u>8</u> (469 mg, $2.02 \cdot 10^{-4}$ mol) using the protocol I.2.4. The crude product <u>9</u> was obtained as a white solid powder after precipitation and washing in diethyl ether.</p>	

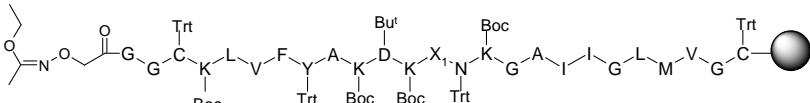
c[-K(BocS(<i>t</i>Bu))-R(Pmc)-K(BocS(<i>t</i>Bu))-P-G-K(BocS(<i>t</i>Bu))-R(Pmc)-K(BocS(<i>t</i>Bu))-P-G-]	<u>10</u>
	<p>Yield: Quantitative (32 mg, $1.20 \cdot 10^{-5}$ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 17.4 min (C_{18}, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): $C_{126}H_{212}N_{24}O_{32}S_2$ $M_{\text{calcd}} = 2639.4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_{\text{exp}} = 2638.9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$</p>
<p>To a solution of compound 9 (20 mg, $1.20 \cdot 10^{-5}$ mol) in DMF ($0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), were added Boc-Ser(<i>t</i>Bu)-OH (14 mg, $5.28 \cdot 10^{-5}$ mol), PyBOP (28 mg, $5.28 \cdot 10^{-5}$ mol) and DIPEA to adjust the pH to 8-9. The reaction was stirred for 1 hr at r.t. and then concentrated under reduced pressure. The crude product 10 was obtained as a white solid powder after precipitation and washing in diethyl ether.</p>	

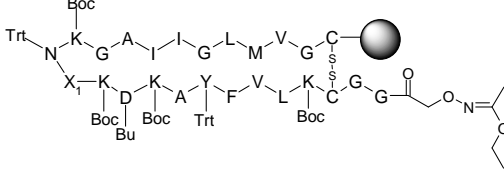
c[-K(CO-CHO)-R-K(CO-CHO)-P-G-K(CO-CHO)-R-K(CO-CHO)-P-G-]	<u>11</u>
	<p>Yield: 21 % (4.1 mg, $2.59 \cdot 10^{-6}$ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 5.4 min (C_{18}, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): $C_{58}H_{92}N_{20}O_{18}$ $M_{\text{calcd}} = 1356.6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_{\text{exp}} = 1356.6$; m/z : $[M+4H_2O+H]^+ = 1429.6$</p>
<p>Boc, <i>t</i>Bu and Pmc protecting groups were removed from the peptide 10 (32 mg, $1.20 \cdot 10^{-5}$ mol) using a solution of TFA/TIS/H_2O 95/2.5/2.5. Precipitation and work-up diethyl ether afforded peptide (26 mg, $1.21 \cdot 10^{-5}$ mol) as white solid powder. To a solution of peptide (5.2 mg, $2.40 \cdot 10^{-6}$ mol) in H_2O/CH_3CN (1/1) ($0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was added $NaIO_4$ (20 mg, $9.61 \cdot 10^{-5}$ mol). The reaction was stirred for 20 min at r.t. and purified by RP-HPLC (5-100 % B in 30 min). This procedure was done 5 times to afford compound 11 as a white powder</p>	

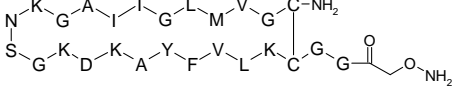
I.3.2. Syntheses of Aβ fragments

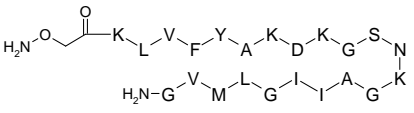
2-(1-ethoxyethylideneaminoxy)acetic acid	12
	<p>Yield: 81 % (4.19 g, $2.60 \cdot 10^{-2}$ mol)</p> <p>¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) :</p> <p>δ 1.27 (t, 3H, J = 7.2 Hz, CH₃-CH₂), 2.04 (s, 3H, CH₃-C=C), 4.01 (q, 2H, J = 7.1 Hz, CH₂-CH₃), 4.48 (s, 2H, O-CH₂-C=O)</p>
<p>To a stirred solution of iodoacetic acid (6 g, $3.22 \cdot 10^{-2}$ mol) in water (25 mL) at 0°C was added aqueous NaOH (2.5 mL, 40 % w/w). The resulting solution was allowed to heat to r.t., and ethyl <i>N</i>-hydroxyacetimidate (4 g, $3.88 \cdot 10^{-2}$ mol) was added followed by aqueous NaOH (2.5 mL, 40 % w/w) and water (25 mL) (pH of solution > 12). After stirring at 80 °C overnight and cooling to r.t., water was added (60 mL) and the aqueous mixture was washed with CH₂Cl₂ (3x50 mL). The water phase was brought to pH = 2-3 with a 1 M hydrochloride solution. The acidified water phase was then extracted with Et₂O and AcOEt, and the combined organic phases was washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated in vacuum, providing compound 12 as colourless oil.</p>	

H-G-G-C(Trt)-K(Boc)-L-V-F-Y(Trt)-A-K(Boc)-D(<i>t</i> Bu)-K(Boc)-X ₁ -N(Trt)-G-A-I-I-G-L-M-V-G-C(Trt)-on resin	13
<p>X₁ = G-S(ψ^{Me,Me}pro)</p> 	
<p>The linear peptide 13 was assembled automatically (ABI 433 A1 Peptide synthesizer) on NovaSyn® TG Sieber resin (300 mg, 0.19 mmol.g⁻¹) using the general procedure I.2.1. Double coupling were realized for amino acids 1st to 8th, 10 and 12 to 14. Sample of resin 13 was treated by TFA/H₂O/TIS/DODT (92/2/2/2) solution affording free peptide for analysis.</p>	<p>RP-HPLC: RT = 9.0 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₁₁₆H₁₉₄N₃₂O₃₁S₃ M_{calcd} = 2627.4 g.mol⁻¹ M_{exp} = 2628.6 g.mol⁻¹</p>

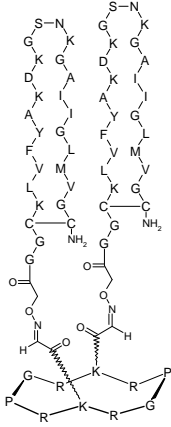
(CH ₃ -CH ₂ -O(CH ₃)C=NOCH ₂ -CO)-G-G-C(Trt)-K(Boc)-L-V-F-Y(Trt)-A-K(Boc)-D(<i>t</i> Bu)-K(Boc)-X ₁ -N(Trt)-G-A-I-I-G-L-M-V-G-C(Trt)-on resin	14
<p>X₁ = G-S(ψ^{Me,Me}pro)</p> 	
<p>Peptide on resin 13 ($5.70 \cdot 10^{-5}$ mol) was solved in 10 mL of DMF and adjusted with DIEPA to pH 8-9. 2-(1-ethoxyethylideneaminoxy)acetic acid 12 (18 mg, $1.11 \cdot 10^{-4}$ mol) and PyBOP (60 mg, $1.11 \cdot 10^{-4}$ mol) was added to the resin solution. The mixture was stirred for 1 hr at r.t. and then the resin was washed with DMF (4x10mL) and DCM (4x10 mL). This procedure was realised two times affording peptide 14 on resin. Sample of resin 14 was treated by TFA/H₂O/TIS/DODT (92/2/2/2) solution affording free peptide for analysis.</p>	<p>RP-HPLC: RT = 8.9 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₁₁₈H₁₉₇N₃₃O₃₃S₃ M_{calcd} = 2700.4 g.mol⁻¹ M_{exp} = 2701.7 g.mol⁻¹</p>

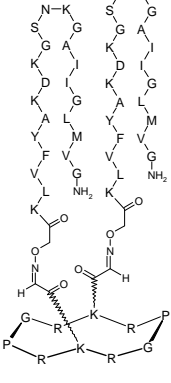
(CH₃-CH₂-O(CH₃)C=NOCH₂-CO)-G-G-C-K(Boc)-L-V-F-Y(Trt)-A-K(Boc)-D(<i>t</i>Bu)-K(Boc)-X₁-N(Trt)-G-A-I-I-G-L-M-V-G-C-on resin	<u>15</u>
<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="margin-right: 20px;">X₁ = G-S($\Psi^{Me,Me}$pro)</div>  </div>	
<p>Peptide on resin 14 ($5.70 \cdot 10^{-5}$ mol) was solved with 10 mL of DMF and iodine (288 mg, $1.13 \cdot 10^{-3}$ mol) was added. The mixture was stirred 2 hr at r.t and then the resin was washed with DMF (4x10mL) and DCM (4x10 mL) affording peptide 15 on resin. Sample of resin 15 was treated by TFA/H₂O/TIS (95/2.5/2.5) solution affording free peptide for analysis.</p>	<p>RP-HPLC: RT = 8.3 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min) MS (ESI-MS, positive mode): C₁₁₈H₁₉₅N₃₃O₃₃S₃ M_{calcd} = 2698.4 g.mol⁻¹ M_{exp} = 2699.1 g.mol⁻¹</p>

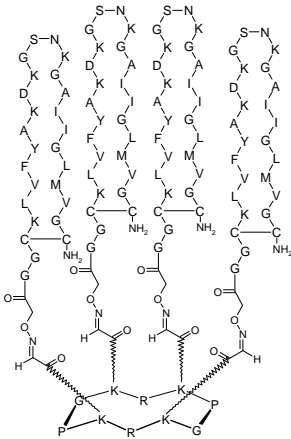
H₂NOCH₂-CO-G-G-C-K-L-V-F-Y-A-K-D-K-G-S-N-G-A-I-I-G-L-M-V-G-C-NH₂	<u>16</u>
<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;">  </div>	
<p>The peptide 16 was released from the resin 15 ($5.70 \cdot 10^{-5}$ mol) using 10 mL cleavage solution of TFA/H₂O/TIS (95/2.5/2.5). The mixture was stirred for 2 hr at r.t then 10 eq. of NH₄I (82 mg, $5.70 \cdot 10^{-4}$ mol) was added and the mixture was stirred for 30 min. The crude free peptide 16 was obtained as a solid powder (142 mg, $4.34 \cdot 10^{-5}$ mol). The peptide was then purified by RP-HPLC (C₁₈, 5-100 % B in 30 min).</p>	<p>Yield: 8 % (15.1 mg, $4.62 \cdot 10^{-6}$ mol) RP-HPLC: RT = 8.3 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min) MS (ESI-MS, positive mode): C₁₁₈H₁₉₅N₃₃O₃₃S₃ M_{calcd} = 2698.4 g.mol⁻¹ M_{exp} = 2699.1 g.mol⁻¹</p>

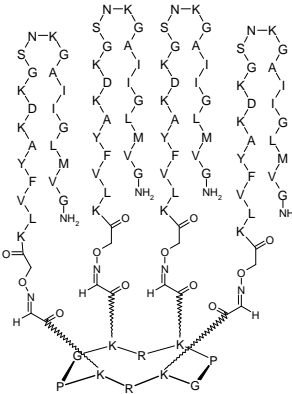
H₂NO-CH₂-CO-K-L-V-F-Y-A-K-D-K-G-S-N-G-A-I-I-G-L-M-V-G-NH₂	<u>17</u>
<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;">  </div>	
<p>The peptide 17 was synthesized as previously described.¹⁰⁷</p>	

I.3.3. Syntheses of models

2Loop (G-G-C-K-L-V-F-Y-A-K-D-K-G-S-N-G-A-I-I-G-L-M-V-G-C-NH ₂) ₂	<u>18</u>
	<p>Yield: 39 % (1.7 mg, 2.06.10⁻⁷ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 9.0 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₂₉₀H₄₇₈N₉₀O₇₈S₆ M_{calcd} = 6665.9 g.mol⁻¹ M_{exp} = 6665.4 g.mol⁻¹</p>
<p>The pure peptides <u>6</u> (0.92 mg, 5.24.10⁻⁷ mol) and <u>16</u> (3.8 mg, 1.16.10⁻⁶ mol) were dissolved in 50 μL of DMSO. The reaction mixture was stirred for 9 hr at 40°C. The product was purified by RP-HPLC (C₁₈, 10-100 % B in 30 min) affording compound <u>18</u> as a white powder.</p>	

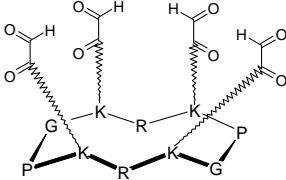
2Lin (K-L-V-F-Y-A-K-D-K-G-S-N-G-A-I-I-G-L-M-V-G-NH ₂) ₂	<u>19</u>
	<p>Yield: 42 % (3.5 mg, 4.73.10⁻⁷ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 8.7 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₂₇₀H₄₅₀N₈₂O₇₀S₂ M_{calcd} = 6029.2 g.mol⁻¹ M_{exp} = 6028.0 g.mol⁻¹</p>
<p>The pure peptides <u>6</u> (2 mg, 1.13.10⁻⁶ mol) and <u>17</u> (7 mg, 2.37.10⁻⁶ mol) were dissolved in 150 μL of DMSO. The reaction mixture was stirred for 7 hr at 40°C. The product was purified by RP-HPLC (C₁₈, 10-100 % B in 30 min) affording compound <u>19</u> as a white powder.</p>	

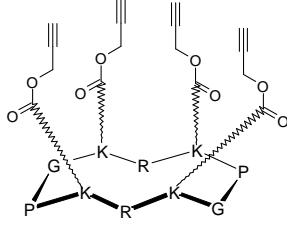
4Loop (G-G-C-K-L-V-F-Y-A-K-D-K-G-S-N-G-A-I-I-G-L-M-V-G-C-NH₂)₄	<u>20</u>
	<p>Yield: 28 % (1 mg, $7.07 \cdot 10^{-8}$ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 10.2 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₅₃₀H₈₆₄N₁₅₂O₁₄₆S₁₂ M_{calcd} = 12086.5 g.mol⁻¹ M_{exp} = 12084.6 g.mol⁻¹</p>
<p>The pure peptides 11 (0.4 mg, $2.52 \cdot 10^{-7}$ mol) and 16 (8.8 mg, $2.69 \cdot 10^{-6}$ mol) were dissolved in 60 μL of DMSO. The reaction mixture was stirred for 32 hr at 40°C. The product was purified by RP-HPLC (C₁₈, 10-100 % B in 30 min) affording compound 20 as a white powder.</p>	

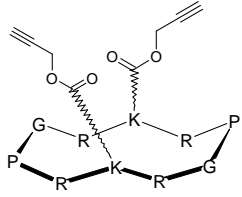
(K-L-V-F-Y-A-K-D-K-G-S-N-G-A-I-I-G-L-M-V-G-NH₂)₄	<u>21</u>
	
<p>The peptide 21 was synthesized as previously described.¹⁰⁷</p>	

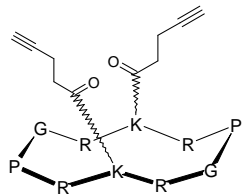
I.4. Syntheses of inhibitors

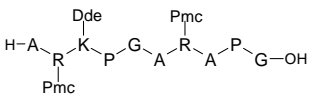
I.4.1. Syntheses of cyclic decapeptides

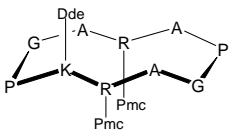
c[-K(CO-CHO)-R-K(CO-CHO)-P-G-K(CO-CHO)-R-K(CO-CHO)-P-G-]	<u>22</u>
	
The compound <u>22</u> was synthesized as previously described. ¹⁹¹	

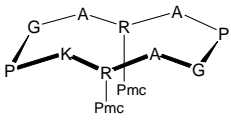
c[-K(COO-CH ₂ -C≡CH)-R-K(COO-CH ₂ -C≡CH)-P-G-K(COO-CH ₂ -C≡CH)-R-K(COO-CH ₂ -C≡CH)-P-G-]	<u>23</u>
	<p>Yield: 56 % (17 mg, 1.01.10⁻⁵ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 7.4 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₆₆H₁₀₀N₂₀O₁₈ M_{calcd} = 1460.7 g.mol⁻¹ M_{exp} = 1460.7 g.mol⁻¹</p>
<p>The peptide <u>9</u> (38 mg, 1.79.10⁻⁵ mol) was dissolved in a mixture of pyridine/DMF (1/1) (0.01 mol.L⁻¹). The solution was cooled to 0°C and propargyloxycarbonyl chloride (0.025 mL, 2.55.10⁻⁴ mol) was added. The resultant solution was stirred for 2 hr at r.t. and then concentrated under reduced pressure. The crude product was obtained as a white solid powder after precipitation and washing in diethyl ether. The crude product (25 mg, 1.25.10⁻⁵ mol) was dissolved in a solution of TFA/H₂O (9/1) (0.01 mol.L⁻¹). After 2 hr, the reaction was concentrated under reduced pressure and the crude product was precipitated and washed with diethyl ether. The product was purified by RP-HPLC (C₁₈, 5-100 % B in 30 min) affording compound <u>23</u> as a white powder.</p>	

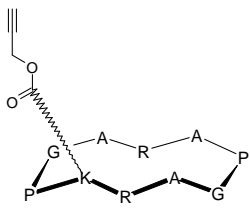
c[-R-K(COO-CH ₂ -C≡CH)-R-P-G-R-K(COO-CH ₂ -C≡CH)-R-P-G-]	<u>24</u>
	<p>Yield: 81 % (6 mg, 3.31.10⁻⁶ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 6.47 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₅₈H₉₆N₂₄O₁₄ M_{calcd} = 1352.7 g.mol⁻¹ M_{exp} = 1352.3 g.mol⁻¹</p>
<p>The peptide 3 (9.2 mg, 4.08.10⁻⁶ mol) was dissolved in a mixture of pyridine/DMF (1/1) (0.01 mol.L⁻¹). The solution was cooled to 0°C and propargyloxycarbonyl chloride (0.012 mL, 1.22.10⁻⁴ mol) was added. The resultant solution was stirred for 1 hr at r.t. and then concentrated under reduced pressure. The crude product was obtained as a white solid powder after precipitation and washing in diethyl ether. The crude product (9 mg, 3.70.10⁻⁶ mol) was dissolved in a solution of TFA/H₂O (9/1) (0.01 mol.L⁻¹). After 2 hr, the reaction was concentrated under reduced pressure and the crude product was precipitated and washed with diethyl ether. The product was purified by RP-HPLC (C₁₈, 5-100 % B in 30 min) affording compound 24 as a white powder.</p>	

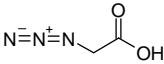
c[-R-K(CO-CH ₂ -CH ₂ -C≡CH)-R-P-G-R-K(CO-CH ₂ -CH ₂ -C≡CH)-R-P-G-]	<u>25</u>
	<p>Yield: 96 % (77 mg, 4.26.10⁻⁵ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 6.5 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₆₀H₁₀₀N₂₄O₁₂ M_{calcd} = 1348.8 g.mol⁻¹ M_{exp} = 1348.6 g.mol⁻¹</p>
<p>To a solution of compound 3 (100 mg, 4.43.10⁻⁵ mol) in DMF (0.01 mol.L⁻¹), were added 4-pentynoic acid (10 mg, 1.01.10⁻⁴ mol), PyBOP (51 mg, 9.81.10⁻⁵ mol) and DIPEA to adjust the pH to 8-9. The reaction was stirred for 4 hr at r.t. and then concentrated under reduced pressure. The crude product was dissolved in a solution of TFA/H₂O (9/1) (0.01 mol.L⁻¹). After 2 hr, the reaction was concentrated under reduced pressure and the crude product was precipitated and washed with diethyl ether affording compound 25 as a white powder.</p>	

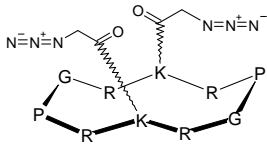
H-A-R(Pmc)-K(Dde)-P-G-A-R(Pmc)-A-P-G-OH	<u>26</u>
	<p>Yield: 70 % (409 mg, $2.44 \cdot 10^{-4}$ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 10.37 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₇₉H₁₂₁N₁₇O₁₉S₂ M_{calcd} = 1675.8 g.mol⁻¹ M_{exp} = 1675.6 g.mol⁻¹</p>
<p>The linear decapeptide <u>26</u> was automatically assembled (348 Ω peptide synthesizer) on Fmoc-Gly-Sasrin[®] resin (500 mg, 0.69 mmol.g⁻¹) using the procedure I.2.1. The peptide was released from the resin following protocol I.2.2. The free linear protected peptide <u>26</u> was obtained as a white solid powder after precipitation and washing in diethyl ether. The crude material <u>26</u> was used without additional purification.</p>	

c[-A-R(Pmc)-K(Dde)-P-G-A-R(Pmc)-A-P-G-]	<u>27</u>
	<p>Yield: Quantitative (400 mg, $2.41 \cdot 10^{-4}$ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 11.7 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₇₉H₁₁₉N₁₇O₁₈S₂ M_{calcd} = 1657.8 g.mol⁻¹ M_{exp} = 1658.3 g.mol⁻¹</p>
<p>The cyclization reaction was carried out as described in protocol I.2.3 using the crude linear peptide <u>26</u> (409 mg, $2.44 \cdot 10^{-4}$ mol). The crude product <u>27</u> was obtained as a white solid powder after precipitation and washing in diethyl ether.</p>	

c[-A-R(Pmc)-K-P-G-A-R(Pmc)-A-P-G-]	<u>28</u>
	<p>Yield: 91 % (329 mg, $2.20 \cdot 10^{-4}$ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 10.7 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₆₉H₁₀₇N₁₇O₁₆S₂ M_{calcd} = 1493.7 g.mol⁻¹ M_{exp} = 1494.5 g.mol⁻¹</p>
<p>Dde protecting groups were removed from the cyclic peptide <u>27</u> (400 mg, $2.41 \cdot 10^{-4}$ mol) using the protocol I.2.4. The crude product <u>28</u> was obtained as a white solid powder after precipitation and washing in diethyl ether.</p>	

c[-A-R(Pmc)-K(COO-CH ₂ -C≡CH)-P-G-A-R(Pmc)-A-P-G-]	29
	<p>Yield: 27 % (21 mg, 1.65.10⁻⁵ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 5.9 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₄₅H₇₃N₁₇O₁₂ M_{calcd} = 1043.5 g.mol⁻¹ M_{exp} = 1043.3 g.mol⁻¹</p>
<p>The peptide 28 (90 mg, 6.02.10⁻⁵ mol) was dissolved in a mixture of pyridine/DMF (1/1) (0.01 mol.L⁻¹). The solution was cooled to 0°C and propargyloxycarbonyl chloride (0.060 mL, 6.02.10⁻⁴ mol) was added. The resultant solution was stirred for 1 hr at r.t. and then concentrated under reduced pressure. The crude product was obtained as a white solid powder after precipitation and washing in diethyl ether. The crude product was dissolved in a solution of TFA/H₂O (9/1) (0.01 mol.L⁻¹). After 2 hr, the reaction was concentrated under reduced pressure and the crude product was precipitated and washed with diethyl ether. The product was purified by RP-HPLC (C₁₈, 5-100 % B in 30 min) affording compound 29 as a white powder.</p>	

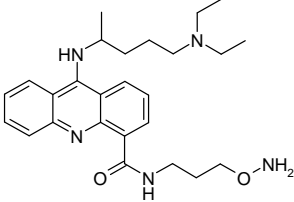
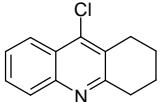
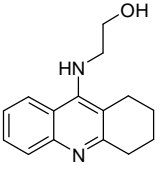
Azidoacetic acid	30
	<p>Yield: 76 % (0.602 g, 5.96.10⁻³ mol)</p> <p>MS (ESI-MS, negative mode): M_{calcd} = 101.0 g.mol⁻¹ M_{exp} = 100.9 g.mol⁻¹</p> <p>¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.89 (s, 2H, H-2)</p> <p>¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 50.1 (C-2), 171.0 (C-1)</p>
<p>A solution of bromoacetic acid (1.09 g, 7.84.10⁻³ mol) and NaN₃ (1.08 g, 1.66.10⁻² mol) in H₂O/DMSO (1/1) was stirred at r.t. overnight. The pH is adjusted to 2.5 with concentrated HCl before extraction with AcOEt. The organic phase was separated, washed with a saturated aqueous solution of NaCl, dried and concentrated to give compound 30 as viscous oil.</p>	

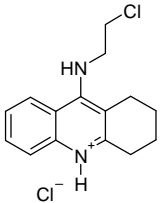
c[-R-K(CO-CH ₂ -N ₃)-R-P-G-R-K(CO-CH ₂ -N ₃)-R-P-G-]	31
	<p>Yield: 18 % (26 mg, 1.43.10⁻⁵ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 6.5 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₅₄H₉₄N₃₀O₁₂ M_{calcd} = 1354.7 g.mol⁻¹ M_{exp} = 1354.4 g.mol⁻¹</p>
<p>To a solution of compound 3 (182 mg, 8.07.10⁻⁵ mol) in DMF (0.01 mol.L⁻¹), were added compound 30 (18 mg, 1.78.10⁻⁴ mol), PyBOP (93 mg, 1.78.10⁻⁴ mol) and DIPEA to adjust the pH to 8-9. The reaction was stirred for 2 hr at r.t. and then concentrated under reduced pressure. The crude product was dissolved in a solution of TFA/H₂O (9/1) (0.01 mol.L⁻¹). After 2 hr, the reaction was concentrated under reduced pressure and the crude product was precipitated and washed with diethyl ether. The product was purified by RP-HPLC (C₁₈, 5-100 % B in 30 min) affording compound 31 as a white powder.</p>	

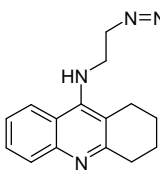
c[-K(COCH ₃)-R-K(COCH ₃)-P-G-K(COCH ₃)R-K(COCH ₃)-P-G-]	32
The compound 32 was synthesized as previously described. ¹⁹¹	

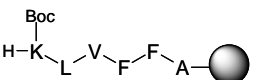
c[-R-K(COCH ₃)-R-P-G-R-K(COCH ₃)-R-P-G-]	33
<p>A solution of compound 3 (20 mg, 8.87.10⁻⁶ mol) in Ac₂O/Pyridine/DMF, 1/2/7 (0.01 mol.L⁻¹) was stirred for 30 min. The solvents were removed and the compound was precipitated and washed in diethyl ether. The crude product was dissolved in a solution of TFA/H₂O (9/1) (0.01 mol.L⁻¹). After 2 hr, the reaction was concentrated under reduced pressure and the crude product was precipitated and washed with diethyl ether. The product was purified by RP-HPLC (C18, 5-100 % B in 30 min) affording compound 33 as a white powder.</p>	<p>Yield: 64 % (9.8 mg, 5.67.10⁻⁶ mol) RP-HPLC: RT = 5.4 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min) MS (ESI-MS, positive mode): C₅₄H₉₆N₂₄O₁₂ M_{calcd} = 1272.7 g.mol⁻¹ M_{exp} = 1272.7 g.mol⁻¹</p>

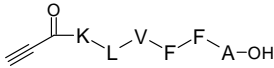
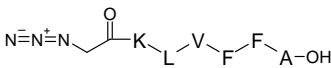
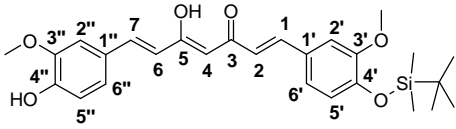
I.4.2. Syntheses of ligands

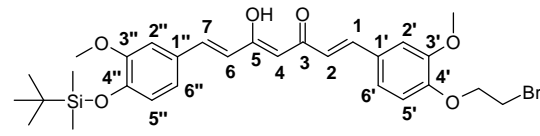
4-[(aminoxypropylamino)carbonyl]-9-[(4-diethylamino-1-methylbutyl)amino]acridine	34
	
The compound 34 was synthesized as previously described. ¹⁹¹	
9-chloro-1,2,3,4-tetrahydroacridine	35
	<p>Yield: 94 % (1.289 g, 5.94.10⁻³ mol)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₁₃H₁₂ClN</p> <p>M_{calcd} = 217.0 g.mol⁻¹ M_{exp} = 216.7 g.mol⁻¹</p> <p>¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.96 (br. s, 4H, H-2,3), 3.03 (br. s, 2H, H-1 or H-4), 3.15 (br. s, 2H, H-1 or H-4), 7.54 (br. t, 1H, J = 7.0 Hz, H-7), 7.67 (br. t, 1H, J = 7.0 Hz, H-6), 8.00 (br. d, 1H, J = 8.5 Hz, H-5), 8.17 (br. d, 1H, J = 8.5 Hz, H-8)</p>
<p>To a mixture of anthranilic acid (1 g, 7.29.10⁻³ mol) and cyclohexanone (0.730 mL, 6.29.10⁻³ mol) was carefully added 7 mL of phosphorus oxychloride in an ice bath. The mixture was heated under reflux for 2 hr. After cooling to room temperature the reaction was added dropwise to NH₃ in ice water with rapid stirring. After the addition was completed a yellow solid had precipitated. The product was centrifuged, washed with water and dried under vacuo, affording of 35 as yellow solid.</p>	
9-[(2-hydroxyethyl)amino]-1,2,3,4-tetrahydroacridine	36
	<p>Yield: 60 % (141 mg, 5.82.10⁻⁴ mol)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₁₅H₁₈N₂O</p> <p>M_{calcd} = 242.1 g.mol⁻¹ M_{exp} = 241.8 g.mol⁻¹</p> <p>¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.90 (br. s, 4H, H-2,3), 2.76 (br. s, 2H, H-1 or H-4), 3.06 (br. s, 2H, H-1 or H-4), 3.64 (m, 2H, CH₂-N), 3.83 (m, 2H, CH₂-O), 7.35 (br. t, 1H, J = 7.0 Hz, H-7), 7.55 (br. t, 1H, J = 7.0 Hz, H-6), 7.93 (br. d, 1H, J = 8.5 Hz, H-5), 7.99 (br. d, 1H, J = 8.5 Hz, H-8)</p>
<p>A mixture of compound 35 (212 mg, 9.76.10⁻⁴ mol) and ethanolamine (278 mL, 4.6.10⁻³ mol) in 5 mL of 1-pentanol was heated at reflux for 6 hr. The product precipitated upon cooling and was isolated by filtration, washing with diethyl ether. The residue was diluted with DCM, washed with a solution of 10 % of NaHCO₃, water and brine. The combined organic extracts were dried (Na₂SO₄), filtered and the solvent removed in vacuo to provide compound 36.</p>	

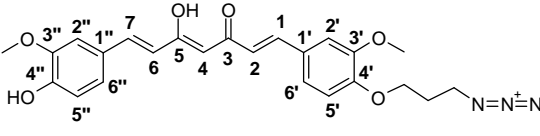
9-[(2-chloroethyl)amino]-1,2,3,4-tetrahydroacridine hydrochloride	37
	<p>Yield: 89 % (98 mg, $3.30 \cdot 10^{-4}$ mol)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): $C_{15}H_{17}ClN_2$ $M_{\text{calcd}} = 260.1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_{\text{exp}} = 259.8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$</p> <p>$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 1.92 (br. s, 4H, H-2,3), 2.73 (br. s, 2H, H-1 or H-4), 3.36 (br. s, 2H, H-1 or H-4), 3.94 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 4.29 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Cl}$), 7.48 (br. t, 1H, $J = 7.0 \text{ Hz}$, H-7), 7.71 (br. t, 1H, $J = 7.0 \text{ Hz}$, H-6), 8.13 (br. d, 1H, $J = 8.5 \text{ Hz}$, H-5), 8.59 (br. d, 1H, $J = 8.5 \text{ Hz}$, H-8)</p>
<p>Compound 36 (90 mg, $3.72 \cdot 10^{-4}$ mol) was dissolved in 1.2 mL of thionyl chloride and heated at 50°C for 30 min. The reaction was concentrated under reduced pressure and the compound 37 was obtained as red oil.</p>	

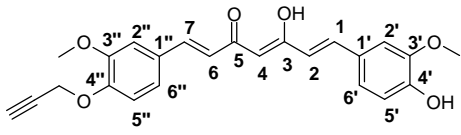
9-[(2-azidoethyl)amino]-1,2,3,4-tetrahydroacridine	38
	<p>Yield: : 62 % (55 mg, $2.06 \cdot 10^{-4}$ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 6.9 min (C_{18}, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): $M_{\text{calcd}} = 267.1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_{\text{exp}} = 266.9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$</p> <p>$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 1.93 (br. s, 4H, H-2,3), 2.76 (br. s, 2H, H-1 or H-4), 3.15 (br. s, 2H, H-1 or H-4), 3.57 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}_3$), 3.69 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 4.57 (br. s, 1H, NH), 7.41 (br. t, 1H, $J = 7.0 \text{ Hz}$, H-7), 7.60 (br. t, 1H, $J = 7.0 \text{ Hz}$, H-6), 7.95 (br. d, 1H, $J = 8.5 \text{ Hz}$, H-5), 8.08 (br. d, 1H, $J = 8.5 \text{ Hz}$, H-8)</p>
<p>Compound 37 (98 mg, $3.30 \cdot 10^{-4}$ mol) was dissolved in a mixture of 5 mL of MeOH/H_2O (1/1). NaN_3 (43 mg, $6.60 \cdot 10^{-4}$ mol) was added and the mixture was heated at 90°C for 8 hr after which time the cooled reaction was extracted with DCM. The combined organic extracts were dried (Na_2SO_4) and concentrated. The residue was purified by column chromatography (10 % MeOH in DCM) to give compound 38 as an orange oil.</p>	

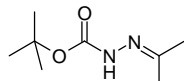
H-K(Boc)-L-V-F-F-A-on resin	39
	
<p>The linear decapeptide 39 was automatically assembled (348 Ω peptide synthesizer) on 2-chlorotritylchloride[®] resin (1 g, $1.4 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) using the procedure I.2.1.</p>	

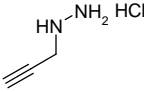
<p style="text-align: center;">HC≡C-CO-K-L-V-F-F-A-OH</p>	40
	<p>Yield: 21 % (115 mg, $1.29 \cdot 10^{-4}$ mol) RP-HPLC: RT = 9.32 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min) MS (ESI-MS, positive mode): C₄₁H₅₇N₇O₈ M_{calcd} = 775.4 g.mol⁻¹ M_{exp} = 775.4 g.mol⁻¹</p>
<p>Peptide on resin 39 ($6.30 \cdot 10^{-4}$ mol) was solved in 10 mL of DMF adjusted with DIEPA to pH 8-9. Propionic acid (120 μL, $1.89 \cdot 10^{-3}$ mol) and PyBOP (982 mg, $1.89 \cdot 10^{-3}$ mol) was added to the resin solution. The mixture was stirred for 30 min at r.t. This procedure was realised two times. The peptide was released from the resin following protocol I.2.2. The crude product was precipitated, washed with diethyl ether and was purified by RP-HPLC (C₁₈, 5-100 % B in 30 min) affording compound 40 as a white powder.</p>	
<p style="text-align: center;">N₃-CH₂-CO-K-L-V-F-F-A-OH</p>	41
	<p>Yield: 25 % (42 mg, $4.56 \cdot 10^{-5}$ mol) RP-HPLC: RT = 9.32 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min) MS (ESI-MS, positive mode): C₄₀H₅₈N₁₀O₈ M_{calcd} = 806.4 g.mol⁻¹ M_{exp} = 806.4 g.mol⁻¹</p>
<p>Peptide on resin 39 ($1.86 \cdot 10^{-4}$ mol) was solved in 10 mL of DMF adjusted with DIEPA to pH 8-9. Azidoacetic acid 30 (189 mg, $9.30 \cdot 10^{-4}$ mol) and PyBOP (483 mg, $9.30 \cdot 10^{-4}$ mol) was added to the resin solution. The mixture was stirred for 30 min at r.t. This procedure was realised two times. The peptide was released from the resin following protocol I.2.2. The crude product was precipitated, washed with diethyl ether and was purified by RP-HPLC (C₁₈, 5-100 % B in 30 min) affording compound 40 as a white powder.</p>	
<p style="text-align: center;">1-[4-<i>tert</i>-butyldimethylsilyloxy-3-methoxyphenyl]-5-hydroxy-7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-one</p>	42
	<p>Yield: 33 % (0.259 g, $5.37 \cdot 10^{-4}$ mol) ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.18 (s, 6H, CH₃-Si), 1.00 (s, 9H, <i>t</i>Bu-Si), 3.85 (s, 3H, CH₃-O), 3.95 (s, 3H, CH₃-O), 5.80 (s, 1H, H-4), 6.47 (d, 1H, J = 15.8 Hz, H-2 or H-6), 6.48 (d, 1H, J = 15.8 Hz, H-2 or H-6), 6.85 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H-5' or H-5''), 6.93 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H-5' or H-5''), 7.04-7.14 (m, 4H, H-2'', H-2'', H-6', H-6''), 7.59 (d, 2H, J = 15.8 Hz, H-1, H-7)</p>
<p><i>Tert</i>-butyldimethylsilyl chloride (0.246 g, $1.63 \cdot 10^{-3}$ mol) was added to a solution of curcumin (0.600 g, $1.63 \cdot 10^{-3}$ mol) and imidazole (0.224 g, $3.26 \cdot 10^{-3}$ mol) in anhydrous DMF (20 mL) at 0°C. The mixture was stirred for 3 hr at r.t., diluted with 5 % aqueous NaHCO₃ and extracted with AcOEt. The combined organic extracts were washed with water, brine, dried (Na₂SO₄) and concentrated. The residue was purified by column chromatography (20 % AcOEt in pentane) to give compound 42.</p>	

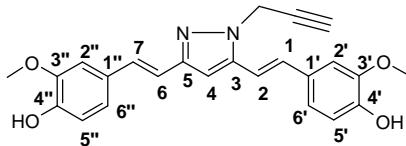
1-[4-(3-Bromopropoxy)-3-methoxyphenyl]-5-hydroxy-7-[4- <i>tert</i> -butyldimethylsilyloxy-3-methoxyphenyl]-1,4,6-heptatrien-3-one	43
	<p>Yield: 29 % (43 mg, $7.13 \cdot 10^{-5}$ mol)</p> <p>$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 0.18 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{-Si}$), 1.00 (s, 9H, <i>t</i>Bu-Si), 2.38 (q, 2H, $J = 6.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 3.63 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Br}$), 3.85 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 3.91 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 4.20 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O}$), 5.81 (s, 1H, H-4), 6.48 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz, H-2 or H-6), 6.49 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz, H-2 or H-6), 6.85 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz, H-5' or H-5''), 6.91 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz, H-5' or H-5''), 7.05-7.15 (m, 4H, H-2'', H-2'', H-6', H-6''), 7.59 (d, 2H, $J = 15.8$ Hz, H-1, H-7)</p>
<p>A solution of compound 42 (0.120 g, $2.48 \cdot 10^{-4}$ mol), 3-bromopropanol (68 μL, $7.5 \cdot 10^{-4}$ mol) and triphenylphosphine (0.260 g, $9.92 \cdot 10^{-4}$ mol) in THF (2 mL) was cooled to 0°C. To this solution was added diisopropylazodicarboxylate (0.198 mL, $1.00 \cdot 10^{-3}$ mol) dropwise under argon. The solution was stirred under argon for 6 hr. Volatile components were removed <i>in vacuo</i> followed by column chromatography (15 % AcOEt in pentane) to afford compound 43.</p>	

1-[4-(3-Azidopropoxy)-3-methoxyphenyl]-5-hydroxy-7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-one	44
	<p>Yield: 95 % (9.2 mg, $2.04 \cdot 10^{-5}$ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 12.5 min (C_{18}, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): $M_{\text{calcd}} = 451.48 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_{\text{exp}} = 451.01 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$</p> <p>$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 2.11 (q, 2H, $J = 6.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 3.55 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O}$) 3.91 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 3.95 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 4.14 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-N}_3$), 5.81 (s, 1H, H-4), 6.48 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz, H-2 or H-6), 6.49 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz, H-2 or H-6), 6.89 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz, H-5' or H-5''), 6.93 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz, H-5' or H-5''), 7.05-7.14 (m, 4H, H-2'', H-2'', H-6', H-6''), 7.59 (d, 2H, $J = 15.7$ Hz, H-1, H-7)</p>
<p>A solution of compound 43 (13 mg, $2.15 \cdot 10^{-5}$ mol) in anhydrous DMF (2 mL) was treated with NaN_3 (20 mg, $3.07 \cdot 10^{-4}$ mol) at r.t. The resulting reaction mixture was warmed at 80°C for 1 hr and 1 hr at r.t. before concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with AcOEt, washed with water and brine. The organic extract was dried (Na_2SO_4) and concentrated under reduced pressure. The compound 44 was obtained as a red solid.</p>	

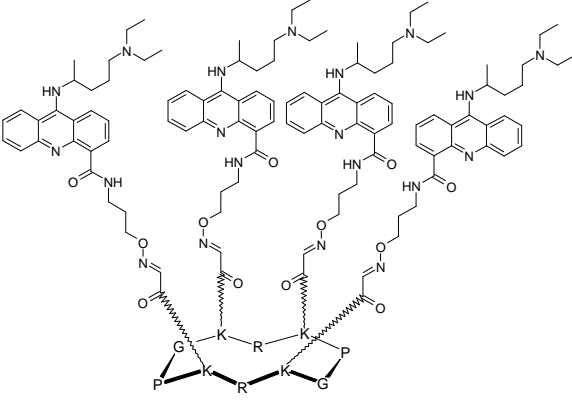
5-hydroxy-7-(4-hydroxy-3-methoxyphényl)-1-[3-methoxyphényl-4-(prop-2-ynyloxy)]-1,4,6-heptatrièn-3-one	45
	<p>Yield: 13 % (27 mg, $6.65 \cdot 10^{-5}$ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 11.9 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p>
<p>Curcumin (0.198 g, $5.36 \cdot 10^{-4}$ mol) and K₂CO₃ (0.075 g, $5.43 \cdot 10^{-4}$ mol) were added to DMF (2.5 mL) followed by 3-bromoprop-1-yne (78 μL, $6.56 \cdot 10^{-4}$ mol). The mixture was stirred at r.t. under argon during 48 hr and the solvent was removed under vacuum. The product was purified first by column chromatography (10 % MeOH in DCM) and then by RP-HPLC (C₁₈, 25-100 % B in 30 min) affording compound 45 as a red solid.</p>	<p>MS (ESI-MS, positive mode): M_{calcd} = 406.44 g.mol⁻¹ M_{exp} = 406.02 g.mol⁻¹</p> <p>¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.53 (t, 1H, J = 2.4 Hz, H-C≡C), 3.93 (s, 3H, CH₃-O), 3.95 (s, 3H, CH₃-O), 4.80 (d, 2H, J = 2.4 Hz, CH₂-O), 5.82 (s, 1H, H-4), 6.49 (d, 1H, J = 15.7 Hz, H-2 or H-6), 6.51 (d, 1H, J = 15.7 Hz, H-2 or H-6), 6.89 (d, 2H, J = 7.9 Hz, H-5' or H-5''), 7.05-7.14 (m, 5H, H-2'', H-2'', H-5' or H-5'', H-6', H-6''), 7.60 (d, 2H, J = 15.7 Hz, H-1, H-7)</p>

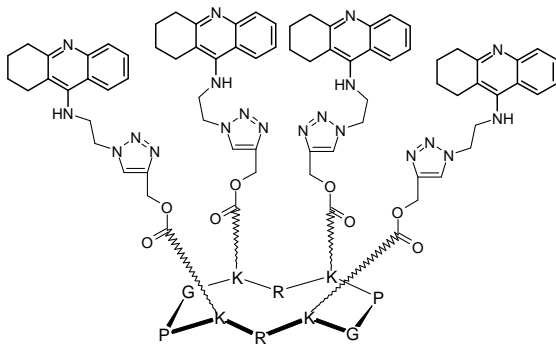
<i>tert</i> -butyl isopropylidene carbazate	46
	<p>Yield: 97 % (6.33 g, $3.67 \cdot 10^{-2}$ mol)</p> <p>¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.50 (s, 9H, <i>t</i>Bu), 1.81 (s, 3H, CH₃), 2.02 (s, 3H, CH₃)</p>
<p>To a solution of <i>tert</i>-butyl carbazate (5 g, $3.78 \cdot 10^{-2}$ mol) in acetone (38 mL) was added MgSO₄ (1 g) and 3 drops of AcOH. The mixture was heated to reflux for 1 hr then cooled, filtered and concentrated under vacuum to give compound 46 as a white solid.</p>	

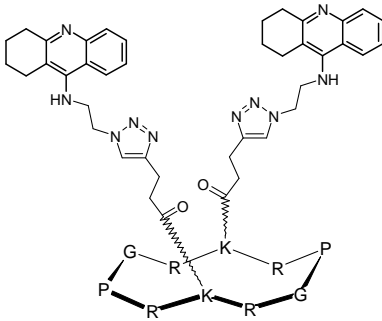
Prop-2-ynylhydrazine hydrochloride	47
	Yield: 50 % (0.169 g, 1.58.10 ⁻³ mol) ¹H NMR (300 MHz, d6-DMSO) δ 3.40 (t, 1H, J = 2.5 Hz, H-3), 3.69 (d, 2H, J = 2.5 Hz, H-1)
<p>To a solution of solid KOH (0.337 g, 6.00.10⁻³ mol) and Bu₄NHSO₄ (0.200 g, 5.89.10⁻⁴ mol) in toluene (10 mL) was added compound 46 (0.542 g, 3.14.10⁻³ mol). The mixture was stirred and heated to 50°C where-upon neat 3-bromoprop-1-yne (517 μL, 6.00.10⁻³ mol) was added slowly. The temperature was increased to 80°C and 1 eq. of 3-bromoprop-1-yne was added. The mixture was stirred at 80°C for 8 hr. The mixture was cooled and washed with water until the aqueous extract has a neutral pH. The organic layer was dried (MgSO₄) and concentrated <i>in vacuo</i> to give lightly colored oil which was used without further purification. This oil was dissolved in a solution of 2 N HCl in toluene (10⁻² M). The mixture was heated at reflux for 3 hr. The mixture was cooled and concentrated <i>in vacuo</i> to afford compound 47 as colored oil.</p>	

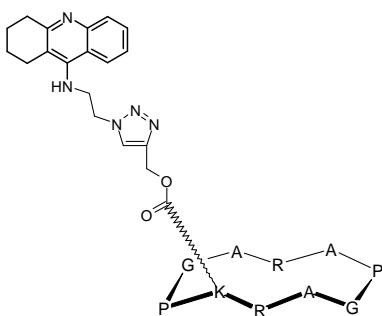
4-((1E,1'E)-2-(5-(4-hydroxy-3-methoxystyryl)-1-prop-2-ynyl)-pyrazol-3-yl)vinyl)-2-methoxyphenol	48
	Yield: 28 % (13 mg, 3.23.10 ⁻⁵ mol) RP-HPLC: RT = 9.79 min (C ₁₈ , 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min) MS (ESI-MS, positive mode): M _{calcd} = 402.4 g.mol ⁻¹ M _{exp} = 402.1 g.mol ⁻¹
<p>To a solution of compound 47 (87 mg, 8.26.10⁻⁴ mol) in MeOH/AcOH (9/1) (10⁻² M) was added curcumin (44 mg, 1.18.10⁻⁴ mol). The resulting mixture was stirred at reflux for 72 hr. The reaction mixture was then concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography (50 % AcOEt in pentane) to give compound 48 as colored oil.</p>	RMN ¹H (500 MHz, d6-DMSO): δ = 3.11 (s, 3H, CH ₃ -O), 3.12 (s, 3H, CH ₃ -O), 2.08 (t, 1H, J = 2 Hz, H-C≡C), 4.27 (d, 2H, J = 2 Hz, CH ₂ -C≡C), 5.98 (d, 1H, J = 8 Hz, H-5''), 5.98 (s, 1H, H-4), 6.00 (d, 1H, J=8 Hz, H-5'), 6.06 (d, 1H, J=16.4 Hz, H-2), 6.17 (dd, 1H, J=1.8, 8 Hz, H-6''), 6.21 (d, 1H, J=16 Hz, H-2), 6.24 (dd, 1H, J=1.8, 8 Hz, H-6'), 6.29 (d, 1H, J=16.4 Hz, H-7), 6.32 (d, 1H, J=1,8 Hz, H-2'), 6.34 (d, 1H, J=16 Hz, H-1), 6.40 (d, 1H, J=1.8 Hz, H-2')

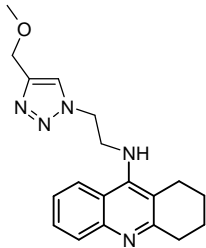
I.4.3. Syntheses of multimeric compounds

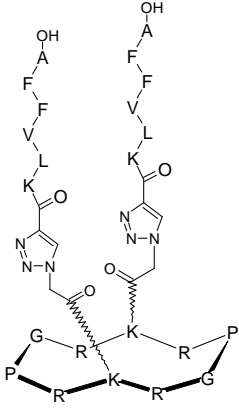
C4Quin	49
	
<p>The compound 49 was synthesized as previously described.¹⁹¹</p>	

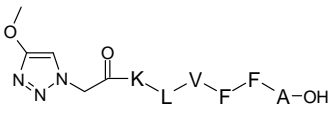
C4Tac	50
	<p>Yield: 42 % (9.6 mg, $2.99 \cdot 10^{-6}$ mol) RP-HPLC: RT = 7.8 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min) MS (ESI-MS, positive mode): $M_{\text{calcd}} = 2529.3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ $M_{\text{exp}} = 2529.8 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$</p>
<p>Compound 38 (9.1 mg, $3.41 \cdot 10^{-5}$ mol) and compound 23 (12.1 mg, $7.16 \cdot 10^{-6}$ mol) were dissolved in 750 μL of H₂O/CH₃CN (1/1). Cu turning (200 mg) and (+)-Sodium L-ascorbate (0.3 mg, $1.51 \cdot 10^{-6}$ mol) were added and the mixture was stirred for 6 hr at 40°C. The solution was then filtrated and lyophilised. The residue was precipitated and washed with diethyl ether and a RP-HPLC (C₁₈, 5-100 % B in 30 min) was performed to afford pure compound 50.</p>	

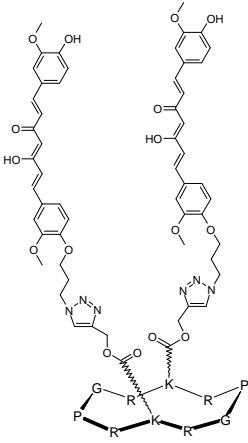
C2Tac	<u>51</u>
	<p>Yield: 27 % (8 mg, $3.12 \cdot 10^{-6}$ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 6.9 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₉₀H₁₃₄N₃₄O₁₂ M_{calcd} = 1883.1 g.mol⁻¹ M_{exp} = 1883.7 g.mol⁻¹</p>
<p>Compound <u>38</u> (7 mg, $2.62 \cdot 10^{-5}$ mol) and compound <u>25</u> (21 mg, $1.16 \cdot 10^{-5}$ mol) were dissolved in 988 μL of H₂O/CH₃CN (1/1). Cu turning (100 mg) and (+)-Sodium L-ascorbate (24 μL, 0.1 M, $2.4 \cdot 10^{-6}$ mol) were added and the mixture was stirred for 29 hr at rt. The solution was then filtrated and lyophilised. The residue was precipitated and washed with diethyl ether and a RP-HPLC (C₁₈, 15-100 % B in 30 min) was performed to afford pure compound <u>51</u>.</p>	

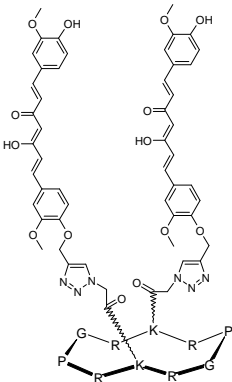
C1Tac	<u>52</u>
	<p>Yield: 59 % (9 mg, $5.45 \cdot 10^{-6}$ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 6.5 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₆₀H₉₀N₂₂O₁₂ M_{calcd} = 1310.2 g.mol⁻¹ M_{exp} = 1311.0 g.mol⁻¹</p>
<p>Compound <u>38</u> (3 mg, $1.12 \cdot 10^{-6}$ mol) and compound <u>29</u> (11.7 mg, $9.20 \cdot 10^{-6}$ mol) were dissolved in 400 μL of H₂O/CH₃CN (1/1). Cu turning (50 mg) and (+)-Sodium L-ascorbate (0.4 mg, $2.02 \cdot 10^{-6}$ mol) were added and the mixture was stirred for 24 hr at 40°C. The solution was then filtrated and lyophilised. The residue was precipitated and washed with diethyl ether and a RP-HPLC (C₁₈, 5-100 % B in 30 min) was performed to afford pure compound <u>52</u>.</p>	

9-[(2-(4-methoxymethyl-triazol-1-yl)ethyl)amino]-1,2,3,4-tetrahydroacridine	53
	<p>Yield: 42 % (14.3 mg, $3.17 \cdot 10^{-5}$ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 6.5 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₁₉H₂₃N₅O M_{calcd} = 337.2 g.mol⁻¹ M_{exp} = 336.6 g.mol⁻¹</p>
<p>Compound 38 (20 mg, $7.49 \cdot 10^{-5}$ mol) and compound 3-methoxy-1-propyne (10 μL, $1.18 \cdot 10^{-4}$ mol) were dissolved in 1.5 mL of tBuOH/H₂O (2/1). (+)-Sodium L-ascorbate (15 μL, 1 M, $1.49 \cdot 10^{-5}$ mol) and CuSO₄ (7.5 μL, 1 M, $7.49 \cdot 10^{-6}$ mol) were added and the mixture was heated with domestic microwave for 10 min. The product was purified by RP-HPLC (C₁₈, 10-100 % B in 30 min) to afford pure compound 53.</p>	

C2Aβ ₁₆₋₂₁	54
	<p>Yield: 39 % (5.6 mg, $1.56 \cdot 10^{-6}$ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 7.7 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₁₃₆H₂₀₈N₄₄O₂₈ M_{calcd} = 2907.4 g.mol⁻¹ M_{exp} = 2906.9 g.mol⁻¹</p>
<p>Compound 40 (7.9 mg, $8.88 \cdot 10^{-6}$ mol) and compound 31 (7.3 mg, $4.03 \cdot 10^{-6}$ mol) were dissolved in 750 μL of TFE/H₂O/tBuOH (1/1/1). (+)-Sodium L-ascorbate (22 μL, 0.01 M, $2.20 \cdot 10^{-7}$ mol) and CuSO₄ (11 μL, 0.01 M, $1.10 \cdot 10^{-7}$ mol) were added and the mixture was heated with domestic microwave for 20 min. The product was purified by RP-HPLC (C₅, 25-100 % B in 30 min) to afford pure compound 54.</p>	

Aβ₁₆₋₂₁	55
	<p>Yield: 20 % (1.1 mg, 1.11.10⁻⁶ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 8.4 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): M_{calcd} = 876.4 g.mol⁻¹ M_{exp} = 876.4 g.mol⁻¹</p>
<p>Compound 41 (5 mg, 5.43.10⁻⁶ mol) and compound 3-methoxy-1-propyne (522 μL, 6.18.10⁻⁶ mol) were dissolved in 510 μL of TFE/tBuOH/H₂O (30/15/1). (+)-Sodium L-ascorbate (55 μL, 0.1 M, 5.50.10⁻⁶ mol) and CuSO₄ (27 μL, 0.1 M, 2.70.10⁻⁶ mol) were added and the mixture was heated at 40°C for 20 hr. The product was purified by RP-HPLC (C₁₈, 10-100 % B in 30 min) to afford pure compound 55.</p>	

C2Cur	56
	<p>Yield: 42 % (0.5 mg, 1.84.10⁻⁷ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT =10.6 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): M_{calcd} = 2255.1 g.mol⁻¹ M_{exp} = 2255.5 g.mol⁻¹</p>
<p>Compound 44 (1.8 mg, 3.99.10⁻⁶ mol) and compound 24 (0.8 mg, 4.42.10⁻⁷ mol) were dissolved in 80 μL of CH₃CN/H₂O/tBuOH (2/1/1). (+)-Sodium L-ascorbate (0.5 mg, 2.52.10⁻⁶ mol) and Cu turning (20 mg) were added and the mixture was heated at 40°C for 72 hr. The product was purified by RP-HPLC (C₅, 25-100 % B in 30 min) to afford pure compound 57.</p>	

C2Cur	57
	<p>Yield: 30 % (1.7 mg, $6.48 \cdot 10^{-7}$ mol)</p> <p>RP-HPLC: RT = 10.4 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-100 % B in 15 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode): C₁₀₂H₁₃₈N₃₀O₂₄ M_{calcd} = 2167.0 g.mol⁻¹ M_{exp} = 2166.9 g.mol⁻¹</p>
<p>Compound 45 (1.8 mg, $4.42 \cdot 10^{-6}$ mol) and compound 31 (3.9 mg, $2.15 \cdot 10^{-6}$ mol) were dissolved in 200 μL of TFE/H₂O/DMSO (1/1/2). (+)-Sodium L-ascorbate (20 μL, 0.01 M, $2.15 \cdot 10^{-7}$ mol) and Cu turning (20 mg) were added and the mixture was heated at 60°C for 7 hr. The product was purified by RP-HPLC (C5, 25-100 % B in 30 min) to afford pure compound 57.</p>	

II. Caractérisation des édifices peptidiques

II.1. Circular dichroism spectroscopy

Circular dichroism (CD) spectra were acquired with signal averaging on a Jasco J-810 Spectropolarimeter equipped with a Jasco Peltier PTC-423S temperature controller, and a baseline was recorded separately and subtracted. Far-UV spectra were recorded from 260 to 190 nm, with quartz cells and 2 s response times. Spectra are the averages of 3 scans and ellipticities are reported as mean residue ellipticities. Compounds were dissolved in water to a concentration of 6 to 50 μM . The formation of β sheet was commenced by the addition of stock phosphate or acetate buffer to give a final concentration of 2 to 50 mM, pH 5.4 or pH 7.1.

II.2. Fluorescence measurements

The binding of thioflavine T (10 μM) was recorded on a Perkin Elmer Luminescence Spectrometer LS50 using a 0.3 cm reduced cell with a sample volume of 70 μL . The bandwidth for excitation was 5 nm and for emission 10 nm, and the response time was 2 s. The fluorescence intensity and wavelength maximum shift was recorded using peptide solution with excitation at 440 nm. The emission spectra were recorded at 0.5 nm intervals between 450 and 560 nm. ThT and compounds were incubated for 1 hr in 20 mM phosphate buffer, pH 7.1, before measuring the fluorescence spectrum.

II.3. Congo Red binding

The absorbance of CR (1 μM) was measured separately in 10 mM phosphate buffer, pH 7.1, between 300 and 700 nm. Compounds were incubated in the same buffer and the absorbance spectrum was measured and used as blank. CR and compounds were incubated for 1 hr in 10 mM phosphate buffer, pH 7.1, before measuring the absorbance spectrum.

II.4. Transmission electron microscopy

Study was performed by Isabelle Paintrand on the CERMAV laboratory. Compounds were dissolved in water to a concentration of 6 to 50 μM . The formation of the fibrils was commenced by the addition of stock phosphate or acetate to give a final concentration of 2 to 50 mM, pH 5.4 or pH 7.1. The solution was left for 6 hr to 7 days at 21°C before application to a glow-discharged 200-mesh carboncoated grid, for three minutes. Thereafter the grid was washed three times with water, one minute each, and finally stained with 2% uranyl acetate. Micrographs were recorded using a 6 Philips CM200 Cryo transmission electron microscope operating at 80 kV and with a magnification of 15000, 38000 and 66000 x.

II.5. Molecular modelling

Compounds are constructed with the Insight II software (2000, accelrys) using the CVFF (Consistent Valence ForceField) force field well suited for peptide studies. For all the compounds, a loop constituted of amino acids Ser26 to Gly29 was previously introduced. The loops were positioned closed enough to allow hydrogen bond formation (distance less than 5 Å). The resulting molecules were minimized using the discover module by 1000 steps of steepest descent followed by 5000 steps of conjugate gradient until convergence of the structures.

III. Protocole des expériences d'inhibition *in vitro*

III.1. Preparation of A β ₄₀ peptide stock solution

Synthetic A β ₄₀ was prepared as previously described (Cf Annexe I).¹³¹ For aggregation assays, a stock solution of A β ₄₀ was prepared as follows: 2.7 mg was dissolved in 200 μ L of 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol to disassemble preformed aggregates, thereafter it was lyophilized. One mL of pure water was added to the lyophilized peptide and the solution was centrifuged at 12000 g to remove eventual aggregates. The stock solution was divided into portions and stored at -20 °C until use. The stock concentration of A β ₄₀ was 500 μ M.

III.2. Preparation of inhibitor stock solutions

Inhibitors were dissolved in DMSO/H₂O (1/1). Stock solutions of 5 to 20 mM were first prepared, thereafter they were diluted with DMSO/H₂O (1/1) to the following concentrations 500 μ M to 0.5 μ M. Final concentrations of DMSO in inhibition studies were less than 2 %.

III.3. Fibril formation measurement of A β ₄₀

Aggregation of A β ₄₀ was performed in 96-well black polypropylene microplates (Greiner). To each well an aliquot of the peptide stock solution was mixed into the aggregation buffer giving a final composition of A β ₄₀ (50 μ M) and ThT (10 μ M) in sodium phosphate (50 mM) and NaCl (100 mM) pH 7.4. Aliquots of 2 μ L of the inhibitor compounds were added, giving the aggregation mixture a total volume 100 μ L. Microplates were sealed with a plastic sheet and incubated in a Molecular Devices Spectra MAX Gemini XS microplate reader at 37 °C.

III.4. Fibril formation measurement with preformed fibrils

The seeding experiment was identical to the aggregation measurement of A β ₄₀, with the addition of preformed fibrils (5 μ M). The preformed fibrils of A β ₄₀ were prepared from the aggregation measurement of A β ₄₀ without inhibitor compounds (described above). Fibrils were sonicated for 10 seconds immediately before use.

III.5. Fluorescence spectroscopy

Microplates were analyzed in a Molecular Devices Spectra MAX Gemini XS microplate spectrophotometer at 37°C. Measurements of ThT binding were recorded once or twice daily using bandpass filters of 445 nm for excitation and 485 nm for emission and a cut-off filter of 475 nm was used.

III.6. Atomic force microscopy

Study was performed on the “plateau caractérisation des interactions” of NanoBio. An aliquot, 3 μ L, from each inhibition study was withdrawn at the end of the aggregation reaction and deposited onto freshly cleaved mica sheets for AFM inspection. The sample was incubated on mica for 2 minutes followed by three washes with 5 μ L water to gently remove the material not adsorbed to the substrate. The mica was dried in air for one hour. In-air AFM images were acquired in non-contact mode in a vibration insulated environment, using a PicoPlus microscope (Molecular Imaging), equipped with a PicoScan-3000 controller. For imaging, we used single beam aluminum-coated cantilevers (type NSC36/ALBS, μ masch) with $R_c < 10$ nm, 110 - 130 μ m lengths and nominal spring constant 0.6 N/m. The drive frequency was between 200 and 400 kHz.

III.7. Acetylcholinesterase inhibition study

Inhibition study was performed using the method of Ellman in 96 well U.V. transparent microplates (Corning®).²²⁶ To each well was mixed 290 μ L of a 0.1 M phosphate buffer, pH 8 with 5 μ L of a 5U Electrophorus electricus (Sigma, C2888, type V-S) solution and with 10 μ L of aliquots of the inhibitor compound solution. Thereafter was added 22 μ L of solution containing 5 mM of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (final concentration 305 μ M) and 75 mM acetylthiocholine (ATC) (final concentration 450 μ M) in 0.1 M phosphate buffer and 0.1 M of NaCl, pH 7.4. The microplate was shaken for 5 s and the variation of absorbance at 412 nm was recorded during 5 min. Assays were done with blank containing all components except AChE in order to account for non-enzymatic reaction. Each concentration was analyzed in triplicate, and IC_{50} values were determined graphically from log concentration-inhibition curves.

ANNEXES

Annexe I

Dolphin, G. T.; Ouberai, M.; Dumy, P.; and Garcia, J. Designed amyloid β -peptide fibril – A tool for high-throughput screening of fibril inhibitors. *ChemMedChem* **2007**, 2, 1613-1623.

FULL PAPERS

DOI: 10.1002/cmdc.200700103

Designed Amyloid β Peptide Fibril—A Tool for High-Throughput Screening of Fibril Inhibitors

Gunnar T. Dolphin, Myriam Ouberai, Pascal Dumy,* and Julian Garcia^{*[a]}

Amyloid β peptide ($A\beta$) fibril formation is widely believed to be the causative event of Alzheimer's disease pathogenesis. Therapeutic approaches are therefore in development that target various sites in the production and aggregation of $A\beta$. Herein we present a high-throughput screening tool to generate novel hit compounds that block $A\beta$ fibril formation. This tool is an application for our fibril model ($A\beta_{1-37}Y_{20}K_{22}K_{24}$)₄ which is a covalent as-

sembly of four $A\beta$ fragments. With this tool, screening studies are complete within one hour, as opposed to days with native $A\beta_{1-40}$. A Z' factor of 0.84 ± 0.03 was determined for fibril formation and inhibition, followed by the reporter molecule thioflavin T. Herein we also describe the analysis of a broad range of reported inhibitors and non-inhibitors of $A\beta$ fibril formation to test the validity of the system.

Introduction

Amyloid diseases are protein-misfolding disorders characterized by aggregation of proteins and peptides, which form insoluble fibrils in vivo that accumulate into amyloid plaques. The most common forms of amyloid disease are the neurodegenerative disorders Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's diseases.^[1–3] Even though amyloid-forming proteins show little sequence homology, amyloid fibrils share common characteristics, such as unbranched fibrillar morphology, cross- β -sheet structure, and binding of the amyloid-specific dyes Congo red and thioflavin T (ThT).

Alzheimer's disease (AD) is a progressive degenerative disease characterized by amyloid fibrillar deposits in the brain that consist mainly of the amyloid β peptides $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$.^[4] Amyloid β peptides are proteolytic fragments of the amyloid precursor protein^[5] and include a membrane segment, giving them their highly hydrophobic and aggregation-prone nature. $A\beta$ is normally present as a random coil, but through formation of intermediate oligomers, misfolds into fibrils, and further aggregation of the fibril forms amyloid. The mechanism for amyloid formation is suggested to occur through a nucleation-dependent polymerization.^[6,7]

It is widely accepted that the formation of fibrils is implicated in the neurotoxicity associated with AD, but there is still much discussion about which aggregation state of $A\beta$ is toxic and what the mechanisms of toxicity are. In AD patients both the disruption of cellular calcium homeostasis and increased oxidative stress have been observed.^[8] Suggested mechanisms for the observed toxicity in AD include $A\beta$ interaction with neuron membranes, generating an increase in intracellular calcium concentration.^[9] This has been proposed to occur through either insertion of $A\beta$ in the cellular membrane with formation of pores,^[10,11] or through direct interaction of $A\beta$ with membranes, which leads to their instability.^[12–14] Moreover, elevated intracellular Ca^{2+} levels can trigger excessive phosphorylation of tau protein, a major component of paired helical filaments, which leads to the accumulation of neurofi-

brillary tangles, a typical pathology of AD and related diseases.^[15] Oxidative damage observed in the brains of AD patients has been suggested to be a result of $A\beta$ -mediated reduction of Cu^{2+} and Fe^{3+} , leading to the production of reactive oxygen species (ROS).^[16,17] The ROS, in turn, modify and decrease the function of critical enzymes in energy metabolism.^[18]

To date, there is no detailed structural information about amyloid fibrils, owing to short-lived intermediates and their insoluble nature. From experiments using circular dichroism (CD), solid-state NMR, EPR, and X-ray scattering, amyloid fibrils have been determined to contain a high amount of β -sheet structure. Key features of $A\beta$ organization in fibrils have also been revealed, such as the cross- β -sheet structural motif, where β strands are perpendicular to the fibril axis and form intermolecular parallel β sheets extending the length of the fibril.^[19]

A number of therapeutic approaches are in development that target different sites on the pathway towards Alzheimer's disease. As fibril formation of $A\beta$ is implicated in AD pathogenesis, important strategies include: decreasing $A\beta$ production,^[20] stimulating the immune system to remove $A\beta$ from the brain,^[21] and direct inhibition of the $A\beta$ self-assembly process.^[22,23] For the suppression or prevention of the transition from monomeric to oligomeric and polymeric $A\beta$ species, an accumulation of reports that describe small-molecule inhibitors has emerged in the past few years. This approach was initially

[a] Dr. G. T. Dolphin, M. Ouberai, Prof. P. Dumy, Prof. J. Garcia
Département Chimie Moléculaire (DCM), UMR 5250, ICMG-FR
Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9 (France)
Fax: (+33) 476514946
E-mail: julian.garcia@ujf-grenoble.fr
pascal.dumy@ujf-grenoble.fr

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.chemmedchem.org> or from the author.

CHEMMEDCHEM

P. Dumy, J. Garcia, et al.

based on the finding that the small dye, Congo red, interacts specifically with amyloid fibrils and inhibits their formation.²⁴

ThT also shows specific binding to amyloid, and is the simplest way to identify amyloid structures and to follow their formation and disassembly in the search for inhibitor compounds. ThT is highly specific and sensitive for the characteristic cross- β -sheet structure of amyloid fibrils, and its binding is easily followed by fluorescence spectroscopy. This is due to a large excitation spectral red shift (bathochrome shift), which allows selective excitation of bound ThT.²⁵ ThT binding can be followed by studying aliquots of amyloid fibril mixtures added to a solution of ThT or by addition of ThT to the fibril-forming mixtures, as it has been shown to have little effect on the assembly process.^{26,27}

However, the discovery of inhibitors is hampered by the rather slow phases of nucleation and self assembly of A β peptides, which has been described as a nucleation-dependent polymerization mechanism.^{26,27} The nucleation and lag phases usually take a few days, and the whole process to fully formed fibrils can take more than a week. However, the nucleation phase can be avoided by the addition of preformed fibrils that seed the self association. The kinetic processes involved in A β organization are highly variable; identical kinetics studies can show different lag phases. For these reasons, there is a need for a fast and reproducible screening tool for the search of amyloid inhibitors. This tool should have the properties of easy handling and stability and should be adaptable to automatic analysis.

Herein we present an application for the engineered fibril building block, (A β_{16-37} Y₂₀K₂₂K₂₄)₄, as a high-throughput screening tool for amyloid inhibitors. Previously we reported the preparation and characterization of (A β_{16-37} Y₂₀K₂₂K₂₄)₄, a fourfold assembly of A β fragments attached to a template scaffold (Figure 1).²⁸ We demonstrated the formation of well-formed fibrils with this assembly by transmission electron microscopy (TEM), CD, and binding with the dyes ThT and Congo red. This construct also displayed important characteristics for high-throughput screening such as highly controllable kinetics of fibril formation, and as the formation of fibrils is rapid and occurs without a lag phase, oligomer formation is expected not to occur with this system. We also demonstrated control over both the initiation and the kinetics of fibril formation by the addition of HPO₄²⁻ at various concentrations.²⁸ As no formation of fibrils occurred with monovalent anions, we con-

cluded that the formation of fibrils is due to charge neutralization of the net positively charged assembly with dianions such as HPO₄²⁻.

We report herein a reproducible analysis of fibril formation and inhibition with amyloid inhibitors, following the real-time change of fluorescence in ThT-fibril interactions. The studies are performed on microplates and the kinetics are fast and complete within one hour. The formation of fibrils is started by simply adding HPO₄²⁻ to solutions of (A β_{16-37} Y₂₀K₂₂K₂₄)₄, ThT, and potential inhibitor molecules. No aggregation or fibril formation is observed without the addition of HPO₄²⁻. To test the validity of our system, this study was carried out with a broad range of reported inhibitors and non-inhibitors.

Results

The screening tool

Previously we reported the preparation of the A β fibril building block, (A β_{16-37} Y₂₀K₂₂K₂₄)₄, which is a fourfold assembly of A β fragments, residues 16–37 of full-length A β , attached to a template scaffold (Figure 1).²⁸ Furthermore, for increased solubility by a net positive charge, three mutations were introduced into the sequence that forms the hydrophilic surface of the filament, namely Phe 20 \rightarrow Tyr, Glu 22 \rightarrow Lys, and Val 24 \rightarrow Lys. This fourfold assembly configuration thus creates two cross-sections (as compared with native A β fibrils), each containing two A β segments that fold through side-chain–side-chain hydrophobic interactions. The characteristic amyloid cross- β -sheet structure is formed between the cross-sections, and aggregation of assemblies forms fibrils (Figure 1). The structure was found to be highly soluble, and the cross- β -sheet structure and formation of fibrils were confirmed by CD, TEM, and specific binding of ThT and CR.²⁸

Herein we present an application for the designed amyloid β peptide fibril building block, (A β_{16-37} Y₂₀K₂₂K₂₄)₄, as a tool for high-throughput screening (HTS) of fibril inhibitors. Important characteristics for HTS applications are displayed in the folding and self association of (A β_{16-37} Y₂₀K₂₂K₂₄)₄, such as rapid fibril formation and control over the initiation of fibril formation by the addition of the divalent anion HPO₄²⁻. Also, the kinetics are highly sensitive to the HPO₄²⁻ concentration, which permits fine-tuning of the kinetics depending on instrumentation. The kinetics are easily followed by the binding of the cross- β -sheet-specific dye ThT (see Table 1 for structure). Figure 2a shows fluorescence spectra of ThT at various times after initiation of (A β_{16-37} Y₂₀K₂₂K₂₄)₄ fibril formation with phosphate buffer (5 mM pH 7.1). In the study of the stagnant solution of ThT and its interaction with (A β_{16-37} Y₂₀K₂₂K₂₄)₄, strong fluorescence intensity is observed at 480 nm, which increases as a function of fibril growth (Figure 2a). By

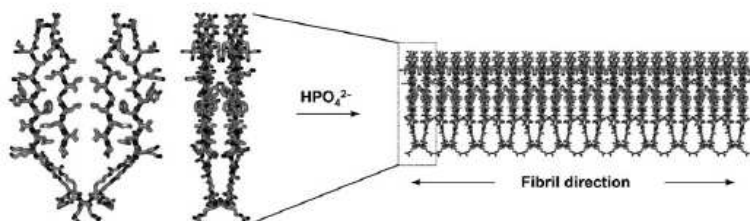


Figure 1. Modeled representation of the fibril building block (A β_{16-37} Y₂₀K₂₂K₂₄)₄, viewed along and from the side of the fibril axis (left); self-assembled (A β_{16-37} Y₂₀K₂₂K₂₄)₄ forms a fibril (represented at right).

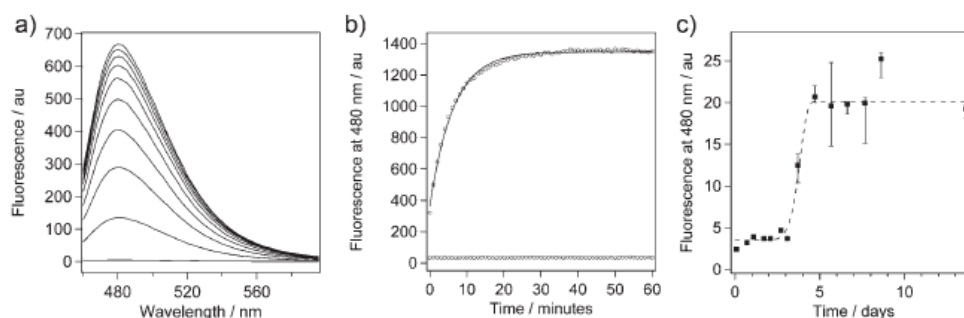


Figure 2. Comparison of folding kinetics between $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ and $A\beta_{1-40}$. a) Fluorescence spectra of ThT ($10 \mu\text{M}$) in the presence of $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ ($4 \mu\text{M}$) at various times after the addition of phosphate buffer (5 mM , $\text{pH } 7.1$, 20°C). Spectra are plotted at (from the bottom) 0, 6, 15, 23, 32, 40, 48, 57, 75, and 84 min; $\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$. b) Folding kinetics of $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ ($70 \mu\text{L}$, $4 \mu\text{M}$, 25°C) in 5 mM HPO_4^{2-} (data points at top), monitored by the fluorescence of bound ThT at 480 nm ; the solid line is the exponential curve fit. Data points at bottom represent the absence of phosphate. c) Folding kinetics of $A\beta_{1-40}$ ($50 \mu\text{M}$) in phosphate buffer (50 mM) and NaCl (100 mM) $\text{pH } 7.4$ at 37°C , monitored by ThT fluorescence at 480 nm with excitation at 440 nm . Data were obtained from $4\text{-}\mu\text{L}$ aliquots that were removed from the aggregation mixture and analyzed separately with $96 \mu\text{L}$ ThT ($10 \mu\text{M}$), HPO_4^{2-} (50 mM , $\text{pH } 7.1$; see Experimental Section). To aid the eye, the data are curve-fitted with an extended-exponential function (dashed line). Data in a) and c) were recorded in a 0.3 cm reduced cuvette; data in b) were recorded using a microplate reader.

studying the increase in fluorescence at 480 nm as a function of time (Figure 2b), it can be seen that the system shows folding with no lag phase and is complete within one hour. The kinetics data are well fitted to a single-exponential function, and the measured rate constant for the complete formation of folded fibrils is 0.2 min^{-1} at 25°C .

For screening purposes, the obvious problem with native $A\beta$ is its slow kinetics of fibril formation, which is shown for $A\beta_{1-40}$ in Figure 2c. As can be seen, the disadvantage is first due to a long nucleation phase (lag phase) that takes more than three days, and thereafter, the slow phase of self assembly into fibrils, as evident with the increase in ThT fluorescence. The whole process to fully formed fibrils is complete after about six days. The aggregation kinetics study of $A\beta_{1-40}$ ($50 \mu\text{M}$) was performed in stagnant solution under optimal conditions (50 mM HPO_4^{2-} and 100 mM NaCl , $\text{pH } 7.4$ at 37°C). It is for this slow process of $A\beta_{1-40}$ fibril formation that we became interested in our $A\beta$ fibril building block as a tool for HTS.

Screening studies

The validity of the present system was subjected to analysis with a broad range of reported inhibitors and non-inhibitors of native $A\beta$ fibril formation. The library of inhibitors contained 19 compounds belonging to more than 10 different chemical classes (Table 1). Also, in the design of the inhibitor library we chose inhibitors that would create an array of previously reported inhibitory effects against $A\beta_{1-40}$ fibril formation. The compounds tested are not only well known to inhibit $A\beta$ aggregation, but are also commercially available and range from natural products to synthetic dyes. Only a cholic acid modified $A\beta$ fragment was prepared as previously reported.^[29] Table 1 shows that a common feature for most of the reported amyloid inhibitors is the presence of aromatic groups, which are expected to interact with the aromatic residues commonly found in amyloid-forming peptides.^[30]

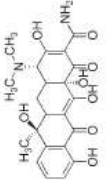
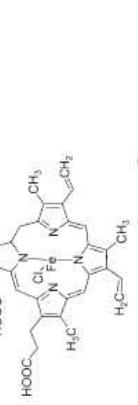
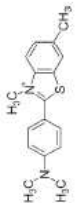
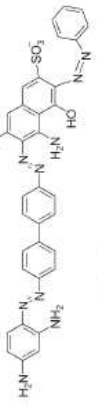
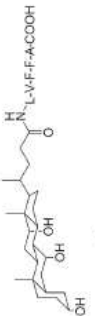
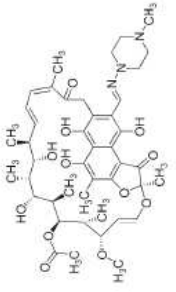
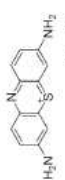

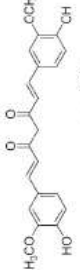
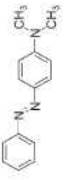
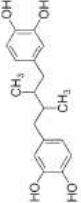

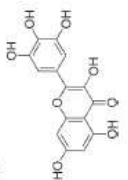

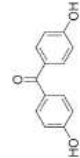

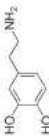
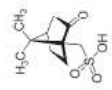

The present system is easy to handle; inhibition studies of fibril formation are performed on microplates for multiple and automatic data collection. First a stock solution containing both the fibril-forming building block $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ and the fluorescent reporter ThT was added to the required wells. Potential inhibitors were then added, and the formation of fibrils was started by the addition of phosphate buffer (HPO_4^{2-}). The final concentrations used were $4 \mu\text{M}$ $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$, $10 \mu\text{M}$ ThT, and 5 mM HPO_4^{2-} . The concentrations of studied inhibitors were 0, 0.01, 0.1, 1, 10, and $100 \mu\text{M}$. No aggregation or fibril formation was observed without the addition of HPO_4^{2-} (Figure 2b). The kinetics were performed at room temperature and monitored by the fluorescence of fibril-bound ThT ($\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 480 \text{ nm}$) as a function of time at 1-min intervals. All inhibitor compounds were analyzed in the absence of $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ and ThT by UV to exclude the possibility that they act as potential inner filters of ThT at the excitation or emission wavelengths, thus acting as false positives. From this analysis we found that only the compounds curcumin, methyl yellow, chlorazol black E, and rifampicin have absorbencies near one or both of the excitation/emission wavelengths. For these four compounds we therefore expect that, to some degree, the fluorescence decrease observed at high compound concentration is due to an absorbency filtration effect (see Discussion Section below).

As the compounds display various degrees of inhibitory effects, we grouped them according to their effects towards $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ fibril formation, to give representative results with a compound from each group (Figure 3). The five groups formed are classified as: very strong inhibitors ($\text{IC}_{50} < 1 \mu\text{M}$), strong inhibitors ($\text{IC}_{50} = 1\text{--}10 \mu\text{M}$), medium inhibitors ($\text{IC}_{50} = 10\text{--}100 \mu\text{M}$), weak inhibitors ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$), and non-inhibitors ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$). Almost all inhibitors tested, as previously reported for $A\beta_{1-40}$, inhibit the aggregation of $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ in a dose-dependent fashion; only one, α -lipoic acid, did not

CHEMMEDCHEM

P. Dumy, J. Garcia, et al.

Table 1. Thioflavin T and compounds used for inhibition studies of (Aβ₄₂)_n, (Aβ₄₀)_n, fibril formation.

Compd class	Compd	Structure	Compd class	Compd	Structure
anthracycline	tetracycline		porphyrin	hemin chloride	
benzothiazoles	thioflavin T		sulfonated dye	chlorazol black E	
modified Aβ fragment	choyl-LVFFA		rifamycin	rifampicin	
phenothiazine	thionin		other	2-amino-4-chlorophenol	
polyphenoles	curcumin			methyl yellow	
	NDGA			α-lipoic acid	
	myricetin			nicotine	
	4,4'-dihydroxybenzophenone			pyridine	
	dopamine		camphor	camphorsulfonic acid	
			cyclodextrin	β-cyclodextrin	

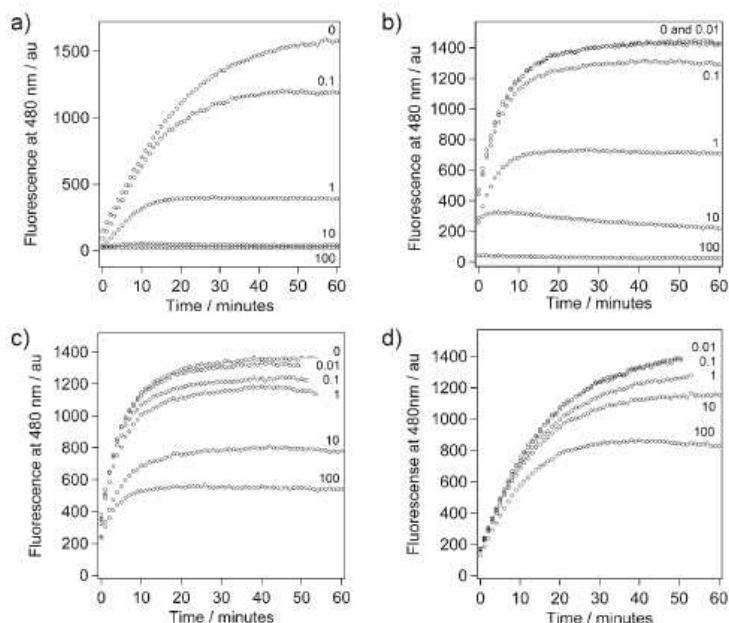


Figure 3. Representative inhibition data for selected inhibitors of $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ fibril formation: a) myricetin, b) NDGA, c) tetracycline, and d) 2-amino-4-chlorophenol. All inhibition studies were monitored by the fluorescence of bound ThT ($10 \mu\text{M}$; $\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 480 \text{ nm}$) to $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ ($4 \mu\text{M}$) in HPO_4^{2-} (5 mM , $\text{pH } 7.1$) at room temperature. Respective inhibitor concentrations (μM) are indicated next to each curve.

display a strong inhibitory effect as previously reported (see below).

Very strong inhibitors

The group of very strong inhibitors is formed by the compounds basic blue 41, the yellow curry pigment curcumin, methyl yellow, the wine-related polyphenol myricetin, and thionin (Table 2). Figure 3a shows representative results for this group, with those of myricetin. Co-incubation of $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ with myricetin markedly decreased the formation of amyloid fibrils as detected by the specific binding of ThT in comparison with the control without inhibitor. Increasing the concentration of these inhibitors progressively reduced the signal from ThT in a dose-dependent fashion. For this group, the presence of $10 \mu\text{M}$ or more of the inhibitor compounds completely blocked the aggregation of $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$, and in the presence of inhibitor at $1 \mu\text{M}$, the signal from ThT was decreased by more than 75%. The concentrations for inhibiting the aggregation of $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ by 50% (IC_{50} values) for these compounds are listed in Table 2. Comparing the IC_{50} values obtained from this group of inhibitors with the system reported herein with those previously reported towards $A\beta_{1-40}$, a high degree of correlation is observed. The IC_{50} values reported for this group are between 0.2 and $0.4 \mu\text{M}$, and previously reported values for $A\beta_{1-40}$ are between 0.3 and $1.5 \mu\text{M}$ (see Table 2 for references).

corresponding values that were previously reported for $A\beta_{1-40}$, which lie between 0.1 and $6 \mu\text{M}$.

Medium inhibitors

The group of medium inhibitors includes tetracycline and choly-LVFFA. Choly-LVFFA is a cholic acid modified amino terminus of an $A\beta$ fragment consisting of residues 17–21. Both of these inhibitors reduced the signal from ThT in a dose-dependent fashion (Figure 3c). In this case, complete inhibition of the aggregation of $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ is not observed in the concentration range studied. The IC_{50} values are $10 \mu\text{M}$ for choly-LVFFA and $35 \mu\text{M}$ for tetracycline. These data are in good agreement with the corresponding values previously reported: $< 5 \mu\text{M}$ for choly-LVFFA and $50 \mu\text{M}$ for tetracycline (see Table 2).

Weak inhibitors

A relatively small decrease in ThT fluorescence was observed in the presence of compounds we classified as weak inhibitors: 2-amino-4-chlorophenol and 4,4'-dihydroxybenzophenone (Figure 3d). For this group, a concentration of about $100 \mu\text{M}$, the highest concentration studied, is required to reduce the ThT signal to 50% of that observed without inhibitor. The IC_{50} value of $100 \mu\text{M}$ for 2-amino-4-chlorophenol is about the same as that previously reported ($\text{IC}_{50} = 30 \mu\text{M}$, Table 2). Published data for $A\beta_{1-40}$ inhibition by 4,4'-dihydroxybenzophenone was

Strong inhibitors

A large decrease in ThT fluorescence was also observed in the presence of compounds that we grouped as strong inhibitors: chlorazol black E, hemin chloride, nordihydroguaiaretic acid (NDGA), and rifampicin. Figure 3b shows representative results for this group with the data from NDGA. Similar to the very strong inhibitors, a progressive increase in the concentration of these inhibitors reduced the signal from ThT in a dose-dependent fashion. For this group, complete reduction of the aggregation of $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ is observed only in the presence of inhibitor at $100 \mu\text{M}$. At $10 \mu\text{M}$, a small amount of fibril formation can be seen, and at $1 \mu\text{M}$, the signal from ThT is decreased to $\sim 50\%$. Table 2 shows the IC_{50} values determined for the group of strong inhibitors. They are between 0.9 and $1.4 \mu\text{M}$ and thus show good correlation with the

CHEMMEDCHEM

P. Dumy, J. Garcia, et al.

not found. However, a study of the closely related 2,2'-dihydroxybenzophenone was reported, with an IC_{50} value of $>40 \mu\text{M}$,^[31] indicating that it is also a weak inhibitor or a non-inhibitor.

Non-inhibitors

The group of non-inhibitors is composed of the lipid-soluble antioxidant α -lipoic acid, β -cyclodextrin, camphorsulfonic acid, the anti-Parkinson's agent dopamine, nicotine, and pyridine (Table 2). Figure 4 shows the results of co-incubation of $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ with these compounds, and here it is clear that they exert only small effects on the specific binding of ThT. Nicotine was previously reported to show anti-fibril-forming effects on $A\beta_{1-40}$ at relatively high concentrations ($IC_{50} = 10 \text{ mM}$).^[42] In the same report it was also shown that pyridine had no inhibitory effect on fibril formation with $A\beta_{1-40}$, and thus our results for pyridine and nicotine correlate well with those previously reported. Camphorsulfonic acid and β -cyclodextrin have a nonaromatic structure that is atypical for fibril inhibitors and were tested here as non-inhibitor controls. Both of these compounds gave the expected results, showing no inhibition at $100 \mu\text{M}$ (Figure 4a).

We did not detect inhibitory effects using the current system with the inhibitors recently reported by Yamada and co-workers: α -lipoic acid^[39] and dopamine^[40] (Figure 4b,c). They reported IC_{50} values for inhibition of $A\beta_{1-40}$ fibril formation of $3.2 \mu\text{M}$ for α -lipoic acid and $0.01 \mu\text{M}$ for dopamine. Their results for dopamine show a very strong inhibitory effect, making it one of the strongest reported inhibitors to date. However, the research group of Fink reported a weak inhibitory effect of dopamine, which was required at 10 – $100 \mu\text{M}$ to inhibit the formation of amyloid fibrils from a solution of $A\beta_{1-40}$ ($230 \mu\text{M}$ in 25 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.5, 37°C).^[41] Owing to this controversy with dopamine we set out to reproduce the previously reported results on the inhibition of $A\beta_{1-40}$ fibril formation with both α -lipoic acid and dopamine. The inhibition study of $A\beta_{1-40}$ ($50 \mu\text{M}$) was performed in stagnant solution using the same conditions as reported by Yamada's research group: HPO_4^{2-} (50 mM , pH 7.4) and NaCl (100 mM) at 37°C .^[39,40] We co-incubated $A\beta_{1-40}$ with the inhibitors at 0, 1, 10, and $100 \mu\text{M}$, and aliquots were studied for changes in ThT fluorescence. As apparent in Figure 5, and as is also the case for the $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ system, we did not observe the expected inhibition as previously reported. In our studies we observe fibril formation at all α -lipoic acid concentrations tested

($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$), and for dopamine we observed inhibition only at $100 \mu\text{M}$ (IC_{50} : 10 – $100 \mu\text{M}$), similar to that reported by Fink and co-workers.^[41] In our hands both α -lipoic acid and dopamine can be classified as weak or non-inhibitors of $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ and $A\beta_{1-40}$ fibril formation.

To assess the quality (precision) and suitability of the fibril inhibitor assay for HTS, the Z' factor was determined for the system with and without inhibitor in 96-well plates (Figure 6). Assays with a Z' factor value between 0.5 and the maximum value of 1 are suitable for HTS. Using the inhibitor curcumin at $100 \mu\text{M}$ and our fibril model at $5 \mu\text{M}$, the Z' factor was calculated as previously described.^[44] The Z' factor for the assay reported herein is 0.84 ± 0.03 , confirming that it is suitable for HTS. We also studied how much DMSO the assay tolerates. At 10% DMSO the fluorescence intensity decreases about 50%. However, this still results in a large dynamic range between positive and negative compounds, enabling the discrimination of hits. The signal stability is

Table 2. Inhibition of $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ and $A\beta_{1-40}$ fibril formation.

Classification ^[a]	Compd	$(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ IC_{50} [μM]	$A\beta_{1-40}$ IC_{50} [μM]
very strong	basic blue 41	0.36	$1.4^{[31]}$
	curcumin	0.35	$0.19^{[32]}$ $0.8^{[33]}$
	methyl yellow	0.34	$1.5^{[31]}$
	myricetin	0.25	$0.29^{[34]}$ $0.9^{[31]}$
	thionin	0.32	$0.3^{[31]}$
strong	chlorazol black E	0.9	$0.3^{[31]}$
	hemim chloride	1.8	$0.1^{[31]}$ $0.4^{[35]}$
	NDGA	1.2	$0.16^{[32]}$
	rifampicin	1.4	$4.9^{[31]}$ $6^{[36]}$
medium	choly-LVFFA	10	$< 5^{[29]}$
	tetracycline	35	$50^{[36,37]}$
weak	2-amino-4-chlorophenol	100	$30^{[31,38]}$
	4,4'-dihydroxybenzophenone	100	ND
non-inhibitors	α -lipoic acid	> 100	$3.2^{[39]}$ $> 100^{[40]}$
	β -cyclodextrin	> 100	ND
	camphorsulfonic acid	> 100	ND
	dopamine	> 100	$0.01^{[40]}$ 10 – $100^{[41,41]}$ 10 – $100^{[41]}$
	nicotine	> 100	$10000^{[42]}$ $> 50^{[37,43]}$
	pyridine	> 100	$> 100000^{[42]}$

[a] Compounds are classified according to their inhibitory effect on the system $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$. [b] Determined in a study of $A\beta_{1-42}$ ($220 \mu\text{M}$). [c] $[A\beta_{1-42}] = 7 \mu\text{M}$. [d] Determined in this study. [e] $[A\beta_{1-40}] = 230 \mu\text{M}$. [f] Determined in a CD study of $A\beta_{1-42}$ ($50 \mu\text{M}$). ND = not determined.

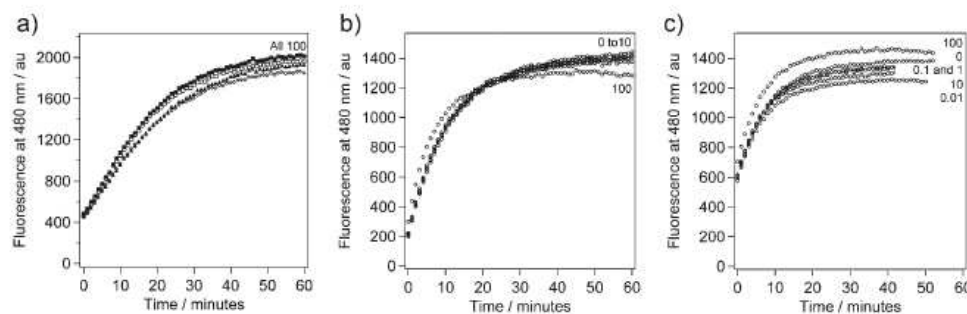


Figure 4. Kinetics data from non-inhibitors of $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})$ fibril formation: a) pyridine (■), nicotine (○), β -cyclodextrin (▲), and camphorsulfonic acid (◇); b) α -lipoic acid; c) dopamine. Studies were performed as described in Figure 3, and respective inhibitor concentrations (μM) are indicated next to each curve.

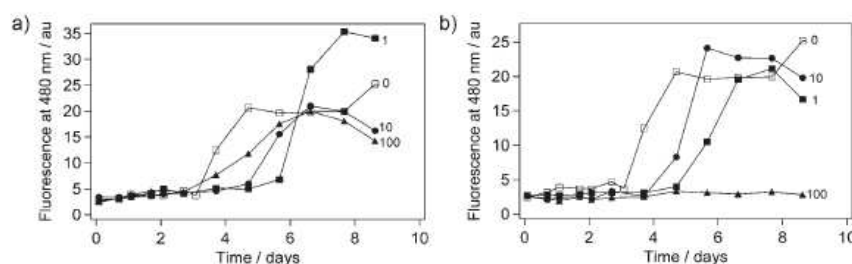


Figure 5. Control inhibition studies of $A\beta_{1-40}$ ($50 \mu\text{M}$) with a) α -lipoic acid and b) dopamine. Aggregation of $A\beta_{1-40}$ was performed in stagnant solution with HPO_4^{2-} (50 mM , pH 7.4) and NaCl (100 mM) at 37°C ; respective inhibitor concentrations (μM) are indicated next to each curve. Data were obtained from $4\text{-}\mu\text{L}$ aliquots that were removed from the aggregation mixture and analyzed separately with a solution of ThT ($96 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{M}$) and HPO_4^{2-} (50 mM , pH 7.1).

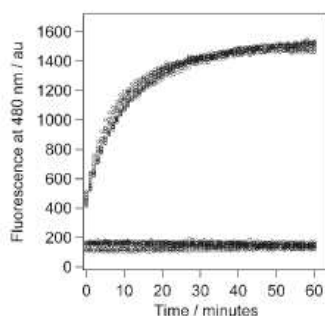


Figure 6. Determination of the Z' factor value for the fibril inhibitor screening tool. In each of three individual 96-well plates, 12 controls with no inhibitor and 12 controls with curcumin ($100 \mu\text{M}$) were used for estimating the Z' value. The assays were performed as described in Figure 3. Here we show the results from one of the plates: the data at top represent the controls with no inhibitor and the data at bottom represent the controls with curcumin; the mean fluorescence values are 1496 ± 67 and 148 ± 14 au, respectively. See the Supporting Information for details from all three plates.

also good: after 24 hours there was no notable change in signal intensity of uninhibited or inhibited samples.

Discussion

The aggregation and formation of fibrils from $A\beta$ is widely accepted to be a key factor in the development of Alzheimer's disease (AD). However, neither the cytotoxic mechanisms nor which aggregation state of $A\beta$ exerts toxicity are well understood. The toxicity may come from unstructured assemblies during the nucleation phase, fibrils, amyloid, or combinations of these. Consequently, an important therapeutic approach in the prevention and control of AD are compounds that inhibit $A\beta$ aggregation.

Herein we present a tool based on $A\beta$ for high-throughput screening of amyloid inhibitor compounds. We show that the engineered fibril building block, $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_n$ is highly sensitive to a broad range of reported inhibitor molecules of $A\beta$ fibril formation. This screening tool shows a number of advantages over native $A\beta_{1-40}$ for in vitro studies. These include fast controllable kinetics, no uncontrolled aggregation of stock peptide (as is the case for $A\beta_{1-40}$), highly reproducible data, and good signal stability, with a Z' factor of 0.84 ± 0.03 , confirming its suitability for HTS.^[64] Our system is easy to handle: to a solution of $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_n$ and ThT reporter we just add potential inhibitor molecules and then start the formation of fibrils by adding HPO_4^{2-} . Using 96-well microplates, a total volume of $70 \mu\text{L}$ was used in each study, and the concentration of the $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_n$ assembly was only $4 \mu\text{M}$; concentrations of $A\beta_{1-40}$ between 50 and $230 \mu\text{M}$ are commonly required

CHEMMEDCHEM

P. Dumy, J. Garcia, et al.

for in vitro screening studies.^[32,39-42] The kinetics were monitored by following the change in fluorescence of ThT-fibril interactions in real time, data were collected at 1-min intervals, and all kinetics were complete within one hour, as compared with $A\beta_{1-40}$, which can take days under the same conditions. An additional advantage of the $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ assembly is the improvement in the ThT fluorescence signal-to-noise ratio, which is easily observed by comparing Figure 2a with Figure 2c. In Figure 2a we observe 4 μM $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ with a fluorescence maximum (F_{max}) of 650 arbitrary units (au), and in Figure 2c we observe 2 μM $A\beta_{1-40}$ with $F_{\text{max}} = 20$ au, yet ThT was present at 10 μM in both cases, and identical instrumentation was used. We expect this difference to be due to the high solubility of $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$, but could also result from differences in the number of binding sites or in the quantum yield of fluorescence.

The aim of these studies was to prove our system as a rapid screening tool of $A\beta$ inhibitors. We studied 19 different compounds composed of well-known inhibitors of $A\beta$ aggregation as well as non-inhibitors. All the compounds tested showed a high degree of correlation with in vitro inhibition studies of $A\beta_{1-40}$, and inhibited the aggregation of $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ in a dose-dependent fashion. From the group of compounds we classified as very strong inhibitors, myricetin was the strongest, with an IC_{50} value of 0.25 μM . This is followed by thionin, methyl yellow, curcumin, and basic blue 41, all with IC_{50} values below 0.4 μM . The natural products myricetin, a wine-related polyphenol, and the yellow curry pigment curcumin are also potent antioxidants, making them highly interesting as drug candidates as well as lead molecules for the development of drugs against AD.

Compounds we classified as strong inhibitors are, with the strongest compound first, chlorazol black E ($IC_{50} = 0.9 \mu\text{M}$), NDGA ($IC_{50} = 1.2 \mu\text{M}$), rifampicin ($IC_{50} = 1.4 \mu\text{M}$), and hemin chloride ($IC_{50} = 1.8 \mu\text{M}$). The IC_{50} values obtained with $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ are all in good agreement with the respective in vitro values obtained with studies on $A\beta_{1-40}$. This group of important inhibitors includes the natural product NDGA, which is isolated from the creosote bush, *Larrea tridentata*,^[45] and is a potent oxygen radical scavenger.^[46] Also in this group, rifampicin is a semisynthetic antibiotic and its mechanism of inhibition of $A\beta$ toxicity is suggested to involve the scavenging of hydroxyl radicals^[30] and/or binding to $A\beta$ through hydrophobic interactions, thus inhibiting its aggregation.^[47]

The groups of medium and weak inhibitors include the modified $A\beta$ fragment choly-LVFFA, the inhibitor tetracycline, 2-amino-4-chlorophenol, and 4,4'-dihydroxybenzophenone. For our system these inhibitors show IC_{50} values that lie between 10 and 100 μM , similar to the values obtained from $A\beta_{1-40}$. Choly-LVFFA is a so-called β -sheet breaker peptide and is different from the other compounds tested, as it uses the important recognition sequence, LVFFA, of $A\beta$ to bind to the growing fibrils, and the bulky choly group disrupts and dissociates them.^[29]

The validity of our system was also tested by using compounds reported to have small effects on $A\beta$ fibril formation. We first tested dopamine, nicotine, and pyridine, which have

been reported to have IC_{50} values of about 100 μM , 10 mM, and >100 mM, respectively, for native $A\beta$. The corresponding IC_{50} values obtained from $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ were all in good correlation with those previously reported, giving IC_{50} values >100 μM . Our results with dopamine are thus in good agreement to those reported by the research group of Fink^[41] and our current control study with $A\beta_{1-40}$. In contrast to these results, Yamada and co-workers^[40] recently reported an IC_{50} value of 0.01 μM for dopamine under similar experimental conditions as those presented herein. The only experimental difference is the pretreatment and storage of $A\beta_{1-40}$: Whereas the Yamada's research group dissolved the peptide in 0.02% ammonia solution and stored it at -80°C , we pretreated $A\beta_{1-40}$ with hexafluoroisopropanol (HFIP), resolubilized the lyophilized product in distilled water, removed eventual aggregates by centrifugation, and stored it at -20°C . Notably, Fink and co-workers studied a higher concentration of $A\beta_{1-40}$ (230 μM) in Tris (25 mM) and NaCl (100 mM) at pH 7.4, as compared with our studies and those of the Yamada research group, with $A\beta_{1-40}$ (50 μM) in HPO_4^{2-} (50 mM) and NaCl (100 mM) at pH 7.4. Therefore, an explanation for this discrepancy should not be due to different experimental conditions, as we used the same as those reported by Yamada and co-workers. Instead, it may be, as indicated by Fink, that an oxidative product or products of dopamine, formed at pH >5, were found to be more active for inhibition of fibril formation of α -synuclein.^[41] It should be noted that the degradation of compounds in our HTS assay is kept to a minimum owing to the fast kinetics that are performed at room temperature.

Thereafter we tested the nonaromatic compounds β -cyclodextrin and camphorsulfonic acid; aromatic structure is commonly found in $A\beta$ aggregation inhibitors. Both of these compounds showed IC_{50} values >100 μM as was expected. Interestingly, the compound β -cyclodextrin has previously been shown to diminish the neurotoxic effects of an $A\beta_{1-40}$ cell line, but any destabilization effect on $A\beta_{1-40}$ fibril formation has not been demonstrated.^[48]

The only compound that did not show a corresponding inhibitory profile against $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ as reported against $A\beta_{1-40}$ fibril formation is the nonaromatic lipid-soluble antioxidant α -lipoic acid, for which Yamada and co-workers recently published an IC_{50} value of 3.2 μM .^[39] In our studies we found that α -lipoic acid is a non-inhibitor against $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$. Under identical experimental conditions as those reported by the Yamada group, we studied the inhibition of $A\beta_{1-40}$ fibril formation with α -lipoic acid, and we did not observe inhibition as previously reported. In our studies of $A\beta_{1-40}$ fibril inhibition we observed fibril formation at all concentrations of α -lipoic acid studied, thus giving an IC_{50} value >100 μM , as is the case for the $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ system. An explanation for this discrepancy may be, as suggested above for dopamine, that degradation products of α -lipoic acid could be more active for inhibition of fibril formation. Therefore, the inhibition studies presented herein demonstrate that fibril formation with the engineered building block $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ behaves identically to $A\beta_{1-40}$ fibril formation.

Is our system relevant for the study of A β fibril inhibitors?

The formation of fibrils with (A β_{16-37} Y $_{20}$ K $_{22}$ K $_{24}$) $_4$ occurs only through hydrophobic (side-chain) and backbone hydrogen bonding (cross- β -sheet) interactions. Both of these interactions direct the growth and create highly stable fibrils. The A β sequence in our engineered fibril building block was reduced to residues 16–37 of the full-length A β peptide, and thus contains only the highly ordered β -strand segments of A β (Figure 1).¹⁹ An important attribute of the residue 16–37 sequence is that it retains the intra-peptide antiparallel β -sheet as well as the parallel inter-peptide β -sheet interactions, which shorter peptides lack. As the (A β_{16-37} Y $_{20}$ K $_{22}$ K $_{24}$) $_4$ construct contains only the β -sheet-forming segment of A β , the ability to stop fibril formation or to destabilize this region could only be performed with potential A β inhibitor drugs.

The segment A β_{1-15} was previously determined to be an unstructured region in the folded A β fibril and is thus not important for its stability,¹⁹ which is also the reason we deleted it from our fibril building block. On the other hand, the segment A β_{1-15} may have implications for the initial formation of fibrils, and drugs that target this segment would therefore have potential in the prevention of AD. However, such a strategy of targeting molecules to this segment seems highly impractical, as it implies that at an early stage, patients would likely be continuously exposed to relatively high concentrations of the drug. In principle, such a drug would increase the lag phase of fibril formation. Furthermore, if fibrils are present or formed, drugs that target this unstructured region of A β would have little effect on the continued growth of the fibrils.

The segment containing residues 25–35 of A β has been widely studied owing to its similar biological behavior to native A β . The fragment A β_{25-35} is able to form fibrils and shows neurotoxicity in many studies.^{49,50} Also, an IC $_{50}$ value of 10 μ M was determined from inhibition studies of fibril formation with curcumin; this inhibition is about 10-fold weaker than found for A β_{1-40} .⁵¹ As the segment A β_{25-35} is conserved in our model fibril building block together with the structural features described above, we believe our system contains all the important residues of A β fibril stability and thus serves as a good model for inhibitor screening.

There are a number of mechanisms that may cause decreased fluorescence of the reporter molecule ThT in inhibition studies of amyloid fibrils without affecting fibril structure, which are rarely discussed. One mechanism is quenching of ThT fluorescence. To avoid quenching, many researchers perform fluorescence measurements on highly diluted samples of the fibril-forming mixture. This is misleading, as quenching by energy transfer is distance dependant; usually a distance less than 6 nm (Förster radius) is required for notable quenching interactions between two compounds. Other quenching interactions require even shorter distances between probe and quencher. Indeed, unbound ThT is not observed in the fluorescence study, and thus dilution of the reaction mixture will not affect the quenching of fibril-bound inhibitor to fibril-bound ThT. In other words, only compounds that bind to fibrils can quench fibril-bound ThT, which is the probe studied.

Another mechanism of decreased fluorescence may be competitive binding to the fibrils between ThT and the compounds studied. In any case, if it is quenching, competitive binding, or fibril inhibition that decreases ThT fluorescence, all these mechanisms indicate binding of the compound to the fibril and are thus potential leads for the development of drugs against AD-associated fibril formation, as well as diagnostic compounds. For these reasons, the HTS system presented herein, as for other fluorescence-based systems, is intended primarily for inhibitor screening. Hits will therefore require further complementary *in vitro* and *in vivo* analysis. A method to discriminate between true and false hits is to perform microscopy on the hit samples, such as AFM or TEM.

The fluorescence of the reporter ThT can be decreased, without interaction of another compound with the fibril, through filter effects at the excitation or emission wavelengths. This could occur when the compounds have strong absorbencies at these wavelengths. To examine if this was possible with the compounds in our library, we analyzed their UV/Vis spectra. From this analysis we found that only curcumin, methyl yellow, chlorazol black E, and rifampicin have absorbencies near one or both of the excitation/emission wavelengths. For these four compounds we expect that, to some degree, the fluorescence decrease observed at high compound concentration is due to an absorbency filtration effect. However, the possibility that the decrease in fluorescence is entirely due to this effect can be excluded, as a strong decrease in fluorescence is still observed at very low compound concentrations, such as 1 μ M, at which any filtration effect is negligible.

Speculating on the throughput potential of this system, we expect that in the environment of HTS, thousands of compounds could be screened per day. As the end fluorescence values are the most relevant data, only one measurement per plate is required. In other words, the plate would be screened one hour after its preparation. As a measurement takes less than one minute for a 96-well plate, many plates could be measured in a single day.

Conclusions

The simplicity of this assay system and its rapid folding kinetics makes it highly interesting to screen large numbers of compounds to generate novel hits for A β fibril formation inhibitors; this is currently underway in our laboratory. The simplicity lies in the fact that our HTS tool produces data that are easily interpreted, as the assay has a high Z' factor of 0.84 ± 0.03 . Difficulties encountered in screening for inhibitors of native A β are: poor signal-to-noise ratio, slow folding kinetics, and the fact that the kinetics of the same sample studied in different wells often show different lag phases and end fluorescence values. Together, these problems have been hurdles for HTS researchers. For comparison, we studied our system with a broad range of reported inhibitors and non-inhibitors, and found good correlation to previously reported results with *in vitro* inhibition studies on native A β . For these reasons, we expect that this screening tool will be highly advantageous for the rapid search of A β fibril inhibitors.

CHEMMEDCHEM

P. Dumy, J. Garcia, et al.

Experimental Section

Materials

Synthetic $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ was prepared as previously described.^[28] Cholyl-LVFFA was prepared as previously described.^[29] All inhibitor compounds were purchased from Sigma except myricetin, which was obtained from Fluka. All other reagents were of the highest analytical grade available.

Preparation of $A\beta_{1-40}$

$A\beta_{1-40}$ was synthesized on an Applied Biosystems 433A peptide synthesizer using an Fmoc-Val-Novasyn-TGA resin (Novabiochem) with a substitution level of 0.24 mmol. Amino acids were coupled at a 10-fold excess under HBTU/DIPEA activation (HBTU = *O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate, DIPEA = *N,N*-diisopropylethylamine). Coupling times of 60 min were used, and difficult residues were double coupled. Deprotection and cleavage from the resin was carried out with a mixture of TFA/TIS/H₂O/EDT (94:2:2:2 v/v), 15 mL(g resin)⁻¹, with occasional swirling for 2 h (TFA = trifluoroacetic acid, TIS = triisopropylsilane, EDT = 1,2-ethanedithiol). After filtration and reduction of the TFA by N₂ bubbling, the peptide was precipitated and washed three times with cold Et₂O. Purification was performed by reversed-phase HPLC on a semi-preparative C5 Discovery Wide Pore (Supelco) with a gradient of 9–90% CH₃CN over 30 min, with 0.1% TFA and a flow rate of 6 mL min⁻¹. The retention time of $A\beta_{1-40}$ was 14 min. The purity was >95% by analytical RP HPLC. The identity was verified by ESMS: the calculated weight for $A\beta_{1-40}$ is 4328 Da; found 4328.8 Da [*M*+H]⁺. $A\beta_{1-40}$ was lyophilized and stored at -20 °C.

Preparation of $A\beta_{1-40}$ peptide stock solution

For aggregation assays, a stock solution of $A\beta_{1-40}$ was prepared as follows: 2.7 mg was dissolved in 200 μ L of 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) to disassemble preformed aggregates, and thereafter it was lyophilized. Pure H₂O was then added, and the solution was centrifuged at 12000 *g* to remove eventual aggregates. The stock solution was divided into portions and stored at -20 °C until use. The stock concentration of $A\beta_{1-40}$ was regarded as 500 μ M.

Preparation of $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ peptide stock solutions

For aggregation assays, a stock solution of $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ was prepared as follows: 0.24 mg was dissolved in 150 μ L HFIP/H₂O (1:1) and lyophilized. Thereafter the peptide was dissolved in pure H₂O (1.2 mL). Stock peptide concentrations were determined spectrophotometrically using an extinction coefficient of 9160 cm⁻¹ M⁻¹ at λ = 280 nm.^[28] The stock concentration of $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ was 20 μ M, and storage was at -20 °C until use.

Preparation of inhibitor stock solutions

Inhibitors were dissolved in EtOH if possible; hemin chloride was dissolved in MeOH, otherwise DMSO was used. Stock solutions of 10 mM were first prepared, and thereafter they were diluted into EtOH/H₂O (1:1) or DMSO/H₂O (1:1) with the following concentrations: 5000, 500, 50, 5, and 0.5 μ M. Final concentrations of EtOH or DMSO in inhibition studies were 1%. Dopamine and α -lipoic acid were dissolved with DMSO for the inhibition studies with $A\beta_{1-40}$.

Measurement of $A\beta_{1-40}$ aggregation

Aggregation of $A\beta_{1-40}$ was performed in 96-well black polypropylene microplates (Greiner). To each well an aliquot of the peptide stock solution was mixed into the aggregation buffer to give a final composition of $A\beta_{1-40}$ (50 μ M), sodium phosphate (50 mM), and NaCl (100 mM) pH 7.4. Thereafter 2- μ L aliquots of the inhibitors were added. Microplates were sealed with a plastic sheet and incubated in a Molecular Devices Spectra MAX Gemini XS microplate reader at 37 °C. Data were obtained from 4- μ L aliquots that were removed from the aggregation mixture and analyzed separately with 96 μ L of a solution of ThT (10 μ M) and HPO₄²⁻ (50 mM) pH 7.1. Kinetics of aggregation were monitored in an PerkinElmer Luminescence Spectrometer LS50 by following the increase in ThT fluorescence using a 0.3-cm reduced quartz cuvette with excitation at 440 nm and collecting data from 460 to 600 nm. Slits for excitation and emission were 2.5 and 10 nm, respectively. Kinetic data of $A\beta_{1-40}$ were fitted with the stretched exponential function:

$$F_t = F_{\infty} - \Delta F e^{-kt^n}$$

for which F_t is the fluorescence at time t , F_{∞} is the fluorescence after complete fibril formation, ΔF is the difference in fluorescence between t_0 and t_{∞} , k is the rate constant, and values greater than 1 for the parameter n indicate a sigmoidal transition with an initial lag phase.^[32]

Measurement of $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ aggregation

ThT was added to the stock solution of $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$. Aliquots (48.6 μ L) of the $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ /ThT mixture were put into the required wells of 96-well black polypropylene microplates. Inhibitors were then added (1.4 μ L), and the solution in each well was mixed with the addition of 20 μ L stock phosphate buffer solution (17.5 mM) to give a total volume of 70 μ L. The final concentrations obtained were 4 μ M $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$, 10 μ M ThT, and 5 mM HPO₄²⁻. The concentrations of studied inhibitors were 0, 0.01, 0.1, 1, 10, and 100 μ M. Microplates were analyzed in a Molecular Devices Spectra MAX Gemini XS microplate spectrophotometer at ambient temperatures. Measurements of ThT binding were started immediately by recording the fluorescence at 1-min intervals using band-pass filters of 440 nm for excitation, 480 nm for emission, and a cut-off filter of 455 nm. In this procedure ThT fluorescence is measured throughout the assembly process in real time. The IC₅₀ values were calculated from the fluorescence values obtained at the end of the kinetics studies, that is, the value at 60 min. These values were then plotted against the log of the inhibitor concentration. Fitting the data with a sigmoidal function in IgorPro software (WaveMetrics), the IC₅₀ was obtained at the fluorescence half-way point.

Evaluation of the HTS tool

The $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$ -based assay was evaluated for its *Z* factor according to Zhang et al.^[34] under the same conditions used for the aggregation measurement of $(A\beta_{16-37}Y_{20}K_{22}K_{24})_4$. This involved three distinct 96-well plates, each containing 12 positive wells in the presence of the inhibitor curcumin (100 μ M) and 12 control wells in the absence of inhibitors. DMSO was used in this study at a concentration of 1%.

Acknowledgements

This work was supported by grants from AFM-INSERM GIS "maladies rares amyloses héréditaires" (no. AE02013 KSA), IUF, and ACI.

Keywords: Alzheimer's disease · amyloid β peptides · high-throughput screening · inhibitors · protein folding

- [1] P. T. Lansbury, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 3342–3344.
 [2] R. M. Murphy, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2002**, *4*, 155–174.
 [3] C. M. Dobson, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2004**, *15*, 3–16.
 [4] G. G. Glenner, C. W. Wong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *120*, 885–890.
 [5] C. Haass, D. J. Selkoe, *Cell* **1993**, *75*, 1039–1042.
 [6] J. T. Jarrett, E. P. Berger, P. T. Lansbury, Jr., *Biochemistry* **1993**, *32*, 4693–4697.
 [7] J. T. Jarrett, J. Lansbury, T. Peter, *Cell* **1993**, *73*, 1055–1058.
 [8] M. P. Mattson, *Nature* **2004**, *430*, 631–639.
 [9] M. P. Mattson, B. Cheng, D. Davis, K. Bryant, I. Lieberburg, R. E. Rydel, *J. Neurosci.* **1992**, *12*, 376–389.
 [10] N. Arispe, E. Rojas, H. B. Pollard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 567–571.
 [11] Z. Galdzicki, R. Fukuyama, K. C. Wadhvani, S. I. Rapoport, G. Ehrenstein, *Brain Res.* **1994**, *646*, 332–336.
 [12] A. Demuro, E. Mina, R. Kaye, S. C. Milton, I. Parker, C. G. Glabe, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 17294–17300.
 [13] W. E. Müller, S. Koch, A. Eckert, H. Hartmann, K. Scheuer, *Brain Res.* **1995**, *674*, 133–136.
 [14] R. P. Mason, J. D. Estemeyer, J. F. Kelly, P. E. Mason, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *222*, 78–82.
 [15] A. Ferreira, Q. Lu, L. Orecchio, K. S. Kosik, *Mol. Cell. Neurosci.* **1997**, *9*, 220–234.
 [16] X. Huang, C. S. Atwood, M. A. Hartshorn, G. Multhaup, L. E. Goldstein, R. C. Scarpa, M. P. Cuajungco, D. N. Gray, J. Lim, R. D. Moir, R. E. Tanzi, A. I. Bush, *Biochemistry* **1999**, *38*, 7609–7616.
 [17] M. A. Smith, C. A. Rottkamp, A. Nunomura, A. K. Raina, G. Perry, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1502*, 139–144.
 [18] J. P. Blass, *J. Neurosci. Res.* **2001**, *66*, 851–856.
 [19] R. Tycko, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 96–103.
 [20] I. Dewachter, F. Van Leuven, *Lancet Neurol.* **2002**, *1*, 409–416.
 [21] D. Schenk, R. Barbour, W. Dunn, G. Gordon, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, Z. Liao, I. Lieberburg, R. Motter, L. Mutter, F. Soriano, G. Shopp, N. Vasquez, C. Vandeventer, S. Walker, M. Wogulis, T. Yednock, D. Games, P. Seubert, *Nature* **1999**, *400*, 173–177.
 [22] M. A. Findeis, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1502*, 76–84.
 [23] F. E. Cohen, J. W. Kelly, *Nature* **2003**, *426*, 905–909.
 [24] A. Lorenzo, B. A. Yankner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 12243–12247.
 [25] H. LeVine III, *Methods Enzymol.* **1999**, *309*, 274–284.
 [26] H. LeVine III, *Protein Sci.* **1993**, *2*, 404–410.
 [27] R. J. Chalifour, R. W. McLaughlin, L. Lavoie, C. Morissette, N. Tremblay, M. Boule, P. Sarazin, D. Stea, D. Lacombe, P. Tremblay, F. Gervais, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 34874–34881.
 [28] G. T. Dolphin, P. Dumy, J. Garcia, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2765–2768; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2699–2702.
 [29] M. A. Findeis, G. M. Musso, C. C. Arico-Muendel, H. W. Benjamin, A. M. Hundal, J.-J. Lee, J. Chin, M. Kelley, J. Wakefield, N. J. Hayward, S. M. Molineaux, *Biochemistry* **1999**, *38*, 6791–6800.
 [30] Y. Porat, A. Abramowitz, E. Gazit, *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, *67*, 27–37.
 [31] S. Taniguchi, N. Suzuki, M. Masuda, S.-i. Hisanaga, T. Iwatsubo, M. Goedert, M. Hasegawa, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 7614–7623.
 [32] K. Ono, K. Hasegawa, H. Naiki, M. Yamada, *J. Neurosci. Res.* **2004**, *75*, 742–750.
 [33] F. Yang, G. P. Lim, A. N. Begum, O. J. Ubeda, M. R. Simmons, S. S. Ambegaokar, P. P. Chen, R. Kaye, C. G. Glabe, S. A. Frautschy, G. M. Cole, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 5892–5901.
 [34] K. Ono, Y. Yoshiike, A. Takashima, K. Hasegawa, H. Naiki, M. Yamada, *J. Neurochem.* **2003**, *87*, 172–181.
 [35] D. Howlett, P. Cutler, S. Heales, P. Camilleri, *FEBS Lett.* **1997**, *417*, 249–251.
 [36] T. Tomiyama, A. Shoji, K.-i. Kataoka, Y. Suwa, S. Asano, H. Kaneko, N. Endo, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 6839–6844.
 [37] G. Forloni, L. Colombo, L. Girola, F. Tagliavini, M. Salmona, *FEBS Lett.* **2001**, *487*, 404–407.
 [38] F. G. De Felice, M. N. N. Vieira, L. M. Saraiva, J. D. Figueroa-Villar, J. Garcia-Abreu, R. Liu, L. Chang, W. L. Klein, S. T. Ferreira, *FASEB J.* **2004**, *18*, 1366–1372.
 [39] K. Ono, M. Hirohata, M. Yamada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *341*, 1046–1052.
 [40] K. Ono, K. Hasegawa, H. Naiki, M. Yamada, *Neurochem. Int.* **2006**, *48*, 275–285.
 [41] J. Li, M. Zhu, A. B. Manning-Bog, D. A. Di Monte, A. L. Fink, *FASEB J.* **2004**, *18*, 962–964.
 [42] K. Ono, K. Hasegawa, M. Yamada, H. Naiki, *Biol. Psychiatry* **2002**, *52*, 880–886.
 [43] A. R. Salomon, K. J. Marcinowski, R. P. Friedland, M. G. Zagorski, *Biochemistry* **1996**, *35*, 13568–13578.
 [44] J.-H. Zhang, T. D. Y. Chung, K. R. Oldenburg, *J. Biomol. Screening* **1999**, *4*, 67–73.
 [45] J. Luo, T. Chuang, J. Cheung, J. Quan, J. Tsai, C. Sullivan, R. F. Hector, M. J. Reed, K. Meszaros, S. R. King, T. J. Carlson, G. M. Reaven, *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *346*, 77–79.
 [46] Y. Goodman, M. R. Steiner, S. M. Steiner, M. P. Mattson, *Brain Res.* **1994**, *654*, 171–176.
 [47] T. Tomiyama, S. Asano, Y. Suwa, T. Morita, K.-i. Kataoka, H. Mori, N. Endo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *204*, 76–83.
 [48] P. Camilleri, N. J. Haskins, D. R. Howlett, *FEBS Lett.* **1994**, *341*, 256–258.
 [49] J. Xu, S. Chen, S. H. Ahmed, H. Chen, G. Ku, M. P. Goldberg, C. Y. Hsu, *J. Neurosci.* **2001**, *21*, RC118.
 [50] C. J. Pike, D. Burdick, A. J. Walencewicz, C. G. Glabe, C. W. Cotman, *J. Neurosci.* **1993**, *13*, 1676–1687.
 [51] C. Riviere, T. Richard, L. Quentin, S. Krisa, J.-M. Merillon, J.-P. Monti, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 1160–1167.
 [52] S. S. Wang, Y.-T. Chen, P.-H. Chen, K.-N. Liu, *Biochem. Eng. J.* **2006**, *29*, 129–138.

Received: May 3, 2007

Revised: July 2, 2007

Published online on September 17, 2007

Annexe II

Dolphin, G. T.; Chierici, S.; Ouberai, M.; Dumy, P.; and Garcia, J. A multimeric Quinacrine conjugate as a potential inhibitor of Alzheimer's β -amyloid fibril formation. *ChemBioChem* **2008**, 9, 952-963.

DOI: 10.1002/cbic.200700602

A Multimeric Quinacrine Conjugate as a Potential Inhibitor of Alzheimer's β -Amyloid Fibril Formation

Gunnar T. Dolphin, Sabine Chierici, Myriam Ouberaï, Pascal Dumy,* and Julian Garcia^{✉[a]}

Amyloid formation and accumulation of the amyloid β -peptide ($A\beta$) in the brain is associated with Alzheimer's disease (AD) pathogenesis. Therefore, among the therapeutic approaches in development to fight the disease, the direct inhibition of the $A\beta$ self-assembly process is currently widely investigated and is one of the most promising approaches. In this study we investigated the potential of a multimeric display of quinacrine derivatives, as compared to the monomer quinacrine, as a design principal for a novel class of inhibitors against $A\beta$ fibril formation. The presented multimeric conjugate exhibits a cluster of four quinacrine

derivatives on a rigid cyclopeptidic scaffold. Herein is reported the synthesis of the conjugate, together with the *in vitro* inhibitory evaluation of $A\beta_{1-40}$ fibrils using the thioflavin T fluorescence assay, and imaging with atomic force microscopy. Our data show that the multimeric compound inhibits $A\beta_{1-40}$ fibril formation with an IC_{50} value of $20 \pm 10 \mu\text{M}$, which contrasts with the non-active monomeric analogue. This work suggests that assembling multiple copies of acridine moieties to a central scaffold, for multiple interactions, is a promising strategy for the engineering of inhibitors against $A\beta$ fibril formation.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is characterized by the accumulation of insoluble fibrillar aggregates of amyloid β -peptide ($A\beta$) and the degeneration and death of neurons in brain regions that are concerned with learning and memory processes.^[1] Abnormal protein deposition is also a shared characteristic of other age-related neurodegenerative diseases, such as Parkinson's and Huntington's diseases^[2-4] and of the prion diseases.^[5,6]

In AD two peptides have been identified in the fibrillar deposition in the brain, the amyloid β -peptides $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$.^[1] Normally, $A\beta$ exists as a random coil, but through formation of intermediate oligomers misfolds into protofibrils, and further aggregation of the protofibrils forms amyloid.^[7,8] It is widely accepted that the formation of fibrils is implicated in the neurotoxicity associated with AD, but still there is much discussion on which aggregation state of $A\beta$ is toxic and on the toxicity mechanisms.^[9-13]

Several approaches aimed at blocking the neurotoxic activity of $A\beta$ are presently pursued: such as reduction of amyloid production by inhibiting the enzymes beta- and gamma-secretase, which produce $A\beta$,^[14] stimulation of the immune system to remove $A\beta$ from the brain by immunizing with $A\beta$ fragments,^[15] and direct inhibition of the $A\beta$ self-assembly process.^[16,17] Especially the identification of inhibitors of protein deposition or fibril formation should provide drugs with neuroprotective effects for the suppression or prevention of the transition from monomeric to oligomeric and polymeric $A\beta$ species. It may also be a critical step towards a better understanding of the role of fibrils in neurodegenerative processes and disease progression.

The search for potent drugs such as amyloid aggregation inhibitors led to the discovery of compounds inhibiting specifically and efficiently amyloid aggregation *in vitro*. Molecules issued from random screening as well as short amyloid peptide

sequences mimicking and inhibiting amyloid aggregation are the two main classes of inhibitors. In the past few years, non-peptidic amyloid aggregation inhibitors have been identified in the literature and is an important approach in the development of therapeutic agents.^[18-21] This approach was initially based on the finding that the small dye, Congo red, interacts specifically with amyloid fibrils and inhibits their formation.^[22] Molecules such as melatonin, furansulfonic acid derivatives, small polyphenol molecules, and the well-known antibiotic Rifampicin, anthracyclones, benzofuran derivatives have been reported.^[23] Although a structure-activity relationship is not easy to distinguish from all these works, many of the inhibitors are either "flat molecules bearing a lipophilic bi- or tri-(hetero)cyclic scaffold and having a basic nitrogen on one of these rings",^[23] or have a polyphenolic structure.^[24]

Unexpectedly, only a few works have investigated the acridine derivatives as β -amyloid inhibitors although these flat heterocyclic scaffolds should display an ideal drug-like profile. The first acridine cores reported to inhibit or interact with the β -amyloid polymerization process in AD are diaryl heterocyclic compounds and 9-acridone derivatives.^[25,26] More recently, the search for radioactive probes for imaging the amyloid- β peptide *in vivo* and for the detection of AD allowed the identifica-

[a] G. T. Dolphin, S. Chierici, M. Ouberaï, Prof. Dr. P. Dumy, Prof. Dr. J. Garcia
Département de Chimie Moléculaire (DCM)
UMR 5250, ICMG FR-2607, CNRS, Université Joseph Fourier
B. P. 53, 38041 Grenoble Cedex 9 (France)
Fax: (+33) 4765 14946
E-mail: julian.garcia@ujf-grenoble.fr
pascal.dumy@ujf-grenoble.fr

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.chembiochem.org> or from the author.

tion of a fluorinated acridine orange analogue with high affinity for A β aggregates.^[27,28]

On the other hand, acridine compounds including quinacrine have been more extensively studied for the treatment of the prion diseases, and effective inhibitory activities on PrP^{Sc} replication *in vitro* have been reported.^[29–34] Although the sequence of the prion protein and of the A β peptides are quite different, the mechanism of their aggregation may be similar, and compounds that are able to interact with the prion protein could also be active on β -amyloid peptides. In support of this, some well-known A β binding compounds such as tetracycline and thioflavin T are reported to exhibit binding to prion peptides similar to that observed with quinacrine.^[35] Moreover, as both diseases lead to aberrantly folded proteins, rich in β -sheet structure that have a high tendency to form aggregates, the inhibitor binding might be more conformation-dependent rather than sequence-dependent. Such conformation-dependent interaction is reported for polyphenols which do not interact with the amyloidogenic monomer but rather with amyloidogenic structures.^[24,36] From this, it appeared interesting to study the quinacrine core and its ability to interact with A β and to inhibit the amyloid polymerization process by analogy with its antiprion effect. To date, such effects on A β fibril formation has not been investigated.

Further, the search for new A β peptide aggregation inhibitors is hampered as the interactions and mechanism of inhibition is not well understood. Common to most known inhibitors is the presence of two substituted aromatic groups separated by a short spacer, such as curcumin and NDGA.^[24,36] From this common feature, it is believed that these aromatic compounds interact with hydrophobic and aromatic amino acids of the misfolding peptides, such as phenylalanine 19 and 20 in A β that are important for fibril formation. As fibril formation proceeds through hydrophobic interactions to form intermediate oligomers with undefined structure, molecules that can interact with these different states on the fibril-folding pathway may prove to be important drug candidates against AD. When designing compounds as potential inhibitors, we postulated that a multimeric arrangement of aromatic residues would be capable of multiple simultaneous interactions with these different states and thus lead to more potent inhibitors because of multimeric effects.^[37] Further, we expected that the multimeric arrangement of aromatic residues would be more potent if they were directionally constructed as a cluster by the aid of a well-defined and rigid scaffold.

Multivalency is a well known and efficient process used by nature to enhance the affinity of binding in biological phenomena such as recognition.^[37] Recently, May et al. showed that the multivalency strategy may be beneficial to enhance the antiprion activity of acridines using covalent dimers.^[29] Their conclusion that "this strategy may be generally applicable to other diseases of protein conformation, in which species along the pathway to the aggregated endpoint are characterized by high protein concentrations" supports our inhibitory multimeric approach in A β peptide aggregation. It was only recently (during the revision of this manuscript) that a multimeric approach was investigated in the field of A β peptide aggre-

gation inhibitors.^[38] This research showed that branched KLVFF tetramers are more potent inhibitors of β -amyloid aggregation compared to the monomeric KLVFF peptide. Moreover as we had in our research group a convenient and proved cyclopeptidic tool allowing the multimeric presentation of ligands, this encouraged us to investigate its multimeric strategy.

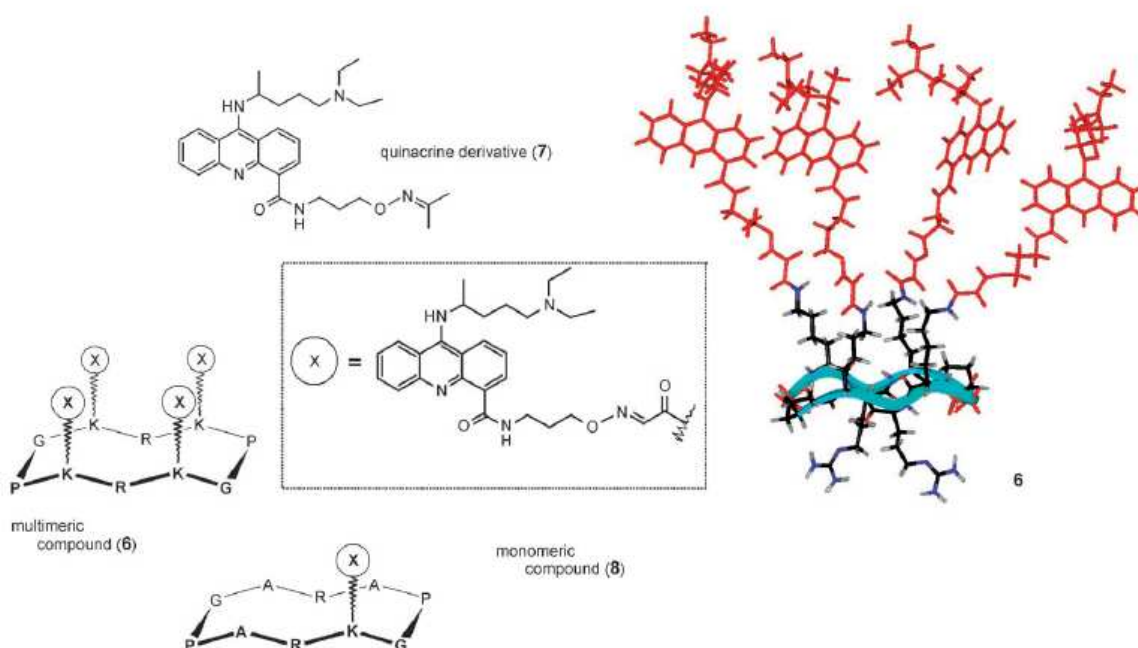
In light of the above, we first focused our investigations on the quinacrine derivative **7** as an inhibitor of the A β polymerization process by analogy with its antiprion effect. Simultaneously, we prepared its multimeric form **6**, exhibiting a cluster of acridines on a cyclopeptidic core for enhanced inhibitory properties by multiple interactions (Scheme 1). These compounds were investigated *in vitro* as potential inhibitors of A β fibril formation. Their design, synthesis, and the inhibitory results, using fluorescence spectroscopy with thioflavin T (ThT) and atomic force microscopy (AFM), are reported in detail in this paper.

Results

Design of the fibril inhibitor candidates

In this first approach, we have chosen the quinacrine derivative, compound **7** (Scheme 1), as a starting point for the design and synthesis of a potential amyloid inhibitor. Thereafter we prepared a multimeric version, compound **6**, which displays four copies of the quinacrine derivative covalently attached to a well-defined and rigid scaffold (Scheme 1). We postulated that a covalent multimeric assembly of the acridines could be a more potent inhibitor because of the well-known local concentration effect.^[37] Indeed, this multimeric arrangement is capable of interacting through multiple molecular contacts with one A β monomer or several monomers aggregated in oligomers or fibrils, thus enhancing the inhibition process. This multivalency approach has been first validated on the prion disease in a recent study where bis-acridines showed increased antiprion activity, around tenfold *in vitro*, compared to the corresponding monomeric compounds.^[29] In our conjugate, the conformational restriction imparted by the scaffold may also be beneficial for the interaction of the acridine cores to A β peptides by minimizing the entropically conformational rearrangement before binding as noted for the bis-acridines on the prion protein. We also prepared as a reference compound the monomeric analogue **8** that bears only one copy of the quinacrine derivative on the scaffold (Scheme 1). This compound was designed to determine whether the multimeric arrangement of compound **6** increases the affinity towards A β .

The scaffold used in this study to present the heterocyclic quinacrine molecules in a multimeric and well-defined spatial orientation is a backbone-cyclized decapeptide. The two polyglycine sequences, as β type-II turn inducers, constrain the peptide backbone conformation into an antiparallel β -sheet.^[39] As a result the cyclic peptide displays an "upper-face" with four residues (here and commonly lysine) and a "lower-face" with two residues (arginine residues here), see Scheme 1.



Scheme 1. Left, schematic representation of the inhibitor candidates. Right, molecular model of the multimeric quinacrine compound 6. The quinacrine derivatives and oxime linkages are in red, the cyclic peptide scaffold with four functionalized lysines is represented as a turquoise ribbon and below the scaffold can be seen the two arginine side chains for increased solubility (Insight II).

These kind of templates, first proposed by Mutter and coworkers as structure inducing devices,^[40,41] has found useful applications in the past as protein mimics (for a recent review see Singh et al.^[42]). It has been used in our laboratory for the construction of vectors for neovasculature targeting in tumor therapy,^[43] for multivalent presentation of carbohydrates,^[44,45] or more recently as a scaffold to construct a β -amyloid peptide model.^[46] Taking advantage of the synthetic versatility of this platform, we designed our candidate to display, via lysine side chains of the upper face, the clustering of the acridine cores and on the lower face, arginine side chains, Scheme 1. We placed the arginine residues to improve the poor solubility of the acridine molecules that may usually limit their *in vivo* use. Further, in future designs this lower face can be used to adjust the pharmacokinetic properties, the cytotoxic effects, or the membrane breaching properties by addition of other functions. This functionalization possibility is an important feature of this scaffold that allows, for example, the attachment of cell penetrating peptides (CPP)^[47,48] for transport across the blood brain barrier (BBB).^[49]

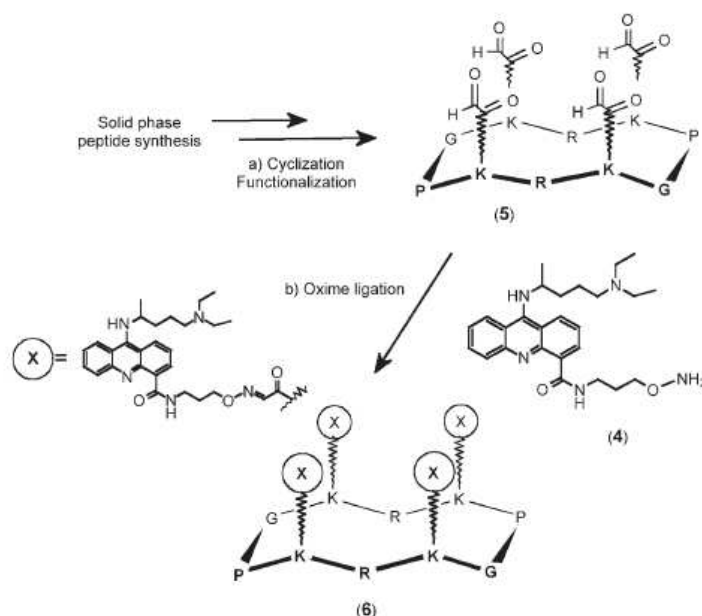
In our quinacrine analogue (Scheme 1), we have only kept the aliphatic side chain found in quinacrine at the nitrogen, position 9. This choice is based on studies with potent antiprion quinacrine derivatives, which revealed that a side chain on the nitrogen at this position is essential for antiprion activity,^[32] unlike the chlorine and methoxy substituent usually found on the quinacrine core.^[31] At the 4 position of the aromatic core, we introduced a spacer arm allowing its grafting to the

central cyclic scaffold. This linker may be beneficial to improve the conformational flexibility of the quinacrine cores on the scaffold surface, to easily reach a bioactive conformation.

Synthesis of the fibril inhibitor candidates

As chemoselective ligation by oxime bond formation is a convenient strategy widely used to assemble peptides^[50-52] and improved in our laboratory^[43,44] to conjugate biomolecules to cyclodecapeptidic scaffolds, its use has been found advantageous in our study. This method allows the ligation, without any coupling reagent in aqueous solution, between unprotected fragments, where one holds an oxyamine function and the other an aldehyde or ketone function. For the synthesis of our inhibitor, candidate 6 required a peptidic scaffold bearing glyoxylyl aldehyde functions on the upper lysine side chains, and a quinacrine analogue displaying the oxyamine group as the suitable complementary function (Scheme 2). For this purpose, the quinacrine derivative 4 was functionalized in the 4 position by an aminoxy spacer. Quinacrine 4 and the scaffold 5 were both synthesized separately and combined together using the oxime bond ligation.

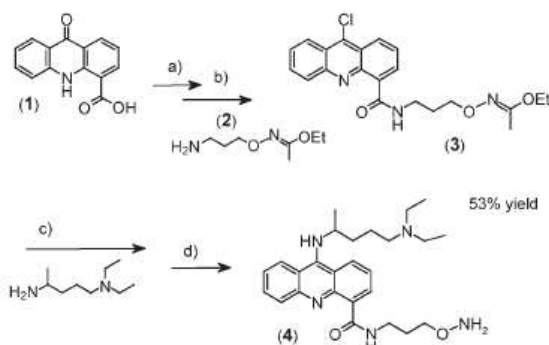
The key cyclopeptidic scaffold 5 (Scheme 2), with the two arginine residues and the four glyoxylyl aldehyde functionalized lysine side-chains, was prepared using standard Fmoc/*t*Bu strategy from the linear peptide presenting Boc and Pmc at the lysine and arginine side chains respectively. Cyclization of the scaffold and introduction of the four glyoxyl-aldehyde



Scheme 2. Strategy for the assembly of the multimeric compound **6**: a) see ref. [45], b) $\text{CH}_3\text{CN}/\text{AcONa}$ buffer 0.1 M pH 4, 1:1, 15 h, 57%.

functionalized lysine side chains were performed as previously described by Grigalevicius et al.^[45]

The preparation of the quinacrine analogue **4** was based on a previous synthetic work on dibasic 9-aminoquinacrine-4-carboxamides by Atwell et al.^[53] Starting from the acridone **1** (Scheme 3), bearing a carboxylic acid group in the 4 position,



Scheme 3. Synthesis of the quinacrine analogue **4**. a) SOCl_2 , 80°C , 2 h; b) CH_2Cl_2 , DIEA, **2**; c) 2-amino-5-diethylaminopentane, MeOH, 70°C , 3 days; d) $\text{HCl}(\text{g})$, CH_2Cl_2 .

allowed us to introduce an appropriate spacer arm as an aminoxypropylamine. The aminoxy part of this linker **2** was protected with an *N*-hydroxyacetimidate and was incorporated on the quinacrine core after activation of the acridone **1** with thionyl chloride. The 9-chloroquinacrine-4-carboxamide **3** was

easily obtained in this way, in CH_2Cl_2 buffered with DIEA. Treatment of **3** with the commercially available 2-amino-5-diethylaminopentane, in methanol at 70°C for three days, produced the protected 9-aminoquinacrine intermediate with the quinacrine side chain at the 9 position. Finally acidic treatment with HCl (**g**) gave the oxime-functionalized quinacrine **4** with 53% of overall yield from acridone **1**.

The aminoxyolated quinacrine **4** was then incorporated (Scheme 2) to the upper face of the scaffold **5** in acetonitrile with sodium acetate buffer following the typical chemoselective ligation procedure previously described.^[45] The reaction was monitored by analytical RP-HPLC and was complete within 15 h. The conjugate **6** was isolated in 57% yield after semipreparative RP-HPLC purification (Figure 1A) and was characterized by MS-ESI

(Figure 1B). The reference compounds, quinacrine derivative **7** and monomeric conjugate **8** (Scheme 1), were prepared by the oxime ligation of the acridine core **4** with respectively, acetone or a scaffold bearing only one glyoxylyl aldehyde function on the upper face.

In vitro inhibition studies of amyloid β -fibril formation by quinacrine compounds

Initially we examined the effects of the monomeric quinacrine analogue **7** and its multimeric version **6** on the inhibition of $\text{A}\beta_{1-40}$ fibril formation by following the specific binding of thioflavin T (ThT) to amyloid fibrils. The ThT assay is the simplest way to identify amyloid structures, and to follow their formation and disaggregation in the search for inhibitor compounds. ThT is highly specific and sensitive for the characteristic cross- β sheet structure of amyloid fibrils and its binding is easily followed by fluorescence spectroscopy because of a large excitation spectral red shift, which allows selective excitation of bound ThT.^[54] The ThT assay can be performed by studying aliquots of amyloid fibril mixtures added to a ThT solution or by studying, in situ, ThT added to the fibril forming mixtures, as it has been shown to have little effect on the assembly process.^[55,54]

Multimeric **6** dose dependently inhibits $\text{A}\beta$ fibril formation

The inhibition studies of $\text{A}\beta_{1-40}$ fibril formation were performed in the presence of $10\ \mu\text{M}$ ThT, in stagnant solution buffered with HPO_4^{2-} (50 mM), pH 7.4 and NaCl (100 mM) at 37°C . We

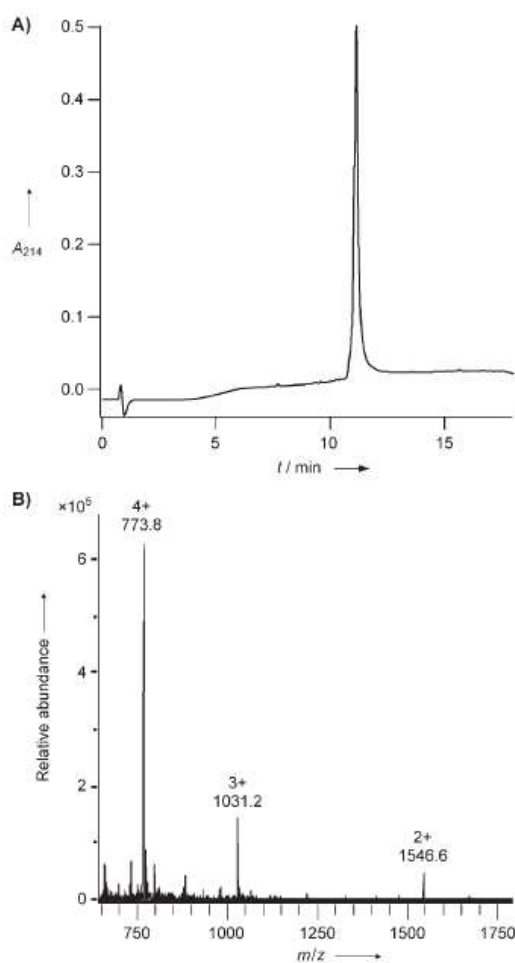


Figure 1. A) RP-HPLC profile of purified compound **6** at 214 nm. (Nucleosil 120 Å 3 μm C_{18} particles, 30×4 mm; 1.3 mL·min⁻¹; linear gradient 95:5 C:D to 40:60 in 15 min; solvent D: 0.1% TFA and 9.9% H₂O in acetonitrile and solvent C: 0.1% TFA in water). B) Electrospray mass spectrum of compound **6**, the spectrum shows multiple charged species. The calculated weight is 3091.9 Da, found 3091.2 Da [$M+H$]⁺.

co-incubated A β_{1-40} with 0, 0.1, 1.0, 10, 20, 50, and 100 μM of the multimeric compound **6** and studied for a period of 14 days the change in ThT fluorescence. In Figure 2, the results for **6** show complete inhibition with concentrations higher than 50 μM . When A β_{1-40} was incubated with 20 μM or less of compound **6**, fibrils were formed as seen by the sigmoidal increase of the ThT fluorescence. A sigmoidal curve is consistent with the nucleation-dependent polymerization model.^[7,8] From the above results an IC₅₀ value for the fourfold quinacrine compound **6** is estimated to 20 ± 10 μM (see the Supporting Information). In Figure 2 we can also see an increase in the lag phase of fibril formation with 10 and 20 μM of **6** in a dose dependent manner as compared to the sample without inhibitor, this indicates an inhibitory effect on oligomer formation during the nucleation phase. The decay of fluorescence signal

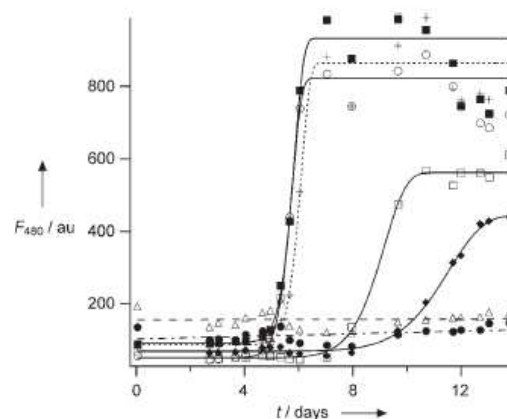


Figure 2. Inhibition studies of A β_{1-40} (50 μM) fibril formation with the fourfold quinacrine compound **6**. Concentrations of **6** are: 0 μM (■), 0.1 (□), 1 μM (○), 10 μM (△), 20 μM (◇), 50 μM (●) and 100 μM (▽). Kinetics were monitored by ThT fluorescence at 480 nm with excitation at 440 nm. The data obtained with 0 to 20 μM of **6** are fitted with extended-exponential functions. The data are representative of three independent experiments.

for the low inhibitor concentrations at the end of the study is probably due to instability of the assay such as precipitation of amyloid.

As seen in Figure 2, the inhibition study of **6** at 100 μM shows some background fluorescence. This background is due to the fluorescence from the quinacrine moieties and was not observed at 20 μM or lower concentrations of **6**. However, monomeric quinacrine **7** displayed a strong fluorescence in the ThT fluorescence region, which prevented its study of fibril inhibition by the ThT assay (Supporting Information). The reason we were able to study the multimeric **6** and not the monomeric compound **7** is most probably due to self-quenching of the quinacrine fluorescence, in compound **6**, as the four quinacrine moieties form a cluster on the cyclic-decapeptide scaffold.

Confirmation of multimeric **6** inhibition of A β fibril formation by AFM

The inhibition of fibril formation by the fourfold quinacrine compound **6** was confirmed by visualization with atomic force microscopy (AFM). When analyzing the AFM image of the A β_{1-40} mixture co-incubated with **6** (100 μM) after 14 days (Figure 3A), we see that no amyloid fibrils have been formed. This can be compared with the control mixture of A β_{1-40} without inhibitor where a number of long protofilaments can be seen (Figure 3B). These protofilaments have lengths to about 4 μm and the heights of the fibrils are 4 nm.

Multimeric **6** has enhanced inhibitory activity than the monomer **7** and the monomer conjugate **8**

As compound **7** has a strong fluorescence in the same range as thioflavin T, it was essential to evaluate the extent of fibril formation by visualizing with AFM. To compare results be-

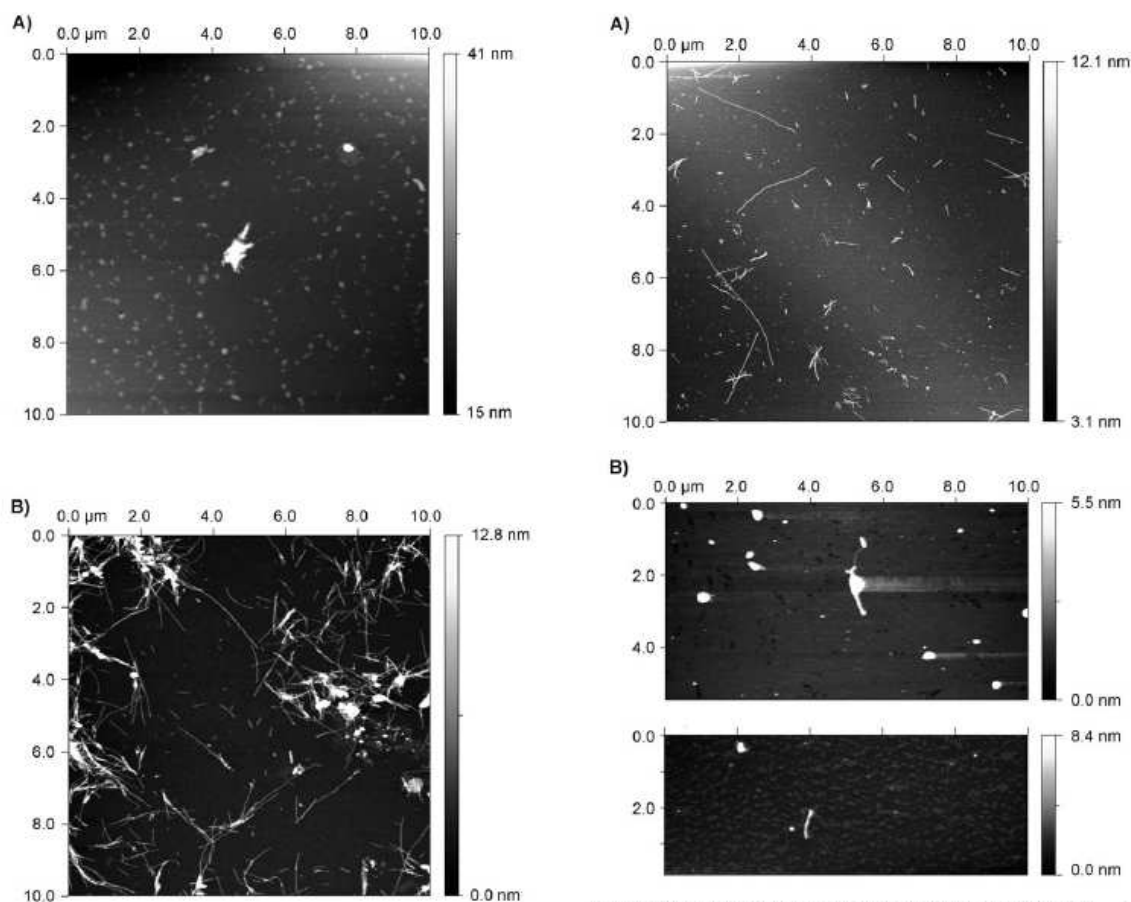


Figure 3. AFM images (height data) of inhibition studies of $A\beta_{1-40}$ obtained at the end of the aggregation reaction (14 days; scan size 10 μm). A) Co-incubation with the fourfold quinacrine compound **6** (100 μM). No fibrils are observed. B) With no inhibitor compound long protofilaments are observed with a height of 4 nm. The Z scale is placed to the right of the images, colors from black to white correspond to the Z range (height).

tween the multimeric **6** (100 μM) and monomer **7**, we have studied **7** at 100 μM as well as at a fourfold higher concentration (400 μM) as there are four quinacrine units on the conjugate **6**. Figure 4A is an AFM image of the $A\beta_{1-40}$ mixture, which has been co-incubated with **7** (100 μM) for 14 days. Here can be seen that this compound has no inhibitory effect on $A\beta_{1-40}$ fibril formation, as number of long protofilaments can be detected, also with lengths to about 4 μm and heights of 4 nm (as in the control study, Figure 3B). At the fourfold concentration of **7** (400 μM), fibrils were observed but to a lesser extent (Figure 4B). We cannot determine exactly an IC_{50} value for **7**, because of background fluorescence, but from the AFM study an IC_{50} value can be estimated to be much larger than 100 μM . Thus the fourfold quinacrine conjugate **6** is a much more potent inhibitor of $A\beta_{1-40}$ aggregation than the monomer **7**.

As another control experiment we have prepared a decapeptide with one quinacrine moiety, compound **8**, compared

Figure 4. AFM image (height data) of protofilaments formed from $A\beta_{1-40}$ co-incubated with the monomeric quinacrine **7** at A) 100 μM and B) 400 μM . The filaments have a height of 4 nm (scan size 10 μm).

to four to prove multimeric effects. The inhibitory effect of compound **8** was determined by AFM as it also has a strong fluorescence in the ThT region. With 100 μM of this compound we found no inhibitory activity in the inhibition study of $A\beta_{1-40}$ fibril formation, thus an IC_{50} value can be estimated to be > 100 μM (Figure 5).

To determine if the cyclic decapeptide scaffold of our multimeric compound alone induces antiamyloidogenic activity, we prepared a scaffold without quinacrine moieties as a control compound. This control **9** contains acetylated lysine residues instead of lysinyl-quinacrine functions. In $A\beta_{1-40}$ fibril formation studies followed by ThT fluorescence, this control **9** showed, at 100 μM , a very weak inhibition effect (Supporting Information).

Together AFM and ThT studies revealed an induced inhibitory effect with our multimeric conjugate **6** with an IC_{50} value of $20 \pm 10 \mu\text{M}$, whereas the monomeric compounds **7** and **8** at 100 μM showed no inhibitory effect. To compare the inhibitory activity with other reported inhibitors of $A\beta$ fibril formation using our assay conditions, we included tetracycline in our study (Supporting Information). Tetracycline has a reported IC_{50} value of 50 μM in a inhibition study of 220 μM of $A\beta_{1-42}$.^[20]

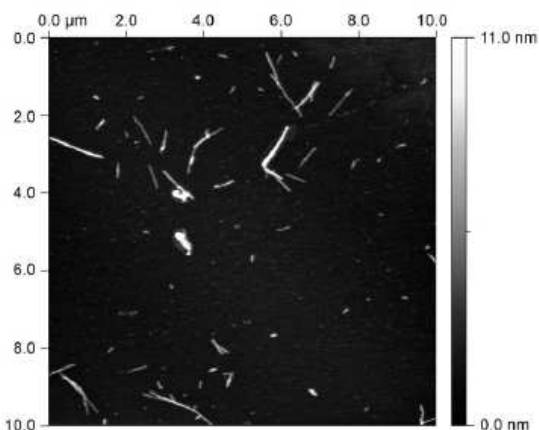


Figure 5. AFM image (height data) of protofilaments formed from $A\beta_{1-40}$ co-incubated with the monomeric conjugate **8** at $100 \mu\text{M}$.

With our experimental conditions, using $A\beta_{1-40}$, we have determined an IC_{50} value of $30 \mu\text{M}$ for tetracycline this is comparable to that previously reported and to our conjugate **6**.

Multimeric **6** inhibits fibril growth on preformed fibril seeds

The inhibitory effect of **6** on $A\beta_{1-40}$ fibril formation was also studied by the ThT assay in the presence of preformed $A\beta_{1-40}$ fibrils as seeds. The kinetics revealed exponential-like formation of fibrils with a strongly reduced lag phase (Figure 6). Incubation

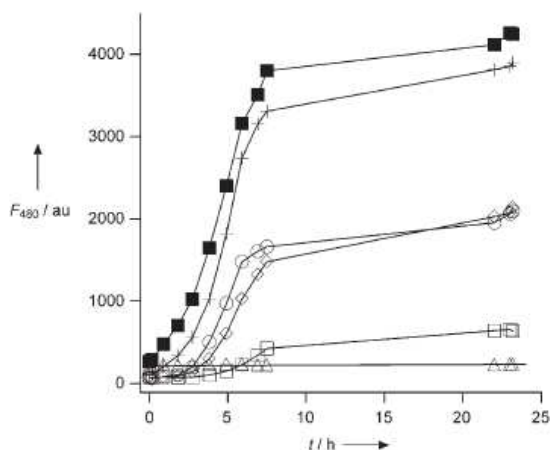


Figure 6. Inhibition studies of $A\beta_{1-40}$ ($50 \mu\text{M}$) fibril formation with the four-fold quinacrine compound **6**, in the presence of sonicated preformed $A\beta_{1-40}$ fibrils ($2.5 \mu\text{M}$). Concentrations of **6** are: $0 \mu\text{M}$ (■), $0.1 \mu\text{M}$ (+), $1 \mu\text{M}$ (○), $2 \mu\text{M}$ (◇), $10 \mu\text{M}$ (□) and $100 \mu\text{M}$ (△). The data are representative of two independent experiments.

of $A\beta_{1-40}$ with increasing concentrations of **6** showed a dose dependent decrease of the final fluorescence level. No formation of fibrils was observed with $100 \mu\text{M}$ of **6** in the ThT kinetic

data and this was confirmed by AFM imaging (data not shown). From this study an apparent IC_{50} value of $2 \pm 1 \mu\text{M}$ for compound **6** was determined.

Seeding experiments were also performed with the control compounds **7** and **8**, the decapeptide scaffold **9** with acetylated lysines and tetracycline. The effects of compounds **7** and **8** were determined by visualizing with AFM. In the presence of $400 \mu\text{M}$ of **7**, formation of snake-like fibrils was observed, and normal fibril growth was seen with $100 \mu\text{M}$ of **8**, showing that these monomeric forms of quinacrine do not inhibit fibril growth (Supporting Information). Thus, again the specificity of multimeric **6** on fibril inhibition was shown as monomers **7** and **8** show no inhibitory activity. The decapeptide scaffold **9** and tetracycline were followed by the ThT assay in the seeding study. The control **9** showed weak inhibitory activity at $100 \mu\text{M}$. For tetracycline we determined an IC_{50} value of $80 \mu\text{M}$, we have not found a previous report of a seeding study with tetracycline (Supporting Information).

Finally, we studied the ability of compound **6** to disaggregate preformed amyloid fibrils. In the studied concentration range from $0 \mu\text{M}$ to $100 \mu\text{M}$, no decrease of the fluorescence was observed in the ThT assay. Fibrils were also observed by AFM imaging after co-incubating for eight days with $100 \mu\text{M}$ of the quinacrine compound **6** (data not shown). Thus, compound **6** does not markedly dissociate preformed amyloid fibrils in the studied concentration range. With the control scaffold with four *N*-acetylated lysine residues **9**, we observed no inhibitory activity in the destabilization study followed by ThT fluorescence (Supporting Information). Disaggregation studies were however not performed on monomeric compounds **7** and **8**. Indeed, as no inhibition was observed in experiments with or without fibril seeds, it is unlikely that they could disaggregate fibrils.

Discussion

The aggregation and formation of fibrils from $A\beta$ is widely accepted to be a key factor in the development of AD. The cytotoxic mechanisms, however, are still not well understood and the identity of the aggregation state that inserts toxicity remains unclear. The toxicity has been proposed to arise from unstructured assemblies during the nucleation phase, fibrils, amyloid, or combinations of these. For this reason different therapeutic approaches are pursued that target different stages in the accumulation of $A\beta$ and formation of amyloid. Important strategies include, stimulating the immune system to remove $A\beta$ from the brain,^[15] direct inhibition of the $A\beta$ self-assembly process,^[16,17] and reduction of $A\beta$ production.^[14]

However, strategies that preferentially target $A\beta_{1-40}$ production may actually worsen the disease course in AD as recently pointed out by McGowan and co-workers.^[57] They have crossed transgenic mice that selectively express high levels of $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$ and thereafter compared the cerebrovascular $A\beta$ deposition in the bitransgenic and singly transgenic littermates. From their studies they could see that levels of $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$ had opposing effects on $A\beta$ deposition, where $A\beta_{1-40}$ inhibited amyloid deposition and $A\beta_{1-42}$ promoted it.

They also observed that increasing levels of A β_{1-40} in the bi-transgenic mice protected them from premature-death, which was observed in the A β_{1-42} transgenic mice.

For these reasons, the development of drugs that inhibit A β aggregation seems to be a more promising therapeutic approach in the prevention and control of AD compared to the strategies that preferentially target A β_{1-40} production. Following this approach, we have investigated in this report the potential of a multimeric quinacrine conjugate **6** as a lead inhibitor compound against fibril formation associated with AD. Our drug candidate exhibits a directional and well-defined cluster of four quinacrine moieties that was easily prepared by the oxime-ligation strategy. We performed *in vitro* analysis of the inhibitory effects of this compound, where we monitored the formation of A β_{1-40} fibrils directly using fluorescence spectroscopy with ThT. We showed herein that the quinacrine compound **6** displays an anti-amyloidogenic effect and dose dependently increased the lag phase of fibril formation. This lag phase increase indicates an inhibitory effect during the nucleation phase, such as inhibition of oligomer formation. Complete inhibition of fibril formation was observed at 50 μM of compound **6** by the ThT assay and this was confirmed by imaging with AFM where no fibrils were observed. From this study we have estimated the IC₅₀ value to 20 \pm 10 μM .

To evaluate the multimeric inhibitory effects of the fourfold quinacrine compound **6** we compared **6** with the monomeric quinacrine derivative **7** on the inhibition of A β_{1-40} fibril formation. As a result of strong fluorescence from the monomeric quinacrine, we were only able to study fibril formation by AFM. We found no observable decrease in the amount or change of the fibril structure with a 100 μM concentration of **7** as compared to the control without inhibitor. In a comparison of monomer **7** and the fourfold quinacrine compound **6** we have to consider the fact that compound **6** holds four times more of the quinacrine moiety than **7**. For this reason we have studied the inhibition effects of **7** at 400 μM by AFM. The formation of fibrils also observed at this concentration indicates that the multimeric presentation of **6** enhances its inhibitory activity. Further, the results from the control experiment performed with the monomeric conjugate **8**, strengthen the evidence of multimeric effects of the inhibitor compound **6**. Indeed, with 100 μM of **8** we found no inhibitory activity in the inhibition study of A β_{1-40} fibril formation. The control compound **9**, which is the scaffold alone, was studied to see if it induces inhibitor activity. With this compound at 100 μM , only a slight decrease of the ThT fluorescence was observed. Together these results demonstrate that the induced inhibitory activity of compound **6** arises from the fourfold cluster of quinacrine moieties that are attached to the decapeptide scaffold.

To determine if the inhibitory effect of compound **6** was entirely due to an increase of the lag phase, we performed seeding experiments, where preformed fibrils were added to the A β_{1-40} aggregation mixture. This procedure eliminates the processes during the lag phase, allowing us to follow only the exponential growth and inhibition of the A β_{1-40} fibrils. In this study we observed a dose dependent decrease of the final fluorescence level. In the aggregation mixture with 100 μM of

the fourfold quinacrine compound **6**, no formation of fibrils was observed in the ThT assay or by AFM imaging. From this study we determined an apparent IC₅₀ value of 2 \pm 1 μM for compound **6**. We conclude from the seeding experiment that compound **6** inhibits fibril growth and that inhibition is not only due to inhibition of oligomer formation during the lag phase. The apparent IC₅₀ values obtained from the inhibition experiments, with and without preformed fibrils as seeds, are 2 \pm 1 and 20 \pm 10 μM , respectively. The difference of these two values may be due to differences of inhibitory mechanisms (see below), but also to the very nature of the assay as described by Findeis et al.^[58] As mentioned by them, the assay is reliable for the identification of potent inhibitors of A β polymerization but accurate determination can be difficult.

The control compounds **7–9** were also studied with seeding experiments. The results from these studies correlate well with the studies that were performed without the addition of preformed fibrils and thus fibril formation was observed for all controls. Interestingly, in the presence of **7** at 400 μM formation of snake-like fibrils were observed, this may be due to the mere high concentration of compound **7** that changes the morphology of the forming fibrils (Supporting Information).

We further analyzed the inhibitory mechanisms of compound **6** with disaggregation studies. However, the disaggregation ability of compound **6** on preformed amyloid fibrils was not very strong, as we were able to observe fibrils by AFM imaging from a mixture of preformed fibrils and 100 μM of **6** after an incubation period of eight days.

Even though compound **6** was not able to disaggregate preformed A β_{1-40} fibrils, it has from the unseeded and seeded experiment an IC₅₀ value of 20 \pm 10 μM and 2 \pm 1 μM for A β_{1-40} fibril formation and inhibition, respectively, and thus can be compared with other reported inhibitors. For example, the anti-amyloidogenic activity of tetracycline was determined here, with our experimental conditions, to have an IC₅₀ value of 30 μM which is similar to that previously reported (IC₅₀ value of about 50 μM).^[20] Another reported inhibitor is 2-amino-4-chlorophenol with an IC₅₀ value of 10 μM .^[59] Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) is a polyphenolic natural product isolated from the creosote bush *Larrea tridentata*.^[60] NDGA is expected to bind to free A β and has a reported IC₅₀ value of 0.16 μM , it is also a potent oxygen radical scavenger.^[61] The modified A β fragment choly-LVFFA is a β -sheet breaker peptide which uses the important recognition sequence LVFFA of the A β sequence to bind to the growing fibrils and disturb and dissociate them; it has a reported IC₅₀ value of about 5 μM .^[58] Rifampicin, a semi-synthetic antibiotic drug also suggested to scavenge hydroxyl free radicals,^[62] is another reported inhibitor of A β fibril formation with an IC₅₀ value of 6 μM .^[63] From the above, our multimeric conjugate is highly competitive as an inhibitor against A β polymerization, also its ability to delay polymerization is of interest as was observed with the A β fragment LVFFA.^[58]

When considering the anti-amyloidogenic mechanisms of inhibitors, one should consider the peptide interactions that induce and stabilize the fibril structure. It is believed that hydrophobic interactions play an important role in A β aggregation. Also the aromatic residues are expected to contribute to

the stability, specificity, and directionality of the fibrils cross- β sheet structure, by means of aromatic stacking and their rigid properties.⁶⁴ The two phenylalanines at positions 19 and 20 in the A β sequence have been determined to be essential for amyloid formation.⁶⁵ Thus, it is conceivable that potential inhibitors would have hydrophobic and aromatic components that could interfere with the hydrophobic and aromatic stacking interactions that are formed during the different stages of fibril formation. In addition to hydrophobic interactions, potential inhibitors would also be able to form hydrogen bonds with the A β backbone amides thus disturbing β -sheet formation.²⁴ As detailed information of known inhibitors and their interactions with fibrils are not available, with the above reasoning one can speculate on the mechanisms of fibril inhibition. Forloni et al. have proposed the antiamyloidogenic activity of tetracycline to be related to hydrophobic, aromatic, and specific hydrogen bond formation with residues of A β .²⁰ Felice et al. have suggested that some di- and tri-substituted aromatic compounds, such as 2-amino-4-chlorophenol, bind to the hydrophobic region of A β by hydrophobic and/or π - π interactions thus blocking associations between A β molecules which would lead to fibril formation.⁵⁹ Rifampicin is also known to bind to A β through hydrophobic interactions thus inhibiting its aggregation.⁶³

Regarding the antiamyloidogenic mechanism of the current multimeric quinacrine compound **6**, the folding interactions during the nucleation phase (oligomer formation) as well as during the formation of fibrils should be taken into account. This is due to the fact that compound **6** induced a longer lag phase and also inhibited further fibril growth in the seeding study with preformed fibrils. The propensity of **6** to bind to specific regions of A β ₁₋₄₀ may occur through a number of interactions as described above. The planar aromatic structure of the quinacrine cores together with multimeric interactions may bind A β through π - π interactions thus blocking associations between A β molecules and inhibiting fibril formation. In the same way, the aromatic core could bind A β molecules through hydrophobic interactions. Also in addition, the current compound could interact with A β through a number of polar interactions such as by the basic functions on the 9 position of the quinacrine, the oxime attachment to the scaffold, and the scaffold itself. The fact that there was no detectable inhibition with the monomeric compound **7** and especially with the monomeric conjugate **8** implies that the inhibitory mechanism of compound **6** is a result of the multiple quinacrine that are directionally displayed in a convenient manner on the central scaffold. As May et al. explained the improved activity of dimers of acridine as antiprion inhibitors compared to the corresponding monomers "Conformational restriction has been used extensively in drug design to pre-organize ligands into a bioactive conformation" and "a rigid scaffold can correctly position and orient key structure features without having to undergo an entropically costly conformational rearrangement before binding".²⁹

It is also reasonable to consider that our multimeric compound could bind specifically to A β through a mechanism yet unknown, which leads to the observed antiamyloidogenic

properties. Further NMR studies could be of interest to give answers about this mechanism and the interactions of this conjugate with free A β .

Other reports have shown binding of 9-aminoacridine compounds to β -sheet rich peptides.^{35,66} Such as Phuan et al. that recently reported a chemical proteomic approach where they functionalized a Sepharose matrix with a bis-9-aminoacridine compound.³⁴ From binding studies with the prion protein from scrapie-infected cultured cells, termed PrP, they observed selectivity of the 9-aminoacridine matrix for the misfolded and β -sheet rich PrP^{Sc} as compared to the normally folded PrP^C. From experimental studies they conclude that this selectivity must be due to conformational and/or oligomeric differences between PrP^C and PrP^{Sc}. They suggest that the possible mechanism of action of antiprion 9-aminoacridine compounds on inhibiting PrP^{Sc} replication may occur by modification of templating epitopes for PrP^C conversion or by altering the stability of PrP^{Sc} oligomers. In view of this study, our quinacrine compound **6** could also interact with cross β -sheets formed during oligomerization.

It is interesting to note, as pointed out by Cohen and Kelly that fibril disaggregating compounds may shift the equilibrium of A β aggregation from fibrils to toxic oligomers.¹⁶ Considering this, the inhibitory effect of our multimeric quinacrine compound on A β fibril formation, displays an interesting profile where preformed fibrils are not disaggregated but fibril growth is inhibited. Such an inhibiting profile is interesting for the treatment of AD patients, where fibrils are not transformed into toxic oligomers and further fibril growth is inhibited, facilitating free A β clearance by proteolytic degradation.

When considering the potential therapeutic use of our multimeric acridine compound **6** and especially its potential use as a drug against AD, two major questions arise. What about its cytotoxicity as a DNA intercalating agent and the ability of this high-molecular weight molecule to pass through the blood brain barrier (BBB)? In this preliminary study, these two parameters have not been evaluated and should be taken into account in further investigations. Nevertheless some comments about these are discussed below.

The cytotoxicity of 9-aminoacridine compounds,^{29,33} potential inhibitors of prion replication, and of 9-aminoacridinecarboxamide derivatives⁵³ is undoubtedly dependent on their ability to interact with DNA. The cytotoxicity-structure relationship is not easy to evaluate. Not only do the substituents of the acridine heterocycle appear to be key factors in determining cytotoxicity but also the steric hindrance and the restricting conformational flexibility of the heterocycles as reported for bis-acridine intercalators.⁶⁷ In light of this, the rigid scaffold of our conjugate **6** could result in a lower cytotoxicity than the multimeric acridine version. Moreover the possibility of an easy chemical modulation of our assembly, especially on the lower face, could help to overcome the problem and to achieve a convenient balance between desirable bioactivity and cytotoxicity.

As for the ability to cross the blood brain barrier (BBB), it is an important issue that needs to be addressed for drugs that are intended to be active in the human brain. The penetration

to the central nervous system is one of the major hurdles for compounds that are effective *in vivo* against AD. The *in vivo* potential of our multimeric compound lies in the fact that it can be further functionalized with targeting and membrane breaching properties. An example of a modified version of our quinacrine complex, would be to attach a cell penetrating peptide (CPP) such as Tat to the central scaffold.^[47,48] Tat is a short 11 residue sequence, derived from the HIV transactivator of transcription,^[49] which has been shown to be able to transport large proteins across the BBB. Conjugation of a CPP can occur on the opposite side of our scaffold that currently holds two arginine residues.

In conclusion, we show in this study that the designed multimeric acridine conjugate dose-dependently inhibits fibril formation from fresh A β_{1-40} *in vitro*. We demonstrated that not only does our compound inhibit fibril formation, but that its anti-amyloidogenic activity is due to the multimeric assembly of the four acridines. Even though the toxicity is unknown and the exact mechanism remains unclear, this multimeric compound should be considered as a lead for the development of a new class of well-defined inhibitors against amyloid fibril formation in Alzheimer's disease. Indeed, the possibility of chemical modulation of our assembly opens up the opportunity to further optimize its inhibitory properties for *in vivo* use as a therapeutic agent and as a tool to study fibril formation mechanisms.

Experimental Section

Materials: All chemical reagents, protected amino acids, chlorotriptyl[®] resin, and solvents were purchased from Sigma Aldrich, Fluka, Acros, Carlo-Erba, or France Biochem S.A. and were used without further purification. Synthetic A β_{1-40} was prepared as previously described.^[68] The 9-oxoacridan-4-carboxylic acid **1** was obtained as described by Atwell et al.^[53] The linker (Ethyl-*N*-hydroxyacetimidate)propylamine **2**^[69] was built up by reaction of ethyl-*N*-hydroxyacetimidate with 3-bromopropylphthalimide followed by selective removal of the phthalimide.

Reversed-phase HPLC analyses were performed on Waters equipment using C₁₈ columns. For the HPLC analyses of compounds **1–3**, a Waters μ -bondapak column 120 Å 10 μ m, 300 \times 3.9 mm² was used and operated at 2 mL min⁻¹ using a linear A-B gradient of 0 to 100% B in 10 min (solvent A: phosphoric acid solution in water, pH 2.5; solvent B: MeOH/H₂O, 95/5, v/v). For HPLC analyses of compounds **4–7**, a Nucleosil column 120 Å 3 μ m, 30 \times 4 mm² was operated at 1.3 mL min⁻¹ with UV monitoring at 214 nm and 250 nm using a linear C-D gradient (5 to 60% D in 15 min run time; solvent C: H₂O containing 0.1% TFA; solvent D: CH₃CN containing 9.9% H₂O and 0.1% TFA). For HPLC purification of **4–7**, the preparative column, Delta-Pak[™] 300 Å 15 μ m, 200 \times 25 mm² was operated at 22 mL min⁻¹ with linear C-D gradient programs in 30 min run time. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on Bruker AC300 spectrometers. Mass spectra were obtained by electron spray ionization (MS-ESI) on a VG Platform II in the positive mode.

Synthesis of *N*-[propyl(ethyl-*N*-hydroxyacetimidate)]-9-chloroquinacrine-4-carboxamide **3:** The 9-oxoacridan-4-carboxylic acid **1** (1.46 mmol) was chlorinated by SOCl₂ as previously described.^[53] The obtained 9-chloroquinacrine-4-carbonyl chloride was then cooled to -10 °C under argon and to this was added in one por-

tion an ice-cold solution of (Ethyl-*N*-hydroxyacetimidate)propylamine **2** (350 mg, 2.19 mmol) and diisopropylethylamine DIEA (381 μ L, 2.19 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (3 mL). After being stirred for 10 min at -10 °C, the reaction solution was warmed to room temperature and left for a further 2 h. The mixture was diluted with CH₂Cl₂ (10 mL), washed twice with 10% aqueous Na₂CO₃, and once with saturated aqueous NaCl. The organic layer was then dried on Na₂SO₄ and evaporated. The compound **3** was obtained as yellow brown oil in quantitative yield and used without further purification. The structure of **3** was confirmed by ¹H and ¹³C NMR analyses (300 and 75.5 MHz, CDCl₃). HPLC: *t*_R = 9.7 min; MS-ESI: calcd 399.8, found 400.0 [*M*+H⁺].

Synthesis of *N*-[propyl(amine)]-9-amino(5-diethylaminopentane)quinacrine-4-carboxamide **4:** The crude **3** was dissolved (1.46 mmol) in HPLC grade MeOH (3 mL) and the commercially available 2-amino-5-diethylaminopentane, was added in one portion. The mixture was heated at 70 °C under stirring until the disappearance of the starting material (seven days). The solvent was evaporated to get the *N*-[propyl(ethyl-*N*-hydroxyacetimidate)]-9-amino(5-diethylaminopentane)quinacrine-4-carboxamide as a brown oil. This intermediate was dissolved in anhydrous CH₂Cl₂ and the mixture was cooled at 0 °C before adding gaseous HCl. No precipitation of the salt was observed. The solvent was evaporated under high vacuum to get a brown powder (630 mg, 72%). The crude was dissolved in solvent C and purified by RP-HPLC (5 to 60% D in 30 min, *t*_R = 12 min) to get 53% of pure compound **4** from the starting material **1**. HPLC: *t*_R = 7.7 min; ¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ = 0.95 (t, 3 H; CH₃), 0.98 (t, 3 H; CH₃), 1.36 (m, 2 H; CH₂), 1.53 (d, 3 H; CH₃), 1.71 (m, 2 H; CH₂), 2.00 (m, 2 H; CH₂), 2.85 (m, 6 H; 3CH₂), 3.47 (t, 2 H; CH₂), 4.15 (t, 2 H; CH₂), 4.40 (m, 1 H; CH), 7.34–7.43 (m, 3 H; H₂, H₅ et H₇), 7.82 (dd, ³J(H,H) = 7.4 Hz, ⁴J(H,H) = 0.9 Hz, 1 H; H₆), 7.96 (d, ³J(H,H) = 8.5 Hz, 1 H; H₁ or H₈), 8.02 (dd, 1 H; H₈ or H₁), 8.09 ppm (d, ³J(H,H) = 8.4 Hz, 1 H; H₃); ¹³C NMR (75.5 MHz, D₂O): δ = 8.2, 8.3, 20.3 (3CH₃), 20.5, 27.3, 33.7, 36.9, 47.4, 47.6, 51.0 (7CH₂), 55.8 (CH), 73.4 (CH₂), 110.8, 114.7, 118.6, 118.8 (4C_{ar}), 119.4 (CH_{ar}), 122.4 (C_{ar}), 122.9, 125.2, 135.0, 136.4 (4CH_{ar}), 158.3 (CO), 162.7 (q, CF₃), 169.0 ppm (CF₃COOH); MS-ESI: calcd 451.6, found 452.2 [*M*+H⁺].

Synthesis of glycoyl-aldehyde functionalized cyclic-decapeptide scaffold **5:** The cyclic scaffold was prepared following the previously reported strategy by Grigalevicius et al.^[45] First the linear peptide, K(Boc)-R(Pmc)-K(Boc)-P-G- K(Boc)-R(Pmc)-K(Boc)-P-G, was built up on chlorotriptyl[®] resin (300 mg) with a loading of 0.6 mmol g⁻¹, by standard solid phase procedures. Coupling conditions were, *N*-Fmoc amino acids (1.5 equiv), PyBOP (benzotriazol-1-yloxy)tris (pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate (1.5 equiv), and DIEA (4 equiv) in DMF. *N* α -Fmoc removal was performed in piperidine solution (20% in DMF). The linear peptide was cleaved from the resin with a solution of 1% TFA in CH₂Cl₂. After evaporation of solvent, the crude was precipitated and washed in diethyl ether to get a white powder (88%). Thereafter, the quantitative cyclization was performed under high dilution for 3 h in acetonitrile with PyBOP as coupling reagent and DIEA to adjust the pH to 8–9. After solvent removal, the cyclic peptide was precipitated and washed in ether (quantitative yield). The removal of Boc and Pmc protecting groups from the lysine and arginine residues was achieved in TFA acidic conditions during 3 h (140 mg, 77%). The lysine side chains were thereafter coupled with protected serine residues, BocSer(*t*Bu)OH, using standard coupling conditions. The Boc and *t*Bu on the serine residues were removed with a solution of TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5) for 2 h, then serine oxidation was carried out in water during 1 h using an excess of NaIO₄. The

CHEMBIOCHEM

P. Dumy, J. Garcia, et al.

solution was diluted with water and purified by RP-HPLC ($t_R = 10$ min, 5 to 40% D in 30 min) to afford the glycoxyaldehyde scaffold **5** (69 mg, 32% for the three last steps). HPLC: $t_R = 5.8$ min; MS-ESI: calcd 1357.50, found 1357.5 $[M+H]^+$, 1427.4 $[M+4H_2O+H]^+$, 715.2 $[M+4H_2O+2H]^2+$.

Synthesis of the multimeric compound 6: The scaffold **5** (20 mg, 12.62 μmol included TFA salts) was dissolved in AcONa buffer (0.1 mM, pH 4) (3 mL). The oxyamine-quinacrine **4** (45 mg, 75.60 μmol) was dissolved in CH_3CN (3 mL) and added to the mixture and stirred at room temperature for 15 h. The reaction was followed by RP-HPLC. The product **6** was isolated after RP-HPLC purification ($t_R = 18$ min, 5 to 60% D in 30 min) as a yellow powder (24 mg, 57%). HPLC: $t_R = 11.1$ min; MS-ESI: calcd 3091.9, found 619.0 $[M+5H]^3+$, 773.8 $[M+4H]^4+$, 1031.4 $[M+3H]^3+$, 1546.6 $[M+2H]^2+$, 3091.2 $[M+H]^+$.

Synthesis of the compound 7: The oxyamine-compound **4** (38 mg, 0.068 mmol) was dissolved in 4 mL of acetone/solvent D (CH_3CN containing 9.9% H_2O and 0.1% TFA), 1/1. The solution was stirred at room temperature for 3 h and then evaporated. No precipitation of the compound was observed by adding ether, dichloromethane, or ethyl acetate. The crude was dissolved in solvent D and purified by RP-HPLC (5 to 60% D in 30 min) to get 27 mg of pure compound as a TFA salt (52%). HPLC: $t_R = 9.2$ min; ^1H NMR (300 MHz, D_2O): $\delta = 1.06$ (t, 3H; CH_3), 1.10 (t, 3H; CH_3), 1.52 (m, 2H; CH_2), 1.66 (d, 3J (H,H) = 6.3 Hz, 3H; CH_3), 1.81, 1.83 (2 s, 6H; 2 CH_3), 1.89 (m, 2H; CH_2), 2.06 (m, 2H; CH_2), 2.92–3.05 (m, 6H; 3 CH_2), 3.60 (t, 2H; CH_2), 4.19 (t, 2H; CH_2), 4.68 (m, 1H; CH), 7.50–7.59 (m, 2H; H2, H7), 7.68 (d, 3J (H,H) = 8.4 Hz, 1H; HS), 7.96 (dd, 3J (H,H) = 7.4 Hz, 1H; H6), 8.17–8.21 (m, 2H; H1, H8), 8.33 ppm (d, 3J (H,H) = 8.3 Hz, 1H; H3); ^{13}C NMR (75.5 MHz, D_2O): $\delta = 8.3$, 8.4, 15.6, 20.4 (4 CH_3), 20.6 (CH_2), 21.1 (CH_3), 28.2, 33.8, 37.7, 47.6, 47.7, 51.1 (6 CH_2), 55.7 (CH), 71.3 (CH_2), 118.7, 114.8 (2 C_{ar}), 119.5 (CH_{ar}), 119.8 (C_{ar}), 123.0, 125.1, 135.0, 136.5 (4 CH_{ar}), 158.9 (CO), 160.4 (CF_3COOH), 168.6 ppm (CF_3COOH); MS-ESI: calcd 491.7, found 492.2 $[M+H]^+$, 246.3 $[M+2H]^2+$.

Synthesis of the monomeric compound 8: Compound **8** was prepared as previously described for **6** by ligation of the oxyamine-acridine **4** and the cyclic scaffold c[K(COCHO)-R-A-P-G-A-R-A-P-G]. HPLC: $t_R = 11.8$ min; MS-ESI: calcd 1450.8, found 363.7 $[M+4H]^4+$, 484.7 $[M+3H]^3+$, 726.7 $[M+2H]^2+$, 1452.0 $[M+H]^+$.

Synthesis of the scaffold 9: The scaffold **9** c[K(Ac)-R-K(Ac)-P-G-K(Ac)-R-K(Ac)-P-G], was prepared by acetylation of the cyclopeptide c[K-R-K-P-G-K-R-K-P-G], intermediate in the synthesis of **5**, using a mixture of $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Py}/\text{DMF}$, 1/2/7. After 30 min under stirring, the solvents were removed and compound **9** was precipitated and washed in ether. HPLC: $t_R = 11.0$ min; MS-ESI: calcd 1300.7, found 434.5 $[M+3H]^3+$, 651.4 $[M+2H]^2+$, 1301.7 $[M+H]^+$.

Preparation of $\text{A}\beta_{1-40}$ peptide stock solution: For aggregation assays, a stock solution of $\text{A}\beta_{1-40}$ was prepared as follows: $\text{A}\beta_{1-40}$ (2.7 mg) was dissolved in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (200 μL) to disassemble preformed aggregates, thereafter it was lyophilized. One mL of pure water was added to the lyophilized peptide and the solution was centrifuged at 12000g to remove eventual aggregates. The stock solution was divided into portions and stored at -20°C until use. The stock concentration of $\text{A}\beta_{1-40}$ was 500 μM .

Preparation of inhibitor stock solutions: Inhibitors were dissolved in DMSO. Stock solutions of 10 to 20 mM were first prepared, thereafter they were diluted with DMSO to the following concentrations 5 mM, 500 μM , 50 μM , and 5 μM . Final concentrations of DMSO in inhibition studies were 2%.

Aggregation measurement of $\text{A}\beta_{1-40}$: Aggregation of $\text{A}\beta_{1-40}$ was performed in 96-well black polypropylene microplates (Greiner). To each well an aliquot of the peptide stock solution was mixed into the aggregation buffer giving a final composition of $\text{A}\beta_{1-40}$ (50 μM) and ThT (10 μM) in sodium phosphate (50 mM) and NaCl (100 mM) pH 7.4. Thereafter 2 μL aliquots of the inhibitor compounds were added, giving the aggregation mixture a total volume 100 μL . Microplates were sealed with a plastic sheet and incubated in a Molecular Devices Spectra MAX Gemini XS microplate reader at 37°C . Kinetic data were fitted with the stretched exponential function: $F(t) = F(\infty) - \Delta F \exp(-(kt)^n)$, where $F(t)$ is the fluorescence at time t , $F(\infty)$ is the fluorescence after complete fibril formation, ΔF is the difference in fluorescence between $t(0)$ and $t(\infty)$, k is the rate constant, and values larger than 1 for the parameter n indicate a sigmoidal transition with an initial lag-phase.^[70]

Aggregation measurement with preformed fibrils: The seeding experiment was identical to the aggregation measurement of $\text{A}\beta_{1-40}$, with the addition of preformed fibrils (2.5 μM). The preformed fibrils of $\text{A}\beta_{1-40}$ were prepared from the aggregation measurement of $\text{A}\beta_{1-40}$ without inhibitor compounds (described above). Fibrils were sonicated for ten seconds immediately before use.

Fibril destabilization: The preformed fibrils of $\text{A}\beta_{1-40}$ were prepared as described above, by following the formation of fibrils with the ThT assay. The fibrils were mixed and sonicated (2×10 s) and left overnight before the destabilization study. The experimental conditions were identical to the aggregation measurement of $\text{A}\beta_{1-40}$.

Determination of IC_{50} values: The IC_{50} values were determined from the fluorescence values obtained at the end of the kinetic studies. Thereafter we plotted these values against Log of the inhibitor concentration. Fitting the data with a sigmoidal function in the Igor Pro software (WaveMetrics) the IC_{50} value was obtained at the fluorescence halfway point.

Fluorescence spectroscopy: Microplates were analyzed in a Molecular Devices Spectra MAX Gemini XS microplate spectrophotometer at 37°C . Measurements of ThT binding were recorded once or twice daily using bandpass filters of 440 nm for excitation and 480 nm for emission and a cut-off filter of 475 nm was used.

Atomic force microscopy: An aliquot (3 μL), from each inhibition study was withdrawn at the end of the aggregation reaction and deposited onto freshly cleaved mica sheets for AFM inspection. The sample was incubated on mica for 2 min followed by three washes with water (5 μL) to gently remove the material not adsorbed to the substrate. The mica was dried in air for one hour. In-air AFM images were acquired in noncontact mode in a vibration insulated environment, using a PicoPlus microscope (Molecular Imaging), equipped with a PicoScan-3000 controller. For imaging, we used single beam aluminum-coated cantilevers (type NSC36/ALBS, μmasch) with $R_c < 10$ nm, 110–130 μm lengths and nominal spring constant 0.6 N m^{-1} . The drive frequency was between 200 and 400 kHz.

Acknowledgements

We thank Rick Reeker, Sonia Ortega, and Frédéric Dubreuil for assistance with AFM studies and the NanoBio laboratory. We thank also Dr Martine Demeunynck for helpful discussion about heterocyclic chemistry. This work was supported by grants from AFM-

INSERM GIS "maladies rares amyloses héréditaires" (no. AE02013 KSA), IUF, and European FP6 EURAMY project "Systemic amyloidoses in Europe".

Keywords: Alzheimer's beta-amyloid fibrils · drug design · inhibitors · multimeric conjugate · quinacrine

- [1] G. G. Glenner, C. W. Wong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *120*, 885–890.
- [2] P. T. Lansbury, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 3342–3344.
- [3] R. M. Murphy, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2002**, *4*, 155–174.
- [4] C. M. Dobson, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2004**, *15*, 3–16.
- [5] S. B. Prusiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 13363–13383.
- [6] F. E. Cohen, K. M. Pan, Z. Huang, M. Baldwin, R. J. Fletterick, S. B. Prusiner, *Science* **1994**, *264*, 530–531.
- [7] J. T. Jarrett, E. P. Berger, P. T. Lansbury, Jr., *Biochemistry* **1993**, *32*, 4693–4697.
- [8] J. T. Jarrett, J. Lansbury, T. Peter, *Cell* **1993**, *73*, 1055–1058.
- [9] M. P. Mattson, *Nature* **2004**, *430*, 631–639.
- [10] A. Ferreira, Q. Lu, L. Orecchio, K. S. Kosik, *Mol. Cell. Neurosci.* **1997**, *9*, 220–234.
- [11] X. Huang, C. S. Atwood, M. A. Hartshorn, G. Multhaup, L. E. Goldstein, R. C. Scarpa, M. P. Cuajungco, D. N. Gray, J. Lim, R. D. Moir, R. E. Tanzi, A. I. Bush, *Biochemistry* **1999**, *38*, 7609–7616.
- [12] M. A. Smith, C. A. Rottkamp, A. Nunomura, A. K. Raina, G. Perry, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2000**, *1502*, 139–144.
- [13] J. P. Blass, *J. Neurosci. Res.* **2001**, *66*, 851–856.
- [14] I. Dewachter, F. Van Leuven, *Lancet Neurol.* **2002**, *1*, 409–416.
- [15] D. Schenk, R. Barbour, W. Dunn, G. Gordon, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, Z. Liao, I. Lieberburg, R. Motter, L. Mutter, F. Soriano, G. Shopp, N. Vasquez, C. Vandever, S. Walker, M. Wogulis, T. Yednock, D. Games, P. Seubert, *Nature* **1999**, *400*, 173–177.
- [16] F. E. Cohen, J. W. Kelly, *Nature* **2003**, *426*, 905–909.
- [17] M. A. Findeis, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2000**, *1502*, 76–84.
- [18] K. Ono, K. Hasegawa, H. Naiki, M. Yamada, *J. Neurosci. Res.* **2004**, *75*, 742–750.
- [19] S. Taniguchi, N. Suzuki, M. Masuda, S.-i. Hisanaga, T. Iwatsubo, M. Goedert, M. Hasegawa, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 7614–7623.
- [20] G. Forloni, L. Colombo, L. Girola, F. Tagliavini, M. Salmona, *FEBS Lett.* **2001**, *487*, 404–407.
- [21] K. Ono, Y. Yoshikake, A. Takashima, K. Hasegawa, H. Naiki, M. Yamada, *J. Neurochem.* **2003**, *87*, 172–181.
- [22] A. Lorenzo, B. A. Yankner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 12243–12247.
- [23] P. Talaga, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2001**, *1*, 175–186.
- [24] Y. Porat, A. Abramowitz, E. Gazit, *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, *67*, 27–37.
- [25] S. J. Hays, H. Levine, III, J. D. Scholten, *9716 191, An* **1997**:405 899, **1997**.
- [26] W. Kelly, *N° W09746547*, **1997**.
- [27] H. Shimadzu, T. Suemoto, M. Suzuki, T. Shiomitsu, N. Okamura, Y. Kudo, T. Sawada, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2003**, *46*, 765–772.
- [28] T. Suemoto, N. Okamura, T. Shiomitsu, M. Suzuki, H. Shimadzu, H. Akatsu, T. Yamamoto, Y. Kudo, T. Sawada, *Neurosci. Res.* **2004**, *48*, 65–74.
- [29] B. C. H. May, A. T. Fafarman, S. B. Hong, M. Rogers, L. W. Deady, S. B. Prusiner, F. E. Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3416–3421.
- [30] R. Klingenstein, S. Löber, P. Kujula, S. Godsave, S. R. Leliveld, P. Gmeiner, P. J. Peters, C. Korth, *J. Neurochem.* **2006**, *98*, 748–759.
- [31] S. Dollinger, S. Löber, R. Klingenstein, C. Korth, P. Gmeiner, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6591–6595.
- [32] C. Korth, B. C. H. May, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 9836–9841.
- [33] B. C. H. May, J. Witkop, J. Sherrill, M. O. Anderson, P. B. Madrid, J. A. Zorn, S. B. Prusiner, F. E. Cohen, R. K. Guy, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4913–4916.
- [34] P.-W. Phuan, J. A. Zorn, J. Safar, K. Giles, S. B. Prusiner, F. E. Cohen, B. C. H. May, *J. Gen. Virol.* **2007**, *88*, 1392–1401.
- [35] A. Barret, F. Tagliavini, G. Forloni, C. Bate, M. Salmona, L. Colombo, A. De Luigi, L. Limido, S. Suardi, G. Rossi, F. Auvré, K. T. Adjou, N. Salès, A. Williams, C. Lasmézas, J. P. Deslys, *J. Virol.* **2003**, *77*, 8462–8469.
- [36] F. Yang, G. P. Lim, A. N. Begum, O. J. Ubeda, M. R. Simmons, S. S. Ambegaokar, P. P. Chen, R. Kaye, C. G. Glabe, S. A. Frautschy, G. M. Cole, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 5892–5901.
- [37] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908–2953.
- [38] S. M. Chafekar, M. Merko, E. W. Meijer, D. Viertel, H. A. Lashuel, F. Baas, W. Scheper, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1857–1864.
- [39] S. Peluso, T. Ruckle, C. Lehmann, M. Mutter, C. Peggion, M. Crisma, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 432–437.
- [40] M. Mutter, E. Altmann, K. H. Altmann, R. Hersperger, P. Koziej, K. Nebel, G. Tuchscherer, S. Vuilleumier, H. U. Gremlich, K. Mueller, *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 835–847.
- [41] M. Mutter, *Trends Biochem. Sci.* **1988**, *13*, 260–265.
- [42] Y. Singh, G. T. Dolphin, J. Razkin, P. Dumy, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1298–1314.
- [43] D. Boturyn, J.-L. Coll, E. Garanger, M.-C. Favrot, P. Dumy, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5730–5739.
- [44] O. Renaudet, P. Dumy, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 243–246.
- [45] S. Grigalevicius, S. Chierici, O. Renaudet, R. Lo-Man, E. Dériaud, C. Leclerc, P. Dumy, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1149–1159.
- [46] G. T. Dolphin, P. Dumy, J. Garcia, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2765–2768; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2699–2702.
- [47] G. P. H. Dietz, M. Bahr, *Mol. Cell. Neurosci.* **2004**, *27*, 85–131.
- [48] G. P. H. Dietz, M. Bahr, *Brain Res. Bull.* **2005**, *68*, 103–114.
- [49] S. R. Schwarze, A. Ho, A. Vocero-Akbani, S. F. Dowdy, *Science* **1999**, *285*, 1569–1572.
- [50] T. Kimmerlin, D. Seebach, *J. Pept. Res.* **2005**, *65*, 229–260.
- [51] W. Zeng, S. Ghosh, M. Macris, J. Pagnon, D. C. Jackson, *Vaccine* **2001**, *19*, 3843–3852.
- [52] K. Rose, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30–33.
- [53] G. J. Atwell, B. F. Cain, B. C. Baguley, G. J. Finlay, W. Denny, *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 1481–1485.
- [54] H. I. LeVine, *Methods Enzymol.* **1999**, *309*, 274–284.
- [55] H. LeVine, III, *Protein Sci.* **1993**, *2*, 404–410.
- [56] R. J. Chalfour, R. W. McLaughlin, L. Lavoie, C. Morissette, N. Tremblay, M. Boule, P. Sarazin, D. Stea, D. Lacombe, P. Tremblay, F. Gervais, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 34874–34881.
- [57] J. Kim, L. Orstead, S. Randle, R. Price, L. Smithson, C. Zwizinski, D. W. Dickson, T. Golde, E. McGowan, *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 627–633.
- [58] M. A. Findeis, G. M. Musso, C. C. Anco-Muendel, H. W. Benjamin, A. M. Hundal, J.-J. Lee, J. Chin, M. Kelley, J. Wakefield, N. J. Hayward, S. M. Molineaux, *Biochemistry* **1999**, *38*, 6791–6800.
- [59] F. G. De Felice, M. N. N. Vieira, L. M. Saraiva, J. D. Figueroa-Villar, J. Garcia-Abreu, R. Liu, L. Chang, W. L. Klein, S. T. Ferreira, *FASEB J.* **2004**, *18*, 1366–1372.
- [60] J. Luo, T. Chuang, J. Cheung, J. Quan, J. Tsai, C. Sullivan, R. F. Hector, M. J. Reed, K. Meszaros, S. R. King, T. J. Carlson, G. M. Reaven, *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *346*, 77–79.
- [61] Y. Goodman, M. R. Steiner, S. M. Steiner, M. P. Mattson, *Brain Res.* **1994**, *654*, 171–176.
- [62] T. Tomiyama, A. Shoji, K.-i. Kataoka, Y. Suwa, S. Asano, H. Kaneko, N. Endo, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 6839–6844.
- [63] T. Tomiyama, S. Asano, Y. Suwa, T. Morita, K.-i. Kataoka, H. Mori, N. Endo, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *204*, 76–83.
- [64] E. Gazit, *FASEB J.* **2002**, *16*, 77–83.
- [65] L. O. Tjernberg, D. J. E. Callaway, A. Tjernberg, S. Hahne, C. Lilliehook, L. Terenius, J. Thyberg, C. Nordstedt, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 12619–12625.
- [66] S. Taniguchi, N. Suzuki, M. Masuda, S. Hisanaga, T. Iwatsubo, M. Goedert, M. Hasegawa, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 7614–7623.
- [67] W. A. Denny, G. J. Atwell, B. C. Baguley, L. P. G. Wakelin, *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1568–1574.
- [68] G. T. Dolphin, M. Ouberaï, P. Dumy, J. Garcia, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1613–1623.
- [69] A. R. Khomutov, R. M. Khmutov, *Biorg. Khim.* **1996**, *22*, 557–559.
- [70] S. S.-S. Wang, Y.-T. Chen, P.-H. Chen, K.-N. Liu, *Biochem. Eng. J.* **2006**, *29*, 129–138.

Received: October 9, 2007
Published online on March 10, 2008

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Vollhardt, K. P. C.; Schore, N. E. Acide amines, peptides, protéines et acides nucléiques. *Traité de Chimie Organique* ed. De Boeck & Larcier, Paris. **1999**, 1158-1159.
2. Grateau, G.; Verine, J.; Delpech, M.; Ries, M. Les amyloses, un modèle de maladie du repliement des protéines. *Med. Sci. (Paris)* **2005**, 21, 627-633.
3. Chiti, F.; Dobson, C. M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* **2006**, 75, 333-366.
4. Cohen, A.S.; Shirahama, T.; Skinner, M. Electron Microscopy of Amyloid. In: J. R. Harris, Editor, *Electron Microscopy of Proteins*, Academic Press, New York, **1982**, pp. 165-205.
5. Klunk, W. E.; Jacob, R. F.; Mason, R. P. Quantifying amyloid by congo red spectral shift assay. *Methods Enzymol.* **1999**, 309, 285-305. Puchtler, H.; Sweat, F. Congo red as a stain for fluorescence microscopy of amyloid. *J. Histochem. Cytochem.* **1965**, 13, 693-694.
6. a) LeVine, H., 3rd. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* **1993**, 2, 404-410. b) LeVine, H., 3rd. Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods Enzymol.* **1999**, 309, 274-284.
7. Eanes, E. D.; Glenner, G. G. X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J. Histochem. Cytochem.* **1968**, 16, 673-677.
8. a) Makin, O. S.; Atkins, E.; Sikorski, P.; Johansson, J.; Serpell, L. C. Molecular basis for amyloid fibril formation and stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102, 315-320. b) Nelson, R.; Sawaya, M. R.; Balbirnie, M.; Madsen, A. O.; Riek, C.; Grothe, R.; Eisenberg, D. Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* **2005**, 435, 773-778.
9. Serpell, L. C.; Sunde, M.; Benson, M. D.; Tennent, G. A.; Pepys, M. B.; Fraser, P. E. The protofilament substructure of amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.* **2000**, 300, 1033-1039.
10. Sunde, M.; Blake, C. The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Adv Protein Chem* **1997**, 50, 123-159.
11. Tycko, R. Progress towards a molecular-level structural understanding of amyloid fibrils. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, 14, 96-103.
12. Makin, O. S.; Serpell, L. C. Structures for amyloid fibrils. *FEBS J.* **2005**, 272, 5950-5961.
13. a) Kodali, R.; Wetzel, R. Polymorphism in the intermediates and products of amyloid assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, 17, 48-57. b) Petkova, A. T.; Leapman, R. D.; Guo, Z.; Yau, W. M.; Mattson, M. P.; Tycko, R. Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Science* **2005**, 307, 262-265.
14. Petkova, A. T.; Ishii, Y.; Balbach, J. J.; Antzutkin, O. N.; Leapman, R. D.; Delaglio, F.; Tycko, R. A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, 16742-16747.
15. Petkova, A. T.; Yau, W. M.; Tycko, R. Experimental constraints on quaternary structure in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Biochemistry* **2006**, 45, 498-512.
16. Ritter, C.; Maddelein, M. L.; Siemer, A. B.; Luhrs, T.; Ernst, M.; Meier, B. H.; Saupe, S. J.; Riek, R. Correlation of structural elements and infectivity of the HET-s prion. *Nature* **2005**, 435, 844-848.
17. Kajava, A. V.; Aebi, U.; Steven, A. C. The parallel superpleated beta-structure as a model for amyloid fibrils of human amylin. *J. Mol. Biol.* **2005**, 348, 247-252.
18. a) Pedersen, J. S.; Christensen, G.; Otzen, D. E. Modulation of S6 fibrillation by unfolding rates and gatekeeper residues. *J. Mol. Biol.* **2004**, 341, 575-588. b) Serio, T. R.; Cashikar, A. G.; Kowal, A. S.; Sawicki, G. J.; Moslehi, J. J.; Serpell, L.; Arnsdorf, M. F.; Lindquist, S. L. Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science* **2000**, 289, 1317-1321.
19. Harper, J. D.; Wong, S. S.; Lieber, C. M.; Lansbury, P. T. Observation of metastable Abeta amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem. Biol.* **1997**, 4, 119-125.
20. Walsh, D. M.; Lomakin, A.; Benedek, G. B.; Condron, M. M.; Teplow, D. B. Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 22364-22372.
21. Walsh, D. M.; Hartley, D. M.; Kusumoto, Y.; Fezoui, Y.; Condron, M. M.; Lomakin, A.; Benedek, G. B.; Selkoe, D. J.; Teplow, D. B. Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 25945-25952.
22. Bitan, G.; Kirkitadze, M. D.; Lomakin, A.; Vollers, S. S.; Benedek, G. B.; Teplow, D. B. Amyloid beta -protein (Abeta) assembly: Abeta 40 and Abeta 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100, 330-335.
23. Kayed, R.; Sokolov, Y.; Edmonds, B.; McIntire, T. M.; Milton, S. C.; Hall, J. E.; Glabe, C. G. Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 46363-46366.

24. Conway, K. A.; Harper, J. D.; Lansbury, P. T., Jr. Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry* **2000**, *39*, 2552-2563.
25. Quintas, A.; Vaz, D. C.; Cardoso, I.; Saraiva, M. J.; Brito, R. M. Tetramer dissociation and monomer partial unfolding precedes protofibril formation in amyloidogenic transthyretin variants. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 27207-27213.
26. Gosal, W. S.; Morten, I. J.; Hewitt, E. W.; Smith, D. A.; Thomson, N. H.; Radford, S. E. Competing pathways determine fibril morphology in the self-assembly of beta2-microglobulin into amyloid. *J. Mol. Biol.* **2005**, *351*, 850-864.
27. Lorenzo, A.; Yankner, B. A. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 12243-12247.
28. Pike, C. J.; Walencewicz, A. J.; Glabe, C. G.; Cotman, C. W. In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res.* **1991**, *563*, 311-314.
29. Hartley, D. M.; Walsh, D. M.; Ye, C. P.; Diehl, T.; Vasquez, S.; Vassilev, P. M.; Teplow, D. B.; Selkoe, D. J. Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 8876-8884.
30. Geula, C.; Wu, C. K.; Saroff, D.; Lorenzo, A.; Yuan, M.; Yankner, B. A. Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. *Nat. Med.* **1998**, *4*, 827-831.
31. a) Lue, L. F.; Kuo, Y. M.; Roher, A. E.; Brachova, L.; Shen, Y.; Sue, L.; Beach, T.; Kurth, J. H.; Rydel, R. E.; Rogers, J. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **1999**, *155*, 853-862. b) McLean, C. A.; Cherny, R. A.; Fraser, F. W.; Fuller, S. J.; Smith, M. J.; Beyreuther, K.; Bush, A. I.; Masters, C. L. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **1999**, *46*, 860-866. c) Wang, J.; Dickson, D. W.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp. Neurol.* **1999**, *158*, 328-337.
32. Lambert, M. P.; Barlow, A. K.; Chromy, B. A.; Edwards, C.; Freed, R.; Liosatos, M.; Morgan, T. E.; Rozovsky, I.; Trommer, B.; Viola, K. L.; Wals, P.; Zhang, C.; Finch, C. E.; Krafft, G. A.; Klein, W. L. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 6448-6453.
33. Sousa, M. M.; Cardoso, I.; Fernandes, R.; Guimaraes, A.; Saraiva, M. J. Deposition of transthyretin in early stages of familial amyloidotic polyneuropathy: evidence for toxicity of nonfibrillar aggregates. *Am. J. Pathol.* **2001**, *159*, 1993-2000.
34. Ligue Européenne Contre la Maladie d'Alzheimer, <http://www.maladiealzheimer.fr/index.htm>
35. Alzheimer, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und phychish-Gerichtliche Medizin, (Berlin)* **1907**, *64*, 146-148.
36. Blennow, K.; de Leon, M. J.; Zetterberg, H. Alzheimer's disease. *Lancet* **2006**, *368*, 387-403.
37. Hardy, J.; Selkoe, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **2002**, *297*, 353-356.
38. Vassar, R.; Bennett, B. D.; Babu-Khan, S.; Kahn, S.; Mendiaz, E. A.; Denis, P.; Teplow, D. B.; Ross, S.; Amarante, P.; Loeloff, R.; Luo, Y.; Fisher, S.; Fuller, J.; Edenson, S.; Lile, J.; Jarosinski, M. A.; Biere, A. L.; Curran, E.; Burgess, T.; Louis, J. C.; Collins, F.; Treanor, J.; Rogers, G.; Citron, M. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **1999**, *286*, 735-741.
39. Clippingdale, A. B.; Wade, J. D.; Barrow, C. J. The amyloid-beta peptide and its role in Alzheimer's disease. *J. Pept. Sci.* **2001**, *7*, 227-249.
40. Iwatsubo, T.; Odaka, A.; Suzuki, N.; Mizusawa, H.; Nukina, N.; Ihara, Y. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* **1994**, *13*, 45-53.
41. Castillo, G. M.; Ngo, C.; Cummings, J.; Wight, T. N.; Snow, A. D. Perlecan binds to the beta-amyloid proteins (A beta) of Alzheimer's disease, accelerates A beta fibril formation, and maintains A beta fibril stability. *J. Neurochem.* **1997**, *69*, 2452-2465.
42. a) Kisilevsky, R. Proteoglycans, glycosaminoglycans, amyloid-enhancing factor, and amyloid deposition. *J. Intern. Med.* **1992**, *232*, 515-516. b) van Horsen, J.; Wesseling, P.; van den Heuvel, L. P.; de Waal, R. M.; Verbeek, M. M. Heparan sulphate proteoglycans in Alzheimer's disease and amyloid-related disorders. *Lancet Neurol.* **2003**, *2*, 482-492.
43. Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Tung, Y. C.; Quinlan, M.; Wisniewski, H. M.; Binder, L. I. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, *83*, 4913-4917. Nukina, N.; Ihara, Y. One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *J. Biochem.* **1986**, *99*, 1541-1544.

44. Iqbal, K.; Alonso Adel, C.; Chen, S.; Chohan, M. O.; El-Akkad, E.; Gong, C. X.; Khatoon, S.; Li, B.; Liu, F.; Rahman, A.; Tanimukai, H.; Grundke-Iqbal, I. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1739, 198-210.
45. Lleo, A.; Greenberg, S. M.; Growdon, J. H. Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Med.* **2006**, 57, 513-533.
46. Michaelis, E. K. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. Neurobiol.* **1998**, 54, 369-415.
47. Areosa, S. A.; Sherriff, F.; McShane, R. Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev.* **2005**, CD003154.
48. Chang, W. P.; Koelsch, G.; Wong, S.; Downs, D.; Da, H.; Weerasena, V.; Gordon, B.; Devasamudram, T.; Bilcer, G.; Ghosh, A. K.; Tang, J. In vivo inhibition of Abeta production by memapsin 2 (beta-secretase) inhibitors. *J. Neurochem.* **2004**, 89, 1409-1416.
49. Siemers, E.; Skinner, M.; Dean, R. A.; Gonzales, C.; Satterwhite, J.; Farlow, M.; Ness, D.; May, P. C. Safety, tolerability, and changes in amyloid beta concentrations after administration of a gamma-secretase inhibitor in volunteers. *Clin. Neuropharmacol.* **2005**, 28, 126-132.
50. Etcheberrigaray, R.; Tan, M.; Dewachter, I.; Kuiperi, C.; Van der Auwera, I.; Wera, S.; Qiao, L.; Bank, B.; Nelson, T. J.; Kozikowski, A. P.; Van Leuven, F.; Alkon, D. L. Therapeutic effects of PKC activators in Alzheimer's disease transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101, 11141-11146.
51. Solomon, B.; Koppel, R.; Hanan, E.; Katzav, T. Monoclonal antibodies inhibit in vitro fibrillar aggregation of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 93, 452-455.
52. Schenk, D.; Hagen, M.; Seubert, P. Current progress in beta-amyloid immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* **2004**, 16, 599-606.
53. Orgogozo, J. M.; Gilman, S.; Dartigues, J. F.; Laurent, B.; Puel, M.; Kirby, L. C.; Jouanny, P.; Dubois, B.; Eisner, L.; Flitman, S.; Michel, B. F.; Boada, M.; Frank, A.; Hock, C. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* **2003**, 61, 46-54.
54. Schenk, D.; Hagen, M.; Seubert, P. Current progress in beta-amyloid immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* **2004**, 16, 599-606.
55. Gorevic, P. D.; Castano, E. M.; Sarma, R.; Frangione, B. Ten to fourteen residue peptides of Alzheimer's disease protein are sufficient for amyloid fibril formation and its characteristic x-ray diffraction pattern. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, 147, 854-862.
56. Burdick, D.; Soreghan, B.; Kwon, M.; Kosmoski, J.; Knauer, M.; Henschen, A.; Yates, J.; Cotman, C.; Glabe, C. Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 546-554.
57. Pike, C. J.; Overman, M. J.; Cotman, C. W. Amino-terminal deletions enhance aggregation of beta-amyloid peptides in vitro. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 23895-23898.
58. a) Tjernberg, L. O.; Naslund, J.; Lindqvist, F.; Johansson, J.; Karlstrom, A. R.; Thyberg, J.; Terenius, L.; Nordstedt, C. Arrest of beta-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 8545-8548. b) Tjernberg, L. O.; Lilliehook, C.; Callaway, D. J.; Naslund, J.; Hahne, S.; Thyberg, J.; Terenius, L.; Nordstedt, C. Controlling amyloid beta-peptide fibril formation with protease-stable ligands. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 12601-12605.
59. Tjernberg, L. O.; Callaway, D. J.; Tjernberg, A.; Hahne, S.; Lilliehook, C.; Terenius, L.; Thyberg, J.; Nordstedt, C. A molecular model of Alzheimer amyloid beta-peptide fibril formation. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 12619-12625.
60. Tjernberg, L.; Hosia, W.; Bark, N.; Thyberg, J.; Johansson, J. Charge attraction and beta propensity are necessary for amyloid fibril formation from tetrapeptides. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 43243-43246.
61. Yankner, B. A.; Duffy, L. K.; Kirschner, D. A. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* **1990**, 250, 279-282.
62. Pike, C. J.; Walencewicz-Wasserman, A. J.; Kosmoski, J.; Cribbs, D. H.; Glabe, C. G.; Cotman, C. W. Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J. Neurochem.* **1995**, 64, 253-265.
63. Mazar, Y.; Gilead, S.; Benhar, I.; Gazit, E. Identification and characterization of a novel molecular-recognition and self-assembly domain within the islet amyloid polypeptide. *J. Mol. Biol.* **2002**, 322, 1013-1024.
64. Tenidis, K.; Waldner, M.; Bernhagen, J.; Fischle, W.; Bergmann, M.; Weber, M.; Merkle, M. L.; Voelter, W.; Brunner, H.; Kapurniotu, A. Identification of a penta- and hexapeptide of islet amyloid polypeptide (IAPP) with amyloidogenic and cytotoxic properties. *J. Mol. Biol.* **2000**, 295, 1055-1071.
65. Jones, S.; Manning, J.; Kad, N. M.; Radford, S. E. Amyloid-forming peptides from beta2-microglobulin-Insights into the mechanism of fibril formation in vitro. *J. Mol. Biol.* **2003**, 325, 249-257.

66. Wood, S. J.; Wetzel, R.; Martin, J. D.; Hurler, M. R. Prolines and amyloidogenicity in fragments of the Alzheimer's peptide beta/A4. *Biochemistry* **1995**, *34*, 724-730.
67. Hilbich, C.; Kisters-Woike, B.; Reed, J.; Masters, C. L.; Beyreuther, K. Substitutions of hydrophobic amino acids reduce the amyloidogenicity of Alzheimer's disease beta A4 peptides. *J. Mol. Biol.* **1992**, *228*, 460-473.
68. Esler, W. P.; Stimson, E. R.; Ghilardi, J. R.; Lu, Y. A.; Felix, A. M.; Vinters, H. V.; Mantyh, P. W.; Lee, J. P.; Maggio, J. E. Point substitution in the central hydrophobic cluster of a human beta-amyloid congener disrupts peptide folding and abolishes plaque competence. *Biochemistry* **1996**, *35*, 13914-13921.
69. Terzi, E.; Holzemann, G.; Seelig, J. Reversible random coil-beta-sheet transition of the Alzheimer beta-amyloid fragment (25-35). *Biochemistry* **1994**, *33*, 1345-1350.
70. Dobeli, H.; Draeger, N.; Huber, G.; Jakob, P.; Schmidt, D.; Seilheimer, B.; Stuber, D.; Wipf, B.; Zulauf, M. A biotechnological method provides access to aggregation competent monomeric Alzheimer's 1-42 residue amyloid peptide. *Biotechnology (N Y)* **1995**, *13*, 988-993.
71. Hou, L.; Kang, I.; Marchant, R. E.; Zagorski, M. G. Methionine 35 oxidation reduces fibril assembly of the amyloid abeta-(1-42) peptide of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 40173-40176.
72. Williams, A. D.; Portelius, E.; Kheterpal, I.; Guo, J. T.; Cook, K. D.; Xu, Y.; Wetzel, R. Mapping abeta amyloid fibril secondary structure using scanning proline mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **2004**, *335*, 833-842.
73. Jarrett, J. T.; Berger, E. P.; Lansbury, P. T., Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **1993**, *32*, 4693-4697.
74. Shivaprasad, S.; Wetzel, R. An intersheet packing interaction in A beta fibrils mapped by disulfide cross-linking. *Biochemistry* **2004**, *43*, 15310-15317.
75. Shivaprasad, S.; Wetzel, R. Scanning cysteine mutagenesis analysis of Abeta-(1-40) amyloid fibrils. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 993-1000.
76. Gordon, D. J.; Meredith, S. C. Probing the role of backbone hydrogen bonding in beta-amyloid fibrils with inhibitor peptides containing ester bonds at alternate positions. *Biochemistry* **2003**, *42*, 475-485.
77. Esler, W. P.; Stimson, E. R.; Fishman, J. B.; Ghilardi, J. R.; Vinters, H. V.; Mantyh, P. W.; Maggio, J. E. Stereochemical specificity of Alzheimer's disease beta-peptide assembly. *Biopolymers* **1999**, *49*, 505-514.
78. Azriel, R.; Gazit, E. Analysis of the minimal amyloid-forming fragment of the islet amyloid polypeptide. An experimental support for the key role of the phenylalanine residue in amyloid formation. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 34156-34161.
79. Tracz, S. M.; Abedini, A.; Driscoll, M.; Raleigh, D. P. Role of aromatic interactions in amyloid formation by peptides derived from human Amylin. *Biochemistry* **2004**, *43*, 15901-15908.
80. Marek, P.; Abedini, A.; Song, B.; Kanungo, M.; Johnson, M. E.; Gupta, R.; Zaman, W.; Wong, S. S.; Raleigh, D. P. Aromatic interactions are not required for amyloid fibril formation by islet amyloid polypeptide but do influence the rate of fibril formation and fibril morphology. *Biochemistry* **2007**, *46*, 3255-3261.
81. Otzen, D. E.; Kristensen, O.; Oliveberg, M. Designed protein tetramer zipped together with a hydrophobic Alzheimer homology: a structural clue to amyloid assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 9907-9912.
82. Brack, A.; Orgel, L. E. Beta structures of alternating polypeptides and their possible prebiotic significance. *Nature* **1975**, *256*, 383-387.
83. Xiong, H.; Buckwalter, B. L.; Shieh, H. M.; Hecht, M. H. Periodicity of polar and nonpolar amino acids is the major determinant of secondary structure in self-assembling oligomeric peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 6349-6353.
84. West, M. W.; Wang, W.; Patterson, J.; Mancias, J. D.; Beasley, J. R.; Hecht, M. H. De novo amyloid proteins from designed combinatorial libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 11211-11216.
85. Wang, W.; Hecht, M. H. Rationally designed mutations convert de novo amyloid-like fibrils into monomeric beta-sheet proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 2760-2765.
86. Lashuel, H. A.; LaBrenz, S. R.; Woo, L.; Serpell, L. C.; Kelly, J. W. Protofilaments, filaments, ribbons, and fibrils from peptidomimetic self-assembly: implications for amyloid fibril formation and materials science. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5262-5277.
87. Deechongkit, S.; Powers, E. T.; You, S. L.; Kelly, J. W. Controlling the morphology of cross beta-sheet assemblies by rational design. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8562-8570.
88. Tuchscherer, G.; Chandravarkar, A.; Camus, M. S.; Berard, J.; Murat, K.; Schmid, A.; Mimna, R.; Lashuel, H. A.; Mutter, M. Switch-peptides as folding precursors in self-assembling peptides and amyloid fibrillogenesis. *Biopolymers* **2007**, *88*, 239-252.

89. Mimna, R.; Camus, M. S.; Schmid, A.; Tuchscherer, G.; Lashuel, H. A.; Mutter, M. Disruption of amyloid-derived peptide assemblies through the controlled induction of a beta-sheet to alpha-helix transformation: application of the switch concept. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2007**, *46*, 2681-2684.
90. Mason, J. M.; Arndt, K. M. Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem* **2004**, *5*, 170-176.
91. Pagel, K.; Vagt, T.; Kokschi, B. Directing the secondary structure of polypeptides at will: from helices to amyloids and back again? *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3843-3850.
92. Kammerer, R. A.; Kostrewa, D.; Zurdo, J.; Detken, A.; Garcia-Echeverria, C.; Green, J. D.; Muller, S. A.; Meier, B. H.; Winkler, F. K.; Dobson, C. M.; Steinmetz, M. O. Exploring amyloid formation by a de novo design. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 4435-4440.
93. Steinmetz, M. O.; Gattin, Z.; Verel, R.; Ciani, B.; Stromer, T.; Green, J. M.; Tittmann, P.; Schulze-Briese, C.; Gross, H.; van Gunsteren, W. F.; Meier, B. H.; Serpell, L. C.; Muller, S. A.; Kammerer, R. A. Atomic models of de novo designed cc beta-Met amyloid-like fibrils. *J. Mol. Biol.* **2008**, *376*, 898-912.
94. Pagel, K.; Vagt, T.; Kohajda, T.; Kokschi, B. From alpha-helix to beta-sheet--a reversible metal ion induced peptide secondary structure switch. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2500-2502.
95. Pagel, K.; Seri, T.; von Berlepsch, H.; Griebel, J.; Kirmse, R.; Bottcher, C.; Kokschi, B. How metal ions affect amyloid formation: Cu²⁺- and Zn²⁺-sensitive peptides. *Chembiochem* **2008**, *9*, 531-536.
96. a) Mutter, M.; Altmann, K. H.; Tuchscherer, G.; Vuilleumier, S. Strategies for the de novo design of proteins. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 771-85. b) Dumy, P.; Favrot, M.-C.; Boturnyn, D.; Coll, J.-L. Synthesis and characterization of novel systems for guidance and vectorization of compounds having a therapeutic activity. Brevet PCT/FR2003/002773 WO 2004/02894, 19 septembre 2003.
97. Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Cervigni, S.; Sila, U.; Sun, X.; Mutter, M. A convenient synthesis of cyclic peptides as regioselectively addressable functionalized templates (RAFT). *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1255-1258.
98. Garanger, E.; Boturnyn, D.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. Chemoselectively addressable template: a valuable tool for the engineering of molecular conjugates. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2402-2410.
99. Singh, Y.; Dolphin, G. T.; Razkin, J.; Dumy, P. Synthetic Peptide templates for molecular recognition: recent advances and applications. *Chembiochem* **2006**, *7*, 1298-1314.
100. Boturnyn, D.; Defrancq, E.; Dolphin, G. T.; Garcia, J.; Labbe, P.; Renaudet, O.; Dumy, P. RAFT Nano-constructs: surfing to biological applications. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 224-240.
101. Boturnyn, D.; Coll, J. L.; Garanger, E.; Favrot, M. C.; Dumy, P. Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5730-5739.
102. Foillard S. Synthèse de nouveaux vecteurs peptidiques pour la thérapie anticancéreuse et l'imagerie tumorale. 200 p. Thèse : *Chimie-biologie* Université Joseph Fourier, **2008**.
103. Grigalevicius, S.; Chierici, S.; Renaudet, O.; Lo-Man, R.; Deriaud, E.; Leclerc, C.; Dumy, P. Chemoselective assembly and immunological evaluation of multiepitopic glycoconjugates bearing clustered Tn antigen as synthetic anticancer vaccines. *Bioconjug Chem* **2005**, *16*, 1149-1159.
104. Futaki, S. Peptide ion channels: design and creation of function. *Biopolymers* **1998**, *47*, 75-81.
105. Tuchscherer, G.; Servis, C.; Corradin, G.; Blum, U.; Rivier, J.; Mutter, M. Total chemical synthesis, characterization, and immunological properties of an MHC class I model using the TASP concept for protein de novo design. *Protein Sci.* **1992**, *1*, 1377-1386.
106. a) Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Esposito, G.; Nicula, S.; Mutter, M. Solution structure of regioselectively addressable functionalized templates: an NMR and restrained molecular dynamics investigation. *Biopolymers* **1996**, *39*, 297-308. b) Peluso, S.; Ruckle, T.; Lehmann, C.; Mutter, M.; Peggion, C.; Crisma, M. Crystal structure of a synthetic cyclodecapeptide for template-assembled synthetic protein design. *Chembiochem* **2001**, *2*, 432-437. c) Peng, Z. H. Solid phase synthesis and NMR conformational studies on cyclic decapeptide template molecule. *Biopolymers* **1999**, *49*, 565-574.
107. Dolphin, G. T.; Dumy, P.; Garcia, J. Control of amyloid beta-peptide protofibril formation by a designed template assembly. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2006**, *45*, 2699-2702.
108. a) Langenhan, J. M.; Thorson, J. S. Recent carbohydrate-based chemoselective ligation applications. *Curr. Org. Synth.* **2005**, *2*, 59-81. Kent, S. Total chemical synthesis of enzymes. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 574-593. b) Lemieux, G. A.; Bertozzi, C. R. Chemoselective ligation reactions with proteins, oligosaccharides and cells. *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 506-513.
109. Su, S.; Acquilano, D. E.; Arumugasamy, J.; Beeler, A. B.; Eastwood, E. L.; Giguere, J. R.; Lan, P.; Lei, X.; Min, G. K.; Yeager, A. R.; Zhou, Y.; Panek, J. S.; Snyder, J. K.; Schaus, S. E.; Porco, J. A., Jr. Convergent synthesis of a complex oxime library using chemical domain shuffling. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2751-2754.

110. Roberts, K. D.; Lambert, J. N.; Ede, N. J.; Bray, A. M. Preparation of cyclic peptide libraries using intramolecular oxime formation. *J. Pept. Sci.* **2004**, *10*, 659-665.
111. Edupuganti, O. P.; Defrancq, E.; Dumy, P. Head-to-tail oxime cyclization of oligodeoxynucleotides for the efficient synthesis of circular DNA analogues. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8708-8710.
112. Hang, H. C.; Bertozzi, C. R. Chemoselective approaches to glycoprotein assembly. *Acc Chem Res* **2001**, *34*, 727-736.
113. Forget, D.; Boturyn, D.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Dumy, P. Highly efficient synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates: chemoselective oxime and thiazolidine formation. *Chemistry* **2001**, *7*, 3976-3984.
114. Chen, X.; Lee, G. S.; Zettl, A.; Bertozzi, C. R. Biomimetic engineering of carbon nanotubes by using cell surface mucin mimics. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2004**, *43*, 6111-6116.
115. Kochendoerfer, G. G.; Kent, S. B. Chemical protein synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 665-671.
116. Singh, Y.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. Preparation of a multitopic glycopeptide-oligonucleotide conjugate. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1359-1362.
117. Merrifield, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
118. Sieber, P. A new acid-labile anchor group for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides by the Fmoc method. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2107-2110.
119. Mutter, M.; Nefzi, A.; Sato, T.; Sun, X.; Wahl, F.; Wöhr, T. Pseudo-prolines (psi Pro) for accessing "inaccessible" peptides. *Pept. Res.* **1995**, *8*, 145-153.
120. Foillard, S.; Rasmussen, M. O.; Razkin, J.; Boturyn, D.; Dumy, P. 1-Ethoxyethylidene, a new group for the stepwise SPPS of aminooxyacetic acid containing peptides. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 983-991.
121. Kamber, B.; Hartmann, A.; Eisler, K.; Riniker, B.; Rink, H.; Sieber, P.; Rittel, W. The synthesis of cystine peptides by iodine oxidation of S-tritylcysteine and S-acetamidomethylcysteine peptides. *Helv. Chim. Acta* **1980**, *63*, 899-915.
122. Yajima, H.; Fujii, N.; Funakoshi, S.; Watanabe, T.; Murayama, E.; Otaka, A. New strategy for the chemical synthesis of proteins. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 805-819.
123. Jencks, W. P. Mechanism of oxime and semicarbazone formation. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 475-481.
124. Garanger, E. Conception, synthèse et caractérisation de nouveaux systèmes de guidage et de vectorisation pour la cancérologie. 280 p. Thèse : *Chimie-biologie* Université Joseph Fourier, **2005**.
125. a) Klement, K.; Wieligmann, K.; Meinhardt, J.; Hortschansky, P.; Richter, W.; Fandrich, M. Effect of different salt ions on the propensity of aggregation and on the structure of Alzheimer's A β (1-40) amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.* **2007**, *373*, 1321-1333. b) Sikkink, L. A.; Ramirez-Alvarado, M. Salts enhance both protein stability and amyloid formation of an immunoglobulin light chain. *Biophys. Chem.* **2008**, *135*, 25-31.
126. Munishkina, L. A.; Henriques, J.; Uversky, V. N.; Fink, A. L. Role of protein-water interactions and electrostatics in alpha-synuclein fibril formation. *Biochemistry* **2004**, *43*, 3289-3300.
127. Zhang, Y.; Cremer, P. S. Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 658-663.
128. Stsiapura, V. I.; Maskevich, A. A.; Kuzmitsky, V. A.; Turoverov, K. K.; Kuznetsova, I. M. Computational study of thioflavin T torsional relaxation in the excited state. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 4829-4835.
129. Krebs, M. R.; Bromley, E. H.; Donald, A. M. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J. Struct. Biol.* **2005**, *149*, 30-37.
130. Groenning, M.; Norrman, M.; Flink, J. M.; van de Weert, M.; Bukrinsky, J. T.; Schluckebier, G.; Frokjaer, S. Binding mode of Thioflavin T in insulin amyloid fibrils. *J. Struct. Biol.* **2007**, *159*, 483-497.
131. Dolphin, G. T.; Ouberaï, M.; Dumy, P.; Garcia, J. Designed amyloid beta peptide fibril - a tool for high-throughput screening of fibril inhibitors. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1613-1623.
132. Findeis, M. A.; Musso, G. M.; Arico-Muendel, C. C.; Benjamin, H. W.; Hundal, A. M.; Lee, J. J.; Chin, J.; Kelley, M.; Wakefield, J.; Hayward, N. J.; Molineaux, S. M. Modified-peptide inhibitors of amyloid beta-peptide polymerization. *Biochemistry* **1999**, *38*, 6791-6800.
133. Chalifour, R. J.; McLaughlin, R. W.; Lavoie, L.; Morissette, C.; Tremblay, N.; Boule, M.; Sarazin, P.; Stea, D.; Lacombe, D.; Tremblay, P.; Gervais, F. Stereoselective interactions of peptide inhibitors with the beta-amyloid peptide. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 34874-34881.
134. Ghanta, J.; Shen, C. L.; Kiessling, L. L.; Murphy, R. M. A strategy for designing inhibitors of beta-amyloid toxicity. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 29525-29528.

135. Lowe, T. L.; Strzelec, A.; Kiessling, L. L.; Murphy, R. M. Structure-function relationships for inhibitors of beta-amyloid toxicity containing the recognition sequence KLVFF. *Biochemistry* **2001**, *40*, 7882-7889.
136. Gibson, T. J.; Murphy, R. M. Design of peptidyl compounds that affect beta-amyloid aggregation: importance of surface tension and context. *Biochemistry* **2005**, *44*, 8898-8907.
137. Cacace, M. G.; Landau, E. M.; Ramsden, J. J. The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena. *Q. Rev. Biophys.* **1997**, *30*, 241-277.
138. a) Arakawa, T.; Tsumoto, K. The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: not facilitate refolding, but suppress aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *304*, 148-152. b) Xie, Q.; Guo, T.; Lu, J.; Zhou, H. M. The guanidine like effects of arginine on aminoacylase and salt-induced molten globule state. *Int J. Biochem. Cell Biol* **2004**, *36*, 296-306.
139. a) Kita, Y.; Arakawa, T.; Lin, T. Y.; Timasheff, S. N. Contribution of the surface free energy perturbation to protein-solvent interactions. *Biochemistry* **1994**, *33*, 15178-15189. b) Tsumoto, K.; Umetsu, M.; Kumagai, I.; Ejima, D.; Philo, J. S.; Arakawa, T. Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnol Prog* **2004**, *20*, 1301-1308.
140. Tonelli, A. The effects of isolated N-methylated residues on the conformational characteristics of polypeptides. *Biopolymers* **1976**, *15*, 1615-1622.
141. Hughes, E.; Burke, R. M.; Doig, A. J. Inhibition of toxicity in the beta-amyloid peptide fragment beta - (25-35) using N-methylated derivatives: a general strategy to prevent amyloid formation. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 25109-25115.
142. Gordon, D. J.; Sciarretta, K. L.; Meredith, S. C. Inhibition of beta-amyloid(40) fibrillogenesis and disassembly of beta-amyloid(40) fibrils by short beta-amyloid congeners containing N-methyl amino acids at alternate residues. *Biochemistry* **2001**, *40*, 8237-8245.
143. Soto, C.; Kindy, M. S.; Baumann, M.; Frangione, B. Inhibition of Alzheimer's amyloidosis by peptides that prevent beta-sheet conformation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *226*, 672-680.
144. Permanne, B.; Adessi, C.; Saborio, G. P.; Fraga, S.; Frossard, M. J.; Van Dorpe, J.; Dewachter, I.; Banks, W. A.; Van Leuven, F.; Soto, C. Reduction of amyloid load and cerebral damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by treatment with a beta-sheet breaker peptide. *FASEB J.* **2002**, *16*, 860-862.
145. Rzepecki, P.; Schrader, T. beta-Sheet ligands in action: KLVFF recognition by aminopyrazole hybrid receptors in water. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3016-3025.
146. Sato, T.; Kienlen-Campard, P.; Ahmed, M.; Liu, W.; Li, H.; Elliott, J. I.; Aimoto, S.; Constantinescu, S. N.; Octave, J. N.; Smith, S. O. Inhibitors of amyloid toxicity based on beta-sheet packing of Abeta40 and Abeta42. *Biochemistry* **2006**, *45*, 5503-5516.
147. Austen, B. M.; Paleologou, K. E.; Ali, S. A.; Qureshi, M. M.; Allsop, D.; El-Agnaf, O. M. Designing peptide inhibitors for oligomerization and toxicity of Alzheimer's beta-amyloid peptide. *Biochemistry* **2008**, *47*, 1984-1992.
148. Taniguchi, S.; Suzuki, N.; Masuda, M.; Hisanaga, S.; Iwatsubo, T.; Goedert, M.; Hasegawa, M. Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 7614-7623.
149. Merlini, G.; Ascari, E.; Amboldi, N.; Bellotti, V.; Arbustini, E.; Perfetti, V.; Ferrari, M.; Zorzoli, I.; Marinone, M. G.; Garini, P.; et al. Interaction of the anthracycline 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin with amyloid fibrils: inhibition of amyloidogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 2959-2963.
150. Tagliavini, F.; McArthur, R. A.; Canciani, B.; Giaccone, G.; Porro, M.; Bugiani, M.; Lievens, P. M.; Bugiani, O.; Peri, E.; Dall'Ara, P.; Rocchi, M.; Poli, G.; Forloni, G.; Bandiera, T.; Varasi, M.; Suarato, A.; Cassutti, P.; Cervini, M. A.; Lansen, J.; Salmona, M.; Post, C. Effectiveness of anthracycline against experimental prion disease in Syrian hamsters. *Science* **1997**, *276*, 1119-1122.
151. Forloni, G.; Colombo, L.; Girola, L.; Tagliavini, F.; Salmona, M. Anti-amyloidogenic activity of tetracyclines: studies in vitro. *FEBS Lett.* **2001**, *487*, 404-407.
152. Tomiyama, T.; Shoji, A.; Kataoka, K.; Suwa, Y.; Asano, S.; Kaneko, H.; Endo, N. Inhibition of amyloid beta protein aggregation and neurotoxicity by rifampicin. Its possible function as a hydroxyl radical scavenger. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 6839-6844.
153. Ono, K.; Yoshiike, Y.; Takashima, A.; Hasegawa, K.; Naiki, H.; Yamada, M. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2003**, *87*, 172-181.
154. Ono, K.; Hasegawa, K.; Yoshiike, Y.; Takashima, A.; Yamada, M.; Naiki, H. Nordihydroguaiaretic acid potently breaks down pre-formed Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *J. Neurochem.* **2002**, *81*, 434-440.

155. Moss, M. A.; Varvel, N. H.; Nichols, M. R.; Reed, D. K.; Rosenberry, T. L. Nordihydroguaiaretic acid does not disaggregate beta-amyloid(1-40) protofibrils but does inhibit growth arising from direct protofibril association. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *66*, 592-600.
156. Ono, K.; Hasegawa, K.; Naiki, H.; Yamada, M. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *J. Neurosci. Res* **2004**, *75*, 742-750.
157. Pereira, M. A.; Grubbs, C. J.; Barnes, L. H.; Li, H.; Olson, G. R.; Eto, I.; Juliana, M.; Whitaker, L. M.; Kelloff, G. J.; Steele, V. E.; Lubet, R. A. Effects of the phytochemicals, curcumin and quercetin, upon azoxymethane-induced colon cancer and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary cancer in rats. *Carcinogenesis* **1996**, *17*, 1305-1311.
158. Lim, G. P.; Chu, T.; Yang, F.; Beech, W.; Frautschy, S. A.; Cole, G. M. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 8370-8377.
159. Yang, F.; Lim, G. P.; Begum, A. N.; Ubeda, O. J.; Simmons, M. R.; Ambegaokar, S. S.; Chen, P. P.; Kaye, R.; Glabe, C. G.; Frautschy, S. A.; Cole, G. M. Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 5892-5901.
160. Wischik, C. M.; Edwards, P. C.; Lai, R. Y.; Roth, M.; Harrington, C. R. Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 11213-11218.
161. International Conference on Alzheimer's disease (ICAD), 26-31 July 2008, Chicago, USA.
162. Gazova, Z.; Bellova, A.; Daxnerova, Z.; Imrich, J.; Kristian, P.; Tomascikova, J.; Bagelova, J.; Fedunova, D.; Antalík, M. Acridine derivatives inhibit lysozyme aggregation. *Eur Biophys. J.* **2008**, *37*, 1261-1270.
163. Howlett, D.; Cutler, P.; Heales, S.; Camilleri, P. Hemin and related porphyrins inhibit beta-amyloid aggregation. *FEBS Lett.* **1997**, *417*, 249-251.
164. Zhuang, Z. P.; Kung, M. P.; Hou, C.; Skovronsky, D. M.; Gur, T. L.; Plossl, K.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M.; Kung, H. F. Radioiodinated styrylbenzenes and thioflavins as probes for amyloid aggregates. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1905-1914.
165. Klunk, W. E.; Wang, Y.; Huang, G. F.; Debnath, M. L.; Holt, D. P.; Shao, L.; Hamilton, R. L.; Ikonovic, M. D.; DeKosky, S. T.; Mathis, C. A. The binding of 2-(4'-methylaminophenyl)benzothiazole to postmortem brain homogenates is dominated by the amyloid component. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 2086-2092.
166. a) Lerner, A.; Koss, E.; Debanne, S.; Rowland, D.; Smyth, K.; Friedland, R. Smoking and oestrogen-replacement therapy as protective factors for Alzheimer's disease. *Lancet* **1997**, *349*, 403-404. b) Ulrich, J.; Johansson-Locher, G.; Seiler, W. O.; Stahelin, H. B. Does smoking protect from Alzheimer's disease? Alzheimer-type changes in 301 unselected brains from patients with known smoking history. *Acta Neuropathol.* **1997**, *94*, 450-454.
167. a) Kihara, T.; Shimohama, S.; Sawada, H.; Kimura, J.; Kume, T.; Kochiyama, H.; Maeda, T.; Akaike, A. Nicotinic receptor stimulation protects neurons against beta-amyloid toxicity. *Ann. Neurol.* **1997**, *42*, 159-163. b) Zamani, M. R.; Allen, Y. S.; Owen, G. P.; Gray, J. A. Nicotine modulates the neurotoxic effect of beta-amyloid protein(25-35) in hippocampal cultures. *Neuroreport* **1997**, *8*, 513-517.
168. a) Salomon, A. R.; Marcinowski, K. J.; Friedland, R. P.; Zagorski, M. G. Nicotine inhibits amyloid formation by the beta-peptide. *Biochemistry* **1996**, *35*, 13568-13578. b) Zeng, H.; Zhang, Y.; Peng, L.; Shao, H.; Menon, N. K.; Yang, J.; Salomon, A. R.; Friedland, R. P.; Zagorski, M. G. Nicotine and amyloid formation. *Biol. Psychiatry* **2001**, *49*, 248-257.
169. Ono, K.; Hasegawa, K.; Yamada, M.; Naiki, H. Nicotine breaks down preformed Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Biol. Psychiatry* **2002**, *52*, 880-886.
170. Zhang, L.; Xing, G. Q.; Barker, J. L.; Chang, Y.; Maric, D.; Ma, W.; Li, B. S.; Rubinow, D. R. Alpha-lipoic acid protects rat cortical neurons against cell death induced by amyloid and hydrogen peroxide through the Akt signalling pathway. *Neurosci. Lett.* **2001**, *312*, 125-128.
171. Ono, K.; Hirohata, M.; Yamada, M. Alpha-lipoic acid exhibits anti-amyloidogenicity for beta-amyloid fibrils in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *341*, 1046-1052.
172. LeVine, H., 3rd. Small molecule inhibitors of Aβ assembly. *Amyloid* **2007**, *14*, 185-197.
173. Camilleri, P.; Haskins, N. J.; Howlett, D. R. beta-Cyclodextrin interacts with the Alzheimer amyloid beta-A4 peptide. *FEBS Lett.* **1994**, *341*, 256-258.
174. Solomon, B.; Koppel, R.; Frankel, D.; Hanan-Aharon, E. Disaggregation of Alzheimer beta-amyloid by site-directed mAb. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 4109-4112.
175. Fraser, P. E.; Darabie, A. A.; McLaurin, J. A. Amyloid-beta interactions with chondroitin sulfate-derived monosaccharides and disaccharides. implications for drug development. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 6412-6419.

176. Hartsel, S. C.; Weiland, T. R. Amphotericin B binds to amyloid fibrils and delays their formation: a therapeutic mechanism? *Biochemistry* **2003**, *42*, 6228-6233.
177. Wood, S. J.; MacKenzie, L.; Maleeff, B.; Hurlle, M. R.; Wetzel, R. Selective inhibition of Abeta fibril formation. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 4086-4092.
178. Xia, Z.; Tauskela, J.; Small, D. L. Disulfonic stilbenes prevent beta-amyloid (25-35) neuronal toxicity in rat cortical cultures. *Neurosci. Lett.* **2003**, *340*, 53-56.
179. Aberg, V.; Norman, F.; Chorell, E.; Westermark, A.; Olofsson, A.; Sauer-Eriksson, A. E.; Almqvist, F. Microwave-assisted decarboxylation of bicyclic 2-pyridone scaffolds and identification of Abeta-peptide aggregation inhibitors. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2817-2823.
180. De Felice, F. G.; Vieira, M. N.; Saraiva, L. M.; Figueroa-Villar, J. D.; Garcia-Abreu, J.; Liu, R.; Chang, L.; Klein, W. L.; Ferreira, S. T. Targeting the neurotoxic species in Alzheimer's disease: inhibitors of Abeta oligomerization. *FASEB J.* **2004**, *18*, 1366-1372.
181. Gestwicki, J. E.; Crabtree, G. R.; Graef, I. A. Harnessing chaperones to generate small-molecule inhibitors of amyloid beta aggregation. *Science* **2004**, *306*, 865-869.
182. Porat, Y.; Abramowitz, A.; Gazit, E. Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chem Biol Drug Des* **2006**, *67*, 27-37.
183. Talaga, P. Beta-amyloid aggregation inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: dream or reality? *Mini-Rev. Med. Chem.* **2001**, *1*, 175-186.
184. May, B. C.; Fafarman, A. T.; Hong, S. B.; Rogers, M.; Deady, L. W.; Prusiner, S. B.; Cohen, F. E. Potent inhibition of scrapie prion replication in cultured cells by bis-acridines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 3416-3421.
185. Honson, N. S.; Jensen, J. R.; Darby, M. V.; Kuret, J. Potent inhibition of tau fibrillization with a multivalent ligand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *363*, 229-234.
186. Chafekar, S. M.; Malda, H.; Merckx, M.; Meijer, E. W.; Viertl, D.; Lashuel, H. A.; Baas, F.; Scheper, W. Branched KLVFF tetramers strongly potentiate inhibition of beta-amyloid aggregation. *Chembiochem* **2007**, *8*, 1857-1864.
187. Smith, M. W.; Gumbleton, M. Endocytosis at the blood-brain barrier: from basic understanding to drug delivery strategies. *J. Drug Target.* **2006**, *14*, 191-214.
188. Huwyler, J.; Yang, J.; Pardridge, W. M. Receptor mediated delivery of daunomycin using immunoliposomes: pharmacokinetics and tissue distribution in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *282*, 1541-1546.
189. Rousselle, C.; Clair, P.; Lefauconnier, J. M.; Kaczorek, M.; Scherrmann, J. M.; Tamsamani, J. New advances in the transport of doxorubicin through the blood-brain barrier by a peptide vector-mediated strategy. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *57*, 679-686.
190. Bradley, M. O.; Shashoua, V. E.; Webb, N. L.; Swindell, C. S. Compositions comprising conjugates of cis-docosahexaenoic acid and Taxotere. PCT Int. Appl. **1997**, 44 pp.
191. Dolphin, G. T.; Chierici, S.; Ouberai, M.; Dumy, P.; Garcia, J. A multimeric quinacrine conjugate as a potential inhibitor of Alzheimer's beta-amyloid fibril formation. *Chembiochem* **2008**, *9*, 952-963.
192. Korth, C.; May, B. C.; Cohen, F. E.; Prusiner, S. B. Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 9836-9841.
193. Atwell, G. J.; Cain, B. F.; Baguley, B. C.; Finlay, G. J.; Denny, W. A. Potential antitumor agents. 43. Synthesis and biological activity of dibasic 9-aminoacridine-4-carboxamides, a new class of antitumor agent. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 1481-1485.
194. a) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2001**, *40*, 2004-2021. b) Manetsch, R.; Krasinski, A.; Radic, Z.; Raushel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K. B.; Kolb, H. C. In situ click chemistry: enzyme inhibitors made to their own specifications. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12809-12818.
195. Huisgen, R. 1,3-Dipolar cycloadditions. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **1963**, *75*, 604-637.
196. a) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2002**, *41*, 2596-2599. b) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
197. Tron, G. C.; Pirali, T.; Billington, R. A.; Canonico, P. L.; Sorba, G.; Genazzani, A. A. Click chemistry reactions in medicinal chemistry: applications of the 1,3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 278-308.
198. Bourne, Y.; Kolb, H. C.; Radic, Z.; Sharpless, K. B.; Taylor, P.; Marchot, P. Freeze-frame inhibitor captures acetylcholinesterase in a unique conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 1449-1454.

- 199.a) Tornøe, C. W.; Sanderson, S. J.; Mottram, J. C.; Coombs, G. H.; Meldal, M. Combinatorial library of peptidotriazoles: identification of [1,2,3]-triazole inhibitors against a recombinant *Leishmania mexicana* cysteine protease. *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 312-324. b) Whiting, M.; Muldoon, J.; Lin, Y. C.; Silverman, S. M.; Lindstrom, W.; Olson, A. J.; Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B.; Elder, J. H.; Fokin, V. V. Inhibitors of HIV-1 protease by using in situ click chemistry. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2006**, *45*, 1435-1439.
200. Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210-216.
201. Wu, P.; Fokin, V. V. Catalytic azide-alkyne cycloaddition: reactivity and applications. *Aldrichimica Acta* **2007**, *40*, 7-17.
202. Angell, Y. L.; Burgess, K. Peptidomimetics via copper-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1674-1689.
203. Khoukhi, N.; Vaultier, M.; Carrie, R. Synthesis and reactivity of methyl .gamma.-azidobutyrate and ethyl .delta.-azidovaleate and of the corresponding acid chlorides as useful reagents for the aminoalkylation. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 1811-1822.
204. Lewis, W. G.; Green, L. G.; Grynszpan, F.; Radic, Z.; Carlier, P. R.; Taylor, P.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click chemistry in situ: acetylcholinesterase as a reaction vessel for the selective assembly of a femtomolar inhibitor from an array of building blocks. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2002**, *41*, 1053-1057.
205. Hu, M.-K.; Lu, C.-F. A facile synthesis of bis-tacrine isosteres. *Tetrahedron Lett* **2000**, *41*, 1815-1818.
206. Franke, R.; Doll, C.; Eichler, J. Peptide ligation through click chemistry for the generation of assembled and scaffolded peptides. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 4479-4482.
207. Ryu, E. K.; Choe, Y. S.; Lee, K. H.; Choi, Y.; Kim, B. T. Curcumin and dehydrozingerone derivatives: synthesis, radiolabeling, and evaluation for beta-amyloid plaque imaging. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6111-6119.
208. Mitsunobu, O. The use of diethyl azodicarboxylate and triphenylphosphine in synthesis and transformation of natural products. *Synthesis* **1981**, *1*, 1-28.
209. Kendall, P. M.; Johnson, J. V.; Cook, C. E. Synthetic route to an aromatic analog of strigol. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 1421-1424.
210. Green, T. W. and Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis* (3rd ed.) **1999**, Wiley, New York, 133-141
211. Shi, W.; Dolai, S.; Rizk, S.; Hussain, A.; Tariq, H.; Averick, S.; L'Amoreaux, W.; El Idrissi, A.; Banerjee, P.; Raja, K. Synthesis of monofunctional curcumin derivatives, clicked curcumin dimer, and a PAMAM dendrimer curcumin conjugate for therapeutic applications. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5461-5464.
212. Narlawar, R.; Pickhardt, M.; Leuchtenberger, S.; Baumann, K.; Krause, S.; Dyrks, T.; Weggen, S.; Mandelkow, E.; Schmidt, B. Curcumin-derived pyrazoles and isoxazoles: Swiss army knives or blunt tools for Alzheimer's disease? *ChemMedChem* **2008**, *3*, 165-172.
213. Meyer, K. G. Simple preparation of monoalkylhydrazines. *Synlett* **2004**, *13*, 2355-2356.
- 214.a) Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H. Cu(I)-catalyzed alkyne-azide click cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *1*, 51-68. b) Meldal, M.; Tornøe, C. W. Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952-3015.
215. Ryu, E. H.; Zhao, Y. Efficient synthesis of water-soluble calixarenes using click chemistry. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1035-1037.
216. Turner, R. A.; Oliver, A. G.; Lokey, R. S. Click chemistry as a macrocyclization tool in the solid-phase synthesis of small cyclic peptides. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5011-5014.
217. Jeener, J., Meier, B. H., Bachmann, P., and Ernst, R. R. Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy, *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4546-4553.
218. Braunschweiler, L., and Ernst, R. R. Coherence transfer by isotropic mixing: Application to proton correlation spectroscopy, *J. Magn. Reson.* **1983**, *53*, 521-528.
219. Piantini, U., Sørensen, O. W., and Ernst, R. R. () Multiple quantum filters for elucidating NMR coupling networks, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6800-6801.
220. Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids.* **1986**, John Wiley and Sons, New York.
221. Shearman, M. S.; Ragan, C. I.; Iversen, L. L. Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 1470-1474.
222. Jarrett, J. T.; Lansbury, P. T., Jr. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* **1993**, *73*, 1055-1058.
223. Naiki, H.; Gejyo, F. Kinetic analysis of amyloid fibril formation. *Methods Enzymol.* **1999**, *309*(Amyloid, Prions, and Other Protein Aggregates), 305-318.

224. Bartolini, M.; Bertucci, C.; Bolognesi, M. L.; Cavalli, A.; Melchiorre, C.; Andrisano, V. Insight into the kinetic of amyloid beta (1-42) peptide self-aggregation: elucidation of inhibitors' mechanism of action. *Chembiochem* **2007**, *8*, 2152-2161.
225. Zhang, H. Y. One-compound-multiple-targets strategy to combat Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 5260-5264.
226. Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V., Jr.; Feather-Stone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88-95.
227. Marco-Contelles, J.; Leon, R.; de Los Rios, C.; Guglietta, A.; Terencio, J.; Lopez, M. G.; Garcia, A. G.; Villarroya, M. Novel multipotent tacrine-dihydropyridine hybrids with improved acetylcholinesterase inhibitory and neuroprotective activities as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7607-7610.
228. Hwang, T. L.; Shaka, A. J. Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary waveforms and pulsed field gradients, *J. Magn. Reson.* **1995**, *112*, 275-279.

RESUMES

Conception de modèles de fibres amyloïdes et d'inhibiteurs de la fibrillogénèse

Les peptides et protéines amyloïdes sont impliqués dans de nombreuses pathologies regroupées sous le terme d'amyloses. Ces protéines, dans des conditions encore mal connues, se replient en feuillets β croisés et s'assemblent en fibres. Afin de comprendre les principes physico-chimiques impliqués dans ce processus, nous avons conçu des modèles de fibres amyloïdes par la synthèse d'édifices peptidiques basés sur la séquence du peptide β amyloïde. Ils se composent de deux ou quatre fragments amyloïdes mutés, linéaires ou cyclisés, que nous avons liés à un châssis décapeptide cyclique. Ces édifices se replient en feuillets β croisés et s'assemblent en protofilaments de 5 à 6 nm de diamètre. A l'aide de la modélisation moléculaire, nous avons montré que le repliement en boucle de type brin β -boucle-brin β et la création d'un cœur hydrophobe sont nécessaires pour la formation des feuillets β croisés parallèles. Ces édifices sont des modèles très prometteurs pour la compréhension du mécanisme de formation des fibres amyloïdes.

Parmi les stratégies thérapeutiques développées récemment pour lutter contre les amyloses, l'inhibition de la formation des dépôts amyloïdes a été largement étudiée. Au cours de nos travaux, nous avons développé des inhibiteurs de la fibrillogénèse par la présentation de plusieurs exemplaires de molécules hydrophobes sur un cyclodécapeptide. Cette stratégie a pour but de créer une zone d'interaction avec le peptide β amyloïde suffisamment importante pour perturber son auto-association. Nous avons montré, par la réalisation d'expériences de polymérisation du peptide $A\beta_{40}$, que ces composés sont des inhibiteurs très efficaces par comparaison avec les dérivés monomériques. Ces résultats confirment l'intérêt de cette stratégie pour interférer avec le phénomène de formation des fibres amyloïdes.

Mots clés : Peptide β amyloïde, Repliement des protéines, Modèles de fibres amyloïdes, Fibrillogénèse, Inhibiteurs, Châssis décapeptide cyclique, Liaison éther d'oxime, Cycloaddition alcyne-azoture

Design of amyloid fibril models and inhibitors of fibrillogenesis

Amyloid peptides and proteins are associated with several diseases named amyloidoses. These proteins, in conditions that are still unclear, fold into cross- β -sheet structures and form fibrils. In order to gain insight into the folding process, we have designed models of amyloid fibrils by the synthesis of polypeptidic edifices based on the sequence of the β amyloid peptide. They are made of two or four mutated, linear or cyclic, β -amyloid fragments covalently attached to a cyclic decapeptide scaffold. These polypeptidic edifices fold into cross- β -sheet structures and polymerize into protofilaments with diameters of 5-6 nm. Using molecular modelling, we have demonstrated that the folding in β strand-loop- β strand structure and a central hydrophobic core are required for the formation of the parallel cross β sheet structures. These edifices are promising models that will allow a better understanding of the amyloid fibril formation.

Among the therapeutic approaches in development to fight amyloidoses, the inhibition of the fibril formation has been widely investigated. In this work we have developed inhibitors of fibrillogenesis by the attachment of hydrophobic compounds on the cyclic decapeptide. The aim of this strategy is to create an important area of interaction with the amyloid β peptide and thus disturb its self-assembly process. We have shown by performing $A\beta_{40}$ polymerization assays that these compounds are very efficient inhibitors which contrast with monomeric analogues. These results support the interest of this strategy to interfere with the amyloid fibril formation.

Keywords: Amyloid β peptide, Protein Folding, Amyloid fibrils models, Fibrillogenesis, Inhibitors, Cyclodecapeptide scaffold, Oxime ligation, Azide-alkyne cycloaddition

Discipline : Chimie-Biologie