

<<SWITCH-PEPTIDES>>: CONCEPTION ET SYNTHÈSE D'INHIBITEURS OU DESTRUCTEURS POTENTIELS DE FIBRILLES AMYLOÏDES

THÈSE N° 3499 (2006)

PRÉSENTÉE LE 28 AVRIL 2006

À LA FACULTÉ SCIENCES DE BASE

Laboratoire de chimie biomimétique et des peptides

SECTION DE CHIMIE ET GÉNIE CHIMIQUE

ÉCOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE LAUSANNE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

Lydiane SAUCEDE

DEA de chimie des biomolécules, Université Montpellier II, France
et de nationalité française

acceptée sur proposition du jury:

Prof. P. Vogel, président du jury
Dr G. Tuchscherer, directrice de thèse
Prof. A. Beck-Sickinger, rapporteur
Prof. A. Eberle, rapporteur
Prof. R. Luthi-Carter, rapporteur



ÉCOLE POLYTECHNIQUE
FÉDÉRALE DE LAUSANNE

Lausanne, EPFL

2006

*« Science sans conscience
n'est que ruine de l'âme »*
Pantagruel (1532), François Rabelais

*« L'expérience est une lanterne attachée dans notre dos,
qui n'éclaire que le chemin parcouru »*

Confucius

*« Notre plus grande gloire n'est pas de ne jamais tomber
mais de nous relever après chaque chute »*

Confucius

*« Au-dessus de l'île on voit des oiseaux
Tout autour de l'île, il y a de l'eau »*

Chasse à l'enfant, Paroles, Jacques Prévert

*« La joie s'acquiert. Elle est une attitude.
Être joyeux n'est pas une facilité, c'est une volonté »*

Gaston Courtois

*« An expert is a person who has made all the mistakes
that can be made in a very narrow field »*

Niels Bohr

*« Je suis comme je suis
Je suis faite comme ça
Que voulez-vous de plus
Que voulez-vous de moi »*

Je suis comme je suis, Paroles, Jacques Prévert

*« J'entends et j'oublie,
Je vois et je me souviens,
Je fais et je comprends »*

Confucius

*« Un savant est un homme qui sait beaucoup de choses
qu'il faudrait connaître mieux que lui pour savoir qu'il n'est pas un âne »*

Paul Léautaud (1988)

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Chimie Biomimétique et Peptidique, à l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, en Suisse. Je tiens exprimer ma profonde et sincère reconnaissance au Professeur Manfred Mutter pour m'avoir accueilli au sein de son groupe de recherche. Je remercie aussi très chaleureusement Madame PD. Dr. G. Tuchscherer pour m'avoir encadré durant ces années de thèse en tant que directrice. Leurs conseils, leur confiance et leurs encouragements m'ont été d'une aide précieuse tout au long de ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement le président du jury, le Professeur Pierre Vogel, ainsi que les membres du jury, les Professeurs Ruth Luthi-Carter, Annette Beck-Sickinger et Alex Eberle d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans le concours du Docteur Marc Adrian, du Professeur Jacques Dubochet, du PD Docteur Eric Grouzmann, du Professeur Hilal Lashuel, et du Professeur Soto.

Merci à tous les membres du groupe Mutter pour leur amitié et les bons moments passés ensemble, que ce soit Karine et Sonia, qui ont débuté cette aventure en même temps que moi, Mandal, le « Tigre du Bengale », Arunan et Richard, mes compagnons de laboratoire, John, Marie-Stéphanie, Christine Kupper, mais aussi Annelis, Luc et Jérémy, fidèles amateurs de café ; Alain, toujours de bonne humeur, Enrico, qui débutera sous peu sa thèse, sans oublier les anciens, Christine B., qui a partagé un temps le labo 5201, Céline, Patricia D., David, Jimena, Agnès, dont la bonne humeur reste gravée dans les murs de ce laboratoire, Francis, Christophe, Tshilolo, Olivier, Jeff, Patricia T. et Damiano.

Un grand merci à la « team » du magasin, Giovanni, Gladys et Jacky, sans oublier ceux de l'atelier technique ainsi que les membres de l'institut, en particulier Martial, Jo et Yves.

Enfin, je souhaiterais remercier tout particulièrement ma famille, mes amis et Julien pour leur soutien, leur disponibilité et leur joie de vivre.

Ce travail a été réalisé à l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, en Suisse, dans le Laboratoire de Chimie Biomimétique et Peptidique (LCBP) dirigé par le Professeur M. Mutter, sous la direction du PD. Dr. G. Tuchscherer.

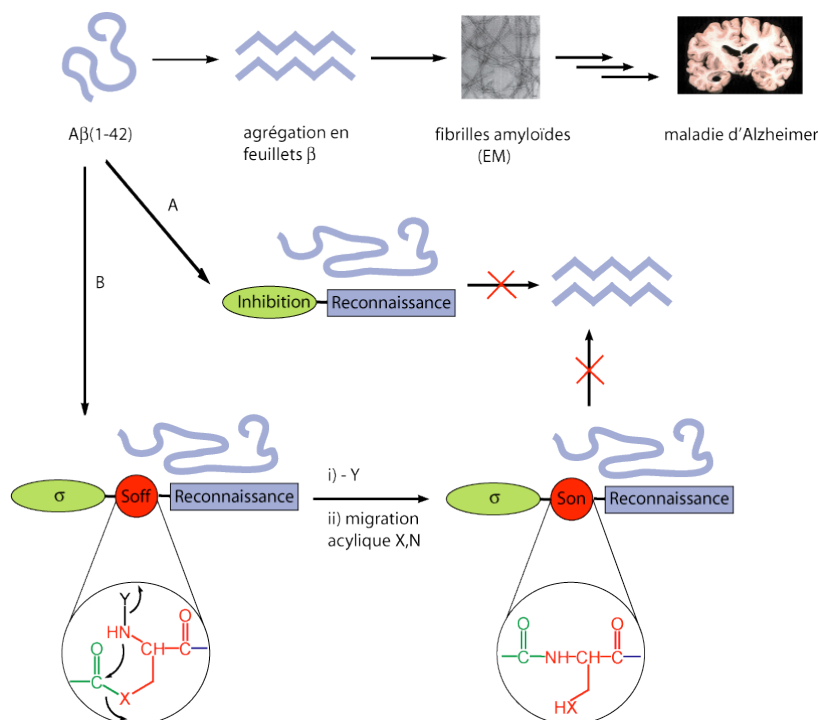
Certaines parties de cette thèse ont été publiées, présentées ou soumises à publication :

- S. Dos Santos, A. Chandravarkar, B. Mandal, R. Mimna, K. Murat, L. Saucède, P. Tella, G. Tuchscherer, M. Mutter, Switch-Peptides: Controlling Self-Assembly of Amyloid β -Derived Peptides in vitro by Consecutive Triggering of Acyl Migrations, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 11888-11889.
- S. Dos Santos, A. Chandravarkar, B. Mandal, R. Mimna, K. Murat, L. Saucède, M.-S. Camus, G. Tuchscherer, M. Mutter, Switch on Amyloid β Peptide Self-Assembly by Enzyme-Triggered Acyl Migration, Oral Communication, Fall Meeting of the Swiss Chemical Society, Lausanne, Switzerland, October **2005**.
- S. Dos Santos, A. Chandravarkar, B. Mandal, R. Mimna, K. Murat, L. Saucède, M.-S. Camus, G. Tuchscherer, M. Mutter, Switch on Amyloid β Peptide Self-Assembly by Enzyme-Triggered Acyl Migration, Poster, 19th American Peptide Symposium: Understanding Biology Using Peptides, San Diego, USA, June 18-23, **2005**.
- M. Mutter *et al.*, Switch-Peptides in Degenerative Diseases, Conference, 1st International Institute for Complex Adaptive Matter (I2CAM) Exploratory Workshop, EPFL, Lausanne, Switzerland, July 16-19, **2005**.
- R. Mimna, L. Saucède, C. Arunan, J. Lopez, M. Mutter, G. Tuchscherer, In situ Nucleation and Disruption of Secondary Structures using X \rightarrow N Acyl Migrations, *Peptides*, Proceedings of the 3rd International and 28th European Peptide Symposium, Prague, Czech Republic, September 5-10, **2004**.
- M. Mutter, A. Chandravarkar, C. Boyat, J. Lopez, S. Dos Santos, B. Mandal, R. Mimna, K. Murat, L. Patiny, L. Saucède, and G. Tuchscherer, Switch-Peptides In Statu Nascendi: Induction of Conformational Transitions Relevant to Degenerative Diseases, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 4172-4178.
- M. Mutter, A. Chandravarkar, C. Boyat, J. Lopez, S. Dos Santos, B. Mandal, R. Mimna, K. Murat, L. Patiny, L. Saucède, und G. Tuchscherer, Switch-Peptide in statu nascendi: Induktion von Konformationsübergängen und deren Bedeutung in degenerativen Erkrankungen, *Angew. Chem.*, **2004**, *116*, 4267-4273.

- R. Mimna, L. Saucède, A. Chandravarkar, J. Lopez, M. Mutter, G. Tuchscherer, In Situ Nucleation and Disruption of Secondary Structures using X to N Acyl Migrations, Oral Communications, Fall Meeting of the Swiss Chemical Society, Zurich, Switzerland, **2004**.
- R. Mimna, L. Saucède, B. Mandal, A. Chandravarkar, S. Dos Santos, G. Tuchscherer, M. Mutter, Switch-Peptides: ISN-Nucleation and Disruption of Secondary Structures Relevant in Degenerative Diseases, Poster, Fall Meeting of the Swiss Chemical Society, Zurich, Switzerland, **2004**.
- R. Mimna, L. Saucède, B. Mandal, A. Chandravarkar, S. Dos Santos, G. Tuchscherer, M. Mutter, Switch-Peptides: ISN-Nucleation and Disruption of Secondary Structures Relevant in Degenerative Diseases, Poster, 3rd International and 28th European Peptide Symposium, Prague, Czech Republic, September 5-10, **2004**.
- L. Saucède, S. Dos Santos, A. Chandravarkar, B. Mandal, R. Mimna, K. Murat, M.-S. Camus, J. Bérard, E. Grouzmann, M. Adrian, J. Dubochet, J. Lopez, H. Lashuel, G. Tuchscherer, M. Mutter, Switch-Peptides: From Conformational Studies to Alzheimer's Disease, *Chimia*, *in press*.
- S. Dos Santos, A. Chandravarkar, B. Mandal, R. Mimna, K. Murat, L. Saucède, M. Camus, G. Tuchscherer, M. Mutter, Switch on Amyloid β Peptide Self-Assembly by Enzyme-Triggered Acyl Migration, *Peptides*, Proceedings of the 19th American Peptide Symposium, San Diego, June 18-23, **2005**, *in press*.
- L. Saucède, G. Tuchscherer, M. Mutter, Switch-Peptides *In Statu Nascendi*: Application to Non-Peptidic Switch Elements, *in preparation*.
- L. Saucède, G. Tuchscherer, M. Mutter, Conjugate Peptidomimetics: a Strategy to Inhibit Amyloid β Peptide Self-Aggregation, *in preparation*.
- L. Saucède, G. Tuchscherer, M. Mutter, Switch-Peptides: Switch on Amyloid β -Derived Peptide Self-Assembly by Sequential Triggering of Acyl Migrations, *in preparation*.
- K. Murat, S. Dos Santos, L. Saucède, B. Mandal, M.-S. Camus, G. Tuchscherer, M. Mutter, A New Generation of β -Sheet Breakers Applying the Switch-Peptide Concept, *in preparation*.

Résumé

A l'heure des grandes avancées scientifiques et médicales, les maladies neurodégénératives touchent de plus en plus nos populations vieillissantes et demeurent un challenge thérapeutique pour nos chercheurs. Les progrès réalisés dans ce domaine ont néanmoins permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires responsables de ces troubles et de mettre l'accent sur l'implication et le rôle clé des changements conformationnels de certaines protéines. Ainsi, l'amyloïde β , peptide supposé responsable de la maladie d'Alzheimer, subit des modifications structurales le conduisant à former des feuillets β , s'agréant ensuite sous forme de fibrilles. Or les propriétés intrinsèques de ces structures impliquent d'importants problèmes, entre autres d'insolubilité et d'auto-agrégation, rendant leur étude délicate.



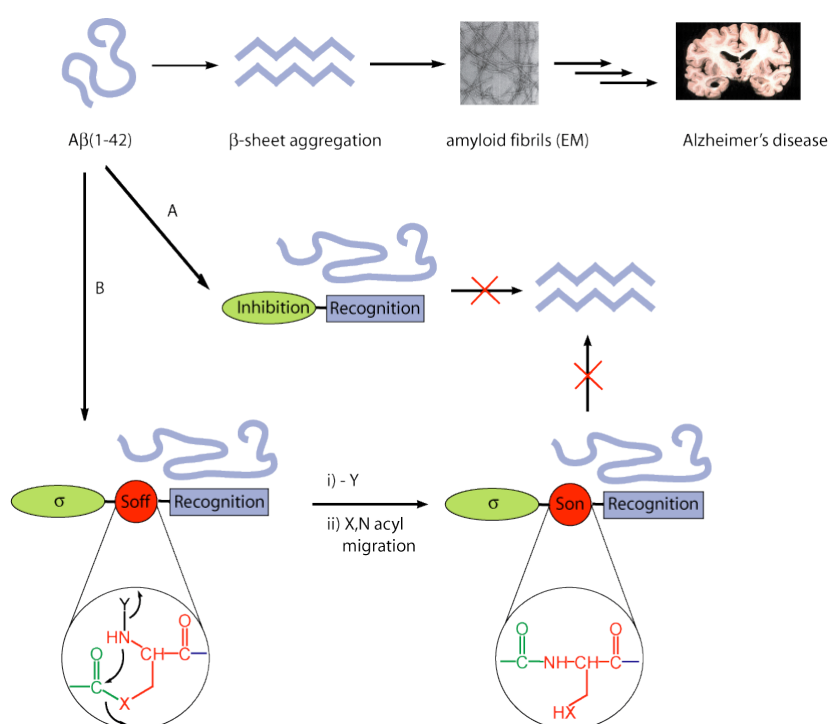
Parmi les principaux axes de recherche de moyens thérapeutiques efficaces pour lutter contre la maladie d'Alzheimer, l'inhibition fibrillaire est une stratégie prometteuse. Elle requiert l'addition d'une molécule, dite destructrice de feuillets β , pouvant bloquer le mauvais repliement déclenché par les transitions conformationnelles. Ce travail de thèse se focalise ainsi sur la conception et la synthèse chimique d'inhibiteurs potentiels de la fibrillogénèse de l'amyloïde β . Ces composés ont tous comme point commun l'utilisation, dans leur structure, d'une courte séquence (« site de nucléation ») dérivée de la partie centrale de l'A β (1-42) leur permettant d'interagir spécifiquement avec le peptide pathogène. Dans un premier temps, nous avons envisagé de concevoir, comme inhibiteurs potentiels, des peptides cycliques contenant des résidus prolines, connues pour leur effet destabilisant de structures secondaires (voie A). En collaboration avec C. Soto et al, Univ. Galveston, l'activité biologique du prototype cyclo(Lys-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu) a été testée. Plus particulièrement, la microscopie électronique, réalisée

en collaboration avec J. Dubochet et M. Adrian, UNIL, la coloration au rouge Congo ou à la thioflavine T et les études par CD montrèrent le potentiel des peptides cycliques en tant qu'inhibiteurs d'A β . Nous avons ensuite synthétisé plus spécifiquement des peptides conjugués, réunissant la séquence de reconnaissance de l'amyloïde β à une molécule organique ayant la capacité de bloquer la fibrillogenèse. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser l'acide (+/-)-trans-4-cotinecarboxylique, l'acide 3-indolebutyrique et un mime tripeptidique de brin β . L'évaluation biologique de ces molécules nous a ainsi permis de mettre en évidence leur potentiel dans cette stratégie thérapeutique, ainsi que le bénéfice apporté par l'intercalation d'une proline entre les deux composantes de ces peptides conjugués. Afin d'introduire, dans la structure des β -destructeurs, un élément de dynamisation comparable à l'isomérisation cis/trans de la proline, nous avons conçu une nouvelle lignée de molécules β -destructrices (voie B). L'élaboration d'un concept innovant de « switch-peptides » permet de contrôler la fonction d'un polypeptide par le biais d'une migration acylique intramoléculaire utilisée comme élément « switch » pour l'induction *in situ* de la structure et de la fonction. En combinant une unité d'induction conformationnelle σ , un élément « switch » S (cystéine ou sérine), et une séquence de reconnaissance amyloïde, nous obtenons là une nouvelle génération de destructeurs de feuillet β dynamiques. A l'état S_{off} , la partie σ est liée à l'élément « switch » S *via* une liaison ester désactivant l'influence structurale de l'unité d'induction conformationnelle sur le peptide cible, résultant en l'absence d'activité biologique. En libérant l'amine de l'élément « switch » jusqu'alors protégée par un groupement Y, nous déclenchons une migration acylique intramoléculaire, rétablissant la liaison amide native, et de ce fait, l'impact de l'unité σ (état S_{on}). En utilisant les pseudo-prolines comme éléments σ β -destructeurs (formant une conformation coudée), les « switch-peptides » correspondants peuvent adopter un état de reconnaissance (S_{off}), puis un état de destruction de feuillet β (S_{on}), contrôlés par une migration acylique intramoléculaire. Nous avons exploré l'utilisation de la cystéine comme élément « switch », avec une attention particulière pour la synthèse chemosélective, la cinétique de la migration acylique correspondante, ainsi que le potentiel en tant que β -destructeur. Nous avons constaté avec intérêt que la migration acylique S \rightarrow N était particulièrement rapide, à pH physiologique, par rapport au réarrangement acylique O \rightarrow N. D'une importance capitale pour de prochains développements du concept « switch », la conception d'éléments « switch » non peptidiques, tels que des composés aromatiques trifonctionnalisés, devrait nous permettre de générer l'élément β -destructeur *in situ*. Dans une première étape, nous avons démontré avec succès la faisabilité de la migration acylique intramoléculaire O \rightarrow N *via* un cycle à 5, 6, 7 ou 9 membres, ainsi que la réversibilité de cette réaction. De plus, nous avons établi l'utilisation de groupements protecteurs Y enzymolabiles pour déclencher ces migrations acyliques. En conclusion, ce travail de thèse présente des concepts prometteurs dans la conception de composés destructeurs de fibrilles ayant un potentiel thérapeutique considérable.

Mots-clé : « Switch-peptides », changements conformationnels, conjugués, migration acylique, maladies dégénératives, inhibiteurs de fibrilles.

Abstract

Despite of considerable progress in the research at the interface of Chemistry, Biology and Medicine, neurodegenerative diseases affect more and more seriously our ageing population and remain a real therapeutic challenge for researcher. Nevertheless, advances made in this field allow us to better understand the molecular mechanisms responsible for these disorders and to stress the involvement and the key-role of conformational changes of some proteins. Thought to be at the origin of Alzheimer's disease, amyloid- β peptide undergoes structural modifications leading to β -sheet structures, which further aggregate into toxic fibrils and plaques. However, intrinsic properties of these structures result in problems such as insolubility and self-aggregation limiting their experimental access.



Among the main research lines to find an efficient therapeutic agent to fight against Alzheimer's disease, fibrillar inhibition is considered as promising strategy. It requires the use of a molecule, called β -breaker, which would be able to block the misfolding triggered by conformational transitions. Consequently, the present thesis is focusing on the design and chemical synthesis of potential inhibitors of amyloid- β fibrillogenesis. As a specific common feature, the designed compounds integrate in their chemical structure a short sequence ("nucleation site") derived from the central part of A β (1-42), allowing to specifically interact with the pathogenic peptide. We first envisaged to design cyclic peptides as potential inhibitors containing proline residues, known for its destabilizing effect upon secondary structures (way A). In collaboration with C. Soto et al, Univ. Galveston, the biological activity of the prototype cyclo(Lys-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu) was tested. Most notably, electron microscopy, in collaboration with J. Dubochet and M. Adrian, UNIL, Congo red and thioflavin T staining, and CD studies pointed to the

potential of cyclic peptides as A β inhibitors. Subsequently, conjugate peptides, assembling the recognition sequence of amyloid- β and organic molecules with potential to block fibrillogenesis were synthesized specifically. (+/-)-Trans-4-cotininecarboxylic acid, 3-indolebutyric acid and a tripeptide β -strand mimic were chosen. The biological assessment of these molecules allowed us to highlight their potential in this therapeutic strategy as well as the advantage given by the intercalation of a proline between the two components of these conjugates. In an effort to introduce in the structure of β -breakers a dynamization element, comparable to the cis/trans isomerization of proline, we designed a new type of β -breaking molecules according to strategy B (Figure). The elaboration of this innovating concept termed “switch-peptides” allows to control the function of a polypeptide by using intramolecular acyl migration as switch-element for the *in situ* induction of structure and function. By combining a conformational induction unit σ , a switch element S (cysteine or serine) and an amyloid recognition sequence, we obtained a new generation of dynamic β -breakers. At the S_{off} state, the σ part was linked to the switch element S *via* an ester bond, deactivating the structural influence of the conformational induction unit on the target peptide, resulting in the absence of biological activity. By removing the protecting group Y from the amino function of the switch element, intramolecular acyl migration was triggered, restoring the native amide bond, setting off the impact of σ (S_{on} state). In applying pseudo-prolines as β -breaking σ -elements (resulting in a “kink” conformation), the corresponding switch-peptide can adopt a recognition state (S_{off}) and a β -sheet disrupting state (S_{on}), triggered by controlled acyl migration. We explored the use of cysteine as switch element, with special attention to the chemoselective synthesis, kinetics of acyl migration and potential for β -breaking. Interestingly, the S \rightarrow N acyl migration proceeded very fast at physiological pH, in comparison to serine derived O \rightarrow N migrations. Of utmost importance for further extensions of the switch-concept, the design of non peptidic S-elements such as trifunctionalized aromatic compounds would allow us to generate the β -breaking element *in situ*. As a first step, the intramolecular acyl migration O \rightarrow N *via* an intermediate of 5, 6, 7 or 9 membered rings, as well as the reversibility of this reaction, was successfully demonstrated. In addition, enzymatically cleavable protecting groups Y for triggering acyl migrations were established. In conclusion, the present thesis presents some promising concepts in the design of fibril disrupting compounds of considerable therapeutical potential.

Key words: switch-peptides, conformational changes, conjugates, acyl migration, degenerative diseases, fibril inhibitors.

Table des Matières

<i>Abréviations</i>	1
<i>Introduction</i>	5
Chapitre 1 : « Drug design » et « switch-peptides »	7
I. Peptides et protéines	7
II. Conception de nouvelles molécules bioactives	10
III. Le concept « switch-peptides »	14
Chapitre 2 : Les objectifs de ce travail de thèse	23
Chapitre 3 : Vue d'ensemble	25
I. Structure des peptides et protéines	25
II. Les migrations acyliques intramoléculaires	33
1. Introduction	33
2. Mécanisme	33
3. Implications biologiques	35
a. Biosynthèse des protéines	35
b. Les cyclodepsipeptides	38
4. Applications chimiques	39
a. Les ligations chimiques	39
b. Ingénierie des protéines	44
c. Groupements protecteurs	46
d. Prodrogues	47
e. Synthèse de séquences difficiles	48
III. La maladie d'Alzheimer	49
1. La maladie, ses causes, son diagnostic	50
2. Traitements thérapeutiques actuels et futurs	54
IV. Les fibrilles d'amyloïdes	55
1. Nature et propriétés des peptides amyloïdes	56
2. Méthodes d'étude des fibrilles amyloïdes	57
a. Coloration au rouge Congo	58
b. Coloration à la thioflavine T	59
c. Microscopie électronique par coloration négative conventionnelle	61
d. Méthode des « host-guest switch-peptides »	63
e. Test cellulaire de la cytotoxicité des amyloïdes	67
<i>Résultats et Discussion</i>	69
Chapitre 1 : Importance de la séquence de reconnaissance	71
I. Considérations générales	71
II. Un peptide cyclique comme inhibiteur potentiel de l'agrégation fibrillaire	81
III. Etude d'un modèle peptidique dérivé de l'amyloïde bêta, l'A β (13-23)	89
1. Synthèse de peptides de référence	90
2. Etude des peptides de référence par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle	99
3. Etude des peptides de référence par coloration au rouge Congo	110
4. Test de screening d'inhibiteurs potentiels de la fibrillogenèse : premiers résultats	114
IV. Evaluation de l'activité inhibitrice du peptide cyclique	123

Chapitre 2 : Les peptides conjugués.....	129
I. Etat des connaissances bibliographiques	129
II. Génération de nouveaux peptides conjugués	136
1. Synthèse de dérivés de cotinine.....	136
2. Synthèse d'un dérivé d'acide indolebutyrique	160
3. Synthèse d'un peptide conjugué contenant un groupe Hao	166
Chapitre 3 : Dynamisation.....	169
I. Les « switch-peptides ».....	169
1. Validation du concept.....	169
2. Une nouvelle classe d'inhibiteurs : les « switch-peptides »	175
3. Migrations acyliques intramoléculaires : S→N versus O→N.....	183
4. Modification de l'approche prodrogue vers une formation de l'inhibiteur <i>in vivo</i>	185
5. Evaluation biologique des « switch-peptides »	194
II. Une nouvelle génération d'éléments « switch ».....	200
1. Une molécule naturelle, la vitamine B ₆	202
a. Généralités	202
b. Pyridoxine.....	207
c. Pyridoxamine	212
2. Les cycles aromatiques trifonctionnalisés.....	225
a. L'acide 3-hydroxyanthranilique	225
b. Considération d'un alcool en position benzylique.....	239
c. Synthèse directe de « switch-peptides » à l'état S _{on}	248
III. Les « switch-peptides » conjugués.....	260
1. Insertion d'un élément « switch », la sérine	260
2. Utilisation d'un élément « switch » inducteur de coude	264
 <i>Conclusion et Perspectives.....</i>	 <i>275</i>
 <i>Experimental part</i>	 <i>279</i>
Chapitre 1 : Instrumentation and general methods.....	281
I. Reagents and solvents.....	281
II. Equipment.....	281
1. Chromatography	281
2. Analysis.....	282
III. Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS).....	284
1. General	284
2. Coupling reaction	284
3. Fmoc deprotection.....	285
4. Colorimetric tests.....	285
5. Acetylation	286
6. Cleavage of peptide from the resin.....	286
7. Small cleavage assays	286
IV. Congo red staining.....	287
 Chapitre 2 : Synthesis description.....	 289
 <i>Liste des composés synthétisés</i>	 <i>363</i>
 <i>Bibliographie</i>	 <i>371</i>

Abréviations

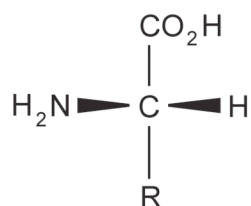
Abréviation	Signification
A β	Amyloïde bêta
Abs	Absorbance
Ac	Acétyle
Acoec	(Acyloxy)alkyle carbonate
ACN	Acétonitrile
AcOEt	Acétate d'éthyle
AD	Maladie d'Alzheimer (Alzheimer's Disease)
AngII	Angiotensine II
APP	Amyloid Precursor Protein – précurseur protéinique de l'amyloïde
AU	Absorbance UV
AZT	Azidothymidine
B ₂	Vitamine B ₂ ou riboflavine
Bn	Benzyl
Boc	<i>Tert</i> -butoxycarbonyle
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyl dicarbonate
Bz	Benzoyl
cLogP	Coefficient de partage entre l'eau et l'octanol
CD	Circular Dichroism
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
COSY	J-correlated spectroscopy
CT	Transition conformationnelle
H-Cys($\Psi^{Me,Me}$ pro)-OH	Acide L-2,2-diméthyl-4-thiazolidinecarboxylique
δ	Déplacement chimique
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
$\Delta\Delta G_f$	Différence d'énergie libre de repliement
DEA	Diéthylamine
DIPEA	Diisopropyléthylamine
DMAP	Diméthylaminopyridine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPIV	Dipeptidyle aminopeptidase IV
EDT	Ethanedithiol
EDCI	1-(3-Diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide
EM	Microscopie électronique
Eq.	Equivalent
ESI-MS	Electrospray ionisation mass spectroscopy – spectroscopie de masse par ionisation électrospray
Et ₂ O	Ether diéthylique
EtOH	Ethanol
Fmoc	9-Fluorénylméthoxycarbonyle
FT-IR	Fourier-Transform Infrared – Infrarouge à transformée de Fourier

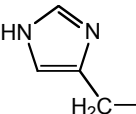
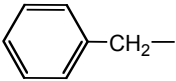
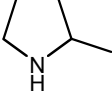
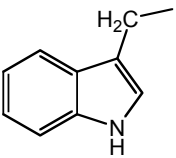
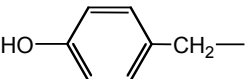
GABA	Gamma-AminoButyric Acid – acide γ -aminobutyrique
HATU	2-(7-aza-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium hexafluorophosphate
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
IDOX	4'-iodo-4'-déoxydoxorubicine
IR	Infrarouge
λ	Longueur d'onde
Liaison H	Liaison hydrogène
Ka	Constante d'affinité
Kd	Constante de dissociation
MeOH	Méthanol
MeIm	N-Méthylimidazole
MLogP	Coefficient de partage entre l'eau et l'octanol calculé par la méthode de Moriguchi ¹¹
MSNT	1-(2-Mésitylènesulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazole
Mtt	4-Méthyltrityle
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium
MW	Molecular Weight – masse moléculaire
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NPY	Neuropeptide Y
Nvoc	6-nitrovératroyloxycarbonyle
P	Peptide cible d'un « switch-peptide »
4-PA	Acide 4-pyridoxique
PBS	Tampon sodium phosphate
Pd/C	Palladium sur charbon
pGlu	Pyroglutamyle, 5-oxo-L-propyle, ou pyrrolidone carboxyle
PL	Pyridoxal
PLP	Pyridoxal phosphate
PM	Pyridoxamine
PMP	Pyridoxamine phosphate
PN	Pyridoxine
PNP	Pyridoxine phosphate
PyBOP	1H-Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
Rdt	Rendement
Rf	Retention factor
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROESY	Rotating frame nuclear overhauser effect spectroscopy
RP-HPLC	Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography – chromatographie liquide haute pression sur phase inverse
Rt	Retention time – temps de rétention
r.t.	Room temperature – température ambiante
S	Elément « switch »
σ	Unité d'induction d'un « switch-peptide »
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis – synthèse de peptide en phase solide
SSRI	Selective Serotonin Reuptake Inhibitor – inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine
t	Temps
T	Température
$t_{1/2}$	Temps de demi-vie – half time
<i>t</i> Bu	<i>Tert</i> -butyle
TEA	Triéthylamine
TFA	Acide trifluoroacétique
TFE	2,2,2-trifluoroéthanol

TFFH	Fluoro-N,N,N',N'-bis(tétraméthylène)formamidinium hexafluorophosphate
THF	Tétrahydrofurane
TIS	Triisopropylsilane
TOCSY	Total correlation spectroscopy
TRIS	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
Trt	Trityl
UV	Ultra-violet
v	volume

Acides Aminés

Structure générale des L-acides aminés (en projection de Fischer):



Nom	Chaîne latérale R	Abréviation	Code à une lettre
Alanine	CH ₃ -	Ala	A
Arginine	H ₂ N-C(NH)-NH-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -	Arg	R
Asparagine	H ₂ NCO-CH ₂ -	Asn	N
Acide aspartique	HO ₂ C-CH ₂ -	Asp	D
Cysteine	HS-CH ₂ -	Cys	C
Acide glutamique	HO ₂ C-CH ₂ CH ₂ -	Glu	E
Glutamine	H ₂ NCO-CH ₂ CH ₂ -	Gln	Q
Glycine	H-	Gly	G
Histidine		His	H
Isoleucine	CH ₃ CH ₂ (CH ₃)CH-	Ile	I
Leucine	(CH ₃) ₂ CH-CH ₂ -	Leu	L
Lysine	H ₂ NCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ -	Lys	K
Methionine	H ₃ C-S-CH ₂ CH ₂ -	Met	M
Phénylalanine		Phe	F
Proline		Pro	P
Serine	HO-CH ₂ -	Ser	S
Threonine	CH ₃ CH(OH)-	Thr	T
Tryptophane		Trp	W
Tyrosine		Tyr	Y
Valine	(CH ₃) ₂ CH-	Val	V

Introduction

Chapitre 1 : « Drug design » et « switch-peptides »	7
I. Peptides et protéines	7
II. Conception de nouvelles molécules bioactives	10
III. Le concept « switch-peptides »	14
Chapitre 2 : Les objectifs de ce travail de thèse	23
Chapitre 3 : Vue d'ensemble	25
I. Structure des peptides et protéines	25
II. Les migrations acyliques intramoléculaires.....	33
1. Introduction.....	33
2. Mécanisme	33
3. Implications biologiques.....	35
a. <i>Biosynthèse des protéines</i>	35
b. <i>Les cyclodepsipeptides</i>	38
4. Applications chimiques.....	39
a. <i>Les ligations chimiques</i>	39
b. <i>Ingénierie des protéines</i>	44
c. <i>Groupements protecteurs</i>	46
d. <i>Prodrogues</i>	47
e. <i>Synthèse de séquences difficiles</i>	48
III. La maladie d'Alzheimer	49
1. La maladie, ses causes, son diagnostic	50
2. Traitements thérapeutiques actuels et futurs.....	54
IV. Les fibrilles d'amyloïdes	55
1. Nature et propriétés des peptides amyloïdes.....	56
2. Méthodes d'étude des fibrilles amyloïdes.....	57
a. <i>Coloration au rouge Congo</i>	58
b. <i>Coloration à la thioflavine T</i>	59
c. <i>Microscopie électronique par coloration négative conventionnelle</i>	61
d. <i>Méthode des « host-guest switch-peptides »</i>	63
e. <i>Test cellulaire de la cytotoxicité des amyloïdes</i>	67

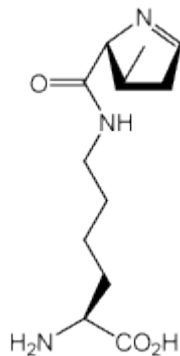
Chapitre 1 : « Drug design » et « switch-peptides »

I. Peptides et protéines

Les protéines sont des biopolymères indispensables à la vie cellulaire ainsi qu'au bon fonctionnement des organismes vivants. Chacune d'entre elles résulte de l'enchaînement unique de 22 unités élémentaires, les acides aminés, assemblées après la lecture du code génétique inscrit dans chaque noyau cellulaire (Abréviations des acides aminés et Figure 1). De cette biosynthèse s'en suit un nombre infini de séquences différentes ayant toutes une fonction biologique bien déterminée.

Ainsi, les anticorps sont chargés de protéger l'organisme contre les agents pathogènes, les virus ou les bactéries. D'autres protéines permettent le transport de molécules vitales, telles que certains ions à travers les membranes cellulaires. C'est aussi le cas de l'hémoglobine qui prend en charge l'oxygène (Figure 2), ainsi que de la transferrine responsable du transport du fer. Certains de ces biopolymères contribuent encore à l'élaboration des tissus musculaires, nerveux, osseux ou cartilagineux.

a)



b)

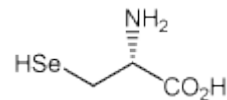


Figure 1 : Structure des deux derniers acides aminés naturels découverts: **a)** la pyrrolysine (mai 2002) est codée par le codon d'arrêt ambre UAG, tandis que **b)** la sélénocystéine (1999) l'est par le codon d'arrêt UGA.

Les hormones font aussi partie de cette famille de biomolécules. L'insuline, par exemple, régule le métabolisme du glucose. Elle est alors directement utilisée par injection chez les patients atteints de diabète (Figure 2). La bradykinine, elle, agit contre la douleur, l'inflammation, les allergies et même contre la tension artérielle¹. Les enzymes quant à elles ont le rôle unique de catalyseurs, qui concerne aussi bien les réactions les plus simples, comme l'hydratation de dioxyde de carbone, que les plus complexes, telles que la duplication des chromosomes. Elles permettent alors d'accélérer ces transformations d'un facteur de plusieurs millions².

Suite au constat de leur importance et de leur prévalence dans le monde biologique, les protéines ont suscité une recherche active afin de comprendre au mieux leur nature et leur mode de fonctionnement.

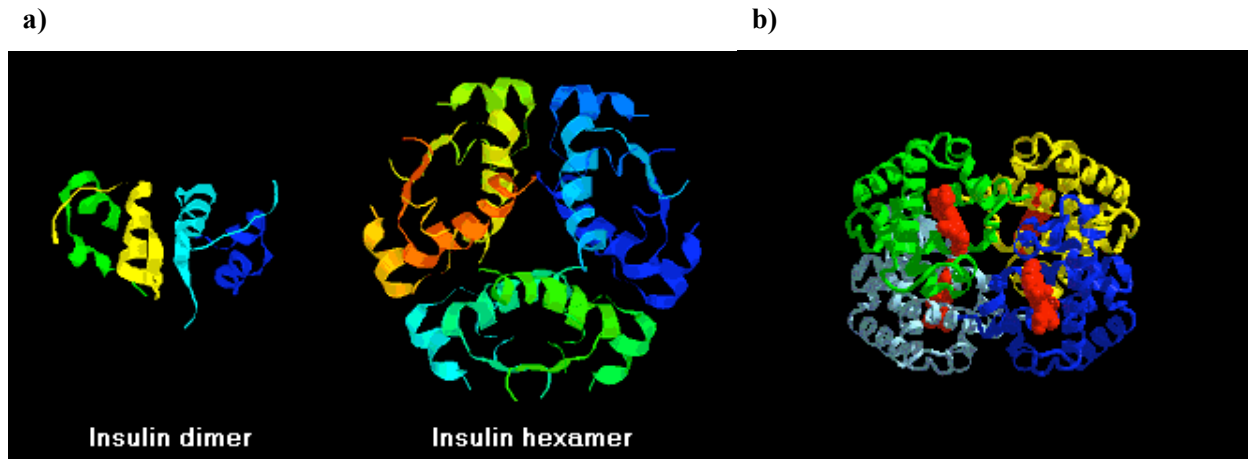


Figure 2 : **a)** Structure de l'insuline, qui se dimérise en solution (à gauche) et forme un hexamère en présence de zinc ionique (à droite)³; **b)** structure de l'hémoglobine, avec ses quatre sous-unités polypeptidiques (en vert, jaune, bleu et gris) et ses groupes hèmes (en rouge) auxquels se lie l'oxygène⁴.

D'une façon générale, la plupart des processus biologiques a pour origine une interaction spécifique entre une protéine et un ligand, qui peut être aussi bien une autre protéine, un ion métallique, une molécule d'oxygène, un acide nucléique, un polysaccharide ou un lipide. Ces biopolymères forment de ce fait un homocomplexe dans le cas où les deux molécules sont de même nature, et un hétérocomplexe si les deux composantes sont différentes. Par définition, un homocomplexe est qualifié de permanent dans la mesure où la dissociation des deux éléments constitutifs requiert la dénaturation des structures monomériques. Un hétérocomplexe, quant à lui, correspond à un événement temporaire impliqué dans le contrôle de nombreux processus cellulaires, tels que la réponse immunitaire, la digestion ou la reproduction cellulaire.

Ces assemblages sont stabilisés grâce à des interactions non-covalentes du type liaison hydrogène, pont disulfure, interactions ionique, hydrophobique ou de Van der Waals. De nombreuses techniques ont été optimisées pour détecter et identifier les protéines impliquées dans ces complexes⁵. Parmi les méthodes purement physiques, la chromatographie d'affinité de protéines, l'« affinity blotting », l'immunoprécipitation ainsi que le « cross-linking » sont largement employés. Les techniques basées sur de grandes bibliothèques, telles que le « phage display » ou le « two-hybrid system », permettent, quant à elles, de dépister les gènes ou fragments de gènes produits par des protéines interagissant avec une cible pré-déterminée. Enfin les avancées en génétique permettent désormais de découvrir de nouveaux gènes ou de confirmer des interactions entre protéines préalablement identifiées.

L'affinité entre un ligand et son récepteur peut être évaluée grâce à une constante d'affinité (K_a) ou de dissociation (K_d) du complexe. Elles sont mesurées grâce à l'utilisation de différentes techniques, telles que la chromatographie d'affinité de protéines, la sédimentation par gradients, l'équilibre de sédimentation, la fluorescence, ou la surface plasmon résonance⁵. Les constantes d'affinité des complexes

enzyme-inhibiteur ou antigène-anticorps ont ainsi pu être estimées comme étant de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-13} mol⁻¹. S'agissant d'interactions protéine-protéine, elles tournent autour du nanomolaire.

En résumé, les interactions protéine-protéine sont très largement répandues dans les mécanismes d'action de nombreux processus biologiques. Il n'est donc guère surprenant de les retrouver aussi impliquées dans de nombreux phénomènes pathologiques. Dès lors, les recherches pharmacologiques se sont particulièrement investies dans la compréhension et le contrôle de ces affinités de liaison.

II. Conception de nouvelles molécules bioactives

La découverte d'un nouveau médicament requiert, avant de pouvoir entrer sur le marché, le criblage de 50 000 à 5 millions de composés, un investissement de 300 à plus de 500 millions de dollars et une durée comprise entre 12 et 24 ans. S'il y a quelques décennies la plupart des molécules était trouvée par hasard, le rationnel s'est peu à peu établi comme une nécessité en même temps que les techniques se sont développées. La conception de médicaments fondée sur la structure de la cible fait désormais partie intégrante de la recherche de nouvelles molécules, permettant d'obtenir de composés plus actifs et ce plus rapidement. Cette méthode montre surtout toute son efficacité et sa puissance lorsqu'elle est couplée avec des techniques combinatoires et des outils computationnels permettant de dessiner le produit idéal en tenant compte de la structure et de la nature du site actif choisi. Malgré tout, la découverte de nouvelles molécules bioactives se heurte encore à de nombreuses difficultés et demeure un véritable challenge⁶.

Parmi les approches thérapeutiques couramment envisagées, l'une d'elles consiste à bloquer l'action d'un composé responsable d'une pathologie. Pour cela, les chercheurs imaginent un nouveau produit capable de le remplacer au niveau de sa zone d'action et ainsi de l'inhiber, tout en prenant garde d'éviter les interactions avec d'autres molécules naturelles n'intervenant pas dans le mécanisme de fonctionnement de la maladie. Il est ainsi souvent nécessaire de travailler par homologie de séquences entre le produit naturel et le composé à synthétiser. Lorsque ce cahier des charges est rempli, le résultat est généralement des plus satisfaisants.

Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (SSRIs = Selective Serotonin Reuptake Inhibitors) sont un parfait exemple de cette démarche⁷. Cette classe d'antidépresseurs agit directement sur le cerveau en augmentant la production d'un neurotransmetteur, la sérotonine. La base de leur stratégie de synthèse a été de considérer les causes biologiques de la dépression, à savoir le manque de stimulation du neurone récepteur au niveau des synapses, définissant l'espace entre deux neurones à travers lesquels passe une information chimique sous forme de neurotransmetteur. En bloquant le mécanisme de recapture de la sérotonine, la drogue agit de façon sélective, ce qui permet de limiter d'éventuels effets secondaires néfastes. La famille des SSRIs regroupe plusieurs molécules couramment prescrites pour calmer les troubles d'anxiété, de la nourriture ou d'obsession compulsive. Les plus célèbres de ces composés sont la fluoxétine, plus connue sous le nom de Prozac[®], ainsi que la sertraline, commercialisée en tant que Zoloft[®].

L'imatinib⁸ est une autre illustration de conception réussie de médicament. Cet inhibiteur de tyrosine kinase a été dessiné pour agir sur la protéine de fusion *bcr-abl*, caractéristique des leucémies avec maladie du chromosome Philadelphie, telles que la leucémie myéloïde chronique et certains cas de leucémie lymphoïde aiguë. Le principal avantage de cette molécule réside dans sa spécificité d'action, la majorité

des autres drogues utilisées en chimiothérapie ne différenciant pas les cellules cancéreuses des tissus sains.

Toutes les molécules ne passent malheureusement pas la phase de développement. Les principales causes d'échec concernent à 39 % leurs faibles propriétés biopharmaceutiques, à 29 % leur manque d'efficacité, à 21 % leur toxicité et à 6 % des raisons économiques. Les propriétés requises pour être un « bon » médicament doivent donc être intégrées le plus tôt possible dans la structure du produit. En considérant quelques règles empiriques et méthodes d'étude de similarité de structure, destinées à faire le tri entre les molécules potentiellement actives et celles qui ne le sont pas⁹, les chances de succès s'accroissent. En 1997, C. Lipinski, du groupe pharmaceutique Pfizer, définit la « règle de cinq¹⁰ » permettant d'estimer la biodisponibilité d'un composé chimique d'après ses caractéristiques moléculaires. Ainsi, le parfait candidat se doit d'avoir un poids moléculaire inférieur ou égal à 500, un coefficient calculé de partage entre l'eau et l'octanol (cLogP), définissant la lipophilicité du produit, inférieur à 5 (ou MLogP, LogP calculé par la méthode de Moriguchi¹¹, inférieur à 4.15), un nombre d'accepteurs de liaison hydrogène inférieur à 10, un nombre de donneurs de liaison hydrogène inférieur à 5 et un nombre de liaisons avec rotation libre inférieur ou égal à 5. Les antibiotiques, antifongiques, vitamines et glycosides cardiaques sont les seuls agents thérapeutiques actifs par voie orale à ne pas se soumettre à cette loi. Restent encore quelques exceptions, telles que le peptide immunosuppresseur cyclosporine, faisant preuve d'une faible bioabsorption mais demeurant indispensable sur le marché des agents thérapeutiques (Tableau 1)¹⁰.

Médicament	MLogP	Donneurs de liaison H	MW	Accepteurs de liaison H
Acyclovir	-0.09	4	225.21	8
Aspirine	1.70	1	180.16	4
AZT	-4.38	2	267.25	9
Benzyl-pénicilline	1.82	2	334.40	6
Cyclosporine	-0.32	5	1202.64	23
Diazépam	3.36	0	284.75	3
Ibuprofène	3.23	1	206.29	2
Scopolamine	1.42	1	303.36	5
Testostérone	3.70	1	288.43	2

Tableau 1 : Exemples de quelques médicaments respectant la « règle de cinq » et offrant une bonne biodisponibilité, exception faite pour la cyclosporine (en rouge)¹⁰.

Les protéines, quant à elles, forment un domaine particulier de la recherche de produits pharmaceutiques. La révolution de la biologie moléculaire et les avancées techniques ont permis de relancer un intérêt beaucoup plus poussé pour l'étude et l'exploitation de ces biopolymères¹². Ils ont certes quelques

inconvenients inhérents à leur nature, à savoir leur faible biodisponibilité orale, la nécessité de les administrer par injection, leur faible stabilité, leur difficulté de délivrance et de perméation à travers les membranes biologiques, leur synthèse coûteuse et difficile, leur mauvaise solubilité, les risques d'effets immunogènes et leur élimination rapide par l'organisme, souvent de l'ordre de quelques minutes. Mais malgré tout, ils se révèlent être des médicaments potentiels de choix grâce à leur haute activité et spécificité qui élimine les risques d'action sur des structures moléculaires autres que la cible prévue, à la minimisation des interactions entre drogues, à leur faible accumulation dans les tissus, à leur toxicité souvent limitée, à leur puissance d'action et à leur diversité tant biologique que chimique¹³.

La conception de protéines demeure cependant un concept extrêmement ambitieux ouvrant de nouvelles portes vers la connaissance et la compréhension du monde du vivant¹⁴. Attisé par un réel besoin aussi bien en recherche que dans le milieu industriel, le développement de nouvelles molécules vise à conserver les propriétés biologiques des enzymes ou autres protéines naturelles afin de les utiliser dans d'autres conditions et les combiner avec des spécificités différentes.

Gutte fut désigné comme étant le pionnier de cette stratégie¹². Au milieu des années 70, il conçut en premier lieu un peptide analogue à la ribonucléase S¹⁵, puis un analogue de la ribonucléase A¹⁶. Il synthétisa ensuite un polypeptide capable d'interagir avec des acides nucléiques¹⁷, avant de s'attaquer à la construction d'un 24-mer se liant au DDT, un célèbre insecticide¹⁸. Ces nouveaux composés n'ont pas contribué en eux-mêmes à dégager les principes généraux de la conception structurelle de molécules. Mais ils ont par contre engendré un véritable engouement pour le « design » de protéines, divisé en deux composantes distinctes mais liées entre elles, se focalisant l'une sur l'activité du composé et l'autre sur sa structure¹². Ainsi, si la première catégorie est fondée sur l'étude de la nature d'un site actif, la seconde, majoritairement adoptée, cherche plutôt à produire une structure tridimensionnelle.

La construction d'un nouveau polypeptide nécessite l'utilisation de deux méthodes convergentes¹⁴. L'ingénierie des protéines est le moyen le plus sûr et prometteur d'obtenir une nouvelle drogue peptidique. Elle consiste à modifier la structure d'une protéine naturelle en introduisant des mutations ponctuelles par mutagenèse dirigée. Elle présente aussi l'avantage d'étudier en détail la relation entre séquence, structure et fonction. Le « design » *de novo* suppose la construction d'une cible tridimensionnelle à partir de blocs élémentaires tout en suivant quelques règles de base. Le principal obstacle réside dans le choix d'une séquence d'acides aminés capables de se replier correctement. C'est la raison pour laquelle cette stratégie se base sur une hypothèse de travail qui considère une structure tertiaire comme un assemblage d'éléments liés entre eux par des jonctions plus ou moins ordonnées (Figure 3). Il suffit alors tout simplement d'utiliser des blocs ayant, d'après nos connaissances expérimentales ou semi-empiriques, une haute propension à adopter une structure secondaire particulière.

Si les techniques génétiques peuvent aussi être envisagées comme des outils de construction de ce type de peptides, les méthodes chimiques restent plus simples à mettre en œuvre et à contrôler même si elles ne s'adressent qu'à de petites protéines, pour des raisons pratiques de synthèse et de purification. Elles permettent alors de produire rapidement des molécules dans un nouveau système et d'introduire des modifications ou acides aminés non naturels. La synthèse *in vivo*, quant à elle, sera plutôt réservée à des systèmes d'expression de protéines bien établis ainsi qu'aux séquences longues.

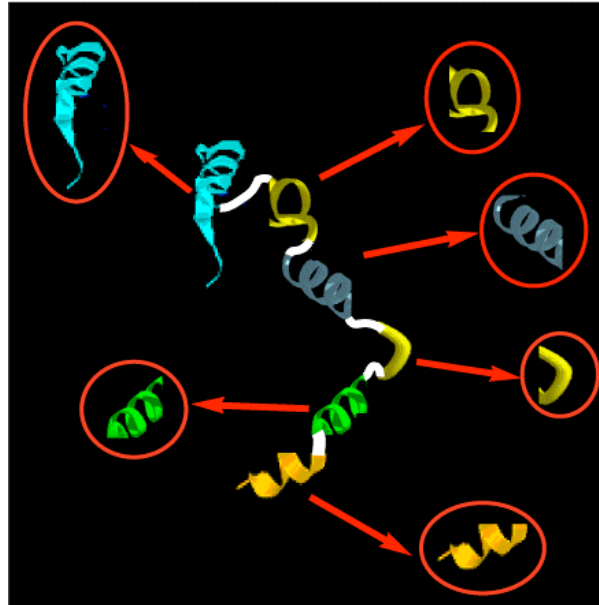


Figure 3 : Illustration du « design » de novo : une structure tridimensionnelle (au centre) est considérée comme étant un assemblage d'éléments ayant des formes bien définies (entourés en rouge) liés entre eux par des jonctions plus ou moins flexibles (en blanc).

Un exemple typique de l'application de la conception de protéines à visée thérapeutique nous est apporté par R. M. Murphy et ses collaborateurs, qui, pour empêcher l'agrégation d'une protéine, l'amyloïde β , responsable de la maladie d'Alzheimer, ont combiné un élément de reconnaissance interagissant de façon spécifique avec la protéine, l' $A\beta(15-25)$ et un élément destructeur de son agrégation, une oligolysine¹⁹.

Ainsi, la conception de protéines fait désormais partie intégrante des stratégies de recherche de nouveaux médicaments puissants et efficaces destinés à lutter contre toutes ces maladies modernes sans véritables traitements thérapeutiques.

III. Le concept « switch-peptides »

Fortement impliqués dans les maladies neurodégénératives, les changements conformationnels des peptides et protéines sont actuellement un sujet de prédilection dans des domaines aussi variés que la chimie, la biologie ou la médecine^{20, 21}. Des études récentes ont ainsi mis en évidence le rôle de la modification structurale en feuillet β du peptide amyloïde β dans la maladie d'Alzheimer^{20, 21}. La transition hélice $\alpha \rightarrow$ feuillet β de la protéine du prion semble, quant à elle, être largement responsable des encéphalopathies spongiformes transmissibles telles que les maladies de Creutzfeldt-Jakob ou de la vache folle^{20, 21, 22}. Cependant les recherches concernant cette catégorie de polypeptides se heurtent à un obstacle de taille, lié leur tendance intrinsèque à s'assembler entre-eux et à s'agréger de façon irréversible.

C'est dans ce contexte que M. Mutter et ses collaborateurs présentèrent en 2004 une méthode novatrice, ayant pour but d'étudier, grâce à un procédé dynamique, le repliement de peptides dès le début et de suivre ensuite son évolution²³. Fondé sur des techniques d'initiation et de dénaturation des structures peptidiques secondaires, le concept « switch-peptides » d'induction de transitions conformationnelles *in statu nascendi* (ISN) définit une nouvelle classe de « switch-peptides ».

Ces oligopeptides amphiphiles furent dessinés par M. Mutter en 1991²⁴. Cette première génération de « switch-peptides » était alors capable de subir, en milieu aqueux, des changements conformationnels réversibles de type hélice $\alpha \leftrightarrow$ feuillet β en fonction des conditions expérimentales utilisées, telles que le pH, la température ou la concentration en sels²⁴. Le concept se basait alors sur le fait qu'une séquence amphiphile alternant des résidus hydrophiles et hydrophobes adopte une structure en feuillet β (Figure 4). La substitution contrôlée de certains acides aminés par des unités neutres permettait alors d'obtenir un peptide amphiphile dont la structure était cohérente avec les propriétés requises par une hélice α aussi bien que par un feuillet β ²⁴.

La deuxième génération de « switch-peptides » est innovante dans le sens où elle permet de suivre véritablement le changement conformationnel d'une molécule *in statu nascendi*, c'est-à-dire au moment précis de sa formation. Ce nouveau type de « switch-peptides » se compose de trois parties distinctes : une unité d'induction conformationnelle (σ), un élément « switch » (**S**) et un peptide cible (**P**) qui peut être aussi bien un peptide « host » adoptant une structure secondaire définie, qu'un ligand ou une séquence native (Figure 5 : σ en vert, **S** en rouge et **P** en bleu)²³.

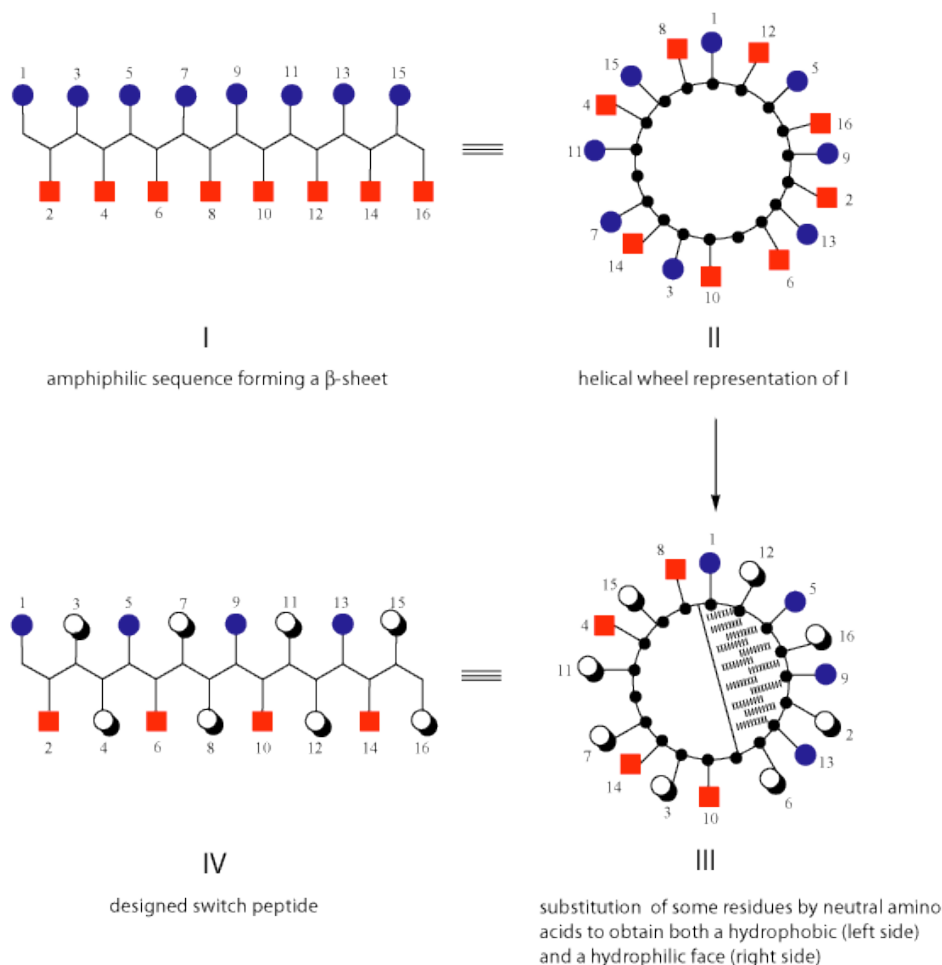


Figure 4 : Conception de la première génération de « switch-peptides » selon M. Mutter ; I = séquence amphiphile avec alternance de résidus hydrophiles (ronds bleus) et hydrophobes (carrés rouges) ; II = représentation selon la roue d'Edmundson du peptide I ; III = substitution précise de certains résidus par des acides aminés neutres (ronds blancs) dans le but d'obtenir une face entièrement hydrophobe (à gauche) et une autre complètement hydrophile (à droite) ; IV = séquence linéaire correspondant au « switch-peptide » III²⁴.

La principale caractéristique conceptuelle réside dans le fait que l'influence structurale de la partie σ n'a lieu qu'après un réarrangement intramoléculaire dû à une migration acylique $X \rightarrow N$ se produisant au niveau de l'élément « switch » S, X étant au choix un atome d'oxygène ou de soufre. Un simple acide aminé, tel que la L-sérine ou la L-thréonine ($X = O$) ou la L-cystéine ($X = S$) peut faire l'office d'un élément « switch ». Néanmoins, d'autres structures organiques, convenablement fonctionnalisées avec un acide carboxylique, une amine et un groupe hydroxyle ou thiol, peuvent aussi être envisagées (Figure 6).

La clé de ce nouveau concept se trouve donc directement relié au transfert acylique intramoléculaire $X \rightarrow N$, réaction sujette, depuis le début des années 1900, à de nombreuses études mécanistiques et offrant, dans ce contexte précis, de nombreux avantages²³. D'une part, les molécules précurseurs, ou « switch-peptides » à l'état S_{off} , sont des isopeptides O/S-acyl N(Y)-protégé (Figure 5, Y en noir) relativement accessibles par voie chimique²⁵. Leur stabilité et ainsi que leur solubilité dans les tampons aqueux, due à

la présence d'une fonction polaire ou chargée au niveau de l'élément **S**, facilitent grandement les étapes de purification avant le réarrangement.

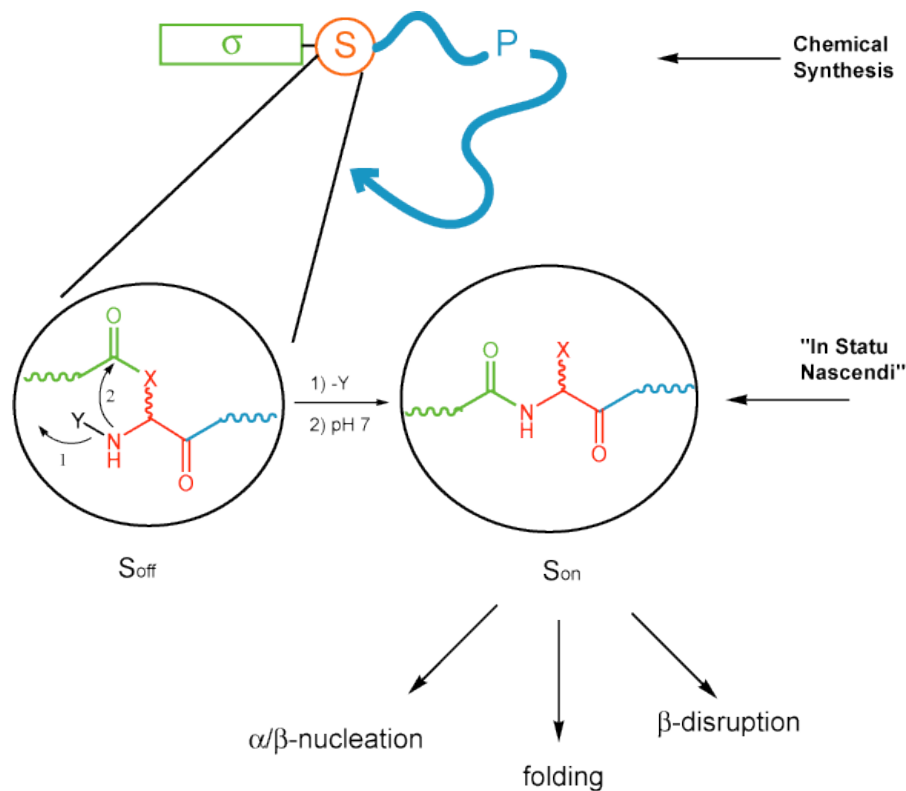


Figure 5 : Concept des « switch-peptides » : le « switch-peptide » est synthétisé chimiquement en combinant une unité d'induction σ , un élément « switch » **S** relié à elle par une liaison ester, et dont l'amine est protégée par un groupement **Y** (S_{off}), et un peptide cible **P** ; après libération de l'amine (étape 1) et réajustement du pH à 7, l'élément **S** subit un réarrangement acylique intramoléculaire $X \rightarrow N$ ($X = O, S$) rétablissant la liaison amide native (S_{on}) ; le concept peut être appliqué au suivi de la nucléation, du repliement des polypeptides ou de la destruction de feuillets β^3 .

D'autre part, l'insertion de l'élément **S** permet d'introduire une liaison non-peptidique flexible interrompant l'enchaînement des liaisons hydrogène de la chaîne amide et par-là même l'effet de l'inducteur σ sur le peptide **P** à l'état S_{off} . Après le clivage du groupement protecteur **Y** et la migration acylique intramoléculaire $X \rightarrow N$, la molécule à l'état S_{on} retrouve sa succession de liaisons peptidiques permettant à la partie σ d'influer sur la structure secondaire du peptide **P**. Ainsi, suivant l'état dans lequel se trouve l'élément « switch » **S**, le « switch-peptide » adopte l'une ou l'autre des deux conformations, chacune étant caractérisée par des propriétés totalement distinctes.

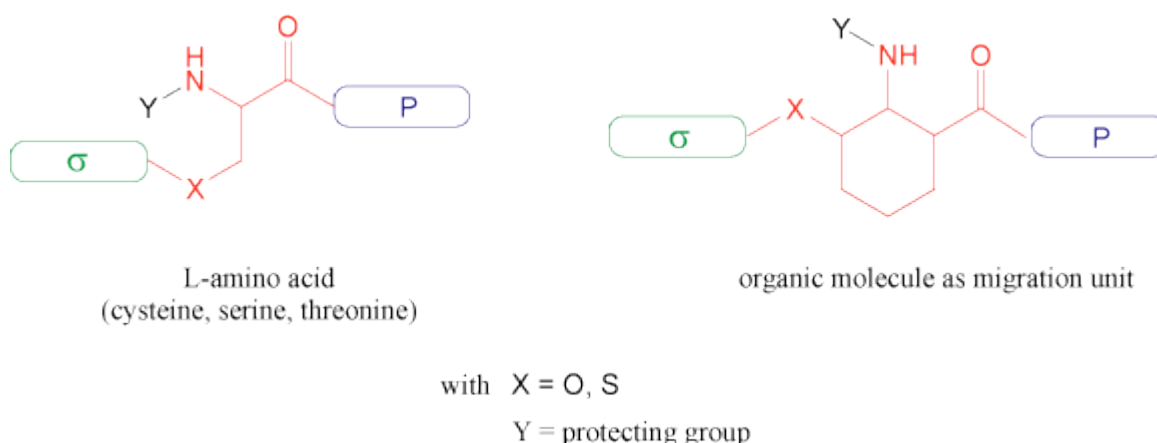


Figure 6 : Exemples d'éléments « switch », qui peuvent être aussi bien un acide aminé (sérine et thréonine pour $X = O$ et cystéine pour $X = S$) qu'une autre structure organique, cyclique ou non, les fonctions amine et hydroxyle ou thiol devant être convenablement positionnées de façon à ce que la migration acyle passe par un intermédiaire à 5 membres (cas de la molécule organique à droite) ou à 6 membres (cas d'un acide aminé naturel).

Ce concept est aussi caractérisé par la liaison peptidique native qui se forme très rapidement au moment de la migration acylique selon une cinétique du premier ordre²⁶.

Enfin, un large choix de méthodologies peut être envisagé pour déclencher la réaction de transfert acylique $X \rightarrow N$ *in situ* en jouant sur la nature du groupement **Y**. Les réactions de réarrangement acylique induites par changement de pH sont utilisées de façon courante. Des groupements N-protecteurs clivables par des enzymes sont aussi employés en vue d'applications tant *in vitro* qu'*in vivo*^{27, 28, 29}.

Il existe en effet plusieurs avantages liés à l'utilisation de groupements protecteurs enzymatiques. Le « switch-peptide » protégé peut être préalablement dissout à pH 7, le déclenchement de la migration acylique étant contrôlé par l'addition de l'enzyme adéquate clivant le groupement protecteur **Y** avec une grande spécificité. Ainsi une arginine en position **Y** est clivée par la trypsine²⁹, une endopeptidase isolée du pancréas bovin ; la D-alanine l'est par la D-aminopeptidase, extraite d'une bactérie, l'*Onchrobacterium anthropi*^{30, 31, 32} ; le groupe (acyloxy)alkyle carbonate (Acoec) est relargué par des estérases^{33, 34} ; le groupe pyroglutamyle, aussi appelé 5-oxo-L-prolyle ou pyrrolidone carboxyle (pGlu), est hydrolysé par la pyroglutamate aminopeptidase, trouvée dans une variété du microorganisme *Pseudomonas fluorescens*^{35, 36, 37} ; l'acétyl est relâché par l'acylase I^{38, 39, 40}, enzyme du rein porcin et du champignon *Aspergillus*, le phénylacétamide l'est par la pénicilline G acylase^{41, 42} ; enfin, le dipeptide arginine-proline est libéré par une endopeptidase proline-spécifique dipeptidyle aminopeptidase IV^{43, 44} (DPPIV)^{45, 46, 47}.

L'utilisation de groupements photoclivables⁴⁸ fut elle-aussi explorée, avec une attention particulière pour le groupe 6-nitroveratroyloxycarbonyl ou Nvoc, clivé par irradiation à 360 nm^{49, 50}.

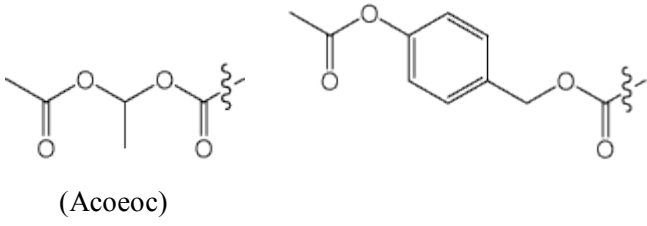
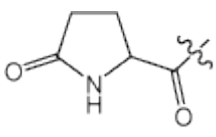
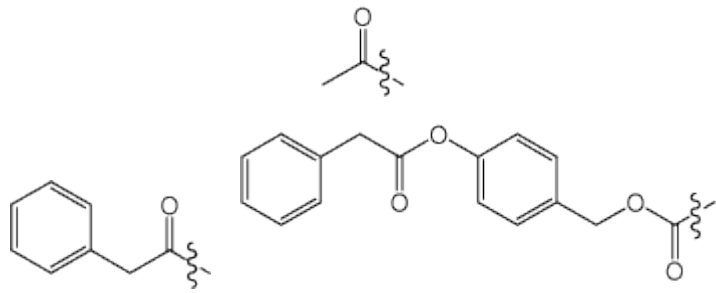
Classification	Groupe protecteur	Enzyme
Estérases	 <p>(Acoeoec)</p>	Estérases
Peptidases	L-Arginine	Trypsine
	D-Alanine	D-aminopeptidase
	 <p>(groupe pyroglutamyle)</p>	Pyroglutamate aminopeptidase
	L-Arginine-L-Proline	DPPIV
Autres		Acylase
		Pénicilline G amidase

Tableau 2 : Liste des groupements N-protecteurs (Y) clivables par une enzyme et envisagés dans le concept des « switch-peptides »^{23, 46, 47}.

La substitution d'une liaison amide par un ester est une méthode couramment utilisée dans l'investigation du rôle des polypeptides au niveau des interactions d'affinité, de la catalyse enzymatique ou du repliement des protéines. Cette stratégie s'est particulièrement développée au cours de ces dix dernières années, et ce grâce à la mise au point de nouvelles techniques expérimentales de mutagenèse dirigée, principalement basées sur la synthèse totale ou la suppression non-sens^{51, 52, 53}.

L'ester a l'avantage d'avoir des propriétés similaires à celles de l'amide, notamment en ce qui concerne la préférence conformationnelle en plan trans, les angles et longueurs de liaisons, ainsi que l'énergie conformationnelle du squelette peptidique, déterminée par des facteurs stériques et dipolaires⁵⁴. Cependant ces deux fonctions organiques diffèrent au niveau de leur aptitude à former des liaisons hydrogène. En effet, suite à la différence de pKa⁵⁵ liée à une perte de basicité⁵⁶, le carbonyle de l'ester est un accepteur de liaison hydrogène plus faible que celui de l'amide⁵⁷, tandis qu'un donneur de liaison hydrogène disparaît lorsque le groupe NH est remplacé par le seul atome d'oxygène⁵⁴ (Figure 7). Il en résulte alors une diminution de la stabilité thermodynamique et donc de la structure secondaire du depsi-peptide.

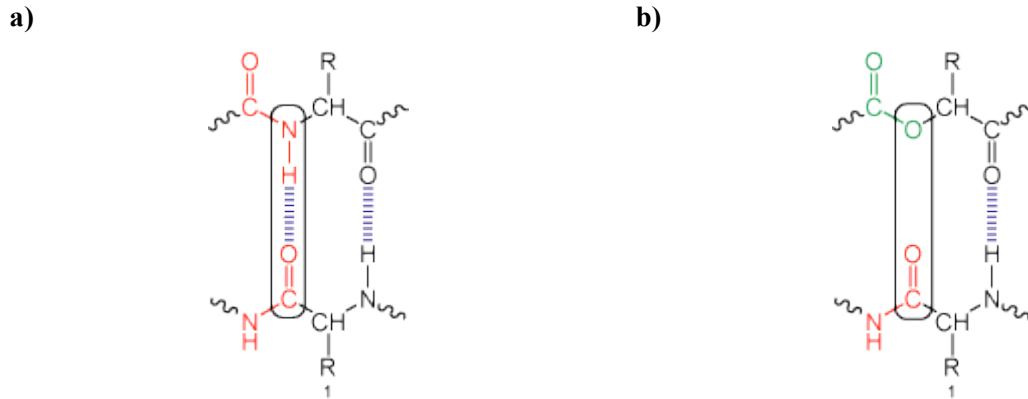


Figure 7 : **a)** Représentation schématique des liaisons hydrogène établies entre les chaînes peptidiques formées de liaisons natives amides ; **b)** effet de la mutation d'une liaison amide par un ester sur le réseau de liaisons hydrogène ; en rouge, la liaison amide, en vert, la liaison ester, en bleu, la liaison hydrogène⁵¹.

Il a été reporté que les effets destabilisateurs pour un analogue peptidique mutant impliquent une différence d'énergie libre de repliement ($\Delta\Delta G_f$) de 0.7 à 24.6 kcal/mol suivant le nombre de liaisons hydrogène supprimées, ce qui correspondrait à un $\Delta\Delta G_f$ de 0 à 2.0 kcal/mol pour chaque liaison hydrogène éliminée⁵¹. Cette valeur ne dépend pas seulement de la force de la liaison hydrogène, les interactions électrostatiques et de Van der Waals ou les effets de solvant y contribuent aussi.

P. G. Schultz et ses collaborateurs ont ainsi étudié l'effet de ce type de modification sur un feuillet β antiparallèle formé par la nucléase staphylococcale⁵⁵. Ils ont pu déterminer que la différence maximale de la force d'une liaison hydrogène impliquant un amide ou un ester était de l'ordre de 3.2 à 4.2 kcal/mol. Leur travail leur permit de conclure que la substitution dans un feuillet β d'une fonction amide par un accepteur de liaison plus faible, l'ester, conduit à une destabilisation de l'ordre de 1.5 à 2-5 kcal/mol.

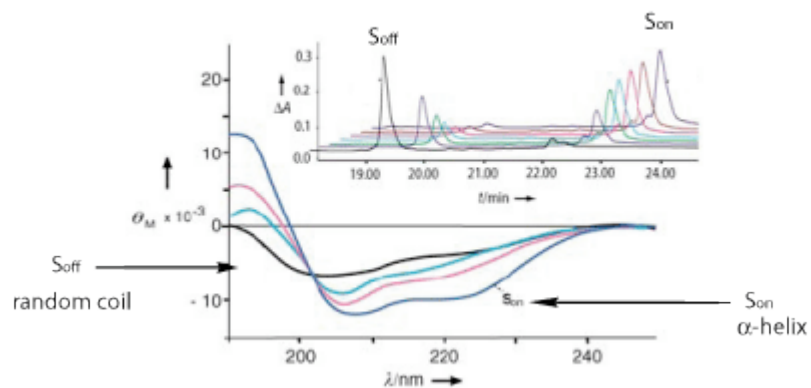
Parallèlement à cela, une autre étude fut menée par P. G. Schultz afin d'évaluer les effets de mutagenèse dirigée au niveau de l'hélice α 39-50 du lysozyme T4⁵⁶. Une modification en position N- et C-terminale, qui n'implique la destruction que d'une seule liaison hydrogène, entraîne une perte de stabilité respectivement de 0.9 et 0.7 kcal/mol. Localisée en milieu de chaîne, elle destabilise la protéine de 1.7 kcal/mol, valeur expliquée par la perte de deux liaisons hydrogène. Ils montrèrent ainsi que la perte d'énergie était plus faible dans le cas d'une hélice α que dans celui d'un feuillet β , résultat expliqué par l'observation d'un ajustement conformationnel obtenu avec une autre forme d'hélice, l'hélice 3₁₀⁵⁸.

Cette substitution de la liaison amide par une liaison ester n'est pas la seule explication de la destruction du peptide. Le fait d'utiliser un acide aminé naturel, tel que la sérine, la thréonine ou la cystéine, implique l'introduction d'un carbone supplémentaire, le C_α , dans le squelette de l'analogue peptidique. Il en résulte une flexibilité accrue autour de cet atome et un nombre plus élevé de conformères. Qui plus est, la présence d'une charge en position α au niveau de la modification contribue

à destabiliser le réseau des liaisons hydrogène. Cette stratégie fut notamment utilisée par Murphy au moment de la conception d'inhibiteurs de l'agrégation en feuillets β de la protéine responsable de la maladie d'Alzheimer⁵⁹.

Dès lors, les applications du concept des « switch-peptides » sont nombreuses. Elles peuvent être regroupées principalement en trois domaines d'étude : la nucléation de structures secondaires, leur destruction et le suivi du repliement de polypeptides (Figure 5). L'utilisation en position σ de blocs et mimes peptidiques capables de franchir la barrière énergétiquement défavorable à une structure secondaire déterminée permet d'étudier plus en détails la nucléation d'un peptide^{60, 61, 62, 63}. Par exemple, un groupement Ncap induit, après ajustement du pH à 7 et migration acylique, une hélice α dans le peptide cible, qui à l'état S_{off} adopte une structure en pelote statistique. Lorsque le groupe Ncap est remplacé par un acétyle, le peptide se transforme en feuillet β à l'état S_{on} (Figure 8)^{23, 50}.

a)



b)

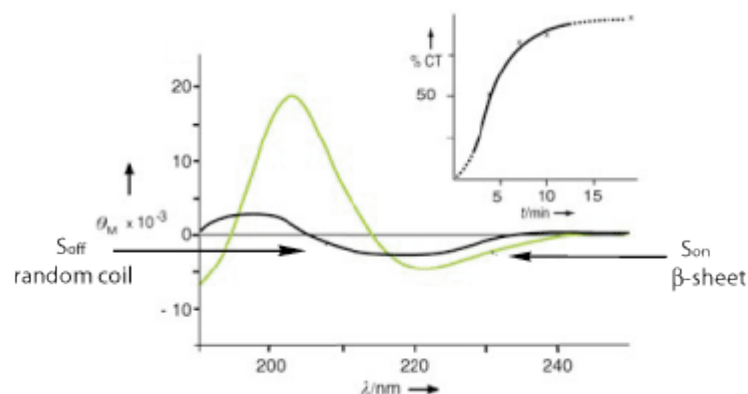


Figure 8 : Etude de la nucléation de structures secondaires ; transitions conformationnelles, induites *in statu nascendi*, suivies par dichroïsme circulaire et RP-HPLC ($\lambda = 218 \text{ nm}$) ; **a)** pour un même peptide, un groupe Ncap permet de passer d'une pelote statistique (random coil) à une hélice α (α -helix), tandis **b)** qu'un acétyle entraîne le repliement en feuillet β (β -sheet) ; CT = transition conformationnelle²³.

L'induction d'une structure et d'une fonction *in statu nascendi* grâce à ce nouveau concept de « switch-peptides » est un outil innovateur et performant qui permet l'étude des transitions conformationnelles de peptides et protéines natives dès le moment de leur formation. Elle rend ainsi accessible l'observation de l'origine moléculaire des processus dynamiques conduisant à la polymérisation et à l'agrégation irréversible tels qu'ils se produisent au tout début des maladies neurodégénératives. Des perspectives incontestables s'ouvrent dès lors tant au niveau de la reconnaissance moléculaire que de la technologie des capteurs biologiques ou de la conception de molécules bioactives.

Chapitre 2 : Les objectifs de ce travail de thèse

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre de la conception et de l'élaboration de nouvelles molécules bioactives, ciblant l'inhibition de l'agrégation fibrillaire de l'amyloïde β , peptide impliqué, suite à un changement conformationnel en feuillets β , dans la pathologie du principal désordre neurodégénératif de notre époque, la maladie d'Alzheimer.

Parmi les stratégies thérapeutiques communément envisagées pour lutter contre ce trouble de la santé, l'inhibition fibrillaire est l'une des plus attrayantes, tant pour des raisons biologiques que chimiques. Dans cette lignée, l'utilisation de molécules destructrices de feuillets β a déjà fait ses preuves. Elle requiert cependant de nombreuses améliorations techniques avant de pouvoir conduire à la synthèse d'un agent médicamenteux efficace et universel. L'introduction, dans la structure d'un inhibiteur potentiel répondant à ce concept, d'une courte séquence dérivée de la partie centrale de l'amyloïde β (1-42) permet à la molécule synthétisée de reconnaître le peptide pathogène avec une haute affinité. Ainsi, toutes les molécules potentiellement inhibitrices de la fibrillogenèse de l'amyloïde β que nous concevrons au cours de ce travail intégreront ce principe, en utilisant les peptides Phe-Phe-Asp-NH₂ ou Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-NH₂ comme séquence de reconnaissance de l'amyloïde β .

Dans un premier temps, nous considérerons la cyclisation comme étant un outil efficace pour améliorer la stabilité chimique, enzymatique et conformationnelle d'un composé, et nous la combinerons à l'emploi d'une proline, connue pour son action destabilisatrice de feuillets β . L'activité biologique de la cyclo(Lys-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu) ainsi synthétisée pourra alors être évaluée dans un système simplifié d'étude de l'amyloïdogenèse, considérant le peptide A β (13-23) comme modèle amyloïde. Nous utiliserons alors différentes techniques de détection et de caractérisation de fibrilles amyloïdes, telles que la microscopie électronique, en collaboration avec J. Dubochet et M. Adrian, UNIL, la coloration au rouge Congo ou à la thioflavine T, en collaboration avec C. Soto, Univ. Galveston, ainsi que le dichroïsme circulaire et la méthode des « host-guest switch-peptides ».

Puis nous envisagerons de développer une nouvelle série de peptides conjugués, reliant la séquence de reconnaissance amyloïde à une molécule connue soit pour détruire les amyloïdes, soit pour s'insérer entre les feuillets β en cours de formation. Dans cette optique, nous utiliserons l'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique, l'acide 3-indolebutyrique et la molécule « Hao », mime tripeptidique de brin β de J. S. Nowick regroupant les fonctions hydrazine, acide 5-amino-2-méthoxybenzoïque et acide oxalique. Chacun de ces composés représentera respectivement la nicotine, la mélatonine et un brin β tripeptidique. L'étude de leur potentiel inhibiteur, grâce aux méthodes évoquées ci-dessus, nous permettra alors de déterminer la nature des produits organiques ayant un avenir dans cette stratégie, l'intérêt d'introduire ou

non une proline entre les deux composantes d'un peptide conjugué et les différences existant entre les deux séquences de reconnaissance Phe-Phe-Asp-NH₂ et Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-NH₂.

Enfin, nous chercherons un moyen de dynamiser nos inhibiteurs potentiels pour qu'ils puissent agir en deux temps. Ils pourront ainsi améliorer leur affinité avec le peptide pathogène, et dans un deuxième temps, mieux perturber l'agrégation fibrillaire. Cela nous amènera à établir les fondements chimiques d'une nouvelle classe de « switch-peptides » composés d'une unité d'induction conformationnelle σ , d'un élément « switch » pouvant adopter deux états S_{off} (liaison ester, inactif) et S_{on} (liaison amide native, actif) par l'intermédiaire d'une migration acylique intramoléculaire X→N (X = O ou S ; S_{off}→S_{on}), et d'une séquence de reconnaissance amyloïde (Figure 5). Nous étudierons l'utilisation d'une cystéine comme élément « switch » et comparerons les propriétés physicochimiques et chimiques de cet acide aminé, ainsi que la cinétique de sa migration acylique, avec son analogue hydroxylé, la sérine, étudiée par d'autres membres du groupe de M. Mutter. Nous envisagerons aussi la ligation chemosélective native comme étant un moyen de former *in vitro* un inhibiteur potentiel. Nous développerons ensuite une nouvelle génération d'éléments « switch » pouvant induire par eux-mêmes une structure coudée dans un « switch-peptide » sans avoir recourt à l'unité d'induction conformationnelle. Pour terminer ce travail, nous tâcherons alors de combiner et appliquer les méthodologies développées jusqu'à présent au cours de la synthèse de « switch-peptides » conjugués.

Chapitre 3 : Vue d'ensemble

I. Structure des peptides et protéines

La distinction entre protéines et peptides se fait généralement de façon arbitraire, en se basant soit sur le poids moléculaire de la molécule, avec un maximum de 10 000 pour les peptides, les protéines pouvant atteindre plusieurs dizaines de millions, soit sur le nombre d'acides aminés, avec une limite de 10 pour un oligopeptide, et 50 pour un peptide. A cette exception près, les peptides et les protéines sont donc relativement similaires.

Un soin particulier fut apporté à l'étude de leur organisation structurale. Ainsi, leur structure primaire est directement déterminée par la séquence des acides aminés. La longueur de la liaison peptidique, reliant l'acide carboxylique d'un acide aminé à l'amine de l'acide aminé suivant, ainsi que les angles diédraux qui s'y rapportent définissent la conformation locale de la chaîne peptidique résultante (Figure 9a). Les longueurs de liaisons restent généralement proches des valeurs indiquées dans la Figure 9a : 1.52 Å pour la liaison $C^{\alpha}_i-C_i$, 1.23 Å pour le carbonyle, 1.33 Å pour la liaison $N_{i+1}-C^{\alpha}_{i+1}$ et 1 Å pour la liaison N-H. La liaison peptidique a une nature particulière de part la délocalisation des électrons libres de l'azote, qui lui confère un caractère partiel de double liaison. Cela se ressent au niveau de la valeur de sa longueur. Alors qu'une simple liaison carbone-azote se situe autour de 1.45 Å et qu'une liaison double de même nature est de 1.25 Å, la liaison peptidique a, quant à elle, une valeur intermédiaire de 1.33 Å. L'incidence de cette propriété sur la position des 6 atomes jouxtant la liaison peptidique est particulièrement importante, puisque ces atomes se retrouvent tous dans un même plan, représenté en mauve dans la Figure 10.

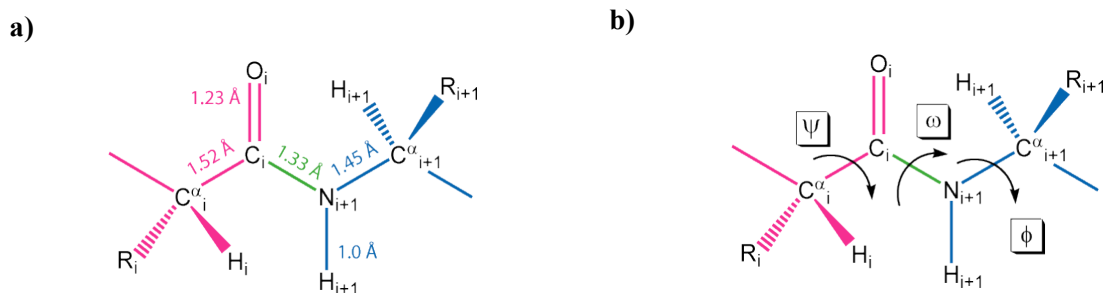


Figure 9 : Données caractéristiques d'une chaîne peptidique, avec, en rose, l'acide aminé i , en bleu l'acide aminé $i+1$ et en vert la liaison peptidique reliant les deux résidus : **a)** valeurs standards des longueurs de liaison; **b)** définition des trois angles diédraux ϕ , ψ et ω .

Les angles diédraux sont au nombre de trois ; ils se définissent comme suit : l'angle de rotation autour de la liaison C-N est nommé ϕ , celui autour de la liaison $C^{\alpha}_i-C_i$ est appelé ψ , quant à l'angle ω , il est déterminé par l'angle de rotation de la liaison peptidique (Figure 9b). La présence du plan autour de la liaison amide a une conséquence directe sur l'angle ω , qui ne peut dès lors n'adopter que deux valeurs, 0

ou 180° . Cette caractéristique permet de définir la liaison amide comme étant « cis » ou « trans » suivant la valeur d' ω , respectivement égale à 0 ou 180° (Figure 10). Les angles φ et ψ ont au contraire un certain degré de liberté, cependant, toutes les valeurs ne leur sont pas permises dans la mesure où il leur faut respecter l'encombrement stérique qui peut exister entre la chaîne latérale et la chaîne principale de chaque acide aminé.

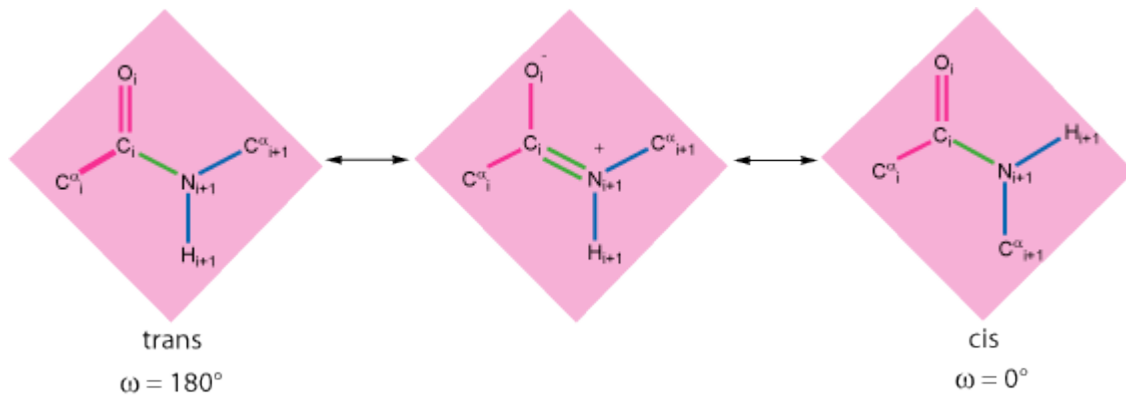


Figure 10 : Isomérisation cis-trans de la liaison amide et valeurs correspondantes de l'angle ω ; le plan réunissant les 6 atomes autour de la liaison amide est symbolisé par le rectangle mauve.

Le biophysicien Indien G. N. Ramachandran fut le premier à calculer les couples de valeurs autorisées pour les angles φ et ψ . Il présenta ses résultats en 1963 sous forme d'un diagramme qui porte son nom⁶⁴. Chaque acide aminé est ainsi défini suivant une carte similaire à celle de la Figure 11.

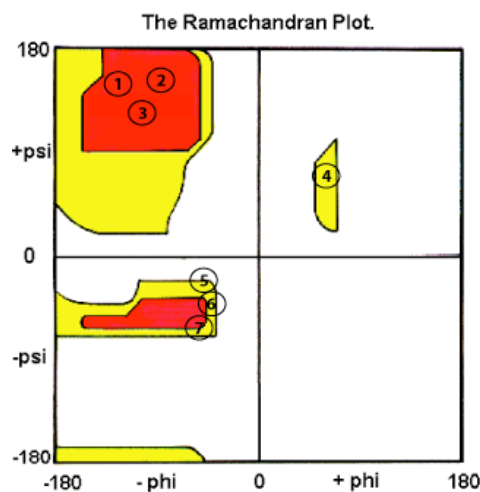


Figure 11 : Diagramme de Ramachandran : les zones colorées et numérotées représentent les conformations peptidiques fréquemment rencontrées : 1 = feuillet β antiparallèle; 2 = polyproline I, polyproline II et polyglycine II; 3 = feuillet β parallèle; 4 = hélice α gauche; 5 = hélice 3_{10} droite; 6 = hélice α droite; 7 = hélice π droite⁶⁵.

Les zones spécifiques de chaque diagramme furent déterminées d'après l'étude des conformations obtenues par un peptide dont les angles φ et ψ de chaque acide aminé constitutif étaient prédéterminés (Figure 11). Ces conformations définissent la structure secondaire d'un peptide ou d'une protéine. Parmi elles, les hélices α et les feuillets β sont les structures les plus fréquemment rencontrées.

En 1951, L. Pauling fut le premier à décrire l'hélice α , structure secondaire la plus fréquemment rencontrée au niveau des protéines et dont l'existence fut confirmée neuf ans plus tard par l'analyse structurale de la myoglobine, réalisée par J. C. Kendrew^{66,67}. Les acides aminés naturels, de configuration L, forment des hélices droites, alors que les acides aminés de configuration D constituent des hélices dites gauches. Il arrive cependant d'observer occasionnellement des régions courtes de trois à cinq acides aminés formant des hélices gauches bien que constituées de résidus naturels⁶⁸ (Figure 11, Figure 12a, b et c). L'hélice α est caractérisée par un nombre de 3.6 résidus par tour, ainsi que par une liaison hydrogène interne stabilisatrice entre le carbonyle du résidu n et l'hydrogène lié à l'azote du résidu $n+4$, délimitant ainsi une boucle de 13 atomes (Figure 12, a). Les hélices π et 3_{10} sont des variantes de l'hélice α , la liaison hydrogène étant localisée entre l'acide aminé n et l'acide aminé $n+5$ pour le premier type d'hélice, et entre le résidu n et le résidu $n+3$ pour le second. L'hélice 3_{10} doit son nom aux 3 acides aminés présents à chaque tour et aux 10 atomes constitutifs du cycle fermé par la liaison hydrogène interne (Figure 11, Figure 12d). La polyproline I, la polyproline II et la polyglycine II sont d'autres variantes appartenant à la famille des hélices (Figure 11).

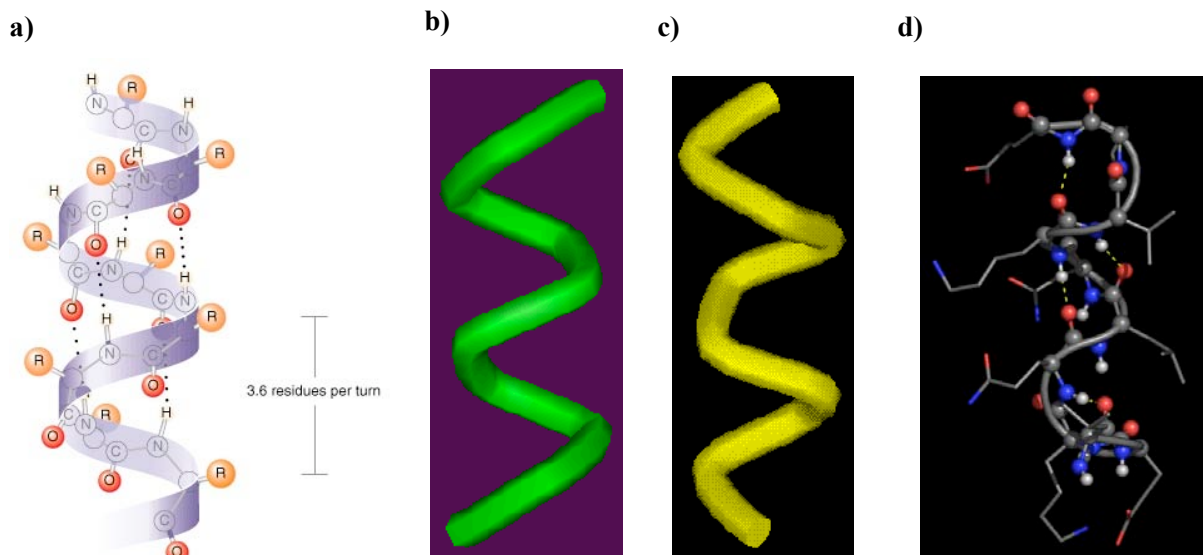


Figure 12 : Les différents types d'hélices : **a)** l'hélice α droite⁶⁹; **b)** comparaison entre l'hélice α droite et **c)** l'hélice α gauche⁷⁰; **d)** représentation schématique d'une hélice 3_{10} ⁷¹.

Le second élément structural majoritairement rencontré dans les protéines est le feuillet β (Figure 11)⁶⁸. Contrairement à l'hélice α , cette structure est construite par association de plusieurs régions d'une même protéine, appelés brins β . Généralement d'une longueur de 5 à 10 résidus, les brins β sont alignés les uns à côté des autres de façon à ce que les groupements carbonyles d'un des brins puissent former des liaisons hydrogène avec les groupes amides des brins adjacents. Lorsque les brins sont alignés dans la même direction biochimique, ils forment un feuillet β parallèle (Figure 13a), par contre, si la direction de ces brins est alternée, le feuillet β résultant est dit antiparallèle (Figure 13b). Il existe aussi des feuillets mixtes, composés à la fois de feuillets β parallèles et de feuillets β antiparallèles (Figure 13c). Mais d'une façon générale, les feuillets antiparallèles sont plus stables que leurs analogues parallèles. D'autre part, la géométrie particulière de ces structures leur confère une apparence repliée où les chaînes latérales pointent alternativement au-dessus et en-dessous du plan dessiné (Figure 13d). Chaque feuillet β se tord par la suite en adoptant une conformation « twistée » droite (Figure 13e).

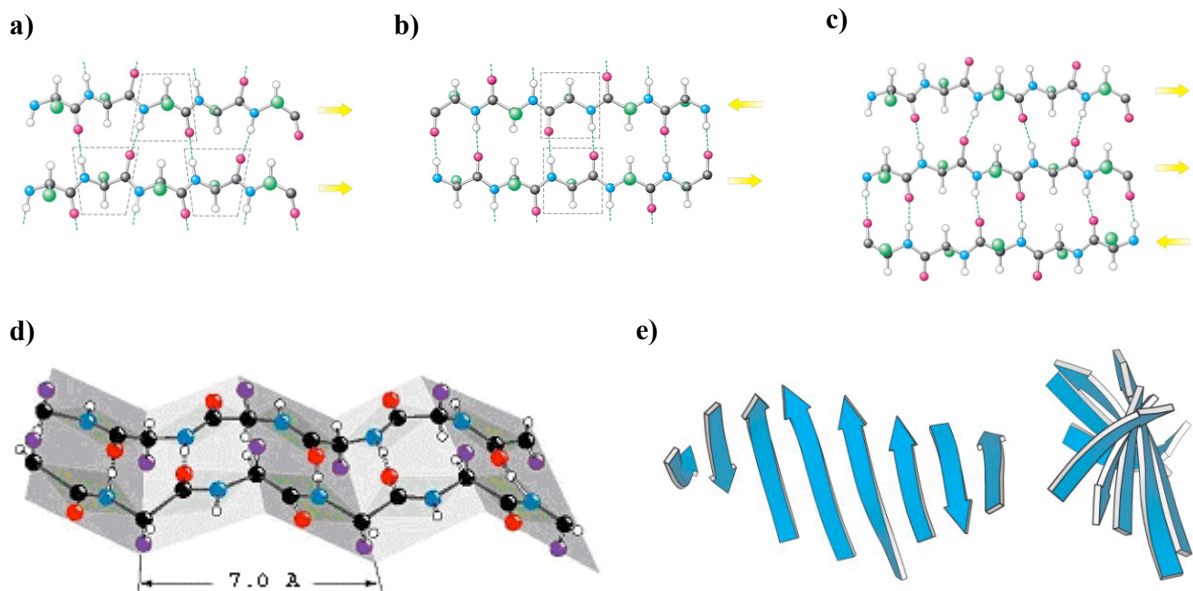


Figure 13 : Structures en feuillet β : **a)** feuillet β parallèle, **b)** feuillet β antiparallèle et **c)** feuillet β mixte⁷²; **d)** feuillet β antiparallèle plissé⁷³; **e)** feuillet β « twisté »⁷².

Enfin, certaines régions peptidiques ne correspondent à aucune structures secondaires typiques. Elles sont alors appelées pelotes statistiques (« random coil »). Elles jouent un rôle important au moment où la protéine acquiert sa conformation bioactive, dans la mesure où elles sont un passage obligé lors des transitions conformationnelles entre hélices α et feuillets β .

La plupart des protéines sont formées d'une succession de structures secondaires reliées entre elles par des boucles de longueurs variables et de formes irrégulières (Figure 14a). Localisées à la surface des molécules et directement exposées au solvant, ces zones sont riches en résidus hydrophiles polaires et

chargés favorisant la création de liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau environnantes. Certaines de ces boucles, appelées boucles en épingle à cheveux ou coudes (« reverse turn »), permettent de connecter entre eux les brins adjacents β antiparallèles et de donner aux protéines leur aspect globulaire. Les coudes γ sont formés de trois résidus consécutifs, les coudes β ont besoin, quant à eux, de quatre acides aminés successifs (Figure 14b)⁷⁴. Au niveau d'un coude β , seuls les angles de torsion des seconds et troisièmes résidus sont critiques, les premiers et quatrièmes acides aminés permettant de stabiliser la structure grâce à la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire.

C. M. Venkatachalam prédisait les trois premiers coudes idéaux, I, II et III, les coudes I', II' et III' correspondant à leur image respective dans un miroir⁷⁵. Les autres types, IV, V, V', VI et VII, furent décrits un peu plus tard⁷⁶. Le Tableau 3 résume les différentes propriétés de ces coudes. Chaque acide aminé choisit alors la nature du coude et sa position dans ce motif suivant ses propriétés intrinsèques⁷⁷.

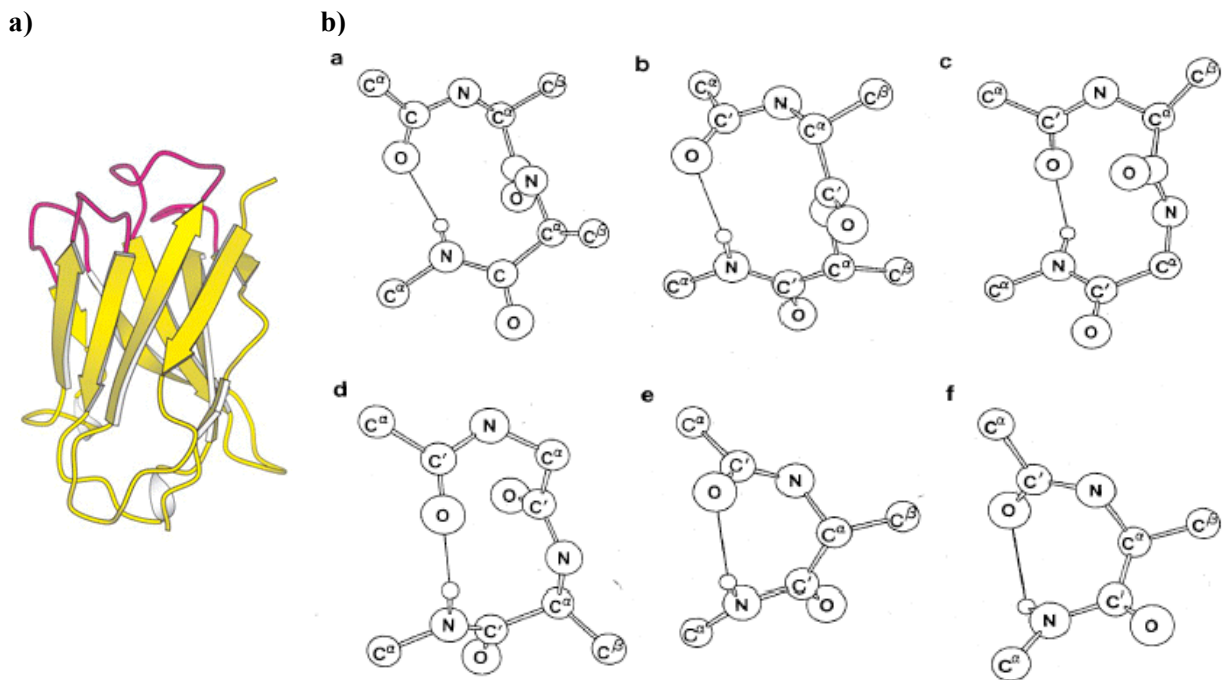


Figure 14 : *a) Boucles (en rose et jaune) connectant différents feuilletts β (flèches en jaune)⁷²; b) coudes, ou « reverse turns »: a = coude β de type I; b = coude β de type I'; c = coude β de type II; d = coude β de type II'; e = coude γ ; f = coude γ inverse⁷⁴.*

Les structures super-secondaires se définissent comme étant des enchaînements typiques de structures secondaires qui, cependant, ne constituent pas en eux-mêmes des domaines structuraux complets.

La structure tertiaire correspond au repliement des structures secondaires les unes sur les autres. A l'origine de l'activité biologique de la protéine, elle doit sa stabilité à un réseau organisé de liaisons hydrogènes, de ponts disulfures et d'interactions ioniques, hydrophobiques ou de Van der Waals.

Lorsque des peptides ayant d'ores et déjà adoptés leur structure tertiaire se combinent entre eux, ils peuvent former une nouvelle structure, dite quaternaire, stabilisée par les mêmes forces que celles évoquées précédemment pour les structures tertiaires. L'insuline et l'hémoglobine, que nous avons présenté au cours de notre introduction, sont deux illustrations typiques de ce type d'arrangements (Figure 2).

Type	Φ_{i+1}	Ψ_{i+1}	Φ_{i+2}	Ψ_{i+2}
I	-60	-30	-90	4
I'	60	30	90	0
II	-60	120	80	0
II'	60	-120	-80	0
III	-60	-30	-60	-30
III'	60	30	60	30
IV	Coude avec 2 angles ou plus différents d'au moins 40° par rapport aux valeurs données ci-dessus			
V	-80	80	80	-80
V'	80	-80	-80	80
VI	Proline cis en position 3			
VII	Coude créé par $\psi_{i+1} \sim 180^\circ$ et $ \phi_{i+2} < 60^\circ$ ou $ \psi_{i+1} < 60^\circ$ et $\phi_{i+2} \sim 180^\circ$			
Coude γ	70 to 85°	-60 to -70°	-120°	$\psi_i = 120^\circ$
Coude γ inverse	-70 to -85°	60 to 70°	120°	$\psi_i = -120^\circ$

Tableau 3 : Classification des différents coudes existant et valeur de leurs angles diédraux correspondants^{74, 76}.

Enfin, le repliement des protéines est le procédé biologique permettant à une protéine d'acquérir sa structure tridimensionnelle et d'être biologiquement active⁶⁸. Alors que certaines molécules adoptent spontanément leurs structures définitives, d'autres requièrent l'intervention de chaperons initiant le procédé et évitant les associations illicites avec d'autres protéines.

D'une façon générale, la structure secondaire d'une protéine ne peut être prédite avec un haut degré de fiabilité juste en se basant sur sa structure primaire, ce qui limite à son tour la prédiction des structures tertiaires⁶⁸. Il existe toutefois de nombreux logiciels utilisés pour évaluer le comportement d'un peptide linéaire en milieu aqueux. Ces programmes s'appuient sur des méthodes semi-empiriques de prédiction de structure, dont les plus célèbres sont la méthode de Chou et Fasman, basée sur la probabilité pour chaque acide aminé à adopter une structure secondaire particulière, la méthode de Garnier, l'approche statistique et mécanistique de Tanaka et Scheraga, et celles fondées sur des considérations stéréochimiques¹⁴.

Par contre, des méthodes précises ont été mises au point afin de déterminer la structure secondaire réellement adoptée par un peptide donné. Elles se basent sur le fait que la conformation d'un peptide affecte directement les propriétés spectrales de son squelette dans la région de l'UV lointain, en dessous de 250 nm⁷⁸. Les centres asymétriques des différents acides aminés constitutifs de la molécule interagissent différemment avec la lumière polarisée lévogyre ou dextrogyre, il en résulte une rotation de la lumière polarisée. Il fut observé que dans les régions où la molécule n'absorbe pas, la rotation de la lumière varie graduellement avec la longueur d'onde, tandis que dans les régions d'absorbance, la rotation augmente rapidement pour redescendre puis augmenter de nouveau : c'est ce qu'on appelle l'effet Cotton (Figure 15a)⁷⁹. La dispersion rotatoire optique (ORD, optical rotatory dispersion) est une méthode fondée sur la dépendance de la rotation de la lumière polarisée par rapport la longueur d'onde, tandis que le dichroïsme circulaire (CD, circular dichroism) s'attache aux différentes extensions des rayons polarisés circulaires droite et gauche par les molécules chirales (Figure 15a et b)⁷⁹. Des spectres typiques furent réalisés avec ces deux techniques en utilisant comme référence une poly(Lys) sous forme d'hélice α , de feuillet β et de pelote statistique (Figure 15b). La structure secondaire d'un peptide quelconque est déterminée par simple comparaison du spectre obtenu avec ceux de référence.

La spectroscopie infrarouge et la spectroscopie Raman permettent aussi d'identifier la nature de la structure secondaire d'un peptide⁸⁰. Ces deux méthodes sont basées sur les fréquences de vibration des atomes liés, et plus particulièrement dans le cas de l'infrarouge, sur les vibrations d'élongation de la liaison C=O, représentées par la bande amide I, fortement influencée par la nature des liaisons hydrogènes associées, elles-mêmes dépendantes de la nature de la conformation du peptide (Figure 16).

Enfin, la résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton (¹H) et du carbone (¹³C) est une autre technique permettant l'étude des structures secondaires des peptides en solution⁸¹, bien qu'il soit relativement difficile et laborieux d'interpréter les résultats obtenus.

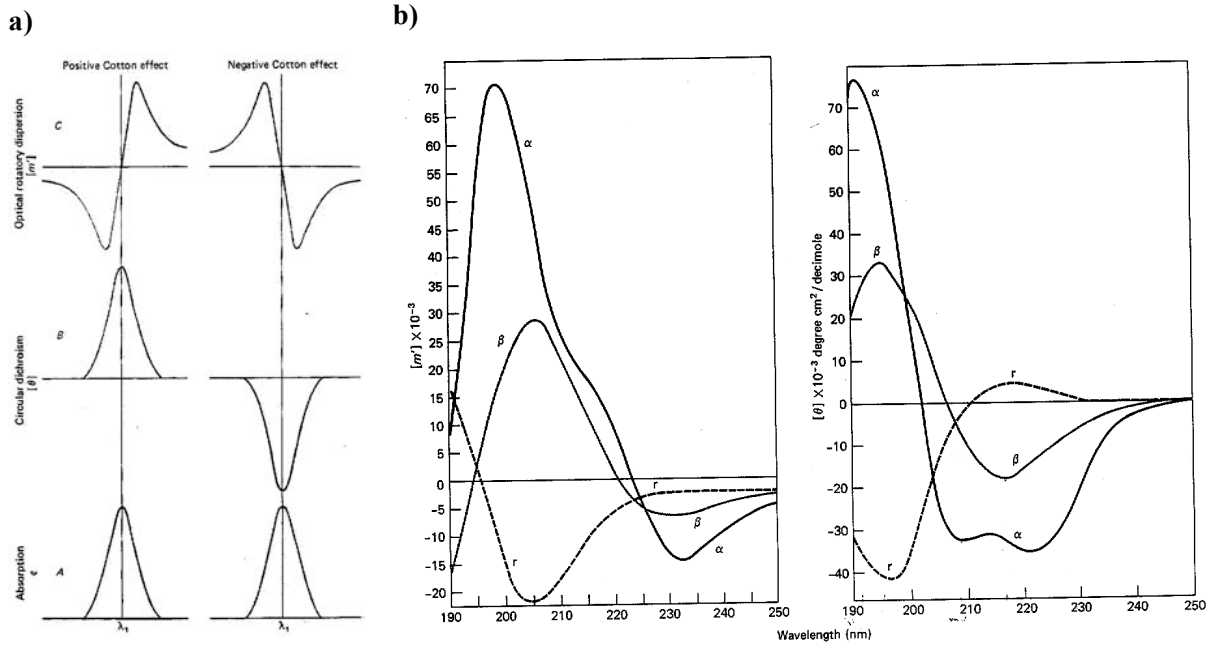


Figure 15 : a) A: bande d'absorption électronique typique d'un effet Cotton positif (à droite) et négatif (à gauche), B: spectre CD résultant; C: spectre ORD correspondant^{79, 82}; b) spectre ORD (à gauche) et spectre CD (à droite) spectres de poly(Lys) sous forme d'hélice α (α), de feuillet β antiparallèle (β) et de pelote statistique (r)^{79, 83, 84}.

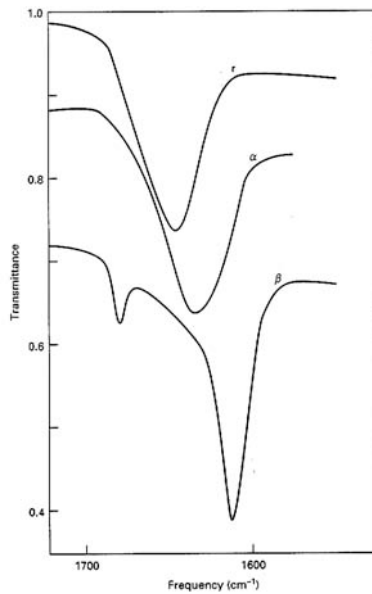


Figure 16 : Spectroscopie infrarouge dans ²H₂O de la bande amide I de poly(Lys) sous forme de pelote statistique (r), d'hélice α (α) et de feuillet β antiparallèle (β)⁸⁵.

II. Les migrations acyliques intramoléculaires

1. Introduction

Les migrations acyliques intramoléculaires furent étudiées avec soin dès le début du XIX^{ème} siècle, notamment par A. W. Titherley, qui fut l'un des premiers à s'y intéresser⁸⁶. Dès lors, les exemples s'accumulèrent et on put les observer aussi bien dans les *o*-aminophénols^{87, 88, 89, 90, 91, 92, 93} que dans les alcools aminés aliphatiques⁹⁴, ainsi que dans les peptides contenant des résidus sérine, thréonine ou cystéine^{95, 96, 97}.

2. Mécanisme

Les réactions de transfert acylique mettent en jeu une amine, un groupement alcool ou thiol et un groupe carboxylique (Figure 17). L'étude de l'isomérisation de l'isocyclosporine A en cyclosporine A, un métabolite fongique ayant une activité immunosuppressive reconnue^{98, 99}, confirma que le réarrangement acylique X→N, X étant aussi bien un oxygène qu'un soufre, était catalysé par les ions hydroxyles et qu'il existait une corrélation directe entre la vitesse de la réaction et le pH lorsque celui-ci était compris entre 8 et 10¹⁰⁰. La migration N→X, quant à elle, est catalysée par l'acidité du milieu réactionnel. Les ions H⁺ permettent de déplacer l'équilibre réactionnel vers la forme (thio)ester par protonation de l'amine libre. Dans ce cas, la cinétique est intimement liée à la nature du solvant organique dans lequel se fait la réaction de transfert.

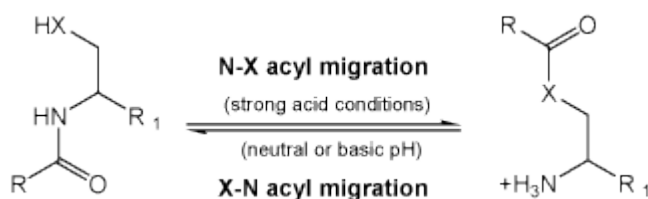


Figure 17 : Principe de la migration acylique : l'équilibre est déplacé dans le sens N→X (X = O ou S) en présence d'un acide fort permettant la protonation de l'amine. Il s'inverse rapidement en milieu neutre ou basique pour reformer l'amide, plus stable au point de vue thermodynamique.

D'une façon générale, les migrations acyliques passent par un intermédiaire cyclique à 5 voire 6 membres. Deux voies furent proposées pour expliquer leur mécanisme. La première conduit à une oxazoline (ou thiazoline) et induit un changement de configuration au niveau du C_β, ce qui est sans importance pour la sérine ou la cystéine, mais est confirmé dans le cas de la thréonine (Figure 18). Le

second chemin réactionnel induit la formation d'une hydroxyoxazolidine (ou hydroxythiazolidine) avec rétention de configuration. Le transfert N→O peut emprunter l'une ou l'autre des deux voies suivant la nature des réactifs utilisés, contrairement au sens O→N qui s'engage uniquement dans celle de l'hydroxyoxazolidine^{101, 102, 103}.

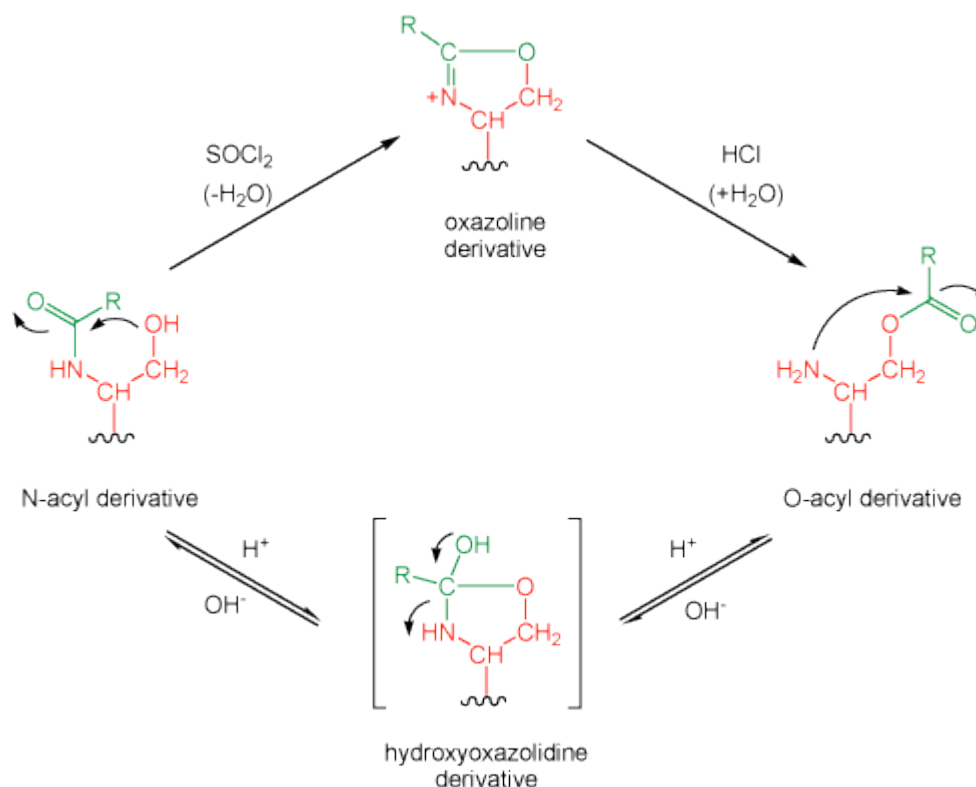


Figure 18 : Mécanisme proposé des transferts acyliques : la migration O→N passe par un dérivé hydroxyoxazolidine avec rétention de la configuration au niveau du C_β, tandis que la migration inverse peut se faire, suivant les conditions utilisées, soit via la formation de l'hydroxyoxazoline, soit via celle d'une oxazoline avec inversion de configuration^{101, 102, 103}.

En 1981, D. S. Kemp démontra que les migrations acyliques pouvaient s'étendre à des intermédiaires cycliques à 9 et 12 membres¹⁰⁴. Ce résultat fut d'une importance capitale, puisqu'il est à la base des recherches menées sur les stratégies de capture d'amines dont nous reparlerons plus loin dans ce chapitre (paragraphe 4. Applications chimiques – a. les ligations chimiques).

Il fut aussi montré que ces réactions se produisaient aussi de façon intermoléculaire entre deux molécules distinctes¹⁰⁵. Dans ce cas particulier, le réarrangement se produit de manière beaucoup plus lente, l'intermédiaire cyclique n'étant pas stabilisé de la même façon.

Les travaux de Y. Shao et H. Paulus permirent d'estimer les vitesses de réarrangements acyliques O→N et S→N respectivement pour la sérine et la cystéine¹⁰⁶. Dans le cas du peptide Fmoc-Gln-(H⁺)Ser-Asp-Gly-Tyr-NH₂, le temps de demi-vie de la migration à 37 °C et à pH 7.0 est inférieur à la minute. Il est

beaucoup plus faible lorsque la sérine est remplacée par une cystéine, avec une valeur de 24 sec à pH 5.0, celui correspondant au pH 7.0 ne pouvant être mesuré, la réaction de transfert étant beaucoup trop rapide. Ils en conclurent donc que les thioesters étaient beaucoup plus sensibles aux attaques nucléophiles des amines que les esters, cela se traduisant par des vitesses de réarrangement environ 10^3 fois plus rapides que celles de leurs analogues¹⁰⁶.

De plus, de part leur caractère spontané, les migrations $X \rightarrow N$ sont liées à des énergies d'activation relativement faibles, de l'ordre de 4 à 5 kcal/mol¹⁰⁶. Ces valeurs sont proches de celles des réactions catalysées mais elles ne correspondent pas aux réactions spontanées du type hydrolyse d'esters ou de thioesters, dont les énergies d'activation sont généralement comprises entre 12 et 20 kcal/mol. L'entropie d'activation relève aussi de la nature particulière de ces transformations. Avec des valeurs de 2.3 et 3.9 cal/mol.°K respectivement pour les transferts $O \rightarrow N$ et $S \rightarrow N$, elles sont particulièrement faibles pour des réactions intramoléculaires impliquant un intermédiaire cyclique¹⁰⁶.

3. Implications biologiques

Dans la nature, les migrations acyliques $N \rightarrow X$ ne se produisent que dans le cas où la formation de l'ester ou du thioester serait immédiatement suivie d'une seconde réaction nécessaire au déplacement de cet équilibre défavorable. Pour cette même raison, il n'existe aucun exemple de réarrangement acylique $X \rightarrow N$, exception faite de la biosynthèse des protéines, dont nous expliquerons brièvement le mécanisme. Nous verrons aussi que les depsipeptides sont des structures ayant toute leur importance dans le monde biologique.

a. Biosynthèse des protéines

Les organismes vivants synthétisent les protéines à partir de l'information génétique codée dans l'ADN de chaque cellule¹⁰⁷ (Figure 19). Pour cela, l'ADN doit se répliquer en ARN selon un processus appelé transcription. L'ARN messager (m-ARN) qui en résulte constitue la matrice responsable de l'agencement précis des acides aminés. Au cours de l'élaboration de la protéine, l'ARN de transfert (t-ARN) permet le transport d'un acide aminé naturel vers le m-ARN. Ce processus se nomme translation. Les deux t-ARN, l'un portant la chaîne peptidique en cours de synthèse et l'autre, le prochain acide aminé, se rapprochent au niveau du ribosome. L'intégration de l'acide aminé dans la chaîne peptidique se fait *via* une migration

acylique O→N intermoléculaire entre l'amine libre de l'acide aminé prêt à être incorporé et l'ester liant le peptide en construction au ribose du t-ARN¹⁰⁸ (Figure 20).

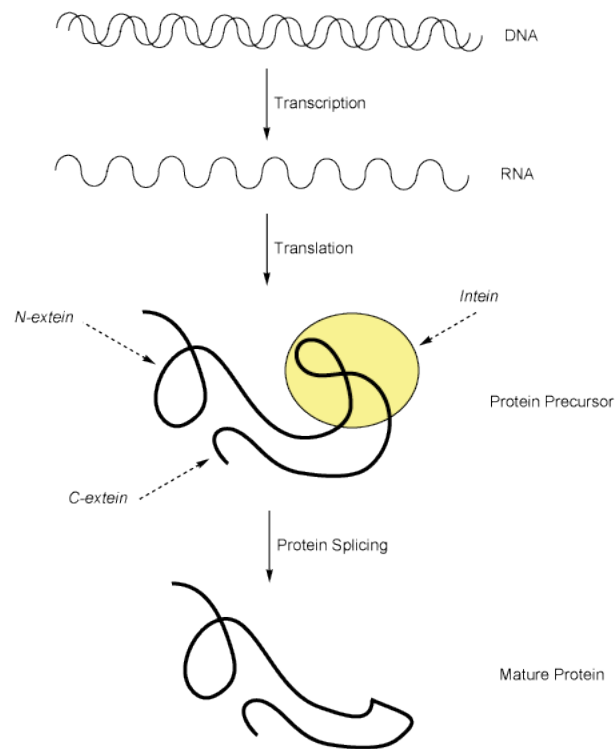


Figure 19 : Schéma simplifié de la biosynthèse des protéines : l'ADN est d'abord transcrit en ARN, puis le précurseur de protéine est obtenu au cours de la traduction ; dans certains cas, un épissage de protéine, entraînant l'excision d'une partie interne du précurseur de protéine, l'intéine, et la jonction des deux parties externes, ou extéines, permet l'accession à la biofonctionnalité.

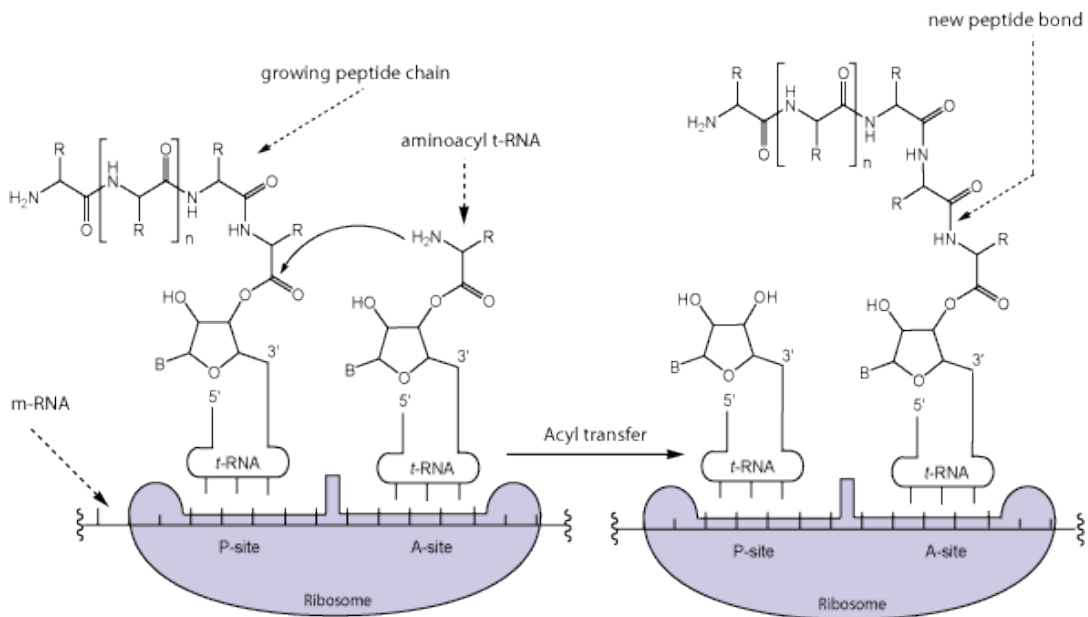


Figure 20 : Vue simplifiée de la biosynthèse des protéines : le groupe acylique en position C-terminale de la chaîne peptidique en formation est transféré via une migration O→N sur l'amine α d'un amino acyl lié à un t-RNA¹⁰⁸.

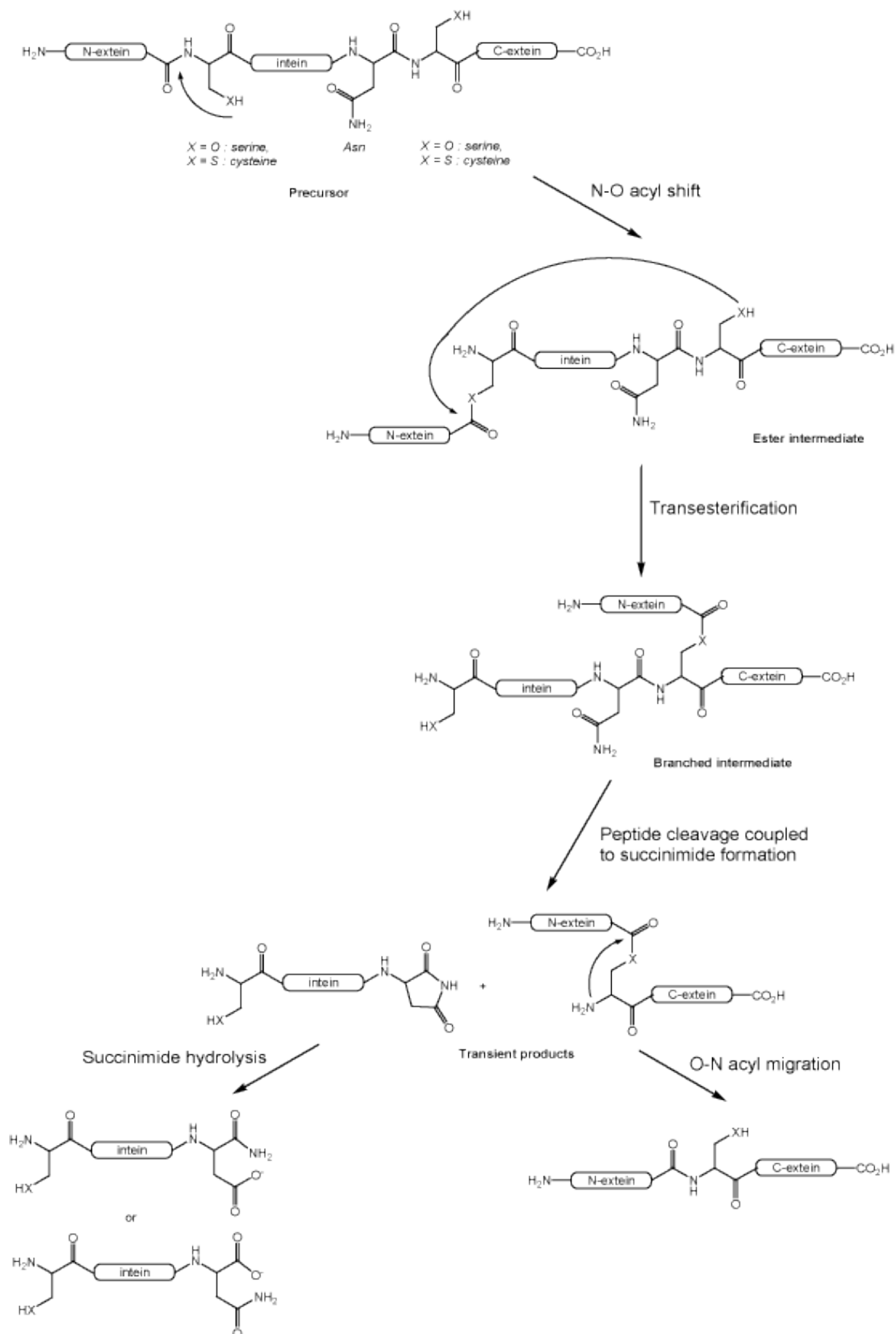


Figure 21 : Mécanisme de l'épissage posttranslational des protéines^{106, 108, 111}.

En 1990, P. M. Kane et R. Hirata découvrirent chacun de leur côté que certaines protéines pouvaient subir une modification semblable au phénomène de l'épissage de l'ARN, consistant à éliminer par excision une partie de leur séquence^{109, 110} (Figure 19). Ce mécanisme posttranslational permet donc à un précurseur de protéine d'expulser un segment polypeptidique interne, l'intéine, et de recoller les parties externes N- et C-terminales, les extéines^{106, 108, 111}. Cette modification se déroule en quatre étapes, les trois premières étant catalysées par l'intéine qui contient tous les éléments nécessaires à ce processus (Figure 21).

La première étape consiste en un réarrangement acylique intramoléculaire N→X, conduisant à la formation d'un depsipeptide linéaire. Une réaction de trans(thio)estérification, impliquant suivant le cas une sérine, une thréonine ou une cystéine, mène ensuite à un intermédiaire depsipeptidique branché. La cyclisation de l'asparagine C-terminal de l'intéine entraîne le clivage de la liaison peptidique voisine ainsi que la formation d'une succinimide. Cette étape a une autre conséquence, à savoir l'excision de l'intéine, les deux extéines étant liées entre elles par une liaison ester ou thioester. Le cycle succinimique subit alors une hydrolyse, qui peut mener soit à l'asparagine d'origine, soit à un acide aspartique amidé. Pendant ce temps, une dernière migration acylique X→N permet de rétablir la liaison peptidique native et de donner naissance à la protéine mature.

b. Les cyclodepsipeptides

Les cyclodepsipeptides font partie des composés biologiquement actifs les plus intéressants que l'on puisse trouver chez les organismes marins. Les éponges, telles que les géodiamolides, l'arénastatine ou le jasplakinolide, sont souvent la principale source de ce type de molécules¹¹². L'onchidine B, par contre, fut découvert dans un mollusque du Pacifique sud, l'*Onchidium* sp (Figure 22b)¹¹².

Mais ce ne sont pas les seules sources naturelles de cyclodepsipeptides. La valinomycine, un antibiotique fongique isolé du *Streptomyces fulvissimus*, est un exemple typique de depsipeptides naturels à activité médicale (Figure 22a)²⁵. Cette molécule cyclique et symétrique est formée de trois unités répétitives d'une même séquence de quatre acides α -aminés et α -hydroxylés. Jusqu'à présent, elle fit preuve de la meilleure sélectivité K^+/Na^+ de tous les K^+ -ionophores connus^{25, 113}. Une autre preuve de l'intérêt biologique cette catégorie de composés : les quinomycines. Ces bisintercalateurs d'ADN se sont révélés être de puissants antitumoraux²⁵.

Ces observations ont ainsi contribuées à renforcer l'intérêt des chercheurs pour ce type de molécules, et pour les depsipeptides en général.

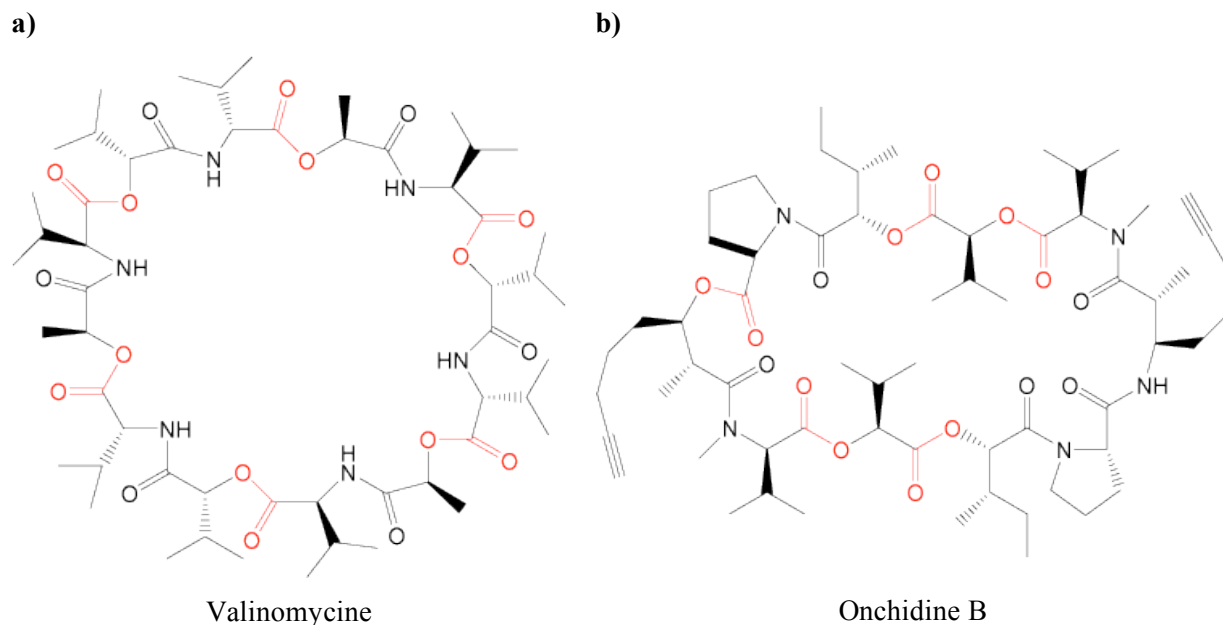


Figure 22 : Structure de deux exemples de cyclodepsipeptides naturels, **a)** la valinomycine et **b)** l'onchidine B ; en rouge, les liaisons esters²⁵.

4. Applications chimiques

En plus de leur importance biologique, les migrations acyliques ont trouvé leur place dans le monde de la chimie. De leurs premières applications en synthèse totale de protéines à leur utilisation en tant que prodrogues, ces réactions sont de nos jours des outils couramment employés dans de nombreux domaines. Nous tâcherons de résumer dans ce chapitre leurs principales applications.

a. Les ligations chimiques

La nécessité d'obtenir constamment de nouveaux peptides par voie chimique permit le développement des techniques de SPPS. Malgré tout, elles trouvèrent leur limite lors de la synthèse de longues séquences ou de peptides particulièrement hydrophobes avec plus de 50 résidus. Difficultés de couplages et de déprotection, réactions secondaires et problèmes de purification sont alors les principaux obstacles rencontrés dans ce genre de situations^{114, 115, 116}. Dès lors, de nouvelles méthodes alternatives furent envisagées, la principale étant fondée sur ces procédés de migrations acyliques^{104, 108}.

D'un point de vue historique, la ligation chimiosélective native fut découverte en 1953 par T. Wieland et ses collaborateurs qui observèrent la formation du dipeptide Val-Cys à partir d'une simple solution aqueuse contenant le thioester Val-SPh et la cystéine⁹⁷.

Cependant, il fallut attendre 1975 pour que D. S. Kemp développe la première approche de ligation chimique, à la stratégie de capture d'amines^{108, 117} (Figure 23). Cette réaction se produit en quatre temps. Dans une première étape, un segment peptidique 1 N-terminal est attaché à un support grâce à une liaison ester. Un second peptide (peptide 2), ayant une fonction amine N-terminale libre, réagit avec ce même support et se fixe dessus. Ceci a pour conséquence le rapprochement des deux fragments peptidiques 1 et 2 qui peuvent alors interagir pour se réunir *via* un transfert acylique O→N et se libérer du support après clivage. Il existe trois principales variantes de cette méthode : la ligation par formation d'hémiaminal, celle par formation d'imine et celle par addition de Michael¹⁰⁸ (Figure 24).

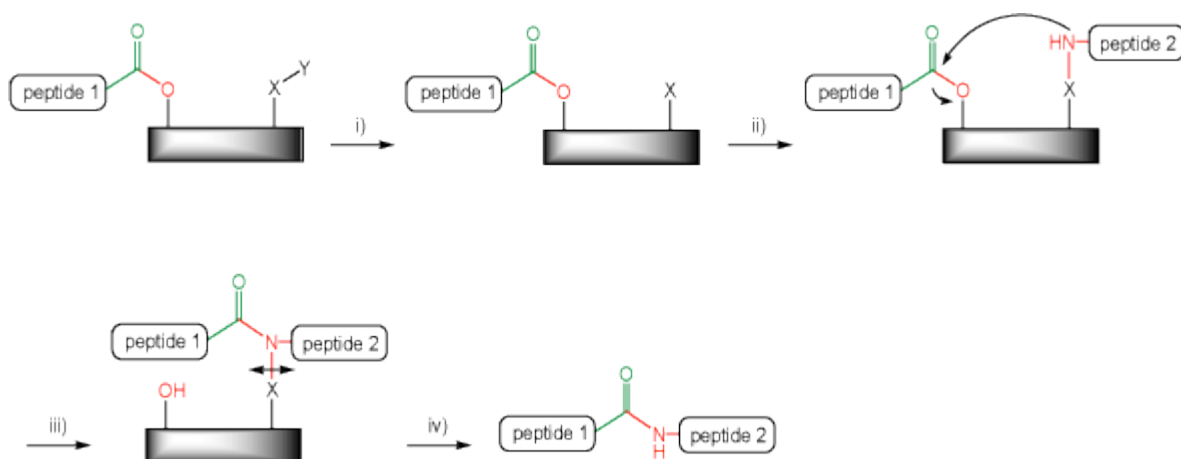


Figure 23 : Principe de la ligation par capture d'amines : i) la fonction réactive X du support est activée par libération de la protection Y ; ii) elle réagit avec l'amine N-terminale du peptide 2 qui s'attache alors au support, se rapprochant du peptide 1 lié au support par une liaison ester ; iii) les peptides 1 et 2 se connectent grâce à une migration acylique O→N, puis iv) le nouveau peptide est clivé du support^{108, 117}.

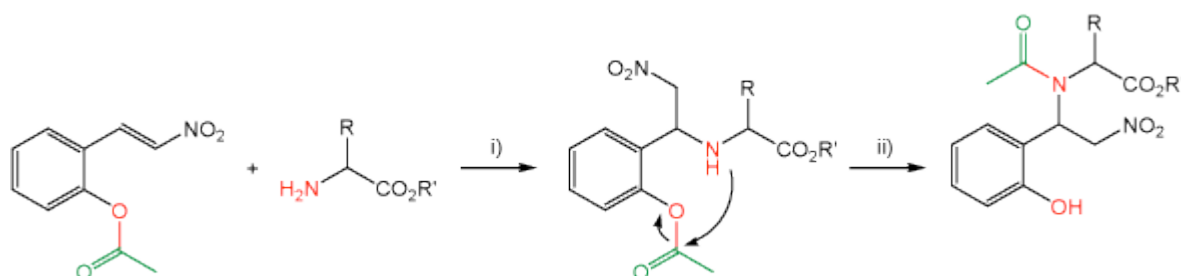


Figure 24 : Principe de la ligation par capture d'amine via une addition de Michael : i) l'amine libre réagit sur une nitrooléfine portant une fonction ester ; ii) la migration acylique O→N permet d'établir la liaison amide désirée¹⁰⁸.

D. S. Kemp développa ensuite la ligation par capture de thiols, dont le principe reste identique au précédent, le peptide 2 pouvant se lier au support soit par l'intermédiaire d'une liaison mercapto, soit par échange de pont disulfure^{108, 118, 119, 120, 121} (Figure 25).

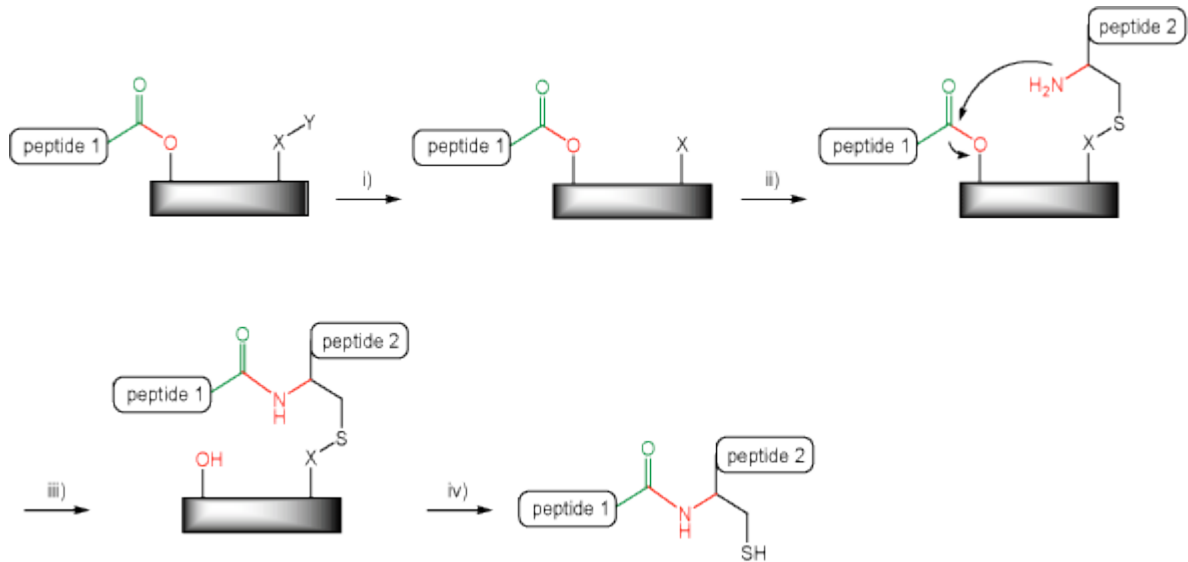


Figure 25 : Principe de la ligation de protéines par capture de thiol ; i) comme pour la capture d'amine, une fonction X est activée après le clivage de Y, ii) puis elle réagit avec la fonction thiol de la cystéine N-terminale du peptide 2 ; iii) proche de l'ester reliant le peptide 1 au support, l'amine de cette même cystéine initie une migration acylique O→N ; iv) les deux segments peptidiques 1 et 2 étant joints, le nouveau peptide est libéré du support^{118, 119}.

La ligation chémosélective native fut le troisième type de ligations chimiques à avoir été découvert. Développée par S. B. H. Kent^{122, 123, 124} puis par J. P. Tam¹²⁵, elle permet la synthèse totale de protéines ne contenant que des acides aminés naturels et totalement déprotégés, après activation de l'acide carboxylique C-terminal du peptide 1 sous forme d'un dérivé thioester (Figure 26). Ce dernier réagit, à pH 6 ou plus, avec l'amine de la cystéine N-terminal du peptide 2 *via* une réaction de transthioestérification, suivie d'un réarrangement acylique S→N spontané, rapide et irréversible, donnant naissance à une liaison peptidique native entre les deux segments 1 et 2.

De nos jours, cette technique est très largement utilisée en synthèse totale de peptides et protéines de longueurs plus ou moins importantes, complètement naturels¹²⁶ ou partiellement modifiés¹²⁷, voire cyclisés sur support solide¹²⁸. Elle s'adapte aussi à la semi-synthèse de protéines, une dérivée de l'ingénierie des protéines¹²⁹.

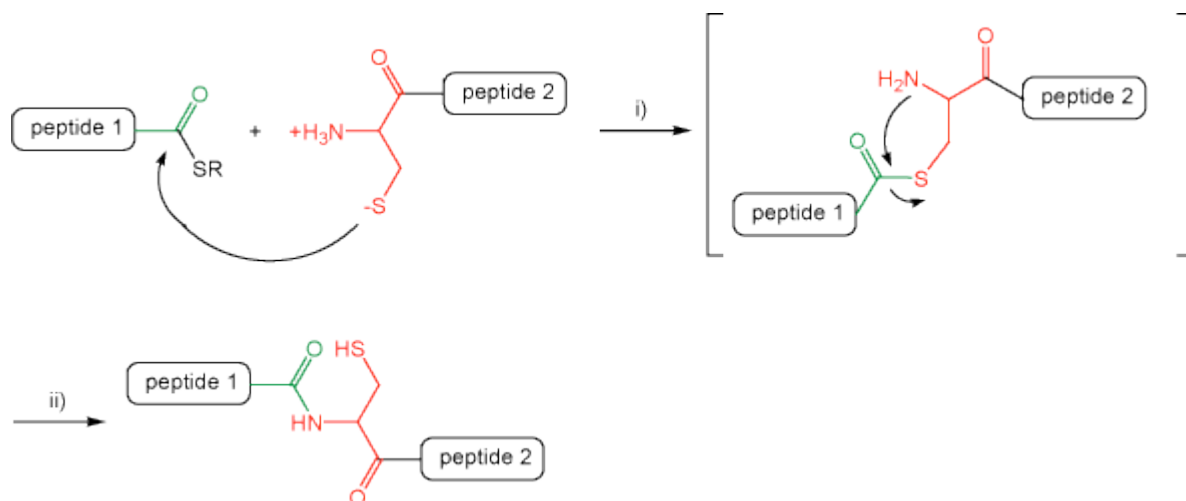


Figure 26 : Principe de la ligation chemosélective native: l'acide carboxylique C-terminal du peptide 1 est activé sous forme de thioester ; i) la chaîne latérale de la cystéine N-terminale du peptide 2 réagit avec le thioester par transthioestérification ; ii) le produit intermédiaire se réarrange spontanément grâce à une migration $S \rightarrow N$ ¹²².

Pour finir, d'autres méthodes, décrites par J. P. Tam, furent regroupées sous le terme général de stratégies de couplage par ligation orthogonale¹⁰⁸. Il en existe plus d'une douzaine, basées aussi bien sur la chimie des imines que sur celle des thioesters, et permettant, elles-aussi, d'obtenir de nombreuses variétés de peptides^{130, 131}. Parmi elles, la ligation chimique par formation de thiazolidine ou d'oxazolidine, fait réagir entre eux deux peptides complètement déprotégés sans activation préalable de l'acide carboxylique C_α^{132, 133, 134, 135}. Cette méthode est fondée sur la réaction hautement spécifique entre un aldéhyde et une base faible qui induit le rapprochement des deux fonctions réactives nécessaires à la migration acylique O→N, conduisant au peptide final *via* la formation d'une liaison amide et d'une pseudo-proline. Ce but est atteint en trois étapes (Figure 27). Au cours de la première étape, l'aldéhyde est introduit par estérification de l'acide carboxylique du peptide 1 avec un glycolaldéhyde. Il réagit alors à pH acide avec l'amine de la sérine, de la thréonine ou de la cystéine N-terminale du peptide 2, pour former, suivant le cas, une oxazolidine ou une thiazolidine. Les réactions avec les autres amines du peptide n'ont que peu d'incidence dans la mesure où elles conduisent des bases de Schiff instables qui redonnent les produits de départ. La migration acylique intramoléculaire O→N avec l'amine de la pseudo-proline rétablit la liaison amide et réunit définitivement les deux peptides 1 et 2. Cette dernière étape, contrairement aux réarrangements acyliques intramoléculaires O→N rencontrés précédemment¹⁰⁶, est relativement lente, avec un temps de demi-vie de 20 h à pH 5.0 pour le modèle étudié par J. P. Tam¹³².

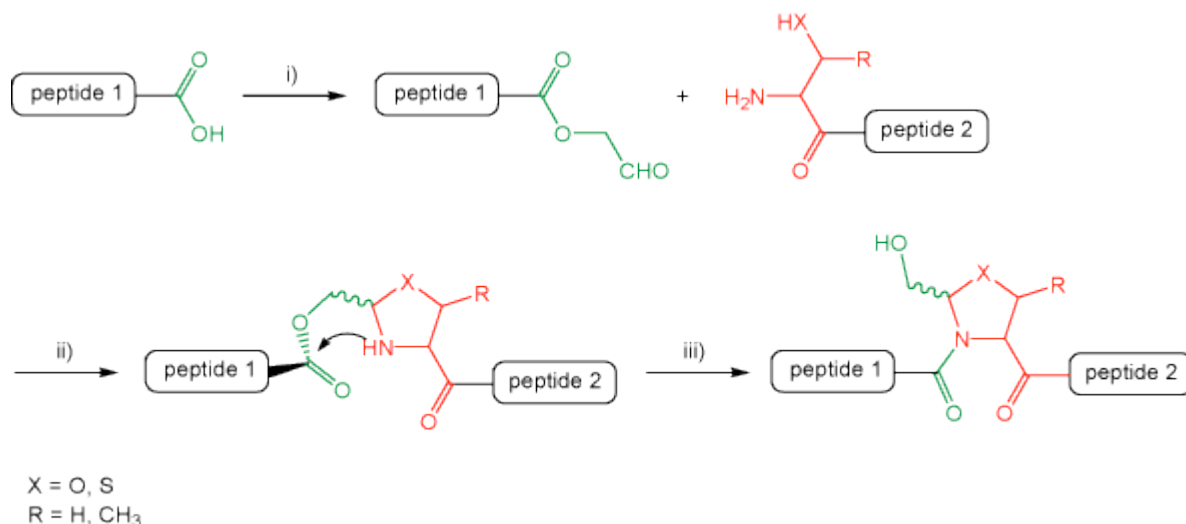


Figure 27 : Schéma général de la ligation chimique par formation de pseudo-proline: i) estérification par un glycolaldéhyde ; ii) réaction de l'aldéhyde avec l'amine N-terminale du peptide 2 et formation d'une pseudo-proline ; iii) migration acylique $O \rightarrow N$ ^{132, 133}.

Parmi les autres méthodes de ligation chimique orthogonale, les plus fameuses sont¹³⁰ :

- la ligation par capture d'imine,
- la ligation de Staudinger (synthèse de dipeptides ou peptides¹³⁶) (Figure 28),
- la ligation de cystéine grâce à la capture de thioester par échange thiol-thioester,
- la ligation de cystéine grâce à la capture de thioester par thioalkylation,
- la ligation de cystéine grâce à la capture de perthioester par échange de disulfure thiol-acyl,
- la ligation de méthionine,
- la ligation de mime de cystéine,
- la ligation d'histidine...

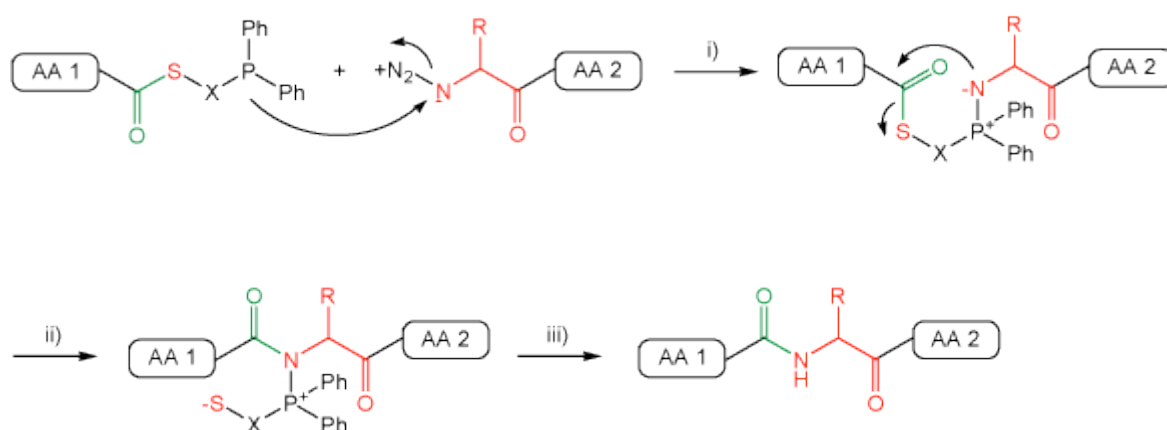


Figure 28 : Principe de la ligation chimique orthogonale par addition de Staudinger : i) un acide aminé (AA 2) est activé sous forme d'azido et réagit sur un thioester ou un imidazole acylé ayant une fonction phosphine ; ii) l'intermédiaire iminophosphorane (ou ylure aza-phosphoreux) subit une migration acylique $O \rightarrow N$ conduisant à la formation d'un sel d'aminophosphonium ; iii) l'hydrolyse entraîne la formation du dipeptide souhaité d'une phosphine-oxide (AA = acide aminé, $X = CH_2$ ou Ph)¹³⁰.

Enfin, il est possible de lier entre eux plusieurs segments peptidiques grâce à des techniques telles que la ligation séquentielle de peptides ou la ligation tandem^{130, 137}.

b. Ingénierie des protéines

L'utilisation des ligations chimiques en ingénierie des protéines a largement contribué aux avancées technologiques de semisynthèse de protéines¹³⁸. De son côté, la découverte de la capacité d'auto-catalyse des intéines lors de leur excision a entraîné en parallèle le développement de nouvelles méthodologies basées sur l'épissage des protéines.

Parmi elles, la chromatographie d'affinité par intéine est une application courante de purification de protéines^{139, 140} (Figure 29). La protéine cible est liée à une intéine, attachée à son autre extrémité à un connecteur d'affinité. Le complexe est alors adsorbé sur une colonne d'affinité. Le peptide subit un réarrangement acylique N→S au niveau de sa jonction avec la cystéine N-terminale de l'intéine, puis une transthioestérification avec un réactif thiolé qui permet le clivage entre le peptide et la colonne d'affinité. La cible purifiée retrouve sa nature initiale après hydrolyse du thioester.

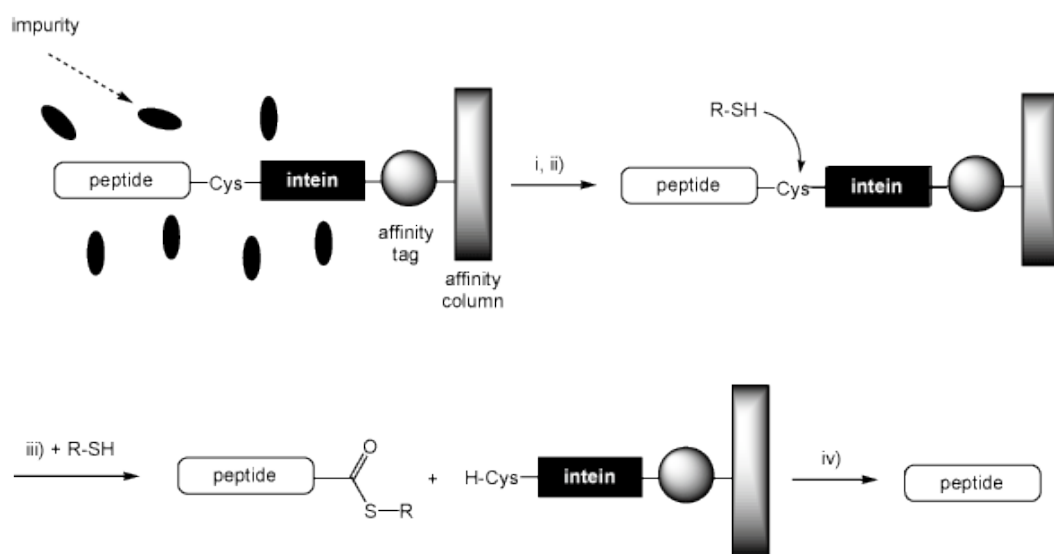


Figure 29 : Principe de la purification de protéines par chromatographie d'affinité par intéine : i) après élution et élimination des impuretés, ii) le complexe peptide-cible / intéine subit une migration acylique N→S catalysée iii) par l'addition d'un réactif thiolé qui réagit sur le peptide cible par transthioestérification ; iv) après hydrolyse du thioester, le peptide purifié retrouve sa nature initiale^{139, 140}.

La ligation de protéines par intéine est un moyen de pallier les difficultés de synthèse des α -thioesters nécessaires à la ligation chimiosélective native^{111, 141, 142} (Figure 30). Dans ce cas, le segment peptidique 1 est transformé en thioester de la même façon que pour la purification de protéines. Le peptide 2 est lié à la partie C-terminale d'une intéine elle-même attachée à un connecteur d'affinité. Après cyclisation de

l'asparagine le peptide 2 est libéré tout en conservant la cystéine C-terminale de l'intéine. Le thiol réagit alors par transthioestérification avec le peptide 1, la migration acylique S→N donnant naissance à la liaison peptidique entre les deux segments 1 et 2. Cette méthode est particulièrement utile dans le cas de semisynthèse de longues protéines, telles que les enzymes¹⁴³, elle peut aussi être couplée à des techniques géniques pour introduire des acides aminés non naturels dans de longues séquences peptidiques¹⁴⁴.

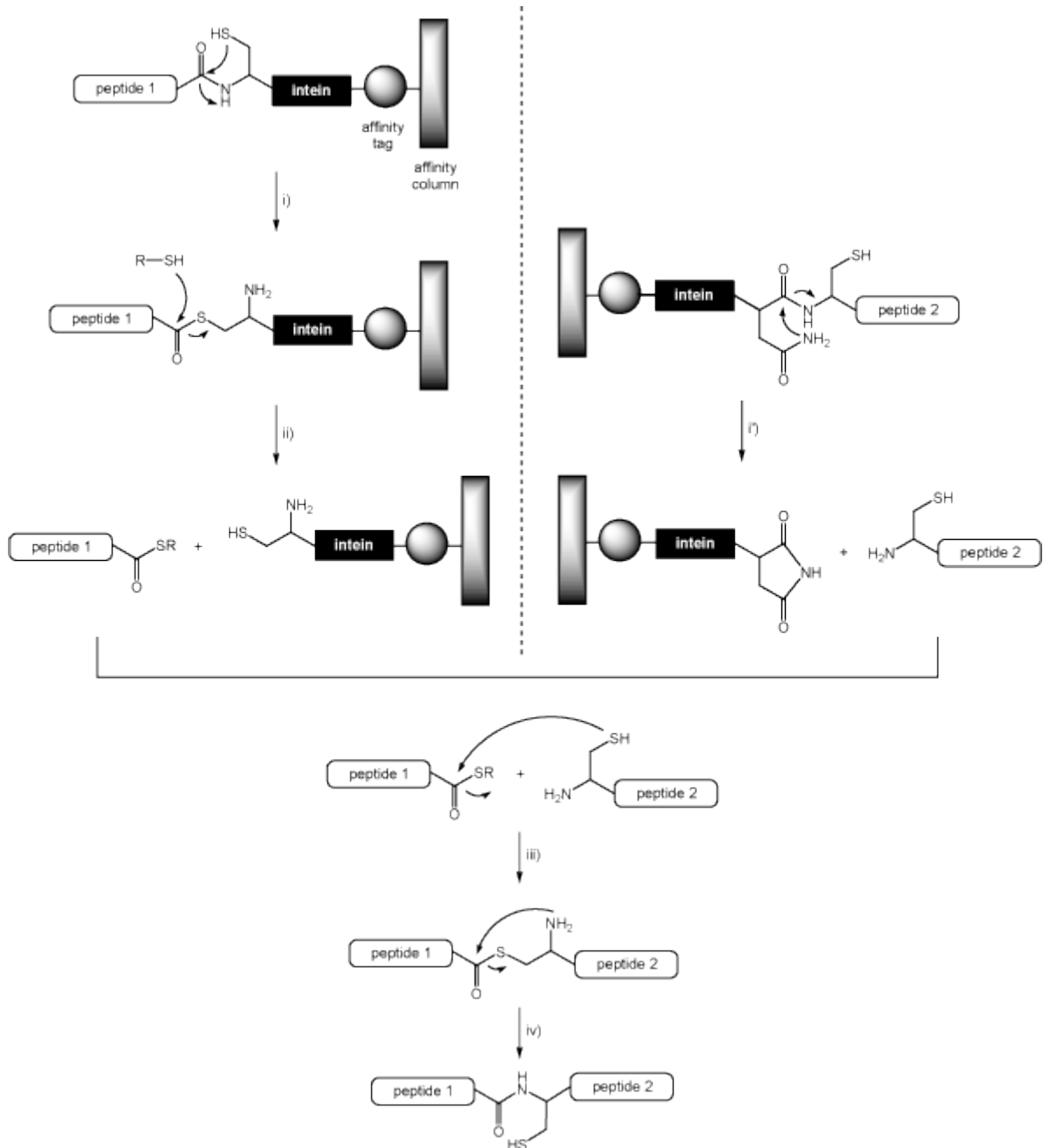


Figure 30 : Principe de la ligation de protéines par intéine : i) migration acylique N→S ; ii) transthioestérification ; i') cyclisation de l'asparagine et addition d'une cystéine à la partie N-terminale du peptide 2 ; iii) transthioestérification entre les peptides 1 et 2 ; iv) transfert acylique S→N spontané établissant la liaison peptidique entre le peptide 1 et le peptide 2.

Enfin, le trans-épissage de protéines requiert la division d'une intéine en deux parties distinctes, liées chacune à une extéine différente, nommée respectivement suivant leur position N- et C-extéines^{145, 146, 147}. L'étape de réassociation permet la réunion des deux sous-unités d'intéine, qui peut alors catalyser sa propre excision et initier la jonction entre les deux extéines (Figure 31). Actuellement, de nombreuses applications en ingénierie des protéines ou dans d'autres domaines se basent sur cette technique, car elles permettent d'accéder à de nombreuses structures peptidiques de nature diverse, tout en contrôlant le moment et le lieu de la réunification de l'intéine^{148, 149, 150, 151, 152}.

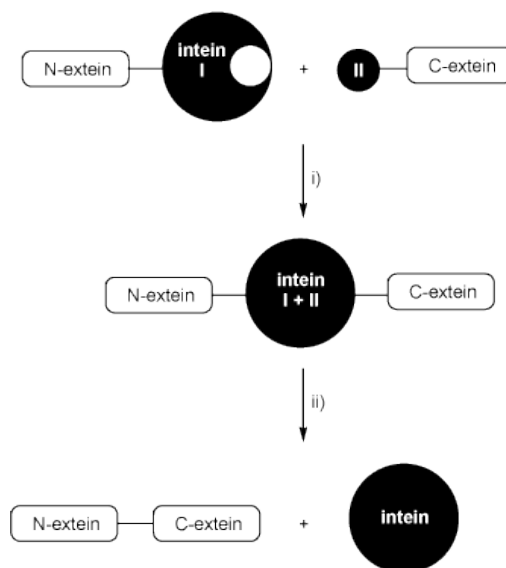


Figure 31 : Principe de la ligation de protéines par trans-épissage: une N-extéine est liée à une partie d'intéine (intein I), tandis que la C-extéine est connectée à la deuxième moitié d'intéine (II) ; i) la réunion des deux moitiés d'intéine permet à cette dernière de retrouver ses propriétés d'excision autocatalytique ; ii) un nouveau peptide naît alors de la jonction entre les deux extéines, après élimination de l'intéine réunifiée^{145, 146, 147}.

c. Groupements protecteurs

Les fonctions hydroxyles peuvent être protégées par des groupements esters contenant une fonctionnalité auxiliaire, qui, une fois modifiée chimiquement, induit la déprotection par clivage assisté d'une façon intramoléculaire¹⁵³. Cette méthode permet d'accélérer la libération de l'alcool par rapport à une simple hydrolyse basique. Certains de ces groupes protecteurs basent leur mécanisme d'action sur une migration acylique O→N intramoléculaire. Ainsi, la réduction d'un nitro¹⁵⁴ ou d'un azido^{155, 156} génère l'amine responsable de la libération de l'alcool, dans la mesure où les deux fonctions réactives entraînent la formation de l'intermédiaire cyclique à 5 ou 6 membres (Figure 32).

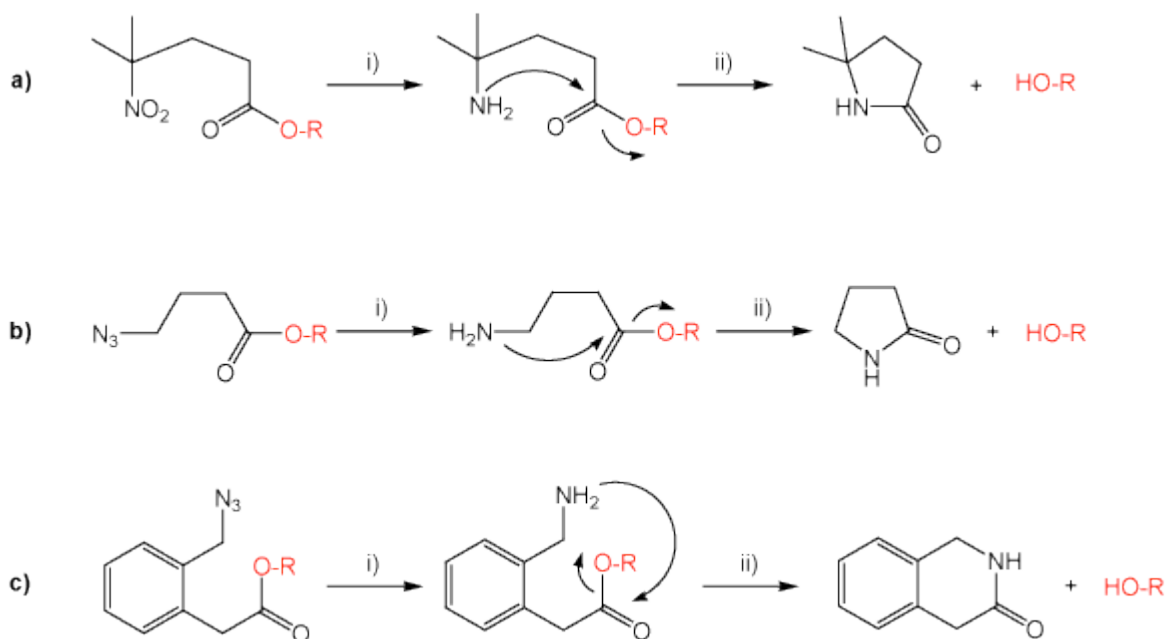


Figure 32 : Principe de la protection des alcools par des groupements protecteurs à clivage assisté: **a)** cas d'une fonction nitro : i) réduction en amine ; ii) migration acylique O→N ; **b)** cas d'une fonction azide : i) réduction en amine ; ii) migration acylique O→N via un intermédiaire cyclique à 5 membres ; **c)** cas d'une autre fonction azide : i) réduction en amine ; ii) migration acylique O→N via un intermédiaire cyclique à 6 membres.

d. Prodrogues

La faible solubilité aqueuse d'une molécule bioactive est l'un des principaux obstacles au développement des drogues administrées par voie orale. Ce problème peut être résolu par l'introduction, au niveau de cette molécule, d'une partie ionisable entraînant la molécule dans l'eau.

Les depsipeptides faisant preuve d'une meilleure hydrophilicité que leurs analogues amidés, des modèles de prodrogues furent donc étudiés pour intégrer une liaison ester capable de subir une migration acylique O→N et de redonner la molécule bioactive^{157, 158}. Une variante de cette méthode consiste à ajouter à la molécule cible des unités auxiliaires chargées d'améliorer la solubilité aqueuse et de relarguer la drogue par migration acylique intramoléculaire O→N^{159, 160, 161}. Cependant, la libération de ces auxiliaires dans l'organisme peut entraîner un risque de toxicité supplémentaire qu'il vaut mieux éviter. C'est pourquoi les dernières stratégies de prodrogues de ce type restent basées sur de simples migrations acyloxy intramoléculaires O→N^{162, 163, 164, 165}.

Dans la mesure où le concept des « switch-peptides » de M. Mutter permet aussi le déclenchement de la migration acylique par voie enzymatique, nous pouvons y voir une application directe pour la synthèse de prodrogues^{23, 47}.

e. Synthèse de séquences difficiles

Par rapport aux peptides naturels, l'introduction d'une liaison ester améliore la solubilité aqueuse du peptide grâce à l'interruption de l'enchaînement des liaisons hydrogène. Ce constat permet d'imaginer des méthodes qui faciliteraient la synthèse de peptides hydrophobes et amélioreraient les rendements correspondants.

Une des stratégies issues de cette réflexion fut d'introduire, au niveau d'une amine N-terminale, un auxiliaire hydroxylé qui faciliterait le couplage de l'acide aminé suivant sur l'amine en passant par une estérification de cet auxiliaire suivie d'une migration acylique O→N intramoléculaire. L'utilisation de ces amines protégées par un groupement 2-hydroxy-4-méthoxybenzyl^{166, 167, 168, 169} (Hmb), 2-hydroxybenzyl¹⁷⁰ (Hbz) ou 2-hydroxy-6-nitrobenzyl¹⁷¹ (Hnb) permet de faciliter les synthèses de peptides difficiles et de limiter les réactions secondaires.

L'introduction directe d'une liaison depsipeptidique, au niveau d'une sérine ou d'une thréonine présente dans une séquence, permet de synthétiser plus facilement un peptide hydrophobe ayant tendance à s'agréger, et ce sans avoir à utiliser de protections particulières comme celles décrites plus haut. La migration acylique O→N finale rétablit simplement et rapidement la structure native du peptide. Cette approche fut validée par Y. Kiso en 2004. Par comparaison directe des deux voies de synthèse possibles pour un même peptide, la voie normale par SPPS (voie 1), et celle introduisant la modification au milieu de la séquence (voie 2), il constata l'efficacité de cette nouvelle approche¹⁷². Ainsi, le peptide Ac-Val-Val-Pns-Val-Val-NH₂, Pns étant l'abréviation de la phénylnorstanine, aussi appelée acide (2*R*, 3*S*)-3-amino-2-hydroxy-4-phénylbutanoïque, fut synthétisé avec un rendement de 6.9 % par la voie 1 et de 54 % par la voie 2. Le peptide Ac-Val-Val-Ser-Val-Val-NH₂ se comporta de la même manière, avec un rendement de 6.0 % par la voie 1 et de 41 % par la voie 2. Cette méthode fut appliquée avec succès à l'amyloïde β (1-42), aussi bien par Y. Kiso^{173, 174, 175} que par M. Mutter pour l'une des applications de son concept de « switch-peptides »^{23, 47}.

III. La maladie d'Alzheimer

Première cause de maladies neurodégénératives, la maladie d'Alzheimer est caractérisée par la destruction progressive mais irréversible des neurones localisés dans certaines zones spécifiques du cerveau, l'hippocampe et les régions polymodales associatives (Figure 33a et b). Ce phénomène entraîne l'apparition de troubles de la mémoire, de la pensée puis du comportement et conduit inéluctablement à la démence. Très fréquemment observée chez les personnes âgées, c'est la quatrième cause de décès chez les adultes, après les maladies cardio-vasculaires, les cancers et les attaques cérébrales.

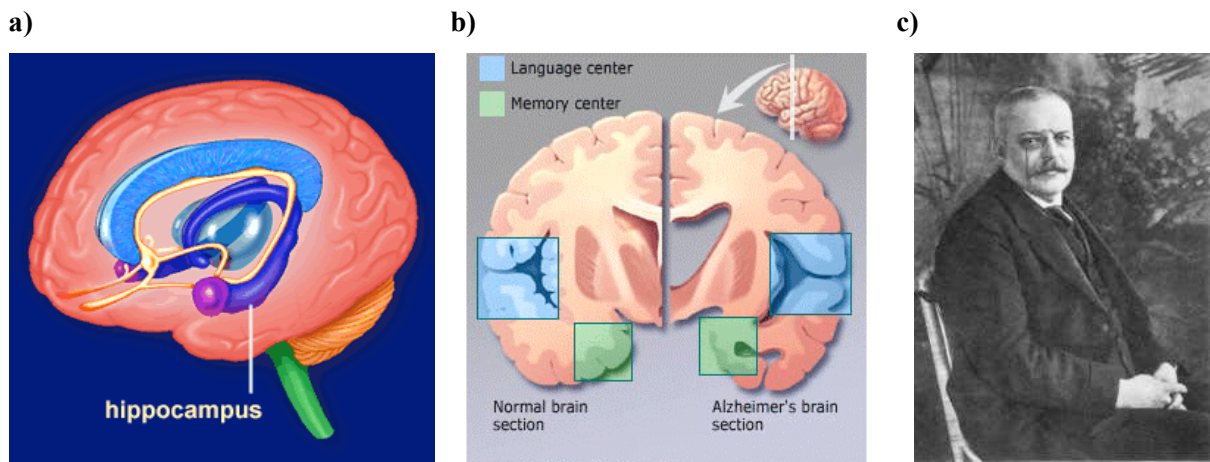


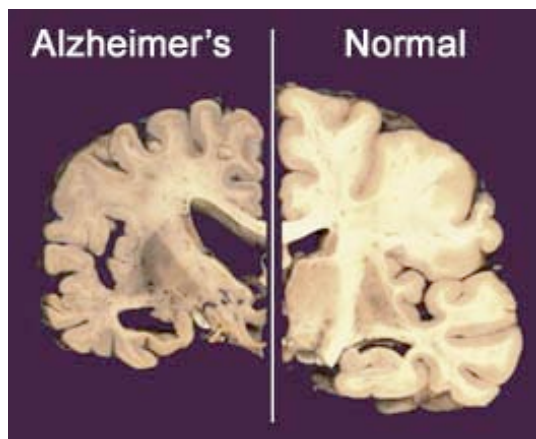
Figure 33 : a) L'hippocampe¹⁷⁶; b) localisation des centres de la mémoire et du langage dans un cerveau normal (à gauche) et chez un malade atteint par la démence¹⁷⁷; c) Aloïs Alzheimer¹⁷⁸.

En 1901, un médecin allemand, A. Alzheimer, fut amené à étudier le cas d'une patiente de 51 ans, Auguste D¹⁷⁹, qui souffrait de troubles mnésiques, aphasiques, d'hallucinations auditives, de paranoïa et qui faisait preuve d'un comportement agressif (Figure 33c). Son cerveau fut analysé avec soin après son décès cinq ans plus tard. En 1907, A. Alzheimer publia ses travaux suite à un congrès de psychiatrie où il put présenter ses récentes découvertes. En 1912, le psychiatre allemand E. Kraepelin définit la maladie d'Alzheimer comme étant une démence rare et dégénérative ayant la particularité de toucher des personnes jeunes (Figure 34a).

Près d'un siècle s'est écoulé depuis. La maladie a désormais un impact important sur notre civilisation, comme le démontrent ces quelques chiffres significatifs. La maladie d'Alzheimer représente environ 50 % des cas de démence chez les personnes âgées et 75 % des maladies neurodégénératives. 15 millions d'individus dans le monde en sont actuellement atteints¹⁷⁹. En Suisse, 89 000 personnes souffriraient de cette maladie, mais seulement un tiers aurait été diagnostiqué¹⁸⁰. En France, l'étude épidémiologique Paquid a permis de montrer que la maladie concerne 3 % des plus de 65 ans, 1 % des personnes âgées de

65 à 70 ans et 10 % des plus de 85 ans¹⁸¹. Cependant, à cause des difficultés de diagnostique, il est probable que 20 % des plus de 80 ans sont touchés. Cette situation liée à l'âge ne fait que s'empirer dans un monde où paradoxalement les gens vivent de plus en plus longtemps. Alors que 300 000 cas avaient été dénombrés en France en 1990, les études prédisent en 2030 jusqu'à 500 000 malades. Les Etats Unis, quant à eux, passeraient les 4 millions de malades actuels à 14 millions en 2050 (Figure 34b).

a)



b)

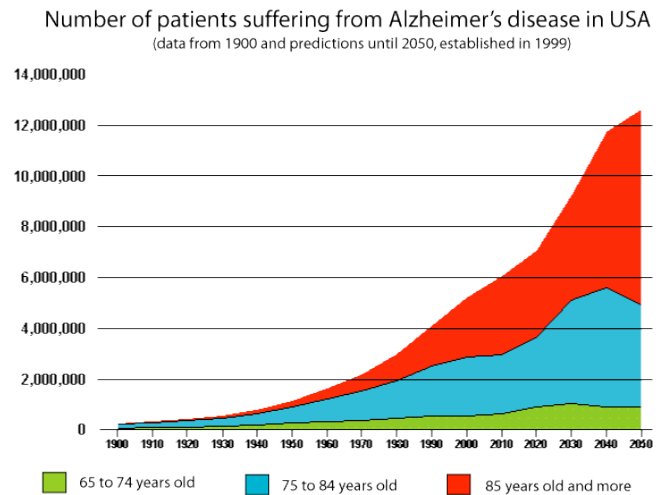


Figure 34 : a) Coupe d'un cerveau atteint par la maladie d'Alzheimer (à gauche) et d'un cerveau sain (à droite)¹⁸²; b) évolution entre 1900 et 2050 du nombre de cas de la maladie d'Alzheimer aux Etats Unis¹⁸³.

Cette maladie est devenue dès lors un véritable problème socio-politique. Aux Etats Unis, les coûts nécessaires aux diagnostics et traitements des patients avoisinent désormais les 100 milliards de dollars par an. Pour tenter de résoudre ce phénomène tant économique que de santé publique, de nombreux gouvernements allouent des fonds considérables à la recherche. Les experts estiment en effet qu'une économie de 50 milliards de dollars par an pourrait être réalisée aux Etats Unis si l'on était capable de retarder de 5 ans le début de la maladie...

1. La maladie, ses causes, son diagnostique

Perte de mémoire progressive, aphasie (perte de langage), agnosie (perte de la reconnaissance visuelle), apraxie (trouble du mouvement) avec incapacité croissante à assumer les tâches simples de la vie quotidienne, désorientation, difficultés d'apprentissage, troubles du jugement et de la planification, changements dans la personnalité, tels sont les symptômes couramment observés chez les malades d'Alzheimer. Afin de mieux cerner la pathologie, une distinction a été faite entre la démence jeune (« early-onset dementia ») et la démence tardive (« late-onset dementia »), dont la différence tient à l'âge

du patient, fixé arbitrairement à 65 ans. La progression de la maladie dépend de chaque personne, le temps entre les premiers signes et la mort variant de 3 à 20 ans, avec une moyenne autour de 8 ans. D'un point de vue médical, les patients sont classés en trois familles. La maladie d'Alzheimer sporadique concerne 75 % des cas. Les malades de ce sous-groupe n'ont pas d'historique familial clair de démence mais ils peuvent avoir un à plusieurs facteurs risque. Parmi les facteurs risque fréquemment rencontrés, les plus connus sont l'âge et l'allèle epsilon 4 du gène de l'apolipoprotéine E, qui code une protéine nécessaire au transport du cholestérol et à la réparation neuronale. *A contrario*, l'allèle epsilon 2 serait plutôt un facteur protecteur. La forme familiale regroupe les individus ayant au moins un proche dément, bien que cette hérédité semble être relativement aléatoire. Cette sous-catégorie touche ainsi 25 % des cas. La démence autosomique est elle-même une sous-division de la classe familiale, elle engloberait 1 à 5 % des patients. Elle est caractérisée par des mutations génétiques qui se produisent pour 0.4 % des malades au niveau du chromosome 21, lié au précurseur de la protéine précurseur amyloïdique APP (« Amyloid Protein Precursor »), pour 2 à 3 % sur le chromosome 14 qui code la préséniline-1 (PS-1), et pour 0.1 % sur le chromosome contrôlant la synthèse de la préséniline-2 (PS-2), les présénilines étant chargées par l'organisme de réguler le catabolisme de l'APP.

La pathologie en elle-même est définie par la présence dans la matière grise des centres corticaux du cerveau de deux types de lésions spécifiques, les enchevêtrements neurofibrillaires (« neurofibrillary tangles »), qui sont à l'origine de la pathologie tau, et les plaques amyloïdes, ou plaques séniles. La compréhension du mécanisme moléculaire de la maladie est relativement récente. D'un point de vue historique, G. G. Glenner et ses collaborateurs furent les premiers à isoler la protéine amyloïde β en 1984¹⁸⁴, puis J.-P. Brion démontra en 1985 la relation entre la dégénérescence neurofibrillaire et la protéine tau¹⁸⁵.

L'APP, glycoprotéine transmembranaire ubiquitaire de 698 à 777 acides aminés¹⁸⁶ qui, clivée par une enzyme, l' α -secrétase, libère un peptide soluble non toxique, est à l'origine des plaques amyloïdes (Figure 35a). Un mécanisme mineur impliquant deux autres enzymes, la β -secrétase et l' γ -secrétase, relargue le peptide amyloïde β (A β), constitué de 40 à 43 acides aminés (Figure 35a, Figure 36). Les présénilines 1 et 2 sont en fait des sous-unités essentielles au complexe γ -secrétase, ce qui explique leur incidence pathologique.

Constituant normal et soluble de l'organisme humain, l'amyloïde β est sécrété dans le fluide extracellulaire et se diffuse dans le fluide cérébro-spinal où il précipite et forme des dépôts diffus, plutôt volumineux avec des diamètres de plusieurs centaines de micromètres, mal définis et localisés dans les noyaux gris centraux et dans le cervelet. Ces amas sont fréquemment observés chez les personnes âgées sans que cela ne se traduise par un déclin de la santé¹⁷⁹.

Ce qui est considéré comme anormal est la présence de dépôts focaux dus à l'agrégation du peptide amyloïde β , devenu insoluble suite à un changement conformationnel¹⁸⁷. Le peptide s'assemble tout

d’abord en feuillets β pour donner naissance à des protofilaments, d’un diamètre de 25 à 35 Å. Cinq de ces sous-unités se réorganisent ensuite pour former une fibrille amyloïde, dont la section est comprise entre 60 à 100 Å (Figure 35b). Les dépôts amyloïdes grossissent avec le temps et se transforment en masses sphériques, appelées plaques amyloïdes, de 5 à 100 μm de diamètre. Elles reçoivent le nom de plaques séniles lorsque des prolongements nerveux les entourent (Figure 36).

Le peptide amyloïde β existe sous deux formes principales, l’A β (1-40) et l’A β (1-42). Le premier type, dont le rôle biologique est encore inconnu à l’heure actuelle, se retrouve dans le fluide cérébral humain. L’A β (1-42) est l’espèce prédominante des plaques séniles, il est aussi responsable de l’agrégation de l’A β (1-40) et d’autres protéines sur ces amas.

Des études ont permis de démontrer que la distribution spatiale et le nombre de plaques amyloïdes étaient en corrélation avec les pertes de mémoire, prouvant par-là même que ces plaques séniles étaient les marques indiscutables de la maladie d’Alzheimer.

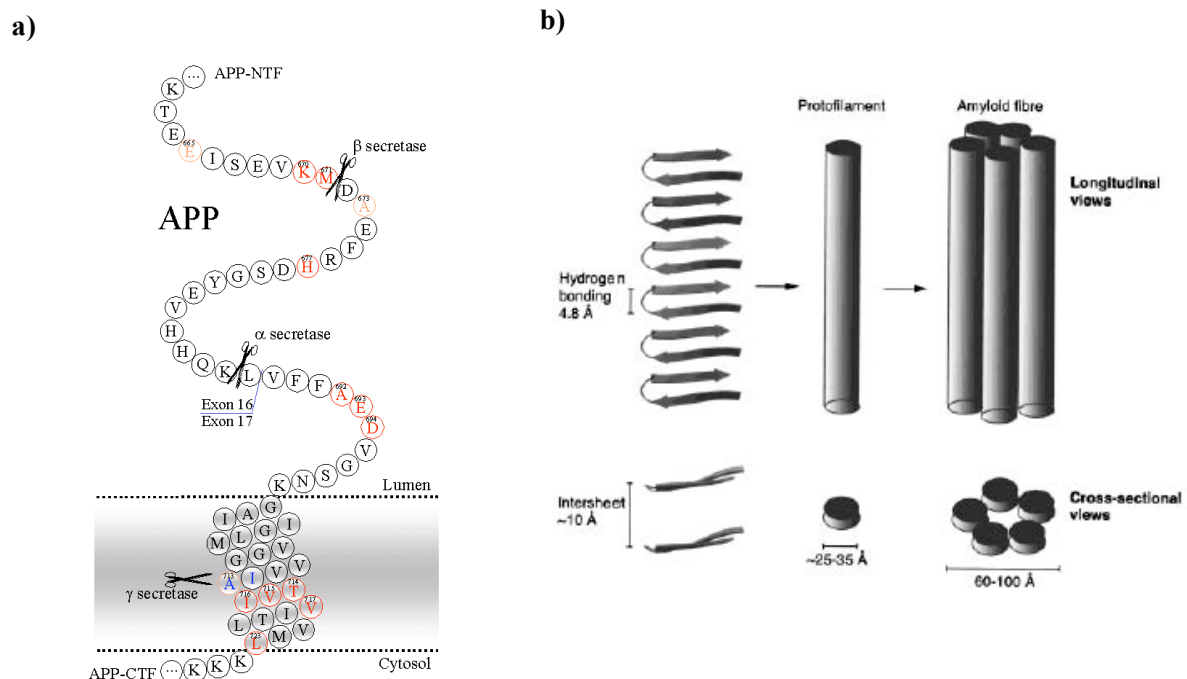


Figure 35 : a) Structure du précurseur de la protéine amyloïde et localisation des différents sites de clivage des sécrétases¹⁸⁸; b) des feuillets β aux fibrilles¹⁸⁹.

La dégénérescence neurofibrillaire (DNF) est le second type de lésions spécifiques de la maladie d’Alzheimer. Elle est due à l’accumulation des paires de filaments en hélice (PHF), constituées de la protéine tau et responsables des lésions intraneuronales. La protéine tau est une molécule importante pour le bon fonctionnement de l’organisme humain. Elle contrôle la polymérisation et la stabilisation des

microtubules chargées d'assurer le transport des produits synthétisés par les neurones du corps cellulaire aux terminaisons nerveuses. La protéine tau possède naturellement plusieurs sites phosphorylés.

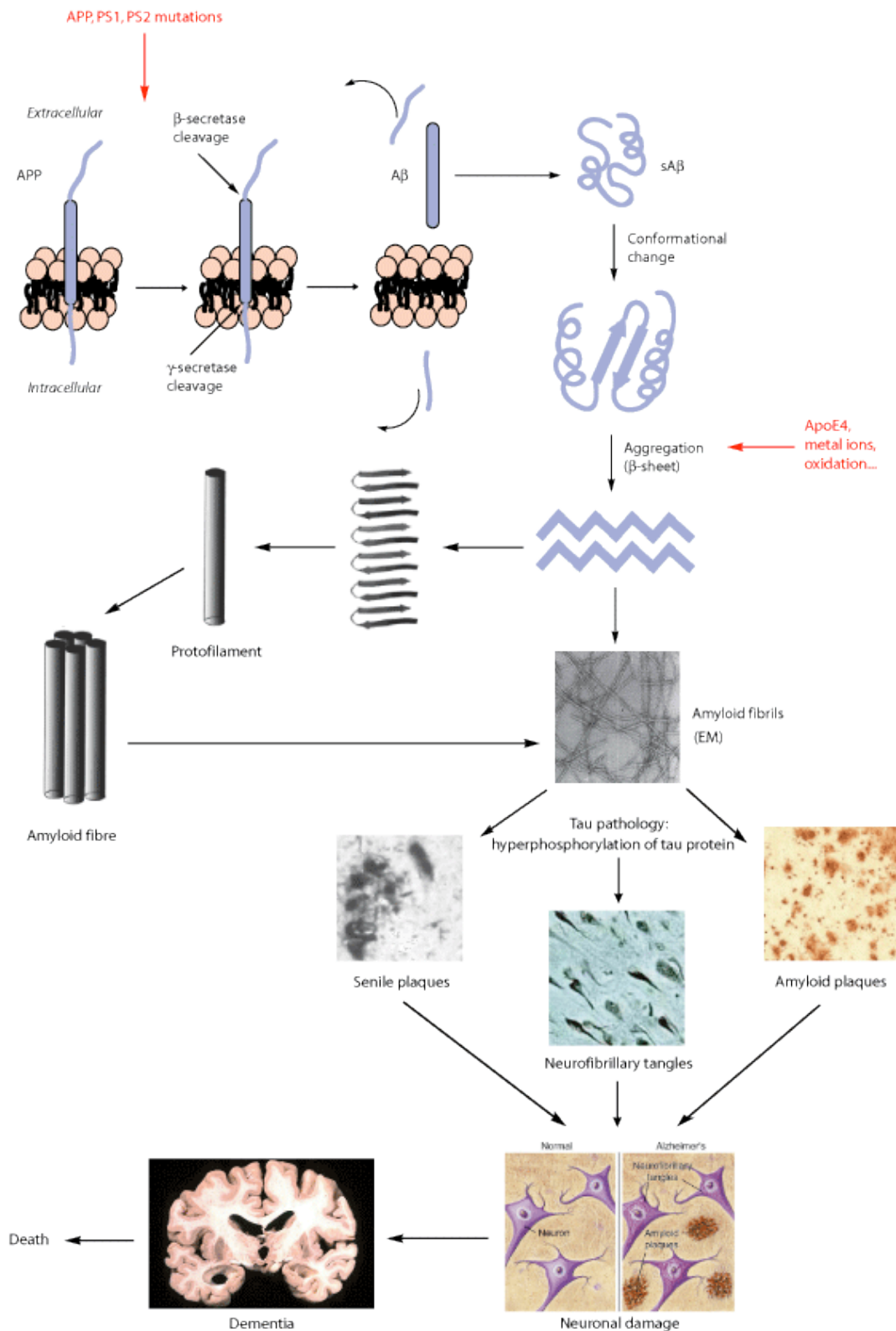


Figure 36 : Mécanisme moléculaire de la maladie d'Alzheimer du précurseur de la protéine amyloïde à la démence^{187, 189}.

Cependant il arrive qu'elle subisse une hyperphosphorylation, événement anormal qui conduit à la formation des triplets constitutifs des paires de filaments en hélice (Figure 36).

L'hypothèse de la cascade amyloïde met en avant la responsabilité majeure de l'amyloïde β dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. Il est communément accepté que la pathologie tau soit en amont de la cascade amyloïde, bien qu'elle soit aussi présente chez des personnes de plus de 75 ans ou dans de nombreuses autres maladies dégénératives avec démence mais sans dépôts amyloïdes, tels que la maladie de Steinert ou celle de Parkinson. Cependant, le phénomène serait accéléré par l'amyloïde β .

A l'heure actuelle, aucune méthode simple ne permet de diagnostiquer avec précision la maladie d'Alzheimer durant la vie du patient, les erreurs de diagnostic clinique pouvant atteindre 15 %. Un diagnostic définitif ne peut être établi qu'après l'autopsie du cerveau, opération nécessaire pour identifier avec certitude la dégénérescence neurofibrillaire et les plaques séniles. C'est ce que l'on appelle le diagnostic neuropathologique. L'utilisation de tests psychométriques et d'analyses complémentaires permet toutefois de déterminer si le patient souffre ou non de la maladie d'Alzheimer. Le malade est considéré comme un cas possible d'Alzheimer tant qu'il existe une ambiguïté avec d'autres pathologies, troubles vasculaires ou dépressions. Après élimination des autres maladies et constat de signes indubitables d'aphasie, apraxie ou agnosie, et de pertes de mémoire, le cas est classé probable.

De nos jours, la méthode de prédiction la plus fiable serait un test d'identification d'odeurs, mis au point par le groupe du Dr Devanand, professeur de psychiatrie clinique et de neurobiologie à l'université de Colombia¹⁹⁰. Cet examen se base sur l'observation de la perte de l'odorat chez les malades dès les premiers stades de la démence. Il suffit de tester la reconnaissance de dix odeurs spécifiques, fraise, fumée de tabac, savon, menthe, clou de girofle, ananas, gaz naturel, lilas, citron et cuir, pour établir un diagnostic précoce.

2. Traitements thérapeutiques actuels et futurs

Les traitements disponibles permettent actuellement de limiter certains symptômes en améliorant la mémoire, ralentissant le déclin et contrôlant le comportement du patient avec des antidépresseurs et autres substances luttant contre l'agitation, l'anxiété ou les illusions. Malheureusement ces médicaments tendent à n'être efficaces que pour un nombre limité de malades, sur une courte période et au prix de nombreux effets secondaires. Une attention particulière fut portée sur les traitements cholinergiques, des études ayant montrées que la pathologie était liée à un manque en acétylcholine, neurotransmetteur important dans le fonctionnement de la mémoire. Les médecins sont souvent amenés à prescrire des inhibiteurs de l'enzyme responsable de l'élimination de cette molécule.

Parmi les principales substances que nous retrouvons sur le marché, la Tacrine permet d’améliorer de renforcer la mémoire mais elle a de nombreux effets secondaires. De nouveaux produits ayant des effets secondaires moindres furent mis au point : l’Aricept est un inhibiteur d’acétylcholinestérase, au même titre que l’Exelon commercialisé par Novartis ou le Réminyl, la Mémantine est un antagoniste au récepteur NMDA développé par Merz et l’Ibuprofen un anti-inflammatoire. De grands espoirs sont fondés sur la vaccination ainsi que sur les destructeurs de feuillettes β qui permettraient d’inhiber la formation des plaques amyloïdes. Les premiers vaccins d’immunisation contre le peptide amyloïde bêta furent testés sur des souris transgéniques^{191, 192, 193, 194, 195}, puis sur des patients humains dès 2001. Les premiers résultats obtenus se montrèrent optimistes, mais si la technique nécessite de nouvelles améliorations¹⁹⁶.

Parallèlement à ces traitements palliatifs, il existe des facteurs neuroprotecteurs qui limiteraient la progression de la maladie. Parmi eux, notons la consommation régulière et modérée de vin rouge, le niveau d’éducation et l’activité intellectuelle, les traitements hormono-substitutifs de la ménopause ou la prise d’anti-inflammatoires non stéroïdiens. Le tabac, grâce à la nicotine qu’il contient, réduirait de 20 % le risque de maladie. Mais c’est sans compter les effets négatifs dus à la cigarette¹⁷⁹...

En résumé, il n’y a à l’heure actuelle aucun traitement efficace permettant de lutter contre de la maladie d’Alzheimer. On ne peut ni l’éviter, ni la soigner, que ce soit partiellement ou totalement. Les médecins ne peuvent que prescrire des médicaments permettant de pallier les principaux symptômes. Tous les efforts restent donc à faire dans ce domaine...

IV. Les fibrilles d’amyloïdes

La maladie d’Alzheimer n’est pas la seule maladie à être due à la présence de fibrilles amyloïdes. Au moins 16 autres protéines s’agrègent de la même façon et sont tenues comme responsables du déclenchement d’affections aussi diverses que le diabète mellitus de type II, les encéphalopathies spongiformes transmissibles ou l’amyloïdose systémique héréditaire finlandaise (Tableau 4)¹⁹⁷.

Aucune similitude n’a pu être établie entre ces différentes molécules, que ce soit au niveau de leur structure primaire, de leur structure tertiaire, de leur rôle biologique ou de leur taille. Malgré cela, elles forment toutes des fibrilles amyloïdes, dont la structure et les propriétés s’avèrent être très proches.

Le constat de ce phénomène particulier associé à l’absence de thérapies efficaces contre ces maladies a vivement encouragé les recherches sur ce type d’agrégation. Pouvoir identifier ces fibrilles avec certitude, trouver des techniques pour les étudier et suivre leur formation, comprendre leurs mécanismes d’association, tels sont les principaux objectifs nécessaires à la découverte de traitements efficaces.

Syndromes cliniques	Sous-unités fibrillaires
Amylose systémique de protéine monoclonale (AL)	Domaine V _L de la chaîne légère de l'I _g
Amylose systémique réactive (AA)	Fragment N-terminal de la protéine amyloïde A
Polyneuropathie amyloïde familiale	Variantes de transthyrétine
Amylose apoAI héréditaire	N-terminal fragments of apoAI variants
Diabète mellitus de type II	Fragment du polypeptide îlot amyloïde
Maladie d'Alzheimer	Protéine A β de 39 à 43 résidus
Amylose lié à l'insuline	Insuline de type sauvage
Encéphalopathies spongiformes transmissibles	Protéine du prion
Carcinome médullaire de la thyroïde	Fragments de la calcitonine
Amylose systémique sénile	Transthyrétine de type sauvage
Amylose liée à l'hémodialyse	Microglobuline β_2 de type sauvage
Amylose atriale isolée	Facteur atrial natriurétique
Angiopathie amyloïde cérébrale héréditaire	Fragment de cystatine-C variant
Amylose héréditaire finlandaise	Fragment de variants de gelsoline
Amylose héréditaire de la chaîne α du fibrinogène	Fragments de variants de la chaîne α du fibrinogène

Tableau 4 : Diversité des protéines de fibrilles amyloïdes¹⁹⁷.

1. Nature et propriétés des peptides amyloïdes

Le terme « amyloïde » fut inventé en 1838 par un botaniste allemand, Matthias Schleiden. Il définissait alors un constituant amylacieux normal des plantes¹⁹⁸.

En 1854, R. Virchow observa la réaction spécifique des corpora amylacieux du système nerveux avec l'iode, et il utilisa ce mot pour caractériser ces structures. En effet, R. Virchow était convaincu à cette époque qu'elles pouvaient être considérées comme étant similaires à l'amidon¹⁹⁸.

L'étude soignée de ces structures permit de donner une définition plus précise de l'amyloïde. Ainsi, il se rapporte à une substance d'apparence homogène et amorphe, métachromatique avec le violet de méthyle et le cristal violet, rose avec l'haematoxyline et l'éosine, rose aussi avec le rouge Congo, mais étant caractérisée avec ce colorant par une biréfringence vert-pomme en lumière polarisée. L'analyse par microscopie électronique permit de déterminer la structure supramoléculaire des fibrilles amyloïdes. Il fut constaté qu'elles étaient constituées de fibrilles rigides, linéaires et non-branchées, de longueur et de largeur bien déterminées. Leur insolubilité et leur forte résistance à la digestion protéolytique font partie de leurs propriétés intrinsèques.

2. Méthodes d'étude des fibrilles amyloïdes

De nombreuses méthodes *in vivo* et *in vitro* furent développées afin de pouvoir identifier et caractériser avec précision ces agrégats amyloïdes. Couramment utilisées de nos jours, elles permettent notamment aux médecins de confirmer leur diagnostic après l'autopsie du cerveau d'un malade d'Alzheimer. Elles sont aussi très utiles pour évaluer l'efficacité de certaines substances en tant qu'inhibiteurs potentiels de la formation des fibrilles amyloïdes. Le Tableau 5 réunit les principales techniques employées de nos jours. Parmi elles, la coloration au rouge Congo, celle à la thioflavine T, la microscopie électronique, les analyses cellulaires de cytotoxicité de l'amyloïde ou les études *in vivo* sur modèles animaux sont généralement les premières techniques à être considérées par les groupes de recherche.

La suite de ce chapitre sera donc consacrée à l'étude des principales méthodes qui nous ont été utiles au cours de nos travaux.

Techniques courantes	Méthodes avancées
Coloration au rouge Congo	Spectroscopie de la résonance plasmon de surface
Coloration à la thioflavine T	Ultraviolet lointain
Microscopie électronique par coloration négative conventionnelle	Microscopie électronique de transmission
Dichroïsme circulaire	« Host-guest switch-peptides »
Infrarouge, FT-IR, ATR-IT	Diffraction des rayons X
Ultraviolet	Chromatographie par exclusion de taille
Dispersion de la lumière	RMN de l'état solide
Analyses de sédimentation	Modeling moléculaire
Turbidité	Spectrométrie de fluorescence
	Microscopie à force atomique
Méthodes biologiques	
Analyses cellulaires de la cytotoxicité de l'amyloïde	Modèle de rat de dépôts d'Aβ cérébraux
Etude de liaisons radio-ligand	Etude du fluide cérébro-spinal des malades d'Alzheimer
Immunoprécipitation	

Tableau 5 : Exemples de quelques techniques couramment utilisées pour l'étude des fibrilles amyloïdes.

a. Coloration au rouge Congo

Le rouge Congo fut créé en 1883 par le chimiste Böttiger^{199, 200}. Ce colorant métachromatique fut employé pour la première fois en 1885, par AGFA, dans l'industrie textile²⁰¹ ; puis, en 1886, il fut utilisé comme indicateur de pH²⁰².

Ce n'est qu'en 1922 que l'affinité du rouge Congo pour les amyloïdes fut remarquée. Bennhold observa que le colorant disparaissait du plasma après son injection en intraveineuse chez des sujets ayant des dépôts amyloïdes, et qu'il s'accumulait dans ces tissus amyloïdes^{198, 203}. Quelques années plus tard, P. Divry et M. Florin décrivent la biréfringence vert-pomme en lumière polarisée des plaques amyloïdes colorées au rouge Congo, ces mêmes agrégats étant teintés en rouge, voire rose foncé, en lumière normale^{198, 204} (Figure 37). Cette congophilie avec biréfringence fut alors le premier critère de définition des amyloïdes à avoir été adopté^{205, 206}.

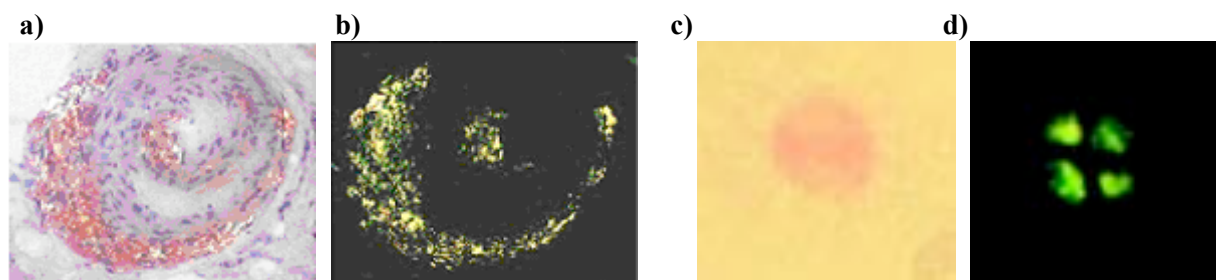


Figure 37 : Plaques amyloïdes d'insuline localisées dans la paroi de vaisseaux sanguins et observées, après coloration au rouge Congo, **a)** en lumière normale et **b)** en lumière polarisée^{207, 208}; **c)** coloration au rouge Congo d'un cerveau souffrant de la maladie d'Alzheimer et observé en lumière normale et **d)** en la lumière polarisée²⁰⁹.

D'un point de vue chimique, le rouge Congo est une molécule linéaire et symétrique permettant à ses fonctions azo et amine de former des liaisons hydrogène avec les fibrilles amyloïdes (Figure 38). Les interactions de liaisons entre le colorant et ces fibrilles dépendent de la conformation en feuillets β des peptides amyloïdes. Cependant le mécanisme de la coloration des amyloïdes au rouge Congo n'est pas encore complètement élucidé²⁰⁹.

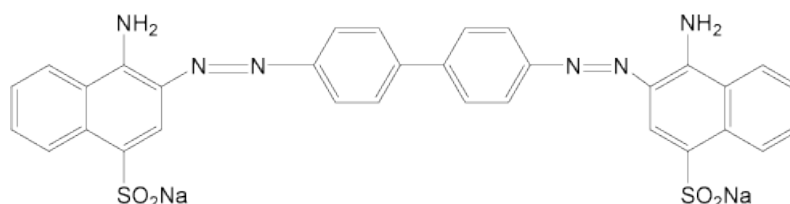


Figure 38 : Structure chimique du rouge Congo.

Malgré le fait que cette méthode soit aussi ancienne, elle est toujours largement utilisée en histologie pour confirmer le diagnostic de maladie d'Alzheimer. Quinze à trente minutes suffisent pour que l'incubation à température ambiante d'un échantillon de peptides amyloïdes avec une solution de rouge Congo soit terminée. Après centrifugation et lavages, le solide est examiné par l'intermédiaire d'un microscope optique équipé d'un polarisateur. Cette simplicité et cette rapidité font de cette coloration au rouge Congo une technique de choix pour l'étude *in vitro* de la formation de fibrilles amyloïdes et de leur inhibition.

Les changements spectraux inhérents au colorant lié aux fibrilles amyloïdes permettent par-là même de définir une méthode spectrophotométrique grâce à laquelle les fibrilles peuvent facilement être quantifiées sans avoir à séparer préalablement les agrégats amyloïdes des précipités neutres du peptide. Cette application, fondée sur la loi de Berr-Lambert, fut adaptée pour la première fois à des fibrilles amyloïdes d'insuline par W. E. Klunk en 1989²¹⁰. Dix ans plus tard, il modifia sa méthode pour mesurer spécifiquement la quantité d'amyloïdes d'A β (1-40)^{211,212}.

Les principaux avantages de cette technique restent la simplicité et la rapidité de mesure, ainsi que le peu de matériel nécessaire aux expériences. Cependant les formules mathématiques doivent être adaptées à chaque type d'amyloïde, dans la mesure où elles se basent sur l'une des qualités intrinsèques à la molécule, à savoir son absorbance en lumière ultraviolette. Le modèle se complique alors lorsqu'une nouvelle variable, un inhibiteur par exemple, est introduit dans le système.

b. Coloration à la thioflavine T

La thioflavine T et la thioflavine S sont deux fluorophores se liant spécifiquement aux structures amyloïdes. La thioflavine S, une primuline polymérisée, méthylée et sulfatée dont la structure n'a pas été complètement déterminée, est fréquemment utilisée sous forme de préparations complexes de molécules dans la démonstration histologique de la présence de fibrilles amyloïdes²¹³. La détection se traduit par une augmentation de l'intensité d'émission de la thioflavine S, sans changements au niveau des spectres d'excitation ou d'émission. Cela conduit à une fluorescence de fond importante qui malheureusement ne permet pas la quantification des amyloïdes en solution.

La thioflavine T est une benzothiazole, qui, une fois liée aux amyloïdes, subit des altérations spectrales caractéristiques qui n'existent pas lorsque le colorant est en présence de précurseurs polypeptidiques ou monomériques, d'agrégats peptidiques amorphes ou même de feuilletts β fibrillaires tels que la poly(L-serine) ou la poly(L-lysine) (Figure 39a)²¹³. Les amyloïdes colorés selon cette méthode se démarquent des agrégats amorphes par une fluorescence jaune-vert en lumière ultraviolette (Figure 39b). L'étude des spectres d'excitation et d'émission du colorant en l'absence ou présence d'amyloïdes permet d'estimer

leurs différences spectrales (Figure 39c). Malheureusement, le mécanisme biophysique exacte de ce phénomène est encore inconnu de nos jours.

Cette méthode n'est pourtant pas absolue : des études ont montré que certaines molécules de colorant pouvaient se lier aux fibrilles sans pour autant induire de changements spectraux. Qui plus est, la fluorescence de la thioflavine T dépend du nombre d'interactions entre la molécule et l'amyloïde ainsi que de l'affinité du colorant pour le peptide (Figure 39d). Ces constatations montrent combien il peut être difficile d'établir une relation précise entre la fluorescence de la thioflavine T et la concentration absolue en fibrilles amyloïdes. Chaque peptide doit donc être étudié préalablement afin de réaliser sa courbe standard. Enfin, si un pH de 8-9 permet la protonation de l'azote du benzothiazole et améliore l'affinité entre la thioflavine T et les amyloïdes, il existe un risque de dépolymérisation des fibrilles dans le cas où les mesures de fluorescence ne seraient pas faites assez rapidement.

La coloration à la thioflavine T est donc une méthode de quantification relative des fibrilles amyloïdes qui doit être utilisée en complémentarité de la méthode spectroscopique du rouge Congo²¹⁴.

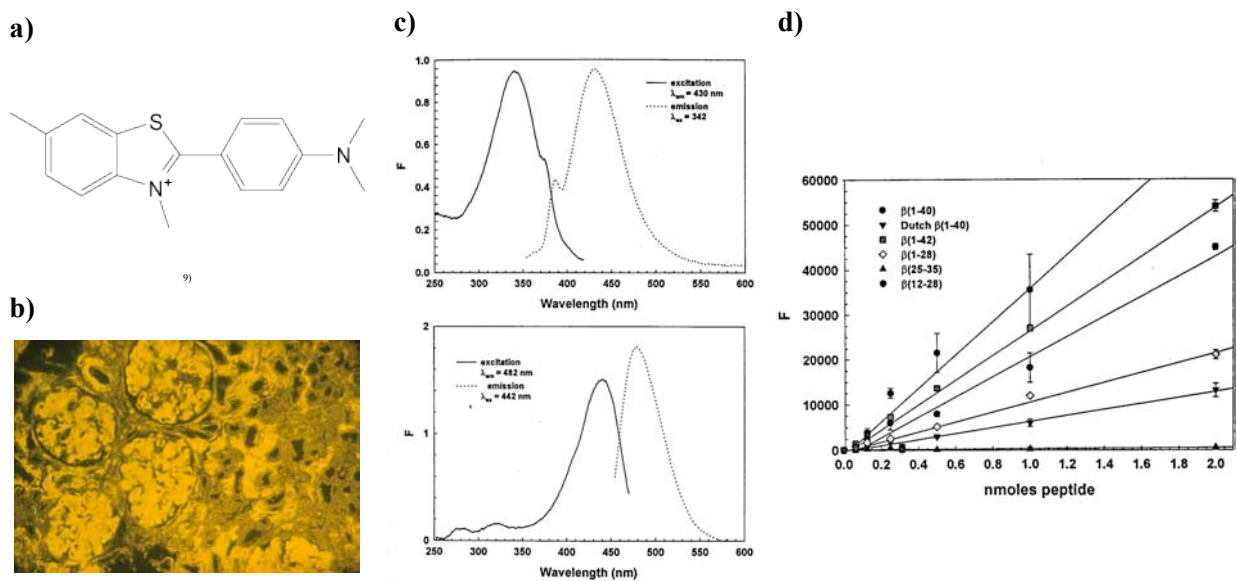


Figure 39 : *a) Structure de la thioflavine T ; b) coloration à la thioflavine T de dépôts amyloïdiques le long des capillaires glomérulaires et des parois artériolaires ; fluorescence jaune-verte en lumière ultraviolette ; c) spectres de fluorescence de la thioflavine T en l'absence (en haut) et présence (en bas) d'Aβ(1-42), avec en trait plein le spectre d'excitation (maximum à 430 nm en haut et 482 nm en bas) et en trait discontinu le spectre d'émission (maximum à 342 nm en haut et 442 nm en bas)²¹³ ; d) fluorescence de la thioflavine T suivant la nature des peptides amyloïdes²¹³.*

c. **Microscopie électronique par coloration négative conventionnelle**

La microscopie électronique permet d'observer la morphologie de macromolécules solides avec une résolution d'environ 2 nm²¹⁵. Pour un meilleur contraste et une meilleure visualisation des petits éléments, la coloration négative est souvent préférée à la coloration positive²¹⁶. La procédure, relativement simple et rapide, ne nécessite qu'une petite quantité de la solution à analyser qui doit être déposée à la surface du film de carbone d'une grille pour microscope électronique. Une solution contenant un colorant dense aux électrons est ensuite appliquée en une fine couche qui enveloppe l'échantillon. La dispersion électronique du produit à observer étant bien moins importante que celle du colorant, il en résulte un contraste d'image important (Figure 40). Dans la majorité des cas, le colorant utilisé en microscopie électronique conventionnelle par coloration négative est une solution de 2 % d'acétate d'uranyle dans l'eau. Certaines expériences requièrent parfois l'emploi d'autres substances, telles que l'aurothioglucose ou l'acide phosphotungstique. Autre avantage de cette technique, les fibrilles amyloïdes peuvent être observées par microscopie électronique aussi bien *in situ*, c'est-à-dire directement dans les tissus, qu'après avoir été isolés.

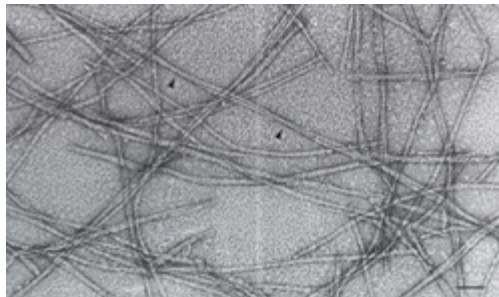


Figure 40 : Fibrilles d'Aβ(1-42) après 24 h d'incubation à 37°C, observées par microscopie électronique par coloration négative conventionnelle ; les flèches indiquent des fibrilles entortillées avec une périodicité d'environ 220 nm ; échelle: 50 nm²¹⁵.

Dès 1967, A. S. Cohen décrit que les dépôts amyloïdes de diverses origines, humaines ou animales, possédaient tous une même structure fibrillaire^{216,217}. Ils forment des paquets de fibrilles droites et rigides dont la largeur va de 60 à 130 Å, avec une moyenne autour de 75-100 Å, et de longueur généralement comprise entre 1 000 et 16 000 Å (Figure 41).

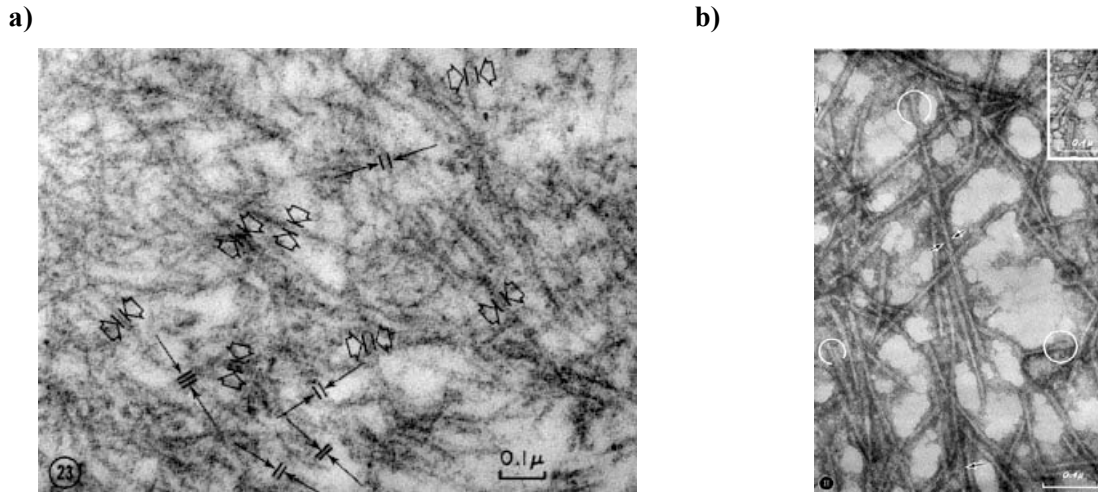


Figure 41 : **a)** Mesure de la largeur de fibrilles amyloïdes, localisées dans une section tissulaire conventionnelle de rate amyloïdotique humaine : la taille la plus fréquemment rencontrée est de 100 Å (flèches noires), mais des valeurs de 200 à 300 Å ne sont pas inhabituelles (flèches larges) ; **b)** fibrilles amyloïdes localisées dans un échantillon de surface d'un tissu riche en amyloïdes ; observation en microscopie électronique par coloration négative au phosphotungstate ; la largeur des fibres est comprise entre 50 et 110 Å ; les flèches et les cercles signalent la présence de protofilaments, respectivement près et sur les fibrilles²¹⁷.

Chaque fibrille est constituée de 5 à 6 sous-unités appelées protofibrilles ou protofilaments²¹⁷. Ce sont des brins fins, d'un diamètre de 25 à 35 Å, associés en forme de perles de 35 à 50 Å sur la longueur. Ils sont eux-mêmes composés de 2 à 3 sous-protofibrilles globulaires de 10 à 15 Å de diamètre (Figure 42). Cette description de A. S. Cohen fut corroborée par la suite, grâce à d'autres techniques, prouvant par là-même l'efficacité de la microscopie électronique par coloration négative²¹⁸.

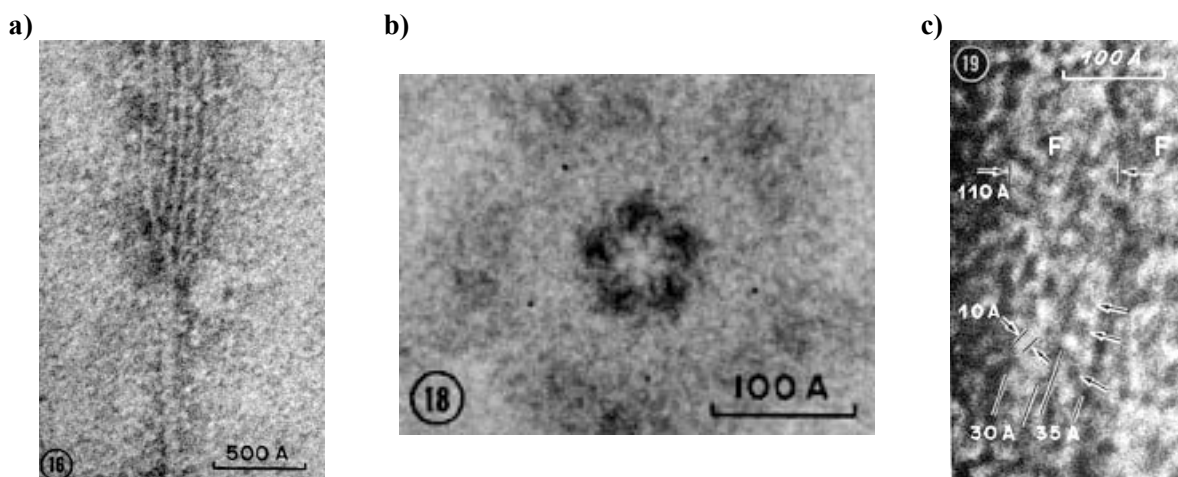


Figure 42 : Fibrilles amyloïdes observées en microscopie électronique par coloration négative : **a)** fibrille amyloïde d'environ 75 Å de largeur (moitié inférieure du micrographe) dispersée, après traitement à l'urée, en plusieurs protofilaments de 25-35 Å de large (moitié supérieure du micrographe) – coloration négative au phosphotungstate ; **b)** coupe d'un filament amyloïde, composé de 5 protofilaments - coloration négative au phosphotungstate ; **c)** fibrilles (F) observées après 15 min de sonication : elles sont composées de protofilaments (25-35 Å de diamètre), eux-mêmes composés de sous-protofibrilles (10-15 Å de diamètre) – coloration négative à l'acétate d'uranyle²¹⁷.

Cette technique permit à C. S. Golsbury et ses collaborateurs d'étudier en 2000 l'agrégation *in vitro* du peptide A β (1-40) à 37°C²¹⁹. Dès le premier jour, la solution contenait des structures pseudo-sphériques, qui se réarrangèrent dès le deuxième jour en fibrilles courtes et flexibles avant de disparaître complètement au profit de fibrilles matures au bout de quatre jours (Figure 43). Le huitième jour, la solution était composée uniquement de fibrilles torsadées et de rubans à bruns multiples.

Ainsi la microscopie électronique conventionnelle par coloration négative est une technique de choix pour l'étude des fibrilles amyloïdes et le suivi de leur formation. Cette méthode simple et puissante fut modifiée dans le but d'améliorer ses propriétés et d'obtenir un maximum de données sur les structures macromoléculaires²¹⁹. Cependant les études standards se contentent habituellement de cette première technique.

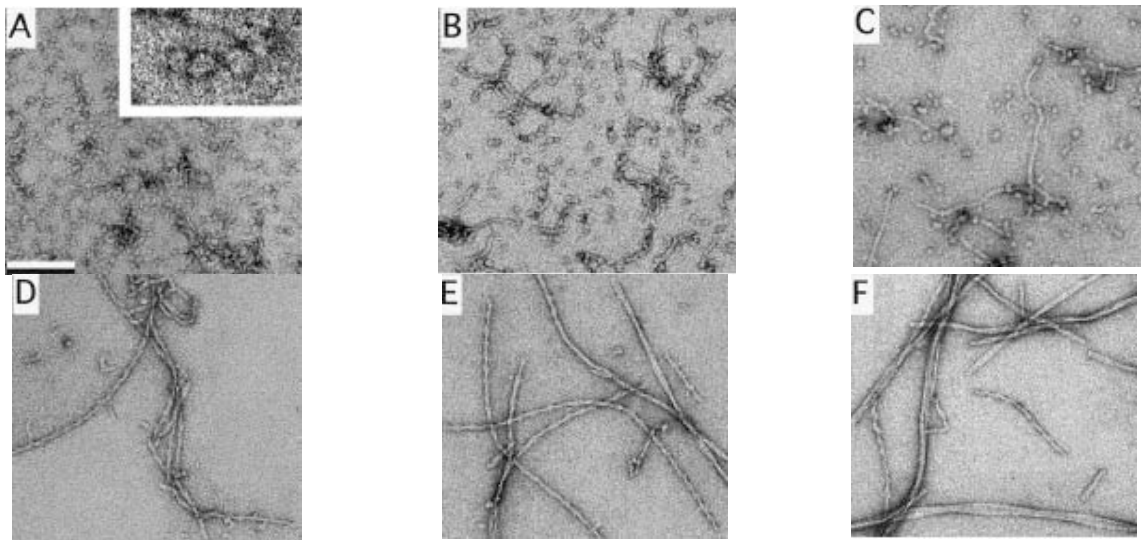


Figure 43 : Développement morphologique des fibrilles d'A β (1-40) au cours d'une incubation non-perturbée à 37°C. **A)** jour 1 : structures pseudo-sphériques ; **B)** jour 2 : disparition des structures rondes, apparition de fibrilles courtes et flexibles ; **C)** jour 3 : moins de structures rondes, plus de fibrilles courtes et flexibles ; **D)** jour 4 : fibrilles matures et rigides ; **E)** jour 5 : fibrilles entortillées ; **F)** jour 8 : fibrilles entortillées et rubans à plusieurs brins²¹⁹.

d. Méthode des « host-guest switch-peptides »

Dès le début des années 1980, M. Mutter et ses collaborateurs utilisèrent des modèles de peptides « host-guest » pour étudier les préférences conformationnelles d'acides aminés et peptides, en se basant sur le principe que les interactions à courte portée, dues aux chaînes latérales-mêmes du peptide, déterminent l'initiation d'une hélice α , d'un feuillet β ou d'un coude β ^{220, 221, 222} (Figure 44).

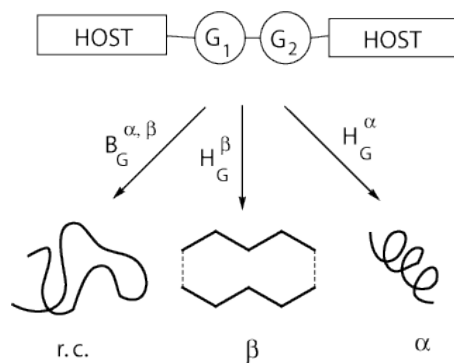


Figure 44 : Modèle de peptides « host-guest » utilisé pour l'étude des préférences conformationnelles d'acides aminés et peptides ; G = acide aminé « guest » ; B = briseur de liaison hydrogène, H = formateur de liaison hydrogène, $r. c.$ = pelote statistique (random coil), β = feuillet bêta ; α = hélice alpha²²².

Leurs résultats montrèrent que la stabilité des structures β était fortement liée aux interactions de voisinage. Ainsi, l'incorporation d'acides aminés « guest » (G_1 et G_2 dans la Figure 44) dans un peptide « host », adoptant naturellement une structure β , permet de destabiliser la conformation du peptide au gré des propriétés intrinsèques des acides aminés « guest » et d'obtenir, au choix, une pelote statistique, un feuillet β ou une hélice α (Figure 44).

L'étude des changements conformationnels des peptides est au cœur-même de nombreux domaines de recherche situés à l'interface entre la chimie, la biologie et la médecine. Il parut donc nécessaire de trouver une méthode efficace qui permettrait d'évaluer l'influence de facteurs externes, température, pH ou autres molécules, sur la capacité d'un peptide à adopter sa structure secondaire. Cette méthode pourrait alors être appliquée à l'étude des protéines amyloïdes se repliant en feuillets β .

En 2004, M. Mutter combina la technique des peptides « host-guest » avec le concept des « switch-peptides » afin d'étudier les transitions conformationnelles de peptides « guest » excisés de leur polypeptide natif (Figure 45)²³.

D'une façon générale, l'introduction d'un élément « switch » au sein du peptide « guest » permet de rompre l'enchaînement des liaisons hydrogène, provoquant ainsi un changement conformationnel en pelote statistique. Ce peptide « guest », incorporé au milieu d'un peptide « host » favorisant les structures en feuillet β , subit, au moment de la migration acylique, une transition conformationnelle rétablissant la conformation en feuillet β . Dans le même temps, les fibrilles commencent à se former (Figure 45)²³.

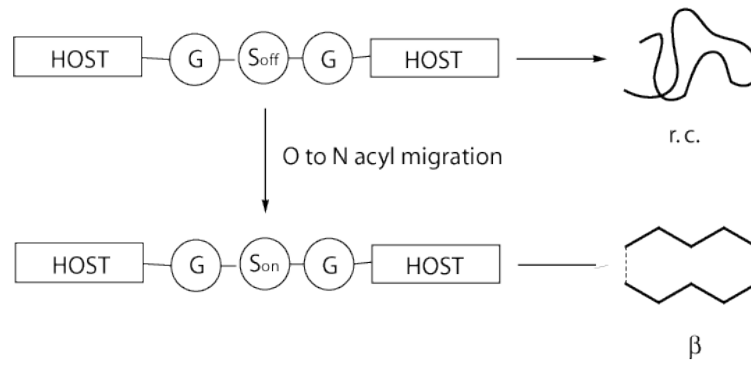
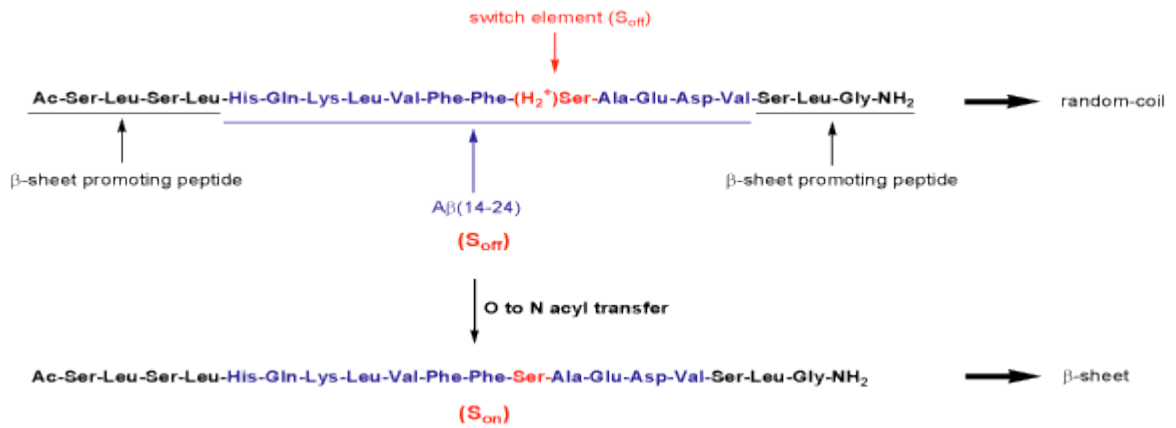


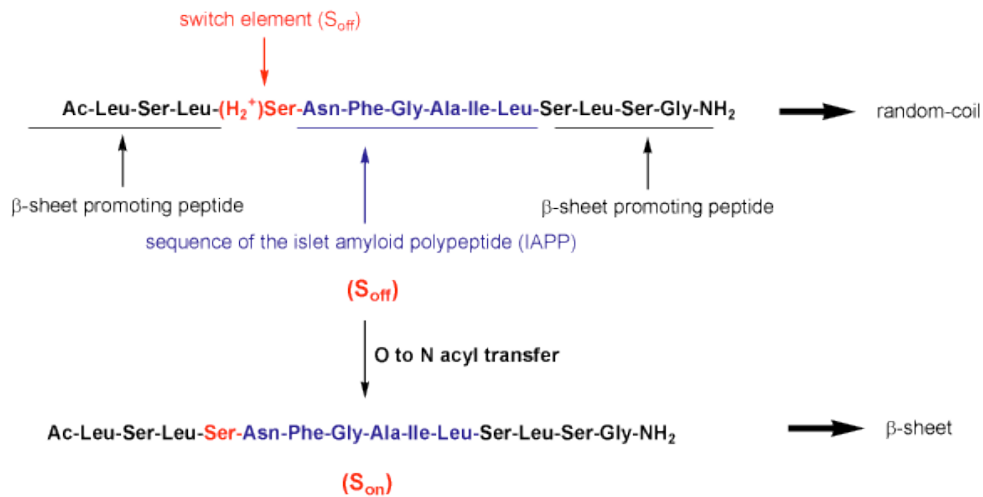
Figure 45 : Modèle de « host-guest switch-peptide » utilisé pour étudier l'influence des éléments externes sur les transitions conformationnelles ; le peptide « host » favorise les structures en feuillet β , le peptide « guest », petite séquence d'un peptide amyloïde, est modifié pour intégrer un élément « switch » ; à l'état S_{off} , l'enchaînement des liaisons hydrogène est interrompu par la liaison ester, le « host-guest switch-peptide » est sous forme de pelote statistique ; la migration acylique rétablissant l'enchaînement des liaisons hydrogène, le peptide change de conformation et adopte une structure en feuillet β (état S_{on})²³.

Cette technique fut appliquée à l'amyloïde β et au polypeptide amyloïde des cellules d'îlot, impliqué dans le diabète mellitus de type II. Les séquences utilisées comme peptides « guest » furent respectivement l'A β (14-24) et le peptide Asn-Phe-Glu-Ala-Ile-Leu (en bleu dans les peptide I et II, Figure 46a et b). Le choix de ces peptides « guest » n'est pas innocent. En effet, de nombreuses études prouvèrent l'importance de ces séquences au moment de la formation des fibrilles. Ces peptides amyloïdes sont cytotoxiques, mais ne forment pas de feuillets β ^{223, 224, 225, 226, 227}. La sérine fut choisie comme élément « switch » (en rouge dans la Figure 46a et b) nécessaire au contrôle de la conformation du peptide : pelote statistique à l'état S_{off} , et feuillet β à l'état S_{on} ²³. La partie « host » est un polypeptide (Leu-Ser)_n-Gly favorisant la conformation en feuillet β . C'est une séquence amphiphatique de part la nature hydrophile de la sérine et hydrophobe de la leucine. Il se multimérise en milieu aqueux et adopte une conformation en feuillets β , interactions hydrophobes encourageant les faces non polaires à rester en contact les unes avec les autres (Figure 47)^{23, 228, 229, 230, 231, 232}. L'absence de chaînes latérales ionisables est un autre avantage de ce modèle, puisque cela évite les interactions ioniques pouvant perturber la conformation suivant la valeur du pH. Enfin, la glycine est utilisée pour éloigner la séquence (Leu-Ser)_n du support solide et faciliter ainsi la synthèse peptidique.

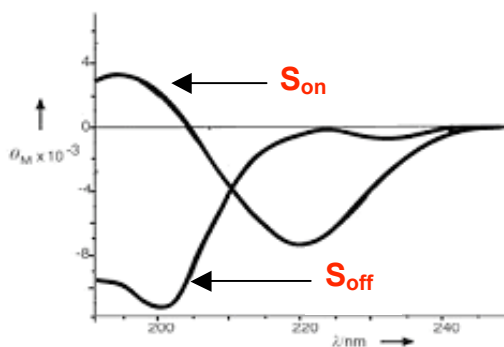
a) Méthode du « Host-guest switch-peptide » appliquée à l'amyloïde β (I)



b) Méthode du « Host-guest switch-peptide » appliquée au polypeptide amyloïde des cellules d'îlot (II)



c) CD du « host-guest switch-peptide » I



d) CD du « host-guest switch-peptide » II

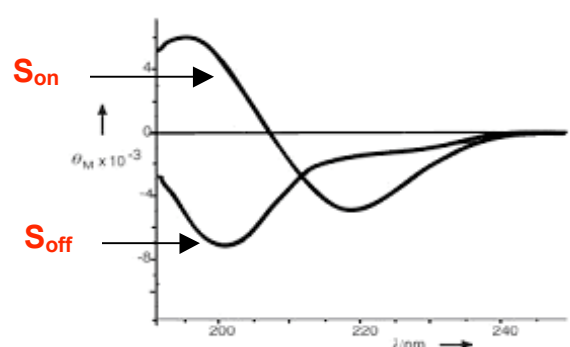


Figure 46 : Principe de la méthode des « host-guest switch-peptides » permettant la transition conformationnelle entre la pelote statistique et le feuillet β : **a)** modèle adapté à l'amyloïde β ($A\beta(14-24)$, peptide I) et **b)** modèle adapté au polypeptide amyloïde des cellules d'îlot (séquence NFGAIL, peptide II); **c)** et **d)** spectres de dichroïsme circulaire correspondants aux peptides I et II, à l'état S_{off} et S_{on} ²³.

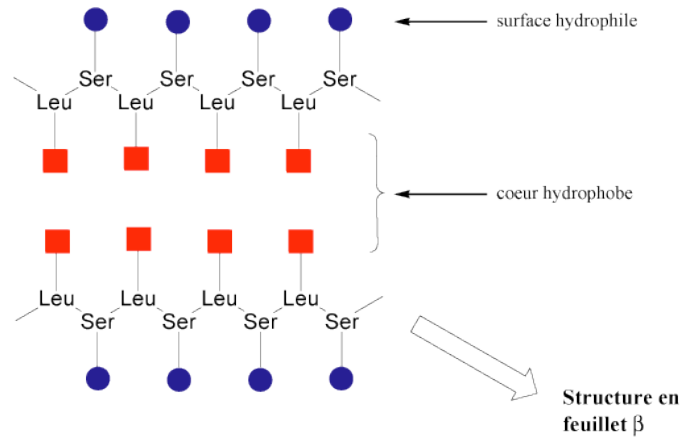


Figure 47 : Principe de l'agrégation en feuillets β du modèle peptidique amphipatique (Leu-Ser)_n.

L'efficacité de la méthode fut prouvée pour chaque modèle par dichroïsme circulaire (Figure 46c et d). Dans les deux cas, le peptide passe, grâce à la migration acylique, de l'état de pelote statistique (état S_{off}) à celui de feuillet β (état S_{on}). Ces changements sont en corrélation avec la formation de fibrilles, mises en évidence par microscopie électronique conventionnelle par coloration négative²³.

Ainsi, ces premiers résultats démontrèrent l'efficacité de la méthode des « host-guest switch-peptides » et son utilité en tant que système-kit de diagnostique, permettant d'évaluer l'activité de molécules potentiellement capables de briser les feuillets β . Un autre avantage novateur de ce concept réside en son adaptabilité à toute autre protéine impliquée dans une maladie dite conformationnelle.

e. Test cellulaire de la cytotoxicité des amyloïdes

Les tests cellulaires de cytotoxicité des amyloïdes se basent sur la toxicité des fibrilles d'amyloïde β . D'un point de vue pratique, une solution de peptide amyloïde ou un mélange de cette molécule avec un inhibiteur potentiel est utilisé et laissé incuber 36 h à 37°C. Elle est ensuite ajoutée à une culture cellulaire qui incube encore pendant 24h à 37°C. Un traitement au bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yle)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium (MTT), substance jaune dégradée par les cellules vivantes en un colorant pourpre, le formazan, permet d'évaluer la toxicité fibrillaire ou l'efficacité de l'inhibiteur par mesure colorimétrique.

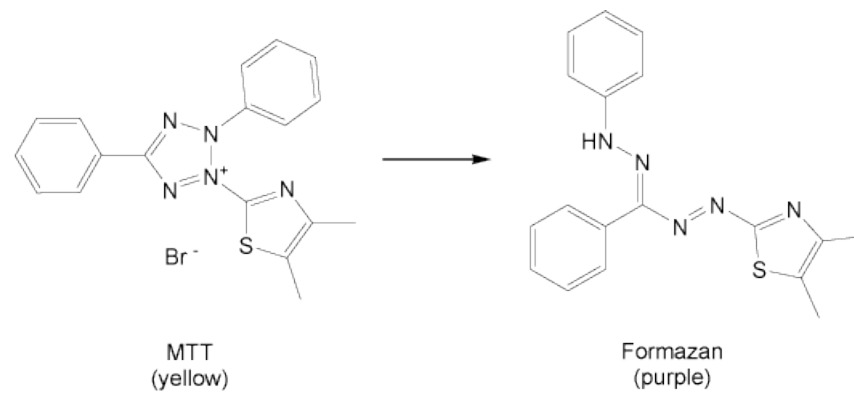


Figure 48 : Principe du test cellulaire de cytotoxicité des amyloïdes : dégradation par les cellules vivantes du MTT en formazan.

En conclusion, ces techniques permettent de contrôler et de suivre la formation des fibrilles amyloïdes. Elles nous offrent ainsi la possibilité d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules destinées à être des inhibiteurs efficaces de l'amyloïdogénèse.

Résultats et Discussion

Chapitre 1 : Importance de la séquence de reconnaissance	71
I. Considérations générales	71
II. Un peptide cyclique comme inhibiteur potentiel de l'agrégation fibrillaire.....	81
III. Etude d'un modèle peptidique dérivé de l'amyloïde bêta, l'Aβ(13-23).....	89
1. Synthèse de peptides de référence	90
2. Etude des peptides de référence par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle.....	99
3. Etude des peptides de référence par coloration au rouge Congo.....	110
4. Test de screening d'inhibiteurs potentiels de la fibrillogenèse : premiers résultats.....	114
IV. Evaluation de l'activité inhibitrice du peptide cyclique	123
Chapitre 2 : Les peptides conjugués.....	129
I. Etat des connaissances bibliographiques	129
II. Génération de nouveaux peptides conjugués	136
1. Synthèse de dérivés de cotinine.....	136
2. Synthèse d'un dérivé d'acide indolebutyrique	160
3. Synthèse d'un peptide conjugué contenant un groupe Hao	166
Chapitre 3 : Dynamisation.....	169
I. Les « switch-peptides ».....	169
1. Validation du concept.....	169
2. Une nouvelle classe d'inhibiteurs : les « switch-peptides »	175
3. Migrations acyliques intramoléculaires : S→N versus O→N.....	183
4. Modification de l'approche prodrogue vers une formation de l'inhibiteur <i>in vivo</i>	185
5. Evaluation biologique des « switch-peptides »	194
II. Une nouvelle génération d'éléments « switch ».....	200
1. Une molécule naturelle, la vitamine B ₆	202
2. Les cycles aromatiques trifonctionnalisés.....	225
III. Les « switch-peptides » conjugués.....	260
1. Insertion d'un élément « switch », la sérine	260
2. Utilisation d'un élément « switch » inducteur de coude.....	264

Chapitre 1 : Importance de la séquence de reconnaissance

I. Considérations générales

A l'heure actuelle, nous ne connaissons pas avec précision les raisons du changement conformationnel en feuillets β conduisant à l'agrégation du peptide amyloïde β . Cependant, avant de concevoir d'une façon rationnelle de nouvelles molécules luttant efficacement contre ce phénomène, il nous est nécessaire de comprendre au mieux ses caractéristiques.

L'amyloïde β fait partie des peptides et protéines à dissonance α/β . Cette catégorie regroupe des molécules possédant une séquence de 7 résidus ou plus, qui, d'après les données de prévision de structures secondaires, est sensée adopter une structure en hélice α , mais qui forme en réalité un feuillet β ²³³. La substitution de certains résidus caractéristiques de l'amyloïde β permet de mettre en évidence cette dissonance α/β dès 1996²³⁴.

Nous nous sommes alors intéressés plus particulièrement aux travaux de L. O. Tjernberg. En 1996, il observa que l'analogue A β (1-28), dont les résidus 16, 17 et 20 étaient remplacés par des alanines, ne formait pas de fibrilles, alors que l'A β (1-28) formait des fibrilles similaires à l'A β (1-42)²³⁴ (Figure 49). Puis en 1999, il mit en évidence l'importance de la séquence A β (14-23) pour la fibrillogenèse, en omettant les résidus 14 à 23 dans l'A β (1-42)²²³. Cette expérience eut pour conséquence l'inhibition de la formation de fibrilles dans les conditions standard d'incubation du peptide.

En fait, l'A β (14-23) forme le cœur des fibrilles d'amyloïde β ²²³. Il est capable de former par lui-même des fibrilles, mais il est encore trop petit pour que ces agrégats soient similaires à ceux de l'A β (1-42). L'undécapeptide A β (13-23) est véritablement la plus petite séquence d'amyloïde β apte à s'agréger d'une façon semblable à celle du peptide pathogène.

Ainsi que nous l'avons vu précédemment, la mutation des résidus d'A β (1-28) par des alanines permet de déterminer les acides aminés essentiels à l'agrégation fibrillaire de ce peptide, à savoir Lys16, Leu17 et Phe20²³⁴. Mais si nous considérons les valeurs de propension à l'hélice α ou au feuillet β pour ces résidus, nous remarquons que l'alanine favorise l'hélice α plutôt que le feuillet β , et qu'il en est de même pour la lysine et la leucine²³⁵ (Figure 49). Ainsi, les mutations K16A et L17A ne devraient donc pas influencer sur la structure secondaire du peptide modifié, contrairement à la phénylalanine 20, qui préfère le feuillet β à l'hélice α ²³⁵. Nous pourrions donc expliquer l'inhibition de l'agrégation du peptide modifié A β (1-28, K16A, L17A, F20A) par cette simple mutation du résidu 20. Or, lorsque l'alanine est substituée à des acides aminés à forte propension au feuillet β ²³⁵, tels que la phénylalanine 19 ou à la valine 18 du peptide

H-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-NH₂, cela n'a que peu d'incidence sur l'affinité de ce peptide avec l'amyloïde β , alors qu'une mutation en position 16, 17 ou 20 inhibe presque totalement cette interaction²³⁴.

Cette étude nous permet donc de conclure que le procédé d'agrégation de l'amyloïde β est dépendant de la séquence, que parallèlement à cela, l'hydrophobicité de la chaîne latérale n'est pas un déterminant général de la formation de fibrilles, et que les résidus 16, 17 et 20 sont nécessaires à la reconnaissance et l'agrégation fibrillaire du peptide amyloïde.

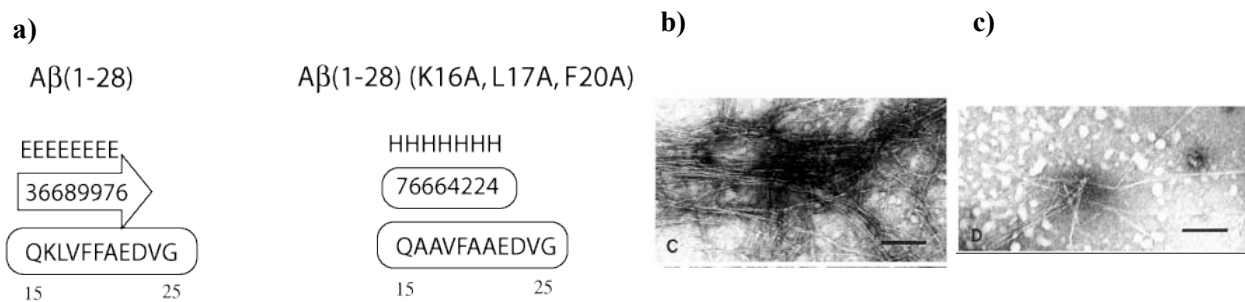


Figure 49 : Effet de la substitution par des alanines sur la dissonance α/β du peptide A β (1-28) : **a)** à gauche, A β (1-28) et à droite, A β (1-28, K16A, L17A, F20A) ; première ligne : prédiction de Chou-Fasman^{236, 237} (E = haute propension au feuillet β ; H = haute propension à l'hélice α) ; ligne du milieu : indices de prédiction du PHD²³⁸ (Profile network from HeiDelberg) (flèche = feuillet β ; cylindre = hélice α)²³³ ; dernière ligne : séquence 15-25 ; **b)** formation de fibrilles d'A β (1-28), observées par microscopie électronique ; **c)** observation par microscopie électronique d'agrégats amorphes d'A β (1-28, K16A, L17A, F20A) ; **b)** et **c)** coloration négative avec 2% d'acétate d'uranyle dans l'eau, échelle : 100 nm²³⁴.

L'étude des fibrilles d'amyloïde β par diffraction aux rayons X et par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier permet de montrer que le peptide s'agrègeait sous forme de feuillets β antiparallèles²²³. Ce résultat fut confirmé par RMN de l'état solide pour le fragment A β (34-42), cette méthode trouvant ses limites lors de l'analyse de séquences plus longues²³⁹. La RMN en solution, quant à elle, ne permet pas d'obtenir de plus amples informations, dans la mesure où elle requiert l'addition de solvants organiques ou de détergents pour solubiliser le peptide, ce qui dénature, partiellement du moins, la structure tertiaire adoptée par la molécule²⁴⁰. Enfin, l'amyloïde β ne cristallisant pas, les rayons X ne peuvent malheureusement pas être utilisés pour définir un modèle structural plus précis de cette molécule.

Certains groupes de recherche utilisèrent alors la modélisation moléculaire pour tenter de combler ces lacunes expérimentales. L. O. Tjernberg proposa notamment des modèles structuraux de dimère, tétramère et octamère du peptide A β (14-23), ainsi que de dimère de l'A β (14-42)²²³.

Dans le modèle du dimère d'A β (14-23), les deux brins sont impliqués dans un feuillet β antiparallèle de façon à ce que l'histidine 14 et l'acide aspartique 23 de chaque extrémité interagissent sous forme de paires d'ions (Figure 50).

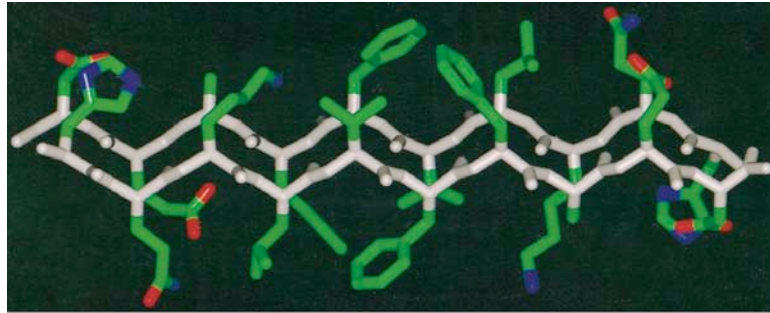
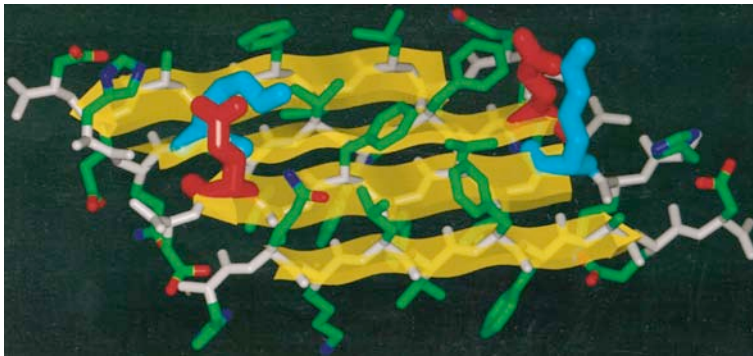


Figure 50 : Modèle structural d'un dimère d'Aβ(14-23), adoptant une structure en feuillet β antiparallèle : les histidines et acides aspartiques des deux extrémités forment des paires d'ions²²³.

Les dimères sont ensuite stabilisés grâce à la formation d'une paire d'ions entre la lysine 16 et l'acide glutamique 22 (Figure 51a). L'agrégation se poursuivrait alors pour former une fibrille dont l'axe serait perpendiculaire aux chaînes peptidiques (Figure 51b).

a)



b)

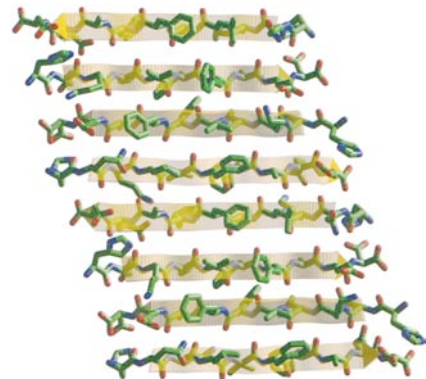


Figure 51 : Modélisation de l'agrégation de l'Aβ(14-23) sous forme de feuillets β antiparallèles (flèches jaunes ou grises) : **a)** tétramérisation ; les deux dimères interagissent grâce à la formation d'une paire d'ions entre les lysines (en bleu) et acides glutamiques (en rouge) de chaque extrémité ; **b)** octamérisation ; l'axe de la fibrille est perpendiculaire aux chaînes peptidiques²²³.

Dans le modèle structural du peptide Aβ(14-42), la partie C-terminale se replie sous ou sur le noyau (14-23) pour former un feuillet β intramoléculaire, avec un coude localisé entre les résidus 25 et 27 (Figure 52a). L'amyloïde β continuerait ainsi à s'assembler pour former d'abord des protofilaments, puis des fibrilles, similaires à celle représentée dans la Figure 52b.

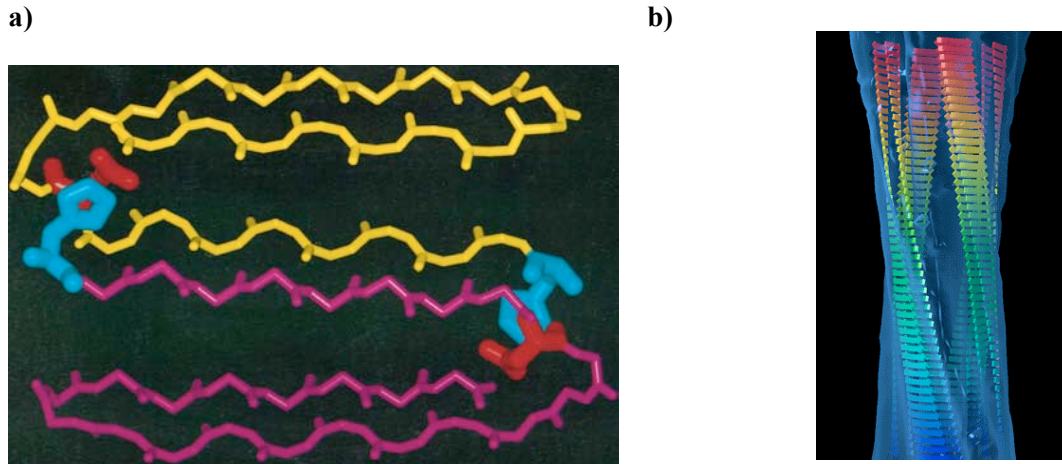


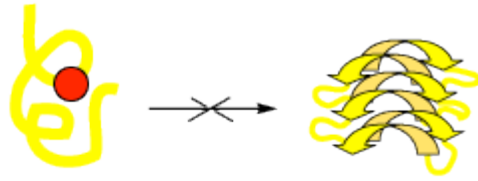
Figure 52 : a) Modélisation structurale d'un dimère d'Aβ(14-42) : la partie C-terminale, hydrophobique, forme un feuillet β intramoléculaire qui se replie sur le noyau 14-23 ; formation d'un coude entre les résidus 25 et 27 ; l'histidine 14 et l'acide aspartique 23, représentés respectivement en bleu et rouge, stabilisent le dimère en formant une paire d'ions, comme dans le cas du modèle moléculaire d'Aβ(14-23)²²³ ; b) représentation d'une fibrille amyloïde²⁴¹.

L'inhibition de l'agrégation fibrillaire de l'amyloïde β demeure un objectif particulièrement attrayant, tant au niveau chimique que biologique ou médical. Au moins quatre stratégies différentes furent proposées pour empêcher cette fibrillogenèse (Figure 53) : stabiliser la conformation native de la protéine, inhiber et inverser les changements conformationnels de cette protéine, inhiber d'une façon compétitive l'oligomérisation, ou, enfin, permettre la dégradation de la protéine ayant déjà adoptée sa conformation pathologique soit en stimulant les défenses immunitaires de l'organisme atteint, soit en déstabilisant les agrégats déjà formés²¹.

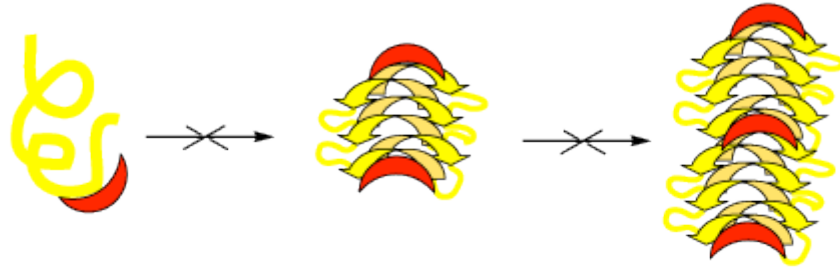
En ce qui concerne la première stratégie, des études ont montré que certaines molécules organiques étaient capables de se lier à la protéine native et de stabiliser sa structure (Figure 53a). C'est notamment le cas de la nicotine²⁴². Cependant, le mécanisme d'inhibition de la fibrillogenèse de l'amyloïde β par ces composés organiques reste encore à élucider^{187,243}.

La deuxième méthode requiert l'emploi de peptides perturbateurs ou destructeurs de feuillets β (Figure 53b). Ces molécules sont des homologues courts de la séquence centrale de l'amyloïde β, possédant la particularité de pouvoir destabiliser les structures en feuillets β. Cette similarité de séquence est une donnée importante dans l'élaboration de cette catégorie d'inhibiteurs, car elle leur permet d'interagir spécifiquement avec le peptide amyloïde. La séquence de reconnaissance est alors combinée à un élément destructeur de feuillet β, qui va permettre l'altération du processus d'agrégation fibrillaire du peptide pathogène, voire même de l'inverser¹⁹.

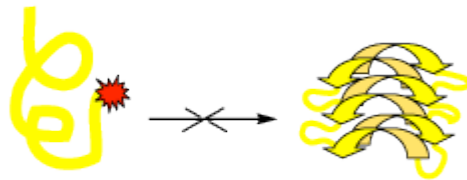
a) Stabilisation of the native protein conformation



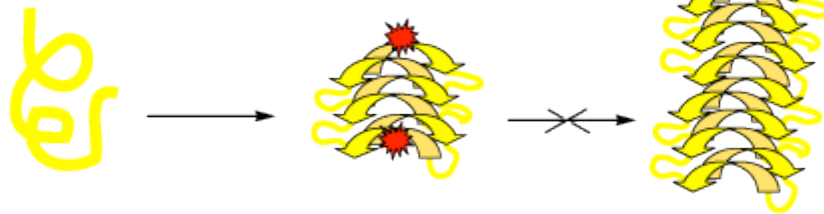
b) β -sheet breakers: inhibition and reversion of protein conformational changes



c) Competitive inhibitors (monomers)



d) Competitive inhibitors (oligomers)



e) Clearance enhancers

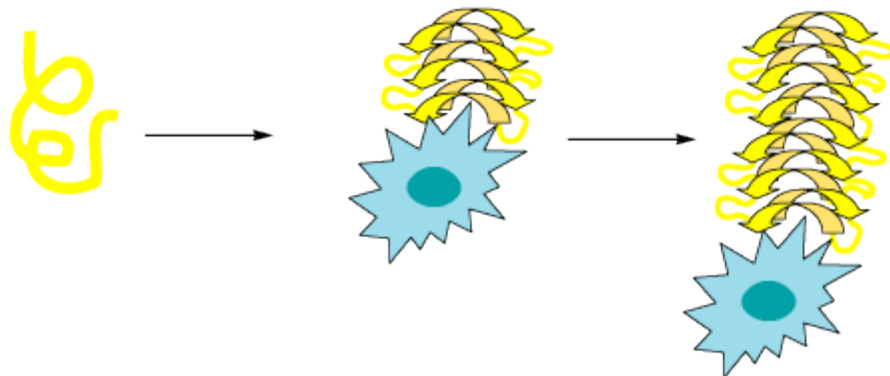


Figure 53 : Représentation schématique des différentes stratégies thérapeutiques d'inhibition de l'agrégation fibrillaire de l'amyloïde β : **a)** stabilisation de la conformation native de la protéine ; **b)** inhibition du changement conformationnel par l'intermédiaire d'un perturbateur de feuillettes β ; **c)** inhibition compétitive au niveau de la formation des monomères d'amyloïde β ; **d)** inhibition compétitive au niveau de l'oligomérisation de l'amyloïde β ; **e)** stimulation des défenses immunitaires (cellule bleue) ; en rouge, les différents inhibiteurs, adaptés à chaque stratégie²¹.

La troisième stratégie concerne les inhibiteurs compétitifs de l'agrégation fibrillaire. Il en existe deux types : la première interagit avec les formes monomériques, tandis que la seconde se concentre sur les oligomères et bloque leur évolution (Figure 53c et d). D'un point de vue pratique, il est difficile de déterminer expérimentalement le mécanisme d'action d'un inhibiteur compétitif. Le rouge Congo est un exemple typique de cette catégorie de molécules, ainsi que l'anticancéreux IDOX (4'-iodo-4'-déoxydoxorubicine) et l'antibiotique tétracycline, qui sont eux-aussi capables d'empêcher le mauvais repliement des protéines amyloïdes et de dissoudre les agrégats en début de formation^{244, 245}.

Enfin, une tactique particulièrement attractive consiste à stimuler l'élimination des fibrilles par l'organisme lui-même. Approche prometteuse, l'immunisation permet au corps de synthétiser des anticorps qui reconnaissent spécifiquement les agrégats d'amyloïde β ¹⁹¹⁻¹⁹⁵.

En ce qui nous concerne, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'inhibition du changement conformationnel du peptide amyloïde β suivant la deuxième stratégie décrite ici.

L'un des premiers exemples de peptides destructeurs de feuillets β fut étudié par R. M. Murphy en 1996. Il utilisa l'A β (15-25) comme élément de reconnaissance et une oligolysine comme élément perturbateur de feuillets β ¹⁹. Le peptide obtenu ne fut pas assez puissant pour inhiber la fibrillogénèse de l'amyloïde β , par contre, il perturba la cinétique d'agrégation du peptide et la morphologie des fibrilles formées, validant ainsi cette méthodologie.

Cette même année, L. O. Tjernberg montra que le peptide H-Lys¹⁶-Leu-Val-Phe-Phe²⁰-OH était un inhibiteur de la fibrillogénèse de l'amyloïde β ²³⁴. L'intérêt majeur de cette découverte réside dans la longueur minimaliste du peptide interagissant avec la molécule pathogène. R. M. Murphy utilisa alors cette séquence de reconnaissance en 2001, et la combina, du côté C-terminal cette fois, à un oligomère de lysine, d'acide glutamique ou de sérine⁵⁹. Il en déduisit l'intérêt d'avoir un grand nombre de charges ioniques dans la structure de l'élément destructeur.

En 1998, C. Soto modifia la séquence Leu¹⁷-Val-Phe-Phe²⁰ en remplaçant la valine 18 par une proline dans le but de diminuer la propension du peptide au feuillet β , tout en conservant son hydrophobicité^{246, 235}. Les études réalisées avec le peptide Leu-Pro-Phe-Phe-Asp prouvèrent qu'il inhibait la fibrillogénèse de l'amyloïde β , détruisait *in vitro* les fibrilles pré-formées, évitait la mort neurale due à la toxicité des fibrilles dans les cultures cellulaires, réduisait la quantité de dépôts d'amyloïde β *in vivo* et empêchait l'amyloïdogénèse dans un modèle de cerveau de rat. Une modélisation moléculaire du peptide interagissant avec l'A β (1-40) laissa supposer que l'inhibiteur se plaçait dans la poche hydrophobe du peptide amyloïde formée par les résidus Leu17, Phe20, Ala21, Ala30, Ile31 et Ile32, et que, plus

spécifiquement, la leucine 1 et la phénylalanine 3 du 5-mère se liaient respectivement à la leucine 17 et à la phénylalanine 20 de l'A β ¹⁸⁷ (Figure 54).

La stabilité enzymatique de la molécule fut améliorée après acétylation de la partie N-terminale et amidation de l'acide libre C-terminal^{247, 248}. La méthylation de la liaison amide entre la proline et la phénylalanine permit encore de limiter la dégradabilité de la molécule correspondante et d'augmenter sa perméabilité à travers la barrière hémato-encéphalique²⁴⁸.

Au cours de son travail de thèse avec M. Mutter, C. Boissard utilisa le concept des pseudo-prolines dans le but d'optimiser les propriétés inhibitrices du peptide H-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-OH et d'élaborer de nouvelles structures bloquant la fibrillogénèse de l'A β (1-42). Ainsi, il remplaça la proline du peptide Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ par une thiazolidine ou une oxazolidine^{248,249}.

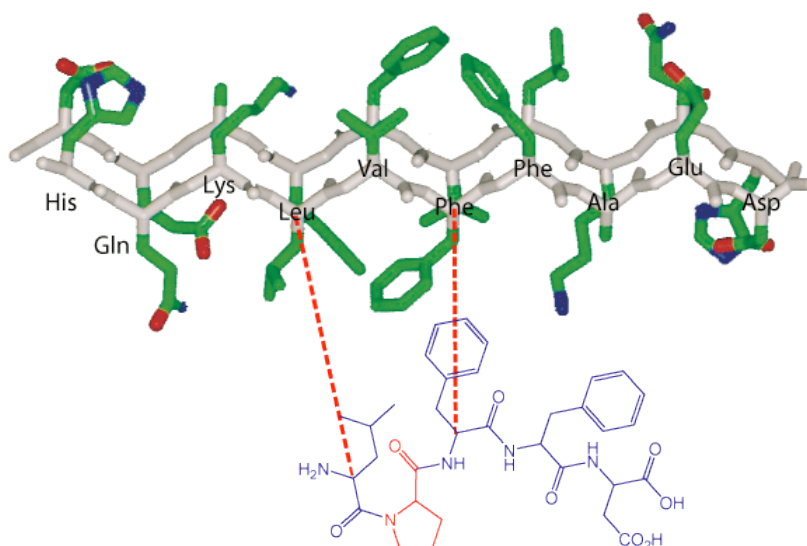


Figure 54 : Représentation schématique des interactions existant entre l'inhibiteur H-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-OH et un dimère d'A β (14-23)²²³ : les pointillés rouges symbolisent les interactions existant entre les deux résidus désignés par l'extrémité des traits au niveau de leur C α ; ainsi, la Leu1 se lie à la Leu17 et la Phe3 à la Phe20¹⁸⁷.

Il introduisit également, au niveau de la partie N-terminale de ce peptide, différents groupes chimiques, acétyle, succinique, bétaïne ou sarcosine, afin d'améliorer la solubilité aqueuse et la stabilité enzymatique des analogues synthétisés. La stabilité et l'activité inhibitrice de ses différentes molécules furent évaluées grâce à une collaboration avec C. Soto.

Les travaux de C. Boissard démontrèrent l'influence du groupe en position N-terminale sur la stabilité de la molécule correspondante. Ainsi, la présence d'un groupe acétyle ou succinique est beaucoup plus avantageuse que celle d'une sarcosine ou d'une bétaïne. D'autre part, les oxazolidines sont plus stables que les dérivées thiazolidines, avec une nette préférence pour les diméthylpseudo-prolines et les monophénylpseudo-prolines par rapport aux dihydropseudo-prolines. Cependant, les monophénylpseudoprolines ont une activité inhibitrice beaucoup plus faible que les diméthylpseudoprolines.

En ce qui concerne l'inhibition de l'amyloïdogénèse, les analogues pseudo-prolines se révélèrent moins efficaces que l'Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂. Ce résultat tiendrait à la nature même des pseudo-prolines utilisées.

Les pseudo-prolines sont soit des oxazolidines dérivées d'une sérine ou d'une thréonine, soit des thiazolidines dérivées d'une cystéine²⁵⁰ (Figure 55). Lorsque la pseudo-proline porte des résidus encombrants en position C(2), la liaison entre elle et le résidu précédent est presque exclusivement *cis*^{251, 252}. Ainsi, la présence d'un cycle et d'une liaison amide *cis* entraîne une modification de la structure secondaire du peptide contenant cet acide aminé particulier. Cela a pour effet la prévention de l'agrégation du peptide, de son auto-association et de la formation de feuillets β.

C'est la raison pour laquelle les pseudo-prolines sont souvent utilisées comme groupes solubilisants et permettent d'améliorer les rendements et vitesses de couplage durant la synthèse de divers peptides^{250, 253}. Elles servent aussi de protection temporaire pour la sérine, la thréonine et la cystéine²⁵³, et sont parfois employées comme prodrogues²⁵². Suivant la nature de leurs substituants en position C(2), elles peuvent induire des coudes β de type VII²⁵¹, ou au contraire augmenter la dynamique de l'isomérisation *cis/trans* de la liaison amide Xaa-ΨPro²⁵⁴.

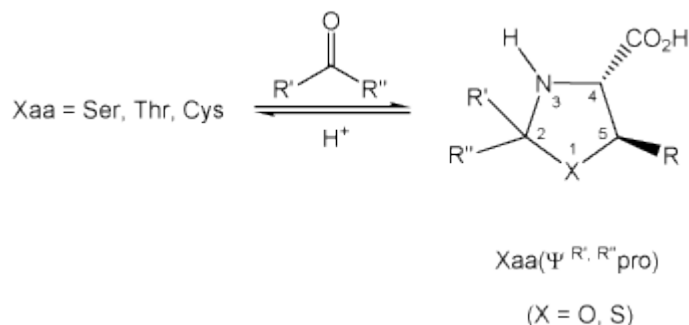


Figure 55 : Les pseudo-prolines dérivées de la sérine, de la thréonine et de la cystéine : formation et hydrolyse²⁵⁰.

La principale différence entre la proline de l'Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ et les pseudo-prolines utilisées par C. Boissard concerne la nature de la liaison Xaa-Pro ou ΨPro. La proline est caractérisée par une isomérisation *cis/trans* de la liaison amide Xaa-Pro, dont le temps de relaxation va de dix à plusieurs centaines de secondes à température ambiante, et ce suivant la structure tertiaire adoptée par le peptide^{251, 254} (Figure 56). En effet, alors que les autres acides aminés naturels adoptent préférentiellement la conformation *trans*, la proline est présente sous forme d'un mélange des deux isomères, les états *cis* et *trans* ayant des énergies similaires en l'absence de contraintes stériques externes²⁵². La pseudo-proline Cys(Ψ^{Me, Me} pro), quant à elle, fixe la conformation de cette liaison presque exclusivement en position *cis*^{249, 251}.

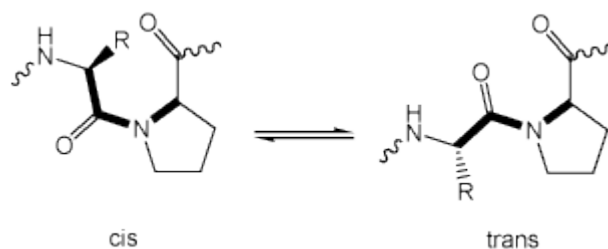


Figure 56 : Isomérisation cis/trans de la liaison Xaa-Pro.

Suite à ces considérations et au vu des résultats obtenus avec les produits de C. Boissard, il en fut déduit que les inhibiteurs de l'agrégation de l'amyloïde β étaient bioactifs lorsqu'ils adoptaient une conformation cis de la liaison amide Xaa- Ψ Pro, mais qu'une rigidification précoce de cette liaison empêchait partiellement la reconnaissance entre l'inhibiteur et le peptide amyloïde^{247, 249} (Figure 57).

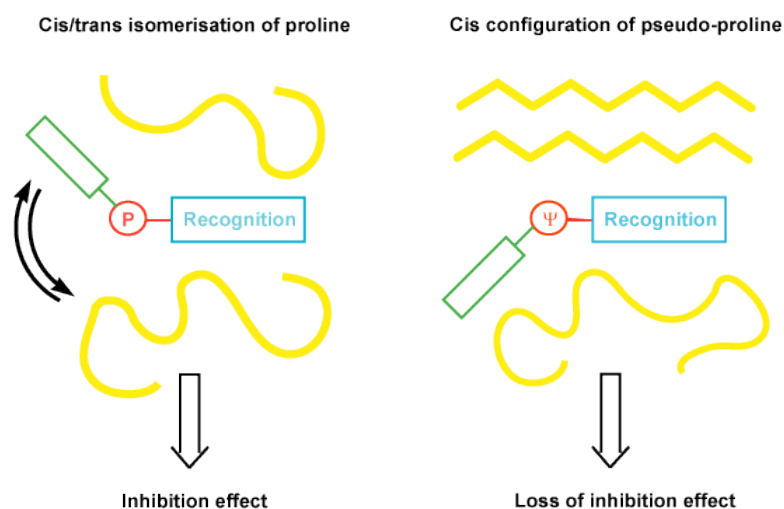


Figure 57 : Effet de la proline et de la pseudo-proline présentes chacune dans un peptide destructeur de feuillets β : la proline, de part son isomérisation cis/trans, inhibe la formation des fibrilles d'amyloïde β ; la pseudo-proline cis a une activité inhibitrice réduite due à sa rigidité^{247, 249}.

Ainsi, les stratégies d'élaboration de nouveaux inhibiteurs puissants devront tenir compte de ces résultats. L'idéal serait d'avoir une molécule qui agisse en deux temps : elle se lierait d'abord au peptide A β (1-42) grâce à sa séquence de reconnaissance, puis elle subirait une modification *in situ* induisant la formation d'un coude, détruisant alors les feuillets β en cours d'agrégation (Figure 58).

New concept for drug design

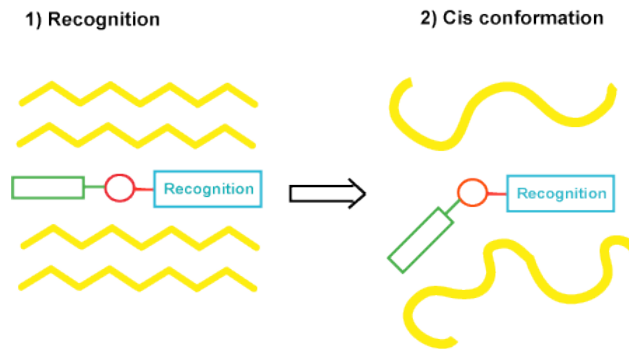


Figure 58 : Nouvelle stratégie de conception d'inhibiteurs puissants de la fibrillogenèse ; la molécule dessinée devra agir en deux temps : **1)** durant la phase de reconnaissance, elle interagira avec l'amyloïde β , puis **2)** elle adoptera une conformation cis et formera un coude déstabilisant les structures préformées en feuillets β .

Dans le cadre de notre travail de thèse, nous avons envisagé trois stratégies de conception d'inhibiteurs de cette fibrillogenèse (Figure 59).

La première voie (I) considère la cyclisation d'un peptide contenant à la fois la proline et la séquence de reconnaissance, comme étant une méthode de choix permettant d'améliorer la stabilité enzymatique de la molécule et de mieux positionner les résidus interagissant avec le peptide pathogène.

La deuxième stratégie (II) conserve le principe de flexibilité de la proline mais utilise une double interaction avec l'amyloïde β en combinant une séquence de reconnaissance peptidique avec une molécule organique, connue pour interagir soit avec le peptide $A\beta(1-42)$ lui-même, soit avec les feuillets β en général. Nous expliquerons plus en détail cette stratégie dans le Chapitre 2 de cette partie.

Enfin, la troisième méthodologie (III) tient compte de nos réflexions précédentes et imagine une série de peptides modifiés agissant en deux temps : d'abord la reconnaissance du peptide amyloïde, puis la destruction des feuillets β . Elle nécessite l'élaboration d'un nouveau concept, celui des « swich peptides », déjà présenté au cours du Chapitre 1 de notre Introduction. Les travaux qui y sont rattachés seront décrits dans le Chapitre 3 de cette partie Résultats et Discussion.

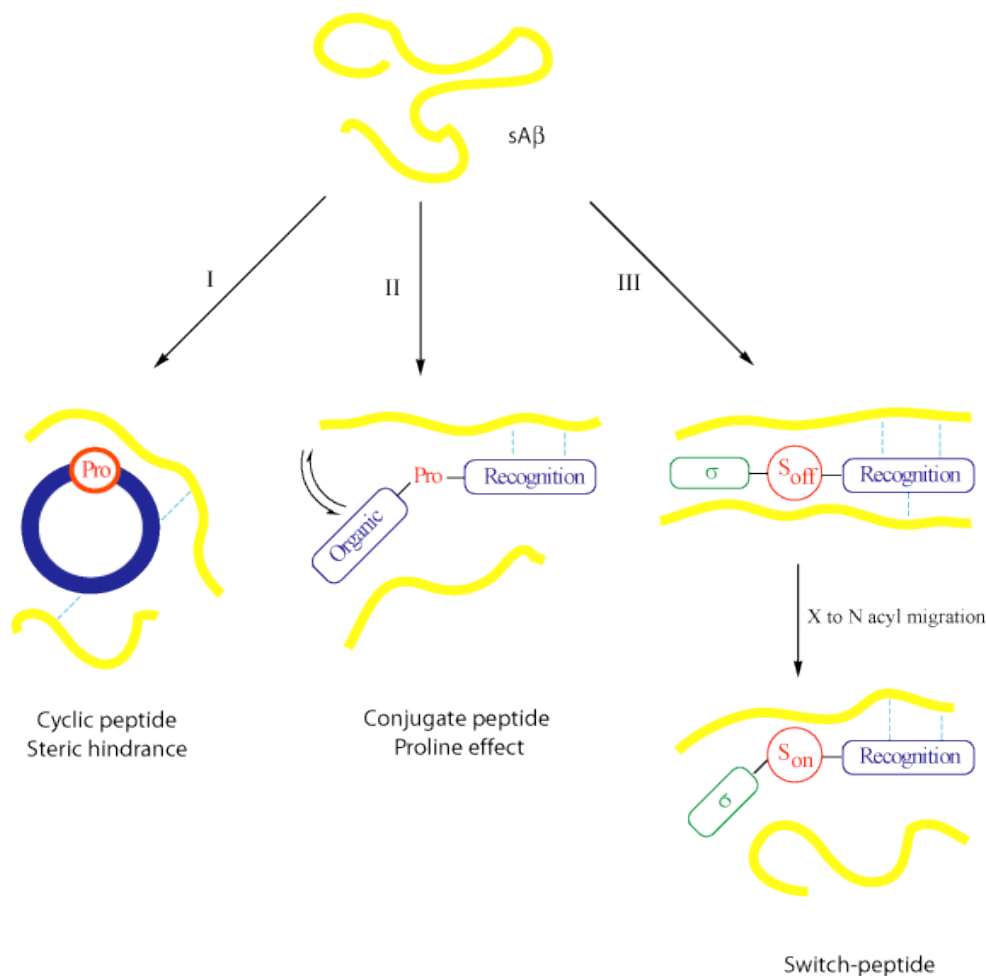


Figure 59 : Stratégies d'inhibition de la fibrillogenèse de l'Aβ, envisagées au cours de ce travail de thèse : I) synthèse d'un dérivé cyclique ; II) synthèse de peptides conjugués conservant l'effet de la proline ; III) dynamisation grâce au concept des « switch-peptides », permettant une meilleure reconnaissance de l'amyloïde avant la formation du coude : en jaune, l'amyloïde β ; en bleu foncé, la séquence de reconnaissance ; en bleu clair, les interactions possibles entre l'inhibiteur potentiel et l'amyloïde ; en vert, l'unité d'induction σ.

II. Un peptide cyclique comme inhibiteur potentiel de l'agrégation fibrillaire

La cyclisation de peptides est une stratégie très souvent utilisée pour diminuer la flexibilité conformationnelle d'une molécule et augmenter sa stabilité ainsi que son efficacité, sa sélectivité, sa biodisponibilité et sa perméabilité à travers les membranes biologiques^{255, 256, 257, 258}.

En 2003, M. Mutter et C. Soto prirent en considération l'utilisation de peptides cycliques en tant qu'inhibiteurs de la fibrillogenèse de l'amyloïde β. Ils élaborèrent une nouvelle molécule, dont la structure se basait sur celle de l'inhibiteur Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂. Une cystéine avait été ajoutée

à chaque extrémité du peptide linéaire afin de permettre la cyclisation du composé par formation d'un pont disulfure intramoléculaire²⁴⁸. Malheureusement, la cyclo(Cys-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-Cys) se montra beaucoup moins efficace que l'inhibiteur de référence Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂. Différentes hypothèses furent évoquées pour expliquer ce résultat : présence d'une liaison disulfure, cycle à 7 résidus peut-être moins favorable à la stabilisation d'un coude β , voire structure trop rigide, comme ce fut le cas de la pseudo-proline cis^{248, 249}. Cependant, il n'y eut aucune certitude quant à la raison réelle de cette diminution d'activité.

Afin de confirmer ou réfuter ces théories, nous avons décidé de synthétiser une nouvelle molécule cyclique, dont la structure resterait basée sur les séquences de reconnaissance Lys-Leu et Phe-Phe (Figure 60). La cyclo(Lys-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu) fut ainsi élaborée dans cette optique. Uniquement composée de liaisons amides afin d'accroître la stabilité chimique et enzymatique du produit par rapport à son analogue linéaire ou cyclisé par un pont disulfure, cette molécule comporte une proline qui favorise la cyclisation²⁵⁹ et 6 résidus²⁶⁰ au lieu des 7 précédents.

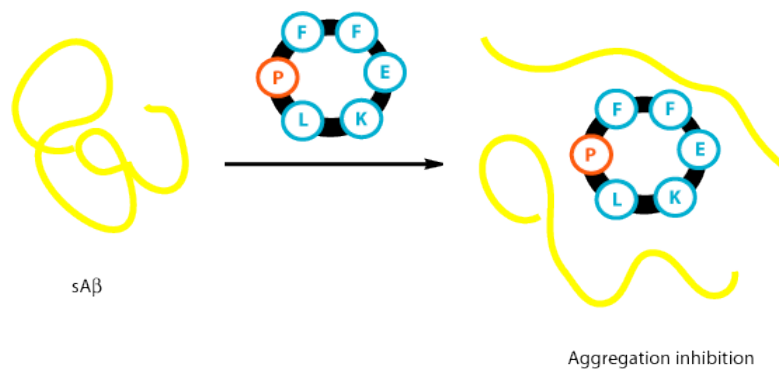


Figure 60 : Principe de l'inhibition de la fibrillogenèse de l'amyloïde β par un peptide cyclique : la cyclo(Lys-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu), mélangée au peptide amyloïde soluble (sA β), se lie à lui grâce à ses séquences de reconnaissance Lys-Leu et Phe-Phe-Glu (en bleu), mais de part son encombrement stérique, elle empêche l'agrégation du peptide pathogène.

La conservation des séquences Lys-Leu et Phe-Phe devrait permettre à notre nouvelle molécule cyclique d'interagir spécifiquement avec les résidus lysine 16, leucine 17 et phénylalanines 19 et 20 de l'amyloïde β , d'une façon similaire à celle de l'inhibiteur l'Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (Figure 61). Nous espérons ainsi que l'agencement des éléments de reconnaissance de notre inhibiteur potentiel et son encombrement stérique seront tels qu'ils destabiliseront complètement l'organisation en feuillets β du peptide pathogène, induisant un arrêt total de sa fibrillogenèse.

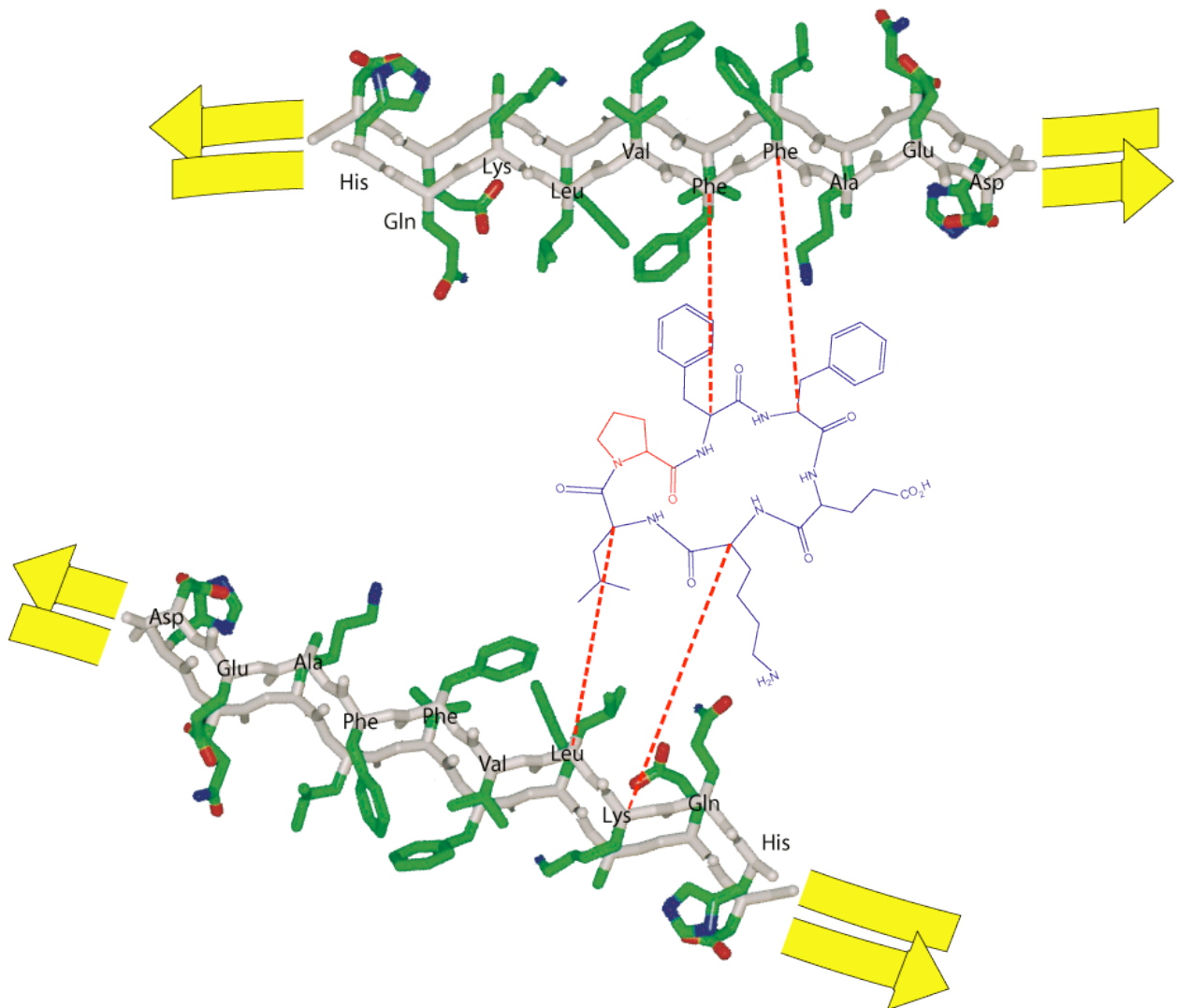


Figure 61 : Représentation schématique des interactions envisagées entre le peptide cyclique *cyclo(Lys-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu)* et un dimère de l' $A\beta(14-23)^{223}$: les deux phénylalanines de l'inhibiteur potentiel devraient se lier aux phénylalanines 19 et 20 du peptide pathogène ; l'encombrement stérique du peptide cyclique devrait alors empêcher la propagation de l'agrégation ; les pointillés rouges symbolisent les interactions existant entre les deux résidus désignés par l'extrémité des traits au niveau de leur C_{α}

La cyclisation de peptide présente encore un autre avantage. Elle permet, dans certains cas, de stabiliser une structure en forme de coude. L'étude du tableau de classification des coudes (Tableau 3, Chapitre 1 de cette partie) établit en effet qu'une proline de conformation *cis* peut être impliquée dans un coude β de type VI lorsqu'elle se trouve en position 3 (ou $i+2$)^{76, 261}. Cependant, le modèle de Chou montre que les probabilités de formation d'un coude β sont relativement faibles lorsqu'une proline est suivie d'une phénylalanine ou que deux phénylalanines sont consécutives²⁶². La synthèse de ce composé nous permettra ainsi de vérifier l'exactitude de ces considérations et d'évaluer son potentiel en tant qu'inhibiteur de l'amyloïdogénèse de l'amyloïde β .

Le peptide cyclique est synthétisé en trois étapes : synthèse du peptide linéaire correspondant, avec conservation des groupes protecteurs des chaînes latérales mais suppression de ceux des fonctions C et N-terminales ; cyclisation ; déprotection totale du peptide (Figure 62).

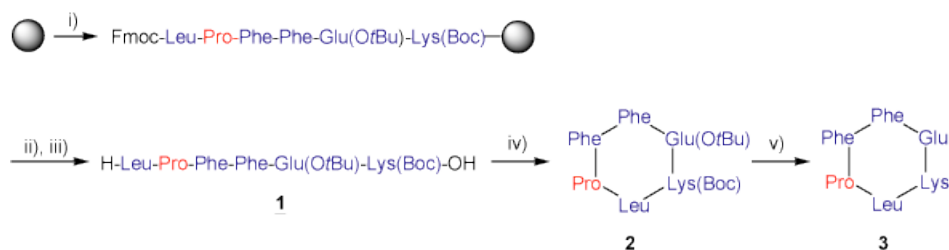


Figure 62 : Synthèse de la cyclo(Lys-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu) (**3**): i) SPPS suivant la stratégie Fmoc/tBu, sur une résine chlorure de 2-chlorotriptyle ; ii) déprotection du Fmoc : 20 % pipéridine/DMF (5 x 2min, r.t.) ; iii) clivage de la résine : AcOH/TFE/DCM (1 : 1 : 8 ; 2 x 2h, r.t.), RP-HPLC préparative C₁₈ (30 à 60 % B en 30 min) ; iii) cyclisation : concentration peptidique à 10⁻⁴M, HATU (3 eq.), sym-collidine (12 eq.), DMF (214 eq.), DCM anhydre, 1h d'addition du peptide sur le réactif, 2h15 d'agitation, r.t. ; iv) déprotection des chaînes latérales du peptide : TFA/TIS/H₂O (95 : 2.5 : 2.5, v/v/v, 40 min, r.t.), RP-HPLC semi-préparative C₁₈ (0 à 100 % B en 30 min) ; rendement total : 50 % ; séquence de reconnaissance en bleu, et élément de destruction des feuillettes β en rouge.

Avant de définir la séquence de notre peptide linéaire, nous avons considéré qu'il fallait minimiser l'influence de l'encombrement stérique des chaînes latérales au cours de l'étape de cyclisation. Nous avons ainsi décidé qu'il serait plus judicieux de construire, dans un premier temps, le peptide H-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu(OtBu)-Lys(Boc)-OH (**1**), puis de cycliser la molécule entre la leucine et la lysine.

La synthèse du peptide linéaire **1** se fait sur support solide. Le choix de la résine est crucial, dans la mesure où nous souhaitons d'une part conserver les protections des chaînes latérales après le clivage du peptide de la résine et d'autre part avoir une fonction C-terminale libre. La résine chlorure de 2-chlorotriptyle permet le relargage d'un acide carboxylique après traitement avec une solution de 10 % d'acide acétique et de 10 % de 2,2,2-trifluoroéthanol dans le dichlorométhane, au cours duquel les esters *tert*-butyliques et les groupements Boc restent stables.

L'addition de 15 volumes de n-hexane au moment de la concentration, sous pression réduite, de la solution de peptide clivé permet d'éliminer l'acide acétique et d'éviter le clivage des groupements protecteurs. Grâce à cette procédure, le peptide H-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu(OtBu)-Lys(Boc)-OH (**1**) est obtenu avec un bon rendement et une pureté estimée à 91 % par RP-HPLC analytique sur colonne C₁₈ avant purification par RP-HPLC préparative sur colonne C₁₈ (Figure 63a).

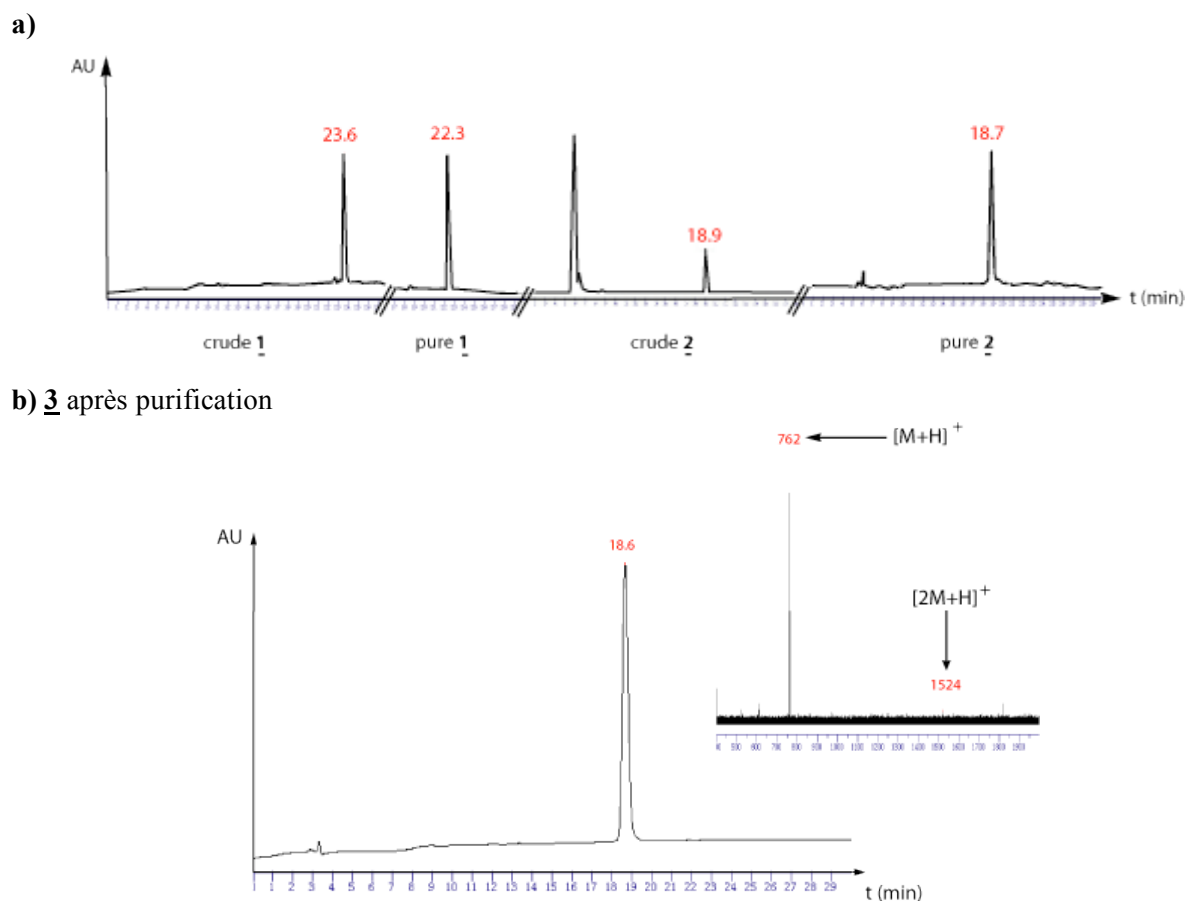


Figure 63 : a) Suivi par RP-HPLC analytique C_{18} de la synthèse de la cyclo(Lys-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu) (3) : synthèse du peptide linéaire 1, avant et après purification ; cyclisation (2) avant et après purification ; b) données analytiques du peptide cyclique 3 : RP-HPLC C_{18} (0 to 100 % B in 30 min) et ESI-MS ($[M+H]^+ = 762$; $[2M+H]^+ = 1524$).

La cyclisation du peptide 1 est réalisée en milieu fortement dilué, de façon à favoriser le couplage intramoléculaire plutôt que la dimérisation du peptide. Une concentration peptidique de 10^{-4} M dans le dichlorométhane anhydre et une addition lente du peptide sur le réactif de couplage HATU et la symcollidine permet d'éviter cette réaction secondaire. Les chaînes latérales de la lysine et de l'acide glutamique sont ensuite déprotégées grâce à une solution d'acide trifluoroacétique, de triisopropylsilane et d'eau (95 : 2.5 : 2.5, v/v/v), pour donner, après purification, le peptide désiré 3 (Figure 63b).

La structure de la cyclo(Lys-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu) (3) est étudiée par RMN 2D, afin de déterminer, grâce à une interprétation croisée de plusieurs expériences de RMN 2D, sous quelle forme, cis ou trans, se trouve la liaison amide Leu-Pro (Figure 64a).

L'expérience COSY (J-Correlated Spectroscopy), correspondant aux connections bleu et cyan, met en évidence les couplages entre hydrogènes géminaux et hydrogènes portés par des carbones voisins. Cela concerne donc les couplages 2J et 3J , J définissant la constante de couplage, exprimée en hertz (Hz), et le

chiffre qui le précède déterminant le nombre de liaisons entre les deux hydrogènes. Cette expérience montre ainsi le couplage existant entre le NH de la liaison amide et le H α .

L'expérience TOCSY (Total Correlation Spectroscopy), exprimée par des connections vertes et jaunes, montre des couplages plus lointains, l'intensité des taches diminuant avec le nombre de liaisons entre les hydrogènes. Il existe ainsi, pour les atomes voisins, une superposition des marques avec celles du COSY.

Enfin, l'expérience ROESY (Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy), en magenta et jaune, correspond aux couplages dans l'espace, entre atomes situés à moins de 5 Å les uns des autres. Elle permet ainsi de déterminer la configuration cis ou trans d'une liaison amide : si la liaison est cis, il existe un couplage entre $iH\alpha$ et $(i+1)H\alpha$, si elle est trans, il y a une connection entre $(i+1)NH$ et $iH\alpha$ (Figure 64b).

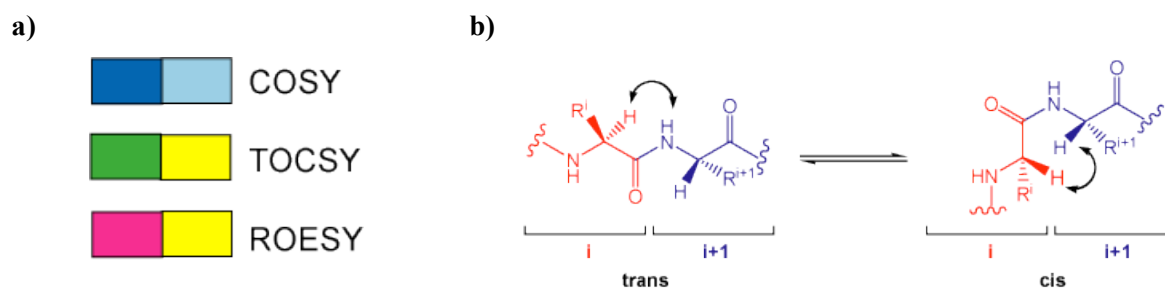
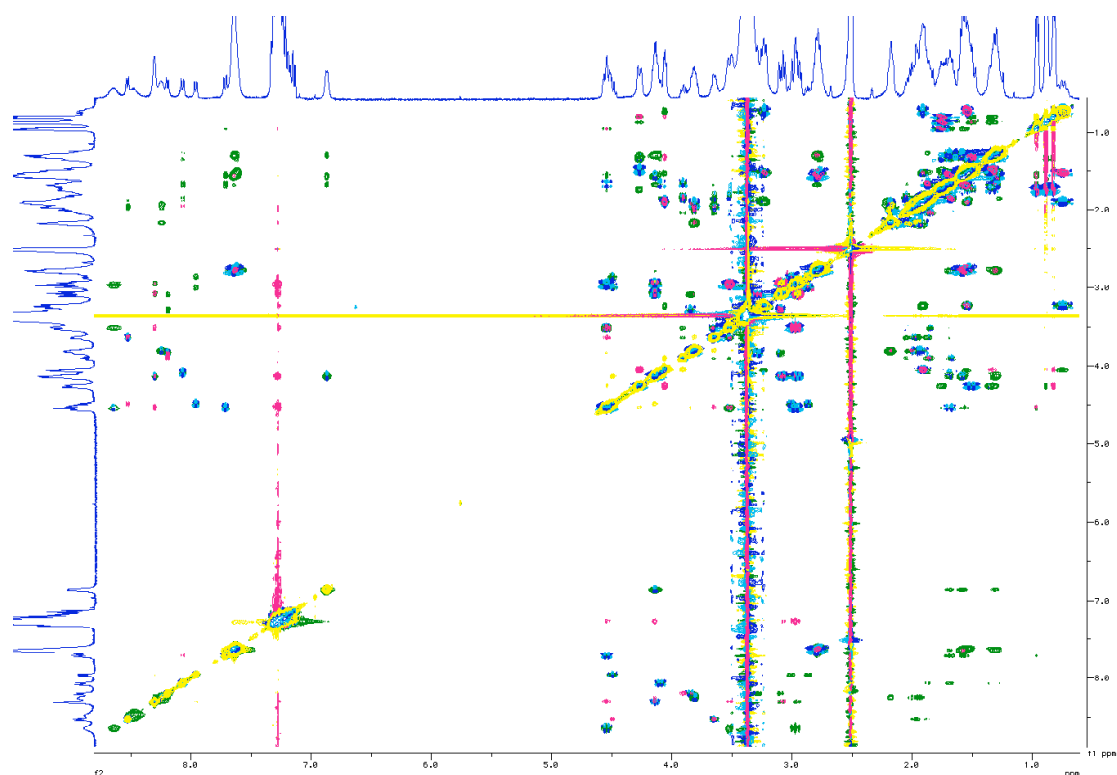


Figure 64 : a) Code de couleurs pour la RMN 2D ; b) différence entre une liaison amide trans et une liaison amide cis : la configuration trans est caractérisée par un couplage en ROESY $(i+1)NH-iH\alpha$, tandis que la configuration cis l'est par un couplage en ROESY $iH\alpha-(i+1)H\alpha$.

Le chloroforme ne permettant d'interpréter le spectre de façon convenable, le choix du solvant se porte sur le DMSO d_6 (Figure 65a). L'étude du spectre RMN révèle que la molécule **3** se présente dans un mélange de deux conformations. Toutes les liaisons amides sont trans, excepté celle entre la leucine et la proline, à la fois cis et trans. En effet, nous observons à la fois un couplage ROESY entre les protons $2H\alpha$ et $3H\alpha$, caractéristique d'une liaison cis (cercle noir, Figure 65b), et un couplage ROESY entre les protons $2'H\alpha$ et $3'H\delta$, indiquant une liaison trans (rectangle noir, Figure 65b). Ce couplage ROESY est directement lié à la présence de la proline.

a)



b)

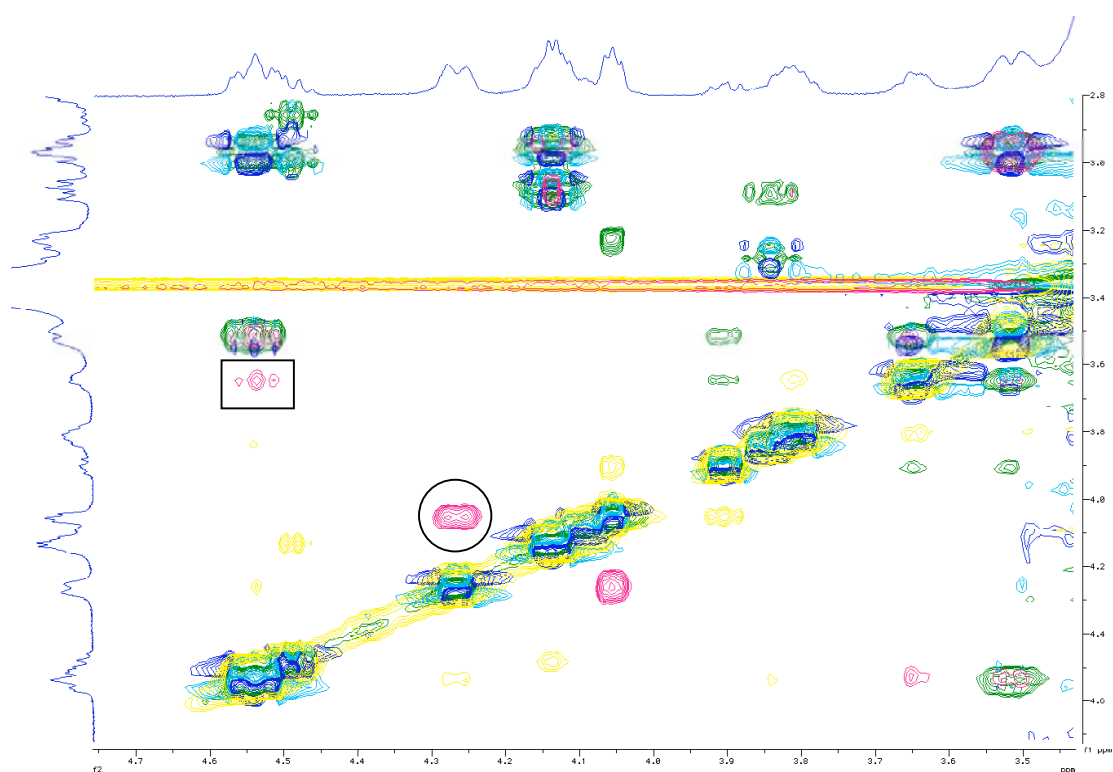


Figure 65 : Spectre RMN 2D ^1H du cyclo(Lys-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu) **3** dans le DMSO d_6 : **a)** vue d'ensemble du spectre RMN ; **b)** agrandissement dans la zone montrant un couplage ROESY entre les protons $2'\text{H}\alpha$ et $3'\text{H}\delta$ (rectangle noir), indiquant une liaison amide Leu-Pro trans, et un couplage ROESY entre le $2\text{H}\alpha$ et le $3\text{H}\alpha$ (cercle noir) indiquant une liaison amide Leu-Pro cis : rapport cis/trans = 3 : 1.

En effet, la détermination de la nature de la liaison amide de la proline se fait grâce à l'étude de l'expérience ROESY et des couplages impliquant le proton $iH\alpha$, ici nommé $2H\alpha$ (Figure 66). Suivant la nature de la configuration de la liaison amide, cet hydrogène se retrouvera plus proche dans l'espace des protons $(i+1)H\delta 1$ et $(i+1)H\delta 2$ (ici $3H\delta 1$ et $3H\delta 2$) ou du proton $(i+1)H\alpha$ (ici $3H\alpha$), la première situation correspondant à la liaison trans, et la seconde à la liaison cis.

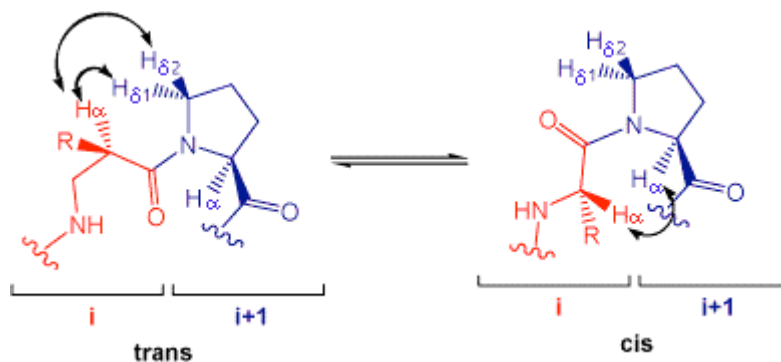


Figure 66 : Différence entre la proline de configuration trans (couplage ROESY entre les protons $(i+1)H\delta 1$ et $iH\alpha$, ainsi qu'entre les protons $(i+1)H\delta 2$ et $iH\alpha$) et la proline de configuration cis (couplage ROESY entre $(i+1)H\alpha$ et $iH\alpha$).

Nous pouvons évaluer la quantité de chaque conformère **3** en faisant le rapport des intégrations des signaux correspondants en RMN 1D 1H . Nous déterminons ainsi que la cyclo(Lys-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu) (**3**) est présente à 25 % avec une liaison amide Leu-Pro trans et à 75 % avec une liaison amide cis. Ce nouvel inhibiteur potentiel de la fibrillogénèse de l'amyloïde β adopte donc majoritairement la forme bioactive cis des inhibiteurs dérivés de l'Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂.

Bien que ce travail de thèse consiste principalement à élaborer de nouvelles molécules à visée thérapeutique, son but ultime réside en l'appréciation, pour chacun de nos produits, de la capacité d'inhibition de la fibrillogénèse de l'amyloïde β . N'ayant, au début de nos recherches, aucun outil de diagnostique simple et rapide à notre disposition au sein du laboratoire, il s'est avéré nécessaire d'utiliser, et donc de mettre au point, une méthode simplifiée permettant d'évaluer, de façon qualitative, l'activité de nos produits et de déterminer les meilleurs candidats qui seraient aptes à subir, par la suite, des tests plus complets grâce à des collaborations avec d'autres laboratoires.

III. Etude d'un modèle peptidique dérivé de l'amyloïde bêta, l'A β (13-23)

L'élaboration d'un test simple permettant d'évaluer l'activité inhibitrice de nos différents mimes peptidiques fait partie intégrante de nos objectifs. L'une des possibilités, rapide et directe, serait de mélanger *in vitro* l'amyloïde β avec l'un de nos inhibiteurs potentiels et de constater si les fibrilles se forment ou non.

L'utilisation de l'A β (1-42) ou de l'A β (1-40) s'avère être plus complexe que ce qu'il n'y paraît. En effet, ces molécules sont difficiles à synthétiser et à isoler en quantité suffisante, ce qui explique entre autres leur prix d'achat : 700 CHF pour 1 mg d'A β (1-42). Ces différents constats sont d'ailleurs à la base de l'introduction de liaisons depsipeptidiques dans ces séquences, de façon à améliorer les rendements de synthèse et de purification, et à développer, en parallèle, des outils de diagnostic d'amyloïdogénèse^{23, 46, 47, 173-174}. Cependant, la mise au point de ces méthodes ne s'est faite que récemment. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à un modèle d'amyloïde β plus simple d'accès et plus facile à manipuler.

Les études de L. O. Tjernberg démontrèrent que l'undécapeptide A β (13-23) était la plus petite séquence naturelle d'amyloïde β capable de former des fibrilles similaires à celles obtenues par l'A β (1-42)²²³ (Figure 67). Ce peptide, relativement court, devrait être beaucoup plus simple à synthétiser que la molécule dont il est issu. Ces deux considérations nous ont ainsi convaincus d'utiliser ce composé comme modèle d'amyloïde pour notre projet d'évaluation de l'inhibition de la fibrillogénèse.

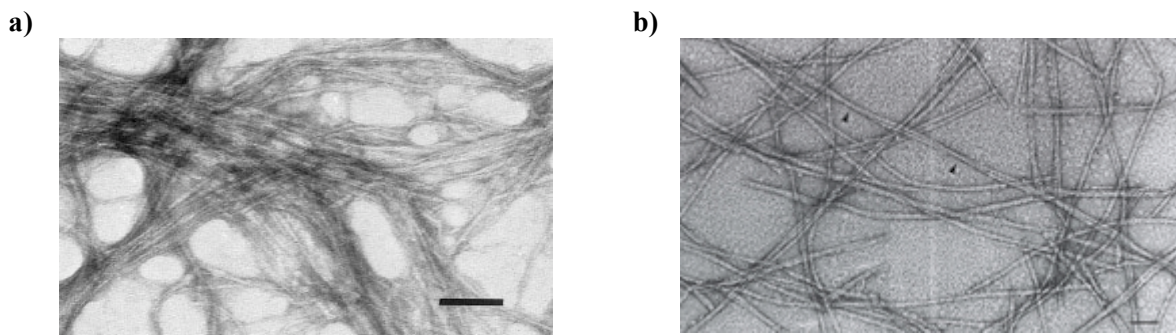


Figure 67 : Microscopie électronique par coloration négative conventionnelle **a)** de l'A β (13-23) après trois jours d'incubation (échelle : 100 nm)²²³ ; **b)** de l'A β (1-42) après 24h d'incubation (échelle : 50 nm)²¹⁵.

Concernant les méthodes de suivi de l'agrégation fibrillaire de notre modèle peptidique, l'A β (13-23), nous avons choisi la microscopie électronique par coloration négative conventionnelle et la coloration au rouge Congo. La coloration à la thioflavine T est une autre technique couramment employée pour quantifier les fibrilles. Cependant, certaines études ayant montré que la thioflavine T pouvait se lier à d'autres molécules que les amyloïdes, il est recommandé de toujours confirmer la nature des agrégats

révélés par cette fluorescence en utilisant d'autres systèmes d'analyse^{214, 223}. C'est la raison pour laquelle nous avons préféré concentrer nos efforts sur les deux premières techniques citées plutôt que sur la coloration à la thioflavine T.

1. Synthèse de peptides de référence

L'Aβ(13-23) est synthétisé sur résine Wang, d'après les procédés standards de la synthèse peptidique sur support solide (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS), suivant la stratégie Fmoc/tBu (Figure 68). La résine Wang a l'avantage de libérer un acide carboxylique C-terminal lors du traitement final, qui permet, par la même occasion, de cliver les groupes protecteurs des chaînes latérales de ce peptide.

Après purification par RP-HPLC préparative sur colonne C₁₈, la molécule **4**, obtenue avec un rendement de 22 %, est caractérisée par RP-HPLC analytique et spectroscopie ESI-MS (Figure 69a et b). Une analyse de sa composition en acides aminés permet de vérifier sa nature.

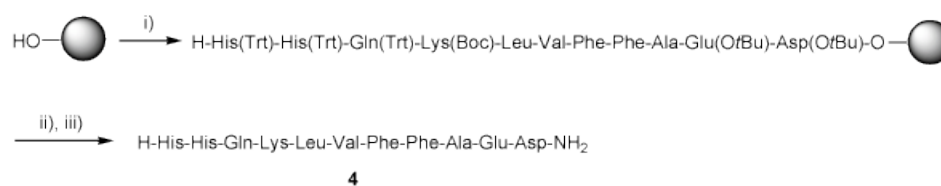


Figure 68 : Synthèse de l'Aβ(13-23) (**4**): i) SPPS sur résine de Wang, en stratégie Fmoc/tBu ; ii) déprotection du Fmoc : 20 % pipéridine/DMF (5 x 2 min, r.t.) ; iii) clivage de la résine et déprotection des chaînes latérales : TFA/TIS/H₂O (95 : 2.5 : 2.5, v/v/v, 1 x 1h puis 1 x 2h, r.t.) ; purification par RP-HPLC préparative sur colonne C₁₈ (0 à 100 % B en 30 min) ; rendement : 22 %.

La structure secondaire du peptide **4** dans l'eau est déterminée par dichroïsme circulaire. Cette méthode nous montre qu'il se replie sous forme de pelote statistique, et non pas sous forme de feuillets β (Figure 69c). Ainsi, cela nous laisse supposer que la transition conformationnelle du peptide **4** est plutôt lente, elle ne se fait en quelques minutes, du moins lorsque la molécule est dissoute dans l'eau avec une concentration de 1.5 10⁻⁴ M. Il est donc fortement probable que la fibrillogenèse de ce produit se révèle donc être un phénomène relativement lent par rapport à celle, très rapide, de l'Aβ(1-42)⁴⁷.

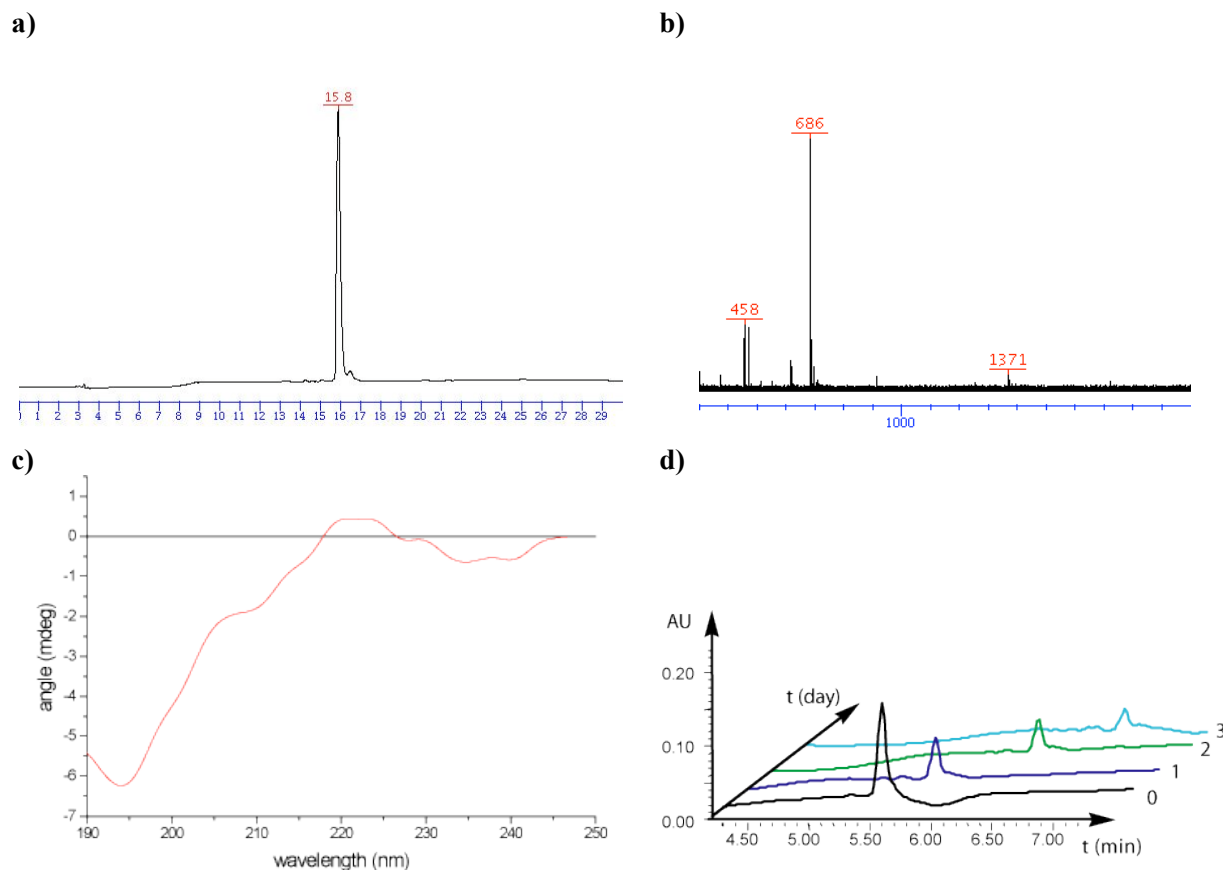


Figure 69 : Caractérisations de l'A β (13-23) (**4**) après purification : **a**) RP-HPLC analytique C₁₈ (gradient : 0 à 100 % B en 30 min ; Rt = 15.8 min) ; **b**) spectre ESI-MS (458 = [M/3+H]⁺ ; 686 = [M/2+H]⁺ ; 1371 = [M+H]⁺) ; **c**) spectre de dichroïsme circulaire du peptide dans l'eau (1.5 10⁻⁴ M) révélant une structure en pelote statistique ; **d**) suivi de l'agrégation fibrillaire par RP-HPLC analytique (gradient : 0 à 100 % B en 10 min).

L'agrégation fibrillaire du peptide **4** est suivie par RP-HPLC analytique (Figure 69d). Une solution de peptide **4** dans un mélange de méthanol, d'eau et de tampon phosphate à pH 7.4 (PBS), incubant à 37°C, est analysée jour après jour sur une période de quatre jours. Cette étude préliminaire nous permet de constater que la fibrillation se fait relativement rapidement au cours du premier jour, puis beaucoup plus lentement. Il semblerait de plus qu'une certaine quantité de peptide reste toujours en solution.

Afin d'évaluer par nous-même la différence entre une fibrille amyloïde et un agrégat amorphe (voir paragraphe suivant), nous avons choisi d'étudier une séquence plus courte d'A β (1-42), l'A β (16-23) (**5**). En effet, d'après la littérature, ce peptide amyloïdogénique formerait un réseau de feuillet β antiparallèles en solution²⁶³, mais ne devrait pas s'agréger sous forme de fibrilles amyloïdes similaires à celles de l'A β (1-42)²²³.

Le peptide **5** est donc synthétisé en phase solide sur résine de Wang, suivant les procédés standards de la SPPS (Figure 70). Après purification par RP-HPLC préparative, le peptide est caractérisé par RP-HPLC analytique et spectroscopie de masse (Figure 71).

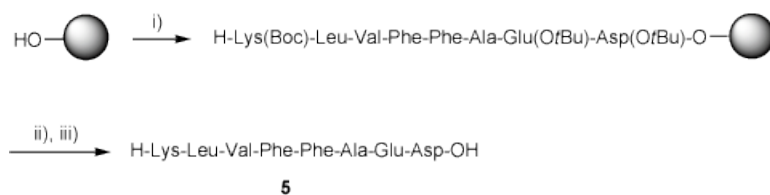


Figure 70 : Synthèse de l'A β (16-23) (**5**) : i) SPPS sur résine de Wang; ii) déprotection de l'amine N-terminale : 20 % pipéridine/DMF (5 x 2 min, r.t.) ; iii) clivage de la résine : TFA/TIS/H₂O (95 : 2.5 : 2.5, v/v/v, 2h, r.t.) ; purification par RP-HPLC préparative (10 à 20 % B en 5 min puis 20 à 50 % B en 30 min) ; rendement : 20 %.

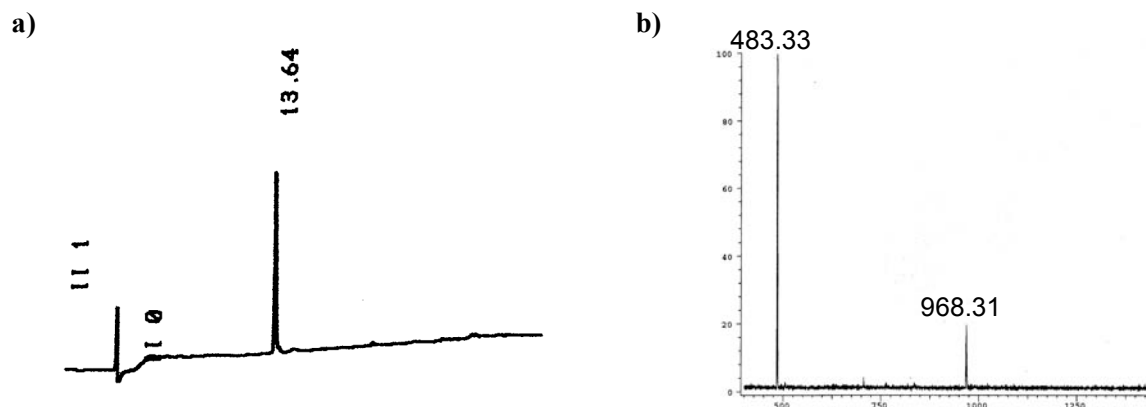


Figure 71 : Caractérisation de l'A β (16-23) (**5**) après purification: **a**) RP-HPLC analytique sur colonne C₁₈ (gradient : 5 à 100 % B en 10 min ; Rt = 13.64 min) et **b**) spectre ESI-MS (483.33 = [M/2+H]⁺; 968.31 = [M+H]⁺).

La structure secondaire adoptée par la molécule **5** est étudiée en solution par dichroïsme circulaire et à l'état solide par spectroscopie infrarouge avec pastille de KBr (Figure 72).

Lorsque le peptide est dissout dans une solution aqueuse à pH 7 avec une concentration, très faible, de 5 10⁻⁸ M, il adopte une structure non définie, ainsi que le montre le spectre obtenu par dichroïsme circulaire (Figure 72a).

Par contre, lorsqu'il se trouve sous forme de lyophilisat, l'A β (16-23) adopte une structure en feuillet plissé, avec une bande d'amide I caractéristique à 1626.6 cm⁻¹ en infrarouge⁸⁵ (Figure 72b).

Nous pouvons ainsi nous attendre à rencontrer avec ce peptide **5** des problèmes de solubilité et de précipitation hors de la solution aqueuse choisie. Il est donc fortement probable que cette molécule s'agrègera sous forme de solide amorphe, sans qu'elle ne soit toutefois capable de former des structures organisées de type fibrillaire.

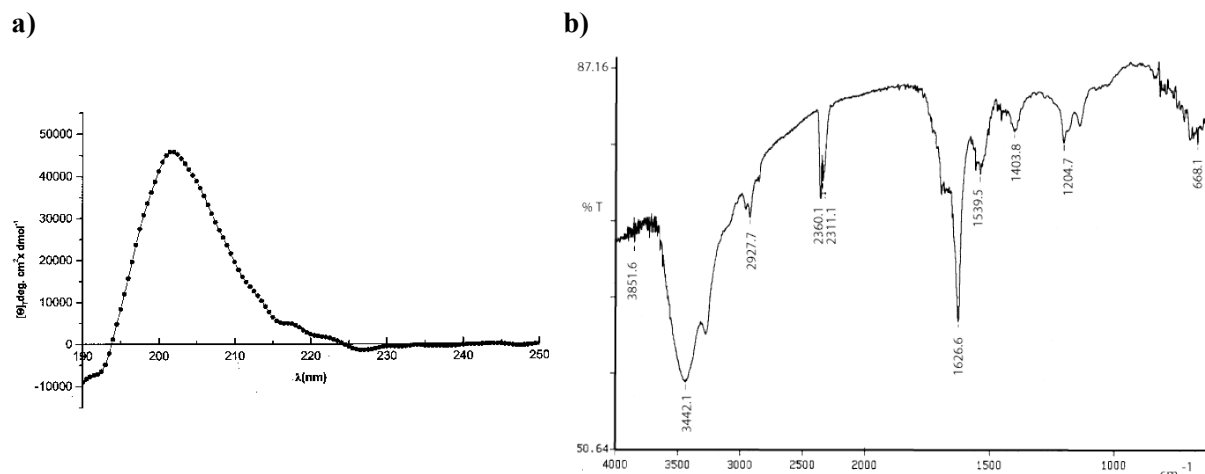


Figure 72 : Analyse de la structure secondaire de l'Aβ(16-23) (**5**) : **a**) spectre de dichroïsme circulaire ($5 \cdot 10^{-8}$ M dans le PBS à pH 7.06) montrant une structure non déterminée ; **b**) spectre infrarouge de l'état solide, avec pastille de KBr ; bande de l'amide I à 1626.6 cm^{-1} , caractéristique d'un feuillet β.

Nous avons ensuite jugé qu'il nous serait utile d'avoir une référence d'inhibiteur d'amyloïdogenèse afin de déterminer quels seraient, parmi les molécules que nous aurons obtenues, les candidats les plus prometteurs. L'Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂, décrit par C. Soto comme étant un inhibiteur puissant de la formation des fibrilles d'amyloïde β, nous a semblé être un bon choix^{247, 248}.

Nous avons donc décidé de synthétiser ce peptide (**6**) en phase solide, sur une résine Rink Amide MBHA qui libère, après clivage, une fonction N-terminale de type amide (Figure 73). Après purification, le peptide désiré est obtenu avec un rendement de 55 %. Il est caractérisé par RP-HPLC analytique et spectroscopie de masse (Figure 74).

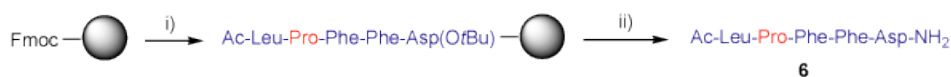


Figure 73 : Synthèse du peptide Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**6**): i) SPPS sur résine Rink Amide MBHA ; ii) clivage de la résine et déprotection de la chaîne latérale de l'acide aspartique : TFA/TIS/H₂O (95 : 2.5 : 2.5, v/v/v, 2h, r.t.) ; purification par RP-HPLC préparative sur colonne C₁₈ (20 à 50 % B en 30 min) ; rendement : 55 %.

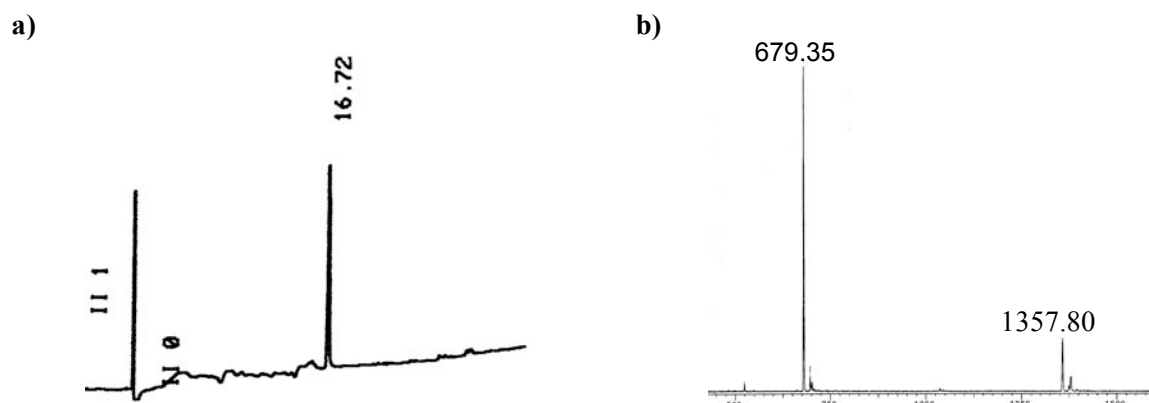


Figure 74 : Caractérisation de l'Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**6**) après purification: **a)** RP-HPLC analytique sur colonne C₁₈ (gradient : 5 à 100 % B en 30 min ; Rt = 16.72 min) et **b)** spectre ESI-MS (679.35 = [M+H]⁺; 1357.80 = [2M+H]⁺).

Le peptide **6** est étudié par RMN 2D ¹H dans le DMSO d₆. Nous observons alors que la molécule n'adopte, dans ce solvant, qu'une seule conformation (Figure 75).



Figure 75 : RMN 2D ¹H de l'inhibiteur Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ dans le DMSO d₆.

L'étude de la zone de couplage entre les protons NH et H α (Ha sur le spectre) nous permet de déterminer le déplacement chimique de chaque proton H α et d'attribuer les NH de chaque acide aminé, exception

faite pour la proline, qui, liée ici à la leucine, ne possède pas de proton sur son azote pouvant être couplée avec 1Ha (Figure 76a et b).

Nous voyons dans cette région des couplages caractéristiques en ROESY, entre 5NH et 4H α , 4NH et 3H α , 3NH et 2H α , qui nous montrent que les liaisons amide correspondantes, à savoir d'une façon respective Phe⁴-Asp⁵, Phe³-Phe⁴ et Pro²-Phe³, sont de configuration trans (Figure 76).

La proline reste un cas particulier (Figure 77a). Nous observons ici l'existence de couplages ROESY entre 1H α et 2H δ 1/2H δ 2 (Figure 77b). Toutes les liaisons amide du peptide Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**6**) sont donc trans dans le DMSO à 30 °C.

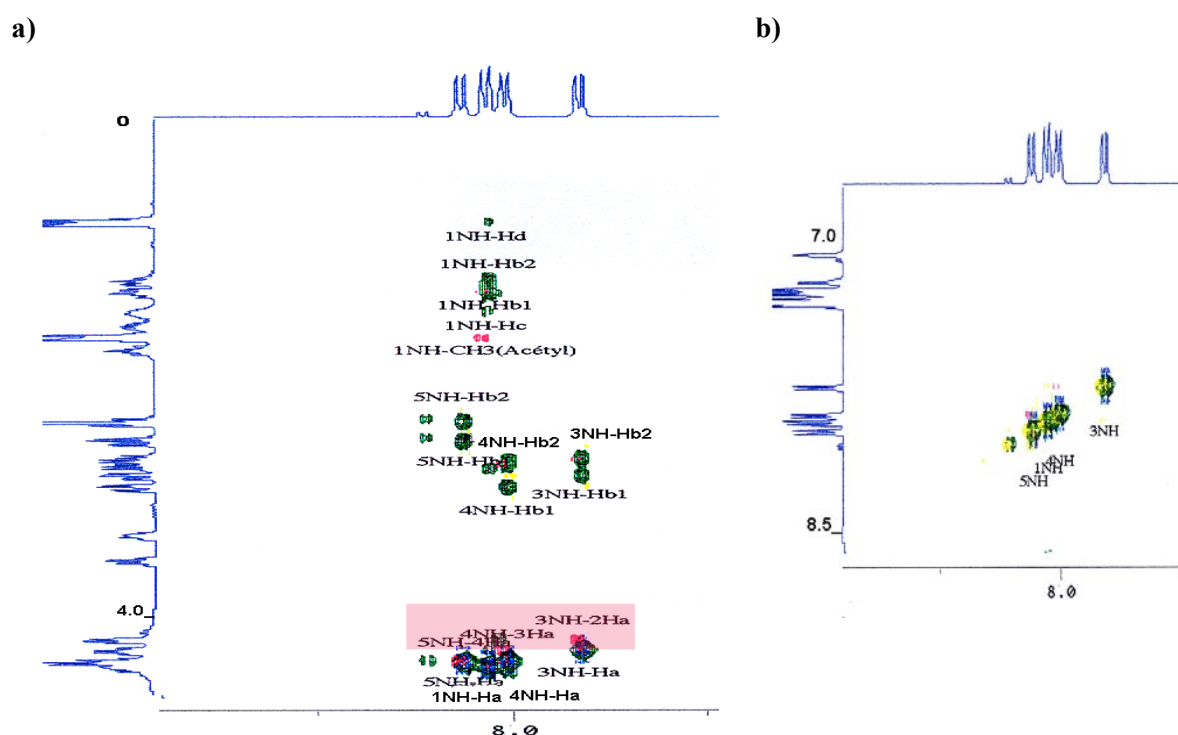


Figure 76 : a) Spectre RMN 2D dans la zone de couplage des NH-Ha : dans la partie rouge, les couplages 5NH-4H α , 4NH-3H α et 3NH-2H α , caractéristiques des liaisons amide, respectivement Phe⁴-Asp⁵, Phe³-Phe⁴ et Pro²-Phe³, de configuration trans ; b) zone des NH : détermination des 4 NH de la molécule **6** (1NH = Leu¹ ; 3NH = Phe³ ; 4NH = Phe⁴ ; 5NH = Asp⁵).

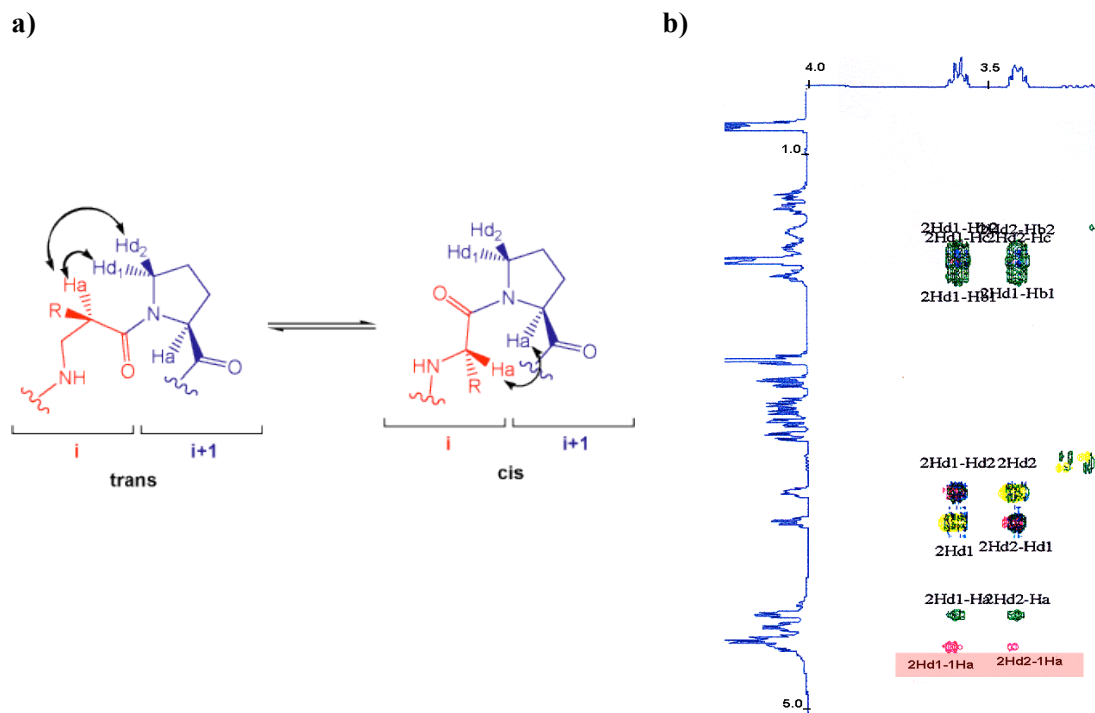


Figure 77 : **a)** Différence de nature des couplages en ROESY entre la proline de configuration *trans* (couplage $(i+1)H\delta 1-iH\alpha$ et $(i+1)H\delta 2-iH\alpha$) et la proline de conformation *cis* (couplage $(i+1)H\alpha-iH\alpha$) ; **b)** détermination de la configuration de la proline présente dans la molécule **6** : couplages en ROESY $2H\delta 1-1H\alpha$ et $2H\delta 2-1H\alpha$ (zone rouge), caractéristiques d'une liaison amide Leu^1-Pro^2 *trans*.

Cette analyse structurale nous a ainsi permis de vérifier la séquence de l'inhibiteur Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**6**) qui va nous servir de référence. Nous avons aussi déterminé que toutes les liaisons amide de la molécule étaient de configuration *trans* dans le DMSO.

Les données de la littérature nous ayant montré que les inhibiteurs de la fibrillogenèse de l'amyloïde β , dont la structure était basée sur celle du peptide **6**, étaient bioactifs lorsque leur liaison amide Xaa- Ψ Pro était *cis*, mais que l'efficacité du produit **6** résidait en l'isomérisation *cis-trans* de la proline, nous aurions pu nous attendre à observer, par RMN, un mélange des deux formes *cis* et *trans* de la liaison amide impliquant la proline.

Cependant, bien que le DMSO soit un solvant polaire proche de l'eau, nous ne pouvons pas pour autant établir avec certitude une analogie directe entre lui et l'eau et en déduire que la molécule **6** adopterait, en phase aqueuse et surtout en présence d'amyloïde β , la même conformation tout *trans*. En effet, nous devons considérer l'influence probable du réseau des liaisons hydrogène présentes dans les feuilletts β de l'amyloïde sur la conformation adoptée alors par le peptide **6**. Le doute subsiste donc quant à la nature, *cis* ou *trans*, de la liaison amide Leu^1-Pro^2 du composé **6** en milieu physiologique et en présence du peptide pathogène.

Afin de pouvoir évaluer, expérimentalement, l'efficacité de la proline comme élément perturbateur de feuillets β , nous avons synthétisé l'analogue de la molécule **6**, Ac-Leu-Val-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**7**), qui se rapproche plus de la séquence naturelle de l'A β (1-42).

Nous avons envisagé deux types de comportement pour ce composé : il pourrait éventuellement contribuer à la formation des feuillets β d'A β (1-42), ou, plus vraisemblablement, la perturber de la même façon que le peptide H-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-OH décrit par L. O. Tjernberg²³⁴ (Figure 78). Cependant, même s'il agit comme un inhibiteur de fibrillogenèse, il est probable qu'il sera moins efficace que l'Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ dans la mesure où il ne combine pas la séquence de reconnaissance amyloïde à l'effet perturbateur de feuillets β de la proline.

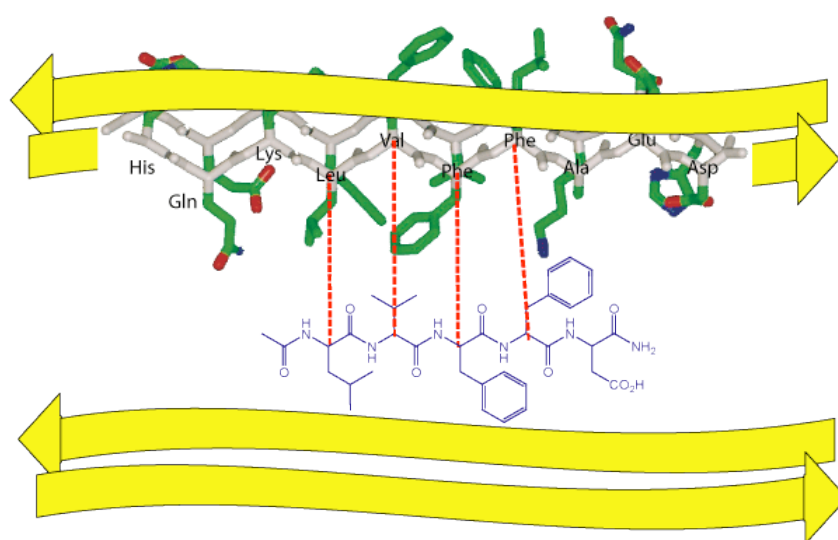


Figure 78 : Représentation schématique des interactions (pointillés rouges) pouvant exister entre le peptide **7** (Ac-Leu-Val-Phe-Phe-Asp-NH₂) et des dimères d'A β (14-23)²²³, basée sur celle de l'inhibiteur Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**6**) : l'absence de l'élément destructeur Pro devrait soit favoriser la propagation de l'agrégation, soit l'inhiber mais moins efficacement de la molécule **6** ; les pointillés rouges symbolisent les interactions existant entre les deux résidus désignés par l'extrémité des traits au niveau de leur C α .

Ac-Leu-Val-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**7**) est synthétisé en phase solide sur une résine Rink Amide MBHA, en suivant les conditions standard de la SPPS (Figure 79). Après purification par RP-HPLC préparative, le peptide est caractérisé par RP-HPLC analytique et spectroscopie de masse (Figure 80).

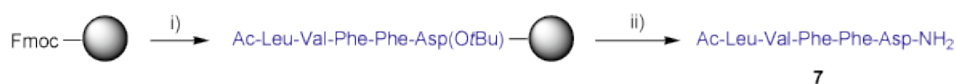


Figure 79 : Synthèse de l'Ac-LVFFD-NH₂ (**7**): i) SPPS en stratégie Fmoc/tBu sur résine Rink Amide MBHA ; ii) clivage de la résine et déprotection de la chaîne latérale de l'acide aspartique : TFA/TIS/H₂O (95 : 2.5 : 2.5, v/v/v, 2h, r.t.); purification par RP-HPLC préparative sur colonne C₁₈ (10 à 20 % B en 5 min, puis 20 à 50 % B en 30 min) ; rendement : 11 %.

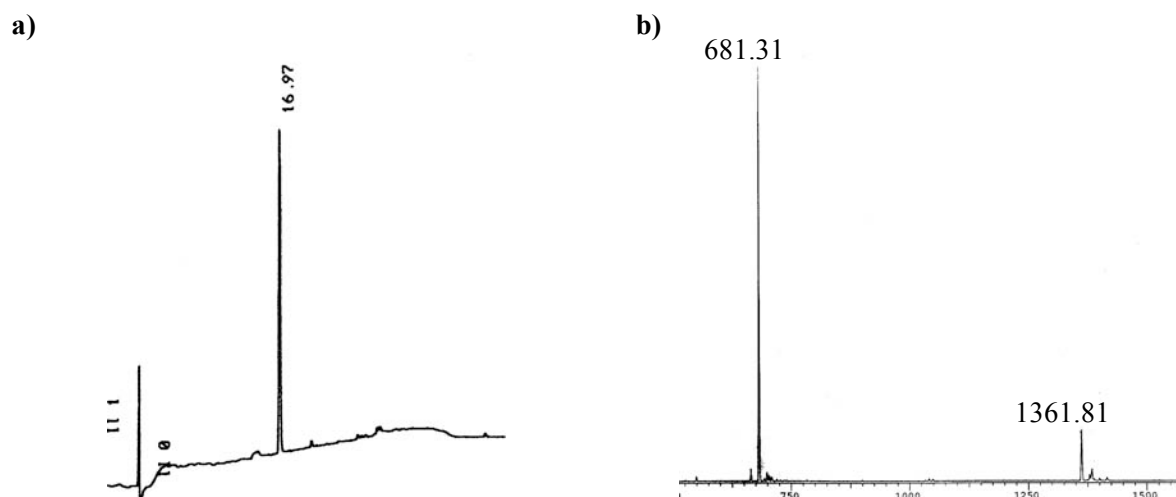


Figure 80 : Caractérisation de l'Ac-Leu-Val-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**Z**) après purification : **a**) RP-HPLC analytique sur colonne C₁₈ (gradient : 5 à 100 % B en 30 min ; Rt = 16.97 min) et **b**) spectre ESI-MS (681.31 = [M+H]⁺ ; 1361.81 = [2M+H]⁺).

La structure secondaire adoptée par le peptide **Z** est étudiée en solution aqueuse par dichroïsme circulaire et à l'état solide par spectroscopie infrarouge avec pastille de KBr (Figure 81). Ces deux méthodes montrent que la molécule **Z** se présente sous forme de pelote statistique, avec notamment une bande amide I caractéristique à 1637 cm⁻¹. Ainsi, malgré la présence de résidus hydrophobes et ayant une forte propension au feuillet β²³⁵, la molécule **Z** est trop petite pour avoir une structure secondaire mieux définie.

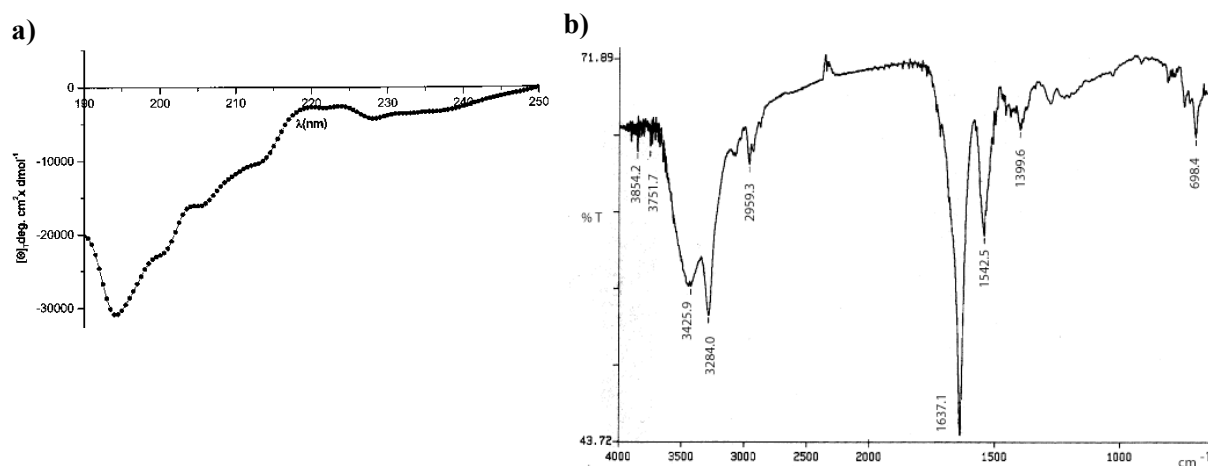


Figure 81 : Analyse de la structure secondaire de l'Ac-Leu-Val-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**Z**) : **a**) spectre de dichroïsme circulaire (8.7 10⁻⁸ M dans le PSB à pH 7.06) révélant une structure en pelote statistique ; **b**) spectre infrarouge à l'état solide avec pastille de KBr : bande amide I à 1637.1 cm⁻¹, caractéristique d'une pelote statistique.

Le peptide **Z** est étudié par RMN 2D dans le DMSO d₆, ce qui nous permet de déterminer que toutes les liaisons amides de la molécule sont trans.

Maintenant que nous avons synthétisé notre peptide amyloïde de référence, l'Aβ(13-23) (**4**), une séquence dérivée ne formant pas de fibrilles, l'Aβ(16-23) (**5**), un inhibiteur puissant de la fibrillogenèse, l'Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**6**) et une molécule analogue, l'Ac-Leu-Val-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**7**), ne bloquant certainement que peu, voire pas, la fibrillogenèse de l'amyloïde β, nous avons à notre disposition tous les outils moléculaires nécessaires à l'étude de l'amyloïdogenèse du composé **4** ainsi que de son inhibition.

2. Etude des peptides de référence par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle

Dans un premier temps, nous allons étudier la fibrillogenèse du peptide Aβ(13-23) **4**, et préparer différentes solutions aqueuses de cette molécule, afin de déterminer quelles sont les meilleures conditions d'observation de ces fibrilles par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (Tableau 6). Les cinq échantillons de peptide **4** diffèrent de part la nature de la solution tampon utilisée, de la concentration peptidique et de la filtration ou non de la solution avant incubation.

Les échantillons sont analysés par M. Adrian, du Laboratoire d'Analyse Structurale de l'Université de Lausanne. Après incubation à température ambiante, les spécimens sont examinés par l'intermédiaire d'un microscope électronique relié à un appareil photographique numérique.

Echantillon	Solution tampon	Concentration peptidique	Filtration
1 (4S1)	0.1 M TRIS.HCl – 150 mM NaCl, pH = 7.49	200 μM	√
2 (4S2)	0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl, pH = 7.32	219 μM	-
3 (4S3)	0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl, pH = 7.32	219 μM	√
4 (4S4)	0.1 M TRIS.HCl – 150 mM NaCl, pH = 7.49	400 μM	√
5 (4S5)	0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl, pH = 7.32	561 μM	-

Tableau 6 : Conditions utilisées pour préparer les différents échantillons d'Aβ(13-23) (**4**) (√: filtration avant incubation; -: pas de filtration avant incubation).

Dans le premier échantillon **4S1**, la concentration peptidique est la plus faible, avec 200 μM. Nous utilisons un tampon TRIS.HCl à pH 7.49 puis filtrons la solution contenant l'Aβ(13-23) avant de la laisser incuber à température ambiante. Dès le premier jour, nous apercevons en microscopie électronique des structures pseudo-sphériques similaires à celles observées et décrites par C. S. Goldsby²¹⁹ (Figure 43, Chapitre 1 de cette partie) (Figure 82). C'est l'une des premières étapes de la fibrillogenèse de notre peptide amyloïde de référence Aβ(13-23). Ces formes disparaissent ensuite le troisième jour pour être remplacées par de petits agrégats, qui ne ressemblent pas encore à des fibrilles matures. La concentration

peptidique de l'échantillon **4S1**, trop faible, est très certainement responsable de la lenteur de cette amyloïdogénèse.

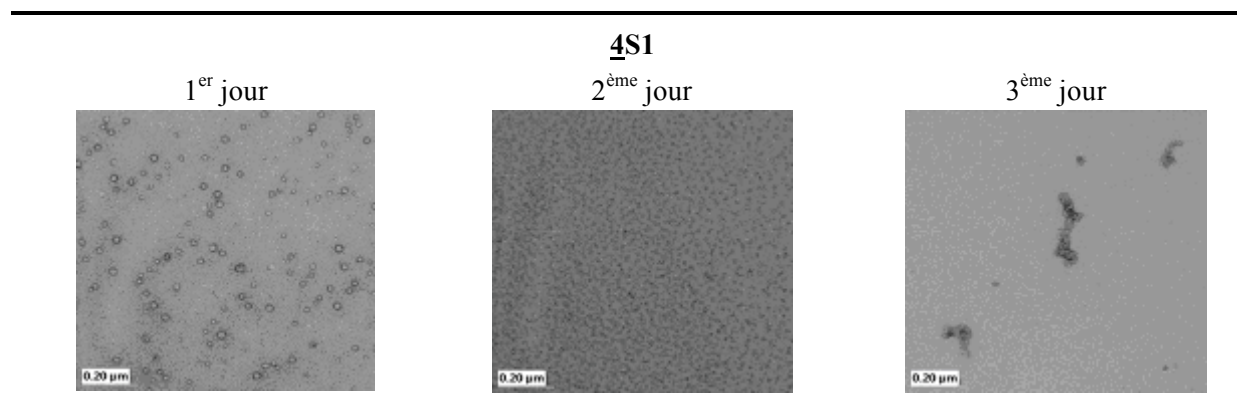


Figure 82 : Agrégation fibrillaire de l'Aβ(13-23) (**4**) présent dans l'échantillon **4S1** ; suivi et observation par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle ; les structures pseudo-sphériques des deux premiers jours d'incubation sont remplacées par de petits agrégats le troisième jour.

La concentration peptidique des échantillons **4S2** et **4S3** est proche de celle de l'échantillon **4S1**, avec 219 μM au lieu des 200 μM précédents (Tableau 6). Ils se différencient par contre de part la nature de la solution tampon utilisée, du sodium potassium phosphate à pH 7.32 pour **4S2** et **4S3**, au lieu du TRIS. HCl à pH 7.49 pour **4S1**. Les échantillons **4S2** et **4S3** se distinguent aussi par l'étape de filtration de la solution peptidique avant incubation, absente dans le premier mais présente dans le second. Nous pourrions ainsi évaluer l'influence de la nature du solvant aqueux et de la filtration sur la fibrillogénèse de notre composé. Les résultats du suivi de l'agrégation des deux spécimens **4S2** et **4S3**, observés par microscopie électronique, sont présentés dans la Figure 83.

Dans l'échantillon **4S2**, non filtré avant l'incubation à température ambiante, nous observons des structures pseudo-sphériques dès le premier jour et ce jusqu'au sixième jour. Dès le début, ces formes cohabitent avec des agrégats, dont l'aspect rappelle plus des aiguilles que des fibrilles. Nous avons toutes les raisons de croire que ces précipités sont amorphes et résultent d'une mauvaise solubilisation du peptide Aβ(13-23) (**4**) au moment de la préparation de l'échantillon. Par contre, au bout de cinq jours, nous commençons à apercevoir quelques fibrilles courtes et flexibles, semblables à celles décrites par C. S. Goldsbury²¹⁹ (Figure 83).

Lorsque le même échantillon est filtré (**4S3**), nous distinguons toujours, sur les micrographes, ces structures pseudo-sphériques, mais aussi, et ce dès le premier jour, un réseau dense de fibrilles courtes et flexibles (Figure 83). L'absence d'aiguilles similaires à celles de l'échantillon **4S2** confirme l'origine de ces agglomérats et démontre la nécessité de l'étape de filtration.

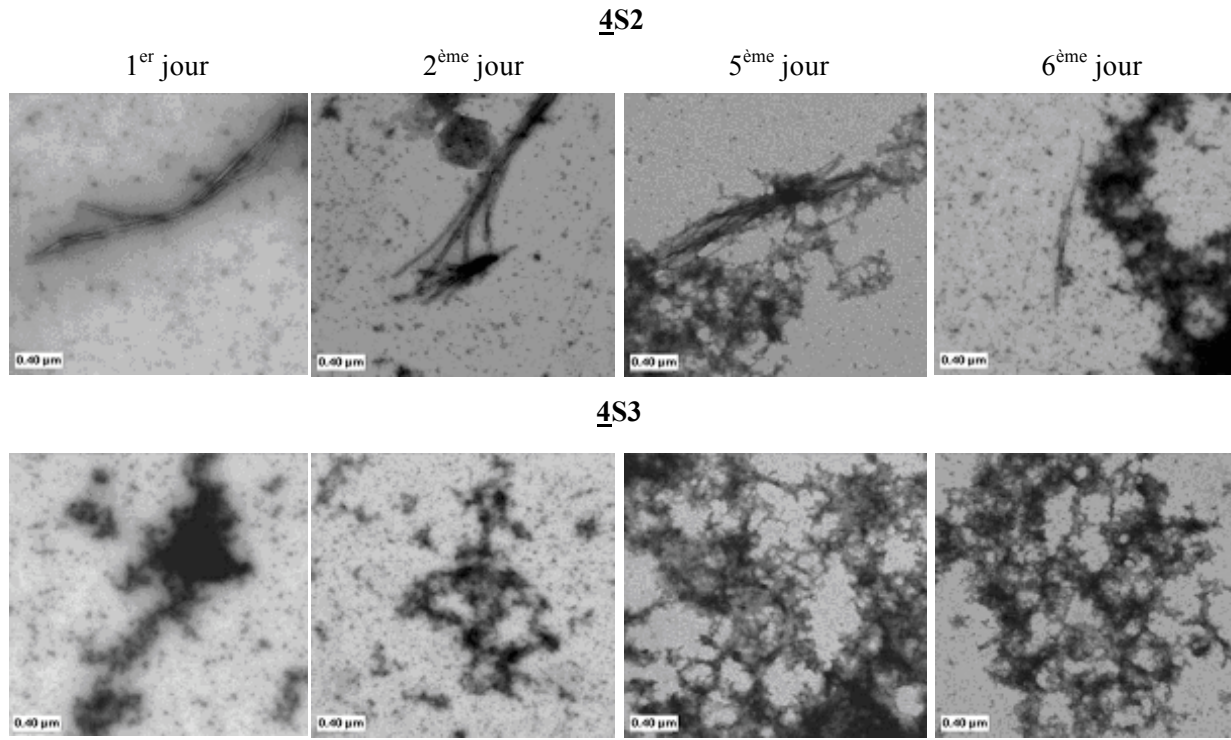


Figure 83 : Agrégation fibrillaire de l'Aβ(13-23) (**4**) présent dans les échantillons **4S2** et **4S3** ; suivi et observation par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle ; **4S2** : structures pseudo-sphériques du 1^{er} au 6^{ème} jour, agrégats amorphes sous forme d'aiguilles, apparition d'un réseau de fibrilles courtes et flexibles dès le 5^{ème} jour ; **4S3** : structures pseudo-sphériques et réseau de fibrilles courtes et flexibles dès le 1^{er} jour, l'absence d'aiguilles similaires à celles observées dans l'échantillon **4S2** montre que ces structures sont dues à la mauvaise solubilisation du composé **4** dans la solution tampon, ce problème étant résolu par la filtration de la solution peptidique avant son incubation.

Maintenant, si nous comparons les échantillons **4S1** et **4S3**, qui se distinguent de part la nature de la solution tampon utilisée, nous voyons que, dans le premier cas, nous n'avons que des structures pseudo-sphériques, tandis que dans le deuxième exemple, nous observons une certaine densité de fibrilles courtes et flexibles, et ce, dès le premier jour. Certes, il existe, entre les deux spécimens, une petite différence au niveau de la concentration peptidique (200 μM pour **4S1**, 219 μM pour **4S3**), mais il est peu probable qu'elle est seule responsable de ces résultats. La nature de la solution tampon pourrait alors influencer l'amyloïdogenèse de l'Aβ(13-23), qui aurait une certaine préférence pour le mélange 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl à pH = 7.32.

La concentration peptidique utilisée jusqu'à présent est cependant trop faible pour que nous puissions détecter la présence de fibrilles matures en moins d'une semaine d'incubation à température ambiante. Nous allons donc voir si ce problème peut être résolu lorsque la concentration peptidique du produit **4** est doublée, comme cela a été le cas pour l'échantillon **4S4**, bien qu'il eut été préparé avec une solution tampon TRIS.HCl à pH 7.49, moins favorable, comme nous venons de le voir, à l'amyloïdogenèse de l'Aβ(13-23) (Tableau 6).

L'échantillon **4S4** a été filtré avant d'être incubé à température ambiante. Au bout d'une journée, nous observons d'étranges formes rondes composées de structures pseudo-sphériques (Figure 84). Le deuxième jour apparaissent quelques amas fibrillaires, le réseau de fibrilles courtes et flexibles persistant après cinq jours d'incubation. Le sixième jour, nous apercevons de très belles structures amyloïdes. Cette concentration peptidique de 400 μM d' $\text{A}\beta(13-23)$ est donc beaucoup mieux adaptée à la méthode de détection de fibrilles amyloïdes qu'est la microscopie électronique par coloration négative conventionnelle.

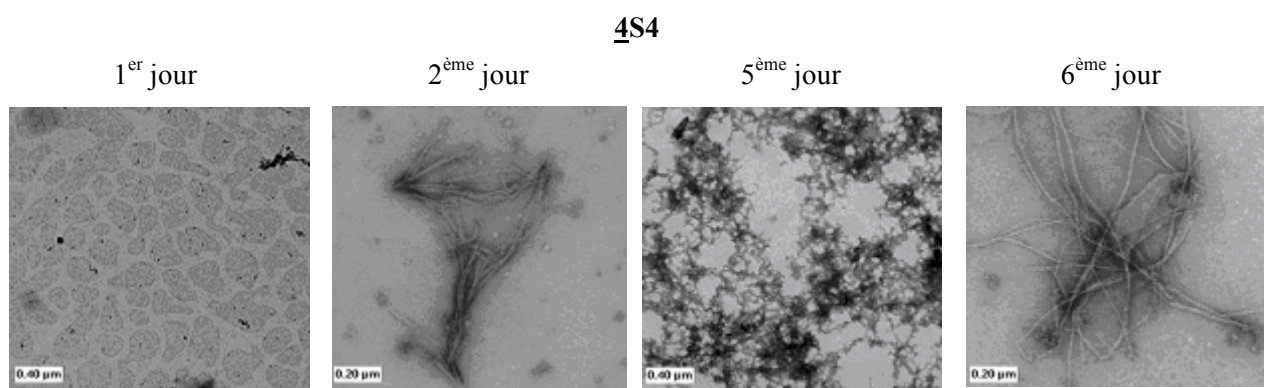


Figure 84 : Agrégation fibrillaire de l' $\text{A}\beta(13-23)$ (**4**) présent dans l'échantillon **4S4** ; suivi et observation par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle ; 1^{er} jour : formes rondes composées de structures pseudo-sphériques ; 2^{ème} jour : apparition de quelques fibrilles ; 5^{ème} jour : le réseau de fibrilles courtes et flexibles demeure, pour disparaître complètement au bout de 6 jours en faveur de fibrilles amyloïdes.

Nous réalisons enfin une dernière expérience de suivi d'amyloïdogenèse avec le peptide **4**. Cette fois, nous solubilisons la molécule dans le tampon 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl à pH = 7.32, de façon à avoir la plus grande concentration peptidique possible, que nous avons déterminé expérimentalement comme étant égale à 561 μM . La solution à étudier n'est pas filtrée avant l'incubation. Au lieu d'être un inconvénient, cela nous permettra de vérifier notre hypothèse concernant la nature des aiguilles observées dans l'échantillon **4S2**. Les résultats de cette étude sont présentés dans la Figure 85.

De très nombreux agrégats sont visibles dès le premier jour. Ils ont la même apparence que ceux présents dans l'échantillon **4S2**, ce qui nous permet de confirmer qu'ils sont dus à une mauvaise solubilisation du peptide amyloïde dans la solution tampon. Néanmoins nous observons, dès le cinquième jour, la formation d'un réseau de fibrilles courtes et flexibles se greffant sur ces précipités amorphes.

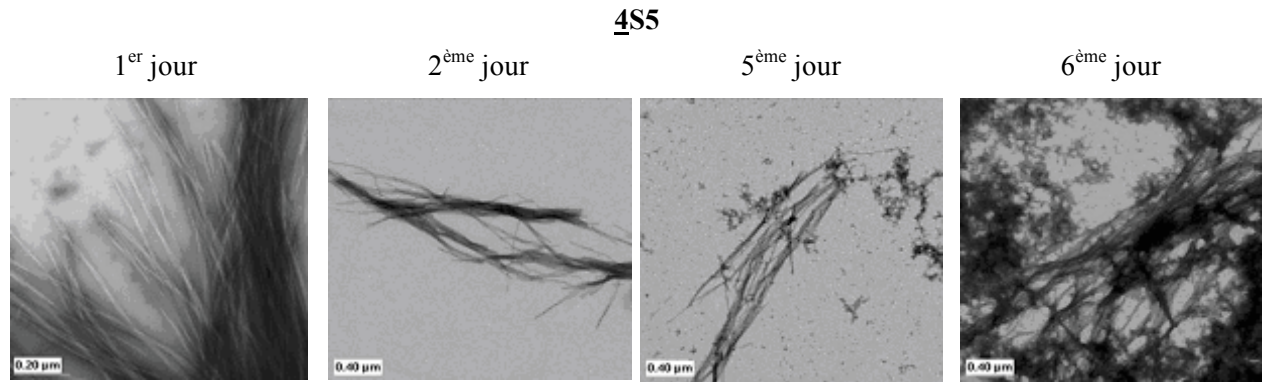


Figure 85 : Agrégation fibrillaire de l'Aβ(13-23) (**4**) présent dans l'échantillon **4S5** ; suivi et observation par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle ; présence d'agrégats amorphes sous formes d'aiguilles, dus à la mauvaise solubilisation du peptide **4** dans la solution tampon ; au bout de cinq jour, un réseau de fibrilles courtes et flexibles se greffent sur ces solides amorphes.

Cette étude nous a ainsi permis de constater que l'amyloïdogenèse du peptide Aβ(13-23) (**4**) pouvait être suivie par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle dans de bonnes conditions lorsque l'échantillon étudié avait une concentration peptidique égale à 400 μM et était filtré avant d'être incubé. De plus, il semblerait que les meilleurs résultats soient obtenus avec la solution tampon 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl à pH 7.32, plutôt qu'avec du 0.1 M TRIS.HCl – 150 mM NaCl à pH 7.49, le peptide étant certainement plus soluble dans la première solution que dans la seconde.

Ainsi que nous l'avons vu précédemment, A. S. Cohen écrivit en 1967 que tous les amyloïdes avaient la même structure fibrillaire, droite et rigide, avec une largeur généralement comprise entre 60 et 130 Å, la moyenne étant située entre 75 et 100 Å, et une longueur de 1000 à 16000 Å²¹⁷. Nous allons donc étudier l'une des fibrilles obtenues dans l'échantillon **4S4** de façon à la comparer à cette description et vérifier dans l'absolu s'il s'agit bien d'une fibrille amyloïde (Figure 86). Les dimensions mesurées, 125 Å pour la largeur et 4500 Å pour la longueur, sont cohérentes avec les données de la littérature. Nous pouvons donc conclure que l'Aβ(13-23) (**4**) s'agrège bien sous forme de fibrilles amyloïdes, ainsi que l'a décrit L. O. Tjernberg²²³.

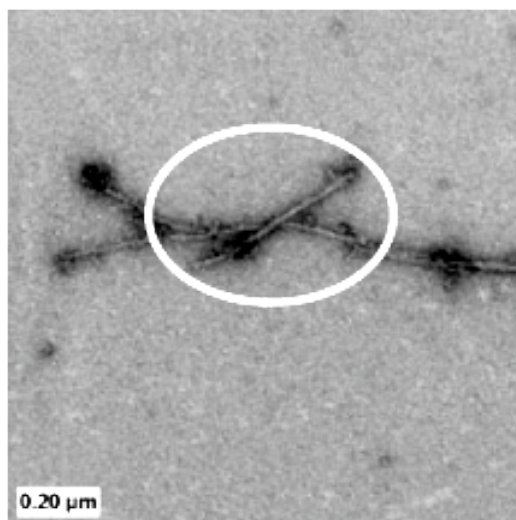


Figure 86 : Dimension d'une fibrille d'Aβ(13-23) (4S4), observée par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle, après 6 jours d'incubation à température ambiante ; largeur = 125 Å, longueur = 4500 Å ; dimensions et aspect caractéristiques d'une fibrille amyloïde.

D'après la littérature, l'Aβ(16-23) (5) est trop court pour pouvoir former des fibrilles²²³, cependant nous avons constaté qu'il pourrait tout de même avoir une certaine tendance à précipiter. Nous allons donc étudier son comportement dans une solution tampon 0.1 M TRIS.HCl – 150 mM NaCl à pH 7.49, et ce grâce à la microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle. La première chose que nous remarquons, c'est sa faible solubilité dans le solvant choisi. Il nous faut donc ajouter un peu de méthanol afin d'augmenter la concentration peptidique dans nos échantillons. Le premier échantillon, 5S1, contient 15 % de méthanol, a une concentration peptidique de 162 μM et est filtré avant incubation à température ambiante (Tableau 7). La solution stock est divisée en plusieurs fractions de 20 μL chacune. Chaque point d'analyse de l'échantillon 5S1 correspondra ainsi à une fraction différente. Le second échantillon, 5S2, contient 13 % de méthanol, ce qui nous permet d'avoir une concentration peptidique de 107 μM, mais n'est pas filtré avant incubation. Cette fois, chaque point d'analyse de 5S2 se fera à partir de la même solution stock.

Echantillon	Solution tampon	Concentration peptidique	Filtration	Note
1 (<u>5S1</u>)	15 % MeOH / 0.1 M TRIS.HCl – 150 mM NaCl, pH = 7.49	162 μM	✓	20 μL/fraction (1 fraction/analyse)
2 (<u>5S2</u>)	13 % MeOH / 0.1 M TRIS.HCl – 150 mM NaCl, pH = 7.49	107 μM	-	Solution stock

Tableau 7 : Conditions utilisées pour préparer les différents échantillons d'Aβ(16-23) (5) (✓: filtration avant incubation ; -: pas de filtration avant incubation).

Nous suivons l'évolution des échantillons 5S1 pendant douze jours et observons que la précipitation du peptide A β (16-23) se fait relativement lentement et donne une faible quantité d'aiguilles irrégulières (Figure 87). La vitesse d'agrégation est très certainement liée à la faible concentration peptidique de départ. L'étude des agglomérats obtenus, de 44 Å de largeur et 800 Å de longueur, nous permet de conclure qu'il ne s'agit pas de fibrilles amyloïdes (Figure 88a).

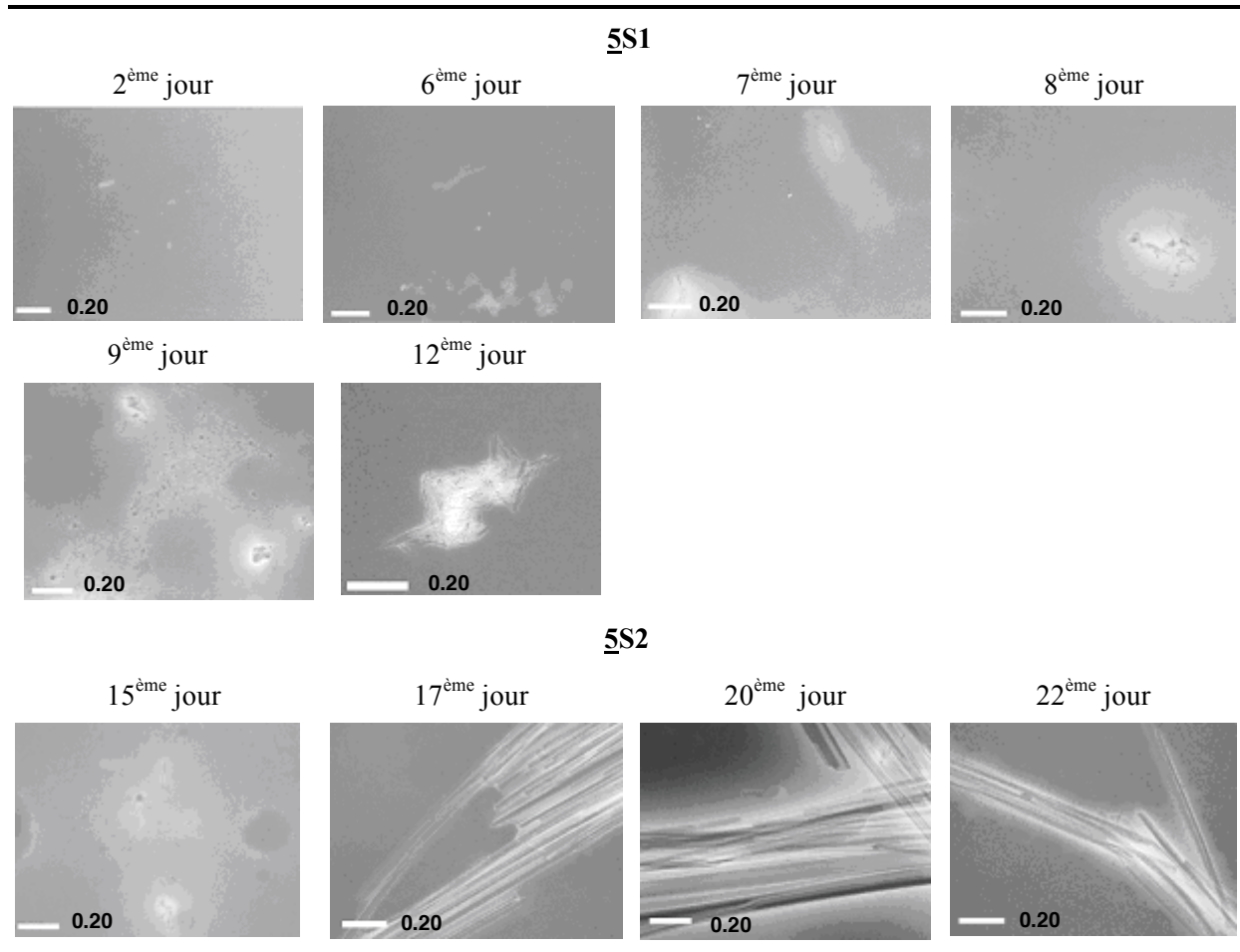


Figure 87 : Précipitation de l'A β (16-23) (5) présent dans les échantillons 5S1 et 5S2 ; suivi et observation par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle ; 5S1 : précipitation lente du peptide qui forme au bout de 12 jours des agrégats amorphes ; 5S2 : formation d'agrégats en forme de longs bâtons rigides.

L'échantillon 5S2 ayant une concentration peptidique encore plus faible que celle de 5S1, il est conservé quinze jours à température ambiante avant d'être analysé par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (Figure 87). Entre dix-sept et vingt-deux jours, nous observons de longues formes rigides ayant l'apparence de bâtons, voire même de cristaux. L'absence de ces structures au bout de quinze jours est très certainement due à un artefact.

Les dimensions d'un de ces agrégats sont calculées expérimentalement : 89 Å au niveau de la largeur et 1870 Å pour la longueur. Ces mesures rentrent dans les marges données pour les amyloïdes, cependant leur aspect diffère (Figure 88).

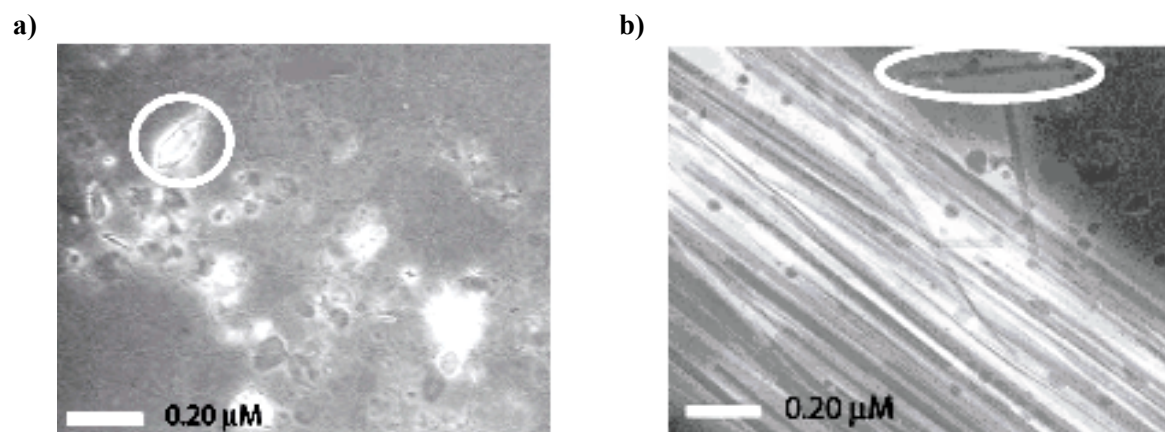


Figure 88 : $A\beta(16-23)$ (**5**) : **a)** dimension d'un agrégat de **5S1** observé après 12 jours d'incubation à température ambiante ; largeur = 44 Å, longueur = 800 Å ; **b)** dimension d'un agrégat de **5S2** après 20 jours d'incubation à température ambiante ; largeur = 89 Å, longueur = 1870 Å ; microscopie électronique par coloration négative conventionnelle.

Ainsi nous avons constaté expérimentalement que l' $A\beta(16-23)$ (**5**) est très peu soluble dans l'eau, a une certaine tendance à précipiter, mais qu'il ne forme pas de fibrilles amyloïdes. La microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle est donc un outil utile qui nous permet de distinguer, d'une façon relativement simple, les fibrilles amyloïdes des agrégats amorphes.

Dans la seconde partie de cette étude de nos peptides de référence par microscopie électronique, nous allons nous concentrer sur le comportement de l'inhibiteur Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**6**) et de son analogue Ac-Leu-Val-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**7**) lorsque ceux-ci sont dissouts dans 15 % de méthanol dans une solution tampon 0.1 M TRIS.HCl – 150 mM NaCl à pH 7.49 (respectivement le Tableau 8 et le Tableau 9).

Un échantillon contenant l'inhibiteur Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**6**), **6S1**, est préparé de façon à obtenir une concentration peptidique de 200 μM. La solution stock est divisée en plusieurs fractions de 20 μL qui incubent en même temps à température ambiante. Chaque point d'analyse de l'échantillon **6S1** correspond ainsi à une fraction différente (Tableau 8).

Echantillon	Solution tampon	Concentration peptidique	Filtration	Note
1 (6S1)	15 % MeOH in 0.1 M TRIS.HCl – 150 mM NaCl, pH = 7.49	200 μM	✓	20 μL/fraction (1 fraction/analyse)

Tableau 8 : Conditions utilisées pour préparer l'échantillon d'Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-NH₂ (**6**) (✓: filtration avant incubation ; -: pas de filtration avant incubation).

L'analogue structural de l'inhibiteur **6**, l'Ac-Leu-Val-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**7**) est étudié selon le même principe. Deux échantillons de cette molécule sont préparés (Tableau 9). Le premier, **7S1**, avec une concentration peptidique de 200 µM, est filtré puis divisé en plusieurs fractions de 20 µL, tandis que le second, **7S2**, a une concentration peptidique de 783 µM, est filtré mais reste sous forme de solution stock.

Echantillon	Solution tampon	Concentration peptidique	Filtration	Note
1 (7S1)	15 % MeOH in 0.1 M TRIS.HCl – 150 mM NaCl, pH = 7.49	200 µM	✓	20 µL/fraction (1 fraction/analyse)
2 (7S2)	15 % MeOH in 0.1 M TRIS.HCl – 150 mM NaCl, pH = 7.49	783 µM	✓	Solution stock

Tableau 9 : Conditions utilisées pour préparer les échantillons d'Ac-Leu-Val-Phe-Phe-NH₂ (**7**) (✓: filtration avant incubation ; -: pas de filtration avant incubation).

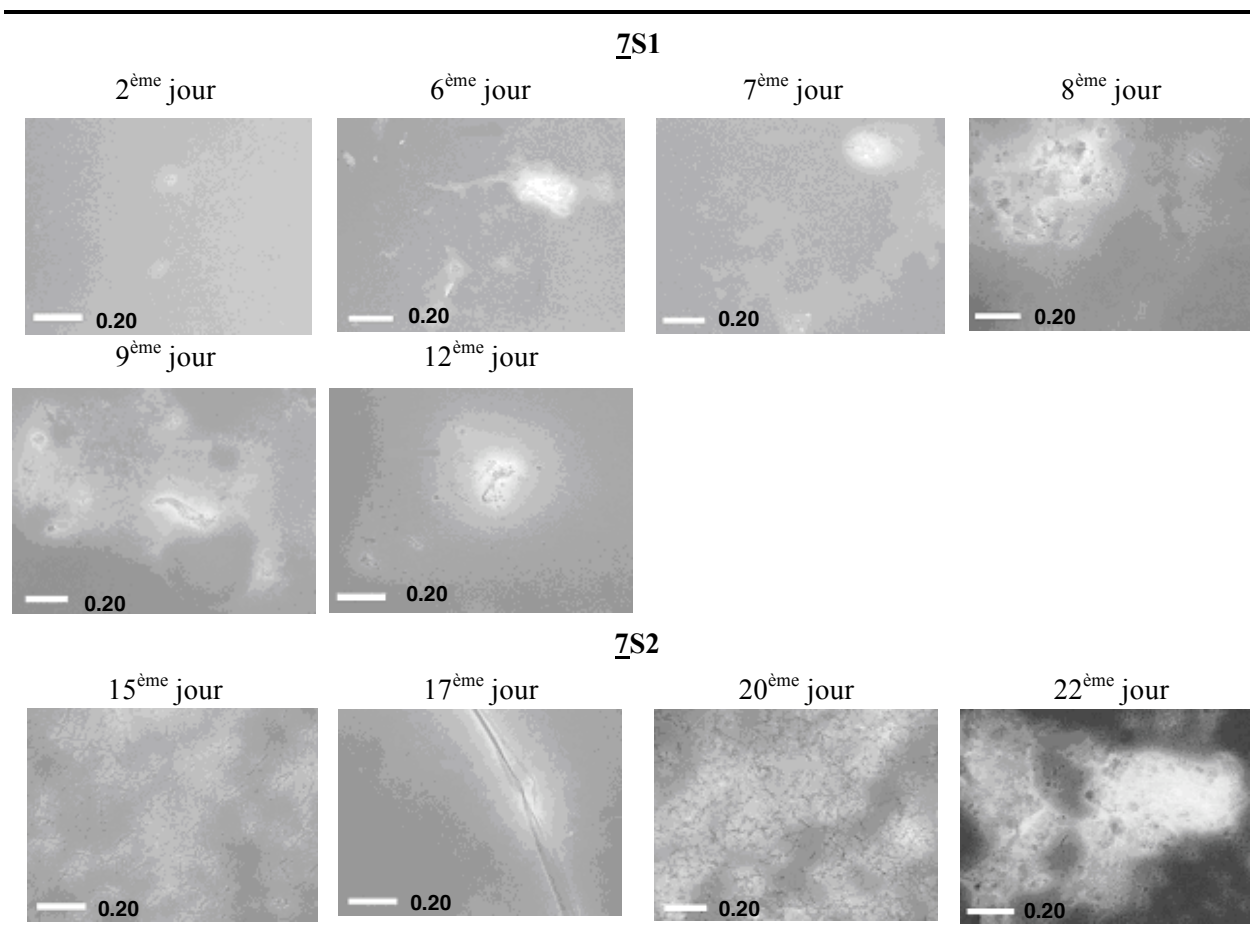


Figure 91 : Précipitation de l'Ac-Leu-Val-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**7**) présent dans les échantillons **7S1** et **7S2** ; suivi et observation par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle ; **7S1** : précipitation du peptide **7** formant quelques filaments courts et fins ; **7S2** : réseau dense d'agrégats sous forme de fibres très fines et très courtes.

Les conditions de préparation de l'échantillon **7S1** sont semblables à celles utilisées pour l'échantillon **6S1** (Tableau 8). Dès le sixième jour d'incubation, nous observons une légère agrégation de la molécule **7**, formant quelques filaments fins et courts (Figure 91).

L'échantillon **7S2**, avec une concentration peptidique de 783 μM , est à la limite de la solubilité du composé **7** dans le mélange de solvants employés. Après quinze jours d'incubation à température ambiante, la molécule **7** forme un large réseau de fibres très fines et très courtes (Figure 91).

Les agrégats présents dans les échantillons **7S1** et **7S2** ont des dimensions respectives de 38 et 18 à 27 Å pour leur largeur, et de 1500 et 620 Å pour leur longueur (Figure 92). Ces données expérimentales, combinées à l'aspect de ces précipités, permettent de bien les différencier des fibrilles amyloïdes.

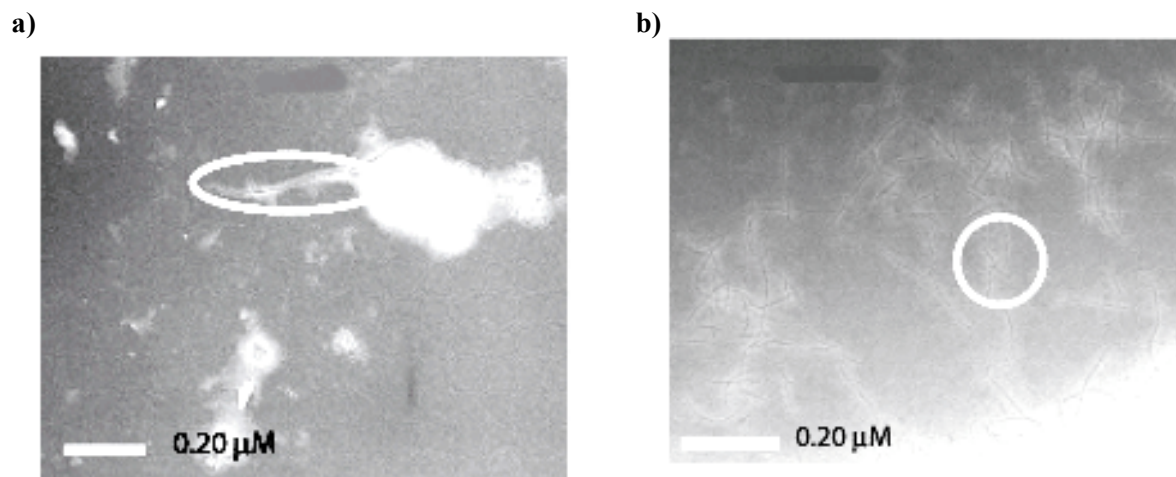


Figure 92 : *Ac-Leu-Val-Phe-Phe-Asp-NH₂* (**7**) : **a**) dimension d'un agrégat de **7S1** observé après 12 jours d'incubation à température ambiante : largeur = 38 Å, longueur = 1500 Å ; **b**) dimension d'un agrégat de **7S2** observé après 15 jours d'incubation à température ambiante : largeur = 18-27 Å, longueur = 620 Å ; microscopie électronique par coloration négative conventionnelle.

Cette étude préliminaire par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle nous a donc permis de déterminer quelles étaient les meilleures conditions expérimentales pour suivre l'amyloïdogenèse de notre peptide amyloïde de référence, l'A β (13-23) (**4**) : une concentration peptidique de l'ordre de 400 μM , une préférence pour la solution tampon 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl, pH = 7.32, et la filtration de l'échantillon avant son incubation à température ambiante. Parallèlement à cela, nous avons observé le comportement en solution d'un peptide dérivé de l'A β (1-42), l'A β (16-23) (**5**), ne formant pas de fibrilles d'après la littérature, ce que nous avons d'ailleurs confirmé, ainsi que d'un inhibiteur puissant de la fibrillogenèse, l'Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**6**), et d'un de ses analogues, l'Ac-Leu-Val-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**7**). Nous avons ainsi vérifié expérimentalement que nous pouvions distinguer facilement les amyloïdes des agrégats amorphes grâce à l'utilisation de cette technique de microscopie électronique.

Ce travail doit maintenant être complété par une étude de la méthode de coloration au rouge Congo afin de maîtriser une autre technique de caractérisation d'amyloïdes utilisée pour confirmer les résultats obtenus par microscopie électronique.

3. Etude des peptides de référence par coloration au rouge Congo

Une étude préliminaire de quatre molécules va nous permettre de mettre en évidence les différences existant entre un amyloïde et un agrégat amorphe lorsque ceux-ci étaient vus au microscope optique après coloration au rouge Congo (Tableau 10).

Amyloïdes	H-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-OH (4) H-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Ser ³⁷ -Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH ([Ser ³⁷]Aβ(1-42))
Non-amyloïdes	H-Val-Tyr-(Arg-Pro)Thr-His-Pro-Phe-OH (dAngII) Ac-Tyr-Ser-Ala-Leu-Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-(D-Ala)Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-NH ₂ (dNPY)

Tableau 10 : Molécules considérées pour l'étude préliminaire de la technique de coloration au rouge Congo ; entre parenthèses et en gras, le nom de référence du produit.

Deux de ces composés appartiennent à la famille de l'amyloïde β. L'Aβ(13-23) (**4**) est notre peptide amyloïde de référence, quant au produit [Ser³⁷]Aβ(1-42), il correspond l'Aβ(1-42) dont la glycine en position 37 a été remplacée par une sérine. Synthétisé par S. Dos Santos^{46, 47}, il résulte d'une double migration acylique O→N à partir du peptide H-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-(H⁺)Ser²⁶-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-(H-Arg-Pro)Ser³⁷-Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH. Une neutralisation du milieu réactionnel permet de rétablir la liaison amide au niveau de la sérine 26, puis l'addition de dipeptidyle aminopeptidase IV (DPPIV)⁴⁴⁻⁴⁷, une enzyme ayant une grande spécificité de clivage pour les dipeptides Xaa-Pro, permet de libérer l'amine de la sérine 37 et de déclencher la seconde migration acylique. Le peptide [Ser³⁷]Aβ(1-42), à l'état S_{on}, est ensuite laissé à température ambiante pour incubation.

Les deux autres molécules n'ont aucun lien avec la famille des amyloïdes, ne forment donc pas de fibrilles et ne réagiront donc pas avec le rouge Congo. Le premier produit de cette catégorie, H-Val-Tyr-

(Arg-Pro)Thr-His-Pro-Phe-OH, est un dérivé d'angiotensine II, synthétisé par S. Dos Santos⁴⁶, et que nous nommerons, pour simplifier, **dAngII**. L'angiotensine II est le composé actif du système rénine-angiotensine (RAS, Renin-Angiotensin System), facteur important de la régulation de la pression sanguine et de la balance électrolyte. La molécule **dAngII** contient un élément « switch » sur la thréonine 3, bloqué à l'état S_{off} par un dipeptide Arg-Pro. Enfin, le second produit de cette catégorie, Ac-Tyr-Ser-Ala-Leu-Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-(D-Ala)Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-NH₂, est un dérivé du neuropeptide Y (ou NPY), qui fut synthétisé par P. Tella, et que nous appellerons, pour plus de simplicité, **dNPY**. Le neurotransmetteur NPY, composé de 36 acides aminés, appartient à la famille des hormones polypeptidiques pancréatiques. C'est l'un des neuropeptides les plus abondants dans le cerveau, mais il est également présent dans le système neuro-végétatif. Le composé **dNPY** intègre un élément « switch » sur la thréonine 12, bloqué à l'état S_{off} par une D-alanine, qui peut être relarguée grâce à l'action d'une enzyme, la peptidase D-acide aminé.

Chacun de ces quatre composés est dissout dans une solution tampon mélangée, si besoin est, à du méthanol, et ce pour des raisons de solubilisation du produit. Les conditions expérimentales pour chaque composé sont décrites dans le Tableau 11. Les échantillons correspondants incubent à température ambiante puis sont colorés avec une solution de rouge Congo (200 µM dans 10 % d'éthanol avec une solution tampon 0.01 M sodium phosphate, 137 mM de NaCl, et 2.7 mM de KCl à pH 7.42). Les échantillons sont ensuite centrifugés et les agrégats rincés à l'eau afin d'éliminer l'excès de rouge Congo. Les précipités colorés sont alors observés grâce à un microscope optique sous une lumière blanche, puis sous une lumière polarisée.

Echantillon	Solution tampon	Concentration peptidique	Incubation
4S6	0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl, pH = 7.32	400 µM	13 jours
4S7	0.1 M TRIS.HCl – 150 mM NaCl, pH = 7.49	200 µM	9 jours
[Ser³⁷]Aβ(1-42)_S1	0.1 M TRIS.HCl – 150 mM NaCl, pH = 7.49	40 µM	9 jours
dAngII_S1	15 % méthanol dans 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl, pH = 7.42	400 µM	3 et 10 jours
dNPY_S1	15 % méthanol dans 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl, pH = 7.42	400 µM	3 et 10 jours

Tableau 11 : Conditions de préparation des différents échantillons peptidiques étudiés, après coloration au rouge Congo, par microscopie optique.

Nous préparons deux échantillons d'A β (13-23) (**4**). Le premier (**4S6**) a une concentration peptidique de 400 μ M dans un tampon phosphate à pH 7.32, tandis que le second (**4S7**) a une concentration peptidique deux fois moins importante, dans un tampon TRIS.HCl à pH 7.49. Le temps d'incubation varie lui aussi, avec une période de 13 jours pour **4S6** et de 9 jours pour **4S7**. Ainsi, nous serons certains d'avoir un maximum de fibrilles matures et nous pourrons aussi juger l'influence de la nature du tampon sur cette méthode coloration.

L'observation des échantillons par microscopie optique nous permet de constater que les structures solides obtenues dans **4S6** et **4S7** sont rouges sous la lumière blanche et sont caractérisées par une biréfringence vert-pomme en lumière polarisée (Figure 93). Nous pouvons donc en conclure que l'A β (13-23) forme bien des fibrilles, comme cela avait déjà été décrit dans la littérature²²³, et comme nous l'avions montré précédemment par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle.

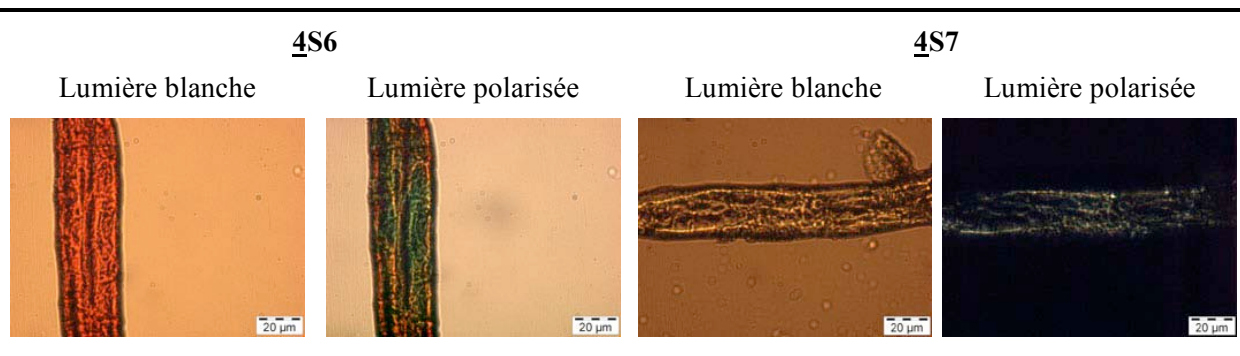


Figure 93 : Observation, par microscopie optique, du peptide A β (13-23) (**4**) après coloration au rouge Congo : l'échantillon **4S6** est étudié après 13 jours d'incubation (photographie caractéristique d'une fibrille, rouge sous une lumière blanche et verte sous une lumière polarisée), et l'échantillon **4S7** l'est après 9 jours d'incubation (la couleur rouge sous une lumière blanche et la biréfringence vert-pomme sous une lumière polarisée est caractéristique d'une fibrille amyloïde).

L'étude de l'A β (1-42), dont la glycine 37 est remplacée par une sérine, nous permet d'avoir un exemple pratique de la coloration au rouge Congo d'un amyloïde. En effet, la mutation mineure du composé ne modifiant pas les propriétés de fibrillogenèse du peptide pathogène^{46, 47}, nous avons, avec cette molécule, un élément de comparaison idéal pour notre peptide amyloïde de référence. L'échantillon [Ser³⁷]A β (1-42)**_S1** est conservé à température ambiante pendant 9 jours avant d'être coloré au rouge Congo. La lumière blanche révèle des fibrilles rouges, quant à la lumière polarisée, elle met en évidence leur biréfringence vert-pomme (Figure 94). Ces résultats nous permettent ainsi de confirmer une dernière fois la nature fibrillaire des précipités formés par le peptide A β (13-23) (**4**).

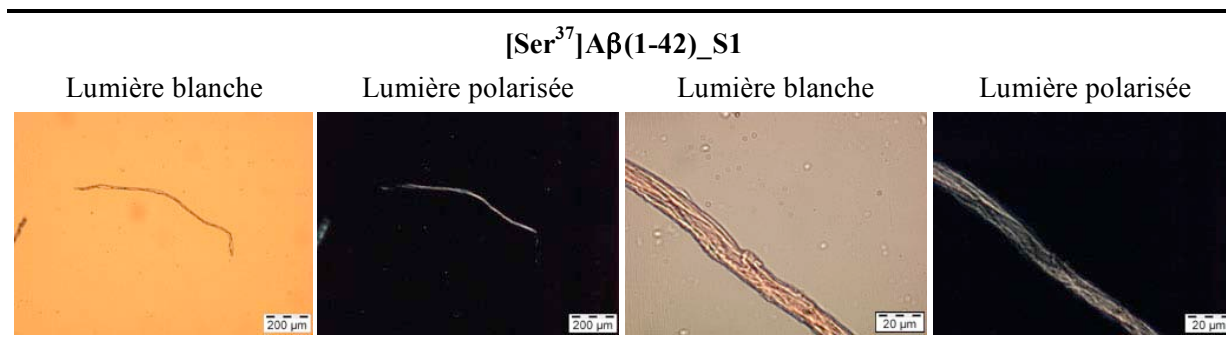


Figure 94 : Observation, par microscopie optique, d'un échantillon d'amyloïde [Ser³⁷]Aβ(1-42) ([Ser³⁷]Aβ(1-42)_S1) après 9 jours d'incubation et coloration au rouge Congo ; coloration rouge sous une lumière blanche et biréfringence vert-pomme sous une lumière polarisée : il s'agit bien là de fibrilles.

L'analogue de l'angiotensine II (**dAngII**) faisant preuve d'une bonne solubilité dans la solution tampon, très peu d'agrégats sont observés au microscope optique. Ces derniers, colorés en rouge à la lumière blanche, se révèlent être plutôt bleus sous une lumière polarisée (Figure 95). Le dérivé d'angiotensine II n'appartient effectivement pas à la famille des peptides amyloïdes.

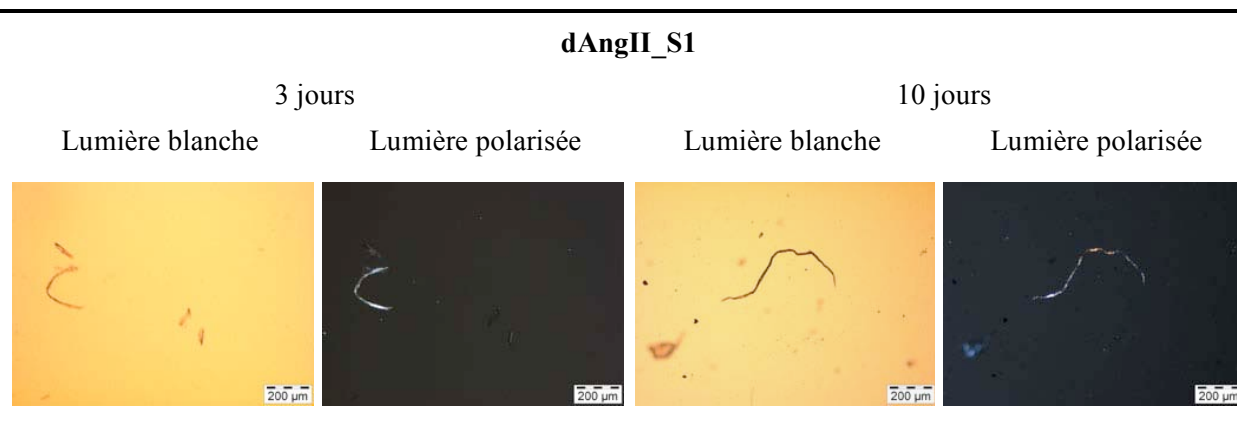


Figure 95 : Observation, par microscopie optique, d'un échantillon du dérivé d'angiotensine II, H-Val-Tyr-(Arg-Pro)Thr-His-Pro-Phe-OH (**dAngII_S1**) après 3 et 9 jours d'incubation, puis coloration au rouge Congo ; les filaments observés sont bien rouges sous une lumière blanche, mais ils ne sont pas caractérisés par une biréfringence vert-pomme sous une lumière polarisée : le dérivé d'angiotensine II ne forme pas de fibrilles.

Enfin, l'analogue du neuropeptide Y a tendance à fortement précipiter dans la solution tampon utilisée et donne, avec le rouge Congo, des structures ramifiées rouges sous une lumière blanche, mais sans aucune biréfringence sous une lumière polarisée (Figure 96). Ces agrégats sont donc complètement amorphes.

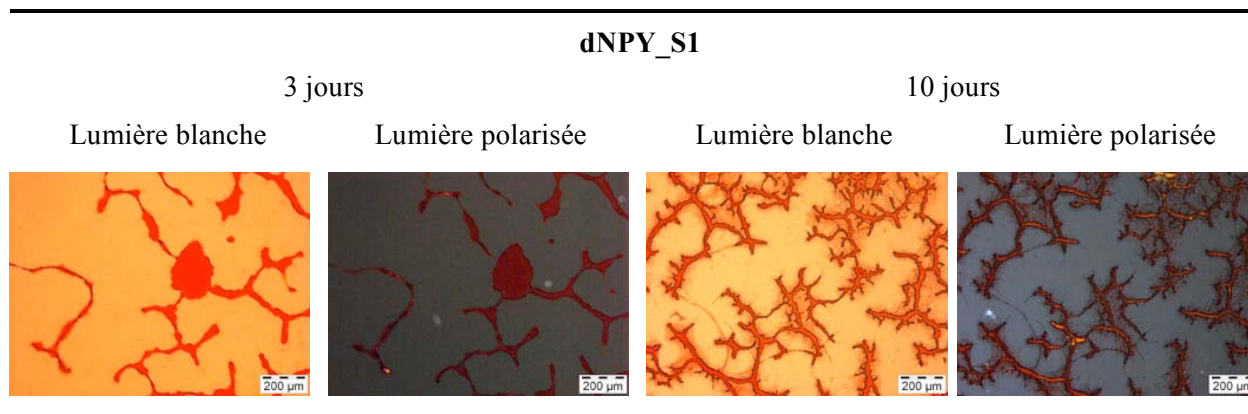


Figure 96 : Observation, par microscopie optique, d'un échantillon du dérivé du neuropeptide Y, *Ac-Tyr-Ser-Ala-Leu-Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-(D-Ala)Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-NH₂* (**dNPY_S1**) après 3 et 9 jours d'incubation, puis coloration au rouge Congo ; structures ramifiées rouges sous une lumière blanche, sans aucune biréfringence sous une lumière polarisée : le dérivé du neuropeptide Y ne forme pas de fibrilles.

Nous avons ainsi vérifié que notre peptide amyloïde de référence, l'A β (13-23) (**4**), formait des fibrilles ayant le même aspect, après coloration au rouge Congo, que l'amyloïde modifié [Ser³⁷]A β (1-42). Ces structures se distinguent aisément des agrégats amorphes formés par d'autres peptides tels que des dérivés de l'angiotensine II ou du neuropeptide II.

4. Test de screening d'inhibiteurs potentiels de la fibrillogenèse : premiers résultats

Nous sommes désormais en mesure de caractériser les structures amyloïdes obtenues à partir de l'A β (13-23) (**4**), aussi bien par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle que par coloration au rouge Congo. Nous sommes donc capables d'évaluer, d'une façon qualitative, l'efficacité avec laquelle différentes molécules inhibent la formation des fibrilles d'A β (13-23) (**4**), et de déterminer quels sont les meilleurs candidats.

La fibrillogenèse de l'A β (13-23) (**4**) est étudiée après dissolution du peptide dans un mélange contenant 15 % de méthanol dans une solution tampon sodium phosphate à 0.01 M, avec 137 mM de NaCl et 2.7 mM de KCl, à pH 7.42, de façon à obtenir une concentration peptidique égale à 400 μ M. Les composés à tester sont mélangés au peptide amyloïde de référence dès le début, au moment de la préparation de la solution.

Le suivi d'une solution ne contenant que l'amyloïde de référence **4** permet d'avoir un contrôle positif de sa fibrillogenèse. L'échantillon **4S8** nous montre que les fibrilles sont visibles dès le premier jour

d'incubation en microscopie électronique et dès le troisième jour après coloration au rouge Congo (Figure 97).

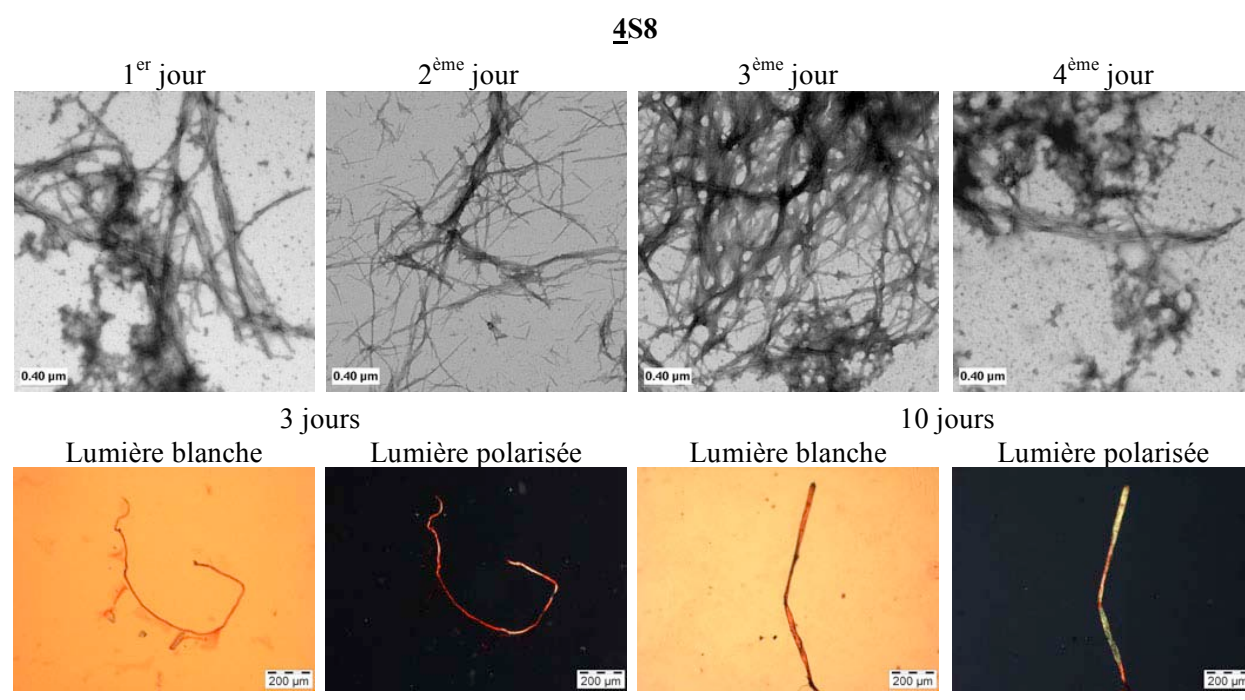


Figure 97 : Observation, soit par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (en haut), soit par microscopie optique sous lumière blanche ou polarisée, et ce après coloration au rouge Congo (en bas), de l'échantillon **4S8** contenant l'amyloïde de référence $\beta(13-23)$; en haut : formation de fibrilles dès le 1^{er} jour d'incubation, mélangées à un réseau de fibrilles courtes et flexibles, aussi appelées protofibrilles, persistant après 4 jours d'incubation ; en bas : détection de fibrilles dès trois jours d'incubation : coloration rouge sous une lumière blanche et biréfringence vert-pomme sous une lumière polarisée.

Ces résultats sont donc tout à fait cohérents avec les études préliminaires réalisées et décrites précédemment dans ce chapitre.

Plusieurs échantillons contenant l'inhibiteur Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**6**) mélangé au peptide amyloïde **4** sont préparés, ainsi qu'il l'est décrit dans le Tableau 12.

Composé	Echantillon	Concentration peptidique	Rapport 6/4
6	6S2	4 mM	
6 + 4	6S3	4 mM / 400 μM	10 : 1
6 + 4	6S4	400 μM / 400 μM	1 : 1
6 + 4	6S5	200 μM / 400 μM	1 : 2

Tableau 12 : Liste des différents échantillons contenant le destructeur de feuillet β Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**6**), mélangé, ou non, à l'amyloïde $\beta(13-23)$ (**4**).

Le 5-mère seul (échantillon **6S2**) a plutôt tendance à précipiter hors de la solution avec le temps. Ce phénomène conduit à la formation de quelques filaments bleus après coloration au rouge Congo et visualisation sous lumière polarisée (Figure 98).

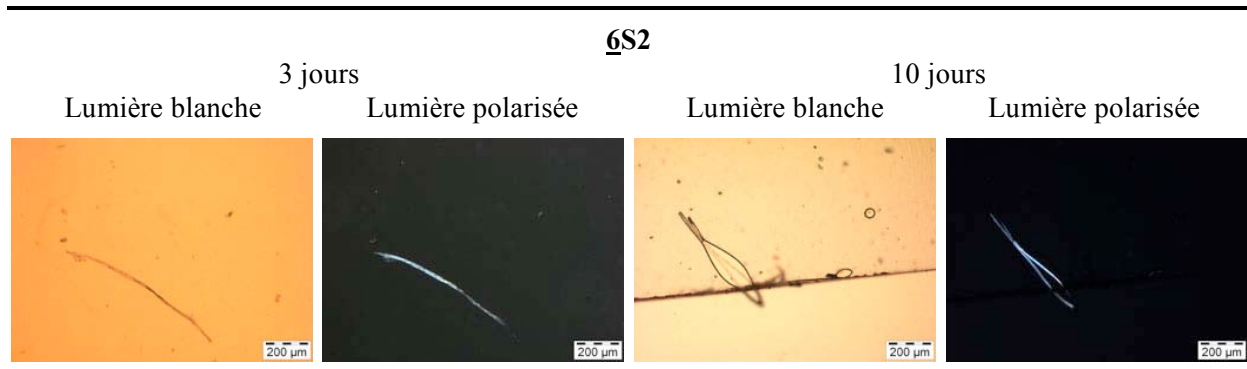


Figure 98 : Coloration au rouge Congo d'une solution ne contenant que l'inhibiteur Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**6S2**) après 3 et 10 jours d'incubation à température ambiante ; observation au microscope optique en lumière blanche puis polarisée ; le peptide **6** précipite partiellement pour former dès 3 jours des agrégats amorphes certes rouges sous une lumière blanche, mais pas bleu sous une lumière polarisée.

Lorsque cette molécule est mélangée en grand excès au peptide amyloïde (échantillon **6S3**, 10 équivalents de **6**), nous n'observons pas la présence de fibrilles après coloration au rouge Congo au bout de trois jours d'incubation, cependant, cette méthode permet d'en détecter après dix jours d'incubation (Figure 99).

La microscopie électronique nous permet de confirmer l'absence de fibrilles matures au cours des trois premiers jours d'incubation, néanmoins, il semblerait que l'échantillon **6S3** contienne une certaine quantité de protofibrilles qui commenceraient à s'assembler de façon à former quelques fibrilles au 4^{ème} jour d'incubation (Figure 99).

Ainsi, le peptide Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**6**) a effectivement la capacité de retarder la fibrillogénèse de l'amyloïde A β (13-23) (**4**), cependant, il n'est pas en mesure de la bloquer totalement, même avec une concentration dix fois supérieure à celle du peptide pathogène.

Un mélange équimolaire du destructeur de feuillets β et de l'amyloïde β (échantillon **6S4**) donne plus ou moins les mêmes résultats qu'avec dix équivalents de la molécule **6**. La coloration au rouge Congo ne montre pas la présence de fibrilles après trois jours d'incubation de la solution à température ambiante, mais la révèle après huit jours (Figure 100).

L'étude de l'échantillon **6S4** par microscopie électronique met en évidence la présence de protofibrilles d'A β (13-23) dès le premier jour d'observation, ainsi que les jours suivants. Cependant, aucune fibrille n'est repérée au bout du quatrième jour, contrairement à ce que nous avons vu dans la préparation **6S3** (Figure 100).

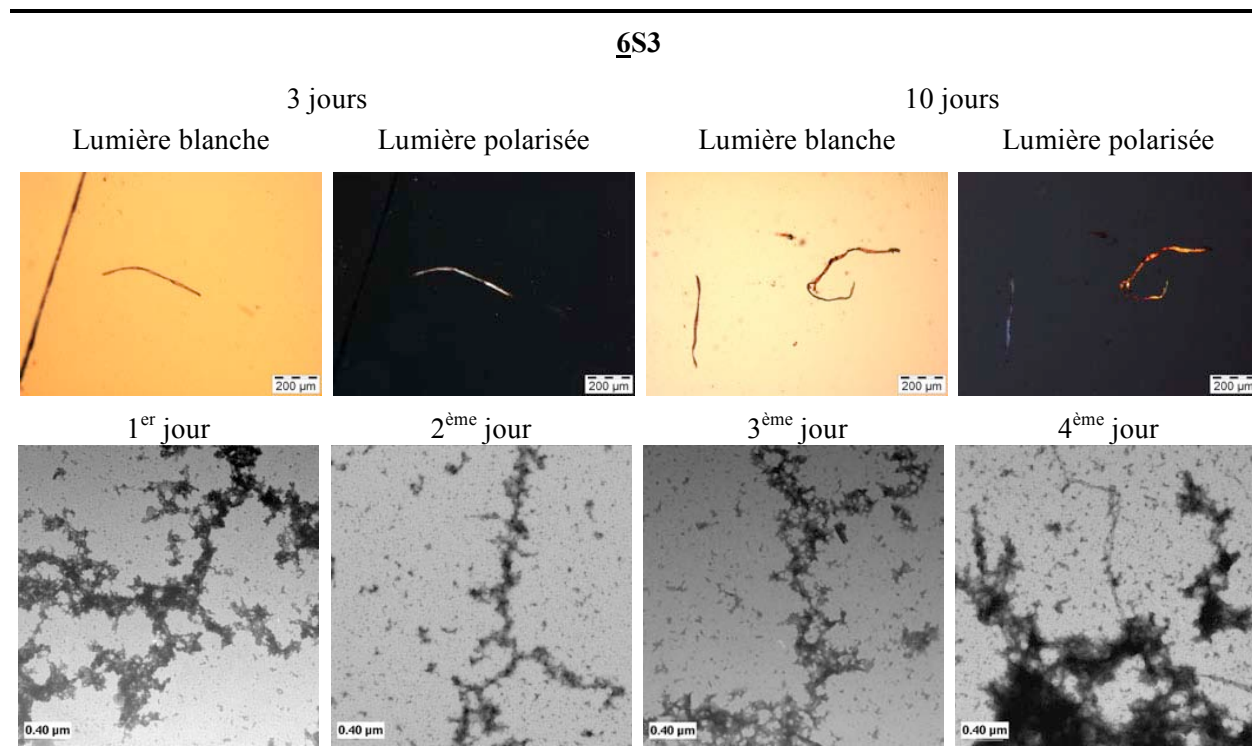


Figure 99 : Suivi de l'échantillon **6S3** par microscopie optique après coloration au rouge Congo (en haut) et par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (en bas) ; en haut : fibrilles dès 10 jours (biréfringence vert-pomme sous une lumière polarisée) ; en bas : présence de protofibrilles dès le 1^{er} jour se transformant en fibrilles dès le 4^{ème} jour.

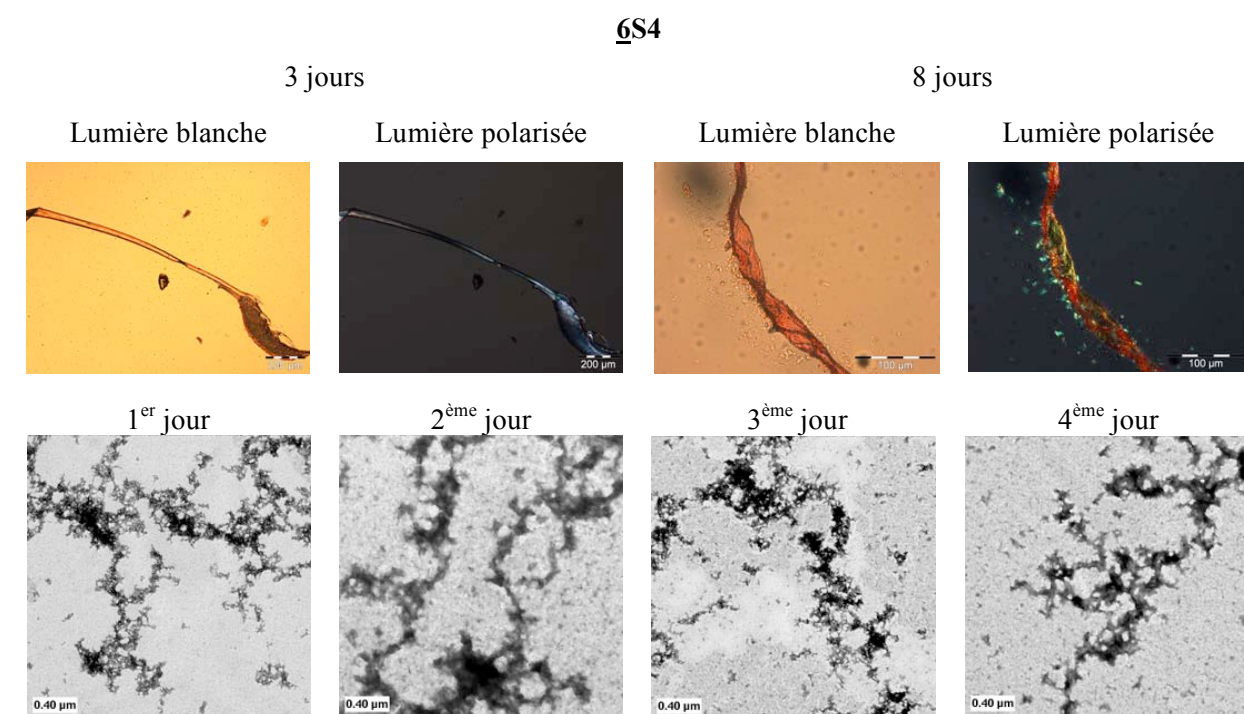


Figure 100 : Suivi de l'échantillon **6S4** par microscopie optique après coloration au rouge Congo (en haut) et par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (en bas) ; en haut : pas de fibrilles au bout de 3 jours (coloration bleue sous une lumière polarisée) mais au bout de 8 jours ; en bas : présence de protofibrilles.

Deux hypothèses découlent de ce constat : soit l'inhibiteur Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ est plus efficace dans un mélange équimolaire avec l'amyloïde β , soit nous avons affaire à un artefact dans l'une ou l'autre des deux études.

L'expérience est réitérée avec un rapport de un pour deux entre l'inhibiteur et la molécule pathogène. Les résultats correspondants sont présentés dans la Figure 101.

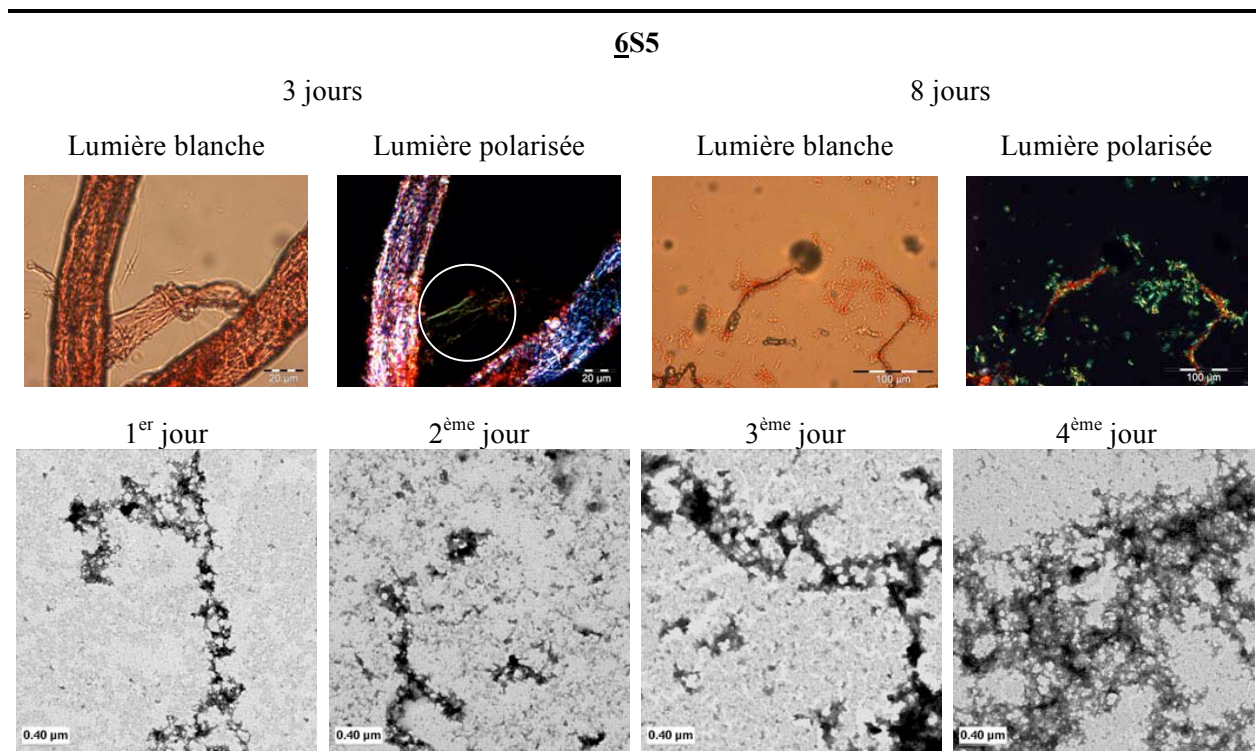


Figure 101 : Suivi de l'échantillon 6S5 par microscopie optique après coloration au rouge Congo (en haut, cercle blanc montrant la présence de fibrilles dès le troisième jour d'incubation, caractérisées par une biréfringence vert-pomme sous une lumière polarisée) et par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (en bas), ne révélant que des protofibrilles.

Dès le troisième jour d'incubation de l'échantillon 6S5, la méthode de coloration au rouge Congo met en évidence la présence de fibrilles (Figure 101, cercle blanc en haut). Au bout de huit jours, les fibrilles sont beaucoup plus nombreuses. La microscopie électronique ne montre, quant à elle, que des protofibrilles entre le premier et le quatrième jour d'observation, mais aucune fibrille mature.

Nous pouvons donc déduire de cette étude que le peptide destructeur de feuillets β Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (6) est particulièrement efficace pour empêcher la fibrillogénèse de l'A β (13-23) dès un équivalent et pendant au moins trois jours. Il l'est cependant beaucoup moins lorsque le rapport entre lui et l'amyloïde descend à un pour deux. Ces résultats vont ainsi nous servir de base de comparaison avec les nouveaux inhibiteurs potentiels que nous aurons synthétisés.

L'Ac-Leu-Val-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**7**) est le premier peptide que nous allons comparer à l'inhibiteur de référence Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**6**). D'après ce que nous avons vu dans la littérature, il ne devrait pas avoir un effet inhibiteur puissant sur l'amyloïdogenèse, fait que nous allons pouvoir vérifier au cours de l'expérience suivante. Deux échantillons contenant la molécule **7** sont alors préparés, ainsi que cela l'est décrit dans le Tableau 13.

Composé	Echantillon	Concentration peptidique	Rapport 7/4
7	7S3	4 mM	
7 + 4	7S4	4 mM / 400 μM	10 : 1

Tableau 13 : Liste des différents échantillons contenant l'Ac-Leu-Val-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**7**), mélangé, ou non, à l'amyloïde Aβ(13-23) (**4**).

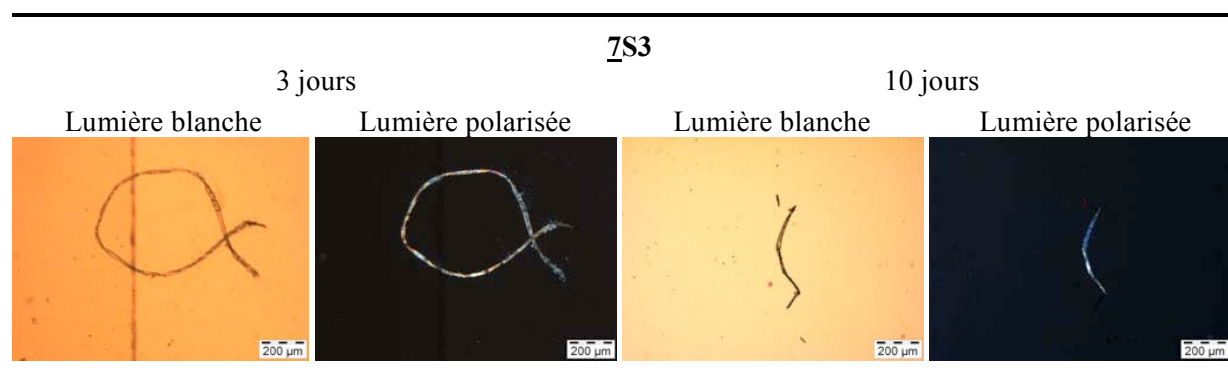


Figure 102 : Coloration au rouge Congo d'une solution ne contenant que l'Ac-Leu-Val-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**7S3**) après 3 et 10 jours d'incubation à température ambiante ; observation au microscope optique sous lumière blanche puis polarisée ; la molécule ne forme pas de fibrilles, puisque nous n'observons pas, sous une lumière polarisée, la biréfringence vert-pomme caractéristique de ces structures.

La solution **7S3** n'est composée que de la molécule **7**. Cela nous permet de constater que la molécule a tendance à précipiter avec le temps, pour former des structures semblables à des filaments, révélés en bleu par la lumière polarisée après coloration au rouge Congo (Figure 102).

Le produit **7** est ensuite mélangé au peptide amyloïde pour donner l'échantillon **7S4**, dans lequel l'Ac-Leu-Val-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**7**) est en large excès par rapport à la molécule pathogène. Dès le premier jour d'incubation, la microscopie électronique révèle la présence de fibrilles dont la quantité augmente avec le temps (Figure 103). Ce résultat est d'ailleurs confirmé grâce à l'utilisation de la méthode de coloration au rouge Congo. Néanmoins, il semblerait que les fibrilles soient moins nombreuses dans cet échantillon que dans l'échantillon de contrôle **4S8** ne contenant que l'Aβ(13-23) (**4**), même si ce constat reste toutefois subjectif. L'Ac-Leu-Val-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**7**) est donc beaucoup moins efficace que

l'Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**6**) en tant qu'inhibiteur de fibrillogenèse, conclusion cohérente avec les données de la littérature.

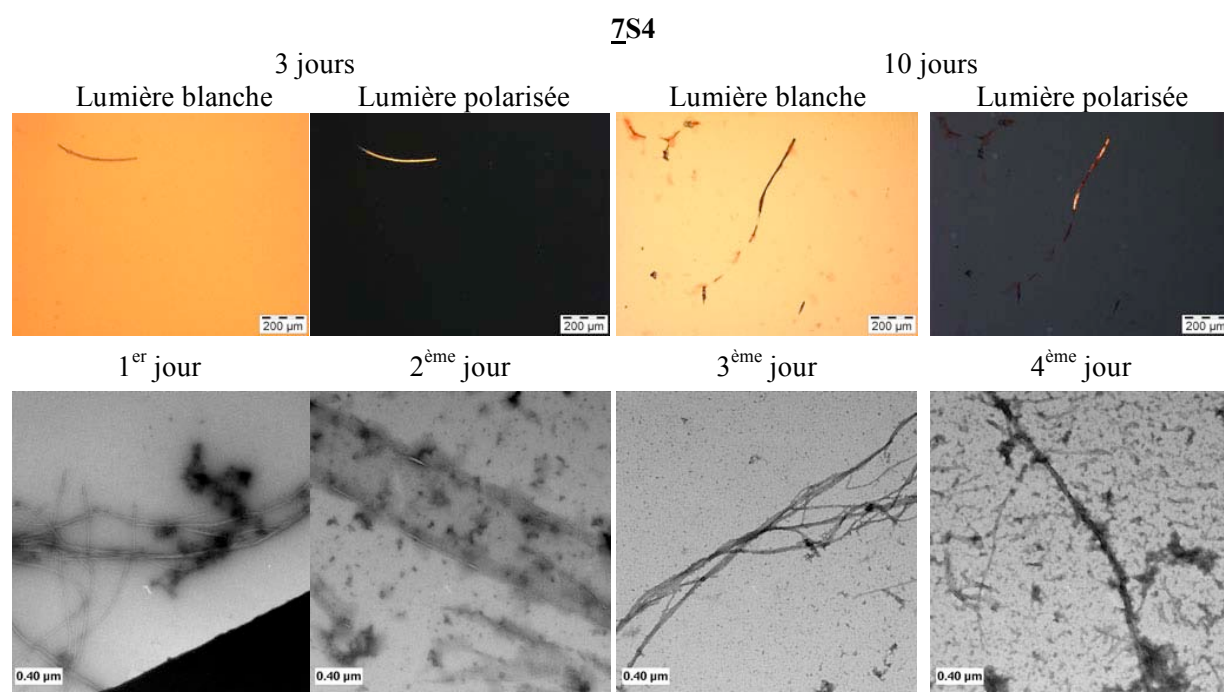


Figure 103 : Suivi de l'échantillon **7S4** par microscopie optique après coloration au rouge Congo (en haut) et par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (en bas) ; en haut : présence de fibrilles détectées dès 3 jours d'incubation (biréfringence vert-pomme sous une lumière polarisée) ; en bas : fibrilles dès le 1^{er} jour, toujours mélangées à des protofibrilles après 4 jours.

Enfin, nous mélangeons à notre amyloïde un autre inhibiteur d'amyloïdogénèse connu, le rouge Congo¹⁸⁷. Bien que le mécanisme d'inhibition ou de coloration de cette molécule ne soit pas encore bien connu, nous pouvons supposer que ce colorant ayant tendance à se fixer sur les amyloïdes, il bloque alors la croissance des fibrilles correspondantes. Nous devrions donc pouvoir déterminer une certaine activité inhibitrice, qui devrait être inférieure à celle de l'Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**6**). Deux échantillons contenant du rouge Congo sont préparés, le premier ne contenant que le colorant, le second étant un mélange avec l'Aβ(13-23) (**4**), avec un rapport de 1 pour 10 en faveur du rouge Congo (Tableau 14).

Composé	Echantillon	Concentration peptidique	Rapport rouge Congo/ 4
Congo red	Congo red_S1	4 mM	
Congo red + 4	Congo red_S2	4 mM / 400 µM	10 : 1

Tableau 14 : Liste des différents échantillons contenant le rouge Congo, mélangé, ou non, à l'amyloïde Aβ(13-23) (**4**).

Le rouge Congo seul (échantillon **Congo red_S1**) forme, dans le mélange de solvants utilisés pour l'expérience, des micelles et des agrégats rouges ou bleus sous une lumière polarisée (Figure 104). C'est d'ailleurs la raison pour laquelle il est nécessaire de toujours filtrer la solution colorante avant de l'utiliser sur les échantillons d'amyloïde, afin de ne pas fausser les résultats.

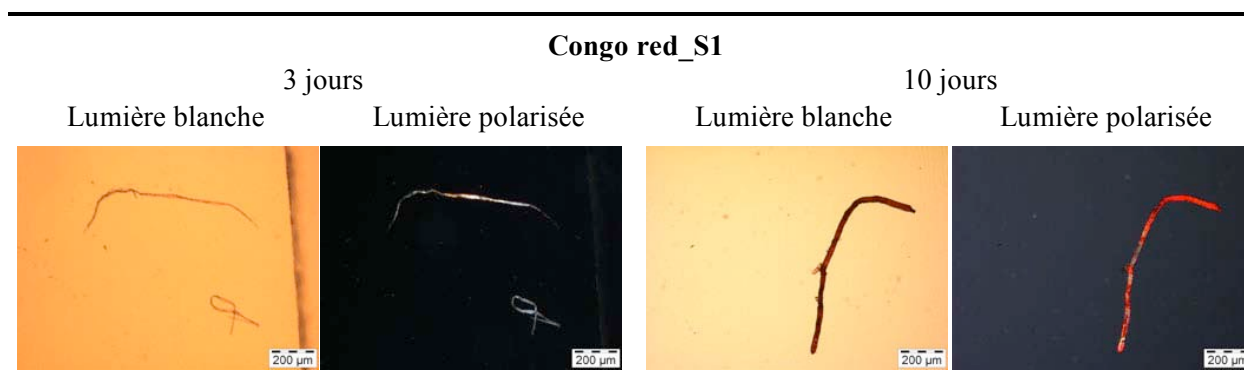


Figure 104 : Coloration au rouge Congo d'une solution ne contenant que du rouge Congo après 3 et 10 jours d'incubation à température ambiante ; observation au microscope optique en lumière blanche puis polarisée d'agrégats amorphes.

Une fois mélangé au peptide amyloïde, le rouge Congo empêche durant les deux premiers jours la formation de fibrilles, mais pas celle des protofibrilles (Figure 105).

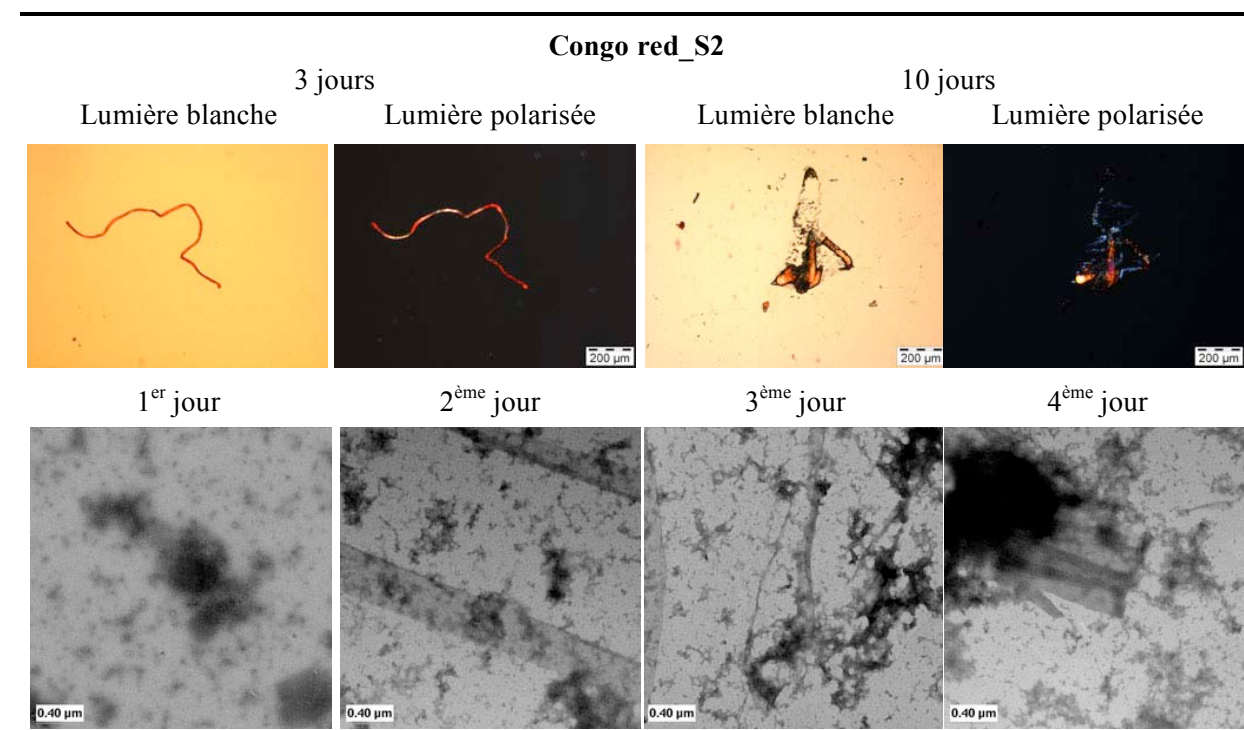


Figure 105 : Suivi de l'échantillon **Congo red_S2** par microscopie optique après coloration au rouge Congo (en haut) et par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (en bas) : en haut : détection de fibrilles dès trois jours d'incubation, caractérisées par une biréfringence vert-pomme sous une lumière polarisée ; en bas : protofibrilles dès le 1^{er} jour, fibrilles au bout de 3 jours.

Cet effet cependant ne dure pas, puisque, au cours du troisième jour, la microscopie électronique et la coloration au rouge Congo nous révèlent la présence de structures amyloïdes. Le rouge Congo a donc bien une action inhibitrice sur la fibrillogenèse de l'amyloïde β , mais il est beaucoup moins efficace que l'inhibiteur peptidique Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**6**). Cela correspond bien à ce que nous avons prévu dès le début de cette expérience.

Enfin, la Figure 106 est un récapitulatif des données obtenues en microscopie optique et électronique lorsque l'A β (13-23) se retrouvait mélangé à dix équivalents de l'une des trois molécules testées en tant qu'inhibiteur d'amyloïdogenèse, à savoir l'Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**6**), l'Ac-Leu-Val-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**7**) et le rouge Congo, et incubait pendant trois jours à température ambiante. Cette comparaison directe nous permet de conclure que la molécule **6** est la plus efficace, suivie de loin par le rouge Congo, puis par la molécule **7**.

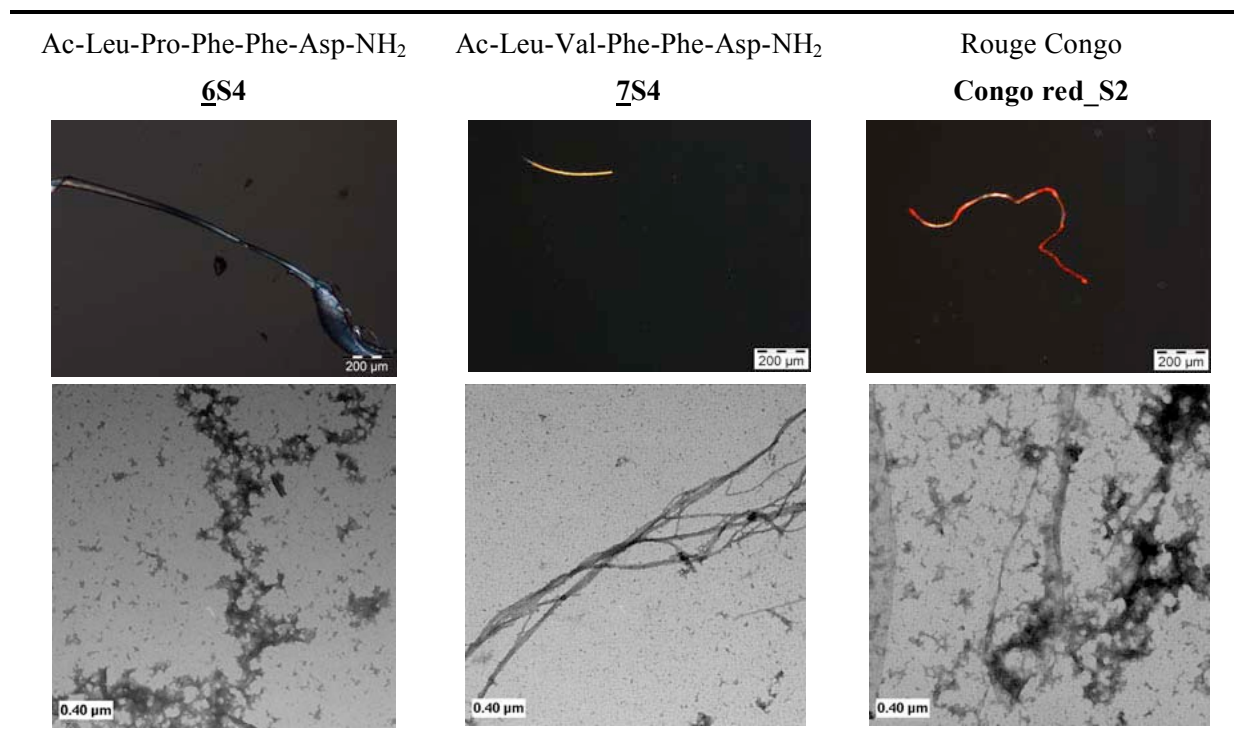


Figure 106 : Comparaison de l'état de la fibrillogenèse de l'A β (13-23) (**4**) en présence de 10 équivalents d'Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**6**; colonne de gauche), d'Ac-Leu-Val-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**7**; colonne du milieu) ou de rouge Congo (colonne de droite) au bout de trois jours d'incubation à température ambiante; photos du haut prises à travers un microscope optique sous lumière polarisée et après coloration au rouge Congo; photos du bas prises à travers un microscope électronique après coloration négative conventionnelle; **6S4**: pas de fibrilles détectées au rouge Congo, mais présence de protofibrilles; **7S4**: fibrilles en haut et en bas; **Congo red_S2**: fibrilles (haut et bas) mélangées à des protofibrilles (bas).

Ainsi, le système que nous avons utilisé ici se révèle être un outil fiable, bien que seulement qualitatif, permettant d'évaluer l'activité inhibitrice d'amyloïdogenèse de n'importe quelle molécule. Son avantage principal réside dans le fait que nous pouvons réaliser nous-même les expériences et obtenir relativement

rapidement des résultats. Cela nous permettra alors de déterminer quels sont nos meilleurs candidats afin de leur faire subir d'autres tests plus précis, tels que la coloration à la thioflavine T ou le test cellulaire d'évaluation de la cytotoxicité des amyloïdes.

IV. Evaluation de l'activité inhibitrice du peptide cyclique

Maintenant que nous sommes en mesure d'évaluer, de façon qualitative, la capacité, pour une molécule donnée, d'empêcher la fibrillogénèse de l'A β (13-23), nous allons pouvoir tester notre premier inhibiteur synthétisé, à savoir la cyclo(Lys-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu) (**3**). Pour cela, nous préparons plusieurs échantillons référencés dans le Tableau 15.

Composé	Echantillon	Concentration peptidique	Rapport 3/4
3	3S1	4 mM	
3+4	3S2	4 mM / 400 μ M	10 : 1
3+4	3S3	400 μ M / 400 μ M	1 : 1
3+4	3S4	400 μ M / 200 μ M	0.5 : 1

Tableau 15 : Liste des différents échantillons contenant le peptide cyclique cyclo(Lys-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu) (**3**), mélangé, ou non, à l'amyloïde A β (13-23) (**4**).

La solution **3S1** ne contient que le peptide cyclique. Son contenu est étudié au microscope optique après coloration au rouge Congo (Figure 107).

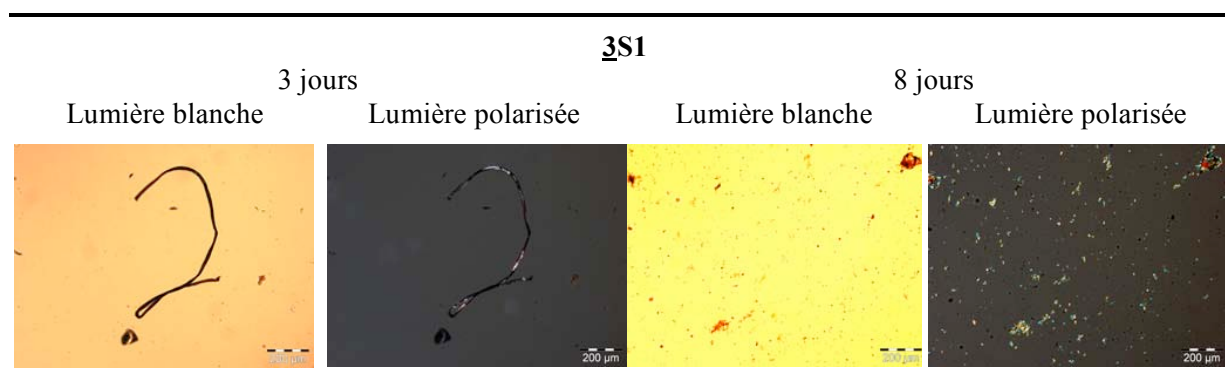


Figure 107 : Coloration au rouge Congo d'une solution ne contenant que le peptide cyclique (échantillon **3S1**) après 3 et 8 jours d'incubation à température ambiante ; observation au microscope optique sous une lumière blanche puis polarisée ; le peptide **3** précipite avec le temps pour former de petits agrégats prenant une coloration bleue ou verte sous une lumière polarisée.

Après huit jours d'incubation à température ambiante, le peptide forme de petits agrégats, certains devenant bleus sous la lumière polarisée, mais d'autres ayant une coloration vert-pomme. Il semble donc

que ce peptide cyclique **3** réagisse avec le Congo red, sans pour autant former de véritables filaments comme ceux que nous avons observés dans le cas de l'Aβ(13-23). Des études plus poussées, notamment par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle, devraient être en mesure d'expliquer ce phénomène plutôt singulier.

Une fois mélangé au peptide amyloïde **4** avec un excès de dix équivalents par rapport à la molécule pathogène (échantillon **3S2**), le peptide cyclique ralentit la formation de fibrilles d'Aβ(13-23), comme nous pouvons le voir par microscopie électronique dans la Figure 108. Nous observons la présence de protofibrilles dès le premier jour d'incubation, cependant il semblerait que quelques fibrilles, très courtes et non mures, soient déjà visibles dès le troisième jour. La microscopie optique avec lumière polarisée après coloration au rouge Congo révèle la présence de fibrilles dès le troisième jour d'incubation. Ces structures sont cependant relativement petites et présentes en faible quantité. Le huitième jour, l'échantillon présente des structures autour desquelles se greffent, semble-t-il, des agrégats similaires à ceux formés par le peptide cyclique seul (échantillon **3S1**) et donnant une couleur verte sous lumière polarisée.

Nous pouvons donc en déduire qu'avec un excès de dix équivalents, le peptide cyclique **3** est capable d'inhiber la formation des fibrilles d'Aβ(13-23) (**4**) au moins aussi bien que le rouge Congo, mais moins efficacement que le 5-mère Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**6**).

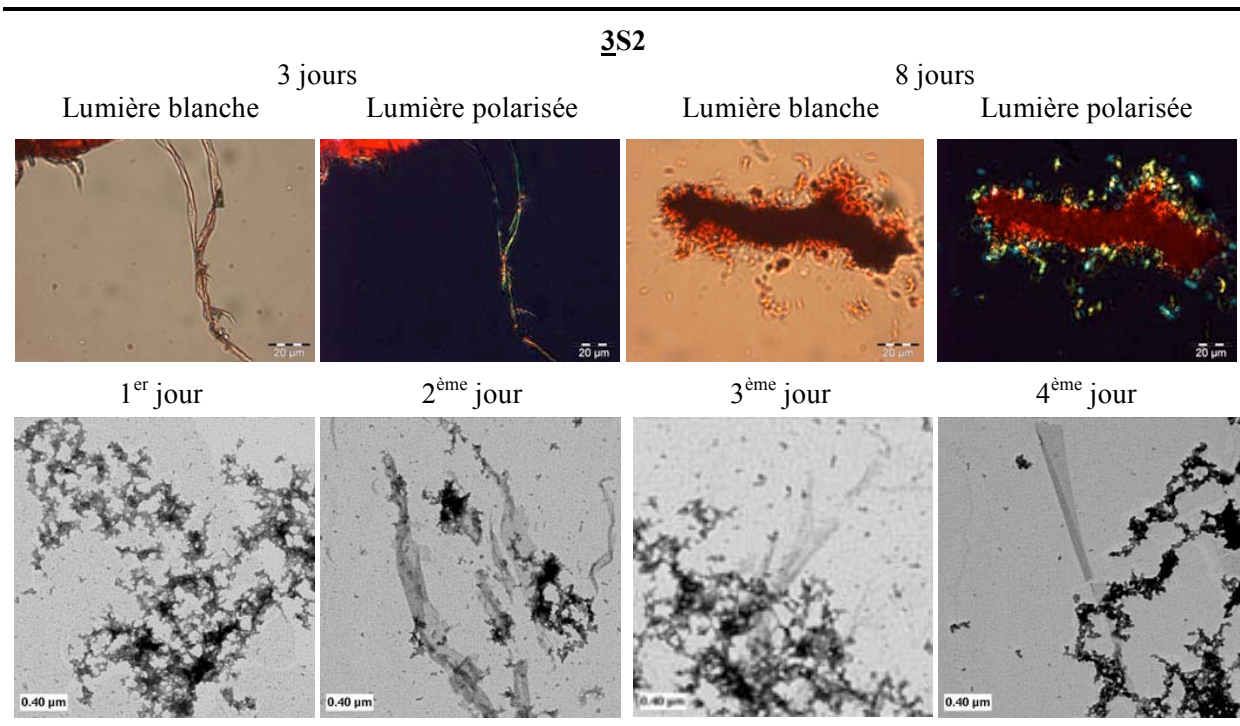


Figure 108 : Suivi de l'échantillon **3S2** par microscopie optique après coloration au rouge Congo (en haut) et par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (en bas) ; en haut : fibrilles détectées au bout de 3 jours (biréfringence vert-pomme sous une lumière polarisée) ; en bas : présence de protofibrilles dès le 1^{er} jour, et de quelques fibrilles courtes et non mures au bout de 3 jours.

La même expérience est réalisée avec un mélange équimolaire d'amyloïde et de peptide cyclique (échantillon **3S3**). Les images obtenues par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle ne montrent que des protofibrilles, mais aucunes fibrilles, et ce pendant les quatre premiers jours d'incubation des peptides à température ambiante (Figure 109). La solution peptidique, observée à son troisième jour d'incubation au microscope optique après coloration au rouge Congo, ne présente que très peu d'agrégats sans aucune biréfringence en lumière polarisée. Au bout de huit jours, nous commençons à apercevoir quelques amas et filaments rouges sous une lumière blanche, et verts sous une lumière polarisée.

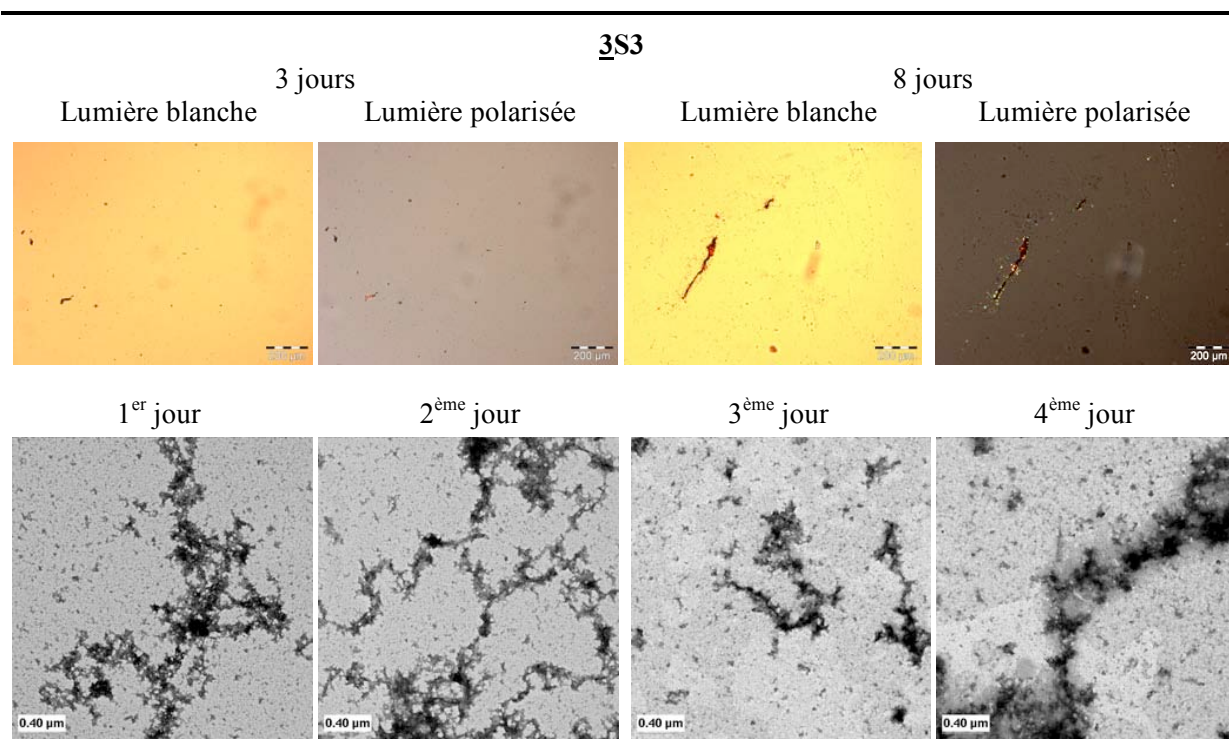


Figure 109 : Suivi de l'échantillon **3S3** par microscopie optique après coloration au rouge Congo (en haut) et par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (en bas) ; en haut : biréfringence vert-pomme sous une lumière polarisée, caractéristique de fibrilles, au bout de 8 jours ; en bas : présence uniquement de protofibrilles.

Il semblerait donc que ce mélange équimolaire de peptide cyclique et d'amyloïde inhibe beaucoup plus efficacement la fibrillogénèse de l'Aβ(13-23) qu'avec un excès de dix équivalents de la molécule **3**. Or nous avons vu précédemment, avec l'échantillon **3S1**, que la cyclo(Lys-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu), dissoute dans le mélange de solvants avec une concentration de 4 mM, avait tendance à précipiter et que les formations solides exhibaient une biréfringence vert-pomme sous une lumière polarisée. Nous pouvons donc imaginer que ce phénomène peut entrer en concurrence avec l'amyloïdogenèse du composé **4** dans l'échantillon **3S2** et fausser les résultats obtenus. Une autre hypothèse reste cependant envisageable. Il est tout à fait possible que la fibrillogénèse soit inhibée par le peptide cyclique, mais que son effet soit plus limité lorsqu'il est en large excès. Quoiqu'il en soit, avec un équivalent de cyclo(Lys-Leu-Pro-Phe-Phe-

Glu) (**3**), la formation de fibrilles d'A β (13-23) (**4**) est bloquée presque aussi efficacement qu'avec un équivalent d'Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**6**) (Figure 100, Figure 109).

Enfin, un équivalent de peptide cyclique est mélangé à deux équivalents d'amyloïde dans l'échantillon **3S4**, observé, après trois et huit jours d'incubation à température ambiante, au microscope optique après coloration au rouge Congo (Figure 110). Cette étude nous montre qu'il n'y a pas de fibrilles au bout de trois jours, mais qu'elles sont présentes au bout de huit jours. L'analyse de cette solution par microscopie électronique montre cependant que quelques fibrilles commencent à être obtenues dès le troisième jour d'incubation.

Si nous comparons ces résultats à ceux obtenus avec l'inhibiteur Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu-NH₂ (**6**, échantillon **6S5**, Figure 101), nous constatons que la cyclo(Lys-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu) (**3**) est potentiellement, avec cette concentration, plus active que le peptide 5-mère.

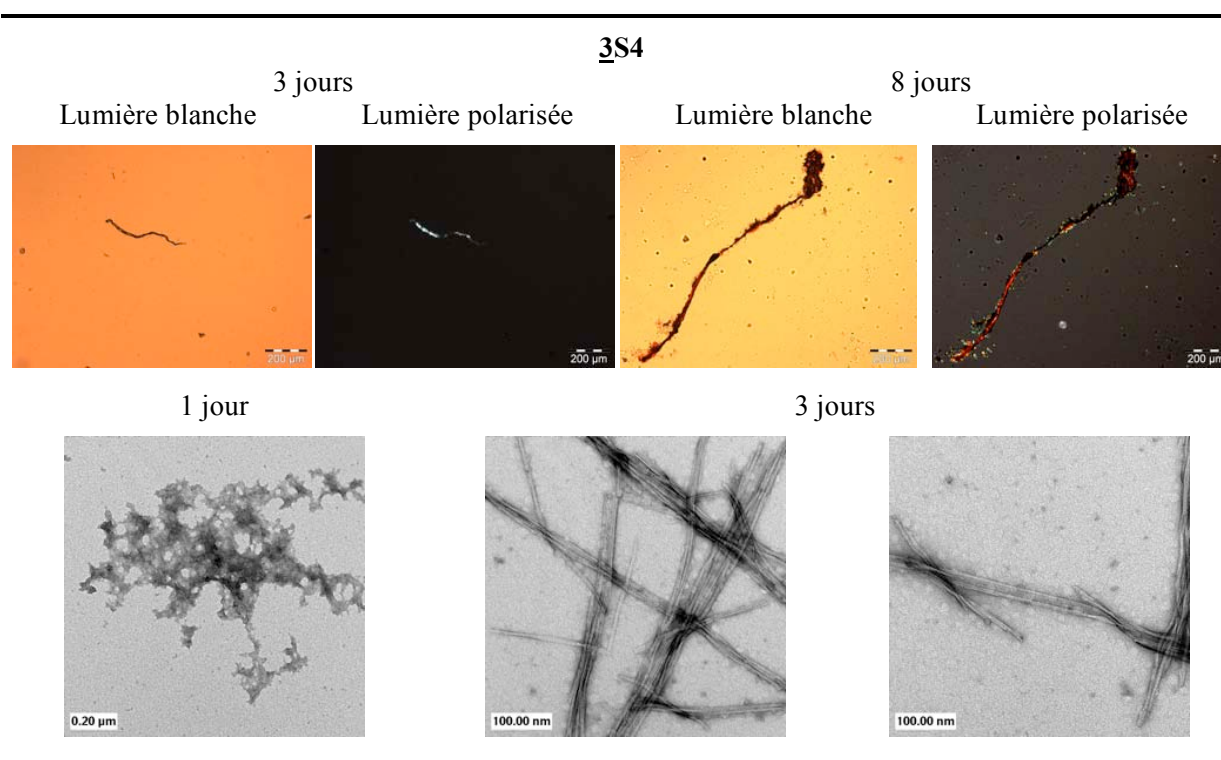


Figure 110 : Suivi de l'échantillon **3S4** par microscopie optique après coloration au rouge Congo (en haut) et par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (en bas) ; en haut : sous une lumière polarisée, biréfringence vert-pomme caractéristique de fibrilles observée uniquement après 8 jours ; en bas : protofibrilles le 1^{er} jour, puis fibrilles dès 3 jours.

Il serait donc intéressant d'étudier avec plus de précision le potentiel de cette nouvelle molécule, en la confrontant directement à la séquence complète de l'amyloïde β , l'A β (1-42). Ce travail est alors réalisé en collaboration avec C. Soto, de l'Université du Texas. La formation d'amyloïdes est évaluée quantitativement grâce à la mesure de l'émission de fluorescence de la thioflavine T liée aux fibrilles

amyloïdes. L'A β (1-42) incube pendant cinq jours à 37 °C en l'absence ou présence de dix équivalents de peptide cyclique **3**. Les résultats obtenus grâce à cette méthode montrent que le peptide cyclique **3** présente effectivement une certaine activité inhibitrice de l'amyloïdogénèse.

La cyclo(Lys-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu) (**3**) présente donc un certain potentiel d'inhibition de la fibrillogénèse de l'amyloïde β , cependant d'autres mesures devront être réalisées afin de confirmer les données présentées et de définir plus précisément quels sont les avantages à employer ce type de molécules contre les amyloses.

Chapitre 2 : Les peptides conjugués

I. Etat des connaissances bibliographiques

Les protéines conjuguées regroupent toutes les protéines couplées à une autre catégorie de molécule. Parmi elles, les glycoprotéines font partie des plus connues et les plus répandues dans la nature. Ces composés sont biosynthétisés suite à la glycosylation d'une protéine, qui, suivant l'acide aminé engagé dans cette réaction, conduit à une N- ou O-glycoprotéine²⁶⁴. Elles ont un rôle très important dans l'organisme, notamment en ce qui concerne la régulation de la réponse inflammatoire, la communication intercellulaire ou la différenciation des cellules. Ainsi, la glycoprotéine P, principalement présente dans les cellules du foie, des tubules des reins, de la muqueuse du côlon et dans les endothéliums vasculaires du cerveau et des testicules, permet d'évacuer hors des cellules toute substance étrangère ou toxine²⁶⁵. Cependant, en 1986, elle fut identifiée comme étant l'une des causes majeures de chimiorésistance des cancers. En effet, sa fonction de détoxication est souvent mise à profit par les cellules cancéreuses pour éliminer les médicaments anticancéreux. Ainsi, en général, les glycoprotéines sont souvent impliquées dans la propagation des différents types de cancers. C'est d'ailleurs une des raisons expliquant le fait qu'elles fassent l'objet de nombreuses études approfondies.

Les métalloprotéines forment un autre sous-groupe de protéines conjuguées²⁶⁶. Elles définissent des protéines contenant un cofacteur métallique, ce métal pouvant être soit un ion isolé, soit coordonné avec un composé organique non protéinique, comme la porphyrine des hémoprotéines²⁶⁷ ou la calmoduline²⁶⁸, soit co-coordonné avec une chaîne latérale de protéines et un ion minéral non métallique, structure rencontrée dans les clusters fer-soufre²⁶⁹.

Ainsi, les protéines conjuguées sont parmi les éléments essentiels au bon fonctionnement des organismes vivants. Leur utilisation, plutôt sous forme de peptides conjugués, fait désormais partie des stratégies couramment utilisées pour lutter efficacement contre la fibrillogénèse de l'amyloïde β . De ce fait, nous nous sommes intéressés de près à la possibilité de combiner une molécule organique capable de bloquer la formation d'amyloïdes avec une séquence de reconnaissance peptidique de l'amyloïde β , ce qui devrait nous permettre d'obtenir une nouvelle génération d'inhibiteurs spécifiques et puissants (voir Chapitre 2, Considérations générales).

La Figure 111 montre quelques exemples de structures organiques capables de perturber la formation d'amyloïdes. Parmi elles, nous retrouvons le rouge Congo¹⁸⁷, l'estrogène, la mélatonine, ainsi que la nicotine et l'aspirine²⁷⁰ (non représentée dans la Figure 111). L'utilité de ces molécules est cependant fortement compromise par leur manque de spécificité, l'ignorance de leur mécanisme d'action, leur difficulté à traverser la barrière hématoencéphalique, la concentration élevée requise pour qu'elles soient

véritablement efficaces, et souvent par leur toxicité¹⁸⁷. Leur couplage avec un peptide de reconnaissance de l'amyloïde β devrait alors pouvoir palier à certaines de ces faiblesses.

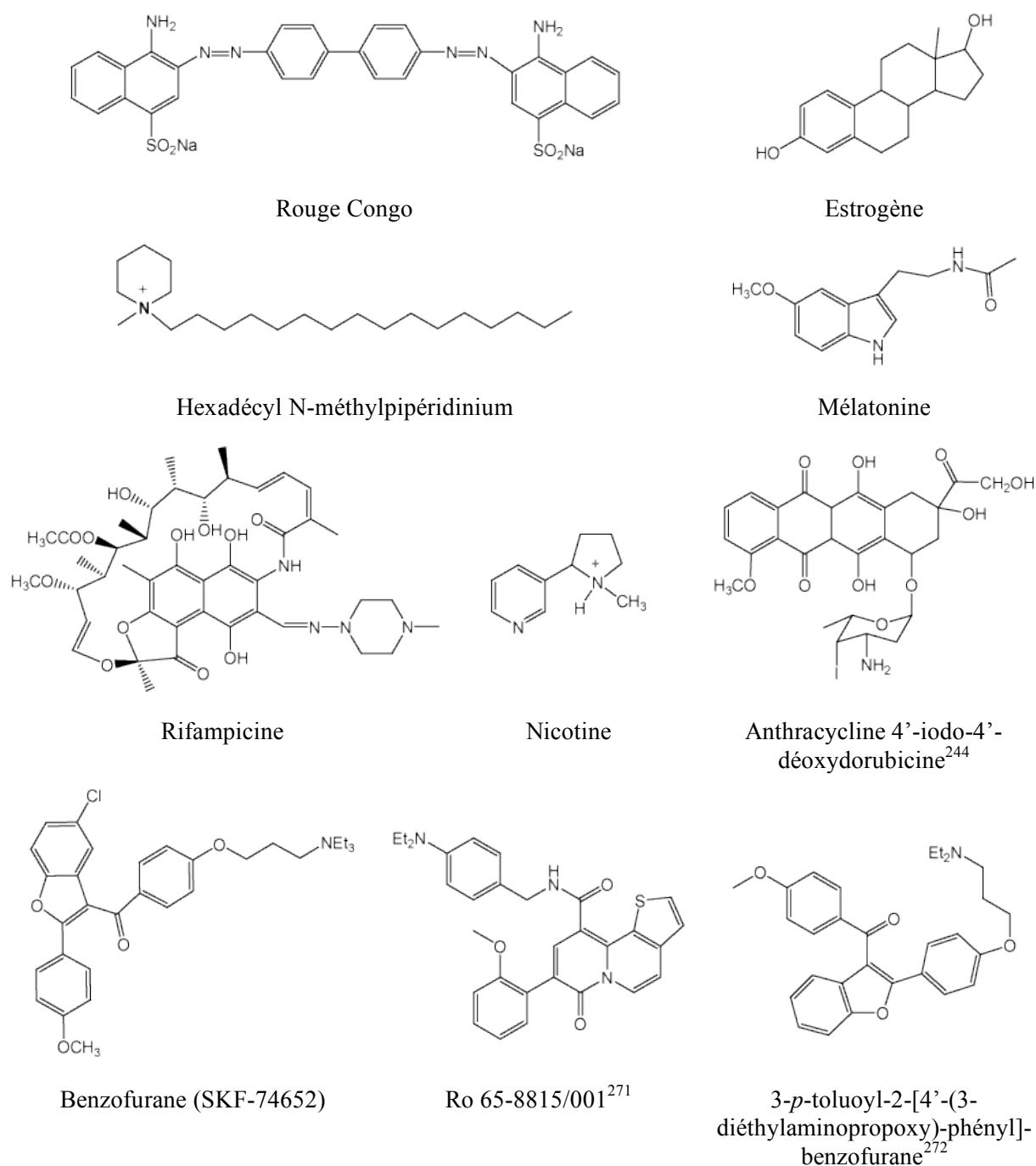


Figure 111 : Exemple de quelques molécules organiques qui préviennent, *in vitro*, soit la formation des fibrilles d'amyloïde β , soit leur toxicité, soit les deux¹⁸⁷.

Il existe déjà quelques exemples de ce type de molécules conjuguées. En 1999, S. M. Molineaux et ses collaborateurs améliorèrent l'activité inhibitrice du peptide Leu-Val-Phe-Phe-Ala en le combinant, au niveau de sa partie N-terminale, à d'autres réactifs organiques afin de créer une nouvelle génération

d'inhibiteurs peptidoorganiques puissants²⁷³. Leur chef de file, le cholyl-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-OH fut ensuite modifié de façon à ce que son activité inhibitrice soit conservée mais que sa stabilité enzymatique soit améliorée (Figure 112).

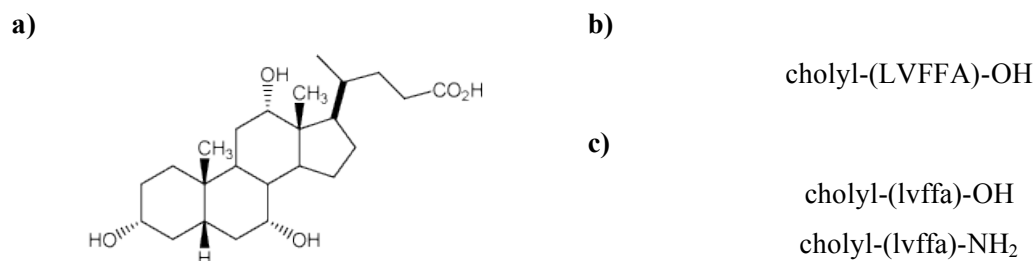


Figure 112 : a) Structure de l'acide cholique; b) structure du chef de file découvert par Morineaux ; c) structure des deux composés modifiés plus stables que le chef de file ; code des acides aminés à une lettre ; les lettres minuscules correspondent aux acides aminés de configuration D²⁷³.

Si nous étudions d'un peu plus près les molécules présentées dans la Figure 111, nous constatons que la plupart de ces composés contiennent un, voire plusieurs cycles aromatiques.

Les interactions aromatiques-aromatiques, de type empilement π , sont connues pour stabiliser les structures globulaires des protéines^{274, 275}. Des études plus approfondies ont démontré leur rôle au niveau de certaines conformations hélicoïdales²⁷⁶, ainsi que dans les processus de reconnaissance moléculaire et d'agrégation fibrillaire de peptides amyloïdiques²⁷⁷. Ces résultats suggèrent ainsi que les cycles aromatiques soient capables de contribuer à la reconnaissance entre l'inhibiteur et l'amyloïde β .

Dès lors, l'une des stratégies envisagées pour bloquer la fibrillogénèse de l'amyloïde β , proposée notamment par E. Gazit en 2002²⁷⁷, est d'utiliser, cette fois, un noyau aromatique comme élément de reconnaissance du peptide amyloïde, et de le connecter à un destructeur de feuillets β (Figure 113).

Cette idée fut ensuite reprise et développée par J. E. Gestwicki, qui utilisa le rouge Congo comme élément de reconnaissance d'amyloïdes et le combina à un élément de recrutement, nommé SLF (Synthetic Ligand for FKBP), ligand synthétique capable de se lier de façon spécifique à la protéine chaperon de liaison FK506 (FKBP, pour FK506 Binding Protein)^{278, 279}. Ainsi, en présence d'amyloïde β , la molécule bivalente interagit d'un côté avec les fibrilles en cours de formation grâce au rouge Congo et de l'autre avec le chaperon, créant ainsi une unité stériquement très encombrée qui perturbe l'agrégation fibrillaire.

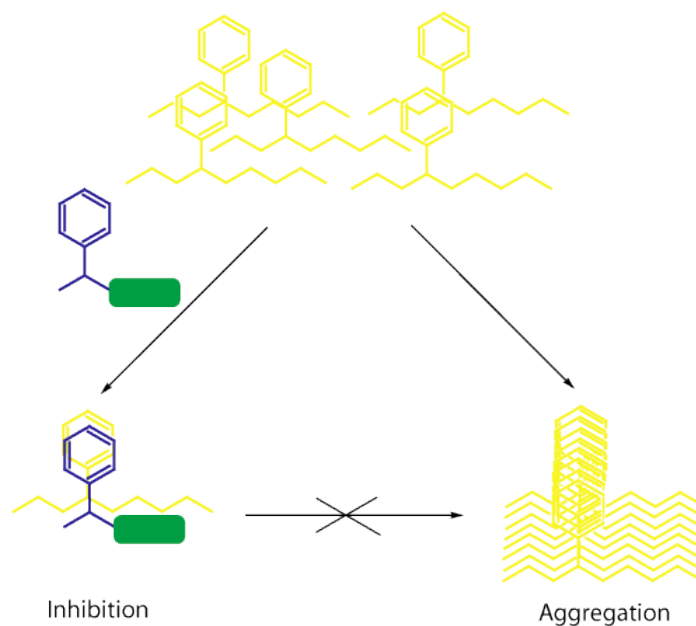


Figure 113 : Une stratégie envisagée pour inhiber l'amyloïdogenèse : utilisation d'un cycle aromatique comme élément de reconnaissance (en bleu) du peptide pathogène (en jaune), et destruction des fibrilles grâce à l'élément perturbateur (en vert) de feuillets β voisins²⁷⁷.

Dans le cadre de travail, qui consiste à concevoir de nouveaux inhibiteurs d'amyloïdogenèse, nous avons choisi d'utiliser un élément organique qui agirait comme un destructeur de feuillets β , et de le combiner avec la séquence de reconnaissance peptidique de l'amyloïde β Phe-Phe (Figure 114, voie IIa), que nous avons déjà utilisé dans le design de notre molécule cyclique **3**, la cyclo(Lys-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu) (voir Chapitre 2, II, de cette partie).

Nous envisageons aussi d'insérer une proline entre ces deux unités afin d'introduire, dans la structure de cette nouvelle série d'inhibiteurs, un coude dynamique initié par l'isomérisation cis-trans de cet acide aminé (Figure 114, voie IIb).

Il nous reste donc à choisir l'élément organique que nous allons utiliser pour construire nos peptides conjugués. Les molécules présentées dans la Figure 111 ne possèdent pas d'acide carboxylique nous permettant de les relier à la partie N-terminale du peptide de reconnaissance. Il nous faut donc utiliser des dérivés de ces structures qui soient correctement fonctionnalisés.

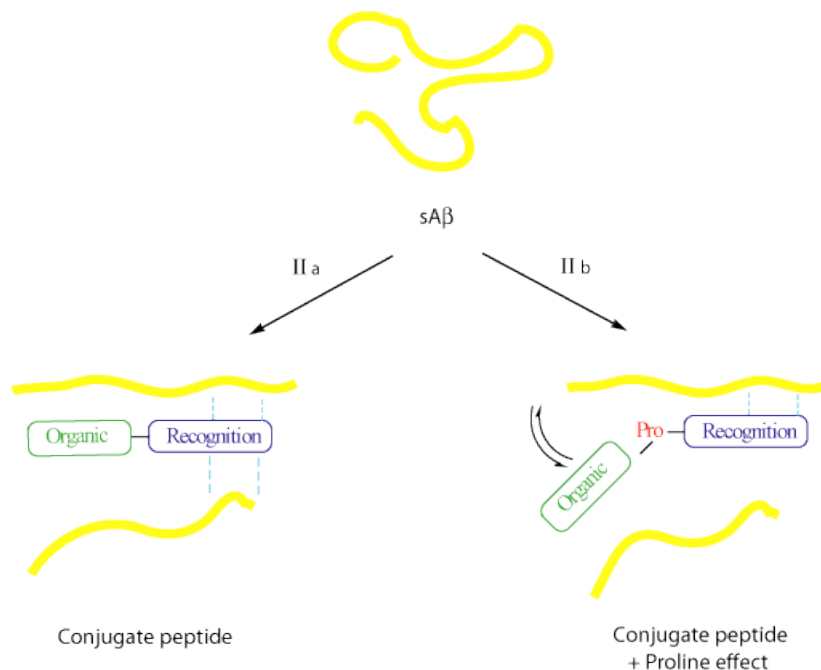


Figure 114 : Stratégie d'inhibition de la fibrillogenèse de l'amyloïde β utilisant les peptides conjugués ; deux voies sont envisageables, celle combinant directement un inhibiteur organique (en vert) à une séquence de reconnaissance peptidique (en bleu) (voie IIa), et celle intercalant entre ces deux unités une proline (en rouge), permettant d'introduire un coude dynamique dans la structure (voie IIb).

L'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique²⁸⁰ a une structure relativement proche de celle de la nicotine (Figure 115).

La nicotine est le produit principal de la fumée de cigarette. Elle est majoritairement métabolisée dans l'organisme en cotinine, après oxydation par le cytochrome P450 présent dans le foie. Si la nicotine inhibe la formation des fibrilles, la cotinine est elle-aussi connue pour ralentir la fibrillogenèse du peptide pathogène, bien qu'elle soit un peu moins efficace²⁴². Le mécanisme de ce phénomène n'est pas encore élucidé. Nous savons néanmoins que la pyridine et la N-méthylpyrrolidine seules ont plutôt tendance à accélérer le processus d'agrégation qu'à le bloquer²⁴².

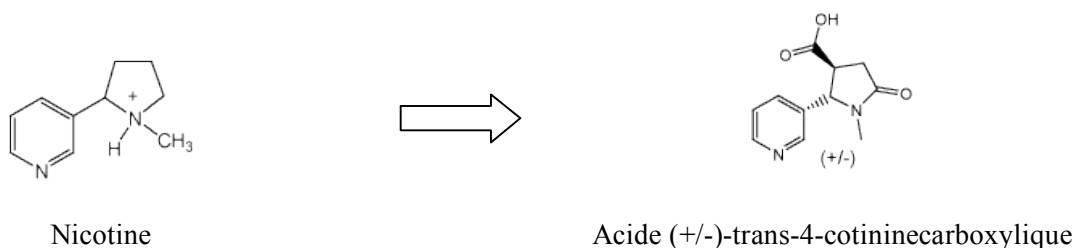


Figure 115 : Structures chimiques d'un inhibiteur amyloïde, la nicotine (à gauche), et d'une molécule dérivée, l'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique (à droite).

L'utilisation de l'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique nous semble donc être un bon compromis alliant une structure active à la fonction carboxylique qui nous est nécessaire à la dérivatisation du produit.

La structure de l'acide 3-indolebutyrique peut être jugée relativement similaire à celle de la mélatonine (Figure 116).

Hormone sécrétée par la glande pinéale, ou épiphyse, localisée dans le cerveau, la mélatonine est synthétisée à partir du tryptophane, initialement hydroxylé puis décarboxylé en sérotonine^{281, 282, 283}. Cette molécule est ensuite N-acétylée par la N-acétyl-transférase, étape régulatrice de cette biosynthèse, terminée par une réaction de méthylation. La mélatonine permet de synchroniser les rythmes biologiques circadiens internes avec le rythme externe imposé par l'environnement, à savoir l'alternance jour-nuit²⁸⁴. Sa sécrétion débute le soir sous l'action de l'obscurité et entraînerait l'endormissement. Elle possède entre autres une activité antioxydante, et aurait une action anticancéreuse, stimulerait les défenses immunitaires et protégerait le système nerveux central, bien que ces dernières propriétés restent à confirmer²⁸⁴.

L'acide 3-indolebutyrique se différencie de la mélatonine par l'absence du groupe méthyléther localisé sur le cycle benzénique de l'indole, et la présence d'une fonction carboxylique au lieu d'un acétamide. De ce fait, la chaîne carbonnée du dérivé organique est plus flexible que celle de la mélatonine. Il y a aussi moins de sites pouvant être impliqués dans des liaisons hydrogènes intermoléculaires.

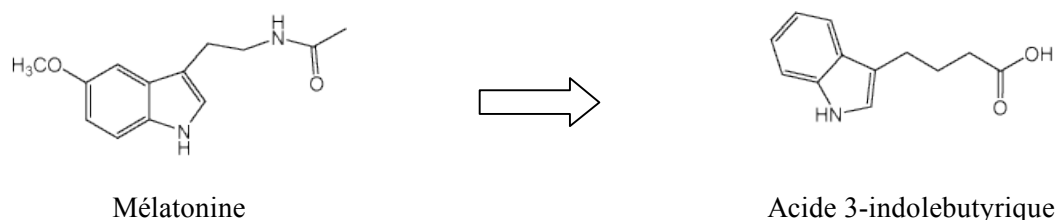


Figure 116 : Structure chimique de la mélatonine, inhibiteur amyloïde (à gauche), et d'une molécule organique fonctionnalisée par un acide carboxylique, l'acide 3-indolebutyrique (à droite).

Enfin, le troisième composé que nous allons utiliser pour ce projet n'appartient pas à la liste des petites molécules organiques inhibitrices de l'amyloïdogenèse. Nous avons souhaité étendre les applications de cette stratégie aux mimes de brins β , en couplant la séquence de reconnaissance peptidique suivie d'une proline, à la molécule Hao, abréviation donnée pour rappeler la succession des groupes Hydrazine, acide 5-Amino-2-méthoxybenzoïque et acide Oxalique de ce composé (HAO)²⁸⁵ (Figure 117).

L'utilisation de mimes de brins β contrariant la formation et la reconnaissance des feuillettes β fait désormais partie des stratégies thérapeutiques établies dans la lutte contre les amyloses et autres maladies liées à la présence de ce type de structures secondaires²⁸⁶. Bien que de nombreux efforts restent encore à

fournir afin de découvrir si les nouvelles molécules conçues par les chercheurs miment parfaitement ou non les brins β , il en existe déjà de nombreux modèles.

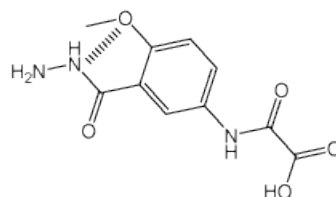


Figure 117 : Structure de l'acide aminé non-naturel Hao, abréviation décrivant la succession des fonctions Hydrazine, acide 5-Amino-2-méthoxybenzoïque et acide Oxalique (HAO)²⁸⁵.

Parmi eux, certaines matrices, développées entre autres par M. Feigel²⁸⁷ ou J. W. Kelly²⁸⁸, permettent de rapprocher deux séquences peptidiques et d'initier la formation d'un réseau de liaisons hydrogène intramoléculeaires (Figure 118a et b). Les structures de ces matrices furent ensuite modifiées, notamment par D. S. Kemp²⁸⁹, de manière à obtenir une superposition de trois brins β (Figure 118c).

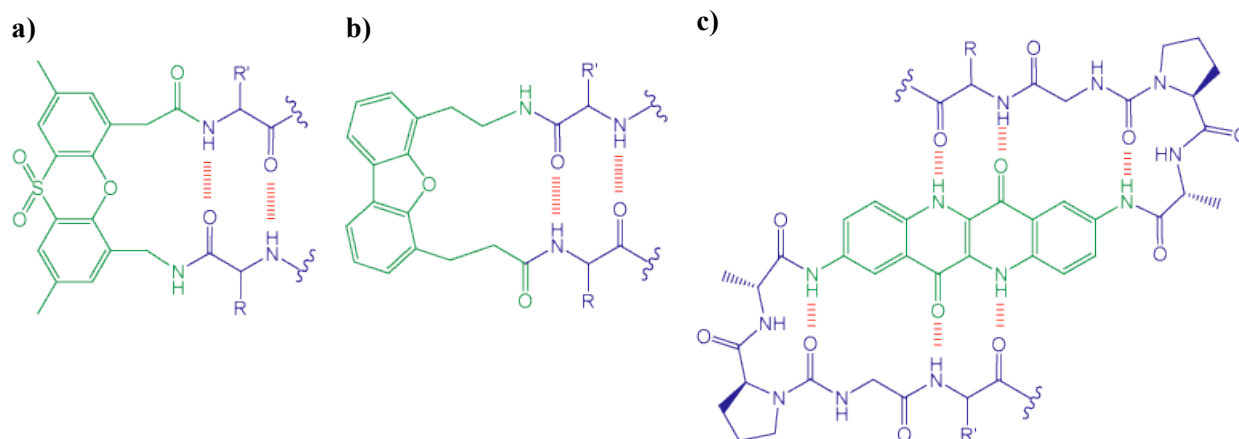
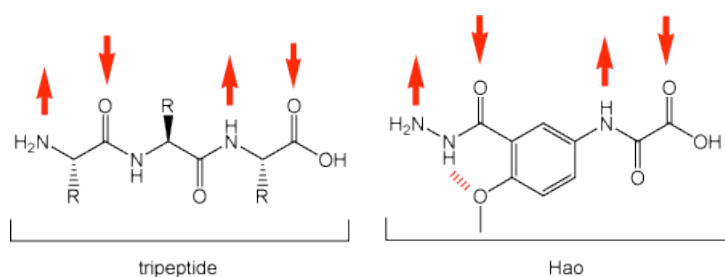


Figure 118 : Exemples de mimes de brins β : **a)** la 2,8-diméthyl-4-(carboxyméthyl)-6-(aminométhyl)phénoxathiin S-dioxyde de M. Feigel²⁸⁷ ; **b)** le dérivé dibenzofurane de J. W. Kelly²⁸⁸ ; **c)** le mime tétracyclique de Kemp²⁸⁹ ; en vert, la structure du mime, en bleu, la séquence peptidique couplée au mime et adoptant une conformation en feuillet β , en rouge, la liaison hydrogène intramoléculeaire.

La molécule Hao, conçue par J. S. Nowick en 2000²⁸⁵, est une version simplifiée d'un brin β tripeptidique, qui reproduit le motif des liaisons hydrogène localisées sur une face d'un brin β pour former un mime de feuillet β dimérique (Figure 119). Son intégration dans un modèle de peptide conjugué de type IIb d'après notre stratégie, (Figure 114) devrait alors nous permettre de synthétiser un puissant inhibiteur de la fibrillogénèse de l'amyloïde β .

a)



b)

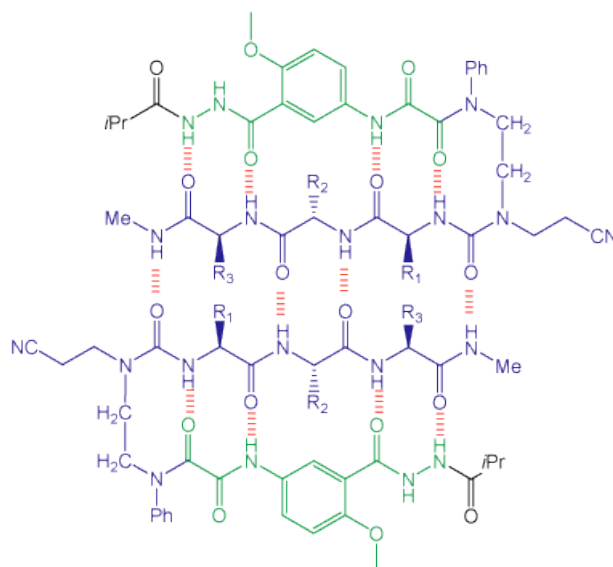


Figure 119 : **a)** Comparaison entre un tripeptide et la molécule Hao : les groupes donneurs (flèche montante rouge) et accepteurs (flèche descendante rouge) de liaisons hydrogène (pointillés rouges) sont localisés aux mêmes niveaux dans les deux cas ; **b)** représentation d'un feuillet β dimérique intégrant le mime Hao (en vert, peptide en bleu et liaisons hydrogène en rouge)²⁸⁵.

II. Génération de nouveaux peptides conjugués

1. Synthèse de dérivés de cotinine

Les premiers exemples de peptides conjugués que nous allons synthétiser considèrent l'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique comme un mime fonctionnalisé de la cotinine.

Dans un premier temps, nous allons coupler cette molécule directement à la séquence de reconnaissance Phe-Phe-Asp-NH₂. La nouvelle molécule dessinée devrait alors reconnaître les phénylalanines 19 et 20 de l'amyloïde par l'intermédiaire ses deux phénylalanines consécutives, tandis que le motif cotinine inhiberait la formation de ces feuillets β , selon un mécanisme actuellement inconnu (Figure 120).

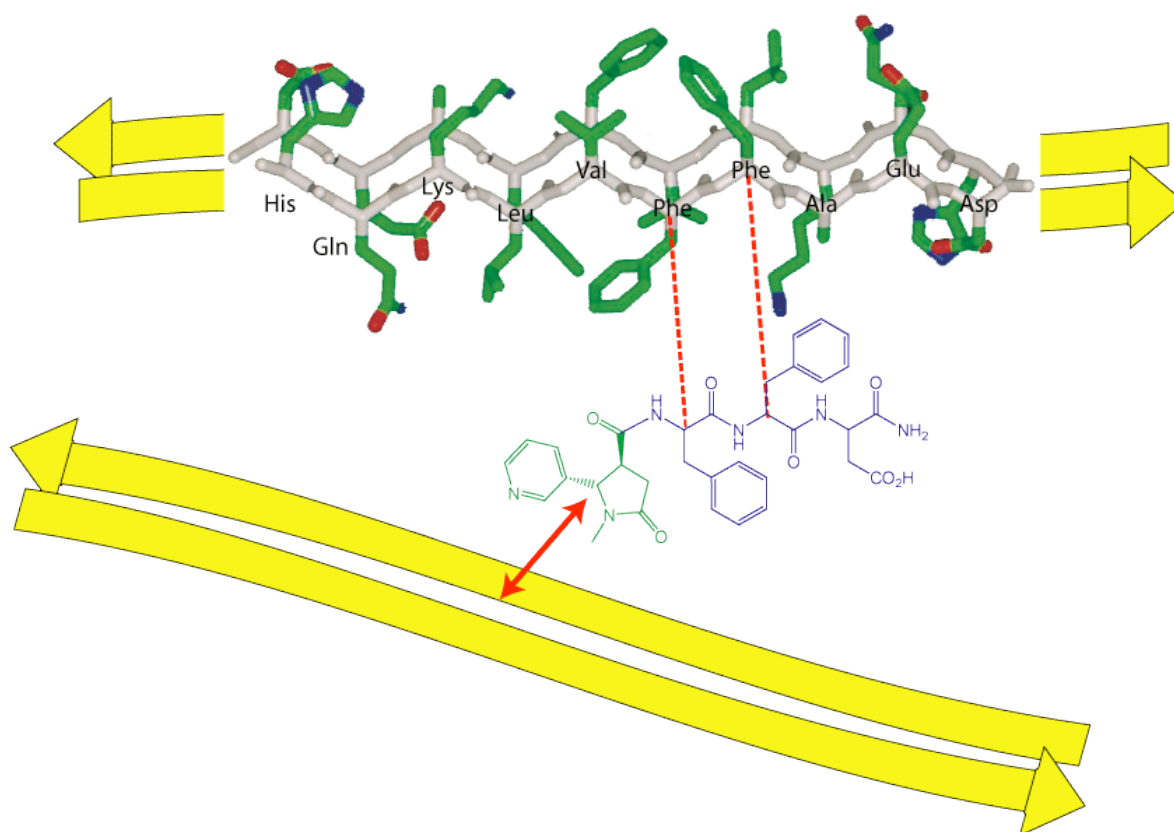


Figure 120 : Représentation schématique des interactions envisagées entre le mime peptidique (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**8**) et un dimère de l'Aβ(14-23)²²³ : les deux phénylalanines (en bleu) de l'inhibiteur potentiel devraient se lier aux phénylalanines 19 et 20 du peptide pathogène, tandis que la cotinine (en vert) serait en mesure d'inhiber la formation d'autres brins β selon un mécanisme actuellement inconnu ; ces deux effets, celui de la trimère peptidique et celui du mime de la cotinine, devraient alors entrer en compétition, destabilisant l'enchaînement normal des feuillettes β de l'amyloïde et entraînant un arrêt de leur propagation ; les pointillés rouges symbolisent les interactions existant entre les deux résidus désignés par l'extrémité des traits au niveau de leur C_α ; la flèche rouge représente l'effet destructeur du dérivé cotinique sur les fibrilles.

Le (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**8**) est synthétisé en phase solide sur une résine Rink Amide MBHA, qui permet de déprotéger la chaîne latérale de l'acide aspartique en même temps que de cliver le peptide de la résine (Figure 121). La molécule est alors obtenue sous un mélange diastéréoisomérique entre le (+)-trans-4-cotininecarboxylyl-Phe-Phe-Asp-NH₂ et le (-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Phe-Phe-Asp-NH₂. Une purification par RP-HPLC préparative sur colonne C₁₈ nous donne deux fractions du produit **8**, la fraction **8a** contenant majoritairement le diastéréoisomère le plus hydrophile (composé **8a**) et la fraction **8b** principalement composée du diastéréoisomère le plus hydrophobe (molécule **8b**) (Figure 122).

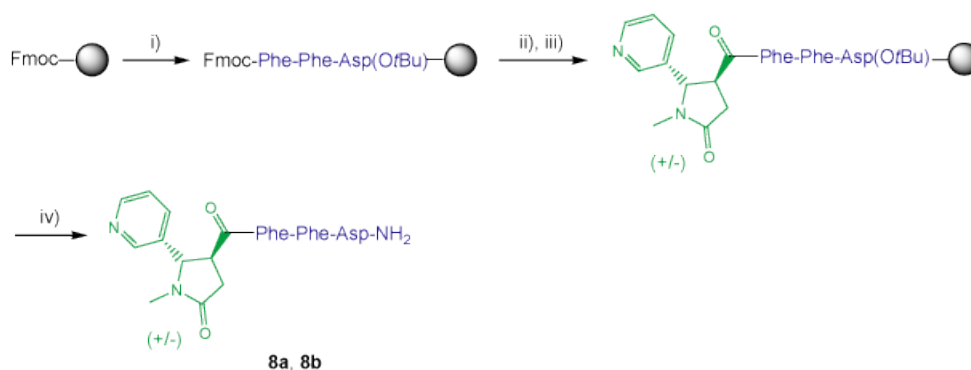


Figure 121 : Synthèse des diastéréoisomères (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**8a** et **8b**) : i) SPPS sur résine Rink Amide MBHA, en stratégie Fmoc/tBu ; ii) déprotection du Fmoc : 20 % pipéridine/DMF (5 x 2 min, r.t.) ; iii) couplage de l'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique après sa préactivation avec du PyBOP (préactivation : 15 min, r.t. ; couplage : 2 x 1h, r.t.) ; iv) clivage de la résine et déprotection de la chaîne latérale de l'acide aspartique : TFA/TIS/H₂O (95 : 2.5 : 2.5, v/v/v, 1h30, r.t.) ; purification par RP-HPLC préparative sur colonne C₁₈ (10 à 40 % B en 30 min) donnant deux fractions, l'une contenant majoritairement le diastéréoisomère **8a**, l'autre contenant majoritairement le diastéréoisomère **8b** ; rendement : 40 %.

L'étude de l'intégration des deux pics suivant leur absorbance à 214 nm nous permet de déterminer la quantité de chaque diastéréoisomère alors présent dans les deux fractions. Ainsi, nous constatons que la fraction **8a** est composée à 77 % par le diastéréoisomère **8a** et à 23 % par le diastéréoisomère **8b**, tandis que la fraction **8b** comporte 15 % de la molécule **8a** et 85 % du produit **8b**.

Une séparation des deux diastéréoisomères **8a** et **8b** se justifierait dans le cas où ce composé se révélerait actif. Dès lors, nous nous sommes contentés d'utiliser le produit **8** tel quel afin d'évaluer son activité inhibitrice d'amyloïdogenèse, avant de décider s'il fallait ou non poursuivre cette étape de purification.

L'activité du (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**8**) est évaluée en le mettant en contact avec l'Aβ(13-23) (**4**) et en suivant la progression de la fibrillogenèse du peptide pathogène par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle et par microscopie optique après coloration au rouge Congo.

L'influence de la séquence de reconnaissance Phe-Phe-Asp-NH₂ sur le groupe (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique est appréciée en testant tout d'abord la capacité d'inhibition de l'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique seul.

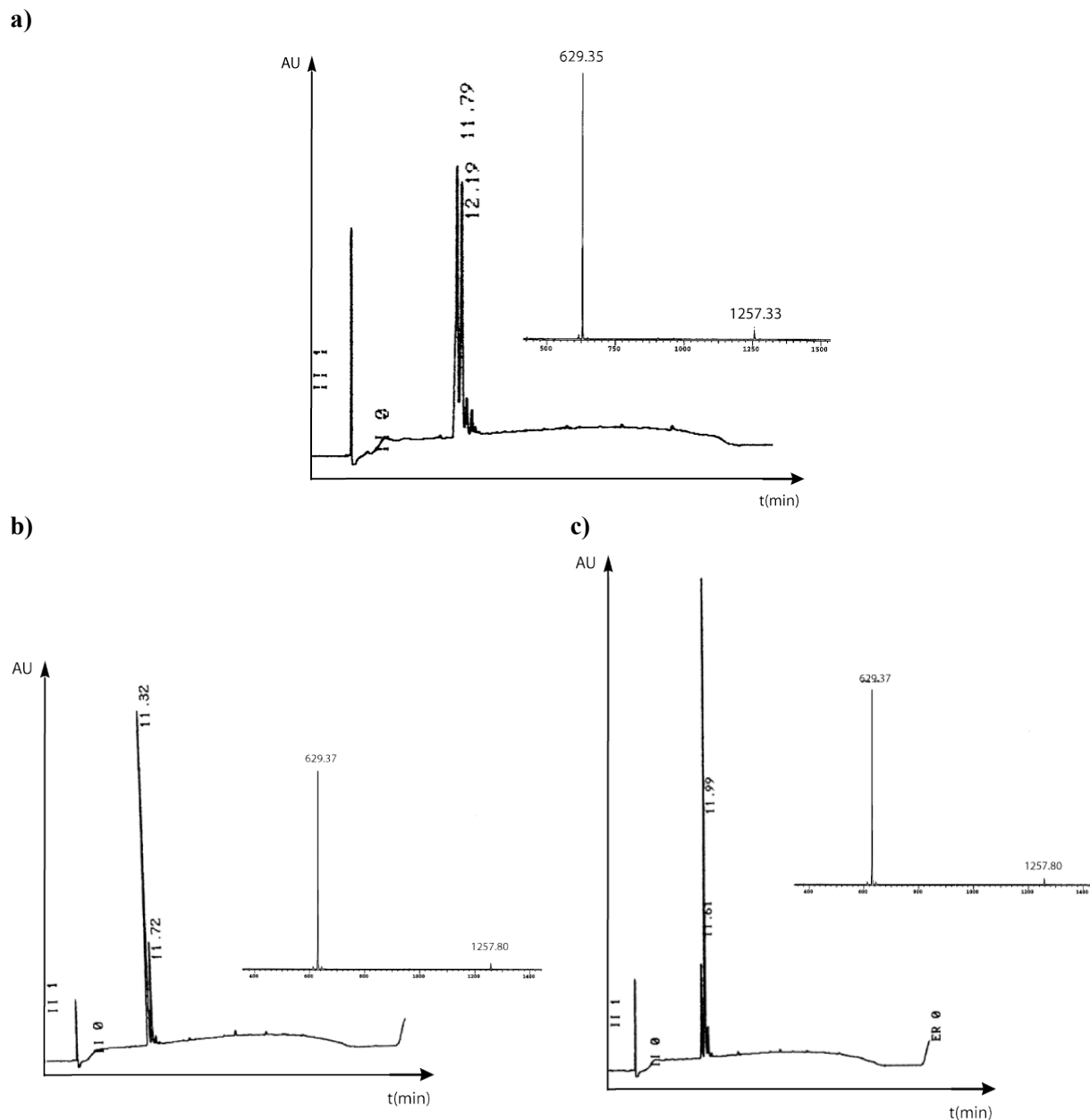


Figure 122 : Caractérisation de (**8a** et **8b**) **a)** avant purification : RP-HPLC analytique sur colonne C_{18} (gradient : 5 à 100 % B en 30 min ; $R_t = 11.79$ et 12.19 min) et spectre ESI-MS ($629.35 = [M+H]^+$; $1257.33 = [2M+H]^+$) ; **b)** après purification, diastéréoisomère **8a** majoritaire : RP-HPLC analytique sur colonne C_{18} (gradient : 5 à 100 % B en 30 min ; $R_t = 11.31$ et 11.72 min) et spectre ESI-MS ($629.37 = [M+H]^+$; $1257.80 = [2M+H]^+$) ; **c)** après purification, diastéréoisomère **8b** majoritaire : RP-HPLC analytique sur colonne C_{18} (gradient : 5 à 100 % B en 30 min ; $R_t = 11.61$ et 11.99 min) et spectre ESI-MS ($629.37 = [M+H]^+$; $1257.80 = [2M+H]^+$).

Pour cela, nous préparons deux échantillons d'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique, noté **Cotinine** pour simplifier (Tableau 16). Le premier, **Cotinine_S1**, ne contient que l'acide, sans le peptide amyloïde. Son contenu est suivi par coloration au rouge Congo et observation au microscope optique (Figure 123). Nous nous apercevons que la molécule a tendance à précipiter et à former de longs filaments de couleur bleutée sous une lumière polarisée.

Composé	Echantillon	Concentration	Rapport Produit/ <u>4</u>
Cotinine	Cotinine_S1	4 mM	-
Cotinine + <u>4</u>	Cotinine_S2	4 mM / 400 μ M	10 : 1

Tableau 16 : Liste des différents échantillons contenant l'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique, noté pour des raisons de simplification **Cotinine**, mélangé ou non à l'A β (13-23) (4).

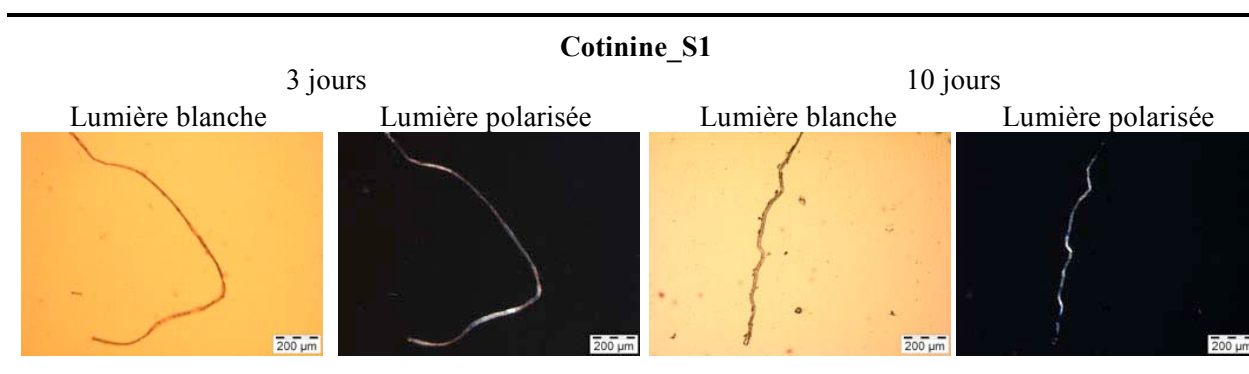


Figure 123 : Coloration au rouge Congo d'une solution d'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique (**Cotinine_S1**) après 3 et 10 jours d'incubation à température ambiante, observée au microscope optique sous une lumière blanche et sous une lumière polarisée ; la molécule précipite avec le temps pour former de longs filaments apparaissant bleus sous une lumière polarisée.

L'étude de l'échantillon **Cotinine_S2**, dans lequel dix équivalents d'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique sont mélangés à un équivalent d'A β (13-23) (4), révèle la propriété d'inhibition d'amyloïdogenèse de la molécule. En effet, aucune fibrille n'est mise en évidence après trois jours d'incubation à température ambiante, ni après coloration au rouge Congo, ni en microscopie électronique, qui nous prouve cependant qu'une certaine quantité de protofibrilles commence à se former (Figure 124). Par contre, cet effet inhibiteur est limité puisque nous observons quelques fibrilles révélées par une coloration au rouge Congo et une observation sous une lumière polarisée après dix jours d'incubation. L'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique possède donc des propriétés inhibitrices de la formation de fibrilles d'amyloïde β .

Nous allons maintenant pouvoir juger si la combinaison de cette molécule organique avec la séquence de reconnaissance peptidique Phe-Phe-Asp-NH₂ permet d'améliorer ou non ses propriétés inhibitrices et d'obtenir un inhibiteur plus puissant.

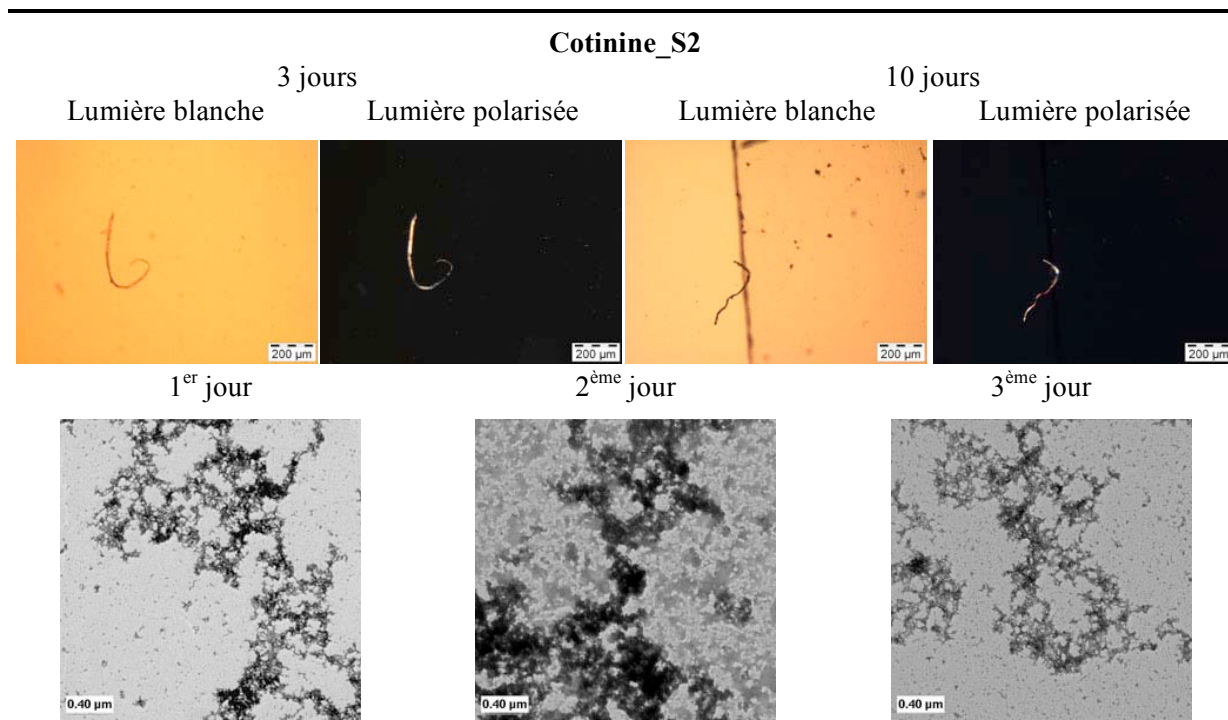


Figure 124 : Suivi de l'échantillon **Cotinine_S2** par microscopie optique après coloration au rouge Congo (en haut) et par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (en bas) : en haut : fibrilles observées après 10 jours d'incubation à température ambiante, caractérisées par une biréfringence vert-pomme sous une lumière polarisée ; en bas : protofibrilles dès le 1^{er} jour, pas de fibrilles observées.

Le comportement de la fraction **8a** du composé (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**8**) est alors analysé grâce à une coloration au rouge Congo et une visualisation au microscope optique (échantillon **8aS1**, Tableau 17, Figure 125).

Composé ou fraction	Echantillon	Concentration peptidique	Rapport 8a/4
8a	8aS1	4 mM	
8a + 4	8aS2	4 mM / 400 μM	10 : 1

Tableau 17 : Liste des différents échantillons contenant la fraction **8a** du composé (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**8**).

Nous constatons que la fraction **8a** du (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**8**) forme, contrairement à l'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique seul, de petits agrégats amorphes au bout de trois jours d'incubation, qui évoluent pour donner quelques filaments semblables à celui montré dans la Figure 125 au bout de dix jours d'incubation.

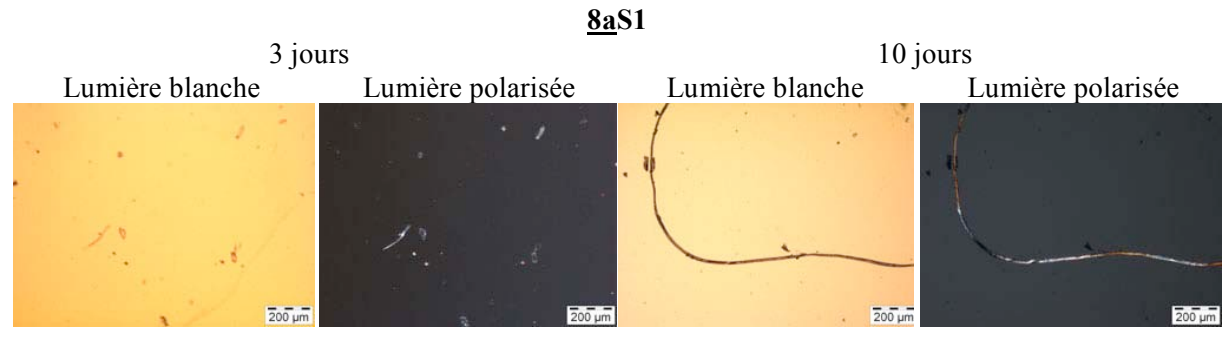


Figure 125 : Suivi de l'échantillon **8aS1** par microscopie optique après coloration au rouge Congo : formation de petits agrégats amorphes après 3 jours, puis de filaments toujours amorphes au bout de 10 jours (pas de biréfringence vert-pomme sous une lumière polarisée).

L'échantillon **8aS2** contient, lui, dix équivalents de la fraction **8a** du composé **8** et un équivalent d'A β (13-23) (**4**) (Tableau 17). Il semblerait que la fibrillogénèse du peptide amyloïde soit alors fortement retardée, puisqu'aucune fibrille n'est observée par coloration au rouge Congo après trois jours d'incubation de la solution, ni même après sept jours, comme cela l'est montré sur les photographies obtenues après visualisation au microscope électronique (Figure 126). Nous remarquons seulement quelques protofibrilles. Après dix jours d'incubation à température ambiante, la coloration au rouge Congo révèle cependant la présence de structures amyloïdes.

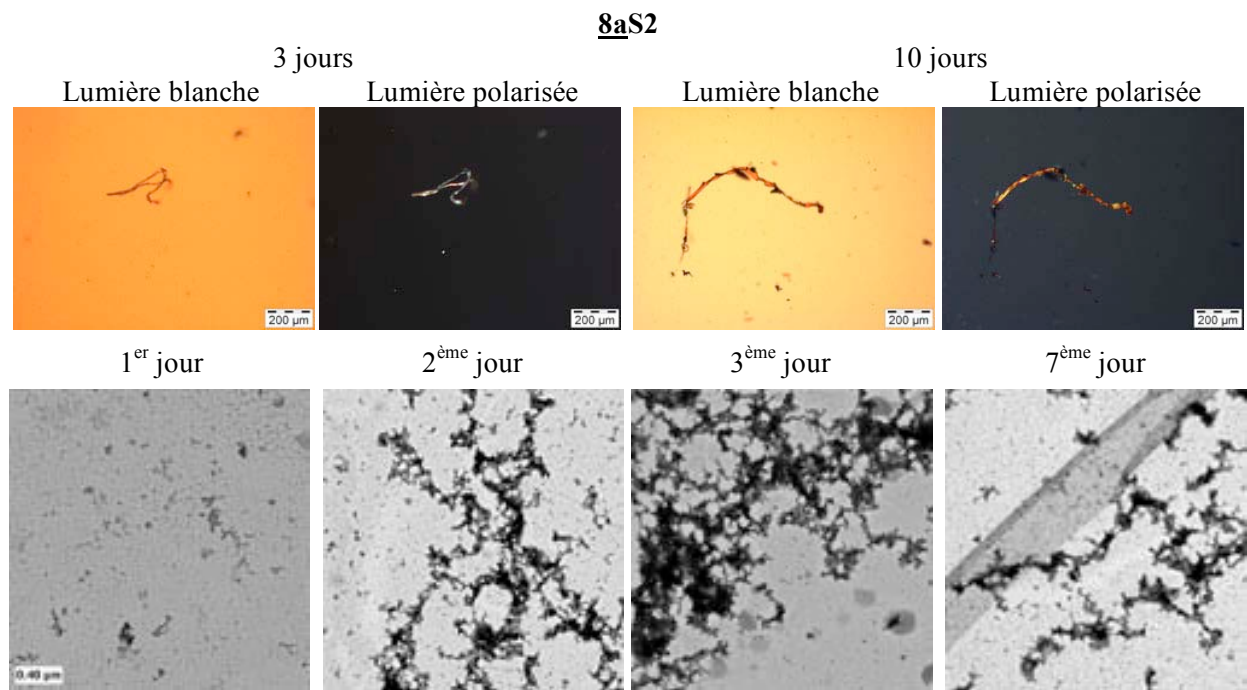


Figure 126 : Suivi de l'échantillon **8aS2** par microscopie optique après coloration au rouge Congo (en haut) et par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (en bas) : en haut : pas de fibrilles après 3 jours, mais observation de ces structures après 10 jours (biréfringence vert-pomme sous une lumière polarisée) ; en bas : structures pseudo-sphériques le 1^{er} jour, apparition de protofibrilles le 2^{ème} jour, mais pas de fibrilles, même après 7 jours d'incubation à température ambiante.

Il nous est difficile de juger par cette méthode le gain apporté à l'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique par la séquence de reconnaissance. Néanmoins, si nous comparons les images obtenues pour les échantillons **Cotinine_S2** et **8aS2** par microscopie électronique le premier jour de leur incubation, nous constatons qu'il n'y a presque pas de protofibrilles dans la solution contenant la fraction **8a** du composé **8**, tandis qu'il y en a une certaine quantité dans celle contenant l'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique. Il semblerait donc que la fraction **8a** du composé **8** soit plus efficace pour empêcher l'agrégation fibrillaire de l'A β (13-23) que l'acide seul.

Dans le deuxième peptide conjugué de cette famille que nous dessinons, nous allons remplacer la séquence de reconnaissance de l'amyloïde Phe-Phe-Asp-NH₂ par la séquence native Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-NH₂, qui devrait être capable d'établir plus de connections avec l'amyloïde que la séquence courte (Figure 127). Nous allons ainsi pouvoir déterminer si le trimère Phe-Phe-Asp est suffisant long pour interagir avec le peptide pathogène ou si un peptide plus long s'avèrerait être plus efficace.

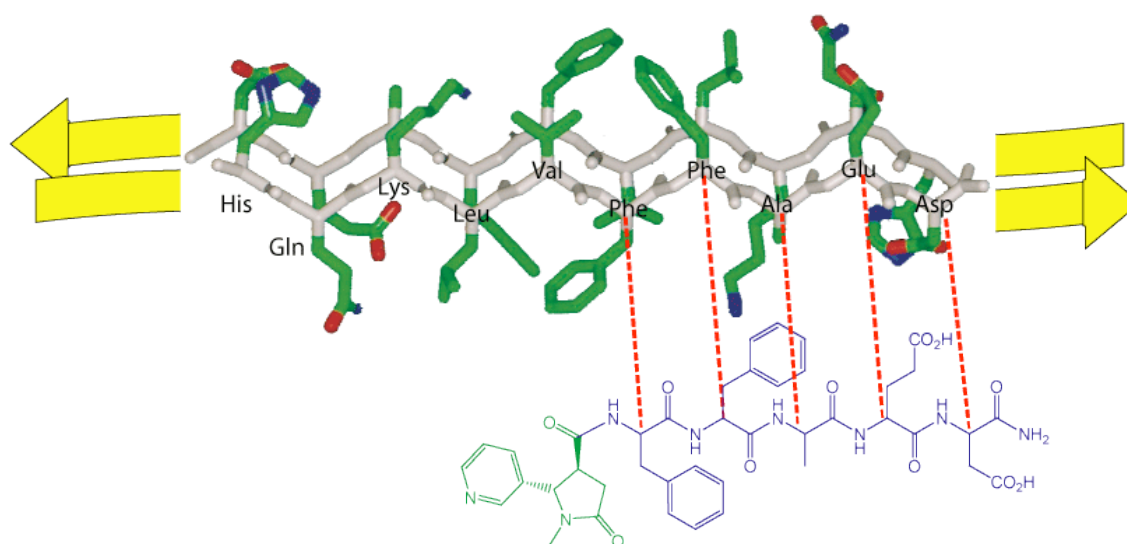


Figure 127 : Représentation schématique des interactions envisagées entre le mîme peptidique (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-NH₂ (**9**) et un dimère de l'A β (14-23)²²³ : les interactions entre la séquence de reconnaissance (en bleu) et l'amyloïde sont schématisées par des pointillés rouge ; la partie cotinine (en vert) intervient de son côté pour empêcher la formation de fibrilles amyloïdes ; les pointillés rouges symbolisent les interactions existant entre les deux résidus désignés par l'extrémité des traits au niveau de leur C α .

Le composé (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-NH₂ (**9**) est synthétisé en phase solide sur une résine Rink Amide MBHA, qui libère le mîme peptidique déprotégé après traitement avec une solution contenant 95 % d'acide trifluoroacétique, 2.5 % d'eau et 2.5 % de TRIS, ces deux derniers composants servant de pièges chimiques (Figure 128).

Le brut est analysé par RP-HPLC analytique et spectroscopie de masse ESI-MS (Figure 129a). Nous observons la présence d'un double pic ayant un temps de rétention aux alentours de 11 min et une masse de 829. Ce double pic correspond aux deux diastéréoisomères **9a** et **9b** du produit **9** désiré.

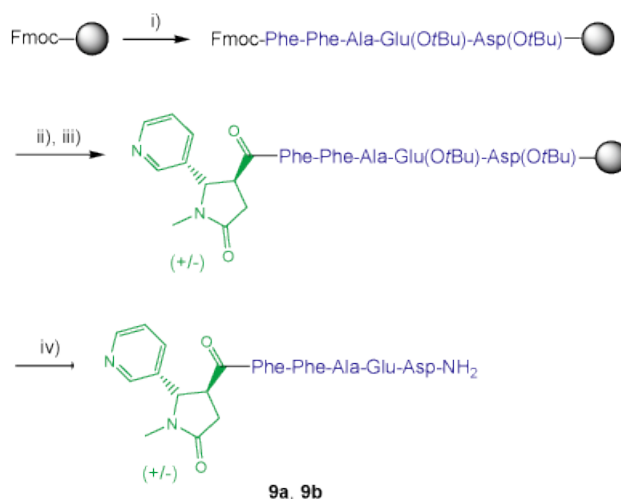


Figure 128 : Synthèse des diastéréoisomères (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-NH₂ (**9a** et **9b**) : i) SPPS sur résine Rink Amide MBHA, en stratégie Fmoc/tBu ; ii) déprotection du Fmoc : 20 % pipéridine/DMF (5 x 2 min, r.t.) ; iii) couplage de l'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique après sa préactivation avec du PyBOP (préactivation : 15 min, r.t. ; couplage : 2 x 45 min, r.t.) ; iv) clivage de la résine et déprotection de la chaîne latérale de l'acide aspartique : TFA/TIS/H₂O (95 : 2.5 : 2.5, v/v/v, 1h45, r.t.) ; purification par RP-HPLC préparative sur colonne C₁₈ (15 à 45 % B en 30 min) ; rendement : 27 %.

Le mème peptidique **9** est purifié par RP-HPLC préparative pour donner deux fractions **9a** et **9b** contenant respectivement un excès du diastéréoisomère le plus hydrophile (composé **9a**) et un excès du diastéréoisomère le plus hydrophobe (composé **9b**) (Figure 129).

La composition de chacune de ces fractions est déterminée par comparaison directe de l'intégration de chaque pic correspondant au composé **9a** ou **9b**, suivant leur absorbance à 214 nm. Ainsi, la fraction **9a** contient 61 % du diastéréoisomère **9a** et 39 % du diastéréoisomère **9b**, tandis que la fraction **9b** comporte 28 % de la molécule **9a** et 72 % du produit **9b**.

L'activité inhibitrice des deux fractions est ensuite testée dans le système mis au point avec l'amyloïde Aβ(13-23) (**4**).

Pour cela, nous préparons quatre échantillons, deux ne comportant que les fractions **9a** ou **9b**, les deux autres étant composés d'un mélange de dix équivalents de la fraction **9a** ou **9b** avec un équivalent du peptide amyloïde. Le détail de la préparation des échantillons ainsi que leur dénomination sont reportés dans le Tableau 18.

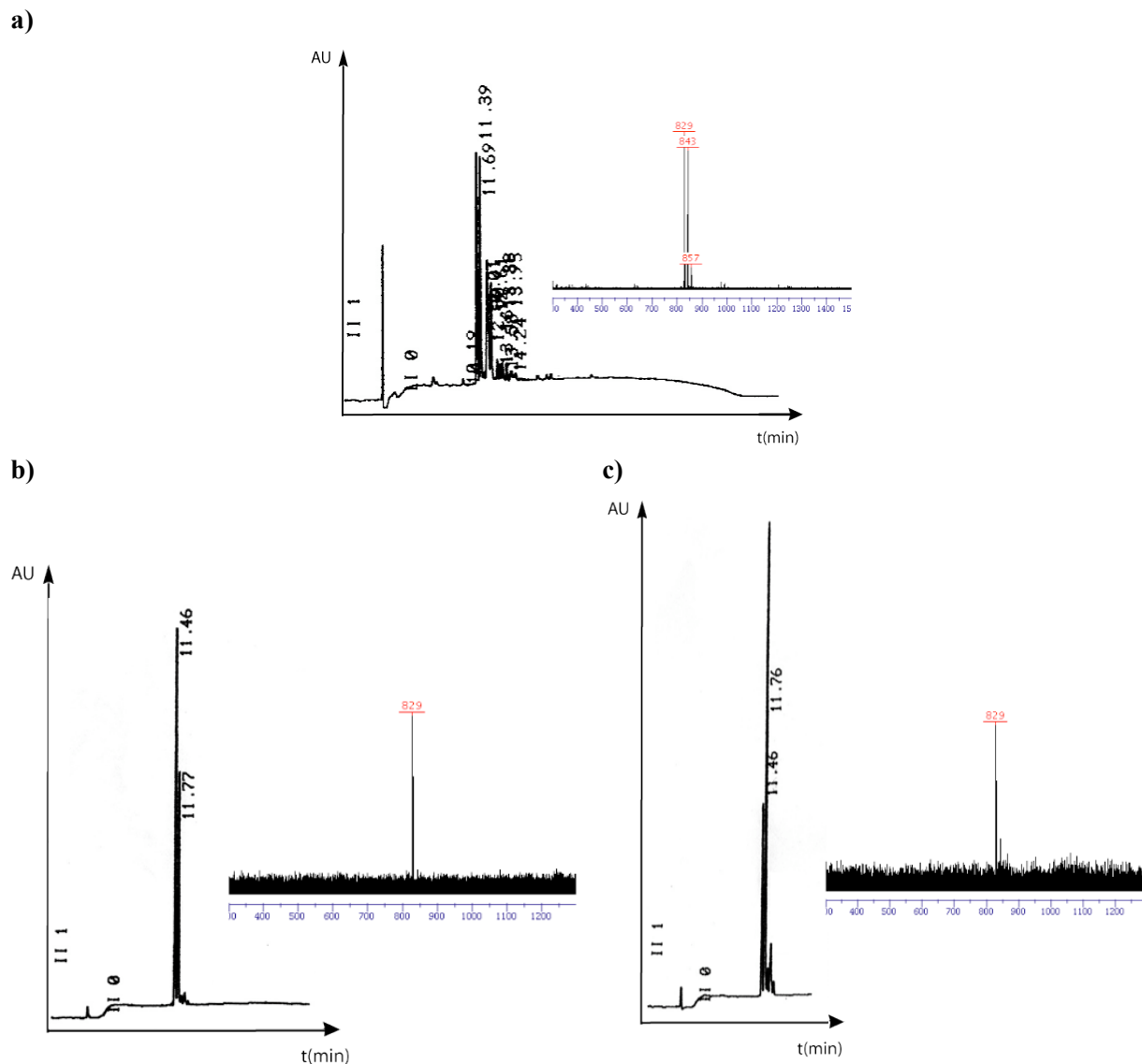


Figure 129 : Caractérisation du (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-NH₂ (**9**) **a**) avant purification : RP-HPLC analytique sur colonne C₁₈ (gradient : 5 à 100 % B en 30 min ; Rt = 11.39 et 11.69 min) et spectre ESI-MS (829 = [M+H]⁺) ; **b**) après purification, diastéréoisomère **9a** majoritaire : RP-HPLC analytique sur colonne C₁₈ (gradient : 5 à 100 % B en 30 min ; Rt = 11.46 et 11.77 min) et spectre ESI-MS (829 = [M+H]⁺) ; **c**) après purification, diastéréoisomère **9b** majoritaire : RP-HPLC analytique sur colonne C₁₈ (gradient : 5 à 100 % B en 30 min ; Rt = 11.46 et 11.76 min) et spectre ESI-MS (829 = [M+H]⁺).

Composé ou fraction	Echantillon	Concentration peptidique	Rapport 9/4
9a	9aS1	4 mM	
9b	9bS1	4 mM	
9a + 4	9aS2	4 mM / 400 μM	10 : 1
9b + 4	9bS2	4 mM / 400 μM	10 : 1

Tableau 18 : Liste des échantillons contenant les composés **9a** et **9b**.

Afin de déterminer le comportement du mime peptidique **9** en solution dans le mélange de solvants utilisé pour les études de fibrillogénèse, nous préparons les échantillons **9aS1** et **9bS1** qui ne contiennent respectivement que la fraction **9a** ou la fraction **9b** (Figure 130). Au bout de trois jours d'incubation à température ambiante, la molécule commence à former quelques agrégats amorphes qui se développent avec le temps et donne quelques filaments, toujours amorphes, au bout de dix jours d'incubation.

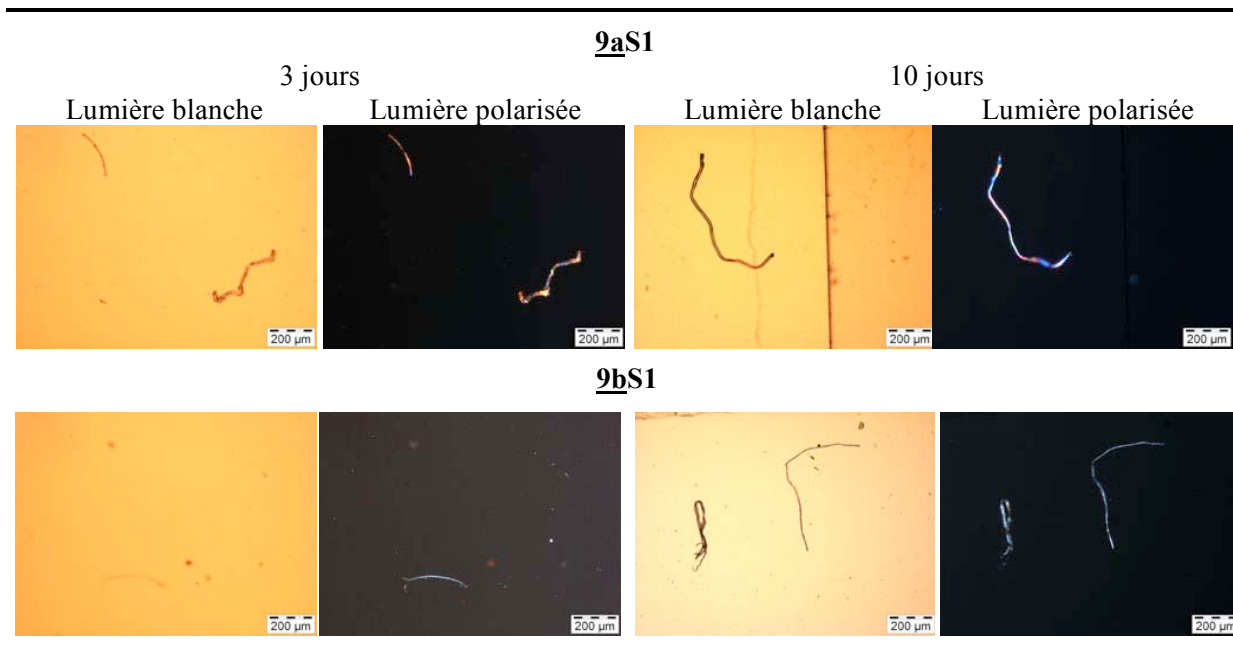


Figure 130 : Suivi des échantillons **9aS1** (en haut) et **9bS1** (en bas) par microscopie optique après coloration au rouge Congo ; observation d'agrégats amorphes (pas de biréfringence vert-pomme sous une lumière polarisée) dans les deux échantillons.

Lorsque chacune des deux fractions se retrouve en présence du peptide amyloïde **4** (échantillons **9aS2** et **9bS2**), nous constatons, après coloration au rouge Congo et visualisation au microscope optique, que le produit (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-NH₂ **9** permet de ralentir l'amyloïdogénèse de l'Aβ(13-23), puisque nous n'observons pas de fibrilles au bout de trois jours d'incubation à température ambiante. Cependant cet effet est limité : après dix jours d'incubation nous notons une biréfringence vert-pomme sur certains filaments (Figure 131). L'activité de la molécule **9** semble donc être similaire à celle du composé (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**8**) (Figure 126).

Les deux solutions sont ensuite étudiées par microscopie optique avec coloration négative conventionnelle (Figure 132). L'échantillon **9aS2** n'est composé, durant les trois premiers jours, que de protofibrilles. La photographie prise le septième jour montre une structure en ruban, non fibrillaire. L'échantillon **9bS2** se comporte de la même manière le premier jour, mais à partir du deuxième jour, nous commençons à apercevoir quelques fibrilles. La photographie prise le troisième jour met en évidence la

présence d'une certaine quantité de structures en ruban semblables à celle observée le septième jour d'incubation de l'échantillon **9aS2**.

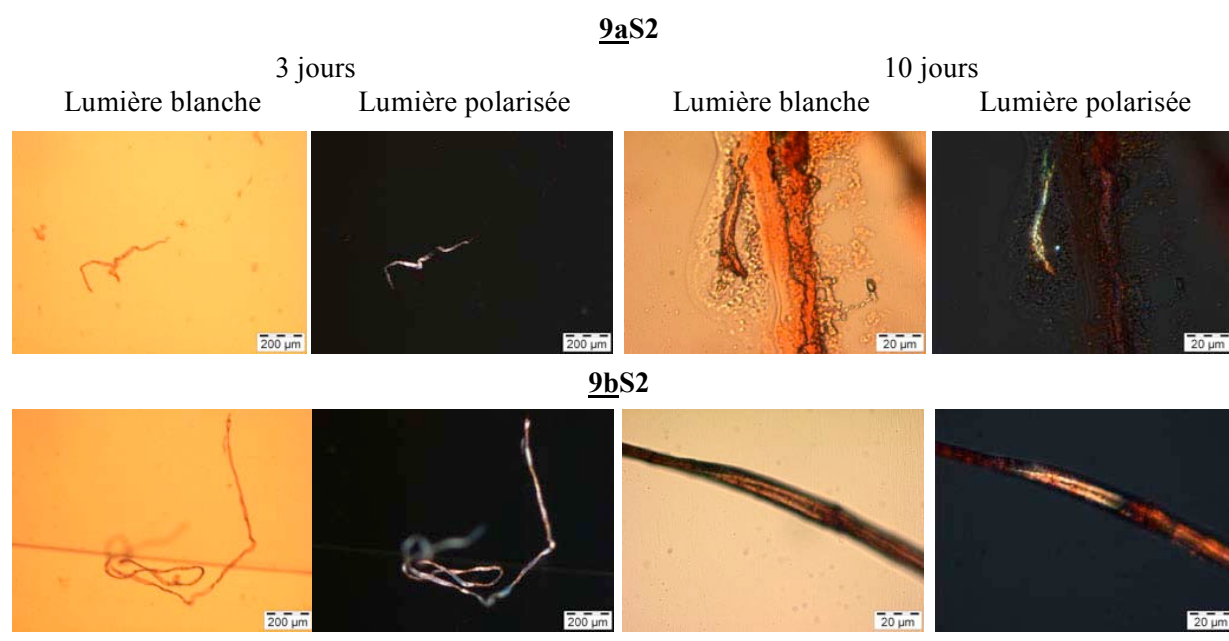


Figure 131 : Suivi des échantillons **9aS2** (en haut) et **9bS2** (en bas) par microscopie optique après coloration au rouge Congo : agrégats amorphes après 3 jours, fibrilles après 10 jours (biréfringence vert-pomme sous une lumière polarisée).

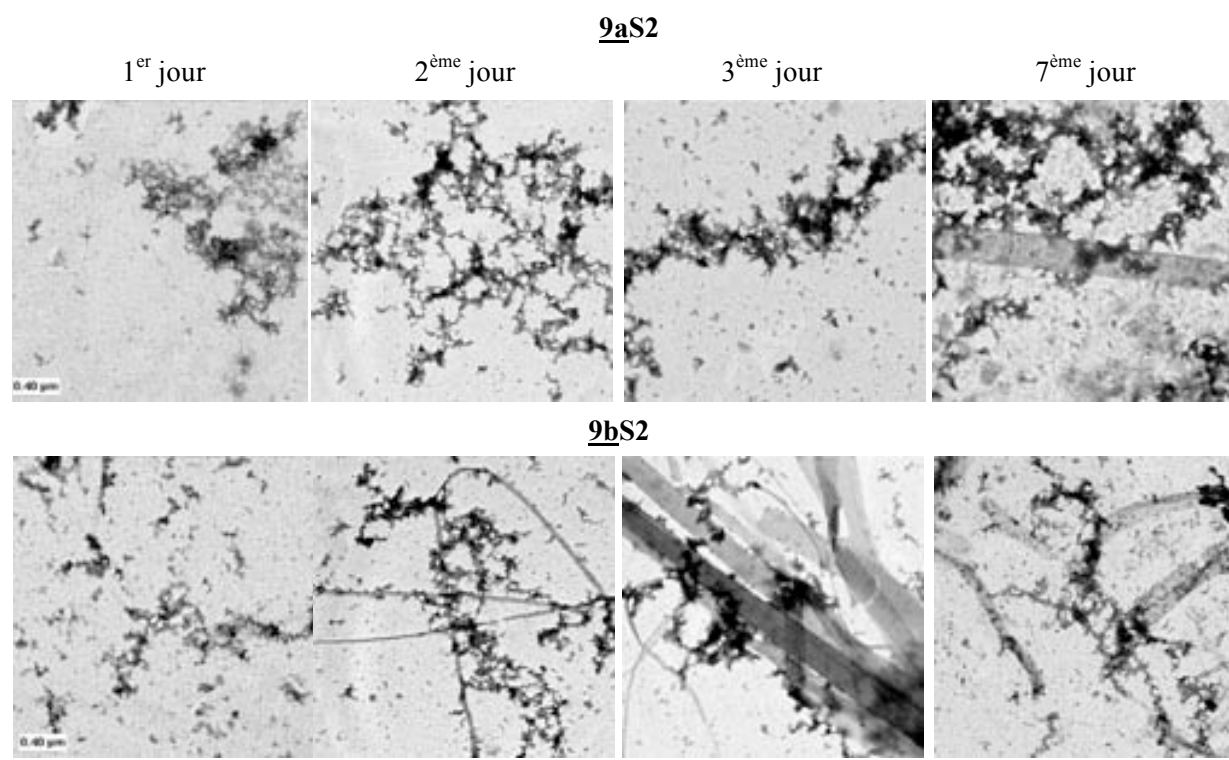


Figure 132 : Suivi des échantillons **9aS2** (en haut) et **9bS2** (en bas) par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle ; **9aS2** : protofibrilles ; **9bS2** : protofibrilles (jour 1 à 7), fibrilles (dès 2 jours).

Il semblerait donc que la fraction **9a** du produit **9** soit aussi efficace que la fraction **8a** du composé **8** en tant qu'inhibiteur de fibrillogenèse de l'Aβ(13-23), tandis que la fraction **9b** serait un peu moins active que les fractions **9a** et **8a**. Cela signifierait ainsi que la différence entre les deux séquences de reconnaissance Phe-Phe-Asp-NH₂ et Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-NH₂ serait relativement faible, alors que l'inhibition de l'amyloïdogenèse se ferait dans de meilleures conditions en présence du diastéréoisomère majoritaire de la fraction **9a**. Cependant, la méthode d'analyse employée n'étant que qualitative, nous ne sommes donc pas en mesure de définir avec précision la nature de l'écart d'activité entre les deux composés ainsi que leurs différentes fractions.

La seconde série de peptides conjugués dérivés de l'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique intègre entre la molécule organique et la séquence de reconnaissance peptidique une proline, sensée induire un coude dynamique grâce à son isomérisation cis/trans. Cela devrait alors améliorer l'activité inhibitrice d'amyloïdogenèse de la molécule dessinée, comme cela l'est montré dans la Figure 133.

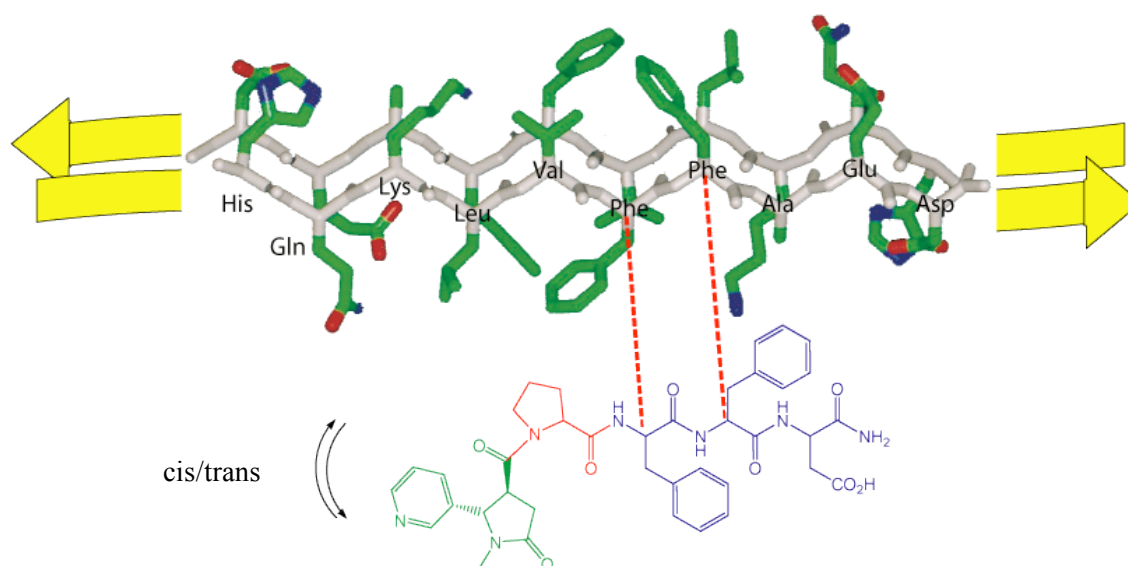


Figure 133 : Représentation schématique des interactions envisagées entre le mime peptidique (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Pro-Phe-Phe--Asp-NH₂ (**10**) et un dimère de l'Aβ(14-23)²²³ : les interactions entre la séquence de reconnaissance (en bleu) et l'amyloïde sont schématisées par des pointillés rouge ; la partie cotinine (en vert) intervient de son côté pour empêcher la formation de fibrilles amyloïdes, tandis que la proline (en rouge) remplit l'office d'un coude dynamique (isomérisation cis/trans) ; les pointillés rouges symbolisent les interactions existant entre les deux résidus désignés par l'extrémité des traits au niveau de leur C_α.

Le peptide conjugué (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**10**) est le premier dérivé de ce type à être dessiné. Sa synthèse est réalisée en phase solide sur une résine Rink Amide MBHA, en suivant les conditions standard de la SPPS (Figure 134). Le clivage de la résine se fait dans un mélange contenant 95 % de TFA, 2.5 % d'eau et 2.5 % de TIS comme pièges chimiques, ce traitement ayant pour effet de libérer dans le même temps la chaîne latérale de l'acide aspartique, protégée par un groupe *tert*-butoxyle.

Le brut peptidique, composé d'un mélange des deux diastéréoisomères, est relativement propre, comme nous pouvons le remarquer grâce aux spectres RP-HPLC analytique et de masse ESI-MS présentés dans la Figure 135a. La molécule **10** est alors facilement purifiée par RP-HPLC préparative. Elle est obtenue avec un rendement de 51 % et est caractérisée par RP-HPLC analytique et spectroscopie de masse ESI-MS, avant d'être testée en tant qu'inhibiteur potentiel de la formation de fibrilles d'Aβ(13-23) (Figure 135b).

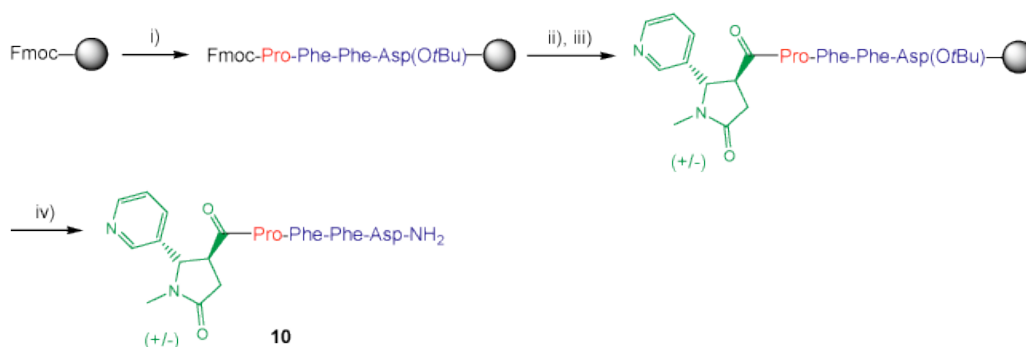


Figure 134 : Synthèse du mélange de diastéréoisomères (+/-)-trans-4-cotininecarboxyl-Propyl-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**10**) : i) SPPS sur résine Rink Amide MBHA, en stratégie Fmoc/tBu ; ii) déprotection du Fmoc : 20 % pipéridine/DMF (5 x 2 min, r.t.) ; iii) couplage de l'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique après sa préactivation avec du PyBOP (préactivation : 15 min, r.t. ; couplage : 2 x 1h, r.t.) ; iv) clivage de la résine et déprotection de la chaîne latérale de l'acide aspartique : TFA/TIS/H₂O (95 : 2.5 : 2.5, v/v/v, 1h30, r.t.) ; purification par RP-HPLC préparative sur colonne C₁₈ (10 à 40 % B en 30 min) ; rendement : 51 %.

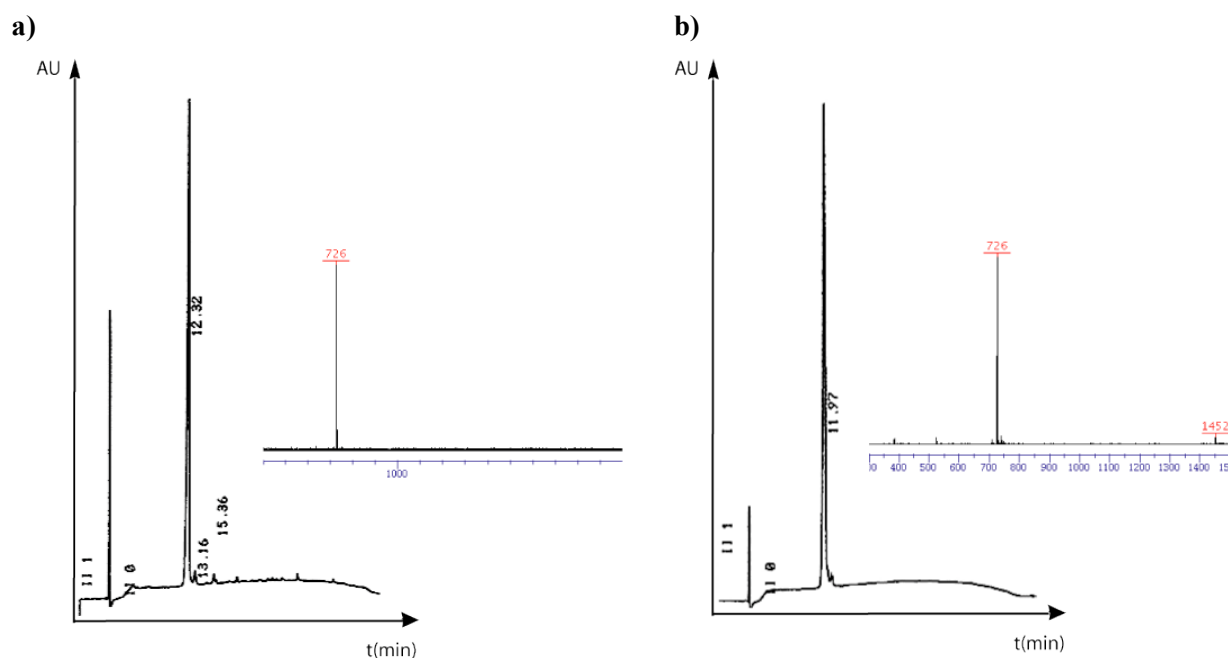


Figure 135 : Caractérisation de (**10**) **a**) avant purification : RP-HPLC analytique sur colonne C₁₈ (gradient : 5 à 100 % B en 30 min ; Rt = 12.82 min) et spectre ESI-MS (726 = [M+H]⁺) ; **b**) après purification : RP-HPLC analytique sur colonne C₁₈ (gradient : 5 à 100 % B en 30 min ; Rt = 11.97 min) et spectre ESI-MS (726 = [M+H]⁺ ; 1452 = [2M + H]⁺).

Nous préparons trois échantillons contenant le produit **10** : le premier, **10S1**, ne contient que cette molécule afin d’observer son comportement dans le mélange de solvants méthanol-tampon ; le deuxième, **10S2**, est composé de dix équivalents de produit **10** pour un équivalent d’amyloïde **4** ; enfin, le troisième échantillon, **10S3**, correspond à un mélange équimolaire entre l’inhibiteur potentiel et le peptide pathogène (Tableau 19).

Composé	Echantillon	Concentration peptide	Rapport 10/4
10	10S1	4 mM	
10 + 4	10S2	4 mM / 400 µM	10 : 1
10 + 4	10S3	400 µM / 400 µM	1 : 1

Tableau 19 : Liste des différents échantillons contenant le composé (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**10**).

De la même façon que les autres dérivés de cotinine que nous avons synthétisés précédemment, le produit **10** a lui aussi tendance à précipiter et à former des filaments amorphes lorsqu’il est seul en solution (Figure 136).

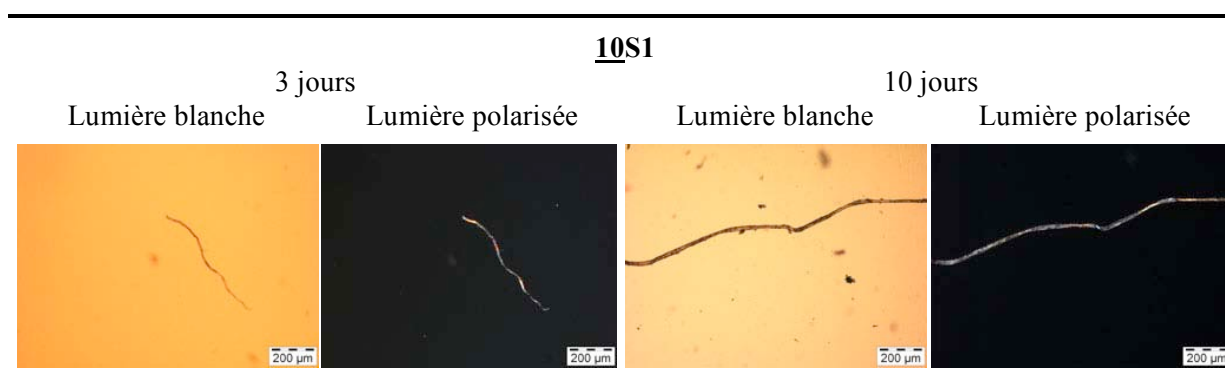


Figure 136 : Suivi de l’échantillon **10S1** par microscopie optique après coloration au rouge Congo : formation d’agrégats amorphes (pas de biréfringence vert-pomme sous la lumière polarisée).

Une fois mélangé au peptide amyloïde avec un excès dix fois supérieur à la quantité d’Aβ(13-23) (échantillon **10S2**), le produit **10** retarde fortement l’amyloïdogenèse en empêchant la formation de fibrilles jusqu’après dix jours d’incubation à température ambiante (Figure 137). En effet la coloration au rouge Congo et la lumière polarisée ne révèlent aucune structure fibrillaire dans l’échantillon concerné. Les images obtenues par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle ne dévoilent que peu de protofibrilles au cours des sept premiers jours d’incubation, mais aucune fibrille (Figure 137). Seules quelques structures en ruban se démarquent dans la solution au bout de trois et sept jours d’incubation.

D'après ces résultats, nous constatons l'efficacité de la molécule (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**10**). Son puissante inhibitrice serait même supérieure à celui de l'Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**6**), qui, dans les mêmes conditions (échantillon **6S3**, voir Résultats et Discussion, Chapitre 2.III.4), laissait apparaître plus de protofibrilles en microscopie électronique et une biréfringence vert-pomme après dix jours d'incubation. L'étude d'un mélange équimolaire entre la molécule **10** et l'amyloïde β devrait nous aider à déterminer si ce nouveau dérivé (échantillon **10S3**) est bel et bien plus actif que l'inhibiteur de référence **6**.

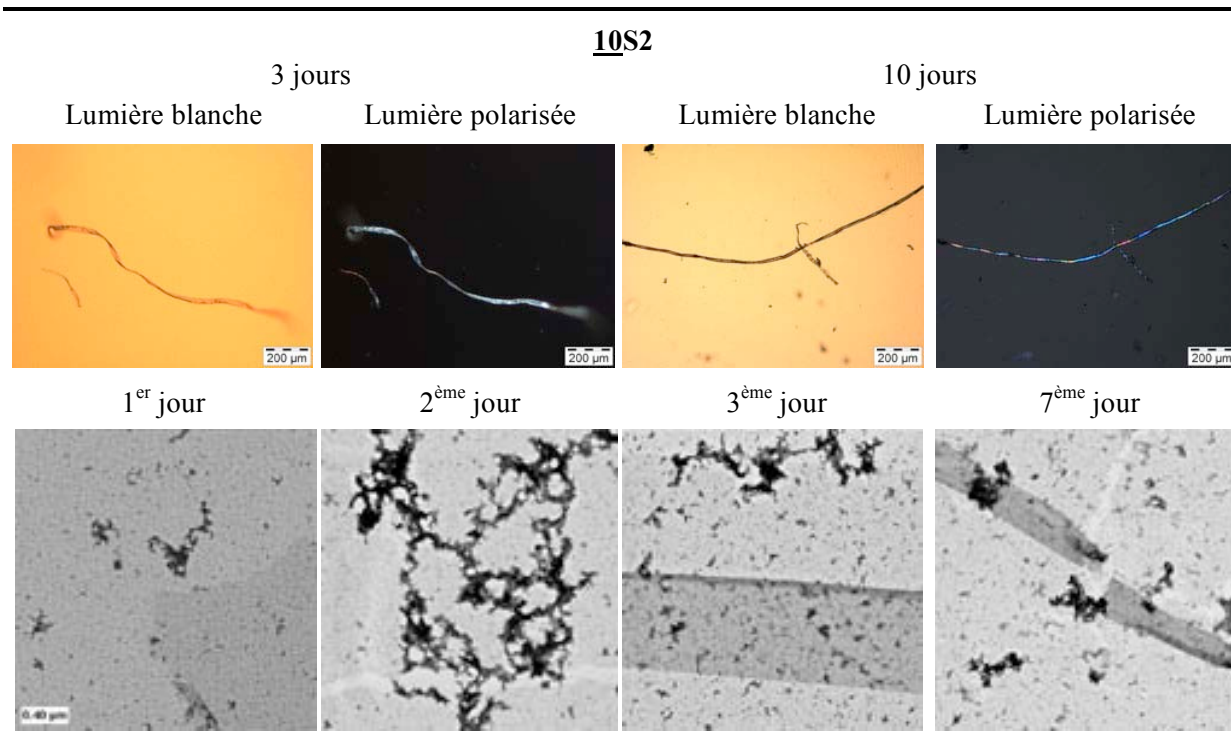


Figure 137 : Suivi de l'échantillon **10S2** par microscopie optique après coloration au rouge Congo (en haut) et par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (en bas) ; en haut : pas de fibrilles ni après 3 jours, ni après 10 jours (pas de biréfringence vert-pomme sous une lumière polarisée) ; en bas : structure pseudo-sphériques (jour 1 uniquement), protofibrilles (dès le 2^{ème} jour), présence de rubans (3^{ème} et 7^{ème} jours).

Les photographies obtenues par microscopie électronique, correspondant aux trois premiers jours d'incubation, montrent la présence de protofibrilles, qui semblent commencer à s'organiser en fibrilles, comme nous pouvons le constater sur la photographie prise au cinquième jour d'incubation (Figure 138). Cependant, la microscopie optique, après coloration de l'échantillon au rouge Congo et visualisation sous une lumière polarisée nous révèle la présence de fibrilles dès le troisième jour d'incubation.

Ainsi un seul équivalent de (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**10**) ralentit la fibrillogénèse de l'A β (13-23), sans pour autant la bloquer de façon significative. Par comparaison, l'Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**6**) permet, dans les mêmes conditions, de ralentir cette amyloïdogenèse au-delà de trois jours (échantillon **6S4**, voir Résultats et Discussion, Chapitre 2.III.4).

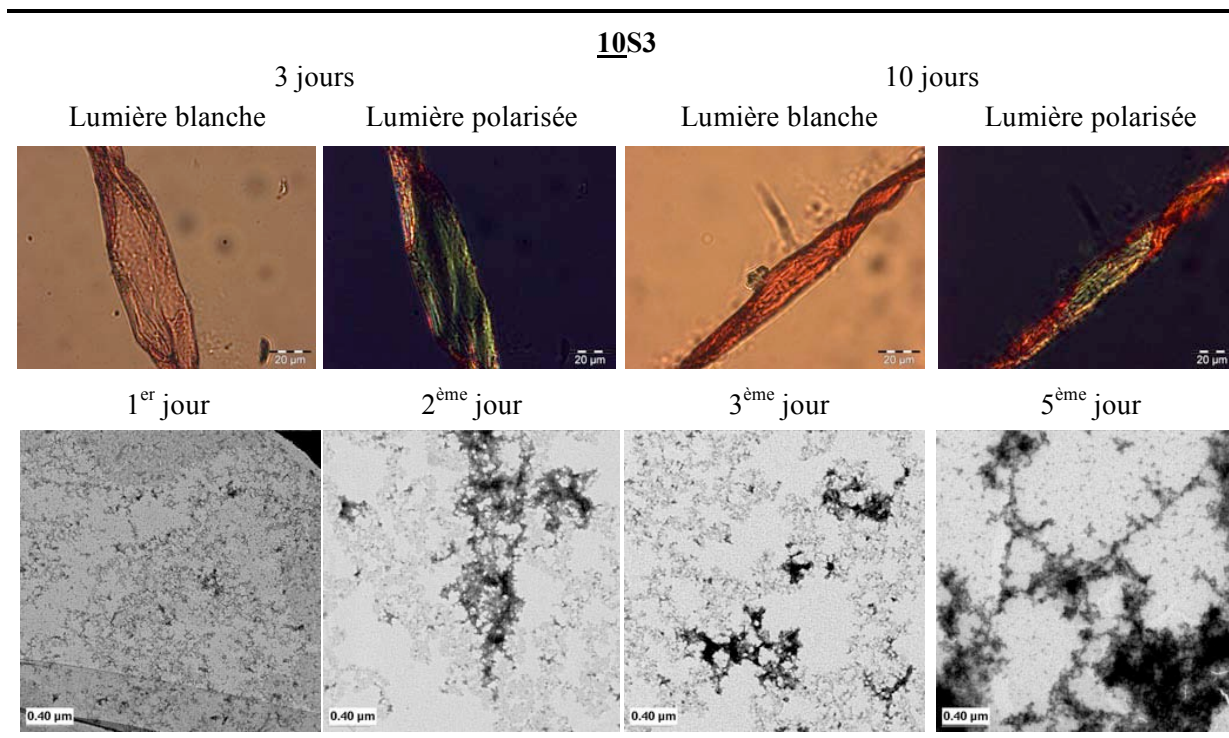


Figure 138 : Suivi de l'échantillon **10S3** par microscopie optique après coloration au rouge Congo (en haut) et par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (en bas) ; en haut : observation de fibrilles dès le 3^{ème} jour (biréfringence vert-pomme sous une lumière polarisée) ; en bas : présence de protofibrilles particulièrement fines, grossissant avec le temps.

Parmi les quatre inhibiteurs potentiels que nous avons synthétisés jusqu'à présent, le composé (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**10**) est le plus actif. Son pouvoir d'inhibition semble être quelque peu inférieur à celui du destructeur de feuillets β de référence, l'Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**6**). Cependant, ce résultat devra être confirmé par d'autres analyses, dans la mesure où la méthode utilisée ici est qualitative et non quantitative.

Au cours du Chapitre 3 de l'Introduction, nous avons défini la méthode des « host-guests switch-peptides » et expliqué quelle pouvait être son utilité en tant que système-kit de diagnostic permettant d'évaluer l'activité de molécules destructrices de feuillets β.

Puisque le composé (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**10**) semble un bon candidat en tant qu'inhibiteur, nous allons le tester dans un système de « host-guest switch-peptides » et juger son efficacité par dichroïsme circulaire.

Le choix du peptide « host-guest » appliqué à l'amyloïde β s'est porté sur une molécule synthétisée par S. Dos Santos^{23, 46}. Il s'agit de l'Ac-[Ser¹-Leu-Ser-Leu]-[His⁵-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-(Arg-Pro)Ser¹²-Glu-Asp-Val]-[Ser¹⁶-Leu]-Gly¹⁸-NH₂. Cette molécule comporte deux unités d'induction en feuillets β sérine-leucine, une séquence de reconnaissance amyloïde, l'Aβ(14-24), et un élément switch sur la sérine 12, remplaçant l'alanine 21 dans la séquence naturelle de l'amyloïde. L'élément switch est bloqué à l'état

S_{off} par le dipeptide arginine-proline couplé sur l'amine de la sérine. L'addition d'enzyme DPPIV libère le groupe amino et déclenche le réarrangement acylique O→N, rétablissant la succession native des liaisons amides dans le peptide « host-guest » et par là-même la capacité de repliement du peptide. Le changement conformationnel est suivi par dichroïsme circulaire. Les spectres correspondant à cette cinétique sont présentés dans la Figure 139. A $t = 0$, nous observons un effet Cotton négatif typique d'une pelotte statistique. Le changement conformationnel induit un déplacement progressif de l'effet Cotton négatif, se plaçant à 218 nm, valeur caractéristique d'un feuillet β .

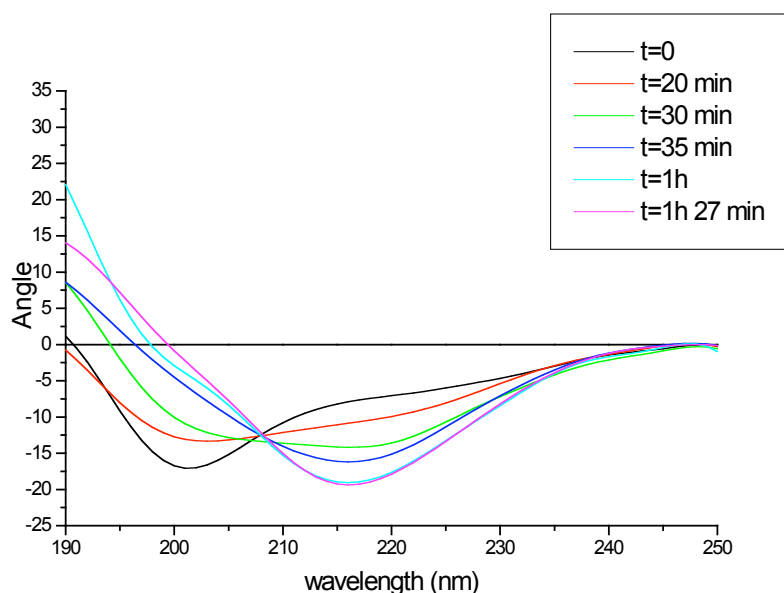


Figure 139 : Suivi, par dichroïsme circulaire, du changement conformationnel du « host-guest switch-peptide » $Ac-[Ser-Leu-Ser-Leu]-[His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-(Arg-Pro)Ser-Glu-Asp-Val]-[Ser-Leu]-Gly-NH_2$, après la déprotection de l'élément switch par le clivage du dipeptide Arg-Pro par la DPPIV ; déplacement de l'effet Cotton négatif entre $t = 0$ et $t = 1h27$, caractéristique d'un passage de pelotte statistique à un feuillet β .

Avant de tester le (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ dans ce système, nous allons commencer par évaluer l'influence de l'Ac-Leu-Val-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**7**) sur le repliement du « host-guest switch-peptide ».

Ce peptide se présente, une fois en solution, sous forme d'une pelotte statistique. C'est ce que nous avons déjà vu dans le chapitre précédent (Figure 140).

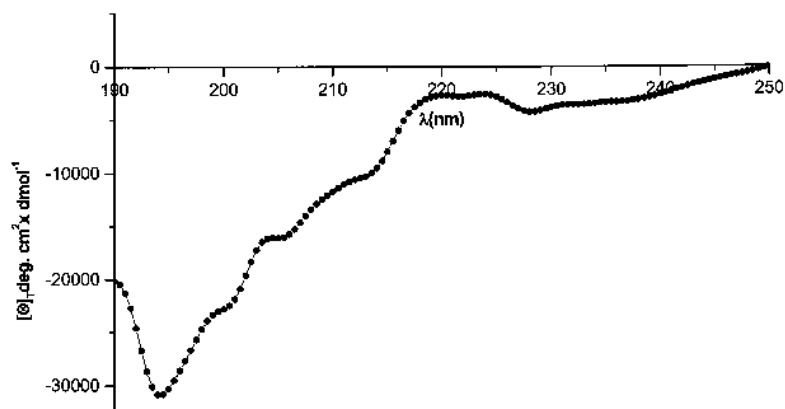


Figure 140 : Spectre de dichroïsme circulaire de l'Ac-Leu-Val-Phe-Phe-Asp-NH₂, montrant une structure en pelote statistique (8.7×10^{-4} M dans le PBS à pH 7.06).

Lorsqu'il est mélangé au « host-guest switch-peptide » avec un ratio de un pour un, et à de la DPPIV chargée de déclencher la migration, nous nous apercevons, par dichroïsme circulaire, que le peptide ralentit le changement conformationnel de la molécule « host-guest ». Au bout de 4h, il semblerait qu'il y ait toujours un mélange entre les deux structures secondaires, à savoir le feuillet β et la pelote statistique (Figure 141).

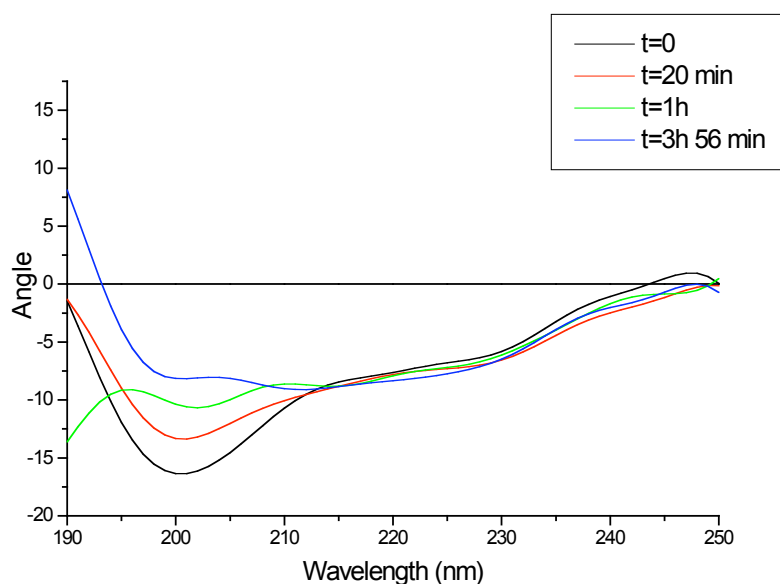


Figure 141 : Etude, par dichroïsme circulaire, de l'influence de l'Ac-Leu-Val-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**7**) sur le changement conformationnel du « host-guest switch-peptide » Ac-[Ser-Leu-Ser-Leu]-[His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-(Arg-Pro)Ser-Glu-Asp-Val]-[Ser-Leu]-Gly-NH₂ après initiation de la migration acylique O→N possible grâce au clivage du dipeptide arginine-proline par la DPPIV.

L'expérience est réalisée dans les mêmes conditions avec le (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**10**).

Nous analysons tout d’abord, par dichroïsme circulaire, le produit seul en solution dans le mélange de méthanol, d’eau et de solution tampon à pH 7.4 utilisé pour l’étude du réarrangement du « host-guest switch-peptide » (Figure 142). Le spectre obtenu montre que le peptide adopte une structure secondaire non définie.

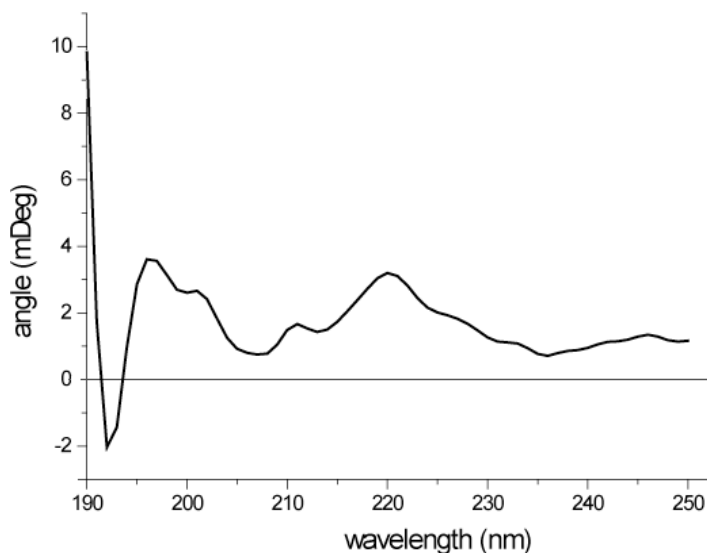


Figure 142 : Spectre de dichroïsme circulaire du (+/-)-trans-4-cotininecarboxyl-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**10**), montrant une structure secondaire non définie.

Lorsque nous étudions le mélange équimolaire entre le « host-guest switch-peptide » et le (+/-)-trans-4-cotininecarboxyl-Pro-Phe-Phe-NH₂ (**10**) en présence de DPPIV, nous constatons que la structure secondaire en pelote statistique n’évolue quasiment pas sur la période d’étude de 1h30 (Figure 143). Le mime peptidique a donc bien tendance à bloquer la formation de feuillet β .

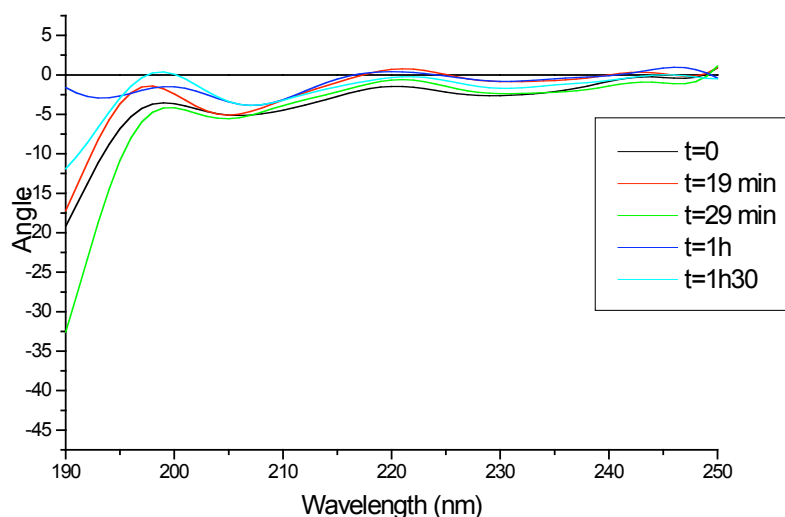


Figure 143 : Etude, par dichroïsme circulaire, de l'influence du (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**10**) sur le changement conformationnel du « host-guest switch-peptide » Ac-[Ser-Leu-Ser-Leu]-[His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-(Arg-Pro)Ser-Glu-Asp-Val]-[Ser-Leu]-Gly-NH₂ après initiation de la migration acylique O→N grâce au clivage du dipeptide arginine-proline par la DPPIV.

Enfin, la molécule **10** est placée en présence de la séquence complète de l'Aβ(1-42). Cette étude est réalisée dans le cadre de la collaboration établie avec C. Soto, de l'Université du Texas. Le protocole suivi pour cette étude est le même que dans le cas du peptide **3** cyclo(Lys-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu) : l'Aβ(1-42) incubé à 37°C pendant cinq jours, tandis que la quantité d'amyloïdes est déterminée grâce à la mesure de la fluorescence d'émission de la thioflavine T liée aux fibrilles. Les expériences réalisées alors mettent en évidence une certaine activité positive de la molécule **10** qui bloque partiellement la formation de fibrilles d'Aβ(1-42). D'autres analyses plus poussées devraient être en mesure de confirmer ces résultats préliminaires.

En remplaçant la séquence de reconnaissance Phe-Phe-Asp-NH₂ de la molécule **10** par la séquence native plus longue Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-NH₂, nous pourrions confirmer les résultats obtenus au moment de la comparaison directe entre les produits (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**8**) et (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-NH₂ (**9**). En effet, rappelons-nous, il nous semblait que les fractions **8a** et **9a** avaient des activités biologiques relativement semblables. L'étude du composé (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Pro-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-NH₂ (**11**) nous permettra alors d'estimer de sa capacité d'inhibition de la fibrillogénèse de l'amyloïde Aβ(13-23) (**4**) par rapport au produit **10**.

La molécule **11** est construite en phase solide sur une résine Rink Amide MBHA, en suivant le même protocole que pour les trois autres composés (Figure 144). Les deux diastéréoisomères ne pouvant être séparés par une simple RP-HPLC préparative sur colonne C₁₈, nous testerons donc directement le

mélange de deux produits, obtenu avec un rendement de 33 % et caractérisé par RP-HPLC analytique et spectroscopie de masse ESI-MS (Figure 145).

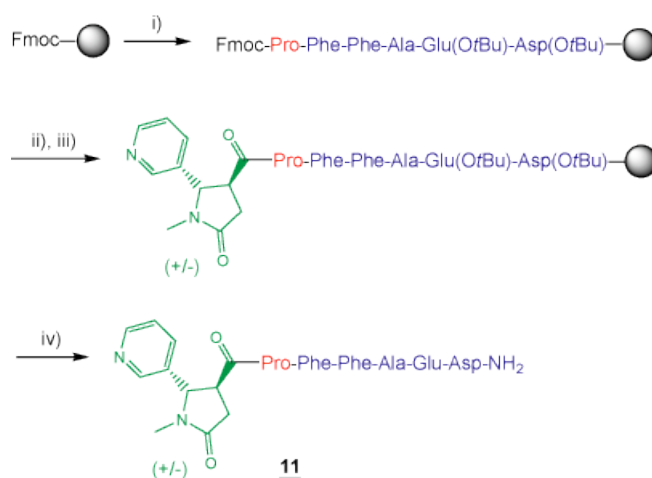


Figure 144 : Synthèse du mélange de diastéréoisomères (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Pro-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-NH₂ (**11**) : i) SPPS sur résine Rink Amide MBHA, en stratégie Fmoc/tBu ; ii) déprotection du Fmoc : 20 % pipéridine/DMF (5 x 2 min, r.t.) ; iii) couplage de l'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique après sa préactivation avec du PyBOP (préactivation : 15 min, r.t. ; couplage : 2 x 45 min, r.t.) ; iv) clivage de la résine et déprotection de la chaîne latérale de l'acide aspartique : TFA/TIS/H₂O (95 : 2.5 : 2.5, v/v/v, 1h45, r.t.) ; purification par RP-HPLC préparative sur colonne C₁₈ (15 à 45 % B en 30 min) ; rendement : 33 %.

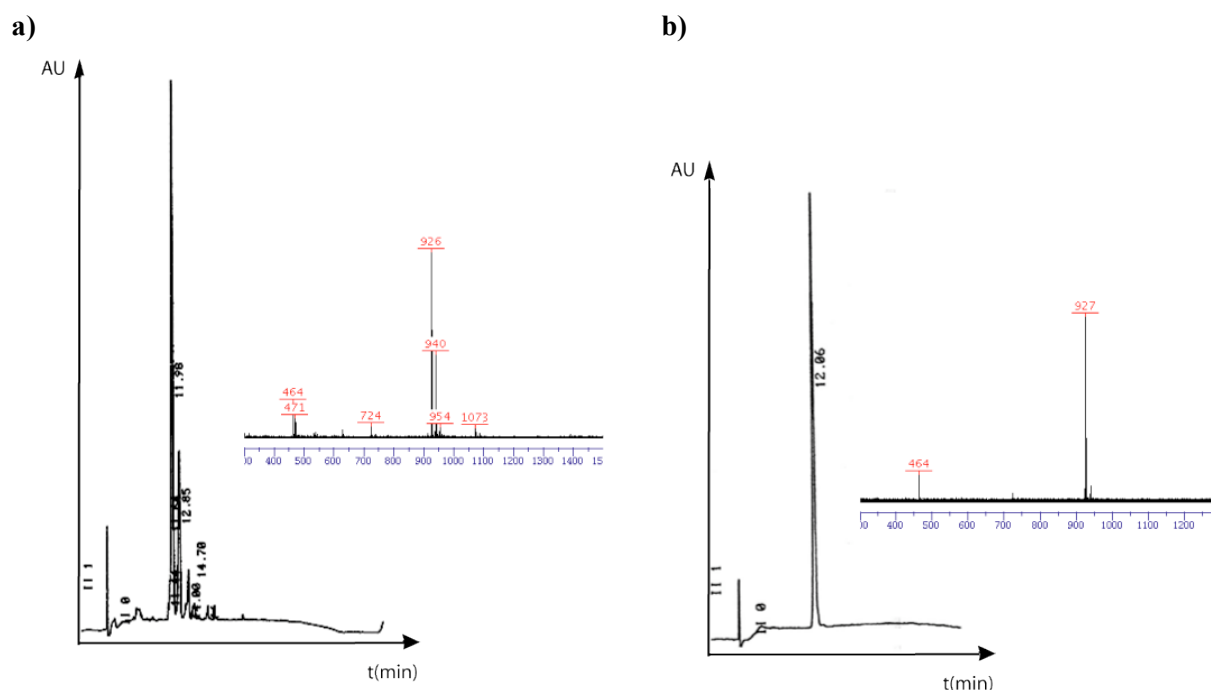


Figure 145 : Caractérisation de (**11**) **a)** avant purification : RP-HPLC analytique sur colonne C₁₈ (gradient : 5 à 100 % B en 30 min ; Rt = 11.98 min) et spectre ESI-MS (464 = [M/2+H]⁺ ; 926 = [M+H]⁺) ; **b)** après purification : RP-HPLC analytique sur colonne C₁₈ (gradient : 5 à 100 % B en 30 min ; Rt = 12.06 min) et spectre ESI-MS (464 = [M/2+H]⁺ ; 927 = [M+H]⁺).

Nous préparons trois échantillons contenant la molécule **11** dans le but d'étudier ses propriétés inhibitrices de l'amyloïdogenèse de l'Aβ(13-23) (**4**). La composition de chacune des solutions correspondantes est décrite dans le Tableau 20.

Composé	Echantillon	Concentration peptidique	Rapport 11/4
11	11S1	4 mM	
11 + 4	11S2	4 mM / 400 μM	10 : 1
11 + 4	11S3	400 μM / 400 μM	1 : 1

Tableau 20 : Liste des échantillons contenant le composé (+/-)-transcotininecarboxylyl-Pro-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-NH₂ (**11**).

L'étude de l'échantillon **11S1**, ne contenant que le produit **11**, montre la présence, après trois jours d'incubation, de quelques agrégats amorphes (Figure 146).

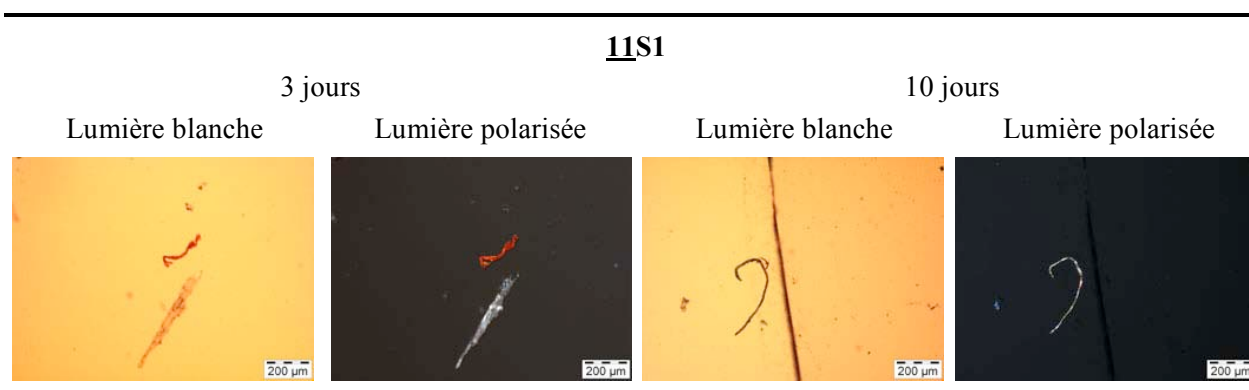


Figure 146 : Suivi de l'échantillon **11S1** par microscopie optique après coloration au rouge Congo, montrant la formation d'agrégats amorphes (pas de biréfringence vert-pomme sous une lumière polarisée).

Une fois mélangé au peptide amyloïde Aβ(13-23), avec un rapport de dix contre un en faveur de l'inhibiteur potentiel, le (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Pro-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-NH₂ (**11**) bloque la formation de fibrilles au-delà de dix jours d'incubation à température ambiante (Figure 147). En effet, la microscopie électronique ne montre que des protofibrilles, ainsi que quelques structures en ruban, tandis que le rouge Congo ne met en évidence que des filaments amorphes, sans aucune biréfringence vert-pomme sous lumière polarisée. Ces résultats sont identiques à ceux obtenus, dans les mêmes conditions, avec le (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**10**).

L'échantillon **11S3** correspond à un mélange équimolaire entre l'amyloïde β et le destructeur de feuillets β **11** (Figure 148).

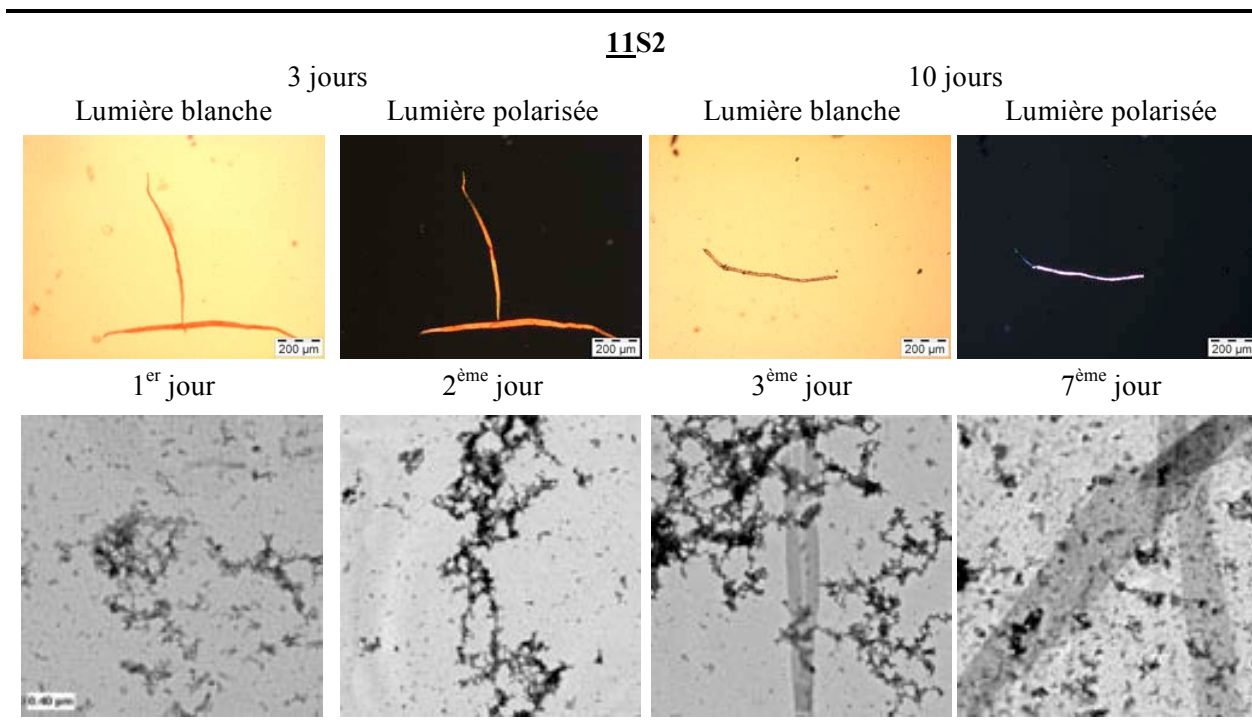


Figure 147 : Suivi de l'échantillon **11S2** par microscopie optique après coloration au rouge Congo (en haut) et par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (en bas) ; en haut : formation d'agrégats amorphes sans aucune biréfringence vert-pomme sous une lumière polarisée ; en bas : présence de protofibrilles entre le 1^{er} et le 7^{ème} jour d'incubation, puis apparition de structures en ruban dès le 3^{ème} jour.

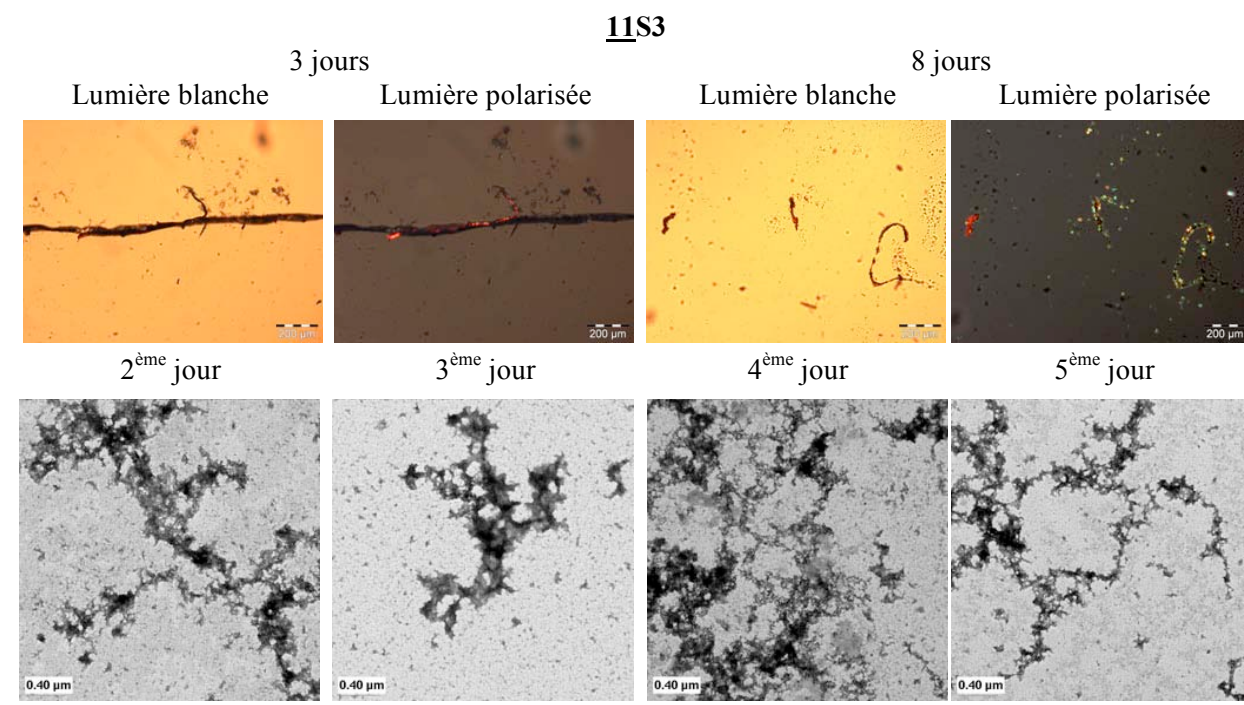


Figure 148 : Suivi de l'échantillon **11S3** par microscopie optique après coloration au rouge Congo (en haut) et par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (en bas) ; en haut : présence de fibrilles mise en évidence au bout de 8 jours d'incubation à température ambiante (biréfringence vert-pomme sous une lumière polarisée) ; en bas : présence de protofibrilles uniquement, pas de fibrilles visualisées.

Pendant les cinq premiers jours d'incubation, la microscopie électronique ne révèle la présence d'aucunes fibrilles. Il en est de même pour la coloration au rouge Congo après trois jours d'incubation. Par contre au huitième jour, nous pouvons observer, à la lumière polarisée, un certain nombre de fibrilles colorées en vert-pomme.

Comparons maintenant ces résultats à ceux obtenus avec la molécule **10** dans l'échantillon **10S3**. Nous constatons que nous avons alors quelques structures amyloïdes après coloration au rouge Congo au troisième jour d'incubation. Il semblerait donc que le dérivé de cotinine **11**, contenant la séquence de reconnaissance de l'amyloïde plus longue soit plus efficace que l'analogue **10**.

Suite à ces résultats préliminaires plutôt prometteurs, le produit (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Pro-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-NH₂ (**11**) est testé en présence d'Aβ(1-42) par le groupe de C. Soto. La quantité d'amyloïdes formés est mesurée grâce à la fluorescence émise par la thioflavine T liée à ces structures. Les expériences réalisées ont alors permis de mettre en évidence une certaine activité inhibitrice du composé **11**, qui devra cependant être confirmée par d'autres analyses indépendantes. La méthode utilisée ici montra que plus est que le (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Pro-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-NH₂ (**11**) était légèrement plus efficace que son analogue (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**10**), corroborant ainsi nos premiers résultats.

2. Synthèse d'un dérivé d'acide indolebutyrique

La structure de l'acide 3-indolebutyrique est relativement proche de celle de la mélatonine, et ce principalement grâce à la présence du noyau indolique. Ainsi, s'il est vrai que les noyaux aromatiques interagissent avec les feuillettes β²⁷⁷, cette molécule organique devrait remplir un rôle similaire à celui de la mélatonine.

Le composé 3-indolebutyryl-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**12**) devrait nous permettre, par comparaison directe avec le (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**8**), voire même avec le (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**10**), de savoir qui, de l'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique ou de l'acide 3-indolebutyrique, serait le meilleur bloc inhibiteur de la fibrillogénèse de l'amyloïde β (Figure 149). Nous pouvons aussi nous demander quelle pourrait être l'influence de la chaîne carbonnée flexible de l'acide 3-indolebutyrique sur l'arrangement de la molécule en présence de feuillettes β, par rapport à une structure aromatique rigide comme celle de la cotinine. L'étude de ce nouveau dérivé devrait ainsi nous aider à répondre à ces questions.

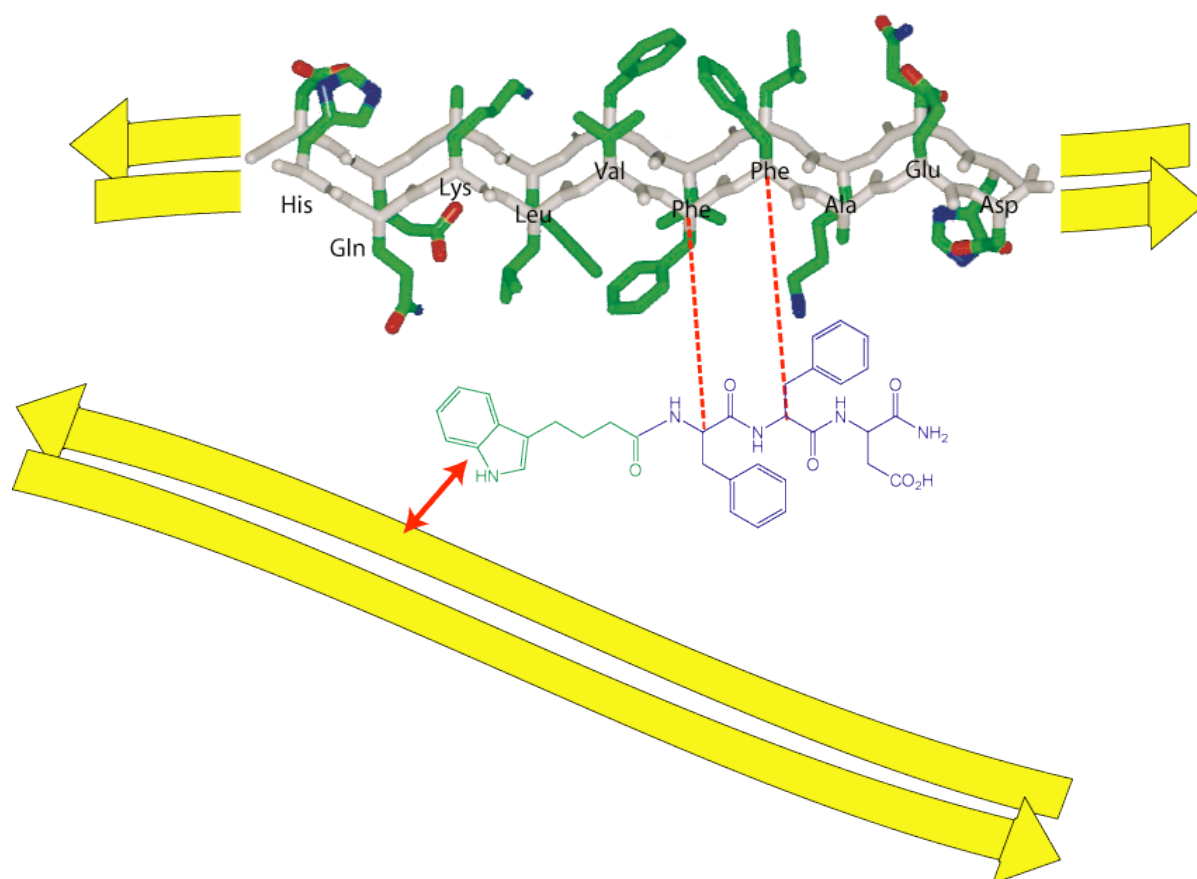


Figure 149 : Représentation schématique des interactions envisagées entre le mème peptidique 3-indolebutyryl-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**12**) et un dimère de l'Aβ(14-23)²²³ : les deux phénylalanines (en bleu) de l'inhibiteur potentiel devraient se lier aux phénylalanines 19 et 20 du peptide pathogène, tandis que l'indole (en vert) serait en mesure soit d'interagir avec un autre brin β, soit d'inhiber la formation d'autres brins β selon un mécanisme actuellement inconnu ; ces deux effets, celui de la trimère peptidique et celui du mème de la mélatonine, devraient alors entrer en compétition, destabilisant l'enchaînement normal des feuillettes β de l'amyloïde et bloquant leur propagation ; les pointillés rouges symbolisent les interactions existant entre les deux résidus désignés par l'extrémité des traits au niveau de leur C_α ; la flèche rouge symbolise l'effet destructeur du mème de la mélatonine sur les feuillettes β.

La molécule **12** est synthétisée en phase solide sur une résine Rink Amide MBHA, ainsi que cela l'est décrit dans la Figure 150. Après déprotection de la chaîne latérale de l'acide aspartique et clivage de la résine par traitement avec une solution d'acide trifluoroacétique à 95 % dans les pièges chimiques eau (2.5 %) et TIS (2.5 %), la solution contenant le mème peptidique est concentrée sous pression réduite et lyophilisée pour donner un solide vert-foncé. Après purification par RP-HPLC préparative, nous obtenons le produit désiré avec un rendement de 3 %, que nous caractérisons par RP-HPLC analytique et spectroscopie de masse ESI-MS (Figure 151).

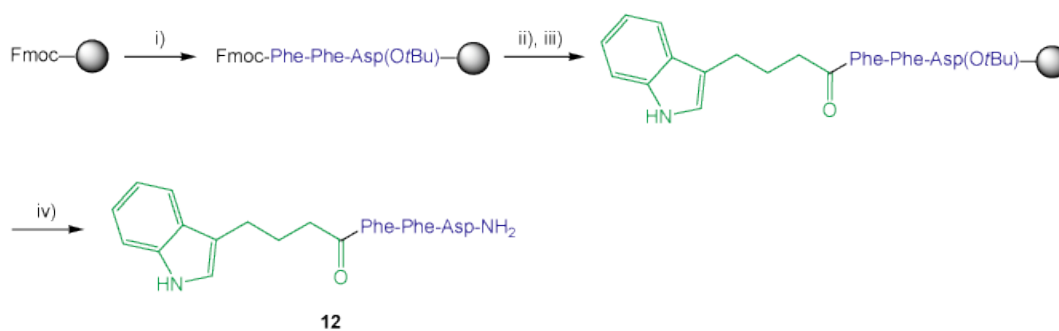


Figure 150 : Synthèse du 3-indolebutyryl-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**12**) : i) SPPS sur résine Rink Amide MBHA, en stratégie Fmoc/tBu ; ii) déprotection du Fmoc : 20 % pipéridine/DMF (5 x 2 min, r.t.) ; iii) couplage de l'acide 3-indolebutyrique après sa préactivation avec du PyBOP (préactivation : 15 min, r.t. ; couplage : 1 x 1h, 1 x 30 min, r.t.) ; iv) clivage de la résine et déprotection de la chaîne latérale de l'acide aspartique : TFA/TIS/H₂O (95 : 2.5 : 2.5, v/v/v, 1h15, r.t.) ; purification par RP-HPLC préparative sur colonne C₁₈ (30 à 60 % B en 30 min) ; rendement : 3 %.

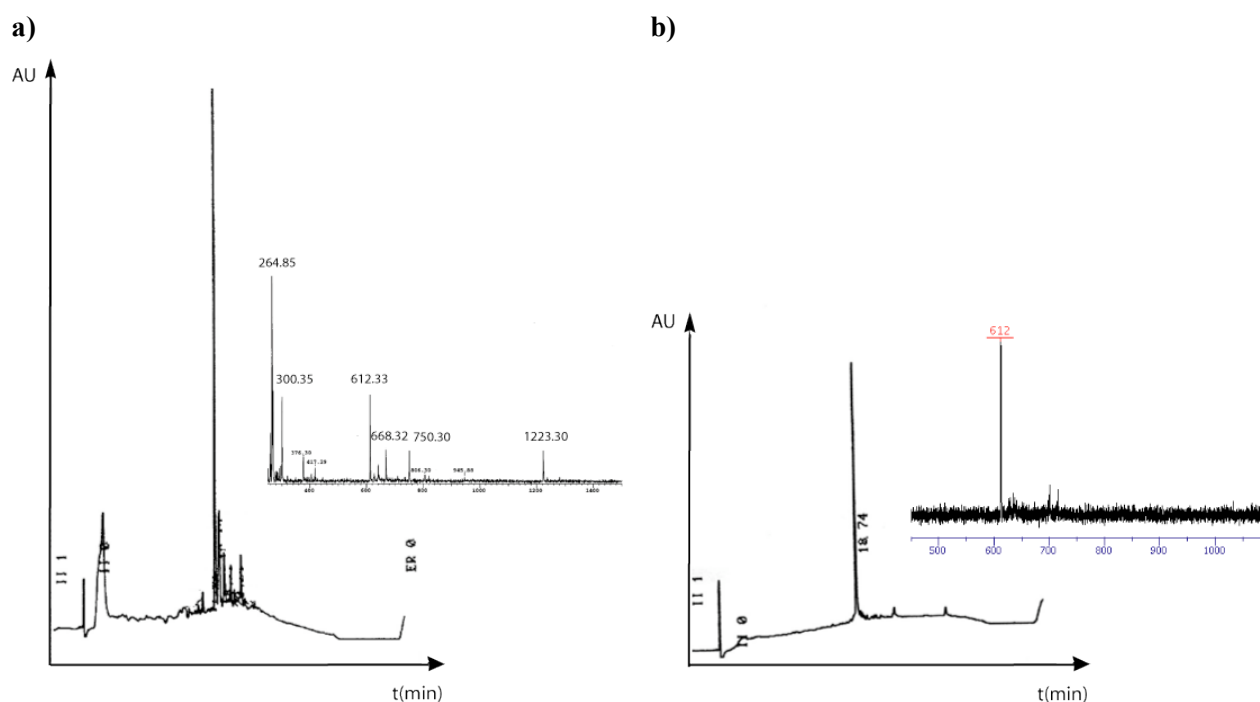


Figure 151 : Caractérisation de (**12**) **a**) avant purification : RP-HPLC analytique sur colonne C₁₈ (gradient : 5 à 100 % B en 30 min ; Rt = 18.43 min) et spectre ESI-MS (612.33 = [M+H]⁺) ; **b**) après purification : RP-HPLC analytique sur colonne C₁₈ (gradient : 5 à 100 % B en 30 min ; Rt = 18.74 min) et spectre ESI-MS (612 = [M+H]⁺).

Les dérivés d'indole sont très facilement sujets à des substitutions électrophiles, notamment au moment du clivage où les ions carbonium ont tendance à alkyler le cycle aromatique^{290, 291}. Des deux cycles, l'hétérocycle est le plus riche en électrons. Les attaques électrophiles se font donc principalement en position 2 ou 3 de l'indole, avec une nette préférence pour la position 3 ; l'attaque de l'azote faisant perdre le caractère aromatique à la molécule, cette réaction est plutôt défavorable. L'utilisation d'autres pièges chimiques tels que l'éthanedithiol contrôle généralement ces réactions d'alkylation du moins dans le cas du tryptophane²⁹¹.

L'oxydation est la seconde réaction indésirable couramment observée avec les dérivés indoliques. La couleur vert-foncé obtenue après clivage du mime peptidique **12** est d'ailleurs un signe caractéristique de cette oxydation. Une isolation plus rapide du peptide hors du milieu acide dans lequel il se trouve au moment du clivage permettrait peut-être de limiter ce phénomène.

Enfin, dans le cas de peptides se terminant par un résidu tryptophane, il a été observé des cas de ré-attachement du peptide sur la résine. Ce phénomène explique très souvent des rendements de synthèse relativement faibles, comme c'est le cas avec notre peptide conjugué **12**²⁹¹. Ce problème se résoud généralement en utilisant une protection N-*tert*-butoxycarbonyl sur l'azote de l'indole.

Nous avons réussi à isoler suffisamment de produit pour pouvoir évaluer ses capacités d'inhibition d'amyloïdogenèse. De la même façon que nous avons procédé avec les dérivés de cotinine, nous allons tout d'abord tester l'efficacité de l'acide indolebutyrique en présence d'amyloïde A β (13-23) (**4**). Pour cela, nous préparons deux échantillons : le premier ne contient que la molécule organique (échantillon **Indole_S1**), tandis que le second est un mélange 10 : 1 d'acide et d'amyloïde (échantillon **Indole_S2**, Tableau 21).

Composé	Echantillon	Concentration peptidique	Rapport Indole/4
Indole	Indole_S1	4 mM	
Indole + 4	Indole_S2	4 mM / 400 μ M	10 : 1

Tableau 21 : Liste des échantillons contenant l'acide 3-indolebutyrique, noté **Indole** pour des raisons de simplification.

La solution d'acide 3-indolebutyrique contient, après trois jours d'incubation à température ambiante, une certaine quantité d'agrégats dus à la précipitation du produit dans le mélange de solvants utilisés, à savoir le méthanol et une solution tampon à pH 7.42 (Figure 152).

Une fois mélangé en large excès avec l'amyloïde A β (13-23) (**4**), l'acide 3-indolebutyrique ralentit la formation de fibrilles qui ne sont observées qu'au dixième jour d'incubation après coloration au rouge Congo et observation au microscope optique sous lumière polarisée (Figure 153). Ces résultats sont semblables à ceux obtenus avec l'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique dans l'échantillon **Cotinine_S2**.

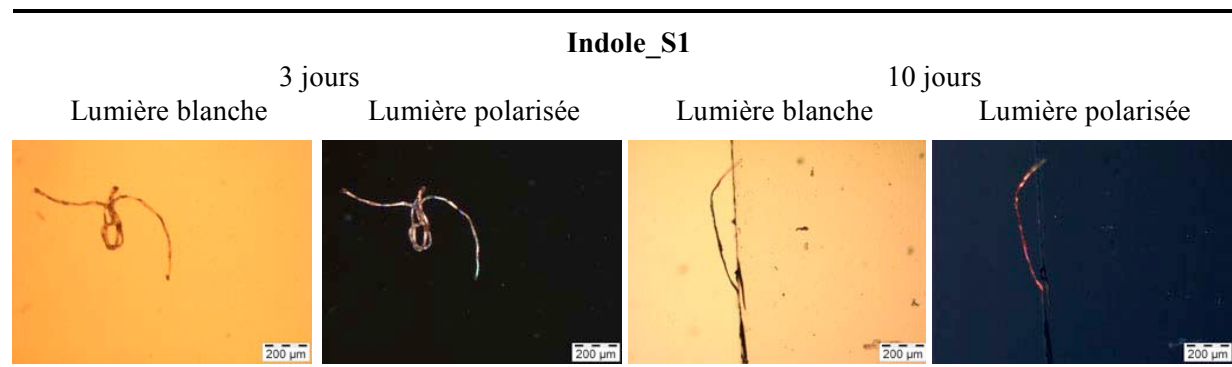


Figure 152 : Suivi de l'échantillon **Indole_S1** par microscopie optique après coloration au rouge Congo : le composé précipite pour former des agrégats amorphes (pas de biréfringence vert-pomme).

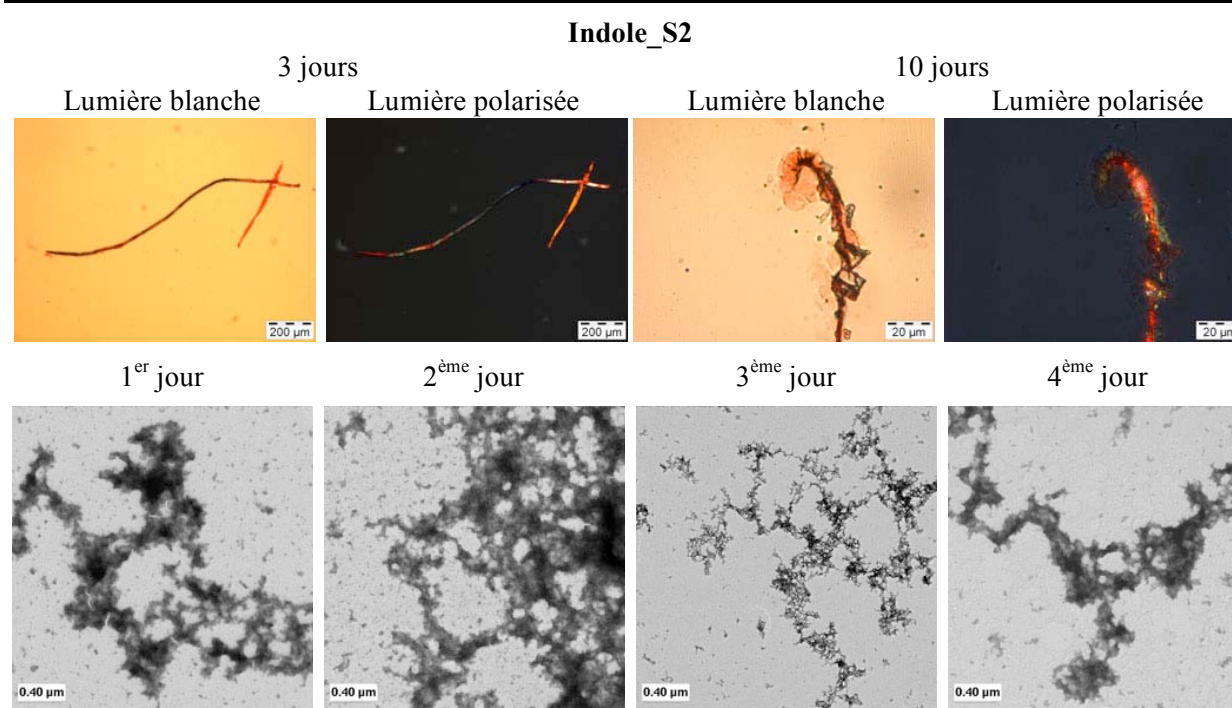


Figure 153 : Suivi de l'échantillon **Indole_S2** par microscopie optique après coloration au rouge Congo (en haut) et par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (en bas) ; en haut : pas de fibrilles après 3 jours, mais observation de ces structures après 10 jours (biréfringence vert-pomme sous une lumière polarisée) ; en bas : présence de protofibrilles du 1^{er} au 4^{ème} jour, pas de fibrilles.

Nous ne préparons ensuite qu'un seul échantillon contenant le produit 3-indolebutyryl-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**12**) dans un mélange équimolaire avec l'amyloïde Aβ(13-23) (**4**) (Tableau 22).

Composé	Echantillon	Concentration peptidique	Rapport 12/4
12 + 4	12S1	400 μM / 400 μM	1 : 1

Tableau 22 : Composition de l'échantillon contenant le composé **12**.

La solution **12S1** est laissée à température ambiante. Elle est analysée par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle au bout d'un, quatre, cinq et huit jours d'incubation : les photographies obtenues au cours des cinq premiers jours ne montrent que des protofibrilles, quelques fibrilles apparaissant sur les photographies prises le huitième jour (Figure 154). La coloration au rouge Congo ne révèle pas non plus de fibrilles après trois jours d'incubation, mais en met en évidence après huit jours.

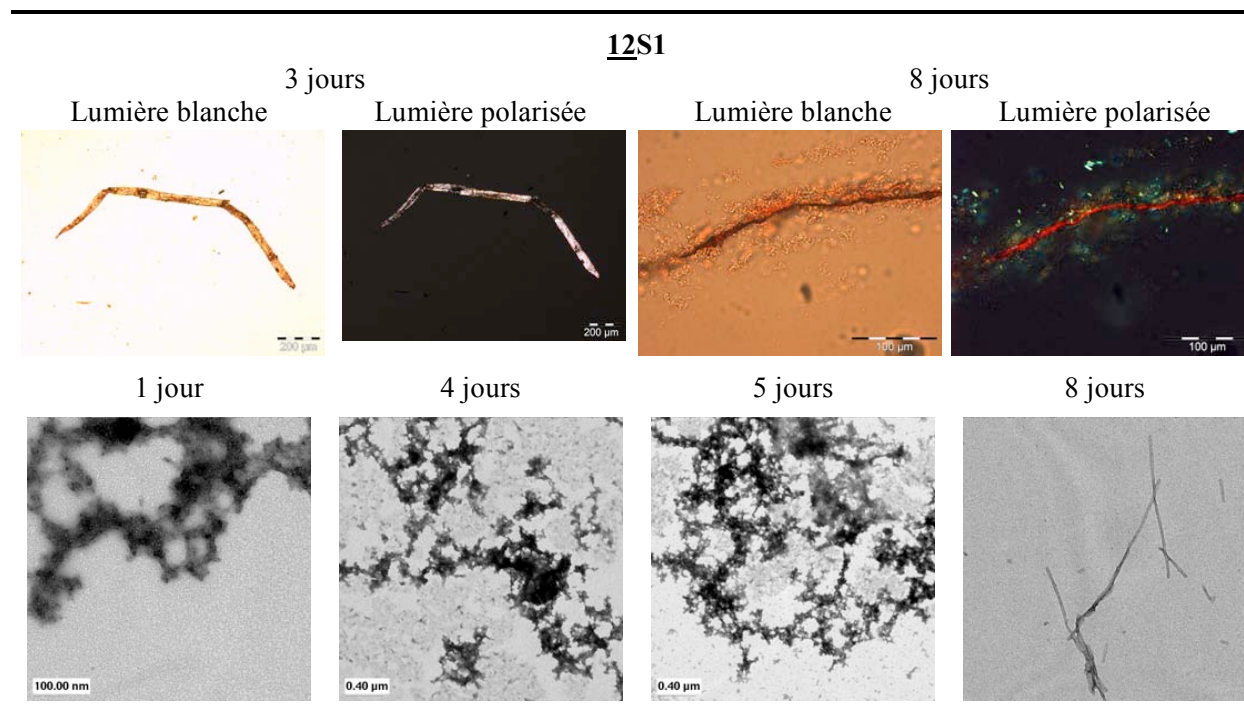


Figure 154 : Suivi de l'échantillon **12S1** par microscopie optique après coloration au rouge Congo (en haut) et par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (en bas) ; en haut : agrégats amorphes après 3 jours, fibrilles après 8 jours (biréfringence vert-pomme sous une lumière polarisée) ; en bas : exclusivement des protofibrilles entre le 1^{er} et le 5^{ème} jour, apparition de fibrilles après 8 jours.

La molécule 3-indolebutyryl-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**12**) semble donc être relativement efficace en tant qu'inhibiteur de la fibrillogenèse de l'amyloïde β. Si nous comparons ces résultats à ceux obtenus avec le (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**10**) dans les mêmes conditions (échantillon **10S3**), nous nous apercevons que la nouvelle molécule est plus efficace que ce dérivé de cotinine. Elle aurait tendance à agir de la même façon que le (+/-)-trans-4-cotininecarboxylyl-Pro-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-NH₂ (**11**, échantillon **11S3**).

Il serait donc intéressant de s'investir plus dans les analyses et tests de ce produit. Pour cela, il nous faudrait re-synthétiser la molécule, en appliquant les modifications suggérées plus haut afin d'améliorer les rendements de synthèse. Nous pourrions aussi envisager de concevoir d'autres dérivés d'acide 3-indolebutyrique, intégrant par exemple une proline, pour son effet destructeur de feuillets β, ou la

séquence de reconnaissance plus longue de l'amyloïde β , permettant, d'après nos résultats préliminaires (voir Résultats et Discussion, Chapitre 3. II.1).

3. Synthèse d'un peptide conjugué contenant un groupe Hao

Le mime de brin β Hao (générique présent de J. S. Nowick) est directement couplé à une proline, de façon à induire un coude dynamique. Elle est elle-même connectée à la courte séquence de reconnaissance peptidique de l'amyloïde β , Phe-Phe-Asp, sensée interagir directement avec les résidus 19 et 20 de l'amyloïde β . Le groupe Hao, grâce aux liaisons hydrogène qu'il peut établir par l'intermédiaire de ses fonctions carbonylées et aminées, devrait se lier facilement aux feuillets β de l'amyloïde. L'effet de la proline devrait alors permettre de destructurer l'arrangement antiparallèle des fibrilles, d'une manière relativement similaire à celle présentée dans la Figure 155.

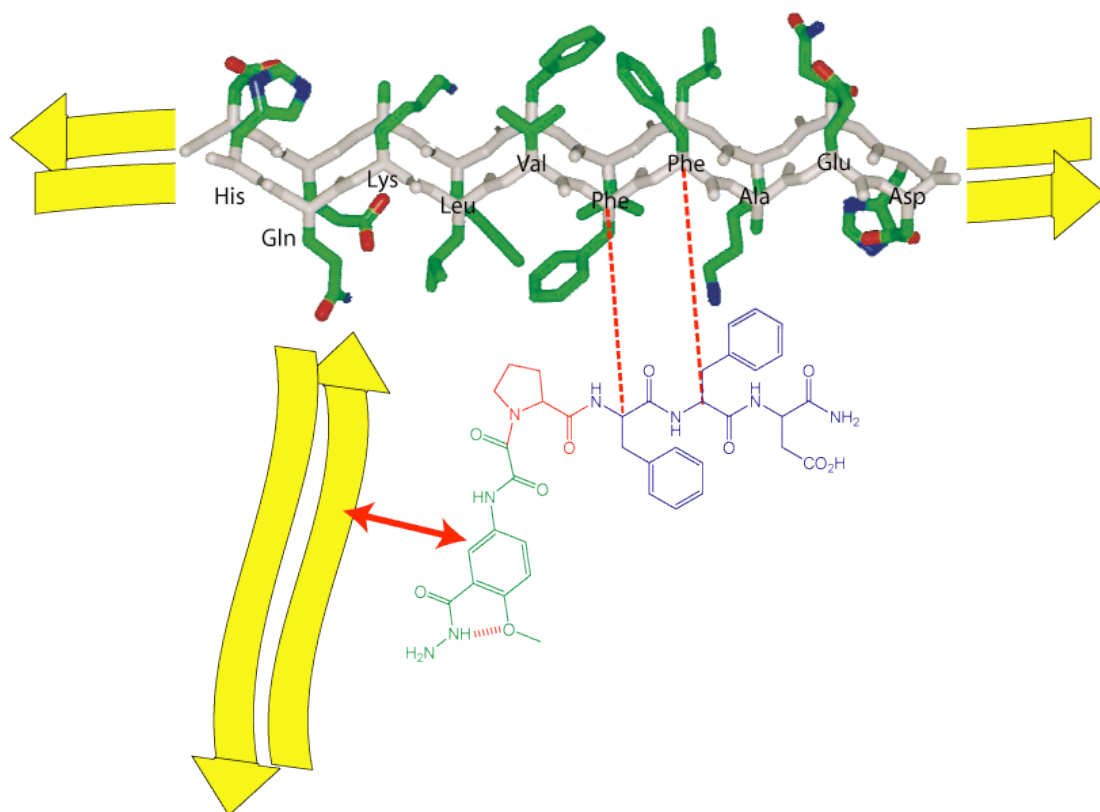


Figure 155 : Représentation schématique des interactions envisagées entre le conjugué peptidique Hao-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**13**) et un dimère de l'A β (14-23)²²³ : les deux phénylalanines (en bleu) de l'inhibiteur potentiel devraient se lier aux phénylalanines 19 et 20 du peptide pathogène, tandis que le groupe Hao (en vert) interagit avec un autre brin β , la proline (en rouge) induisant un coude dans la structure ; les deux interactions se faisant dans des directions opposées, elles devraient alors destabiliser l'enchaînement normal des feuillets β de l'amyloïde et bloquer leur propagation ; les pointillés rouges symbolisent les interactions existant entre les deux résidus désignés par l'extrémité des traits au niveau de leur C α ; la flèche rouge représente l'effet du mime de brin β Hao sur les feuillets β de l'amyloïde.

La molécule Hao-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**13**) est synthétisée en phase solide sur une résine Rink Amide MBHA en suivant les procédés standards de la SPPS (Figure 156). Le groupe Hao est protégé par un groupement 2,7-di-*tert*-butyl-9-fluorénylméthoxycarbonate, abrégé Fmoc*. Ce groupe protecteur, mis au point par le groupe de J. S. Nowick, a l'avantage d'avoir une meilleure solubilité que son analogue 9-fluorénylméthoxycarbonate Fmoc²⁹². La libération de l'amine se fait dans les mêmes conditions que lorsqu'elle est protégée par le groupement Fmoc, c'est-à-dire après un traitement de vingt minutes dans une solution de 20 % de pipéridine dans le DMF à température ambiante. Après déprotection de l'Hao, le conjugué peptidique est déprotégé et clivé de la résine, puis précipité dans le diéthyl éther glacé, lyophilisé et purifié par RP-HPLC préparative C₁₈. Les spectres de masse ESI-MS et de RP-HPLC analytique caractérisant le produit **13** sont présentés dans la Figure 157.

Des essais d'acétylation en solution de l'hydrazine ne permirent pas d'obtenir le produit désiré mais entraînèrent de nombreuses réactions secondaires sur la molécule de départ Hao-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**13**).

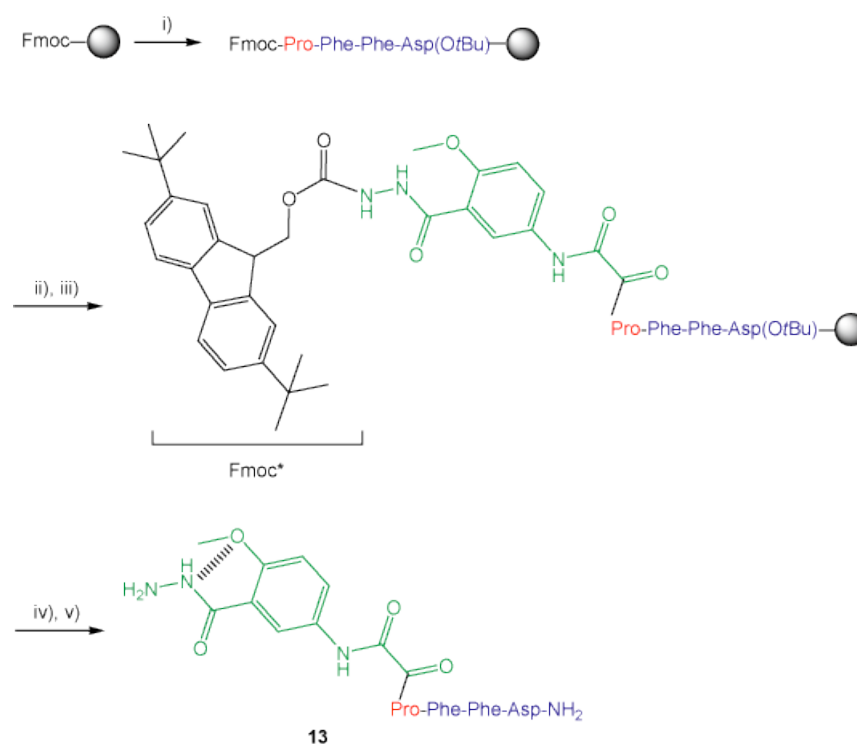


Figure 156 : Synthèse du composé Hao-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**13**) : i) SPPS sur résine Rink Amide MBHA, en stratégie Fmoc/*t*Bu ; ii) déprotection du Fmoc : 20 % pipéridine/DMF (5 x 2 min, r.t.) ; iii) couplage du Fmoc*-Hao-OH en présence de HATU et DIPEA dans un mélange DCM/DMF (2h30, r.t.) ; iv) déprotection du Fmoc* : 20 % pipéridine/DMF (5 x 2 min, r.t.) ; v) clivage de la résine et déprotection de la chaîne latérale de l'acide aspartique : TFA/TIS/H₂O (95 : 2.5 : 2.5, v/v/v, 2h30, r.t.) ; purification par RP-HPLC préparative sur colonne C₁₈ (0 à 100 % B en 30 min) puis par RP-HPLC semi-préparative (20 à 50 % B en 30 min) ; rendement : 17 %.

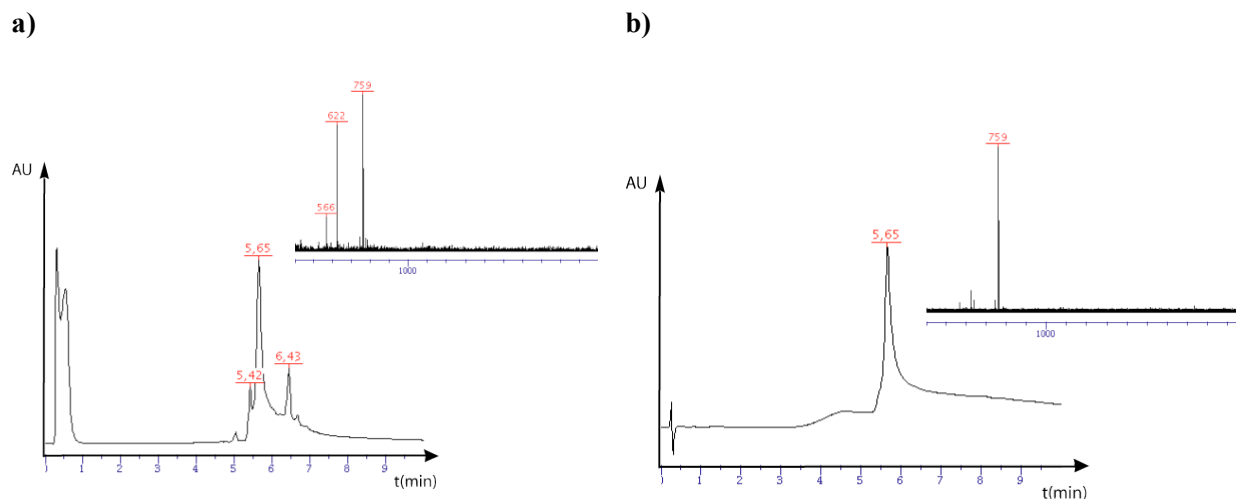


Figure 157 : Caractérisation du peptide conjugué *Hao-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂* (**13**) **a)** avant purification : RP-HPLC analytique sur colonne *C₁₈* (gradient : 0 à 100 % B en 10 min ; *R_t* = 5.65 min) et spectre ESI-MS (759 = $[M+H]^+$) ; **b)** après purification : RP-HPLC analytique sur colonne *C₁₈* (gradient : 0 à 100 % B en 10 min ; *R_t* = 5.65 min) et spectre ESI-MS (759 = $[M+H]^+$).

Dans la série des peptides conjugués, nous avons donc synthétisé six produits différents : quatre sont des dérivés de cotinine (composés **8** à **11**), l'un utilise un noyau indolique sensé mimer la mélatonine (molécule **12**), tandis que le dernier utilise un mime de brin β , Hao (produit **13**). Certains d'entre eux ont montré une certaine activité en tant qu'inhibiteurs de la fibrillogénèse de l'amyloïde β , les plus efficaces étant le (+/-)-trans-4-cotininecarboxyl-yl-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**10**), le (+/-)-trans-4-cotininecarboxyl-yl-Pro-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-NH₂ (**11**) et le 3-indolebutyryl-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**12**). D'autres tests restent cependant à effectuer afin de confirmer les résultats obtenus ici. Nous avons aussi suggéré quelques autres synthèses pouvant permettre d'améliorer l'activité inhibitrice des peptides conjugués.

Chapitre 3 : Dynamisation

I. Les « switch-peptides »

1. Validation du concept

Les résultats obtenus par C. Boissard, C. Soto *et al* nous ont permis de définir les prérequis d'une nouvelle classe d'inhibiteurs plus puissants pour lutter contre l'amyloïdogenèse de l'amyloïde $\beta^{247, 249}$. Les molécules de cette famille agiraient idéalement en deux temps : dans un premier temps, elles devraient se mélanger au peptide pathogène et se lier à lui grâce à leur unité de reconnaissance amyloïdique, puis, après avoir subi une transformation structurelle induisant la formation d'un coude dans leur séquence, elles devraient être en mesure d'éloigner les brins β les uns des autres et donc de détruire les feuillets β en cours d'agrégation (Figure 158).

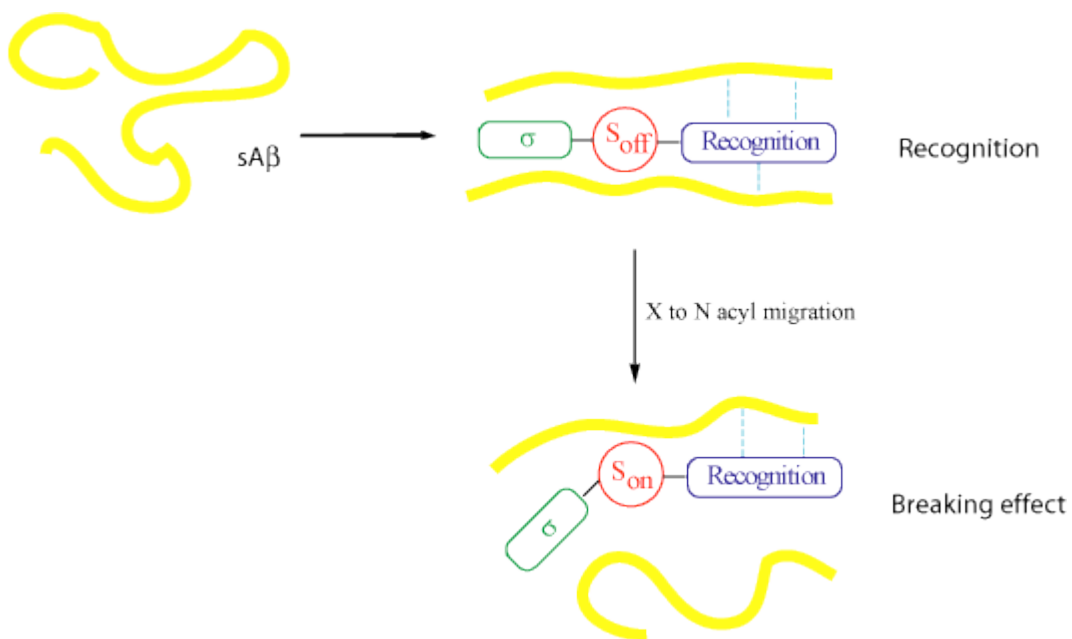


Figure 158 : Stratégie d'inhibition de la fibrillogenèse de l'amyloïde β utilisant le concept des « switch-peptides » ; la molécule synthétisée ici est composée de trois blocs : une unité d'induction (σ , en vert), un élément « switch » (en rouge) et une séquence de reconnaissance peptidique de l'amyloïde β (en bleu) ; le composé agit alors en deux temps : 1/ il se lie à l'amyloïde β par l'intermédiaire de sa séquence de reconnaissance (état S_{off} , recognition) ; 2/ suite à la migration acylique $O \rightarrow N$, la molécule forme un coude qui détruit l'arrangement en feuillets β du peptide pathogène (état S_{on} , breaking effect)²³.

Cette stratégie nécessite cependant l'élaboration d'un nouveau concept de « switch-peptides », concept que nous avons déjà abordé au cours du Chapitre 1 de l'Introduction²³. Le « switch-peptide » est formé de trois parties : une unité d'induction conformationnelle σ (en vert, Figure 158), un élément « switch » S (en rouge) pouvant adopter au choix l'état S_{off} ou l'état S_{on} via une migration acylique intramoléculaire, et

un peptide de reconnaissance (Recognition, en bleu) semblable à ceux utilisés pour la molécule cyclique **3** ou les peptides conjugués synthétisés précédemment (composés **8** à **13**).

A l'état S_{off} , le peptide linéaire devrait être en mesure de reconnaître l'amyloïde avec une haute spécificité. Le déclenchement du réarrangement acylique $X \rightarrow N$ devrait ensuite rétablir l'influence de l'unité d'induction σ sur le reste de la molécule, entraîner la formation du coude désiré et permettre la destruction des fibrilles en formation (Figure 158).

Dans un premier temps, nous avons décidé d'utiliser, comme élément « switch », un acide aminé naturel. Parmi les trois candidats disponibles et aptes à ce rôle, à savoir la sérine, la thréonine et la cystéine, notre choix s'est porté sur le dérivé thiolé, que nous pourrions ensuite comparer aux deux autres composés utilisés par d'autres collaborateurs du groupe de M. Mutter^{23, 46, 47}.

D'après notre stratégie, nous avons besoin d'insérer un coude au niveau de l'unité d'induction conformationnelle afin de pouvoir détruire les feuillets β . Nous avons alors choisi d'utiliser une pseudo-proline adoptant majoritairement une conformation cis, telle que l'acide (L)-2,2-diméthyl-4-thiazolidinecarboxylique noté H-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH. Ce mime d'acide aminé sera couplé alors à un résidu hydrophobe pour respecter au maximum l'enchaînement naturel des acides aminés de l'amyloïde β (Résultats et Discussion, Chapitre 1, I. Considérations générales).

Dans un souci de validation de ce nouveau concept, nous avons tout d'abord omis de connecter l'élément « switch » à la séquence de reconnaissance de l'amyloïde.

L'acide (L)-2,2-diméthyl-4-thiazolidinecarboxylique **14** est synthétisé d'après une adaptation de la procédure décrivant la réaction de condensation de l'hydrochlorhydrate de la L-cystéine avec du 2,2-diméthoxypropane²⁹³ (Figure 159). La pseudo-proline est récoltée par filtration après précipitation à froid et utilisée directement dans la prochaine étape sans autre purification.

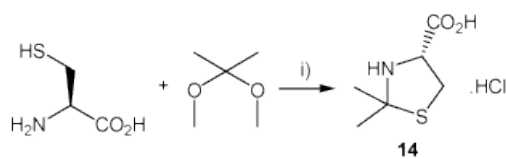


Figure 159 : Formation du chlorhydrate de l'acide (L)-2,2-diméthyl-4-thiazolidinecarboxylique H-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH.HCl (**14**) : i) condensation entre la H-Cys-OH.HCl (1 eq.) et le 2,2-diméthoxypropane (18 eq.) dans l'acétone (0.1 M) (1 h à reflux, 30 min à r.t.) ; précipitation à froid puis filtration ; rendement : 60 %.

La pseudo-proline **14** est ensuite couplée à la Fmoc- β -alanine, choisie comme résidu hydrophobe. L'acide carboxylique de la Fmoc- β Ala-OH est d'abord activé sous forme de chlorure d'acyle avec du chlorure d'oxalyle (composé **15**, Figure 160), avant de réagir sur l'amine du produit **14**. La réaction se fait sans observation de racémisation, avec un rendement de 60 % après purification par RP-HPLC préparative.

L'amine de la β -alanine est ensuite déprotégée puis acétylée suivant des conditions standards pour conduire au dipeptide désiré Ac- β Ala-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH (**17**) (Figure 160).

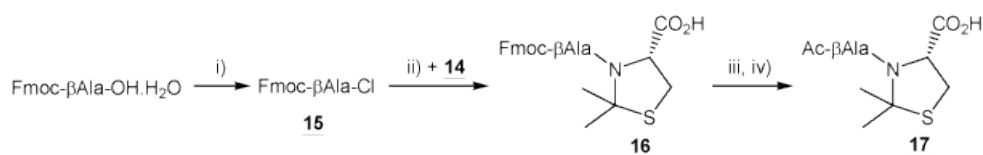


Figure 160 : Formation du dipeptide Ac- β Ala-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH (**17**) : i) transformation de la Fmoc- β Ala-OH.H₂O (1 eq.) en son chlorure d'acyle correspondant **15** : chlorure d'oxalyle (1 eq.), DCM anhydre (0.2 M) et DMF (0.02 eq.) (sous argon, 2h, r.t., quantitatif) ; ii) couplage entre le composé **15** (1.2 eq.) et la pseudo-proline **14** (1 eq.) dans le THF, DCM et DMF (sous argon, 0°C puis r.t., 15h) ; lavages, purification par RP-HPLC préparative sur une colonne C₁₈ (gradient : 5 à 100 % B en 30 min) ; rendement : 60 % ; iii) clivage du Fmoc : diéthylamine (1.5 eq.), DMF (0.22 mM) (40 min, r.t.) ; iv) acétylation : anhydride acétique (4 eq.), pyridine (4 eq.), DCM anhydre (0.3 mM) (sous argon, 20 min, r.t.) puis purification par RP-HPLC préparative sur colonne C₁₈ (gradient : 15 à 45 % B en 30 min) ; rendement : 91 %.

Au cours de ces dernières années, le développement de nombreuses applications centrées sur les ligations chimiques a entraîné la mise au point de diverses méthodes efficaces permettant d'accéder rapidement à différents dérivés thioesters. Cependant la majorité des travaux se focalisa principalement sur la recherche de nouvelles résines^{294, 295}, de linkers spécifiques^{296, 297, 298, 299} ou de méthodes permettant la déprotection du groupe Fmoc sans réactions secondaires entre le thioester et le nucléophile nécessaire à cette étape^{300, 301}, sans oublier les réactions de transthioestérification à partir de dérivés de thiophénol ou de benzyl mercaptan^{302, 303, 304}.

Dans notre cas, la synthèse directe, en solution, du bloc Ac- β Ala-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH **17** nous évite les problèmes liés au clivage du groupement Fmoc en présence du thioester. Puisque dans un premier temps nous n'allons pas coupler l'élément « switch » à une séquence de reconnaissance amyloïde, l'assemblage du dipeptide **17** à la Boc-Cys-OH peut se faire lui aussi en solution. La méthode mise au point pour cette étape pourra ensuite être appliquée à la synthèse de « switch-peptides » en phase solide.

La réaction de thioestérification entre la cystéine, dont l'amine est protégée par un groupement Boc, et le dipeptide **17**, se fait en milieu inerte, sans oxygène, de façon à éviter l'oxydation de la cystéine en cystine^{305, 306}. Après avoir réalisé plusieurs essais avec différents agents de couplage tels que HATU, MSNT ou DCC/HOBt, nous obtenons les meilleurs résultats, tant au niveau de la pureté du brut que du rendement, en pré-activant l'acide carboxylique du composé **17** avec du PyBOP pendant 30 min à température ambiante, puis en ajoutant l'acide aminé thiolé qui forme alors le thioester correspondant Ac- β Ala-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-(Boc)Cys-OH **18** (Figure 161). Afin d'éviter la dégradation possible du thioester due à la présence de la DIPEA dans le milieu réactionnel, la molécule **18** est directement purifiée par RP-HPLC préparative sur une colonne C₁₈ (Figure 162a).

Le choix du PyBOP pour la synthèse de thioesters fut d'ailleurs confirmé en 2003 par A. G. Beck-Sickinger et M. Beyermann qui publièrent une étude comparant différents agents d'activation entre eux ainsi que plusieurs thiols permettant d'éviter l'oxydation de la fonction -SH en disulfure³⁰⁷.

Mais revenons-en à la nomenclature utilisée pour définir nos « switch-peptides ». Il est toujours relativement délicat de nommer un mime peptidique, et surtout un depsipeptide ou son analogue thioester, car les recommandations IUPAC-IUB trouvent leurs limites³⁰⁸. Nous avons ainsi décidé de suivre les recommandations proposées par S. V. Filip et F. Cavelier, résumées dans un numéro du « Journal of Peptide Science » publié en 2004 et offrant une solution simple pour « baptiser » ce type de composés³⁰⁹. Ainsi, un « switch-peptide » à l'état S_{off} sera nommé en adjutant le nom de la partie σ , celui de l'élément « switch » et celui de la séquence de reconnaissance, celui de la protection de la fonction amine impliquée dans la migration acylique X \rightarrow N se plaçant entre parenthèses juste avant le nom de l'élément « switch ». En suivant cette nomenclature, le composé **18** se trouve donc appelé Ac- β Ala-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-(Boc)Cys-OH. La déprotection de l'amine impliquant sa protonation, la molécule se nommera Ac- β Ala-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-(H⁺)Cys-OH après le clivage du groupe Boc.

La déprotection de l'amine de la cystéine, après traitement avec une solution de 70 % de TFA dans le dichlorométhane pendant 30 min à température ambiante, conduit ainsi au premier « switch-peptide » **19**, bloqué à l'état S_{off} par le proton présent sur cette amine primaire (Figure 161). Aucune trace d'hydrolyse du thioester n'est observée au cours de cette étape : la fonction reste stable en milieu acide. Le produit **19** est ensuite caractérisé par RP-HPLC analytique et spectroscopie de masse ESI-MS, les spectres correspondants étant présentés dans la Figure 162b.

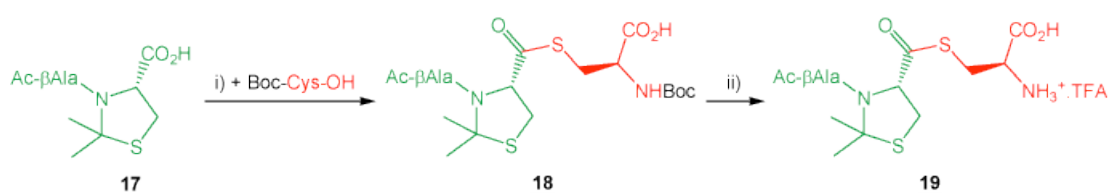


Figure 161 : Synthèse du « switch-peptide » Ac- β Ala-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-(H⁺)Cys-OH (**19**) : i) thioestérification : pré-activation de l'acide carboxylique du dipeptide **17** (1.2 eq.) avec du PyBOP (1.2 eq.) dans le DMF (0.07 M) (sous argon, 30 min, r.t.) ; addition de la Boc-Cys-OH (1 eq.) et de DIPEA (2.6 eq.) (argon, 1h30, r.t.) ; purification par RP-HPLC sur colonne C₁₈ (gradient : 15 à 45 % B en 30 min) ; rendement : 14 % ; ii) clivage du groupement Boc : 70 % TFA/DCM (30 min, r.t.) ; rendement : quantitatif ; unité d'induction en vert, élément « switch » en rouge.

Le « switch-peptide » **19**, à l'état S_{off}, est alors dissout dans une solution tampon sodium phosphate 0.2 M à pH 6.23, donnant une solution à pH de 6.15 placée dans un bain à 39°C. Le réarrangement acylique intramoléculaire S \rightarrow N, dont le mécanisme est présenté dans la Figure 163, est suivi par RP-HPLC analytique : des aliquots de 50 μ L provenant du milieu réactionnel sont dilués avec 94 μ L d'une solution

d'acide chlorhydrique 0.1 M et 50 μL de solution tampon. Le fait de descendre le pH de l'échantillon à analyser à 1 environ permet en effet de bloquer la migration acylique et de connaître la composition exacte de l'échantillon au moment voulu, en injectant 20 μL de la solution quenchée en RP-HPLC analytique. Le thioester étant stable dans ces conditions, nous n'observons pas d'hydrolyse pouvant fausser les résultats.

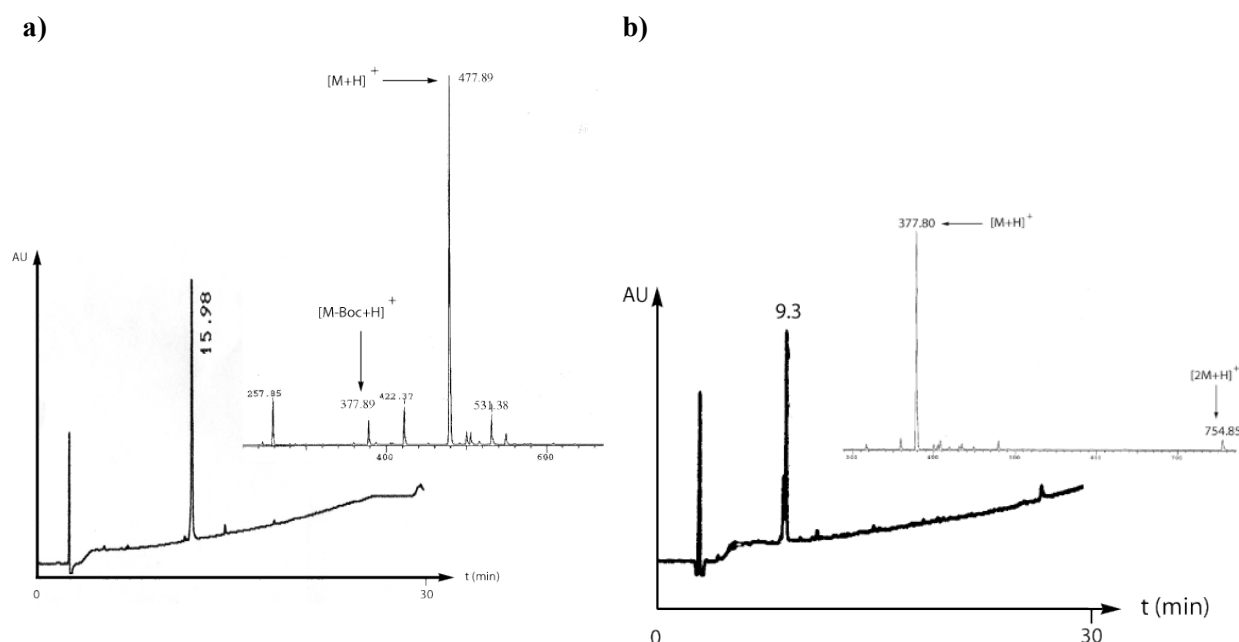


Figure 162 : Caractérisation, par RP-HPLC analytique sur une colonne C_{18} (gradient : 5 à 100 % B en 30 min) et spectroscopie ESI-MS, **a)** du thioester protégé $\text{Ac-}\beta\text{Ala-Cys}(\Psi^{\text{Me,Me}} \text{ pro})\text{-}(\text{Boc})\text{Cys-OH}$ **18** et **b)** du « switch-peptide » à l'état S_{off} $\text{Ac-}\beta\text{Ala-Cys}(\Psi^{\text{Me,Me}} \text{ pro})\text{-}(\text{H}^+)\text{Cys-OH}$ **19**.

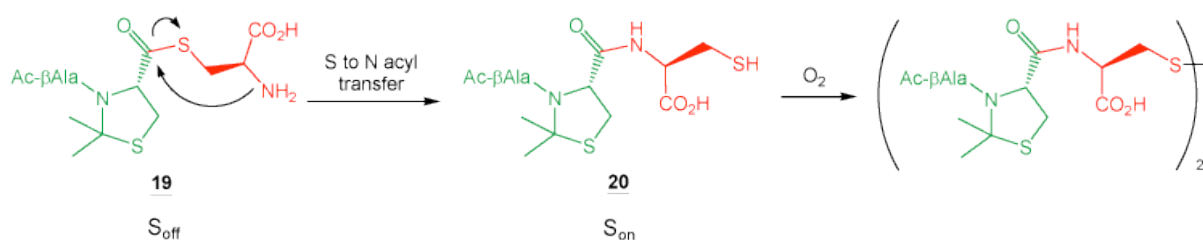


Figure 163 : Principe de la migration acylique intramoléculaire $S \rightarrow N$ appliquée au « switch-peptide » $\text{Ac-}\beta\text{Ala-Cys}(\Psi^{\text{Me,Me}} \text{ pro})\text{-}(\text{H}^+)\text{Cys-OH}$ (**19**, état S_{off}), conduisant au « switch-peptide » $\text{Ac-}\beta\text{Ala-Cys}(\Psi^{\text{Me,Me}} \text{ pro})\text{-Cys-OH}$ (**20**, état S_{on}), pouvant être soumis à une oxydation en présence de l'oxygène de l'air, formant alors le dimère correspondant.

Les spectres RP-HPLC correspondant à l'étude de cette cinétique sont présentés dans la Figure 164a. Au bout de 15 min, il ne reste pratiquement plus de « switch-peptide » à l'état S_{off} (**19**). Nous voyons par contre apparaître un autre pic, plus hydrophobe, correspondant à la forme oxydée du « switch-peptide » **20** à l'état S_{on} (Figure 164a et c). Ce phénomène est dû à la présence de l'oxygène contenu dans l'air. Il

peut être évité en dégazant préalablement à l'azote toutes les solutions utilisées et en réalisant la migration sous une atmosphère d'argon.

La variation de l'absorbance UV pour chaque produit S_{off} (**19**) et S_{on} (**20**) nous permet de déterminer, d'après une cinétique du premier ordre, le temps de demi-vie de ce réarrangement, égal à 2 min 30 sec (Figure 165). Cette réaction est donc relativement rapide, bien qu'elle se produise à un pH encore acide.

Ce premier test avec le « switch-peptide » **19** nous permet ainsi de valider notre nouveau concept de « switch-peptides » avec la cystéine comme élément « switch ». La migration acylique se fait rapidement, même à pH 6, mais il faut prendre garde à travailler en conditions non oxydantes pour conserver le thiol libre.

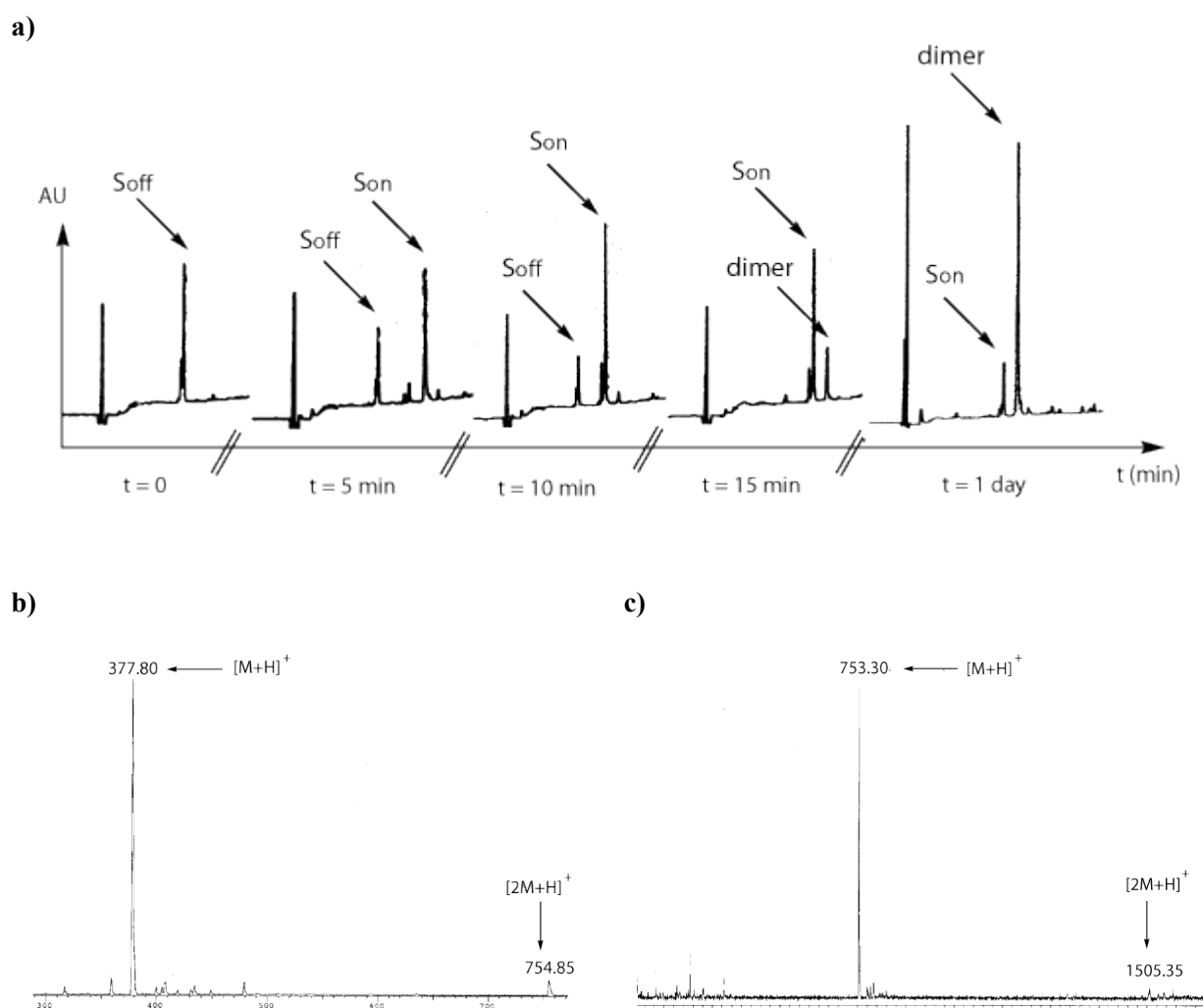


Figure 164 : Cinétique du réarrangement acylique intramoléculaire $S \rightarrow N$ à pH 6.15 et à 39°C pour le « switch-peptide » **19**, permettant de valider ce concept de « switch-peptides » : **a)** suivi par RP-HPLC analytique sur une colonne C_{18} (gradient : 5 à 100 % B en 30 min) ; **b)** spectre ESI-MS du milieu réactionnel à $t = 0$: caractérisation du « switch-peptide » **19** ; **c)** spectre ESI-MS du milieu réactionnel après 1 jour : caractérisation de la forme oxydée du « switch-peptide » **20**.

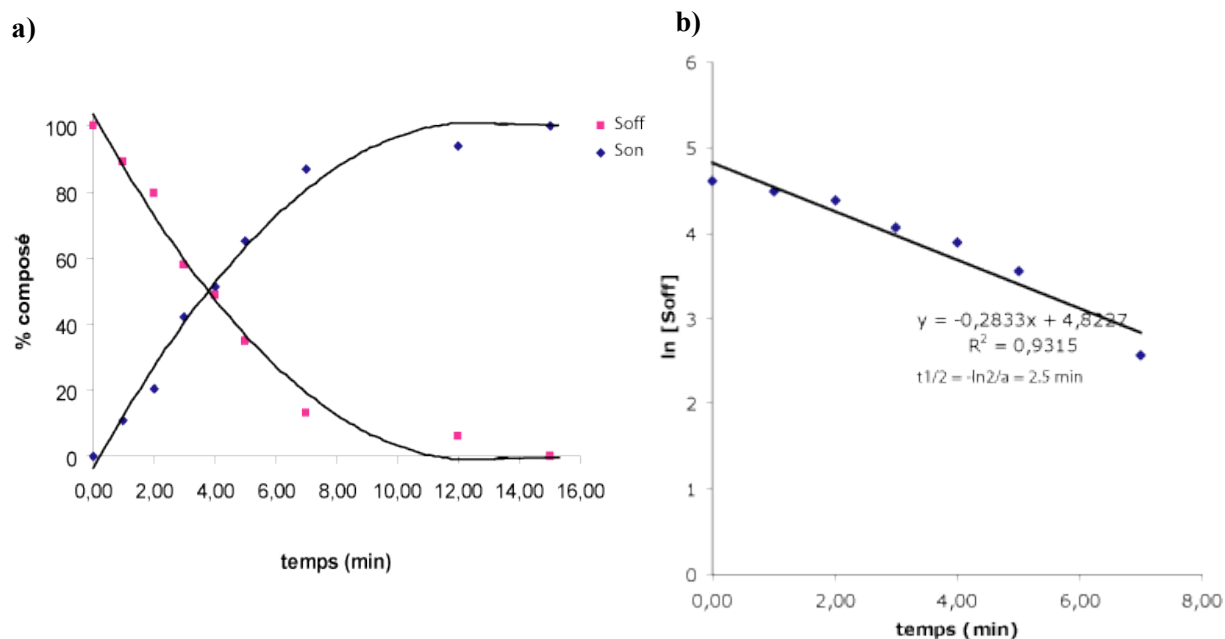


Figure 165 : Etude de la cinétique du réarrangement acylique du composé **19** : **a)** courbe représentative de l'apparition du composé S_{on} (**20**) et de la disparition du composé S_{off} (**19**) en fonction du temps ; **b)** cinétique du premier ordre donnant le temps de demi-vie à 2 min 30 sec.

2. Une nouvelle classe d'inhibiteurs : les « switch-peptides »

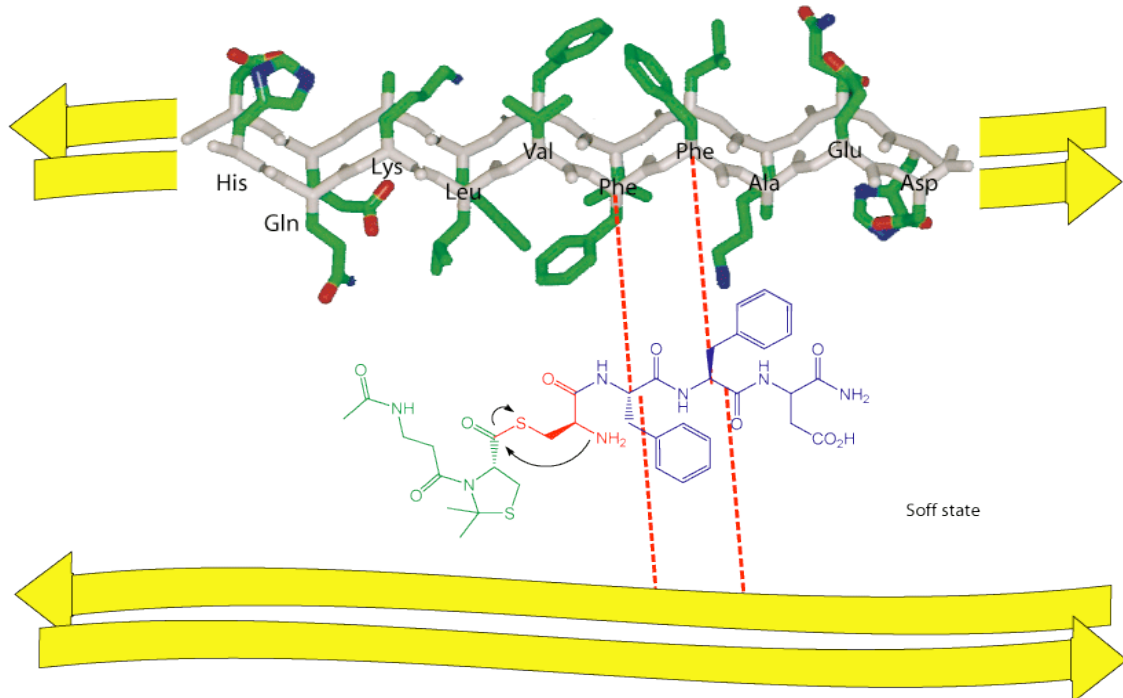
Maintenant que nous avons déterminé les meilleures conditions de thioestérification en solution de la chaîne latérale de la cystéine avec un dérivé de pseudo-proline, il nous faut les adapter à la synthèse sur support solide afin d'obtenir directement, sur la résine, un premier inhibiteur potentiel de l'amyloïdogénèse dans cette série, contenant à la fois la séquence de reconnaissance de l'amyloïde β , l'élément switch à l'état S_{off} et l'unité d'induction σ .

Nous avons choisi d'utiliser, comme nous l'avons fait lors de la conception de certains des peptides conjugués que nous avons synthétisés précédemment (composés **8**, **10**, **12** et **13**), la plus petite séquence de reconnaissance du peptide pathogène, à savoir le trimère Phe-Phe-Asp-NH₂. Nous allons conserver la cystéine comme élément « switch », ainsi que le dipeptide Ac- β Ala-Cys($\Psi^{Me, Me}$ pro)-OH comme unité d'induction.

A l'état S_{off} , le nouveau « switch-peptide » ainsi défini devrait pouvoir se lier à l'amyloïde β avec une haute affinité, ses deux phénylalanines établissant des interactions spécifiques avec les phénylalanines 19 et 20 du peptide pathogène (Figure 166a). Un changement de pH vers un pH 6-7 déclenchant la migration acylique intramoléculaire S \rightarrow N devrait permettre de rétablir la liaison amide native entre la cystéine et la pseudo-proline et placer le « switch-peptide » à l'état S_{on} . La diméthylthiazolidine, grâce à la

conformation cis de sa liaison amide, pourra alors agir comme un destructeur de feuillets β formés par l'amyloïde β et interrompre leur agencement en protofibrilles et fibrilles (Figure 166b).

a)



b)

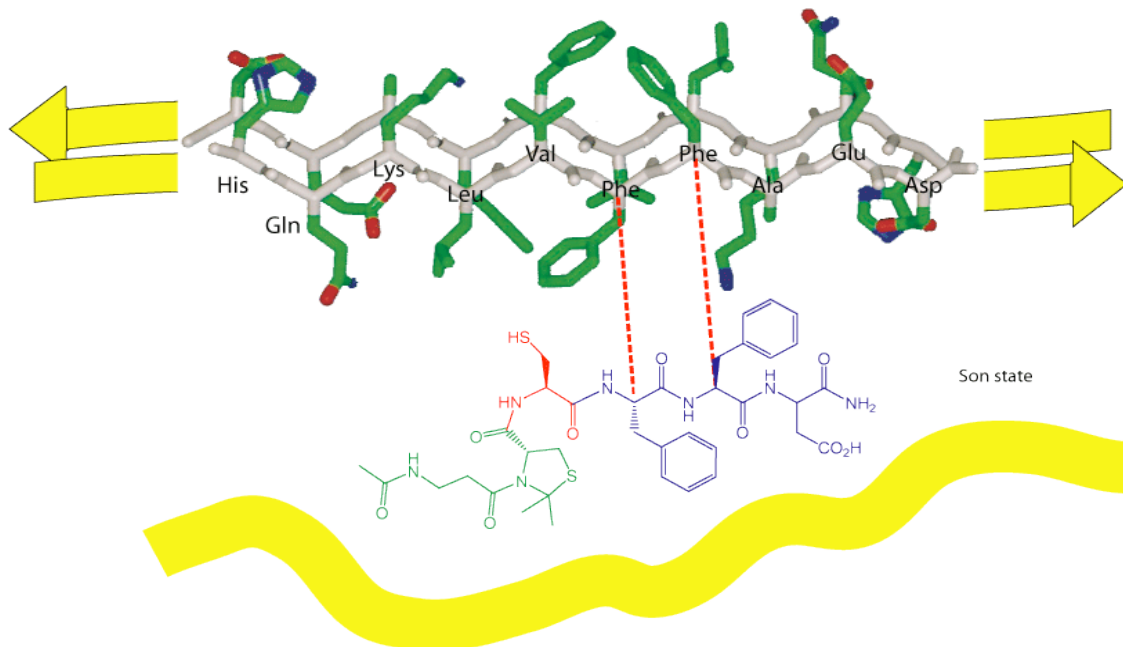


Figure 166 : Représentation schématique des interactions envisagées entre le « switch-peptide » et un dimère d' $\beta(14-23)^{223}$: **a)** à l'état S_{off} : les phénylalanines de la séquence de reconnaissance (en bleu) interagissent parfaitement (pointillés rouges) avec ceux du peptide pathogène (en jaune) ; **b)** après réarrangement (état S_{on}), le « switch-peptide » adopte une structure en coude (en vert, l'unité d'induction conformationnelle ; en rouge, l'élément switch, ici une cystéine) qui empêche l'arrangement en feuillets antiparallèles et résulte en l'inhibition de la formation de fibrilles ; les pointillés rouges symbolisent les interactions existant entre les deux résidus désignés par l'extrémité des traits au niveau de leur C_{α} .

Le « switch-peptide » Ac-βAla-Cys(Ψ^{Me, Me} pro)-(H⁺)Cys-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**21**), à l'état S_{off}, est synthétisé directement sur une résine Rink Amide MBHA, suivant les conditions standards de la SPPS et selon la stratégie Fmoc/tBu (Figure 167).

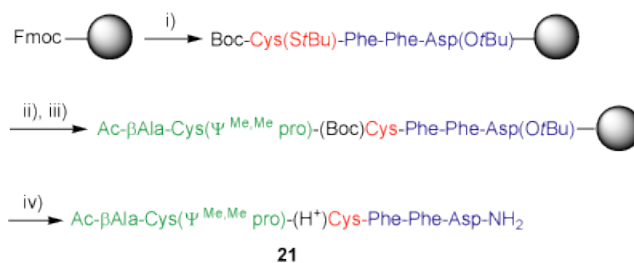


Figure 167 : Synthèse du « switch-peptide » Ac-βAla-Cys(Ψ^{Me,Me} pro)-(H⁺)Cys-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**21**) à l'état S_{off}: i) SPPS sur une résine Rink Amide MBHA, en stratégie Fmoc/tBu ; ii) déprotection du thiol : 50 % 2-mercapto-éthanol/DMF (17h, 80°C) ; iii) thioestérification : pré-activation de l'Ac-βAla-Cys(Ψ^{Me,Me} pro)-OH (**17**, 4 eq.) avec du PyBOP (4 eq.), DMF dégazé (10 min, r.t.) ; addition à la résine avec de la DIPEA (7 eq.) (1h15, r.t.) ; iv) déprotection et clivage de la résine (TFA/TIS/H₂O ; 95 : 2.5 : 2.5 ; v/v/v ; 1h15, r.t.) ; purification par RP-HPLC préparative sur une colonne C₁₈ (gradient : 25 à 55 % B en 30 min) ; rendement : 40 %.

Un test de clivage dans un mélange de TFA, de TIS et d'eau (95 : 2.5 : 2.5, v/v/v) nous permet de confirmer la synthèse de la séquence Boc-Cys(SiBu)-Phe-Phe-Asp(OtBu) sur le support solide. Le peptide correspondant, H₂⁺-Cys(SiBu)-Phe-Phe-Asp-NH₂, est alors caractérisé par RP-HPLC analytique et spectroscopie de masse ESI-MS (Figure 168a).

La résine est ensuite traitée avec une solution de 50 % de 2-mercapto-éthanol dans le DMF pendant 14h à température ambiante. D'après les données de la littérature³¹⁰, ce traitement devrait nous permettre de déprotéger la chaîne latérale de la cystéine et d'accéder à la fonction thiol. Cependant un test de clivage nous prouve l'inefficacité de cette méthode. En effet, la majorité du peptide reste sous sa forme protégée (Figure 168b).

Un deuxième essai de déprotection, réalisé cette fois avec une solution de 75 % de 2-mercapto-éthanol dans le DMF et une agitation à température ambiante pendant 5h30 ne permet pas de libérer plus de thiol que lors du traitement précédent (Figure 168c).

Un dernier test avec une solution de 50 % de 2-mercapto-éthanol dans le DMF et une agitation à 80°C pendant 17h, inspiré des travaux de B. Denis et E. Trifilieff³¹¹, conduit finalement au produit désiré (Figure 168d).

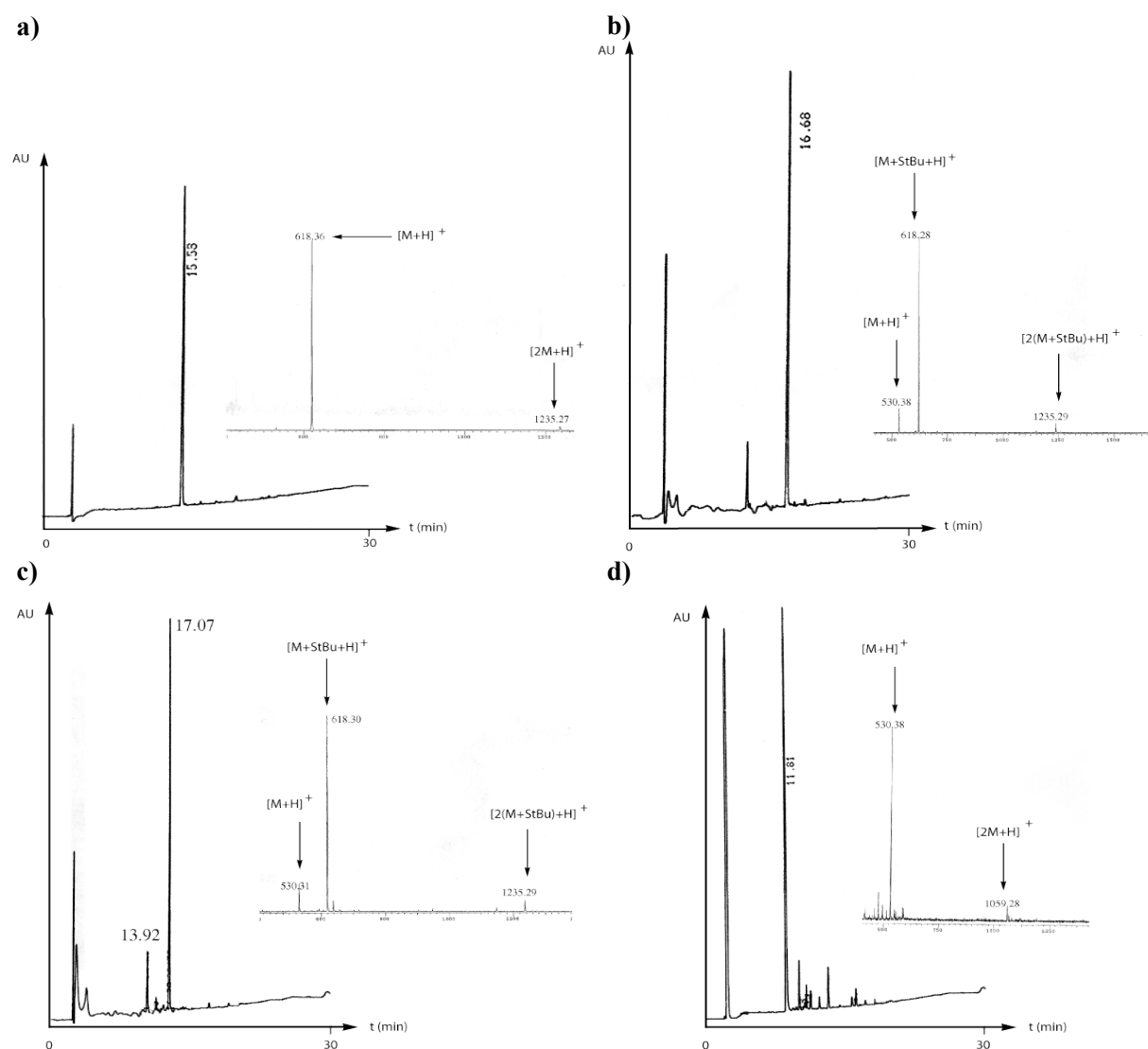


Figure 168 : Boc-Cys(StBu)-Phe-Phe-Asp(tBu)-Rink Amide MBHA : déprotection de la chaîne latérale de la cystéine ; analyse de tests de clivage par RP-HPLC analytique sur une colonne C_{18} (gradient : 5 à 100 % B en 30 min) et spectroscopie ESI-MS : **a)** avant déprotection ; **b)** 1^{er} traitement : 50 % de 2-mercapto-éthanol/DMF (14h, r.t.) ; **c)** 2^{ème} traitement : 75 % de 2-mercapto-éthanol/DMF (5h30, r.t.) ; 3^{ème} traitement : 50 % de 2-mercapto-éthanol/DMF (17h, 80°C).

La réaction de thioestérification entre le dipeptide Ac- β Ala-Cys($\Psi^{Me,Me}$ pro)-OH (**17**) et la chaîne latérale de la cystéine se fait dans les mêmes conditions que celles établies en solution : le bloc se terminant par un acide carboxylique est pré-activé avec du PyBOP en solution dans du DMF dégazé pendant 10 min à température ambiante avant d'être ajouté à la résine avec de la DIPEA. Le peptide **21** ainsi formé est ensuite déprotégé et clivé de la résine grâce à une solution de 95 % de TFA, 2.5 % de TIS et 2.5 % d'eau (Figure 169a). Le brut est directement purifié, après précipitation du peptide à froid dans le diéthyl éther, par RP-HPLC préparative, pour conduire au thioester désiré avec un rendement de 40 %. Le « switch-peptide » à l'état S_{off} (**21**) est alors caractérisé par RP-HPLC analytique et spectroscopie de masse (Figure 169b).

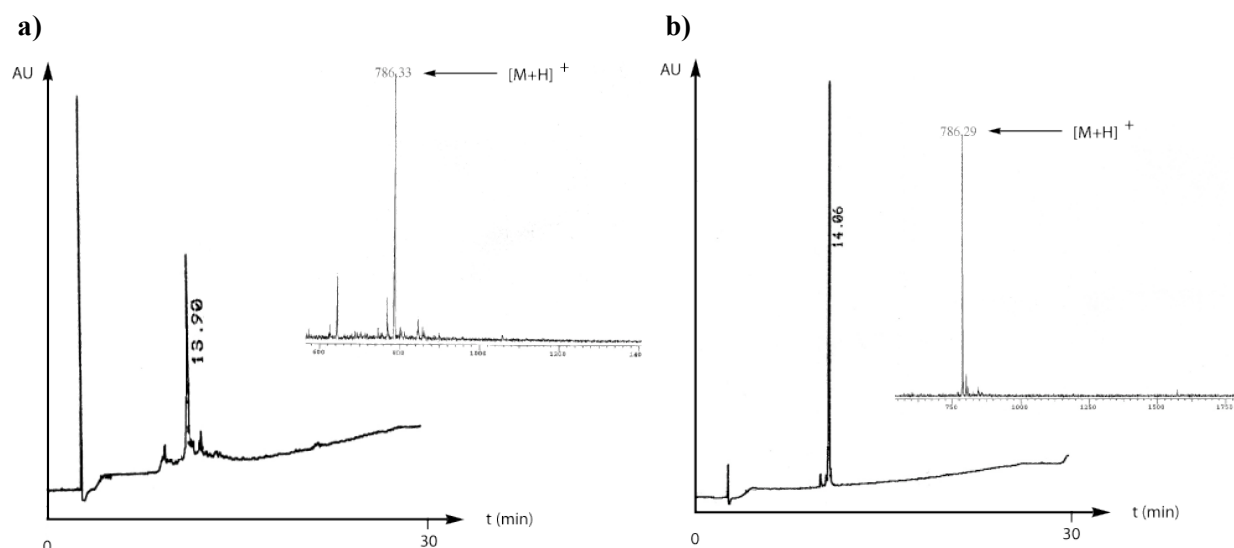


Figure 169 : Caractérisation, par RP-HPLC analytique sur une colonne C_{18} (gradient : 5 à 100 % B en 30 min) et spectroscopie ESI-MS, du « switch-peptide » **21** $Ac\text{-}\beta\text{Ala-Cys}(\Psi^{Me,Me} pro)\text{-}(H^+)Cys\text{-Phe-Phe-Asp-NH}_2$ **a)** avant et **b)** après purification.

Une augmentation de pH permet de déclencher la migration acylique intramoléculeire $S \rightarrow N$ et de faire passer le « switch-peptide » **21** de l'état S_{off} à l'état S_{on} (composé **22**, Figure 170). A travers quelques essais, nous allons étudier l'influence du pH, ainsi que de la température, sur ce réarrangement. Les conditions expérimentales utilisées pour cette étude sont présentées dans le Tableau 23.



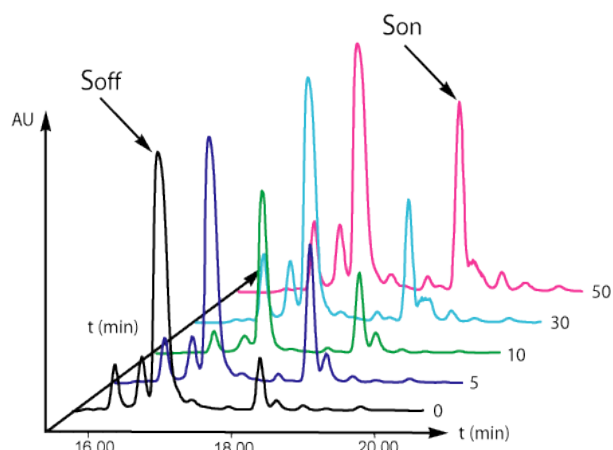
Figure 170 : Migration acylique $S \rightarrow N$ appliquée au « switch-peptide » $Ac\text{-}\beta\text{Ala-Cys}(\Psi^{Me,Me} pro)\text{-}(H^+)Cys\text{-Phe-Phe-Asp-NH}_2$ (**21**, S_{off}), conduisant au « switch-peptide » $Ac\text{-}\beta\text{Ala-Cys}(\Psi^{Me,Me} pro)\text{-Cys-Phe-Phe-Asp-NH}_2$ (**22**) à l'état S_{on} .

Mélange de solvants utilisés	Concentration peptidique	pH résultant	Température	$t_{1/2}$
13 % d'ACN dans un tampon sodium phosphate à 0.2 M et pH = 5.9	0.01 M	5.8	37°C	5 min
9 % d'ACN dans un tampon sodium phosphate à 0.2 M et pH = 5.9	0.01 M	5.8	3-5°C	2h 02 min
40 % d'ACN dans un tampon sodium phosphate à 0.01 M et pH = 7.1	0.01 M	3.1	37°C	1h 25 min
20 % d'ACN dans un tampon carbonate à 0.2 M et pH = 9.42	0.01 M	9.1	37°C	$t < 30$ sec

Tableau 23 : Conditions utilisées pour étudier le réarrangement acylique intramoléculeire $S \rightarrow N$ dans le cas du « switch-peptide » **21**.

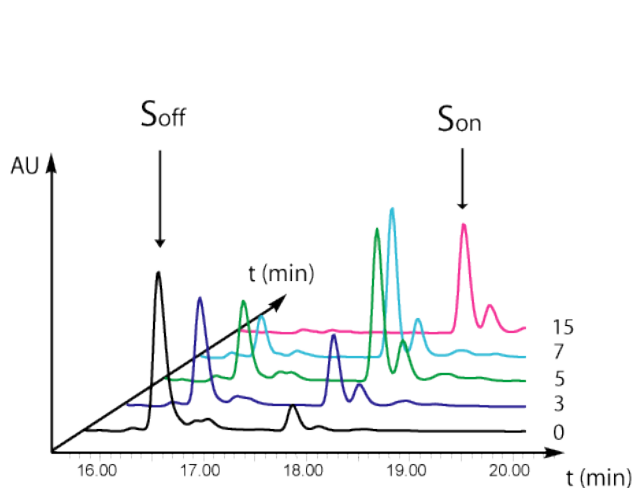
Pour chacun des quatre tests réalisés ici, le peptide **21** est dissout dans un mélange contenant toujours une certaine quantité d'acétonitrile, comprise entre 9 et 40 %, afin d'assurer une solubilisation rapide du composé dans la solution tampon. En effet, nous avons vu, au moment de la validation de ce concept, que la migration acylique S→N se faisait relativement rapidement. Il nous est donc nécessaire d'avoir une solubilisation immédiate du peptide **21** pour de ne pas fausser les résultats au moment des premières mesures, à $t = 30$ sec ou 1 min par exemple. Tous les solvants utilisés au cours de ces expériences sont dégazés à l'azote, les expériences se faisant sous une atmosphère d'argon afin d'éviter la formation d'un pont disulfure entre deux composés à l'état S_{on} . Les cinétiques correspondant aux quatre échantillons préparés sont suivies par RP-HPLC analytique, les spectres étant présentés dans la Figure 171 ci-dessous.

pH = 3.1, T = 37°C



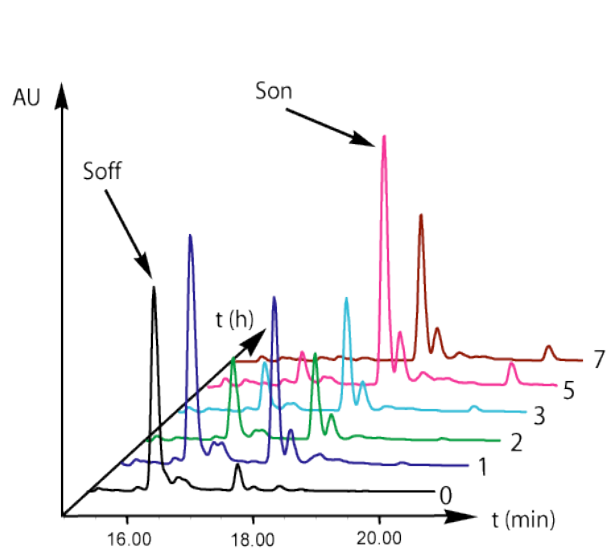
$t_{1/2} = 1\text{h } 25\text{ min}$

pH = 5.8, T = 37°C



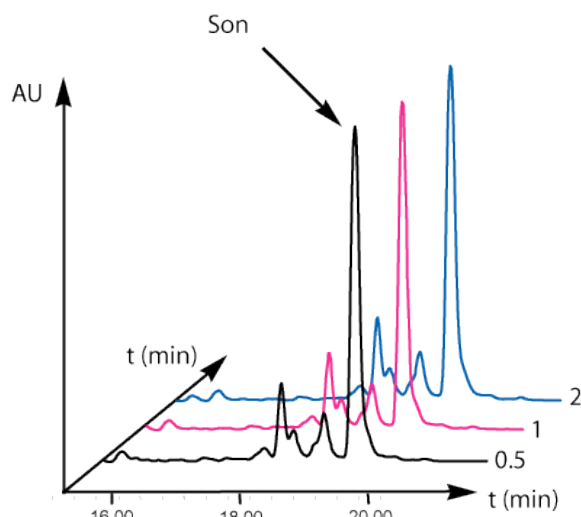
$t_{1/2} = 5\text{ min}$

pH = 5.8, T = 3-5°C



$t_{1/2} = 2\text{h } 02\text{ min}$

pH = 9.1, T = 37°C



$t < 30\text{ sec}$

Figure 171 : Etude de la cinétique du réarrangement acylique S→N pour le « switch-peptide » **21**, à différents pH et/ou températures: suivi par RP-HPLC analytique (gradient : 0 à 100 % B en 30 min).

Pour cela, des aliquots provenant du milieu réactionnel sont dilués avec de la solution tampon et quenchés avec une solution d'acide chlorhydrique 0.1 M, le fait d'abaisser le pH à 1 environ permettant de stopper le transfert acylique. Une quantité connue de chacun de ces échantillons est ensuite injectée en RP-HPLC analytique, où nous pouvons suivre la disparition du pic correspondant au composé à l'état S_{off} (composé **21**) et la croissance du pic correspondant au composé à l'état S_{on} (composé **22**), sans observer pour autant la formation du produit oxydé. Notons que dans le cas du pH à 9.1, nous n'observons plus de « switch-peptide » **21** au bout de 30 sec : cette réaction est extrêmement rapide dans ces conditions.

Les valeurs d'absorption en UV obtenues pour les produits S_{on} et S_{off} nous permettent alors de calculer, pour chaque situation, le temps de demi-vie de la migration acylique $S \rightarrow N$ dans le cas du « switch-peptide » **21** (Figure 172). A pH 5.8 et à 37°C, le temps de demi-vie est de 5 min. Si la température descend entre 3 et 5°C, cette valeur augmente drastiquement à 2h et 2 min, mais le réarrangement se fait toujours. Il en est de même si le pH descend à 3.1 tout en conservant une température physiologique. Ces données confirment donc qu'il est nécessaire de bien contrôler le pH après avoir quenché les échantillons et de les analyser rapidement, ou le cas échéant, de les conserver à très basse température (-18°C maximum). Enfin, comme nous l'avons déjà mentionné, la migration est quasi-instantanée à pH 9.1 et à 37°C. Rappelons-nous cependant que le « switch-peptide » **19**, analogue du composé **21** sans la séquence de reconnaissance amyloïde, se réarrangeait, à un pH de 6.15 et une température de 39°C, avec un temps de demi-vie de 2 min 30. Si nous faisons fi des petites différences de température et pH entre les expériences concernant les produits **19** et **21**, nous constatons l'influence du tripeptide en position C-terminale de l'élément « switch » qui a tendance à ralentir légèrement la migration acylique intramoléculaire $O \rightarrow N$.

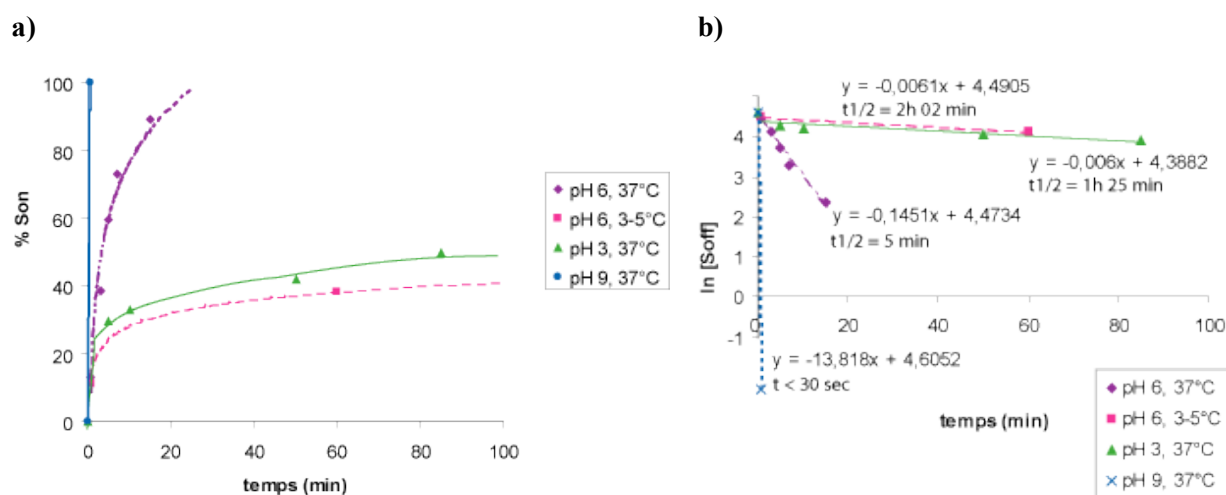


Figure 172 : Etude de la cinétique du réarrangement acylique du composé **21** : **a)** courbe représentative de l'apparition du composé à l'état S_{on} (composé **22**) en fonction du temps, à différents pH et/ou températures ; **b)** cinétique de premier ordre donnant le temps de demi-vie suivant les conditions expérimentales suivies.

Cependant, nous sommes forcés de constater que ce transfert acylique S→N pour ce composé est relativement rapide dans des conditions physiologiques. Si nous voulions étudier l'influence de l'état S_{off} ou S_{on} de ce peptide sur la formation de fibrilles d'amyloïde β, nous ne serions donc pas en mesure de distinguer les deux étapes. Pour cela il nous serait nécessaire de bloquer la migration acylique à l'état S_{off} en conservant une protection de l'amine de l'élément « switch ». Nous avons donc décidé de synthétiser un peptide analogue au peptide **21**, dont l'amine de la cystéine serait acétylée, ce qui permettrait de garder l'ensemble de la molécule à l'état S_{off} (Figure 173).

L'Ac-βAla-Cys(Ψ^{Me, Me} pro)-(Ac)Cys-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**23**) est construit étape par étape sur une résine Rink Amide MBHA, d'une façon similaire à celle utilisée pour le « switch-peptide » **21** (Figure 173). Le groupement protecteur *StBu* de la chaîne latérale de la cystéine est facilement clivé après un traitement avec 50 % de 2-mercapto-éthanol dans le DMF pendant 9h à température ambiante. Il n'est pas nécessaire ici d'augmenter la température du milieu réactionnel à 80°C. Pourtant, l'unique différence entre les deux séquences ne concerne que la nature du groupe lié à l'amine de la cystéine, à savoir un Boc dans le cas du peptide **21** et un acétyle dans le cas présent.

Le dipeptide Ac-βAla-Cys(Ψ^{Me, Me} pro)-OH (**17**) est d'abord pré-activé avec du PyBOP dans du DMF pendant 15 min à température ambiante avant d'être thioestérifié par la fonction thiol de la cystéine. Le « switch-peptide » **23**, bloqué à l'état S_{off}, est déprotégé et clivé de la résine avec un mélange de 95 % de TFA, 2.5 % de TIS et 2.5 % d'eau couplé à une agitation à température ambiante pendant 1h30. Le brut est ensuite purifié par RP-HPLC préparative pour donner le composé **23** désiré avec un rendement de 26 % (Figure 174).

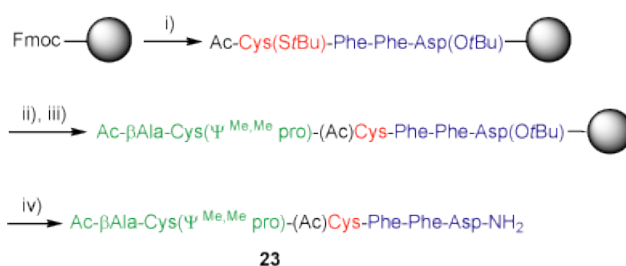


Figure 173 : Synthèse sur une résine Rink Amide MBHA du « switch-peptide » Ac-βAla-Cys(Ψ^{Me, Me} pro)-(Ac)Cys-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**23**), bloqué à l'état S_{off}: i) SPPS; ii) clivage du *StBu*: 50 % de 2-mercapto-éthanol dans le DMF (9h, r.t.); iii) pré-activation du dipeptide Ac-βAla-Cys(Ψ^{Me, Me} pro)-OH (4 eq.) avec du PyBOP (4 eq.) (DMF, 15 min, r.t.); addition à la résine avec de la DIPEA (7 eq.) (1h, r.t.); iv) déprotection et clivage de la résine (TFA/TIS/H₂O, 95 : 2.5 : 2.5 ; v/v/v, 1h30, r.t.); purification par RP-HPLC préparative sur une colonne C₁₈ (gradient : 30 à 60 % B en 30 min); rendement : 26 %.

Avec l'obtention du composé **23**, nous sommes ainsi en mesure de comparer l'efficacité des deux produits **22** (état S_{on}) et **23** (état S_{off} bloqué) en tant qu'inhibiteurs potentiels de l'amyloïdogenèse de l'amyloïde β.

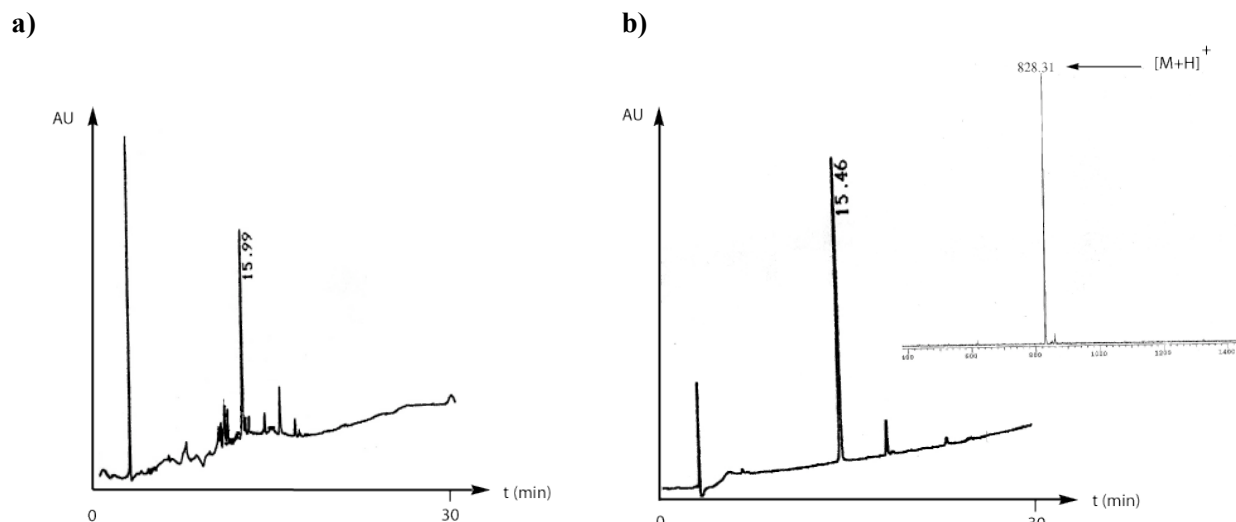


Figure 174 : Caractérisation de l'Ac-βAla-Cys(Ψ^{Me, Me} pro)-(Ac)Cys-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**23**) par RP-HPLC analytique sur colonne C₁₈ (gradient : 5 à 100 % B en 30 min) et spectroscopie ESI-MS **a**) avant et **b**) après purification.

3. Migrations acyliques intramoléculaires : S→N versus O→N

Suite aux nombreux intérêts fondamentaux et innovateurs apportés par l'élaboration du concept de « switch-peptides », plusieurs collaborateurs du groupe de M. Mutter se sont regroupés pour participer à son développement^{46, 47, 50, 312, 313}. Cela nous a permis de collecter un pool d'informations concernant ces migrations acyliques intramoléculaires X→N, réalisées sur des séquences similaires, et d'en déduire quelques remarques générales.

Les résultats correspondants aux produits semblables aux « switch-peptides » dont nous avons explicité la synthèse dans les parties précédentes (composés **19** et **21**) sont présentés dans le Tableau 24^{46, 47, 312}.

La comparaison directe entre les « switch-peptides » **19** et **21** nous montre l'influence de la substitution de la fonction C-terminale de l'élément « switch » par un tripeptide, qui a tendance à ralentir le réarrangement. Lorsque l'amine de la partie N-terminale de cette séquence de reconnaissance est N-méthylée (comparaison entre les deux dernières entrées du Tableau 24), nous nous apercevons que la vitesse de la migration augmente en conséquence.

La nature de l'unité d'induction, ici la pseudo-proline, est elle-aussi très importante pour cette cinétique. En effet, nous constatons que le transfert acylique est beaucoup plus rapide dans le cas d'une pseudo-proline dihydro Cys(Ψ^{H, H} pro) que dans le cas d'une pseudo-proline diméthylée, avec, à pH 3.8, des temps de demi-vie respectivement de 8 min et 12h. Il est probable que ce phénomène soit lié à la différence d'encombrement stérique voire même d'électronégativité entre les deux molécules.

Composés à l'état S _{off}	Solvants	pH	T (°C)	t _{1/2}
Ac-βAla-Cys(Ψ ^{Me, Me} pro)-(H ⁺)Cys-OH (19)	PBS	6.2	39	2 min 30
Ac-βAla-Cys(Ψ ^{Me, Me} pro)-(H ⁺)Cys-Phe-Phe-Asp-NH ₂ (21)	AcN / PBS (2:3)	3.1	37	1h25
	AcN / PBS (1:110)	5.8	3-5	2h02
	AcN / PBS (1:66)	5.8	37	5 min
	AcN / CaB (1:4)	9.1	37	< 30 sec
Ac-Leu-Cys(Ψ ^{H, H} pro)-(H ⁺)Cys-Phe-Phe-Asp-NH ₂ *	MeOH / CiB (1:4)	3	r.t.	27 min
	MeOH / CiB (1:4)	3.8	r.t.	8 min
	MeOH / CiB (1:4)	4.8	r.t.	< 2 min
	PBS	5.8	r.t.	< 30 sec
Ac-Leu-Cys(Ψ ^{Me, Me} pro)-(H ⁺)Cys-Phe-Phe-Asp-NH ₂ *	AcN / CiB (1:9)	3.8	r.t.	12h
	AcN / CiB (1:9)	4.8	r.t.	1h20
	AcN / PBS (1:9)	5.8	r.t.	28 min
	AcN / PBS (1:9)	7.4	r.t.	10 min
Ac-Leu-Cys(Ψ ^{Me, Me} pro)-(H ⁺)Ser-Phe-Phe-Asp-NH ₂ *	PBS	7.4	r.t.	10h40
	PBS	7.4	37	2h40
	PBS	8.0	37	1h45
Ac-Leu-Cys(Ψ ^{Me, Me} pro)-(H ⁺)Ser-(Me)Phe-Phe-Asp-NH ₂ *	PBS	7.4	37	1h27

Tableau 24 : Récapitulatif des temps de demi-vie correspondants aux cinétiques de migrations acyliques intramoléculaires X→N pour différents « switch-peptides » appartenant tous à la même famille⁴⁷ ; * : séquences synthétisées par K. Murat³¹² ; * : séquences synthétisées par S. Dos Santos⁴⁶.

Mais la différence majeure qui existe entre tous ces composés concerne la nature même de l'élément « switch », ou plus exactement de l'atome lié au groupe acylique à l'état S_{off}. Lorsque le soufre de la cystéine se voit remplacer par un atome d'oxygène, ce qui correspond à la substitution de la cystéine par une sérine, le temps de demi-vie de la migration acylique augmente drastiquement, passant, pour un pH de 7.4 à température ambiante, de 10 min dans le cas de l'Ac-Leu-Cys(Ψ^{Me, Me} pro)-(H⁺)Cys-Phe-Phe-Asp-NH₂ à 10h40 dans le cas de l'Ac-Leu-Cys(Ψ^{Me, Me} pro)-(H⁺)Ser-Phe-Phe-Asp-NH₂.

Ceci s'explique par les différences de réactivité entre un ester et un thioester. En effet, les thioesters sont de bons agents acylants car la délocalisation d'un doublet d'électrons libres de l'atome de soufre vers le carbonyle est rendu difficile par le mauvais recouvrement des orbitales du soufre et du carbone, dû à leur différence de grosseur. Les thioesters sont donc plus réactifs que leurs analogues oxygénés, parallèlement au fait que les thiolates font de bien meilleurs groupes partants que les alcoolates.

Ces constatations sont d'une importance capitale, car suivant les applications prévues pour un « switch-peptide » déterminé, nous sommes en mesure de faire varier la cinétique de son réarrangement acylique en fonction des modifications que nous apportons à la molécule. Cela signifie, en d'autres termes, que nous sommes véritablement capables de « jouer » avec ces migrations acyliques en choisissant une fourchette, plus ou moins large, de temps de demi-vie.

Il est ainsi fortement probable qu'une application médicale de nos inhibiteurs « switch-peptides » pourrait nécessiter un temps de réarrangement plus long que celui obtenu avec notre composé **21**, l'Ac- β Ala-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-(H⁺)Cys-Phe-Phe-Asp-NH₂. A ce moment-là, nous pourrions donc envisager la substitution de la cystéine par une sérine, dont la fonction N-terminale pourrait même être protégée par un groupe différent du proton, se clivant plus lentement *in situ* et *in vivo*. Nous rejoignons donc là plutôt un concept de double prodrogues^{46, 47, 312}.

4. Modification de l'approche prodrogue vers une formation de l'inhibiteur *in vivo*

Dans le Chapitre 31 de l'Introduction, nous avons déjà pu constater l'intérêt, au niveau biologique, des migrations acyliques, et plus particulièrement des ligations chemosélectives natives. Il existe d'ores et déjà plusieurs exemples de ce type de réactions ayant été réalisés dans un milieu cellulaire^{314, 315}. En effet, cette approche, fortement liée au concept de prodrogues, est particulièrement attrayante aux vues de ses applications aussi bien en recherche fondamentale qu'en médecine ou dans de nombreux autres domaines, mais elle reste un véritable défi quant aux nombreuses exigences de biocompatibilité qu'elle requiert. En effet, il est nécessaire, entre autres, que les deux éléments constitutifs de la prodrogue soient stables jusqu'à ce qu'ils atteignent leur objectif dans l'organisme, restent inertes avec les autres composés biologiques, réagissent spécifiquement dans des conditions physiologiques pour former la drogue désirée qui doit être suffisamment stable elle-aussi pour agir spécifiquement avec sa cible.

Notre concept de « switch-peptides » se place déjà dans une stratégie de synthèse de prodrogues utilisant la migration acylique comme un outil permettant d'obtenir la forme bioactive de la molécule dans des conditions physiologiques. C'est donc tout naturellement que nous avons pensé modifier notre approche pour l'adapter à une voie de synthèse d'inhibiteurs potentiels de la fibrillogénèse de l'amyloïde β à partir de deux blocs distincts, se réunissant *via* une ligation chemosélective native pouvant avoir lieu *in vivo*.

Au moment du design de ces deux blocs prodrogues, une évidence s'offre à nous : la cisssion de la molécule bioactive doit se faire au niveau de la liaison entre l'unité d'induction σ et l'élément « switch », qui sera, ici aussi, une cystéine (Figure 175). Cet acide aminé sera alors couplé à la séquence de

reconnaissance de l'amyloïde β , tandis que l'unité d'induction sera modifiée pour se terminer, au niveau de sa partie C-terminale, par un thioester.

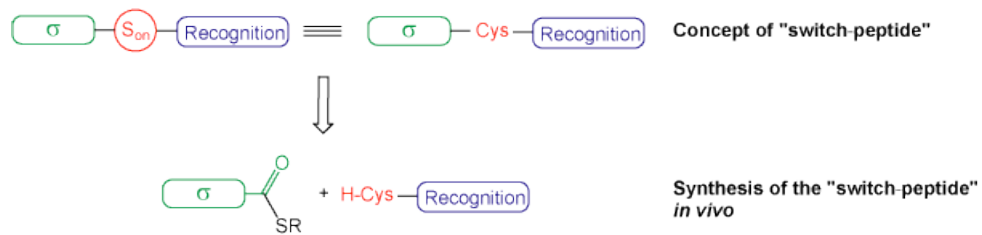


Figure 175: Design des deux blocs prodrogues de la nouvelle stratégie de synthèse de l'inhibiteur *in vivo*, calqué sur le modèle des « switch-peptides » ; unité d'induction conformationnelle σ en vert, élément « switch » en rouge et séquence de reconnaissance amyloïde en bleu.

Le bloc contenant la séquence de reconnaissance de l'amyloïde β pourra alors se positionner idéalement vis-à-vis de l'A β (1-42) en s'y liant spécifiquement, avant que ne soit ajouté l'unité d'induction modifiée qui se couplera à cette séquence de reconnaissance *via* une ligation chemosélective native (Figure 176). Une fois la molécule bioactive reconstituée, l'effet de son coude intégré dans l'unité d'induction conformationnelle pourra alors agir sur le peptide pathogène en détruisant les feuillets β en cours d'agrégation.

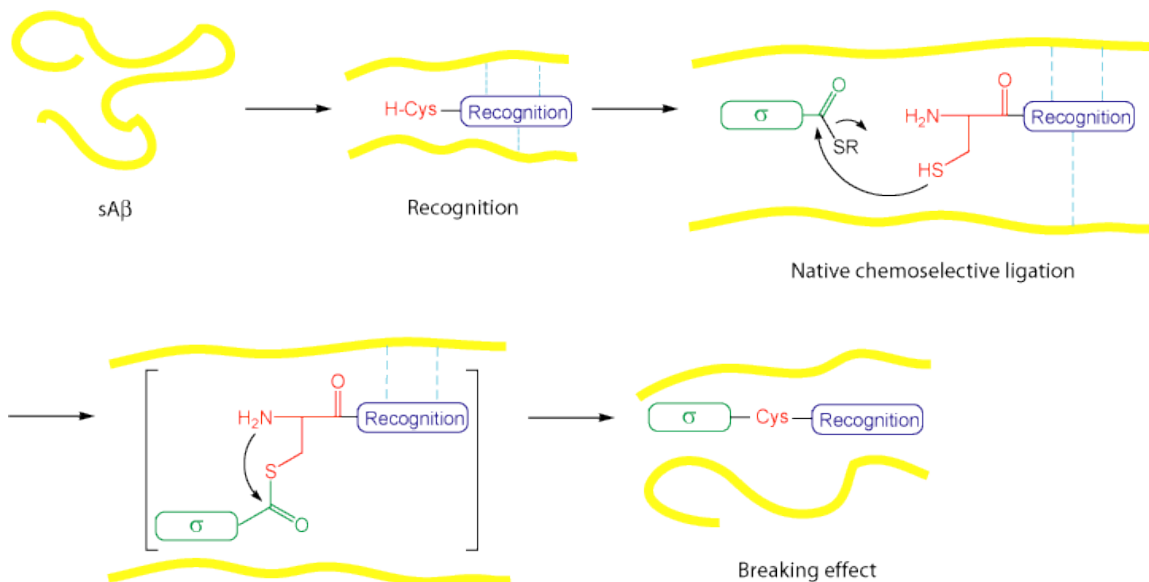


Figure 176 : Stratégie de synthèse d'un inhibiteur potentiel de la fibrillogenèse de l'amyloïde β et effet sur l'agrégation du peptide pathogène : la séquence de reconnaissance (en bleu) se lie spécifiquement à l'amyloïde β (étape de reconnaissance), puis la chaîne latérale de la cystéine réagit avec l'unité d'induction conformationnelle dérivée par un thioester *via* une ligation chemosélective native, rétablissant la structure de l'inhibiteur potentiel, équivalent à un « switch-peptide » à l'état S_{on} ; la succession de liaisons amides étant rétablie dans la molécule, l'unité d'induction conformationnelle peut alors remplir son office de destructeur de feuillets β .

Il nous reste encore à déterminer la nature du groupement R du thioester C-terminal de l'unité d'induction conformationnelle σ . Pour cela, nous nous sommes inspirés d'une molécule naturelle, la coenzyme A.

Une coenzyme est une molécule organique essentielle à la catalyse de certaines réactions enzymatiques. Dans cette catégorie de composés naturels, la coenzyme A est une coenzyme de transfert de groupements acyles, importante pour le métabolisme des glucides, lipides et protéines (Figure 177). Grâce à sa partie fonctionnelle, qui correspond à sa fonction thiol, la coenzyme A transporte les groupes acyles en les capturant *via* une liaison thioester³¹⁶. Elle agit ainsi comme un agent d'acylation, par exemple dans le cycle de Krebs³¹⁷, voie catabolique et anabolique générant de l'énergie pour l'organisme, ou peut aussi générer un ion énolate après élimination d'un proton porté par le carbone C2 du thioester, comme c'est le cas dans la bêta-oxydation³¹⁸, voie principale de la dégradation des acides gras.

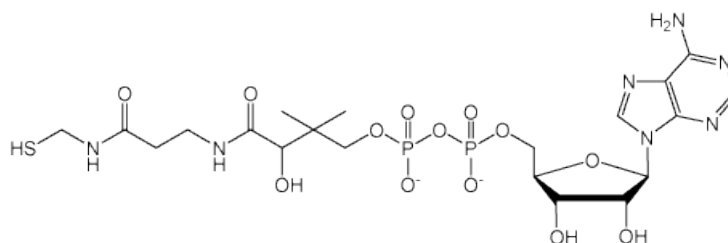


Figure 177 : Structure de la coenzyme A³¹⁶.

Nous avons ainsi décidé de conserver ce principe de transthioestérification naturelle pour synthétiser, par ligation native *in situ*, un inhibiteur potentiel de l'amyloïdogenèse, dont la structure serait calquée sur celle de l'Ac- β Ala-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-Cys-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**22**).

Nous avons donc cherché une molécule similaire à la coenzyme A, plus simple au niveau de sa structure, mais conservant son effet solubilisant dans les milieux hydrophiles. Nous avons sélectionné le 2-diméthylaminoéthanthiol, commercialisé sous forme de sel d'hydrochlorure et présentant l'avantage d'avoir une fonction thiol primaire couplée à une amine tertiaire, protonnée à pH physiologique et donc solubilisatrice (Figure 178). Une fois couplée au dipeptide Ac-Ala-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH, utilisé ici à la place du bloc Ac- β Ala-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH (**17**), cette molécule devrait permettre d'améliorer la solubilité aqueuse de cette unité d'induction conformationnelle.



Figure 178 : Structure du 2-diméthylaminoéthanthiol et comportement à pH physiologique.

Afin de clarifier un peu l'effet de cette stratégie utilisant les blocs Ac-Ala-Cys($\Psi^{Me, Me}$ pro)-SH-CH₂-CH₂-NMe₂ et H-Cys-Phe-Phe-Asp-NH₂ sur l'amyloïde β , en voici une simulation simplifiée (Figure 179) :

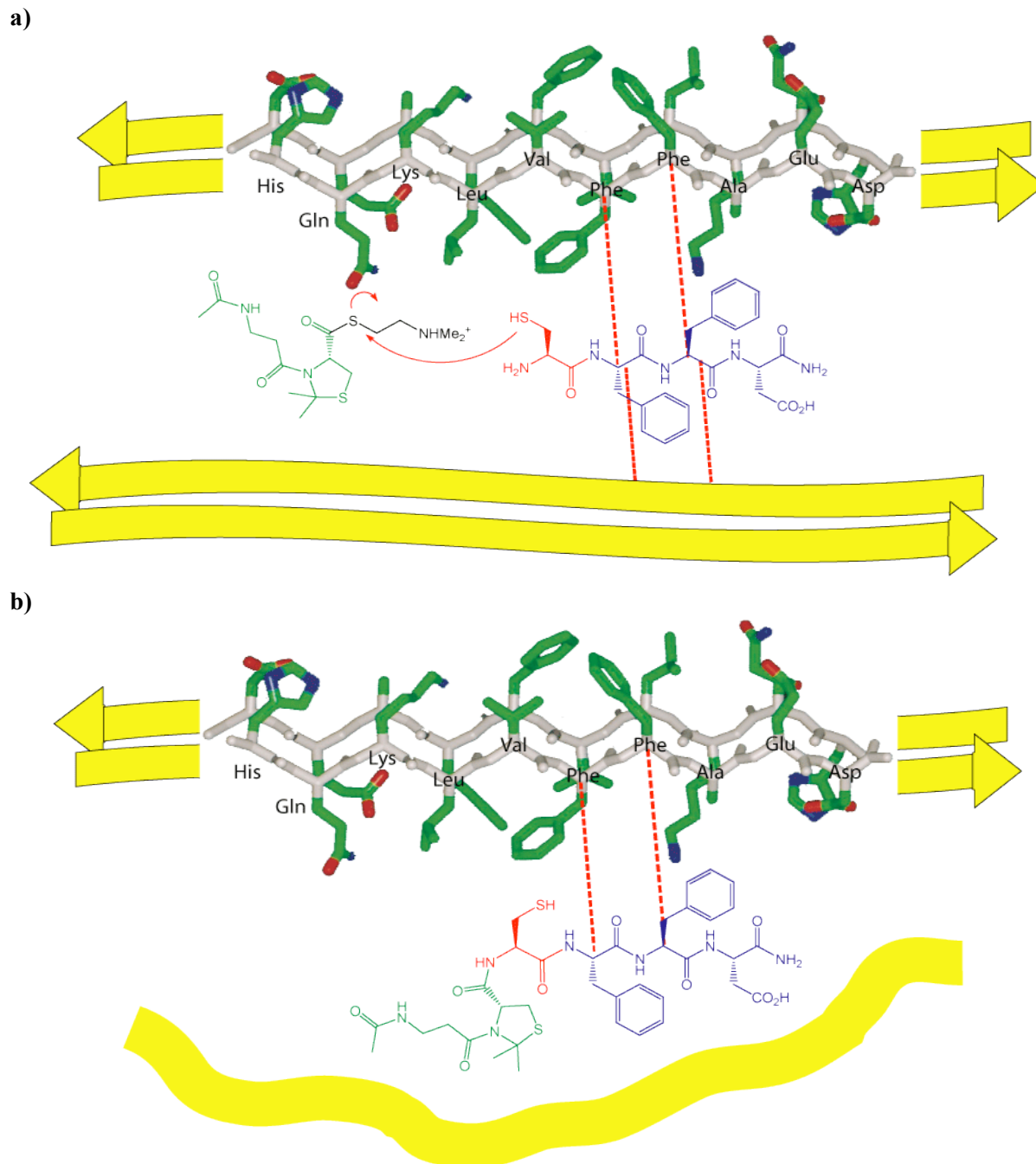


Figure 179 : Représentation schématique des interactions envisagées entre l'inhibiteur potentiel de la fibrillogenèse de l'amyloïde β et un dimère d' $A\beta(14-23)^{223}$: **a**) à l'état : les phénylalanines de la séquence de reconnaissance (en bleu) interagissent parfaitement (pointillés rouges) avec ceux du peptide pathogène (en jaune) ; **b**) après ligation native, l'inhibiteur adopte une structure en coude (en vert, l'unité d'induction conformationnelle ; en rouge, l'élément switch, ici une cystéine) qui empêche l'arrangement en feuillets antiparallèles, avec comme conséquence l'inhibition de la formation de fibrilles ; les pointillés rouges symbolisent les interactions existant entre les deux résidus désignés par l'extrémité des traits au niveau de leur C α .

La séquence de reconnaissance, grâce à ses résidus phénylalanines, reconnaît spécifiquement la séquence (14-24) de l'amyloïde β . Puis la cystéine qui lui est connectée s'engage dans une ligation chémosélective native avec le thioester solubilisateur attaché à l'unité d'induction. Cela permet la restauration de la drogue active qui agit immédiatement en détruisant les feuillettes β en cours d'agrégation (Figure 179).

La synthèse des deux éléments constitutifs de l'inhibiteur se fait en solution. Plusieurs essais de couplage direct entre l'Ac-Ala-OH et la pseudo-proline H-Cys($\Psi^{Me, Me}$ pro)-OH (**14**) sont réalisés dans le but de pouvoir éviter les étapes de déprotection-acétylation de l'amine terminale sans pour autant devoir observer d'épimérisation du produit. Les meilleurs résultats sont obtenus avec l'HATU comme agent d'activation : l'acide aminé acétylé est d'abord pré-activé avec ce réactif et de la DIPEA pendant 20 min, avant que la pseudo-proline ne soit ajoutée au milieu réactionnel (Figure 180). Après une purification par RP-HPLC semi-préparative, le dipeptide désiré est obtenu avec un rendement de 18 %.

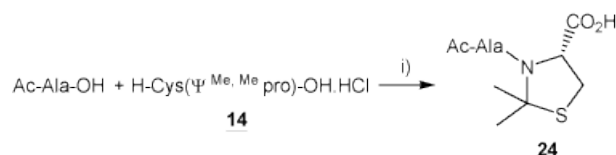


Figure 180 : Synthèse directe du dipeptide Ac-Ala-Cys($\Psi^{Me, Me}$ pro)-OH (**24**) : i) pré-activation de l'Ac-Ala-OH (1.2 eq.) avec HATU (1.2 eq.) et DIPEA (2.9 eq.) dans DCM anhydre (argon, 20 min, r.t.) ; addition de la pseudo-proline **14** en deux fois (0.7 e.q puis 0.3 eq. après 7h à r.t.) (11h, r.t.) ; purification par RP-HPLC semi-préparative sur une colonne C_{18} (gradient : 15 à 45 % B en 30 min) ; rendement : 18 %.

Il serait intéressant de pouvoir comparer cette valeur, relativement faible pour un simple couplage, avec celle du rendement de la voie de synthèse dite « plus classique » pour ce dipeptide. Cela nous permettrait en effet de choisir la méthode la plus efficace pour accéder à ce composé.

Pour cette seconde stratégie de synthèse, nous partons donc du Fmoc-Ala-OH.H₂O, transformé par du chlorure d'oxalyle en son chlorure d'acyle correspondant **25**, qui agit avec sur l'amine de la pseudo-proline **14** pour former le dipeptide Fmoc-Ala-Cys($\Psi^{Me, Me}$ pro)-OH **26** (Figure 181). Le groupe 9-fluorénylméthoxycarbonyl est clivé en présence de DEA dans le DMF, puis l'amine N-terminale est directement acétylée par de l'anhydride acétique mélangé à de la pyridine. Ces deux dernières étapes sont quantitatives. Le rendement global de cette synthèse avoisine donc les 30 %. Ce chiffre est plus élevé que celui qui a été obtenu lors de la première voie de synthèse, cependant ce couplage entre l'alanine et le mimé de la proline reste difficile. Par comparaison, celui entre la β -alanine et la pseudo-proline suivant la même stratégie que la seconde présentée ici, conduit au dipeptide voulu avec un rendement global proche de 55 %. De ce point de vue, il est donc beaucoup plus avantageux d'utiliser la β -alanine que l'alanine pour cette synthèse.

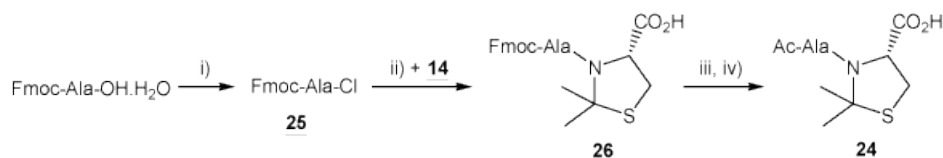


Figure 181 : Autre voie de synthèse du dipeptide Ac-Ala-Cys($\Psi^{Me, Me}$ pro)-OH (**24**) : i) addition à froid (0°C) du chlorure d'oxalyle (3.2 eq.) sur la Fmoc-Ala-OH.H₂O (1 eq.) dans le DCM et DMF (1h45) puis agitation à r.t. (4h) ; rendement quantitatif ; ii) addition du chlorure d'acyle **25** sur la pseudo-proline H-Cys($\Psi^{Me, Me}$ pro)-OH **14** (1 eq.) mélangée à la TEA (2 eq.) dans le DCM, à froid (0°C), puis agitation à r.t.(argon, 20h) ; addition de **14** (0.6 eq.) et TEA (1 eq.) à froid et agitation (44h, r.t.) ; purification par RP-HPLC sur une colonne C₁₈ (gradient : 40 à 70 % B en 30 min) ; rendement : 33 % ; iii) clivage du Fmoc : DEA (1.5 eq.), DMF (40 min, r.t.) ; iv) acétylation : Ac₂O (4 eq.), pyridine (4 eq.), DCM anhydre (argon, 20 min, r.t.) ; rendement : quantitatif.

Maintenant que nous disposons du dipeptide Ac-Ala-Cys($\Psi^{Me, Me}$ pro)-OH (**24**), nous pouvons le thioestérifier avec le 2-diméthylaminoéthanthiol, en suivant la méthode précédemment décrite de pré-activation de l'acide carboxylique avec du PyBOP (Figure 182). Après purification par RP-HPLC semi-préparative, le thioester **27**, obtenu avec un rendement de 55 %, est caractérisé par RP-HPLC analytique et spectroscopie de masse ESI-MS (Figure 183).

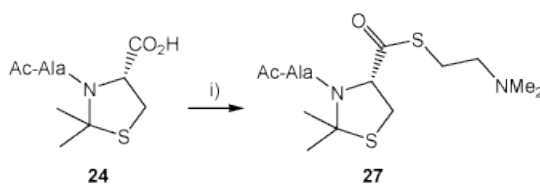


Figure 182 : Thioestérification : i) pré-activation du dipeptide **24** (1 eq.) avec PyBOP (1 eq.) dans le DMF (30 min, r.t.) puis addition d'hydrochlorure de 2-diméthylaminoéthanthiol (1 eq.) et DIPEA (3.5 eq.) (45 min, r.t.) ; purification par RP-HPLC semi-préparative sur une colonne C₁₈ (gradient : 5 à 35 % de B en 30 min) ; rendement : 55 %.

Le second bloc, H-Cys-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**28**), est préparé en phase solide sur une résine Rink Amide MBHA, suivant la stratégie Fmoc/*t*Bu standard de la SPPS (Figure 184). La chaîne latérale de la cystéine est protégée cette fois par un groupe trityle, qui est facilement éliminé au cours du clivage de la résine. Le tétrapeptide est rapidement purifié par RP-HPLC préparative et isolé pour éviter la formation du pont disulfure avec l'oxygène de l'air. Il est alors également caractérisé par RP-HPLC analytique et ESI-MS (Figure 185).

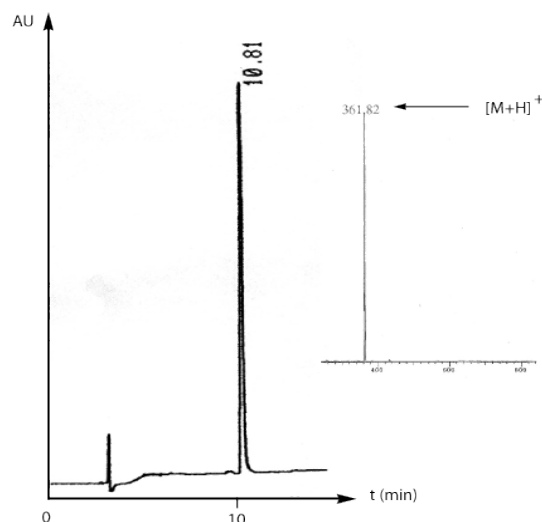


Figure 183 : Caractérisation du thioester **27** par RP-HPLC analytique sur colonne C_{18} (gradient : 5 à 100 % de B en 30 min) et spectroscopie ESI-MS.

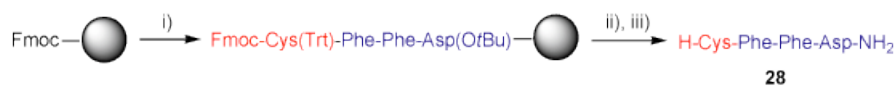


Figure 184 : Synthèse sur support du peptide $\text{H-Cys-Phe-Phe-Asp-NH}_2$ (**28**) : i) SPPS sur une résine Rink Amide MBHA, en stratégie Fmoc/tBu ; ii) déprotection du Fmoc : 20 % pipéridine/DMF (5 x 2 min, r.t.) ; iii) déprotection des chaînes latérales et clivage de la résine (TFA/TIS/ H_2O , 95 : 2.5 : 2.5, v/v/v, 2h, r.t.) ; purification par RP-HPLC préparative sur une colonne C_{18} (gradient : 15 à 35 % B en 30 min) ; rendement : 23 %.

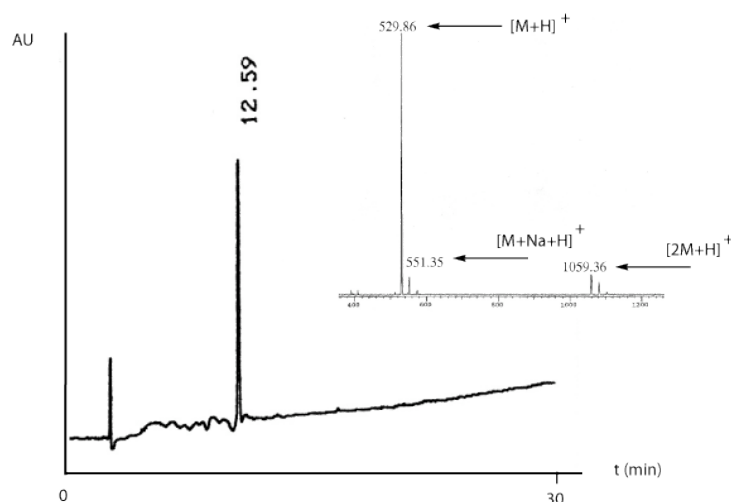


Figure 185 : Caractérisation du peptide $\text{H-Cys-Phe-Phe-Asp-NH}_2$ (**28**) par RP-HPLC analytique sur une colonne C_{18} (gradient : 5 à 100 % de B en 30 min) et spectroscopie ESI-MS.

Un essai de ligation chimiosélective native est réalisé entre les deux blocs $\text{Ac-Ala-Cys}(\Psi^{\text{Me, Me}} \text{ pro})\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NMe}_2$ (**27**) et $\text{H-Cys-Phe-Phe-Asp-NH}_2$ (**28**) (Figure 186). La réaction se fait dans une solution tampon 0.1 M NaH_2PO_4 à pH 7.53 contenant 6 M d'hydrochlorure de guanidine, donnant une solution

aqueuse dénaturante permettant d'obtenir des concentrations peptidiques élevées, typiquement supérieures à 1 mM, et dans notre cas égales à 4.5 mM³¹⁹.

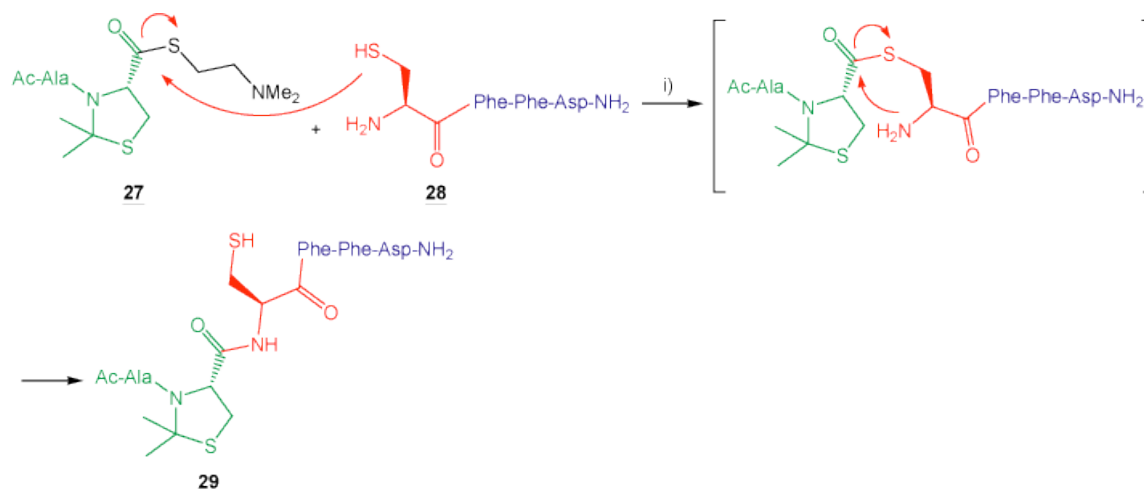


Figure 186 : Ligation chemosélective native entre i) le thioester **27** (1.1 eq.) et le peptide linéaire **28** (1 eq.), donnant le peptide Ac-Ala-Cys($\Psi^{Me, Me}$ pro)-Cys-Phe-Phe-Asp-NH₂ désiré (**29**) : tampon 6 M d'hydrochlorure de guanidine, 0.1 M NaH₂PO₄ à pH 7.53, thiophénol (90 eq.) (27h30, r.t.) ; extraction à l'éther et analyse de la phase aqueuse ; rendement estimé par RP-HPLC analytique : 10 % ; unité d'induction σ en vert, élément « switch » en rouge, séquence de reconnaissance en bleu.

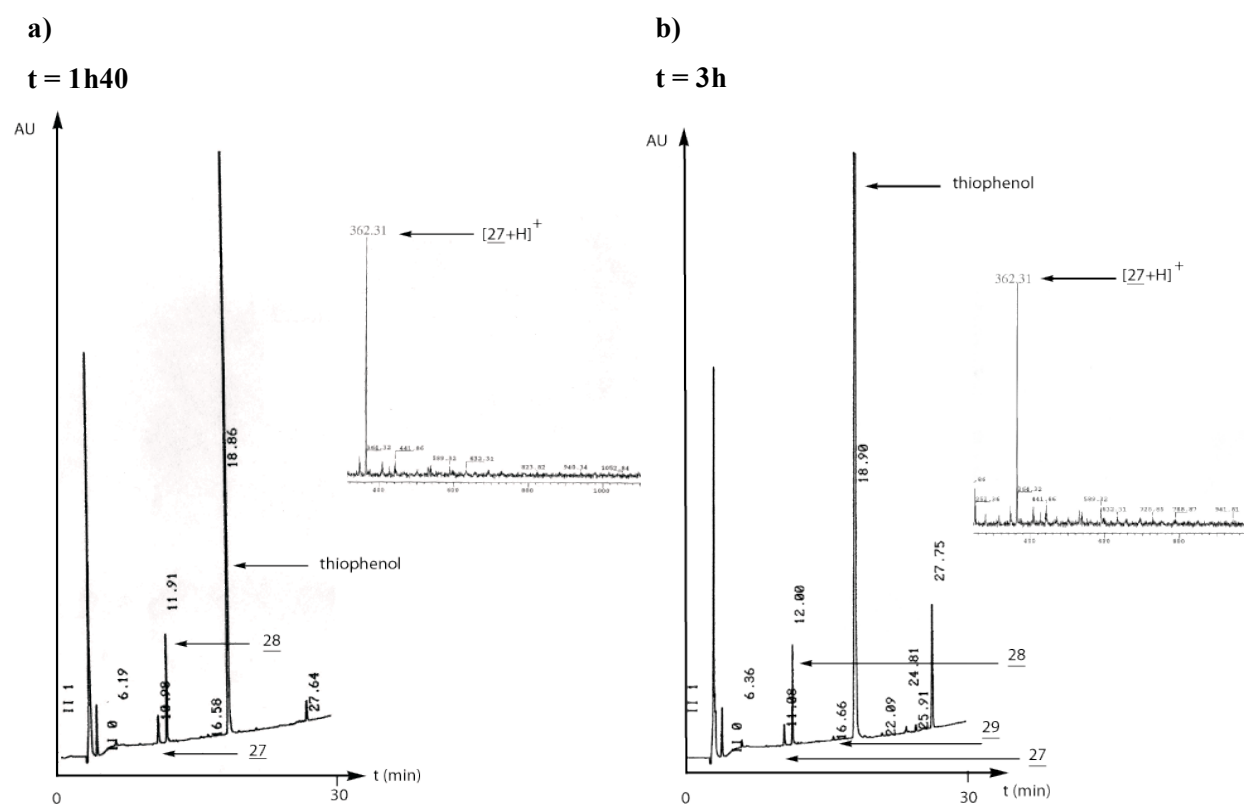


Figure 187 : Suivi, par RP-HPLC analytique sur une colonne C₁₈ (gradient : 5 à 100 % B en 30 min) et ESI-MS, de l'avancement de la ligation chemosélective native entre les peptides **27** et **28**, donnant le peptide Ac-Ala-Cys($\Psi^{Me, Me}$ pro)-Cys-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**29**), au bout a) d'1h40 et b) de 3h.

L'addition d'un large excès de thiophénol (90 eq.) permet de se placer dans un milieu réducteur empêchant l'oxydation de la cystéine en cystine, inversant la formation potentielle de thioesters non productifs *in situ* et pouvant aussi catalyser la formation d'un thioester plus réactif par échange de thiol avec le composé **28**³¹⁹. L'avancement de la ligation, faite à température ambiante, est régulièrement suivie par RP-HPLC analytique et ESI-MS (Figure 187, Figure 188 et Figure 189).

La réaction progresse lentement, nous ne commençons à apercevoir la formation du peptide natif **29** qu'au bout de 3h (Figure 187). Les produits **27**, **28** et **29** sont alors caractérisés par spectroscopie de masse après leur purification par RP-HPLC analytique (Figure 188).

Au bout de 26h, il ne reste pratiquement plus de thioester de départ (Figure 189). Nous arrêtons donc la réaction après 27h30 d'agitation, avec une extraction du thiophénol avec du diéthyl éther³²⁰. La phase aqueuse est ensuite lyophilisée puis analysée, ce qui nous permet d'évaluer le rendement de cette réaction, approximativement égal à 10 %.

t = 3h45

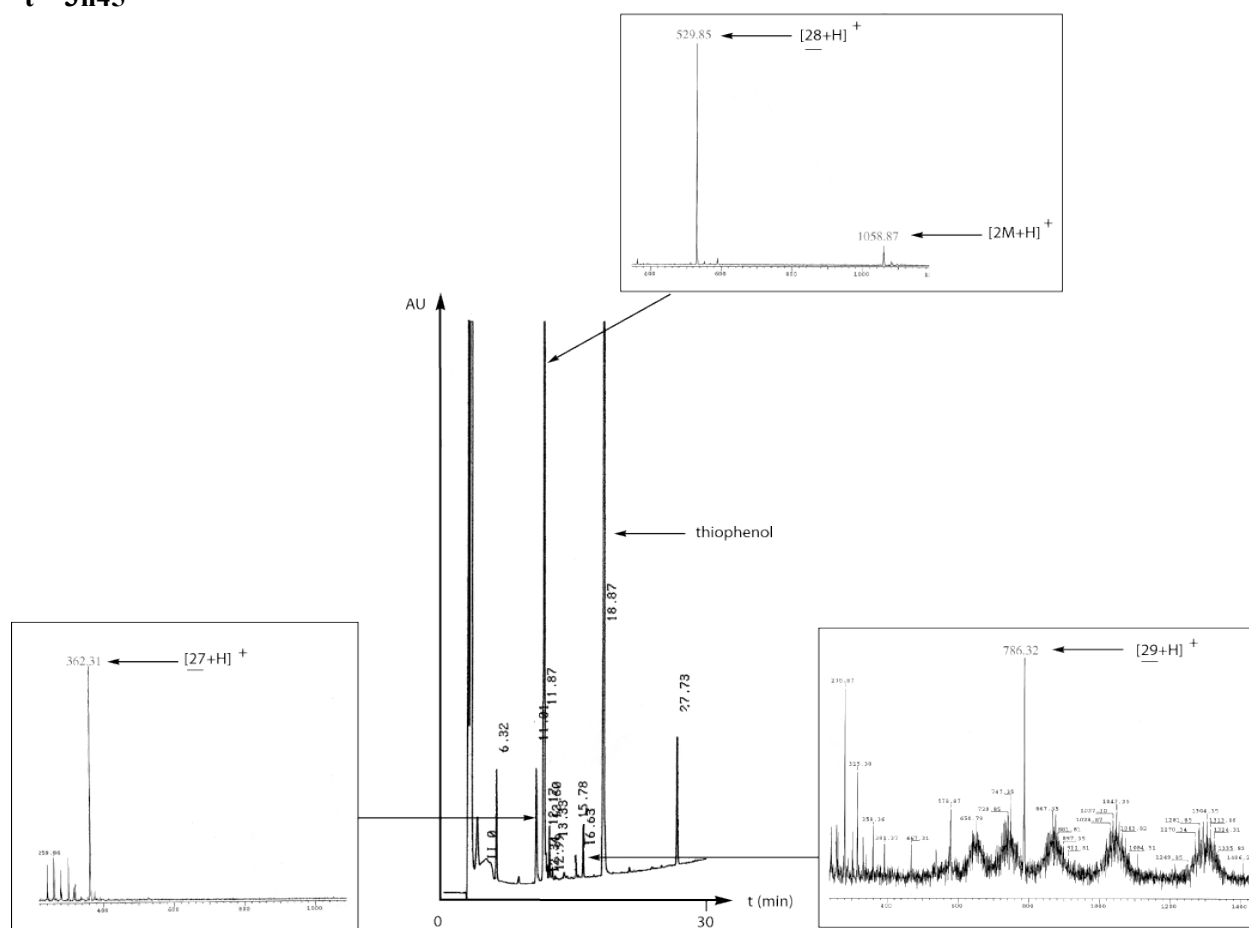


Figure 188 : Composition, au bout de 3h45, du milieu réactionnel de la ligation chémosélective native entre les peptides **27** et **28**, donnant le peptide Ac-Ala-Cys($\Psi^{Me, Me} pro$)-Cys-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**29**), analysée par RP-HPLC analytique sur une colonne C₁₈ (gradient : 5 à 100 % B en 30 min) et ESI-MS.

t = 26h

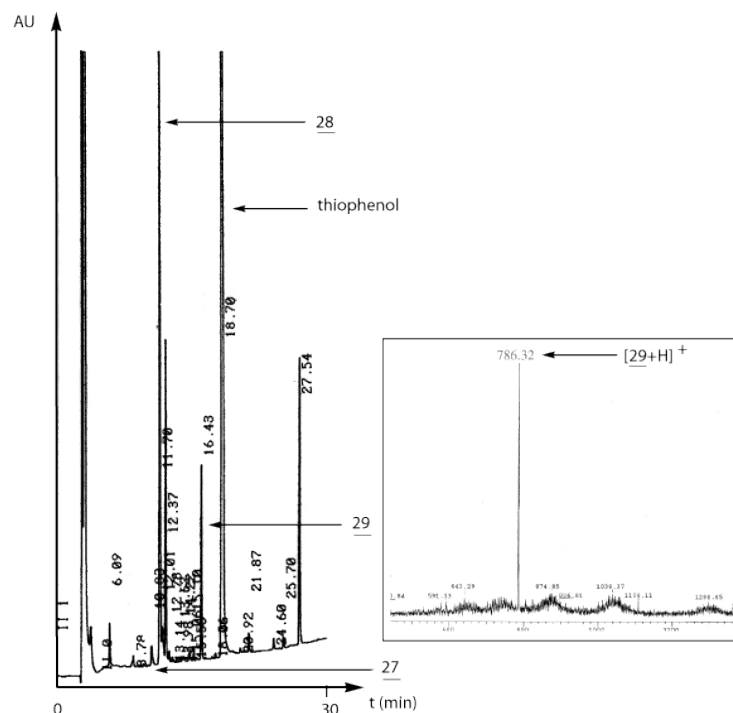


Figure 189 : Composition, au bout de 26h, du milieu réactionnel de la ligation chimiosélective native entre les peptides 27 et 28, donnant le peptide *Ac-Ala-Cys(Ψ^{Me, Me} pro)-Cys-Phe-Phe-Asp-NH₂* (29), analysée par RP-HPLC analytique sur une colonne C₁₈ (gradient : 5 à 100 % B en 30 min) et ESI-MS.

Il est donc envisageable de synthétiser, *in vivo*, par ligation chimiosélective native, cet inhibiteur potentiel de la fibrillogénèse de l'amyloïde β. Si cette molécule ou l'un de ses analogues se révélait être efficace pour lutter contre le phénomène biologique à la base de la maladie d'Alzheimer, il serait donc particulièrement intéressant de considérer l'utilisation de cette méthode de synthèse, pouvant peut-être même améliorer l'effet de la drogue sur les feuillets β en formation. Pour l'instant, il nous reste donc à tester, d'une façon prioritaire, l'activité biologique des inhibiteurs potentiels de cette nouvelle génération.

5. Evaluation biologique des « switch-peptides »

Au moment de tester le potentiel d'inhibition de la fibrillogénèse de l'amyloïde β des « switch-peptides » que nous avons synthétisés et décrits au cours des paragraphes précédents, deux composés méritent tout particulièrement notre attention. Il s'agit de l'*Ac-βAla-Cys(Ψ^{Me, Me} pro)-(H⁺)Cys-Phe-Phe-Asp-NH₂* (21), « switch-peptide » à l'état S_{off} pouvant se réarranger rapidement à pH physiologique pour donner le composé *Ac-βAla-Cys(Ψ^{Me, Me} pro)-Cys-Phe-Phe-Asp-NH₂* (22, état S_{on}), et de son analogue bloqué à l'état S_{off}, l'*Ac-βAla-Cys(Ψ^{Me, Me} pro)-(Ac)Cys-Phe-Phe-Asp-NH₂* (23).

Nous allons donc évaluer l'activité de ces deux molécules dans le système que nous avons déjà mis au point avec l'Aβ(13-23) (**4**). Deux échantillons contenant le « switch-peptide » **21** sont préparés comme il l'est décrit dans le Tableau 25 suivant.

Composé	Echantillon	Concentration peptidique	Rapport 21/4
21	21S1	4 mM	-
21 + 4	21S2	4 mM / 400 μM	10 : 1

Tableau 25 : Liste des échantillons contenant le « switch-peptide » **21**.

Le comportement du peptide seul en solution est évalué grâce à l'étude de l'échantillon **21S1** (Figure 190). Nous remarquons tout de suite un phénomène intéressant : une biréfringence vert-pomme en lumière polarisée apparaît sur certains de ses agrégats. Il nous reste cependant à déterminer s'il s'agit de fibrilles ou d'un artefact. Les données de la littérature nous ont montré qu'un peptide amyloïde ayant moins de 12 résidus n'était pas capable de former de fibrilles. Notre inhibiteur n'en contenant que 6, cette coloration verte devrait correspondre à un autre phénomène indépendant. Sauf si le composé **21** se dimérise *via* la formation d'un pont disulfure, auquel cas nous obtiendrions un nouveau peptide formé de 12 acides aminés, et dont nous pourrions envisager l'interaction avec le rouge Congo.

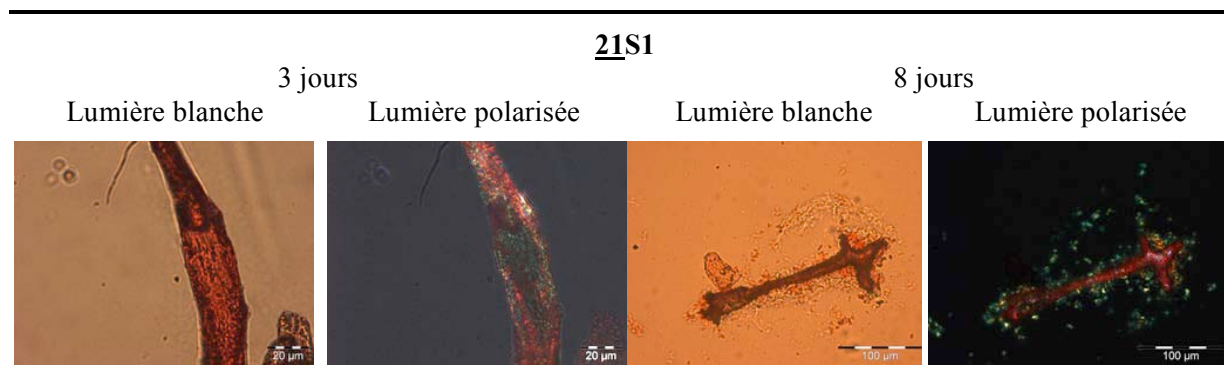


Figure 190 : Suivi de l'échantillon **21S1** par microscopie optique après coloration au rouge Congo.

Après une incubation de trois jours à température ambiante, l'échantillon **21S2** contenant un mélange de 10 équivalents pour 1 équivalent d'amyloïde, ne montre pas la trace de fibrilles après coloration au rouge Congo et visualisation sous une lumière polarisée (Figure 191). Il semblerait donc que le phénomène de biréfringence observé dans l'échantillon **21S1** soit annihilé par la présence de l'amyloïde β.

La microscopie électronique nous montre cependant une certaine quantité de fibrilles présentes dès le deuxième jour d'incubation. Au bout de quatre jours, nous n'observons plus de protofibrilles avec cette méthode, tandis que la coloration au rouge Congo révèle la présence de fibrilles après 8 jours d'incubation. La mesure des dimensions d'un filament obtenu le quatrième jour d'incubation (largeur :

110 Å ; longueur : 3700 Å) nous confirme sa nature fibrillaire (cf Introduction, Chapitre 3.IV.2.c Microscopie électronique par coloration négative conventionnelle).

Contrairement à ce que nous aurions pu nous attendre, ce « switch-peptide » manque d'efficacité en tant qu'inhibiteur de la fibrillogenèse de l'amyloïde β . Si nous le comparons aux autres composés que nous avons étudié auparavant, qu'ils soient cycliques ou conjugués, il semblerait que ce produit soit le moins actif, bien qu'il nous faille garder à l'esprit que cette méthode est avant tout qualitative et non pas quantitative.

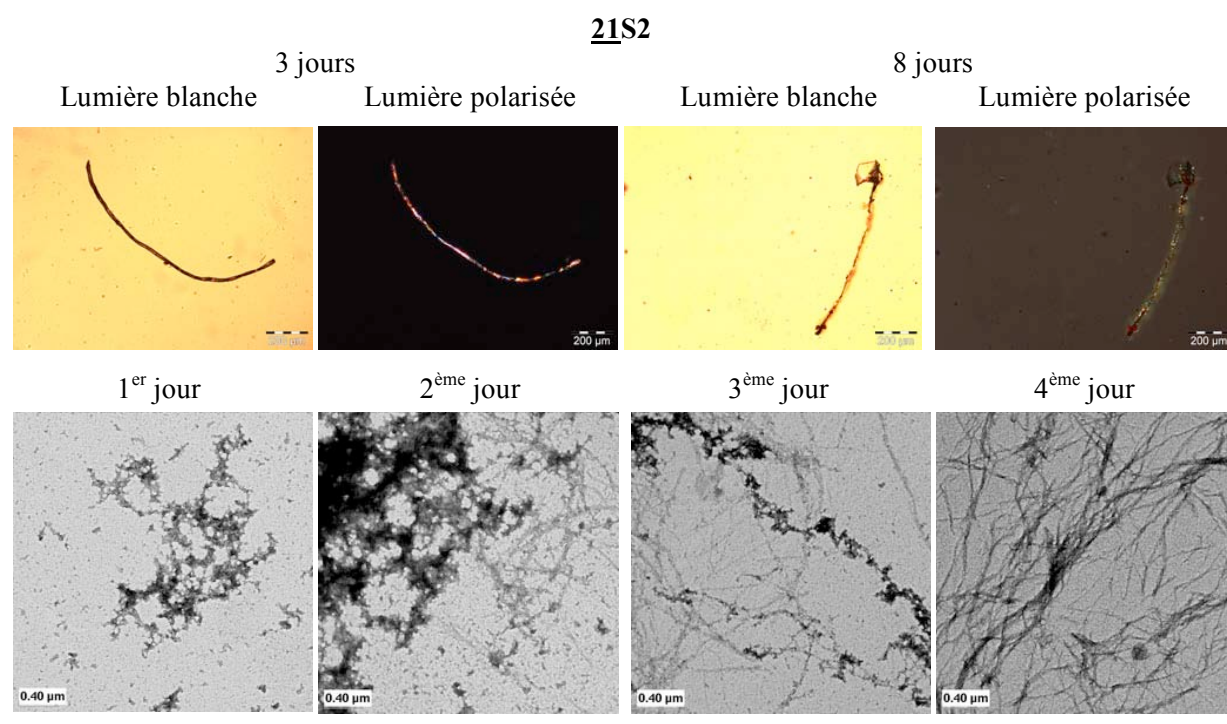


Figure 191 : Suivi de l'échantillon **21S2** par microscopie optique après coloration au rouge Congo (en haut) et par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (en bas).

Il pourrait cependant exister une explication à ce phénomène. En effet, rappelons-nous que le réarrangement acylique intramoléculaire S→N libère au niveau du peptide **22** une fonction thiol libre, celle de la cystéine (Figure 192).

Cette dernière est soumise à une oxydation en présence de l'oxygène de l'air et induit la dimérisation du composé **22**. Imaginons maintenant l'effet de ce produit sur l'amyloïde β , grâce à la simulation des interactions existant entre ce composé et l'amyloïde β , présentées dans la Figure 193.

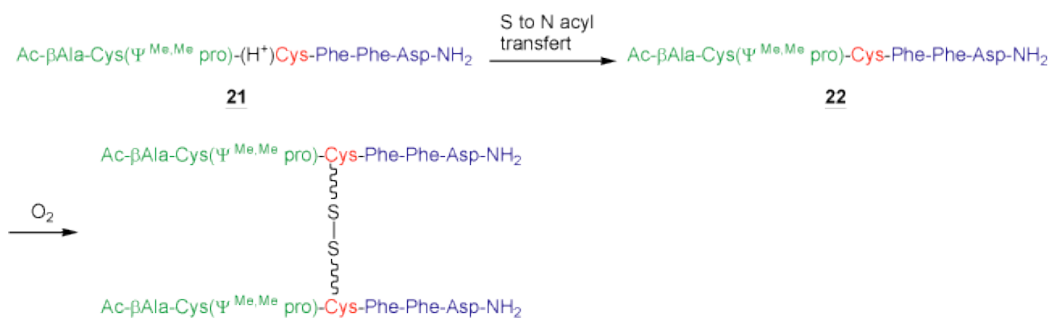


Figure 192 : Migration acylique $S \rightarrow N$ intramolécule du « switch-peptide » $\text{Ac-}\beta\text{Ala-Cys}(\Psi^{\text{Me,Me}}\text{pro})\text{-(H}^+\text{)Cys-Phe-Phe-Asp-NH}_2$ (**21**) donnant le peptide $\text{Ac-}\beta\text{Ala-Cys}(\Psi^{\text{Me,Me}}\text{pro})\text{-Cys-Phe-Phe-Asp-NH}_2$ (**22**), pouvant s'oxyder en présence de l'oxygène de l'air et former le dimère correspondant via un pont disulfure.

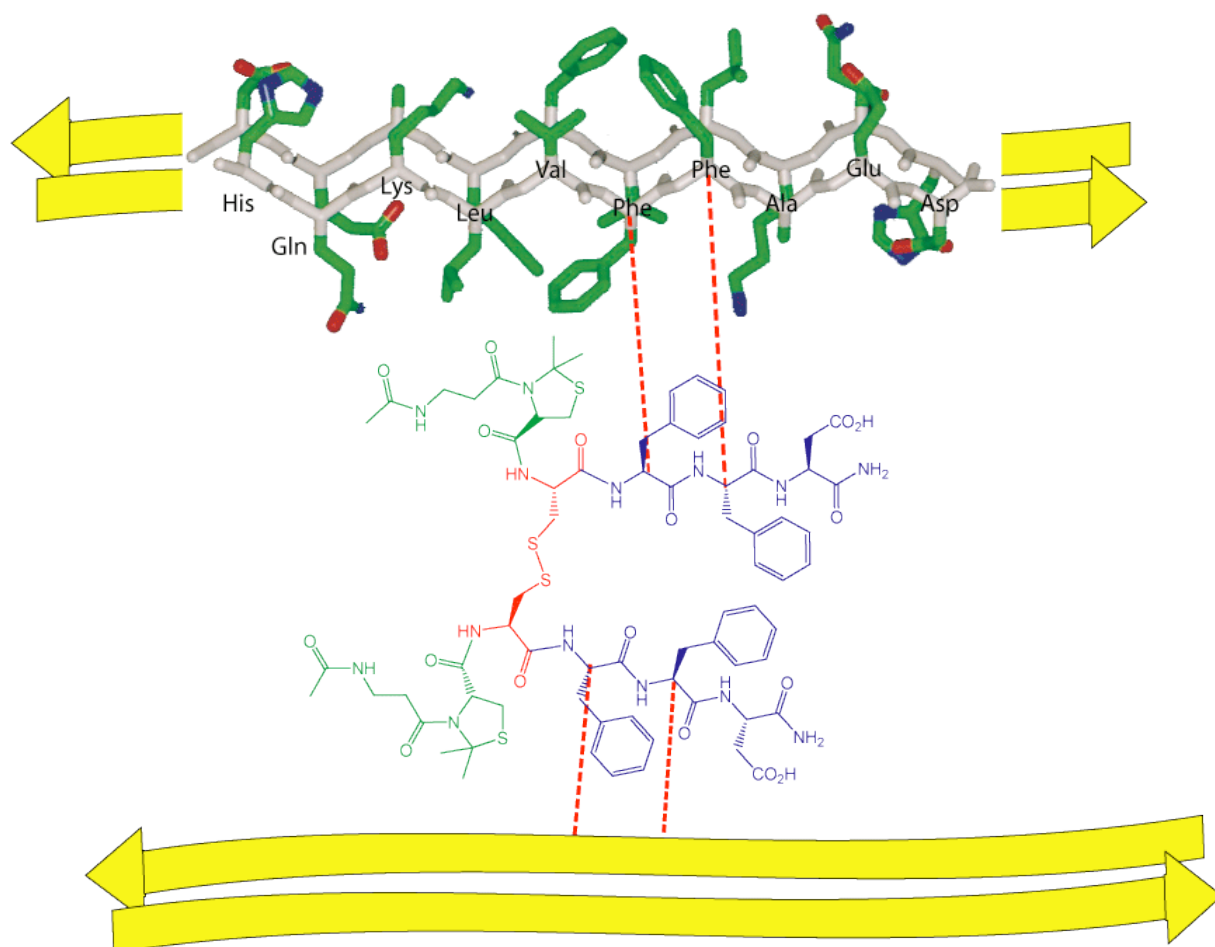


Figure 193 : Représentation schématique des interactions envisagées entre le « switch-peptide » **22**, à l'état S_{on} et oxydé, et un dimère d' $A\beta(14-23)^{223}$: la molécule contenant le pont disulfure pourrait être suffisamment flexible pour que ses quatre phénylalanines interagissent parfaitement avec celles du peptide pathogène ; elle serait donc capable d'éloigner l'un de l'autre deux brins β sans toutefois les détruire, son effet inhibiteur s'en retrouvant donc fortement réduit ; les pointillés rouges symbolisent les interactions existant entre les deux résidus désignés par l'extrémité des traits au niveau de leur C_{α} .

Il apparaît donc clairement sur ce schéma la possibilité d'une agrégation des feuillets β de l'amyloïde β de chaque côté de la molécule, stabilisée par les interactions entre phénylalanines, et qui pourrait alors

surpasser l'effet destructeur de la pseudo-proline. Si cette théorie se révèle exacte, il serait donc nécessaire de remplacer la cystéine par un autre élément « switch » ne contenant pas de fonction thiol, tel que la sérine ou la thréonine.

Il existe néanmoins une autre possibilité expliquant ce phénomène de faible activité de la molécule **21**. Nous avons vu en effet que la migration acylique intramoléculaire était excessivement rapide pour ce composé. Il est donc possible qu'elle se termine avant que l'inhibiteur potentiel à l'état S_{off} ne puisse se mêler correctement au peptide amyloïde. Nous nous retrouverions donc dans une situation semblable à celle rencontrée par C. Boissard avec ses dérivés pseudo-prolines de configuration cis, moins actifs que des dérivés contenant une proline. En supposant que cette hypothèse s'avère exacte, il nous faudrait donc ralentir la migration acylique soit en remplaçant la cystéine par une sérine, soit en protégeant l'amine de l'élément « switch » par un groupement par exemple enzymolabile, qui mettrait un certain temps à être clivé.

Parallèlement à l'étude précédente, nous avons préparé deux échantillons contenant le « switch-peptide » **23** bloqué à l'état S_{off} (Tableau 26).

Composé	Echantillon	Concentration peptidique	Rapport 23/4
23	23S1	4 mM	
23 + 4	23S2	4 mM / 400 μ M	10 : 1

Tableau 26 : Liste des échantillons contenant le « switch-peptide » bloqué à l'état S_{off} **23**.

L'échantillon **23S1**, ne contenant que le composé **23**, montre que le produit a tendance à s'agréger mais nous n'observons aucune biréfringence vert-pomme sous la lumière polarisée (Figure 194).

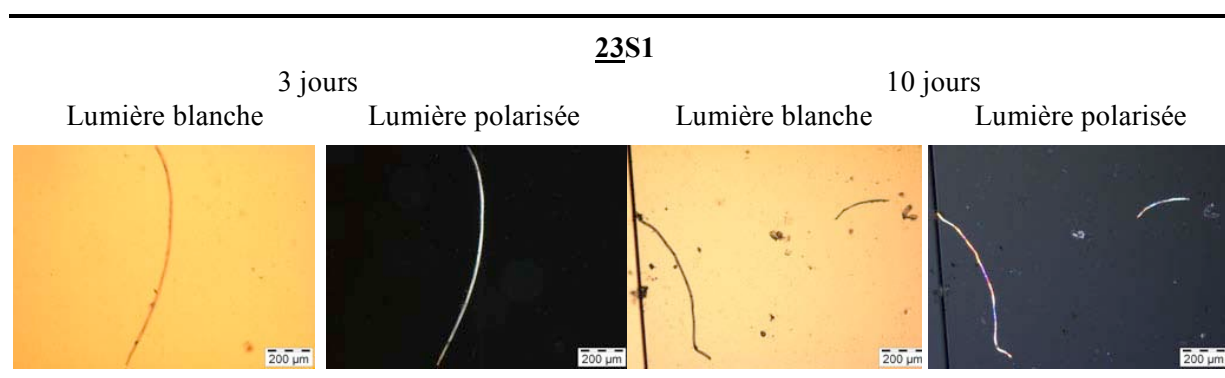


Figure 194 : Suivi de l'échantillon **23S1** par microscopie optique après coloration au rouge Congo.

Une fois mélangé au peptide amyloïde **4**, le composé **23** ralentit fortement la formation de fibrilles, qui ne sont observées qu'à l'état de protofibrilles en microscopie électronique au cours des quatre premiers jours d'observation, et ne sont révélées qu'après dix jours d'incubation par une coloration au rouge Congo (Figure 195).

Ainsi, contrairement à ce que nous aurions pu nous attendre au moment du design de nos « switch-peptides », la forme bloquée à l'état S_{off} (**23**) se révèle être un bien meilleur inhibiteur de cette fibrillogenèse que son analogue **21** pouvant être soumis à une migration acylique intramoléculaire. Son activité est estimée comme étant supérieure à celle du peptide cyclique **3**, inférieure à celle des peptides conjugués intégrant une proline et un dérivé cotinine (composés **10** et **11**), mais somme toute de l'ordre de celles des peptides conjugués **8** et **9**.

Ce constat reste cependant en accord avec nos hypothèses précédentes permettant d'expliquer le manque de réactivité du « switch-peptide » **21**. En effet, la molécule **23** ne peut se dimériser puisque sa fonction thiol est impliquée dans une liaison thioester. De la même façon, cette liaison thioester rendant la molécule plus flexible, il est possible qu'elle puisse mieux se mélanger au peptide pathogène que son analogue S_{on} **22**.

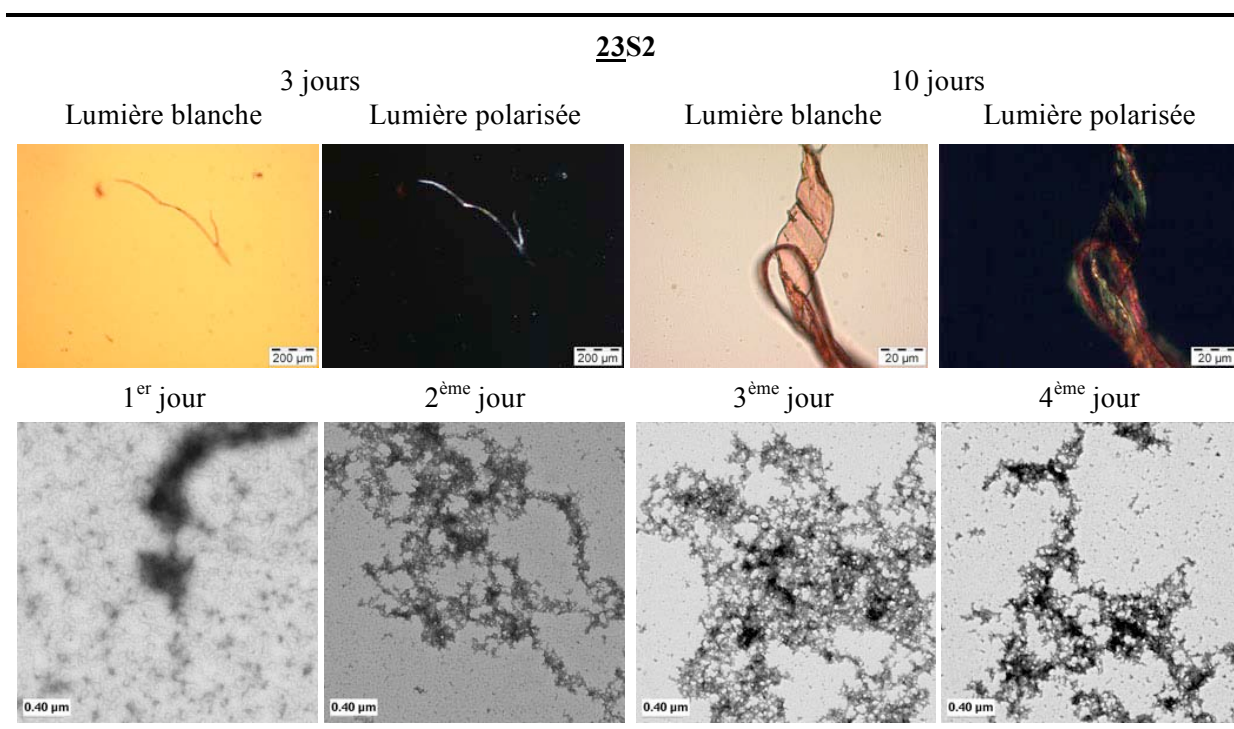


Figure 195 : Suivi de l'échantillon **23S2** par microscopie optique après coloration au rouge Congo (en haut) et par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (en bas).

Bien que ces premiers tests n'aient pas donné les résultats escomptés du point de vue de l'évaluation biologique, ce nouveau concept de « switch-peptides » nous offre néanmoins de nombreuses possibilités d'amélioration de ces drogues potentielles. Des modifications concernant principalement l'élément

« switch », et plus précisément la nature de l'hétéroatome ou de la protection de l'amine, devraient nous permettre de pallier les faiblesses rencontrées jusqu'à présent avec ces « switch-peptides ».

II. Une nouvelle génération d'éléments « switch »

Tout au long de ce travail, nous avons utilisé le concept de « switch-peptides » pour synthétiser des inhibiteurs puissants de la fibrillogenèse de l'amyloïde β . Cette génération de composés requiert cependant, outre une structure acceptant le transfert acylique, l'introduction, dans l'unité d'induction conformationnelle σ , d'un élément de destruction de feuillets β , telle que la pseudo-proline de conformation *cis* utilisée jusqu'à présent, induisant la rupture de la séquence linéaire de l'inhibiteur à l'état S_{on} .

Il serait néanmoins intéressant, pour cette catégorie de peptides, de pouvoir regrouper la fonction « switch » et l'inducteur de coude en les fusionnant dans une seule molécule pour former un nouveau type d'éléments « switch ». Cela reviendrait ainsi à utiliser un motif rigide trifonctionnalisé, que nous pourrions insérer au milieu d'une séquence de reconnaissance du peptide pathogène.

Après avoir constaté la disparité de réactivité des esters et des thioesters impliqués dans les migrations acyliques intramoléculaires $X \rightarrow N$, nous avons jugé qu'il serait plus judicieux de pouvoir travailler avec des temps de demi-vie plus lents, laissant sous-entendre l'emploi d'un atome d'oxygène plutôt qu'un atome de soufre au niveau de l'élément « switch ».

La combinaison de ces différentes observations nous permet alors de dessiner une nouvelle génération d'éléments « switch » inducteurs de coude. Ainsi à l'état S_{off} , la molécule linéaire correspondante s'adapte parfaitement pour se mêler à l'amyloïde β et s'insérer entre deux brins β en cours de formation (Figure 196).

La migration acylique intramoléculaire $O \rightarrow N$ placerait ensuite la partie de reconnaissance N-terminale sur l'amine positionnée de telle sorte que le « switch-peptide » à l'état S_{on} adopte une forme de coude permettant d'éloigner les brins β les uns des autres, et donc de détruire les fibrilles qui commencent à s'agréger (Figure 197).

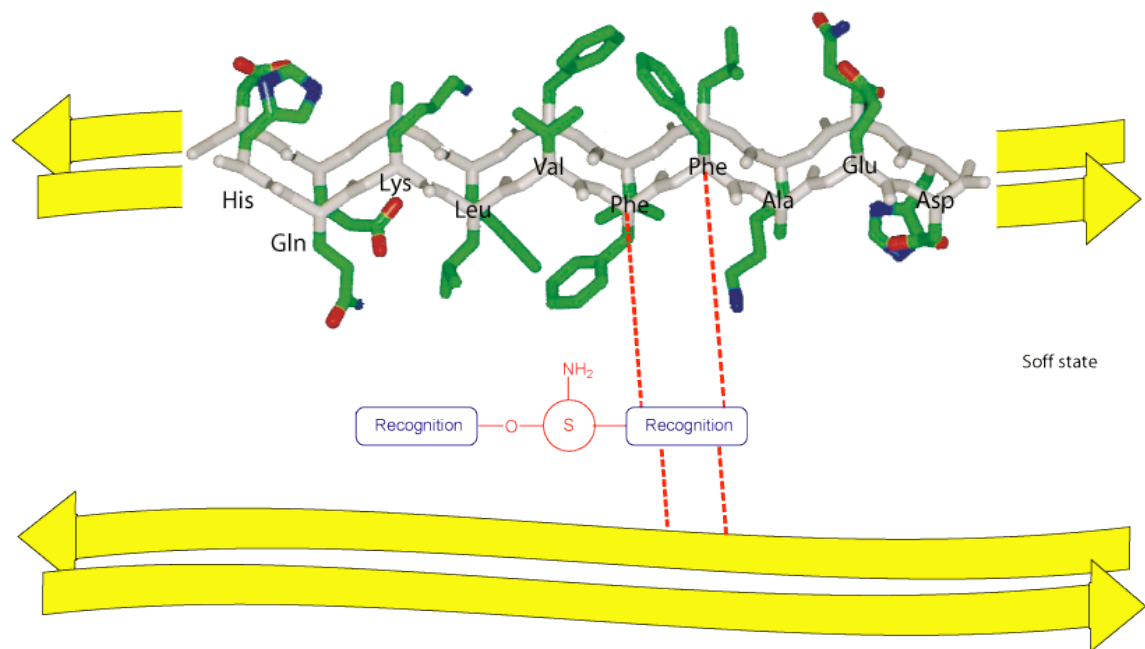


Figure 196 : Représentation schématique des interactions envisagées entre le « switch-peptide », à l'état S_{off} , intégrant un élément « switch » inducteur de coude et un dimère d' $A\beta(14-23)^{223}$: le peptide linéaire se mélange parfaitement avec l'amyloïde β , tandis que sa séquence de reconnaissance se lie spécifiquement au peptide pathogène ; les pointillés rouges symbolisent les interactions existant entre les deux résidus désignés par l'extrémité des traits au niveau de leur C_{α} .

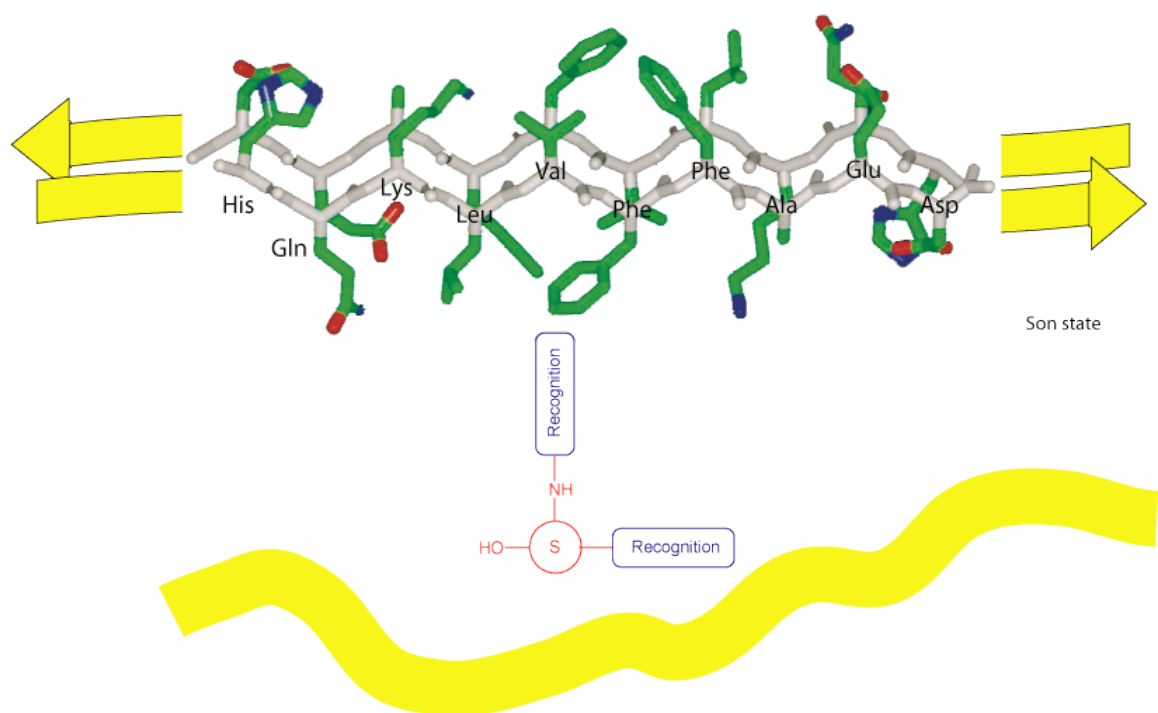


Figure 197 : Représentation schématique des interactions envisagées entre le « switch-peptide », à l'état S_{on} , intégrant un élément « switch » inducteur de coude et un dimère d' $A\beta(14-23)^{223}$: l'inhibiteur, parfaitement mélangé au peptide pathogène, subit une migration acylique intramoléculaire $O \rightarrow N$ rétablissant la liaison amide native entre l'élément « switch » et la partie N-terminale de la molécule et induisant la formation d'un coude dans la structure qui détruit l'agencement de l'amyloïde β en feuillets β ; les pointillés rouges symbolisent les interactions existant entre les deux résidus désignés par l'extrémité des traits au niveau de leur C_{α} .

La Figure 198 regroupe quelques molécules organiques pouvant être considérées comme des éléments « switch » inducteurs de coude. Parmi elles, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux composés naturels, mieux adaptés à la conception de drogues, ainsi qu'aux dérivés aromatiques, plus rigides.

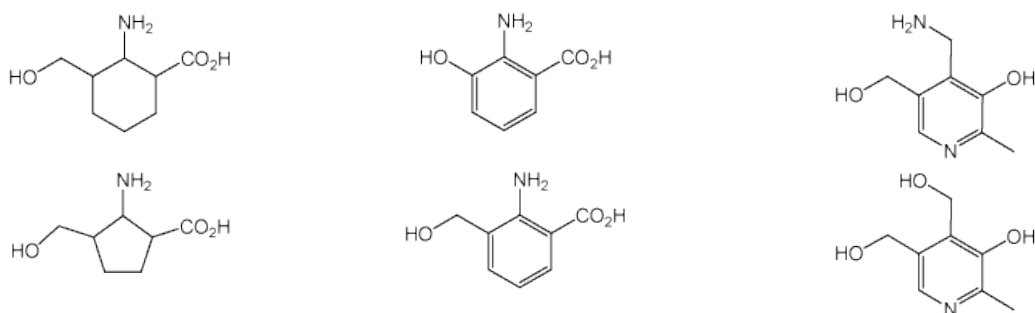


Figure 198 : Quelques exemples de structures pouvant être utilisés en tant qu'éléments « switch » induisant la formation d'un coude dans une séquence peptidique ; première colonne : composés cycliques ; deuxième colonne : composés aromatiques ; troisième colonne : composés naturels (pyridoxamine en haut, pyridoxine en bas).

1. Une molécule naturelle, la vitamine B₆

a. Généralités

Les vitamines sont des substances essentielles tant au bon fonctionnement du métabolisme qu'à la croissance des êtres vivants, à leur développement et à la régulation des fonctions cellulaires. Elles agissent en partenariat avec des enzymes, des co-facteurs ou d'autres composés nécessaires à la bonne santé de l'organisme. Elles n'ont aucuns liens entre elles, ni structurels ni fonctionnels, mais leur absence dans l'alimentation ou leur mauvaise absorption par le corps déclenche inéluctablement un trouble spécifique.

L'importance des vitamines est connue depuis le début du siècle dernier, grâce à W. Fletcher, qui, en 1905, montra que la cosse de riz contenait des nutriments essentiels prévenant le Bériberi, maladie cardiovasculaire agissant aussi sur le système nerveux³²¹. En 1912, K. Funk baptisa ce type de composés « vital amines », transformé en « vitamines »³²². Ils conservèrent ainsi ce nom même après qu'il fut découvert que cette catégorie de molécules n'était pas constituée uniquement par des amines.

Il existe treize vitamines indispensables à l'organisme. Il s'agit des vitamines A, C, D, E, K, et B, les vitamines B regroupant huit autres molécules, à savoir la thiamine, la riboflavine, la niacine, l'acide pantothénique, la biotine, la vitamine B₆, la vitamine B₁₂ et l'acide folique. Elles sont généralement divisées en deux groupes, celui des liposolubles (vitamine A, D, E et K) et celui des hydrosolubles (vitamines B et C).

Lorsque la vitamine B fut identifiée, les chercheurs pensaient qu'il ne s'agissait que d'une seule molécule³²³, puis ils découvrirent qu'elle formait en fait un complexe de plusieurs composés

chimiquement distincts, coexistants dans les mêmes aliments (Tableau 27). Ces molécules agissent en fait de concert pour soutenir le métabolisme, maintenir la bonne santé de la peau et la tonicité musculaire, améliorer le fonctionnement du système immunitaire et du système nerveux ainsi que pour promouvoir la croissance et la division cellulaire.

Vitamine B	Nom scientifique	Nom usuel
Vitamine B ₁	Thiamine	
Vitamine B ₂	Riboflavine	Vitamine G
Vitamine B ₃	Niacine, acide nicotinique, nicotinamide	Vitamine P ou PP (pour prévention du pellagre)
Vitamine B ₅	Acide pantothénique	
Vitamine B ₆	Pyridoxine, pyridoxal, pyridoxamine	
Vitamine B ₇	Biotine	Vitamine H
Vitamine B ₉	Acide folique	Vitamine M
Vitamine B ₁₂	Cyanocobalamine	

Tableau 27 : Liste des vitamines humaines appartenant au groupe des vitamines B.

Parmi toutes ces vitamines, celle qui nous intéresse plus particulièrement est la vitamine B₆. D'un point de vue historique, cette molécule fut découverte en 1934 par P. György, qui nomma cette partie du complexe de la vitamine B₂ responsable de la guérison de jeunes rats atteints de la pellagre du rat, pyridoxine^{324, 325, 326}. Le composé fut isolé sous sa forme cristalline en 1938 par K. Folkert^{327, 328} et R. Kuhn^{329, 330, 331} qui l'identifièrent comme étant la 2-méthyl-3-hydroxy-4,5-di(hydroxyméthyl)-pyridine (Figure 199). Un an plus tard, S. Harris et K. Folkers publièrent sa synthèse totale^{332, 333}.

En 1942, E. Snell décrivit l'existence d'une substance surpassant de loin la pyridoxine en tant que facteur de prolifération dans de nombreuses espèces de bactéries d'acide lactique³³⁴. Il fut montré que la pyridoxine était partiellement transformée en cette matière, alors appelée « pseudopyridoxine », par les organismes animaux. Deux ans plus tard, E. Snell identifia deux autres formes naturelles de la vitamine B₆, à savoir la pyridoxamine et le pyridoxal, correspondant respectivement soit à l'amination, soit à l'oxydation partielle de la pyridoxine^{335, 336, 337, 338} (Figure 199).

Ainsi, en réalité, la vitamine B₆ existe sous trois formes chimiques majeures, correspondant à la pyridoxine (fonction alcool), la pyridoxamine (fonction amine) et au pyridoxal (fonction aldéhyde), chacune de ces trois structures se trouvant aussi sous sa forme phosphorylée (Figure 199).

Quotidiennement utilisée par l'organisme humain, la pyridoxine se trouve exclusivement dans la nourriture³³⁹, sous sa forme libre ou sous forme de glycoside. Avant d'être phosphorylés, les trois dérivés

de la vitamine B₆ sont absorbés par le jéjunum selon un procédé non-saturable, la pyridoxamine et le pyridoxal étant préalablement hydrolysés par des enzymes lumenales et/ou la microflore³³⁹.

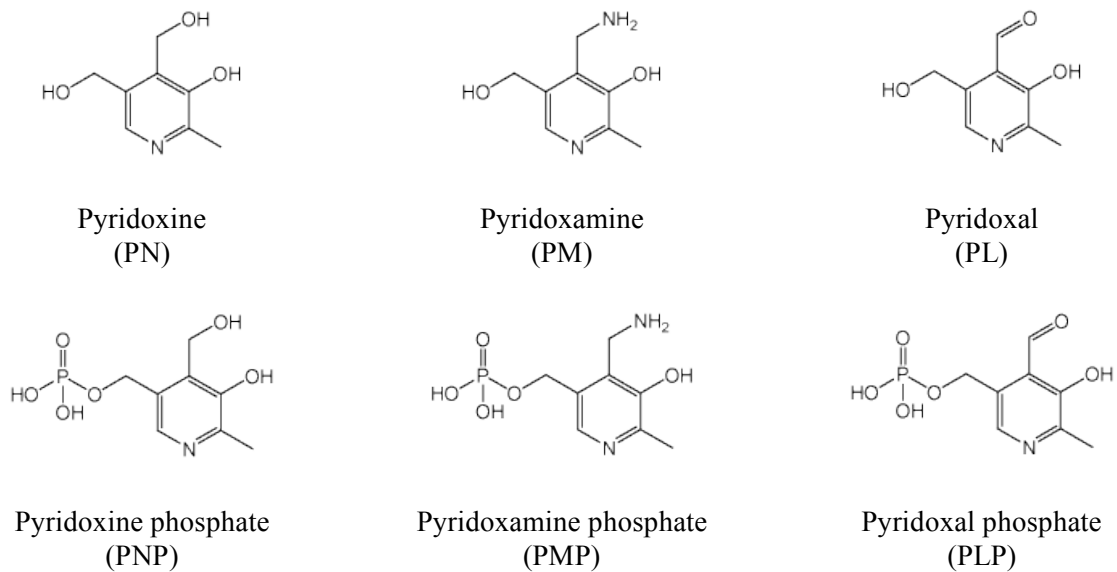
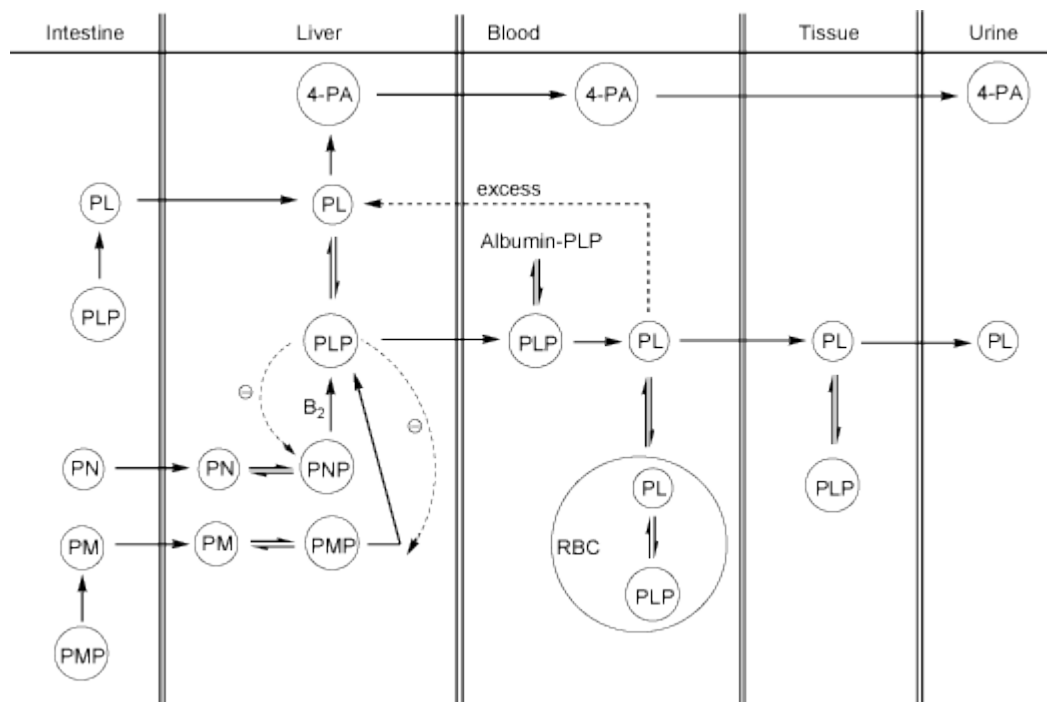


Figure 199 : Structure des trois formes majeures de la vitamine B₆ ainsi que de leurs dérivés phosphorylés correspondants.

Une vue simplifiée du métabolisme de la vitamine B₆ est présentée dans la Figure 200³³⁹.

Les formes simples sont phosphorylées par une kinase, puis la pyridoxine phosphate et la pyridoxamine phosphate sont converties par une oxydase flavine-dépendante pour donner la forme bioactive de la vitamine B₆, le pyridoxal phosphate, ce qui correspond à l'étape cruciale de ce métabolisme. Cette forme bioactive ne pouvant traverser les membranes cellulaires, elle doit être déphosphorylée à l'extérieur puis rephosphorylée à l'intérieur des cellules. Le pyridoxal, relargué dans la circulation sanguine, est utilisé par divers tissus suivant leurs besoins, son excès étant éliminé par le foie qui le dégrade en acide pyridoxique avant son évacuation dans l'urine.

La vitamine B₆ est impliquée dans le fonctionnement de plus d'une centaine d'enzymes agissant sur le métabolisme des protéines. Elle est essentielle à celui des globules rouges car elle participe à la maturation de l'hémoglobine et permet d'augmenter la quantité d'oxygène qu'elle transporte. Elle joue aussi un rôle dans la conversion des stocks de carbohydrates et de nutriments en glucose, mécanisme nécessaire à la conservation d'un niveau constant de glucose dans le sang, ainsi que dans la transformation du tryptophane en niacine et dans la formation de nicotinamide (Figure 201). Elle participe également à la synthèse de l'insuline, d'anticorps et de neurotransmetteurs tels que la dopamine, la sérotonine, la noradrénaline ou l'acide gamma-aminobutyrique (GABA).



PL = pyridoxal ; PLP = pyridoxal 5-phosphate ; PN = pyridoxine ; PNP = pyridoxine 5-phosphate ;
 PM = pyridoxamine ; PMP = pyridoxamine 5-phosphate ; 4-PA = acide 4-pyridoxique ;
 RBC = Red Blood Cell (globules rouges) ; B₂ = riboflavine ; ⊖ = rétro-inhibition.

Figure 200 : Vue simplifiée du métabolisme de la vitamine B₆³³⁹.

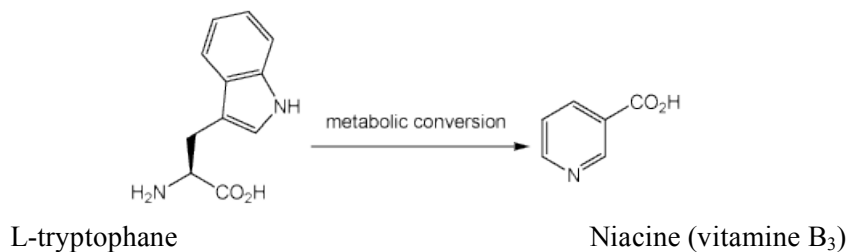


Figure 201 : Conversion métabolique du tryptophane en niacine.

De nombreux troubles neuropsychiatriques (fatigue, dépression nerveuse, neurasthénie), hématologiques, immunitaires et dermatologiques sont ainsi souvent observées en cas de carence. Outre une répercussion sur toutes ses activités, un manque de vitamine B₆ se traduit aussi par une augmentation d'homocystéine dans le sang, facteur-risque de maladies cardiaques et d'attaques (Figure 202)³³⁹.

Les propriétés structurales de cette classe de composés font des dérivés de vitamine B₆ des candidats intéressants dans le développement de nouveaux éléments « switch » induisant une structure en forme de coude.

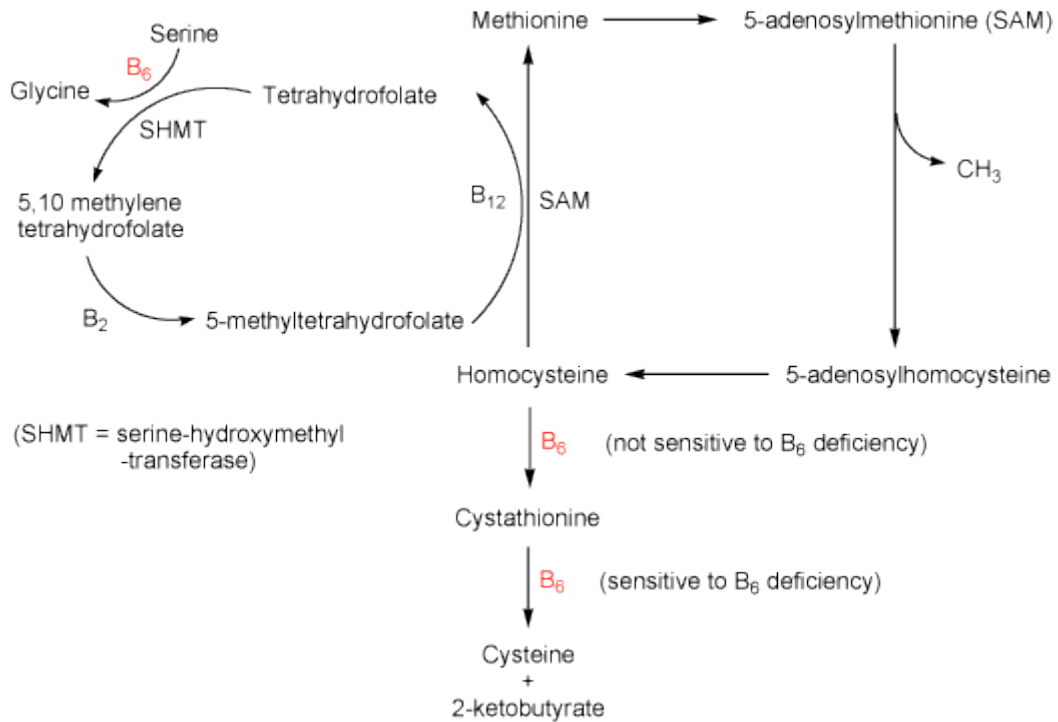
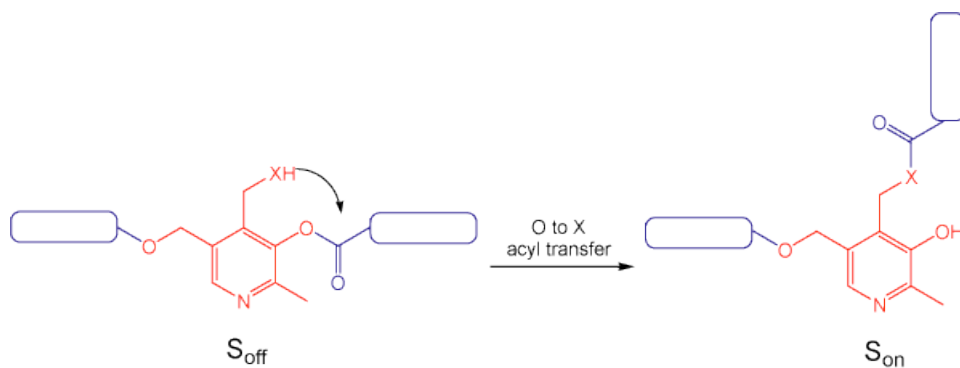


Figure 202 : Métabolisme de l'homocystéine³³⁹.

Leur structure rigide, grâce au noyau aromatique, est convenablement substituée par trois fonctions alcools dans le cas de la pyridoxine, et par deux fonctions alcools et une fonction amine dans le cas de la pyridoxamine (Figure 203). Ils possèdent en outre un autre attrait primordial lors du design de molécules bioactives, puisqu'ils sont naturellement présents dans l'organisme. Cela signifie que leur intégration dans un « switch-peptide » ne devrait pas entraîner de toxicité additive, et qu'ils pourront être facilement biodégradés après avoir rempli leur office.



X = O (pyridoxine)

X = NH (pyridoxamine)

Figure 203 : Concept des « switch-peptides » intégrant, comme élément « switch » inducteur de coude, une pyridoxine (X = O) ou une pyridoxamine (X = N).

b. Pyridoxine

La pyridoxine et la pyridoxamine sont des molécules trifonctionnalisées dont au moins une des fonctions est plus réactive que les deux autres. Dans le cas de la pyridoxine, il s'agit de l'alcool phénolique, dont le pKa de 10 à 25°C est inférieur à celui des deux alcools benzyliques, égal à 15. En ce qui concerne la pyridoxamine, la fonction la plus réactive est bien entendu l'amine.

Cette différence de réactivité va nous permettre de protéger sélectivement le phénol ou l'amine par un groupement protecteur pouvant être clivé dans des conditions douces et orthogonales avec les esters que nous aurons placés dans une deuxième étape sur les alcools benzyliques de la vitamine B₆.

Parmi les groupements protecteurs qui existent, les protections benzyliques et benzyl carbamates, respectivement pour les fonctions alcools et amines, font partie des possibilités les plus adaptées pour cette stratégie de synthèse. Leur hydrolyse par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon, préserve en effet les groupements esters. Cependant la vitamine B₆ est une molécule particulière car elle possède deux positions benzyliques qui peuvent elles-aussi réagir au moment de cette réaction de déprotection. Nous allons donc réaliser un premier essai d'application de cette stratégie sur la pyridoxine afin de tester la compatibilité de l'hydrogénation catalytique avec ce type de composés. Cela nous permettra de plus d'étudier un autre type de migration acylique intramoléculaire que nous n'avons pas encore abordé, et qui peut se produire entre deux atomes d'oxygène.

Il existe en effet quelques exemples de transfert acylique O→O dans la littérature. Ainsi la conversion du triméthylacétate de 2-hydroxyméthyl-4-nitrophényle, catalysée par la cyclohexaamylose et ralentie par la cycloheptaamylose, fut étudiée avec soin par D. W Griffiths et M. L. Bender en 1973³⁴⁰. D. S. Kemp décrit un modèle de migration d'acétylène entre un phénol et une carbinolamine en 1975³⁴¹, et en 1988, M. D. Corbett et B. R. Corbett reportèrent le cas d'un transfert d'acétylène entre l'oxygène d'un acide glycolylhydroxamique N,O-acétylé et l'oxygène du groupe glycolyle³⁴².

D'un point de vue expérimental, le phénol de la pyridoxine est d'abord benzylé par du bromure de benzyl en présence de carbonate de sodium anhydre dans un mélange 1 : 1 de méthanol et d'eau (Figure 204). Après purification par colonne chromatographique sur gel de silice, la 3-benzyloxy-4,5-bis(hydroxy)-2-méthylpyridine (**30**) est analysée et caractérisée par RP-HPLC analytique, spectroscopie de masse ESI-MS et RMN (Figure 205, Figure 206).

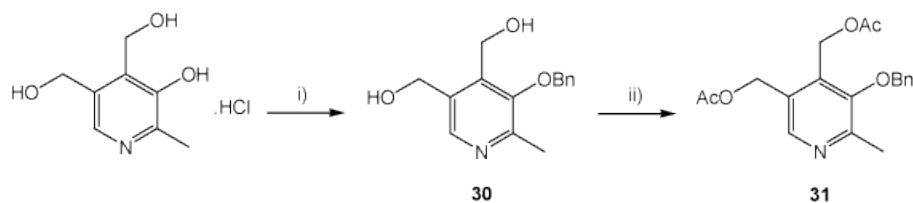


Figure 204 : Synthèse de la 3-benzyloxy-4,5-bis(hydroxyméthyl)-2-méthylpyridine 4',5'-bis(acétate) (**31**) : i) benzoylation : BnBr (1.7 eq.), Na₂CO₃ (3.4 eq.) dans 50 % de méthanol dans l'eau (2h30, r.t.) ; purification par chromatographie sur gel de silice (90 % AcOEt/n-hexane) ; rendement : 41 % ; ii) acétylation : Ac₂O (3 eq.), DIPEA (4 eq.), DMAP (0.1 eq.), DCM anhydre (0.1 M) (25 min, r.t.) ; purification par chromatographie sur gel de silice (40 % AcOEt/n-hexane) ; rendement : 99 %.

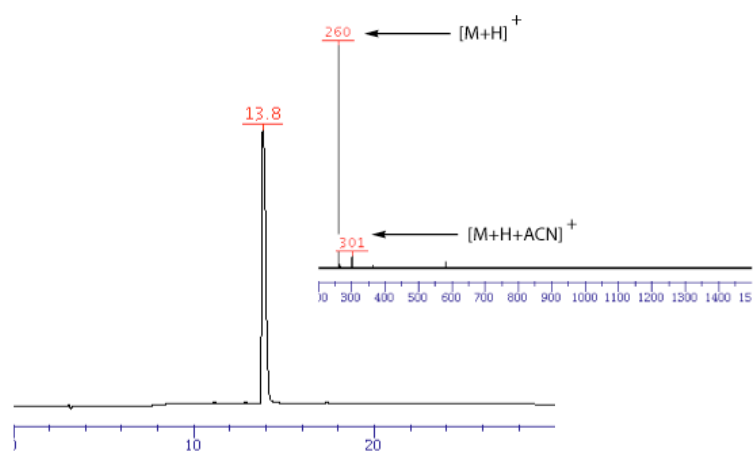


Figure 205 : Caractérisation du composé **30** après purification par RP-HPLC analytique sur colonne C₁₈ (gradient : 0 à 100 % B en 30 min) et spectroscopie ESI-MS.

L'analyse par RMN ¹H nous permet de confirmer la présence du benzyl sur l'alcool phénolique et non par sur l'un ou l'autre des deux alcools benzyliques de la molécule : les signaux des protons benzyliques en position 4 et 5 de la molécule **30** correspondent en effet à des déplacements chimiques proches de ceux de la pyridoxine (Figure 206a, d et e). Nous observons de plus le dédoublement de ces signaux dans le DMSO d₆ pouvant s'expliquer par l'existence d'un couplage ³J entre ces protons et l'alcool correspondant.

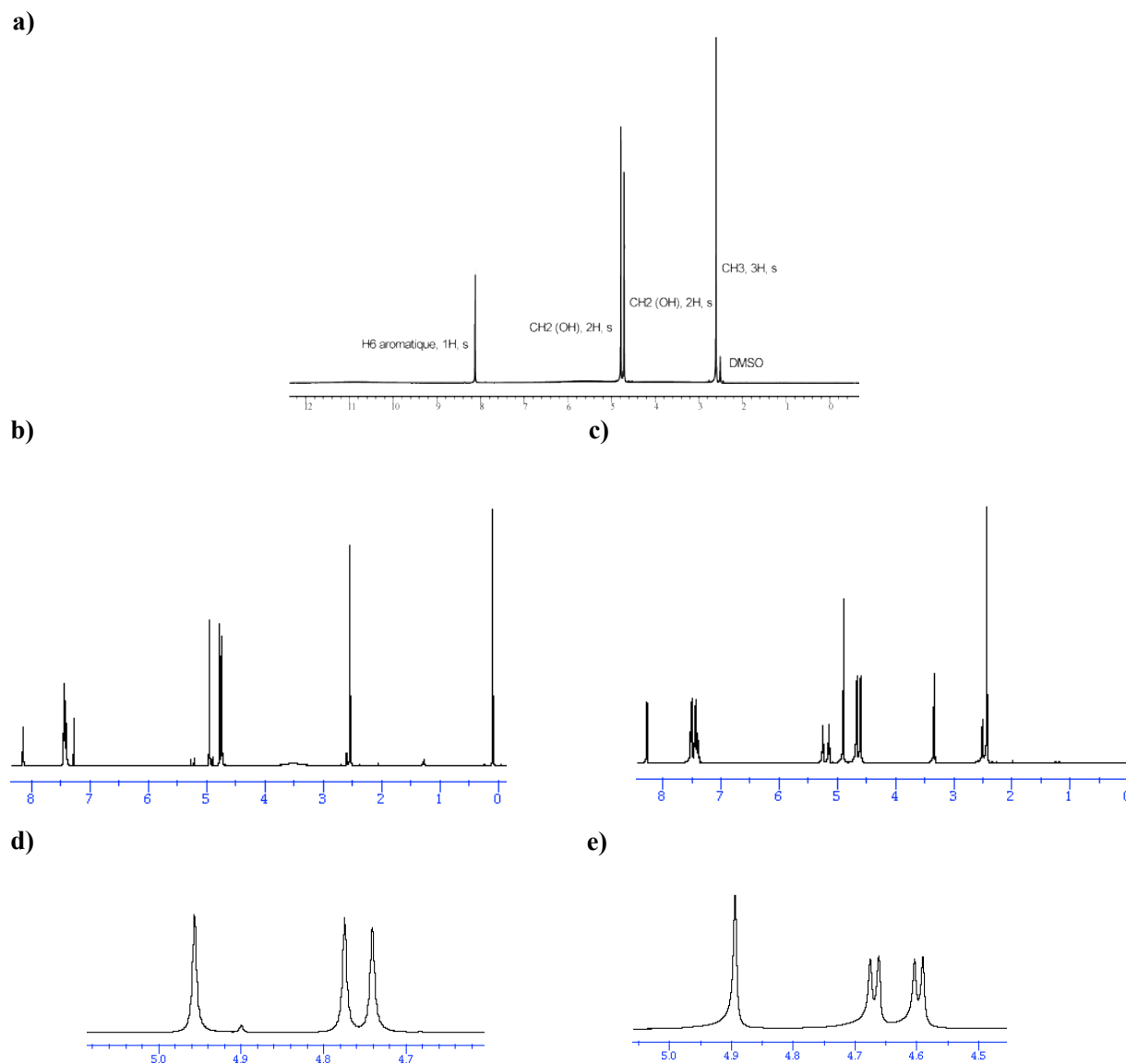
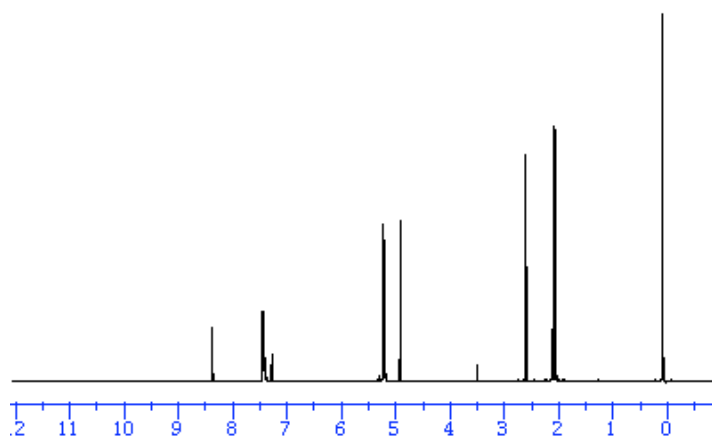


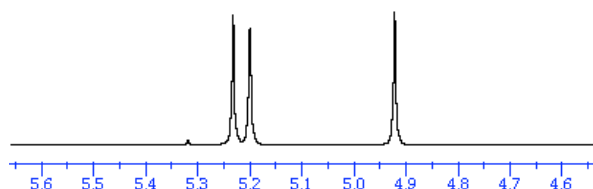
Figure 206 : Spectres RMN ^1H a) de la pyridoxine et b à e) du composé **30** après sa purification : b) dans le CDCl_3 , et c) dans le $\text{DMSO } d_6$; d) agrandissement du spectre b) dans la zone des CH_2 benzylques, et e) agrandissement du spectre c) dans la zone des CH_2 benzylques.

Les alcools libres du composé **30** sont ensuite acétylés suivant une procédure standard utilisant de l'anhydride acétique catalysé par de la DMAP (Figure 204). Cette réaction quasi-quantitative conduit au produit **31** purifié puis analysé par des méthodes classiques. La RMN ^1H de ce composé permet de vérifier l'acétylation des alcools benzylques, caractérisée par le déblindage des protons benzylques en position 4 et 5 et l'apparition de deux singlets aux alentours de 2 ppm, correspondants aux méthyles des deux groupements acétyles (Figure 207).

a)



b)



c)

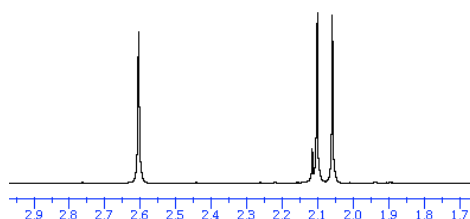


Figure 207 : Spectre RMN ^1H du composé **31** dans CDCl_3 : **a)** spectre entier ; **b)** agrandissement dans la zone des protons benzyliques ; **c)** agrandissement dans la zone des protons méthyliques.

La molécule **31** est ensuite dissoute dans de l'éthanol puis mélangée à 10 % en masse de palladium sur charbon avant d'être placée et agitée sous une atmosphère d'hydrogène pendant 2h à température ambiante (Figure 208). Le résidu, obtenu après filtration du milieu réactionnel sur célite et concentration sous pression réduite, est ensuite analysé par RP-HPLC analytique, spectroscopie de masse et RMN ^1H (Figure 209).

Le spectre RP-HPLC montre l'existence de quatre produits, plus hydrophiles que le produit de départ (**31**) dont le temps de rétention était proche de 21 min, et dont la masse la plus élevée est égale à 237, ce qui pourrait correspondre à la masse de la pyridoxine di-acétylée ayant perdu une fonction alcool en position benzylique (Figure 208b, structures du haut). Il n'y a cependant aucune trace du produit **32**, ce qui nous prouve la dégradation de la molécule au cours de l'hydrogénation catalytique.

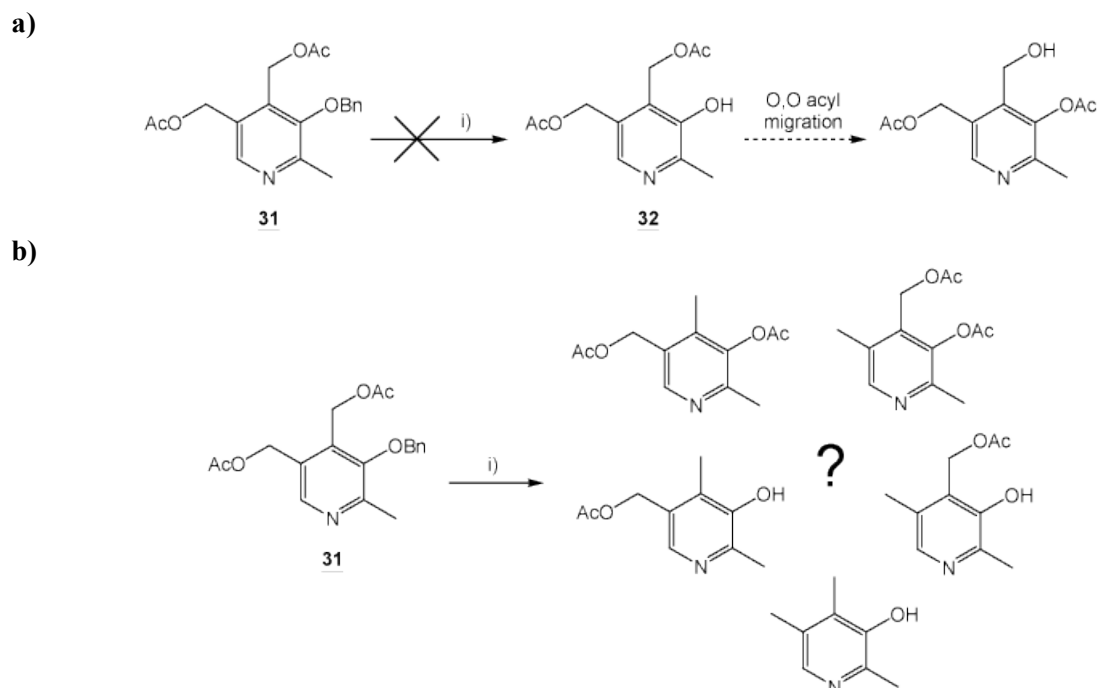


Figure 208 : **a)** Hydrogénation catalytique de la molécule **31** en vue de la déprotection de son alcool phénolique : *i)* 10 % en masse de Pd/C dans l'éthanol, en présence d'hydrogène (0.05 M, 2h, r.t.), devant conduire au composé **32** pouvant être sujet à une migration acylique intramoléculaire O→O entre l'ester en position 4' et le phénol en position 3 ; **b)** suggestion de quelques structures pouvant être obtenues par des réactions secondaires de l'hydrogénation catalytique *i)* du produit **31**.

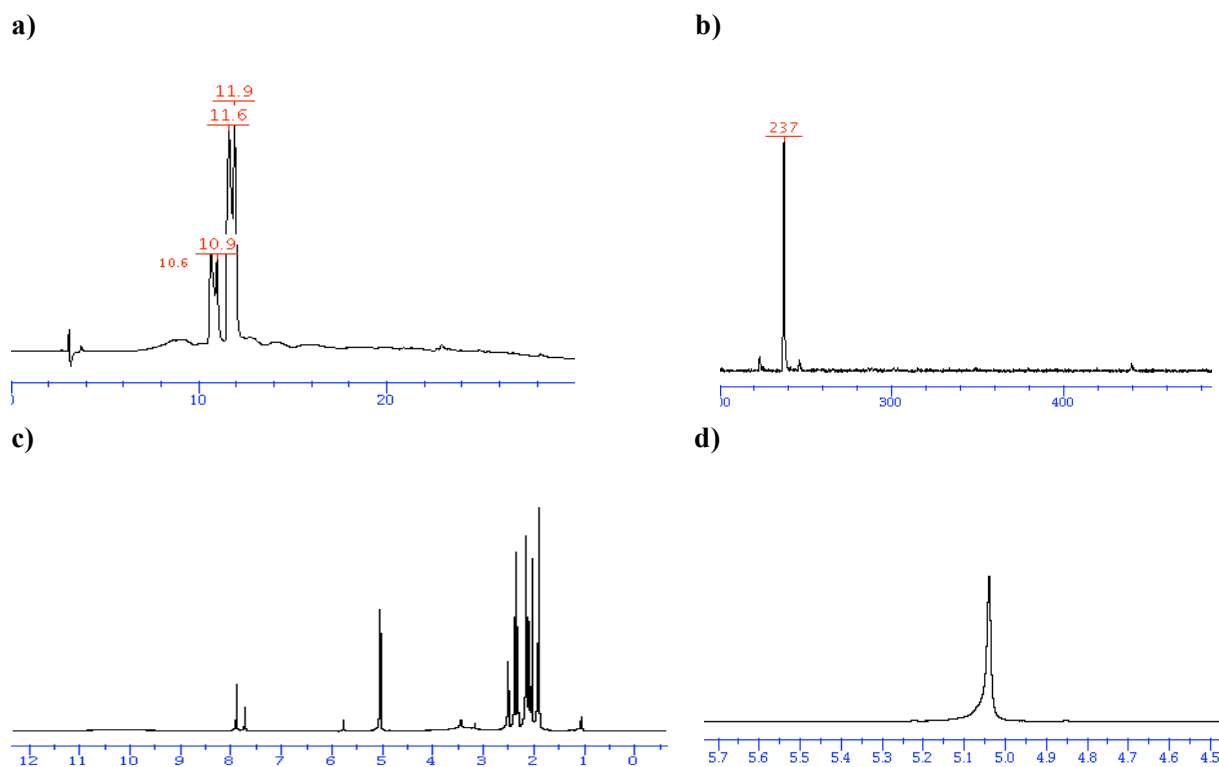


Figure 209 : Analyse chimique du brut issu de l'hydrogénation catalytique du composé **31** : **a)** par RP-HPLC analytique C₁₈ (0 à 100 % B en 30 min) ; **b)** par spectroscopie ESI-MS ; **c)** par RMN ¹H dans le DMSO d₆ ; **d)** agrandissement du spectre c) dans la zone des protons benzyliques.

L'étude du spectre RMN ^1H participe à l'élucidation de la nature des produits de cette dégradation (Figure 209c et d). Nous observons l'existence de plusieurs signaux dans la zone des méthyles déblindés, pouvant correspondre soit à des acétyles, soit à des méthyles aromatiques semblables à celui en position 2 du noyau pyridinique. Il y a conservation du signal émis par le proton H_6 vers 8 ppm, mais dans la zone des CH_2 benzyliques, nous ne voyons plus qu'un seul signal au lieu de deux, comme nous aurions pu nous y attendre si nous avions obtenu la molécule **32**.

Ces diverses analyses nous permettent donc de conclure que la molécule **31** s'est très certainement dégradée au niveau d'une de ses positions benzyliques, et qu'une partie du produit de départ s'est transformée de façon à conserver les deux acétyles, ce qui pourrait s'expliquer par l'existence d'une migration acylique intramoléculaire $\text{O} \rightarrow \text{O}$ déplaçant un acétyle sur le phénol, et qui se serait produite durant l'hydrogénation catalytique (Figure 208b).

D'une façon générale, il semble donc que le choix d'une protection clivable par hydrogénation catalytique ne soit pas compatible avec la stabilité de la vitamine B6 di-estérifiée. Il nous faut donc utiliser d'autres types de groupements protecteurs, tels que le Boc ou des groupes enzymolabiles, que nous placerons préférentiellement sur l'amine de la pyridoxamine, ce qui nous permettra de mieux contrôler et suivre la dernière étape de notre stratégie, à savoir la migration acylique intramoléculaire.

c. *Pyridoxamine*

Le groupe *tert*-butoxy carbonyle est la protection standard des amines primaires. Elles réagissent avec le carbonate de di-*tert*-butyle beaucoup plus rapidement que les alcools, ce qui va nous permettre de protéger sélectivement l'amine de la pyridoxamine sans avoir à masquer préalablement les fonctions hydroxyles de cette molécule (Figure 210). Ce groupement protecteur est clivé en présence de 40 % d'acide trifluoroacétique dans du dichlorométhane anhydre, ce qui devrait permettre de préserver les fonctions esters que nous auront alors placées sur les deux alcools de la pyridoxamine. Cette stratégie nous semble ainsi parfaitement adaptée à l'étude de la migration acylique appliquée à cette forme de la vitamine B₆.

Le dihydrochlorure de pyridoxamine réagit avec du dicarbonate de di-*tert*-butyle en présence de triéthylamine en solution dans du dichlorométhane anhydre pendant 7h à température ambiante et à l'abri de la lumière pour donner quantitativement la forme protégée **33** (Figure 210).

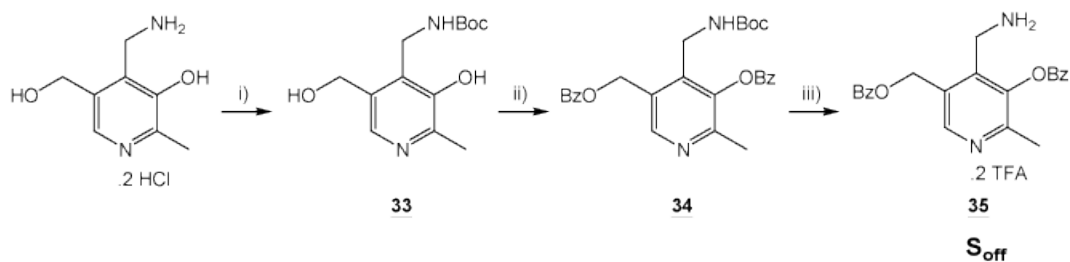


Figure 210 : Synthèse du « switch-peptide » **35** à l'état S_{off} : i) Boc_2O (1 eq.), TEA (2.2 eq.), DCM anhydre (0.1 M), 7h, r.t. ; rendement : quantitatif ; ii) BzCl (2 eq.), TEA (2.2 eq.), DCM anhydre (0.1 M) (argon, 3h30, 0°C à r.t.) ; évaporation; BzCl (1 eq.), TEA (6.7 eq.), DCM anhydre (0.1 M) (argon, 2h30, 0°C à r.t.) ; purification chromatographie sur gel de silice (20 % acétate d'éthyle dans le *n*-hexane) ; rendement : 75 % (2 étapes) ; iii) 40 % TFA dans le DCM anhydre (0.1 M) (argon, 1h30, r.t.) ; rendement : quantitatif.

Les deux alcools de la pyridoxamine protégée **33** réagissent alors avec du chlorure de benzoyle en présence de triéthylamine et de dichlorométhane anhydre pour former les esters correspondants (molécule **34**, Figure 210). Un premier essai avec deux équivalents de chlorure d'acyle donne une réaction incomplète après 3h30 d'agitation. L'estérification est donc relancée avec un équivalent de chlorure de benzoyle puis elle est arrêtée au bout de 2h30 par une addition de méthanol qui permet de consommer les dernières traces de chlorure d'acyle n'ayant pas encore réagi. Le composé **34** est obtenu avec un rendement de 75 % pour les deux premières étapes de cette synthèse après purification par chromatographie sur gel de silice. Son amine est ensuite déprotégée avec une solution de 40 % de TFA dans le dichlorométhane anhydre en 1h30. Ce traitement est orthogonal avec la présence des esters benzoïques sur la molécule, nous n'observons pas de produits d'hydrolyse au cours de cette réaction. Le mélange réactionnel est alors concentré sous pression réduite, le produit **35**, correspondant à l'état S_{off} , étant alors caractérisé par RP-HPLC analytique et spectroscopie de masse (Figure 211).

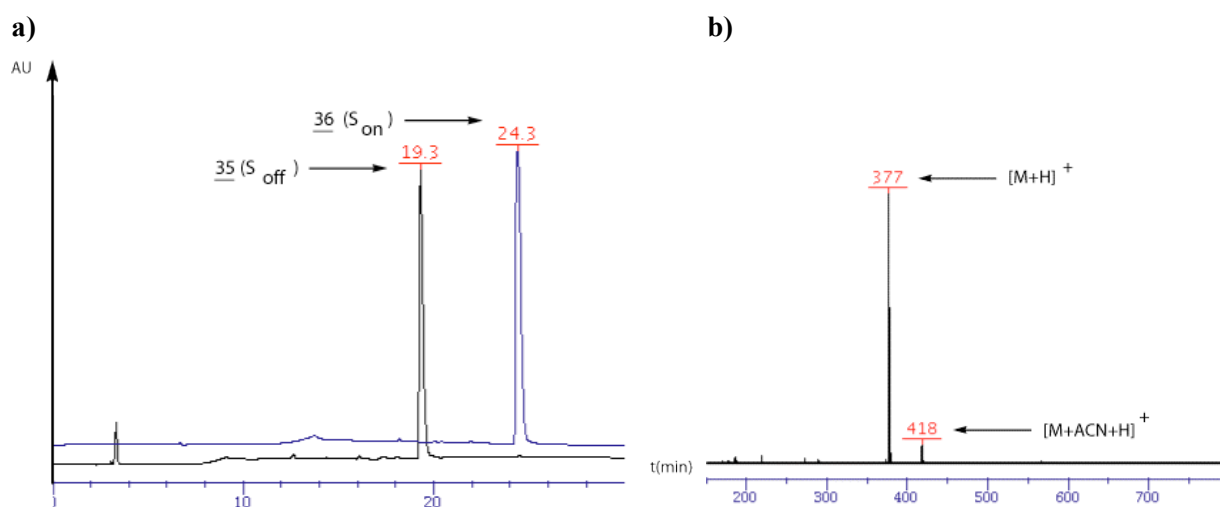


Figure 211 : Caractérisation, par **a)** RP-HPLC analytique C_{18} (gradient : 0 à 100 % B en 30 min) et **b)** spectroscopie ESI-MS, des produits **35** et **36**, correspondants respectivement à l'état S_{off} et S_{on} de la même molécule.

Cependant, deux co-évaporations de l'huile résiduelle contenant la molécule **35** avec de l'éther diéthylique suffisent à déclencher la migration acylique intramoléculaire O→N et à donner quantitativement le produit **36**, correspondant à l'état S_{on} (Figure 211, Figure 212). Une analyse du produit brut après les co-évaporations à l'éther par RMN ¹H nous permet en effet de certifier la nature de la molécule **36**, caractérisée notamment par un triplet à 9.5 ppm, confirmant l'implication du proton de l'amide dans un couplage avec deux protons voisins, localisés sur le carbone benzylique rattaché à l'azote de la pyridoxamine, se signalant à leur tour sous la forme d'un doublet à 4.74 ppm (Figure 213b, e et f).

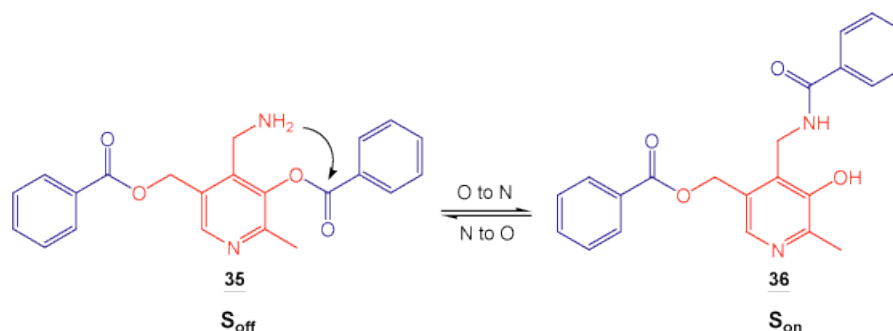


Figure 212 : Migration acylique intramoléculaire appliquée à la pyridoxamine di-benzoylée : O→N = passage de l'état S_{off} (molécule **35**) à l'état S_{on} (molécule **36**) : pH neutre ; N→O = passage de l'état S_{on} à l'état S_{off} : ACN saturé en HCl (0.12 M, tamis moléculaire, argon, 1 jour et 17h, r.t).

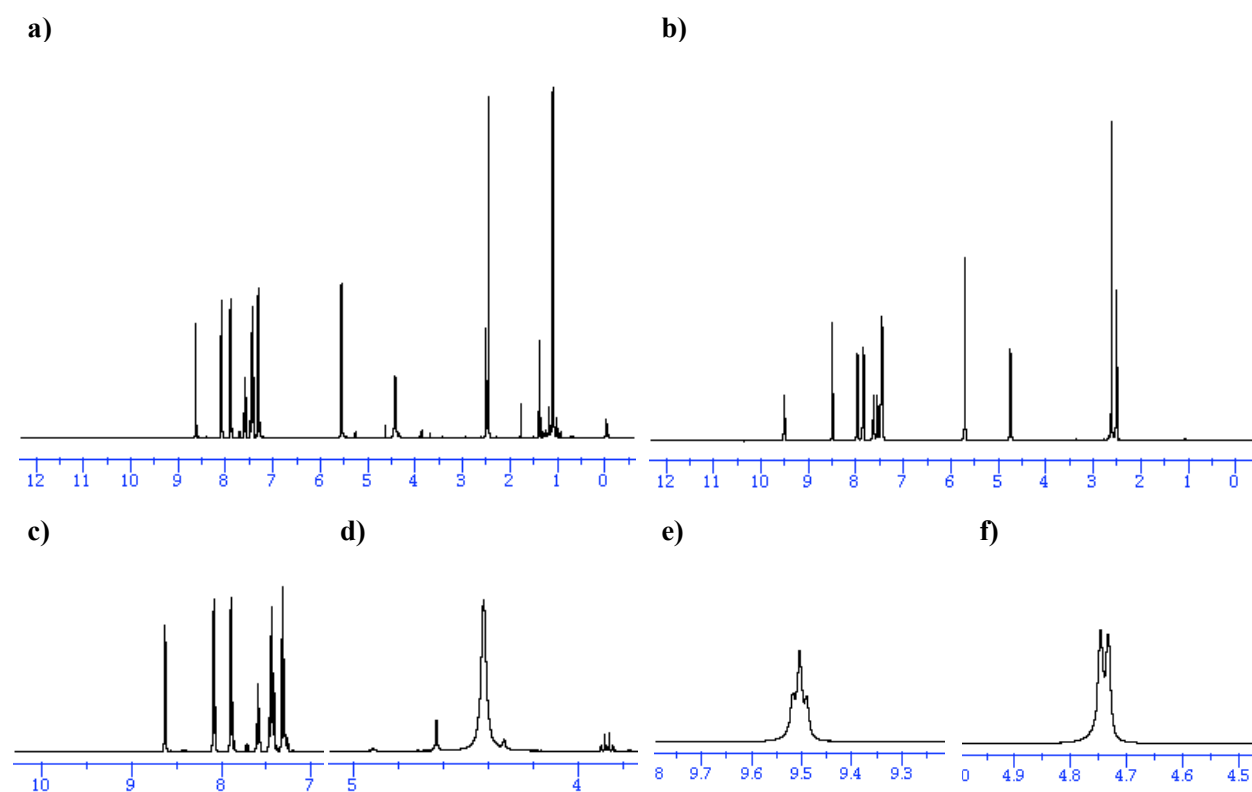


Figure 213 : Caractérisation, par RMN ¹H (DMSO d₆), **a**) du dérivé de pyridoxamine à l'état S_{off} (molécule **35**) et **b**) à l'état S_{on} (molécule **36**) ; agrandissements : **c**) dans la zone des protons aromatiques (spectre **a**) : pas de proton amide ; **d**) dans la zone des CH₂ benzyliques (spectre **a**) : singulet du CH₂-N ; **e**) dans la zone des NH (spectre **b**) : triplet du NH amide ; **f**) dans la zone des CH₂ benzyliques (spectre **b**) : doublet du CH₂-N.

Ce transfert acylique se révèle donc être relativement rapide et difficile à maîtriser. Afin de confirmer cependant la structure de la molécule **35** juste après la déprotection son amine, un nouveau test de clivage du Boc est réalisé, dans un tube RMN, sur un aliquot du composé **34** avec 50 % de TFA deutéré dans du DMSO d_6 , de façon à caractériser le produit dès sa formation, soit après 30 min à température ambiante (Figure 213a, c et d). L'absence d'un signal correspondant à un proton NH amide et la présence d'un singulet émis par les protons benzyliques liés à l'amine primaire nous permettent ainsi d'affirmer que nous obtenons bien la forme S_{off} désirée après le clivage du Boc.

Qui plus est, le traitement de la molécule **36** (état S_{on}) avec une solution d'acétonitrile saturée en acide chlorhydrique sous argon, sur tamis moléculaire et à température ambiante, permet de restaurer la structure de départ, correspondant au composé **35**, via une migration acylique intramoléculaire $N \rightarrow O$ (Figure 214). Cette réaction nous permet ainsi de retrouver, si besoin est, la molécule à l'état S_{off} .

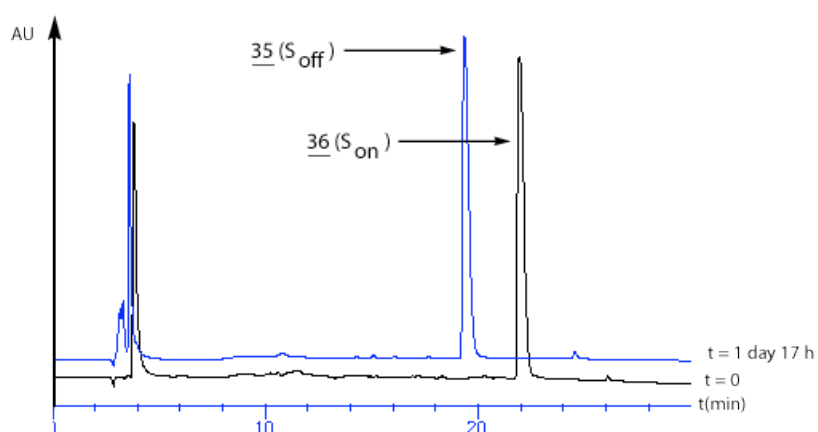


Figure 214 : Suivi, par RP-HPLC analytique C_{18} (gradient : 0 à 100 % B en 30 min) de la migration acylique intramoléculaire $N \rightarrow O$ de la molécule **36**, donnant quantitativement la molécule **35** après 1 jour et 17h.

Vu la rapidité de sa migration acylique intramoléculaire $O \rightarrow N$, la molécule **35** aura donc peu de temps pour se mélanger parfaitement au peptide amyloïde et interagir avec lui à l'état S_{off} . Elle agira donc principalement, voire exclusivement, sous la forme qu'elle adoptera à l'état S_{on} , c'est-à-dire en tant que composé **36**. Il est donc important de connaître la stabilité du produit **36** dans des conditions physiologiques pour pouvoir estimer la labilité de sa liaison ester.

Pour cela, nous réalisons une étude du comportement de la molécule **36** en solution dans différents solvants ou solutions tampon à température ambiante. La composition du mélange correspondant à différents instants est ensuite déterminée par RP-HPLC analytique C_{18} et spectroscopie de masse, les résultats de ce travail étant résumés dans le Tableau 28. Cela nous permet de constater que la molécule est stable au cours des 12 premiers jours et que la liaison ester n'est que partiellement hydrolysée après 27

jours d'agitation à température ambiante. La stabilité de cette molécule est donc suffisante pour que nous puissions tester son activité inhibitrice au cours de la fibrillogénèse de l'amyloïde β .

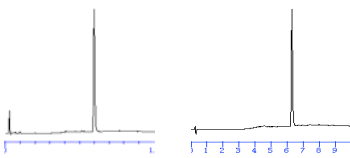
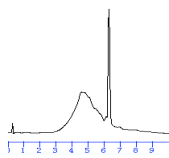
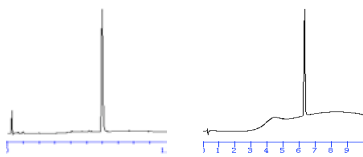
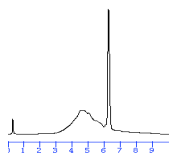
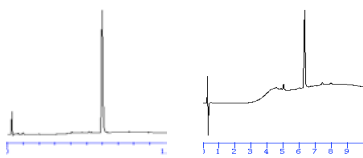
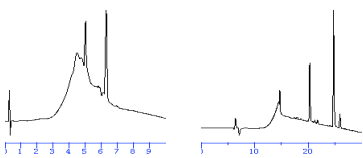
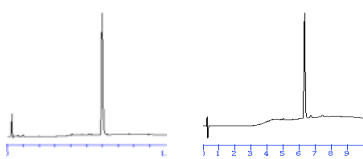
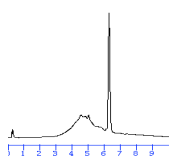
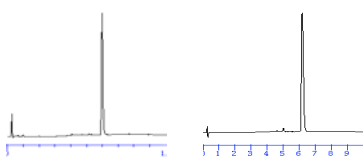
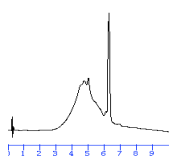
Echantillon	Solvants	Produit stable	Hydrolyse partielle
36S1	MeOH	Entre 0 et 12 jours	Après 27 jours
			
36S2	ACN	Entre 0 et 12 jours	Après 27 jours
			
36S3	PBS (0.1 M, pH 7.02) + MeOH	Entre 0 et 12 jours	Après 27 jours et 130 jours
			
36S4	PBS (0.1 M, pH 7.02) + ACN	Entre 0 et 12 jours	Après 27 jours
			
36S5	PBS (0.1 M, pH 8.0) + ACN	Entre 0 et 12 jours	Après 27 jours
			

Tableau 28 : Etude de la stabilité de la molécule **36** dans différentes solutions, à différents pH et à température ambiante ; analyse par RP-HPLC analytique sur une colonne C_{18} (gradient : 0 à 100 % B en 10 ou 30 min).

Nous avons ensuite préparé deux échantillons contenant le composé **36**, mélangé au peptide $A\beta(13.23)$ (**4**) avec un rapport 1 : 1 (échantillon **36S6**) ou en large excès (rapport 10 : 1, échantillon **36S7**), afin d'étudier son comportement en microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle ainsi

qu'en microscopie optique après coloration au rouge Congo, et de déterminer l'influence de ce « switch-peptide » sur la fibrillogénèse de l'amyloïde β (Tableau 29).

Composé	Echantillon	Concentration peptidique	Rapport <u>36/4</u>
<u>36</u> + <u>4</u>	<u>36S6</u>	400 μ M / 400 μ M	1 : 1
<u>36</u> + <u>4</u>	<u>36S7</u>	4 mM / 400 μ M	10 : 1

Tableau 29 : Liste des différents échantillons contenant le « switch-peptide » à l'état S_{on} 36.

La molécule 36, en mélange équimolaire avec l'amyloïde β (échantillon 36S6) a tendance à précipiter petit à petit hors de la solution tampon pour former des aiguilles regroupées en pelottes et apparaissant bleues ou noires sous une lumière polarisée après coloration au rouge Congo (Figure 215). Nous n'observons dans ces conditions que très peu de fibrilles, sous forme de points verts en lumière polarisée après huit jours d'incubation à température ambiante et une coloration au rouge Congo.

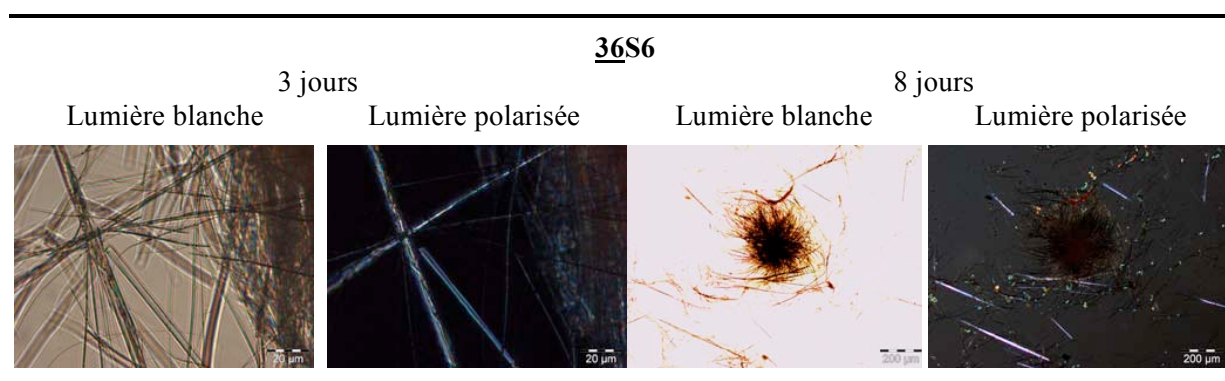


Figure 215 : Suivi de l'échantillon 36S6 par microscopie optique après coloration au rouge Congo.

Une fois mélangé avec un excès de dix équivalents par rapport à l'A β (13-23) (4), le « switch-peptide » 36 dérivé de la vitamine B₆ dans son état S_{on} ralentit fortement la formation de fibrilles au-delà de quatre jours, comme nous pouvons le constater par microscopie électronique, la coloration au rouge Congo mettant en évidence quelques fibrilles courtes et disparates commençant à se former après huit jours d'incubation à température ambiante (Figure 216).

La molécule 36 fait donc preuve d'un certain potentiel en tant qu'inhibiteur de la fibrillogénèse de l'amyloïde β . L'intérêt pour ce type de composés grandit encore par le fait que le composé testé ne contient pas encore la séquence de reconnaissance de l'amyloïde β . Nous avons donc bon espoir de pouvoir un jour utiliser ces « switch-peptides » avec élément « switch » inducteur de coude dans un but médicinal, et ce malgré la nécessité de quelques améliorations techniques visant à mieux contrôler la

migration acylique intramoléculaire O→N et à insérer la séquence de reconnaissance de l'amyloïde β dans la structure de ces inhibiteurs potentiels.

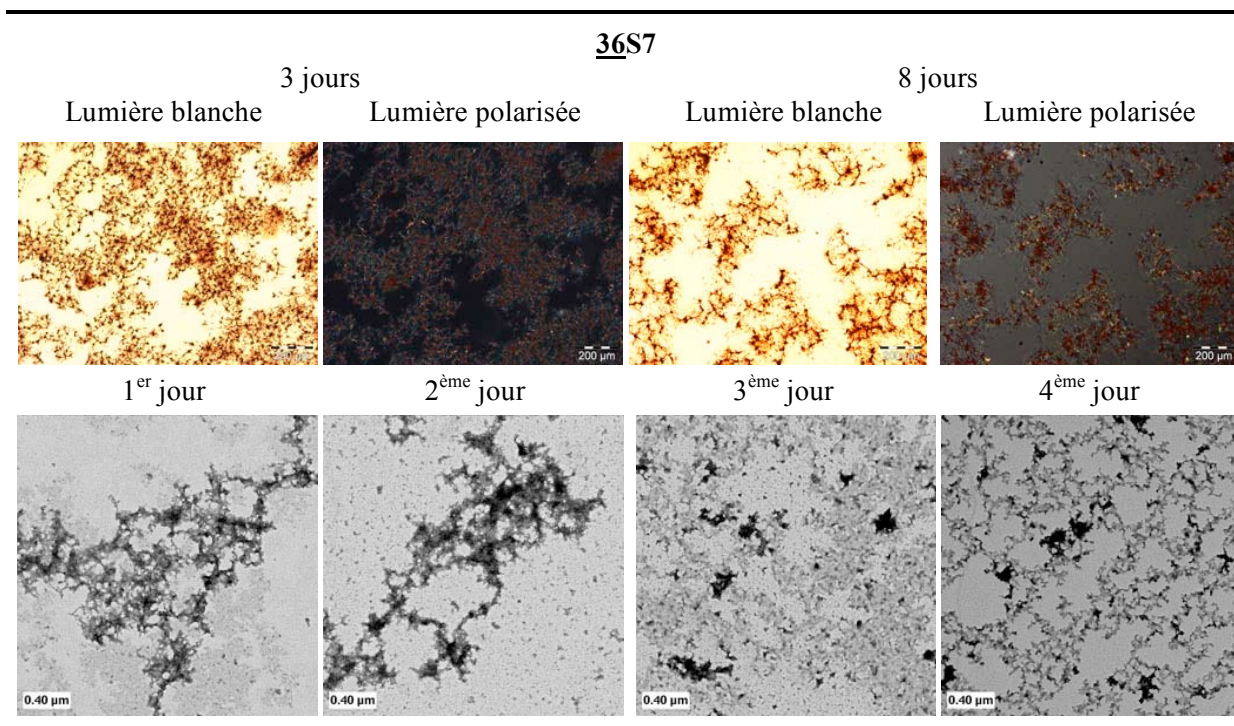


Figure 216 : Suivi de l'échantillon **36S7** par microscopie optique après coloration au rouge Congo (en haut) et par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (en bas).

L'utilisation d'un groupement enzymolabile sur l'amine primaire de la pyridoxamine se présente comme étant une alternative de choix pour ralentir la migration acylique intramoléculaire O→N et permettre à la molécule à l'état S_{off} de se mêler au peptide amyloïde avant de se réarranger, puis de former une structure en forme de coude et de détruire les feuillets β en formation.

Parmi les enzymes fonctionnant à pH 7, la trypsine est une endopeptidase isolée du pancréas bovin clivant spécifiquement les liaisons peptidiques impliquant le carbonyle d'une lysine ou d'une arginine et dont l'activité optimale se situe à un pH compris entre 7 et 9²⁹.

Nous avons ainsi choisi de coupler une arginine, fortement solubilisante, à l'amine primaire de la pyridoxamine, en faisant réagir dans une première étape du Boc-Arg(Boc₂)-OH sur le sel de la vitamine B₆ correspondant en présence de PyBOP, conduisant au composé **37** (Figure 217).

Les deux alcools libres de cette molécule sont ensuite benzoylés avec du chlorure de benzoyle pour donner le produit **38** dont les groupements Boc sont clivés avec une solution de 40 % de TFA dans le dichlorométhane anhydre, ce qui nous permet d'obtenir le « switch-peptide » **39** correspondant à l'état S_{off} , l'amine étant protégée par une simple arginine.

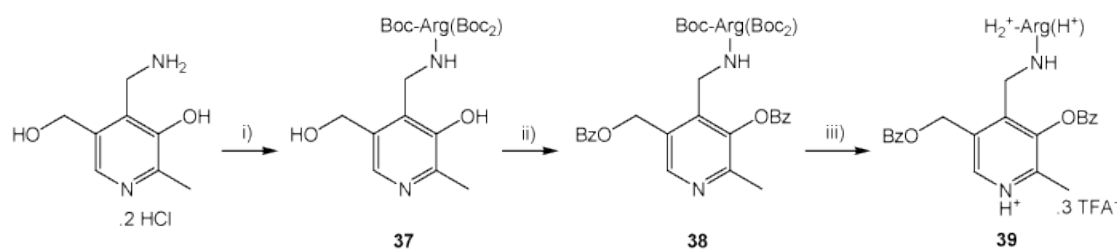


Figure 217 : Synthèse du « switch-peptide » **39** bloqué à l'état S_{off} par une arginine : i) couplage peptidique : Boc-Arg(Boc₂)-OH (1 eq.), PyBOP (1 eq.), DIPEA (4 eq.), DCM anhydre (0.1 M) (argon, 2h, r.t.) ; purification par colonne chromatographique sur gel de silice (80 % AcOEt/n-hexane) ; rendement : 89 % ; ii) benzylation : BzCl (2 eq.), TEA (2 eq.), DCM anhydre (0.1 M) (argon, 1h20, 0°C puis r.t.) ; purification par chromatographie sur gel de silice (50 % AcOEt/n-hexane) ; rendement : 96 % ; iii) déprotection des amines de l'arginine : 40 % TFA/DCM anhydre (0.06 M) (argon, 3h, r.t.) ; purification par précipitation dans l'éther froid ; rendement : 68 %.

Ce composé est alors mélangé à de la trypsine dans une solution tampon à différents pH et températures, le clivage enzymatique et la migration acylique intramolécule $O \rightarrow N$ consécutive étant suivi par RP-HPLC analytique et spectroscopie de masse (Figure 218, Figure 219, Figure 220).

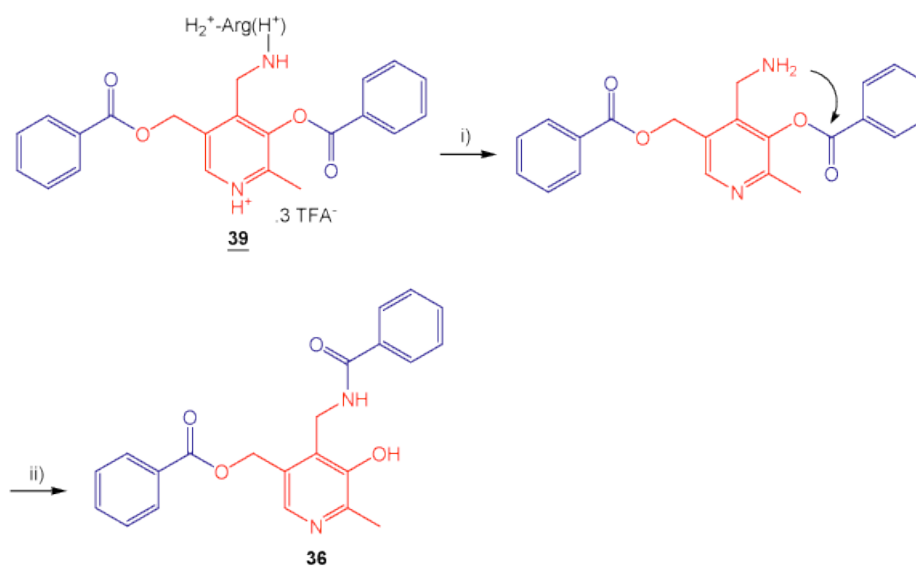


Figure 218 : i) Clivage enzymatique de la liaison peptidique entre l'arginine et l'amine du noyau pyridoxamine de la molécule **39** par la trypsine, suivi par ii) une migration acylique intramolécule $O \rightarrow N$, conduisant au composé **36** correspondant à l'état S_{off} .

Dans les deux figures présentées ici (Figure 219 et Figure 220), nous observons la disparition du pic correspondant au composé **39** à l'état S_{off} , protégé par l'arginine, cependant nous ne voyons pas l'apparition du pic correspondant au produit désiré **36**, caractérisé par un état S_{on} après le clivage de l'arginine par la trypsine.

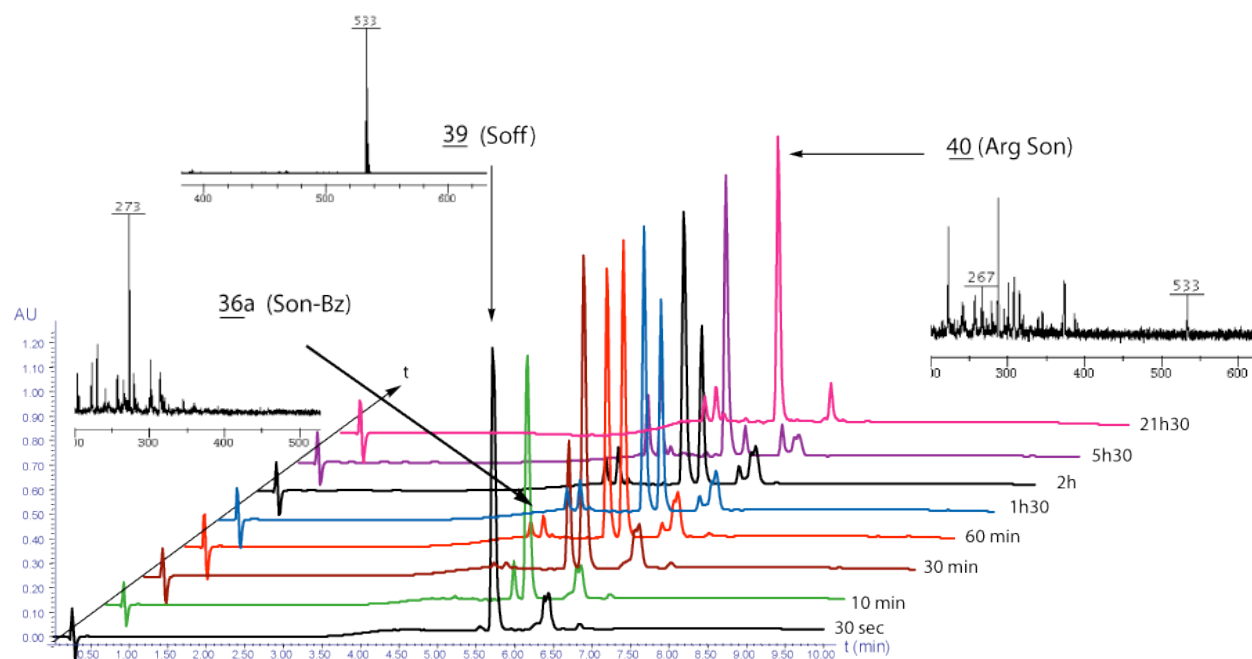


Figure 219 : Etude, par RP-HPLC analytique sur une colonne C_{18} (gradient : 0 à 100 % B en 10 min) et spectroscopie ESI-MS, de la cinétique du clivage enzymatique par la trypsine suivi du réarrangement acylique intramoléculaire $O \rightarrow N$ pour le composé **39** à température ambiante et pH 7.02 : nous observons la disparition du pic correspondant au produit S_{off} (**39**), la formation d'un produit secondaire **40** et celle du composé S_{on} hydrolysé (**36a**).

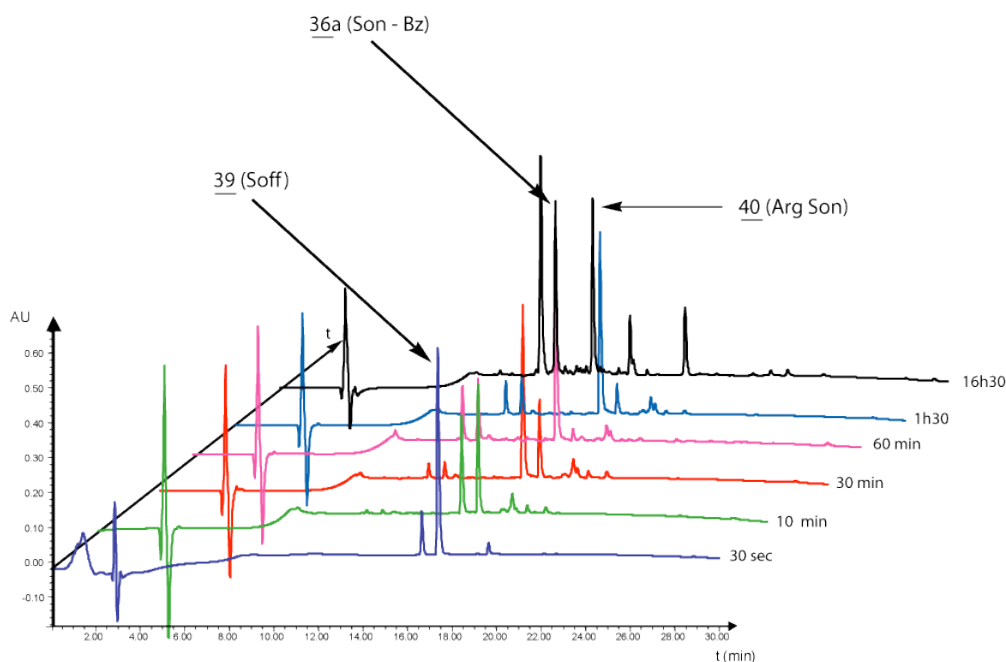


Figure 220 : Etude, par RP-HPLC analytique sur une colonne C_{18} (gradient : 0 à 100 % B en 10 min), de la cinétique du clivage enzymatique par la trypsine suivi du réarrangement acylique intramoléculaire $O \rightarrow N$ pour le composé **39** à 37°C et pH 7.42 : nous observons la disparition du pic correspondant au produit S_{off} (**39**), la formation d'un produit secondaire **40** et celle du composé S_{on} hydrolysé (**36a**).

A la place, deux autres pics apparaissent, le plus hydrophobe, désigné comme étant le composé **40**, ayant la même masse que le produit de départ, et le plus hydrophile concordant avec la masse du produit à l'état S_{on} dont l'ester serait hydrolysé (composé **36a**). L'augmentation simultanée du pH et de la température permet, comme nous pouvons le constater en comparant ces deux figures, d'augmenter les cinétiques de clivage enzymatique, réarrangement, dégradation, et hydrolyse de l'ester.

Mais revenons-en au mécanisme théorique de la réaction d'hydrolyse enzymatique et de réarrangement acylique intramoléculeire $O \rightarrow N$ pour le « switch-peptide » **39** (Figure 221). Dans une première étape (i, Figure 221), l'arginine devrait être clivée par la trypsine, puis l'amine libre de la pyridoxamine se trouverait engagée avec l'ester phénolique dans un cycle à six membres favorisés conduisant à une migration acylique intramoléculeire $O \rightarrow N$ (étape ii, Figure 221) et donnant la structure désirée **36**. La présence du composé **36a** pourrait s'expliquer par la rupture de la liaison entre le carbonyle et l'oxygène en position benzylique (voie vii, Figure 221), cependant, une étude précédente nous a démontré la stabilité de cet ester en solution aqueuse (Tableau 28), tandis que ce mécanisme devrait nous permettre de visualiser momentanément le composé **36** sur les spectres obtenus par RP-HPLC analytique et spectroscopie de masse, ce qui n'est pas le cas.

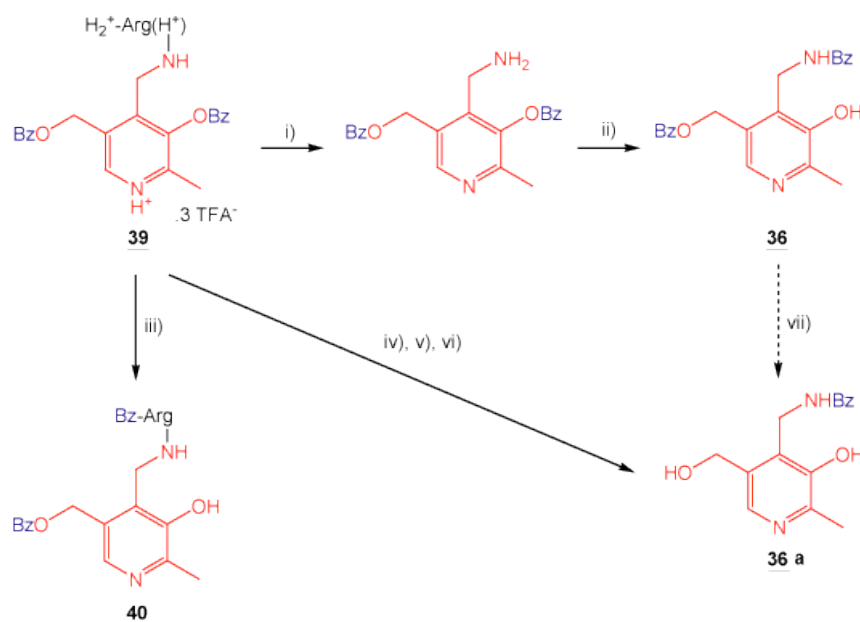


Figure 221 : Schéma réactionnel des réactions se produisant en même temps que la dégradation enzymatique suivie de la migration acylique $O \rightarrow N$: i) clivage de l'arginine par la trypsine ; ii) réarrangement acylique intramoléculeire $O \rightarrow N$ (composé **36**) ; iii) migration acylique intramoléculeire $O \rightarrow N$ du benzoyle en position phénolique sur l'amine N-terminale de l'arginine (composé **40**) ; iv) hydrolyse de l'ester en position phénolique ; v) clivage enzymatique ; vi) migration acylique intramoléculeire $O \rightarrow N$ du benzoyle en position benzylique sur l'amine de la pyridoxamine (composé **36a**) ; vii) hydrolyse de l'ester, peu probable si nous considérons l'étude de la stabilité du composé **36** réalisée précédemment.

Il existe cependant une autre possibilité pour obtenir le produit **36a** sans passer par la synthèse de la molécule **36** (voie iv, v et vi, Figure 221). Dans ce cas, l'ester phénolique, labile, s'hydrolyserait (étape iv, Figure 221) avant que la trypsine ne clive l'arginine (étape v, Figure 221), puis l'amine libre s'investirait dans un cycle à sept membres avec l'ester en position benzylique, conduisant au transfert acylique du benzoyle sur cette amine et à la formation du composé **36a** (étape vi, Figure 221). Ce mécanisme coïncide alors parfaitement avec les données obtenues précédemment. Il est donc très fortement probable que la molécule **39** réagit ainsi dans ces conditions expérimentales, ce qui n'explique pas encore la formation du composé **40**, caractérisé par une masse identique à celle du produit de départ.

D'après les spectres RP-HPLC obtenus ici, il semblerait que la voie empruntée principalement par le composé **39** conduise au produit **40**, qui pourrait correspondre à un réarrangement intramoléculaire de la molécule de départ. Cette dernière est composée d'un ester benzylique relativement stable, d'un ester phénolique réactif et d'une arginine dont l'amine N-terminale est déprotégée. Nous pouvons alors imaginer l'existence d'une migration acylique intramoléculaire O→N du benzoyle entre la position phénolique et l'amine α de l'arginine. Nous avons effectivement vu dans le Chapitre 3 de l'Introduction que les transferts acyliques intramoléculaires pouvaient s'étendre à des intermédiaires contenant 9 et 12 membres¹⁰⁴. Il est possible que nous ayons ici un exemple pratique de ce type de réaction.

Afin de confirmer cette théorie, nous allons étudier le comportement du composé **39** lorsqu'il est dissout à température ambiante dans une solution tampon à pH 7.02, ces conditions étant similaires à celles utilisées pour la première expérience de clivage enzymatique de ce composé par la trypsine (Figure 219, Figure 222).

Les spectres RP-HPLC obtenus au cours de cette étude nous montrent la disparition du pic correspondant au produit **39** (état S_{off}) et l'apparition du pic correspondant au composé **40**, sans autre signe de dégradation.

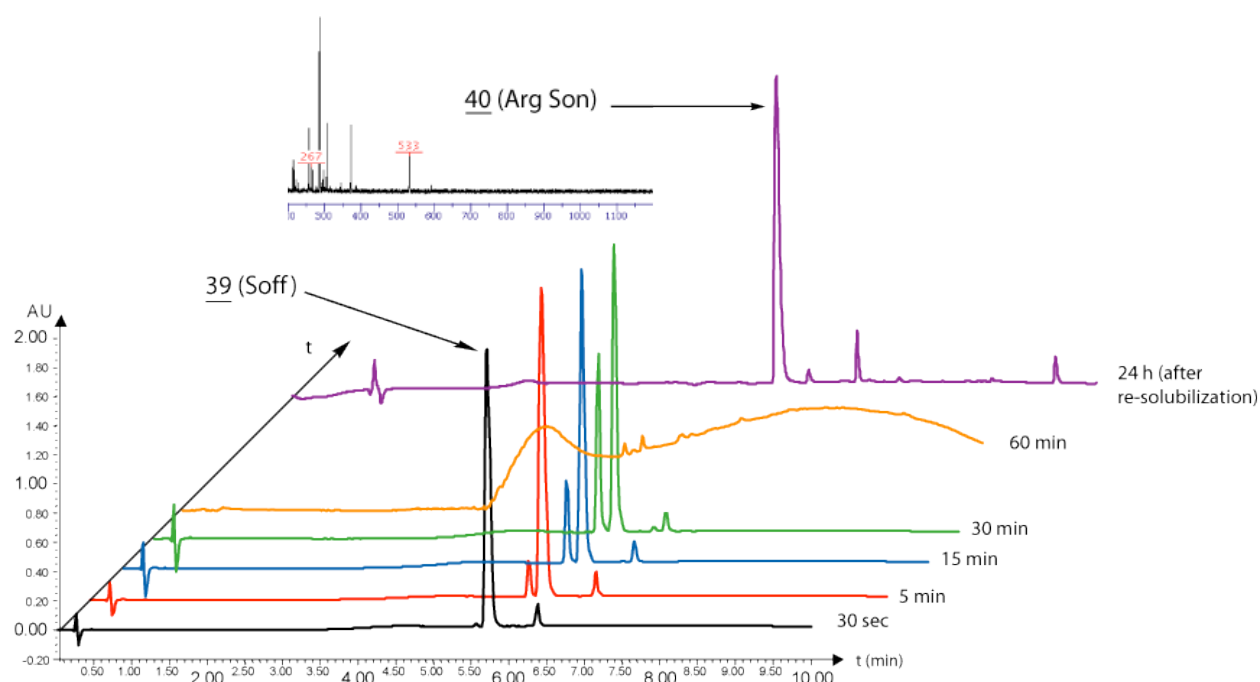


Figure 222 : Etude de la cinétique du réarrangement acylique $O \rightarrow N$ pour le « switch-peptide » **39**, donnant, à température ambiante et à pH 7.02, le composé **40**, avec un temps de demi-vie de 50 min ; suivi par RP-HPLC C_{18} analytique (gradient : 0 à 100 % B en 10 min).

Le produit **40** est alors analysé par RMN 1H afin de définir sa structure primaire (Figure 223). Un agrandissement dans la zone des protons amides montre tout d'abord que l'amine de la pyridoxamine est toujours impliquée dans une liaison peptidique avec le carbonyle de l'arginine (triplet à 9.1 ppm, Figure 223a), et qu'il existe un autre proton amide, celui de l'amine terminale de l'arginine, qui se retrouve coupler à un benzoyle (doublet à 8.67 ppm, dû au couplage du NH avec le H_α de l'arginine, Figure 223b). Enfin, un agrandissement dans la zone des protons benzyliques montrent que ceux qui sont rattachés à l'oxygène de la pyridoxamine sont toujours voisins d'un ester, comme le prouve le déblindage du singulet correspondant (Figure 223c), beaucoup moins important que s'ils étaient directement connectés à un hydroxyle (cas de la molécule **37**, Figure 223d). Le composé **40** correspond donc bien à la migration acylique intramoléculaire $O \rightarrow N$ du benzoyl en position phénolique sur l'amine terminale de l'arginine *via* un cycle intermédiaire à 9 membres (Figure 221).

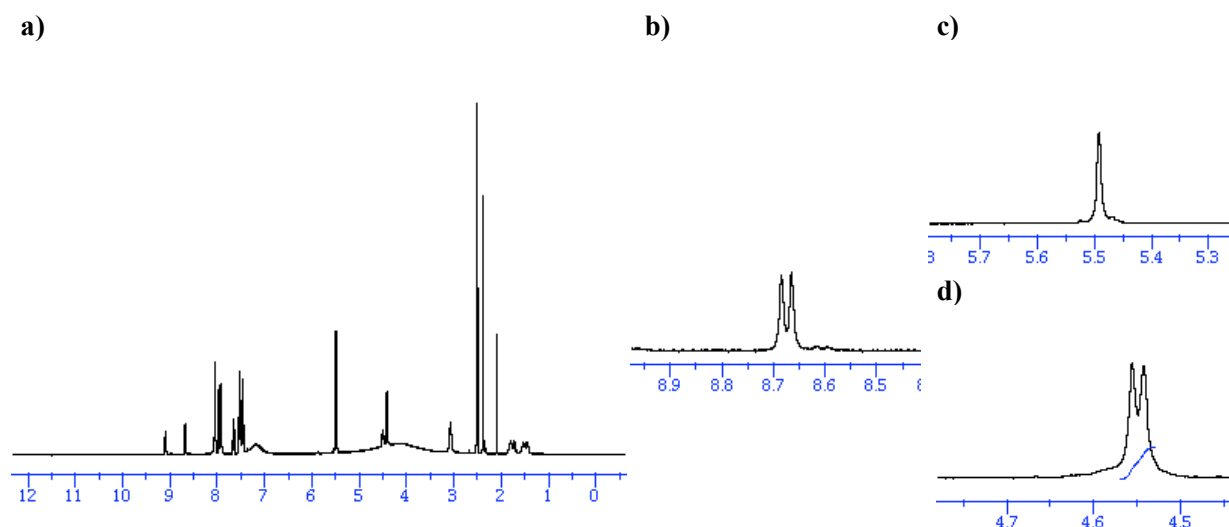


Figure 223 : Analyse de la structure du composé **40** par RMN ^1H dans le DMSO d_6 : **a)** vue d'ensemble du spectre obtenu ; **b)** agrandissement dans la zone des protons amides, montrant le signal émis par le proton de l'azote N-terminal de l'arginine couplé au proton H_α de cette même arginine ; **c)** et **d)** comparaison des signaux émis par les protons benzyliques du noyau pyridoxamine attachés à l'oxygène respectivement dans le cas du composé **40** et celui du composé **37** (formation d'un doublet dû au couplage entre ces protons et celui porté par le groupe OH) : le déblindage des protons du produit **40** prouvent que l'oxygène dont ils sont voisins est impliqué dans une liaison ester.

Le temps de demi-vie de ce transfert acylique peut alors calculer à partir des données collectées lors du suivi de cette cinétique de premier ordre par RP-HPLC analytique. Cela nous donne une valeur de 50 min pour un pH de 7.02 à température ambiante.

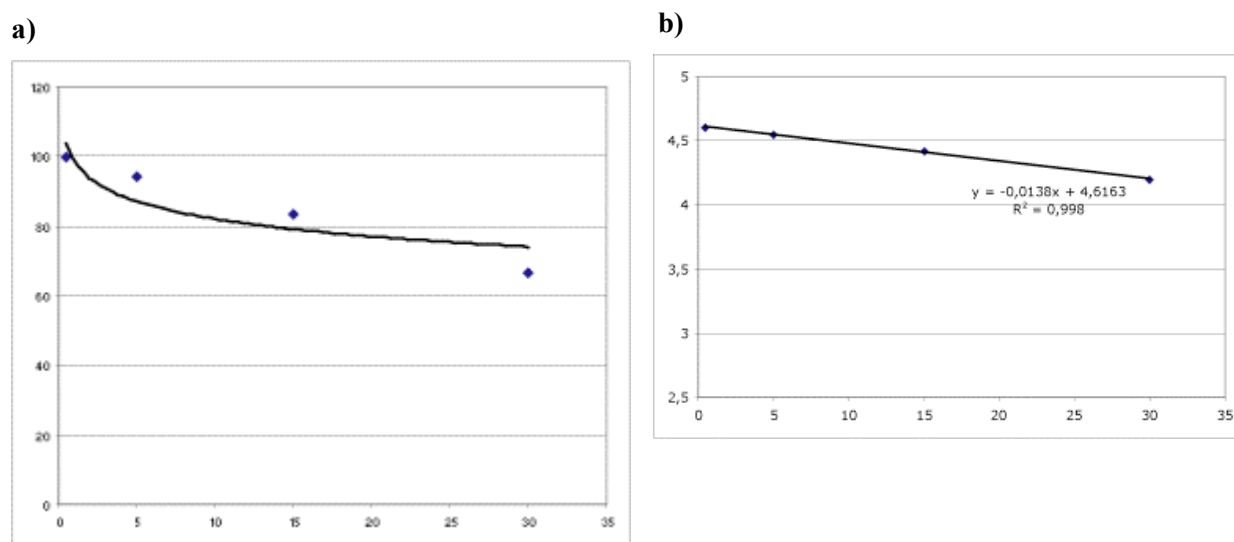


Figure 224 : Etude de la cinétique du réarrangement acylique $\text{O} \rightarrow \text{N}$ du composé **39** donnant la molécule **40** : **a)** courbe représentative de la disparition du produit à l'état S_{off} (**39**) en fonction du temps, à température ambiante et pH 7.02 ; **b)** cinétique de premier ordre donnant le temps de demi-vie égal à 50 min.

Cette migration acylique intramoléculaire est donc extrêmement lente par rapport à celle qui existe entre le phénol et l'amine de la pyridoxamine (composé **35**), phénomène qui s'explique par l'existence de cet intermédiaire cyclique à neuf membres, beaucoup moins favorable que l'intermédiaire cyclique à six membres présent pour le composé **35**.

Les premiers résultats concernant les « switch-peptides » intégrant un élément « switch » inducteur de coude dérivé d'une molécule naturelle, la vitamine B₆, sont positifs. Au cours de ce paragraphe, nous avons effectivement démontré la faisabilité d'une migration acylique intramoléculaire O→N, voire même O→O, pour ce type de composés, passant par des intermédiaires cycliques à 6, 7 et même 9 membres (composés **31**, **35** et **39**). L'utilisation de groupements protecteurs hydrogénables n'est pas recommandée lorsque la molécule comporte d'autres positions benzyliques pouvant être dégradées au cours de l'hydrogénation catalytique, tandis que le Boc n'oppose aucune difficultés. L'emploi d'une arginine clivable par une enzyme, la trypsine, peut cependant conduire à une migration acylique intramoléculaire sur l'amine terminale de cet acide aminé pouvant entrer en forte concurrence avec la déprotection de l'amine voulue. Nous avons aussi mis en évidence l'existence d'une certaine activité inhibitrice de l'un de ces composés à l'état S_{on}, bien qu'il n'ait pas contenu de séquence de reconnaissance amyloïde (composé **36**).

Il nous reste cependant quelques modifications à apporter dans le design de ce type de molécules afin de mieux contrôler la vitesse de transfert acylique et la stabilité du produit à l'état S_{off}. L'insertion d'une fonction carboxylique pourrait aussi permettre de fixer la séquence de reconnaissance amyloïde sur l'élément « switch » et rendre l'inhibiteur correspondant beaucoup plus efficace. La recherche d'un motif adéquat dans le pool existant des composés organiques aromatiques trifonctionnels est désormais nécessaire à la continuité de ce travail.

2. Les cycles aromatiques trifonctionnalisés

a. L'acide 3-hydroxyanthranilique

L'acide 3-hydroxyanthranilique est un produit commercial, trifonctionnalisé par un alcool, une amine et un acide carboxylique, tous trois substituant le même noyau aromatique de telle sorte que cette molécule soit très proche du motif idéal de nos éléments « switch » inducteurs de coude.

L'amine est tout d'abord protégée par un groupement Boc, introduit par la réaction avec l'anhydride correspondant, Boc₂O, et donnant la molécule que nous notons ici **41** (Figure 225).

Par la suite, plusieurs stratégies de synthèse s'offrent à nous. Dans un premier temps, nous décidons de tester en solution la réactivité de la molécule **41** lors de la formation des liaisons ester et amide de part et d'autre du cycle aromatique. Nous pouvons alors entreprendre de coupler l'acide carboxylique du

composé **41** avec l'amine N-terminale d'un acide aminé tel que l'alanine H-Ala-OMe ou la phénylalanine H-Phe-OMe, ce qui nous donne de bons résultats lors de la synthèse des composés correspondants **42** et **43** après activation de l'acide carboxylique avec du DCC en présence d'HOBt, utilisé ici pour prévenir les risques de racémisation au niveau du C α de l'acide aminé (Figure 225).

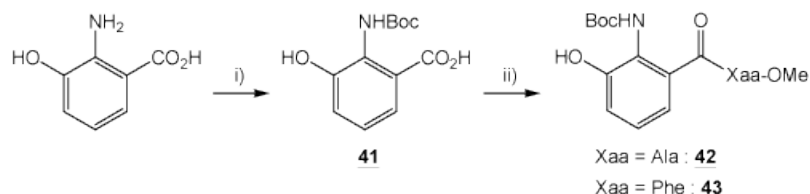


Figure 225 : i) Protection de l'amine de l'acide 3-hydroxyanthranilique par un groupement Boc : Boc₂O (1 eq.), DIPEA (2 eq.), DCM anhydre (0.02 M) et DMF (0.25 M) (argon, 24h, r.t.) ; rendement : 89 % ; ii) formation d'une liaison amide : l'acide carboxylique de la molécule **41** (1 eq.) dissoute dans du THF anhydre (0.07 M) est pré-activé en présence de DCC (1.1 eq.) et d'HOBt (1.1 eq.) (argon, 30 min, -5°C) avant d'être mélangé à l'acide aminé H-Xaa-OMe (1.1 eq.) en solution dans le THF anhydre (0.2 M) (argon, la nuit, r.t.) ; purification : colonne chromatographique sur gel de silice (15 % AcOEt/éther de pétrole) ; rendement : 90 % (Xaa = Ala ; **42**) et 65 % (Xaa = Phe ; **43**).

Or il est aussi possible d'estérifier préalablement l'acide carboxylique d'un second acide aminé avec l'alcool phénolique de la molécule **41** avant de créer la liaison amide (Figure 226). Pour cela, nous activons tout d'abord la Fmoc-Ala-OH en formant son dérivé chloré en présence de chlorure d'oxalyle avant de la faire réagir sur le motif aromatique **41**. Cependant, le rendement de cette réaction, de l'ordre de 20 %, est relativement faible.

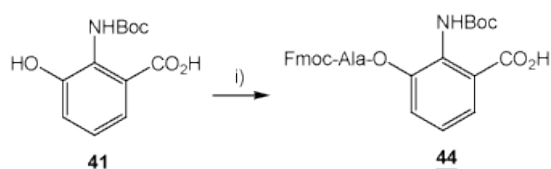


Figure 226 : Estérification de l'alcool de la molécule **41** en présence de l'acide carboxylique libre : i) formation du Fmoc-Ala-Cl à partir de Fmoc-Ala-OH (1.5 eq.) : chlorure d'oxalyle (1.6 eq.), DCM anhydre (0.23 M) et DMF (8.1 eq.) (argon, 3h, de -5°C à r.t.) ; addition du Fmoc-Ala-Cl redissout dans du DCM anhydre (0.2 M) sur une solution contenant la molécule **41** (1 eq.) et de la TEA (2 eq.) dans du DCM anhydre (0.16 M) (argon, -5°C à r.t., 28h) ; purification : lavage avec du 10 % d'acide citrique et extraction de la phase aqueuse avec du DCM ; rendement <20 %.

La même réaction est alors réalisée sur le dérivé anthranilique **43** dont l'acide carboxylique est couplé à l'ester méthylique d'une phénylalanine (voie i, Figure 227). Le rendement de cette estérification est plus faible que précédemment, avec une valeur de 12 %.

L'estérification *via* l'utilisation de MSNT en présence de 1-méthylimidazole montre alors de bien meilleurs résultats, avec des rendements de 66 et 88 %, respectivement pour le composé **43** avec la Fmoc-

Ala-OH (produit **45**, voie ii, Figure 227) et le composé **42** avec la Fmoc-Phe-OH (produit **46**, voie ii, Figure 227).

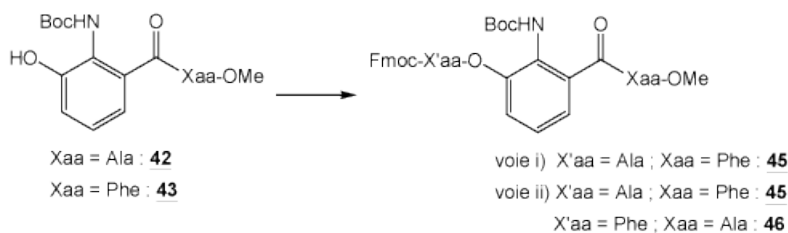


Figure 227 : Estérification de l'alcool de l'acide 3-hydroxyanthranilique après la formation de la liaison amide : **voie i**) via un chlorure d'acyle : Fmoc-Ala-OH (2 eq.), chlorure d'oxalyle (2.5 eq.), DCM anhydre (0.23 M) (argon, 3h, -5°C à r.t.) ; addition du Fmoc-Ala-Cl dissout dans du DCM anhydre (0.2 M) sur la molécule **43** (1 eq.) en solution avec de la TEA (7 eq.) dans du DCM anhydre (0.16 M) (argon, -5°C à r.t., 16h) ; reprise du brut dans l'AcOEt, lavages (10 % d'acide citrique puis 10 % d'une solution aqueuse de NaHCO₃), extraction, et colonne chromatographique sur gel de silice (20 % AcOEt/éther de pétrole) ; rendement : 12 % ; **voie ii**) pré-activation de l'acide carboxylique : Fmoc-Xaa-OH (1 eq.), MSNT (1 eq.), THF anhydre (argon, 30 min, r.t.) ; addition du dérivé anthranilique (composé **42** ou **43**, 1 eq.) et du 1-méthylimidazole dans du THF anhydre (argon, r.t.) ; addition d'un complément de Fmoc-Xaa-OH (0.5 eq.) préalablement activé ; purification : lavage, voire RP-HPLC préparative C₁₈ (composé **45**, gradient : 60 à 90 % d'eau dans l'ACN en 30 min) ; rendement : 66 % (composé **45**) et 88 % (composé **46** : estimation par RP-HPLC analytique).

La stabilité de la liaison ester ainsi formée est ensuite testée, dans le cas des molécules **45** et **46**, en présence d'une solution de 20 % de pipéridine dans le DMF à température ambiante pendant 20 min. Ce traitement conduit à la dégradation totale de l'ester pour les deux composés étudiés, montrant ainsi la faiblesse de cette fonction chimique et les difficultés que nous pourrions rencontrer lors de l'utilisation d'un tel dérivé au moment de la synthèse sur support solide, selon une stratégie Fmoc/*t*Bu, d'inhibiteurs potentiels de l'amyloïdogénèse de l'amyloïde β.

Afin de contourner le problème, nous allons donc synthétiser, sur une résine Rink Amide MBHA, la séquence de reconnaissance du peptide pathogène Aβ(1-42) Phe-Phe-Asp-NH₂, que nous avons précédemment considérée dans le cas du design de nos autres inhibiteurs potentiels (Figure 228). L'élément « switch » inducteur de coude N-protégé **41** sera ensuite couplé, sur la résine, à l'amine terminale de la dernière phénylalanine, avant que l'alcool phénolique du mime peptidique ne soit estérifié par un unique acide aminé, tel que la Boc-Leu-OH. La conception de cette molécule nous permet ainsi d'éviter le clivage d'un groupement Fmoc en présence de l'ester déjà formé. Une augmentation du pH vers pH 7 devrait ensuite déclencher la migration acylique intramolécule O→N et transformer le composé **47** en sa forme active S_{on} (Figure 229).

D'un point de vue pratique, l'acide N-*tert*-butoxycarbonyl-3-hydroxyanthranilique **41** est activé en présence de HATU pour former une liaison amide avec l'amine terminale de la phénylalanine (Figure 228). L'ester, quant à lui, se fait après activation de l'acide carboxylique de la Boc-Leu-OH.H₂O avec du DIC, la réaction étant catalysée par de la DMAP. L'avancement de ces deux étapes est contrôlé grâce à

l'analyse par RP-HPLC analytique d'aliquots issus de tests de clivage de la résine, ce qui nous permet de déterminer la nécessité de répéter trois fois chacune des deux réactions. Le mime peptidique à l'état S_{off} **47** est ensuite déprotégé et clivé de la résine après un traitement avec une solution contenant 95 % de TFA, 2.5 % de TIS et 2.5 % de DCM anhydre. Le remplacement de l'eau, utilisée généralement au cours de cette étape comme « scavenger », par le dichlorométhane sec permet en effet de limiter les risques d'hydrolyse acide de la liaison ester. Le brut est ensuite précipité dans de l'éther glacé puis redissout dans du TFA avant d'être concentré à sec, ce traitement ayant l'avantage de conserver le composé **47** à l'état S_{off} .

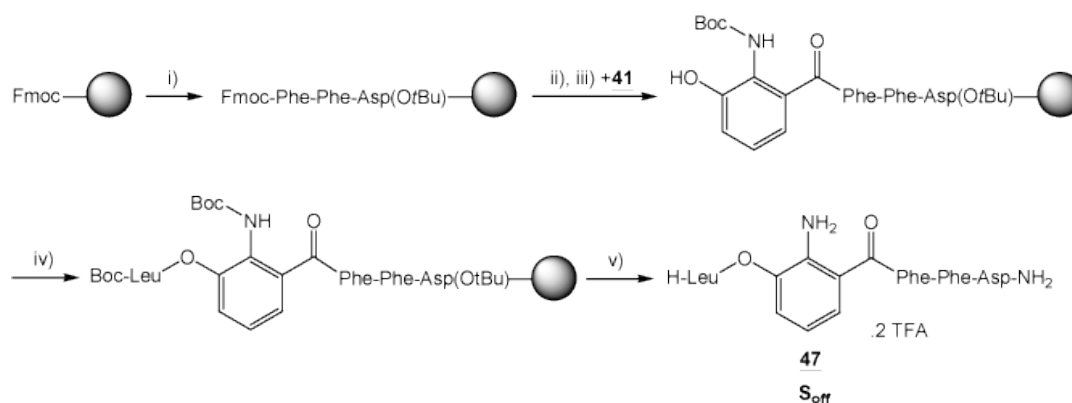


Figure 228 : Synthèse, sur support solide, d'un inhibiteur potentiel de la fibrillogenèse de l'amyloïde β , incorporant le tripeptide Phe-Phe-Asp-NH₂ comme séquence de reconnaissance du peptide pathogène et l'acide 3-hydroxyanthranilique comme élément « switch » inducteur de coude : i) SPPS sur une résine Rink Amide MBHA, selon une stratégie Fmoc/tBu ; ii) clivage du Fmoc ; iii) couplage de l'élément « switch » N-protégé **41** (3 eq., 3 fois) en présence de HATU ; iv) estérification : Boc-Leu-OH.H₂O (3 eq.), DIC (3 eq.), DMAP (3 eq.) (3 fois) ; v) déprotection et clivage de la résine : TFA/TIS/DCM (95 : 2.5 : 2.5, v/v/v, 1h, r.t., 2 fois) ; précipitation (Et₂O glacé) ; purification par RP-HPLC préparative C₁₈ (gradient : 30 à 60 % B en 30 min) conduisant à un produit pur à 30 % après estimation par RP-HPLC analytique.

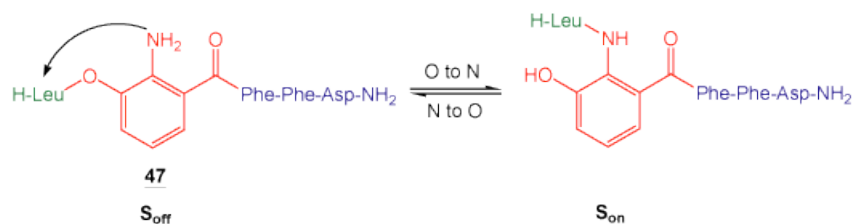


Figure 229 : Migration acylique intramoléculaire $O \rightarrow N$ et $N \rightarrow O$ appliquée au « switch-peptide » **47**, intégrant le tripeptide Phe-Phe-Asp-NH₂ comme séquence de reconnaissance du peptide pathogène β (1-42) (en bleu), l'acide 3-hydroxyanthranilique comme élément « switch » inducteur de coude (en rouge) et la leucine comme élément mobile de la molécule (en vert).

L'analyse du brut par RP-HPLC analytique et spectroscopie de masse ESI nous confirme l'obtention du composé désiré **47**, mélangé à plusieurs autres sous-produits (Figure 230). Un essai de purification par RP-HPLC C₁₈ préparative, avec un gradient de 30 à 60 % de B en 30 min, ne nous permet pas cependant

d'isoler correctement cet inhibiteur potentiel **47**, présent à environ 30 % dans trois fractions différentes (Figure 231).

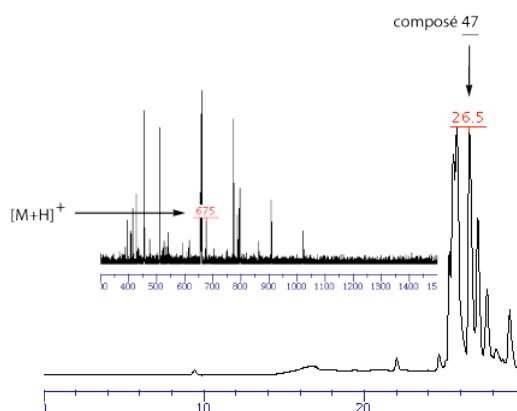


Figure 230 : Caractérisation, par RP-HPLC C_{18} analytique (gradient : 15 à 45 % en 30 min) et ESI-MS, du brut contenant le « switch-peptide » **47** à l'état *Soff* : $t_r = 26.5$ min, $[M+H]^+ = 675$.

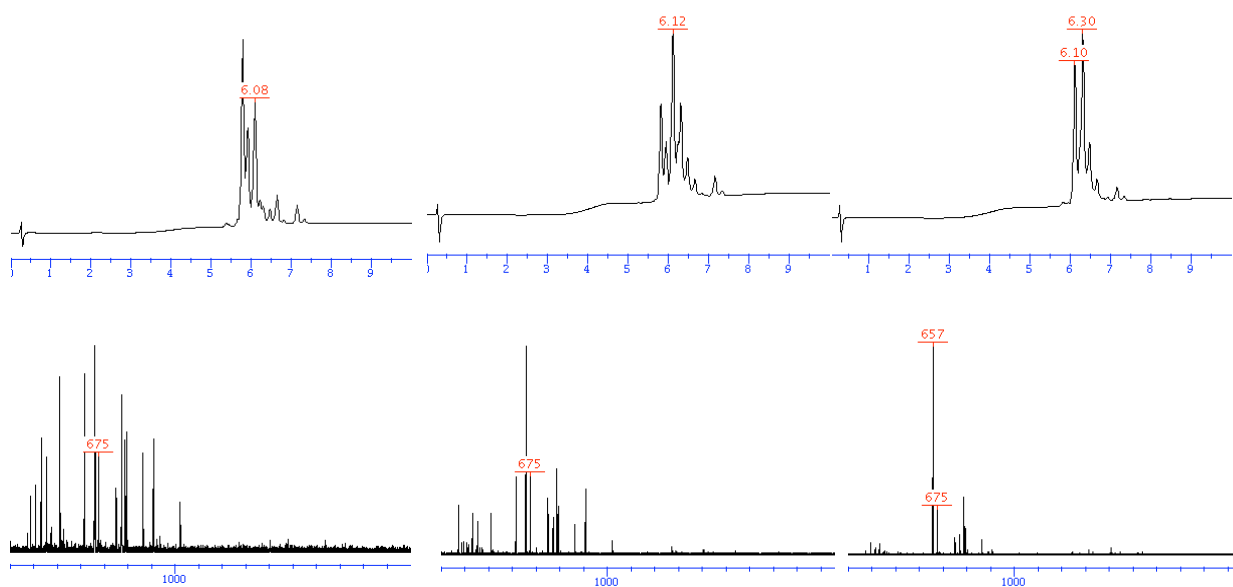


Figure 231 : Caractérisation, par RP-HPLC C_{18} analytique (gradient : 0 à 100 % B en 10 min ; en haut) et spectroscopie de masse ESI (en bas), des trois fractions contenant le « switch-peptide » **47**, obtenues après un essai de purification par RP-HPLC préparative ; composé **47** : $t_r = 6.1$ min, $[M+H]^+ = 675$.

La principale difficulté de ce travail de purification réside en la nature-même de la liaison ester, particulièrement labile en milieu aqueux, d'autant plus dans un environnement acide, et sujette à une migration acylique intramoléculaire $O \rightarrow N$ dès que le pH devient neutre. A chaque essai de purification, nous prenons donc le risque de voir la molécule synthétisée se dégrader. La clé de cette étape se résume donc à trouver le juste équilibre entre l'hydrolyse et le réarrangement de ce type de « switch-peptide » au moment de sa purification, d'où l'intérêt d'obtenir un brut après clivage relativement propre, afin de

simplifier l'isolement du composé voulu. Pour cela, il nous faut donc contrôler avec soin le rendement des étapes d'introduction de l'élément « switch » inducteur de coude et d'estérification de l'alcool phénolique. Nous allons alors synthétiser un « switch-peptide » simplifié, ne comportant qu'une phénylalanine à la place de la séquence de reconnaissance de l'amyloïde β , un élément « switch » dérivé de l'acide 3-hydroxyanthranilique et une alanine comme groupement acylique migrateur et nous allons tenter de déterminer les points faibles de cette synthèse (Figure 232).

L'acide *N-tert*-butoxycarbonyl-3-hydroxyanthranilique **41** est couplé à l'amine N-terminale de la phénylalanine bloquée sur les billes d'une résine Rink Amide MBHA. La réaction se fait en présence de PyBOP, utilisé en tant qu'agent activateur, et de DIPEA, suivant les conditions standard de la SPPS. Le couplage est relancé une seconde fois, avant que nous n'analysions, par RP-HPLC analytique et spectroscopie de masse, un aliquot clivé de la résine. Cela nous permet de déterminer que le produit majoritaire, obtenu au cours de ce test de clivage, correspond bien au produit désiré, que nous nommons ici **48a** (Figure 233a).

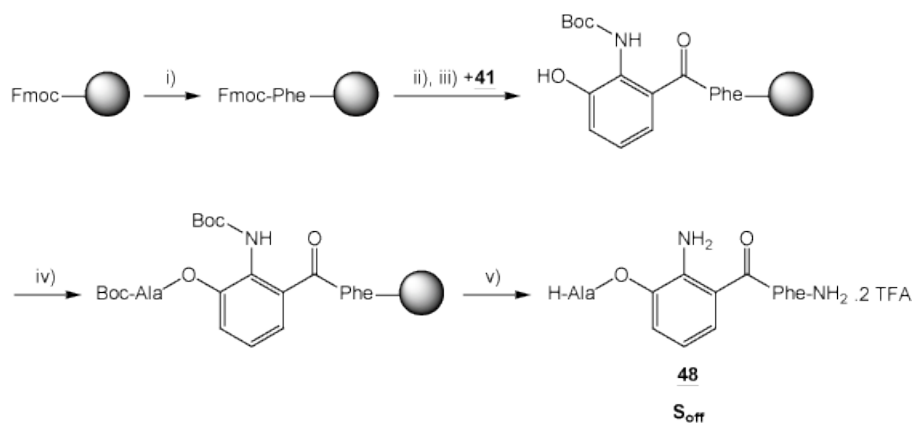


Figure 232 : Synthèse de la séquence minimale d'un « switch-peptide » **48** sur support solide : i) SPPS sur une résine Rink Amide MBHA suivant une stratégie Fmoc/tBu ; ii) clivage du Fmoc (20 % pipéridine/DMF, 5 x 2 min, r.t.) ; iii) introduction de l'élément « switch » inducteur de coude **41** avec du PyBOP (2 fois, r.t.) ; iv) estérification : pré-activation de la Boc-Ala-OH (3 eq.) avec MSNT (3 eq., azote, 30 min, r.t.) puis addition à la résine avec de la 1-méthylimidazole (2.2 eq.) (3 fois, azote, 1h, r.t.) ; v) déprotection et clivage de la résine (TFA / TIS / DCM ; 95 / 2.5 / 2.5, 1h30, r.t.), précipitation du peptide brut dans l'éther glacé.

L'alcool phénolique est estérifié par une Boc-Ala-OH après l'activation de sa fonction acide carboxylique par du MSNT, réactif que nous avons déjà utilisé au moment des tests préliminaires de réactivité en solution. L'avancement de la réaction est déterminé après l'analyse d'un échantillon de résine traité avec une solution de clivage. Après trois estérifications consécutives, le mime peptidique est déprotégé et clivé de la résine, puis il est précipité dans un large excès d'éther diéthylique glacé. Le brut est alors analysé par RP-HPLC analytique et spectroscopie de masse, ce qui nous permet de localiser, sur le chromatogramme, le pic correspondant au composé **48** à l'état S_{off} (Figure 233b).

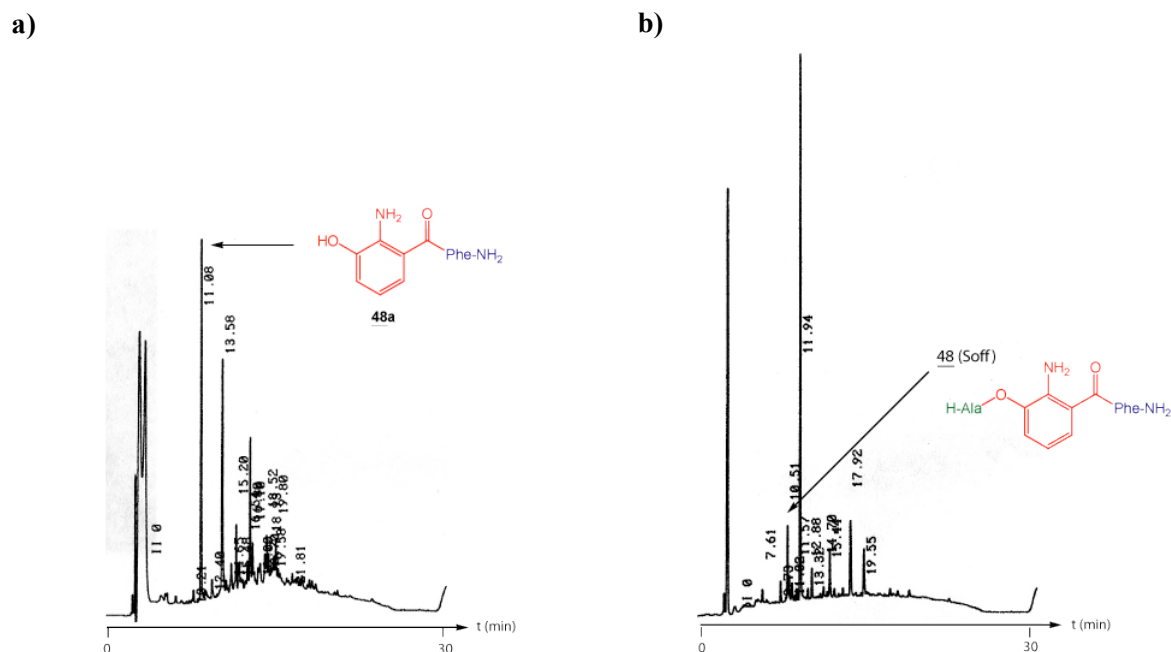


Figure 233 : Chromatogrammes obtenus après analyse par RP-HPLC analytique C_{18} (gradient : 5 à 100 % B en 30 min) : **a)** test de clivage après le couplage de l'élément « switch » sur la résine (composé **48a**) ; **b)** brut après précipitation dans l'éther mais avant lyophilisation (composé désiré **48** à $t_r = 10.5$ min).

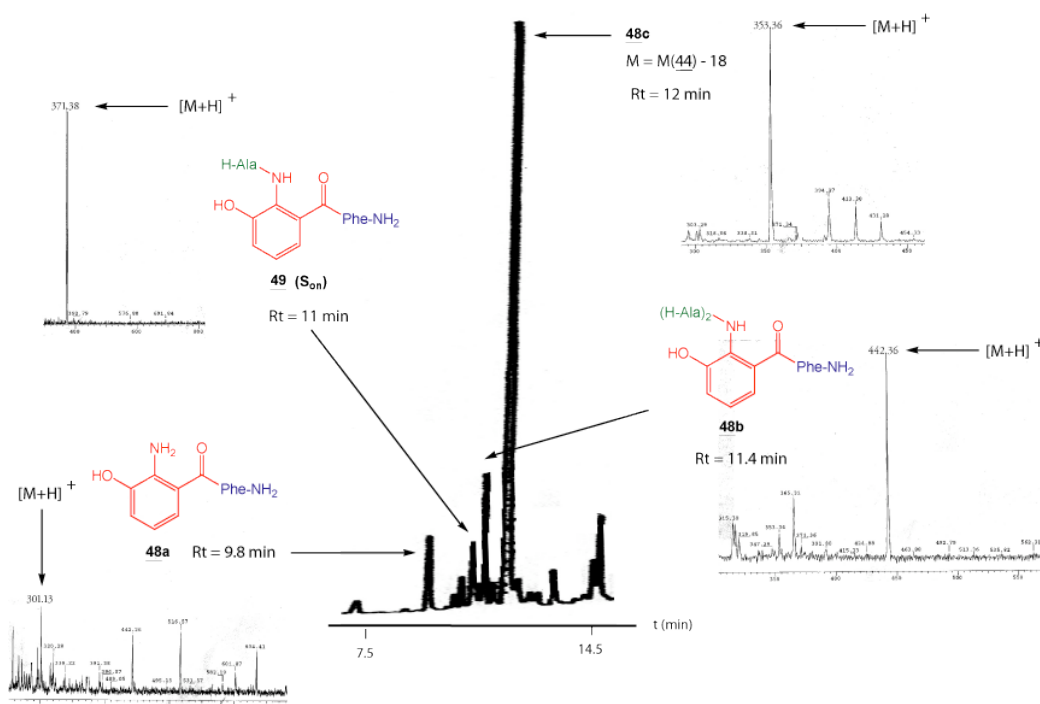


Figure 234 : Analyse en spectroscopie ESI-MS des pics obtenus par RP-HPLC analytique (gradient : 5 à 100 % B en 30 min), correspondant aux composés présents dans le brut réactionnel après lyophilisation ; nous y observons la présence de l'ester hydrolysé (composé **48a**, $t_r = 9.8$ min), du produit à l'état S_{0n} (composé **49**, $t_r = 11$ min), d'un dérivé contenant 2 alanines (composé **48b** avec sa structure supposée, $t_r = 11.4$ min), et d'un produit majoritaire dont la masse correspond à celle du produit **48** moins 18 (composé **48c**, $t_r = 12$ min).

Le solide blanc est ensuite dissout dans un mélange d'eau et d'acétonitrile puis est directement et rapidement congelé et lyophilisé afin d'éviter tout risque de dégradation de la liaison ester ou de déclenchement de la migration acylique intramoléculaire O→N. L'analyse du brut après lyophilisation nous apprend néanmoins que notre composé s'est réarrangé malgré ces précautions (Figure 234).

Nous observons en effet un déplacement du temps de rétention du pic dont la masse correspond au produit désiré, et ce vers la zone des produits hydrophobes. Ceci est caractéristique d'un réarrangement acylique intramoléculaire O→N (composé **49**, Figure 234 et Figure 235). L'étude du chromatogramme RP-HPLC analytique du produit brut nous permet aussi de déterminer la présence du composé non estérifié, ou hydrolysé, **48a** et d'un produit dont la masse correspondrait à la présence de deux résidus alanines (composé **48b**, structure supposée présentée sur la Figure 234). Enfin, bien que le produit majoritaire soit caractérisé par spectroscopie de masse, sa structure ne peut être déterminée avec certitude avec ces seules analyses (composé **48c**, Figure 234). Enfin, trois essais successifs de purification du « switch-peptide » **49** à l'état S_{off} ne nous permettent pas d'isoler convenablement le composé désiré.

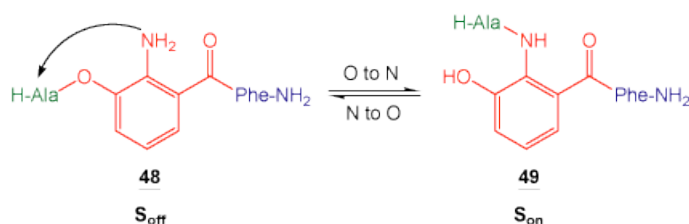


Figure 235 : Migration acylique intramoléculaire O→N, appliquée au « switch-peptide » simplifié **48** (état S_{off}), donnant la forme amide **49** correspondant à l'état S_{on} .

La principale faiblesse de cette stratégie de synthèse réside dans le choix de la protection de l'amine impliquée dans la migration acylique, un proton qui ne bloque pas complètement le « switch-peptide » dans sa position S_{off} au moment de la purification. L'utilisation d'une résine Rink Amide MBHA présente elle-aussi un inconvénient dû aux conditions drastiques employées au cours du clivage du peptide. Cependant, ce problème peut facilement être résolu en remplaçant cette résine par une résine Sieber Amide, libérant un amide après traitement avec une solution ne contenant qu'un pourcent de TFA dans le dichlorométhane.

Les avantages liés à l'utilisation d'un groupement protecteur enzymolabile placé sur l'amine de l'élément « switch » engagée dans le réarrangement acylique ont déjà été présenté au début de ce travail (voir dans l'Introduction – Chapitre 1 - III. Le concept « switch-peptides »). Dans le cas de la pyridoxamine, nous avons utilisé comme protection une arginine, clivable par la trypsine. Cependant, nous avons observé que la réaction principale se produisant au moment de la déprotection enzymatique ne correspondait pas

au clivage attendu, mais que l'amine terminale de l'arginine se retrouvait alors impliquée dans une migration acylique intramoléculaire O→N *via* un intermédiaire cyclique à 9 membres.

Afin d'éviter de rencontrer le même problème avec l'acide 3-hydroxyanthranilique, nous avons considéré l'emploi d'un dipeptide, moins favorable à ce type de réaction secondaire, tel que la lysine-proline, clivable par la DPPIV⁴³⁻⁴⁴. La dipeptidyl peptidase IV, abrégée DPPIV, est une peptidase de type sérine clivant les dipeptides N-terminaux localisés sur des chaînes peptidiques constituées de trois acides aminés ou plus lorsque le deuxième résidu est une proline ou, moins efficacement, une alanine ou hydroxyproline. Ce clivage enzymatique requiert la présence d'une charge positive sur la position N-terminale libre et une configuration L pour chacun des acides aminés impliqués dans ce processus de déprotection.

Le « switch-peptide » correspondant **51** est synthétisé par SPPS sur une résine Sieber Amide, libérant un amide C-terminal dans des conditions très douces ne requérant qu'un pourcent de TFA dans le dichlorométhane, que nous choisisons anhydre afin d'éviter l'hydrolyse partielle de l'ester phénolique en milieu acide aqueux (Figure 236).

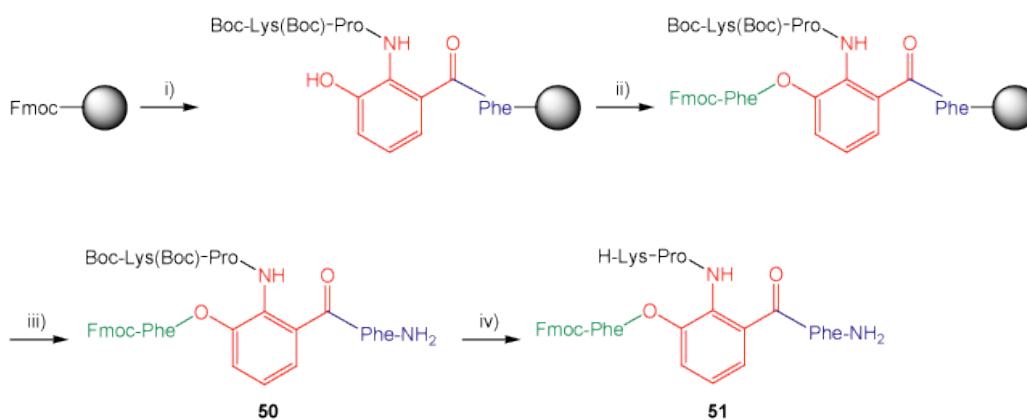


Figure 236 : Synthèse du « switch-peptide » **51** à l'état S_{off} : i) SPPS sur une résine Sieber Amide ; ii) estérification : traitement de la résine avec 20 % de pipéridine dans le DMF (5 x 2 min, r.t.) pour libérer le phénol, puis réaction avec la Fmoc-Phe-OH (3 eq.) activée avec du DIC (3 eq.) et catalysé par de la DMAP (0.1 eq.) (2 x 2h, r.t.) ; iii) clivage de la résine (1 % TFA dans le DCM anhydre, 30 min, r.t.), évaporation après addition d'un large excès d'hexane, précipitation dans l'éther glacé (composé **50**) ; iv) clivage des groupements Boc (50 % TFA dans le DCM anhydre, 40 min, r.t.).

L'acide 3-hydroxyanthranilique est couplé à l'amine de la phénylalanine après activation de l'acide carboxylique avec du PyBOP, suivant les conditions standards de la SPPS. La Fmoc-Pro-OH est introduite sur l'amine aromatique par un double couplage avec de l'HATU. Son amine est ensuite déprotégée et couplée au résidu Boc-Lys(Boc)-OH. La résine est ensuite traitée avec une solution de 20 % de pipéridine dans le DMF, comme pour le clivage d'un groupement Fmoc. Cette étape permet de libérer l'alcool phénolique éventuellement impliqué dans une liaison ester avec la lysine protégée. La Fmoc-Phe-

OH est ensuite liée au phénol par l'intermédiaire d'une activation au DIC, catalysée par de la DMAP. Le « switch-peptide » **50**, protégé et bloqué à l'état S_{off} , est ensuite libéré de la résine puis isolé après une co-évaporation à l'hexane, chargé d'entraîner le TFA, et une précipitation à l'éther diéthylique glacé. Les amines de la lysine sont ensuite déprotégées avec une solution de 50 % de TFA dans le dichlorométhane anhydre pour donner le « switch-peptide » **51** désiré.

L'analyse du brut contenant le composé **50** nous montre que la présence d'un sous-produit **50a**, dont la masse correspond au tripeptide Boc-Lys(Boc)-Pro-Phe-NH₂. Celle du brut après le clivage des groupements Boc met en évidence l'existence de deux sous-produits mélangés au composé **51**, à savoir le tripeptide **51a** et le « switch-peptide » de délétion **51b** (Figure 237, Figure 238).

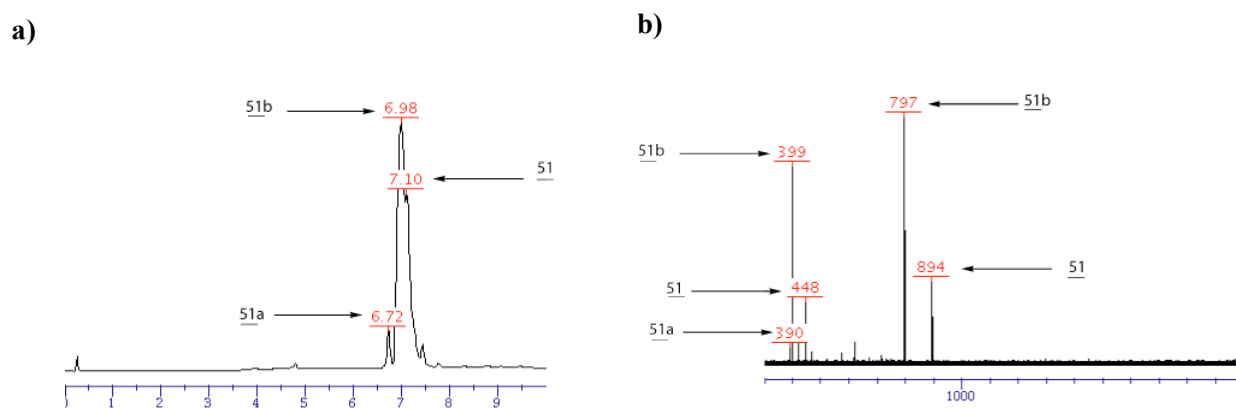


Figure 237 : Caractérisation du « switch-peptide » **51**, ainsi que des deux sous-produits présents dans le brut réactionnel : **a**) par RP-HPLC analytique sur colonne C18 (0 à 100 % B en 10 min) (**51** : 7.10 min ; **51a** : 6.72 min ; **51b** : 6.98 min) ; **b**) par spectroscopie ESI-MS (**51** : 448 = $[M/2+H]^+$ et 894 = $[M+H]^+$; **51a** : 390 = $[M+H]^+$; **51b** : 399 = $[M/2+H]^+$ et 797 = $[M+H]^+$).



Figure 238 : Nature des deux sous-produits (**51a** et **51b**) contenus dans le brut du composé **51**.

Considérant les risques importants de dégradation de l'ester au cours d'une éventuelle étape de purification, nous décidons de réaliser les tests de clivage enzymatique et de migration acylique intramoléculaire O→N consécutive sur le mélange de produits **51**, **51a** et **51b**. Le solide brut est alors dissout dans une solution tampon sodium phosphate 0.1 M à pH 7.4 et laissé à température ambiante. Un équivalent de DPPiV est ensuite ajouté à cette solution. L'enzyme devrait alors cliver le dipeptide H-Lys-Pro pour libérer l'amine du cycle aromatique qui pourra alors attaquer le groupement acylique placé sur

l'alcool phénolique en position ortho et déclencher le réarrangement acylique intramolécule O→N (Figure 239). Cette transformation est suivie par RP-HPLC analytique en prélevant des aliquots de la solution étudiée à différents moments et en les quénchant avec une solution d'acide chlorhydrique 0.1 M. Pour plus de sécurité, les échantillons sont ensuite congelés dans l'azote liquide en attendant d'être analysés.

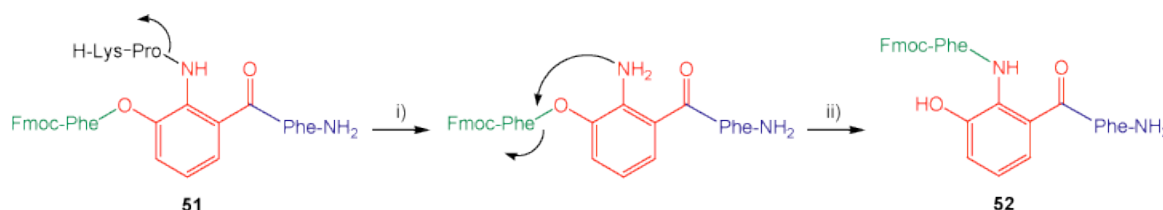


Figure 239 : Clivage enzymatique et réarrangement acylique appliqués au « switch-peptide » **51** (état S_{off}) : i) addition de DPPIV ; ii) migration acylique intramolécule O→N conduisant au « switch-peptide » **52** (état S_{on}).

La superposition des différents chromatogrammes obtenus montre la disparition très rapide du composé **51b** et celle, plus lente, du « switch-peptide » **51** (Figure 240).

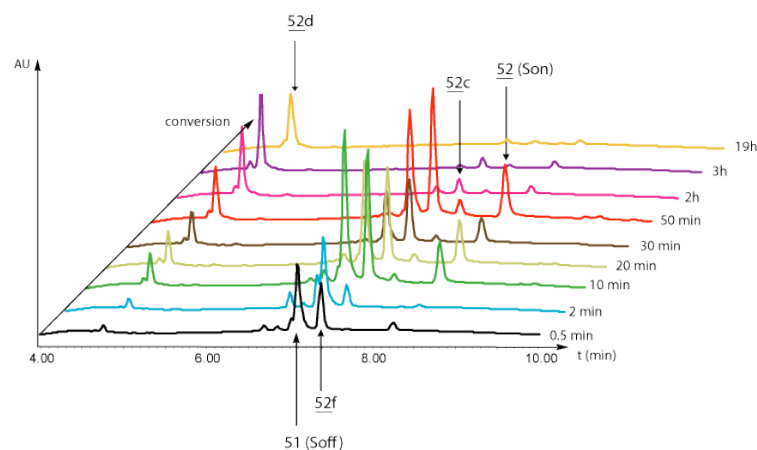


Figure 240 : Suivi, par RP-HPLC analytique C_{18} (gradient : 0 à 100 % B en 10 min), de la migration acylique intramolécule O→N après le mélange de DPPIV (1.7 eq.) avec le « switch-peptide » **51** (état S_{off}) dissout dans une solution tampon à pH 7.4, conduisant au « switch-peptide » **52** (état S_{on}) ; une certaine quantité du produit de départ subit une hydrolyse de son ester suivie du clivage enzymatique, menant aux composés **52c** et **52d**, tandis que le produit secondaire **51b** se réarrange lui aussi pour former le composé **52f**.

L'expérience est arrêtée au bout de 20h après dilution avec du méthanol et lyophilisation. Le brut réactionnel est ensuite étudié par RP-HPLC analytique, tandis que les pics correspondants aux différents produits absorbant à 214 nm sont isolés et analysés par spectroscopie de masse ESI (Figure 241).

Cela nous permet d'identifier le « switch-peptide » désiré à l'état S_{on} (**52**), ainsi que le produit **52d**, correspondant à l'hydrolyse de l'ester phénolique et au clivage enzymatique du dipeptide H-Lys-Pro

(Figure 242), le résidu Fmoc-Phe-OH, que nous noterons ici **52c**, et le « switch-peptide » **52f**, obtenu après la migration acylique intramoléculaire O→N dans le composé **51b** (Figure 244).

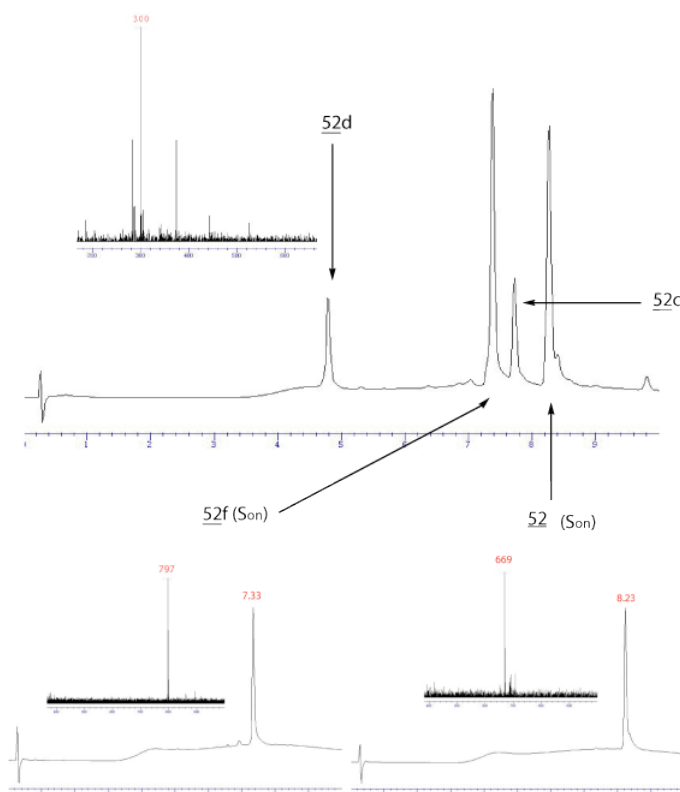


Figure 241 : Analyse, par RP-HPLC analytique C_{18} (gradient : 0 à 100 % B en 10 min) du brut réactionnel après le clivage enzymatique et la migration acylique intramoléculaire O→N du composé brut **51** et caractérisation par spectroscopie de masse ESI de chacun des produits (composés **52d**, **52f**, **52c** et **52**) ; la structure de ces molécules est explicitée dans les figures suivantes.

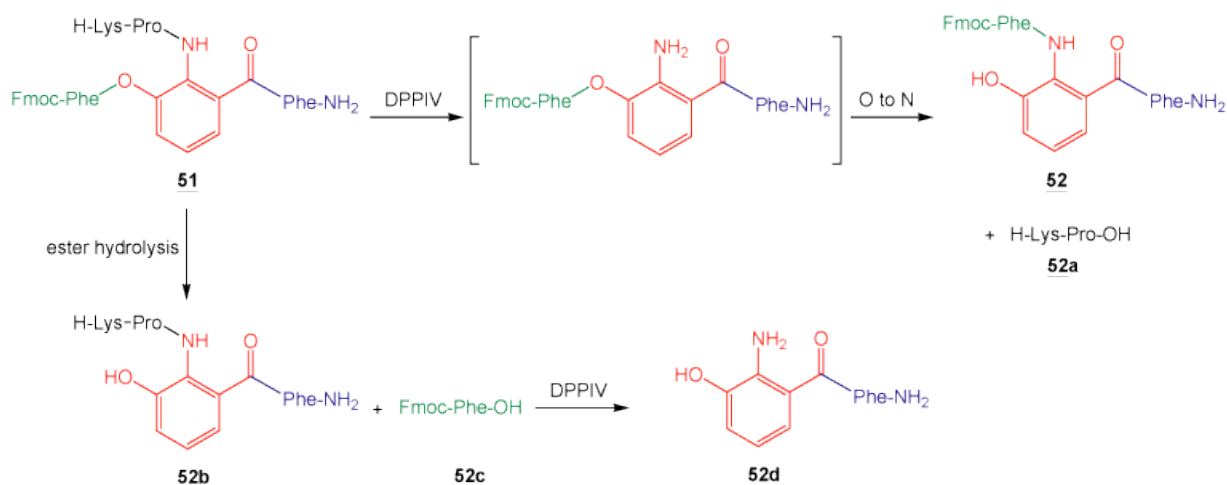


Figure 242 : Formation des différents produits possibles à partir du composé **51** ayant subi le clivage enzymatique et la migration acylique intramoléculaire O→N : la voie normale conduit au produit réarrangé **52** et au dipeptide H-Lys-Pro-OH **52a**, tandis que l'hydrolyse préalable de l'ester donne le produit **52b** (Fmoc-Phe-OH = **52c**), dont l'amine est ensuite libérée pour former le composé **52d**.

Nous observons aussi par spectroscopie de masse la présence des deux produits **52a** et **52e**, formés après le clivage enzymatique au niveau du tripeptide **51a** (Figure 243). Par contre, le produit de l'hydrolyse de l'ester phénolique de la molécule **51b** n'est pas détecté au cours de cette expérience (Figure 245).

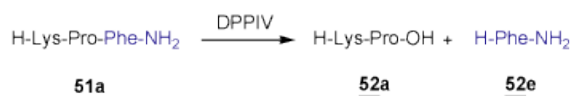


Figure 243 : Effet de la DPPIV sur le composé **51a**, conduisant aux produits **52a** et **52e**.

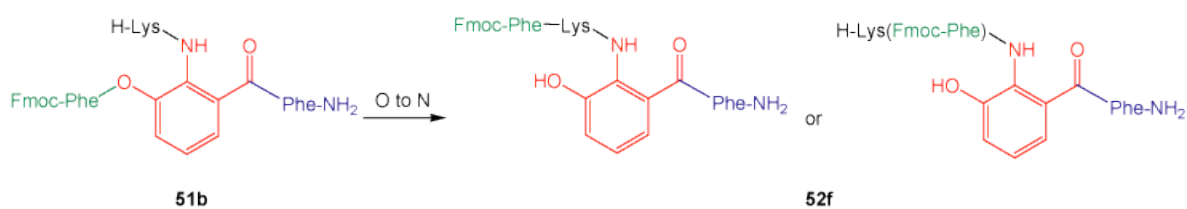


Figure 244 : Migration acylique intramoléculaire O→N appliquée au composé **51b**, donnant l'un des deux produits dont la structure est montrée ici (composé de gauche formé via un intermédiaire cyclique à 8 membres ; composé de droite formé via un cycle à 12 membres).

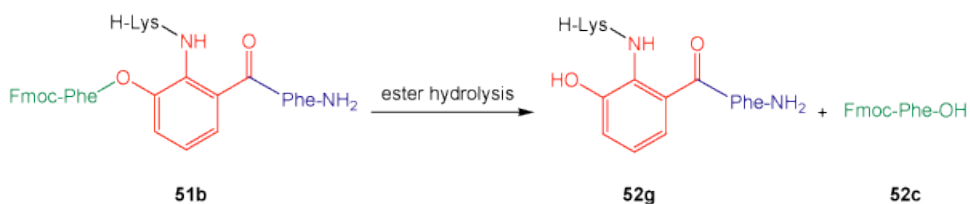


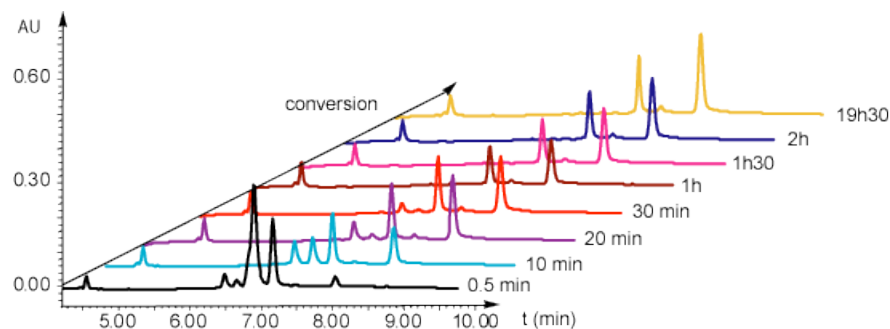
Figure 245 : La formation du composé **52g**, résultant de l'hydrolyse de l'ester du composé **51b**, n'est cependant pas observé dans le brut réactionnel.

Le clivage enzymatique et la migration acylique sont ensuite testés dans un mélange contenant 20 % d'acétonitrile dans la solution tampon à pH 7.4 avec un équivalent de DPPIV à température ambiante, ainsi qu'avec un équivalent de DPPIV dans la solution tampon mais cette fois à température physiologique (Figure 246). Ces tests nous permettent de démontrer que l'enzyme supporte bien la présence du solvant organique utilisé ici, le chromatogramme obtenu et présenté dans la Figure 246a étant similaire à celui de la première étude (Figure 240). A 37°C, l'hydrolyse de l'ester phénolique semble bien plus rapide, ce qui résulte en une concentration plus élevée en composé **52d** et plus faible en « switch-peptide » à l'état S_{on} (molécule **52**) (Figure 246b).

Nous réalisons enfin une dernière série d'expériences, en étudiant la stabilité des composés contenus dans le brut de la molécule **51** dans une solution tampon à pH 7.4 à température ambiante, ainsi qu'à 37 °C (Figure 247). Dans les deux cas, les deux « switch-peptides » **51** et **51b** se dégradent très rapidement, en moins de 20 min. L'ester en position phénolique pose donc un énorme problème de stabilité qui nous

limite en ce qui concerne la valorisation du concept des « switch-peptides » avec élément « switch » inducteur de coude. Cette faiblesse pourrait cependant être palliée en remplaçant l'alcool phénolique par un hydroxyle benzylique, l'étude de la molécule **36** dérivée de la pyridoxamine nous ayant montré le gain de stabilité de l'ester correspondant (Tableau 28).

a)



b)

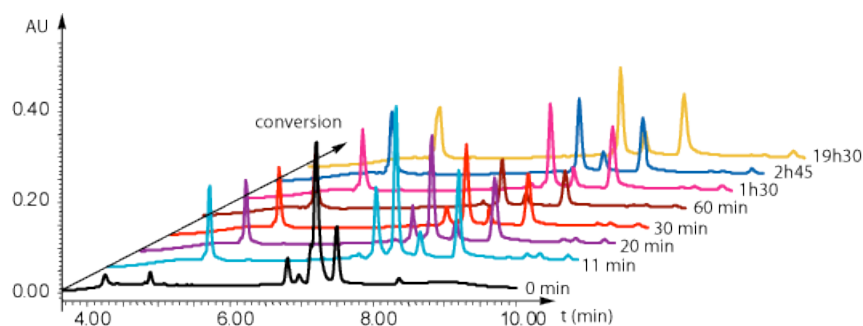
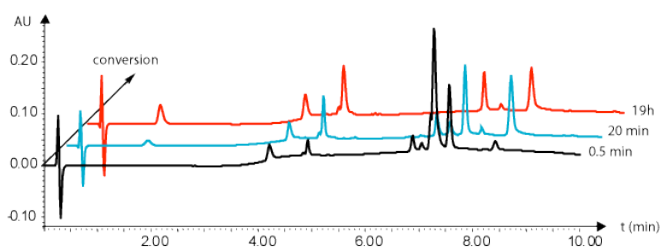


Figure 246 : Addition de DPPIV au brut réactionnel du composé **51**; suivi du clivage enzymatique et de la migration acylique intramoléculaire O→N par RP-HPLC C₁₈ (0 à 100 % B en 10 min) à **a)** température ambiante dans 20 % ACN dans une solution tampon PBS à pH 7.4 (1 eq. de DPPIV) et **b)** à 37°C dans une solution tampon à pH 7.4 (1 eq. de DPPIV).

a)



b)

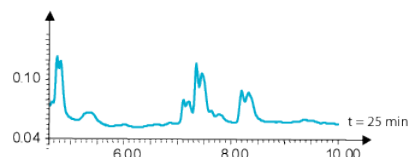


Figure 247 : Etude de la stabilité des composés **51**, **51a** et **51b** : **a)** à pH = 7.4 et température ambiante ; **b)** à pH = 7.4 et 37°C ; suivi par RP-HPLC C₁₈ analytique (gradient : 0 à 100 % B en 10 min).

b. Considération d'un alcool en position benzylique

Parmi le pool des molécules organiques trifonctionnalisées pouvant être utilisées comme élément « switch » inducteur de coude pour notre concept de « switch-peptides », l'acide ortho-aminomandélique, dont la structure est présentée dans la Figure 248, correspond parfaitement à notre cahier des charges. La synthèse de ce composé a été décrite en 1952, par E. J. Alford et K. Schofield, à partir du 2-nitrobenzaldéhyde³⁴³ (Figure 248).

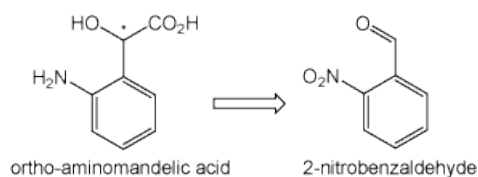


Figure 248 : Rétrosynthèse de l'acide ortho-aminomandélique à partir du 2-nitrobenzaldéhyde ; l'astérisque montre la présence d'un centre chiral.

L'étude de « switch-peptides » intégrant dans leur structure un acide ortho-aminomandélique va nous permettre de juger la stabilité de l'ester correspondant ainsi que l'utilité du groupement nitro en tant que protection temporaire de la fonction amine. En effet, la transformation du dérivé nitro en amine primaire se fait par hydrogénation catalytique avec du palladium sur charbon, l'addition d'une quantité catalytique d'acide acétique permettant d'accélérer la réduction tout en acidifiant l'amine formée et bloquant par là-même la molécule dans son état S_{off} . D'après la littérature³⁴⁴, ces conditions devraient être orthogonales avec la présence de liaisons amide et ester, hypothèse que nous pourrions vérifier au cours de ce travail.

La première étape de cette stratégie de synthèse est une réaction de cyanation qui permet de transformer l'aldéhyde du 2-nitrobenzaldéhyde en alcool secondaire et d'introduire au niveau de ce dernier une fonction nitrile, créant alors un centre chiral racémique (Figure 249).

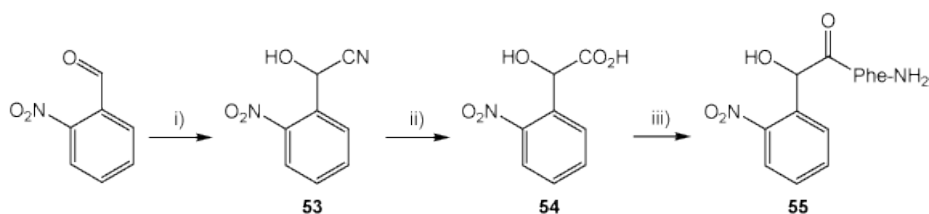


Figure 249 : i) Cyanation du 2-nitrobenzaldéhyde : KCN (1.5 eq.), acide acétique (3.3 M) (argon, 5h, 0°C à r.t., 60 %) ; ii) hydrolyse de la fonction nitrile en acide carboxylique : HCl 37 % (30 min, reflux) et cristallisation (78 %) ; iii) couplage peptidique entre l'acide carboxylique de la molécule **54** avec H-Phe-NH₂ (1 eq.) : HATU (1 eq.), DIPEA (3 eq.), DCM anhydre (argon, 3h45, r.t.) ; purification par lavages et RP-HPLC C₁₈ préparative (0 à 100 % B en 30 min) (52 %).

La cyanohydrine est ensuite hydrolysée en acide carboxylique en chauffant la molécule **53** dans de l'acide chlorhydrique concentré, pour donner l'acide ortho-nitromandélique correspondant **54**. L'acide carboxylique de cette molécule réagit ensuite avec une phénylalanine amidée par l'intermédiaire de l'agent d'activation HATU, le PyBOP n'ayant pas donné de résultats satisfaisants.

A partir du composé **55**, nous allons d'ores et déjà réaliser quelques essais de réduction par hydrogénation catalytique de la fonction nitro en amine, l'absence d'ester sur l'alcool secondaire limitant les dégradations possibles de la molécule au cours de cette étape d'adaptation de la réaction à notre composé (Figure 250). La molécule **55**, mélangée à du palladium sur charbon dans du méthanol et/ou de l'acide acétique, est placée dans un environnement contenant de l'hydrogène à 50 bars.

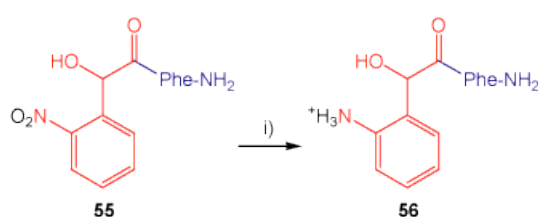


Figure 250 : Réduction, par hydrogénation catalytique, du groupement nitro de la molécule **55** en l'amine correspondante (composé **56**) : i) palladium sur charbon, méthanol, acide acétique, H_2 (50 bars).

Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque le composé est dissout à 0.6 mM dans du méthanol contenant 10 % massique d'acide acétique et agité à 50°C. Au bout de 3h, le produit de départ est totalement consommé, cependant nous observons toujours la présence du dérivé nitroso en quantité non négligeable (Figure 251, Figure 252b).

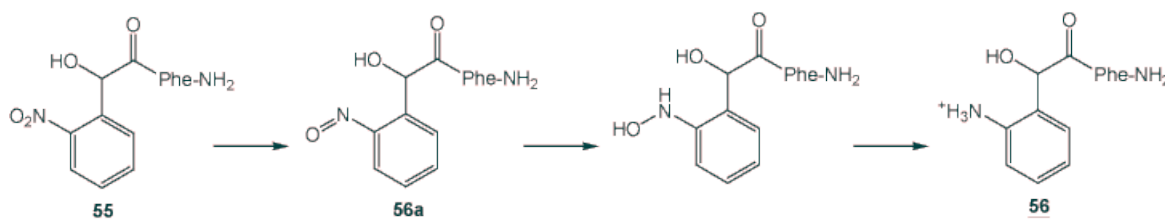


Figure 251 : Mécanisme de la réduction de la fonction nitro (**55**) en l'amine correspondante (**56**) par hydrogénation catalytique.

Un temps de réaction plus long ou une quantité plus importante d'acide acétique dans le milieu réactionnel conduit cependant à la dégradation totale de la molécule (Figure 252c, d et e).

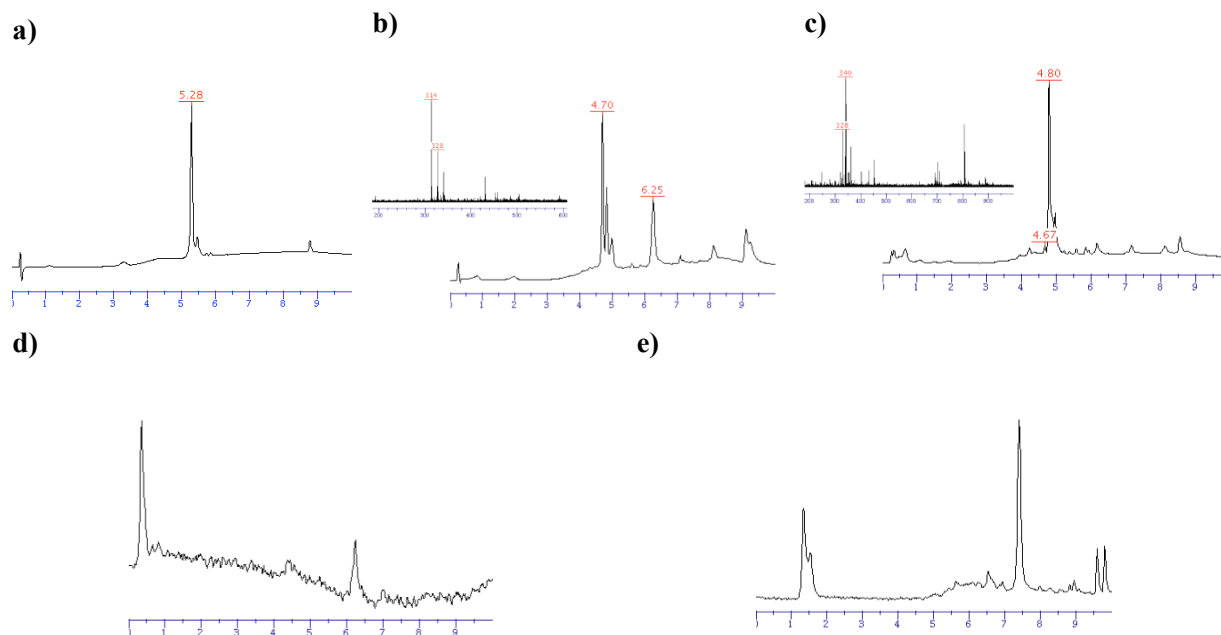


Figure 252 : Suivi, par RP-HPLC analytique C_{18} (gradient : 0 à 100 % B en 10 min), de la réaction d'hydrogénation du composé **55** : **a)** essai 1, $t = 0$; **b)** essai 1, $t = 3h$; **c)** essai 1, brut réactionnel ; **d)** essai 2, $t = 1h$; **e)** essai 3, $t = 50 \text{ min}$; composé **56** : $R_t = 4.7 \text{ min}$, $[M+H]^+ = 314$; composé **56a** : $R_t = 6.3 \text{ min}$, $[M+H]^+ = 328$.

Ces tests nous montrent ainsi les difficultés liées à l'utilisation de la fonction nitro en tant que protection temporaire de l'amine correspondante au moment de son clivage, relativement incompatible avec l'élaboration de « switch-peptides ». Il nous semblerait donc plus judicieux d'obtenir directement l'acide ortho-aminomandélique à partir du composé **54** avant de former la liaison amide, et de re-protéger l'amine par un autre groupement protecteur, tel que le dipeptide Lys-Pro, clivable par l'enzyme DPPIV. Cette stratégie de synthèse devra faire l'objet d'un travail ultérieur, mais pour l'instant, nous allons plutôt nous concentrer sur l'étude de la stabilité de l'ester pouvant être formée sur l'alcool secondaire de la molécule **56**. Cela nous permettra ainsi de déterminer si l'acide ortho-aminomandélique peut être considéré comme étant un élément « switch » inducteur de coude idéal pour notre concept de « switch-peptides ».

Dans un premier temps, l'alcool secondaire de la molécule **55** est acétylé avec de l'anhydride acétique en présence de pyridine pour donner la molécule correspondante **57** (Figure 253, Figure 254).

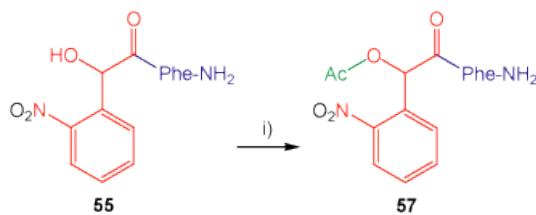


Figure 253 : Acétylation de l'alcool de la molécule **55** : i) Ac_2O (2.6 eq.), pyridine (3 eq.), DCM anhydre (argon, 40 min, r.t.) ; purification par colonne chromatographique sur gel de silice (éluant : 50 % AcOEt/n-hexane puis 70 % AcOEt/n-hexane ; $R_{dt} = 44 \%$).

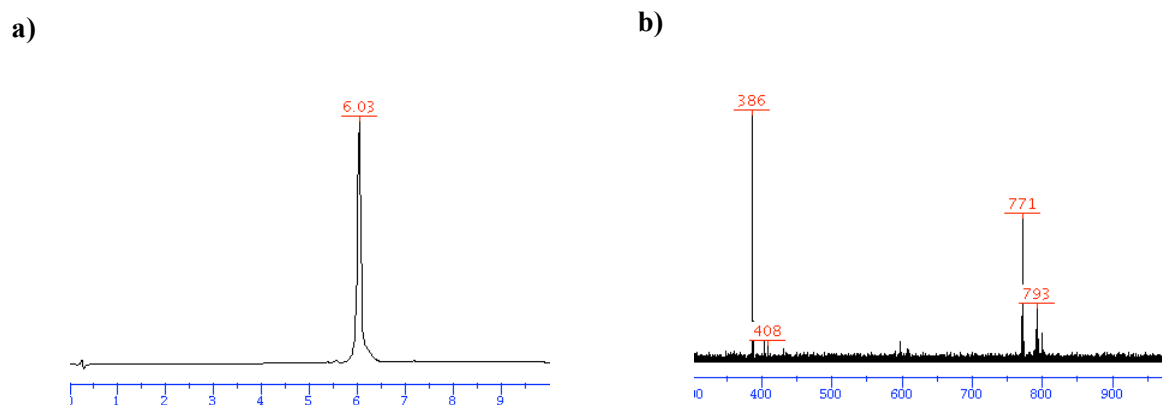


Figure 254 : Caractérisation du composé **57 a)** par RP-HPLC analytique C_{18} (gradient : 0 à 100 % B en 10 min) et **b)** par spectroscopie de masse ESI : 386 = $[M+H]^+$; 408 = $[M+Na]^+$; 771 = $[2M+H]^+$; 793 = $[2M+Na]^+$.

Un essai d'estérification de l'alcool avec un acide aminé, en l'occurrence une N-Fmoc phénylalanine, est ensuite réalisé avec succès après activation de l'acide carboxylique avec du DIC catalysé par de la DMAP (molécule **58**, Figure 255).

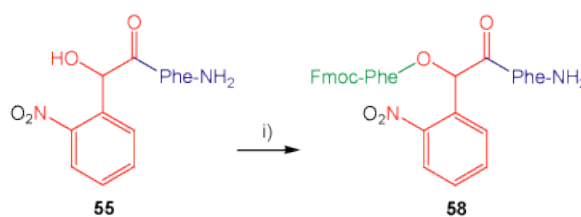


Figure 255 : Estérification de l'alcool secondaire du composé **55** : i) Fmoc-Phe-OH (1.4 eq.), DIC (2 eq.), DMAP (0.8 eq.), DCM anhydre (argon, 1h10, r.t.) ; purification par colonne chromatographique sur gel de silice (éluant : 50 % AcOEt/n-hexane ; Rdt = 95 %).

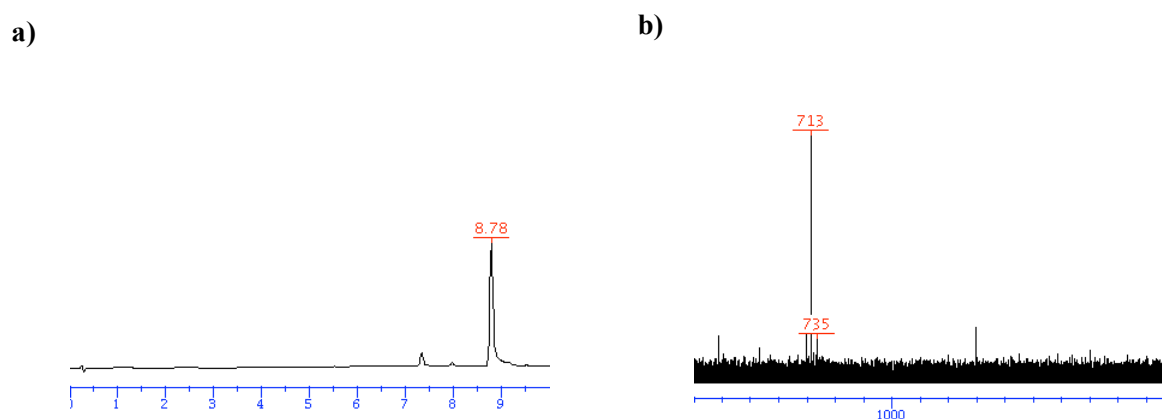


Figure 256 : Caractérisation du composé **58 a)** par RP-HPLC analytique C_{18} (gradient : 0 à 100 % B en 10 min) et **b)** par spectroscopie de masse ESI : 713 = $[M+H]^+$; 735 = $[M+Na]^+$.

Les deux « switch-peptides » **57** et **58**, tous deux bloqués à l'état S_{off} par la fonction nitro, sont ensuite dissouts dans une solution tampon à différents pH, échelonnés entre 7.1 et 8.6 (Figure 257, Tableau 30). Le contenu de chaque solution est ensuite analysé, à différents moments, par RP-HPLC analytique, ce qui nous permet de visualiser la présence de la forme ester ainsi que son hydrolyse. Au bout de 21 jours, nous évaluons, pour chaque « switch-peptide », la quantité des deux entités, hydrolysée et non-hydrolysée (Tableau 30). Ce travail nous permet de démontrer le gain de stabilité de l'ester benzylique, supérieure à 21 jours à pH 7.4, par rapport à l'ester phénolique, complètement dégradé en une vingtaine de minutes dans les mêmes conditions (Figure 247).

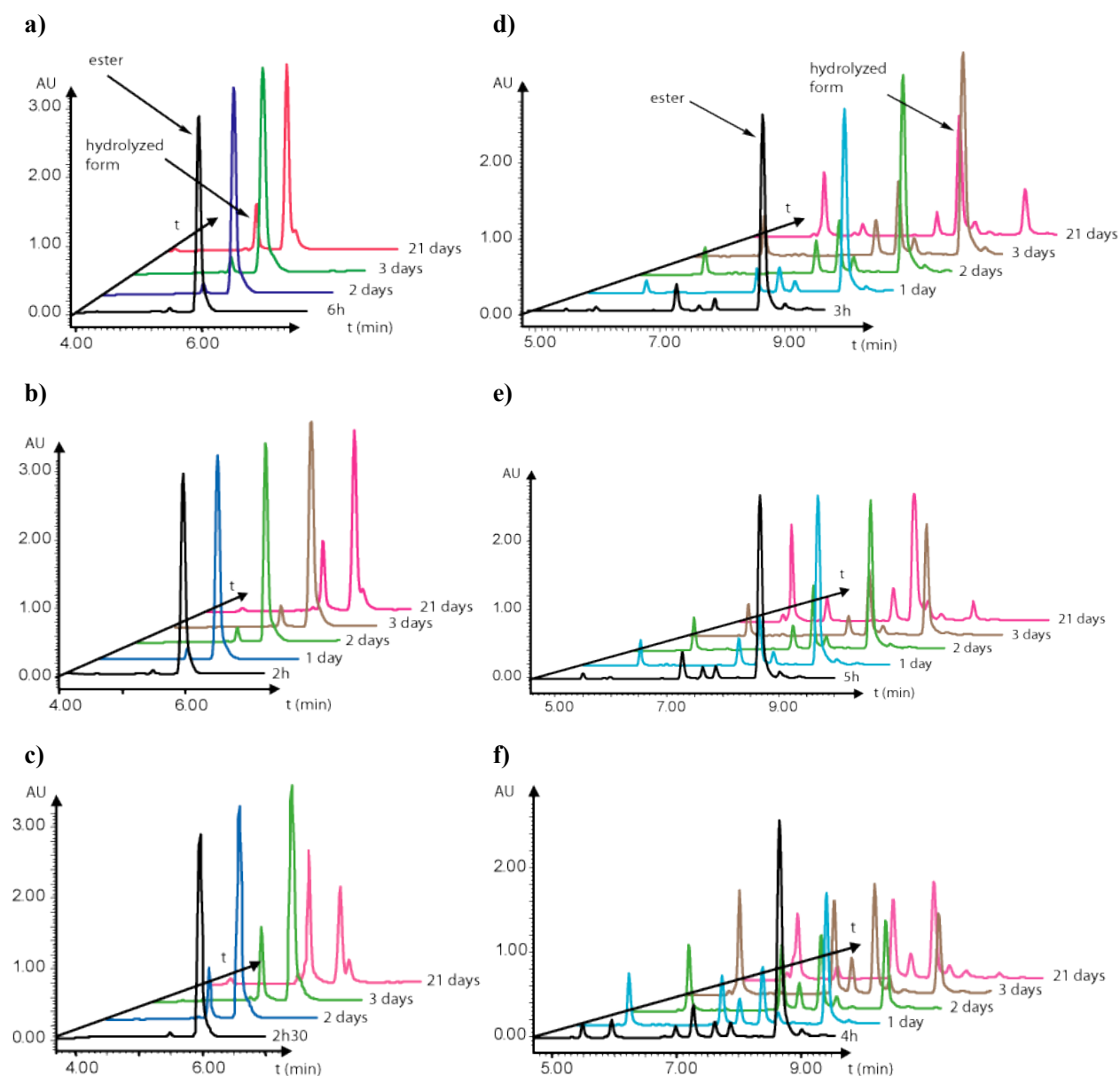


Figure 257 : Etude de stabilité du composé **57** à température ambiante et à **a) pH 7.1 ; b) pH 7.4 ; c) pH 8.6 ; idem avec le produit **58** à d) pH 7.1 ; e) pH 7.4 ; f) pH 8.6.**

Nous pouvons aussi établir une corrélation entre la valeur du pH et la dégradation de l'ester, moins stable à pH élevé. Enfin, l'acétyle est beaucoup plus stable que l'ester dérivé de la Fmoc-Phe-OH, avec 51 % de dégradation pour le premier à pH 8.6 et 99 % pour le second. L'acide ortho-aminomandélique possède ainsi tous les atouts d'un élément « switch » inducteur de coude.

Molécule testée	pH de la solution tampon	% d'ester hydrolysé après 21 jours à r.t.
Composé 57	7.1	15 %
	7.4	22 %
	8.6	51 %
Composé 58	7.1	84 %
	7.4	95 %
	8.6	99 %

Tableau 30 : Etude de la stabilité des esters des molécules **57** et **58** à r.t. : évaluation, par RP-HPLC analytique, du pourcentage de produit hydrolysé suivant le pH de la solution tampon utilisé.

Enfin, la molécule **55**, petite molécule aromatique, et les deux « switch-peptides » **57** et **58**, bloqués à l'état S_{off} , sont mélangés à de l'A β (13-23) (**4**) afin d'évaluer leur capacité d'inhibition de la fibrillogénèse de l'amyloïde β .

Nous préparons tout d'abord deux échantillons contenant le dérivé **55**, l'un formant un mélange équimolaire avec le peptide pathogène (échantillon **55S1**), le second montrant un excès de dix équivalents d'inhibiteur potentiel par rapport à l'amyloïde β (échantillon **55S2**, Tableau 31). Les deux solutions sont laissées à température ambiante le temps de leur incubation, puis leur contenu est analysé par microscopie optique après coloration au rouge Congo et microscopie électronique après coloration négative conventionnelle (Figure 258, Figure 259). La présence de fibrilles est détectée dès les premiers jours par les deux techniques et pour les deux échantillons.

Cette étude nous montre ainsi que le composé testé ne réduit pas de façon significative la nucléation des fibrilles d'amyloïde β .

Composé	Echantillon	Concentration	Nombre d'eq./ 4
55 + 4	55S1	400 μ M / 400 μ M	1 : 1
55 + 4	55S2	4 mM / 400 μ M	10 : 1

Tableau 31 : Composition des échantillons contenant le composé **55**.

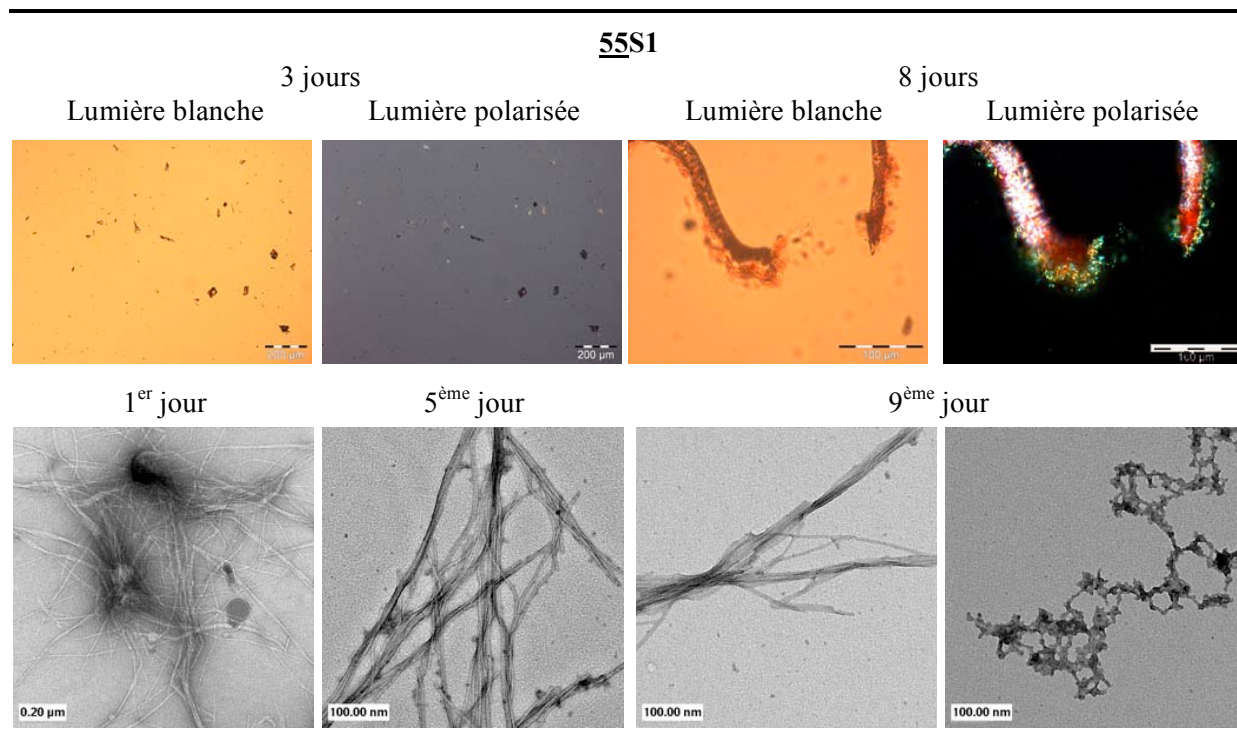


Figure 258 : Suivi de l'échantillon **55S1** par microscopie optique après coloration au rouge Congo (en haut) et par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (en bas) ; en haut : pas de fibrilles observées après 3 jours, mais présence détectée au bout de 8 jours ; en bas : formation de fibrilles dès le 1^{er} jour.

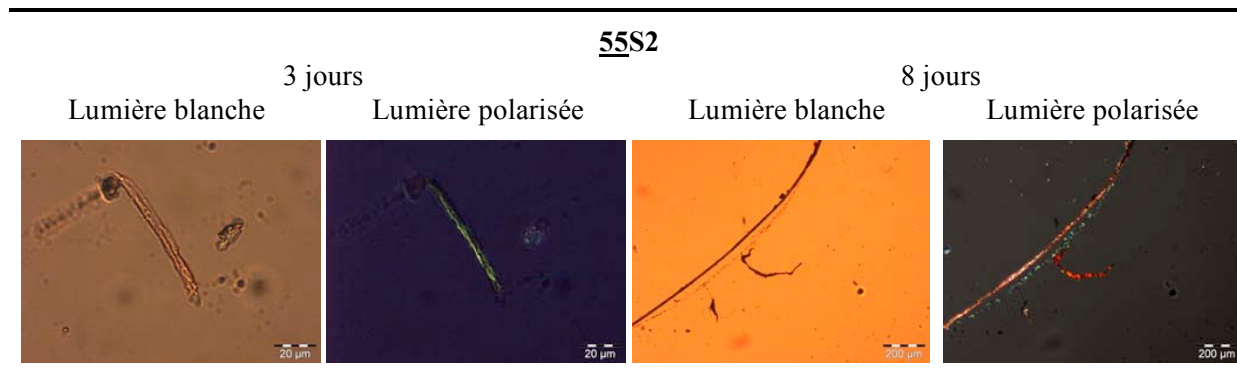


Figure 259 : Suivi de l'échantillon **55S2** par microscopie optique après coloration au rouge Congo: observation de la présence de fibrilles dès le 3^{ème} jour d'incubation.

Le dérivé acétylé **57** est alors évalué selon la même procédure. Nous préparons deux solutions, l'une contenant un équivalent d'A β (13-23) (échantillon **57S1**), la seconde correspondant à un excès de dix équivalents du « switch-peptide » à l'état S_{off} (Tableau 32).

Composé	Echantillon	Concentration	Nombre d'eq./ <u>4</u>
<u>57</u> + <u>4</u>	<u>57S1</u>	400 μ M / 400 μ M	1 : 1
<u>57</u> + <u>4</u>	<u>57S2</u>	4 mM / 400 μ M	10 : 1

Tableau 32 : Composition des échantillons contenant le « switch-peptide » 57 bloqué à l'état S_{off} .

Le premier échantillon, 57S1, montre la présence de fibrilles par microscopie optique après coloration au rouge Congo dès le troisième jour d'incubation (Figure 260). La microscopie électronique par coloration négative conventionnelle, quant à elle, nous prouve la formation de fibrilles dès le premier jour d'incubation de la solution étudiée.

Un excès de dix équivalents du « switch-peptide » 57 par rapport au peptide pathogène n'est guère plus efficace, puisque nous observons la présence de fibrilles dès trois jours d'incubation à température ambiante (Figure 261).

Nous en concluons ainsi que le composé testé ici n'a pas d'activité inhibitrice notable pour lutter contre la fibrillogénèse de l'amyloïde β .

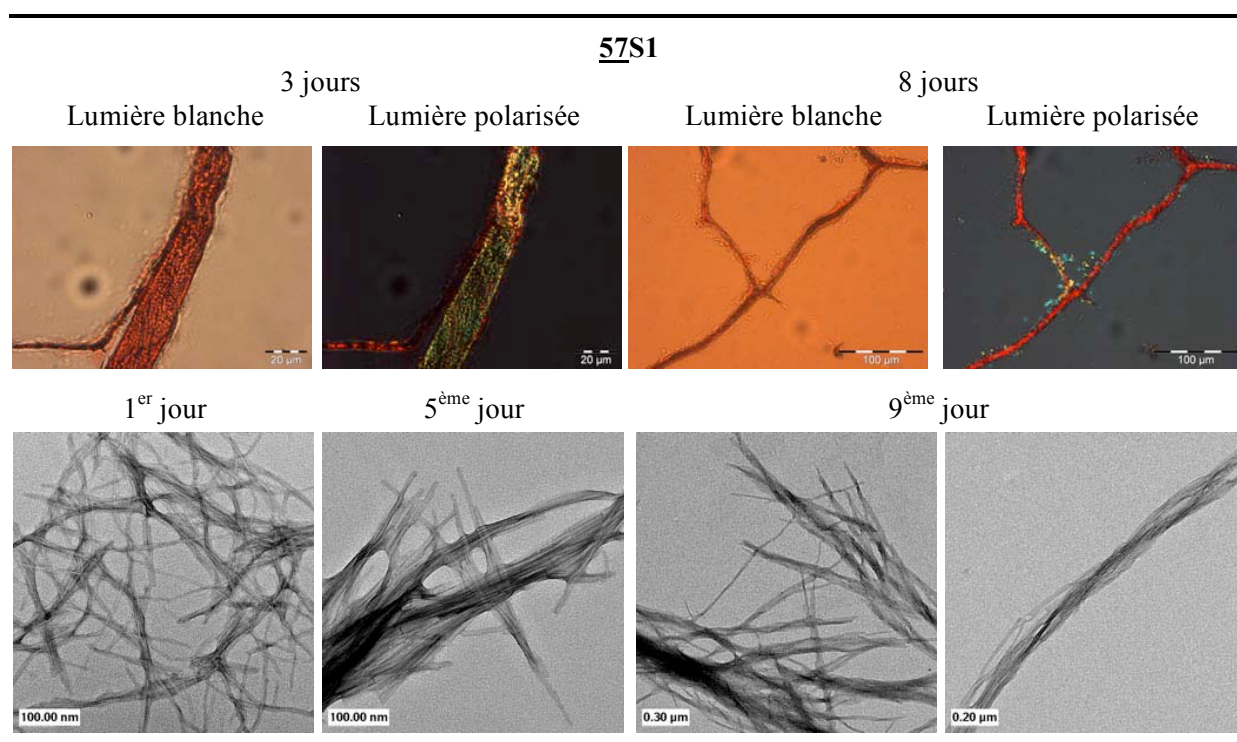


Figure 260 : Suivi de l'échantillon 57S1 par microscopie optique après coloration au rouge Congo (en haut) et par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (en bas) ; en haut : fibrilles observées dès 3 jours d'incubation (biréfringence vert-pomme sous une lumière polarisée) ; en bas : formation de fibrilles dès le 1^{er} jour.

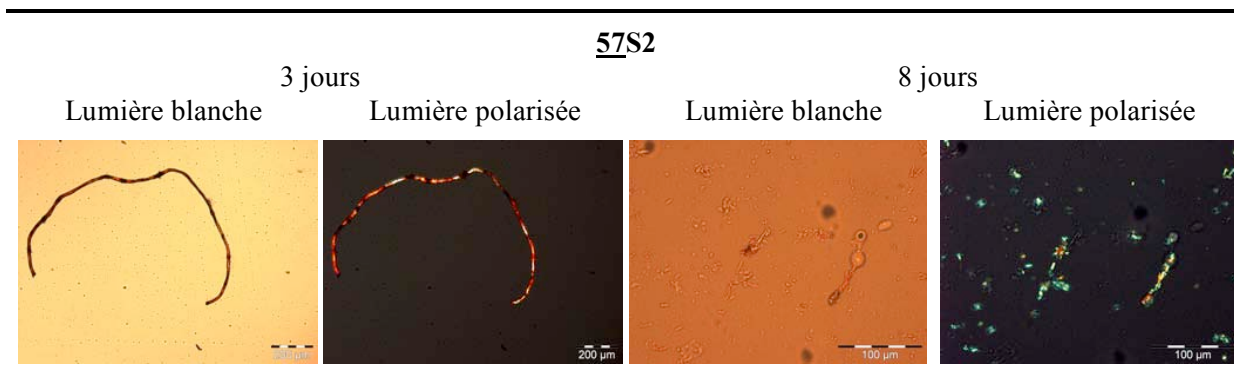


Figure 261 : Suivi de l'échantillon **57S2** par microscopie optique après coloration au rouge Congo: observation de la présence de fibrilles dès le 3^{ème} jour d'incubation (biréfringence vert-pomme sous une lumière polarisée).

Enfin, le « switch-peptide » **58** subit lui-aussi un test d'évaluation de l'activité inhibitrice potentielle de la fibrillogenèse de l'amyloïde β , dans les mêmes conditions que les deux autres dérivés de cette famille de composés (Tableau 33).

Composé	Echantillon	Concentration	Nombre d'eq./ 4
58 + 4	58S1	400 μ M / 400 μ M	1 : 1
58 + 4	58S2	4 mM / 400 μ M	10 : 1

Tableau 33 : Composition des échantillons contenant le « switch-peptide » **58** bloqué à l'état S_{off} .

Les remarques que nous pouvons faire en observant les photographies obtenues pour chacun des échantillons sont semblables à celles établies précédemment au cours de l'étude des deux autres composés. Nous remarquons cependant qu'il y a beaucoup moins de fibrilles détectées ici par microscopie électronique que dans les deux autres situations. Nous pouvons aussi noter la présence d'une certaine quantité de protofibrilles d'amyloïde β , structures quasi-absentes dans les autres échantillons étudiés auparavant.

A partir de ces observations, nous pouvons en déduire et supposer que la molécule **58** est légèrement plus active que ses analogues **55** et **57**. Cependant, nous ne pouvons considérer qu'elle bloque véritablement la fibrillogenèse de l'amyloïde β .

Ainsi, aucun des trois dérivés testés contenant l'acide 2-nitromandélique ne possède réellement une activité inhibitrice prononcée de cette amyloïdogenèse. Ce constat peut s'expliquer par l'absence d'une véritable séquence de reconnaissance de l'amyloïde β , induisant un manque de spécificité de la molécule testée envers le peptide pathogène, et par là-même un défaut d'inhibition.

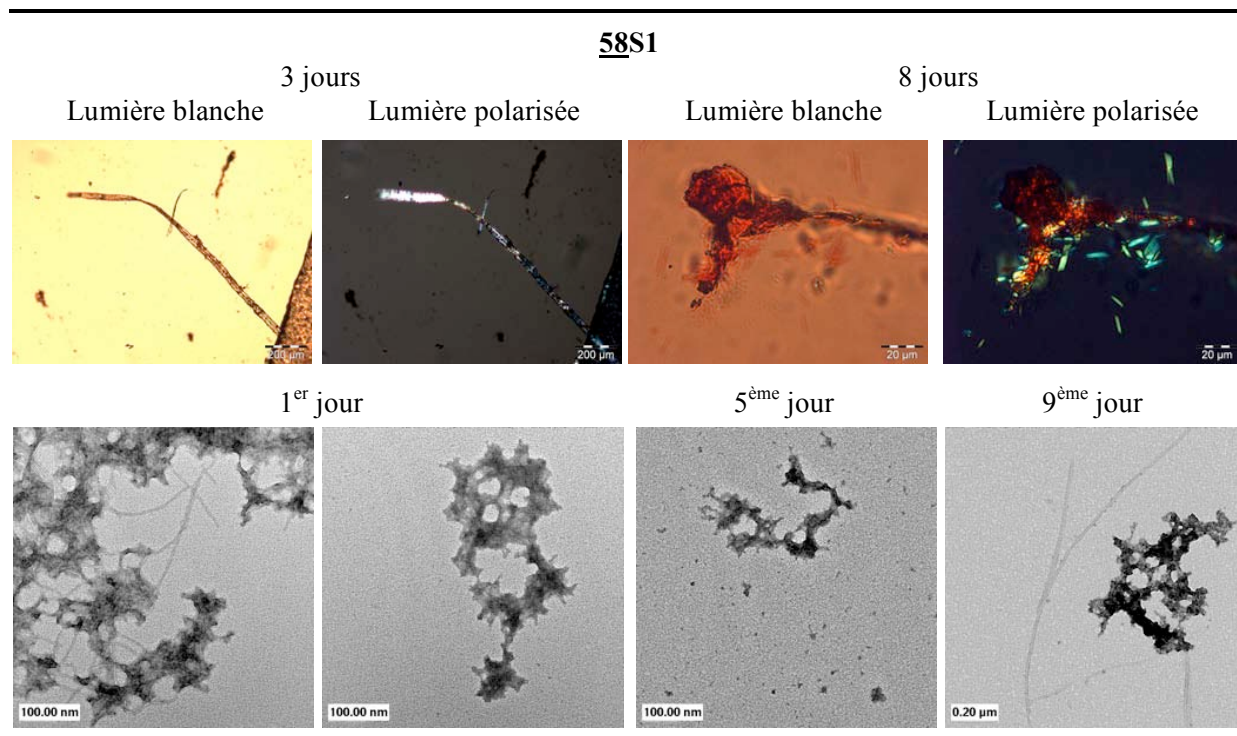


Figure 262 : Suivi de l'échantillon **58S1** par microscopie optique après coloration au rouge Congo (en haut) et par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (en bas) ; en haut : fibrilles observées dès 3 jours d'incubation ; en bas : formation de protofibrilles dès le 1^{er} jour, et observation de quelques filaments fibrillaires, mais en quantité bien moins importante que dans le cas des échantillons contenant les composés **55** et **57**.



Figure 263 : Suivi de l'échantillon **58S2** par microscopie optique après coloration au rouge Congo: observation de la présence de fibrilles dès le 3^{ème} jour d'incubation.

c. Synthèse directe de « switch-peptides » à l'état S_{on}

Les travaux réalisés sur les aromatiques trifonctionnalisés nous ont permis d'établir les bases d'une nouvelle génération d'éléments « switch » induisant un coude *in situ*. Il nous reste cependant quelques efforts à fournir avant d'avoir à notre disposition un élément « switch » fonctionnel, dérivant très certainement de l'acide ortho-aminomandélique, convenablement protégé, par exemple par un dipeptide

Lys-Pro clivable par l'enzyme DPPIV, et permettant une migration acylique intramoléculaire O→N ni trop lente, ni trop rapide. De plus, l'insertion de ce type de structure à l'état S_{off} dans un « switch-peptide » sur support solide n'est pas encore, à l'heure actuelle, une étape triviale. En effet, elle conduit généralement à la formation d'un ou plusieurs produits secondaires, ceci ayant pour conséquence l'obtention du produit désiré à l'état S_{off} avec des rendements de synthèse relativement faibles.

La synthèse de « switch-peptides » directement à l'état S_{on} et possédant un élément « switch » inducteur de coude présente plusieurs avantages :

- elle permet, dans un premier temps, de vérifier si les conditions d'introduction de l'élément « switch » dans une structure peptidique sont compatibles avec la synthèse sur support solide, tout en éliminant les problèmes liés à la présence de l'ester ;
- elle nous permet aussi de tester directement le réarrangement acylique intramoléculaire inverse N→O afin d'obtenir, peut-être plus facilement, le mime peptidique inactif correspondant à l'état S_{off} ;
- enfin, elle nous offre la possibilité d'évaluer dès maintenant l'efficacité du « switch-peptide » à l'état S_{on} en tant qu'inhibiteur potentiel d'amyloïdogénèse, en mélangeant la molécule à tester à l'amyloïde β (13-23) (**4**) ; cela nous permettra ainsi d'avoir une référence avant d'apprécier l'activité de son analogue « switch-peptide » pouvant se réarranger de l'état S_{off} à l'état S_{on}.

Les recherches menées sur l'acide ortho-aminomandélique n'étant pas encore totalement abouties, nous allons utiliser ici, comme élément « switch » inducteur de coude, deux aromatiques trifonctionnalisés commerciaux, l'acide 3-hydroxyanthranilique, avec lequel nous avons déjà travaillé (Chapitre 4.2.a.), et l'acide 3-hydroxy-4-aminobenzoïque.

Les « switch-peptides », dont nous allons expliciter la synthèse au cours de ce paragraphe, intégreront alors l'un de ces deux éléments « switch », plus, en position C-terminale, la courte séquence de reconnaissance de l'amyloïde β Phe-Phe-Asp-NH₂, et en position N-terminale, une leucine, correspondant à l'acide aminé naturel 17 de l'amyloïde β (1-42).

Lors de la synthèse du premier « switch-peptide » à l'état S_{on} de cette série, nous allons utiliser l'acide 3-hydroxyanthranilique comme élément « switch ». Bien qu'en SPPS, il ne soit pas de mise de coupler des blocs possédant des fonctions organiques libres pouvant causer un certain nombre de réactions secondaires³⁴⁵, nous allons employer directement le dérivé aromatique trifonctionnalisé sans aucune protection et adapter nos conditions de couplage à la réactivité de chacun des groupes fonctionnels de cette molécule. Cela nous permettra ainsi de gagner du temps sur les étapes de protection-déprotection nécessaires à la préparation d'un synthon convenablement protégé.

La séquence H-Phe-Phe-Asp(OtBu) est construite au fur et à mesure en suivant une stratégie Fmoc/tBu (Figure 264). L'acide 3-hydroxyanthranilique est couplé à l'amine N-terminale de la seconde phénylalanine après avoir activé l'acide carboxylique du résidu aromatique avec du PyBOP, selon les procédures standards de la SPPS. La réaction se fait à l'abri de la lumière afin d'éviter les dégradations éventuelles de la molécule trifonctionnalisée. Un seul couplage est nécessaire pour attacher l'élément « switch » à la séquence de reconnaissance de l'amyloïde β , ce qui nous permet de limiter les réactions secondaires pouvant se faire sur l'amine aromatique. La Boc-Leu-OH est ensuite couplée *via* une activation au PyBOP. Le « switch-peptide » ainsi synthétisé est ensuite déprotégé et clivé de la résine après traitement avec une solution contenant 95 % de TFA, 2.5 % de TIS et 2.5 % d'eau. Cette étape permet aussi de libérer l'amine de la leucine, d'introduire une charge positive supplémentaire sur le « switch-peptide » et ainsi d'augmenter la solubilité aqueuse de la molécule potentiellement bioactive. Le mîme peptidique **59** est ensuite purifié par RP-HPLC semi-préparative pour conduire au produit pur avec un rendement de 17 % (Figure 265a).

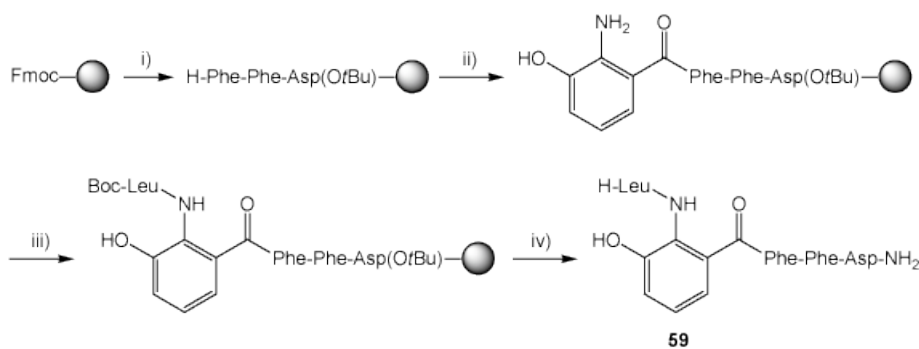
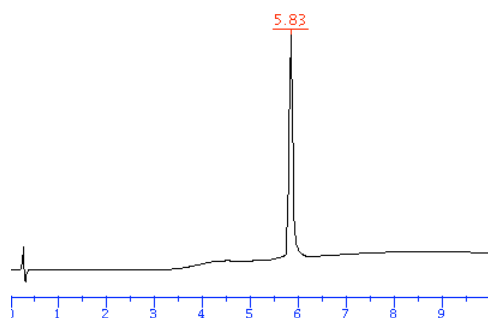


Figure 264 : Synthèse du « switch-peptide » **59**, avec élément « switch » inducteur de coude à l'état S_{on} : i) SPPS sur résine Rink Amide MBHA en stratégie Fmoc/tBu ; ii) introduction de l'acide 3-hydroxyanthranilique : PyBOP (1.5 eq.), DIPEA (3 eq.), DCM (obscurité, 50 min, r.t.) ; iii) formation d'une liaison amide entre la Boc-Leu-OH.1/2 H_2O (2 eq.) et l'amine du cycle aromatique avec activation au PyBOP (2 eq.) (1h, r.t.) ; iv) déprotection et clivage du « switch-peptide » de la résine (TFA/TIS/ H_2O ; 95 : 2.5 : 2.5 ; v/v/v ; 1h30, r.t.) ; purification par RP-HPLC C_{18} semi-préparative (gradient : 20 à 50 % B en 30 min) ; Rdt = 17 %.

a)



b)

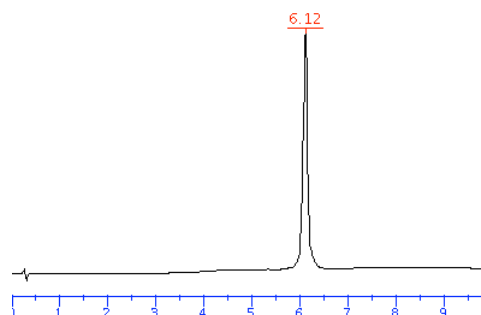


Figure 265 : Caractérisation, par RP-HPLC analytique C_{18} (gradient : 0 à 100 % B en 30 min) : a) du composé **59** et b) du produit secondaire majoritaire, correspondant au dérivé aspartimide.

Le produit secondaire majoritaire est lui aussi isolé puis analysé par RP-HPLC analytique et spectroscopie de masse ESI (Figure 265b). Son temps de rétention montre qu'il est plus hydrophobe que le produit **59**, quant à sa masse ($[M+H]^+ = 657$), elle correspond à une perte de 18 par rapport à celle du composé **59** ($[M+H]^+ = 675$). Il est donc fortement probable que ce produit secondaire est dû à la formation d'aspartimide, réaction secondaire souvent observée lors de synthèses sur support solide³⁴⁶.

Un essai de réarrangement acylique intramoléculaire N→O est réalisé sur le composé **59** (Figure 266). La molécule est dissoute dans une solution 1 M d'acide méthane sulfonique dans du dioxane anhydre, elle est mélangée à du tamis moléculaire chargé de capturer toutes traces d'eau pouvant conduire à l'hydrolyse du composé **47**, puis elle est chauffée à 37°C sous argon. L'avancement de la réaction est suivi en analysant, par RP-HPLC analytique et spectroscopie de masse ESI, des échantillons directement prélevés du milieu réactionnel (Figure 267). Nous observons alors l'apparition du composé **47** sous forme de traces, mais nous notons principalement la dégradation des produits de départ et d'arrivée au bout de trois jours (Figure 267c). La molécule **59** est donc trop sensible pour conduire au produit à l'état S_{off} via une migration acylique intramoléculaire N→O.

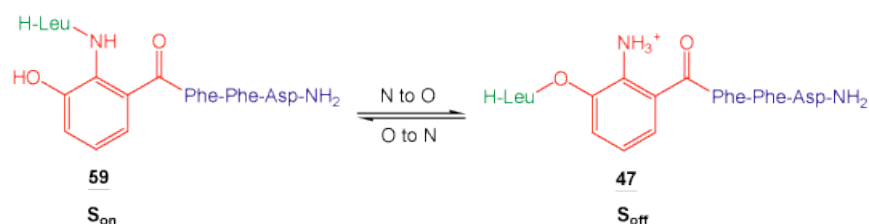


Figure 266 : Migration acylique intramoléculaire N→O appliquée au « switch-peptide » **59** (état S_{on}) et conduisant au composé **47** à l'état S_{off} : 1 M d'acide méthane sulfonique dans le dioxane anhydre (0.1 M), tamis moléculaire, argon, 37°C ; élément migrateur en vert, élément « switch » en rouge, séquence de reconnaissance en bleu.

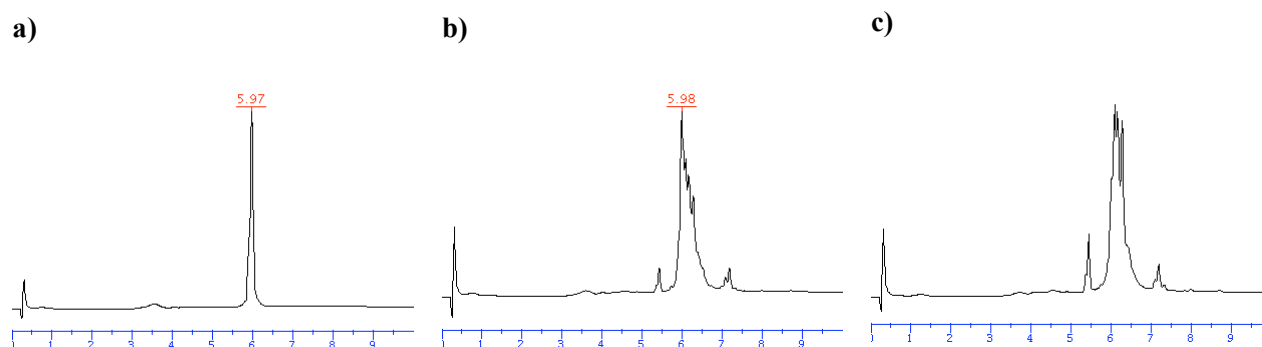


Figure 267 : Suivi, par RP-HPLC analytique C_{18} (gradient : 0 à 100 % B en 10 min), de la migration acylique intramoléculaire N→O du composé **59** : **a)** à $t = 0$; **b)** à $t = 1$ jour ; **c)** à $t = 3$ jours : produit **47** à 5.5 min ; dégradation majoritaire au bout de 3 jours.

Afin d'augmenter la stabilité, tant enzymatique que chimique, du « switch-peptide » **59**, l'amine N-terminale de la leucine peut être acétylée. Pour cela, le composé correspondant **60** est synthétisé sur une résine Rink Amide MBHA en suivant la même procédure que pour le produit **59** (Figure 268). La Boc-leucine est couplée à l'amine du cycle aromatique, puis le groupement Boc est clivé sur la résine après le traitement de la molécule avec une solution contenant 50 % d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane. L'amine libre est ensuite acétylée suivant les conditions standards, avant que le peptide ne soit déprotégé et clivé de la résine avec une solution de 95 % de TFA, 2.5 % de TIS et 2.5 % d'eau. L'analyse du brut réactionnel par RP-HPLC analytique et spectroscopie de masse ESI révèle entre autres la présence majoritaire du composé non-acétylé **59** (pic à 18.4 min), celle du produit désiré **60** (pic à 20.2 min) et celle du dérivé aspartimide acétylé (pic à 21.6 min) (Figure 269a).

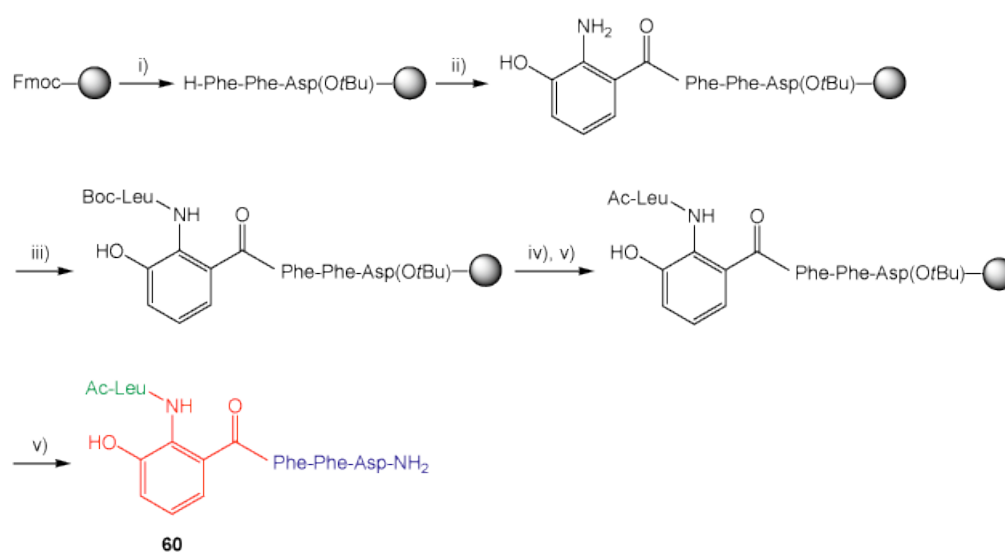


Figure 268 : Synthèse du « switch-peptide » **60**, avec élément « switch » inducteur de coude à l'état S_{on} : i) SPPS sur résine Rink Amide MBHA en stratégie Fmoc/tBu ; ii) introduction de l'acide 3-hydroxyanthranilique : PyBOP (1.5 eq.), DIPEA (3 eq.), DCM (obscurité, 50 min, r.t.) ; iii) formation d'une liaison amide entre la Boc-Leu-OH.1/2 H_2O (2 eq.) et l'amine du cycle aromatique avec activation au PyBOP (2 eq.) (1h, r.t.) ; iv) clivage du Boc : 50 % TFA/DCM (30 min, r.t.) ; v) acétylation ; vi) déprotection et clivage du « switch-peptide » de la résine (TFA/TIS/ H_2O ; 95 : 2.5 : 2.5 ; v/v/v ; 1h30, r.t.) ; purification par RP-HPLC C_{18} semi-préparative (gradient : 20 à 50 % B en 30 min, puis 30 à 60 % B en 30 min) ; Rdt = 2 % ; élément migrateur en vert, élément « switch » en rouge, séquence de reconnaissance en bleu.

Le produit brut est ensuite purifié par deux RP-HPLC semi-préparatives consécutives pour conduire au « switch-peptide » **60** pur avec un rendement de 2 %, qui s'explique par le nombre de réactions secondaires et les difficultés pour isoler la molécule (Figure 269b).

La quantité de produit pur obtenu ne nous permettant pas de tester et la migration acylique intramoléculaire N→O, et l'activité inhibitrice de la fibrillogénèse de l'amyloïde β , nous avons décidé de conserver la molécule **60** afin de tester son potentiel biologique. Les résultats de cette étude seront présentés un peu plus loin dans ce paragraphe.

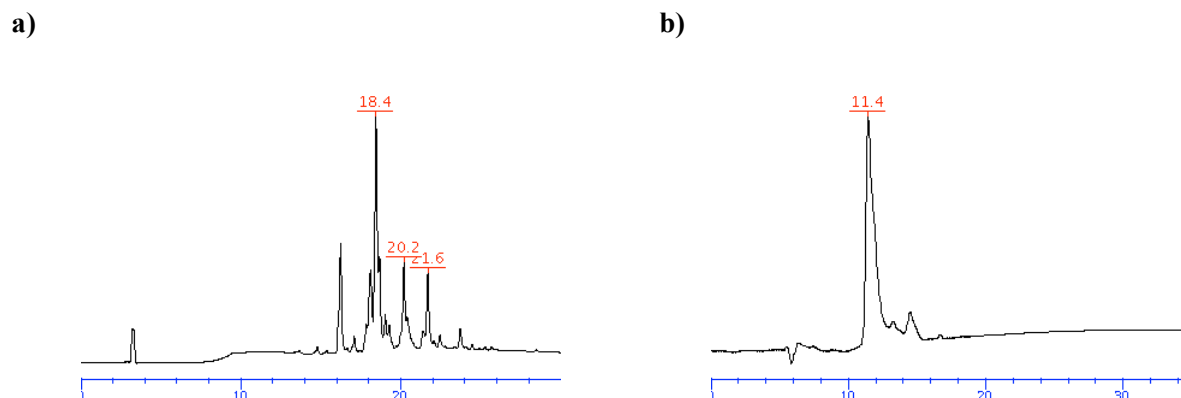


Figure 269 : Caractérisation, par RP-HPLC analytique C_{18} (gradient: 0 à 100 % B en 30 min) : **a)** du composé **60** brut (composé non acétylé **59** à 18.4 min, composé **60** à 20.2 min, dérivé aspartimide à 21.6 min) ; **b)** du composé **60** après purification (gradient : 40 à 100 % B en 30 min ; $R_t = 11.4$ min).

L'analogue du « switch-peptide » **59** intégrant, comme élément « switch », l'acide 3-amino-4-hydroxybenzoïque est synthétisé sur une résine Rink Amide MBHA d'une façon similaire à celle utilisée pour obtenir le composé **59** (Figure 264, Figure 270). Au vu des difficultés rencontrées au cours de la synthèse du « switch-peptide » acétylé **60**, nous avons choisi d'obtenir et tester tout d'abord le produit non protégé **61** avant de décider s'il était intéressant d'avoir à notre disposition son analogue N-acétylé. Le chromatogramme correspondant au brut du composé **61** analysé par RP-HPLC analytique nous montre que cette synthèse est elle-aussi sujette à de nombreuses réactions secondaires, conduisant notamment à la formation d'aspartimide (Figure 271a). Le produit est ensuite purifié par une RP-HPLC préparative puis par une RP-HPLC semi-préparative pour conduire à la molécule désirée avec un rendement relativement faible de 5 % (Figure 271b).

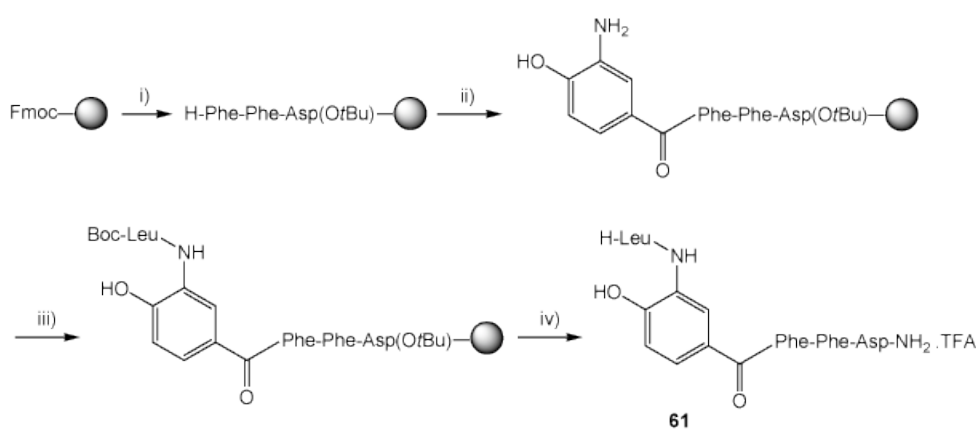


Figure 270 : Synthèse du « switch-peptide » **61**, avec élément « switch » inducteur de coude à l'état S_{on} : i) SPPS sur résine Rink Amide MBHA en stratégie Fmoc/tBu ; ii) introduction de l'acide 3-hydroxy-4-aminobenzoïque (1.5 eq.) sur la résine après activation avec du PyBOP (1.5 eq.) en présence de DIPEA (3 eq.) ; iii) formation de la liaison amide entre la Boc-Leu-OH.1/2 H_2O (2 eq.) et l'amine du cycle aromatique via une activation au PyBOP (2 eq.) ; iv) déprotection et clivage du « switch-peptide » de la résine (TFA/TIS/ H_2O ; 95 : 2.5 : 2.5 ; v/v/v ; 1h30, r.t.) ; purification par RP-HPLC préparative C_{18} (20 à 50 % B en 30 min) puis semi-préparative (20 à 50 % B en 30 min) ; $R_{dt} = 5$ %.

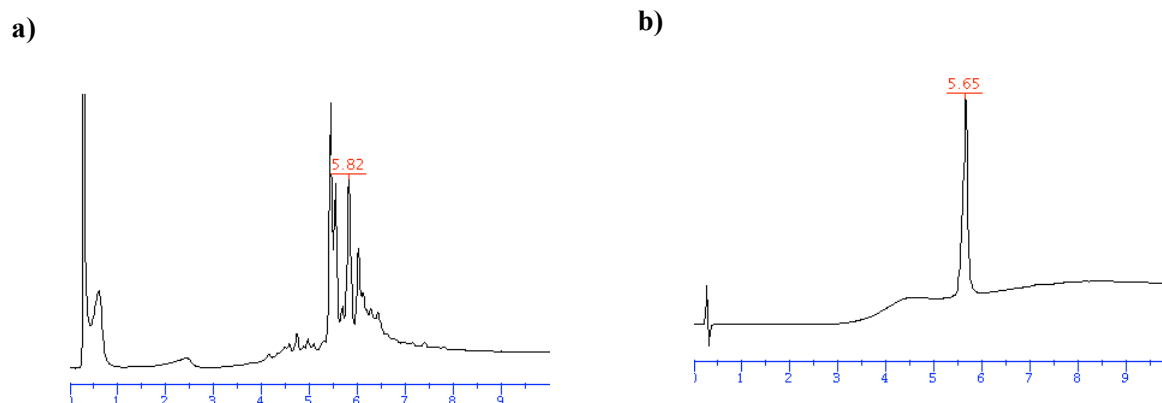


Figure 271 : Caractérisation, par RP-HPLC analytique C_{18} (gradient : 0 à 100 % B en 10 min), du composé **61** : **a)** brut ; **b)** après purification ($R_t = 5.7$ min).

Un essai de migration acylique intramoléculaire N→O est réalisé sur le composé **61**. Pour cela, la molécule à l'état S_{on} est dissoute à 0.1 M dans une solution 1 M d'acide méthane sulfonique dans du dioxane anhydre, sous argon et sur tamis moléculaire, afin d'éviter tout risque d'hydrolyse du composé à l'état S_{off} **62** en milieu acide. Le milieu réactionnel est alors chauffé à 37°C, son contenu étant suivi grâce à l'analyse d'échantillons par RP-HPLC analytique (Figure 273). Au bout de 21h30, il ne reste pratiquement plus de produit de départ (**61**, r.t. = 5.7 min). Après une journée d'agitation à température physiologique, la réaction conduit à un produit pur correspondant au « switch-peptide » à l'état S_{off} **62** (r.t. = 5.4 min), et ce avec un temps de demi-vie de 2h34 (Figure 273b et c).

Ainsi, alors que la synthèse du « switch-peptide » **61** intégrant l'acide 3-amino-4-hydroxybenzoïque est plus délicate que celle de son analogue **59** utilisant l'acide 3-hydroxyanthranilique comme élément « switch », la migration acylique intramoléculaire N→O fonctionne mieux dans le cas du composé **61** que dans celui du composé **59**. L'insertion du « switch » aromatique acide 3-amino-4-hydroxybenzoïque conduit donc à un produit beaucoup plus stable dans les conditions expérimentales utilisées que dans le cas de l'autre élément « switch » inducteur de coude.

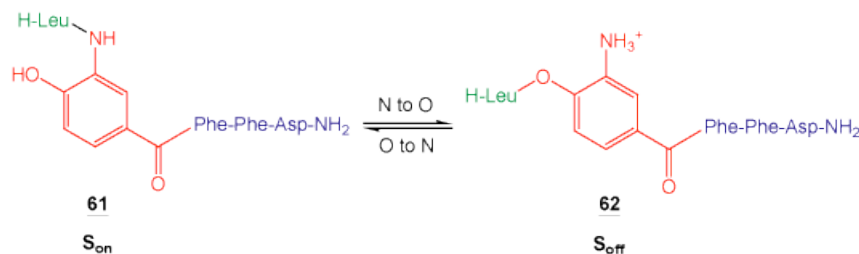


Figure 272 : Migration acylique intramoléculaire N→O appliquée au « switch-peptide » **61**, intégrant un élément « switch » inducteur de coude à l'état S_{on} et conduisant au composé **62** : solution 1 M d'acide méthane sulfonique dans le dioxane anhydre (0.1 M), tamis moléculaire, argon, 37°C ; élément migrateur en vert, élément « switch » en rouge, séquence de reconnaissance en bleu.

La seule différence entre les deux composés aromatiques ne concerne en fait que la position de l'acide carboxylique par rapport à l'hydroxyle, en position méta dans le cas de l'acide 3-hydroxyanthranilique et en para pour l'acide 3-amino-4-hydroxybenzoïque. L'influence de l'acide carboxylique sur l'ester de la forme S_{on} via le cycle aromatique et ses effets mésomères permettent d'expliquer les stabilités relatives des « switch-peptides » correspondants.

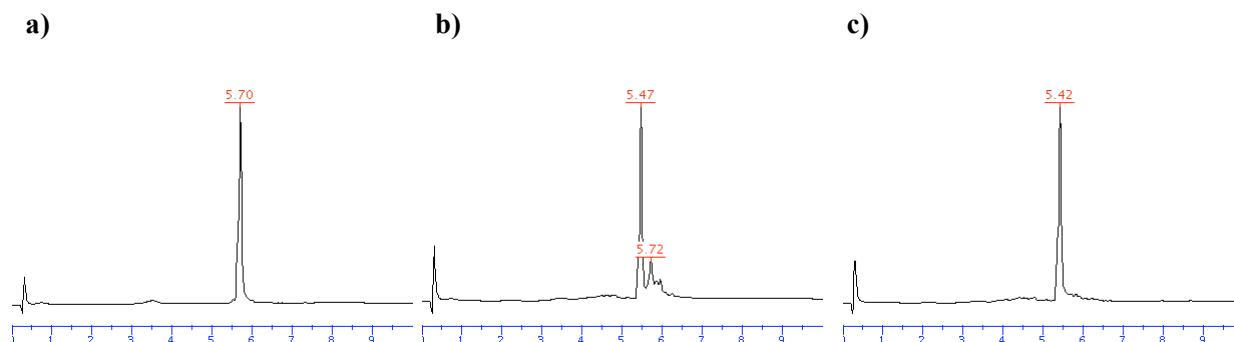


Figure 273 : Suivi, par RP-HPLC analytique C_{18} (gradient : 0 à 100 % B en 10 min), du réarrangement acyclique intramoléculaire $N \rightarrow O$ de la molécule **61** (état S_{on}), conduisant au composé **62** (état S_{off}) : **a**) à $t = 0$; **b**) à $t = 21h30$; **c**) à $t = 1$ jour ; réarrangement total après une journée ; $t_{1/2} = 2h34$ min.

La position de l'acide carboxylique par rapport à l'amine détermine aussi l'angle entre la séquence de reconnaissance Phe-Phe-Asp et l'élément migrateur H-Leu. Cet angle est ainsi plus petit dans le cas de l'acide 3-hydroxyanthranilique qu'avec l'acide 3-amino-4-hydroxybenzoïque. Ce constat peut alors avoir une influence non négligeable sur l'efficacité de la reconnaissance du « switch-peptide » par l'amyloïde β et un impact déterminant sur son activité inhibitrice de l'amyloïdogenèse.

Les trois « switch-peptides » à l'état S_{on} **59**, **60** et **61** sont alors mélangés à de l'amyloïde β (13-23) (**4**) et suivis, après incubation à température ambiante, par microscopie électronique après coloration négative conventionnelle et microscopie optique après coloration au rouge Congo. L'étude et la comparaison du comportement de chacune de ces trois molécules nous permettra alors de déterminer leur potentiel en tant qu'inhibiteur de la fibrillogenèse de l'amyloïde β .

Nous préparons trois échantillons avec le « switch-peptide » **59**. Le premier (**59S1**) contient 4 équivalents d'A β (13-23), le deuxième (**59S2**) correspond à un mélange équimolaire, quant au troisième (**59S3**), il correspond à un excès de 5 équivalents de la molécule à tester (Tableau 34).

Composé	Echantillon	Concentration	Nombre d'eq./ <u>4</u>
<u>59</u> + <u>4</u>	<u>59S1</u>	100 µM / 400 µM	0.25 : 1
<u>59</u> + <u>4</u>	<u>59S2</u>	400 µM / 400 µM	1 : 1
<u>59</u> + <u>4</u>	<u>59S3</u>	2 mM / 400 µM	5 : 1

Tableau 34 : Composition des échantillons contenant le « switch-peptide » 59 à l'état S_{on} .

Dans chacun des trois échantillons, la présence de fibrilles amyloïdes est détectée dès trois jours d'incubation par la méthode de coloration au rouge Congo (Figure 274, Figure 275 et Figure 276). Nous remarquons cependant qu'elles se regroupent sous forme de petits morceaux, révélés en vert sous une lumière polarisée, plutôt que sous forme de filaments, semblables à ceux que nous avons observés dans les échantillons contenant les « switch-peptides » de la première génération 21 et 23 (Résultats et Discussion, Chapitre 3.I.5. Evaluation biologique des « switch-peptides »).

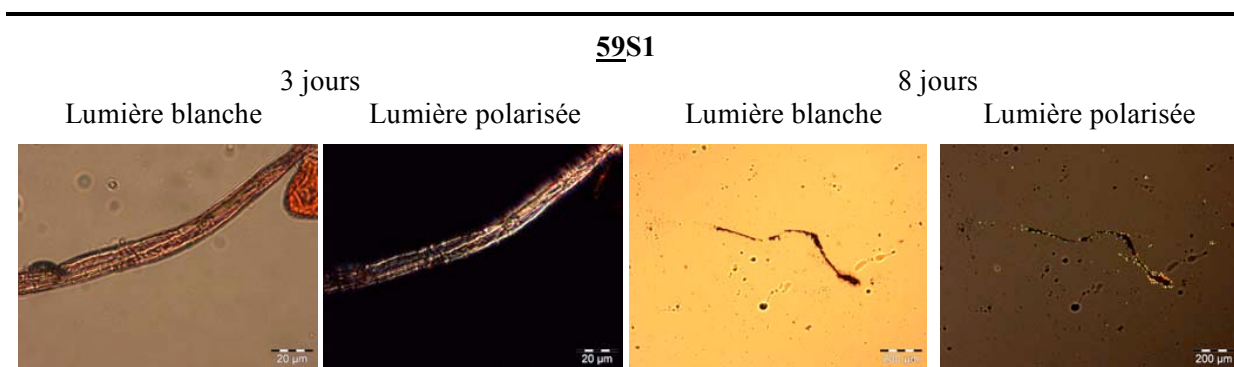


Figure 274 : Suivi de l'échantillon 59S1 par microscopie optique après coloration au rouge Congo : présence de structures amyloïdes détectées dès 3 jours d'incubation (coloration verte sous une lumière polarisée).

Dans le cas de l'échantillon 59S3, la solution peptidique est suivie par microscopie électronique, ce qui nous permet d'observer la formation de protofibrilles dès le premier jour d'incubation et de confirmer la présence de fibrilles amyloïdes après au moins cinq jours d'incubation à température ambiante (Figure 275).

Le « switch-peptide » 59 n'a donc pas un effet inhibiteur marqué de la fibrillogénèse de l'Aβ(13-23) (4), résultat auquel nous pouvions nous attendre, dans la mesure où la molécule est déjà sous la forme d'un coude qui l'empêche de se mêler convenablement au peptide pathogène en cours d'agrégation. En effet, le même problème avait été rencontré par C. Boissard *et al* lors de l'évaluation biologique de ses inhibiteurs potentiels intégrant une pseudo-proline bloquée en conformation *cis*^{247, 249} (Résultats et Discussion - Chapitre 1 - 1. Considérations générales). Ce constat ne fait ainsi que renforcer l'intérêt pour le concept des « switch-peptides ».

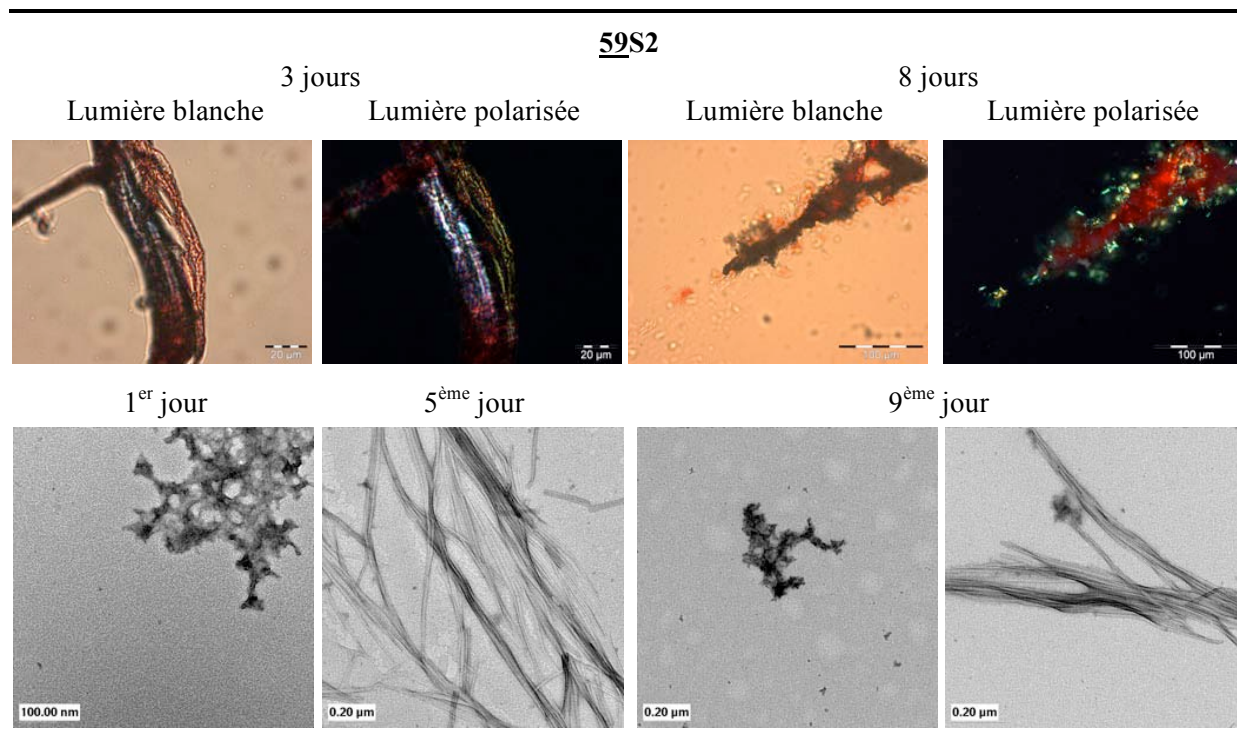


Figure 275 : Suivi de l'échantillon **59S2** par microscopie optique après coloration au rouge Congo (en haut) et par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (en bas) : en haut : présence de fibrilles dès trois jours d'incubation à r.t. (coloration verte sous une lumière polarisée) ; en bas : présence de protofibrilles au bout du premier jour, restant présentes en faible quantité après 9 jours d'incubation et laissant la place à des fibrilles (5^{ème} jour et 9^{ème} jour).

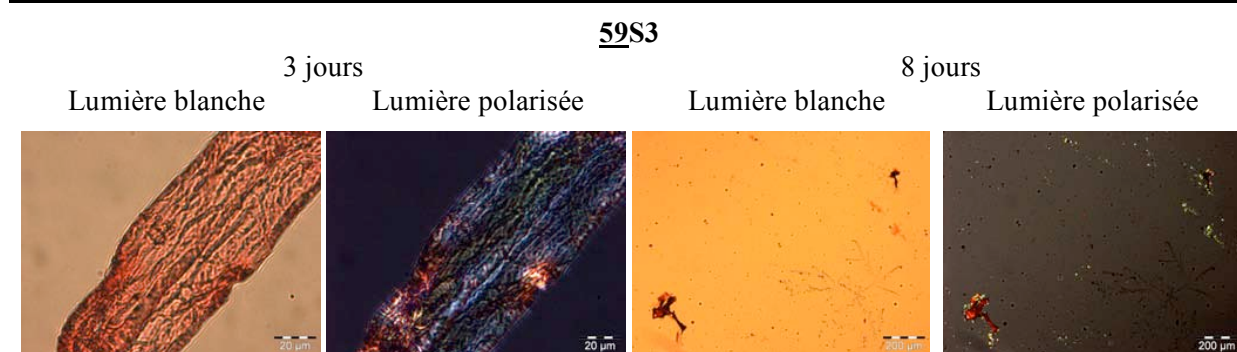


Figure 276 : Suivi de l'échantillon **59S3** par microscopie optique après coloration au rouge Congo : observation de fibrilles dès le 3^{ème} jour d'incubation (coloration verte sous une lumière polarisée).

Le « switch-peptide » à l'état S_{on} **60**, dont l'amine N-terminale de la leucine est acétylée, est mélangé à l'Aβ(13-23) **4** selon un rapport 1 pour 4 en faveur du peptide pathogène (Tableau 35).

Composé	Echantillon	Concentration	Nombre d'eq./ 4
60 + 4	60S1	100 μM / 400 μM	0.25 : 1

Tableau 35 : Composition de l'échantillon contenant le composé **60**.

La solution peptidique est laissée à température ambiante pour y être incubée. Elle est ensuite analysée à différents moments par microscopie optique après coloration au rouge Congo (Figure 277). Cette méthode ne détecte aucune fibrille au bout de trois jours d'incubation, par contre, au bout de huit jours, elle révèle la présence de petits amas rouges sous une lumière blanche, se colorant en vert sous une lumière polarisée. Mais, contrairement à ce que nous voyons généralement avec cette technique, aucun filament n'est observé dans l'aliquot étudié, résultat similaire à ceux obtenu avec la molécule **59**.

Ainsi, il semble que le « switch-peptide » **60** ait une certaine efficacité pour bloquer la fibrillogénèse de l'amyloïde β (13-23) (**4**), et ce malgré le fait que le peptide pathogène soit en excès par rapport au produit **60**. D'autres analyses seront donc nécessaires afin de confirmer l'activité inhibitrice de cette molécule à différentes concentrations, tout en utilisant d'autres techniques de détection d'amyloïdes telles que la microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle.

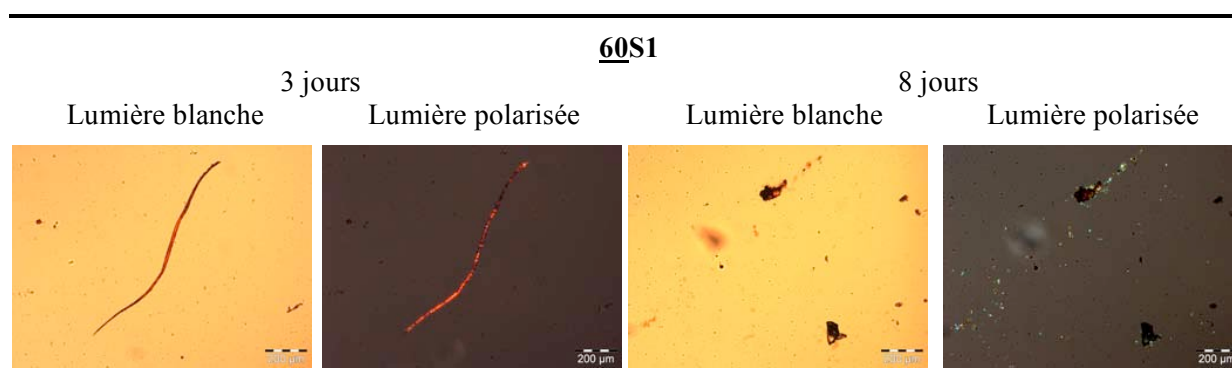


Figure 277 : Suivi de l'échantillon **60S1** par microscopie optique après coloration au rouge Congo : aucune fibrille n'est observée au bout de trois jours d'incubation, cependant nous observons la présence de structures amyloïdes clairsemées après huit jours d'incubation.

Enfin, le « switch-peptide » **61**, à l'état S_{on} et intégrant l'élément « switch » inducteur de coude acide 3-amino-4-hydroxybenzoïque, est testé de la même façon que les composés **59** et **60** (Tableau 36).

Composé	Echantillon	Concentration	Nombre d'eq./ 4
61 + 4	61S1	400 μ M / 400 μ M	1 : 1
61 + 4	61S2	2 mM / 400 μ M	5 : 1

Tableau 36 : Composition des échantillons contenant le « switch-peptide » **61** à l'état S_{on} .

L'échantillon **61S1**, correspondant à un mélange équimolaire entre le composé **61** et le peptide amyloïde $A\beta$ (13-23) (**4**) est laissé à température ambiante. Au bout de trois jours, la coloration au rouge Congo révèle la présence de fibrilles colorées en rouge sous une lumière blanche et en vert sous une lumière

polarisée (Figure 278). La microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle montre la présence de protofibrilles dès le premier jour d'incubation, qui évoluent pour former des fibrilles matures (5^{ème} jour), pour finalement disparaître et laisser une place exclusive aux structures amyloïdes (9^{ème} jour) qui prennent l'aspect de filaments au microscope optique (Figure 278).

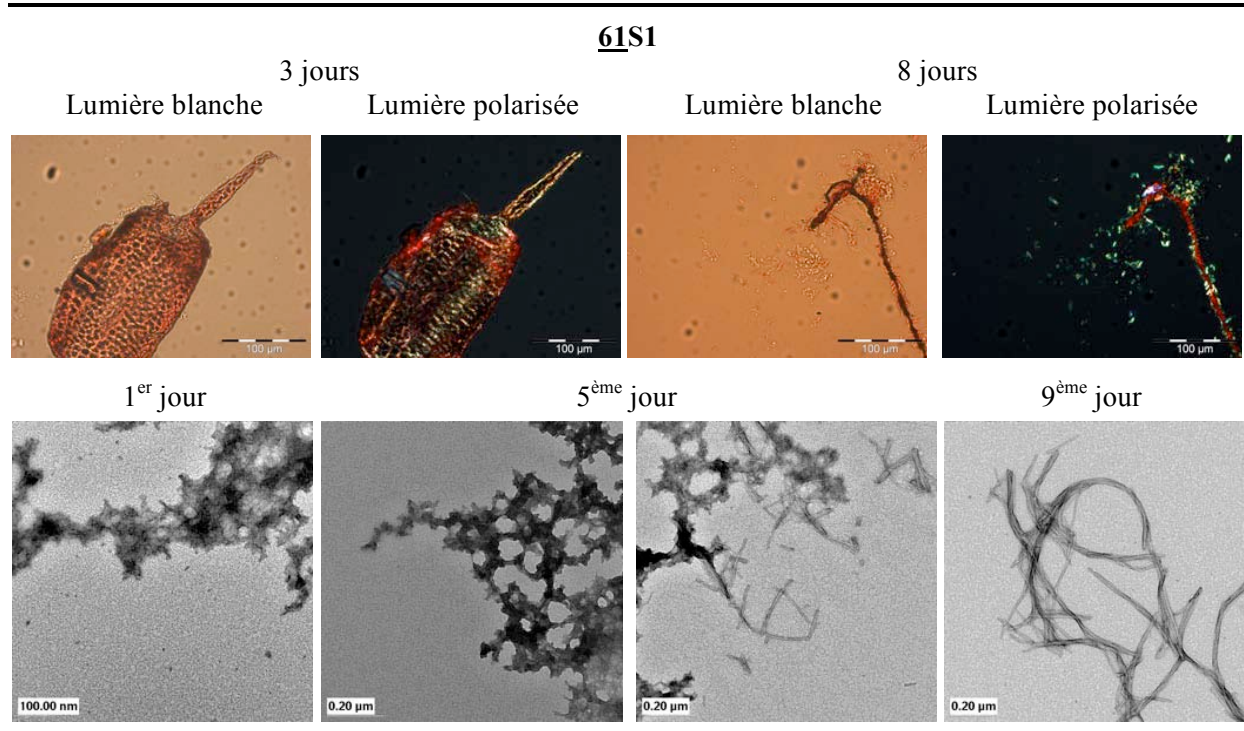


Figure 278 : Suivi de l'échantillon **61S1** par microscopie optique après coloration au rouge Congo (en haut) et par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle (en bas) ; en haut : présence de fibrilles dès 3 jours d'incubation (coloration verte sous une lumière polarisée) ; en bas : présence de protofibrilles le 1^{er} jour d'incubation, qui se transforment en fibrilles partiellement au bout de 5 jours et totalement au bout de 9 jours.

Dans le second échantillon préparé (**61S2**), où la quantité d'inhibiteur potentiel est cinq fois plus importante que celle du modèle d'amyloïde utilisé (composé **4**), les fibrilles sont détectées dès le troisième jour d'incubation à température ambiante et forment de longs filaments sur lesquels se greffent de petits morceaux également révélés en vert sous une lumière polarisée (Figure 279).

Ainsi, nous ne constatons aucune différence d'activité inhibitrice notable entre le « switch-peptide » **59** dont la séquence de reconnaissance amyloïde est en ortho par rapport à la leucine, et le « switch-peptide » **61**, dans lequel le tripeptide Phe-Phe-Asp est en méta par rapport à la leucine. Il nous faudra donc utiliser une méthode quantitative de détection de fibrilles amyloïdes afin de déterminer quelle est la position, ortho ou méta, la plus avantageuse entre la séquence de reconnaissance et l'unité migrante.

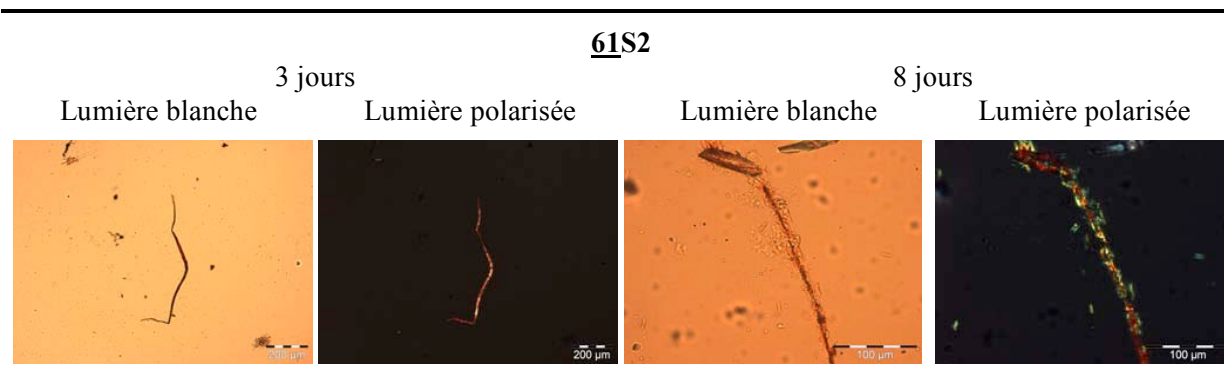


Figure 279 : Suivi de l'échantillon **61S2** par microscopie optique après coloration au rouge Congo, montrant la présence de fibrilles dès 3 jours d'incubation.

Par contre, nous avons montré que le « switch-peptide » acétylé **60** présentait à l'heure actuelle les meilleurs résultats d'inhibition de la fibrillogénèse de l'A β (13-23) (**4**) parmi ceux obtenus par les composés de cette série de « switch-peptides » avec élément « switch » inducteur de coude. Néanmoins, ces tests préliminaires devront être confirmés par une étude plus poussée de l'activité biologique de ce mime peptidique.

III. Les « switch-peptides » conjugués

1. Insertion d'un élément « switch », la sérine

L'intérêt des peptides conjugués comme inhibiteurs puissants de la fibrillogénèse de l'amyloïde β a déjà été présenté au cours du Chapitre 2 de cette partie Résultats et Discussion. Nous avons alors pensé combiner ce concept de peptides conjugués à celui des « switch-peptides », afin de générer une nouvelle classe d'inhibiteurs à la fois efficaces et spécifiques pour lutter contre l'amyloïdogénèse de l'A β .

Pour ce premier « switch-peptide » conjugué que nous allons synthétiser, nous allons coupler la séquence de reconnaissance amyloïde Phe-Phe-Asp à la sérine choisie comme élément « switch », elle-même liée à l'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique mimant la cotinine (Figure 280). Le mime peptidique **63** est synthétisé sur support solide sur une résine Rink Amide MBHA selon une stratégie Fmoc/*t*Bu. L'élément « switch » Boc-Ser-OH est couplé avec du PyBOP à l'amine N-terminale de la phénylalanine sans protection préalable de sa chaîne latérale. Son groupe hydroxyle est ensuite estérifié avec de l'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique *via* une activation au DIC catalysée à la DMAP. Une agitation à température ambiante pendant 2h30 est suffisante pour une estérification quantitative.

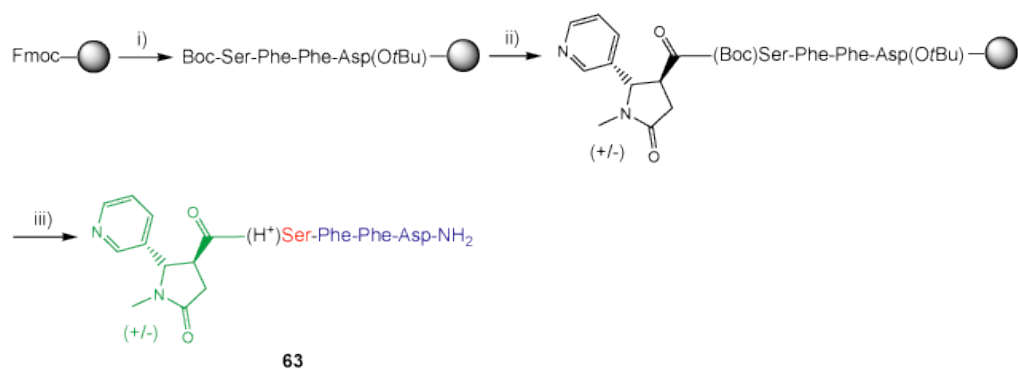


Figure 280 : Synthèse du « switch-peptide » **63**, à l'état S_{on} , par SPPS : i) sur une résine Rink Amide MBHA selon stratégie Fmoc/tBu ; ii) estérification de la chaîne latérale de la sérine avec un acide (+/-)-trans-4-cotinicarboxylique (3 eq.) activée par du DIC (3 eq.) et catalysée avec de la DMAP (0.1 eq.) (2h30, r.t.) ; iii) déprotection et clivage de la résine (TFA/EDT ; 95 : 2.5 ; v/v ; 1h40, r.t.) ; purification par simple précipitation dans l'éther diéthylique glacé ; Rdt : 53 % ; élément destructeur de feuilletés β en vert, élément « switch » en rouge, séquence de reconnaissance en bleu.

Le mime peptidique est ensuite déprotégé et clivé de la résine avec une solution contenant 95 % de TFA et 5 % d'EDT, ce dernier permettant d'éviter l'oxydation du noyau pyridinique. Le « switch-peptide » à l'état S_{off} est purifié par simple précipitation dans l'éther glacé pour être obtenu pur avec un rendement de 53 % et être caractérisé par RP-HPLC analytique C_{18} et spectroscopie de masse ESI (Figure 281).

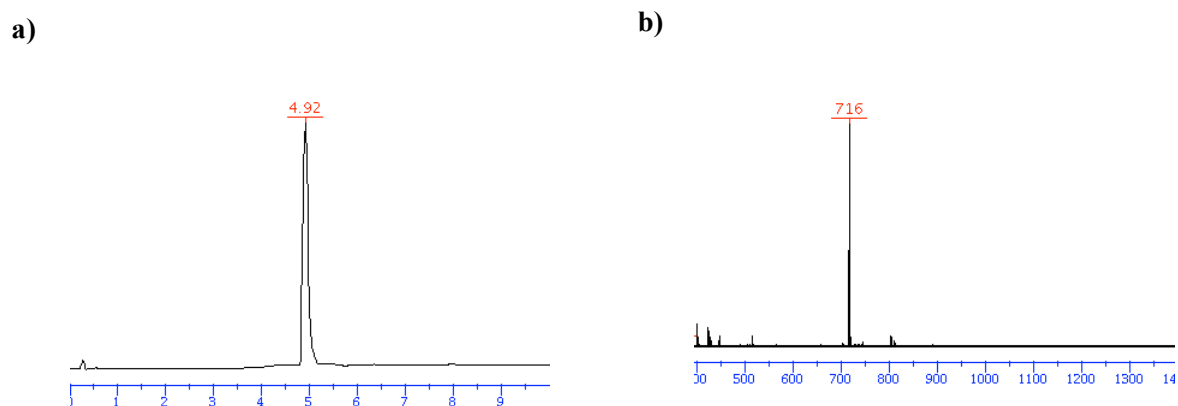


Figure 281 : Caractérisation du composé **63** à l'état S_{off} **a)** par RP-HPLC analytique C_{18} (gradient : 0 à 100 % B en 10 min ; $R_t = 4.9$ min) et **b)** par spectroscopie de masse ESI ($[M+H]^+ = 716$).

Le « switch-peptide » **63** est bloqué à l'état S_{off} par un proton porté par l'amine N-terminale de la sérine. Un réajustement du pH à pH 7.43 déclenche la migration acylique intramoléculaire O \rightarrow N et rétablit la succession de liaisons amides dans le « switch-peptide » **63** qui passe alors à l'état S_{on} (composé **64**) (Figure 282).



Figure 282 : Migration acylique intramoléculaire $O \rightarrow N$ appliquée au « switch-peptide » conjugué **63** (état S_{off}) et conduisant au « switch-peptide » **64** correspondant à l'état S_{on} : PBS 0.1 M pH 7.43 (0.01 M), r.t. ; $t_{1/2} = 0.5$ min ; élément destructeur de feuillettes β en vert, élément « switch » en rouge, séquence de reconnaissance en bleu.

La réaction de transfert acylique, réalisée à température ambiante, est suivie par RP-HPLC analytique en prélevant des aliquots directement du milieu réactionnel et en les quénchant avec un volume égal d'une solution 2 M d'acide chlorhydrique aqueux (Figure 283).

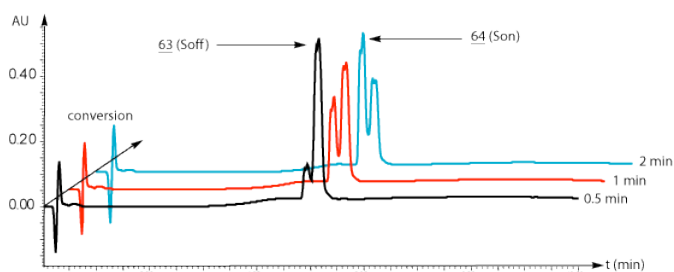


Figure 283 : Suivi, par RP-HPLC analytique (gradient : 0 à 100 % B en 10 min), du réarrangement acylique intramoléculaire $O \rightarrow N$ appliqué au « switch-peptide » conjugué **63** (état S_{off}) et conduisant au « switch-peptide » conjugué **64** (état S_{on}) ; pH = 7.43 ; r.t. ; $t_{1/2} = 0.5$ min.

Les valeurs d'absorption UV obtenues à 214 nm pour les produits S_{off} **63** et S_{on} **64** permettent d'établir la courbe représentative de la disparition du composé de départ en fonction du temps suivant une cinétique d'ordre 1 et de calculer le temps de demi-vie de la migration acylique intramoléculaire $O \rightarrow N$, égal à 30 secondes (Figure 284). Ce réarrangement acylique intramoléculaire $O \rightarrow N$ est donc extrêmement rapide.

Si nous comparons ce résultat avec ceux obtenus avec les « switch-peptides » présentés dans ce chapitre dans la sous-partie « 3. La migration acylique intramoléculaire : $S \rightarrow N$ versus $O \rightarrow N$ » de la partie « I. Les « switch-peptides » », nous nous rendons compte que le temps de demi-vie de la réaction conduisant au produit **64** est de l'ordre de ceux obtenus avec la cystéine à la place de la sérine comme élément « switch ». En effet, dans des conditions expérimentales similaires, l'Ac-Leu-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-(H⁺)Ser-Phe-Phe-Asp-NH₂ a un temps de demi-vie de 10h40, l'Ac-Leu-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-(H⁺)Cys-Phe-Phe-Asp-NH₂ un temps de demi-vie de 10 min et l'Ac-Leu-Cys($\Psi^{\text{H, H}}$ pro)-(H⁺)Cys-Phe-Phe-Asp-NH₂ un temps de demi-vie inférieur à 30 secondes à pH 5.8. L'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique accélère donc énormément la migration acylique intramoléculaire $O \rightarrow N$ de la sérine, d'un facteur de 1280 fois par rapport à l'Ac-Leu-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro).

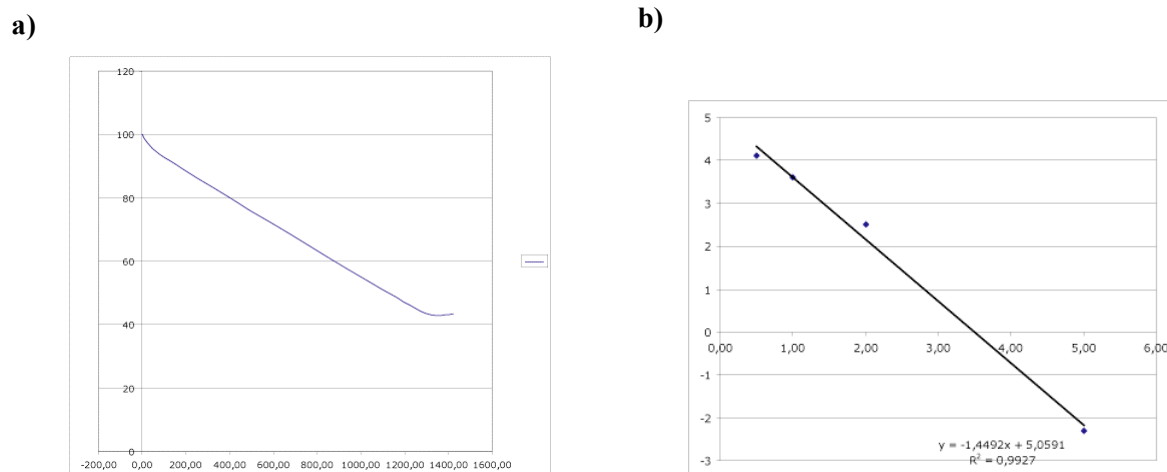


Figure 284 : Etude de la cinétique du réarrangement acylique intramoléculeire O→N du composé **63** (état S_{off}) en composé **64** (état S_{on}) : **a)** courbe représentative de la disparition du composé **63** en fonction du temps (en min) ; **b)** cinétique de premier ordre donnant le temps de demi-vie dans les conditions utilisées ($t_{1/2} = 30$ sec).

Vu la vitesse du réarrangement acylique intramoléculeire O→N entre les composés **63** et **64**, l'utilisation du « switch-peptide » **63** (état S_{off}) en tant qu'inhibiteur potentiel de la fibrillogénèse de l'amyloïde β aura donc autant d'effet que celle du « switch-peptide » **64**, correspondant à l'état S_{on} . En ce qui concerne la structure du composé **64**, elle se rapproche de celle du produit **8**, où l'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique est directement lié à la séquence de reconnaissance Phe-Phe-Asp-NH₂ (Résultats et Discussion – Chapitre 2.II.1-. Synthèse de dérivés de cotinine). Dans la mesure où le composé **8** avait un effet peu marqué sur la fibrillogénèse de l'amyloïde β (13-23) (**4**), nous n'allons pas tester le « switch-peptide » **63** dans le système utilisant le modèle amyloïde $A\beta$ (13-23) (**4**). Par contre, nous pourrions envisager de synthétiser d'autres « switch-peptides » conjugués utilisant le mime de la cotinine, une structure en forme de coude tel que la proline ou la thiazolidine diméthylée, chargée de détruire plus efficacement les feuillets β (cf. composés **10** et **11** ; Résultats et Discussion – Chapitre 2.II.1-. Synthèse de dérivés de cotinine), et une protection enzymatique, par exemple, placée sur l'amine N-terminale de la sérine, telle que le dipeptide Lys-Pro, clivable par la DPPiV. Le fait de remplacer la protection protonique de l'amine par un groupe enzymolabile devrait nous permettre de ralentir la migration acylique intramoléculeire O→N et ainsi d'augmenter l'efficacité du « switch-peptide » en tant qu'inhibiteur de l'amyloïdogenèse de l' $A\beta$ (1-42), ou, à défaut, de celle de l' $A\beta$ (13-23) (**4**).

2. Utilisation d'un élément « switch » inducteur de coude

La seconde génération de « switch-peptides » conjugués va intégrer dans sa séquence un élément « switch » inducteur de coude tel que l'acide 3-hydroxyanthranilique ou l'acide 3-amino-4-hydroxybenzoïque. Comme nous l'avons vu précédemment, la migration acylique intramoléculeuse appliquée aux cycles aromatiques est très rapide dans le sens O→N (Chapitre 3 de cette partie, II.2. Les cycles aromatiques trifonctionnalisés). Le fait d'utiliser l'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique comme unité migrante devrait encore accélérer cette migration, d'une façon similaire à celle que nous avons observé dans le cas de la sérine employée alors comme élément « switch » (cf paragraphe précédent : 1. Insertion d'un élément « switch » simple, la sérine). A l'heure actuelle, tant que nous ne disposons pas d'un élément « switch » inducteur de coude « idéal » (cf introduction de la partie Chapitre 3.II.2.c) nous n'avons donc que peu d'intérêt envers les « switch-peptides » avec élément « switch » inducteur de coude à l'état S_{off} . L'obtention de ce type de « switch-peptides » à l'état S_{on} va nous permettre de comparer les synthèses, migrations acyliques intramoléculeuses N→O et activité biologique de ces mimes peptidiques avec les « switch-peptides » **59**, **60** et **61** dont les caractéristiques ont été présentées au cours du Chapitre 3.II.2.c.

Le premier « switch-peptide » de cette série est synthétisé sur une résine Rink Amide MBHA selon une stratégie Fmoc/*t*Bu, en suivant le même protocole que pour les « switch-peptides » **59**, **60** et **61** (Figure 285). L'acide 3-hydroxyanthranilique est couplé à l'amine N-terminale de la phénylalanine avec du PyBOP sans protection préalable du dérivé aromatique. L'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique est ensuite couplé à l'amine de l'élément « switch » *via* une activation au PyBOP, un seul couplage d'une heure suffisant à avoir une réaction complète. Le mime peptidique est ensuite déprotégé et clivé de la résine avec une solution contenant 95 % de TFA, 2.5 % de TIS et 2.5 % d'eau, sans que nous n'observions de réaction d'oxydation du noyau pyridinique (Figure 286a). La molécule **65** est alors purifiée par RP-HPLC préparative puis par RP-HPLC semi-préparative pour donner le produit pur avec un rendement de 2 % (caractérisation par RP-HPLC analytique et spectroscopie de masse ESI présentée dans la Figure 286b et c). Ce rendement est bien inférieur à celui obtenu au cours de la synthèse de l'analogue structurel de ce « switch-peptide » correspondant au composé **59** (rendement de synthèse : 17 %). Par contre nous observons cette fois encore la formation du dérivé aspartimide (Figure 286d et e).

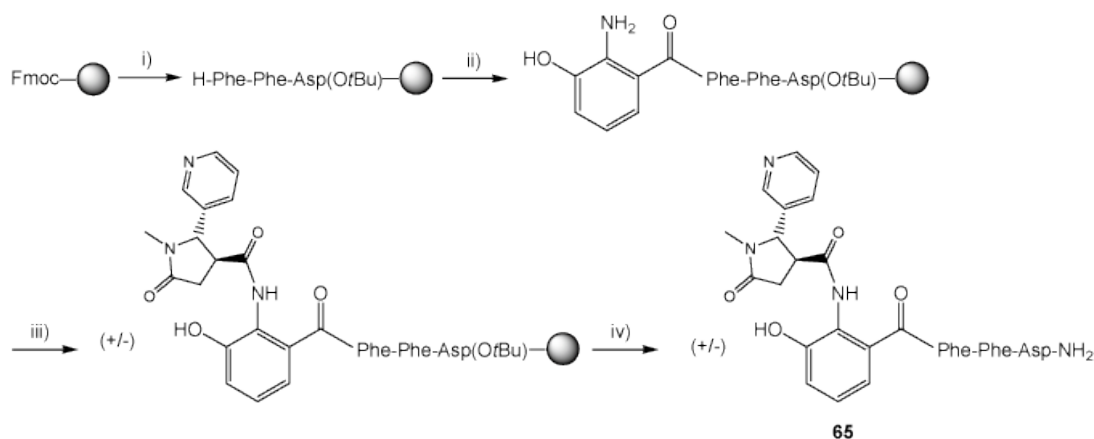


Figure 285 : Synthèse du « switch-peptide » **65**, à l'état S_{on} : i) SPPS sur une résine Rink Amide MBHA suivant une stratégie Fmoc/tBu ; ii) liaison amide entre l'acide 3-hydroxyanthranilique (1.5 eq.) et l'amine N-terminale de la Phe, via une activation standard au PyBOP (1.5 eq.) (obscurité, 50 min, r.t.) ; iii) couplage entre l'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique (2 eq.) et l'amine du cycle aromatique après activation au PyBOP (2 eq.) (obscurité, 1h, r.t.) ; iv) déprotection et clivage de la résine (TFA/TIS/ H_2O ; 95 : 2.5 : 2.5 ; 2h, r.t.) ; purification par RP-HPLC C_{18} préparative (gradient : 0 à 100 % B en 30 min) puis semi-préparative (gradient : 0 à 100 % B en 30 min) ; Rdt = 2 %.

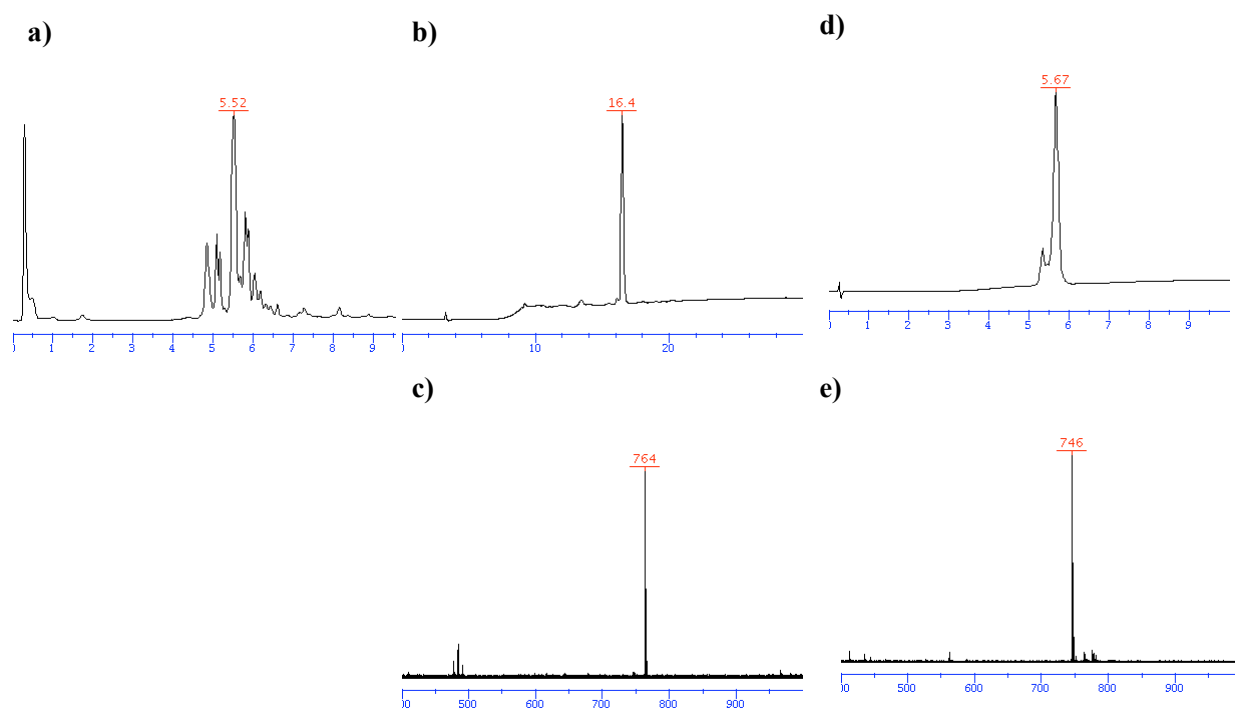


Figure 286 : Caractérisation, par RP-HPLC analytique C_{18} (gradient: 0 à 100 % B en 10 ou 30 min suivant la taille de la colonne utilisée) (en haut) et/ou spectroscopie de masse ESI (en bas), du composé **65** : **a)** brut ; **b)** et **c)** après purification ($R_t = 5.5$ min ou 16.4 min suivant le système utilisé ; $[M+H]^+ = 764$; **d)** et **e)** du composé aspartimide correspondant ($R_t = 5.7$ min ; $[M+H]^+ = 746$).

La molécule **65** est ensuite dissoute pour obtenir une concentration peptidique de 1 mM dans une solution 1 M d'acide méthane sulfonique dans du dioxane anhydre. La solution résultante est alors agitée à 37 °C sous argon et sur tamis moléculaire afin d'éviter la présence d'eau risquant d'hydrolyser le composé **66** à

l'état S_{off} (Figure 287). L'avancement de la réaction est suivie par RP-HPLC analytique après avoir prélevé des aliquots directement du milieu réactionnel (Figure 288). Nous observons alors la formation du « switch-peptide » **66** à l'état S_{off} sous forme de traces, mais principalement la dégradation du produit de départ en une journée. Nous avons fait pratiquement les mêmes remarques avec le composé **59**.

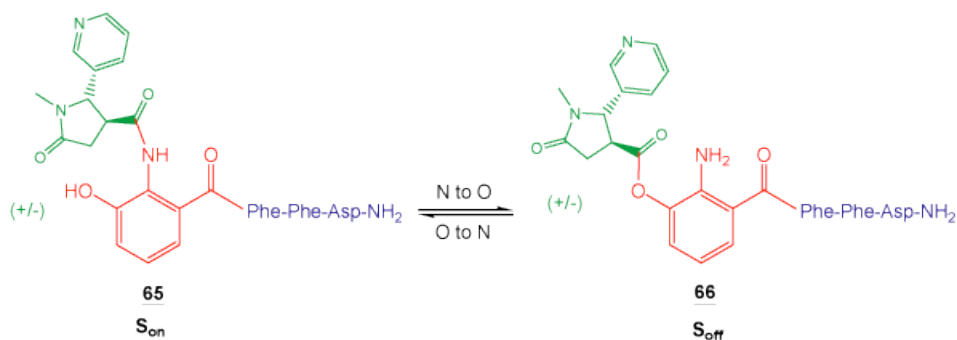


Figure 287 : Migration acylique intramoléculaire $N \rightarrow O$ appliquée au « switch-peptide » **65** (état S_{on}), conduisant à son analogue à l'état S_{off} (molécule **66**) : solution 1 M d'acide méthane sulfonique dans le dioxane anhydre (1 mM), tamis moléculaire, argon, 37°C ; élément destructeur de feuillets β en vert, élément « switch » en rouge, séquence de reconnaissance en bleu.

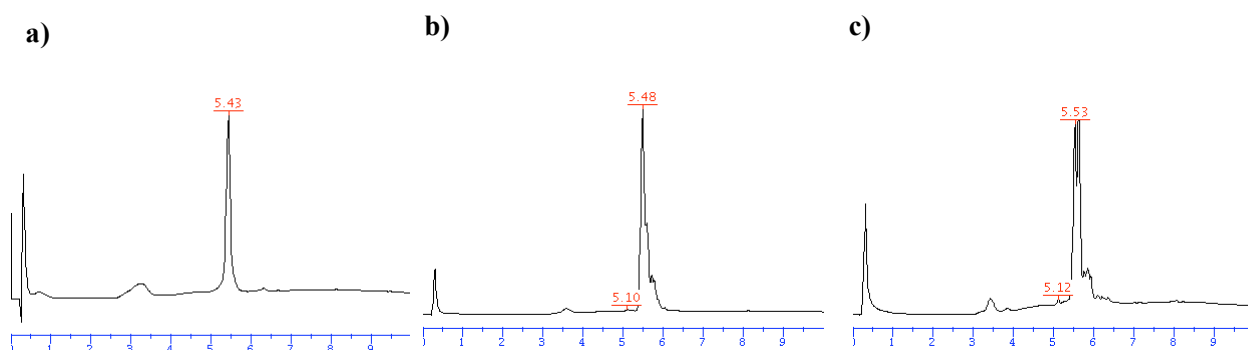


Figure 288 : Suivi, par RP-HPLC analytique C_{18} (gradient : 0 à 100 % B en 10 min), de la migration acylique intramoléculaire $N \rightarrow O$ appliquée au composé **65** (état S_{on} ; $R_t = 5.4$ min) et donnant son analogue à l'état S_{off} **66** ($R_t = 5.1$ min), à : **a**) $t = 0$; **b**) $t = 5$ h ; **c**) $t = 1$ jour ; dégradation du produit dans les conditions utilisées.

L'analogue du « switch-peptide » **65** intégrant l'acide 3-amino-4-hydroxybenzoïque comme élément « switch » inducteur de coude est alors synthétisé dans les mêmes conditions que celles qui ont été décrites précédemment (Figure 289). Après sa déprotection et son clivage de la résine (Figure 290a), le mime peptidique **67** est purifié par deux RP-HPLC préparatives et une RP-HPLC semi-préparative pour conduire au produit pur (Figure 290b et c) avec un rendement de 3 %, valeur proche de celle obtenue pour le composé **65**, aussi bien que pour le composé **61**, dérivé dans lequel le mime de la cotinine du produit **67** est remplacé par une leucine.

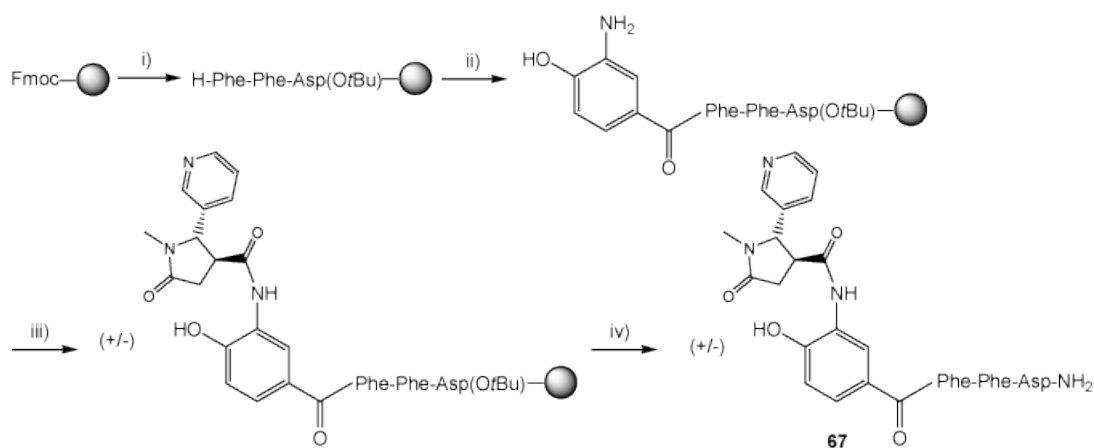


Figure 289 : Synthèse du « switch-peptide » **67**, à l'état S_{on} : i) SPPS sur une résine Rink Amide MBHA suivant une stratégie Fmoc/tBu ; ii) liaison amide entre l'acide 3-amino-4-hydroxybenzoïque (1.5 eq.) et l'amine N-terminale de la phénylalanine, via une activation standard au PyBOP (1.5 eq.) (obscurité, 50 min, r.t.) ; iii) couplage entre l'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique (2 eq.) et l'amine du cycle aromatique après activation au PyBOP (2 eq.) (obscurité, 1h, r.t.) ; iv) déprotection et clivage de la résine (TFA/TIS/ H_2O ; 95 : 2.5 : 2.5 ; 2h, r.t.) ; purification par deux RP-HPLC C_{18} préparatives consécutives (gradient : 0 à 100 % B en 30 min) puis par une RP-HPLC semi-préparative C_{18} (0 à 100 % B en 30 min) ; Rdt = 3 %.

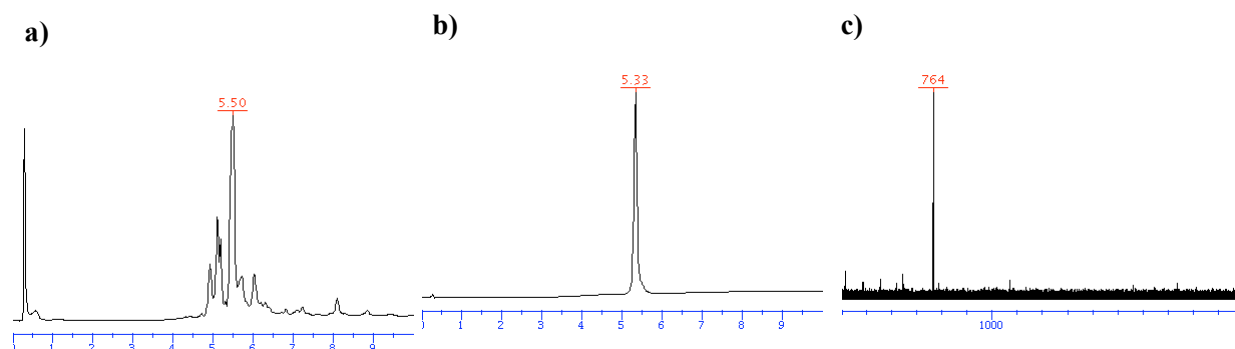


Figure 290 : Caractérisation du « switch-peptide » **66** (état S_{on}) : **a**) brut (RP-HPLC analytique C_{18} ; gradient : 0 à 100 % B en 10 min) ; **b**) après purification, par RP-HPLC analytique (mêmes conditions, R_t = 5.3 min) et **c**) par spectroscopie de masse ESI ($[M+H]^+$ = 764).

Le « switch-peptide » **67** à l'état S_{on} est ensuite dissout dans une solution 1 M d'acide méthane sulfonique dans du dioxane anhydre et placé à 37°C, sous une atmosphère d'argon et sur tamis moléculaire, afin de tester la migration acylique intramoléculaire N→O sur ce composé (Figure 291).

L'avancement de la réaction est suivi par RP-HPLC analytique en injectant sur une colonne C_{18} des aliquots directement prélevés du milieu réactionnel (Figure 292). Les valeurs d'absorption UV à 214 nm obtenus pour les composés S_{on} **67** et S_{off} **68** nous permettent d'établir la courbe représentative de la disparition du produit de départ en fonction du temps et de calculer le temps de demi-vie de cette cinétique d'ordre 1, égal à 19h11 (Figure 293).

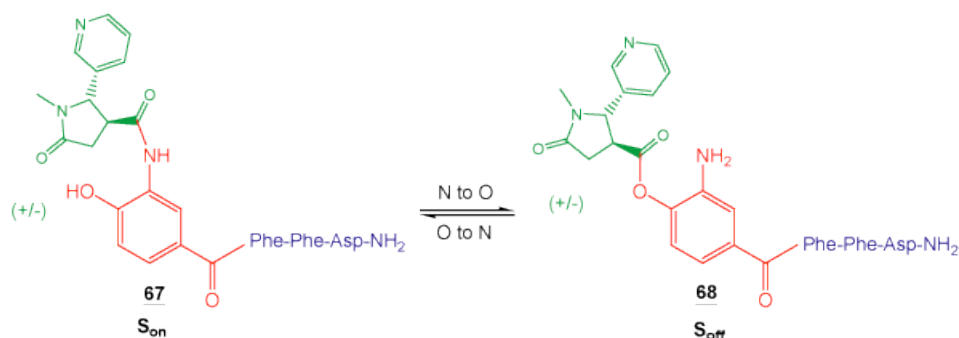


Figure 291 : Migration acylique intramoléculaire $N \rightarrow O$ appliquée au composé **67** (état S_{on}) et conduisant au « switch-peptide » à l'état S_{off} correspondant (molécule **68**) : solution 1 M d'acide méthane sulfonique dans le dioxane anhydre (1 mM), tamis moléculaire, argon, 37°C ; $t_{1/2} = 19h11$; élément destructeur de feuillettes β en vert, élément « switch » en rouge, séquence de reconnaissance en bleu.

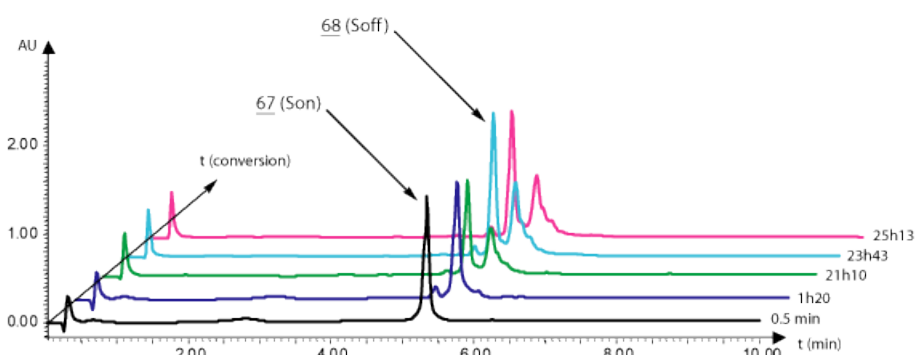
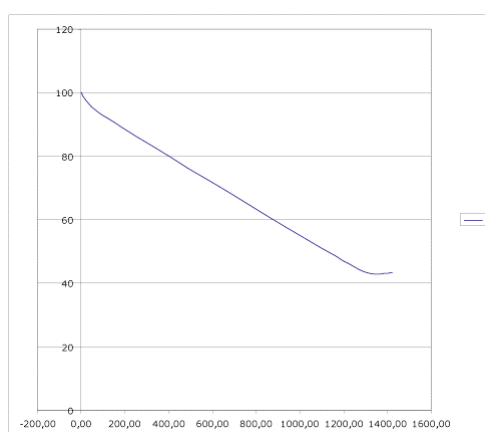


Figure 292 : Suivi, par RP-HPLC analytique (gradient : 0 à 100 % B en 10 min), du réarrangement acylique intramoléculaire $N \rightarrow O$ appliqué au « switch-peptide » conjugué **67** (état S_{on}) et conduisant au « switch-peptide » conjugué **68** (état S_{off}) ; $t_{1/2} = 19h11$.

a)



b)

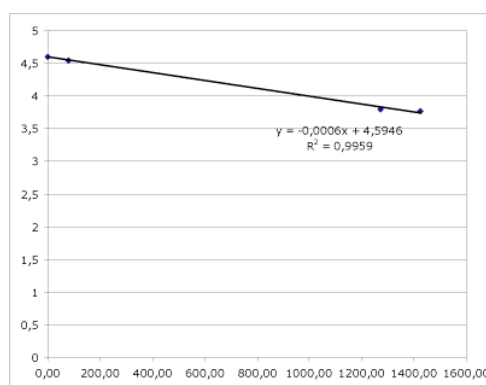


Figure 293 : Etude de la cinétique du réarrangement acylique intramoléculaire $N \rightarrow O$ du composé **67** (état S_{on}) en composé **68** (état S_{off}) : **a)** courbe représentative de la disparition du composé **67** en fonction du temps (en min) ; **b)** cinétique de premier ordre donnant le temps de demi-vie dans les conditions utilisées ($t_{1/2} = 19h11$).

Les « switch-peptides » avec élément « switch » inducteur de coude à l'état S_{on} **65** et **67** sont ensuite mélangés à de l'amyloïde β (13-23) (**4**) dissout dans une solution contenant 15 % de méthanol dans une solution tampon PBS 0.01 M, NaCl 137 mM, 2.7 mM KCl à pH 7.42. Le contenu de chaque solution est alors suivi par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle et/ou microscopie optique après coloration au rouge Congo afin de déterminer l'activité inhibitrice de l'amyloïdogenèse pour chacun des deux « switch-peptides » **65** et **67** et ce à différentes concentrations.

Nous préparons deux échantillons contenant la molécule **65** (Tableau 37). Le premier, que nous nommerons ici **65S1**, contient un mélange équimolaire entre l'inhibiteur potentiel et le modèle de peptide pathogène **4**.

Composé	Echantillon	Concentration	Nombre d'eq./ 4
65 + 4	65S1	400 μ M / 400 μ M	1 : 1
65 + 4	65S2	2 mM / 400 μ M	5 : 1

Tableau 37 : Composition des échantillons contenant le « switch-peptide » **65**, à l'état S_{on} .

Au premier jour d'incubation à température ambiante, la microscopie électronique nous révèle la présence de protofibrilles dans la solution étudiée, mais pas celle de fibrilles (Figure 294). Au bout de trois jours d'incubation, nous n'observons que très peu d'agrégats amorphes au microscope optique, puis après cinq jours, la microscopie électronique montre la présence de fibrilles, confirmée par la coloration au rouge Congo après huit jours.

En ce qui concerne l'échantillon **65S2**, correspondant à un rapport de 5 contre 1 en faveur de l'inhibiteur potentiel **65**, la coloration au rouge Congo révèle la présence de fibrilles dès trois jours d'incubation à température ambiante (Figure 295).

Sur les photographies prises au bout de huit jours à travers le microscope optique après coloration au rouge Congo, nous remarquons cependant que, dans les deux échantillons **65S1** et **65S2**, les amyloïdes sont sous forme de petits morceaux, comme ceux observés dans les échantillons contenant le composé **59**, non pas sous forme de filaments, semblables à ceux obtenus dans les échantillons contenant les peptides conjugués dérivés de cotinine **8**, **9**, **10** et **11** (Résultats et Discussion, Chapitre 2.II.1. Synthèse de dérivés de cotinine).

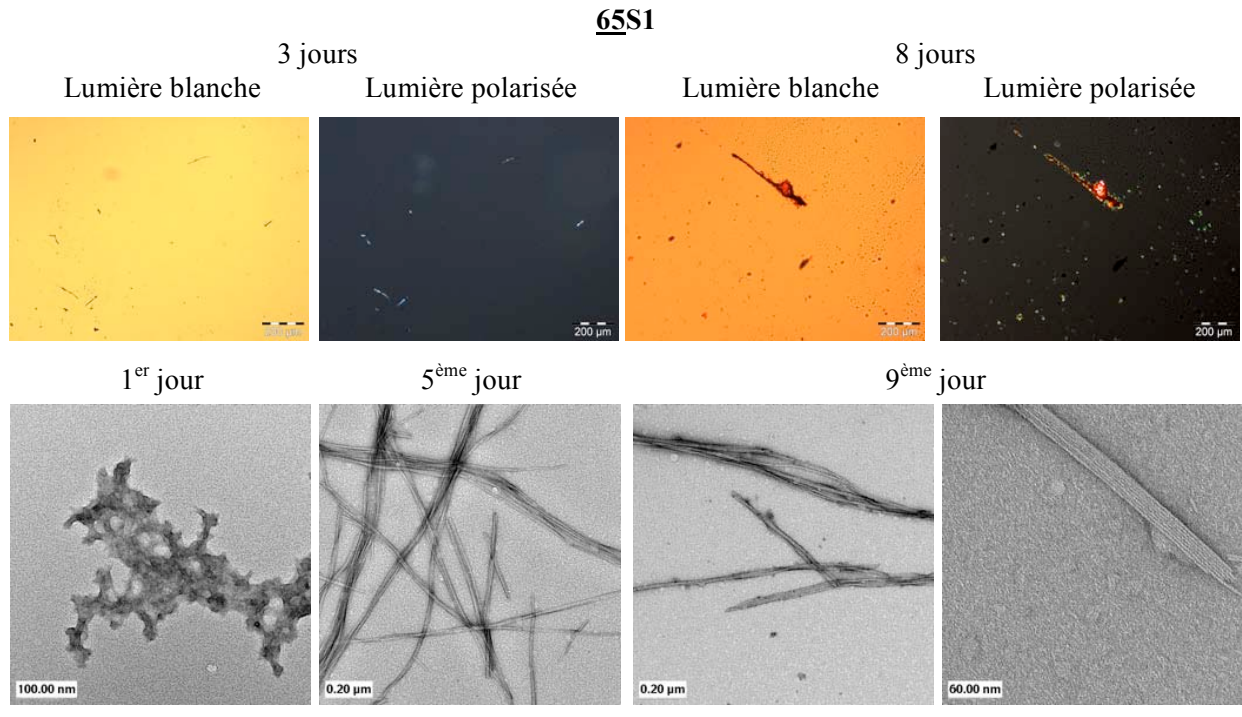


Figure 294 : Suivi de l'échantillon **65S1** par microscopie optique après coloration au rouge Congo (en haut) et par microscopie optique avec coloration négative conventionnelle : la première technique ne détecte la présence de fibrilles qu'après 8 jours d'incubation (coloration verte sous une lumière polarisée) ; la seconde montre la présence de protofibrilles au premier jour d'incubation, puis celle de fibrilles amyloïdes au bout de 5 jours.

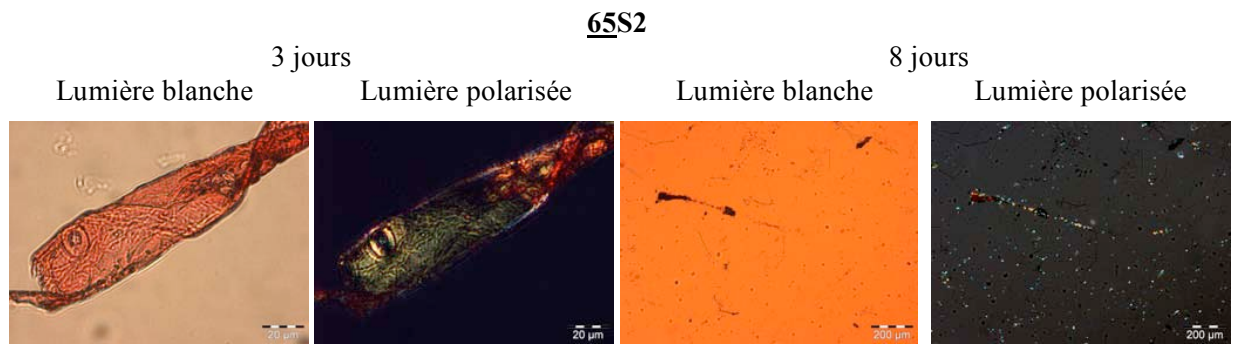


Figure 295 : Suivi de l'échantillon **65S2** par microscopie optique après coloration au rouge Congo : détection de fibrilles dès 3 jours d'incubation à r.t. (coloration verte sous une lumière polarisée).

Il semblerait donc que le « switch-peptide » **65**, à l'état S_{on} , soit plus efficace lorsqu'il se trouve dans un rapport équimolaire avec le peptide pathogène que lorsqu'il est en excès par rapport à l' $A\beta(13-23)$. Ce résultat singulier devra alors être vérifié par des études plus poussées concernant l'activité biologique de ce mime peptidique **65**, utilisant d'autres techniques d'évaluation de la fibrillogénèse, telles que la coloration à la thioflavine T avec de l' $A\beta(1-42)$ ou la méthode des « host guest switch-peptides » (cf dans l'Introduction le Chapitre 3.IV.2. Méthodes d'étude des fibrilles amyloïdes).

Maintenant, si nous comparons ces résultats avec ceux obtenus lors de l'utilisation de l'analogue « switch-peptide » **59**, dans lequel le mime de la cotinine est remplacé par une leucine, nous nous rendons compte de l'efficacité du composé **65** qui parvient, dans l'échantillon **65S1**, à ralentir la formation de fibrilles amyloïdes au-delà de trois jours (Figure 275, Figure 294).

Enfin, pour terminer ce travail, le « switch-peptide » **67** à l'état S_{on} est testé dans les mêmes conditions que celles qui ont été utilisées pour le composé **65**, et ce afin de comparer leurs efficacités relatives en tant qu'inhibiteurs de la fibrillogenèse de l'amyloïde β . Nous préparons alors deux échantillons contenant la molécule **67** (Tableau 38). Le premier échantillon (**67S1**) correspond à un mélange équimolaire avec l'A β (13-23) (**4**). Dans la seconde solution (**67S2**), l'inhibiteur potentiel est cinq fois en excès par rapport au peptide pathogène. Leurs résultats respectifs sont présentés dans la Figure 296 et la Figure 297.

Composé	Echantillon	Concentration	Nombre d'eq./ 4
67 + 4	67S1	400 μ M / 400 μ M	1 : 1
67 + 4	67S2	2 mM / 400 μ M	5 : 1

Tableau 38 : Composition des échantillons contenant le « switch-peptide » **67** à l'état S_{on} .

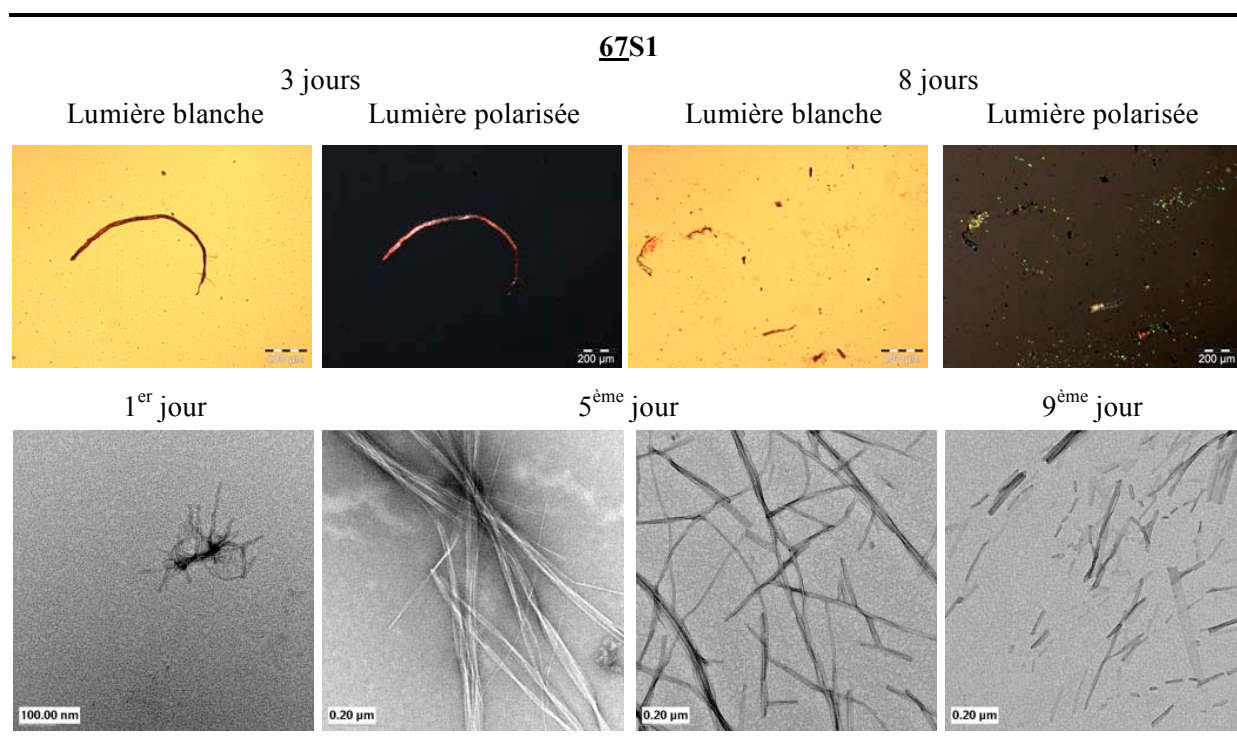


Figure 296 : Suivi de l'échantillon **67S1** par microscopie optique après coloration au rouge Congo et par microscopie électronique avec coloration négative conventionnelle : fibrilles clairsemées détectées au bout de 8 jours avec la 1^{ère} technique (coloration verte sous une lumière polarisée), mais pas au bout de 3 jours ; la seconde méthode d'analyse montre la présence de quelques fibrilles dès le 1^{er} jour d'incubation, mais elles restent relativement courtes même après 9 jours d'incubation, comme si elles avaient été brisées.

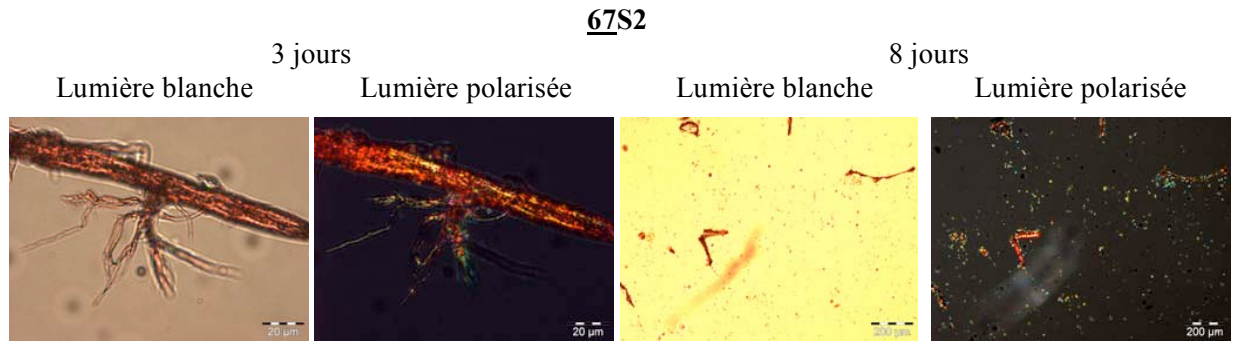


Figure 297 : Suivi de l'échantillon **67S2** par microscopie optique après coloration au rouge Congo : des fibrilles sont détectées dès 3 jours d'incubation (coloration verte sous une lumière polarisée), et forment un « nuage clairsemé » au bout de 8 jours.

L'échantillon **67S1** forme quelques fibrilles courtes dès le premier jour d'incubation, mais pas en quantité suffisante pour qu'elles soient détectées au bout de trois jours par la coloration au rouge Congo, qui révèle leur présence après huit jours sous forme de petits morceaux verts sous une lumière polarisée. Les photographies obtenues par microscopie électronique après coloration négative conventionnelle montrent de longues fibrilles au bout de cinq jours d'incubation, puis de fibrilles beaucoup plus courtes au bout de neuf jours (Figure 296 et Figure 298).

Quelques uns de ces agrégats sont alors mesurés afin de comparer leur taille avec les dimensions de fibrilles amyloïdes couramment observées, généralement comprises entre 60 et 130 Å pour la largeur, et entre 1 000 et 16 000 Å pour la longueur²¹⁷ (Figure 298).

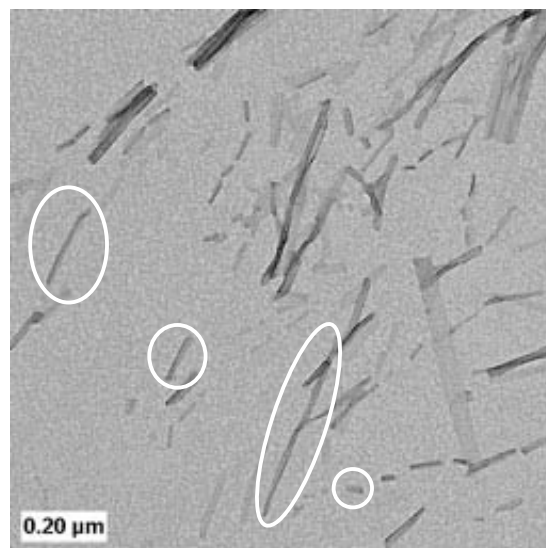


Figure 298 : Dimensions de quelques agrégats (entourés en blanc) observés dans l'échantillon **67S1** au bout de 9 jours d'incubation à température ambiante ; de gauche à droite : 1^{er} filament = fibrille ($l = 110 \text{ \AA}$, $L = 2\,060 \text{ \AA}$) ; 2^{ème} filament = fibrille ($l = 110 \text{ \AA}$, $L = 1\,100 \text{ \AA}$) ; 3^{ème} filament = fibrille ($l = 110 \text{ \AA}$, $L = 4\,570 \text{ \AA}$) ; 4^{ème} filament = agrégat amorphe ($l = 170 \text{ \AA}$, $L = 400 \text{ \AA}$) ; photographie obtenue par microscopie électronique après coloration négative conventionnelle²¹⁷ ($l = \text{largeur}$; $L = \text{longueur}$).

Cela nous permet de déterminer que l'échantillon **67S1** correspond à un mélange de fibrilles et d'agrégats amorphes, ces structures n'ayant pas été observées au bout de cinq jours. Il semblerait donc que le « switch-peptide » **67** à l'état S_{on} puisse ralentir la formation des fibrilles d'A β (13-23) (**4**) voire même les détruire, ce résultat demandant néanmoins à être confirmé.

Enfin, dans l'échantillon **67S2**, la molécule **67** se comporte de la même façon que le « switch-peptide » **65** dans les mêmes conditions (échantillon **65S2**, Figure 295). La coloration au rouge Congo détecte en effet, dès trois jours d'incubation à température ambiante, la présence de fibrilles, formant au bout de huit jours un mélange de petits morceaux d'amyloïde et de filaments (Figure 297).

Si nous comparons ces résultats à ceux obtenus avec l'analogue du « switch-peptide » **67** dans lequel le mime de la cotinine est remplacé par une leucine (molécule **61**), nous nous apercevons que le « switch-peptide » conjugué **67** aurait tendance à être un meilleur inhibiteur de fibrillogénèse que ce composé **61**. Bien entendu, ces données devront être confirmées par une méthode de détection quantitative de l'amyloïdogénèse de l'A β (13-23), voire de l'A β (1-42).

Ainsi, il semblerait qu'un équivalent de « switch-peptide » **65** ou **67** puisse ralentir la fibrillogénèse de l'A β (13-23) **4**, l'effet de ces inhibiteurs potentiels étant moindre lorsque ces molécules se trouvent en excès par rapport au peptide pathogène. De plus, si l'on en croit les images obtenues pour l'échantillon **67S1** au bout de neuf jours, il s'avérerait que le composé **67** aurait tendance à plus perturber la croissance fibrillaire du produit **4** que le « switch-peptide » **65**. Enfin, ces deux « switch-peptides » conjugués avec élément « switch » inducteur de coude **65** et **67** semblent être plus actifs que les simples « switch-peptides » avec élément « switch » inducteur de coude **59** et **60**. Une étude plus approfondie de ces deux séries de composés devrait nous permettre de confirmer ces résultats.

Conclusion et Perspectives

Au cours de ce travail, nous nous sommes concentrés à chercher de nouvelles structures pouvant inhiber la formation de fibrilles d'amyloïde β , supposées être à l'origine de la maladie d'Alzheimer. Au moment de la conception de ces nouveaux inhibiteurs potentiels, nous avons toujours considéré l'importance de l'utilisation d'une séquence de reconnaissance du peptide pathogène, basée sur l'enchaînement naturel de ses acides aminés et centrée autour de la phénylalanine 19 de l'A β (1-42).

Dans un premier temps, nous avons utilisé la cyclisation comme outil permettant d'améliorer la stabilité structurelle, chimique et enzymatique d'un composé dérivé de la séquence A β (16-21) dans lequel le résidu 18 est remplacé par une proline, connue pour son effet destabilisateur de feuillets β . La molécule ainsi synthétisée, à savoir la cyclo(Lys-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu), a fait preuve d'une certaine activité inhibitrice de la fibrillogenèse de l'A β (13-23), peptide correspondant à la plus petite séquence d'amyloïde β formant des fibrilles similaires à celles de l'A β (1-42), et dont nous avons étudié avec soin l'amyloïdogenèse, notamment par microscopie électronique par coloration négative conventionnelle et par microscopie optique après coloration au rouge Congo.

Nous avons ensuite créé une nouvelle série de peptides conjugués dans lesquels la partie N-terminale d'une séquence de reconnaissance amyloïde a été couplée à un acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique, un acide 3-indolebutyrique ou un groupe Hao, mimant respectivement la nicotine, la mélatonine ou un brin β tripeptidique contenant les fonctions hydrazine, acide 5-amino-2-méthoxybenzoïque et acide oxalique, sensés pouvoir interagir avec les fibrilles amyloïdes, voire les inhiber. Dans certains cas, nous avons intercalé, entre les deux composantes de ces inhibiteurs, une proline, et nous avons ainsi mis en avant l'importance de la présence de ce coude dynamique au moment de l'inhibition de l'amyloïdogenèse du peptide amyloïde A β (13-23). L'étude de ces composés nous a, entre autres, permis de montrer le potentiel d'une séquence de reconnaissance amyloïde plus longue, Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-NH₂, par rapport à celle couramment utilisée, correspondant au tripeptide Phe-Phe-Asp-NH₂, ainsi que celui de l'acide 3-indolebutyrique par rapport à l'acide (+/-)-trans-4-cotininecarboxylique, représentant, chacun en ce qui le concerne, la mélatonine et la nicotine.

Nous avons alors constaté l'intérêt majeur d'introduire, dans nos composés, un élément dynamique, favorisant, dans un premier temps, la reconnaissance du peptide pathogène (état S_{off}), puis détruisant, dans un deuxième temps, l'agencement des feuillets β (état S_{on}). Nous avons ainsi participé à l'élaboration du

concept des « switch-peptides », utilisant la migration acylique intramoléculaire $X \rightarrow N$ ($X = O$ ou S) comme outil permettant de rétablir la succession des liaisons amides de l'inhibiteur potentiel, et, par conséquent, l'influence d'une unité d'induction σ sur la séquence de reconnaissance amyloïde.

Lors de la synthèse de la première génération de « switch-peptides », nous nous sommes concentrés sur l'élément « switch » cystéine, induisant, dans les mêmes conditions, une cinétique beaucoup plus rapide que la sérine. Nous avons alors mis en avant l'influence de la température et du pH du milieu réactionnel sur la vitesse de la migration acylique $S \rightarrow N$. Nous avons aussi montré la capacité inhibitrice de cette première génération de « switch-peptides » sur la fibrillogenèse de l'A β (13-23).

Nous avons ensuite exploré la possibilité de former *in vivo* un inhibiteur potentiel de l'amyloïdogenèse en exploitant la ligation chemosélective native qui permet de générer la conformation coudée de la molécule *in situ* avec un temps de demi-vie supérieur à ceux obtenus *via* la migration acylique intramoléculaire $S \rightarrow N$ précédemment considérée.

Puis nous avons décidé de générer une nouvelle catégorie d'éléments « switch », dit inducteurs de coude, combinant la migration acylique intramoléculaire $O \rightarrow N$ à la formation d'une structure coudée. Pour cela, nous avons étudié plusieurs types de composés aromatiques, en particulier la pyridoxine et la pyridoxamine, deux formes naturelles de la vitamine B₆. Nous en avons déduit l'intérêt majeur d'utiliser un alcool en position benzylique plutôt que phénolique, pour des raisons de stabilité de l'ester correspondant. Plusieurs groupements protecteurs de la fonction amine ont alors été envisagés et testés. Les protections hydrogénéolabiles ($Y = Bn, NO_2$) se sont révélées relativement difficiles à manipuler, tandis qu'un proton induisait sur ces structures aromatiques une migration acylique intramoléculaire $O \rightarrow N$ beaucoup trop rapide. Nous nous sommes alors intéressés aux groupements clivables enzymatiquement. L'utilisation d'une arginine, libérée par l'action de la trypsine, a mis en évidence l'existence, en tant que réaction secondaire, d'un réarrangement acylique intramoléculaire $O \rightarrow N$ sur l'amine N-terminale de cet acide aminé protecteur *via* un intermédiaire cyclique à 9 membres. L'emploi, comme protection temporaire de l'amine impliquée dans le transfert acylique, du dipeptide Lys-Pro, clivable par l'enzyme DPPIV, nous a alors donné de bien meilleurs résultats.

Ces diverses expériences nous ont ainsi donné l'opportunité de confirmer la faisabilité de la migration acylique intramoléculaire $O \rightarrow N$ *via* un intermédiaire cyclique à 5, 6, 7 ou 9 membres et de montrer la réversibilité de cette réaction en milieu acide anhydre pour certains de nos composés aromatiques trifonctionnalisés (migration acylique intramoléculaire $N \rightarrow O$).

Nous avons ainsi établi, d'après cette étude du réarrangement acylique intramoléculaire $O \rightarrow N$, les caractéristiques nécessaires à la génération d'un élément « switch » inducteur de coude parfait et envisagé les « switch-peptides » conjugués comme étant de futurs inhibiteurs puissants de la fibrillogenèse de l'amyloïde β .

En novembre 2005, R. Riek et ses collaborateurs publièrent le fruit de leurs recherches concernant l'élucidation de la structure tridimensionnelle de fibrilles d'amyloïdes β (1-42)³⁴⁷. Ils mirent en évidence l'importance, au moment de la fibrillisation, de l'interaction ionique intermoléculaire entre la lysine 28 d'un premier brin amyloïde et l'acide aspartique 23 du brin suivant. Ils proposèrent alors un modèle structural expliquant la croissance fibrillaire et pouvant servir de base à la conception d'inhibiteurs potentiels de l'amyloïdogenèse, sur lequel nous pourrions nous appuyer pour concevoir nos prochains « switch-peptides » conjugués.

Ce travail de thèse représente de ce fait l'avancée réalisée dans le développement de nouvelles molécules bioactives visant à bloquer l'auto-agrégation de l'A β (1-42), signe indissociable de la principale maladie neurodégénérative de notre époque, à savoir la maladie d'Alzheimer.

Experimental part

Chapitre 1 : Instrumentation and general methods.....	281
I. Reagents and solvents.....	281
II. Equipment.....	281
1. Chromatography.....	281
2. Analysis.....	282
III. Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS).....	284
1. General.....	284
2. Coupling reaction.....	284
3. Fmoc deprotection.....	285
4. Colorimetric tests.....	285
5. Acetylation.....	286
6. Cleavage of peptide from the resin.....	286
7. Small cleavage assays.....	286
IV. Congo red staining.....	287
Chapitre 2 : Synthesis description.....	289

Chapitre 1 : Instrumentation and general methods

I. Reagents and solvents

Solvents and reagents were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany) or Acros (Geel, Belgium). DMF for peptide synthesis was purchased from SdS (Peypin, France) and degassed with nitrogen before use.

Fmoc amino acid derivatives, Rink amide resins, Wang resin and 2-chlorotrityl resin were purchased from Calbiochem-Novabiochem AG (Läufelfingen, Basel), Alexis (Läufelfingen, Switzerland) or Bachem Fine Chemicals (Bubendorf, Switzerland).

Acetonitrile for analytical and preparative RP-HPLC was purchased from Biosolve BV (Valkenswaard, Netherlands). Water used for RP-HPLC was Milli-Q quality, passed through a Milli-Q purification system (Volketswil, Switzerland). Trifluoroacetic acid for RP-HPLC analysis was purchased from Baker AG (Basel, Switzerland).

NMR solvents were obtained from Dr. Glaser AG (Basel, Switzerland) and Armar Chemicals (Döttingen, Switzerland).

II. Equipment

1. Chromatography

Analytical RP-HPLC

Analytical reversed-phase HPLC spectra were recorded on a Waters System (Waters Corporation, Milford, MA, USA) consisting of two Waters 600 pumps, a Waters 600 System Controller, a Waters 486 Tunable Absorbance Detector and a printer Waters 746. Columns packed with Vydac Nucleosil 218TP54 C₁₈ particles (250 x 4.6 mm) or 208TP54 C₈ particles (250 x 4.6 mm) were used with a flow rate of 1 mL/min and Waters Atlantis dC₁₈ columns (20 x 4.6 mm) were used with a flow rate of 1.5 mL/min. The UV absorbance was monitored at 214 nm. All gradients were linear in eluent A (0.09 % TFA in water) and eluent B (0.09 % TFA, 9.91 % H₂O in acetonitrile).

Preparative RP-HPLC

Preparative RP-HPLC purifications were performed on a Waters Delta Prep 3000 System, with a Waters 600E System Controller and a Waters 484 Absorbance Detector, with Vydac Nucleosyl 218TP152050R C₁₈ particles (250 x 50 mm). Flow rates of 80 mL/min were used and the UV absorbance was monitored

Experimental Part

at 214 nm. All gradients were linear in eluent A (0.09 % TFA in water) and eluent B (0.09 % TFA, 9.91 % H₂O in acetonitrile).

Semi-preparative RP-HPLC

Semi-preparative RP-HPLC purifications were performed on a Waters Delta Prep 3000 System, with a Waters 600E System Controller and a Waters 484 Absorbance Detector, with Vydac Nucleosil 218TP1022 C₁₈ particles (250 x 21 mm). Flow rate of 18 mL/min were used and the UV absorbance was monitored at 214 nm. All gradients were linear in eluent A (0.09 % TFA in water) and eluent B (0.09 % TFA, 9.91 % H₂O in acetonitrile).

Column chromatography

For column chromatography, silica gel SiO₂ Merck 60 (0.040 – 0.063 mm, 230-400 Mesh) was used,

2. Analysis

Mass Spectroscopy

Electrospray ionization mass spectra (ESI-MS) were recorded on a Finnigan MAT SSQ 710 C spectrometer equipped with an IBM PS1295XP486 (software Technivent Vector II) in positive or negative ionization mode with CH₃CN/H₂O/CH₃CO₂H 50 : 50 : 1 as solvents.

MALDI-TOF mass spectra were recorded on an Axima-CFR Shimadzu apparatus using an α -cyano matrix in reflection mode.

NMR Spectroscopy

NMR spectra were measured on DRX400 Bruker spectrometer at 30°C. Chemical shifts are reported in ppm downfield from TMS. Two-dimensional ROESY experiments³⁴⁸ (mixing time 200 ms), homonuclear Hartman-Hahn³⁴⁹ (HOHAHA, TOCSY) experiments (spin-lock 100 ms), and COSY-DQF³⁵⁰ were recorded in the phase sensitive mode using the time-proportional phase incrementation method. A total of 2K data points was collected in the F₂ dimension with a spectral width of 4000 Hz. In the F₁ dimension, 512 or 1K points were measured. The data were processed using the SwaN-NMR software³⁵¹. A zero-filling in the F₁ dimension and a square sinebell window shifted by 90° in both dimensions were applied prior to the two-dimensional Fourier-transformation. In the case of COSY-DQF, a square sinebell window shifted by 0° was applied in F₁.

Experimental Part

Circular Dichroism

CD spectra were recorded on JASCO J-810 spectropolarimeter. A supply of high-purity nitrogen is essential to displace oxygen, in order to avoid degradation of the mirrors by ozone generated by the high power xenon source as well as to reduce absorbance from oxygen bands below 200 nm. A 1 mm cuvette (Hellma, QS, strain-free suprasil) was used for all measurements. The cell was cleaned prior to each use with TFA or concentrated chromic acid, water and methanol, and dried using a jet of nitrogen gas. Spectra were recorded from 190 nm to 250 nm using Time course or Interval scan measurements. Scanning mode was continuous with a speed of 100 nm/min, a 0.25 s response, a band width of 1 nm, an accumulation of 1 and a data pitch of 0.2 nm. Spectra are presented in mean residue ellipticity (θ) in $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$.

Infrared Spectroscopy

Infrared spectra were recorded as KBr pellets on a Perkin Elmer 1430 spectrometer at a resolution of 2 cm^{-1} averaging 16 scans.

Fourier-Transform Infrared spectra (FT-IR) were recorded on a Spectrum One FT-IR spectrometer (Perkin Elmer Instruments).

Electron Microscopy

Negative staining electron microscopy studies were performed by Marc Adrian at the “Laboratoire d’Analyse Structurale” at the University of Lausanne.

A solution containing the desired product was prepared. Filtration of the sample was done using a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm . After incubation at room temperature, the sample was studied by electron microscopy: an aliquot of 5 μL was first adsorbed for one minute to a carbon-coated 200-mesh copper grid. It was then stained by direct addition of 10 μL of 2 % aqueous uranyl acetate to the sample droplet for two minutes and air-dried after removal of excess liquid with filter paper. The specimen was then examined in a JEOL 1210 electron microscope, operated at 100 kV. Digitized photographs were recorded with a slow scan CCD camera (Gatan, Model 679). Magnification calibration was performed using catalase crystals.

Optical Microscopy

After Congo red staining, aggregates were laid on a microscope slide Menzel-Gläser® (pre cleaned/ready-to-use, ca 76 X 26 mm), covered with a microscope glass Assistant (50-18 m/m). The specimens were then examined in a OlympusBX60 optical microscope. Polarized light was obtained using a U-AN 360 Olympus T₂ and a U-POT Olympus lens. Digitized photographs were recorded with a Color View Soft Imaging System camera, using AnalySIS software.

Amino acid composition analysis

Samples for amino acid composition analysis were sent to the Institute of Biochemistry of the University of Lausanne. 2 µg of peptide was hydrolysed by acid hydrolysis in the vapour phase (6 N HCl) at 105°C for 18h. The hydrolysed peptide was then derivatized by DABSCI. One tenth of this material was subjected to analysis by RP-HPLC.

III. Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS)

1. General

The syntheses were carried out either manually with a mechanical stirrer or automatically on an Advanced ChemTech 200 Peptide Synthesizer (Louisville, USA) according to the standard procedures of solid phase peptide synthesis, following the Fmoc/*t*Bu strategy. The glass reaction vessel, fitted with a sintered glass filter, was previously silanized overnight with a 25 % solution of dichlorodimethylsilane in dry toluene and then washed with methanol and DCM. This step is required to improve the surface hydrophobicity and prevents the beads from sticking to the wall of the vessel.

Rink Amide MBHA, Wang and 2-chlorotrityl chloride resins were chosen for the synthesis of C-terminal amide peptides, C-terminal carboxylic acid peptides and C-terminal carboxylic acid peptide with protected side chains, respectively. The resins were swollen with DCM (15 mL/g of resin, 30 min, twice) before starting the synthesis.

2. Coupling reaction

As a standard, the coupling reactions were carried out using N_α-Fmoc-protected amino acids (2 eq.), PyBOP (2 eq.) or HATU (2 eq.) as activating reagent and DIPEA (4 eq, up to a pH between 8 and 9) as base. The equivalents were calculated on the basis of the theoretical loading of the resin. The amino acid and the activating reagent were dissolved in DMF (10 mL/g of resin) or in a mixture of DMF and DCM (1:1, v/v, 10 mL/g of resin) for solubility reasons. The time of the coupling reactions varied from 30 min to 2h. In case of incomplete coupling reactions, the coupling reaction could be repeated (R in SPPS table).

3. Fmoc deprotection

The Fmoc protecting group was removed by treatment of the resin with a solution of 20 % piperidine in DMF (20 mL/g of resin, 2 min, 5 times). The resin was then washed several times with DMF to eliminate any traces of base before the next coupling reaction.

4. Colorimetric tests

The completeness of the coupling reactions was qualitatively verified by Kaiser or TNBS tests for primary amines, by the chloranil test for secondary amines and then by the Ellman test for thiols.

*Kaiser test*³⁵²

A solution of ninhydrin (1 g) in ethanol (20 mL), a solution of phenol (80 g) in ethanol (20 mL) and a solution of KCN (2 mL of a 1 mM aqueous solution) in pyridine (98 mL) were first prepared. A few resin beads, washed several times with DCM, were placed in a test tube, and then two drops of each of the solutions above were added. The mixture was heated at 80-90°C for 3 min. A positive test was indicated by a dark blue color on the resin. In this case, a second coupling reaction or an acetylation was carried out.

*TNBS test*³⁵³

A solution of 10 % DIPEA in DMF and a solution of 1 % 2,4,6-dinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) in DMF were first prepared. A few resin beads, washed several times with DMF, were placed in presence of one drop of each of the solutions above and left for 5 min. Red beads indicated a positive test.

*Chloranil test*³⁵⁴

A solution of 2 % acetaldehyde in DMF and a solution of 2 % *p*-chloranil in DMF were first prepared. One drop of each of the solutions was added to a few resin beads that were left for 5 min. Blue stained resin beads indicated the presence of secondary amines.

*Ellman test*³⁵⁵

A solution of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB, 40 mg) in a sodium phosphate buffer 0.1 M at pH 8 (10 mL) was first prepared. A few drops of this solution were added to some resin beads that was left for 5 min. A yellow coloration indicated the presence of aliphatic sulfhydryl groups.

5. Acetylation

In case of incomplete coupling reactions, acetylation was carried out using acetic anhydride (20 eq.) and pyridine (10 eq) in DMF (10 mL/g of resin) and shaking for 20 min (A in SPPS table).

6. Cleavage of peptide from the resin

Rink Amide MBHA and Wang resins

The peptidyl-resin was treated with a solution of TFA, TIS and water (95 : 2.5 : 2.5, v/v/v, 15 mL/g of resin) for 1 to 2 h at room temperature. The nature of the scavengers was dependent of the peptide sequence. The solvents were concentrated under reduced pressure and the peptide was precipitated and washed with cold diethyl ether. After centrifugation, the crude was dissolved in water and subjected to lyophilization.

2-chlorotrityl chloride resin

The peptide was cleaved from the resin by treatment with a solution of AcOH, TFE and DCM (1:1:8, v/v/v, 15 mL/g of resin) for 2 h at room temperature. The resin was treated a second time under the same conditions. N-hexane (15 volumes) was added to the peptide solution before concentration under reduced pressure in order to help the elimination of the acetic acid and to avoid the deprotection of the lateral chains. Three times n-hexane was added to the residue and evaporated. The peptide was precipitated and washed with cold diethyl ether. The solid was dissolved in water before lyophilization.

Sieber Amide resin

The peptide was cleaved from the resin by treatment with a solution of 1 % TFA in dryDCM for 30 min at room temperature. N-hexane was added to the peptide solution before concentration under reduced pressure in order to help the elimination of TFA and avoid the deprotection of the lateral chains, or cleavage of ester in the case of switch-peptides.

7. Small cleavage assays

Small cleavage assays were performed at different stages during solid phase synthesis in order to control the evolution of the synthesis. A few beads of resin were treated with the cleavage solution adapted to the nature of the resin. After filtration through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm and precipitation in cold diethyl ether, the crude peptide was analyzed by mass spectroscopy and analytical RP-HPLC.

IV. Congo red staining

Preparation of the Congo red solution

Congo red (35 mg, 0.05 mmol) was dissolved in ethanol (25 mL) and 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (225 mL) to obtain a final concentration of 200 μ M in 10 % ethanol in buffer. The solution was filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μ m in order to avoid micelles and aggregates.

General procedure of Congo red staining

A solution of the desired product was prepared, filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μ m to remove the insoluble particles, and incubated at room temperature during a certain time. The sample was stained by addition of a sufficient quantity of the Congo red solution, which was prepared as previously described, and kept at room temperature overnight. After centrifugation, the residue was washed twice with water to eliminate the excess of Congo red and was put on a plaque before analysis by optical microscopy under normal and polarized light.

Chapitre 2 : Synthesis description

H-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu(OtBu)-Lys(Boc)-OH.TFA (1)

The linear protected peptide was manually synthesized on 2-chlorotrityl chloride resin 200-400 mesh (1g, initial loading: 0.82 mmol/g, 0.82 mmol). The first amino acid Fmoc-Lys(Boc)-OH (769 mg, 1.64 mmol, 2 eq.) was coupled to the resin in the presence of DIPEA (0.6 mL, 3.46 mmol, 4.2 eq.) in anhydrous DCM (10 mL, 10 mL/g of resin) under an argon atmosphere and stirred for 1h. The reaction was repeated. Couplings were carried out using N α -Fmoc-protected amino acids (1.64 mmol, 2 eq.), PyBOP (854 mg, 1.64 mmol, 2 eq.) as activating reagent and DIPEA (0.6 mL, 3.46 mmol, 4.2 eq) as base, in DMF/DCM (1: 1, v/v). Some difficult couplings (in bold in the table) required HATU (935 mg, 2.46 mmol, 3 eq.) as activating reagent. The synthesis was done as described in the following table.

Residue	Weight (mg)	Quantity (mmol)	Number of eq.	Coupling time	R/A
2-chlorotrityl chloride resin	1000	0.82			-
Fmoc-Lys(Boc)-OH	769	1.64	2	1h, 1h	R
Fmoc-Glu(OtBu)-OH.H ₂ O	728	1.64	2	1h, 1h	R,A
Fmoc-Phe-OH	953	2.46	3	1h, 1h30, 1h, 1h	R, R, R
Fmoc-Phe-OH	635	2.46	3	1h, 1h, 1h	R, R, A
Fmoc-Pro-OH.H ₂ O	554	1.64	2	1h, 1h	R
Fmoc-Leu-OH	870	2.46	3	2h, 1h30	R, A

The peptide was cleaved from the resin by stirring with AcOH/TFE/DCM (1: 1: 8, v/v/v, 15 mL) at room temperature for 2h. N-hexane (15 volumes) was added to the peptide solution before concentration under reduced pressure in order to help the elimination of the acetic acid and avoid deprotection of the lateral chains. The resin was treated a second time under the same conditions. The residue was dissolved three times in n-hexane before evaporation to eliminate a maximum of acid. Then the peptide was precipitated in cold diethyl ether and centrifuged (three times). The white solid (942 mg) was dried overnight under reduced pressure. The purity of the crude product was estimated by analytical RP-HPLC to be 91 %.

Some peptide (194 mg) was purified for analysis purpose by preparative RP-HPLC (30 to 60 % of B in 30 min) to give a white powder (172 mg, 0.184 mmol). The structure of the peptide was confirmed by amino acid composition analysis.

Yield: 97 % (estimation from the sample purification)

RP-HPLC: Rt = 22.3 min (0 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 936.14
MW (observed): 468.87 = $[M/2+H]^+$; 936.34 = $[M+H]^+$; 1872.85 = $[2M+H]^+$

Cyclo(Lys(Boc)-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu(OtBu)) (2)

The crude peptide **1** (65 mg, 0.062 mmol in theory, 1 eq.) in solution in dry DCM (10 mL) with some DMF (1 mL, 12.86 mmol, 214 eq.) for solubility reason was slowly added for 1h to HATU (71 mg, 0.19 mmol, 3 eq.) and sym-collidine (0.1 mL, 0.75 mmol, 12 eq.) in anhydrous DCM (610 mL, final peptide concentration: 10^{-4} M). The reaction mixture was stirred vigorously at room temperature and under an argon atmosphere for 2h15 after the end of the addition of the peptide. Advancement of the reaction was followed by analytical RP-HPLC and ESI-MS. After completion, methanol (50 mL) was added and the solution was stirred for 5 min before concentration of the solvents under reduced pressure. The crude was dissolved in water before lyophilisation. It gave a yellow residue that was used without further purification.

RP-HPLC: Rt = 18.8 min (50 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 918.13
MW (observed): 918.3 = $[M+H]^+$; 940.3 = $[M+Na]^+$

Cyclo(Lys-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu).TFA (3)

The lateral chains of the crude cyclic peptide **2** (0.062 mmol in theory, 1 eq.) were deprotected with a solution of TFA, TIS and water (95: 2.5: 2.5; v/v/v; 10 mL) stirred at room temperature for 40 min. Solvents were removed under reduced pressure to give a yellow oil. The peptide was purified by semi-preparative RP-HPLC C₁₈ (0 to 100 % B in 30 min) to afford the desired product (30 mg, 0.034 mmol) with a yield of 50 % for the three steps (peptide synthesis, cyclization and deprotection).

Yield: 50 % (3 steps)

RP-HPLC: Rt = 18.6 min (0 to 100 % of B in 30 min, column C₁₈) and 6.23 min (0 to 100 % of B in 10 min, column C₁₈)

ESI-MS: MW (calculated): 761.91
MW (observed): 762.36 = $[M+H]^+$; 1524 = $[2M+H]^+$

Peptide content: 84 %

2D NMR ¹H: (DMSO d₆, 30°C) δ(ppm) = 8.63 (4HN), 8.52 (6'HN), 8.47 (2HN), 8.29 (5HN), 8.28 (6HN), 8.19 (4'HN), 8.05 (1'HN), 7.94 (5'HN), 7.70 (2'HN), 7.64 (1HN), 4.54 (4H_α), 4.53 (2'H_α), 4.50 (5'H_α), 4.21 (2H_α), 4.13 (5H_α), 4.12 (1H_α), 4.09 (1'H_α), 4.00 (3H_α), 3.87 (3'H_α), 3.84 (4'H_α), 3.80 (6H_α), 3.65 (3'H_α), 3.64 (6'H_α), 3.64 (3'H_{β1}), 3.51 (3'H_{β2}), 3.50 (4H_{β1}), 3.28 (4'H_{β2}), 3.28 (4'H_{β1}), 3.22 (3H_δ), 3.09 (4'H_{β2}), 3.06 (5H_{β1}), 2.99 (4H_{β2}), 2.99

(5'H_{β1}), 2.96 (5'H_{β1}), 2.95 (5H_{β2}), 2.87 (5'H_{β2}), 2.78 (1H_ε), 2.04 (3'H_γ), 1.90 (3H_β), 1.85 (3'H_{β1}), 1.74 (2H_ε), 1.67 (1H_β), 1.66 (3'H_{β2}), 1.57 (1H_δ), 1.55 (2'H_β), 1.54 (3H_{γ1}), 1.50 (2H_{β1}), 1.32 (2H_{β2}), 1.29 (1H_γ), 0.95 (2'H_δ), 0.87 (2H_{δ1}), 0.81 (2H_{δ2}), 0.75 (3H_{γ2}). Trans amide bonds, excepted for the Leu-Pro amide bond: mixture of cis and trans conformations (3: 1).

Sample preparation for conventional negative staining electron microscopy and Congo red staining

3S1

3 (3.5 mg, 4 μmol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 4 mM. It was then filtered and let to incubate at room temperature. The contents of the sample were then controlled by using conventional negative staining electron microscopy (100 μL) and Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μL).

3S2

Conventional negative staining electron microscopy:

3 (0.7 mg, 0.799 μmol) was dissolved in the stock solution B of Aβ(13-23) (**4**) (147 μL) and diluted with a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (53 μL) to obtain a concentration of **4** equal to 400 μM and a concentration of **3** equal to 4 mM (**4/3**; 1: 10). The solution was filtered, incubated at room temperature and its content was controlled by conventional negative staining electron microscopy (200 μL).

Congo red staining:

3 (3.5 mg, 4 μmol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 4 mM. It was then mixed with Aβ(13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μmol; **4/3**; 1: 10), filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm and incubated at room temperature. Its contents were then controlled by Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μL).

3S3

Conventional negative staining electron microscopy

3 (0.14 mg, 0.16 μmol) was dissolved in the stock solution D of Aβ(13-23) (**4**) (215 μL) and then diluted with a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (185 μL) in order to obtain a concentration of Aβ(13-23) (**4**) equal to 400 μM and a concentration of **3** equal to 400 μM (**4/3**; 1: 1). The solution was filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm, incubated at room temperature and its contents were followed by conventional negative staining electron microscopy (200 μL).

Congo red staining:

3 (0.35 mg, 0.4 μ mol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 400 μ M. It was then mixed with A β (13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μ mol; **4/3**; 1: 1), filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μ m and incubated at room temperature. Its contents were then controlled by Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μ L).

3S4

Conventional negative staining electron microscopy:

3 (0.08 mg, 0.09 μ mol) was dissolved in the stock solution C of **4** (450 μ L) to have a concentration of A β (13-23) (**4**) equal to 400 μ M and a concentration of **3** equal to 200 μ M (**4/3**; 2: 1). The solution was filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μ m, incubated at room temperature and its contents were followed by conventional negative staining electron microscopy (200 μ L).

Congo red staining:

3 (0.18 mg, 0.21 μ mol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 200 μ M. It was then mixed with A β (13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μ mol; **4/3**; 2: 1), filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μ m and incubated at room temperature. Its contents were then controlled by Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μ L).

H-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-OH.3 TFA (4)

The peptide **4** was synthesized manually on Wang resin (1g, initial loading: 0.68 mmol/g, 0.68 mmol) according to the standard procedures of SPPS following the Fmoc/*t*Bu strategy. The first amino acid, Fmoc-Asp(O*t*Bu)-OH (2.8 g, 6.8 mmol, 10eq.) was coupled to the alcohol function of the resin in presence of N,N'-diisopropylcarbodiimide (0.53 mL, 3.4 mmol, 5 eq.) and 4-dimethylaminopyridine (8 mg, 0.07 mmol, 0.1 eq.) in anhydrous dichloromethane (7 mL, 7 mL/g of resin). Other couplings were carried out using N $_{\alpha}$ -Fmoc-protected amino acids (2.04 mmol, 3 eq.), PyBOP (1.6 g, 2.04 mmol, 3 eq.) as activating reagent and DIPEA (0.7 mL, 4.05 mmol, 6 eq.) in a mixture of DCM and DMF (1: 1, v/v, 7 mL). The synthesis of the peptide is described in the next table.

After deprotection of the final N-terminal function, the peptide was fully deprotected and cleaved from the resin by treatment with a solution of TFA/TIS/H₂O (95: 2.5: 2.5, v/v/v, 15 mL) and stirring for 1h at room temperature. The resin was treated a second time in the same conditions for 2h. The peptide solution was concentrated under reduced pressure and the product was precipitated by addition of cold diethyl ether to give an uncolored gel. It was dissolved in water and acetonitrile and then lyophilized (4.15 g of crude product). The peptide was purified by preparative RP-HPLC C₁₈ (0 to 100 % of B in 30 min) to afford a white powder (250 mg, 0.15 mmol) after concentration and lyophilisation of the solvents.

Residue	Weight (g)	Quantity (mmol)	Number of eq.	Coupling time	R/A
Wang resin	1	0.68			
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	2.8	6.8	10	1h30, 1h30, 2h	R,R,A
Fmoc-Glu(OtBu)-OH.H ₂ O	0.87	3.4	3	1h	-
Fmoc-Ala-OH	0.67	3.4	3	1h	-
Fmoc-Phe-OH	0.53	3.4	3	1h	-
Fmoc-Phe-OH	0.53	3.4	3	1h	-
Fmoc-Val-OH	0.69	3.4	3	1h	-
Fmoc-Leu-OH	0.72	3.4	3	1h	-
Fmoc-Lys(Boc)-OH	0.96	3.4	3	1h, 1h	R
Fmoc-Gln(Trt)-OH	1.25	3.4	3	30 min	-
Fmoc-His(Trt)-OH	1.26	3.4	3	1h	-
Fmoc-His(Trt)-OH	1.26	3.4	3	1h, 1h	R

Yield: 22 %

RP-HPLC: Rt = 15.8 min (0 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 1370.51

MW (observed): 457.80 = [M/3+H]⁺; 686.33 = [M/2+H]⁺; 1370.84 = [M+H]⁺

Peptide content: 98 %

CD: random coil (1.5 10⁻⁴ M in water, r.t.)

Control of the fibrillogenesis of peptide **4** by analytical RP-HPLC

Aggregation of peptide **4** was followed by analytical RP-HPLC on a short column C₁₈. The solid (1250 µg; 0.73 µmol) was dissolved in a mixture of methanol (135 µL), PBS buffer (0.01 M, pH = 7.4, 765 µL) and water (200 µL) to reach a peptide concentration of 664 µM before filtration through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 µm. The solution was incubated in a plastic ependorf at 37°C. The quantity of remaining soluble product is checked as follows: 50 µL of the peptide solution were diluted with 50 µL of water before filtration through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 µm. 10 µL of this filtered solution was injected in an analytical RP-HPLC on a short column C₁₈ (0 to 100 % B in 10 min).

Sample preparation for conventional negative staining electron microscopy and Congo red staining

Stock solution A

4 (10.9 mg, 6.36 µmol) was dissolved in methanol (1.19 mL) and then in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (6.76 mL) to obtain a final peptide concentration of 800 µM in 15 % methanol in buffer. The solution was then filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 µm.

Stock solution B

4 (0.56 mg, 0.327 μmol) was dissolved in 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (600 μL).

Stock solution C

4 (3.94 mg, 2.3 μmol) was dissolved in 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (5750 μL).

Stock solution D

4 (0.63 mg, 0.37 μmol) was dissolved in 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (500 μL).

4S1

4 (0.18 mg, 0.11 μmol) was dissolved in 0.1 M TRIS.HCl – 150 mM at pH 7.49 (530 μL , 200 μM), and the solution was filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm . 200 μL were incubated at room temperature and studied by electron microscopy.

4S2

4 (1.92 mg, 1.12 μmol) was dissolved in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.32 (2 mL). 200 μL of this solution was taken and diluted with 500 μL of buffer. 1 mL of the new solution was taken and diluted with 1 mL of buffer. 1 mL of this last solution (219 μM) was kept at room temperature without filtration.

4S3

1 mL of **4S2** was filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm , giving **4S3**. The solution was incubated at room temperature.

4S4

4 (0.30 mg, 0.18 μmol) was dissolved in 0.1 M TRIS.HCl – 150 mM at pH 7.49 (440 μL , 400 μM). The solution was filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm and incubated at room temperature.

4S5

4 (1.92 mg, 1.12 μmol) was dissolved in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.32 (2 mL, 561 μM). 200 mL of this solution were incubated at room temperature, without filtration.

4S6

4 (0.3 mg, 0.18 μmol) was dissolved in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.32 (440 μL , 400 μM). 100 μL of this solution were kept at room temperature for 13 days before staining.

4S7

4 (0.4 mg, 0.23 μmol) was dissolved in 0.1 M TRIS.HCl – 150 mM NaCl at pH 7.49 (1.17 mL, 200 μM). 0.6 mL of this solution was incubated at room temperature for 9 days.

4S8

0.5 mL of the stock solution A of the amyloid peptide **4** was diluted with 0.5 mL of 15 % methanol in the buffer. The contents of the sample were determined by Congo red staining (400 μL : 200 after 3 days and 200 after 10 days) and electron microscopy (70 μL).

4S9

4 (0.69 mg, 0.4 μmol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 400 μM . It was then filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm and let to incubate at room temperature. The contents of the sample were then controlled by Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μL).

H-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-(H⁺-Arg-Pro)Ser³⁷-Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH ([Ser³⁷]A β (1-42))

[Ser³⁷]A β (1-42)_S1

H-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-(H⁺)Ser²⁶-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-(H⁺-Arg-Pro)Ser³⁷-Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH (0.1 mg, 0.02 μmol) was dissolved in 0.1 M TRIS.HCl – 150 mM NaCl at pH 7.49 (500 μL , 40 μM). The first O \rightarrow N acyl transfer (Ser²⁶) was induced by a change to pH 7. A solution of DPPIV (50 μL of the enzyme solution with a concentration of 0.605.10⁻⁴ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) was added to the sample in order to cleave the arginine-proline dipeptide, which triggered the second O \rightarrow N acyl migration. The resulting solution was kept at room temperature for 9 days before Congo red staining.

H-Val-Tyr-(Arg-Pro)Thr-His-Pro-Phe-OH (dAngII)

dAngII_S1

H-Val-Tyr-(Arg-Pro)Thr-His-Pro-Phe-OH (**dAngII**) (0.39 mg, 0.3 μmol) was dissolved in 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (750 μL , peptide concentration: 400 μM) and filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm . Incubation time: 3 days (half of the solution) and 10 days (the rest of the solution).

Ac-Tyr-Ser-Ala-Leu-Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-(D-Ala)Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-NH₂ (dNPY)

dNPY_S1

Ac-Tyr-Ser-Ala-Leu-Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-(D-Ala)Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-NH₂ (**dNPY**) (0.22 mg, 0.1 μmol) was dissolved in 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42

(250 μ L, peptide concentration: 400 μ M) and filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μ m. Incubation time: 3 days (half of the solution) and 10 days (the rest of the solution).

Congo red

Stock solution A

Congo red (6.5 mg, 9.33 μ mol) was dissolved in methanol (0.18 mL) and then in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (0.99 mL) to obtain a final peptide concentration of 8 mM in 15 % methanol in buffer.

Congo red_S1

0.5 mL of the stock solution A of Congo red were diluted with 0.5 mL of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 to obtain a final concentration of 4 mM. The resulting solution was filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μ m, incubated at room temperature and analyzed by Congo red staining after 3 and 10 days (400 μ L: 200 after 3 days and 200 after 10 days).

Congo red_S2

0.5 mL of the stock solution A of Congo red were mixed with 0.5 mL of the stock solution A of **4** (amyloid peptide: 400 μ M; tested molecule: 10 eq., 4 mM), filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μ m and kept at room temperature. The contents of the sample were controlled by Congo red staining (400 μ L: 200 after 3 days and 200 after 10 days) and electron microscopy (70 μ L).

H-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-OH.2 TFA (5**)**

The peptide **5** was synthesized automatically on Wang resin (1g, initial loading: 0.68 mmol/g, 0.68 mmol) according to the standard procedures of SPPS following the Fmoc/*t*Bu strategy. The first amino acid was coupled manually, due to the difficult coupling on the alcohol function of the resin. Fmoc-Asp(*O**t*Bu)-OH (2.8 g, 6.8 mmol, 10 eq) reacted with *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (0.53 mL, 3.4 mmol, 5 eq.) in anhydrous DCM (47 mL, 0.14 M) and DMF (2 mL, 3.4 M) and the solution was stirred at 0°C under an argon atmosphere for 20 min. The solvents were concentrated under reduced pressure and the white solid was in suspension in DMF (12 mL, 12 mL/g of resin) and added to the resin. It was stirred for 1h40 after addition of DMAP (10 mg, 0.07 mmol, 0.1 eq.). The procedure was repeated three times in the same conditions. Other couplings were carried out using *N* _{α} -Fmoc-protected amino acids (2.04 mmol, 3 eq.), PyBOP (1.6 g, 2.04 mmol, 3 eq.) as activating reagent and DIPEA (0.84 mL, 4.22 mmol, 6 eq.) in DMF (10 mL). The synthesis of the peptide is described in the following table.

Residue	Weight (g)	Quantity (mmol)	Number of eq.	Coupling time	R/A
Wang resin	1	0.68			
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	2.8	6.8	10	1h40, 1h30, 1h, 2h	R,R,R,A
Fmoc-Glu(OtBu)-OH.H ₂ O	0.91	2.04	3	1h	-
Fmoc-Ala-OH.H ₂ O	0.67	2.04	3	1h	-
Fmoc-Phe-OH	0.91	2.04	3	1h, 1h	R
Fmoc-Phe-OH	0.91	2.04	3	1h, 1h	R
Fmoc-Val-OH	0.8	2.04	3	1h, 1h	R
Fmoc-Leu-OH	0.83	2.04	3	1h, 1h	R
Fmoc-Lys(Boc)-OH	0.64	1.37	2	1h	-

After deprotection of the final N-terminal function, the peptide was fully deprotected and cleaved from the resin by treatment with a solution of TFA/TIS/H₂O (95: 2.5: 2.5, v/v/v, 15 mL) for 2h at room temperature. The peptide solution was concentrated under reduced pressure and the product was precipitated by addition of cold diethyl ether to give an uncolored gel. It was dissolved in water and acetonitrile and lyophilized (4.15 g of crude product). The peptide was purified by preparative RP-HPLC C₁₈ (10 to 20 % of B in 5 min then 20 to 50 % of B in 30 min) to afford a white powder (159 mg, 0.13 mmol) after concentration and lyophilisation of the solvents.

Yield: 20 %

RP-HPLC: Rt = 13.6 min (5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 968.1

MW (observed): 483.33 = [M/2+H]⁺; 968.31 = [M+H]⁺

IR on solid KBr sample pellets: amide I band at 1626.6 cm⁻¹, characteristic of a β -sheet conformation.

CD: undefined structure (5 10⁻⁸ M in PBS pH 7.06, r.t.)

Sample preparation for conventional negative staining electron microscopy and Congo red staining

5S1

5 (0.16 mg, 0.13 μ mol) was dissolved in methanol (100 μ L), then in 0.1 M TRIS.HCl – 150 mM NaCl at pH 7.49 (400 μ L). The cloudy solution was filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μ m and 121 μ L of this solution were diluted with methanol (5.8 μ L) and buffer (73.2 μ L) to give a final solution with a peptide concentration of 162 μ M in 15 % methanol in buffer. Samples of 20 μ L were prepared from this solution.

5S2

5 (0.58 mg, 0.48 μ mol) was dissolved in methanol (400 μ L) and then in 0.1 M TRIS.HCl – 150 mM NaCl at pH 7.49 (2 000 μ L). The half of the volume was diluted with methanol (294.7 μ L) and buffer (1973.3

μL). 400 μL of this solution was kept at room temperature without filtration (peptide concentration of 107 μM in 13 % methanol in buffer).

Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**6**)

The peptide **6** was synthesized manually on Rink Amide MBHA resin (1g, initial loading: 0.78 mmol/g, 0.78 mmol) according to the standard procedures of SPPS following the Fmoc/*t*Bu strategy, as described in the following table.

Residue	Weight (g)	Quantity (mmol)	Number of eq.	Coupling time	R/A
Rink Amide MBHA resin	1	0.78			
Fmoc-Asp(<i>O</i> <i>t</i> Bu)-OH	0.64	1.56	2	1h	-
Fmoc-Phe-OH	0.6	1.56	2	1h	-
Fmoc-Phe-OH	0.6	1.56	2	1h	-
Fmoc-Pro-OH.H ₂ O	0.55	1.56	2	2h	-
Fmoc-Leu-OH	0.55	1.56	2	1h30	-

The N-terminus of the peptide was deprotected and then acetylated with Ac₂O (1.5 mL, 15.87 mmol, 20 eq.) and pyridine (0.63 mL, 7.73 mmol, 10 eq.) in DMF (10 mL) by stirring at room temperature for 20 min. The peptide was deprotected and cleaved from the resin by treatment with a solution of TFA/TIS/H₂O (95: 2.5: 2.5, v/v/v, 15 mL, 2h, r.t.). It was precipitated after addition of cold diethyl ether, dissolved in water and acetonitrile, and then lyophilized. The crude product (940 mg) was purified by preparative RP-HPLC C₁₈ (20 to 50 % B in 30 min) to afford a white powder (0.29 g, 0.43 mmol) after lyophilisation of the solvents.

Yield: 55 %

RP-HPLC: Rt = 16.7 min (5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 678.77

MW (observed): 679.35 = [M+H]⁺; 1357.80 = [2M+H]⁺

2D NMR ¹H: (DMSO d₆, 30°C) δ(ppm) = 8.12 (5HN, d, 1H, J_{5NH-5Hα} = 7.6 Hz), 8.05 (1HN, d, 1H, J_{1NH-1Hα} = 7.9 Hz), 8 (4HN, d, 1H, J_{4NH-4Hα} = 7.7 Hz), 7.81 (3HN, d, 1H, J_{3NH-3Hα} = 7.3 Hz), 6.92 to 7.28 (Harom, m), 4.51 (1H_α, m, 1H), 4.48 (5H_α, m, 1H), 4.46 (4H_α, m, 1H), 4.36 (3H_α, td, m, 1H), 4.28 (2H_α, dd, 1H), 3.64 (2H_{δ1}, td, 1H), 3.43 (2H_{δ2}, td, 1H), 3.04 (4H_{β1}, dd, 1H), 2.94 (3H_{β1}, dd, 1H), 2.85 (4H_{β2}, m, 1H), 2.8 (3H_{β2}, m, 1H), 2.66 (5H_{β1}, dd, 1H), 2.5 (5H_{β2}, dd, 1H), 1.92 (2H_{β1}, m, 1H), 1.8 (1CH₃, s, 3H), 1.8 (2H_γ, m, 2H), 1.71

(2H_{β2}, m, 1H), 1.58 (1H_γ, m, 1H), 1.42 (1H_{β1}, m, 1H), 1.33 (1H_{β2}, m, 1H), 0.86 (1H_δ, m, 6H); all trans amide bonds.

Sample preparation for conventional negative staining electron microscopy and Congo red staining

Stock solution A

6 (7.3 mg, 10.75 μmol) was dissolved in methanol (0.2 mL) and then in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1.14 mL) to obtain a final peptide concentration of 8 mM in 15 % methanol in buffer.

6S1

6 (0.38 mg, 0.56 μmol) was dissolved in methanol (300 μL) and then in 0.1 M TRIS.HCl – 150 mM NaCl at pH 7.49 (400 μL). The solution was filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm. 50 μL of this solution were diluted with methanol (8.6 μL) and buffer (141.4 μL) to obtain a final peptide concentration of 200 μM in 15 % methanol in buffer. Samples of 20 μL were prepared.

6S2

0.5 mL of the stock solution A of **6** were diluted with 0.5 mL of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 to obtain a final concentration of 4 mM. The resulting solution was filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm, incubated at room temperature and analyzed by Congo red staining after 3 and 10 days (400 μL: 200 after 3 days and 200 after 10 days).

6S3

0.5 mL of the stock solution A of **6** were mixed with 0.5 mL of the stock solution A of **4** (amyloid peptide: 400 μM; tested molecule: 10 eq., 4 mM; **4/6**; 1: 10), filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm, and then incubated at room temperature. The contents of the sample were controlled by Congo red staining (400 μL: 200 after 3 days and 200 after 10 days) and electron microscopy (70 μL).

6S4

Conventional negative staining electron microscopy:

6 (0.2 mg, 0.29 μmol) was dissolved in the stock solution C of **4** (725 μL) to have a concentration of Aβ(13-23) (**4**) equal to 400 μM and a concentration of **6** equal to 400 μM (**4/6**; 1: 1). The solution was filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm, incubated at room temperature and the nature of its contents was controlled by conventional negative staining electron microscopy (200 μL).

Congo red staining

6 (0.27 mg, 0.4 μmol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 400 μM. It was then mixed with Aβ(13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μmol; **4/6**; 1: 1), filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm, and then incubated at room temperature. The contents of the sample were controlled by Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μL).

6S5

Conventional negative staining electron microscopy:

3 (0.22 mg, 0.32 μmol) was dissolved in the stock solution C of **4** (1600 μL) to have a concentration of A β (13-23) (**4**) equal to 400 μM and a concentration of **3** equal to 200 μM (**4/3**; 2: 1). The solution was filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm , incubated at room temperature and its contents were controlled by conventional negative staining electron microscopy (200 μL).

Congo red staining

6 (0.14 mg, 0.2 μmol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 400 μM . It was then mixed with A β (13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μmol ; **4/6**; 2: 1), filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm , and then incubated at room temperature. The contents of the sample were controlled by Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μL).

Ac-Leu-Val-Phe-Phe-Asp-NH₂ (7)

The peptide **7** was synthesized automatically on Rink Amide MBHA resin (1g, initial loading: 0.78 mmol/g, 0.78 mmol) according to the standard procedures of SPPS following the Fmoc/*t*Bu strategy, as described in the following table.

The N-terminus of the peptide was deprotected and then acetylated with Ac₂O (1.5 mL, 15.87 mmol, 20 eq.) and pyridine (0.63 mL, 7.726 mmol, 10 eq.) in DMF (10 mL) by stirring at room temperature for 20 min. The peptide was deprotected and cleaved from the resin by treatment with a solution of TFA/TIS/H₂O (95: 2.5: 2.5, v/v/v, 15 mL, 2h, r.t.). It was precipitated after addition of cold diethyl ether, dissolved in water and acetonitrile, and then lyophilized. The crude product (940 mg) was purified by preparative RP-HPLC C₁₈ (10 to 20 % B in 5 min, 20 to 50 % B in 30 min) to afford a white powder (56 mg, 0.08 mmol) after lyophilisation of the solvents.

Residue	Weight (g)	Quantity (mmol)	Number of eq.	Coupling time	R/A
Rink Amide MBHA resin	1	0.78			
Fmoc-Asp(O <i>t</i> Bu)-OH	0.96	2.34	3	1h, 1h	R
Fmoc-Phe-OH	0.91	2.34	3	1h, 1h	R
Fmoc-Phe-OH	0.91	2.34	3	1h, 1h	R
Fmoc-Val-OH	0.8	2.34	3	1h, 1h	R
Fmoc-Leu-OH	0.83	2.34	3	1h, 1h	R

Yield: 11 %

Experimental Part

RP-HPLC: $R_t = 17$ min (5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 680.79

MW (observed): 681.31 = $[M+H]^+$; 703.34 = $[M+Na]^+$; 1361.81 = $[2M+H]^+$

IR on solid KBr sample pellets: amide I band at 1637.1 cm^{-1} , characteristic of a random coil conformation.

CD: random coil ($8.7 \cdot 10^{-8}$ M in PBS pH 7.06, r.t.)

2D NMR ^1H : (DMSO d_6 , $30\text{ }^\circ\text{C}$): all trans amide bonds.

Sample preparation for conventional negative staining electron microscopy and Congo red staining

Stock solution A

7 (6.3 mg, $9.25\text{ }\mu\text{mol}$) was dissolved in methanol (0.17 mL) and then in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (0.99 mL) to obtain a final peptide concentration of 8 mM in 15 % methanol in buffer.

Stock solution B

7 (0.33 mg, $0.48\text{ }\mu\text{mol}$) was dissolved in methanol, in 0.1 M phosphate buffer at pH = 7.4 and in water (1: 1: 3; v/v/v; 1.62 mL, $3 \cdot 10^{-4}$ M).

7S1

7 (0.13 mg, $0.19\text{ }\mu\text{mol}$) was dissolved in methanol (100 μL) and then in 0.1 M TRIS.HCl – 150 mM NaCl at pH 7.49 (200 μL). The solution was filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm and 62.8 μL of the solution were diluted with some methanol (9.1 μL) and buffer (128.1 μL) to give a final solution with a peptide concentration of 200 μM in 15 % methanol in buffer. Samples of 20 μL were prepared.

7S2

7 (1.23 mg, $1.81\text{ }\mu\text{mol}$) was dissolved in methanol (346 μL) and then in 0.1 M TRIS.HCl – 150 mM NaCl at pH 7.49 (1 960.4 μL). 400 μL of this solution were filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm (peptide concentration of 783 μM in 15 % methanol in buffer).

7S3

0.5 mL of the stock solution A of 7 were diluted with 0.5 mL of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 to obtain a final concentration of 4 mM. The resulting solution was filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm , incubated at room temperature and analyzed by Congo red staining after 3 and 10 days (400 μL : 200 after 3 days and 200 after 10 days).

7S4

0.5 mL of the stock solution A of 7 were mixed with 0.5 mL of the stock solution A of 4 (amyloid peptide: 400 μM ; tested molecule: 10 eq., 4 mM), filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit

0.22 μm and kept at room temperature. The contents of the sample were controlled by Congo red staining (400 μL : 200 after 3 days and 200 after 10 days) and electron microscopy (70 μL).

(+/-)-trans-4-cotininecarboxyl-Phe-Phe-Asp-NH₂.TFA (**8a** and **8b**)

The peptide was synthesized manually on Rink Amide MBHA resin (initial loading: 0.64 mmol/g of resin, 1g, 0.64 mmol) according to the standard procedures of SPPS following the Fmoc/*t*Bu strategy, as described in the following table.

Residue	Weight (g)	Quantity (mmol)	Number of eq.	Coupling time	R/A
Rink Amide MBHA resin	1	0.64			-
Fmoc-Asp(<i>O</i> <i>t</i> Bu)-OH	0.53	1.29	2	1h, 1h	R, A
Fmoc-Phe-OH	0.5	1.28	2	1h, 1h	R, A
Fmoc-Phe-OH	0.5	1.28	2	1h, 1h	A
(+/-)-trans-4-cotininecarboxylic acid	0.211	0.96	1.5	1h, 1h	R

(+/-)-trans-4-cotininecarboxylic acid was pre-activated with PyBOP (500 mg, 0.96 mmol, 1.5 eq.) in DCM and DMF (5 mL, 1: 1, v/v) by stirring for 15 min at room temperature. The solution was added to the resin with DIPEA (0.2 mL, 1.16 mmol, 1.8 eq.), DCM and DMF (5 mL, 1: 1, v/v). After 1h at room temperature, a second coupling reaction was carried out in the same conditions with half quantities. The peptide was cleaved from the resin after treatment with a solution of TFA/TIS/H₂O (95: 2.5: 2.5, v/v/v, 10 mL, 1h30, r.t.), precipitated with cold diethyl ether and then lyophilized before purification by preparative RP-HPLC C₁₈ (gradient: 10 to 40 % of B in 30 min), affording a white solid (189 mg, 0.255 mmol) after concentration of the solvents under reduced pressure and lyophilization. Two fractions of the desired product were obtained, each one containing in the majority one of the two diastereoisomers: **8a** (111 mg, 0.15 mmol) and **8b** (78 mg, 0.105 mmol).

Yield: 40 %

RP-HPLC: Rt (**8a**) = 11.3 min (5 to 100 % B in 30 min)

Rt (**8b**) = 11.7 min (5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 628.69

MW (observed): 629.37 = [M+H]⁺; 1257.8 = [2M+H]⁺

Sample preparation for conventional negative staining electron microscopy and Congo red staining (+/-)-trans-4-cotininecarboxylic acid (Cotinine)

Stock solution A

(+/-)-trans-4-cotininecarboxylic acid (2.4 mg, 10.9 μmol) was dissolved in methanol (0.2 mL) and then in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1.16 mL) to obtain a final peptide concentration of 8 mM in 15 % methanol in buffer.

Cotinine_S1

0.5 mL of the stock solution A of (+/-)-trans-4-cotininecarboxylic acid were diluted with 0.5 mL of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 to obtain a final concentration of 4 mM. The resulting solution was filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm , incubated at room temperature and analyzed by Congo red staining after 3 and 10 days (400 μL : 200 after 3 days and 200 after 10 days).

Cotinine_S2

0.5 mL of the stock solution A of (+/-)-trans-4-cotininecarboxylic acid were mixed with 0.5 mL of the stock solution A of **Cotinine** (amyloid peptide: 400 μM ; tested molecule: 10 eq., 4 mM), filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm and kept at room temperature. The contents of the sample were controlled by Congo red staining (400 μL : 200 after 3 days and 200 after 10 days) and electron microscopy (70 μL).

Fraction containing a majority of the molecule 8a

Stock solution A

8a (6.7 mg, 9.02 μmol) was dissolved in methanol (0.17 mL) and then in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (0.96 mL) to obtain a final peptide concentration of 8 mM in 15 % methanol in buffer.

8aS1

0.5 mL of the stock solution A of **8a** were diluted with 0.5 mL of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 to obtain a final concentration of 4 mM. The resulting solution was filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm , incubated at room temperature and analyzed by Congo red staining after 3 and 10 days (400 μL : 200 after 3 days and 200 after 10 days).

8aS2

0.5 mL of the stock solution A of **8a** were mixed with 0.5 mL of the stock solution A of **4** (amyloid peptide: 400 μM ; tested molecule: 10 eq., 4 mM), filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm and kept at room temperature. The contents of the sample were controlled by Congo red staining (400 μL : 200 after 3 days and 200 after 10 days) and electron microscopy (70 μL).

8aS3

8a (0.05 mg, 0.06 μmol) was dissolved in the stock solution B of **4** (147 μL) and diluted with a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (3 μL) to obtain a concentration of **4** equal to 400 μM and a concentration of **3a** also equal to 400 μM (**4/3a**; 1: 1). The solution was filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm , incubated at room temperature and its content was followed by conventional negative staining electron microscopy (70 μL).

(+/-)-trans-4-cotininecarboxyl-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-NH₂.TFA (9a and 9b)

The peptide was synthesized manually on Rink Amide MBHA resin (initial loading: 0.64 mmol/g of resin, 1g, 0.64 mmol) according to the standard procedures of SPPS following the Fmoc/*t*Bu strategy, as described in the following table.

Residue	Weight (g)	Quantity (mmol)	Number of eq.	Coupling time	R/A
Rink Amide MBHA resin	1	0.64			-
Fmoc-Asp(<i>O</i> <i>t</i> Bu)-OH	0.53	1.29	2	1h, 1h30	R
Fmoc-Glu(<i>O</i> <i>t</i> Bu)-OH	0.57	1.28	2	1h, 1h	R
Fmoc-Ala-OH.H ₂ O	0.42	1.28	2	45 min	-
Fmoc-Phe-OH	0.5	1.28	2	1h, 1h	R
Fmoc-Phe-OH	0.5	1.28	2	1h, 1h	R
(+/-)-trans-4-cotininecarboxylic acid	0.211	0.96	1.5	45 min, 1h	R

(+/-)-trans-4-cotininecarboxylic acid was pre-activated with PyBOP (500 mg, 0.96 mmol, 1.5 eq.) in DCM and DMF (5 mL, 1: 1, v/v) by stirring for 15 min at room temperature. The solution was added to the resin with DIPEA (0.2 mL, 1.16 mmol, 1.8 eq.), DCM and DMF (5 mL, 1: 1, v/v). After 45 min at room temperature, a second coupling reaction was carried out in the same conditions with half quantities. The peptide was cleaved from the resin by treatment with a solution of TFA/TIS/H₂O (95: 2.5: 2.5, v/v/v, 10 mL, 1h45, r.t.), precipitated in cold diethyl ether, and then lyophilized before purification by preparative RP-HPLC C₁₈ (gradient: 15 to 45 % of B in 30 min), affording a white solid (160 mg, 0.17 mmol) after concentration of the solvents under reduced pressure and lyophilization. Two fractions of the desired product were obtained, each one containing in the majority one of the two diastereoisomers: **9a** (89 mg, 0.09 mmol) and **9b** (71 mg, 0.08 mmol).

Yield: 27 %

RP-HPLC: Rt (**9a**) = 11.5 min (5 to 100 % B in 30 min)

Rt (**9b**) = 11.8 min (5 to 100 % B in 30 min)

Experimental Part

ESI-MS: MW (calculated): 828.87
MW (observed): 829.27 = [M+H]⁺

Sample preparation for conventional negative staining electron microscopy and Congo red staining **Fraction containing a majority of compound 9a**

Stock solution A

9a (8.3 mg, 8.8 μmol) was dissolved in methanol (0.17 mL) and then in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (0.93 mL) to obtain a final peptide concentration of 8 mM in 15 % methanol in buffer.

9aS1

0.5 mL of the stock solution A of 9a were diluted with 0.5 mL of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 to obtain a final concentration of 4 mM. The resulting solution was filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm, incubated at room temperature and analyzed by Congo red staining after 3 and 10 days (400 μL: 200 after 3 days and 200 after 10 days).

9aS2

0.5 mL of the stock solution A of 9a were mixed with 0.5 mL of the stock solution A of 4 (amyloid peptide: 400 μM; tested molecule: 10 eq., 4 mM), filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm and kept at room temperature. The contents of the sample were controlled by Congo red staining (400 μL: 200 after 3 days and 200 after 10 days) and electron microscopy (70 μL).

Fraction containing a majority of compound 9b

Stock solution A

9b (8 mg, 8.48 μmol) was dissolved in methanol (0.16 mL) and then in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (0.9 mL) to obtain a final peptide concentration of 8 mM in 15 % methanol in buffer.

9bS1

0.5 mL of the stock solution A of 9b were diluted with 0.5 mL of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 to obtain a final concentration of 4 mM. The resulting solution was filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm, incubated at room temperature and analyzed by Congo red staining after 3 and 10 days (400 μL: 200 after 3 days and 200 after 10 days).

9bS2

0.5 mL of the stock solution A of 9b were mixed with 0.5 mL of the stock solution A of 4 (amyloid peptide: 400 μM; tested molecule: 10 eq., 4 mM), filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit

0.22 μm and kept at room temperature. The contents of the sample were controlled by Congo red staining (400 μL : 200 after 3 days and 200 after 10 days) and electron microscopy (70 μL).

(+/-)-trans-4-cotininecarboxyl-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂.TFA (10)

The peptide was synthesized manually on Rink Amide MBHA resin (initial loading: 0.64 mmol/g of resin, 1g, 0.64 mmol) according to the standard procedures of SPPS following the Fmoc/*t*Bu strategy, as described in the following table.

Residue	Weight (g)	Quantity (mmol)	Number of eq.	Coupling time	R/A
Rink Amide MBHA resin	1	0.64			-
Fmoc-Asp(<i>O</i> <i>t</i> Bu)-OH	0.53	1.29	2	1h, 1h	R, A
Fmoc-Phe-OH	0.5	1.28	2	1h, 1h	R, A
Fmoc-Phe-OH	0.5	1.28	2	1h, 1h	A
Fmoc-Pro-OH.H ₂ O	0.43	1.28	2	1h	-
(+/-)-trans-4-cotininecarboxylic acid	0.211	0.96	1.5	1h, 1h	R, A

(+/-)-trans-4-cotininecarboxylic acid was pre-activated with PyBOP (500 mg, 0.96 mmol, 1.5 eq.) in DCM and DMF (5 mL, 1: 1, v/v) by stirring for 15 min at room temperature. The solution was added to the resin with DIPEA (0.2 mL, 1.16 mmol, 1.8 eq.), DCM and DMF (5 mL, 1: 1, v/v). After 1h at room temperature, a second coupling reaction was carried out in the same conditions with half quantities. The peptide was cleaved from the resin by treatment with a solution of TFA/TIS/H₂O (95: 2.5: 2.5, v/v/v, 10 mL, 1h30, r.t.), precipitated in cold diethyl ether, and then lyophilized before purification by preparative RP-HPLC C₁₈ (gradient: 10 to 40 % of B in 30 min), affording a white solid (274 mg, 0.326 mmol) after concentration of the solvents under reduced pressure and lyophilization.

Yield: 51 %

RP-HPLC: Rt = 12 min (5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 725.79

MW (observed): 726.34 = [M+H]⁺

CD: undefined secondary structure

Sample preparation for conventional negative staining electron microscopy and Congo red staining

Stock solution A

10 (7.2 mg, 8.57 μmol) was dissolved in methanol (0.16 mL) and then in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (0.91 mL) to obtain a final peptide concentration of 8 mM in 15 % methanol in buffer.

10S1

0.5 mL of the stock solution A of **10** were diluted with 0.5 mL of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 to obtain a final concentration of 4 mM. The resulting solution was filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm , incubated at room temperature and analyzed by Congo red staining after 3 and 10 days (400 μL : 200 after 3 days and 200 after 10 days).

10S2

0.5 mL of the stock solution A of **10** were mixed with 0.5 mL of the stock solution A of **4** (amyloid peptide: 400 μM ; tested molecule: 10 eq., 4 mM; **4/10**: 1: 10), filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm and incubated at room temperature. The contents of the sample were controlled by Congo red staining (400 μL : 200 after 3 days and 200 after 10 days) and electron microscopy (70 μL).

10S3

Conventional negative staining electron microscopy

10 (0.05 mg, 0.06 μmol) was dissolved in the stock solution B of A β (13-23) (**4**) (147 μL) and diluted with a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (53 μL) to obtain a concentration of **4** equal to 400 μM and a concentration of **10** also equal to 400 μM (**4/10**: 1: 1). The solution was filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm , incubated at room temperature and its content was controlled by conventional negative staining electron microscopy (150 μL).

Congo red staining

10 (0.34 mg, 0.4 μmol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 400 μM . It was then mixed with A β (13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μmol ; **4/10**: 1: 1), filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm and incubated at room temperature. The contents of the sample were then controlled by Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μL).

Host-guest switch-peptide technique

Stock solution B

10 (0.78 mg, 1.07 μmol) was dissolved in methanol, in 0.1 M phosphate buffer at pH = 7.4 and in water (1: 1: 3; v/v/v; 3.58 mL, 3.10^{-4} M).

10S4

150 μL of the stock solution B of **10** were diluted with 150 μL of a mixture of methanol, 0.1 M phosphate buffer at $\text{pH} = 7.4$ and water (1: 1: 3; v/v/v) and with 5 μL of water. The solution was analyzed by circular dichroism.

10S5

150 μL of the stock solution B of **10** were mixed with 150 μL of the stock solution A of the host-guest switch-peptide (**10**/host-guest; 1: 1). 5 μL of a solution of the enzyme DPPIV (0.65 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in water) were added to the solution before analysis by circular dichroism.

Molecule 7:

7S5

150 μL of the stock solution B of **7** were mixed with 150 μL of the stock solution A of the host-guest switch-peptide (**7**/host-guest; 1: 1). 5 μL of a solution of the enzyme DPPIV (0.65 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in water) were added to the solution before analysis by circular dichroism.

Ac-Ser-Leu-Ser-Leu-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-(Arg-Pro)Ser-Glu-Asp-Val-Ser-Leu-Gly-NH₂ (host-guest switch-peptide)

Stock solution A

The peptide at the S_{off} state (2.33 mg, 1.01 μmol) was dissolved in methanol, in 0.1 M phosphate buffer at $\text{pH} = 7.4$ and in water (1: 1: 3; v/v/v; 3.37 mL, $3 \cdot 10^{-4}$ M).

Host-Guest switch-peptide_S1

150 μL of the stock solution A of the host-guest switch-peptide were diluted with 150 μL of a mixture of methanol, 0.1 M phosphate buffer at $\text{pH} = 7.4$ and water (1: 1: 3; v/v/v). 5 μL of a solution of the enzyme DPPIV (0.65 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in water) were added to the solution before analysis by circular dichroism.

(+/-)-trans-4-cotininecarboxyl-Pro-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-NH₂.TFA (11)

The peptide was synthesized manually on Rink Amide MBHA resin (initial loading: 0.64 mmol/g of resin, 1g, 0.64 mmol) according to the standard procedures of SPPS following the Fmoc/*t*Bu strategy, as described in the following table.

(+/-)-trans-4-cotininecarboxylic acid was pre-activated with PyBOP (500 mg, 0.96 mmol, 1.5 eq.) in DCM and DMF (5 mL, 1: 1, v/v) by stirring for 15 min at room temperature. The solution was added to the resin with DIPEA (0.2 mL, 1.16 mmol, 1.8 eq.), DCM and DMF (5 mL, 1: 1, v/v). After 45 min at room temperature, a second coupling reaction was carried out in the same conditions with half quantities. The peptide was cleaved from the resin by treatment with a solution of TFA/TIS/H₂O (95: 2.5: 2.5, v/v/v, 10 mL, 1h45, r.t.), precipitated in cold diethyl ether, and then lyophilized before purification by

preparative RP-HPLC C₁₈ (gradient: 15 to 45 % of B in 30 min), affording a white solid (221 mg, 0.21 mmol) after concentration of the solvents under reduced pressure and lyophilization.

Residue	Weight (g)	Quantity (mmol)	Number of eq.	Coupling time	R/A
Rink Amide MBHA resin	1	0.64			-
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.53	1.29	2	1h, 1h30	R
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.57	1.28	2	1h, 1h	R
Fmoc-Ala-OH.H ₂ O	0.42	1.28	2	45 min	-
Fmoc-Phe-OH	0.5	1.28	2	1h, 1h	R
Fmoc-Phe-OH	0.5	1.28	2	1h, 1h	R
Fmoc-Pro-OH.H ₂ O	0.43	1.28	2	1h	-
(+/-)-trans-4-cotininecarboxylic acid	0.211	0.96	1.5	45 min, 1h	R, A

Yield: 33 %

RP-HPLC: Rt = 12.1 min (5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 925.98

MW (observed): 464.32 = [M/2+H]⁺; 926.81 = [M+H]⁺

Sample preparation for conventional negative staining electron microscopy and Congo red staining

Stock solution A

11 (9.8 mg, 9.42 μmol) was dissolved in methanol (0.18 mL) and then in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a final peptide concentration of 8 mM in 15 % methanol in buffer.

11S1

0.5 mL of the stock solution A of **11** were diluted with 0.5 mL of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 to obtain a final concentration of 4 mM. The resulting solution was filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm, incubated at room temperature and analyzed by Congo red staining after 3 and 10 days (400 μL: 200 after 3 days and 200 after 10 days).

11S2

0.5 mL of the stock solution A of **11** were mixed with 0.5 mL of the stock solution A of **4** (amyloid peptide: 400 μM; tested molecule: 10 eq., 4 mM), filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μm and kept at room temperature. The contents of the sample were controlled by Congo red staining (400 μL: 200 after 3 days and 200 after 10 days) and electron microscopy (70 μL).

11S3

Conventional negative staining electron microscopy

11 (0.14 mg, 0.16 μ mol) was dissolved in the stock solution D of A β (13-23) (**4**) (285 μ L) and then diluted with a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (35 μ L) in order to obtain a concentration of A β (13-23) (**4**) equal to 400 μ M and a concentration of **3** equal to 400 μ M (**4/11**; 1: 1). The solution was filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μ m, incubated at room temperature and its contents were followed by conventional negative staining electron microscopy (200 μ L).

Congo red staining

11 (0.42 mg, 0.4 μ mol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 400 μ M. It was then mixed with A β (13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μ mol; **4/11**; 1: 1), filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μ m and incubated at room temperature. The contents of the sample were then controlled by Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μ L).

3-indolebutyryl-Phe-Phe-Asp-NH₂.TFA (12**)**

The peptide was synthesized manually on Rink Amide MBHA resin (initial loading: 0.64 mmol/g of resin, 1g, 0.64 mmol) according to the standard procedures of SPPS following the Fmoc/*t*Bu strategy, as described in the following table.

Residue	Weight (g)	Quantity (mmol)	Number of eq.	Coupling time	R/A
Rink Amide MBHA resin	1	0.64			-
Fmoc-Asp(<i>O</i> <i>t</i> Bu)-OH	0.53	1.29	2	1h, 1h	R, A
Fmoc-Phe-OH	0.5	1.28	2	1h, 1h	R, A
Fmoc-Phe-OH	0.5	1.28	2	1h, 1h	A
3-indolebutyric acid	0.26	1.28	2	1h, 30 min	R

3-indolebutyric acid was pre-activated with PyBOP (666 mg, 1.28 mmol, 2 eq.) in DCM and DMF (10 mL, 1: 1, v/v) by stirring for 15 min at room temperature. The solution was added to the resin with DIPEA (0.33 mL, 1.93 mmol, 3 eq.). After 1h at room temperature, a second coupling reaction was carried out in the same conditions with half quantities and stirring for 30 min. The peptide was cleaved from the resin after treatment with a solution of TFA/TIS/H₂O (95: 2.5: 2.5, v/v/v, 10 mL, 1h15, r.t.), precipitated with cold diethyl ether and then lyophilized to give a dark green solid. This colour is characteristic of an oxidation of indole. The product was then purified by preparative RP-HPLC C₁₈

(gradient: 30 to 60 % of B in 30 min), affording the desired compound (13 mg, 0.018 mmol) after concentration of the solvents under reduced pressure and lyophilization.

Yield: 3 %

RP-HPLC: $R_t = 18.7$ min (5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 611.69

MW (observed): 612.53 = $[M+H]^+$

Sample preparation for conventional negative staining electron microscopy and Congo red staining 3-indolebutyric acid (Indole)

Stock solution A

3-indolebutyric acid (2.5 mg, 12.3 μ mol) was dissolved in methanol (0.23 mL) and then in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1.31 mL) to obtain a final peptide concentration of 8 mM in 15 % methanol in buffer.

Indole_S1

0.5 mL of the stock solution A of 3-indolebutyric acid were diluted with 0.5 mL of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 to obtain a final concentration of 4 mM. The resulting solution was filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μ m, incubated at room temperature and analyzed by Congo red staining after 3 and 10 days (400 μ L: 200 after 3 days and 200 after 10 days).

Indole_S2

0.5 mL of the stock solution A of 3-indolebutyric acid were mixed with 0.5 mL of the stock solution A of **4** (amyloid peptide: 400 μ M; tested molecule: 10 eq., 4 mM), filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μ m and kept at room temperature. The contents of the sample were controlled by Congo red staining (400 μ L: 200 after 3 days and 200 after 10 days) and electron microscopy (70 μ L).

Molecule **12**

12S1

Conventional negative staining electron microscopy:

12 (0.22 mg, 0.36 μ mol) was dissolved in the stock solution C of **4** (900 μ L) to have a concentration of A β (13-23) (**4**) equal to 400 μ M and a concentration of **12** equal to 400 μ M (**4/12**; 1: 1). The solution was filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22 μ m, incubated at room temperature and its contents were controlled by conventional negative staining electron microscopy (200 μ L).

Congo red staining:

12 (0.25 mg, 0.4 μ mol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 400 μ M. It was then mixed with A β (13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μ mol; **4/12**; 1: 1), filtered through a Millex Syringe Driven Filter Unit 0.22

μm and incubated at room temperature. Its contents were then controlled by Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μL).

Hao-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂.TFA (13)

The peptide was synthesized manually on Rink Amide MBHA resin (initial loading: 0.64 mmol/g of resin, 500 mg, 0.32 mmol) according to the standard procedures of SPPS following the Fmoc/*t*Bu strategy, as described in the following table.

Residue	Weight (g)	Quantity (mmol)	Number of eq.	Coupling time	R/A
Rink Amide MBHA resin	0.5	0.32			-
Fmoc-Asp(<i>O</i> <i>t</i> Bu)-OH	0.26	0.64	2	1h, 1h	R, A
Fmoc-Phe-OH	0.25	0.64	2	1h, 1h	R, A
Fmoc-Phe-OH	0.25	0.64	2	1h, 1h	A
Fmoc-Pro-OH.H ₂ O	0.34	0.96	3	30 min	-
Fmoc*-Hao-OH	0.18	0.32	1	2.30	A

Fmoc*-Hao-OH was coupled to the proline on the resin in presence of HATU (122 mg, 0.32 mmol, 1 eq.) as activating reagent and DIPEA as base (0.17 mL, 0.96 mmol, 3 eq.), in a mixture of DCM and DMF (10 mL, 1: 1, v/v). The resin was stirred at room temperature for 2h30, and then the Fmoc* protecting group was deprotected with 20 % piperidine in DMF (20 mL, 5 x 2 min, r.t.). The peptide was cleaved from the resin by treatment with a solution of TFA/TIS/H₂O (95: 2.5: 2.5, v/v/v, 10 mL, 2h30, r.t.), precipitated in cold diethyl ether, and then lyophilized before purification first by preparative RP-HPLC C₁₈ (gradient: 0 to 100 % of B in 30 min), and then by semi-preparative RP-HPLC C₁₈ (gradient: 20 to 50 % of B in 30 min), affording a white solid (40 mg, 0.053 mmol) after concentration of the solvents under reduced pressure and lyophilization.

Yield: 17 %

RP-HPLC: Rt = 5.65 min (0 to 100 % B in 10 min)

ESI-MS: MW (calculated): 758.78

MW (observed): 759.28 = [M+H]⁺

L-2,2-dimethyl-4-thiazolidinecarboxylic acid hydrochloride H-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH.HCl (14**)**

L-cysteine hydrochloride hydrate (1g, 5.714 mmol, 1 eq.) was dissolved in concentrated HCl 37 % (4 mL, 1.4 M) and stirred at room temperature for 5 min. After concentration under reduced pressure, the amino acid was suspended in acetone (60 mL, 0.1 M), before addition of 2,2-dimethoxypropane (12.5 mL, 101.786 mmol, 18 eq.). The mixture was heated to reflux for 1h (oil bath at 65 °C), let at room temperature for 30 min and then cooled down in an ice bath. The white powder was isolated after filtration and drying overnight (666 mg, 3.37 mmol).

Yield: 60 %

RP-HPLC: Rt = 0.3 min (0 to 100 % B in 10 min)

ESI-MS: MW (calculated): 161.22

MW (observed): 162.82 = [M+H]⁺

NMR ¹H: (DMSO d₆, 30°C) δ (ppm) = 5.75 (NH, 1H, s), 3.78-3.74 (H _{α} , dd, 1H, J_{H α -H β 1} = 7.1 Hz, J_{H α -H β 2} = 8.3 Hz), 3.3-3.26 (H _{β 1}, dd, 1H, J_{H β 1-H α} = 7.1 Hz, J_{H β 1-H β 2} = 10.5 Hz), 2.86-2.81 (H _{β 2}, dd, 1H, J_{H β 2-H α} = 8.7 Hz, J_{H β 2-H β 1} = 10.5 Hz), 1.58 (CH₃, s, 3H), 1.38 (CH₃, s, 3H).

Fmoc- β Ala-Cl (15**)**

Fmoc- β Ala-OH (100 mg, 0.321 mmol, 1 eq.) was dissolved in anhydrous dichloromethane (1.4 mL, 0.2 M) and DMF (0.5 μ L, 0.02 eq.) under an argon atmosphere. The solution was cooled down with an ice bath before a slow addition of oxalyl chloride (0.03 mL, 0.344 mmol, 1 eq.), resulting in a yellow solution that was stirred for 2h at room temperature. The reaction was followed by ESI-MS and analytical RP-HPLC, after addition of methanol to an aliquot from the reactive mixture, which gave the corresponding methyl ester. Solvents were concentrated under reduced pressure, affording a yellow residue that was used without further purification.

Yield: quantitative

RP-HPLC: Rt = 20.5 min (5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 329.78; Fmoc- β Ala-OMe (calculated): 325.28

MW (observed): 325.82 = [M(ester)+H]⁺

Fmoc- β Ala-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH (16**)**

H-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH.HCl **14** (52 mg, 0.263 mmol, 1 eq.) was dissolved in dry tetrahydrofuran (2 mL, 0.1 M) and DMF (0.5 mL, 0.5 M) under an argon atmosphere and cooled down with an ice bath. Fmoc- β Ala-Cl **15** (0.321 mmol, 1.2 eq), in solution in dry tetrahydrofuran (4 mL, 0.07 M) and dichloromethane

(2 mL, 0.1 M), was slowly added to the first solution. The temperature was let to increase to room temperature; the brown solution was stirred for 15h before concentration under reduced pressure. The brown residue was dissolved in ethyl acetate (6 mL, 0.04 M) and washed successively with a solution of 5 % citric acid (6 mL, twice) and saturated brine (6 mL, twice). The organic phases were combined, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure, affording a white solid (72 mg, 0.158 mmol) after purification by preparative RP-HPLC C₁₈ (gradient: 5 to 100 % B in 30 min).

Yield: 60 %

RP-HPLC: Rt = 23.1 min (5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 454.54

MW (observed): 455.31 = [M+H]⁺

Ac-βAla-Cys(Ψ^{Me, Me} pro)-OH (17)

Fmoc-βAla-Cys(Ψ^{Me, Me} pro)-OH 16 (200 mg, 0.44 mmol, 1 eq.) was solubilized in DMF (20 mL, 0.22 mM) before addition of diethylamine (70 μL, 0.68 mmol, 1.5 eq.). After 40 min at room temperature, the solvents were concentrated under reduced pressure. The white oil was then dissolved in dry dichloromethane (15 mL, 0.3 mM) and mixed with pyridine (0.14 mL, 1.72 mmol, 4 eq.) and acetic anhydride (0.17 mL, 1.8 mmol, 4 eq.) under an argon atmosphere. After 20 min at room temperature, solvents were concentrated under reduced pressure. A purification by preparative RP-HPLC C₁₈ (gradient: 15 to 45 % B in 30 min) gave the desired compound as a white powder (110 mg, 0.4 mmol).

Yield: 91 %

H-βAla-Cys(Ψ^{Me, Me} pro)-OH

ESI-MS: MW (calculated): 232.3

MW (observed): 232.87 = [M+H]⁺

Ac-βAla-Cys(Ψ^{Me, Me} pro)-OH (17)

RP-HPLC: Rt = 9.7 min (5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 274.34

MW (observed): 275.31 = [M+H]⁺

Ac-βAla-Cys(Ψ^{Me, Me} pro)-(Boc)Cys-OH (18)

Ac-βAla-Cys(Ψ^{Me, Me} pro)-OH 17 (300 mg, 1.094 mmol, 1.2 eq.) and PyBOP (569 mg, 1.093 mmol, 1.2 eq.) were dissolved in dimethylformamide (14 mL, 0.07 M) and stirred at room temperature under an argon atmosphere for 30 min. Boc-Cys-OH (202 mg, 0.913 mmol, 1 eq.) and then DIPEA (0.4 mL, 2.337 mmol, 2.6 eq.) were added to the yellow solution that was stirred for 1h30. Solvents were concentrated

under reduced pressure, and then the residue was dissolved in water before lyophilisation. A purification by preparative RP-HPLC C₁₈ (gradient: 15 to 45 % of B in 30 min) afforded a white powder (62 mg, 0.13 mmol).

Yield: 14 %

RP-HPLC: Rt = 15.9 min (5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 477.60

MW (observed): 377.89 = [M-Boc+H]⁺; 477.89 = [M+H]⁺

Ac-βAla-Cys(Ψ^{Me, Me} pro)-(H⁺)Cys-OH (19)

Ac-βAla-Cys(Ψ^{Me, Me} pro)-(Boc)Cys-OH 18 (32 mg, 0.067 mmol, 1 eq) was dissolved in a solution of 70 % of TFA in dichloromethane (3 mL, 0.02 M) and stirred at room temperature for 30 min. Solvents were concentrated under reduced pressure and the product was used without further purification.

Yield: quantitative

RP-HPLC: Rt = 9.3 min (5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 377.48

MW (observed): 377.80 = [M+H]⁺

Ac-βAla-Cys(Ψ^{Me, Me} pro)-Cys-OH (20) via a S→N acyl migration

A fourth of crude 22 (16.8 μmol), dissolved in sodium phosphate buffer 0.2 M at pH 6.23 (1.7 mL, 0.01 M) giving a resulting pH equal to 6.15, was stirred at 39°C. The kinetics of the S→N acyl migration was followed by analytical RP-HPLC C₁₈ (gradient: 0 to 100 % B in 30 min). Samples of 50 μL from the reaction mixture were diluted with 94 μL of a solution of hydrochloric acid 0.1 M and 50 μL of the buffer in order to block the rearrangement. 20 μL of these solutions were injected in analytical RP-HPLC. The same reaction in degassed solutions and under an argon atmosphere allowed to avoid the formation of the disulfide compound.

Yield: quantitative

RP-HPLC: Rt = 11.6 min (5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 377.48

MW (observed): 377.80 = [M+H]⁺; 754.85 = [2M+H]⁺

Half time: 2 min 30 sec.

Oxidized form: [Ac-βAla-Cys(Ψ^{Me, Me} pro)-Cys-OH]₂

RP-HPLC: Rt = 12.9 min (5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 753.94
 MW (observed): 753.3 = [M+H]⁺; 1505.35 = [2M+H]⁺

Ac-βAla-Cys(Ψ^{Me, Me} pro)-(H⁺)Cys-Phe-Phe-Asp-NH₂.TFA (**21**)

The peptide was synthesized manually on Rink Amide MBHA resin (1.33 g, initial loading: 0.78 mmol/g, 1.04 mmol), according to the standard procedures of SPPS following the Fmoc/*t*Bu strategy, as described in the next table.

Residue	Weight (g)	Quantity (mmol)	Number of eq.	Coupling time	R/A
Rink Amide MBHA resin	1.33	1.04			-
Fmoc-Asp(<i>O</i> <i>t</i> Bu)-OH	0.85	2.07	2	1h, 1h	R, A
Fmoc-Phe-OH	0.81	2.09	2	1h, 1h	R
Fmoc-Phe-OH	0.81	2.09	2	1h	-
Boc-Cys(<i>S</i> <i>t</i> Bu)-OH	0.97	3.12	3	1h15	-

Deprotection of the lateral chain of cysteine was attempted with a solution of 2-mercaptoethanol in DMF (1: 1, v/v, 35 mL, 0.03 M) and stirring at room temperature for 14h, as described in the literature²⁹³. A cleavage test revealed that the function was not deprotected.

A second treatment with 75 % of 2-mercaptoethanol in DMF (35 mL, 0.03 M, 5h30 at room temperature) did not release the thiol function.

Stirring the resin with 50 % of 2-mercaptoethanol in DMF (35 mL, 0.03 M) at 80°C for 17h, as suggested by Denis and Trifilieff³¹¹ finally released the SH group.

Ac-βAla-Cys(Ψ ^{Me, Me} pro)-OH (17)	1.14	4.16	4	1h15, 1h15	R
--	------	------	---	------------	---

The dipeptide **17** was pre-activated with PyBOP (2.17 g, 4.16 mmol, 4 eq.) in DMF (10 mL, 0.4 M) for 10 min at room temperature. The solution was then added to the resin and stirred with DIPEA (1.27 mL, 7.29 mmol, 7 eq.) at room temperature for 1h15.

The peptide was deprotected and cleaved from the resin with a solution of TFA/TIS/H₂O (95: 2.5: 2.5, v/v/v, 15 mL) for 1h30 at room temperature. The resin was washed several times with methanol and TFA and the solvents were concentrated under reduced pressure. The crude peptide was precipitated in cold diethyl ether, centrifuged, dissolved in water and then lyophilized. It was purified by preparative RP-HPLC C₁₈ (gradient: 25 to 55 % B in 30 min) to afford a white solid (378 mg, 0.42 mmol) after lyophilisation of solvents.

Yield: 40 %

Experimental Part

RP-HPLC: Rt = 14.2 min (5 to 100 % B in 30 min); 16.3 (0 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 785.93

MW (observed): 786.33 = [M+H]⁺

Sample preparation for conventional negative staining electron microscopy and Congo red staining

21S1

21 (3.14 mg, 4 μmol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 400 μM. It was then filtered and incubated at room temperature. Its contents were then controlled after Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μL).

21S2

Conventional negative staining electron microscopy

21 (0.63 mg, 0.802 μmol) was dissolved in the stock solution B of **4** (147 μL) and diluted with a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (53 μL) to obtain a concentration of **4** equal to 400 μM and a concentration of **24** equal to 4 mM (**4/24**; 1: 10). The solution was filtered, incubated at room temperature and its contents were followed by conventional negative staining electron microscopy (70 μL).

Congo red staining

21 (3.14 mg, 4 μmol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 400 μM. It was then mixed with Aβ(13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μmol; **4/21**; 1: 10), filtered and incubated at room temperature. Its contents were then controlled after Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μL).

Ac-βAla-Cys(Ψ^{Me, Me} pro)-Cys-Phe-Phe-Asp-NH₂ (22**) via a S→N acyl migration**

pH = 3.1; T = 37°C

4 mg of **24** (5.1 μmol) were dissolved in a degassed mixture of sodium phosphate buffer 0.01 M at pH = 7.1 (0.3 mL) and acetonitrile (0.2 mL) to give a 0.01 M peptide concentration and a resulting pH equal to 3.1. The solution was stirred at 37°C and the kinetics of the S→N acyl migration was followed by RP-HPLC. Samples of 30 μL from the reaction mixture were diluted with 10 μL of a degassed solution of hydrochloric acid 0.1 M and 20 μL of the degassed buffer in order to stop the rearrangement. 17 μL of these solutions were injected by analytical RP-HPLC C₁₈ (gradient: 0 to 100 % B in 30 min).

t_{1/2}: 1h 24 min 40 sec.

pH = 5.83; T = 3 to 5°C

4 mg of **24** (5.1 μ mol) were dissolved in a degassed mixture of sodium phosphate buffer 0.2 M at pH = 5.93 (0.51 mL) and acetonitrile (0.05 mL) to give a peptide concentration of 0.01 M and a resulting pH equal to 5.83. The solution was stirred at 3 to 5°C and the kinetics of the S \rightarrow N acyl migration was followed by RP-HPLC. Samples of 25 μ L from the reaction mixture were diluted with 25 μ L of a degassed solution of hydrochloric acid 0.1 M in order to stop the rearrangement. 20 μ L of these solutions were injected by analytical RP-HPLC C₁₈ (gradient: 0 to 100 % B in 30 min).

$t_{1/2}$: 2h 1 min 26 sec.

pH = 5.83; T = 37°C

2.6 mg of **24** (3.3 μ mol) were dissolved in a degassed mixture of sodium phosphate buffer 0.2 M at pH = 5.93 (0.33 mL) and acetonitrile (0.052 mL) to give a peptide concentration of 0.01 M and a resulting pH equal to 5.83. The solution was stirred at 37°C and the kinetics of the S \rightarrow N acyl migration was followed by RP-HPLC. Samples of 25 μ L from the reaction mixture were diluted with 25 μ L of a degassed solution of hydrochloric acid 0.1 M in order to stop the rearrangement. 20 μ L of these solutions were injected by analytical RP-HPLC C₁₈ (gradient: 0 to 100 % B in 30 min).

$t_{1/2}$: 4 min 47 sec.

pH = 9.1; T = 37°C

4 mg of **24** (5.1 μ mol) were dissolved in a degassed mixture of carbonate buffer 0.2 M at pH = 9.42 (0.4 mL) and acetonitrile (0.1 mL) to give a peptide concentration of 0.01 M and a resulting pH equal to 9.1. The solution was stirred at 37°C and the kinetics of the S \rightarrow N acyl migration was followed by RP-HPLC. Samples of 25 μ L from the reaction mixture were diluted with 15 μ L of a degassed solution of hydrochloric acid 0.1 M and 15 μ L of the degassed buffer in order to stop the rearrangement. 17 μ L of these solutions were injected by analytical RP-HPLC C₁₈ (gradient: 0 to 100 % B in 30 min).

t: inferior to 30 sec.

RP-HPLC: R_t = 17.8 min (0 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 785.93

MW (observed): 786.29 = [M+H]⁺

Ac- β Ala-Cys(Ψ ^{Me, Me} pro)-(Ac)Cys-Phe-Phe-Asp-NH₂ (23**)**

The peptide was synthesized manually on Rink Amide MBHA resin (0.67 g, initial loading: 0.78 mmol/g, 0.52 mmol), as described in the following table, according to the standard procedures of SPPS following the Fmoc/*t*Bu strategy.

The dipeptide Ac- β Ala-Cys(Ψ ^{Me, Me} pro)-OH **17** was pre-activated with PyBOP (1.08 g, 2.08 mmol, 4 eq.) in DMF (5 mL, 0.4 M) for 15 min at room temperature. The solution was then added to the resin and stirred with DIPEA (0.64 mL, 3.67 mmol, 7 eq.) at room temperature for 1h.

Experimental Part

The peptide was deprotected and cleaved from the resin with a solution of TFA/TIS/H₂O (95: 2.5: 2.5, v/v/v, 10 mL) for 1h30 at room temperature. The resin was washed several times with methanol and TFA and the solvents were concentrated under reduced pressure.

Residue	Weight (g)	Quantity (mmol)	Number of eq.	Coupling time	R/A
Rink Amide MBHA resin	0.67	0.52			-
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.43	1.05	2	1h, 1h	R, A
Fmoc-Phe-OH	0.40	1.03	2	1h, 1h	R
Fmoc-Phe-OH	0.40	1.03	2	1h	-
Fmoc-Cys(S _t Bu)-OH	0.67	1.56	3	1h15	-

Deprotection of amine with 20 % piperidine in DMF (5 x 2 min), and then acetylation.
Deprotection of the lateral chain of cysteine with a solution of 2-mercaptoethanol in DMF (1: 1, v/v, 10 mL, 0.05 M); stirring at room temperature for 9h.

Ac-βAla-Cys(Ψ ^{Me, Me} pro)-OH (17)	0.57	2.67	4	1h, 1h	R
---	------	------	---	--------	---

The crude peptide precipitated from cold diethyl ether, was centrifuged, dissolved in water and then lyophilized. It was purified by preparative RP-HPLC C₁₈ (gradient: 30 to 60 % B in 30 min) to afford a white solid (110 mg, 0.133 mmol) after lyophilisation of solvents.

Yield: 26 %

RP-HPLC: Rt = 15.6 min (5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 827.97

MW (observed): 828.31 = [M+H]⁺

Sample preparation for conventional negative staining electron microscopy and Congo red staining

Stock solution A

23 (7.4 mg, 8.94 μmol) was dissolved in methanol (0.17 mL) and then in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (0.95 mL) to obtain a final peptide concentration of 8 mM in 15 % methanol in buffer.

23S1

0.5 mL of the stock solution A of **26** were diluted with 0.5 mL of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 to obtain a final concentration of 4 mM. The resulting solution was filtered (filter unit – porosity: 0.22 μm), incubated at room temperature and analyzed by Congo red staining after 3 and 10 days (400 μL: 200 after 3 days and 200 after 10 days).

23S2

0.5 mL of the stock solution A of **26** were mixed with 0.5 mL of the stock solution A of **4** (amyloid peptide: 400 μ M; tested molecule: 10 eq., 4 mM), filtered with a filter unit (porosity: 0.22 μ m) and kept at room temperature. The contents of the sample were controlled by Congo red staining (400 μ L: 200 after 3 days and 200 after 10 days) and electron microscopy (70 μ L).

Ac-Ala-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH (24**)**

Direct synthesis of the dipeptide 24

Ac-Ala-OH (75 mg, 0.572 mmol, 1.2 eq.) and HATU (218 mg, 0.573 mmol, 1.2 eq.) were dissolved in anhydrous dichloromethane (3 mL, 0.2 M) under an argon atmosphere. After addition of DIPEA (0.24 mL, 1.402 mmol, 2.9 eq.), the resulting solution was stirred at room temperature for 20 min. The main part of H-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH.HCl **14** (77 mg, 0.39 mmol, 0.7 eq.) was mixed to the reagents, the complement (17 mg, 0.086 mmol, 0.3 eq.) being added after 7h. The reaction mixture was stirred for 11h before addition of methanol (10 mL, 0.05 M) and stirring for 10 min. The solvents were concentrated under reduced pressure and the yellow residue was purified by semi-preparative RP-HPLC C₁₈ (gradient: 15 to 45 % of B in 30 min) to afford the white dipeptide (28 mg, 0.102 mmol).

Yield: 18 %

RP-HPLC: Rt = 6.7 min (20 to 40 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 274.34

MW (observed): 275.37 = [M+H]⁺; 549.33 = [2M+H]⁺

Indirect synthesis of 24

Fmoc-Ala-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH (**26**) (342 mg, 0.754 mmol, 1 eq.) in solution in dimethylformamide (34 mL, 0.02 M) was stirred with diethylamine (0.12 mL, 1.16 mmol, 1.5 eq.) at room temperature for 40 min. The solvents were concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in anhydrous dichloromethane (26 mL, 0.03 M) and stirred in presence of pyridine (0.24 mL, 2.964 mmol, 4 eq.) and acetic anhydride (0.33 mL, 2.968 mmol, 4 eq.) under an argon atmosphere for 20 min. The solvents were concentrated under reduced pressure. The resulting oil was used without further purification.

Yield: quantitative

RP-HPLC: Rt = 6.6 min (20 to 40 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 274.34

MW (observed): 275.37 = [M+H]⁺; 549.33 = [2M+H]⁺

Fmoc-Ala-Cl (25)

Fmoc-Ala-OH.H₂O (11 g, 33.4 mmol, 1 eq.) gave a white suspension in anhydrous dichloromethane (163 mL, 0.2 M) and DMF (4.1 mL, 8.1 M). It was stirred under an argon atmosphere at 0°C before a slow addition of oxalyl chloride (9.3 mL, 106.6 mmol, 3.2 eq.) for 1h45. The temperature was slowly increased to room temperature and the mixture was let to react during 4h. The reaction was followed by ESI-MS and RP-HPLC after an aliquot was mixed with methanol, which reacted with the acyl chloride to form the corresponding ester derivative. The solvents were concentrated under reduced pressure and the yellow residue was used without further purification.

Yield: quantitative

ESI-MS: MW (calculated) = 329.78; MW of Fmoc-Ala-OMe (calculated) = 325.36

MW (observed) = 325.83

Fmoc-Ala-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH (26)

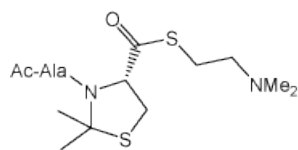
H-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH.HCl 14 (6.61 g, 33.4 mmol, 1 eq.) gave a white suspension in anhydrous dichloromethane (175 mL, 0.2 M) that was stirred at 0°C under an argon atmosphere. TEA (9.3 mL, 66.9 mmol, 2 eq.) was added to the mixture, and then a solution of Fmoc-Ala-Cl 25 (33.4 mmol, 1 eq) in anhydrous dichloromethane (175 mL, 0.2 M) was slowly mixed with the previous solution. The temperature was let to increase to room temperature and the solution was stirred for 20h. A cold solution of 14 (3.9 g, 19.7 mmol, 0.6 eq.) and TEA (2.8 mL, 20.1 mmol, 1 eq.) in dry dichloromethane (40 mL, 0.8 M) was added to the reactive mixture, cooled down with an ice bath. The reagents were stirred at room temperature for 44h before concentration under reduced pressure, giving a brown residue (38.76 g). A part of the crude (2.64 g) was purified by preparative RP-HPLC C₁₈ (gradient: 40 to 70 % of B in 30 min) to afford a white solid (342 mg, 0.75 mmol).

Yield: 33 % (estimate for 2 steps)

RP-HPLC: Rt = 12.7 min (gradient: 5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 454.54

MW (observed): 454.87 = [M+H]⁺

Ac-Ala-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-S-CH₂-CH₂-N(CH₃)₂ (27**)**

Ac-Ala-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH **24** (51 mg, 0.186 mmol, 1 eq.) and PyBOP (97 mg, 0.186 mmol, 1 eq.) were dissolved in dimethylformamide (2.94 mL, 0.06 M) and stirred at room temperature for 30 min before addition of 2-dimethylaminoethanethiol hydrochloride (27 mg, 0.191 mmol, 1 eq.) and DIPEA (0.11 mL, 0.643 mmol, 3.5 eq.). The resulting solution was stirred at room temperature for 45 min, and then the solvents were concentrated under reduced pressure. The crude product was directly purified by semi-preparative RP-HPLC C₁₈ (gradient: 5 to 35 % of B in 30 min) to give a white solid (37 mg, 0.103 mmol) after lyophilisation of the solvents.

Yield: 55 %

RP-HPLC: Rt = 10.8 min (5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 361.53

MW (observed): 361.82 = [M+H]⁺

H-Cys-Phe-Phe-Asp-NH₂.TFA (28**)**

The peptide **28** was synthesized automatically on Rink Amide MBHA resin (1g, initial loading: 0.78 mmol/g, 0.78 mmol) according to the standard procedures of SPPS following the Fmoc/*t*Bu strategy. Couplings were carried out using Fmoc-N_α-protected amino acids (2.34 mmol, 3 eq.), PyBOP (1.42 g, 2.73 mmol, 3.5 eq.) as activating reagent and DIPEA (0.84 mL, 4.84 mmol, 6.2 eq.) in dimethylformamide, as described in the following table.

Residue	Weight (g)	Quantity (mmol)	Number of eq.	Coupling time	R/A
Rink Amide MBHA resin	1	0.78			
Fmoc-Asp(<i>O</i> <i>t</i> Bu)-OH	0.96	2.34	3	1h	R
Fmoc-Phe-OH	0.91	2.34	3	1h	R
Fmoc-Phe-OH	0.91	2.34	3	1h	R
Fmoc-Cys(<i>Trt</i>)-OH	1.37	2.34	3	1h	R

After deprotection of the terminal amine, the peptide was fully deprotected and cleaved from the resin by treatment for 2h with a mixture of TFA, TIS and water (95: 2.5: 2.5, v/v/v, 15 mL). The solvents were concentrated under reduced pressure. The crude was purified by preparative RP-HPLC C₁₈ (gradient: 15

to 35 % of B in 30 min) to afford a white solid (116 mg, 0.18 mmol) after evaporation and lyophilisation of the solvents.

Yield: 23 %

RP-HPLC: $R_t = 12.6$ min (5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 529.61

MW (observed): 529.86 = $[M+H]^+$; 551.35 = $[M+Na+H]^+$; 1059.36 = $[2M+H]^+$

Ac-Ala-Cys($\Psi^{Me, Me}$ pro)-Cys-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**29**)

The thioester **27** (27 mg, 0.075 mmol, 1.1 eq.) and the peptide **28** (36 mg, 0.068 mmol, 1 eq.) were dissolved in a buffer 6 M guanidine hydrochloride, 0.1 M NaH₂PO₄ at pH = 7.53 (15 mL, 4.5 mM) and stirred with some thiophenol (0.63 mL, 6.119 mmol, 90 eq.) at room temperature for 27h30. The solution was extracted with diethyl ether (25 mL, four times) to remove the thiophenol from the aqueous phase²⁹⁵, which was lyophilized and analyzed by analytical RP-HPLC and ESI-MS.

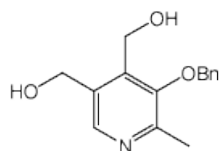
Yield: 10 % (estimate by analytical RP-HPLC C₁₈)

RP-HPLC: $R_t = 16.6$ min (gradient: 5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 785.93

MW (observed): 786.32 = $[M+H]^+$

3-benzyloxy-4,5-bis(hydroxymethyl)-2-methylpyridine (**30**)



To a white suspension of pyridoxine hydrochloride (300 mg, 1.46 mmol, 1 eq.) in ethanol (6 mL, 0.24M) was added anhydrous sodium carbonate (528 mg, 4.982 mmol, 3.4 eq.) in water (6 mL, 0.24 M) and then benzyl bromide (0.3 mL, 2.528 mmol, 1.7 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 2h30 before addition of acetic acid (1 mL, 1.5 M) to neutralize the base. Ethanol was removed by evaporation under reduced pressure and the crude was diluted with ethyl acetate (20 mL) and saturated brine (20 mL). The aqueous phase was extracted with ethyl acetate (2 x 20 mL, 2 x 15 mL). Organic phases were collected, washed once with saturated brine (20 mL), dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated under reduced pressure. Crude solid (654 mg) was purified by chromatographic column on silica gel (90 % AcOEt in n-hexane) to afford the desired white product (154 mg, 0.594 mmol).

Yield: 41 %

Rf: 0.1 (90 % AcOEt in n-hexane)

Experimental Part

RP-HPLC: Rt = 13.8 min (0 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated) = 259.3

MW (observed) = 260.31 = [M+H]⁺, 301.39 = [M+ACN+H]⁺

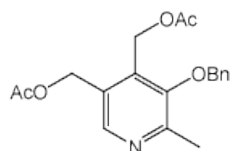
NMR ¹H: (DMSO d₆, 30°C): δ (ppm) = 8.27 (s, 1H, H₆), 7.52-7.38 (m, 5H, aromatic H of Bn), 4.90 (s, 2H, CH₂, Bn), 4.68-4.66 (sd, 2H, J = 5.09 Hz, CH₂), 4.64-4.59 (sd, 2H, J = 5.72 Hz, CH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃).

(CDCl₃, 30°C): δ (ppm) = 8.15 (s, 1H, H₆), 7.47-7.40 (m, 5H, aromatic H of Bn), 4.96 (s, 2H, CH₂, Bn), 4.77 (s, 2H, CH₂), 4.74 (s, 2H, CH₂), 2.54 (s, 3H, CH₃).

NMR ¹³C: (DMSO d₆, 30°C): δ (ppm) = 152.0 (aromatic C, pyridoxine), 144.5 (aromatic C, pyridoxine), 140.5 (aromatic C, pyridoxine), 137.9 (aromatic C, pyridoxine), 136.3 (aromatic C, pyridoxine), 129.3 (C, Bn), 129.0 (2C, Bn), 76.7 (CH₂), 59.4 (CH₂), 54.8 (CH₂), 20.2 (CH₃).

(CDCl₃, 30°C): δ (ppm) = 154.2 (aromatic C, pyridoxine), 145.2 (aromatic C, pyridoxine), 141.9 (aromatic C, pyridoxine), 136.8 (aromatic C, pyridoxine), 134.3 (aromatic C, pyridoxine), 129.1 (C, Bn), 129.0 (C, Bn), 128.7 (C, Bn), 77.7-77.4-77.1 (CDCl₃ and CH₂), 61.9 (CH₂), 56.8 (CH₂), 20.0 (CH₃).

{4-[(acetyloxy)methyl]-6-methyl-5-[(phenylmethyl)oxy]pyridin-3-yl}methyl acetate (**31**)



Compound **30** (200 mg, 0.771 mmol, 1 eq.) and DMAP (10 mg, 0.082 mmol, 0.1 eq.) were dissolved in dry dichloromethane (8 mL, 0.1 M) before addition of DIPEA (0.55 mL, 3.179 mmol, 4 eq.) and acetic anhydride (0.22 mL, 2.311 mmol, 3 eq.). The resulting mixture was stirred under an argon atmosphere at room temperature for 25 min before addition of methanol (1 mL). Solvents were concentrated under reduced pressure before purification by chromatographic column on silica gel (40 % AcOEt in n-hexane), giving the desired white product (262 mg, 0.763 mmol)

Yield: 99 %

RP-HPLC: Rt = 20.96 min (0 to 100 % B in 30 min)

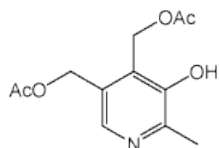
ESI-MS: MW (calculated): 343.37

MW (observed): 344.30 = [M+H]⁺, 385.31 = [M+ACN+H]⁺

Experimental Part

NMR ^1H : (CDCl₃, 30°C) δ (ppm) = 8.37 (s, 1H, H₆), 7.45-7.40 (m, 5H, aromatic H of Bn), 5.23 (s, 2H, CH₂ of pyridoxine), 5.20 (s, 2H, CH₂ of pyridoxine), 4.92 (s, 2H, CH₂ of Bn), 2.60 (s, 3H, CH₃ of pyridoxine), 2.10 (s, 3H, CH₃ of acetyl), 2.06 (s, 3H, CH₃ of acetyl).

{4-[(acetyloxy)methyl]-5-hydroxy-6-methylpyridin-3-yl}methyl acetate (**32**)

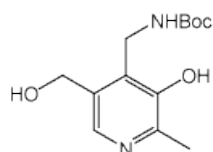


Compound **31** (391 mg, 1.139 mmol, 1 eq.) was dissolved in ethanol (22 mL, 0.05 M) and then palladium-charcoal (39 mg, 10 % in mass) was added to the solution. The mixture was stirred under a hydrogen atmosphere for 2h at room temperature before filtration on celite and washing with methanol. Solvents were concentrated under reduced pressure to give a white solid. Crude product was analyzed by ESI-MS and NMR ^1H , which proved the degradation of the compound with at least a loss of one benzyl alcohol.

RP-HPLC: Rt = 10.7 min (18.66 %), 11 min (8.15 %), 11.6 min (46.6 %), 11.9 (26.59 %) (0 to 100 % B in 30 min).

ESI-MS: MW (calculated): 253.25
MW (observed): 237.27 = [M-O+H]⁺

1,1-dimethylethyl [3-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-4-yl]methylcarbamate (**33**)



Pyridoxamine dihydrochloride (200 mg, 0.83 mmol, 1 eq.) gave a white suspension in anhydrous dichloromethane (6.5 mL). After addition of triethylamine (0.25 mL, 1.794 mmol, 2.2 eq.) and of a solution of di-*tert*-butyl dicarbonate (181 mg, 0.829 mmol, 1 eq.) in the rest of dichloromethane (2 mL, total volume of 8.5 mL, 0.1 M), the mixture, sheltered from the light, was stirred under an argon atmosphere for 7h at room temperature. Solvents were concentrated under reduced pressure, giving a white solid (587 mg) that was used without further purification.

Yield: quantitative (estimate by analytical RP-HPLC)

Rf: 0.25 (100 % AcOEt)

RP-HPLC: Rt = 14.9 min (0 to 100 % B in 30 min)

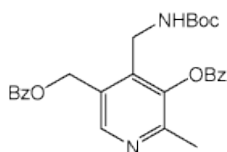
Experimental Part

ESI-MS: MW (calculated): 268.31

MW (observed): 269.33 = [M+H]⁺; 310.33 = [M+ACN]⁺

NMR ¹H: (DMSO d₆, 30°C) δ (ppm) = 7.9 (s, 1H, H₆), 7.47 (s, 1H, NH), 4.54 (s, 2H, CH₂-O of pyridoxamine), 4.19 (s, 2H, CH₂-N of pyridoxamine), 2.34 (s, 3H, CH₃ of pyridoxamine), 1.38 (s, 9H, CH₃ of Boc).

4-[(1,1-dimethylethyl)oxy]carbonylamino)methyl]-2-methyl-5-[(phenylcarbonyl)oxy]methyl}pyridin-3-yl benzoate (**34**)



Crude **33** (570 mg, 0.83 mmol, 1 eq.) was dissolved in anhydrous dichloromethane (8.5 mL, 0.1 M). The solution was stirred in an ice bath under an argon atmosphere before addition of triethylamine (0.25 mL, 1.794 mmol, 2.2 eq.) and of benzoyl chloride, drop-by-drop (0.2 mL, 1.736 mmol, 2 eq.), giving a yellow solution. The temperature was increased slowly to room temperature. After 3h30, methanol (1.9 mL) was added to the mixture, that was stirred for 10 min at room temperature before concentration under reduced pressure. Analysis by RP-HPLC and ESI-MS revealed an incomplete reaction. The crude was dissolved in anhydrous dichloromethane (8.5 mL, 0.1 M), cooled down in an ice bath and mixed with triethylamine (0.77 mL, 5.524 mmol, 6.7 eq.) and benzoyl chloride (0.1 mL, 0.868 mmol, 1 eq.), the temperature increasing slowly to room temperature. After 2h30, methanol was added (1 mL) and solvents were removed by distillation under reduced pressure, giving a yellow solid. It was purified by chromatographic column on silica gel, first neutralized with 1 % DIPEA in n-hexane and then washed several times with pure n-hexane (20 % ethyl acetate in n-hexane), to afford a white solid (294 mg, 0.617 mmol).

Yield: 75 % (2 steps)

Rf: 0.24 (30% AcOEt in n-hexane)

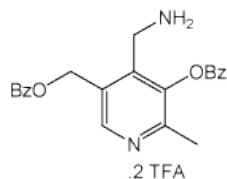
RP-HPLC: Rt = 24.7 min (0 to 100 % of B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 476.52

MW (observed): 477.33 = [M+H]⁺; 518.29 = [M+ACN]⁺; 953.37 = [2M+H]⁺.

NMR ¹H: (DMSO d₆, 30°C) δ (ppm) = 8.54 (s, 1H, H₆), 8.19 (m, 2H, H_{ortho} Bz-O), 7.99 (m, 2H, H_{ortho} Bz-OCH₂), 7.78 (m, 1H, H_{para} Bz-O), 7.63 (m, 3H, 1 H_{para} Bz-OCH₂ and 2 H_{meta} Bz-O), 7.53 (m, 2 H, 2 H_{meta} Bz-OCH₂), 7.2 (m, 1H, NH), 5.51 (s, 2H, CH₂-O), 4.22 (sl, 2H, CH₂-N), 2.33 (s, 3H, CH₃ pyridoxamine), 1.21 (s, 9H, 3 CH₃ Boc).

4-(aminomethyl)-2-methyl-5-[[[(phenylcarbonyl)oxy]methyl]pyridin-3-yl]benzoate (**35**)



Pure **34** (268 mg, 0.562 mmol, 1 eq.) was dissolved in a solution of 40 % TFA in anhydrous dichloromethane (6 mL, 0.1 M) and stirred at room temperature under an argon atmosphere for 1h30. Attempt of precipitation of **35** in cold diethyl ether was realized without success. Solvents were then concentrated under reduced pressure, giving a yellow gum.

Deprotection for NMR ¹H study

Pure **34** (18 mg, 38 μmol) was dissolved in 50 % deuterated TFA in DMSO d₆ (0.6 mL, 63 mM) and let at room temperature for 30 min under a nitrogen atmosphere before analysis by NMR spectroscopy.

Yield: quantitative

RP-HPLC: Rt = 19.3 min (0 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 376.41

MW (observed): 377 = [M+H]⁺; 418 = [M+ACN]⁺.

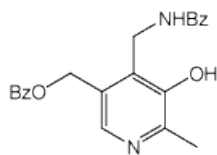
NMR ¹H: (DMSO d₆, 30°C) δ = 8.63 (s, 1H, H₆), 8.08 (d, 2H, H_{ortho} Bz-O, ³J_{Hortho-Hmeta} = 9 Hz), 7.99 (d, 2H, H_{ortho} Bz-OCH₂, ³J_{Hortho-Hmeta} = 7 Hz), 7.59 (dd, 1H, H_{para} Bz-O, ³J_{Hpara-Hmeta} = 7.8 Hz, ³J_{Hpara-Hmeta} = 7 Hz), 7.43 (m, 3H, 1 H_{para} Bz-OCH₂ and 2 H_{meta} Bz-O), 7.31 (m, 2 H, 2 H_{meta} Bz-OCH₂), 5.56 (s, 2H, CH₂-O), 4.42 (s, 2H, CH₂-N), 2.46 (s, 3H, CH₃ pyridoxamine).

Intramolecular N→O acyl migration for the compound **36** affording the molecule **35**

The molecule **36**, at the S_{on} state (30 mg, 0.06 mmol, 1 eq.), was dissolved in acetonitrile saturated in gaseous HCl (76 g/L, 0.5 mL, 0.12 M) and stirred on molecular sieves, under an argon atmosphere and at room temperature. The reaction was followed by analytical RP-HPLC C₁₈ and mass spectroscopic ESI-MS. The N→O acyl migration was complete after 1 day and 17h.

Yield: quantitative

(5-hydroxy-6-methyl-4-[(phenylcarbonyl)amino]methyl)pyridin-3-yl)methyl benzoate (36)



From compound 35: O→N acyl migration

Two coevaporations of crude **35** with diethyl ether gave yellow foam (272 mg), that was purified by preparative RP-HPLC (30 to 60 % of B in 30 min), affording a white solid after lyophilisation of solvents (118 mg from 134 mg of crude, 0.241 mmol).

Yield: 87 % (two steps)

RP-HPLC: Rt = 24.3 min (0 to 100 % B in 30 min); 6.0 min (0 to 100 % B in 10 min)

ESI-MS: MW (calculated): 376.41

MW (observed): 377 = [M+H]⁺; 418 = [M+ACN]⁺.

NMR ¹H: (DMSO d₆, 30°C) δ = 9.50 (t, 1H, NH, ³J_{NH-CH} = 5.2 Hz, ³J_{NH-CH'} = 5.7 Hz), 8.49 (s, 1H, H₆), 7.96 (d, 2H, 2 H_{ortho} Bz-O, ³J_{Hortho-Hmeta} = 7.6 Hz), 7.85 (d, 2H, 2 H_{ortho} Bz-N, ³J_{Hortho-Hmeta} = 7.8 Hz), 7.63 (dd, 1H, H_{para} Bz-O, ³J_{Hpara-Hmeta} = 7.5 Hz, ³J_{Hpara-Hmeta'} = 7.9 Hz), 7.55 (dd, 1H, H_{para} Bz-N, ³J_{Hpara-Hmeta} = 6.8 Hz, ³J_{Hpara-Hmeta'} = 7.6 Hz), 7.47-7.42 (m, 4H, 4 H_{meta} Bz-O et Bz-N), 5.7 (s, 2H, CH₂-O), 4.74 (d, 2H, CH₂-N, ³J_{CH₂-NH} = 4.8 Hz), 2.62 (s, 3H, CH₃ pyridoxamine).

From compound 39: enzymatic cleavage then O→N acyl migration

Attempt at room temperature and pH 7.02

Compound **39** (2.13 mg, 2.44 μmol) was dissolved in sodium phosphate buffer 0.1 M at pH 7.02 (287 μL), mixed with a solution of trypsin (0.5 mg) in sodium phosphate buffer 0.1 M at pH 7.02 (0.88 mL, total volume = 487 μL, 5 mM) and stirred at room temperature. Samples from the resolving solution (30 μL) were diluted with the buffer (30 μL) and frozen in liquid nitrogen to stop the reaction. 5 μL of these samples were then analyzed by analytical RP-HPLC C₁₈ and mass spectroscopy. A slow precipitation was observed in the studied mixture. The starting material completely disappeared after more than 5h30, but the desired compound **36** was not observed. A part of the molecule **39** rearranged to form compound **40** whereas the phenolic ester partially hydrolyzed before the O→N acyl migration, to afford compound **36a** after enzymatic cleavage followed by a O→N acyl migration.

Attempt at 37°C and pH 7.42

Compound **39** (1.48 mg, 1.69 μmol) was dissolved in sodium phosphate buffer 0.1 M at pH 7.43 (1.13 mL), stirred at 37°C and mixed with a solution of trypsin (0.81 mg) in sodium phosphate buffer 0.1 M at pH 7.43 (0.88 mL, total volume = 2.01 mL, 0.84 mM). Samples from the resolving solution (50 μL) were

diluted with the buffer (50 μ L) and frozen in liquid nitrogen to stop the reaction. 10 μ L of these samples were then analyzed by analytical RP-HPLC C₁₈ and mass spectroscopy. A slow precipitation was observed in the studied mixture. The starting material completely disappeared after 2h, but the desired compound **36** was not observed. A part of the molecule **39** rearranged to form compound **40** whereas the phenolic ester partially hydrolyzed before the O \rightarrow N acyl migration, to afford compound **36a** after enzymatic cleavage followed by a O \rightarrow N acyl migration.

***N*-{[3-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-4-yl]methyl}benzamide (**36a**)**

RP-HPLC: Rt = 12.4 min (0 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 272.30

MW (observed): 273.32 = [M+H]⁺

Stability study of the compound **36 – general procedure**

The molecule **36** was dissolved in a buffer or a solvent and stirred at room temperature (see the table, below).

Sample	36	Solvents	Observation time	Observations
36S1	1.06 mg (1.75 μ mol)	MeOH (0.6 mL, 3 mM) + 0.4 mL (at t = 12 days)	From 0 to 12 days After 27 days	Stable Partial hydrolysis
36S2	0.79 mg (1.3 μ mol)	ACN (0.6 mL, 2 mM) + 0.4 mL (at t = 12 days)	From 0 to 12 days After 27 days	Stable Partial hydrolysis
36S3	0.88 mg (1.46 μ mol)	PBS (0.1 M, pH 7.02) + MeOH (1: 1, v/v, 0.5 mL, 3 mM) + 0.4 mL (at t = 12 days)	From 0 to 12 days After 27 days	Stable Partial hydrolysis, more important than for other samples
36S4	1.10 mg (1.8 μ mol)	PBS (0.1 M, pH 7.02) + ACN (1: 1, v/v, 0.6 mL, 3 mM) + 0.4 mL (at t = 12 days)	From 0 to 12 days After 27 days	Stable Partial hydrolysis
36S5	1 mg (1.65 μ mol)	PBS (0.1 M, pH 8.0) + ACN (1: 1, v/v, 0.6 mL, 3 mM) + 0.4 mL (at t = 12 days)	From 0 to 12 days After 27 days	Stable Partial hydrolysis

The composition of the resulting solution was controlled by analytical RP-HPLC C₁₈ and mass spectroscopy ESI-MS. In case of precipitation of the compound, the solution was then diluted with the original solvent.

Sample preparation for conventional negative staining electron microscopy and Congo red staining **36S6**

Conventional negative staining electron microscopy

36 (0.26 mg, 0.53 μ mol) was dissolved in the stock solution C of **4** (1325 μ L) to have a concentration of A β (13-23) (**4**) equal to 400 μ M and a concentration of **36** equal to 400 μ M (**4/36**; 1: 1). The solution was filtered, incubated at room temperature and its contents were controlled by conventional negative staining electron microscopy (200 μ L).

Congo red staining

36 (0.2 mg, 0.4 μ mol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 400 μ M. It was then mixed with A β (13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μ mol; **4/36**; 1: 10), filtered and incubated at room temperature. Its contents were then controlled after Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μ L). A precipitation was observed from the first day of incubation.

36S7

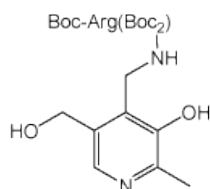
Conventional negative staining electron microscopy

36 (0.39 mg, 0.795 μ mol) was dissolved in the stock solution B of **4** (147 μ L) and diluted with a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (53 μ L) to obtain a concentration of **4** equal to 400 μ M and a concentration of **36** equal to 4 mM (**4/36**; 1: 10). The solution was filtered, incubated at room temperature and its content was followed by conventional negative staining electron microscopy (70 μ L).

Congo red staining

36 (1.96 mg, 4 μ mol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 4 mM. It was then mixed with A β (13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μ mol; **4/36**; 1: 10), filtered and incubated at room temperature. Its contents were then controlled after Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μ L). A precipitation was observed from the first day of incubation.

1,1-dimethylethyl {[[(1,1-dimethylethyl)oxy]carbonyl}amino{[4-({[(1,1-dimethylethyl)oxy]carbonyl}amino)-5-({[3-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-4-yl]methyl}amino)-5-oxopentyl]amino}methylidencarbamate (37)



Pyridoxamine dihydrochloride (200 mg, 0.83 mmol, 1 eq.) and Boc-Arg(Boc₂)-OH (394 mg, 0.83 mmol, 1 eq.) were mixed with PyBOP (432 mg, 0.83 mmol, 1 eq.) and DIPEA (0.58 mL, 3.35 mmol, 4 eq.) in dry DCM (8 mL, 0.1 M), giving first a white suspension then a colorless solution, protected from the light and stirred at room temperature under an argon atmosphere for 2h. Solvents were then concentrated under reduced pressure, giving white foam. The crude was purified by chromatographic column on silica gel (80 % AcOEt in n-hexane), affording the desired molecule **37** as a white solid, complexed with DIPEA (559 mg, 0.74 mmol).

Yield: 89 %

Rf: 0.1 (90 % AcOEt/n-hexane); 0.52 (40 % AcOEt/DCM)

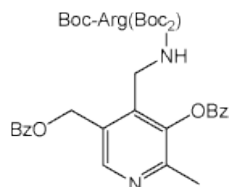
RP-HPLC: Rt = 22.8 min (0 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 624.73

MW (observed): 313.33 = [M/2+H]⁺; 625.79 = [M+H]⁺

NMR ¹H: (DMSO d₆, 30°C) δ = 9.07 (sl, 2H, NH pyridoxamine and NH_η Arg), 8.70 (m, 1H, NH_ε Arg), 7.88 (s, 1H, H₆ pyridoxamine), 7.03 (d, 1H, NH_α Arg, ³J_{NH_α-CH_α} = 8.2 Hz), 5.21 (dd, 1H, 1H_α Arg, ³J_{H_α-H_{β1}} = 5.7 Hz, ³J_{H_α-H_{β2}} = 5 Hz), 4.55 (d, 2H, CH₂-O pyridoxamine, ³J_{H-OH} = 5.5 Hz), 4.28 (d, 2H, CH₂-N pyridoxamine, ³J_{H-NH} = 5.6 Hz), 2.32 (s, 3H, CH₃ pyridoxamine), 1.99 (s, 2H, 2H_δ Arg), 1.50-1.35 (m, 31H, 2H_β Arg, 2H_γ Arg and 9 CH₃ Boc).

4-[10-{{(1,1-dimethylethyl)oxy}carbonyl}-4-{{(1,1-dimethylethyl)oxy}carbonyl}amino)-9-imino-13,13-dimethyl-3,11-dioxo-12-oxa-2,8,10-triazatetradec-1-yl]-2-methyl-5-{{(phenylcarbonyl)oxy}methyl}pyridin-3-yl benzoate (38**)**



Product **37** (537 mg, 0.71 mmol) was dissolved in anhydrous DCM (8 mL, 0.1 M) with TEA (0.24 mL, 1.72 mmol, 2 eq.) under an argon atmosphere, being protected from the light and cooled down in an ice bath. Benzoyl chloride (0.2 mL, 1.74 mmol, 2 eq.) was added drop by drop to the solution, then the temperature of the resulting yellow mixture increased slowly to room temperature. The progress of the reaction was controlled by TLC and ESI-MS spectroscopy. After 1h20, methanol was added to stop the benzylation, and then the solvents were concentrated under reduced pressure. The crude was purified by chromatographic column on silica gel (eluant: 50 % AcOEt in n-hexane) affording the desired molecule **38** as a white solid (570 mg, 0.68 mmol).

Yield: 96 %

Rf: 0.1 (30 % AcOEt/n-hexane); 0.78 (90 % AcOEt/n-hexane)

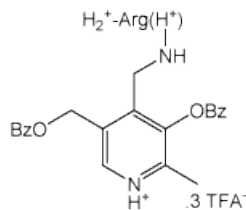
RP-HPLC: Rt = 26.7 min (0 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 832.94

MW (observed): 417.49 = $[M/2+H]^+$; 833.46 = $[M+H]^+$

NMR ^1H : (DMSO d_6 , 30°C) δ = 9.07 (sl, 1H, NH pyridoxamine), 8.56 (s, 1H, H₆ pyridoxamine), 8.2-7.52 (m, 10H, H aromatic Bz), 6.76 (d, 1H, NH _{α} Arg, $^3J_{\text{NH-CH}\alpha}$ = 8.2 Hz), 5.56 (s, 2H, CH₂-O pyridoxamine), 4.34 (sl, 1H, 1H _{α} Arg), 3.69 (sl, 2H, CH₂-N pyridoxamine), 3.33 (s, 2H, 2H _{δ} Arg), 2.32 (s, 3H, CH₃ pyridoxamine), 1.40-1.34 (m, 31H, 2H _{β} Arg, 2H _{γ} Arg and 9 CH₃ Boc).

4-({[5-{{[amino(imino)methyl]amino}-2-({[(1,1-dimethylethyl)oxy]carbonyl} amino)pentanoyl]amino} methyl)-2-methyl-5-{{(phenylcarbonyl)oxy}methyl} pyridin-3-yl benzoate (39)



Compound **38** (21 mg, 25 μmol , 1 eq.) was dissolved in a anhydrous solution containing 40 % of TFA in DCM (0.4 mL, 0.06 M) and stirred under an argon atmosphere for 3h at room temperature. Two precipitations from cold diethyl ether afforded the desired product **39** as a white solid (15 mg, 17 μmol).

Yield: 68 %

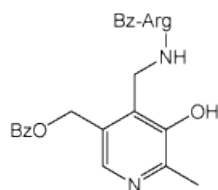
RP-HPLC: $R_t = 16.8$ min (0 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 532.59

MW (observed): 533.34 = $[\text{M}+\text{H}]^+$

NMR ^1H : (DMSO d_6 , 30°C) $\delta = 8.92$ (m, 1H, NH pyridoxamine), 8.61 (s, 1H, H₆ pyridoxamine), 8.24-7.54 (m, 10H, H aromatic Bz), 5.6 (s, 2H, CH₂-O pyridoxamine), 4.46 (m, 2H, CH₂-N pyridoxamine), 3.70 (m, 1H, 1H _{α} Arg), 3.06 (m, 2H, 2H _{δ} Arg), 2.35 (s, 3H, CH₃ pyridoxamine), 1.61 (m, 2H, 2H _{β} Arg), 1.39 (m, 2H, 2H _{γ} Arg).

***N*-{4-{{[amino(imino)methyl]amino}-1-[(3-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-4-yl]methyl}amino)carbonyl]butyl}benzamide (40)**



At r.t. and pH 7.02

The molecule **39** (1.08 mg, 1.24 μmol) was dissolved in a sodium phosphate buffer 0.1 M at pH 7.02 (245 μL , 5 mM) and stirred at room temperature. After 25 min, the mixture was diluted with the buffer (245 μL , 2.5 mM), then after 2h, it was again diluted with ACN (245 μL , 1.67 mM). The kinetic was then followed by analytical RP-HPLC C₁₈ (0 to 100 % B in 10 min).

$t_{1/2}$: 50 min

At 37°C and pH 7.02

The molecule **39** (70 mg, 0.08 mmol) was dissolved in a sodium phosphate buffer 0.1 M at pH 7.02 (3.2 mL, 25 mM) and stirred at 37°C. A slow precipitation being observed, the solution was diluted with ACN (2.5 mL, total volume = 5.7 mL, 14 μ M) after 2h. The study was stopped after 24h by lyophilisation of the solvents. The crude was then analyzed by NMR ^1H in DMSO d_6 .

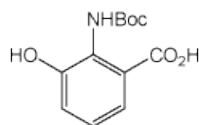
RP-HPLC: Rt = 5.5 min (0 to 100 % B in 10 min), 16.2 min (0 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 532.59

MW (observed): 533.34 = $[\text{M}+\text{H}]^+$

NMR ^1H : (DMSO d_6 , 30°C) δ = 9.1 (t, 1H, NH pyridoxamine, $^3J_{\text{NH-CH}_2}$ = 5 Hz), 8.67 (d, 1H, NH Arg, $^3J_{\text{NH-H}\alpha}$ = 7.7 Hz), 8.07-7.45 (m, 10H, H aromatic Bz), 8.04 (s, 1H, H $_{\beta}$ pyridoxamine), 5.49 (s, 2H, CH $_2$ -O pyridoxamine), 4.5 (m, 1H, 1H $_{\alpha}$ Arg), 4.42 (d, 2H, CH $_2$ -N pyridoxamine, $^3J_{\text{H-NH}}$ = 5.8 Hz), 3.07 (m, 2H, 2H $_{\delta}$ Arg), 2.38 (s, 3H, CH $_3$ pyridoxamine), 1.84-1.67 (m, 2H, 2H $_{\beta}$ Arg), 1.57-1.4 (m, 2H, 2H $_{\gamma}$ Arg).

N-*tert*-butoxycarbonyl-3-hydroxyanthranilic acid (**41**)



3-hydroxyanthranilic acid (750 mg, 4.898 mmol, 1 eq.), di-*tert*-butyl dicarbonate (1.07 g, 4.898 mmol, 1 eq.) and DIPEA (1.71 mL, 9.817 mmol, 2 eq.) were mixed in anhydrous dichloromethane (210 mL, 0.02 M) and freshly degazed dimethylformamide (20 mL, 0.25 M). The suspension was stirred under an argon atmosphere for 24h at room temperature. The resulting solution was concentrated under reduced pressure and the crude product was used without any further purification.

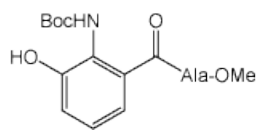
Yield: 89 % (estimate by analytical RP-HPLC)

RP-HPLC: 16.7 min (gradient: 5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 253.25

MW (observed): 252.28 = $[\text{M}+\text{H}]^+$; 505.36 = $[2\text{M}+\text{H}]^+$

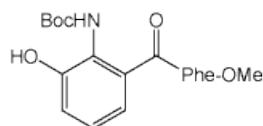
N-Boc-3-hydroxyanthranilyl-Ala-OMe (**42**)



N-*tert*-butoxycarbonyl-3-hydroxyanthranilic acid (**41**) (89 % pure, 348 mg, 1.22 mmol, 1 eq.) was dissolved dry THF (16.5 mL, 0.07 M) under an argon atmosphere and cooled down in an ice bath before addition of HOBt (182 mg, 1.35 mmol, 1.1 eq.) and DCC (278 mg, 1.35 mmol, 1.1 eq.). The solution was stirred for 30 min at -5°C and then H-Ala-OMe (139 mg, 1.35 mmol, 1.1 eq.) in solution in dry THF (6 mL, 0.2 M) was added to the mixture, which was stirred overnight while the temperature slowly increased to r.t. DCU was removed from the reaction medium by filtration over cotton, and the solvents were concentrated under reduced pressure. The crude solid was purified by chromatographic column on silica gel (elution: 15 % AcOEt in petroleum ether) to afford the desired white product (373 mg, 1.1 mmol).

Yield: 90 %
RP-HPLC: 16.9 min (gradient: 5 to 100 % B in 30 min)
ESI-MS: MW (calculated): 338.36
MW (observed): 339.3 = [M+H]⁺

N-Boc-3-hydroxyanthranilyl-Phe-OMe (**43**)



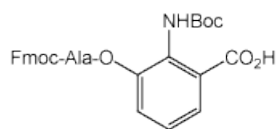
N-*tert*-butoxycarbonyl-3-hydroxyanthranilic acid (**41**) (89 % pure, 334 mg, 1.17 mmol, 1 eq.) was dissolved dry THF (16.5 mL, 0.07 M) under an argon atmosphere and cooled down in an ice bath before addition of HOBt (166 mg, 1.23 mmol, 1.1 eq.) and DCC (253 mg, 1.23 mmol, 1.1 eq.). The solution was stirred for 15 min at -5°C and then H-Phe-OMe (220 mg, 1.23 mmol, 1.1 eq.) in THF (6 mL, 0.2 M) was added to the mixture, which was stirred overnight while the temperature slowly increased to r.t. DCU was removed from the reaction medium by filtration over cotton, and then washing with 10 % NaHCO₃ (3 x 40 mL) and 10 % citric acid (2 x 25 mL). The organic layers were collected together, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude solid was purified by chromatographic column on silica gel (elution: 20 % AcOEt in petroleum ether) to afford the desired white product (312 mg, 0.75 mmol).

Yield: 65 %
RP-HPLC: 22.1 min (gradient: 5 to 100 % B in 30 min)

Experimental Part

ESI-MS: MW (calculated): 414.45
MW (observed): 415.28 = [M+H]⁺

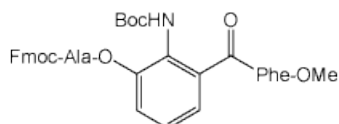
N-Boc-(Fmoc-Ala)3-hydroxyanthranilic acid (**44**)



Fmoc-Ala-OH (745 mg, 2.39 mmol, 1.5 eq.) was pre-activated as an acyl chloride by reaction with oxalyl chloride (0.22 mL, 2.56 mmol, 1.6 eq.) in anhydrous DCM (10.4 mL, 0.23 M) and degazed DMF (1 mL, 12.91 mmol, 8.1 eq.) at -5°C under an argon atmosphere. The temperature slowly increased to room temperature, whereas the solution was stirred for 3h. Solvents were concentrated under reduced pressure, giving a brown residue that was re-dissolved in dry DCM (8.5 mL, 0.2 M) and slowly added to a solution of *N*-*tert*-butoxycarbonyl-3-hydroxyanthranilic acid (**41**) (89 % pure, 465 mg, 1.63 mmol, 1 eq.) and TEA (0.46 mL, 3.3 mmol, 2 eq.) in anhydrous DCM (10.5 mL, 0.16 M) under an argon atmosphere and at low temperature (-5°C). The reaction medium was stirred at room temperature for 28h, its contents being controlled by analytical RP-HPLC C₁₈ and ESI-MS. After concentration under reduced pressure, the residue was solubilized in DCM (30 mL) and washed with 10 % citric acid (3 x 30 mL). The aqueous phase was extracted with DCM (4 x 15 mL), and then the organic layers were collected and concentrated under reduced pressure. Analytical RP-HPLC C₁₈ estimated the yield, close to 20 %.

Yield: <20 %
RP-HPLC: 21.4 min (gradient: 5 to 100 % B in 30 min)
ESI-MS: MW (calculated): 546.57
MW (observed): 447.32 = [M-Boc+H]⁺

N-Boc-(Fmoc-Ala)3-hydroxyanthranilyl-Phe-OMe (**45**)



Synthetic route i):

Fmoc-Ala-OH (1,08 g, 3.26 mmol, 2 eq.) was pre-activated as an acyl chloride by reaction with oxalyl chloride (0.7 mL, 8.15 mmol, 2.5 eq.) in anhydrous DCM (14 mL, 0.23 M) at -5°C under an argon atmosphere. The temperature slowly increased to room temperature, whereas the solution was stirred for 3h. Solvents were then concentrated under reduced pressure, giving a brown residue that was dissolved in

Experimental Part

dry DCM (8.5 mL, 0.2 M) and slowly added to a cold solution containing the molecule **43** (676 mg, 1.63 mmol, 1 eq.) and TEA (1.63 mL, 11.69 mmol, 7 eq.) in anhydrous DCM (10.5 mL, 0.16 M). The temperature of the reaction medium gradually increased until r.t., whereas the solution was stirred for 16h. Solvents were concentrated under reduced pressure, giving a brown residue that was re-dissolved in ethyl acetate (35 mL) and washed with 10 % citric acid (3 x 25 mL), 10 % NaHCO₃ (2 x 15 mL). The basic aqueous solution was extracted with ethyl acetate (2 x 15 mL) then the organic layers were collected, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatographic column on silica gel (elution: 20 % AcOEt in petroleum ether), affording a white solid (133 mg, 0.19 mmol).

Yield: 12 %

Synthetic route ii):

Fmoc-Ala-OH.H₂O (248 mg, 0.75 mmol, 1 eq.) was dissolved in a mixture of ethyl acetate and methanol and stirred in presence of anhydrous Na₂SO₄ for 15 min before filtration, concentration to dryness under reduced pressure. It was then mixed with MSNT (224 mg, 0.76 mmol, 1 eq.) in dry THF (0.4 mL, 1.9 M) and stirred at room temperature for 30 min under an argon atmosphere before addition of a solution containing the molecule **43** (310 mg, 0.75 mmol, 1 eq.) in anhydrous THF (1 mL, 0.8 M), and of 1-methylimidazole (0.03 mL, 0.38 mmol, 0.5 eq.), giving a yellow solution. After 6h, Fmoc-Ala-OH.H₂O (124 mg, 0.38 mmol, 0.5 eq.), which was pre-activated with MSNT (224 mg, 0.76 mmol, 1 eq.) in THF (0.4 mL, 1.9 M) by stirring for 30 min at room temperature under an argon atmosphere, was added to the reaction medium. After 17h at room temperature, the starting material **43** was not observed anymore either by analytical RP-HPLC C₁₈ or ESI-MS. Solvents were concentrated under reduced pressure, giving a yellow oil, that was solubilized in ethyl acetate (15 mL) before washing with 10 % citric acid (3 x 15 mL) and saturated brine (10 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and then concentrated under reduced pressure. The peptide mimetic was purified by analytical RP-HPLC C₁₈ (gradient: 60 to 90 % water in ACN in 30 min) to afford a white solid after lyophilisation (349 mg, 0.49 mmol).

The compound **45** was then used to study the stability of its ester bond in presence of 20 % piperidine in DMF for 20 min. However, after observation of the quantitative degradation of the ester bond, the treatment was confirmed to be incompatible with the molecule **45**.

Yield: 66 %

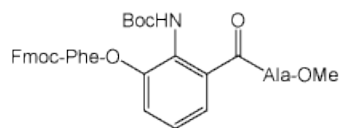
Stability in presence of 20 % piperidine in DMF for 20 min: 0 %

RP-HPLC: 27.7 min (gradient: 5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 707.77

MW (observed): = 708.36 = [M+H]⁺; 730.28 = [M+Na]⁺; 1415.32 = [2M+H]⁺

N-Boc-(Fmoc-Phe)3-hydroxyanthranilyl-Ala-OMe (**46**)



Fmoc-Phe-OH (481 mg, 1.24 mmol, 1.2 eq.) was mixed with MSNT (368 mg, 1.24 mmol, 1.2 eq.) in dry THF (1.2 mL, 0.9 M) and stirred at room temperature for 30 min under an argon atmosphere before addition of a solution containing the molecule **42** (350 mg, 1.03 mmol, 1 eq.) in anhydrous THF (1.2 mL, 0.9 M), and of 1-methylimidazole (0.04 mL, 0.5 mmol, 0.5 eq.), giving a yellow solution. After stirring overnight, Fmoc-Phe-OH (240 mg, 0.62 mmol, 0.6 eq.), which was pre-activated with MSNT (184 mg, 0.62 mmol, 0.6 eq.) in THF (0.5 mL, 2.5 M) by stirring for 30 min at room temperature under an argon atmosphere, was added to the reaction medium with 1-methylimidazole (0.02 mL, 0.25 mmol, 0.25 eq.) and stirred overnight at room temperature. Solvents were then concentrated under reduced pressure, giving yellow oil that was solubilized in ethyl acetate (20 mL) before washing with 10 % citric acid (3 x 15 mL), 10 % NaHCO₃ (3 x 15 mL) and saturated brine (15 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and then concentrated under reduced pressure. Compound **46** was then directly used without further purification (purity estimate by analytical RP-HPLC C₁₈: 35 % **46**, 53 % Fmoc-Phe-OH, 6 % **42**) to study the stability of the ester bond in presence of 20 % piperidine in DMF for 20 min. However, after observation of the quantitative degradation of this ester bond, the treatment was confirmed to be incompatible with the molecule.

Yield: 88 % (estimate by analytical RP-HPLC C₁₈)

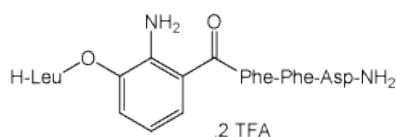
Stability in presence of 20 % piperidine in DMF for 20 min: 0 %

RP-HPLC: 27.4 min (gradient: 5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 707.77

MW (observed): = 708.36 = [M+H]⁺; 729.89 = [M+Na]⁺

(H-Leu)3-hydroxyanthranilyl-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**47**)



The peptide was synthesized manually on Rink Amide MBHA resin (initial loading: 0.64 mmol/g of resin, 500 mg, 0.32 mmol) according to the standard procedures of SPPS following the Fmoc/*t*Bu strategy, as described in the next table:

Residue	Weight (mg)	Quantity (mmol)	Number of eq.	Coupling time	R/A
Rink Amide MBHA	500	0.32			
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	264	0.64	2	1h	-
Fmoc-Phe-OH	248	0.64	2	1h	-
Fmoc-Phe-OH	248	0.64	2	1h	-
41 (89 % pure)	274	0.96	3	1h, 1h, 2h	R, R
Boc-Leu-OH.H ₂ O	239	0.96	3	2h30, 2h30, 2h20	R, R

N-*tert*-butoxycarbonyl-3-hydroxyanthranilic acid (**41**) was coupled to the amino group of the corresponding phenylalanine using HATU (365 mg, 0.96 mmol, 3 eq.) instead of PyBOP for reactivity reasons. The free alcohol function of the 3-hydroxyanthranilic residue was esterified with Boc-Leu-OH.H₂O in presence of DIC (0.15 mL, 0.96 mmol, 3 eq.) and DMAP (4 mg, 0.03 mmol, 0.1 eq.) in anhydrous DCM (7 mL). The switch-peptide was then deprotected and cleaved from the resin by treatment with 95 % TFA, 2.5 % anhydrous DCM and 2.5 % TIS (10 mL, 1h, r.t., 2 times). The resin was washed with TFA (6 mL) and DCM (2 x 6 mL) before mixing the organic solutions containing the desired product. They were concentrated under reduced pressure, and then the peptide mimetic was precipitated in cold diethyl ether, re-dissolved in TFA, and dried under reduced pressure to afford brown oil. The product was attempted to be purified by preparative RP-HPLC C₁₈ (gradient: 30 to 60 % B in 30 min), however this process afforded only impure fractions (1st fraction: 11 mg, 22% pure; 2nd fraction: 11 mg, 29 % pure; 3rd fraction: 9 mg, 31 % pure; purity estimate by analytical RP-HPLC C₁₈ according to the absorbance of the different compounds at 214 nm) containing the switch-peptide **42** at the S_{off} state.

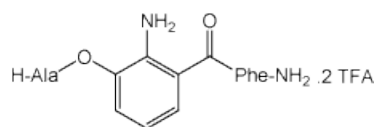
RP-HPLC: 6.1 min (gradient: 0 to 100 % B in 10 min); 18.2 min (gradient: 0 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 674.74

MW (observed): 675.26 = [M+H]⁺

N→O intramolecular acyl migration:

Compound **59** (330 μg, 0.42 μmol) was dissolved in a solution of 1 M methane sulfonic acid in anhydrous dioxane (420 μL, 0.1 M) and stirred at 37°C under an argon atmosphere on molecular sieves. The content of the resulting solution was followed by analytical RP-HPLC C₁₈ (10 μL per injection). The starting material, corresponding to the S_{on} state of the switch-peptide, as well as the molecule **47** (S_{off} state), were mainly degraded after 3 days.

(H-Ala)3-hydroxyanthranilyl-Phe-NH₂ (48)

The peptide was synthesized manually on Rink Amide MBHA resin (initial loading: 0.64 mmol/g of resin, 1 g, 0.64 mmol) according to the standard procedures of SPPS following the Fmoc/*t*Bu strategy, as described in the next table:

Residue	Weight (mg)	Quantity (mmol)	Number of eq.	Coupling time	R/A
Rink Amide MBHA	1000	0.64			
Fmoc-Phe-OH	496	1.28	2	1h, 1h	R
41 (89 % pure)	365	1.28	2	1h, 1h	R
Boc-Ala-OH	363	1.92	3	1h, 1h, 1h	R, R

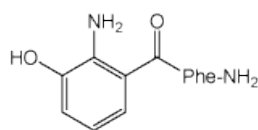
N-*tert*-butoxycarbonyl-3-hydroxyanthranilic acid (**41**) was coupled to the amino group of the phenylalanine using PyBOP (666 mg, 1.28 mmol, 2 eq.) as a normal coupling. The free alcohol function of the aromatic ring was esterified in presence of 1-methylimidazole (0.15 mL, 1.88 mmol, 2.2 eq.) after pre-activation of Boc-Ala-OH (363 mg, 1.92 mmol, 3 eq.) with MSNT (569 mg, 1.92 mmol, 3 eq.) in DCM/DMF (8 mL, 1: 1) for 30 min under a nitrogen atmosphere (coupling: 1h, nitrogen atmosphere, r.t., 3 times). The switch-peptide **43** was deprotected and cleaved from the resin by treatment with a solution TFA, TIS and dry DCM (95: 2.5: 2.5, v/v/v, 25 mL, 1h30, r.t.). The resulting solution was analyzed after purification of an aliquot by analytical RP-HPLC C₁₈ (gradient: 5 to 100 % B in 30 min) and analysis of the main compounds by spectroscopy ESI-MS, confirming the presence of the desired product at the S_{off} state (**43**). The peptide mimetic was precipitated twice in cold diethyl ether and then lyophilized in a mixture of water and acetonitrile, frozen as fast as possible to avoid O→N acyl migration or degradation of the ester. This step afforded to a white solid, whose contents was controlled by analytical RP-HPLC C₁₈ and ESI-MS, revealing the disappearance of the switch-peptide at the S_{off} state (molecule **43**) whereas the presence of the switch-peptide at the S_{on} state (molecule **44**) was confirmed.

RP-HPLC: 10.5 min (gradient: 5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 370.4

MW (observed): 371.38 = [M+H]⁺

3-Hydroxyanthranilyl-Phe-NH₂ (48a)

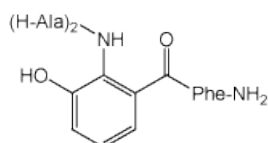


RP-HPLC: 9.8 min (gradient: 5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 299.32

MW (observed): 301.13 = [M+H]⁺

N-(H-Ala)₂-3-hydroxyanthranilyl-Phe-NH₂ (48b)



RP-HPLC: 11.4 min (gradient: 5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 441.48

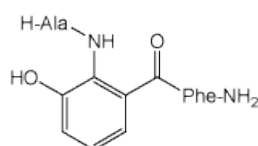
MW (observed): 442.36 = [M+H]⁺

(48c)

RP-HPLC: 12 min (gradient: 5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (observed): 353.36 = [M+H]⁺

H-Ala-3-hydroxyanthranilyl-Phe-NH₂ (49)

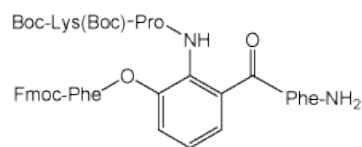


Precipitation in cold diethyl ether (twice) of the solution containing the switch-peptide **43** at the S_{off} state after cleavage from the resin and lyophilisation after solubilization in a mixture of water and acetonitrile triggered the O→N acyl migration, affording the switch-peptide **44** at the S_{on} state. Attempt of purifications by preparative RP-HPLC C₁₈ (gradient: 10 to 40 % B in 30 min; 3 times) gave a mixture containing the switch-peptide **44** always mixed with the compound **43c** (ratio estimate by analytical RP-HPLC C₁₈: 22 % of **44**).

RP-HPLC: 11 min (gradient: 5 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (calculated): 370.4

MW (observed): 371.38 = [M+H]⁺

Boc-Lys(Boc)-Pro-(Fmoc-Phe)3-hydroxyanthranilyl-Phe-NH₂ (50)

The peptide mimetic was synthesized manually on Sieber Amide resin (initial loading: 0.55 mmol/g, 500 mg, 0.275 mmol) according to the standard procedures of SPPS and as described in the following table:

Residue	Quantity (mg; mmol; eq.)	Coupling agent	Coupling time	R/A	Observations
Fmoc-Phe-OH	320; 0.83; 3	PyBOP	50 min	-	-
3-hydroxy- -anthranilic acid	84; 0.55; 2	PyBOP	1h	-	-
Fmoc-Pro-OH .H ₂ O	293; 0.83; 3	HATU	2 x 30 min	R	-
Boc-Lys(Boc)- OH.DCHA	436; 0.83; 3	HATU	1h20		Cleavage test; treatment with 20 % piperidine/DMF (5 x 2 min)
Fmoc-Phe-OH	320; 0.83; 3	DIC, DMAP	2 x 2h		-

Treatment of the resin with 20 % piperidine in DMF after the coupling of Boc-Lys(Boc).OH allowed to keep free the phenol group, the ester formed as a secondary reaction being unstable in these conditions. The alcohol was esterified by reaction of Fmoc-Phe-OH, activated with DIC (3 eq.) and catalyzed with DMAP (0.1 eq.) (2 x 2h, r.t.). Then the crude product was cleaved from the resin after treatment with 1 % TFA in dry DCM (10 mL) for 30 min. The resin was washed carefully with dry DCM (4 x 10 mL). Hexane (100 mL) was added to the collected solvents before concentration under reduced pressure in order to eliminate a maximum of TFA, affording a white residue (130 mg, 0.12 mmol). The compound was then characterized and used without further purification.

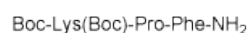
Yield: 22 %

RP-HPLC: Rt = 5.4 min (50 to 100 % B in 10 min).

ESI-MS: MW (calculated): 1094.3

MW (observed): 994.8 = [M-Boc+H]⁺; 1094.9 = [M+H]⁺; 1116.87 = [M+Na]⁺

Characterization of the side product **50a**:



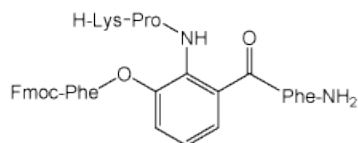
Quantity: 7.5 % estimate by analytical RP-HPLC.

RP-HPLC: Rt = 6.8 min (50 to 100 % B in 10 min).

Experimental Part

ESI-MS: MW (calculated): 589.7
MW (observed): 490.32 = [M-Boc+H]⁺; 590.3 = [M+H]⁺; 612.28 = [M+Na]⁺

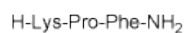
H-Lys-Pro-(Fmoc-Phe)3-hydroxyanthranilyl-Phe-NH₂ (**51**)



The crude product **50** (130 mg, 0.12 mmol) was dissolved in a solution containing 50 % of TFA in dry DCM (5 mL) and stirred at room temperature under an argon atmosphere for 40 min. The deprotected peptide mimetic was precipitated in cold diethyl ether, centrifuged, washed twice with cold diethyl ether, centrifuged and dried overnight under reduced pressure. The product (125 mg, 0.11 mmol) was then characterized and used without further purification.

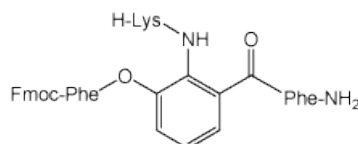
Yield: 94 % (purity estimate by analytical RP-HPLC: 23 %)
RP-HPLC: Rt = 7.1 min (0 to 100 % B in 10 min).
ESI-MS: MW (calculated): 894.02; with 2 TFA: 1122.06
MW (observed): 447.81 = [M/2+H]⁺; 894.39 = [M+H]⁺.

Characterization of the side product **51a**:

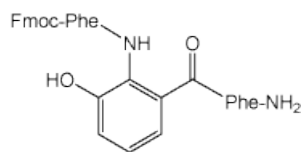


Quantity: 7 % (estimate by analytical RP-HPLC)
RP-HPLC: Rt = 6.7 min (0 to 100 % B in 10 min).
ESI-MS: MW (calculated): 389.49
MW (observed): 390.4 = [M+H]⁺.

Characterization of the main side product (H-Lys-(Fmoc-Phe)3-hydroxyanthranilyl-Phe-NH₂ **51b**):



Quantity: 67 % (estimate by analytical RP-HPLC)
RP-HPLC: Rt = 7.0 min (0 to 100 % B in 10 min).
ESI-MS: MW (calculated): 796.91
MW (observed): 399.39 = [M/2+H]⁺; 797.35 = [M+H]⁺.

Fmoc-Phe-3-hydroxyanthranilyl-Phe-NH₂ (52)**Enzymatic cleavage and consecutive O→N acyl migration:**

The crude product 51, mixed with 51a and 51b, was dissolved in a sodium phosphate buffer 0.1 M at pH = 7.4, blended or not with acetonitrile for solubility reasons. A solution of DPPIV (solution stock: 0.16 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) was added to the peptide solution and then the kinetic was followed by taking samples from the reaction mixture (see preparation in the next table) and analyzing them by analytical RP-HPLC C₁₈ (10 μL per injection; gradient: 0 to 100 % B in 10 min). The formation of a white precipitated was observed as one goes along.

A detailed description of the different tests realized for this experiment is given in the next table:

Quantity of <u>51</u> (mg; μmol)	Quantity of enzyme (μL ; μmol ; eq.)	Solvents	Peptide concentration	T ($^{\circ}\text{C}$)	Sample preparation
0.42; 0.47	5; 0.8; 1.7	PBS 0.1 M pH = 7.4 (470 μL)	1 mM	r.t.	10 μL + 10 μL HCl 0.1 M; liquid N ₂
2.15; 2.41	15; 2.41; 1	PBS 0.1 M pH = 7.4 (2405 μL) + ACN (600 μL)	0.8 mM	r.t.	20 μL + 20 μL HCl 0.1 M; liquid N ₂
1.48; 1.66	10; 1.66; 1	PBS 0.1 M pH = 7.4 (1660 μL)	1 mM	37	20 μL + 20 μL HCl 0.1 M; liquid N ₂

After 20 h, the mixture of solid and solution was diluted with some methanol before to be lyophilized and then characterized by analytical RP-HPLC and ESI-MS. A mixture of various products was observed, as described as follow:

Characterization of 52 (S_{on} state):

RP-HPLC: Rt = 8.2 min (0 to 100 % B in 10 min, short column C₁₈).

ESI-MS: MW (calculated): 668.74

MW (observed): 669.4 = [M+H]⁺; 691 = [M+Na]⁺.

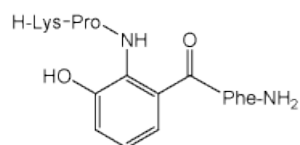
Experimental Part

Characterization of **52a**:

H-Lys-Pro-OH

ESI-MS: MW (calculated): 243,30
MW (observed): 244 = [M+H]⁺

Characterization of **H-Lys-Pro-3-hydroxyanthranilyl-Phe-NH₂ 52b**:



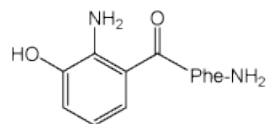
ESI-MS: MW (calculated): 524.6
MW (observed): 525.33 = [M+H]⁺

Characterization of **52c**:

Fmoc-Phe-OH

RP-HPLC: Rt = 7.7 min (0 to 100 % B in 10 min).
ESI-MS: MW (calculated): 387.43
MW (observed): 388 = [M+H]⁺

Characterization of **3-hydroxyanthranilyl-Phe-NH₂ 52d**:



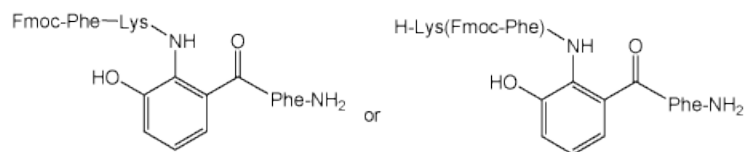
RP-HPLC: Rt = 4.8 min (0 to 100 % B in 10 min).
ESI-MS: MW (calculated): 299.3
MW (observed): 300.33 = [M+H]⁺.

Characterization of **52e**:

H-Phe-NH₂

ESI-MS: MW (calculated): 164.2
MW (observed): 165 = [M+H]⁺

Characterization of **Fmoc-Phe-Lys-3-hydroxyanthranilyl-Phe-NH₂** or **H-Lys(Fmoc-Phe)-3-hydroxyanthranilyl-Phe-NH₂** **52f**:



RP-HPLC: Rt = 7.4 min (0 to 100 % B in 10 min).

ESI-MS: MW (calculated): 796.91

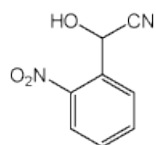
MW (observed): 797.33 = [M+H]⁺.

Stability study of compound **51**:

The switch-peptide **51**, blocked in its S_{off} state with a lysine-proline dipeptide, was dissolved and then analyzed by analytical RP-HPLC (10 μL per injection) at different moments. A description of the different tests that were realized with the molecule is given in the next table:

Quantity of 51 (μg, μmol)	Solvent	Peptide concentration	T (°C)	Sample preparation	Remarks
770, 0.86	PBS 0.1 M pH 7.4 (860 μL) + ACN (200 μL)	0.8 mM	r.t.	20 μL diluted with 20 μL PBS	Full degradation
740, 0.833	PBS 0.1 M pH 7.4 (828 μL)	1 mM	37 °C	Directly from the solution	Full degradation

Hydroxy(2-nitrophenyl)acetonitrile (**53**)



Nitrobenzaldehyde (1g, 6.62 mmol, 1 eq.) was dissolved in acetic acid (2 mL, 3.3 M) and cooled down with an ice bath before a slow addition (8 min) of a solution of KCN (660 mg, 10.14 mmol, 1.5 eq.) in water (1.32 mL, 7.7 M) under an argon atmosphere. The resulting mixture was stirred for 2 min at 0°C, and then the temperature was increased to room temperature. The yellow solution was stirred vigorously for 5h before addition of water (9 mL). Afterwards, it was let at room temperature overnight to allow the compounds to precipitate. The solid was washed with water (10 mL), dried under reduced pressure, and used without further purification (709 mg, 3.98 mmol).

Yield: 60 %

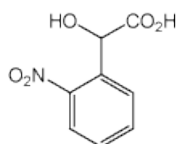
Experimental Part

NMR ^1H : (DMSO d_6 , 30°C) δ = 8.17-8.15 (d, 1 H, H aromatic, ortho position in relation to NO_2), 7.97-7.7 (2 dd, 2 H, H aromatic), 7.53-7.51 (d, 1H, H aromatic, ortho position in relation to CH), 6.17 (s, 1H, CH).

NMR ^{13}C : (DMSO d_6 , 30°C) δ = 148 (1 C aromatic, linked to NO_2), 135 (1 C aromatic, para position in relation to C- NO_2), 133 (1 C aromatic), 131 (1 C aromatic), 129 (1 C aromatic), 126 (1 C aromatic, linked to CH), 120 (1 C \equiv N), 59.7 (1 CH).

FT-IR: 3360 cm^{-1} (associated alcohol); 2247 cm^{-1} (C \equiv N); 1609 and 1578 cm^{-1} (aromatic C=C); 1519 and 1337 cm^{-1} (nitro).

Ortho-nitromandelic acid (**54**)



Compound **53** (700 mg, 3.93 mmol, 1 eq.) was dissolved in a solution containing 37 % HCl in water (3.5 mL, 1.1 M) and heated to reflux for 30 min. The solution was concentrated under reduced pressure to half volume and let to crystallize overnight at room temperature. The solid was collected after filtration and washing with HCl 37 % (485 mg, 2.46 mmol, yield: 63 %). The stock-solution was concentrated and recrystallized to afford a second batch containing the desired molecule (117 mg, 0.59 mmol, yield: 15 %).

Yield: 78 %

RP-HPLC: R_t = 2.5 min (0 to 100 % B in 10 min).

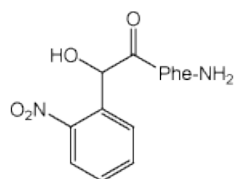
ESI-MS: MW (calculated): 197.14
MW (observed): 394.29 = $[2\text{M}+\text{H}]^+$.

NMR ^1H : (DMSO d_6 , 30°C) δ = 8.01-7.99 (d, 1H, H aromatic, ortho position in relation to NO_2), 7.83-7.56 (m, 3H, H aromatic), 5.63 (s, 1H, CH).

NMR ^{13}C : (DMSO d_6 , 30°C) δ = 173 (1 CO_2H), 149 (1 C aromatic, linked to NO_2), 136 (1 C aromatic, para position in relation to NO_2), 134 (1 C aromatic), 130 (1 C aromatic), 129 (1 C aromatic), 125 (1 C aromatic, ortho position to NO_2), 69.8 (1 CH).

FT-IR: 3500 cm^{-1} (alcohol); 1715 cm^{-1} (C=O); 1611 and 1580 cm^{-1} (aromatic C=C); 1521 and 1343 cm^{-1} (nitro).

Ortho-nitromandelyl-Phe-NH₂ (**55**)



Compound **54** (97 mg, 0.49 mmol, 1 eq.), H-Phe-NH₂.HCl (102 mg, 0.51 mmol, 1eq.), HATU (193 mg, 0.51 mmol, 1 eq.) were dissolved in dry DCM (5 mL, 0.1 M) and mixed with DIPEA (0.26 mL, 1.5 mmol, 3 eq.) under an argon atmosphere. The resulting solution was stirred at room temperature for 3h45 before addition of methanol (5 mL) to stop the reaction. The solvents were concentrated under reduced pressure. Afterwards the residue was dissolved in DCM (10 mL) and washed with an aqueous solution containing 10 % citric acid (10 mL). The aqueous layer was extracted with DCM (2 x 5 mL) and AcOEt (25 mL), and then the organic phases were collected before washing with saturated brine (10 mL). They were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude solid was purified by preparative RP-HPLC C₁₈ (gradient: 0 to 100 % B in 30 min), affording a mixture the two diastereoisomers of the desired compound (88 mg, 0.26 mmol).

Yield: 52 %

RP-HPLC: Rt = 5.4 min (0 to 100 % B in 10 min).

ESI-MS: MW (calculated): 343.33

MW (observed): 344.32 = [M+H]⁺; 687.38 = [2M+H]⁺.

FT-IR: 3314 cm⁻¹ (NH amide), 3197 cm⁻¹ (alcohol); 1655 cm⁻¹ (C=O amide); 1608 cm⁻¹ (aromatic C=C); 1518 and 1346 cm⁻¹ (nitro).

Sample preparation for Congo red staining and electron microscopy by conventional negative staining:

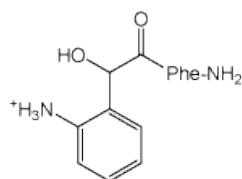
55S1

55 (0.14 mg, 0.4 μmol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 400 μM. It was then mixed with Aβ(13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μmol; **4/55**; 1 : 1), filtered and incubated at room temperature. Its contents were then controlled by Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μL).

55S2

55 (1.37 mg, 4 μmol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 4 mM. It was then mixed with Aβ(13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μmol; **4/55**; 1: 10), filtered and incubated at room temperature. Its contents were then controlled by Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μL).

Ortho-aminomandelyl-Phe-NH₂ (**56**)



First attempt:

Compound **55** (8 mg, 23 μ mol, 1 eq.) was dissolved in methanol (40 mL, 0.6 mM) with acetic acid (3 μ L, 10 % weight) and mixed with a few palladium-charcoal. The resulting solution was heated to 50 °C at 50 bars and stirred under a hydrogen atmosphere. Aliquots were taken at different moments to control the content of the reaction mixture by analyzing them by analytical RP-HPLC C₁₈ and ESI-MS. After 3h, the starting material was completely consumed, giving a mixture containing among others the desired compound and the nitroso derivative as an intermediate. After 5h30, no dramatic changes were observed, but a longer reaction time led to degradation.

Second attempt:

Compound **55** (6 mg, 17 μ mol, 1 eq.) was dissolved in acetic acid (40 mL, 0.4 mM), mixed with a few palladium-charcoal and stirred at room temperature under a hydrogen atmosphere (50 bars). After 1h, the product was completely degraded.

Third attempt:

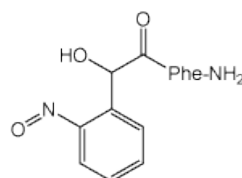
Compound **55** (6 mg, 17 μ mol, 1 eq.) was dissolved in a mixture of methanol (35 mL) and acetic acid (5 mL; total volume: 40 mL, 0.4 mM), and then stirred at room temperature under a hydrogen atmosphere (50 bars). After 2h30, we observed a complete degradation of the molecule.

RP-HPLC: Rt = 4.7 min (0 to 100 % B in 10 min).

ESI-MS: MW (calculated): 313.35

MW (observed): 314.4 = [M+H]⁺.

Identification of the nitroso derivative (ortho-nitrosomandelyl-Phe-NH₂)

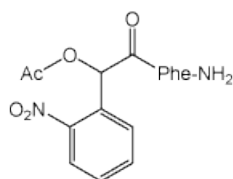


RP-HPLC: Rt = 6.3 min (0 to 100 % B in 10 min).

ESI-MS: MW (calculated): 327.33

MW (observed): 328.38 = [M+H]⁺; 340.37 = [M+Na]⁺.

O-Acetyl-ortho-nitromandelyl-Phe-NH₂ (**57**)



Compound **55** (28 mg, 82 μ mol, 1 eq.) was dissolved in anhydrous DCM (1 mL, 0.08 M) and mixed with acetic anhydride (0.02 mL, 0.21 mmol, 2.6 eq.) and pyridine (0.02 mL, 0.245 mmol, 3 eq.) under an argon atmosphere. The resulting solution was stirred at room temperature for 40 min before addition of methanol (0.5 mL) and concentration under reduced pressure. The residue was purified by chromatographic column on silica gel (50 % AcOEt/n-hexane, then 70 % AcOEt/n-hexane), affording a white solid (14 mg, 36 μ mol).

Yield: 44 %

Rf: 0.2 (70 % AcOEt/n-hexane)

RP-HPLC: Rt = 6 min (0 to 100 % B in 10 min).

ESI-MS: MW (calculated): 385.37

MW (observed): 386 = [M+H]⁺; 408 = [M+Na]⁺; 771 = [2M+H]⁺; 793 = [2M+Na]⁺.

FT-IR: 3321 cm⁻¹ (NH amide); 1744 cm⁻¹ (C=O ester); 1661 cm⁻¹ (C=O amide); 1610 cm⁻¹ (aromatic C=C); 1523 and 1348 cm⁻¹ (nitro).

Sample preparation for Congo red staining and electron microscopy by conventional negative staining:

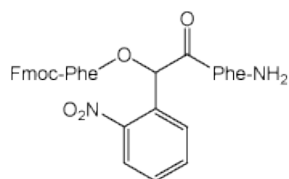
57S1

57 (0.15 mg, 0.4 μ mol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 400 μ M. It was then mixed with A β (13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μ mol; **4/57**; 1: 1), filtered and incubated at room temperature. Its contents were then controlled by Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μ L).

57S2

57 (1.54 mg, 4 μ mol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 4 mM. It was then mixed with A β (13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μ mol; **4/57**; 1: 10), filtered and incubated at room temperature. Its contents were then controlled by Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μ L).

O-(Fmoc-Phe)-ortho-nitromandelyl-Phe-NH₂ (**58**)



Compound **55** (21 mg, 61 μ mol, 1 eq.) was mixed with Fmoc-Phe-OH (33 mg, 85 μ mol, 1.4 eq.) in anhydrous dichloromethane (1 mL, 0.06 M), whereas its carboxylic acid function was activated with DIC (0.02 mL, 128 μ mol, 2 eq.), catalyzed by DMAP (6 mg, 49 μ mol, 0.8 eq.). The resulting mixture was stirred at room temperature for 1h10 under an argon atmosphere, before addition of methanol (0.5 mL), which stopped the coupling reaction. After concentration of solvents under reduced pressure, the residue was purified by chromatographic column on silica gel (50 % AcOEt/n-hexane), affording the desired product as a white solid (41 mg, 58 μ mol).

Yield: 95 %

Rf: 0.17 (50 % AcOEt/n-hexane)

RP-HPLC: Rt = 8.8 min (0 to 100 % B in 10 min).

ESI-MS: MW (calculated): 712.75

MW (observed): 713.38 = [M+H]⁺; 735.29 = [M+Na]⁺.

FT-IR: 3330 cm⁻¹ (NH amide); 1750 cm⁻¹ (C=O ester); 1668 cm⁻¹ (C=O amide); 1604 and 1449 cm⁻¹ (aromatic C=C); 1518 and 1347 cm⁻¹ (nitro).

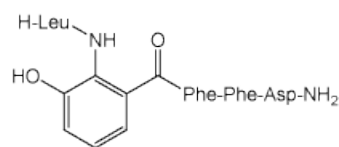
Sample preparation for Congo red staining and electron microscopy by conventional negative staining:

58S1

58 (0.29 mg, 0.4 μ mol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 400 μ M. It was then mixed with A β (13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μ mol; **4/58**; 1: 1), filtered and incubated at room temperature. Its contents were then controlled by Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μ L).

58S2

58 (2.85 mg, 4 μ mol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 4 mM. It was then mixed with A β (13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μ mol; **4/58**; 1: 10), filtered and incubated at room temperature. Its contents were then controlled by Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μ L). A precipitation was observed from the first day of incubation.

H-Leu-3-hydroxyanthranilyl-Phe-Phe-Asp-NH₂ (59)

The peptide was synthesized manually on Rink Amide MBHA resin (initial loading: 0.64 mmol/g of resin, 667 mg, 0.427 mmol) according to the standard procedures, with Fmoc-amino acid (2 eq.), PyBOP (444 mg, 0.853 mmol, 2 eq.) as activating reagent and DIPEA (0.3 mL, 1.734 mmol, 4 eq.) as base. Coupling of 3-hydroxyanthranilic acid (98 mg, 0.64 mmol, 1.5 eq.) was also done with PyBOP (334 mg, 0.642 mmol, 1.5 eq.) activation with DIPEA (0.22 mL, 1.271 mmol, 3 eq.) and under reduced light. The synthesis of the peptide is described in the following table.

Residue	Weight (mg)	Quantity (mmol)	Number of eq.	Coupling time	R/A
Rink Amide MBHA resin	667	0.427			
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	351	0.853	2	1h, 1h	R
Fmoc-Phe-OH	331	0.854	2	1h, 1h	R
Fmoc-Phe-OH	331	0.854	2	1h, 1h	R
3-hydroxyanthranilic acid	98	0.64	1.5	50 min	-
Boc-Leu-OH.1/2 H ₂ O	205	0.853	2	1h	-

The molecule was fully deprotected and cleaved from the resin by treatment with TFA/TIS/H₂O (95: 2.5: 2.5, v/v/v, 12 mL) for 1h30 at room temperature. The resin was washed several times with TFA, DCM and methanol, and then the solvents were concentrated under reduced pressure. The yellow oil was dissolved in water before lyophilisation. The crude product was then purified by semi-preparative RP-HPLC C₁₈ (gradient: 20 to 50 % B in 30 min), affording the desired compound **59** (56 mg, 72 μmol).

Yield: 17 %

RP-HPLC: Rt = 5.3 min (0 to 100 % B in 10 min)

ESI-MS: MW (calculated): 674.74

MW (observed): 675 = [M+H]⁺

Main side product: aspartimide formation

RP-HPLC: Rt = 6.1 min (0 to 100 % B in 10 min)

ESI-MS: MW (observed): 657 = [M+H]⁺

Sample preparation for Congo red staining and electron microscopy by conventional negative staining:

59S1

59 (0.32 mg, 0.4 μmol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 400 μM . It was then mixed with A β (13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μmol ; **4/59**; 1: 1), filtered and incubated at room temperature. Its contents were then controlled by Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μL).

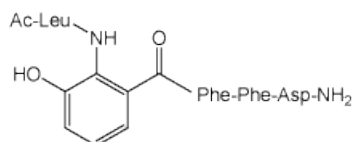
59S2

59 (1.55 mg, 2 μmol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 2 mM. It was then mixed with A β (13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μmol ; **4/59**; 1: 5), filtered and incubated at room temperature. Its contents were then controlled by Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μL).

59S3

59 (0.08 mg, 0.1 μmol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 100 μM . It was then mixed with A β (13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μmol ; **4/59**; 4: 1), filtered and incubated at room temperature. Its contents were then controlled by Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μL).

Ac-Leu-3-hydroxyanthranilyl-Phe-Phe-Asp-NH₂ (60**)**



The peptide was synthesized manually on Rink Amide MBHA resin (initial loading: 0.64 mmol/g of resin, 667 mg, 0.427 mmol) according to the standard procedures, with Fmoc-amino acid (2 eq.), PyBOP (444 mg, 0.853 mmol, 2 eq.) as activating reagent and DIPEA (0.3 mL, 1.734 mmol, 4 eq.) as base. Coupling of 3-hydroxyanthranilic acid (98 mg, 0.64 mmol, 1.5 eq.) was also done with PyBOP (334 mg, 0.642 mmol, 1.5 eq.) activation with DIPEA (0.22 mL, 1.271 mmol, 3 eq.) and under reduced light. The synthesis of the peptide is described in the following table.

Residue	Weight (mg)	Quantity (mmol)	Number of eq.	Coupling time	R/A
Rink Amide MBHA resin	667	0.427			
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	351	0.853	2	1h, 1h	R
Fmoc-Phe-OH	331	0.854	2	1h, 1h	R
Fmoc-Phe-OH	331	0.854	2	1h, 1h	R
3-hydroxyanthranilic acid	98	0.64	1.5	50 min	-
Boc-Leu-OH.1/2 H ₂ O	205	0.853	2	1h	-

The Boc group on the leucine residue was cleaved with a solution of 50 % TFA in DCM (30 min, r.t.). The free amino function was then acetylated following the standard procedures in SPPS before the full deprotection and cleavage of the molecule from the resin (treatment with TFA/TIS/H₂O (95: 2.5: 2.5, v/v/v, 12 mL) for 1h30 at room temperature). The resin was washed several times with TFA, DCM and methanol and the solvents were concentrated under reduced pressure. The yellow oil was then dissolved in water before lyophilisation. The crude product was purified by two consecutive semi-preparative RP-HPLC C₁₈ (gradient: 20 to 50 % B in 30 min, then 30 to 60 % B in 30 min), affording the desired compound **60** (4 mg, 5.6 μ mol).

Yield: 2 %

RP-HPLC: Rt = 20.2 min (0 to 100 % B in 30 min); 11.4 min (40 to 100 % B in 30 min); 6.4 min (0 to 100 % B in 10 min).

ESI-MS: MW (calculated): 716.78

MW (observed): 717 = [M+H]⁺

Main side product: aspartimide formation

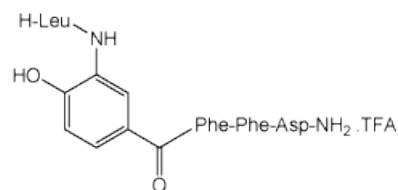
RP-HPLC: Rt = 21.7 min (0 to 100 % B in 30 min)

ESI-MS: MW (observed): 699 = [M+H]⁺

Sample preparation for Congo red staining and electron microscopy by conventional negative staining:

60S1

60 (0.07 mg, 0.1 μ mol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 100 μ M. It was then mixed with A β (13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μ mol; **4/60**; 4: 1), filtered and incubated at room temperature. Its contents were then controlled by Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μ L).

H-Leu-[3-amino-4-hydroxybenzoyl]-Phe-Phe-Asp-NH₂ (61)

The peptide was synthesized manually on Rink Amide MBHA resin (initial loading: 0.64 mmol/g of resin, 667 mg, 0.427 mmol) according to the standard procedures, with Fmoc-amino acid (2 eq.), PyBOP (444 mg, 0.853 mmol, 2 eq.) as activating reagent and DIPEA (0.3 mL, 1.734 mmol, 4 eq.) as base. Coupling of 3-amino-4-hydroxybenzoic acid (98 mg, 0.64 mmol, 1.5 eq.) was also done with PyBOP (334 mg, 0.642 mmol, 1.5 eq.) activation with DIPEA (0.22 mL, 1.271 mmol, 3 eq.) and under reduced light. The synthesis of the peptide is described in the following table.

Residue	Weight (mg)	Quantity (mmol)	Number of eq.	Coupling time	R/A
Rink Amide MBHA resin	667	0.427			
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	351	0.853	2	1h, 1h	R
Fmoc-Phe-OH	331	0.854	2	1h, 1h	R
Fmoc-Phe-OH	331	0.854	2	1h, 1h	R
3-amino-4-hydroxybenzoic acid	98	0.64	1.5	50 min	-
Boc-Leu-OH.1/2 H ₂ O	205	0.853	2	1h	-

The molecule was fully deprotected and cleaved from the resin by treatment with TFA/TIS/H₂O (95: 2.5: 2.5, v/v/v, 12 mL) for 1h30 at room temperature. The resin was washed several times with TFA, DCM and methanol, and then the solvents were concentrated under reduced pressure. The yellow oil was diluted in water before lyophilisation. The crude was purified by preparative RP-HPLC C₁₈ (gradient: 20 to 50 % B in 30 min) and by semi-preparative RP-HPLC C₁₈ (gradient: 20 to 50 % B in 30 min) to afford a white solid (13 mg, 19.3 μmol).

Yield: 5 %

RP-HPLC: Rt = 5.7 min (0 to 100 % B in 10 min)

ESI-MS: MW (calculated): 674.74

MW (observed): 675 = [M+H]⁺

Sample preparation for Congo red staining and electron microscopy by conventional negative staining:

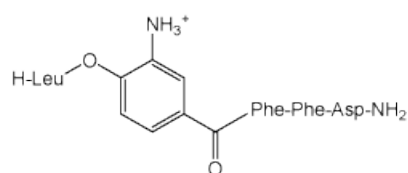
61S1

61 (0.32 mg, 0.4 μmol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 400 μM . It was then mixed with A β (13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μmol ; **4/61**; 1: 1), filtered and incubated at room temperature. Its contents were then controlled by Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μL).

61S2

61 (1.55 mg, 2 μmol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 2 mM. It was then mixed with A β (13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μmol ; **4/61**; 1: 5), filtered and incubated at room temperature. Its contents were then controlled by Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μL).

(H-Leu)[3-amino-4-hydroxybenzoyl]-Phe-Phe-Asp-NH₂ (62)



Compound **61** (460 μg , 0.58 μmol) was dissolved in a solution 1M methane sulfonic acid in dry dioxane (585 μL , 0.1 M) and stirred at 37 °C under an argon atmosphere and on molecular sieves. Content of the resulting solution was controlled by analytical RP-HPLC C₁₈ (10 μL per injection). The intramolecular N \rightarrow O acyl migration was complete after 1 day.

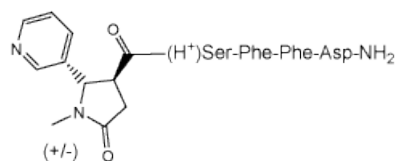
$t_{1/2}$: 2h34

RP-HPLC: $R_t = 5.47$ min (0 to 100 % B in 10 min)

ESI-MS: MW (calculated): 674.74

MW (observed): 675 = $[M+H]^+$

(+/-)-trans-4-cotininecarboxyl-(H⁺)Ser-Phe-Phe-Asp-NH₂ (63)



The peptide was synthesized manually on Rink Amide MBHA resin (initial loading: 0.64 mmol/g of resin, 500 mg, 0.32 mmol) according to the standard procedures, with Fmoc-amino acid (2 eq.), PyBOP (444 mg, 0.853 mmol, 2 eq.) as activating reagent and DIPEA (0.3 mL, 1.734 mmol, 4 eq.) as base. The alcohol function on the lateral chain of the serine was esterified with (+/-)-trans-4-cotininecarboxylic acid (3 eq.), activated with DIC (0.15 mL, 0.97 mmol, 3 eq.) and catalyzed with DMAP (4 mg, 0.03 mmol, 0.1 eq.). The synthesis of the peptide mimetic **63** is described in the following table:

Residue	Weight (mg)	Quantity (mmol)	Number of eq.	Coupling time	R/A
Rink Amide MBHA resin	500	0.32			
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	264	0.64	2	1h	-
Fmoc-Phe-OH	248	0.64	2	1h	-
Fmoc-Phe-OH	248	0.64	2	1h	-
Boc-Ser-OH	132	0.64	2	1h, 1h	R
(+/-)-trans-4-cotininecarboxylic acid	211	0.96	3	2h30	-

The molecule was fully deprotected and cleaved from the resin by treatment with TFA/EDT (95: 5, v/v, 20 mL) for 1h40 at room temperature. The resin was washed several times with TFA and methanol, afterwards the peptide was precipitated in cold diethyl ether and then dissolved in a mixture of TFA and water before lyophilisation to afford a pure white solid (322 mg, 0.34 mmol).

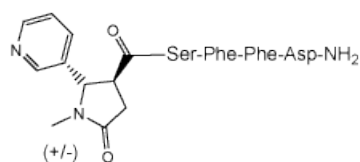
Yield: 53 %

RP-HPLC: Rt = 17.9 min (0 to 100 % B in 30 min); 5 min (0 to 100 % B in 10 min)

ESI-MS: MW (calculated): 715.75

MW (observed): 359 = [M/2+H]⁺; 716 = [M+H]⁺

(+/-)-trans-4-cotininecarboxyl-Ser-Phe-Phe-Asp-NH₂ (**64**)



Compound **63** (3.6 mg, 0.05 mmol) was dissolved in a sodium phosphate buffer 0.1 M at pH 7.43 (0.5 mL, 0.01 M). The resulting solution was stirred at room temperature and its content was verified by analytical RP-HPLC C₁₈ (0 to 100 % B in 10 min; 10 µL per injection) after quenching aliquots (50 µL) with an aqueous solution of HCl 2 M (50 µL).

t_{1/2}: 30 sec

Yield: quantitative

Experimental Part

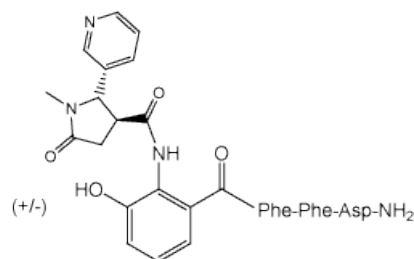
RP-HPLC: Rt = 20 min (0 to 100 % B in 30 min); 5.2 min (0 to 100 % B in 10 min)

ESI-MS: MW (calculated): 715.75

MW (observed): 359 = $[M/2+H]^+$; 716 = $[M+H]^+$

(+/-)-trans-4-cotininecarboxyl-[3-hydroxyanthranilyl]-Phe-Phe-Asp-NH₂

(65)



The peptide was synthesized manually on Rink Amide MBHA resin (initial loading: 0.64 mmol/g of resin, 667 mg, 0.427 mmol) according to the standard procedures, with Fmoc-amino acid (2 eq.), PyBOP (444 mg, 0.853 mmol, 2 eq.) as activating reagent and DIPEA (0.3 mL, 1.734 mmol, 4 eq.) as base. The synthesis is described in the following table. Coupling of 3-hydroxyanthranilic acid and of (+/-)-trans-4-cotinine carboxylic acid were realized under reduced light.

Residue	Weight (mg)	Quantity (mmol)	Number of eq.	Coupling time	R/A
Rink Amide MBHA resin	667	0.427			-
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	351	0.853	2	1h, 1h	R
Fmoc-Phe-OH	331	0.854	2	1h, 1h	R
Fmoc-Phe-OH	331	0.854	2	1h, 1h	R
3-hydroxyanthranilic acid	98	0.64	1.5	50 min	-
(+/-)-trans-4-cotininecarboxylic acid	188	0.854	2	1h	-

The peptide mimetic was fully deprotected and cleaved from the resin by treatment with a solution of DODT in TFA (5: 95, v/v, 12 mL; 2h, r.t.). The resin was washed several times with TFA, methanol and DCM, and then the solvents were concentrated under reduced pressure. The yellow oil was diluted in pure water before lyophilisation. The crude molecule was purified by consecutive preparative RP-HPLC C₁₈ (gradient: 0 to 100 % B in 30 min) and semi-preparative RP-HPLC C₁₈ (gradient: 0 to 100 % B in 30 min) to afford a white solid (7 mg, 9.17 μmol).

Yield: 2 %

RP-HPLC: Rt = 16.4 min (0 to 100 % B in 30 min); 5.43 min (0 to 100 % B in 10 min)

Experimental Part

ESI-MS: MW (calculated): 763.80
MW (observed): 764 = [M+H]⁺

Main side product: aspartimide formation

RP-HPLC: Rt = 5.7 min (0 to 100 % B in 10 min)

ESI-MS: MW (observed): 746 = [M+H]⁺

Sample preparation for Congo red staining and electron microscopy by conventional negative staining:

65S1

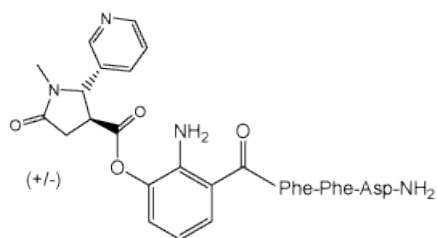
65 (0.35 mg, 0.4 μmol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 400 μM. It was then mixed with Aβ(13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μmol; **4/65**; 1: 1), filtered and incubated at room temperature. Its contents were then controlled by Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μL).

65S2

65 (1.75 mg, 2 μmol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 2 mM. It was then mixed with Aβ(13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μmol; **4/65**; 1: 5), filtered and incubated at room temperature. Its contents were then controlled by Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μL).

[(+/-)-trans-4-cotininecarboxyl][3-hydroxyanthranilyl]-Phe-Phe-Asp-NH₂

(66)

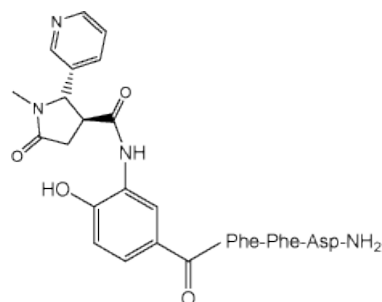


Compound **65** (290 μg, 0.38 μmol) was dissolved in a solution 1 M methane sulfonic in dry dioxane (380 μL, 1 mM) and stirred at 37 °C under an argon atmosphere and on molecular sieves. The content of the resulting solution was analyzed by analytical RP-HPLC C₁₈ (10 μL per injection). The main part of the starting molecule did not rearranged as product **66** but degraded. A complete degradation of the molecules **65** and **66** was observed after 1 day.

RP-HPLC: Rt = 5.12 min (0 to 100 % B in 10 min)

ESI-MS: MW (calculated): 763.80
MW (observed): 764 = [M+H]⁺

(+/-)-trans-4-cotininecarboxyl-[3-amino-4-hydroxybenzoyl]-Phe-Phe-Asp-NH₂ (67)



The peptide was synthesized manually on Rink Amide MBHA resin (initial loading: 0.64 mmol/g of resin, 667 mg, 0.427 mmol) according to the standard procedures, with Fmoc-amino acid (2 eq.), PyBOP (444 mg, 0.853 mmol, 2 eq.) as activating reagent and DIPEA (0.3 mL, 1.734 mmol, 4 eq.) as base. The synthesis is described in the following table. Coupling of 3-amino-4-hydroxybenzoic acid and of (+/-)-trans-4-cotinine carboxylic acid were realized under reduced light.

Residue	Weight (mg)	Quantity (mmol)	Number of eq.	Coupling time	R/A
Rink Amide MBHA resin	667	0.427			-
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	351	0.853	2	1h, 1h	R
Fmoc-Phe-OH	331	0.854	2	1h, 1h	R
Fmoc-Phe-OH	331	0.854	2	1h, 1h	R
3-amino-4-hydroxybenzoic acid	98	0.64	1.5	50 min	-
(+/-)-trans-4-cotininecarboxylic acid	188	0.854	2	1h	-

The peptide mimetic was deprotected and cleaved from the resin by treatment with a solution of DODT in TFA (5: 95, v/v, 12 mL) for 2h at room temperature. The resin was washed several times with TFA, methanol and DCM, and then the solvents were concentrated under reduced pressure. The yellow oil was diluted in pure water before lyophilisation. The crude product was purified by two consecutive preparative RP-HPLC C₁₈ (gradient: 0 to 100 % B in 30 min) and a semi-preparative RP-HPLC (gradient: 0 to 100 % B in 30 min) to afford a white solid (8 mg, 10.5 μmol).

Yield: 3 %

RP-HPLC: Rt = 18.1 min (0 to 100 % in 30 min); 5.45 min (0 to 100 % B in 10 min)

ESI-MS: MW (calculated): 763.80

MW (observed): 764 = [M+H]⁺

Sample preparation for Congo red staining and electron microscopy by conventional negative staining:

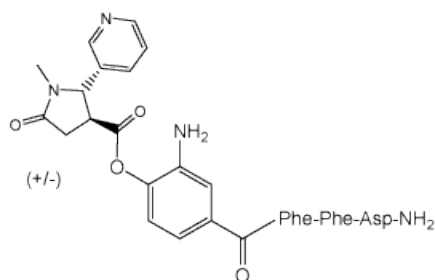
67S1

67 (0.35 mg, 0.4 μ mol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 400 μ M. It was then mixed with A β (13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μ mol; **4/67**; 1: 1), filtered and incubated at room temperature. Its contents were then controlled by Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μ L).

67S2

67 (1.75 mg, 2 μ mol) was dissolved in a solution of 15 % methanol in 0.01 M PBS – 137 mM NaCl – 2.7 mM KCl at pH 7.42 (1 mL) to obtain a peptide concentration equal to 2 mM. It was then mixed with A β (13-23) (**4**) (0.69 mg, 0.4 μ mol; **4/67**; 1: 5), filtered and incubated at room temperature. Its contents were then controlled by Congo red staining (after 3 days and 7 days, 2 x 400 μ L).

[(+/-)-trans-4-cotininecarboxyl][3-amino-4-hydroxybenzoyl]-Phe-Phe-Asp-NH₂ (68**)**



Compound **67** (300 μ g, 0.39 μ mol) was dissolved in 1M methane sulfonic acid in anhydrous dioxane (390 μ L, 1 mM) and stirred at 37°C under an argon atmosphere on molecular sieves. The content of the resulting solution was controlled by analytical RP-HPLC C₁₈ (10 μ L per injection). The starting material was fully rearranged but the molecule **68** completely degraded after 1 day and 4h.

t_{1/2}: 19h11

RP-HPLC: Rt = 5.12 min (0 to 100 % B in 10 min)

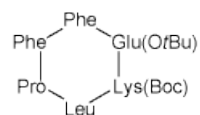
ESI-MS: MW (calculated): 763.80

MW (observed): 764 = [M+H]⁺

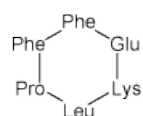
Liste des composés synthétisés

H-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu(OtBu)-Lys(Boc)-OH

1



2



3

H-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-NH₂

4

H-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-OH

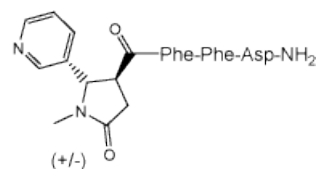
5

Ac-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH₂

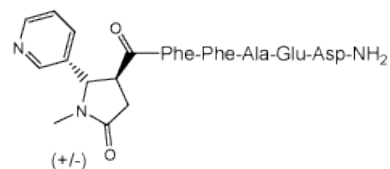
6

Ac-Leu-Val-Phe-Phe-Asp-NH₂

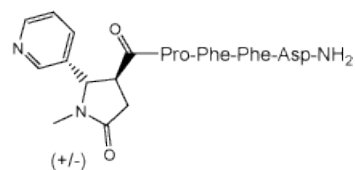
7



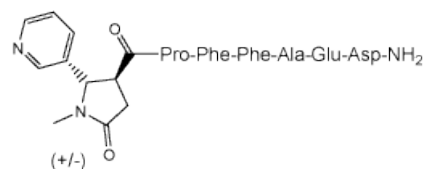
8a, 8b



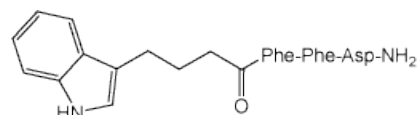
9a, 9b



10

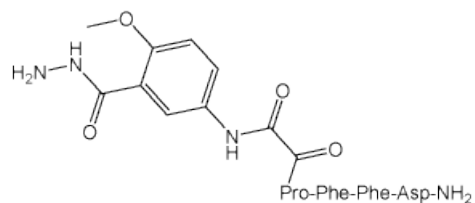
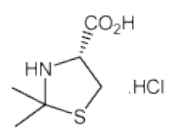
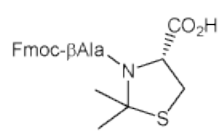
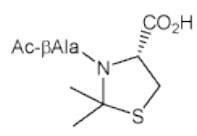
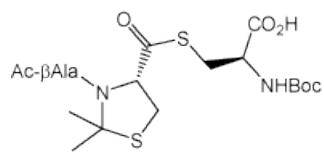
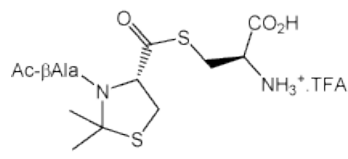
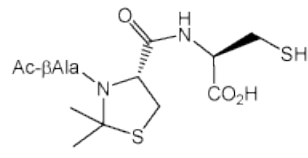
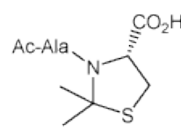
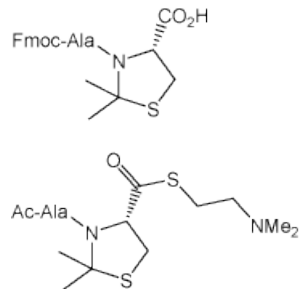


11



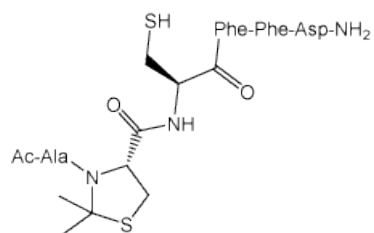
12

Liste des composés synthétisés

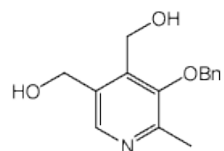
	<u>13</u>
	<u>14</u>
Fmoc-βAla-Cl	<u>15</u>
	<u>16</u>
Fmoc-βAla	<u>17</u>
	<u>18</u>
Ac-βAla	<u>19</u>
	<u>20</u>
Ac-βAla-Cys(Ψ ^{Me,Me} pro)-(H ⁺)Cys-Phe-Phe-Asp-NH ₂	<u>21</u>
	<u>22</u>
Ac-βAla-Cys(Ψ ^{Me,Me} pro)-Cys-Phe-Phe-Asp-NH ₂	<u>23</u>
	<u>24</u>
Ac-βAla-Cys(Ψ ^{Me,Me} pro)-(Ac)Cys-Phe-Phe-Asp-NH ₂	<u>25</u>
	<u>26</u>
Fmoc-Ala-Cl	<u>27</u>
	<u>28</u>
Fmoc-Ala	<u>29</u>

H-Cys-Phe-Phe-Asp-NH₂

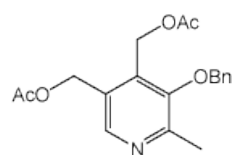
28



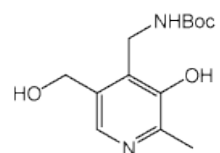
29



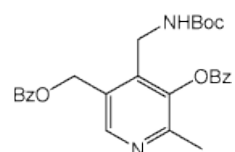
30



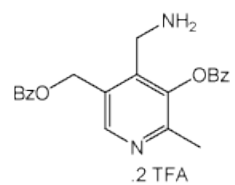
31



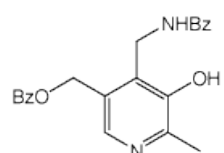
33



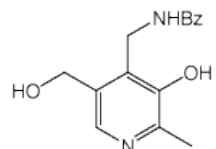
34



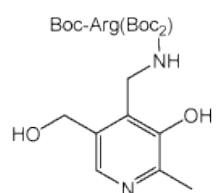
35



36



36a

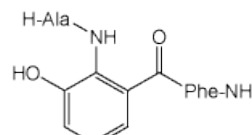
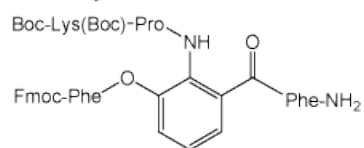
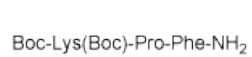
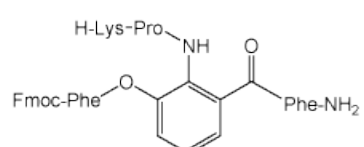

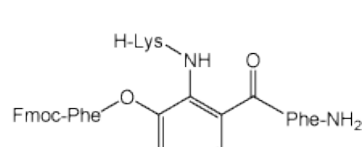
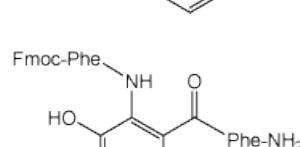

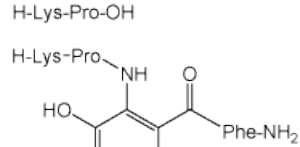

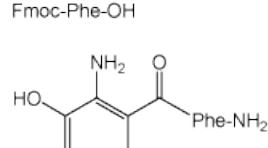

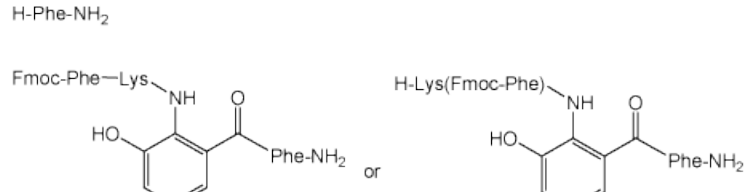
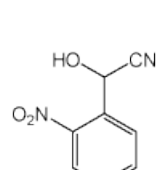


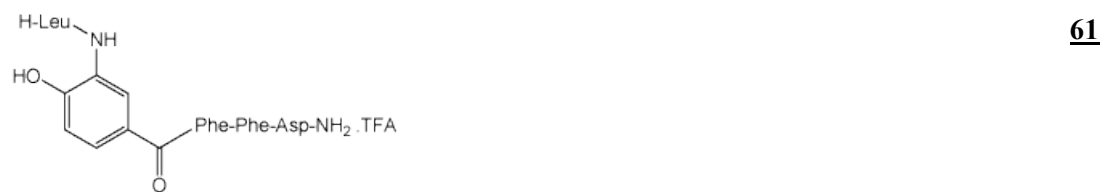
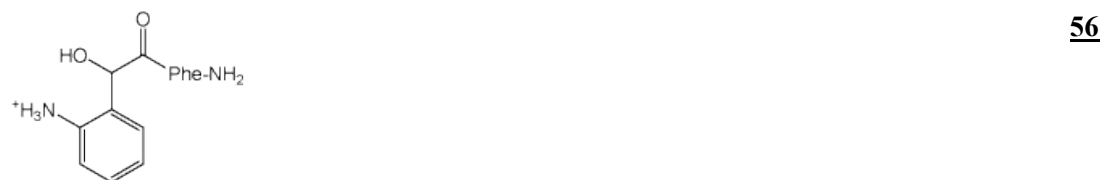
37

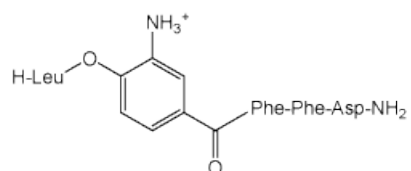
Liste des composés synthétisés



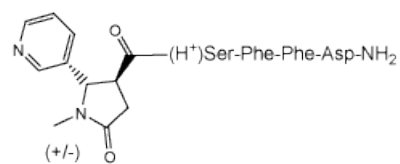
Liste des composés synthétisés

	<u>49</u>
	<u>50</u>
	<u>50a</u>
	<u>51</u>
	<u>51a</u>
	<u>51b</u>
	<u>52</u>
	<u>52a</u>
	<u>52b</u>
	<u>52c</u>
	<u>52d</u>
	<u>52e</u>
	<u>52f</u>
	<u>53</u>

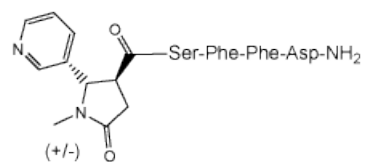




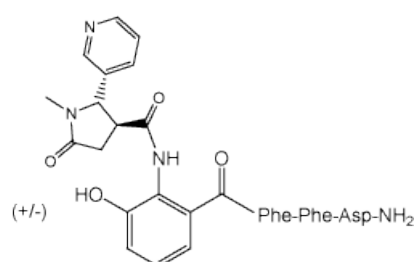
62



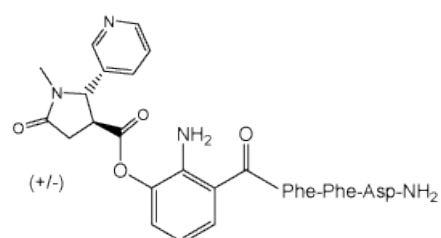
63



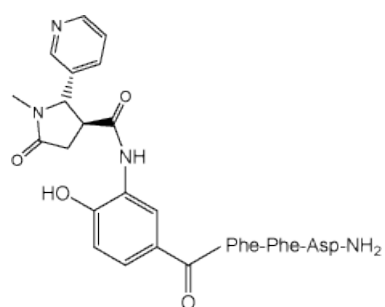
64



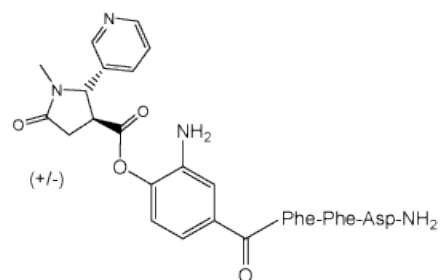
65



66



67



68

Bibliographie

- ¹ Amblard M., *Lettre des Sciences Chimiques*, Oct **2001**, 76, 10.
- ² Vollhardt, C.; Schore, N. E., *Traité de Chimie Organique*, De Boeck University, 2nd Edition, **1995**, 1023-1024.
- ³ Austgen, L.; Bowen, R. A.; Rouge, M., *Hypertexts for Biomedical Sciences*, Colorado State University, http://arbl.cvmb.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/pancreas/insulin_struct.html.
- ⁴ Ho, C., www.psc.edu/science/Ho/Ho.html, **1994**, Pittsburgh Supercomputing Center, USA.
- ⁵ Phizicky, E. M.; Fields, S., Protein-protein interactions: methods for detection and analysis, *Microbiological Reviews*, **1995**, 59, (1), 94-123.
- ⁶ Henry, C. M.; Structure-based drug design. Detailed information about ligand-protein interactions is speeding the drug discovery process, *C&EN, Science & Technology, Pharmaceuticals*, **2001**, 79, (23), 69-74.
- ⁷ MyWiseOwl.com, www.mywiseowl.com/articles/Selective_serotonin_reuptake_inhibitor
- ⁸ MyWiseOwl.com, www.mywiseowl.com/articles/Drug_design
- ⁹ Ajay; Walters, W. P.; Murcko, M. A., Can we learn to distinguish between “drug-like” and “nondrug-like” molecules?, *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 3314-3324.
- ¹⁰ Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1997**, 23, 3-25.
- ¹¹ Moriguchi, I.; Hirono, S.; Liu, Q.; Nakagome, Y.; Matsushita, Y., Simple method of calculating octanol/water partition coefficient, *Chem. Pharm. Bull.*, **1992**, 42, 976-978.
- ¹² Richardson, J. S.; Richardson, D. C., The *de novo* design of protein structures, *Trends in Biochem. Sci.*, **1989**, 14, (7), 304-309.
- ¹³ Marx, V., Watching peptides drugs grow up. Peptide therapeutics market grows in fits and starts for drug firms and contract manufacturers, *C&EN, Business*, **2005**, 83, (11), 17-24.
- ¹⁴ Mutter, M.; Vuilleumier, S., A chemical approach to protein design - template-assembled synthetic proteins (TASP), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1989**, 28, 535-554.
- ¹⁵ Gutte, B.; A synthetic 70-amino acid residue analog of ribonuclease S-protein with enzymic activity, *J. Biol. Chem.*, **1975**, 250, (3), 889-904.
- ¹⁶ Gutte, B., Study of Rnase A mechanism and folding by means of synthetic 63-residue analogs, *J. Biol. Chem.*, **1977**, 252, (2), 663-670.
- ¹⁷ Gutte, B.; Däumigen, M.; Wittschieber, E., Design, synthesis and characterization of a 34-residue polypeptide that interacts with nucleic acids, *Nature*, **1979**, 281, (5733), 650-656.

- ¹⁸ Moser, R.; Thomas, R. M.; Gutte, B., An artificial crystalline DDT-binding polypeptide, *FEBS Lett.*, **1983**, *157*, (2), 247-251.
- ¹⁹ Ghanta, J.; Shen, C.-L.; Kiessling, L. L.; Murphy, R. M., A strategy for designing inhibitors of β -amyloid toxicity, *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, (47), 29525-29528.
- ²⁰ Taylor, J. P.; Hardy, J.; Fishbeck, K. H., Toxic proteins in neurodegenerative disease, *Science*, **2002**, *296*, 1991-1995.
- ²¹ Soto, C., Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases, *Nat. Rev. Neurosci.*, **2003**, *4*, 49-60.
- ²² Liebman, S. W., Progress towards an ultimate proof of the prion hypothesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, *99*, 9098-9100.
- ²³ Mutter, M.; Chandravarkar, A.; Boyat, C.; Lopez, J.; Dos Santos, S.; Mandal, B.; Mimna, R.; Murat, K.; Patiny, L.; Saucède, L.; Tuchscherer, G., Switch-peptides In Statu Nascendi: Induction of Conformational Transitions Relevant to Degenerative Diseases, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2004**, *43*, 4172-4178.
- ²⁴ Mutter, M.; Gassmann, R.; Buttkus, U.; Altmann, K.-H., Switch-peptides: pH-induced α -helix to β -sheet transitions of bis-amphiphilic oligopeptides, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1991**, *30*, (11), 1514-1516.
- ²⁵ Kuisle, O.; Quiñoá, E.; Riguera, R., A general methodology for automated solid-phase synthesis of depsides and depsipeptides. Preparation of a valinomycin analogue, *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 8063-8075.
- ²⁶ Coltard, D. M., Peptide segment coupling by prior ligation and proximity-induced intramolecular acyl transfer, *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 3449-3491.
- ²⁷ Song, X.; Xu, C. R.; He, H. T.; Siahaan, T. J., Synthesis of a novel cyclic prodrug of RGD peptidomimetic to improve its cell membrane permeation, *Bioorg. Chem.*, **2002**, *30*, 285-301.
- ²⁸ Bundgaard, H., The double prodrug concept and its applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1989**, *3*, 39-65.
- ²⁹ Kadereit, D.; Waldmann, H., Enzymatic protecting group techniques, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3367-3396.
- ³⁰ Asano, Y.; Nakazawa, A.; Kato, Y.; Kondo, K., Discovery of a D-stereospecific aminopeptidase and its use as a catalyst in organic chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1989**, *28*, (4), 450-451.
- ³¹ Asano, Y.; Nakazawa, A.; Kato, Y.; Kondo, K., Properties of a novel D-stereospecific aminopeptidase from *Ochrobactrum anthropi*, *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, (24), 14233-14239.
- ³² Asano, Y.; Lübbehüsen, T. L., Enzymes acting on peptides containing D-amino acid, *J. Biosci. Bioeng.*, **2000**, *89*, (4), 295-306.
- ³³ Hamel, A. R.; Hubler, F.; Mutter, M., Water-soluble prodrugs of cyclosporine A with tailored conversion rates, *J. Peptide Res.*, **2005**, *65*, 364-374.

-
- ³⁴ Williams, F. M., Serum enzymes of drug metabolism, *Pharmac. Ther.*, **1987**, *34*, 99-109.
- ³⁵ Wilk, S.; Wilk, E. K., Pyroglutamyl peptidase II, a thyrotropin releasing hormone degrading enzyme: purification and specificity studies of the rabbit brain enzyme, *Neurochem. Int.*, **1989**, *15*, (1), 81-89.
- ³⁶ Doolittle, R. F.; Armentrout, R. W., Pyrrolidonyl peptidase. An enzyme for selective removal of pyrrolidonecarboxylic acid residues from polypeptides, *Biochem.*, **1968**, *7*, (2), 516-521.
- ³⁷ Mozdzanowski, J.; Bongers, J.; Anumula, K., High-yield deblocking of amino termini of recombinant immunoglobulins with pyroglutamate aminopeptidase, *Anal. Biochem.*, **1998**, *260*, 183-187.
- ³⁸ Chenault, H. K.; Dahmer, J.; Whitesides, G. M., Kinetic resolution of unnatural and rarely occurring amino acids: enantioselective hydrolysis of *N*-acyl amino acids catalyzed by acylase I, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 6354-6364.
- ³⁹ Liljeblad, A.; Lindborg, J.; Kanerva, L. T., Acylase I in the alcoholysis of α -substituted dicarboxylic acid esters and derivatives: enantio- and regioselectivity, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**, *11*, 3957-3966.
- ⁴⁰ Youshko, M. I.; van Langen, L. M.; Sheldon, R. A.; Švedas, V. K., Application of aminoacylase I to the enantioselective resolution of α -amino acid esters and amides, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2004**, *15*, 1933-1936.
- ⁴¹ Waldmann, H.; Sebastian, D., Enzymatic protecting group techniques, *Chem. Rev.*, **1994**, *94*, 911-937.
- ⁴² Davis, B. G.; Boyer, V., Biocatalysis and enzymes in organic synthesis, *Nat. Prod. Rep.*, **2001**, *18*, 618-640.
- ⁴³ Fischer, G.; Heins, J.; Barth, A., The conformation around the peptide bond between the P₁- and P₂-positions is important for catalytic activity of some proline-specific proteases, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1983**, *742*, 452-462.
- ⁴⁴ Yaron, A.; Naider, F., Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **1993**, *28*, (1), 31-81.
- ⁴⁵ Tella, P., Synthesis, characterization and conformational studies of switch-peptides, Diploma work, Prof. M. Mutter, EPFL, CH-Lausanne, **2005**.
- ⁴⁶ Dos Santos, S., Switch-peptides: controlling biological function and self-assembly of amyloid β -derived peptides using enzymes-triggered acyl migrations, Thesis, Prof. M. Mutter, EPFL, CH-Lausanne, **2005**.
- ⁴⁷ Dos Santos, S.; Chandravarkar, A.; Mandal, B.; Mimna, R.; Murat, K.; Saucède, L.; Tella, P.; Tuchscherer, G.; Mutter, M., Switch-peptides: controlling self-assembly of amyloid β -derived peptides *in vitro* by consecutive triggering of acyl migrations, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 11888-11889.

-
- ⁴⁸ Bosques, C. J.; Imperiali, B., Photolytic control of peptide self-assembly, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 7530-7531.
- ⁴⁹ Patchornik, A.; Amit, B.; Woodward, R. B., Photosensitive protecting groups, *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, *92*, 6333-6335.
- ⁵⁰ Mimna, R., Switch-peptides: in situ nucleation of conformational transitions relevant to protein misfolding diseases, Thesis, Prof. M. Mutter, EPFL, CH-Lausanne, **2005**.
- ⁵¹ Yang, X.; Wang, m.; Fitzgerald, M. C., Analysis of protein folding and function using backbone modified proteins, *Bioorg. Chem.*, **2004**, *32*, 438-449.
- ⁵² Arad, O.; Goodman, M., Depsipeptide analogues of elastin repeating sequences: synthesis, *Biopolymers*, **1990**, *29*, 1633-1649.
- ⁵³ Silinski, P.; Fitzgerald, M. C., Comparative analysis of two different amide-to-ester bond mutations in the β -sheet of 4-oxalocrotonate tautomerase, *Biochemistry*, **2003**, *42*, 6620-6630.
- ⁵⁴ Ingwall, R. T.; Goodman, M., Polydepsipeptides. III. Theoretical conformational analysis of randomly coiling and ordered depsipeptide chains, *Macromolecules*, **1974**, *7*, (5), 598-605.
- ⁵⁵ Chapman, E.; Thorson, J. S.; Schultz, P. G., Mutational analysis of backbone hydrogen bonds in staphylococcal nuclease, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 7151-7152.
- ⁵⁶ Koh, J. T.; Cornish, V. W.; Schultz, P. G., *An experimental approach to evaluating the role of backbone interactions in proteins using unnatural amino acid mutagenesis*, *Biochemistry*, **1997**, *36*, 11314-11322.
- ⁵⁷ Arnett, E. M.; Mitchell, E. J.; Murty, T. S. S. R., "Basicity". A comparison of hydrogen bonding and proton transfer to some Lewis bases, *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, *96*, (12), 3875-3891.
- ⁵⁸ Karle, I. L.; Das, C.; Balaram, P., Effects of hydrogen-bond deletion on peptide helices: structural characterization of depsipeptides containing lactic acid, *Biopolymers*, **2001**, *59*, 276-289.
- ⁵⁹ Lowe, T. L.; Strzelec, A.; Kiessling, L. L.; Murphy, R. M., Structure-function relationship for inhibitors of β -amyloid toxicity containing the recognition sequence KLVFF, *Biochemistry*, **2001**, *40*, 7882-7889.
- ⁶⁰ Zimm, B. H.; Bragg, J. K., Theory of the phase transition between helix and random coil in polypeptide chains, *J. Chem. Phys.*, **1959**, *31*, (2), 526-535.
- ⁶¹ Schneider, J. P.; Kelly, J. W., Templates that induce α -helical, β -sheet, and loop conformations, *Chem. Rev.*, **1995**, *95*, 2169-2187.
- ⁶² Austin, R. E.; Maplestone, R. A.; Sefler, A. M.; Liu, K.; Hruzewicz, W. N.; Liu, C. W.; Cho, H. S.; Wemmer, D. E.; Bartlett, P. A., A template for stabilization of a peptide α -helix: synthesis and evaluation of conformational effects by circular dichroism and NMR, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 6461-6472.

-
- ⁶³ Kelso, M. J.; Beyer, R. L.; Hoang, H. N.; Lakdawala, A. S.; Snyder, J. P.; Oliver, W. V.; Robertson, T. A.; Appleton, T. G.; Fairlie, D. P., α -turn mimetics: short peptide α -helices composed of cyclic metallopeptide modules, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 4828-4842.
- ⁶⁴ Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V., Stereochemistry of polypeptide chain configurations, *J. Biol. Chem.*, **1963**, *7*, 95-99.
- ⁶⁵ Creighton, T. E., *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W. H. Freeman and Company, New York, **1984**, 173.
- ⁶⁶ Dunitz, J. D., Pauling's left-handed α -helix, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, (22), 4167-4173.
- ⁶⁷ Kendrew, J. C.; Dickerson, R. E.; Strandberg, B. E.; Hart, R. G.; Davies, D. R.; Phillips, D. C.; Shore, V. C., Structure of myoglobin, a three dimensional Fourier synthesis at 2Å resolution, *Nature*, **1960**, *185*, 422-427.
- ⁶⁸ Branden, C.; Tooze, J., *Introduction to Protein Structure, Second Edition*, **1999**, Garland Publishing.
- ⁶⁹ Griffiths *et al.*, www.mun.ca/biology/scarr/Gr09-05.htm, **2000**.
- ⁷⁰ www.web-books.com/MoBio/Free/Ch2C4.htm.
- ⁷¹ www.chem.ucsb.edu/~molvisual/prot_struct.html.
- ⁷² Oregon State University,
<http://oregonstate.edu/instruction/bb450/lecturenoteskevin/proteinstructureoutline.html>.
- ⁷³ College of Saint Benedict, Saint John's University,
employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/protstructure/antiparallelpleatedsheet.jpg.
- ⁷⁴ Smith, J. A.; Pease, L. G., Reverse turns in peptides and proteins, *Critical Reviews in Biochemistry*, **1977**, *115*, 135-175,
- ⁷⁵ Venkatachalam, C. M., Stereochemical criteria for peptides and proteins. V. Conformation of a system of three linked peptide units, *Biopolymers*, **1968**, *6*, 1425-1436.
- ⁷⁶ Chou, P. Y.; Fasman, G. D., β -turns in proteins, *J. Mol. Biol.*, **1977**, *115*, 135-175.
- ⁷⁷ Crawford, J. L.; Lipscomb, W. N.; Schellman, C. G., The reverse turn as a polypeptide conformation in globular proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1973**, *70*, (2), 538-542.
- ⁷⁸ Creighton, T. E., *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W. H. Freeman and Company, New York, **1984**, 270-271.
- ⁷⁹ Creighton, T. E., *Proteins: Structures and Molecular Principles*, 2nd Edition, W. H. Freeman and Company, New York, **1984**, 190-191.
- ⁸⁰ Creighton, T. E., *Proteins: Structures and Molecular Principles*, 2nd Edition, W. H. Freeman and Company, New York, **1984**, 191-192.
- ⁸¹ Creighton, T. E., *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W. H. Freeman and Company, New York, **1984**, 271.
- ⁸² Adler, A. J.; Greenfield, N. J.; Fasman, G. D., Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides, *Methods in Enzymology*, **1973**, *27*, 675-735.

-
- ⁸³ Greenfield, N. J. and Fasman, G. D., Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation, *Biochemistry*, **1969**, *8*, (10), 4108-4116.
- ⁸⁴ Greenfield, N.; Davidson, B.; Fasman, G. D., The use of computed optical rotatory dispersion curves for the evaluation of protein conformation, *Biochemistry*, **1967**, *6*, (6), 1630-1637.
- ⁸⁵ Susi, H., Infrared spectroscopy. Conformation, *Methods Enzymol.*, **1972**, *26*, 455-472.
- ⁸⁶ McConnan, J.; Titherley, A. W., CXXXII. – Labile isomerism among acyl derivatives of salicylamide, *J. Chem. Soc. Trans.*, **1906**, *89*, 1318-1339.
- ⁸⁷ Auwers, K.; Eisenlohr, F., Intramolecular processes in acylated compounds, *Ann.*, **1910**, *369*, 209-245.
- ⁸⁸ Raiford, L. C., Molecular rearrangement in the acylation of certain aminophenols, *J. Am. Chem. Soc.*, **1919**, *41*, 2068-2080.
- ⁸⁹ Raiford, L. C.; Couture, J. R., The role of weight of acyl in the migration from nitrogen to oxygen. II., *J. Am. Chem. Soc.*, **1924**, *46*, 2305-2318.
- ⁹⁰ Raiford, L. C., Lankelma, H. P., The effect of the acidity of acyl upon the migration from nitrogen to oxygen in ortho-aminophenols, *J. Am. Chem. Soc.*, **1925**, *47*, 1111-1123.
- ⁹¹ Bell, F., CCLVII.- The migration of acyl groups in o-aminophenols, *J. Chem. Soc.*, **1930**, 1981-1987.
- ⁹² Bell, F., CCCX.- The migration of acyl groups in o-aminophenols. Part II., *J. Chem. Soc.*, **1931**, 2962-2967.
- ⁹³ De W. Anderson, G.; Bell, F., The migration of acyl groups in o-aminophenols. Part III., *J. Chem. Soc.*, **1949**, 2668-2671.
- ⁹⁴ Bergmann, M., Intramolecular transpositions of organic compounds, *Festschrift Kaiser Wilhelm Ges. Forderung Wiss. Zehnjährigen Jubiläum*, **1921**, 27-33.
- ⁹⁵ Desnuelle, P.; Casal, A., Sur la moindre résistance à l'hydrolyse acide des liaisons peptidiques situées à côté d'une fonction hydroxyle, *Biochim. Biophys. Acta*, **1948**, *2*, 64-75.
- ⁹⁶ Sakakibara, S.; Shin, K. H.; Hess, G. P., An approach to the specific cleavage of peptide bonds. I. The acyl migration in dipeptides containing hydroxyamino acids in anhydrous hydrogen fluoride, *J. Am. Chem. Soc.*, **1962**, *84*, 4921-4928.
- ⁹⁷ Wieland, T.; Bokelmann, E.; Bauer, L.; Lang, H. U.; Lau, H., Bildung von S-haltigen Peptiden durch intramolekulare Wanderung von Aminoacylresten, *Liebigs Ann. Chem.*, **1953**, *583*, 129-149.
- ⁹⁸ Calne, R. Y.; Thiru, S.; McMaster, P.; Craddock, G. N., Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors, *The Lancet*, **1978**, *312*, (8104), 1323-1327.
- ⁹⁹ Chapman, I.; Mazzoni, L., Mechanisms of inhibition by cyclosporin A on pulmonary leukocyte accumulation, *TiPS*, **1994**, *15*, 99-101.
- ¹⁰⁰ Oliyai, R.; Stella, V. J., Kinetics and mechanism of isomerization of cyclosporin A, *Pharm. Res.*, **1992**, *9*, (5), 617-622.

- ¹⁰¹ Van Tamelen, E. E., The mechanism of nitrogen-oxygen acyl migrations, *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, *73*, 5773-5774.
- ¹⁰² Josefsson, L., Mechanism of O,N-acyl shift in O-acetyl-DL-serine, *Biochim. Biophys. Acta*, **1963**, *74*, 774-775.
- ¹⁰³ Iwai, K.; Ando, T., N→O acyl rearrangement, *Methods Enzymol.*, **1967**, *11*, 263-282.
- ¹⁰⁴ Kemp, D. S.; Kerkman, D. J.; Leung, S.-L.; Hanson, G., Intramolecular O,N-acyl transfer via cyclic intermediates of nine and twelve members. Models for extensions of the amine capture strategy for peptide synthesis, *J. Org. Chem.*, **1981**, *46*, 490-498.
- ¹⁰⁵ Lew, B. M.; Mills, K. V.; Paulus, H., Characteristics of protein splicing in *trans* mediated by a semisynthetic split intein, *Peptide Science*, **1999**, *51*, (5), 355-362.
- ¹⁰⁶ Shao, Y.; Paulus, H., Protein splicing: estimation of the rate of O-N and S-N acyl rearrangements, the last step of the splicing process, *J. Peptide Res.*, **1997**, *50*, 193-198.
- ¹⁰⁷ Vollhardt, C.; Schore, N. E., *Traité de Chimie Organique*, De Boeck University, 2nd edition, **1995**, 1052-1059.
- ¹⁰⁸ Coltart, D. M., Peptide segment coupling by prior ligation and proximity-induced intramolecular acyl transfer, *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 3449-3491.
- ¹⁰⁹ Kane, P. M.; Yamashiro, C. T.; Wolczyk, D. F.; Neff, N.; Goebel, M.; Stevens, T. H., Protein splicing converts the yeast TFP1 gene product to the 69-kD subunit of the vacuolar H⁺-adenosine triphosphate, *Science*, **1990**, *250*, 651-657.
- ¹¹⁰ Hirata, R.; Ohsumi, Y.; Nakano, A.; Kawasaki, K.; Anraku, Y., Molecular structure of a gene, *VMA1*, encoding the catalytic subunit of H⁺-translocating adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 6726-6533.
- ¹¹¹ Noren, C. J.; Wang, J.; Perler, F. B., Dissecting the chemistry of protein splicing and its application, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*, 450-466.
- ¹¹² Fernández, R.; Rodríguez, J.; Quiñoá, E.; Riguera, R.; Muñoz, L.; Fernández-Suárez, M.; Debitus, C., Onchidin B: a new cyclodepsipeptide from the mollusc *Onchidium* sp., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 11635-11643.
- ¹¹³ Izatt, R. M.; Bradshaw, J. S.; Nielsen, S. A.; Lamb, J. D.; Christensen, J. J., Thermodynamic and kinetic data for cation-macrocycle interaction, *Chem. Rev.*, **1985**, *85*, 271-339.
- ¹¹⁴ Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E., Convergent solid-phase peptide synthesis, *Tetrahedron*, **1993**, *49*, (48), 11065-11133.
- ¹¹⁵ Borgia, J. A.; Fields, G. B., Chemical synthesis of proteins, *Trends in Biotechnology (TIBTECH)*, **2000**, *18*, 243-251.
- ¹¹⁶ Albericio, F., Developments in peptide and amine synthesis, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2004**, *8*, 211-221.

-
- ¹¹⁷ Kemp, D. S., The amine capture strategy for peptide bond formations – an outline of progress, *Biopolymers*, **1981**, 20, (9), 1793-1804.
- ¹¹⁸ Kemp, D. S.; Leung, S.-L.; Kerkman, D. J., Models that demonstrate peptide bond formation by prior thiol capture. I. Capture by disulfide formation, *Tet. Lett.*, **1981**, 22, 181-184.
- ¹¹⁹ Kemp, D. S., Models that demonstrate peptide bond formation by prior thiol capture. II. Capture by organomercury derivatives, *Tet. Lett.*, **1981**, 22, 185-189.
- ¹²⁰ Fotouhi, N.; Galakatos, N. G.; Kemp, D. S., Peptide synthesis by prior thiol capture. 6. Rates of the disulfide bond forming capture reaction and demonstration of the overall strategy by synthesis of the C-terminal 29-peptide sequence of BPTI, *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 2803-2817.
- ¹²¹ Kemp, D. S.; Carey, R. I., Resolution of the histidine problem for thiol capture. Synthesis of a 39-peptide, *Tet. Lett.*, **1991**, 32, (25), 2845-2848.
- ¹²² Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. H., Synthesis of proteins by native chemical ligation, *Science*, **1994**, 266, 776-779.
- ¹²³ Dawson, P. E.; Chrchill, M. J.; Ghadiri, M. R.; Kent, S. B. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, (19), 4325-4329.
- ¹²⁴ Muir, T. W.; Dawson, P. E.; Kent, S. B. H., Protein synthesis by chemical ligation of unprotected peptides in aqueous solution, *Methods Enz.*, **1997**, 289, (13), 266-298.
- ¹²⁵ Tam, J. P.; Lu, Y.-A.; Liu, C.-F.; Shao, J., Peptide synthesis using unprotected peptides through orthogonal coupling methods, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, 92, 12485-12489.
- ¹²⁶ Lu, W.; Qasim, M. A.; Kent, S. B. H., Comparative total syntheses of turkey ovomucoid third domain by both stepwise solid phase peptide synthesis and native chemical ligation, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 8518-8523.
- ¹²⁷ Canne, L. E.; Bark, S. J.; Kent, S. B. H., Extending the applicability of native chemical ligation, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 5891-5896.
- ¹²⁸ Tulla-Puche, J.; Barany, G., On-resin native chemical ligation for cyclic peptide synthesis, *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 4101-4107.
- ¹²⁹ Huse, M.; Holford, M. N.; Kuriyan, J.; Muir, T. W., Semi-synthesis of hyperphosphorylated type I TGF β receptor: addressing the mechanism of kinase activation, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 8337-8338.
- ¹³⁰ Tam, J. P.; Xu, J.; Eom, K. D., Methods and strategies of peptide ligation, *Biopolymers*, **2001**, 60, 194-205.
- ¹³¹ Botti, P.; Pallin, T. D.; Tam, J. P., Cyclic peptides from linear unprotected peptide precursors through thiazolidine formation, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 10018-10024.
- ¹³² Liu, C.-F.; Tam, J. P., Chemical ligation approach to form a peptide bond between unprotected peptide segments. Concept and model study, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, (10), 4149-4153.

-
- ¹³³ Liu, C.-F.; Tam, J. P., Peptide segment ligation strategy without use of protecting groups, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 6584-6588.
- ¹³⁴ Liu, C.-H.; Rao, C.; Tam, J. P., Orthogonal ligation of unprotected peptide segments through pseudo-proline formation for the synthesis of HIV-1 protease analogs, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 307-312.
- ¹³⁵ Tam, J. P.; Miao, Z., Stereospecific pseudoproline ligation of N-terminal serine, threonine, or cysteine-containing unprotected peptides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 9013-9022.
- ¹³⁶ Nilsson, B. L.; Hondal, R. J.; Soellner, M. B.; Raines, R. T., Protein assembly by orthogonal chemical ligation methods, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 5268-5269.
- ¹³⁷ Eom, K. D.; Miao, Z.; Yang, J.-L.; Tam, J. P., Tandem ligation of multipartite peptides with cell-permeable activity, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 73-82.
- ¹³⁸ Wallace, C. J. A., Peptide ligation and semisynthesis, *Curr. Opin. Biotechnology*, **1995**, *6*, 403-410.
- ¹³⁹ Chong, S.; Mersha, F. B.; Comb, D. G.; Scott, M. E.; Landry, D.; Vence, L. M.; Perler, F. B.; Benner, J.; Kucera, R. B.; Hirvonen, C. A.; Pelletier, J. J.; Paulus, H.; Xu, M.-Q., Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavage affinity tag derived from a protein splicing element, *Gene*, **1997**, *192*, (2), 271-281.
- ¹⁴⁰ Chong, S.; Montello, G. E.; Zhang, A.; Cantor, E. J.; Liao, W.; Xu, M.-Q.; Benner, J., Utilizing the C-terminal cleavage activity of a protein splicing element to purify recombinant proteins in a single chromatographic step, *Nucleic Acids Res.*, **1998**, *26*, (22), 5109-5115.
- ¹⁴¹ Muir, T. W.; Sondhi, D.; Cole, P. A., Expressed protein ligation: a general method for protein engineering, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, (12), 6705-6710.
- ¹⁴² David, R.; Richter, M. P. O.; Beck-Sickinger, A. G., Expressed protein ligation – Methods and applications, *Eur. J. Biochem.*, **2004**, 663-677.
- ¹⁴³ Arnold, U.; Hinderaker, H.; Nilsson, B. L.; Huck, B. R.; Gellman, S. H.; Raines, R. T., Protein prothesis: a semisynthetic enzyme with a β -peptide reverse turn, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 8522-8523.
- ¹⁴⁴ Ayers, B.; Blaschke, U. K.; Camarero, J. A.; Cotton, G. J.; Holford, M.; Muir, T. W., Introduction of unnatural amino acids into proteins using expressed protein ligation, *Peptide Science*, **1999**, *51*, (5), 343-354.
- ¹⁴⁵ Shingledecker, K.; Jiang, S.-Q.; Paulus, H., Molecular dissection of the *Mycobacterium tuberculosis* RecA intein: design of a minimal intein and of a *trans*-splicing system involving two intein fragments, *Gene*, **1998**, *207*, (2), 187-195.
- ¹⁴⁶ Lew, B. M.; Mills, K. V.; Paulus, H., Characteristics of protein splicing in *trans* mediated by a semisynthetic split intein, *Biopolymers*, **1999**, *51*, 355-362.
- ¹⁴⁷ Perler, F. B., A natural example of protein *trans*-splicing, *Trends Biochem. Sci.*, **1999**, *24*, (6), 209-211.

-
- ¹⁴⁸ Scott, C. P.; Abel-Santos, E.; Wall, M.; Wahnon, D. C.; Benkovic, S. J., Production of cyclic peptides and proteins *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Soc. USA*, **1999**, *96*, (24), 13638-13643.
- ¹⁴⁹ Yamazaki, T.; Otomo, T.; Oda, N.; Kyogoku, Y.; Uegaki, K.; Ito, N.; Ishimo, Y.; Nakamura, H., Segmental isotope labeling for protein NMR using peptide splicing, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, (22), 5591-5592.
- ¹⁵⁰ Ozawa, T.; Nogami, S.; Sato, M.; Ohya, Y.; Umezawa, Y., A fluorescent indicator for detecting protein-protein interactions *in vivo* based in protein splicing, *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, (21), 5151-5157.
- ¹⁵¹ Giriat, I.; Muir, T. W., Protein semi-synthesis in living cells, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 7180-7181.
- ¹⁵² Mootz, H. D.; Muir, T. W., Protein splicing triggered by a small molecule, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 9044-9045.
- ¹⁵³ Greene, T. W.; Wuts, P. G. M., *Protective groups in organic synthesis*, John Wiley and Sons, Inc., 2nd Edition, **1991**, 111-114.
- ¹⁵⁴ Ho, T.-L., Protection of alcohols and amines by 4-methyl-4-nitropentanoylation, *Synth. Comm.*, **1980**, *10*, (6), 469-472.
- ¹⁵⁵ Kusumoto, S.; Sakai, K.; Shiba, T., 4-azidobutyryl group for temporary protection of hydroxyl functions, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1986**, *59*, (4), 1296-1298.
- ¹⁵⁶ Xu, J.; Guo, Z., (2-azidomethyl)phenylacetyl as a new, reductively cleavable protecting group for hydroxyl groups in carbohydrate synthesis, *Carbohydrate Res.*, **2002**, *337*, 87-91.
- ¹⁵⁷ Hurley, T. R.; Colson, C. E.; Hicks, G.; Ryan, M. J., Orally active water-soluble *N,O*-acyl transfer products of a β,γ -bishydroxyl amide containing rennin inhibitor, *J. Med. Chem.*, **1993**, *36*, 1496-1498.
- ¹⁵⁸ Oliyai, R.; Stella, V. J., Structural factors affecting the kinetics of *O,N*-acyl transfer in potential *O*-peptide prodrugs, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1995**, *5*, (22), 2735-2740.
- ¹⁵⁹ Matsumoto, H.; Sohma, Y.; Kimura, T.; Hayashi, Y.; Kiso, Y., Controlled drug release: new water-soluble prodrugs of an HIV protease inhibitor, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 605-609.
- ¹⁶⁰ Hamada, Y.; Ohtake, J.; Sohma, Y.; Kimura, T.; Hayashi, Y.; Kiso, Y., New water-soluble prodrugs of HIV protease inhibitors based on *O*→*N* intramolecular acyl migration, *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*, 4155-4167.
- ¹⁶¹ Gopin, A.; Pessah, N.; Shamis, M.; Rader, C.; Shabat, D., A chemical adaptor system designed to link a tumor-targeting device with a prodrug and an enzymatic trigger, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, (3), 327-332.
- ¹⁶² Skwarczynski, M.; Sohma, Y.; Kimura, M.; Hayashi, Y.; Kimura, T.; Kiso, Y., *O-N* intramolecular acyl migration strategy in water-soluble prodrugs of taxoids, *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, *13*, 4441-4444.

- ¹⁶³ Hayashi, Y.; Skwarczynski, M.; Hamada, Y.; Sohma, Y.; Kimura, T.; Kiso, Y., A novel approach of water-solubles paclitaxel prodrug with no auxiliary and no byproduct: design and synthesis of isotaxel, *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 3782-3784.
- ¹⁶⁴ Kazmierski, W. M.; Bevans, P.; Furfine, E.; Spaltenstein, A.; Yang, H., Novel prodrug approach to amprenavir-based HIV-1 protease inhibitors via O→N acyloxy migration of P1 moiety, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 2523-2526.
- ¹⁶⁵ Skwarczynski, M.; Sohma, Y.; Noguchi, M.; Kimura, M.; Hayashi, Y.; Hamada, Y.; Kimura, T.; Kiso, Y., No auxiliary, no byproduct strategy for water-soluble prodrugs of taxoids: scope and limitation of O-N intramolecular acyl and acyloxy migration reactions, *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 2655-2666.
- ¹⁶⁶ Quibell, M.; Turnell, W. G.; Johnson, T., Preparation and purification of β -amyloid (1-43) via soluble, amide backbone protected intermediates, *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 1745-1750.
- ¹⁶⁷ Quibell, M.; Owen, D.; Packman, L. C.; Johnson, T., Suppression of piperidine-mediated side product formation for Asp(OBu¹)-containing peptides by the use of N-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl) (Hmb) backbone amide protection, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **1994**, 2343-2344.
- ¹⁶⁸ Quibell, M.; Packman, L. C.; Johnson, T., Synthesis of the 3-repeat region of human tau-2by solid phase assembly of backbone amide-protected segments, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 11656-11668.
- ¹⁶⁹ Offer, J.; Quibell, M.; Johnson, T., On-resin solid-phase synthesis of asparagines N-linked glycopeptides: use of N-(2-acetoxy-4-methoxybenzyl) (Ac ϵ Hmb) aspartyl amide-bond protected to prevent unwanted aspartimide formation, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, **1996**, 175-182.
- ¹⁷⁰ Johnson, T.; Quibell, M., The N-(2-hydroxybenzyl) protecting group for amide bond protection in solid phase peptide synthesis, *Tet. Lett.*, **1994**, *35*, (3), 463-466.
- ¹⁷¹ Miranda, L. P.; Meuterms, W. D. F.; Smythe, M. L.; Alewood, P. F., An activated O→N acyl transfer auxiliary: efficient amide-backbone substitution of hindered "difficult" peptides, *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 5460-5468.
- ¹⁷² Sohma, Y.; Sasaki, M.; Hayashi, Y.; Kimura, T.; Kiso, Y., Novel and efficient synthesis of difficult sequence-containing peptides through O-N intramolecular acyl migration reaction of O-acyl isopeptides, *Chem. Comm.*, **2004**, 124-125.
- ¹⁷³ Sohma, Y.; Hayashi, Y.; Skwarczynski, M.; Hamada, Y.; Sasaki, M.; Kimura, T.; Kiso, Y., O-N intramolecular acyl migration reaction in the development of prodrugs and the synthesis of difficult sequence-containing bioactive peptides, *Biopolymers*, **2004**, *76*, 344-356.
- ¹⁷⁴ Sohma, Y.; Sasaki, M.; Hayashi, Y.; Kimura, T.; Kiso, Y., Design and synthesis of a novel water-solubles A β 1-42 isopeptide: an efficient strategy for the preparation of Alzheimer's disease-related peptide, A β 1-42, via O-N intramolecular acyl migration reaction, *Tet. Lett.*, **2004**, *45*, 5965-5968.
- ¹⁷⁵ Sohma, Y.; Hayashi, Y.; Kimura, M.; Chiyomori, Y.; Taniguchi, A.; Sasaki, M.; Kimura, T.; Kiso, Y., The 'O-acyl isopeptide method' for the synthesis of difficult sequence-containing peptides:

application to the synthesis of Alzheimer's disease-related amyloid β peptide (A β) 1-42, *J. Pept. Sci.*, **2005**, *11*, 441-451.

¹⁷⁶ Donner, C., Morphonix, www.morphonix.com/.../specimens/hippocampus.html.

¹⁷⁷ WebMD Corporation, **2001**,
<http://www.ghi.com/yourhealth/encyclopedia/articles/Alzheimer's%20Disease/Alzheimer.jpg>.

¹⁷⁸ Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Munich, <http://psywifo.klinikum.uni-muenchen.de/klinik/historie/images/alzheimer.jpg>.

¹⁷⁹ Alzheimer Montpellier, www.alzheimer-montpellier.org.

¹⁸⁰ Association Alzheimer Suisse, www.alz.ch.

¹⁸¹ Delacourte, A.; Group "Cerebral Aging and Neurodegeneration", Inserm U.422, Lille, France; www.alzheimer-adna.com/index.htm.

¹⁸² Kim, J. H.; Bannykh, S.; Ciesielski, T., Yale University School of Medicine, www.yalepath.org/DEPT/diagunits/neuro.htm.

¹⁸³ Diagnostic Center for Alzheimer's Disease, <http://www.alzheimer-montpellier.org/site.html>.

¹⁸⁴ Glenner, G. G.; Wong, C. W., Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1984**, *122*, (3), 1131-1135.

¹⁸⁵ Brion, J.-P.; Flament-Durand, J.; Dustin, P., Alzheimer's disease and tau proteins, *The Lancet*, **1986**, *328*, (8515), 1098.

¹⁸⁶ Quiquempois, J.-M., **1999**, www.alzheimer-montpellier.org/site.html.

¹⁸⁷ Soto, C., Plaque busters: strategies to inhibit amyloid formation in Alzheimer's disease, *Molecular Medicine Today*, **1999**, *5*, 343-350.

¹⁸⁸ Mayo Foundation for Medical Education and Research, **2005**,
<http://mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/mcj/Amyloid.cfm>

¹⁸⁹ Serpell, L. C.; Blake, C. C. F.; Fraser, P. E., Molecular Structure of a fibrillar Alzheimer's A β fragment, *Biochem.*, **2000**, *39*, 13269-13275.

¹⁹⁰ Odor identification test, strong predictor of Alzheimer's disease, *Medicinal Study News*, Monday, 13 December **2004**.

¹⁹¹ Sommer, B., Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: ten years on, *Current Opinion in Pharmacology*, **2002**, *2*, (1), 92.

¹⁹² Sigursson, E. M.; Wisniewski, T.; Frangione, B., A safer vaccine for Alzheimer's disease?, *Neurobiology of Aging*, **2002**, *23*, (6), 1001-1008.

¹⁹³ Nicolau, C.; Greferath, R.; Baladan, T. S.; Lazare, J. E.; Hopkins, R. J., A liposome-based therapeutic vaccine against β -amyloid plaques on the pancreas of transgenic NORBA mice, *PNAS*, **2002**, *99*, (4), 2332-2337.

-
- ¹⁹⁴ Morgan, D.; Diamond, D. M.; Gottschall, P. E.; Ugen, K. E.; Dickey, C.; Hardy, J.; Duff, K.; Jantzen, P.; DiCario, G.; Wilcock, D.; Connor, K.; Hatcher, J.; Hope, C.; Gordon, M.; Arendash, G., A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease, *Nature*, **2000**, *408*, (6815), 982-985.
- ¹⁹⁵ Bard, F.; Cannon, C.; Barbour, R.; Burke, R.-L.; Games, D.; Grajeda, H.; Guido, T.; Hu, K.; Huang, J.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Kholodenko, D.; Lee, M.; Lieberburg, I.; Motter, R.; Nguyen, M.; Soriano, F.; Vasquez, N.; Weiss, K.; Welch, B.; Seubert, P.; Schenk, D.; Yednock, T., Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease, *Nature Medicine*, **2000**, *6*, (8), 916-919.
- ¹⁹⁶ Rowland, R., *CNN Medical Unit*, **2001**, "Alzheimer's vaccine passes key test".
- ¹⁹⁷ Sunde, M.; Serpell, L. C.; Bartlam, m.; Fraser, P. E.; Pepys, M. B.; Blake, C. C. F., Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction, *J. Mol. Biol.*, **1997**, *273*, (3), 729-739.
- ¹⁹⁸ Kyle, R. A., Amyloidosis: a convoluted story, *British J. Heamatology*, **2001**, *114*, 529-538.
- ¹⁹⁹ Steensma, D. P., "Congo" red: out of Africa?, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **2001**, *125*, (2), 250-252.
- ²⁰⁰ Böttiger, P., *Deutsches Reichs Patent [German Imperial Patent]*, 28753, **1884**, August 20.
- ²⁰¹ Griesbach, H., Weitere untersuchungen über azofarbstoffe behufs tinction menschlicher und thierischer gewebe, *Zeitschrift für Wissenschaftliche Mikroskopie und für Mikroskopische Technik*, **1886**, *3*, 358-385.
- ²⁰² Schultz, H., Über das Congorot als reagens auf freie säure, *Centralblatt für die Medizinischen Wissenschaften*, **1886**, 29-30.
- ²⁰³ Bennhold, H., Eine spezifische amyloidfärbung mit Kongorot, *Münchener Medizinische Wochenschrift*, **1922**, *69*, 1537-1538.
- ²⁰⁴ Divry, P.; Florkin, M., *CR Soc. Biol. (Paris)*, **1927**, *97*, 1808-1810.
- ²⁰⁵ Sipe, J. D.; Cohen, A. S., Review: history of the amyloid fibril, *J. Struct. Biol.*, **2000**, *130*, (2-3), 88-98.
- ²⁰⁶ Missmahl, H. P.; Hartwig, M., *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.*, **1952**, *324*, 489-508.
- ²⁰⁷ Mad Cow Disease; <http://www.mad-cow.org/~tom/Congo.html#Congo>
- ²⁰⁸ Washington University School of Medicine; <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/pathol/amyloidp.htm>
- ²⁰⁹ Jin, L.-W., Claborn, K. A., Kurimoto, M.; Geday, M. A.; Maezawa, I.; Sohraby, F.; Estrada, -M.; Kaminsky, W.; Kahr, B., Imaging linear birefringence and dichroism in cerebral amyloid pathologies, *PNAS*, **2003**, *100*, (26), 15294-15298.
- ²¹⁰ Klunk, W. E.; Pettegrew J. W.; Abraham, D. J., Two simple methods for quantifying low-affinity dye-substrate binding, *J. Histochem. Cytochem.*, **1989**, *37*, (8), 1293-1297.

-
- ²¹¹ Klunk, W. E.; Jacob, R. F.; Mason, R. P., Quantifying amyloid beta-peptide (A β) aggregation using the Congo red-A β (CR-a β) spectrophotometric assay, *Anal. Biochem.*, **1999**, *266*, 66-76.
- ²¹² Klunk, W. E.; Jacob, R. F., Mason, R. P., Quantifying amyloid by congo red spectral shift assay, *Methods in Enzymology*, Academic Press, **1999**, *309*, (19), 285-305.
- ²¹³ LeVine III, H., Quantification of β -sheet amyloid fibril structures with thioflavin T, *Methods in Enzymology*, **1999**, *309*, 274-284.
- ²¹⁴ Grateau, G.; Verine, J.; Delpuch, M.; Ries, M., Les amyloses, un modèle de maladie du repliement des protéines, *Medecine Sciences*, **2005**, *21*, 627-633.
- ²¹⁵ Nielsen E. H.; Nybo, M.; Svehag, S.-E., Electron microscopy of prefibrillar structures and amyloid fibrils, *Methods in Enzymology*, Academic Press, **1999**, *309*, (31), 491-496.
- ²¹⁶ Brenner, S.; Horne, R. W., Negative staining method for high-resolution electron microscopy of viruses, *Biochim. Biophys Acta*, **1959**, *34*, 103-110.
- ²¹⁷ Shirahama, T.; Cohen, A. S., High-resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril, *J. Cell Biol.*, **1967**, *33*, (3), 679-708.
- ²¹⁸ Serpell, L. C., Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly, *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, *1502*, (1), 16-30.
- ²¹⁹ Goldsbury, C. S.; Wirtz, S.; Müller, S. A.; Sunderji, S.; Wicki, P.; Aebi, U.; Frey, P., Studies on the in vitro assembly of a beta 1-40: implications for the search for a beta fibril formation inhibitors, *J. Struct. Biol.*, **2000**, *130*, (2-3), 217-231.
- ²²⁰ Maser, F.; Klein, B.; Mutter, M.; Toniolo, C.; Bonora, G. M., Conformational preferences of side-chain protected amino acid residues and their impact in peptide synthesis, *Biopolymers*, **1983**, *22*, 233-240.
- ²²¹ Mutter, M.; Maser, F.; Altmann, K.-H.; Toniolo, C.; Bonora, G. M., Sequence-dependence of secondary structure formation: conformational studies of host-guest peptides in α -helix and β -structure supporting media, *Biopolymers*, **1985**, *24*, 1057-1074.
- ²²² Mutter, M., The Construction of New Proteins and Enzymes-a Prospect for the Future?, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1985**, *24*, (8), 639-653.
- ²²³ Tjernberg, L.O.; Callaway, D. J. E.; Tjernberg, A.; Hahne, S.; Lilliehöök, C.; Terenius L.; Thyberg, J.; Nordstedt, C., A molecular model of Alzheimer amyloid beta-peptide fibril formation, *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, (18), 12619-12625.
- ²²⁴ Tenidis, K.; Waldner, M.; Bernhagen, J.; Fischle, W.; Bergmann, M.; Weber, M.; Merckle, 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.
- ²²⁵ Azriel, R.; Gazit, E., Analysis of the minimal amyloid-forming fragment of the islet amyloid polypeptide, *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, (36), 34156-34161.

- ²²⁶ Zanuy, D.; Ma, B.; Nussinov, R., Short peptide amyloid organization: stabilities and conformations of the islet amyloid peptide NFGAIL, *Biophys. J.*, **2003**, *84*, 1884-1894.
- ²²⁷ Wu, C.; Lei, H.; Duan, Y., The role of the Phe in the formation of well-ordered oligomers of amyloidogenic hexapeptide (NFGAIL) observed in molecular dynamics simulations with explicit solvent, *Biophys. J.*, **2005**, *88*, 2897-2906.
- ²²⁸ DeGrado, W. F.; Lear, J. D., Induction of peptide conformation at apolar/water interfaces. 1. A study with model peptides of defined hydrophobic periodicity, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*
- ²²⁹ Rajashekhar, B.; Kaiser, E. T., Design of biologically active peptides with non-peptidic structural elements, *J. Biol. Chem.*, **1986**, *261*, (29), 13617-13623.
- ²³⁰ Kaiser, E. T., Peptides with affinity for membranes, *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **1987**, *16*, 561-581.
- ²³¹ Mutter, M.; Altmann, E.; Altmann, K.-H.; Hersperger, R.; Koziej, P.; Nebel, K.; Tuchscherer, G.; Vuilleumier, S.; Gremlich, H.-U.; Müller, K., 94. The construction of new proteins. Part III) Artificial folding units by assembly of amphiphilic secondary structures on a template, *Helv. Chim. Acta*, **1988**, *71*, 835-847.
- ²³² 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. USA*, **1995**, *92*, 6349-6353.
- ²³³ Kallberg, Y.; Gustafsson, M.; Persson, B.; Thyberg, J.; Johansson, J., Prediction of amyloid fibril-forming proteins, *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, (16), 12945-12950.
- ²³⁴ Tjernberg, L. O.; Näslund, J.; Lindqvist, F.; Johansson, J.; Karlström, A. R.; Thyberg, J.; Tereniust, L.; Nordstedt, C., Arrest of β -amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand, *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, (15), 8545-8548.
- ²³⁵ Idicula-Thomas, S.; Balaji, P. V., Understanding the relationship between the primary structure of proteins and their amyloidogenic propensity: clues from inclusion body formation, *Prot. Eng., Design & Selection*, **2005**, *18*, (4), 175-180.
- ²³⁶ Chou, P. Y.; Fasman, G. D., Conformational parameters for amino acids in helical, β -sheet, and random coil regions calculated from proteins, *Biochem.*, **1974**, *13*, (2), 211-222.
- ²³⁷ Chou, P. Y.; Fasman, G. D., Prediction of protein conformation, *Biochem.*, **1974**, *13*, (2), 222-245.
- ²³⁸ Rost, B.; Sander, C., Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy, *J. Mol. Biol.*, **1993**, *232*, 584-599.
- ²³⁹ Lansbury, P. T. Jr., Costa, P. R.; Griffiths, J. M.; Simon, E. J.; Auger, M.; Halverson, K. J.; Kocisko, D. A.; Hensch, Z. S.; Ashburn, T. T.; Spencer, R. G. S.; Tidor, B.; Griffin, R. G., Structural model for the β -amyloid fibril based on interstrand alignment of an antiparallel-sheet comprising a C-terminal peptide, *Nat. Struct. Biol.*, **1995**, *2*, (11), 990-998.

- ²⁴⁰ Sticht, H.; Bayer, P.; Willbold, D.; Dames, S.; Hilbich, C.; Beyreuther, K.; Frank, R. W.; Rösch, P., Structure of amyloid A4-(1-40)-peptide of Alzheimer's disease, *Eur. J. Biochem.*, **1995**, 233, (1), 293-298.
- ²⁴¹ Jiménez, J. L.; Guijarro, J. T.; Orlova, E.; Zurdo, J.; Dobson, C. M.; Sunde, M.; Saibil, H. R., Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing, *EMBO J.*, **1999**, 18, (4), 815-821.
- ²⁴² Salomon, A. R.; Marcinowski, K. J.; Friedland, R. P.; Zagorski, M. G., Nicotine inhibits amyloid formation by the β -peptide, *Biochem.*, **1996**, 35, 13568-13578.
- ²⁴³ Thorsett, E. D.; Latimer, L. H., Therapeutic approaches to Alzheimer's disease, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2000**, 4, 377-382.
- ²⁴⁴ Merlini, G.; Ascari, E.; Amboldi, N.; Bellotti, V.; Arbustini, E.; Perfetti, V.; Ferrari, M.; Zorzoli, I.; Marinone, M. G.; Garini, P.; Diegoli, M.; Trizio, D.; Ballinari, D., Interaction of the anthracycline 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin with amyloid fibrils: inhibition of amyloidogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, 92, (7), 2959-2963.
- ²⁴⁵ Forlini, G.; Colombo, L.; Girola, L.; Tagliavini, F.; Salmona, M., Anti-amyloidogenic activity of tetracyclines: studies in vitro, *FEBS Lett.*, **2001**, 487, (3), 404-407.
- ²⁴⁶ Soto, C.; Sigurdsson, E. M.; Morelli, L.; Kumar, R. A.; Castaño, E. M.; Frangione, B., Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy, *Nat. Med.*, **1998**, 4, (7), 822-826.
- ²⁴⁷ Adessi, C.; Soto, C., Beta-sheet breaker strategy for the treatment of Alzheimer's disease, *Drug Dev. Res.*, **2002**, 56, 184-193.
- ²⁴⁸ Adessi, C.; Frossard, M.-J.; Boissard, C.; Fraga, S.; Bieler, S.; Ruckle, T.; Vilbois, F.; Robinson, S. M.; Mutter, M.; Banks, W. A.; Soto, C., Pharmaceutical profiles of peptide drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease, *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, (16), 13905-13911.
- ²⁴⁹ Boissard, C., Etude de Relations Structure-Activité de Peptides Bioactifs Comprenant une Pseudo-Proline, Thesis n°2596, Prof. M. Mutter, EPFL, CH-Lausanne, **2002**.
- ²⁵⁰ Mutter, M.; Nefzi, A.; Sato, T.; Sun, X.; Wahl, F.; Wöhr, T., Pseudo-prolines (Ψ Pro) for accessing "inaccessible" peptides, *Peptide Research*, **1995**, 8, (3), 145-153.
- ²⁵¹ Keller, M.; Sager, C.; Dumy, P.; Schutkowski, M.; Fischer, G. S.; Mutter, M., Enhancing the proline effect: pseudo-prolines for tailoring *cis/trans* isomerization, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 2714-2720.
- ²⁵² Tuchscherer, G.; Mutter, M., Peptidomimetics for bridging structure and function: pseudo-prolines (Ψ Pro) in peptide synthesis, molecular recognition and drug design, *Chimia*, **2001**, 55, 306-313.
- ²⁵³ Wöhr, T.; Wahl, F.; Nefzi, A.; Rohwedder, B.; Sato, T.; Sun, X.; Mutter, M., Pseudo-prolines as a solubilizing, structure-disrupting protection technique in peptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 9218-9227.

- ²⁵⁴ Mutter, M.; Wöhr, T.; Gioria, S.; Keller, M., Pseudo-prolines: induction of *cis/trans*-conformational interconversion by decreased transition state barriers, *Biopolymers*, **1999**, *51*, 121-128.
- ²⁵⁵ Kessler, H., Conformation and biological activity of cyclic peptides, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1982**, *21*, 512-523.
- ²⁵⁶ Hruby, V. J., Minireview – Conformational restrictions of biologically active peptides via amino acids side chain groups, *Life Sci.*, **1982**, *31*, 189-199.
- ²⁵⁷ Charpentier, B.; Dor, A.; Roy, P.; England, P.; Pham, H.; Durieux, C.; Roques, B. P., Synthesis and binding affinities of cyclic and related linear analogues of CCK₈ selective for central receptors, *J. Med. Chem.*, **1989**, *32*, 1184-1190.
- ²⁵⁸ Wen, J. J.; Spatola, A. F., A systematic approach to the solid-phase synthesis of a linear and cyclic pseudopeptide libraries containing ψ [CH₂NH] amide bond surrogates, *J. Peptide Res.*, **1997**, *49*, 3-14.
- ²⁵⁹ Sager, C.; Mutter, M.; Dumy, P., Influence of *cis-trans* isomerisation on pentapeptide cyclisation, *Tet. Lett.*, **1999**, *40*, 7987-7991.
- ²⁶⁰ Chen, H.; Haynes, R. K.; Scherkenbeck, J., Synthesis of cyclic hexapeptides based on the antibiotic cyclic decapeptide loloatin C by a in situ indirect cyclization method, *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 38-47.
- ²⁶¹ Obrecht, D.; Altorfer, M.; Robinson, J. A., Novel peptide mimetic building blocks and strategies for efficient lead findings, *Adv. Med. Chem.*, **1999**, *4*, 1-68.
- ²⁶² Chou, K.-C., Prediction of β -turn, *J. Peptide Res.*, **1997**, *49*, 120-144.
- ²⁶³ Petty, S. A.; Decatur, S. M., Experimental evidence for the reorganization of β -strands within aggregates of the A β (16-22) peptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 13488-13489.
- ²⁶⁴ Wikipedia, <http://fr.wikipedia.org/wiki/Glycoprotéine>
- ²⁶⁵ Robert, J., Fondation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer (FNLCLCC), Le dictionnaires des cancers de A à Z, http://www.fnclcc.fr/fr/patients/dico/definition.php?id_definition=654
- ²⁶⁶ Wikipedia, <http://fr.wikipedia.org/wiki/Métalloprotéine>
- ²⁶⁷ Koolman, J.; Röhm, K.-H., Atlas de poche de biochimie, Médecine-Sciences Flammarion, 2^e édition, **1999**, 188-189.
- ²⁶⁸ Koolman, J.; Röhm, K.-H., Atlas de poche de biochimie, Médecine-Sciences Flammarion, 2^e édition, **1999**, 366-367.
- ²⁶⁹ Koolman, J.; Röhm, K.-H., Atlas de poche de biochimie, Médecine-Sciences Flammarion, 2^e édition, **1999**, 136-137.
- ²⁷⁰ Harris, J. R., In vitro fibrillogenesis of the amyloid β ₁₋₄₂ peptide: cholesterol potentiation and aspirin inhibition, *Micron*, **2002**, *33*, 609-626.
- ²⁷¹ Kuner, P.; Bohrmann, B.; Tjernberg, L. O.; Näslund, Hubert, G.; Celnk, S.; Grüniger-Leicht, F.; Richards, J. G.; Jakob-Roetne, R.; Kemp, J. A.; Nordstedt, C., Controlling polymerization of β -

amyloid and prion-derived peptides with synthetic small molecule ligand, *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, (3), 1673-1678.

²⁷² Twyman, L. J.; Allsop, D., A short synthesis of the β -amyloid (A β) aggregation inhibitor 3-*p*-toluoyl-2-[4'-(3-diethylaminopropoxy)-phenyl]-benzofuran, *Tet. Lett.*, **1999**, *40*, 9383-9384.

²⁷³ 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 β -peptide polymerization, *Biochem.*, **1999**, *38*, 6791-6800.

²⁷⁴ Burley, S. K.; Petsko, G. A., Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure, *Science*, **1985**, *229*, (4708), 23-28.

²⁷⁵ Singh, J.; Thornton, J. M., The interaction between phenylalanine rings in proteins, *FEBS Lett.*, **1985**, *191*, (1), 1-6.

²⁷⁶ Aravinda, S.; Shamala, N.; Das, C.; Sriranjini, A.; Karle, I. L.; Balaram, P., Aromatic-aromatic interactions in crystal structures of helical peptide scaffolds containing projecting phenylalanine residues, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, (18), 5308-5315.

²⁷⁷ Gazit, E., A possible role for π -stacking in the self-assembly of amyloid fibrils, *FASEB J.*, **2002**, *16*, 77-83.

²⁷⁸ Gestwicki, J. E.; Crabtree, G. R.; Graef, I. A., Harnessing chaperones to generate small-molecule inhibitors of amyloid β aggregation, *Science*, **2004**, *306*, 865-869.

²⁷⁹ Wickelgren, I., A wily recruiter in the battle against toxic amyloid aggregation, *Science*, **2004**, *306*, 791-792.

²⁸⁰ Nkubana, C., Vers un vaccin synthétique : synthèses de conjugués immunogéniques de dérivés de la nicotine, Diplôme d'Etudes Supérieures en Chimie, Prof. M. Mutter, Université de Lausanne, Suisse, **1999**.

²⁸¹ Wikipedia, fr.wikipedia.org/wiki/Mélatonine

²⁸² Lexique Encyclobio, http://www.dictionnaire-biologie.com/biologie/definition_104.html

²⁸³ Kocher, L., Université Claude Bernard de Lyon 1 (UCBL), UFR de Médecine LYON SUD, <http://lyon-sud.univ-lyon1.fr/P2/Physio-LK/Pineale.pdf>

²⁸⁴ Lexique Encyclobio, http://www.cite-sciences.fr/francais/ala_cite/expo/tempo/defis/lexique/definition1.php?definition=2&idmot=104&iddef=209&idmedia=&page=6

²⁸⁵ Nowick, J. S.; Chung, D. M.; Maitra, K.; Maitra, S.; Stigers, K. D.; Sun, Y., An unnatural amino acid that mimics a tripeptide β -strand and forms β -sheetlike hydrogen-bonded dimers, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 7654-7661.

²⁸⁶ Loughlin, W. A.; Tyndall, J. D. A.; Glenn, M. P.; Fairlie, D. P., Beta-strand mimetics, *Chem. Rev.*, **2004**, *104*, 6085-6117.

- ²⁸⁷ Feigel, M., 2,8-Dimethyl-4-(carboxymethyl)-6-(aminomethyl)phenoxathiin *S*-dioxide: an organic substitute for the β -turn in peptides?, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 181-182.
- ²⁸⁸ Díaz, H.; Espina, J. R.; Kelly, J. W., A dibenzofuran-based amido acid designed to nucleate antiparallel β -sheet structure: evidence for intramolecular hydrogen bond formation, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 8316-8318.
- ²⁸⁹ Kemp, D. S.; Bowen, B. R., Synthesis of peptide-functionalized diacylaminoepindolidiones as templates for β -sheet formation, *Tet. Lett.*, **1988**, *29*, (40), 5077-5080.
- ²⁹⁰ Joule, J. A.; Mills, K.; Smith, G. F., *Heterocyclic chemistry*, Chapman & Hall, 3rd Edition, **1995**, 301-349.
- ²⁹¹ Novabiochem Catalog, **2000**, B6-B9.
- ²⁹² Stigers, K. D.; Koutroulis, M. R.; Chung, D. M.; Nowick, J. S., Fmoc*: a more soluble analogue of the 9-fluorenylmethoxycarbonyl protecting group, *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 3858-3860.
- ²⁹³ Lewis, N. J.; Inloes, R. L.; Hes, J., Synthetic sulfur-containing amino acids. Inhibition of transport systems in S37 ascites tumor cells, *J. Med. Chem.*, **1978**, *21*, (10), 1070-1073.
- ²⁹⁴ Biancalana, S.; Hudson, D.; Songster, M. F.; Thompson, S. A., Fmoc chemistry compatible thio- ligation assembly of proteins, *Lett. Peptide Sci.*, **2001**, *7*, 291-297.
- ²⁹⁵ Quaderer, R.; Hilvert, D., Improved synthesis of C-terminal peptide thioesters on "safety-catch" resins using LiBr/THF, *Org. Lett.*, **2001**, *3*, (20), 3181-3184.
- ²⁹⁶ Alsina, J.; Yokum, T. S.; Albericio, F.; Barany, G., Backbone amide linker (BAL) strategy for *N*^α-9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) solid-phase synthesis of unprotected peptide *p*-nitroanilides and thioesters, *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, (24), 8761-8769.
- ²⁹⁷ Ingenito, R.; Bianchi, E.; Fattori, D.; Pessi, A., Solid phase synthesis of peptide C-terminal thioesters by Fmoc/*t*-Bu chemistry, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 11369-11374.
- ²⁹⁸ Brask, J.; Albericio, F.; Jensen, K. J., Fmoc solid-phase synthesis of peptide thioesters by masking as trithioortho esters, *Org. Lett.*, **2003**, *5*, (16), 2951-2953.
- ²⁹⁹ Olliver, N.; Behr, J.-B.; El-Madhi, O.; Blanpain, A.; Melnyk, O., Fmoc solid-phase synthesis of peptide thioesters using an intramolecular *N,S*-acyl shift, *Org. Lett.*, **2005**, *7*, (13), 2647-2650.
- ³⁰⁰ Li, X.; Kawakami, T.; Aimoto, S., Direct preparation of peptide thioesters using an Fmoc solid-phase method, *Tet. Lett.*, **1998**, *39*, 8669-8672.
- ³⁰¹ Bu, X.; Xie, G.; Law, C. W.; Guo, Z., An improved deblocking agent for direct Fmoc solid-phase synthesis of peptide thioesters, *Tet. Lett.*, **2002**, *43*, 2419-2422.
- ³⁰² Holmes, D. S.; Dyer, U. C.; Russell, S.; Sheringham, J. A.; Robinson, J. A., Total synthesis of a putative triene intermediate in monensin biosynthesis, activated as a caprylcysteamine thiol ester, *Tet. Lett.*, **1988**, *29*, (48), 6357-6360.

- ³⁰³ Holmes, D. S.; Sherringham, J. A.; Dyer, U. C.; Russel, S. T.; Robinson, J. A., 27. Synthesis of putative intermediates on the monensin biosynthetic pathway and incorporation experiments with the monensin-producing organism, *Helv. Chim. Acta*, **1990**, 73, 239-258.
- ³⁰⁴ Ho, P. T.; Ngu, K.-Y., An effective synthesis of *N*-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl) α -amino aldehydes from *S*-benzyl thioesters, *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 2313-2316.
- ³⁰⁵ Fontana, A.; Toniolo, C., Chapter 5: Detection and determination of thiols, *The chemistry of functional groups; The chemistry of the thiol group – Part I*, Edited by S. Patai, The Hebrew University, Jerusalem, J. Wiley and Sons, London – New York – Sydney – Toronto, An Interscience® Publication, **1974**, 271-323.
- ³⁰⁶ Wolman, Y., Chapter 14: Protection of the thiol group, *The chemistry of functional groups; The chemistry of the thiol group – Part I*, Edited by S. Patai, The Hebrew University, Jerusalem, J. Wiley and Sons, London – New York – Sydney – Toronto, An Interscience® Publication, **1974**, 669-684.
- ³⁰⁷ von Eggelkraut-Gottanka, R.; Klose, A.; Beck-Sickinger, A. G.; Beyermann, M., Peptide α -thioester formation using standard Fmoc-chemistry, *Tet. Lett.*, **2003**, 44, 3551-3554.
- ³⁰⁸ a) <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid/>; b) IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983, *Biochem. J.*, **1984**, 219, 345-373; c) IUPAC-IUB JCBN, *Eur. J. Biochem.*, **1984**, 138, 9-37; d) IUPAC-IUB JCBN, *Eur. J. Biochem.*, **1985**, 152, 1; e) IUPAC-IUB JCBN, *Eur. J. Biochem.*, **1993**, 213, 2; f) IUPAC-IUB JCBN, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **1984**, 24, 84; g) IUPAC-IUB JCBN, *Pure Appl. Chem.*, **1984**, 56, 595-624; h) IUPAC-IUB JCBN, *Amino Acids and Peptides*, **1985**, 16, 387-410; i) IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature and Nomenclature Commission of IUBMB, *Biochemical Nomenclature and Related Documents*, 2nd Edition, Portland Press. London, **1992**, 39-67.
- ³⁰⁹ Filip, S. V.; Cavelier, F., A contribution to the nomenclature of depsipeptides, *J. Peptide Sci.*, **2004**, 10, 115-118.
- ³¹⁰ Eritja, R.; Ziehler-Martin, J. P.; Walker, P. A.; Lee, T. D.; Legesse, K.; Albericio, F.; Kaplan, B. E., On the use of *s*-*t*-butylsulphenyl group for protection of cysteine in solid-phase peptide synthesis using fmoc-amino acids, *Tetrahedron*, **1987**, 43, (12), 2675-2680.
- ³¹¹ Denis, B.; Trifilieff, E., Synthesis of palmitoyl-thioester T-cell epitopes of myelin proteolipid protein (PLP). Comparison of two thiol protecting groups (StBu and Mmt) for on-resin acylation, *Journal of Peptide Science*, **2000**, 6, 372-377.
- ³¹² Murat, K., “Switch-Peptides”: le Potentiel de la Migration S,N Acylique dans l’Induction de l’Activité Biologique et la Rupture de Structures Secondaires In Situ, Thesis, Prof. M. Mutter, EPFL, CH-Lausanne, **2006**.
- ³¹³ Mandal, B., Switch-Peptides: a New Tool for the Study of β -Sheet Aggregation and the Design of Novel β -Sheet Breakers, Thesis, Prof. M. Mutter, EPFL, CH-Lausanne, **2006**.

- ³¹⁴ Camarero, J. A.; Fushman, D.; Cowburn, D.; Muir, T. W., Peptide chemical ligation inside living cells: in vivo generation of a circular protein domain, *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, *9*, 2479-2484.
- ³¹⁵ Yeo, D. S. Y.; Srinivasan, R.; Uttamchandani, M.; Chen, G. Y. J.; Zhu, Q.; Yao, S. Q., Cell-permeable small molecule probes for the site-specific labeling of proteins, *Chem. Comm.*, **2003**, *23*, 2870-2871.
- ³¹⁶ Hanson, R. W., *Essentials of Bio-organic chemistry*, London, E. Arnold, **1984**, 202.
- ³¹⁷ Hanson, R. W., *Essentials of Bio-organic chemistry*, London, E. Arnold, **1984**, 107.
- ³¹⁸ Hanson, R. W., *Essentials of Bio-organic chemistry*, London, E. Arnold, **1984**, 113.
- ³¹⁹ Dawson, P. E.; Churchill, M. J.; Ghadiri, M. R.; Kent, S. B. H., Modulation of reactivity in native chemical ligation through the use of thiol additives, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, (19), 4325-4329.
- ³²⁰ Tam, J. P.; Yu, Q.; Yang, J.-L., Tandem ligation of unprotected peptides through thiapropyl and cysteinyl bonds in water, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 2487-2494.
- ³²¹ Obikoya, G., *The History of Vitamins*, www.vitamins-nutrition.org/vitamins/history-vitamins.html
- ³²² Wikipedia, http://en.wikipedia.org/wiki/Kazimierz_Funk
- ³²³ Wikipedia, http://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_B
- ³²⁴ György, P., *Nature, London*, **1934**, *133*, 498.
- ³²⁵ György, P., LXXXVI. Investigations on the vitamin B₂ complex. I. The differentiation of lactoflavin and the "rat antipellagra" factor, *Biochem. J.*, **1935**, *29*, 741.
- ³²⁶ György, P., Crystalline vitamin B₆, *J. Am. Chem. Soc.*, **1938**, *60*, 983-984.
- ³²⁷ Stiller, E. T.; Keresztesy, J. C.; Stevens, J. R., The structure of vitamin B₆. I., *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*, (5), 1237-1242.
- ³²⁸ Stanton, A.; Harris, S. A.; Stiller, E. T.; Folkers, K., Structure of vitamin B₆, *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*, (5), 1242-1244.
- ³²⁹ Kuhn, R.; Wendt, G., *Ber.* **1939**, *72*, 305.
- ³³⁰ Kuhn, R.; Andersag, H.; Westpahl, O.; Wendt, G., *Ber.* **1939**, *72*, 309.
- ³³¹ Kuhn, R.; Wendt, G.; Westphal, O., *Ber.* **1939**, *72*, 310.
- ³³² Harris, S. A.; Folkers, K., Synthesis of vitamin B₆, *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*, (5), 1245-1247.
- ³³³ Harris, S. A.; Folkers, K., Synthesis of vitamin B₆. II., *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*, (12), 3307-3310.
- ³³⁴ Snell, E. E.; Guirard, B. M.; Williams, R. J., Occurrence in natural products of a physiologically active metabolite of pyridoxine, *J. Biol. Chem.* **1942**, *143*, (2), 519-530.
- ³³⁵ Snell, E. E., *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* **1942**, *51*, 356.
- ³³⁶ Snell, E. E., The vitamin activities of "pyridoxal" and "pyridoxamine", *J. Biol. Chem.* **1944**, *154*, (1), 313-314.
- ³³⁷ Harris, S. A.; Heyl, D.; Folkers, K., The structure and synthesis of pyridoxine and pyridoxal, *J. Biol. Chem.* **1944**, *154*, 315-316.

- ³³⁸ Snell, E. E.; Rannefeld, A. N., The vitamin B₆ group. III. The vitamin activity of pyridoxal and pyridoxamine for various , *J. Biol. Chem.* **1944**, *157*, 475-489
- ³³⁹ Holman, P., *J. Austr. Coll. Nutr. Env. Med.* **1995**, *14*, (1), 5-16.
- ³⁴⁰ Griffiths, D. W.; Bender, M. L., Orientational catalysis by cyclohexaamylose, *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, *95*, (5), 1679-1680.
- ³⁴¹ Kemp, D. S.; Vellaccio, F. Jr., Rapid intramolecular acyl transfer from phenol to carbinolamine – Progress toward a new class of peptide coupling reagent, *J. Org. Chem.*, **1975**, *40*, (20), 3003-3004.
- ³⁴² Corbett, M. D.; Corbett, B. R., *N*-glycolylhydroxamic acids: an improved synthetic method and the in situ generation and intramolecular rearrangement of *N*-acetoxy-*N*-glycolyl-2-aminofluorene, *Chem. Res. Toxicol.*, **1988**, *1*, 222-227.
- ³⁴³ Alford, E. J.; Schofield, K., Cinnolines. XXVIII. The nature of the C3 position. 1. The Neber-Bossel synthesis of 3-hydroxycinnoline, *J. Chem. Soc., Abstracts*, **1952**, 2102-2108.
- ³⁴⁴ Greene, T. W.; Wuts, P. G. M., *Protective groups in organic synthesis*, John Wiley and Sons, Inc., 2nd Edition, **1991**.
- ³⁴⁵ Stewart, J. M., Protection of the hydroxyl group in peptide synthesis, *The Peptides*, **1981**, *3*, (4), 169-201.
- ³⁴⁶ Stathopoulos, P.; Papas, S.; Kostidis, S.; Tsikaris, V., α - and β -aspartyl peptide ester formation via aspartimide ring opening, *J. Peptide Sci.*, **2005**, *11*, 658-664.
- ³⁴⁷ Lührs, T.; Ritter, C.; Adrian, M.; Riek-Loher, D.; Bohrmann, B.; Döbeli, H.; Schubert, D.; Riek, R., 3D structure of Alzheimer's amyloid- β (1-42) fibrils, *Proc. Natl. Acad. Soc. USA*, **2005**, *102*, (48), 17342-17347.
- ³⁴⁸ Bax, A.; Davis, D. G., Practical aspects of two-dimensional transverse NOE spectroscopy, *J. Magn. Res.*, **1985**, *63*, 207-213.
- ³⁴⁹ Davis, D. G.; Bax, A., Assignment of complex proton NMR spectra via two-dimensional homonuclear Hartmann-Hahn spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 2820-2821.
- ³⁵⁰ Derome, A. E.; Williamson, M. P., Rapid-pulsing artifacts in double-quantum-filtered COSY, *J. Magn. Res.*, **1990**, *88*, 177-185.
- ³⁵¹ Balacco, G., SwaN-NMR: a complete and expansible NMR software for the Macintosh, *J. Chem. Inform. Comput. Sci.*, **1994**, *34*, 1235-1241.
- ³⁵² Kaiser, E.; Colescott, R. L., Bossinger, C. D. and Cook, P. I., Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides, *Anal. Biochem.*, **1970**, *34*, 595-598.
- ³⁵³ Hancock, W. S.; Battersby, J. E., A new micro-test for the detection of incomplete coupling reactions in solid-phase peptide synthesis using 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, *Anal. Biochem.*, **1976**, *71*, 260-264.
- ³⁵⁴ Vojtkovsky, T., Detection of secondary amines on solid phase, *Pept. Res.*, **1995**, *8*, 236-237.
- ³⁵⁵ Ellman, G. I., Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1959**, *82*, (1), 70-77.

PhD Student in Chemistry and Chemical Engineering

Peptide Chemistry and Biomimetics

Lydiane SAUCEDE

Ch. Champrilly 23
1004 LAUSANNE
SWITZERLAND
Phone: +41 (0)21 625 10 93
Office: +41 (0)21 693 93 92
Cell phone: +41 (0)78 738 26 35
E-mail: lydiane.saucede@epfl.ch



Age: 28 (08/02/1978)
Nationality: French
Marital status: single
Full clean driving license

SKILLS

Chemistry	Design of biologically relevant molecules, prodrugs. Alzheimer's Disease, leukocyte migration, AIDS and sialyltransferase inhibitors. Peptides: synthesis in solution, on solid phase and with an automatic synthesizer; switch-peptides, pseudoproline, chemoselective ligation, acyl migration, ester and thioester, enzymes. Nucleotides: nucleosides, hydrogeno- and boranophosphonates, carbohydrates. Organic chemistry: functionalized aromatic cycles and heterocycles.
Methods of purification	Regular (silica gel) and reverse phase (preparative and semi-preparative HPLC, chromatography).
Analysis	Analytical HPLC, ESI-MS, NMR (¹ H, ¹³ C, ³¹ P, 1D and 2D), CD, UV, IR, FTIR, fluorescence, α_D , electron and optical microscopy, staining.
Teaching, Management	Practical work: Organic Chemistry for student in 2 nd year of Pharmacy, University of Lausanne (UNIL), Switzerland (2 semesters). Marketing, accounting (basic knowledge). Ability in oral presentation (award).
Languages	French (mother tongue); English (fluent); German (good level).
Computer Science	Word, Power Point, Excel, Adobe Photoshop and Illustrator, Acrobat, Endnote, ChemDraw, 4D, Scifinder, Belstein, MestRe-C, SwanNMR.

RESEARCH EXPERIENCE

2001 to present	PhD in Chemistry and Chemical Engineering specialized in Peptide Chemistry and Biomimetics. "Switch-Peptides: Design and Synthesis of Potentially Amyloid-Fibril-Inhibiting or -Disrupting Compounds". Laboratory of Biomimetic and Peptide Chemistry (LCBP), Prof. M. MUTTER, Swiss Federal Institute of Technology, Lausanne, Switzerland. Supervisor: PD Dr G. Tuchscherer.
2001 (6 months)	Scientific training period of "DEA". "Synthesis of Nucleotide Analogues of AZT Incorporating a Peptide Residue". Laboratoire de Chimie Organique Biomoléculaire de Synthèse, U.M.R. 5625 (C.N.R.S.), Dr. G. GOSSELIN, University Montpellier II, Montpellier, France. Supervisors: Prof. C. PERIGAUD and Dr. S. PEYROTTE.
2000 (3 months)	Research Experience for Undergraduates (REU), National Science Foundation (USA). "Synthesis of a New Potent Inhibitor for Sialyltransferases". Dr. B. A. HORENSTEIN's Group, Biochemistry Division, Chemistry Department, University of Florida, FL-Gainesville, USA.
2000 (4 months)	Scientific training period of "Maîtrise". "Synthesis of 2'-Desoxy- β -L-8-methylguanosine for its Incorporation in Oligonucleotides". Laboratoire de Chimie Organique Biomoléculaire de Synthèse, U.M.R. 5625 (C.N.R.S.), Dr. G. GOSSELIN, University Montpellier II, Montpellier, France. Supervisor: Prof. B. RAYNER.

EDUCATION

2001 to present	PhD in Chemistry and Chemical Engineering . Swiss Federal Institute of Technology, Lausanne, Switzerland.
2000 – 2001	DEA (Post-graduate Diploma). "Biomolecule chemistry: synthesis, structure and reactivity". University Montpellier II, Montpellier (34), France.
1999-2000	Maîtrise (Master's Degree): "Molecular Chemistry", with honors (2.2). University Montpellier II, Montpellier (34), France.
1998-1999	Licence (Bachelor of sciences): "Molecular Chemistry". University Montpellier II, Montpellier (34), France.
1996-1998	DEUG A (Two-year University Degree in Mathematics), option "Physics and Chemistry". University Montpellier II, Montpellier (34), France.
1995-1996	Baccalauréat Scientifique (GCE-A-levels) in Mathematics, with honors (2.2). Lycée J.F. Champollion, Lattes (34), France.

ACTIVITIES

Travels, squash, hiking, theatre, reading.

CONTACTS

Prof. Manfred MUTTER

EPFL, SB, ISIC, LCBP (Laboratory of Biomimetic and Peptide Chemistry), BCH 5303, 1015 LAUSANNE, SWITZERLAND; Phone: +41 (0)21 693 94 11; Fax: +41 (0)21 693 94 15; E-mail: manfred.mutter@epfl.ch

PD Dr Gabriele TUCHSCHERER

EPFL, SB, ISIC, LCBP (Laboratory of Biomimetic and Peptide Chemistry), BCH 5122, 1015 LAUSANNE, SWITZERLAND; Phone: +41 (0)21 693 94 63; E-mail: gabriele.tuchscherer@epfl.ch

Prof. Pierre VOGEL

EPFL, SB, ISIC, LGSA (Laboratory of Glycochemistry and Asymmetric Synthesis), BCH 5307, 1015 LAUSANNE, SWITZERLAND, Phone: +41 (0)21 693 93 71; Fax: +41 (0)21 693 93 55; E-mail: pierre.vogel@epfl.ch

Dr Gilles GOSSELIN

U.M.R. 5625, C.N.R.S., Université Montpellier II, CC 008. Place Eugène Bataillon. 34095 MONTPELLIER cedex 5, FRANCE; Phone: +33 (0)4 67 14 38 55; Fax: +33 (0)4 67 54 96 10; E-mail: gosselin@univ-montp2.fr

PUBLICATIONS

- “Switch-Peptides: Controlling Self-Assembly of Amyloid β -Derived Peptides in vitro by Consecutive Triggering of Acyl Migrations”, S. Dos Santos, A. Chandravarkar, B. Mandal, R. Mimna, K. Murat, L. Saucède, P. Tella, G. Tuchscherer, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 11888-11889.
- “In situ Nucleation and Disruption of Secondary Structures using X \rightarrow N Acyl Migrations”, R. Mimna, L. Saucède, C. Arunan, J. Lopez, M. Mutter, G. Tuchscherer, *Peptides*, proceedings of the 3rd International and 28th European Peptide Symposium, Prague, Czech Republic, September 5-10, **2004**.
- “Switch Peptides In Statu Nascendi: Induction of Conformational Transitions Relevant to Degenerative Diseases”, M. Mutter, A. Chandravarkar, C. Boyat, J. Lopez, S. Dos Santos, B. Mandal, R. Mimna, K. Murat, L. Patiny, L. Saucède, and G. Tuchscherer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 4172-4178.
- “Switch-Peptide in statu nascendi: Induktion von Konformationsübergängen und deren Bedeutung in degenerativen Erkrankungen”, M. Mutter, A. Chandravarkar, C. Boyat, J. Lopez, S. Dos Santos, B. Mandal, R. Mimna, K. Murat, L. Patiny, L. Saucède, und G. Tuchscherer, *Ang. Chem.*, **2004**, *116*, 4267-4273.
- “Switch-Peptides: From Conformational Studies to Alzheimer’s Disease”, L. Saucède, S. Dos Santos, A. Chandravarkar, B. Mandal, R. Mimna, K. Murat, M.-S. Camus, J. Bérard, E. Grouzmann, M. Adrian, J. Dubochet, J. Lopez, H. Lashuel, G. Tuchscherer, M. Mutter, *Chimia*, in press.
- “Switch on Amyloid β Peptide Self-Assembly by Enzyme-Triggered Acyl Migration”, S. Dos Santos, A. Chandravarkar, B. Mandal, R. Mimna, K. Murat, L. Saucède, M. Camus, G. Tuchscherer, M. Mutter, *Peptides*, Proceedings of the 19th American Peptide Symposium, San Diego, June 18-23, **2005**, in press.
- “A New Generation of β -Sheet Breakers Applying the Switch-Peptide Concept”, K. Murat, S. Dos Santos, L. Saucède, B. Mandal, M.-S. Camus, G. Tuchscherer, M. Mutter, in preparation.
- “Switch-Peptides: Application to Non-Peptidic Switch Elements”, L. Saucède, G. Tuchscherer, M. Mutter, in preparation.
- “Conjugate Peptidomimetics: a Strategy to Inhibit Amyloid β Peptide Self-Aggregation”, L. Saucède, G. Tuchscherer, M. Mutter, in preparation.
- “Switch-Peptides: Switch on Amyloid β -Derived Peptide Self-Assembly by Sequential Triggering of Acyl Migrations”, L. Saucède, G. Tuchscherer, M. Mutter, in preparation.

ORAL COMMUNICATION

- “Switch on Amyloid β Peptide Self-Assembly by Enzyme-Triggered Acyl Migration”, S. Dos Santos, A. Chandravarkar, B. Mandal, R. Mimna, K. Murat, L. Saucède, M.-S. Camus, G. Tuchscherer, M. Mutter. Fall Meeting of the Swiss Chemical Society, Lausanne, Switzerland, October 13, **2005**.
Swiss Chemical Society award for the best oral presentation in Organic Chemistry 2005.
- “Switch-Peptides in Degenerative Diseases”, M. Mutter, S. Dos Santos, A. Chandravarkar, B. Mandal, R. Mimna, K. Murat, L. Saucède, M.-S. Camus, G. Tuchscherer, 1st International Institute for Complex Adaptive Matter (I2CAM) Exploratory Workshop, EPFL, Lausanne, Switzerland, July 16-19, **2005**.
- “In Situ Nucleation and Disruption of Secondary Structures Using X to N Acyl Migrations”, R. Mimna, L. Saucède, A. Chandravarkar, J. Lopez, M. Mutter, G. Tuchscherer, Fall Meeting of the Swiss Chemical Society, Zurich, Switzerland, October 7, **2004**.

POSTERS

- “Switch on Amyloid β Peptide Self-Assembly by Enzyme-Triggered Acyl Migration”, S. Dos Santos, A. Chandravarkar, B. Mandal, R. Mimna, K. Murat, L. Saucède, M.-S. Camus, G. Tuchscherer, M. Mutter, 19th American Peptide Symposium: Understanding Biology Using Peptides, San Diego, USA, June 18-23, **2005**.
- “Switch-Peptides: ISN-Nucleation and Disruption of Secondary Structures Relevant in Degenerative Diseases”, R. Mimna, L. Saucède, B. Mandal, A. Chandravarkar, S. Dos Santos, G. Tuchscherer, M. Mutter, Fall Meeting of the Swiss Chemical Society, Zurich, Switzerland, October 7, **2004**.
- “Switch-Peptides: ISN-Nucleation and Disruption of Secondary Structures Relevant in Degenerative Diseases”, R. Mimna, L. Saucède, B. Mandal, A. Chandravarkar, S. Dos Santos, G. Tuchscherer, M. Mutter, 3rd International and 28th European Peptide Symposium, Prague, Czech Republic, September 5-10, **2004**.