



Synthèse et évaluation biologique de dérivés polyquinoléine chélateurs d'ions métalliques en relation avec la maladie d'Alzheimer

Céline Deraeve

► To cite this version:

Céline Deraeve. Synthèse et évaluation biologique de dérivés polyquinoléine chélateurs d'ions métalliques en relation avec la maladie d'Alzheimer. Autre. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2006. Français. NNT: . tel-00142741

HAL Id: tel-00142741

<https://theses.hal.science/tel-00142741>

Submitted on 20 Apr 2007

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

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

THESE

présentée devant

L'UNIVERSITE PAUL SABATIER - TOULOUSE III (SCIENCES)

Ecole Doctorale

CHIMIE

en vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PAUL SABATIER

Spécialité

CHIMIE DES BIOMOLECULES ET APPLICATIONS

par

Céline DERAEEVE

SYNTHESE ET EVALUATION BIOLOGIQUE DE DERIVES POLYQUINOLEINE CHELATEURS D'IONS METALLIQUES EN RELATION AVEC LA MALADIE D'ALZHEIMER

Soutenue le 12 octobre 2006

Jury :

Isabelle ARTAUD	Directeur de Recherche au CNRS, LCBPT, Paris	Rapporteur
Jean-Michel LASSALLE	Professeur à l'Université Paul Sabatier Toulouse III	
Sylvain LEHMANN	Professeur à l'Université Montpellier I	Rapporteur
Bernard MEUNIER	Directeur de Recherche au CNRS, LCC, Toulouse	
	Président Directeur Général de la société PALUMED	
Marguerite PITIE	Chargée de Recherche au CNRS, LCC, Toulouse	
Pierre TISNES	Professeur à l'Université Paul Sabatier Toulouse III	Président

Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS
205, route de Narbonne, 31077 Toulouse cedex 4

A ma famille

A Mathias

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS de Toulouse dirigé par Monsieur Jean-Jacques Bonnet, Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse. Je le remercie de m'avoir accueillie au sein de cet établissement.

Je tiens à remercier tout particulièrement Madame Isabelle Artaud, Directeur de Recherche au CNRS et Monsieur Sylvain Lehmann, Professeur à l'Université de Montpellier, pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Leur présence à ce jury est un honneur et je leur en suis très reconnaissante.

Monsieur Jean-Michel Lassalle, Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse, m'a également fait l'honneur de participer à ce jury de thèse. Je tiens à lui adresser mes remerciements pour son implication dans l'évaluation de ce travail.

Monsieur Pierre Tisnès, Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse, a présidé ce jury. Je le remercie pour sa présence, ainsi que pour son accueil à mon arrivée à Toulouse pour le DEA "Chimie des Biomolécules" dont il était le responsable.

Ces travaux ont été effectués au sein de l'équipe de Monsieur Bernard Meunier, Directeur de Recherche au CNRS. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir accordé sa confiance en m'accueillant au sein de son équipe et en me proposant un sujet à l'interface de la chimie et de la biologie. Ses compétences, son dynamisme et ses conseils ont été précieux tout au long de ces trois années de travail.

Je tiens enfin à exprimer ma profonde gratitude à Marguerite Pitié, Chargée de Recherche au CNRS, qui a assuré la direction de cette thèse. Je la remercie de m'avoir fait partager ses larges connaissances scientifiques lors de nos discussions. Sa détermination et sa rigueur scientifique ont été indispensables au bon déroulement de mes recherches. Enfin, je la remercie chaleureusement pour ses encouragements et sa disponibilité, ayant toujours pris le temps de répondre à mes sollicitations.

J'adresse aussi mes remerciements aux différents services du LCC grâce auxquels ce travail a pu être réalisé dans de très bonnes conditions : le service RMN et en particulier Yannick Coppel, le service de spectrométrie de masse, le service de microanalyse, Heinz Gornitzka et Laure Vendier pour les structures aux rayons X, Alix Saquet au service d'électrochimie, et Philippe Eyraud au service de documentation.

Je remercie également Honoré Mazarguil pour la synthèse peptidique et la société Palumed pour le financement d'une partie de ces travaux.

Je souhaite également adresser de chaleureux remerciements à ceux que j'ai cotoyés pendant ces trois années au laboratoire et avec qui j'ai passé des moments inoubliables :

Jean, Geneviève, Anne, Catherine, Vania, Jean-Luc, Françoise, Christophe L. et Isabelle, merci à vous pour vos conseils avisés et pour votre gentillesse. Merci aussi à Peter pour les discussions "Alzheimer".

Un énorme merci à Christophe B. et à Alexandrine pour m'avoir épaulée dans ce travail (et pour tout le reste), et aux thésards de l'équipe K avec qui j'ai partagé beaucoup, que ce soit au labo comme à l'extérieur : les anciens Alex (mon premier compagnon de paillasse), Sylvain (que je suis très heureuse de partir retrouver à Dortmund) et Sophie M. (que de fous rires au labo 121!), Sophie L., Joël, Tamara (et Romain), François (au labo ou autour d'un verre, avec Charline) et la petite dernière, Fatima. Je n'oublie pas non plus les thésards de l'équipe F : Luc, Vanessa (ainsi que Seb et ses bons petits plats et la petite Mathilde que j'espère voir avant de quitter Toulouse) et Christine. Merci aussi à Ludivine (et Pat, qui nous font rêver aux antipodes), à Guigui (pour les soirées, les concerts et le galet), à Michel (et ses blaguounettes), à Paul et à Marc, sans oublier tous les post-doc et thésards croisés au fil de ces années : Ulla, Robert, Magda, Antonella, Michael, Adam, Ana et Guilio.

Merci aussi à Martine et à Michel et Philippe au magasin, ainsi qu'à Madame Lecouls pour leur gentillesse.

Je voudrais aussi remercier les anciens du DEA des Biomolécules, les copains des stages CIES, ainsi que mes amis "du grans nord" (Sabine, Jeff et la bande du lycée) et toulousains (merci Natacha) qui m'ont permis de "décompresser" dans les moments de stress.

Enfin et surtout, mes remerciements les plus forts reviennent à mes parents qui m'ont encouragée et soutenue pendant toutes ces années d'études et sans qui je n'aurais pu aller au bout de mes projets. J'y associe également ma sœur Claire, mes grands-parents et l'ensemble de ma famille, ainsi que Nadine, Paulo et Maëllis.

Pour terminer, merci à Mathias qui a été à mes côtés pour me soutenir et qui a partagé avec moi, entre autres, les histoires de "ligands et de chélation" pendant ces trois années de thèse.

Table des matières

Liste des abréviations

Introduction générale	1
-----------------------	---

Chapitre I

La maladie d'Alzheimer : Mécanismes et stratégies thérapeutiques

I. La maladie d'Alzheimer	3
I.1 Manifestations cliniques	3
I.2 Diagnostic	5
II. Systèmes cellulaires perturbés dans la maladie d'Alzheimer	6
II.1 Introduction : les cellules du tissu nerveux	6
II.1.1 Les neurones et la transmission neuronale	6
II.1.2 Les cellules gliales	7
II.2 Dysfonctionnement des systèmes de neurotransmetteurs dans la maladie d'Alzheimer	8
II.2.1 L'acétylcholine	8
II.2.2 Le glutamate : phénomène d'excitotoxicité	9
II.2.3 Le "zinc libre" comme neuromodulateur	10
II.3 Toxicité générée par le dérèglement de l'homéostasie du calcium	11
II.4 Inflammation	11
III. Dégénérescence des axones et disparition des synapses dans la maladie d'Alzheimer	12
III.1 La protéine tau et son implication dans les neurofibrilles	12
III.1.1 La protéine tau	12
III.1.2 Les neurofibrilles	13
III.1.3 Toxicité des neurofibrilles	13
IV. Le peptide β-amyloïde : une origine possible de la maladie d'Alzheimer	14
IV.1 Origine de $A\beta$: la protéine APP	14
IV.2 Le peptide β -amyloïde ($A\beta$)	16
IV.2.1 Oligomérisation et fibrillation d' $A\beta$ en absence d'ions métalliques	17
IV.2.2 Agrégation d' $A\beta$ en présence d'ions métalliques	19
IV.2.2.1 Les ions métalliques dans la maladie d'Alzheimer	19
IV.2.2.2 Interaction d' $A\beta$ avec les ions métalliques	20
IV.2.2.3 Rôle des ions métalliques dans l'agrégation d' $A\beta$	23
IV.2.3 $A\beta$: constituant principal des plaques amyloïdes	24

IV.3	Toxicité associée au peptide β -amyloïde	25
IV.3.1	Structures impliquées dans la toxicité d'A β	25
IV.3.2	Toxicité des complexes métalliques d'A β : Génération d'espèces oxygénées réactives	26
IV.3.2.1	<i>Production d'H₂O₂ par Aβ en présence d'ions métalliques</i>	26
IV.3.2.2	<i>Auto-oxydation du peptide Aβ</i>	28
IV.3.3	Toxicité d'A β via son interaction avec les membranes	29
IV.4	Facteurs favorisant l'accumulation et la toxicité d'A β	31
IV.4.1	Les facteurs génétiques	31
IV.4.2	Le cholestérol	32
IV.4.3	A β et le système cholinergique	33
IV.4.3.1	<i>Stimulation de la production d'Aβ</i>	33
IV.4.3.2	<i>Stimulation de l'accumulation d'Aβ</i>	33
IV.4.4	Le zinc (II)	34
IV.4.5	Diminution de l'activité d'enzymes assurant la dégradation d'A β	34
V.	Relation entre Aβ et tau	35
VI.	La cascade amyloïde	36
VII.	Stratégies thérapeutiques	39
VII.1	Approches symptomatiques et traitements utilisés	40
VII.1.1	Inhibiteurs des choline estérases	41
VII.1.2	Antagonistes des récepteurs du glutamate de la famille NMDA : Régulation de l'homéostasie du Ca ²⁺	42
VII.1.3	Anti-inflammatoires non stéroïdiens	43
VII.1.4	Antioxydants	44
VII.1.5	Remarque	46
VII.2	Agents thérapeutiques ciblant les causes de la maladie	47
VII.2.1	Inhibiteurs de la phosphorylation ou de la polymérisation de tau	47
VII.2.2	Diminution de la production d'A β	48
VII.2.2.1	<i>Inhibiteurs de la β-sécrétase</i>	48
VII.2.2.2	<i>Inhibiteurs de la γ-sécrétase</i>	51
VII.2.2.3	<i>Activateurs de l'α-sécrétase</i>	54
VII.2.2.4	<i>Diminution de la production d'Aβ par des composés favorisant la réduction des taux de cholestérol</i>	54
VII.2.2.5	<i>Remarque sur l'emploi des inhibiteurs/activateurs des sécrétases</i>	55
VII.2.3	Augmentation de l'élimination d'A β	56
VII.2.3.1	<i>Approche vaccinale</i>	56
VII.2.3.2	<i>Agents déstructurant les feuillets-β ("β-sheet breakers")</i>	57
VII.2.3.3	<i>Chélateurs d'ions métalliques</i>	60
VII.2.3.4	<i>Remarque sur l'emploi de molécules agissant sur les agrégats d'Aβ</i>	63
VIII.	Conclusion	63
IX.	Bibliographie	65

Chapitre II

Première étude : Stratégie de chélation *via* un bi-chélateur hétérocyclique

I.	Ligands 1,10 phénanthroline	81
II.	Stratégie bi-phénanthroline	82
II.1	Résumé d'un article paru dans ChemBioChem	84
II.2	Article	85
II.3	Commentaires	95
II.3.1	Stratégie bi-chélateur	95
II.3.2	Evaluation biologique de molécules	95
II.3.2.1	<i>Souris transgéniques modélisant la maladie d'Alzheimer</i>	95
II.3.2.2	<i>Extraits de cerveaux humains post-mortem</i>	96
II.3.2.3	<i>Cultures cellulaires</i>	97
II.3.2.4	<i>Tests biochimiques</i>	97
III.	Bibliographie	98

Chapitre III

Ligands polyquinoléine - Conception et synthèse

I.	Introduction : ligands quinoléine et clioquinol	101
II.	Stratégie polyquinoléine	103
II.1	Ligands quinoléine substitués en position 8 par un hétéroatome et leurs complexes métalliques	103
II.2	Stratégie polyquinoléine	105
II.3	Conception des molécules	105
II.3.1	Nature de l'hétéroatome participant à la chélation	106
II.3.2	Bras de jonction : position et taille	106
II.3.3	Substitutions	108
III.	Synthèse des ligands polyquinoléine	109
III.1	Bras de jonction alkyle en position 2	109
III.1.1	Bras à une unité carbonée (bras C ₁)	109
III.1.1.1	<i>Substitutions du bras C₁</i>	111
III.1.1.2	<i>Substitutions du noyau quinoléine en positions 5 et 7</i>	114
III.1.1.3	<i>Dérivés de la 8-aminoquinoléine</i>	118
III.1.2	Bras à deux unités carbonées (bras C ₂)	121
III.1.2.1	<i>Substitutions du noyau quinoléine en positions 5 et 7</i>	125
III.1.2.2	<i>Dérivés de la 8-aminoquinoléine</i>	126
III.2	Bras de jonction en position 2 comportant un hétéroatome	129

III.2.1	Bras amine	129
III.2.2	Bras amide en position 2	132
III.3	Bras de jonction en position 8	133
III.3.1	Bras à un chaînon	133
III.3.2	Augmentation de la longueur du bras	134
IV.	Conclusion	136
V.	Partie expérimentale	136
VI.	Bibliographie	164

Chapitre IV

Ligands polyquinoléine - Propriétés de chélation et études sur A β

I.	Chélation des ions métalliques Cu ^{II} et Zn ^{II}	169
I.1	Principe de l'étude par spectrophotométrie UV-visible	169
I.1.1	Détermination de la stœchiométrie L / M	169
I.1.2	Estimation des constantes d'affinité par compétition	170
I.1.2.1	Choix des chélateurs compétiteurs (L_c)	170
I.1.2.2	Expériences de compétition	171
I.2	Exemple : cas du ligand CT2	173
I.2.1	Stœchiométrie L / Cu ^{II}	173
I.2.2	Constantes d'affinité pour le Cu ^{II}	175
I.3	Résultats	177
II.	Etudes in vitro sur le peptide A β	183
II.1	Capacité des ligands à inhiber la précipitation d'A β induite par les ions métalliques	184
II.1.1	Description du test	184
II.1.1.1	Conditions	184
II.1.1.2	Choix du réactif de quantification en protéine	184
II.1.1.3	Optimisation du test	185
II.1.2	Quantification de la précipitation d'A β par les ions métalliques	186
II.1.2.1	Précipitation d'A β par les ions Cu ^{II} , Zn ^{II} et Fe ^{III}	186
II.1.2.2	Analyse de la précipitation d'A β en fonction du rapport Cu ^{II} / A β	187
II.1.3	Inhibition de la précipitation d'A β par l'ajout de ligands	188
II.1.4	Influence de la stœchiométrie métal / ligand	192
II.2	Capacité des ligands à inhiber la production d'H ₂ O ₂ :	193
II.2.1	Description du test	194
II.2.1.1	Choix du réactif de détection d'H ₂ O ₂	194
II.2.1.2	Choix des conditions de réaction	194
II.2.2	Quantification de la production d'H ₂ O ₂ par le système A β + Cu ^{II} + réducteur	195

II.2.3	Inhibition de la production d'H ₂ O ₂ par l'ajout de ligands	196
II.2.4	Stabilité d'H ₂ O ₂	200
III.	Tests complémentaires pour une utilisation in vivo	202
III.1	Hydrophobicité	202
III.1.1	Principe	203
III.1.2	Résultats	203
III.2	Test de génotoxicité potentielle : Test de Ames	205
III.2.1	Principe	206
III.2.2	Résultats	206
IV.	Conclusion	208
V.	Partie expérimentale	209
VI.	Bibliographie	218

Chapitre V

Mécanismes de production / dégradation d'H₂O₂ par Aβ·M_n - Rôle des chélateurs

I.	Production et dégradation d'H₂O₂ par les complexes de cuivre de Aβ	221
I.1	Résumé de l'article	221
I.2	Article	222
I.3	Commentaire	233
II.	Bibliographie	234
	Conclusions générales et perspectives	235

Liste des abréviations

Ac	acétyle
ACAT	acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransférase
ACh	acétylcholine
AChE	acétylcholine estérase
ADAM	"a disintegrin and metalloprotease"
ADDLs	"A β -derived diffusible ligands"
ADN	acide désoxyribonucléique
AIBN	2,2'-azobisisobutyronitrile
AICD	domaine intracellulaire de l'APP
AINS	anti-inflammatoire non stéroïdien
APLP1	"A β precursor-like protein 1"
ApoE	apolipoprotéine E
APP	"amyloid precursor protein"
A β	β -amyloïde
BACE 1/2	"bêta-site APP cleaving enzyme" de type 1/2
BC	bathocuproïne disulfonate
BCA	acide bicinchonique
Bn	benzyle
BOP	(benzotriazole-1-yloxy)tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate
BP	bathophénanthroline disulfonate
BSA	albumine de sérum bovin
Bu	butyle
BuChE	butylcholine estérase
cdk-5	kinase cycline-dépendante 5
CE ₅₀	concentration efficace permettant d'obtenir 50 % de l'effet maximal étudié
ChAT	choline acétyltransférase
CI ₅₀	concentration inhibitrice permettant de diminuer de 50 % le phénomène étudié
COX-1/2	cyclooxygénase de type 1/2
CDTA	acide <i>trans</i> -1,2-diaminocyclohexane- <i>N,N,N',N'</i> -tétraacétique
CTi	composé testé n°i
d	doublet
DAPH	4,5-dianilinophthalimide
DAPT	{N-[N-(3,5-difluorophénacétyl)-L-alanyl]-S-phénylglycine <i>t</i> -butyl ester}
dd	doublet dédoublé

DIC	détection par ionisation chimique
DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DTPA	acide diéthylènetriaminepentaacétique
EDDA	acide éthylènediamine- <i>N,N'</i> -diacétique
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
EGTA	acide éthylènebis(oxyéthylènenitrilo)-tétraacétique
EORs	espèces oxygénées réactives
eq	équivalent
Eq.	équation
ER	réticulum endoplasmique
ES	électrospray
Et	éthyle
F-TEDA-BF ₄	1-chlorométhyl-4-fluoro-1,4-diazoniabi-cyclo(2,2,2)octane bis-tétrafluoroborate
GSK-3	kinase glycogène synthase 3
HMG-CoA	3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A
HMQC	"Heteronuclear Multiple Quantum Correlation"
HOBT	1-hydroxybenzotriazole monohydrate
HPLC	chromatographie liquide à haute pression
HRP	péroxydase de raifort ("Horseradish Peroxidase")
IRM	imagerie à résonance magnétique
K _{app}	constante d'affinité apparente
K _a	constante d'affinité
K _d	constante de dissociation
K _i	constante d'inhibition
L	ligand
L _c	ligand compétiteur
LDA	diisopropylamine de lithium
L _s	ligand étudié
m	multiplet
M	métal
MALDI-TOF	désorption/ionisation laser assistée par une matrice – temps de vol
<i>m</i> -CPBA	acide <i>m</i> -chloroperbenzoïque
Me	méthyle
MLCT	transfert de charge du métal vers le ligand ("metal to ligand charge transfert")
MPACs	"metal-protein attenuating compounds"
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
NCS	<i>N</i> -chlorosuccinimide
NDGA	acide nordihydroguaiarétique
NIS	<i>N</i> -iodosuccinimide
NMDA	<i>N</i> -méthyl-D-aspartate
NOE	"nuclear Overhauser enhancement"
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
Pd ₂ (dba) ₂	tris(dibenzylidène-acétone)-dipalladium(0)
Ph	phényle
Phen	phénanthroline
PKC	protéine kinase C
PM	poids moléculaire
PS1/2	préséniline 1/2
q	quadruplet
quint	quintuplet
<i>rac</i> -BINAP	<i>rac</i> -2,2'-bis(diphénylphosphino)-1,1',binaphthyl
RMN	résonance magnétique nucléaire
RPE	résonance para-électronique
s	singulet
SDS	sodium dodécyl sulfate
SM	spectrométrie de masse
SMON	neuropathie myélo-optique subaigüe
t	triplet
t/min	tours par minute
<i>t</i> Bu	<i>tertio</i> -butyle
TEA	triéthylamine
TEP	tomographie à émission de positrons
Tetren	tétraéthylènepentamine
TFA	acide trifluoroacétique
THF	tétrahydrofurane
TPEN	<i>N,N,N',N'</i> -tetrakis(2-pyridylméthyl)éthylènediamine
Trien	triéthylènetétramine
Tris	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UV	ultra-violet
ZnT3	zinc transporteur-3
α /β-APPs	fragment soluble de l'APP résultant de la coupure par l'α- ou la β-sécrétase

Introduction générale

La maladie d'Alzheimer, qui affecte entre 12 et 15 millions d'individus dans le monde, est la maladie neurodégénérative la plus fréquente. Suite au vieillissement de la population, elle constitue à l'heure actuelle un problème majeur de santé publique.

Comme dans plusieurs autres maladies neurodégénératives (maladie de Parkinson, maladie de Huntington ou maladies liées aux prions par exemple), la pathologie est associée à un repliement toxique d'une protéine qui conduit à l'agrégation de celle-ci. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, c'est le peptide β -amyloïde ($A\beta$) qui s'agrège dans le cerveau sous forme de plaques amyloïdes. Les ions métalliques (cuivre, zinc, fer, ...) interagissant avec $A\beta$ sont impliqués dans cette précipitation et prennent également part à sa toxicité *via* la génération d'espèces réactives de l'oxygène induisant des dommages sur de nombreuses entités biologiques (lipides, protéines, ADN).

Seuls deux types de traitements existent actuellement dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, et agissent sur les symptômes cliniques de celle-ci. Des stratégies thérapeutiques ciblant les causes de cette maladie sont donc souhaitables pour lutter contre sa progression. Parmi les différentes voies envisagées, la chélation des ions métalliques interagissant de manière toxique avec le peptide β -amyloïde semble être un axe de recherche intéressant.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au développement de molécules chélatantes à activité anti-Alzheimer potentielle. Dans le but d'améliorer les propriétés de chélation de ligands bidentates du Cu^{II} et du Zn^{II} , notre stratégie a consisté à relier deux de ces ligands par un lien covalent pour former des molécules tétradentates stables afin de pouvoir moduler, en particulier, l'homéostasie des ions métalliques tels que le cuivre dans le cerveau.

L'étude bibliographique présentée dans le premier chapitre de ce mémoire sera consacrée aux mécanismes de la maladie d'Alzheimer. Elle traitera en particulier du peptide β -amyloïde et de son interaction avec les ions métalliques, ainsi qu'aux événements qui lui sont associés et qui conduisent à la dégénérescence et à la mort neuronale. Suite à cette description seront exposées les stratégies thérapeutiques actuelles et en développement.

Le second chapitre rapportera une première étude sur la Cyclo-bi-Phen, un composé de type polyphénanthroline qui chélate les ions métalliques et a montré des effets intéressants sur des souris transgéniques modélisant la maladie d'Alzheimer.

Dans le troisième chapitre, nous décrirons la conception et la synthèse de chélateurs polyquinoléine (principalement bisquinoléine) pour lesquels les entités quinoléine composant ces molécules sont reliées par un bras de jonction en position 2 ou 8 du noyau quinoléine.

Le quatrième chapitre présentera une étude des propriétés de chélation de ces ligands pour les ions métalliques Cu^{II} et Zn^{II} impliqués dans la maladie d'Alzheimer. Il exposera également l'évaluation *in vitro* des chélateurs synthétisés, qui a révélé pour certains composés une activité d'inhibition de la précipitation d' $\text{A}\beta_{42}$ induite par les ions métalliques mais aussi de la production de peroxyde d'hydrogène due aux complexes $\text{A}\beta_{42}$.métal.

Enfin, le dernier chapitre proposera une étude mécanistique concernant la production et la dégradation du peroxyde d'hydrogène par le peptide $\text{A}\beta_{42}$ en présence d'ions métalliques rédox-actifs et d'un réducteur. Le mode d'action des chélateurs vis-à-vis de ces phénomènes de production / dégradation d' H_2O_2 sera également étudié.

Chapitre I

La maladie d'Alzheimer : Mécanismes et stratégies thérapeutiques

I. La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est la maladie neurodégénérative la plus fréquente (elle représente 50 à 60 % des cas de démence estimés) et touchait en 2005 entre 12 et 15 millions d'individus dans le monde (Alzheimer International, www.alz.co.uk). Dans les pays occidentaux, elle constitue la quatrième cause de décès, précédée par les maladies cardiaques, le cancer et les accidents vasculaires cérébraux.

Cette maladie affecte plus de 10 % des personnes de plus de 65 ans. L'âge est un facteur de risque majeur, la probabilité de développer la maladie doublant tous les 5 ans après 65 ans. Avec l'augmentation et le vieillissement de la population, aussi bien dans les pays développés que dans les pays en voie de développement, le nombre de cas de maladie d'Alzheimer va continuer à s'accroître. Ainsi, d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le nombre de personnes de plus de 60 ans atteignait 600 millions en 2001, et les prévisions annoncent 1,2 milliard en 2025 et 2 milliards en 2050. Par ailleurs, en Europe, l'une des régions du monde où la tendance au vieillissement est la plus marquée, la proportion des plus de 60 ans devrait passer de 20 à 35 % d'ici 2050 (OMS, www.who.int/fr). La maladie d'Alzheimer est donc actuellement un problème majeur de santé publique.

I.1 Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques de la maladie d'Alzheimer incluent des troubles importants de la mémoire, particulièrement des événements récents (mémoire épisodique) dans les stades initiaux de la maladie, les faits anciens restant en mémoire jusqu'à un stade avancé de la maladie (Vandenberghe and Tournoy, 2005). L'aggravation des troubles conduit à une perte de cohérence dans le discours et une inintelligibilité de l'expression écrite, ainsi qu'à des détériorations dans d'autres domaines cognitifs interférant avec l'humeur, la raison ou le jugement. Il en découle une altération de la personnalité, des troubles neurologiques (aphasie, crises épileptiques) et une démence prononcée. A un stade final, même des tâches simples comme le maintien de l'hygiène ne peuvent plus être accomplies et le patient devient totalement dépendant. L'agitation et des comportements délirants viennent de plus compliquer la prise en charge du malade par son entourage, ce qui rend la phase terminale de la maladie particulièrement difficile.

Une fois le diagnostic établi, l'espérance de vie peut atteindre 20 ans, même si la durée moyenne de survie se situe entre 5 et 10 ans.

Lésions présentes dans le cerveau

La maladie d'Alzheimer se caractérise par deux types de lésions cérébrales qui avaient été décrites dès 1906 par le médecin psychiatre allemand Alois Alzheimer : les plaques amyloïdes extracellulaires et des enchevêtrements intra-neuronaux de neurofibrilles (Fig. 1) (LaFerla and Oddo, 2005). Ces lésions sont principalement accumulées dans le cortex (partie superficielle du cerveau) et l'hippocampe (Fig. 2).

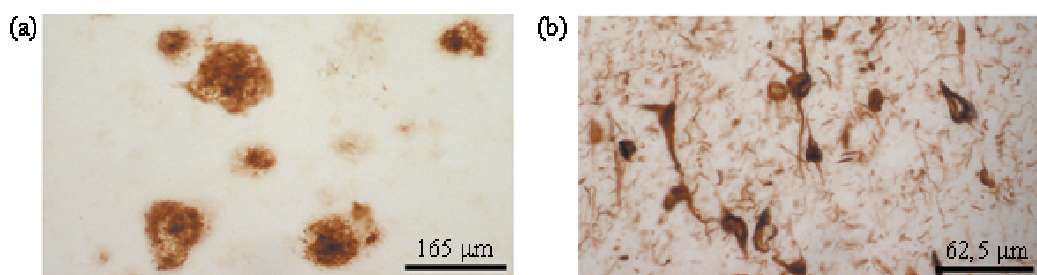


Fig. 1. Plaques et enchevêtrements dans un cerveau de patient atteint de la maladie d'Alzheimer, post mortem (d'après LaFerla and Oddo, 2005). (a) Microphotographie de plaques amyloïdes marquées par des anticorps spécifiques anti-A β 42. (b) Microphotographie de neurofibrilles marquées par des anticorps spécifiques.

De plus, la maladie d'Alzheimer se caractérise par la perte de synapses et de neurones. Ce phénomène a lieu dans un premier temps dans la partie la plus interne du lobe temporal du cerveau (cortex entorhinal et hippocampe), qui est la région vers laquelle convergent les informations pour être mises en mémoire (Fig. 2). Les lésions se développent ensuite vers les lobes pariétaux, occipitaux et frontaux, pour envahir presque tout le cerveau, sans toutefois atteindre les centres de commande de la motricité.

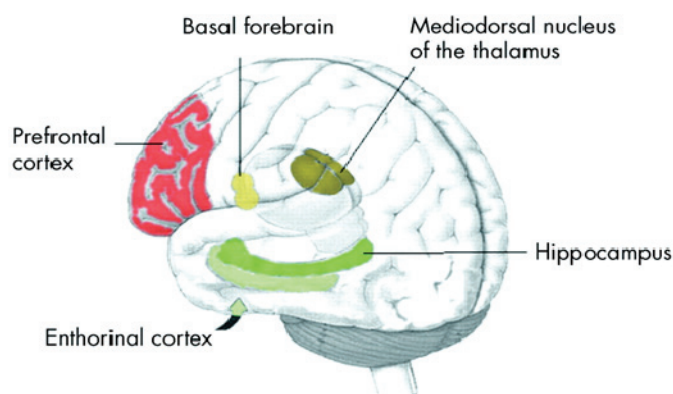


Fig. 2. Représentation des zones du cerveau impliquées dans la mémoire épisodique (d'après Vandenberghe and Tournoy, 2005).

Enfin, le cerveau des malades d'Alzheimer présente d'autres altérations neuropathologiques (Fig. 3) incluant l'atrophie du cerveau, la réduction sélective de certains systèmes de neurotransmetteurs (tels que l'acétylcholine) qui sont retrouvés en particulier dans les zones associées aux plaques amyloïdes et aux neurofibrilles et une diminution du métabolisme énergétique. On trouve également dans le cerveau de ces malades un taux de stress oxydant important et un niveau élevé d'inflammation (Mattson, 2004).

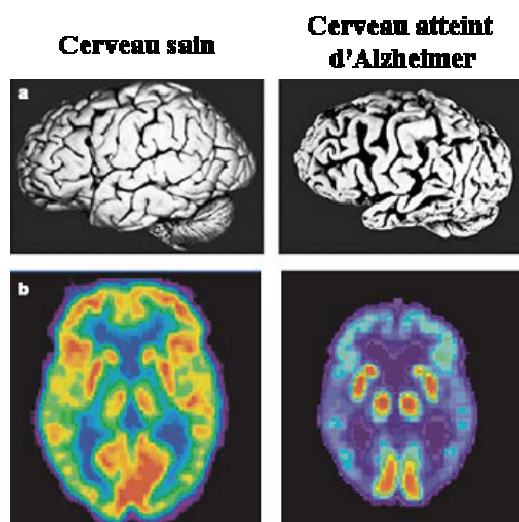


Fig. 3. Comparaison de cerveaux de personnes saines et d'individus atteints de la maladie d'Alzheimer (d'après Mattson, 2004). (a) Volume global du cerveau (rétrécissement marqué du lobe temporal (partie basse) et des lobes frontaux (partie gauche)). (b) Imagerie TEP révélant le glucose : le patient atteint de la maladie d'Alzheimer montre une forte diminution du métabolisme énergétique dans le cortex frontal (haut du cerveau) et les lobes temporaux (sur les côtés).

I.2 Diagnostic

Le diagnostic actuel de la maladie d'Alzheimer repose sur la combinaison de tests neuropsychologiques et de techniques d'imagerie cérébrale (IRM, tomographie à émission de positrons (TEP)). Cependant, à l'heure actuelle, aucune de ces techniques n'est capable de détecter les troubles ou les lésions à des stades précoces, ce qui est problématique pour une prise en charge rapide des malades. Aujourd'hui encore, un diagnostic certain ne peut être établi que par l'observation des plaques amyloïdes et des enchevêtrements de neurofibrilles lors d'un examen *post mortem*.

De plus, il faut noter que pendant de nombreuses années l'absence d'un modèle animal de la maladie, propre à l'homme, a constitué un lourd handicap pour la compréhension de la pathologie et l'exploration de nouveaux axes thérapeutiques. En

effet, la maladie d'Alzheimer se développe lentement et toute amélioration est essentiellement évaluée par des tests comportementaux de fiabilité limitée.

Il est actuellement possible d'utiliser des souris transgéniques pour tester des hypothèses biologiques et des molécules ayant une activité thérapeutique potentielle. Ces souris sont produites par surexpression de un à deux (voire trois) gènes humains, le plus souvent mutés, impliqués dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Les souris transgéniques résultantes, bien que ne développant pas tous les aspects de la maladie d'Alzheimer, sont des modèles puissants pour l'étude des lésions caractéristiques de la maladie et des déficits cognitifs associés (Higgins and Jacobsen, 2003).

Nous nous attacherons dans la suite de cet exposé à établir un lien entre les observations cliniques associées aux déficits cognitifs (les plus dramatiques étant la dégénérescence des neurones et la perte de synapses) et les causes de ces dysfonctionnements.

II. Systèmes cellulaires perturbés dans la maladie d'Alzheimer

II.1 Introduction : les cellules du tissu nerveux

II.1.1 Les neurones et la transmission neuronale

Le neurone est un type de cellule différenciée qui compose, avec les cellules gliales, le tissu nerveux. Il est composé d'un corps cellulaire et de prolongements de deux types : les dendrites et l'axone (Fig. 4). Son rôle est d'assurer la transmission du signal nerveux. *Il est important de noter que la plupart des neurones sont incapables de division cellulaire. Cette incapacité fait qu'un traumatisme endommage le système nerveux de façon irréversible.*

Lors de la transmission neuronale, les dendrites reçoivent une information provenant d'autres neurones sous la forme d'un potentiel membranaire électrique (potentiel d'action). Celui-ci est engendré par un flux d'ions Ca^{2+} dans la cellule au travers

des canaux ioniques suivi d'un efflux de K^+ à travers la membrane pour restaurer le potentiel membranaire au repos. Cet influx nerveux se propage de proche en proche le long de l'axone, puis est transféré au neurone suivant au niveau de la synapse. Le signal électrique y est alors converti en signal chimique : l'axone du neurone présynaptique contient des neurotransmetteurs chimiques qui sont libérés au niveau de la synapse sous l'influence du potentiel d'action. Le neurotransmetteur diffuse dans la fente synaptique et se lie à des récepteurs spécifiques sur le neurone post-synaptique, initiant un signal qui sera à son tour transmis dans cette cellule (Fig. 4).

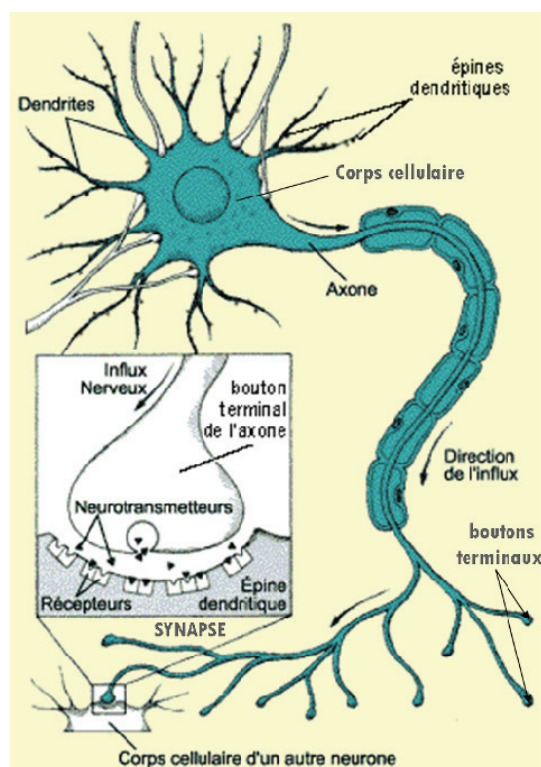


Fig. 4. Représentation schématique d'un neurone et d'une synapse (d'après www.lecerveau.mcgill.ca).

De plus, la mémoire et l'apprentissage sont associés à la transmission neuronale par un processus appelé potentialisation à long terme. Ce phénomène consiste en un renforcement de l'activité et de l'efficacité des synapses sur de longues durées, *via* des changements morphologiques durables des neurones.

II.1.2 Les cellules gliales

Les cellules gliales sont une composante majeure du système nerveux central, leur nombre étant environ trois fois supérieur à celui des neurones. Sans participer de façon

directe à la neurotransmission, les cellules gliales jouent un rôle de soutien qui contribue à la définition des contacts synaptiques et au maintien des capacités de transmission des signaux des neurones.

On trouve dans le système nerveux central plusieurs types de cellules gliales, dont les astrocytes et les cellules microgliales. Les astrocytes assurent un support mécanique aux neurones et les approvisionnent en nutriments. Ils ont de plus un rôle de digestion et d'élimination des "déchets". Les cellules microgliales constituent quand à elles la première ligne de défense contre les envahisseurs étrangers, avec un rôle comparable à celui des macrophages.

II.2 Dysfonctionnement des systèmes de neurotransmetteurs dans la maladie d'Alzheimer

Certains systèmes de neurotransmetteurs (acétylcholine et glutamate) sont particulièrement affectés lors de la maladie d'Alzheimer, en particulier dans les zones du cerveau les plus touchées par la maladie que sont l'hippocampe et le cortex.

II.2.1 L'acétylcholine

L'acétylcholine (ACh) est un neurotransmetteur important impliqué dans l'attention et l'apprentissage. Son taux est régulé par deux enzymes : elle est synthétisée à partir de la choline par la choline acétyltransférase (ChAT) et hydrolysée par l'acétylcholine estérase (AChE) (Schéma 1).

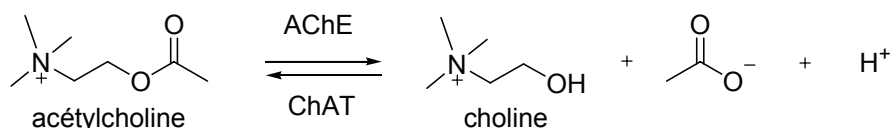


Schéma 1. Libération de la choline à partir de l'acétylcholine.

Dans les parties endommagées du cerveau des malades atteints par la maladie d'Alzheimer, on observe une perte importante de neurones cholinergiques avec de faibles niveaux d'acétylcholine dans l'espace intersynaptique (Fig. 5). Ce faible niveau d'acétylcholine ne peut être relié seulement à l'activité de l'acétylcholine estérase. En effet, l'activité de cette enzyme diminue lors de la progression de la maladie. L'existence d'une enzyme de la même famille, la butylcholine estérase (BuChE), qui reconnaît

également l'acétylcholine comme substrat et dont l'activité croît au cours de la maladie, pourrait expliquer ce déficit en acétylcholine (Scarpini *et al.*, 2003).

Le déficit en acétylcholine se traduit par une diminution des fonctions cognitives suite à une diminution de l'activation des récepteurs cholinergiques.

De plus, la maladie d'Alzheimer présente également une diminution du nombre de récepteurs nicotiques (type N) dans le cortex cérébral et l'hippocampe (Hellström-Lindhal, 2000), ce qui constitue un handicap supplémentaire pour la transmission neuronale cholinergique.

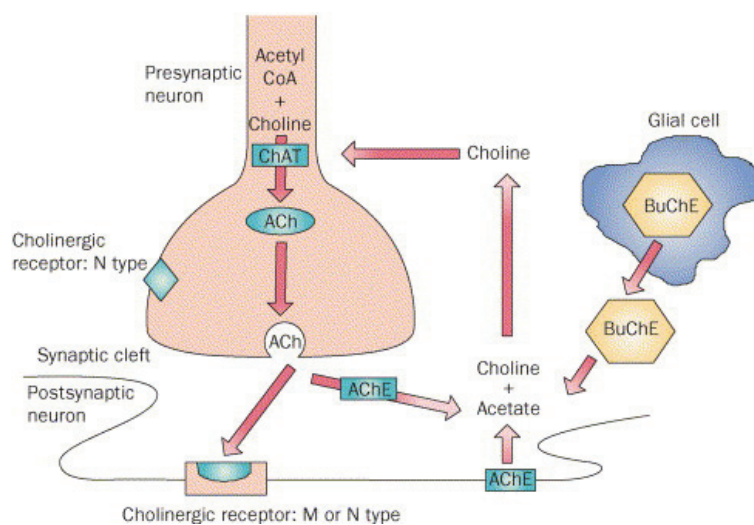


Fig. 5. Représentation schématique du système cholinergique (d'après Scarpini *et al.*, 2003). ChAT : choline acétyltransférase, ACh : acétylcholine, AChE : acétylcholine estérase, BuChE : butyrylcholine estérase, récepteurs cholinergiques de types M : muscariniques et N : nicotiniques.

II.2.2 Le glutamate : phénomène d'excitotoxicité

Le glutamate est un neurotransmetteur exciteur majeur du système nerveux central. Les neurones à glutamate sont impliqués dans les processus cognitifs du cortex tels que l'apprentissage et la mémoire, dont le processus de potentialisation à long terme.

Lors de la maladie d'Alzheimer, des dysfonctionnements du métabolisme énergétique et des systèmes de transport du glutamate, ainsi que le stress oxydant, conduisent à l'accumulation de ce neurotransmetteur dans les synapses. Or le glutamate endogène induit un effet neurotoxique (appelé excitotoxicité) *via* l'activation excessive des récepteurs qui lui sont associés, en particulier les récepteurs du NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate).

Le récepteur du NMDA est couplé à un canal ionique perméable au Ca^{2+} (et au Na^+) (Fig. 6). Au potentiel de repos de celle-ci, ce canal calcique est bloqué par des ions Mg^{2+} . Une dépolarisation de la membrane permet d'expulser le Mg^{2+} . Dans ces conditions, et si du glutamate est fixé sur le récepteur, le canal ionique s'ouvre, permettant un influx de Ca^{2+} dans la cellule. L'hyperactivation des récepteurs du NMDA par le glutamate en excès est accompagnée d'une entrée massive des ions calcium dans la cellule neuronale qui est toxique pour celle-ci, comme cela sera évoqué par la suite (Lipton, 2006).

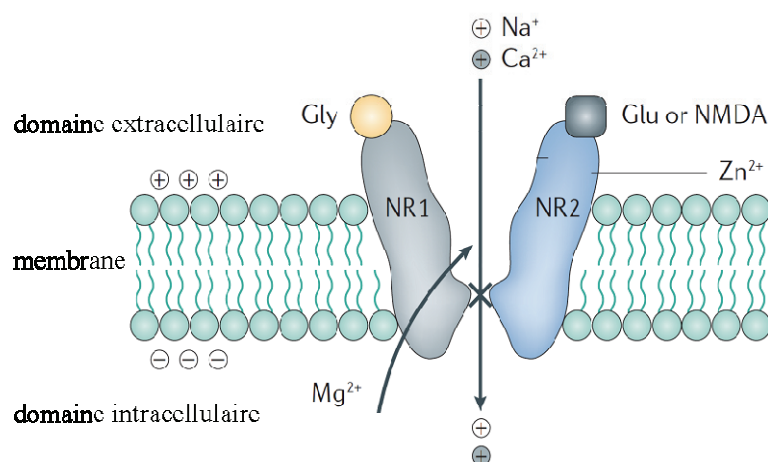


Fig. 6 : Représentation du récepteur du NMDA activé par le glutamate (d'après Lipton, 2006). "NR1" et "NR2" : sous-unités 1 et 2 du récepteur du NMDA. "Glu or NMDA" : site de liaison du glutamate ou du NMDA. "Gly" : site de liaison de la glycine. " Zn^{2+} " : site de liaison du Zn^{2+} .

II.2.3 Le zinc "libre" comme neuromodulateur

Parmi les espèces libérées au niveau des synapses de l'hippocampe, on trouve également des ions métalliques, et en particulier le Zn^{II} (Atwood *et al.*, 1999).

Le Zn^{II} "libre", c'est-à-dire rapidement échangeable, est contenu dans les vésicules synaptiques de certains neurones situés principalement au niveau de l'hippocampe. Il est libéré de manière Ca^{2+} -dépendante dans la fente synaptique lors de la transmission du signal nerveux, à des concentrations pouvant atteindre 300 μM . Le Zn^{II} peut alors pénétrer dans le neurone post-synaptique par l'intermédiaire de canaux perméables au zinc (Frederickson, 2003).

Il a un rôle de neuromodulateur, permettant le transport d'information d'une cellule à une autre.

Du Cu^{II} échangeable est également libéré dans la fente synaptique, mais à des concentrations beaucoup plus faibles que pour le Zn^{II} (de l'ordre de 15 μM) (Atwood *et al.*, 1999).

II.3 Toxicité générée par le dérèglement de l'homéostasie du calcium

L'ion calcium est le messager intracellulaire le plus important du cerveau. Il joue un rôle fondamental dans les processus d'apprentissage et de mémoire et est impliqué dans la survie et la mort neuronale.

L'incapacité des neurones à réguler l'homéostasie du Ca^{2+} est un aspect de la maladie d'Alzheimer intimement responsable de la mort des neurones.

En effet, des taux élevés de calcium intracellulaire ont de nombreuses conséquences délétères. Ainsi, une concentration élevée de Ca^{2+} génère du stress oxydant via la surconcentration de calcium dans les mitochondries. De plus, une dérégulation de l'homéostasie du calcium a un impact sur les fonctions neuronales dépendant du calcium telles que la libération de neurotransmetteurs et la plasticité synaptique.

Enfin, l'excès de Ca^{2+} intracellulaire cause l'activation de kinases, caspases et d'autres facteurs d'induction d'apoptose, conduisant à la perte des neurones (Lipton, 2006; Suh and Checler, 2002).

II.4 Inflammation

La mort des cellules nerveuses dans la maladie d'Alzheimer est accompagnée de phénomènes inflammatoires, les marqueurs de cette inflammation étant significativement plus élevés dans le cerveau des malades que chez les contrôles (Suh and Checler, 2002).

Les cellules microgliales et les astrocytes sont alors à l'origine de la libération de médiateurs inflammatoires (cytokines, chémokines, facteur de croissance TGF, facteur de transmission $\text{NF}\kappa\text{B}$,...) et de la production d'espèces oxygénées réactives à la suite de l'activation du complément. Tous ces phénomènes issus du processus d'inflammation peuvent faciliter le développement de stress oxydant et / ou induire l'apoptose (Bachurin, 2003).

III. Dégénérescence des axones et disparition des synapses dans la maladie d'Alzheimer

Le dysfonctionnement des synapses est un événement précoce dans la maladie d'Alzheimer et précède la mort neuronale. En perturbant la transmission du signal nerveux au niveau synaptique, il est responsable des déficits cognitifs et de la perte de mémoire observés dans la maladie.

Ce problème trouve son origine dans les enchevêtrements de neurofibrilles observés dans les neurones au sein des zones du cerveau touchées par la maladie d'Alzheimer. Il faut noter que ce type de lésions n'est pas spécifique à la maladie d'Alzheimer, mais est également retrouvé dans d'autres maladies neurodégénératives regroupées sous le terme de "taupathies" car elles impliquent la même protéine tau. Des exemples de taupathies sont la démence fronto-temporale avec parkinsonisme liée au chromosome 17, la maladie de Pick ou encore la paralysie supranucléaire progressive (LaFerla and Oddo, 2005).

III.1 La protéine tau et son implication dans les neurofibrilles

III.1.1 La protéine tau

La protéine tau est responsable de l'assemblage et de la stabilisation des microtubules, qui sont des composants essentiels du cytosquelette des neurones. Les microtubules structurent les axones et assurent le transport intracellulaire.

Dans son état natif, tau est une protéine comprenant entre 352 et 441 acides aminés (de masse 55 à 62 kDa) et existant sous six isoformes produites à partir d'un gène unique situé sur le chromosome 17. Des mutations ont été reportées sur ce gène, conduisant notamment à la démence fronto-temporale avec parkinsonisme, mais aucune n'a été reliée à la maladie d'Alzheimer (LaFerla and Oddo, 2005). Ces protéines ont la particularité de posséder dans leur séquence trois à quatre répétitions d'un même domaine qui permet la liaison aux microtubules (Fig. 7). Celle-ci est fortement régulée par la phosphorylation de la protéine tau au niveau de résidus sérine et thréonine.

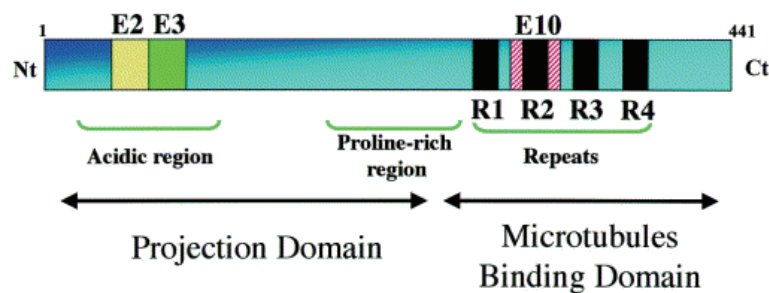


Fig. 7. Représentation de l'isoforme la plus longue de la protéine tau (d'après Buée *et al.*, 2000). Le domaine de projection interagit avec le cytosquelette et le domaine de liaison aux microtubules régule la polymérisation de ceux-ci.

III.1.2 Les neurofibrilles

Les enchevêtrements de neurofibrilles sont constitués d'agrégats de protéines tau sous forme hyperphosphorylée (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986). De nombreuses kinases, dont GSK-3 (kinase glycogène-synthase 3) et cdk-5 (kinase cycline-dépendante 5), sont impliquées dans l'hyperphosphorylation de tau (Buée *et al.*, 2000). Elles sont notamment activées par le stress oxydant et le Ca^{2+} en excès. En effet, les neurones affectés par les enchevêtrements de neurofibrilles présentent des taux de calcium élevés et des signes d'hyperactivation des protéases et des kinases Ca^{2+} -dépendantes (Mattson, 2004).

Suite à cette hyperphosphorylation, tau se dissocie des microtubules (Bramblett *et al.*, 1993).

La protéine tau hyperphosphorylée libérée montre une solubilité nettement plus faible. Elle est aussi plus sensible aux modifications chimiques induites par le stress oxydant (Takeda *et al.*, 2000). Elle subit des changements conformationnels à la suite de son oxydation puis s'agrège sous forme de paires hélicoïdales de filaments, selon un processus de polymérisation avec étape de nucléation (Barghorn and Mandelkow, 2002). Enfin, les paires de filaments s'associent en structures plus grandes : les neurofibrilles. Par ailleurs, il est suggéré que les ions Al^{III} et Fe^{III} , retrouvés associés à tau dans des cerveaux de patients *post mortem*, soient impliqués dans la polymérisation des protéines tau hyperphosphorylées (Sayre *et al.*, 2000; Shin *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 1997a).

III.1.3 Toxicité des neurofibrilles

Ces structures en filaments hélicoïdaux présentes dans le cytoplasme des neurones sont responsables de neurodégénérescence. Leur nombre et leur localisation dans le

cerveau de malades d'Alzheimer a pu être corrélé à la dégénérescence des neurones et au niveau de démence (Arriagada *et al.*, 1992).

En effet, l'hyperphosphorylation de tau inhibe l'assemblage des microtubules et cause leur dissociation, conduisant à la perturbation du cytosquelette neuronal. Il en résulte une altération du transport intracellulaire vers les parties les plus éloignées du corps cellulaire. Ces deux phénomènes conduisent à la disparition progressive des axones et par conséquent des synapses. Il s'en suit une altération de la mémoire à court terme, de la cognition et des capacités d'apprentissage qui mènent à la démence.

IV. Le peptide β -amyloïde : une origine possible de la maladie d'Alzheimer

Bien que les principaux symptômes de la maladie d'Alzheimer aient été décrits, nous n'avons pas encore proposé de causes à ces effets délétères. L'origine du stress oxydant, le lien avec les systèmes de neurotransmetteurs et le déclenchement de la pathologie associée à tau restent à définir.

Cette origine est très probablement liée au peptide β -amyloïde ($A\beta$), qui est le composant principal des plaques amyloïdes caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.

IV.1 Origine d' $A\beta$: la protéine APP

Le peptide $A\beta$ est issu de la protéolyse de la protéine APP ("Amyloid Precursor Protein") dont le gène est situé sur le chromosome 21 et code pour plusieurs isoformes d'APP. Les APP sont des glycoprotéines transmembranaires de taille variable (entre 695 et 770 résidus). Elles possèdent une longue partie N-terminale située dans le domaine extracellulaire, une partie transmembranaire et une courte région C-terminale dans le cytoplasme (Fig. 8). Les protéines APP sont exprimées dans tous les tissus, mais il faut noter que les neurones expriment plus particulièrement la forme APP₆₉₅ que l'on trouve en forte quantité dans le cerveau (Clippingdale *et al.*, 2001). Dans cet organe, APP est produite dans le corps neuronal puis est transportée le long des axones jusqu'aux

synapses, où elle est principalement concentrée au niveau de structures membranaires en "raft".

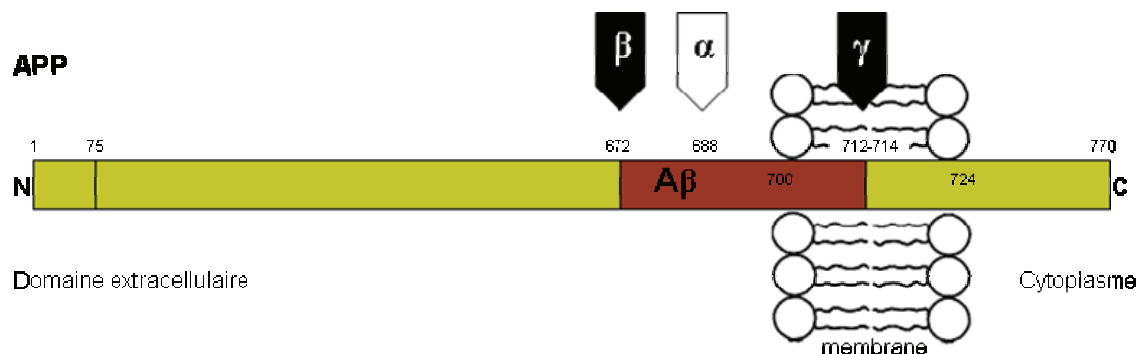


Fig. 8. Représentation schématique de la protéine APP. La numérotation des acides aminés de l'APP est donnée pour la forme la plus longue (770 acides aminés). La forme comportant 695 résidus commence en position 75. "α", "β" et "γ" indiquent les sites de coupure de l'APP par les enzymes α-, β-, et γ- sécrétases, respectivement.

Le rôle de ces protéines n'est pas totalement compris actuellement, mais une hypothèse fréquemment rencontrée dans la littérature propose leur implication dans la régulation de l'homéostasie du cuivre dans les neurones (Gaggelli *et al.*, 2006; Maynard *et al.*, 2002; White *et al.*, 1999). En effet, APP fixe un équivalent de Cu^{II} avec une valeur de $K_D = 10 \text{ nM}$ (Hesse *et al.*, 1994), et des études RMN ont mis en évidence le rôle des His^{147} et His^{151} , de la Tyr^{168} et de la Met^{170} dans une sphère de coordination tétraédrique pouvant favoriser la coordination de Cu^{I} (Barnham *et al.*, 2003; Multhaup *et al.*, 1996).

Les protéines APP sont dégradées par des protéases appelées sécrétases (Fig. 9).

L'APP est coupée dans un premier temps par l'α- ou la β-sécrétase (Selkoe, 2001). L'α-sécrétase coupe près du domaine transmembranaire, au milieu de la région Aβ de l'APP, pour sécréter un large ectodomaine hydrosoluble (α-APPs) et laisser un fragment de 83 acides aminés (C83) dans la membrane. La β-sécrétase coupe APP plus loin de la membrane, ce qui produit un ectodomaine soluble appelé β-APPs et un fragment C-terminal de 99 résidus (C99).

C83 et C99 sont tous deux substrats d'une troisième protéase, la γ-sécrétase. Cette enzyme est constituée d'un complexe multi-protéique, comprenant la préséniline, la nicastrine, Aph-1 et Pen-2 (De Strooper, 2003). Elle catalyse une hydrolyse inhabituelle car se produisant au sein de la région transmembranaire. L'hydrolyse de C83 par la γ-sécrétase libère le fragment p3, alors que C99 est coupé pour donner le peptide Aβ. Ce dernier correspond à la partie N-terminale de C99. Il est libéré à l'extérieur de la cellule,

essentiellement au niveau des synapses, où la protéine APP est majoritairement localisée. Néanmoins, une localisation intraneuronale d'A β a aussi été mise en évidence au moyen d'anticorps dans des cellules de souris transgéniques APP2576 et des extraits de cerveaux humains (Takahashi *et al.*, 2002).

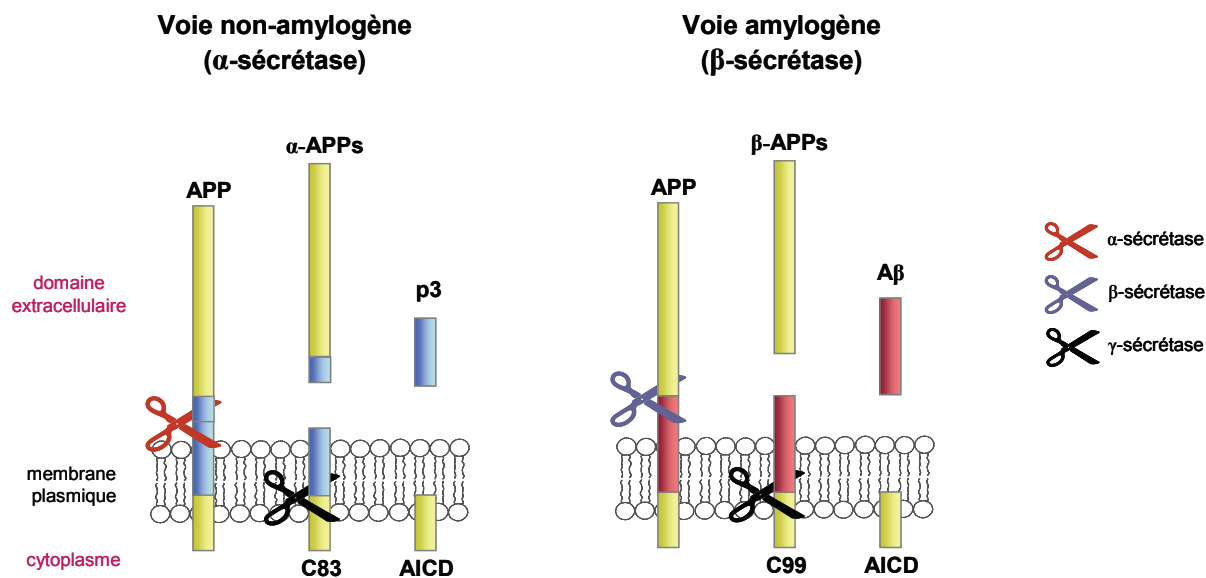


Fig. 9. Les voies de protéolyse de la protéine APP. AICD : domaine intracellulaire de l'APP (d'après Selkoe, 2001).

IV.2 Le peptide β-amyloïde (A β)

Lors de la production d'A β par la γ-sécrétase, la coupure du fragment C99 est hétérogène. Elle conduit principalement (dans près de 90 % des cas) à un peptide A β de 40 acides aminés noté A β_{40} . Cependant, d'autres formes plus courtes ou plus longues sont également produites (entre 39 et 43 acides aminés), en particulier la forme A β_{42} (Fig. 10), qui représente environ 10 % des espèces d'A β produites.

Asp¹-Ala-Glu-Phe-Arg-His⁶-Asp-Ser-Gly-Tyr¹⁰-Glu-Val-His¹³-His¹⁴-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met³⁵-Val-Gly-Gly-Val-Val⁴⁰-Ile⁴¹-Ala⁴²

Fig. 10. Séquence du peptide A β_{42} , écrite du N-terminal vers le C-terminal. La partie en gras correspond au domaine transmembranaire (d'après Clippingdale *et al.*, 2001). A β_{40} ne comporte pas Ile⁴¹ et Ala⁴² (en bleu). Les acides aminés en rouge ont été évoqués comme impliqués dans la coordination des ions métalliques et / ou la production d'espèces oxygénées réactives.

Les deux peptides A β ₄₀ et A β ₄₂ sont présents en tant qu'espèces solubles dans les fluides biologiques de tous les individus.

Cependant, les peptides A β sont enclins à l'agrégation. Cette agrégation est considérée comme un événement critique dans la maladie d'Alzheimer. Dans le cerveau des malades d'Alzheimer, la majorité de l'A β est en effet agrégé sous forme d'oligomères et de fibrilles, ou de plaques plus ou moins denses (Clippingdale *et al.*, 2001). La forme A β ₄₂ est la principale composante de ces agrégats (Iwatsubo *et al.*, 1994) et elle est supposée jouer un rôle plus important qu'A β ₄₀ dans la pathologie.

IV.2.1 Oligomérisation et fibrillation d'A β en absence d'ions métalliques

Le peptide A β libéré lors de la protéolyse de l'APP est une espèce monomérique soluble. La structure secondaire de ce monomère est essentiellement non organisée ("random coil"), avec une faible proportion d'hélices- α (Clippingdale *et al.*, 2001).

Une étape clé dans l'agrégation d'A β est la transition de cette structure secondaire vers une structure en feuillets- β (Walsh *et al.*, 1999).

Cet effet est dépendant du solvant, du pH et de la force ionique, ainsi que de la concentration en peptide (Bitan *et al.*, 2003; Clippingdale *et al.*, 2001; Jarrett *et al.*, 1993). En particulier, un pH compris entre 4 et 7 favorise la formation de structures en feuillets- β (Soto *et al.*, 1995).

Ces structures en feuillets- β sont stabilisées par des interactions hydrophobes. Elles ont tendance à interagir entre elles pour former des structures oligomériques de type protofibrille (Walsh *et al.*, 1997). Toutefois, d'autres assemblages oligomériques solubles ont également été décrits, tels que des oligomères globulaires d'A β (allant des trimères aux 12-mères principalement) appelés ADDLs (pour "A β -derived diffusible ligands") (Gong *et al.*, 2003; Lambert *et al.*, 1998). Ces espèces ont pu être détectées *ex vivo* sur des coupes de cerveaux humains par des anticorps spécifiques de ces espèces oligomériques d'A β (Gong *et al.*, 2003).

Les protofibrilles s'associent également en structures plus grandes sous la forme de fibrilles "torsadées" (de diamètre de 6 à 10 nm et de longueur indéterminée) qui peuvent être visualisées par des colorants spécifiques des structures en feuillets- β tels que la thioflavine T (Walsh *et al.*, 1999).

Une étude récente de RMN [^{15}N , ^1H] basée sur des échanges hydrogène/deutérium, associée à des résultats antérieurs issus d'expériences de RMN du solide et d'études de mutagenèse, a pu conduire à un modèle tridimensionnel de ces structures fibrillaires impliquant $\text{A}\beta_{42}$ (Fig. 11). A l'intérieur d'un même peptide, les résidus 1-17 sont désordonnés et les résidus 18-42 forment deux brins- β antiparallèles (acides aminés 18 à 25 et 31 à 42) (Fig. 11, C). Des interactions hydrophobes entre feuillets- β stabilisent l'association de différents peptides $\text{A}\beta$ de manière parallèle (Fig. 11, A). Une interaction ionique forte entre les résidus Lys^{28} et Asp^{23} de deux peptides (Fig. 11, B) favorise également l'association des peptides et la croissance de protofibrilles (Fig. 11, C). Ces dernières s'associent à leur tour pour former des fibrilles (Fig. 11, E) (Lührs *et al.*, 2005).

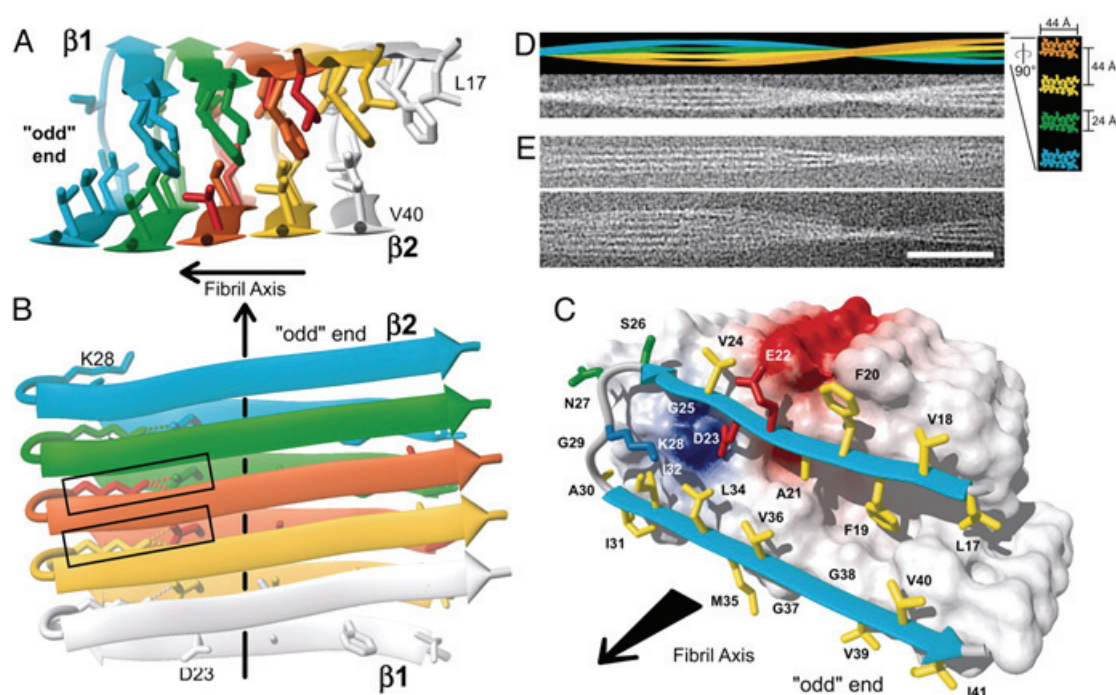


Fig. 11. Structure tridimensionnelle d'une fibrille d' $\text{A}\beta_{42}$ (oxydé sur Met^{35}) (d'après Lührs *et al.*, 2005). La direction de l'axe de la fibrille est indiquée par les flèches. (A et B) Structure en rubans des résidus 17-42 illustrant la nature intermoléculaire des interactions entre les feuillets β . (C) Polarité de la surface de van der Waals (code couleur des résidus : jaune : hydrophobe, vert : polaire, rouge : chargé négativement et bleu : chargé positivement). (D) Simulation d'une fibrille constituée de 4 protofibrilles. (E) Exemples de micrographies de fibrilles d' $\text{A}\beta_{42}$ (oxydé sur Met^{35}), échelle de la barre : 50 nm.

Des structures issues d'expériences de RMN du solide ont également été réalisées pour des fibrilles d' $\text{A}\beta_{40}$. Elles ont aussi mis en évidence des structures en brins- β antiparallèles pour les résidus 10 à 22 et 30 à 40 d'une séquence d' $\text{A}\beta_{40}$, qui s'assemblent de manière parallèle pour former les fibrilles d' $\text{A}\beta_{40}$. Dans ce modèle, les liaisons stabilisant les feuillets- β sont intramoléculaires. Des liaisons intermoléculaires

ponctuelles, telles que l'interaction électrostatique entre Lys²⁸ et Asp²³, stabilisent les fibrilles (Petkova *et al.*, 2006).

En fait, A β ₄₀ et A β ₄₂ adoptent des structures différentes en solution et ne s'agrègent pas selon le même mécanisme (Bitan *et al.*, 2003), ce qui conduit probablement à ces modèles structuraux différents suivant le peptide étudié. Des études cinétiques ont indiqué que la fibrillation comporte deux étapes pour les deux peptides : une étape lente de nucléation suivie d'une étape rapide de polymérisation. Ces deux étapes sont accélérées dans le cas d'A β ₄₂ (Jarrett *et al.*, 1993), de part la formation préalable de pentamères ou d'hexamères qui s'associent ensuite entre eux lors de la fibrillation (Bitan *et al.*, 2003). Ces structures multimériques, observées par chromatographie d'exclusion stérique, n'ont pas été retrouvées dans le cas d'A β ₄₀. Cette absence de pré-organisation explique probablement la polymérisation plus lente de ce dernier.

L'hydrophobicité supérieure d'A β ₄₂ par rapport à ses analogues plus courts peut expliquer ce phénomène. Il montre une plus faible solubilité et une tendance plus forte à former des structures en feuillets- β . Il possède ainsi une très forte capacité à s'agréger, environ 70 fois plus rapidement qu'A β ₄₀ (Clippingdale *et al.*, 2001).

IV.2.2 Agrégation d'A β en présence d'ions métalliques

IV.2.2.1 *Les ions métalliques dans la maladie d'Alzheimer*

Les ions métalliques sont impliqués dans la maladie d'Alzheimer, ainsi que dans de nombreuses autres maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, la maladie de Creutzfeldt-Jacob, ou encore la sclérose latérale amyotrophique (Gaggelli *et al.*, 2006).

Ils sont présents dans le cerveau sain à des concentrations relativement élevées (Atwood *et al.*, 1999), où ils participent à l'activité neuronale au niveau des synapses (Zn^{II} en particulier) et assurent le fonctionnement des métalloprotéines (cytochrome c oxydase, Cu/Zn superoxyde dismutase, ...). Ainsi, le Zn^{II} est présent dans le néocortex à une concentration de l'ordre de 150 à 200 μ M (soit dix fois plus que dans le sang), et sa concentration peut atteindre 300 μ M dans la fente synaptique lors de la transmission du signal nerveux. Le Cu^{II} est également très abondant dans le cerveau, à des concentrations comprises entre 60 et 110 μ M. Quand au fer (sous forme de Fe^{III} ou de Fe^{II}), sa

concentration dans l'hippocampe et le cortex cérébral peut atteindre 400 à 600 μM , soit 10 à 50 fois plus que dans le sang.

Or le processus de vieillissement, en relation avec la dérégulation du métabolisme énergétique, conduit à une diminution du contrôle strict de la teneur et de la distribution des ions métalliques. Leur concentration augmente, avec l'âge de l'individu, dans de nombreux tissus, et dans le cerveau en particulier (Atwood *et al.*, 1999). On retrouve ce phénomène accru dans le cas de la maladie d'Alzheimer. Dans le cerveau des malades, les concentrations en ions cuivre, zinc et fer sont plus élevées que la normale, en particulier dans les plaques amyloïdes et à proximité de celles-ci (Tableau 1) (Atwood *et al.*, 1999; Lovell *et al.*, 1998).

	Cuivre (μM)	Fer (μM)	Zinc (μM)
Plaques séniles	393	940	1055
Neuropile – malade d'Alzheimer	304	695	786
Neuropile – contrôle sain	69	338	346

Tableau 1. Concentrations en ions métalliques dans les plaques amyloïdes et le neuropile (zone de la substance grise située entre les corps cellulaires et les capillaires sanguins et qui comprend les ramifications des neurones et des cellules gliales, ainsi que les synapses) de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (d'après Atwood *et al.*, 1999).

IV.2.2.2 Interaction d'A β avec les ions métalliques

Les peptides A β complexent les ions métalliques, en particulier le Cu^{II} et le Zn^{II} , qui ont été retrouvés à proximité de structures riches en A β *ex vivo* (Cherny *et al.*, 1999). Une étude récente de microscopie couplée à une analyse spectrométrique Raman a montré que ces deux ions métalliques sont coordonnés à A β dans les extraits de cerveaux humains, faisant de A β une métalloprotéine (Dong *et al.*, 2003). Le Fe^{III} (ou le Fe^{II}) pourrait également interagir avec A β , mais cette chélation est plus sujette à caution et dépend des conditions d'analyse. Enfin, d'autres ions métalliques comme le Co^{II} ou le Ni^{II} sont également capables d'interaction avec A β *in vitro* (Atwood *et al.*, 1998).

Des constantes d'affinité très élevées entre A β et les ions métalliques Cu^{II} et Zn^{II} ont été estimées par des expériences de compétition avec différents chélateurs (Atwood *et al.*, 2000) ou des études de chélation en présence de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ (Bush *et al.*, 1994a) (Tableau 2).

Ion métallique (M)	pH	Stœchiométrie M / A β	log K		Référence
			A β_{40}	A β_{42}	
Cu ^{II}	pH = 7,4	0,5	10,3	17,2	Atwood <i>et al.</i> , 2000
		2	7,9	8,3	
Cu ^{II}	pH = 6,6	0,5	9,6	16,3	Atwood <i>et al.</i> , 2000
		2,5	7,0	7,5	
Zn ^{II}	pH = 7,4	0,7	7,0	n.d.	Bush <i>et al.</i> , 1994a
		2,5	5,3	n.d.	

Tableau 2. Valeur du logarithme des constantes d'affinité (log K) des formes A β_{40} et A β_{42} pour les ions métalliques Cu^{II} et Zn^{II}. N.d. : non déterminé.

L'affinité d'A β pour le Cu^{II} est la plus étudiée. A pH = 7,4, A β_{42} pourrait chélater jusqu'à 2,5 équivalents de Cu^{II}, en liant ces ions métalliques au niveau d'un site de forte affinité (log K = 17,2) et d'un site de plus faible affinité (log K = 8,3). Dans le cas d'A β_{40} , les constantes d'affinité sont nettement plus faibles, en particulier pour le site de forte affinité. Il a été proposé que les atomes de Cu^{II} se fixent de manière coopérative sur ces peptides. Par ailleurs, une diminution du pH de 7,4 à 6,6 diminue l'affinité d'A β_{42} ou A β_{40} pour le Cu^{II} d'environ 1 unité de log (Atwood *et al.*, 2000).

Dans d'autres études, seul un site de coordination qui pourrait correspondre au site de plus faible affinité pour le Cu^{II} a été observé. Ainsi, une première étude par spectrophotométrie UV-visible proposait pour A β_{42} , à pH = 7,4, une valeur de log K = 6,5 pour son affinité envers le Cu^{II} (Atwood *et al.*, 1998). Ces valeurs de constantes d'affinité restent un sujet de discussion et d'autres types d'analyse n'ont fait apparaître que des valeurs beaucoup plus faibles. Ainsi, une analyse par fluorescence propose une valeur de log K = 5,7 pour le Cu^{II} dans le cas d'A β_{42} (Garzon-Rodriguez *et al.*, 1999).

L'affinité pour le Zn^{II} n'a été étudiée qu'avec A β_{40} . Il posséderait également deux sites de chélation à pH = 7,4 : un site de haute affinité (log K = 7,0) et un site de plus faible affinité (log K = 5,3) (Tableau 2). Dans une autre étude réalisée en présence de ⁶⁵Zn²⁺, seule une valeur de log K = 5,5 a pu être observée (Clements *et al.*, 1996).

Enfin, l'affinité d'A β pour le Fe^{III} a été beaucoup moins étudiée et semble être plus faible que pour le Cu^{II} ou le Zn^{II} (Garzon-Rodriguez *et al.*, 1999).

De telles différences pour les affinités mesurées peuvent être en partie expliquées par la forte tendance à la précipitation du peptide A β . Ainsi, pour des méthodes d'analyses basées sur l'observation spectrométrique directe du peptide, une précipitation partielle de celui-ci peut conduire à une sous-estimation de la constante d'affinité du peptide pour les ions métalliques étudiés.

Des études de RPE, de RMN ^1H et de spectroscopie Raman sur A β et sur des peptides synthétiques dont la séquence a été sélectivement modifiée par rapport à la forme sauvage ont permis d'identifier les acides aminés impliqués dans la chélation du Cu^{II} et du Zn^{II} (Gaggelli *et al.*, 2006). Le site de chélation est situé dans le domaine 1-16 d'A β , qui est la partie non structurée dans le modèle de fibrilles d'A β_{42} décrit plus haut (Fig. 11). Il a été proposé que la coordination implique des environnements 3N1O ou 4N pour le Cu^{II} et le Zn^{II} (Miura *et al.*, 2000; Syme *et al.*, 2004).

Les trois histidines (en positions 6, 13 et 14) d'A β participent à la chélation des ions métalliques Cu^{II} et Zn^{II} (Curtain *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 1999; Miura *et al.*, 2000; Syme *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2000). La nature du quatrième résidu impliqué dans la chélation est sujette à débat. Suivant le pH auquel a été réalisée l'analyse, l'oxygène de la Tyr¹⁰ a été proposé (Miura *et al.*, 2000), ainsi que la fonction NH_2 terminale (Karr *et al.*, 2005; Syme *et al.*, 2004; Syme and Viles, 2006), des résidus carboxylates (sur Asp¹, Glu³ ou Glu¹¹) (Karr *et al.*, 2005; Mekmouche *et al.*, 2005; Zirah *et al.*, 2006) ou encore des azotes du squelette peptidique (Miura *et al.*, 2000).

Les sites proposés pour la coordination des ions métalliques sur A β varient en effet en fonction de la nature de cet ion métallique, du pH, et de la stœchiométrie métal : ligand envisagée (Miura *et al.*, 2000; Syme *et al.*, 2004). Ainsi par exemple, des études de spectroscopie Raman indiquent que les modes de liaisons des ions métalliques par le peptide sont différents à pH = 7,4 et à pH = 6,6. De même, si le peptide lie des quantités équimolaires de Cu^{II} et de Zn^{II} à pH = 7,4, le Cu^{II} déplace totalement le Zn^{II} fixé sur A β en occupant son site de liaison à pH plus acide (pH = 6,6) (Atwood *et al.*, 2000).

Divers schémas de coordination impliquant différentes stœchiométries peptide / ion métallique ont été proposés. La figure 12 en donne deux exemples. C'est ainsi que pour un ratio A β / Cu^{II} = 1, un mode de chélation faisant intervenir une seule molécule d'A β par ion métallique a été proposé (Fig. 12, A). Mais l'une des histidines pourrait être un résidu pontant entre deux atomes de cuivre. Ainsi, pour le même ratio A β / Cu^{II} , un

schéma de coordination favorisant des structures dimériques a également été envisagé avec une histidine pontante (Fig. 12, B) (Curtain *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2006).

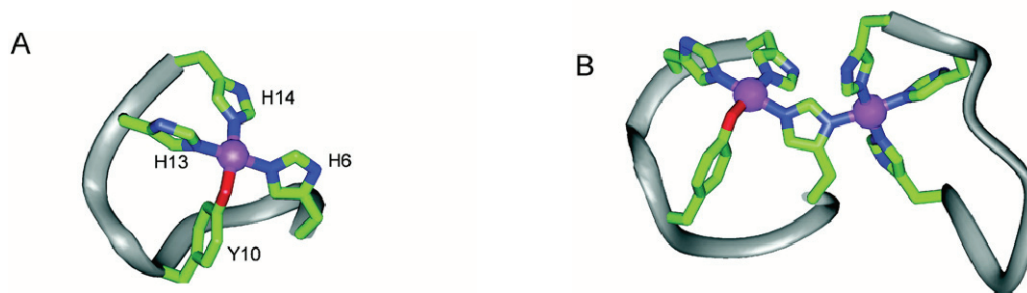


Fig.12. Exemples de modèles du site de coordination de Cu^{II} lié à $\text{A}\beta$ (d'après Curtain *et al.*, 2001). (A) Site de coordination monomérique dans un environnement 3N1O. (B) Proposition de modèle dimérique mettant en jeu une histidine pontante entre deux atomes de Cu^{II} , expliquant la fixation coopérative des ions métalliques et la formation d'espèces dimériques. Une structure dimérique avec une histidine pontante et deux sites de coordination identiques pour les Cu^{II} (3N1O) a également été proposée (Smith *et al.*, 2006).

De façon importante, une histidine pontante complexant plus d'un ion métallique pourrait expliquer les stœchiométries élevées en Cu^{II} et Zn^{II} observées pour $\text{A}\beta$ (Tableau 2) (Atwood *et al.*, 2000; Bush *et al.*, 1994a).

D'autres types de liaisons intermoléculaires ont été proposés dans le cas du Zn^{II} . Dans ces modèles, un atome de zinc est complexé par deux peptides ($\text{A}\beta^{\text{i}}$) différents selon un schéma de coordination de type $\text{His}(\text{A}\beta^{\text{i}})\text{-Zn}^{\text{II}}\text{-His}(\text{A}\beta^{\text{j}})$ susceptible de conduire à des espèces polymériques (Miura *et al.*, 2000; Syme and Viles, 2006).

IV.2.2.3 Rôle des ions métalliques dans l'agrégation d' $\text{A}\beta$

De nombreux travaux ont montré que l'interaction du peptide $\text{A}\beta$ avec les ions métalliques, notamment le Zn^{II} et le Cu^{II} , à des concentrations sub-micromolaires favorise l'agrégation de celui-ci (Bush, 2002; Cuajungco *et al.*, 2005). Les dépôts formés sont amorphes (par opposition aux agrégats fibrillaires observés en absence d'ions métalliques), et peuvent être visualisés avec des colorants spécifiques (Yoshiike *et al.*, 2001).

Ainsi, le Zn^{II} à des concentrations physiologiques (≥ 300 nM) induit *in vitro* l'agrégation rapide d' $\text{A}\beta_{40}$ (par comparaison à l'agrégation lente en absence de métal) en structures résistantes aux protéases (Bush *et al.*, 1994a; Bush *et al.*, 1994b; Huang *et al.*, 1997). Le Cu^{II} , et dans une moindre mesure le Fe^{III} , induisent également la précipitation d' $\text{A}\beta$ à pH = 7,4 (Atwood *et al.*, 1998). La précipitation d' $\text{A}\beta_{42}$ est de plus fortement

accrue par rapport à $A\beta_{40}$, quelles que soient les conditions. Ainsi, des traces de Cu^{II} ($< 0,1 \mu M$) suffisent à induire la précipitation d' $A\beta_{42}$ (Atwood *et al.*, 2000).

Ce phénomène de précipitation est d'autre part amplifié à pH acide (pH = 6,6), dans le cas du Cu^{II} comme du Fe^{III} (Atwood *et al.*, 1998).

On peut noter enfin que l'utilisation de chélateurs d'ions métalliques, tels que l'EDTA ou l'acide diéthylènetriaminepentaacétique (DTPA), permet de solubiliser $A\beta_{40}$ ou $A\beta_{42}$ agrégé en présence d'ions métalliques *in vitro* (Atwood *et al.*, 1998; Atwood *et al.*, 2000).

IV.2.3 $A\beta$: constituant principal des plaques amyloïdes

Dans le cerveau, le peptide $A\beta$ est également retrouvé précipité sous la forme de structures beaucoup plus complexes, les plaques amyloïdes. $A\beta$ est le composant principal de ces structures dans lesquelles il est associé à de nombreuses autres protéines (α -synucléine, α_2 -macroglobuline, acétylcholine estérase, apolipoprotéine E, cytokines, ...) (Atwood *et al.*, 1999).

Des ions métalliques ont également été retrouvés associés à ces structures dans des cerveaux humains *post mortem* (Cuajungco *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2003; Sayre *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 1997a; Tabner *et al.*, 2002). Des chélateurs tels que la *N,N,N',N'*-tetrakis(2-pyridyl-méthyl)éthylène diamine (TPEN), la bathocuproïne (BC), l'acide éthylènebis-(oxyéthylènenitrilo)-tétraacétique (EGTA) ou le clioquinol sont capables de dissoudre des plaques amyloïdes issues de cerveaux humains *ex vivo* (Cherny *et al.*, 1999; Cherny *et al.*, 2001). Le clioquinol permet également de diminuer de près de 50 % le taux de plaques amyloïdes chez des souris transgéniques APP2576 (Cherny *et al.*, 2001).

Certaines expériences indiquent que les ions métalliques contribuent directement à la formation des plaques amyloïdes.

Ainsi, des souris transgéniques Tg2576 surexprimant APP (et donc aptes à former des plaques amyloïdes) mais délétères pour le gène codant pour ZnT3 (responsable du transport de Zn^{II} dans les vésicules synaptiques) ont un taux de plaques réduit et une quantité d' $A\beta$ soluble augmentée (Lee *et al.*, 2002).

Une autre étude chez des lapins modélisant la maladie d'Alzheimer grâce à un régime riche en cholestérol a montré que des traces de cuivre dans l'alimentation sont suffisantes pour induire la formation de plaques amyloïdes et générer des problèmes d'apprentissage (Sparks and Schreurs, 2003).

Il est d'autre part important de remarquer que chez les rongeurs, trois mutations sur la séquence d'A β (Arg⁵ $\rightarrow$ Gly, Tyr¹⁰ $\rightarrow$ Phe et His¹³ $\rightarrow$ Arg) altèrent sa capacité à chélater les ions métalliques. Ainsi l'A β ₄₀ de rat lie le zinc beaucoup plus faiblement que son homologue humain ($K_D = 3,8 \mu M$) (Bush *et al.*, 1994b). Il en résulte que l'A β de rat n'est pas affecté par la présence de zinc ou de cuivre à des concentrations de l'ordre du micromolaire, à la différence du peptide d'origine humaine (Atwood *et al.*, 1998). Cela pourrait expliquer la rareté avec laquelle ces animaux forment des plaques amyloïdes avec l'âge (Higgins and Jacobsen, 2003).

IV.3 Toxicité associée au peptide β -amyloïde

Le peptide A β est toxique sur culture cellulaire (Atwood *et al.*, 2003). Or, il existe sous diverses formes qui peuvent toutes être responsables d'une part de cette toxicité.

IV.3.1 Structures impliquées dans la toxicité d'A β

La nature de l'espèce à l'origine de la toxicité (oligomérique ou fibrillaire, extracellulaire ou intracellulaire) est toujours débattue actuellement (Hardy and Selkoe, 2002; Klein *et al.*, 2001).

Toutefois, des études biochimiques et immunologiques sur cerveaux humains *post mortem* montrent que les dysfonctionnements cognitifs dans la maladie d'Alzheimer corrélaient mieux avec les taux d'A β soluble que ceux des plaques amyloïdes (McLean *et al.*, 1999). Ce phénomène a été retrouvé chez différents types de souris transgéniques exprimant la protéine APP humaine, pour lesquels des déficits cognitifs ont été relevés dès l'âge de trois mois. A cet âge, seuls des taux élevés d'A β soluble peuvent être mis en évidence par des anticorps spécifiques, alors que les plaques amyloïdes ne sont pas visibles avant sept mois chez ces animaux (Moechars *et al.*, 1999; Mucke *et al.*, 2000).

Les oligomères globulaires d'A β ₄₂ (ADDLs) et les protofibrilles ont aussi été proposés comme des formes solubles d'A β pouvant générer de la toxicité (Gong *et al.*, 2003; Hartley *et al.*, 1999; Lambert *et al.*, 1998; Walsh *et al.*, 2002).

D'autre part, des accumulations intraneuronales d'A β , visualisées au moyen d'anticorps et de techniques de microscopie électronique, corrélient avec une altération de la morphologie et du fonctionnement des synapses *in vivo* (Mucke *et al.*, 2000; Oddo *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2002).

IV.3.2 Toxicité des complexes métalliques d'A β : Génération d'espèces oxygénées réactives

IV.3.2.1 Production d'H₂O₂ par A β en présence d'ions métalliques

Les ions métalliques cuivre et fer présentent une forte activité rédox dans les conditions physiologiques en présence de réducteur et d'oxygène moléculaire. En effet, l'oxygène moléculaire peut être réduit, en présence de Cu^I ou de Fe^{II}, en espèces oxygénées réactives (EORs, Schéma 2, Eq. 2-4). Celles-ci comprennent l'anion superoxyde O₂^{•-}, le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et le radical hydroxyle OH[•] obtenu par des réactions de type Fenton (Eq. 4) ou Haber-Weiss (Eq. 6) (Gaggelli *et al.*, 2006).

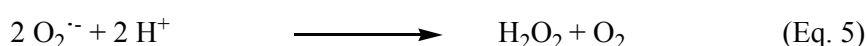
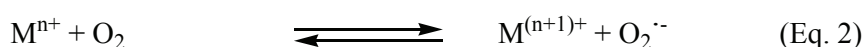


Schéma 2. Principales réactions conduisant à la production des espèces oxygénées réactives (Cu : n = 1, Fe : n = 2).

Les radicaux OH[•] sont très réactifs et par conséquent très toxiques. Ils créent des dommages oxydants à proximité de leur site de production. Par contre, H₂O₂ est une espèce particulièrement diffusante. Elle peut franchir les barrières biologiques et engendrer des dégâts loin de son site de production, notamment *via* sa réduction en OH[•].

Le peptide A β en présence d'ions métalliques cuivre et fer est toxique sur culture cellulaire. Cette toxicité est inhibée par l'ajout de catalase (enzyme qui réduit H₂O₂ en H₂O et O₂), ce qui implique la production d'H₂O₂ dans le processus de toxicité (Huang *et al.*, 1999a; Opazo *et al.*, 2002). Cette réaction peut également être inhibée par des

antioxydants et des piègeurs de $O_2^{\cdot -}$ et/ou d' H_2O_2 , des concentrations élevées de zinc entrant en compétition avec le cuivre et le fer (Cuajungco *et al.*, 2000) ou des chélateurs du cuivre et/ou du fer tels que la bathophénanthroline (BP), l'acide diéthylènetriamine-pentaacétique (DTPA), le clioquinol ou encore la desferrioxamine (Barnham *et al.*, 2004b; Huang *et al.*, 1999a; Huang *et al.*, 1999b; Sayre *et al.*, 2000).

Tous ces résultats sont en accord avec une production d' H_2O_2 par les complexes de Cu ou de Fe d'A β selon les mécanismes proposés dans le schéma 2.

Il est à noter que le potentiel de réduction de Cu^{II} en Cu^I par A β_{42} est fortement positif (environ + 500-550 mV par rapport à Ag/AgCl) et caractéristique des cuproprotéines réductrices, suggérant que la forme Cu^I est stabilisée par le peptide (Huang *et al.*, 1999b).

Des expériences de compétition en présence de chélateurs affins pour Cu^I (bathocuproïne) ou Fe^{II} (BP) sont en accord avec la capacité du peptide A β_{42} , et dans une moindre mesure A β_{40} , à réduire le Cu^{II} ou le Fe^{III} qui lui est coordonné en Cu^I et Fe^{II} , respectivement. Il est à noter que cette observation n'a pas été retrouvée pour les formes plus courtes (telles qu'A β_{28}) ou l'A β_{40} de rat (Huang *et al.*, 1999a). Cette réduction des ions métalliques pourrait impliquer les résidus Met³⁵ ou Tyr¹⁰ d'A β , facilement oxydables en espèces radicalaires Met-S⁺ ou Tyr-O[•] (Barnham *et al.*, 2004b; Varadarajan *et al.*, 1999). Ainsi, des formes oxydées de la Met³⁵ d'A β ont été retrouvées dans des régions riches en ions métalliques des plaques amyloïdes (Dong *et al.*, 2003).

Des réducteurs comme l'ascorbate ou la dopamine présents dans le cerveau peuvent également générer des phénomènes d'oxydoréduction au niveau des complexes métalliques d'A β (Opazo *et al.*, 2002).

En résumé, les complexes métalliques d'A β (en particulier de la forme A β_{42}) réduisent le Cu^{II} et le Fe^{III} *in vitro*, entraînant alors la production d' H_2O_2 par le système en présence d'oxygène moléculaire (selon les équations 2 et 3 du schéma 2) (Huang *et al.*, 1999a). Cette production d' H_2O_2 peut être catalytique en présence de réducteur (Opazo *et al.*, 2002).

Le peroxyde d'hydrogène formé va pouvoir entraîner la production de radicaux OH[•] *via* la réaction de Fenton. Ainsi, des études de RPE avec des piègeurs de radicaux ont

montré *in vitro* la présence de radicaux hydroxyle associée aux complexes $A\beta \cdot Cu^I$ ou $A\beta \cdot Fe^{II}$ (Dikalov *et al.*, 2004; Tabner *et al.*, 2002).

IV.3.2.2 Auto-oxydation du peptide $A\beta$

La réduction du Cu^{II} ou du Fe^{III} complexé à $A\beta$ et la production d' H_2O_2 rendent le peptide sensible à l'auto-oxydation. Des modifications d' $A\beta$, dues à son oxydation, ont été relevées *in vitro* et *ex vivo* au niveau des plaques amyloïdes (Piccini *et al.*, 2005; Roher *et al.*, 1993; Zirah *et al.*, 2006). Ainsi, des formes tronquées d' $A\beta$ peuvent être générées, en particulier par la formation de pyroglutamates N-terminaux. On retrouve également au niveau des plaques amyloïdes des modifications de certains acides aminés d' $A\beta$ telles que l'isomérisation (notamment au niveau des aspartates), la racémisation ou l'oxydation (en particulier la sulfoxydation des méthionines) (Fig. 13).

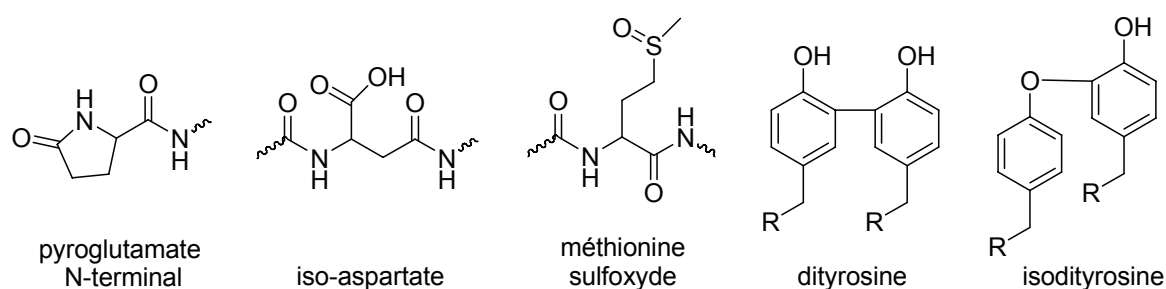


Fig. 13. Modifications chimiques observées sur $A\beta$ et associées à un phénomène d'oxydation.

De plus, les ions métalliques structurent les peptides en favorisant des assemblages polymériques. Cette "pré-organisation" va faciliter la création de liens covalents entre ces différents peptides en particulier par la formation radicalaire de dimères de tyrosines (Fig. 13) (Atwood *et al.*, 2004). Ces dimères ont été retrouvés dans les extraits de cerveaux de malades d'Alzheimer *post mortem* (Dyrks *et al.*, 1992). De façon importante, la création de ces liens covalents inter-brins conduit à la formation de polymères d' $A\beta_{40}$ et d' $A\beta_{42}$ particulièrement résistants. Ainsi, l'emploi de détergents comme le SDS ne permet pas de solubiliser ces structures *in vitro* (Atwood *et al.*, 2000).

Ces diverses modifications entraînent une résistance aux protéases, rendant ainsi plus difficile la métabolisation et l'élimination des peptides.

IV.3.3 Toxicité d'A β via son interaction avec les membranes

A β est un peptide présentant un domaine hydrophobe retrouvé dans la région transmembranaire de l'APP dont il est issu. Cette caractéristique favorise son interaction avec les membranes.

La structure de l'A β associé aux membranes est relativement peu connue. Des études de RMN du solide et de dichroïsme circulaire en présence d'A β et de phospholipides ont toutefois permis d'en obtenir des modèles. En présence de Cu^{II} ou Zn^{II}, A β se structure en oligomères comportant des hélices- α qui peuvent pénétrer dans la membrane (Curtain *et al.*, 2001).

L'interaction d'A β avec les membranes a été associée à sa toxicité (Ciccotosto *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2006). En effet, l'agrégation d'A β en structures fortement hydrophobes et leur pénétration au sein des structures lipidiques a plusieurs conséquences sur leur intégrité.

Ainsi, la libération d'espèces oxygénées réactives (EORS) par des complexes métalliques d'A β à proximité ou au sein des membranes est responsable de dommages oxydants sur celles-ci (Murray *et al.*, 2005). L'attaque de radicaux sur les liaisons d'acides gras insaturés (acide arachidonique, acide docosahénoïque, ...) initie des réactions en chaînes sur d'autres acides gras. Les produits formés incluent le 2-propèn-1-al (acroléine, Fig. 14), le 4-hydroxy-2-nonèn-1-al, le malondialdéhyde et les isoprostanes. Ces espèces ont été retrouvées à des niveaux élevés dans les cerveaux de malades d'Alzheimer, à proximité des plaques amyloïdes et des neurofibrilles (Butterfield *et al.*, 2001). Ces oxydations d'acides gras ont également des conséquences sur les protéines. En effet, la formation d'adduits covalents entre des protéines et le 4-hydroxy-2-nonèn-1-al ou l'acroléine est également observée dans les régions présentant des neurofibrilles ou des dépôts amyloïdes (Butterfield *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 1997b).

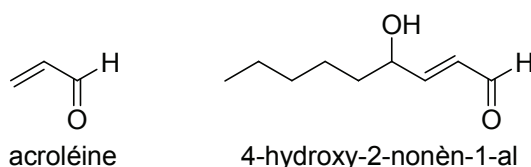


Fig. 14. Structures du 2-propèn-1-al (acroléine) et du 4-hydroxy-2-nonèn-1-al.

Des espèces oxydées du cholestérol (telles que le 4-cholestén-3-one) ont également été retrouvées *in vivo* chez des souris transgéniques modélisant la maladie d'Alzheimer et dans des cerveaux humains *post mortem* (Puglielli *et al.*, 2005).

Par ailleurs, A β peut former des canaux membranaires à cations (Arispe *et al.*, 1993). Des études de microscopie à force atomique ont montré la présence de structures multimériques (tétramériques ou hexamériques) d'A β_{42} en forme de canaux au sein de bicouches lipidiques, favorisant l'influx de Ca²⁺ dans les cellules (Lin *et al.*, 2001).

D'autre part, l'insertion dans les membranes d'oligomères d'A β entraîne une diminution de la fluidité de celles-ci (Kremer *et al.*, 2000). Il en résulte une altération de leurs propriétés, conduisant par exemple à leur dépolarisation (Hartley *et al.*, 1999) ou à l'augmentation de leur perméabilité. Celle-ci est accompagnée de l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺ (sans impliquer la formation de pores ou de canaux ioniques) (Demuro *et al.*, 2005).

Enfin, A β active également des canaux à calcium voltage-dépendants au niveau des membranes (MacManus *et al.*, 2000).

Ainsi, le peptide A β (qu'il soit sous une forme monomérique ou oligomérique, en absence ou en présence d'ions métalliques) peut causer des effets délétères sur les membranes. La conséquence principale de ces phénomènes d'oxydation et de pénétration des membranes est une augmentation de la perméabilité de celles-ci. Il en résulte une dérégulation de l'homéostasie du Ca²⁺ conduisant à la mort cellulaire.

D'un point de vue plus général, A β est donc un peptide particulièrement complexe qui est retrouvé *in vivo* sous la forme de monomères, d'oligomères, de fibrilles et d'agrégats métalliques. Mis à part les espèces solubles intra- ou extracellulaires, ces diverses structures forment à plus grande échelle des dépôts diffus, des plaques extracellulaires ou des structures organisées au niveau des membranes. Toutes ces structures sont en interaction les unes avec les autres et ont de nombreuses toxicités.

IV.4 Facteurs favorisant l'accumulation et la toxicité d'A β

IV.4.1 Les facteurs génétiques

Dans environ 5 % des cas, la maladie d'Alzheimer est d'origine génétique et se déclenche précocement, avant 60 ans. On parle alors de "forme familiale" de la maladie d'Alzheimer. A ce jour, plus de 150 mutations sur trois gènes ont été identifiées et sont responsables de la transmission génétique de la maladie. Les gènes impliqués sont un gène du chromosome 21 codant pour la protéine APP et deux gènes situés sur les chromosomes 14 et 1, codant respectivement pour les présénilines 1 et 2 composant les γ -sécrétases. C'est ainsi que la plupart des personnes atteintes de trisomie 21 (syndrome de Down) expriment 1,5 fois plus d'APP que les individus sains et souffrent de démence de type Alzheimer dès l'âge de 40 ans (Selkoe, 2001).

Toutes ces mutations conduisent à une protéolyse altérée de l'APP, qui provoque une surproduction d'A β , que ce soit chez les souris transgéniques ou chez l'homme.

Ainsi, toutes les mutations identifiées sur l'APP sont situées à proximité des sites de coupe par les sécrétases, et favorisent les voies de protéolyse qui conduisent à A β (Fig. 15). De même, les mutations des gènes codant pour les présénilines PS1 et PS2 accentuent l'activité de coupe du système γ -sécrétase (Hardy, 1997; Selkoe, 2001).

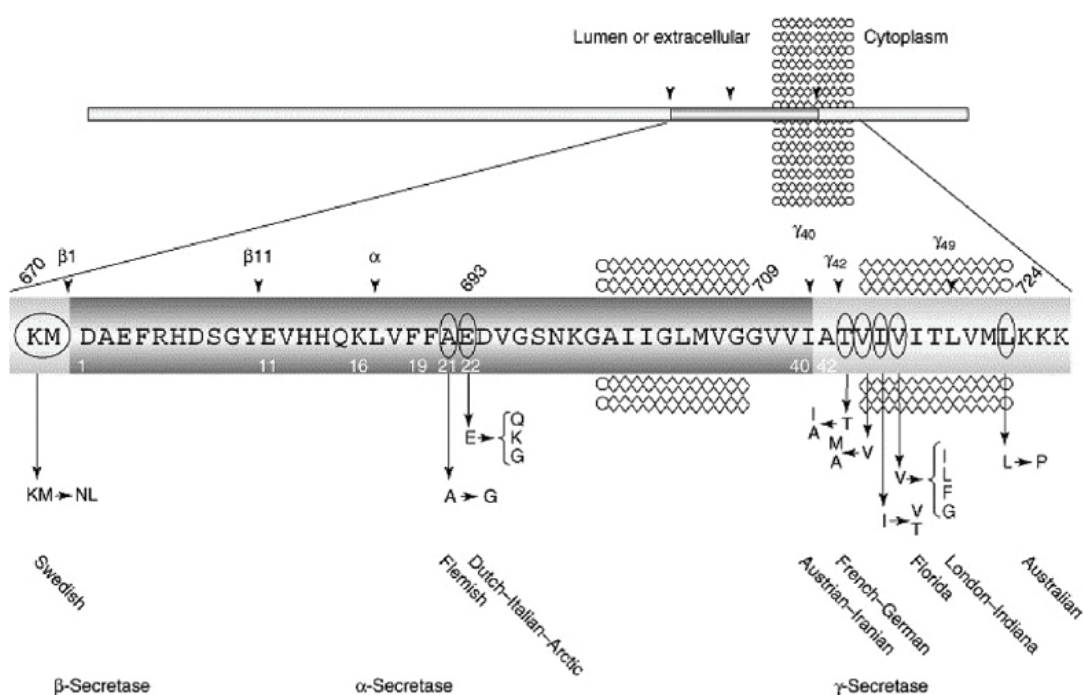


Fig. 15. Mutations de la protéine APP responsables de la forme familiale de la maladie d'Alzheimer (d'après Gaggeli *et al.*, 2006). La région détaillée est celle comprenant la séquence du peptide A β . Les acides aminés mutés sont entourés et les changements d'acides aminés correspondant sont indiqués. Les flèches indiquent les sites de coupure des sécrétases.

Il est important de noter que les mutations sur les présénilines et sur l'APP (lorsqu'elles se situent à proximité du site de coupure de la γ -sécrétase) favorisent de plus l'espèce A β ₄₂ parmi les différentes formes d'A β (Hardy, 1997; Selkoe, 2001).

IV.4.2 Le cholestérol

Le cholestérol est un constituant essentiel des membranes cellulaires. Il joue un rôle fondamental dans le développement et le maintien de la plasticité et du fonctionnement des neurones (Shobab *et al.*, 2005).

Des études épidémiologiques ont montré qu'un niveau élevé de cholestérol pouvait être corrélé avec un risque plus élevé de développement de la maladie d'Alzheimer (Kivipelto *et al.*, 2001).

Il existe par ailleurs des facteurs de susceptibilité génétique pour la maladie d'Alzheimer au niveau du gène APOE, qui code pour l'apolipoprotéine E (ApoE) impliquée dans le transport du cholestérol. Trois variants alléliques existent pour ce gène : APOE2, APOE3 et APOE4. Les personnes possédant deux copies du gène APOE4 ont un risque plus élevé que la moyenne de développer la maladie d'Alzheimer, tandis que les porteurs de APOE2 ont un risque plus faible (Corder *et al.*, 1993). Or, le transport du cholestérol est altéré pour les individus possédant l'isoforme ϵ 4 de la protéine ApoE. Ils ont alors un taux plasmatique de cholestérol élevé comparé à l'ensemble de la population (Shobab *et al.*, 2005).

Il existe un rapport direct entre le cholestérol et la production d'A β . Chez des souris transgéniques [APP $\times$ PS1] nourries selon un régime riche en cholestérol, les taux d'A β et le nombre de plaques amyloïdes sont nettement plus élevés que chez les souris contrôle (Refolo *et al.*, 2000). D'autre part, des cultures neuronales traitées par des statines (inhibiteurs de la biosynthèse du cholestérol) présentent une forte réduction des taux d'A β intracellulaires et sécrétés. De même, l'administration de statines à des cochons d'Inde diminue les taux plasmatiques de cholestérol mais aussi la concentration d'A β dans le fluide cérébrospinal et les tissus cérébraux (Fassbender *et al.*, 2001).

L'influence du cholestérol sur les taux d'A β est liée à l'activité des sécrétases impliquées dans le métabolisme de l'APP : le cholestérol semble moduler leur activité et favoriser la voie amylogène. Des études sur cultures neuronales ou sur des souris transgéniques [APP $\times$ PS1] montrent que des environnements riches en cholestérol réduisent la protéolyse de l'APP par l' α -sécrétase, conduisant ainsi à un taux élevé d'A β (Bodovitz and Klein, 1996; Refolo *et al.*, 2000). A l'opposé, une diminution des taux de cholestérol (*via* des agents réalisant l'extraction du cholestérol ou des statines) a pour conséquences une augmentation de la coupure de l'APP par l' α -sécrétase (Kojro *et al.*, 2001), ou une diminution de cette coupure par la β -sécrétase (Simons *et al.*, 1998). Par ailleurs, l'élimination du cholestérol dans les membranes inhibe l'activité de la γ -sécrétase de façon totale mais réversible (Wahrle *et al.*, 2002).

Le mécanisme d'action du cholestérol sur les sécrétases n'est pas totalement connu, mais il est admis que le taux de cholestérol influence la fluidité des membranes : une diminution du taux de cholestérol augmente leur fluidité. Cette modification pourrait affecter les sécrétases associées à celles-ci en perturbant le contact entre les enzymes et leur substrat APP. Elle pourrait aussi modifier l'activité intrinsèque des enzymes, notamment pour la γ -sécrétase dont le site actif est situé dans la membrane (Bodovitz and Klein, 1996; Wahrle *et al.*, 2002).

IV.4.3 A β et le système cholinergique

IV.4.3.1 *Stimulation de la production d'A β*

Les récepteurs cholinergiques, et en particulier ceux de type muscarinique, ont également un rôle sur la protéolyse de la protéine APP et la production d'A β . Ainsi, la stimulation des récepteurs cholinergiques muscariniques par l'acétylcholine active la protéine kinase C (PKC). Celle-ci active l' α -sécrétase et favorise le clivage de l'APP par la voie non amylogène (Hellström-Lindh, 2000). Le déficit en acétylcholine observé dès les premiers stades de la maladie d'Alzheimer pourrait donc défavoriser la coupure de l'APP par l' α -sécrétase et augmenter la production d'A β .

IV.4.3.2 *Stimulation de l'accumulation d'A β*

L'acétylcholine estérase est fréquemment colocalisée avec les plaques amyloïdes dans le cerveau des malades d'Alzheimer, et semble participer à la formation de ces

dépôts. Des études de fluorescence et de dichroïsme circulaire ont montré que la formation de structures en feuillets- β et la fibrillation d'A β étaient amplifiées en présence d'acétylcholine estérase (Bartolini *et al.*, 2003). Il faut noter que l'utilisation d'inhibiteurs compétitifs et non compétitifs de cette enzyme a permis d'exclure l'intervention du site catalytique de celle-ci dans l'interaction avec A β . Cette interaction A β / AChE semblerait plutôt avoir lieu à proximité d'un site de liaison anionique périphérique de l'enzyme. En effet, un inhibiteur cationique non compétitif de l'AChE ciblant ce site périphérique inhibe de façon significative la fibrillation d'A β .

Ce rôle de cofacteur de l'acétylcholine estérase dans la fibrillation d'A β permet d'expliquer la localisation des dépôts amyloïdes au niveau des synapses des neurones cholinergiques. Elle explique aussi pourquoi cette classe de neurones est préférentiellement affectée par le stress oxydant généré par A β lors de la maladie.

IV.4.4 Le zinc (II)

Le Zn^{II} est un autre élément qui favorise la précipitation du peptide A β . Ainsi, la concentration élevée de zinc au niveau de la fente synaptique lors de la transmission neuronale permet d'expliquer l'accumulation d'agrégats d'A β au niveau des synapses.

De plus, une dérégulation des systèmes de transport du zinc plus importante chez les femmes pourrait favoriser chez elles le développement de la maladie (Henderson, 1997; Lee *et al.*, 2002). Des études épidémiologiques ont montré que les femmes ont un risque plus grand que les hommes de développer la maladie d'Alzheimer (Andersen *et al.*, 1999), même après une correction due à leur plus longue espérance de vie.

IV.4.5 Diminution de l'activité d'enzymes assurant la dégradation d'A β

Enfin, l'accumulation du peptide A β dépend également de la balance entre la production et la dégradation de ce peptide. En plus de sa surproduction lors de la maladie d'Alzheimer, il semblerait que sa dégradation par des peptidases spécifiques soit elle aussi altérée.

Ainsi, une variabilité de séquence du gène codant pour l' α_2 -macroglobuline, impliquée dans la dégradation d'A β , a été identifiée comme facteur de risque (Selkoe,

2001). Des modifications de cette protéine suite à cette variabilité génétique pourraient être responsables d'une diminution de son activité.

Une autre protéine est impliquée dans la dégradation d'A β : la néprilysine. Une diminution de l'activité de cette endopeptidase a été reportée dans l'hippocampe suite au vieillissement (Iwata *et al.*, 2002; Selkoe, 2001). Les taux de néprilysine (et de son ARNm) sont de plus réduits dans l'hippocampe et le cortex temporal des malades d'Alzheimer, favorisant l'accumulation du peptide A β dans ces zones (Higuchi *et al.*, 2005).

V. Relation entre A β et tau

Le lien entre les lésions de la maladie d'Alzheimer observées histologiquement (plaques amyloïdes et enchevêtrements de neurofibrilles) et les composants qui leur sont associés (A β et tau) ont longtemps été controversés. De même, l'origine du processus neurodégénératif a été discutée : elle pourrait être due à la production anormale d'A β ou à la dégénération du cytosquelette neuronal causée par tau (Suh and Checler, 2002).

Des travaux sur des kinases ont apporté les premiers éléments de réponse : les kinases GSK-3 et cdk-5, capables de phosphoryler tau *in vitro*, sont activées suite à l'agrégation d'A β et conduisent à la mort neuronale (Alvarez *et al.*, 1999; Takashima *et al.*, 1993).

Plus récemment, des études réalisées sur des souris triplement transgéniques [APP $\times$ PS1 $\times$ tau] ont élégamment montré le lien hiérarchique entre A β et tau (LaFerla and Oddo, 2005).

L'emploi d'anticorps spécifiques a montré que ces souris développent les pathologies associées à A β et à tau, mais de façon non synchrone. En effet, la détection d'A β intracellulaire est possible dès trois mois et celle des dépôts amyloïdes extracellulaires vers six mois alors que les premiers changements conformationnels de tau ne sont visibles qu'au bout de dix à douze mois et l'hyperphosphorylation de tau seulement à partir de douze à quinze mois (Oddo *et al.*, 2003).

Dans une seconde étude sur cette même lignée de souris, Oddo *et al.* ont de plus montré que la suppression d'A β par immunothérapie (ou grâce à un inhibiteur de γ -

sécrétase) conduit à un retrait de la pathologie associée à tau si le traitement est réalisé à un stade précoce (avant qu'il y ait hyperphosphorylation). La disparition d'A β précède celle de tau et la réapparition de la pathologie associée à A β précède également celle associée à tau (Oddo *et al.*, 2004). Ces travaux suggèrent ainsi qu'A β peut moduler la progression de la pathologie liée à tau.

Cela est corrélé au fait que des souris transgéniques [PS1 $\times$ tau] (dépourvues d'APP humain et donc ne développant pas de pathologie associée à A β) développent des taupathies plus tardivement et moins sévèrement (les dysfonctionnements synaptiques sont en particulier moins prononcés) que des souris triplement transgéniques [APP $\times$ PS1 $\times$ tau] (Oddo *et al.*, 2003).

Il faut toutefois noter que tau lui-même est essentiel pour la neurotoxicité associée à A β . Ainsi, dans un modèle cellulaire en présence d'A β fibrillaire, on observe une dégénérescence des neurones isolés de souris transgéniques surexprimant tau (humain ou de souris), alors que les cellules issues d'animaux délétères pour tau ne dégèrent pas. De plus, la dégénérescence est rétablie suite à la réexpression de tau (Rapoport *et al.*, 2002).

En tant que points essentiels, nous pouvons retenir que le peptide A β est à l'origine d'un niveau élevé de stress oxydant qui va engendrer une dérégulation de l'homéostasie de calcium et conduire à l'hyperphosphorylation de tau et à la taupathie.

VI. La cascade amyloïde

La maladie d'Alzheimer est une maladie complexe et multifactorielle, qui touche principalement les synapses de certains neurones situés dans l'hippocampe et le cortex. C'est au niveau de ces zones que les principaux acteurs de la maladie exercent leurs effets délétères (Fig. 16).

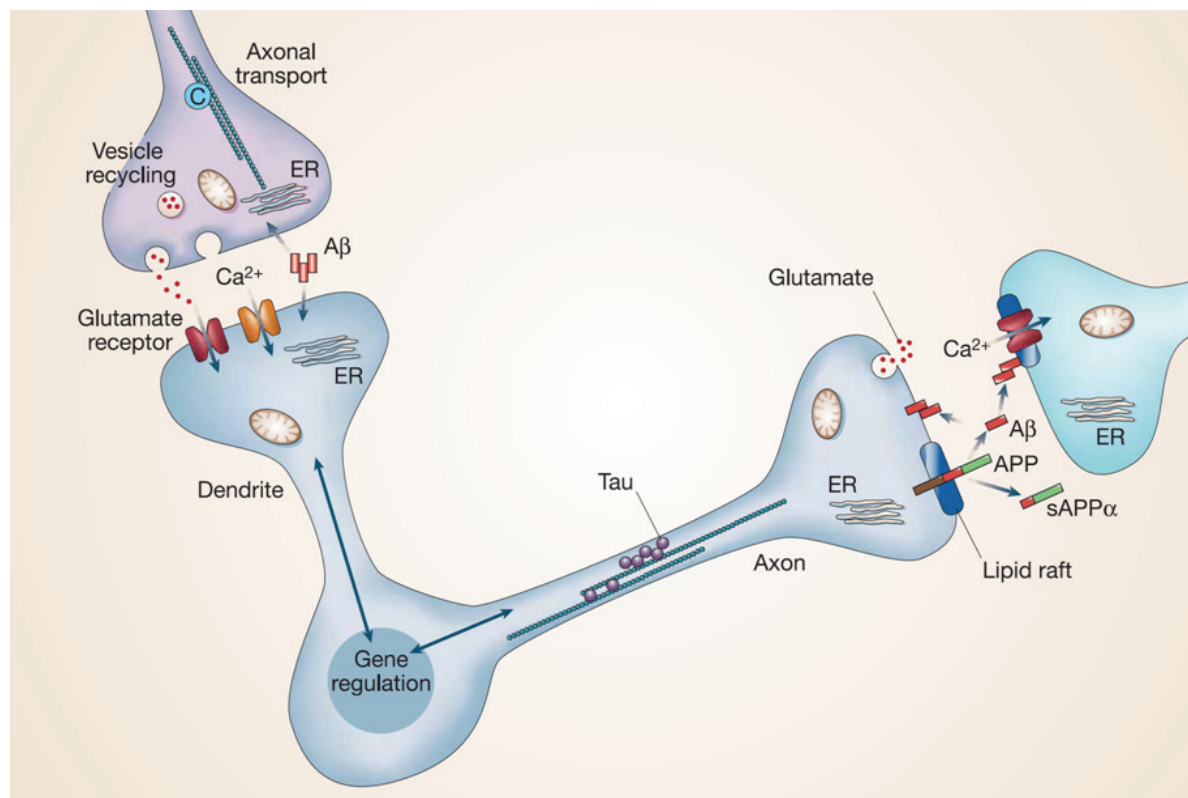


Fig. 16. Localisation des principaux facteurs conduisant à la maladie d'Alzheimer (d'après Mattson, 2004). ER : réticulum endoplasmique.

Pour expliquer l'origine et le développement de la maladie, la cascade amyloïde est le plus souvent proposée (Hardy and Higgins, 1992; Hardy and Selkoe, 2002). Elle est illustrée sur le schéma 3.

Dans l'hypothèse de cette cascade amyloïde, l'origine de la dégénération neuronale et synaptique observée dans la maladie d'Alzheimer réside dans une protéolyse altérée de la protéine APP. Des causes génétiques et environnementales (le taux de cholestérol par exemple) et une altération générale du fonctionnement du cerveau liée à l'âge sont responsables de l'augmentation de la production d'Aβ (et plus particulièrement de sa forme la plus toxique, Aβ₄₂). Celui-ci est alors libéré au niveau de la membrane présynaptique des neurones, où l'APP est accumulé.

Dans le cas des neurones à acétylcholine, la présence de l'acétylcholine estérase dans cette zone favorise la fibrillation d'Aβ et la formation de plaques amyloïdes. De même, les ions métalliques Zn^{II} et Cu^{II} libérés lors de la transmission synaptique causent l'agrégation du peptide au niveau des synapses.

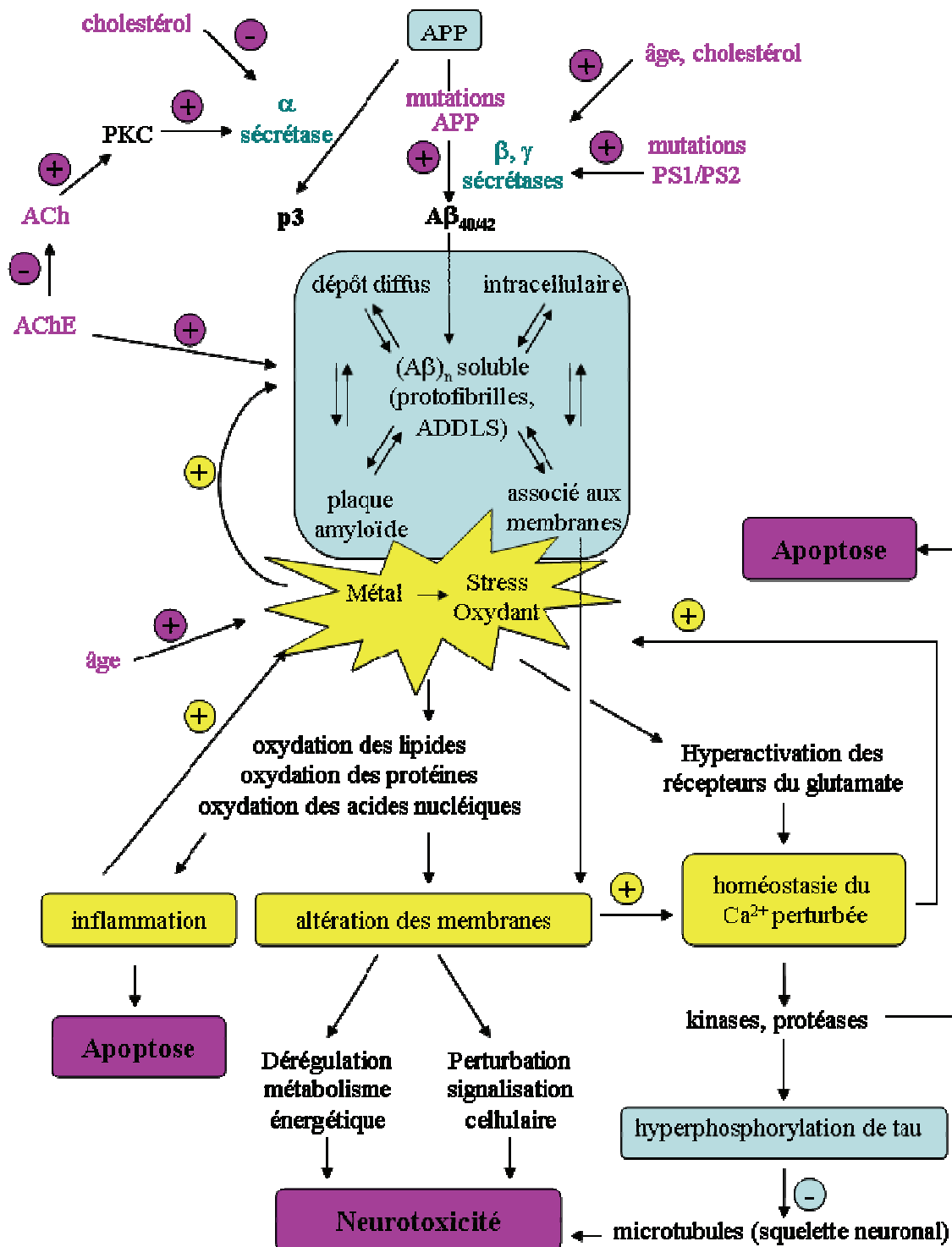


Schéma 3. Illustration du rôle central occupé par le peptide β -amyloïde dans les différents événements conduisant à la toxicité neuronale et à l'apoptose.

Ces ions métalliques peuvent être à l'origine de toxicité, *via* la production de stress oxydant. Celui-ci conduit en particulier à l'oxydation des membranes et à la perte de leur intégrité. De plus, l'interaction directe du peptide $A\beta$ hydrophobe avec ces membranes et

sa pénétration entraîne également la perméation de celles-ci. Il en résulte une augmentation du flux de Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule neuronale.

L'augmentation du taux de Ca^{2+} intracellulaire a de nombreux effets délétères. Elle génère du stress oxydant supplémentaire. Cette augmentation active également des kinases, conduisant à l'hyperphosphorylation de tau. Il s'en suit une déstructuration des axones et une perte des synapses qui conduit à l'altération de la mémoire et des fonctions cognitives.

Une concentration intracellulaire de Ca^{2+} excessive peut également déclencher des facteurs d'induction d'apoptose et conduire à la mort neuronale.

Un cercle vicieux vient amplifier ces phénomènes.

La dérégulation des synapses perturbe le fonctionnement des systèmes de neurotransmetteurs cholinergiques et favorise ainsi la production supplémentaire d'A β et son accumulation.

Les dysfonctionnements synaptiques et le stress oxydant augmentent par ailleurs l'influx de Ca^{2+} dans la cellule au niveau des neurones à glutamate, *via* la suractivation des récepteurs au NMDA. Ce phénomène conduit à une toxicité accrue au niveau de ce type de neurones.

Enfin, l'inflammation déclenchée suite à ces événements produit davantage de stress oxydant et accentue la toxicité générale.

VII. Stratégies thérapeutiques

Plusieurs revues permettent de faire le point sur les différentes approches thérapeutiques actuellement envisagées pour lutter contre la maladie d'Alzheimer (Bachurin, 2003; Suh and Checler, 2002). Ces stratégies peuvent être regroupées en deux classes selon qu'elles agissent ou non sur les causes de la maladie (Schéma 4).

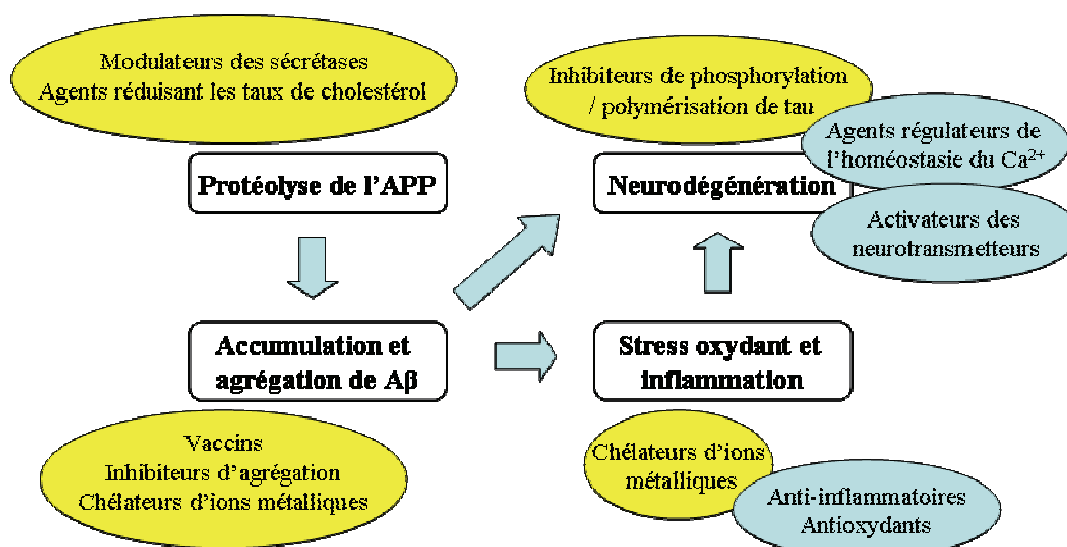


Schéma 4. Cibles pharmacologiques et approches thérapeutiques pour la maladie d'Alzheimer. Les agents ciblant les causes directes de la maladie sont notés en jaune.

Les molécules étudiées dans ces différentes stratégies thérapeutiques ont un point commun : elles doivent atteindre leur cible dans le cerveau, qui est un organe très protégé. Pour cela, elles doivent franchir la barrière hémato-méningée, qui contrôle le passage éventuel des substances transportées par le sang vers le fluide cérébrospinal. Plusieurs caractéristiques sont essentielles pour la pénétration passive d'un composé à travers les barrières biologiques en général, et la barrière hémato-méningée en particulier (Lipinski *et al.*, 2001). Le composé doit notamment posséder un faible poids moléculaire (< 500) et être hydrophobe. De plus, il doit être suffisamment stable pour ne pas être dégradé avant d'atteindre le cerveau.

Après une présentation des approches symptomatiques, nous détaillerons plus en détail les stratégies ciblant les causes de la maladie, et notamment les protéines Aβ et tau.

VII.1 Approches symptomatiques et traitements utilisés

Il n'y a actuellement aucun traitement curatif pour la maladie d'Alzheimer. Mis à part des neuroleptiques et des antidépresseurs utilisés pour lutter contre les troubles comportementaux des malades, les seuls traitements utilisés à ce jour sont des inhibiteurs des choline estérases ou des antagonistes des récepteurs du NMDA. D'autres axes

thérapeutiques, utilisant des antioxydants ou des anti-inflammatoires, sont actuellement en cours d'évaluation clinique quand à leur efficacité sur la maladie d'Alzheimer.

VII.1.1 Inhibiteurs des choline estérases

Afin de compenser le déficit du neurotransmetteur acétylcholine observé dans la maladie d'Alzheimer, une voie thérapeutique intéressante consiste à utiliser des inhibiteurs des choline estérases. Leur rôle est d'augmenter la concentration et la durée d'action de l'acétylcholine dans la fente synaptique et donc d'améliorer l'activation des récepteurs cholinergiques, améliorant ainsi les fonctions cognitives.

Ces composés ont été les premières molécules utilisées pour le traitement des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Bachurin, 2003).

La tacrine (Cognex[®]) a été une des premières molécules employées (Fig. 17). C'est un inhibiteur non compétitif de l'acétylcholine estérase mais aussi de la butylcholine estérase. Cependant, sa faible organospécificité et ses effets secondaires toxiques (consistant principalement en l'inhibition des canaux à sodium et potassium) font qu'elle a été abandonnée en faveur d'inhibiteurs de seconde génération.

Ces composés, tels que le donepezil (Aricept[®]) et la galantamine (Reminyl[®]), ciblent l'acétylcholine estérase et l'inhibent de façon compétitive. Ils semblent également avoir une fonction agoniste sur les récepteurs cholinergiques nicotiniques (Arias *et al.*, 2005) et pallient ainsi efficacement les déficits en acétylcholine.

Enfin, une dernière catégorie de molécules, de la famille des carbamates, comprend la rivastigmine (Exelon[®]), qui est un inhibiteur des deux formes acétylcholine et butylcholine estérases de type "slow-binding". Cette capacité à inhiber deux enzymes impliquées dans la maladie est probablement responsable de sa meilleure efficacité pour augmenter les taux d'acétylcholine quand on la compare au donepezil et à la galantamine (qui n'en inhibent qu'une seule). De plus, la rivastigmine est régiosélective, permettant une inhibition sélective des choline estérases du cerveau par rapport aux formes périphériques de ces enzymes.

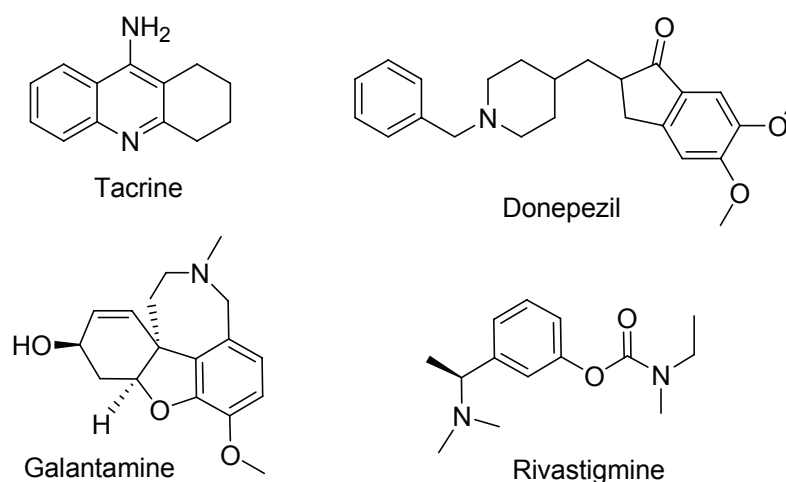


Fig. 17. Structure des inhibiteurs de choline estérases utilisés (ou ayant été utilisés) dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

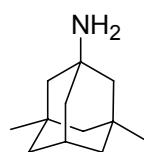
Toutefois, les inhibiteurs de l'activité cholinestérase induisent également des états dépressifs et devraient dans le futur être remplacés par de nouvelles molécules ayant d'autres cibles thérapeutiques au sein du système cholinergique (Fig. 5).

Dans ce domaine, les voies de recherches consistent à trouver des molécules capables de stimuler la synthèse et/ou le relargage de l'acétylcholine au niveau présynaptique (Bachurin, 2003) ou de stimuler les récepteurs cholinergiques muscariniques ou nicotiniques post-synaptiques par des agents possédant des propriétés cholinomimétiques (Suh and Checler, 2002).

VII.1.2 Antagonistes des récepteurs du glutamate de la famille NMDA : Régulation de l'homéostasie du Ca^{2+}

Des antagonistes des récepteurs du NMDA qui bloqueraient l'influx de calcium induit par le glutamate pourraient empêcher la neurotoxicité causée par $\text{A}\beta$.

Le plus étudié de ces dérivés est la mémantine (Namenda[®], Fig. 18), un inhibiteur non compétitif du récepteur du NMDA. Il possède une affinité modérée pour ce récepteur qui permet de bloquer de manière transitoire l'ouverture des canaux à calcium. Cela entraîne une réduction de la mort cellulaire engendrée par excitotoxicité sans altérer les fonctions normales de ce récepteur du NMDA (Lipton, 2006).



Mémantine

Fig. 18. Structure de la mémantine.

La mémantine a permis de réduire les détériorations cognitives et comportementales chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer à des stades modérés à graves lors de la phase III d'essais cliniques (Reisberg *et al.*, 2003). Son emploi en combinaison avec le donepezil a de plus permis d'améliorer les fonctions cognitives chez ce même type de patients (Tariot *et al.*, 2004). La mémantine est actuellement utilisée en tant que traitement neuroprotecteur ralentissant le développement de la maladie d'Alzheimer pour des cas modérés à graves.

Dans ce domaine, une autre approche consisterait à utiliser des composés inhibant la toxicité du calcium induite par A β , en bloquant par exemple certains canaux calciques ou en modulant l'activité de récepteurs chargés de réguler l'homéostasie du calcium.

VII.1.3 Anti-inflammatoires non stéroïdiens

La neurodégénérescence du tissu cérébral dans la maladie d'Alzheimer étant accompagnée de phénomènes inflammatoires, il a très vite été envisagé d'utiliser des anti-inflammatoires dans son traitement.

Ainsi, des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ont été testés dans le cadre de la maladie d'Alzheimer (Dannhardt and Kiefer, 2001; Townsend and Pratico, 2005). Ces molécules agissent en inhibant les cyclooxygénases (COX), qui sont des enzymes de la biosynthèse des prostaglandines intervenant dans les processus d'inflammation.

Il existe deux types de cyclooxygénases : (i) la cyclooxygénase de type 1 (COX-1), constitutive et exprimée dans presque tous les tissus, assure un grand nombre de fonctions homéostatiques, (ii) la cyclooxygénase de type 2 (COX-2), inductible en réponse à l'inflammation, est présente constitutivement au niveau des neurones. Son expression est fortement augmentée dans la maladie d'Alzheimer suite à l'inflammation (Dannhardt and Kiefer, 2001).

L'ibuprofène, le flurbiprofène, ou encore l'indométhacine (Fig. 19) sont des inhibiteurs réversibles des deux types de COX (compétitif pour le premier et de type "slow-binding" pour les deux derniers) proposés pour réduire l'inflammation dans la maladie d'Alzheimer. Une large utilisation de ces médicaments est toutefois limitée en raison des effets secondaires observés généralement pour les AINS, tels que des ulcères, dus à l'inhibition de COX-1 (Bachurin, 2003).

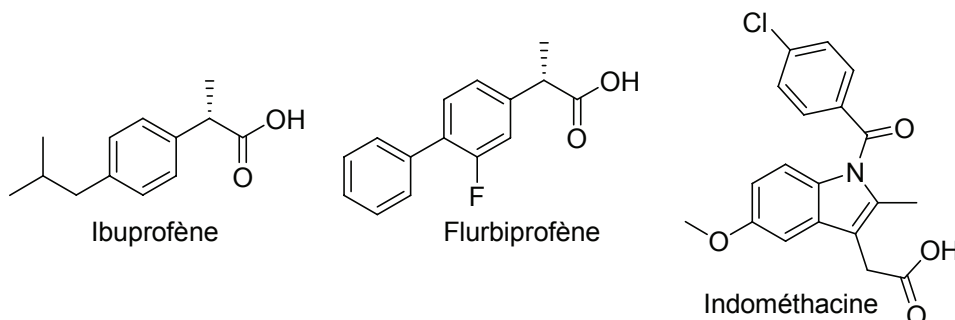


Fig. 19. Exemples d'anti-inflammatoires non stéroïdiens testés dans le cadre de la maladie d'Alzheimer.

Beaucoup d'efforts se portent à l'heure actuelle vers la recherche d'inhibiteurs spécifiques de COX-2, qui devraient permettre de cibler la réponse inflammatoire au niveau du cerveau. Ils devraient en particulier être dépourvus des effets secondaires liés à l'inhibition de la synthèse constitutive des prostaglandines puisqu'ils sont inactifs envers COX-1 (Dannhardt and Kiefer, 2001). Des exemples de tels composés sont le rofecoxib (Vioxx®) ou le celecoxib (Celebrex®), qui sont des inhibiteurs irréversibles de COX-2 (Fig. 20). Malheureusement, les premiers essais cliniques dans le cadre de la maladie d'Alzheimer n'ont révélé aucun effet thérapeutique (Reines *et al.*, 2004).

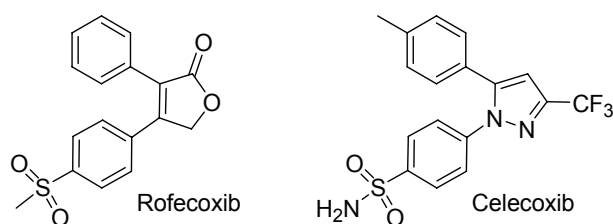


Fig. 20. Exemples d'anti-inflammatoires non stéroïdiens spécifiques de COX-2 testés dans le cadre de la maladie d'Alzheimer.

VII.1.4 Antioxydants

Afin de limiter le stress oxydant observé au cours de la maladie d'Alzheimer, de nombreux antioxydants ont été testés chez l'animal et chez l'homme (Bachurin, 2003).

Le principe d'un antioxydant est d'être facilement oxydé par les espèces réactives de l'oxygène, empêchant la réaction de ces dernières sur les molécules biologiques.

Ainsi par exemple, la mélatonine (Fig. 21), une hormone de régulation du sommeil, possède des propriétés antioxydantes. La mélatonine est facilement hydroxylée en position 6 par $\text{OH}^\bullet$, ce qui explique en partie sa capacité à piéger ces radicaux toxiques. L'avantage essentiel de cette molécule (et de son précurseur, la sérotonine) est de passer facilement la barrière hémato-méningée. Administrée à des souris transgéniques APP2576, la mélatonine a montré une activité positive en réduisant le stress oxydant et en augmentant la durée de vie de ces animaux (Matsubara *et al.*, 2003). Cependant, sa distribution est contrôlée dans de nombreux pays européens car une accentuation des états dépressifs a été associée à son administration.

D'autres produits naturels possédant des propriétés antioxydantes ont été testés dans le cadre de la maladie d'Alzheimer. Ainsi, l' α -tocophérol (une des formes prédominantes de la vitamine E) a fait l'objet d'études cliniques. Bien qu'une première étude ait montré son efficacité pour retarder le développement de la maladie chez des patients atteints de maladie d'Alzheimer modérée ou grave (Sano *et al.*, 1997), l'utilisation de la vitamine E reste sujette à débat (Boothby and Doering, 2005).

De même, les hormones stéroïdiennes possèdent un effet neuroprotecteur qui a été associé, au moins en partie, à un fort effet antioxydant (Bachurin, 2003). Les isomères 17α - et 17β -œstradiol et certains de leurs dérivés synthétiques passent la barrière hémato-méningée et bloquent efficacement l'accumulation intracellulaire d'EORs. Des études cliniques ont montré un effet protecteur de ces œstrogènes contre le risque de maladie d'Alzheimer chez les femmes recevant un traitement post-ménopausique à base de ces molécules (Henderson, 1997). Cependant, les œstrogènes ne semblent pas entraîner d'améliorations probantes sur l'évolution de la maladie (Suh and Checler, 2002).

Enfin, les polyphénols sont également des antioxydants puissants. Ainsi, la curcumine (une épice indienne) protège des cultures cellulaires du stress oxydant induit par $\text{A}\beta_{42}$ et réduit les dommages oxydants chez des souris transgéniques APP2576 (Kim *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2001). Le resvératrol et la catéchine (des composants du vin rouge et du thé vert, respectivement) ont aussi un effet protecteur vis-à-vis d' $\text{A}\beta$ sur culture cellulaire (Conte *et al.*, 2003).

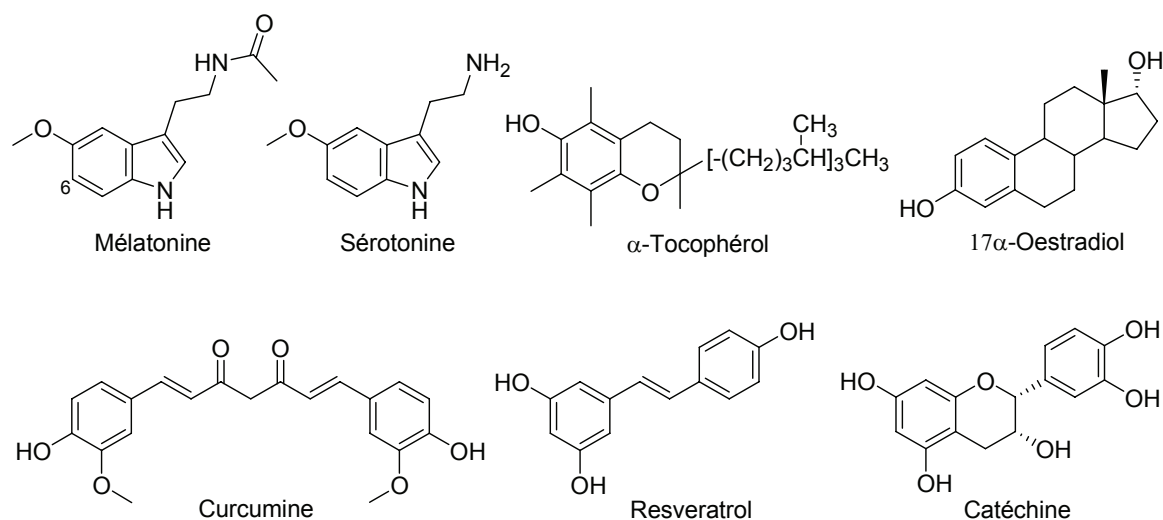


Fig. 21. Structures de quelques composés d'origine naturelle ayant montré des propriétés antioxydantes en relation avec la maladie d'Alzheimer.

Certains dérivés synthétiques sont également évalués pour leurs propriétés antioxydantes vis-à-vis de la toxicité induite par A β . C'est le cas de polyphénols synthétiques dérivés des composés naturels cités précédemment, ou encore du composé D609 (Fig. 22). Ce dernier possède une fonction dithiocarbonate lui permettant de se lier aux aldéhydes α - β insaturés (4-hydroxy-2-nonèn-1-al, acroléine,...) retrouvés à proximité des plaques amyloïdes et de bloquer ainsi leur toxicité. Ce dérivé passe la barrière hémato-méningée chez des gerbilles et réduit le stress oxydant induit par A β introduit *ex vivo* sur des synaptosomes de ces animaux (Perluigi *et al.*, 2006).

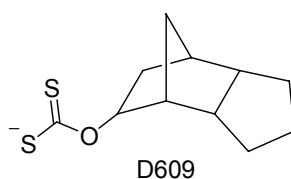


Fig. 22. Structure du composé synthétique D609 ayant montré des propriétés antioxydantes en relation avec la maladie d'Alzheimer.

VII.1.5 Remarque

Pour conclure, il faut noter que l'utilisation de ces traitements d'approche symptomatique a parfois des effets additionnels sur les causes de la maladie d'Alzheimer, par un mécanisme différent de celui qui a lieu lors de leur utilisation classique. C'est le cas de certains composés de la famille des anti-inflammatoires non stéroïdiens ou de certains antioxydants, dont les effets seront repris dans le chapitre suivant.

VII.2 Agents thérapeutiques ciblant les causes de la maladie

Une approche curative de la maladie d'Alzheimer consiste à développer des agents affectant les voies responsables de la neurodégénérescence. De nombreux efforts de recherche ont été menés ces dernières années, conduisant à des stratégies thérapeutiques actuellement à des stades de développement plus ou moins avancés. Ces stratégies cherchent principalement à diminuer la production d'A β , à augmenter son élimination ou à bloquer son agrégation et ses effets toxiques. Une autre cible est la taupathie associée à la maladie.

VII.2.1 Inhibiteurs de la phosphorylation ou de la polymérisation de tau

Le blocage de la pathologie associée à la formation de neurofibrilles de protéine tau hyperphosphorylée est une stratégie thérapeutique intéressante, d'autant que les taupathies interviennent dans plusieurs maladies neurodégénératives.

Des inhibiteurs des kinases responsables de la phosphorylation de tau, telles que la kinase cycline-dépendante 5 (cdk-5) et la kinase glycogène-synthase 3 (GSK-3) ont été étudiés. Il en est ainsi du lithium, déjà utilisé dans le traitement des maladies bipolaires telles que la mania-co-dépression, et qui est un inhibiteur réversible de la GSK-3. Sur culture neuronale, il réduit la phosphorylation de tau et améliore la fixation de tau aux microtubules, stabilisant ainsi ces dernières (Hong *et al.*, 1997).

Toutefois, le phénomène de phosphorylation régule un grand nombre d'enzymes. Il est donc important d'être spécifique pour les kinases impliquées dans la phosphorylation de tau, ce qui rend très difficile le développement de cette stratégie.

Des agents inhibant l'agrégation de tau ou dissociant les neurofibrilles préformées sont également à l'étude. Un criblage à haut débit sur différents isoformes de tau et sur des protéines tau modifiées a permis d'identifier un certain nombre de dérivés (Fig. 23) capables d'inhiber *in vitro* l'agrégation de tau et de désassembler des agrégats préformés, avec des CI₅₀ de l'ordre du micromolaire. D'un point de vue général, la CI₅₀ correspond dans tout ce chapitre à la concentration en molécule permettant de diminuer de 50 % le phénomène étudié. Dans le cas présent, par exemple, les CI₅₀ sont les concentrations en composés nécessaires pour inhiber de 50 % la formation d'agrégats ou pour désassembler 50 % des agrégats préformés, respectivement. Parmi ces molécules, l'émodine et B1C11

sont également capables d'inhiber l'agrégation de tau et de réduire sa toxicité sur des modèles cellulaires de taupathies (Khlistunova *et al.*, 2006; Pickhardt *et al.*, 2005).

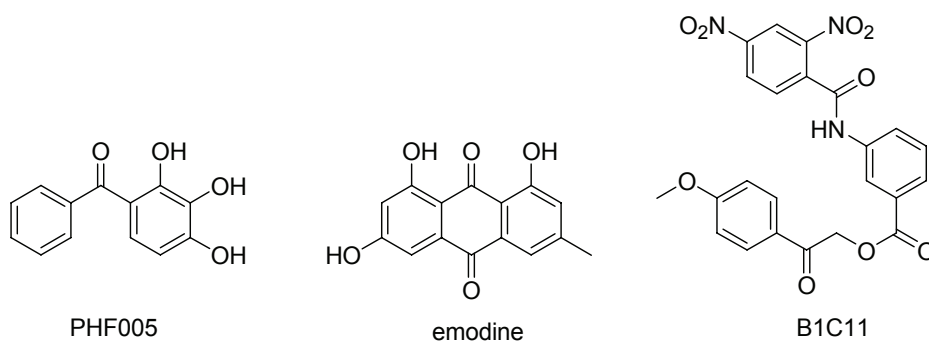


Fig. 23. Structures de quelques composés inhibant la polymérisation de la protéine tau.

VII.2.2 Diminution de la production d'A β

La protéolyse de la protéine APP par les sécrétases β et γ conduit à la formation des peptides A β . La recherche d'inhibiteurs de ces deux sécrétases a donc été menée (Citron, 2004a, 2004b; Dewachter and Van Leuven, 2002; John *et al.*, 2003). Afin de diminuer cette production d'A β , d'autres recherches concernent l'activation de l' α -sécrétase (impliquée dans l'hydrolyse non amylogène de l'APP) ou la régulation des sécrétases par la modulation des taux de cholestérol.

VII.2.2.1 Inhibiteurs de la β -sécrétase

La β -sécrétase est une protéine transmembranaire de 501 acides aminés de la famille de pepsines. Elle est responsable de la coupure de l'APP selon la voie amylogène (Lin *et al.*, 2000). C'est une protéase à aspartate, c'est-à-dire qu'elle possède dans le site actif deux résidus aspartate (Asp³² et Asp³⁸⁸) requis pour l'activité de coupure de la liaison peptidique (Schéma 5).

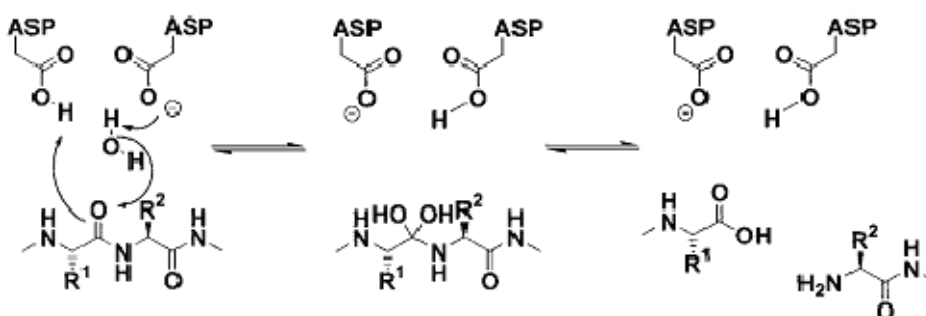


Schéma 5. Mécanisme d'hydrolyse d'une liaison peptidique par une protéase à aspartate (d'après Schmidt, 2003).

Des inhibiteurs de ce type d'enzyme sont connus. Ce sont des analogues tétraédriques de l'état de transition se formant au sein de l'enzyme.

Ce type d'inhibiteur a été développé envers la β -sécrétase (Schmidt, 2003). La synthèse d'un peptide (OM99-2, Fig. 24) reprenant une partie de la structure de l'APP sous sa forme mutée au niveau du site de coupure par la β -sécrétase (mutant Sweedich, Fig. 15) a tout d'abord été réalisée. Il possède à la place de la liaison peptidique scissile un motif hydroxyéthylène mimant l'état de transition (Ghosh *et al.*, 2000). Il inhibe l'activité β -sécrétase avec une constante d'inhibition $K_i = 1,6$ nM sur l'enzyme isolée.

Cette activité a par la suite été améliorée avec un composé de structure proche, OM00-3 ($K_i = 0,3$ nM) (Turner *et al.*, 2001).

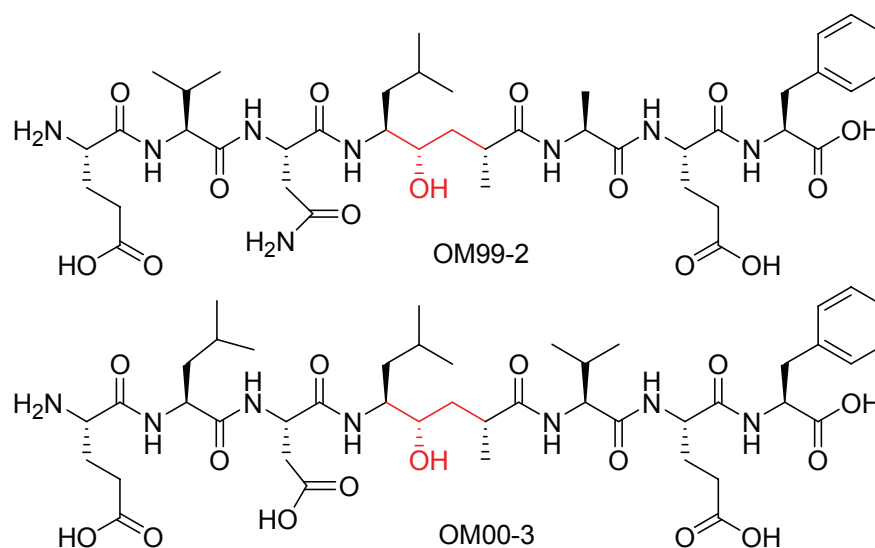


Fig. 24. Structures de dérivés peptidiques analogues de l'état de transition inhibant la β -sécrétase. Le motif isostère hydroxyéthylène est représenté en rouge.

La structure tridimensionnelle de la partie protéase de la β -sécrétase comportant OM99-2 dans le site actif a été déterminée par diffraction aux rayons X (Fig. 25) (Hong *et al.*, 2000). Elle confirme le mode d'action de ces dérivés, puisque la fonction -OH du motif hydroxyéthylène se lie aux aspartates du site catalytique et déplace la molécule d'eau catalytique impliquée normalement dans la réaction d'hydrolyse de la protéine APP.

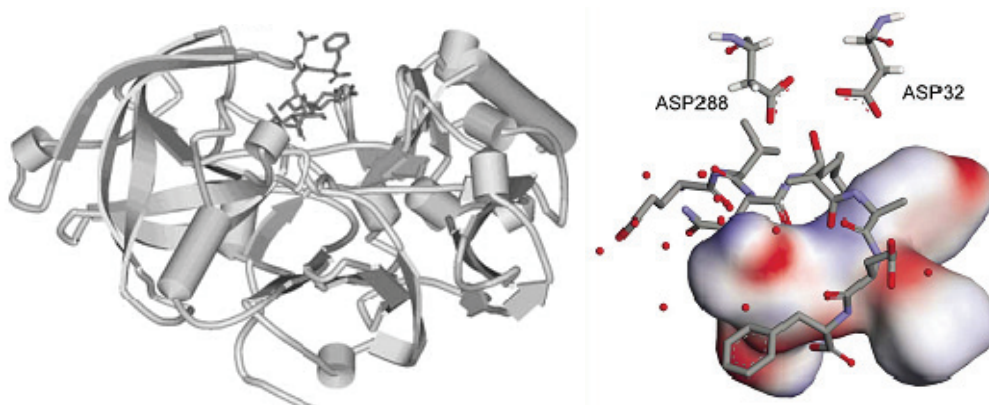


Fig. 25. Structures d'un fragment de la β -sécrétase et de son site actif en présence de l'inhibiteur OM99-2 (d'après Schmidt, 2003).

Cependant, ces premiers inhibiteurs sont facilement hydrolysés au niveau de leurs liens peptidiques et montrent une faible capacité à passer les membranes biologiques en raison de leur taille, ce qui conduit à un manque d'activité sur cellule. Des molécules plus courtes et dont la structure s'éloigne davantage des structures peptidiques "naturelles" ont été obtenues sur la base de ces premiers composés, en variant les motifs isostères de l'état de transition ainsi que les acides aminés et leurs substituants. C'est le cas des molécules **A**, qui mime l'état de transition grâce à un motif statine ($CI_{50} = 0,12 \mu M$ sur l'enzyme isolée, $CI_{50} = 4 \mu M$ sur culture cellulaire) (Hom *et al.*, 2003), ou **B** avec un motif aminoéthylène ($K_i = 26 nM$ sur l'enzyme isolée, $CI_{50} = 0,18 \mu M$ sur culture cellulaire) (Yang *et al.*, 2006) (Fig. 26).

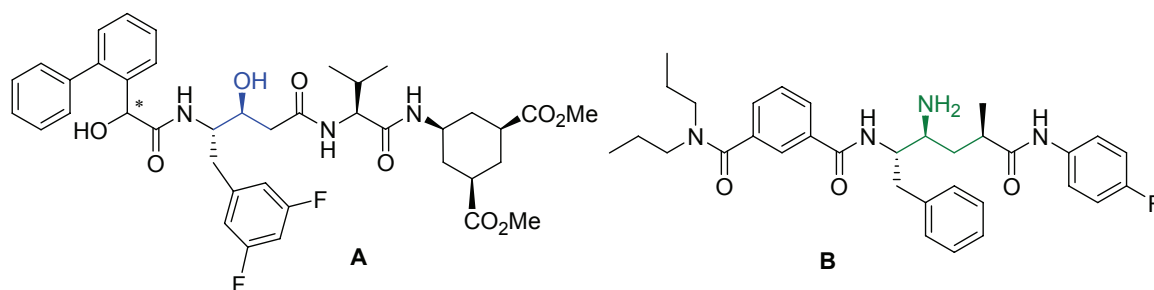


Fig. 26. Structures de dérivés peptidiques modifiés inhibiteurs de la β -sécrétase. Le motif isostère mimant l'état de transition est représenté en bleu (statine) ou en vert (aminoéthylène).

D'autres inhibiteurs ont été obtenus par criblage à haut débit ou par "docking" à partir de la structure tridimensionnelle de la β -sécrétase co-cristallisée avec OM99-2. C'est le cas des molécules **C** ($CI_{50} = 0,35 \mu M$), **D** ($CI_{50} = 1 \mu M$) et **E** ($CI_{50} = 0,093 \mu M$) qui ont montré une activité inhibitrice sur l'enzyme purifiée (Fig. 27) (Garino *et al.*, 2006; John *et al.*, 2003). Cependant, l'obtention de tels composés, dont la structure s'éloigne du

substrat naturel de l'enzyme, et leur optimisation est relativement difficile dans la mesure où le site actif révélé par la structure cristallographique est une poche très large (Hong *et al.*, 2000).

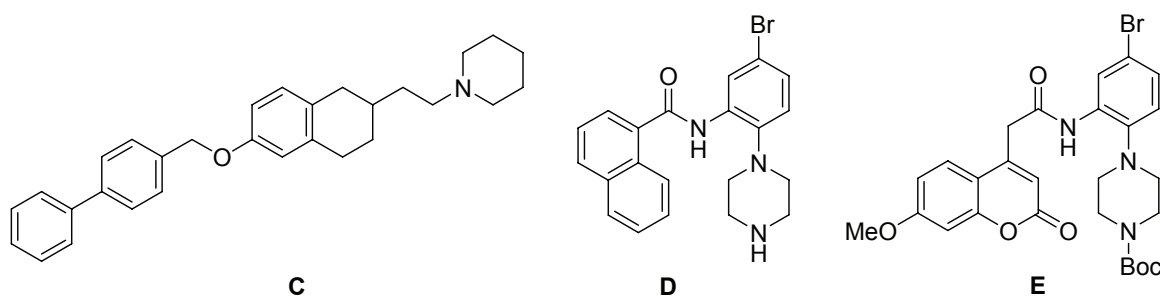


Fig. 27. Structures d'autres inhibiteurs de la β -sécrétase.

Il faut néanmoins noter que les sécrétases membranaires comme la β -sécrétase possèdent généralement plusieurs substrats. Ainsi, d'eux d'entre eux ont récemment été identifiés pour la β -sécrétase : les protéines ST6Gal I (une sialyltransférase située dans l'appareil de Golgi) et PSGL-1 (qui intervient lors des réactions inflammatoires) (Dewachter and Van Leuven, 2002; Lichtenthaler *et al.*, 2003). Il pourrait donc être risqué d'agir sur la β -sécrétase, bien qu'il faille également noter que des souris knock-out pour cette protéase montrent une réduction marquée de niveaux d'A β dans le cerveau, sans problème majeur au niveau du développement, de l'état de santé général ou de la fertilité (Luo *et al.*, 2001).

De plus, il existe un homologue à la β -sécrétase, la protéine BACE-2, qui intervient dans la vascularisation des tissus. Il est donc important de synthétiser des inhibiteurs sélectifs de la β -sécrétase (BACE-1).

VII.2.2.2 Inhibiteurs de la γ -sécrétase

La γ -sécrétase est un complexe protéique comprenant quatre types de protéines transmembranaires : une préséniline (PS1 ou PS2), la nicastrine, Aph-1 et Pen-2 (De Strooper, 2003). Bien que cette enzyme n'ait pas été isolée à ce jour, il est établi que son site actif est situé au niveau des présénilines qui sont, comme la β -sécrétase, des protéases à aspartate (Wolfe *et al.*, 1999) et que les trois autres protéines ont un rôle de cofacteur.

La γ -sécrétase réalise un clivage inhabituel au sein de la région transmembranaire, dans un environnement hydrophobe. Peu d'exemples sont connus pour ce type de réactivité, ce qui devrait faciliter la spécificité des inhibiteurs pour cette enzyme. Ces inhibiteurs devront par ailleurs être hydrophobes pour atteindre le site actif, une caractéristique qui devrait aussi faciliter leur passage à travers la barrière hémato-méningée (Citron, 2004b).

Les premiers inhibiteurs de la γ -sécrétase étaient, comme dans le cas de la β -sécrétase, des dérivés peptidiques reprenant le site de clivage de l'APP par l'enzyme (Suh and Checler, 2002).

Par la suite, d'autres inhibiteurs de la γ -sécrétase ont été découverts par des criblages à haut débit suivis de modifications chimiques permettant d'affiner les structures retenues. C'est le cas du composé DAPT (Fig. 28, $CI_{50} = 20$ nM pour la production de A β sur extrait cellulaire), qui pénètre la barrière hémato-méningée et permet de diminuer de 50 % les taux d'A β corticaux dans le cerveau de souris transgéniques APP (Dovey *et al.*, 2001; Schmidt, 2003). D'autres modifications sur la base du DAPT, telles que l'introduction d'un motif benzocaprolactame, ont conduit au dérivé LY-411,575 ($CI_{50} = 0,082$ nM sur extrait cellulaire) (Wong *et al.*, 2004).

Selon le même processus, des modifications ont été réalisées sur un squelette de type benzodiazépine. Ce motif est présent dans de nombreuses molécules possédant une activité psychotrope et qui franchissent par conséquent la barrière hémato-méningée. Parmi les inhibiteurs de γ -sécrétase obtenus, le composé A est particulièrement actif ($CI_{50} = 0,06$ nM sur extrait cellulaire) (Churcher *et al.*, 2003).

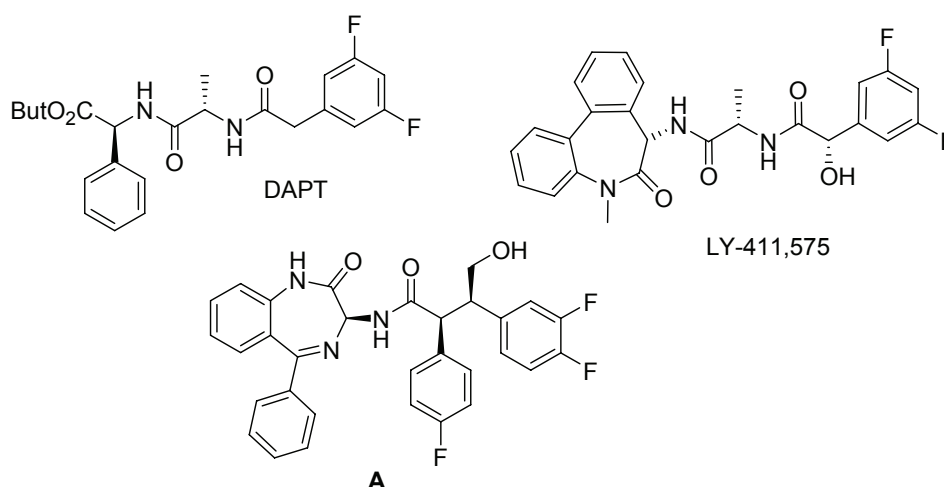


Fig. 28. Structures de quelques inhibiteurs des γ -sécrétases.

D'autre part, il est apparu que certains anti-inflammatoires non stéroïdiens tout d'abord utilisés dans la maladie d'Alzheimer pour leur effet sur COX, tels que l'ibuprofène ou le flurbiprofène (Fig. 19), pouvaient moduler le clivage de l'APP par la γ -sécrétase. De tels composés déplacent le site de coupure de celle-ci pour libérer des fragments plus courts (tels qu'A β ₃₈) et beaucoup moins toxiques qu'A β ₄₂. Ainsi, l'administration de ces composés réduit la quantité d'A β ₄₂, les taux de plaques amyloïdes et l'inflammation du cerveau chez des souris transgéniques APP2576 (Eriksen *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2000; Weggen *et al.*, 2001). Cet effet est indépendant de l'inhibition de COX (Townsend and Pratico, 2005; Weggen *et al.*, 2001).

Pour pallier à la toxicité gastro-intestinale de ces composés liée à l'inhibition de COX, des analogues du flurbiprofène inhibant la production d'A β ₄₂ mais sans effet sur l'action de COX ont été préparés. C'est le cas du R-flurbiprofène (Fig. 29) actuellement en phase III d'essais cliniques (Jacobsen *et al.*, 2005) ou du composé **B** (CI₅₀ = 20 μ M pour la production d'A β sur culture cellulaire) qui franchit la barrière hémato-méningée et permet de réduire les taux d'A β ₄₂ plasmatique sur souris transgéniques APP2576 (Peretto *et al.*, 2005).

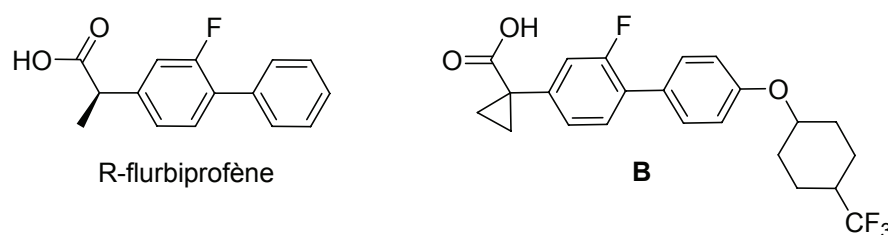


Fig. 29. Structures de dérivés issus du flurbiprofène et inhibiteurs des γ -sécrétases.

Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs de la γ -sécrétase peut conduire à des effets secondaires dus à l'inhibition du clivage de la protéine Notch (impliquée dans la régulation de la différenciation neuronale, de la spermatogénèse, de l'ovogénèse et de la myogénèse) (De Strooper *et al.*, 1999) ou d'autres protéines substrats de cette enzyme telles que APLP1, ErbB4 ou Ire1 (Dewachter and Van Leuven, 2002). Ainsi récemment, l'utilisation *in vivo* de LY-411,575 a causé des effets secondaires graves en relation avec Notch sur des souris transgéniques APP TgCRND8 (Wong *et al.*, 2004). Il est donc primordial de trouver des inhibiteurs sélectifs de la γ -sécrétase qui n'interfèrent pas avec la voie de signalisation de Notch. Certains AINS, qui modifient l'activité γ -sécrétase sans l'inhiber, répondent à ce critère (Weggen *et al.*, 2001).

VII.2.2.3 Activateurs de l' α -sécrétase

L' α -sécrétase est une métalloprotéase à zinc de la famille ADAM (pour "a disintegrin and metalloprotease") dont la nature exacte n'a pas encore été établie. Son activité est régulée par sa phosphorylation, *via* la protéine kinase C (PKC) (Dewachter and Van Leuven, 2002).

La stimulation de la coupure de l'APP par l' α -sécrétase pourrait être un outil intéressant, dans la mesure où les sécrétases α et β sont en compétition pour un même pool d'APP. Ainsi, la stimulation de l' α -sécrétase diminue la formation d'A β , en dirigeant l'APP vers la voie de dégradation non amylogène (Suh and Checler, 2002).

Une telle activation n'a jusqu'à présent pu être réalisée par des agonistes de l' α -sécrétase mais plutôt par des voies indirectes. Ainsi, la stimulation du clivage de l'APP par l' α -sécrétase est possible en utilisant des ligands de la PKC (Kozikowski *et al.*, 2003). Des agonistes des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine M₁ et M₃, dont les effets sur l'APP sont également liés à la PKC, permettent aussi de favoriser l'hydrolyse de l'APP par l' α -sécrétase *in vitro* et *in vivo* (Lin *et al.*, 1999; Nitsch *et al.*, 1992).

VII.2.2.4 Diminution de la production d'A β par des composés favorisant la réduction des taux de cholestérol

Les statines sont des composés qui réduisent les taux de cholestérol en inhibant de manière compétitive la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase. Cette enzyme catalyse la conversion de HMG-CoA en mévalonate lors de l'étape limitante de la biosynthèse du cholestérol (Shobab *et al.*, 2005). En diminuant les taux de cholestérol, les statines modulent l'activité des sécrétases impliquées dans la protéolyse de la protéine APP. Elles conduisent alors à la réduction de la production d'A β *in vitro* et *in vivo* (Fassbender *et al.*, 2001).

Des études épidémiologiques ont montré que l'utilisation de statines, telles que la simvastatine (Zocor[®]) ou l'atorvastatine (Lipitor[®]) (Fig. 30), pourrait réduire le risque de développer la maladie d'Alzheimer de 40 à 70 % (Jick *et al.*, 2000; Wolozin *et al.*, 2000).

Cependant, des premiers essais cliniques avec l'atorvastatine chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer à un stade faible ou modéré n'ont montré que de faibles tendances à l'amélioration des symptômes cliniques (Sparks *et al.*, 2005).

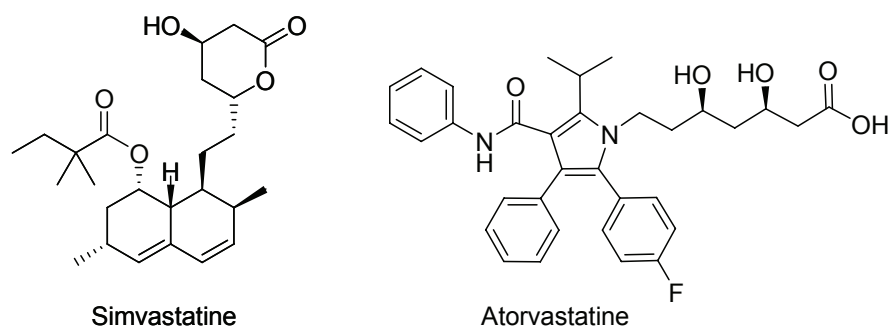


Fig. 30. Structures de quelques statines.

Dans la même optique de diminution des taux de cholestérol pour empêcher la production d'A β , des inhibiteurs de l'acyl-coenzyme A : cholestérol acyltransférase (ACAT) sont également à l'étude. L'ACAT est responsable du stockage du cholestérol dans l'organisme sous forme d'ester de cholestérol. En absence de cette enzyme, les cellules ne peuvent stocker qu'une quantité réduite de cholestérol. Ainsi, le composé CP-113,818 (Fig. 31), un inhibiteur de l'ACAT mimant son substrat acyl-coenzyme A, permet de réduire les taux de cholestérol chez la souris sauvage. Il permet également de réduire les taux d'A β_{42} soluble et de plaques et d'améliorer la mémoire chez des souris transgéniques APP (Hutter-Paier *et al.*, 2004).

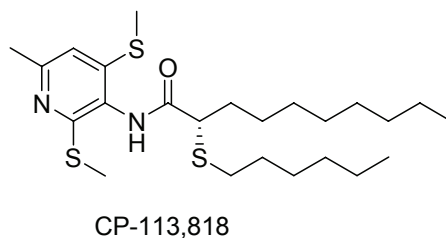


Fig. 31. Structure d'un inhibiteur de l'ACAT.

VII.2.2.5 Remarque sur l'emploi des inhibiteurs/activateurs des sécrétases

Bien que l'utilisation des modulateurs de sécrétases ou d'agents de régulation des taux de cholestérol pour diminuer la production d'A β soit une stratégie thérapeutique intéressante vis-à-vis de la maladie d'Alzheimer, elle risque cependant d'être limitée. En effet, la production d'A β est antérieure de plusieurs années à la détection de la maladie. Ainsi, une étude sur des souris transgéniques dont l'expression de l'APP peut être régulée montre que, à la suite de l'inhibition de l'expression de l'APP, la production d'A β est supprimée et la charge en plaques stabilisée, mais sans être réduite. Les plaques amyloïdes préexistantes, qu'elles soient diffuses ou denses, ne sont pas éliminées dans

une échelle de temps équivalente à celle qui avait permis leur formation (Jankowsky *et al.*, 2005).

VII.2.3 Augmentation de l'élimination d'A β

VII.2.3.1 *Approche vaccinale*

Une stratégie thérapeutique consiste à améliorer l'élimination du peptide A β par immunisation. Cette immunisation peut se faire selon deux méthodes : de façon active en utilisant le peptide A β lui-même, ou de façon passive avec des anticorps anti-A β .

La simple immunisation par injection d'A β_{42} humain par voie sous-cutanée engendre le développement d'anticorps dirigés contre le peptide chez des souris transgéniques APP. Elle empêche ainsi la formation de plaques amyloïdes chez les souris jeunes et conduit à une réduction de la charge en plaques chez les souris plus âgées (Schenk *et al.*, 1999). Elle permet de plus de réduire les dysfonctionnements cognitifs chez des souris transgéniques [APP $\times$ PS1] (Morgan *et al.*, 2000).

Des premiers essais cliniques (phase IIa) d'immunisation avec A β_{42} préagrégué (AN-1792) ont eu lieu en 2002. Cependant, 6 % des patients ont développé des encéphalites méningées graves à la suite de ces essais qui ont donc été interrompus. La cause probable de ces inflammations méningées est une réponse auto-immune forte visant l'APP qui est présent dans les neurones sains.

Les effets des injections (1 à 3 sur les 6 prévues) ont tout de même été évalués. Le traitement a conduit au développement d'anticorps anti-(AN-1792) dans 20 % des cas, mais les variations des taux d'A β_{42} dans le fluide cérébrospinal ou les résultats de tests cognitifs sont peu significatifs (Gilman *et al.*, 2005). D'autre part, l'analyse du cerveau d'un patient décédé à la suite d'une encéphalite a montré une réduction significative du taux de plaques amyloïdes associée à la présence de cellules microgliales qui pourraient être responsables de la destruction de ces plaques par phagocytose (Nicoll *et al.*, 2003).

Des tests d'immunisation passive avec des anticorps anti-A β ont également été menés. Comme dans le cas de l'immunisation directe, plusieurs études montrent que les anticorps permettent de réduire les plaques chez des souris transgéniques APP (PDAPP) (Bard *et al.*, 2000; DeMattos *et al.*, 2001). Certains de ces anticorps anti-A β sont actuellement testés cliniquement chez l'homme (Jacobsen *et al.*, 2005).

Il existe plusieurs hypothèses pour expliquer les mécanismes d'immunisation par des anticorps. Trois modèles non exclusifs ont été proposés (Citron, 2004b).

Dans un premier mécanisme, une faible partie des anticorps pénétrerait dans le cerveau (il ont été retrouvés liés à des plaques amyloïdes) et entraînerait l'élimination des plaques préexistantes par phagocytose *via* les cellules microgliales (Bard *et al.*, 2000; Schenk *et al.*, 1999).

Une seconde hypothèse ferait intervenir la solubilisation directe des dépôts amyloïdes par des anticorps pénétrant dans le cerveau et interagissant directement avec les plaques. C'est probablement le cas pour les anticorps dirigés contre l'épitope EFRH (les acides aminés 3 à 6 d'A β), dont l'effet de solubilisation sur A β a été prouvé *in vitro* (Frenkel *et al.*, 2000). Cet effet pourrait être rattaché à un effet de déstructuration des repliements en feuillets- β retrouvés au niveau des fibrilles.

Enfin, selon un troisième mécanisme, l'élimination se ferait de façon périphérique, *via* la séquestration de l'A β plasmatique par des anticorps anti-A β . En perturbant ainsi l'équilibre d'A β entre le plasma et le cerveau, les anticorps draineraient alors, par un différentiel de concentration, les peptides amyloïdes vers l'extérieur du cerveau (DeMattos *et al.*, 2001).

VII.2.3.2 Agents déstructurant les feuillets- β (" β -sheet breakers")

La neurotoxicité induite par A β est associée à l'agrégation du peptide, induite par la formation de fibrilles à partir de structures en feuillets- β . Une approche thérapeutique consiste à mettre au contact des agrégats amyloïdes des molécules capables de se lier à A β et de déstabiliser ces feuillets- β (" β -sheet breakers").

De courts peptides, reprenant une partie de la séquence d'A β située aux alentours des acides aminés 16 à 21, sont capables de déstructurer les peptides A β agrégés en fibrilles et les plaques amyloïdes. C'est le cas des peptides KLVFF (pour Lys-Leu-Val-Phe-Phe, qui correspond aux acides aminés 16 à 20 d'A β) (Tjernberg *et al.*, 1996), ou LPFFD (pour Leu-Pro-Phe-Phe-Asp, noté iA β 5) sélectionné à partir d'une série de peptides synthétiques modifiés et contenant un résidu proline qui favorise l'effet " β -sheet breaker" (Soto *et al.*, 1998).

Ces pentapeptides présentent une forte affinité pour les formes monomères des peptides β -amyloïdes. Il semble qu'ils interagissent avec les résidus hydrophobes de la

partie C-terminale du peptide A β et s'intercalent entre les deux brins du feuillet- β (Fig. 11). Ils déstabilisent ainsi ces structures responsables de l'agrégation. Il existe deux conséquences à ce phénomène : les " β -sheet breakers" empêchent la formation de fibrilles mais permettent également de désagréger les structures amyloïdes existantes *in vitro* et *in vivo*, par déplacement de l'équilibre entre les formes fibrillaires et les formes solubles d'A β .

L'activité " β -sheet breaker" de nombreuses séquences peptidiques a été étudiée puis ces séquences ont été optimisées. Entre autres, leur stabilité biologique a été augmentée en minimisant leur dégradation par les protéases. Ainsi, iA β 5p (Ac-LPFFD-NH₂), qui est en fait le peptide iA β 5 protégé en positions N- et C-terminales, possède des propriétés pharmacocinétiques améliorées. Il franchit la barrière hémato-méningée et permet de réduire les dépôts amyloïdes et la mort neuronale chez des souris transgéniques APP et [APP $\times$ PS1] (Permanne *et al.*, 2002). Un autre exemple est iA β 5p-A1 (Ac-LP-(NMe)-FFD-NH₂) qui est en plus méthylé sur un azote amidique et possède une stabilité accrue *in vivo* (Adessi *et al.*, 2003).

Les meilleures séquences ont de plus été couplées à différentes structures dans le but d'augmenter leur distribution au niveau du cerveau. C'est ainsi que le composé PPI-368 (reprenant les résidus 17 à 21 d'A β et couplé à l'acide cholique, Fig. 32) et son analogue PPI-433 comportant les acides aminés D non reconnus par les protéases ont été sélectionnés. Ils sont particulièrement efficaces pour inhiber la nucléation d'A β et ralentir l'extension des fibrilles, mais sont éliminés au niveau du foie chez le rat (Findeis *et al.*, 1999).

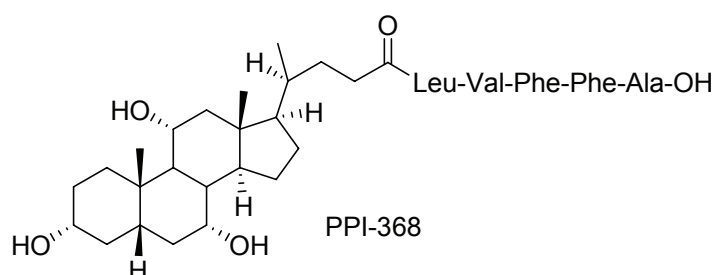


Fig. 32. Structure du peptide modifié PPI-368.

Les recherches s'orientent actuellement vers des dérivés non peptidiques ayant les mêmes capacités à déstructurer les plaques amyloïdes. Des exemples représentatifs sont reportés sur la figure 33.

Certains de ces composés ont été sélectionnés par criblage à haut débit, comme le DAPH, qui diminue la proportion de feuillets- β ($CI_{50} \approx 15 \mu M$), réduit la quantité de fibrilles synthétiques *in vitro* et diminue la toxicité d'A β_{42} sur culture neuronale (Blanchard *et al.*, 2004). Un autre composé, RS-0406, empêche la formation d'oligomères et de fibrilles d'A β et désagrège des fibrilles préformées. Il permet de plus de diminuer la toxicité d'A β sur culture cellulaire et d'améliorer la potentialisation à long terme *ex vivo* sur des coupes de cerveaux (Nakagami *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2005).

Par ailleurs, il est actuellement proposé que certains polyphénols, connus pour leurs propriétés antioxydantes, puissent aussi agir en tant qu'inhibiteurs de fibrillation d'A β (Porat *et al.*, 2006). Ainsi, le NDGA permet d'inhiber *in vitro* la formation de fibrilles d'A β_{42} (concentration efficace pour inhiber la formation de fibrilles de 50 % : $CE_{50} = 0,86 \mu M$) et de déstabiliser des fibrilles préexistantes ($CE_{50} = 0,87 \mu M$) (Ono *et al.*, 2002; Ono *et al.*, 2003). De même, la curcumine inhibe la formation des fibrilles d'A β_{40} et les désagrège ($CI_{50} = 0,8$ et $1 \mu M$ respectivement). Elle permet de plus de réduire les taux de plaques amyloïdes chez des souris transgéniques APP2576 (Yang *et al.*, 2005).

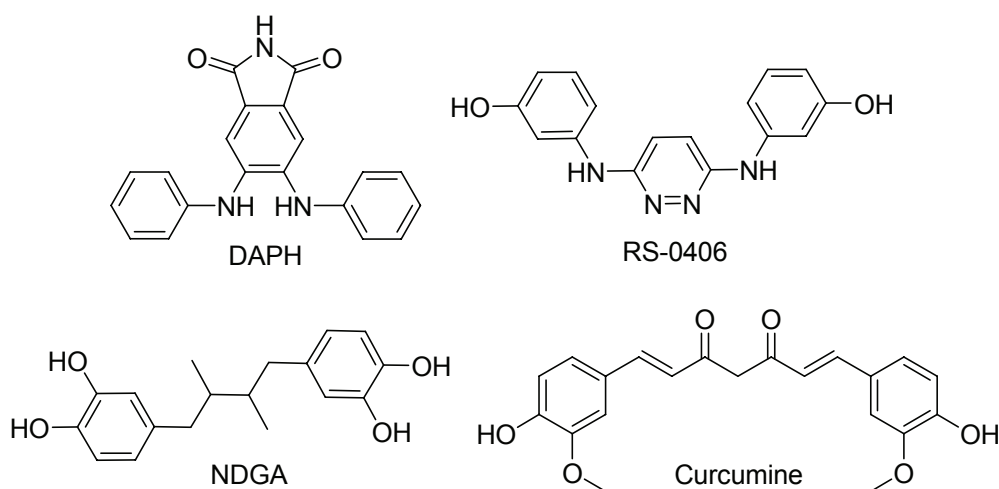


Fig. 33. Exemples d'inhibiteurs non peptidiques de fibrillation d'A β .

Tous ces composés présentent des structures fortement aromatiques, les noyaux (phényle ou phénolique) étant reliés par un espaceur plus ou moins long et rigide. Il a été proposé qu'ils aient un effet " β -sheet breaker" en perturbant les interactions hydrophobes qui conduisent à la fibrillation du peptide (Ono *et al.*, 2003). Une autre hypothèse, non exclusive, propose que ces composés se lient préférentiellement aux structures amyloïdes

en feuillets- β (de la même manière qu'un colorant spécifique tel que la thioflavine T) et inhibent ainsi la croissance des fibrilles (Porat *et al.*, 2006).

Enfin, un composé ionique simple, le tramiprosate (AlzhemedTM, Fig. 34) est en phase III d'essais cliniques (Jacobsen *et al.*, 2005). Ce composé se lie à l'A β soluble et maintient celui-ci dans une structure non organisée et / ou en hélice- α . Il réduit les plaques amyloïdes et les taux d'A β soluble et insoluble chez des souris transgéniques APP (Gervais *et al.*, 2006).

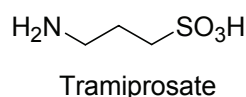


Fig. 34. Structure du tramiprosate.

VII.2.3.3 Chélateurs d'ions métalliques

La mise en évidence d'un niveau élevé d'ions métalliques à activité rédox comme le cuivre ou le fer au niveau des zones du cerveau touchées par la maladie d'Alzheimer est à l'origine de l'idée d'utiliser des chélateurs de ces ions métalliques pour empêcher leurs effets pathogènes (Bush, 2002; Cuajungco *et al.*, 2005). Ces ions métalliques agissent sur la structuration des peptides amyloïdes et leur agrégation en plaques insolubles, ainsi que sur la production de stress oxydant par A β . L'emploi de chélateurs devrait permettre de retirer ces ions métalliques des complexes qu'ils forment avec A β .

Le premier essai thérapeutique dans cette voie a concerné un chélateur puissant, la desferrioxamine (Desféral[®], Fig. 35), utilisé jusque là dans le traitement des excès en fer (Richardson and Ponka, 1998). Ce composé a permis une réduction significative du déclin des aptitudes comportementales chez des malades d'Alzheimer (Crapper McLachlan *et al.*, 1991). Cependant, il possède un certain nombre de désavantages : (i) c'est une molécule hydrophile chargée passant mal la barrière hémato-méningée, (ii) elle est rapidement dégradée *in vivo* et (iii) elle provoque des effets secondaires importants (anémie, ...) du fait d'une déplétion généralisée des ions métalliques (Bush, 2002).

L'emploi de chélateurs plus hydrophobes a alors été envisagé. C'est ainsi qu'un chélateur hydrophobe sélectif du cuivre et du zinc, le clioquinol (Fig. 35), utilisé en tant qu'antibiotique jusqu'en 1970, a fait l'objet d'études chez l'homme comme agent potentiel contre la maladie d'Alzheimer. Contrairement à la desferrioxamine, le

clioquinol passe la barrière hémato-méningée. Des souris transgéniques APP2576 traitées par le clioquinol présentent une diminution de 49 % de la charge en plaques, une augmentation du taux d'A β soluble et une amélioration de leur état général en comparaison avec les souris contrôles (Cherny *et al.*, 2001). Ces effets s'accompagnent d'une augmentation des taux de Cu^{II} et Zn^{II} solubles, traduisant une redistribution des ions métalliques par le clioquinol plutôt qu'une chélation systématique. Ces résultats encourageants ont permis d'entreprendre des essais de phase II chez des patients présentant une maladie d'Alzheimer modérément grave et répartis en deux groupes selon l'importance de leurs symptômes (Ritchie *et al.*, 2003). L'effet du traitement sur 24 semaines a été significatif en ce qui concerne la prévention du déclin cognitif pour les personnes à un stade avancé de la maladie. Dans tous les cas, le traitement par le clioquinol a été accompagné d'une réduction du taux d'A β ₄₂ plasmatique. Cependant, les essais cliniques ont été suspendus en raison de la toxicité d'un sous-produit du clioquinol (5,7-diiodo-8-hydroxyquinoléine) présent dans les lots utilisés pour ces tests.

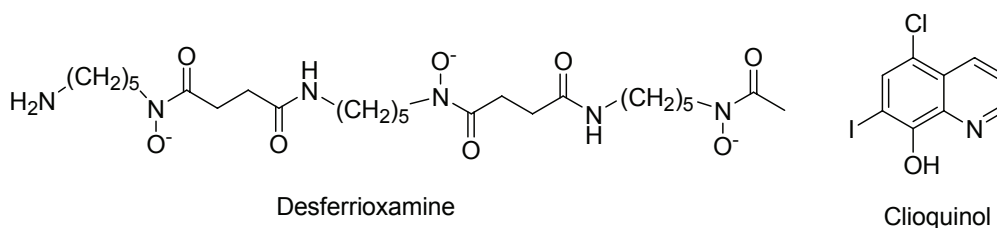


Fig. 35. Chélateurs d'ions métalliques évalués cliniquement dans le cadre de la maladie d'Alzheimer.

D'autres chélateurs ont également été testés sur modèle animal. Ainsi, le chélateur lipophile DP-109 (Fig. 36) permet de réduire le taux de plaques amyloïdes et d'augmenter la concentration d'A β soluble chez des souris transgéniques APP2576 (Lee *et al.*, 2004). Le composé XH1 est une molécule duale conçue pour posséder des propriétés de chélation *via* la structure du DTPA et une affinité pour les plaques amyloïdes grâce à deux entités 4-benzothiazole-2-yl-phénylamine. Ce motif est en effet retrouvé dans la thioflavine T, un colorant spécifique des plaques amyloïdes interagissant avec les feuillets- β . XH1 montre un effet modeste de diminution des plaques et des taux d'A β soluble chez des souris transgéniques [APP $\times$ PS1] (Dedeoglu *et al.*, 2004).

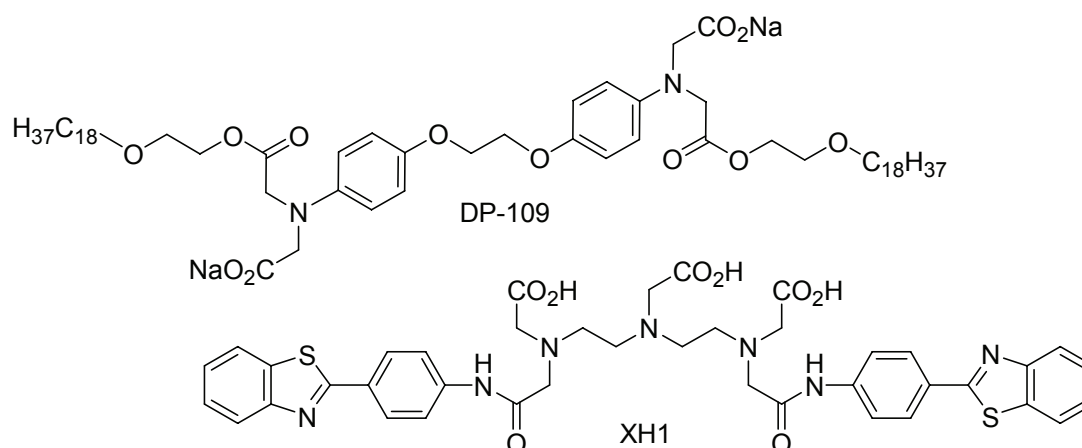


Fig. 36. Structures de chélateurs d'ions métalliques testés dans le cadre de la maladie d'Alzheimer.

Enfin, des molécules possédant des propriétés chélatantes sont proposées comme agents à activité potentielle contre la maladie d'Alzheimer. C'est le cas par exemple de dérivés de la 8-hydroxyquinoléine (comme le clioquinol) tels que VK-28 ou HLA-20 (Fig. 37), développés comme chélateurs du fer dans le cas de la maladie de Parkinson (Ben Shachar *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2005), ou encore du chélateur de cuivre JKL 169 (Moret *et al.*, 2006). Cependant, ces molécules doivent être testées afin d'évaluer leur activité *in vitro* (puis éventuellement *in vivo*) dans le cadre de la maladie d'Alzheimer.

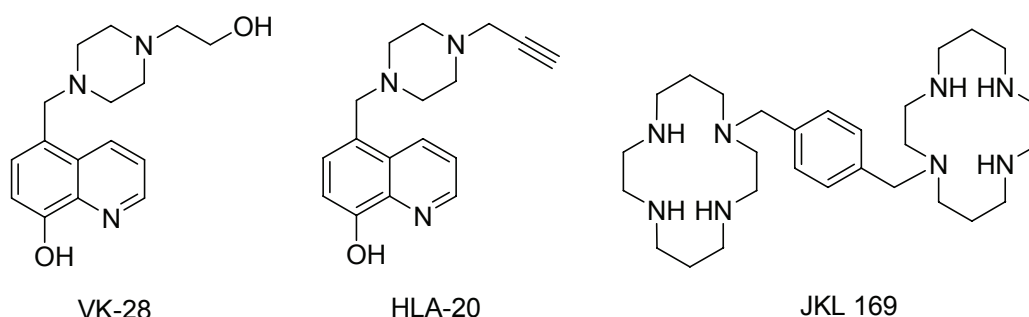


Fig. 37. Structures de quelques composés chélateurs d'ions métalliques présentant une activité potentielle contre la maladie d'Alzheimer.

Cette stratégie de chélation des ions métalliques ne vise pas à appauvrir l'organisme en ions métalliques, comme c'est le cas des chélateurs systématiques (triéthylènetétramine, D-pénicillamine, desferrioxamine, ...). Ces derniers, utilisés par exemple dans le traitement de la maladie de Wilson (cuivre) ou de la β -thalassémie (forme d'anémie héréditaire) pour le fer (Sarkar, 1999), agissent en séquestrant les ions métalliques périphériques et en les éliminant par excrétion.

Le but est ici d'entrer en compétition avec le peptide pour les ions métalliques et de perturber les interactions métal-protéine délétères. Les chélateurs doivent pouvoir franchir la barrière hémato-méningée et posséder des propriétés de chélation adaptées, suffisamment fortes et / ou sélectives pour interagir avec les ions métalliques fixés sur A β sans toutefois complexer les ions métalliques des métalloprotéines. Une stratégie proposée par Bush *et coll.* sous le nom de MPACs ("metal-protein attenuating compounds") serait d'utiliser des chélateurs permettant de piéger les ions métalliques sur A β et de redistribuer ceux-ci en les réexportant dans la circulation sanguine générale (Barnham *et al.*, 2004a).

VII.2.3.4 Remarque sur l'emploi de molécules agissant sur les agrégats d'A β

L'emploi d'agents qui ont un effet sur les agrégats d'A β devra être contrôlé pour savoir si leur action ne risque pas de favoriser le relargage de formes plus ou moins oligomériques qui corréleraient davantage avec l'évolution de la maladie d'Alzheimer que les plaques amyloïdes.

Il faut toutefois remarquer que ces stratégies thérapeutiques se sont révélées très prometteuses *in vitro* mais aussi *in vivo*. Dans ce domaine, certains composés sont de plus très puissants car ils ont l'avantage de cibler deux aspects de la maladie d'Alzheimer. C'est le cas de certains " β -sheet breakers" qui possèdent également des propriétés antioxydantes, comme la curcumine. De même, les chélateurs d'ions métalliques, en retirant les ions métalliques fixés sur A β , agissent contre la précipitation du peptide mais éliminent également une source importante de stress oxydant.

VIII. Conclusion

La maladie d'Alzheimer est un phénomène complexe et multifactoriel. Elle repose sur des causes génétiques et environnementales, et est accentuée avec l'âge. Elle implique une cascade d'événements mettant en jeu de nombreuses structures cellulaires du cerveau (protéines, membranes, ...) et qui conduisent à terme à la dégénérescence des neurones, à la disparition des synapses et à la mort cellulaire. Ces phénomènes sont responsables de

l'altération de la mémoire et des fonctions cognitives observée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

Cette complexité permet le développement d'un large éventail de stratégies thérapeutiques envisageables pour traiter cette maladie. A l'heure actuelle, deux voies seulement ont abouti à des médicaments (les inhibiteurs des choline estérases et un inhibiteur des récepteurs du NMDA) qui permettent d'améliorer les symptômes chez les patients. Bien que ces traitements n'agissent pas sur les causes de la maladie, le nombre de cibles biologiques possibles permet d'espérer de telles thérapies dans le futur.

Le peptide β -amyloïde ($A\beta$) est une espèce clé dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Son interaction avec les ions métalliques Cu^{II} et Zn^{II} est également un point majeur, puisque ces derniers prennent part à la précipitation du peptide β -amyloïde et à sa toxicité *via* la génération d'espèces réactives de l'oxygène toxiques pour un grand nombre d'espèces biologiques (lipides, protéines, ADN).

La stratégie de chélation de ces ions métalliques, qui a donné de premiers résultats positifs *in vivo*, semble donc être un axe de recherche intéressant. En effet, des espèces perturbant les interactions délétères entre $A\beta$ et les ions métalliques (rédox-actifs notamment) sont susceptibles d'empêcher l'agrégation d' $A\beta$ et donc de favoriser son élimination, et pourraient également permettre d'inhiber les phénomènes d'oxydation engendrant de la toxicité.

L'implication du laboratoire dans la synthèse de polyhétérocycles azotés, qui sont des chélateurs potentiels d'ions métalliques, nous a orientés vers une telle stratégie, dont les premiers résultats feront l'objet de la suite de ce mémoire.

Le deuxième chapitre concerne un composé polyphénanthroline cyclique précédemment synthétisé au laboratoire, qui chélate efficacement les ions cuivre et zinc et possède une activité *in vivo* intéressante sur un modèle animal de la maladie d'Alzheimer.

Dans les trois chapitres suivants, nous présenterons la synthèse de chélateurs polyquinoléine, qui sont d'autres entités capables de se coordonner aux ions métalliques. Nous décrirons également les propriétés physico-chimiques de ces ligands et de leurs complexes avec les ions métalliques Cu^{II} et Zn^{II} , ainsi qu'une étude mécanistique et des tests *in vitro* sur le peptide amyloïde $A\beta_{42}$. Ces premiers tests ont révélé pour certains

composés une activité d'inhibition de la précipitation d'A β ₄₂ due aux ions métalliques. Ils sont également capables d'inhiber la production de peroxyde d'hydrogène par les complexes de cuivre d'A β . Ces premiers tests nous ont permis de réaliser une sélection parmi ces différentes molécules pour de plus amples études biologiques.

IX. Bibliographie

- Adessi, C., Frossard, M.-J., Boissard, C., Fraga, S., Bieler, S., Ruckle, T., Vilbois, F., Robinson, S.M., Mutter, M., Banks, W.A., and Soto, C. (2003) Pharmacological profiles of peptide drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **278**: 13905-13911.
- Alvarez, A., Toro, R., Caceres, A., and Maccioni, R.B. (1999) Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents β -amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett.* **459**: 421-426.
- Andersen, K., Launer, L.J., Dewey, M.E., Letenneur, L., Ott, A., Copeland, J., Dartigues, J.-F., Kragh-Sorensen, P., Baldereschi, M., Brayne, C., Lobo, A., Martinez-Lage, J.M., Stijnen, T., and Hofman, A. (1999) Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: the EURODEM Studies. *Neurology* **53**: 1992-1997.
- Arias, E., Gallego-Sandin, S., Villarroya, M., Garcia, A.G., and Lopez, M.G. (2005) Unequal neuroprotection afforded by the acetylcholinesterase inhibitors Galantamine, Donepezil, and Rivastigmine in SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of nicotinic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **315**: 1346-1353.
- Arispe, N., Pollard, H.B., and Rojas, E. (1993) Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid β -protein [A β P-(1-40)] in bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 10573-10577.
- Arriagada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T., and Hyman, B.T. (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* **42**: 631-639.
- Atwood, C.S., Moir, R.D., Huang, X., Scarpa, R.C., Bacarra, N.M.E., Romano, D.M., Hartshorn, M.A., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (1998) Dramatic aggregation of Alzheimer A β by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J. Biol. Chem.* **273**: 12817-12826.
- Atwood, C.S., Huang, X., Moir, R.D., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (1999) Role of free radicals and metal ions in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Met. Ions Biol. Syst.* **36**: 309-364.
- Atwood, C.S., Scarpa, R.C., Huang, X., Moir, R.D., Jones, W.D., Fairlie, D.P., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (2000) Characterization of copper interactions with Alzheimer amyloid β peptides: Identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid β 1-42. *J. Neurochem.* **75**: 1219-1233.
- Atwood, C.S., Obrenovich, M.E., Liu, T., Chan, H., Perry, G., Smith, M.A., and Martins, R.N. (2003) Amyloid- β : a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid- β . *Brain Res. Rev.* **43**: 1-16.

- Atwood, C.S., Perry, G., Zeng, H., Kato, Y., Jones, W.D., Ling, K.-Q., Huang, X., Moir, R.D., Wang, D., Sayre, L.M., Smith, M.A., Chen, S.G., and Bush, A.I. (2004) Copper mediates dityrosine cross-linking of Alzheimer's amyloid β . *Biochemistry* **43**: 560-568.
- Bachurin, S.O. (2003) Medicinal chemistry approaches for the treatment and prevention of Alzheimer's disease. *Med. Res. Rev.* **23**: 48-88.
- 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., and Yednock, T. (2000) Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nature Med.* **6**: 916-919.
- Barghorn, S., and Mandelkow, E. (2002) Toward a unified scheme for the aggregation of tau into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* **41**: 14885-14896.
- Barnham, K.J., McKinsty, W.J., Multhaup, G., Galatis, D., Morton, C.J., Curtain, C.C., Williamson, N.A., White, A.R., Hinds, M.G., Norton, R.S., Beyreuther, K., Masters, C.L., Parker, M.W., and Cappai, R. (2003) Structure of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein copper binding domain. *J. Biol. Chem.* **278**: 17401-17407.
- Barnham, K.J., Cherny, R.A., Cappai, R., Melov, S., Masters, C.L., and Bush, A.I. (2004a) Metal-protein attenuating compounds (MPACs) for the treatment of Alzheimer's disease. *Drug Des. Rev.-Online* **1**: 75-82.
- Barnham, K.J., Haeflner, F., Ciccotosto, G.D., Curtain, C.C., Tew, D., Mavros, C., Beyreuther, K., Carrington, D., Masters, C.L., Cherny, R.A., Cappai, R., and Bush, A.I. (2004b) Tyrosine gated electron transfert is key to the toxic mechanism of Alzheimer's disease β -amyloid. *FASEB J.* **18**: 1427-1429.
- Bartolini, M., Bertucci, C., Cavrini, V., and Andrisano, V. (2003) β -Amyloid aggregation induced by human acetylcholine esterase: inhibition studies. *Biochem. Pharmacol.* **65**: 407-416.
- Ben Shachar, D., Kahana, N., Kampel, V., Warshawsky, A., and Youdim, M.B.H. (2004) Neuroprotection by a novel brain permeable iron chelator, VK-28, against 6-hydroxydopamine lesion in rats. *Neuropharmacology* **46**: 254-263.
- Bitan, G., Kirkitadze, M.D., Lomakin, A., Vollers, S.S., Benedek, G.B., and Teplow, D.B. (2003) Amyloid β -protein ($A\beta$) assembly: $A\beta$ 40 and $A\beta$ 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 330-335.
- Blanchard, B.J., Chen, A., Rozeboom, L.M., Stafford, K.A., Weigle, P., and Ingram, V.M. (2004) Efficient reversal of Alzheimer's disease fibril formation and elimination of neurotoxicity by a small molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 14326-14332.
- Bodovitz, S., and Klein, W.L. (1996) Cholesterol modulates α -secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* **271**: 4436-4440.
- Boothby L.A., and Doering, P.L. (2005) Vitamin C and Vitamin E for Alzheimer's disease. *Ann. Pharmacother.* **39**: 2073-2080.
- Bramblett, G.T., Goedert, M., Jakes, R., Merrick, S.E., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (1993) Abnormal tau phosphorylation at Ser³⁹⁶ in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron* **10**: 1089-1099.

- Buée, L., Bussi re, T., Bu e-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P.R. (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.* **33**: 95-130.
- Bush, A.I., Pettingell, W.H., d Paradis, M., and Tanzi, R.E. (1994a) Modulation of A  adhesiveness and secretase site cleavage by zinc. *J. Biol. Chem.* **269**: 12152-12158.
- Bush, A.I., Pettingell, W.H., Multhaup, G., d Paradis, M., Vonsattel, J.-P., Gusella, J.F., Beyreuther, K., Masters, C.L., and Tanzi, R.E. (1994b) Rapid induction of Alzheimer A  amyloid formation by zinc. *Science* **265**: 1464-1467.
- Bush, A.I. (2002) Metal complexing agents as therapies for Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **23**: 1031-1038.
- Butterfield, D.A., Drake, J., Pocernich, C., and Castegna, A. (2001) Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid peptide. *Trends Molec. Medicine* **7**: 548-554.
- Cherny, R.A., Legg, J.T., McLean, C.A., Fairlie, D.P., Huang, X., Atwood, C.S., Beyreuther, K., Tanzi, R.E., Masters, C.L., and Bush, A.I. (1999) Aqueous dissolution of Alzheimer's disease A  amyloid deposits by biometal depletion. *J. Biol. Chem.* **274**: 23223-23228.
- Cherny, R.A., Atwood, C.S., Xilinas, M.E., Gray, D.N., Jones, W.D., McLean, C.A., Barnham, K.J., Volitakis, I., Fraser, F.W., Kim, Y.S., Huang, X., Goldstein, L.E., Moir, R.D., Lim, J.T., Beyreuther, K., Zheng, H., Tanzi, R.E., Masters, C.L., and Bush, A.I. (2001) Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits  -amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* **30**: 665-676.
- Churcher, I., Williams, S., Kerrad, S., Harrison, T., Castro, J.L., Shearman, M.S., Lewis, H.D., Clarke, E.E., Wrigley, J.D.J., Beher, D., Tang, Y.S., and Liu, W. (2003) Design and synthesis of highly potent benzodiazepine  -secretase inhibitors: Preparation of (2S,3R)-3-(3,4-difluorophenyl)-2-(4-fluorophenyl)-4-hydroxy-N-((3S)-1-methyl-2-oxo-5-phenyl-2,3-dihydro-1H-benzo[e][1,4]-diazepin-3-yl)butyramide by use of an asymmetric Ireland-Claisen rearrangement. *J. Med. Chem.* **46**: 2275-2278.
- Ciccotosto, G.D., Tew, D., Curtain, C.C., Smith, D., Carrington, D., Masters, C.L., Bush, A.I., Cherny, R.A., Cappai, R., and Barnham, K.J. (2004) Enhanced toxicity and cellular binding of a modified amyloid   peptide with a methionine to valine substitution. *J. Biol. Chem.* **279**: 42528-42534.
- Citron, M. (2004a)  -secretase inhibition for the treatment of Alzheimer's disease - promise and challenge. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**: 92-97.
- Citron, M. (2004b) Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nature Rev. Neurosci.* **5**: 677-685.
- Clements, A., Allsop, D., Walsh, D.M., and Williams, C.H. (1996) Aggregation and metal-binding properties of mutant forms of the amyloid A  peptide of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **66**: 740-747.
- Clippingdale, A.B., Wade, J.D., and Barrow, C.J. (2001) The amyloid-  peptide and its role in Alzheimer's disease. *J. Peptide Sci.* **7**: 227-249.
- Conte, A., Pellegrini, S., and Tagliazucchi, D. (2003) Synergistic protection of PC12 cells from  -amyloid toxicity by resveratrol and catechin. *Brain Res. Bull.* **62**: 29-38.

- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., and Pericak-Vance, M.A. (1993) Gene dose of Apolipoprotein E type 4 allele and risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**: 921-923.
- Crapper McLachlan, D.R., Dalton, A.J., Kruck, T.P.A., Bell, M.Y., Smith, W.L., and Andrews, D.F. (1991) Intramuscular desferrioxamine in patients with Alzheimer's disease. *Lancet* **337**: 1304-1308.
- Cuajungco, M.P., Goldstein, L.E., Nunomura, A., Smith, M.A., Lim, J.T., Atwood, C.S., Huang, X., Farrag, Y.W., Perry, G., and Bush, A.I. (2000) Evidence that the β -amyloid plaques of Alzheimer's disease represent the redox-silencing and entombment of A β by zinc. *J. Biol. Chem.* **275**: 19439-19442.
- Cuajungco, M.P., Frederickson, C.J., and Bush, A.I. (2005) Amyloid- β metal interaction and metal chelation. *Sub-Cellular Biochem.* **38**: 235-254.
- Curtain, C.C., Ali, F., Volitakis, I., Cherny, R.A., Norton, R.S., Beyreuther, K., Barrow, C.J., Masters, C.L., Bush, A.I., and Barnham, K.J. (2001) Alzheimer's disease amyloid- β binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits. *J. Biol. Chem.* **276**: 20466-20473.
- Dannhardt, G., and Kiefer, W. (2001) Cyclooxygenase inhibitors - current status and future prospects. *Eur. J. Med. Chem.* **36**: 109-126.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Schrijvers, V., Wolfe, M.S., Ray, W.J., Goate, A., and Kopan, R. (1999) A presenilin-1-dependant- γ -secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* **398**: 518-522.
- De Strooper, B. (2003) Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active γ -secretase complex. *Neuron* **38**: 9-12.
- Dedeoglu, A., Cormier, K., Payton, S., Tseitin, K.A., Kremsky, J.N., Lai, L., Li, X., Moir, R.D., Tanzi, R.E., Bush, A.I., Kowall, N.W., Rogers, J.T., and Huang, X. (2004) Preliminary studies of a novel bifunctional metal chelator targeting Alzheimer's amyloidogenesis. *Exp. Gerontol.* **39**: 1641-1649.
- DeMattos, R.B., Bales, K.R., Cummins, D.J., Dodart, J.-C., Paul, S.M., and Holtzman, D.M. (2001) Peripheral anti-A β antibody alters CNS and plasma A β clearance and decreases brain A β burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 8850-8855.
- Demuro, A., Mina, E., Kaye, R., Milton, S.C., Parker, I., and Glabe, C.G. (2005) Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J. Biol. Chem.* **280**: 17294-17300.
- Dewachter, I., and Van Leuven, F. (2002) Secretases as targets for the treatment of Alzheimer's disease: the prospects. *Lancet Neurol.* **1**: 409-416.
- Dikalov, S.I., Vitek, M.P., and Mason, R.P. (2004) Cupric-amyloid β peptide complex stimulates oxidation of ascorbate and generation of hydroxyl radical. *Free Radic. Biol. Med.* **36**: 340-347.
- Dong, J., Atwood, C.S., Anderson, V.E., Siedlak, S.L., Smith, M.A., Perry, G., and Carey, P.R. (2003) Metal binding and oxidation of amyloid- β within isolated senile plaque cores: Raman microscopic evidence. *Biochemistry* **42**: 2768-2773.

- Dovey, H.F., John, V., Anderson, J.P., Chen, L.Z., de Saint Andrieu, P., Fang, L.Y., Freedman, S.B., Folmer, B., Goldbach, E., Holsztynska, E.J., Hu, K.L., Johnson-Wood, K.L., Kennedy, S.L., Kholodenko, D., Knops, J.E., Latimer, L.H., Lee, M., Liao, Z., Liederburg, I.M., Motter, R.N., Mutter, L.C., Nietz, J., Quinn, K.P., Sacchi, K.L., Seubert, P.A., Shopp, G.M., Thorsett, E.D., Tung, J.S., Wu, J., Yang, S., Yin, C.T., Schenk, D.B., May, P.C., Altstiel, L.D., Bender, M.H., Boggs, L.N., Britton, T.C., Clemens, J.C., Czilli, D.L., Dieckman-McGinty, D.K., Droste, J.J., Fuson, K.S., Gitter, D.B., Hyslop, P.A., Johnstone, E.M., Li, W.-Y., Little, S.P., Mabry, T.E., Miller, F.D., Ni, B., Nissen, J.S., Porter, W.J., Potts, B.D., Reel, J.K., Stephenson, D., Su, Y., Shipley, L.A., Whitesitt, C.A., Yin, T., and Audia, J.E. (2001) Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J. Neurochem.* **76**: 173-181.
- Dyrks, T., Dyrks, E., Hartmann, T., Masters, C., and Beyreuther, K. (1992) Amyloidogenicity of β A4 and β A4-bearing amyloid protein precursor fragments by metal-catalyzed oxidation. *J. Biol. Chem.* **267**: 18210-18217.
- Eriksen, J.L., Sagi, S.A., Smith, T.E., Weggen, S., Das, P., McLendon, D.C., Ozols, V.V., Jessing, K.W., Zavitz, K.H., Koo, E.H., and Golde, T.E. (2003) NSAIDs and enantiomers of flubiprofen target γ -secretase and lower A β 42 in vivo. *J. Clin. Invest.* **112**: 440-449.
- Fassbender, K., Simons, M., Bergmann, C., Stroick, M., Lütjohann, D., Keller, P., Runz, H., Kühl, S., Bertsch, T., von Bergmann, K., Hennerici, M., Beyreuther, K., and Hartmann, T. (2001) Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease β -amyloid peptides A β 42 and A β 40 *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 5856-5861.
- 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., and Molineaux, S.M. (1999) Modified-peptide inhibitors of amyloid β -peptide polymerization. *Biochemistry* **38**: 6791-6800.
- Frederickson, C. (2003) Imaging zinc: old and new tools. *Sci. STKE*: pe18.
- Frenkel, D., Katz, O., and Solomon, B. (2000) Immunization against Alzheimer's β -amyloid plaques via EFRH phage administration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 11455-11459.
- Gaggelli, E., Kozlowski, H., Valensin, D., and Valensin, G. (2006) Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis). *Chem. Rev.* **106**: 1995-2044.
- Garino, C., Pietrancosta, N., Laras, Y., Moret, V., Rolland, A., Quéléver, G., and Kraus, J.-L. (2006) BACE-1 inhibitory activities of new substituted phenyl-piperazine coupled to various heterocycles: Chromene, coumarin and quinoline. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**: 1995-1999.
- Garzon-Rodriguez, W., Yatsimirsky, A.K., and Glabe, C.G. (1999) Binding of Zn(II), Cu(II), and Fe(III) ions to Alzheimer's A β peptide studied by fluorescence. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**: 2243-2248.
- Gervais, F., Paquette, J., Morissette, C., Krywkowski, P., Yu, M., Azzi, M., Lacombe, D., Kong, X., Aman, A., Laurin, J., Szarek, W.A., and Tremblay, P. (2006) Targeting soluble A β peptide with Tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis. *Neurobiol. Aging*: in press.
- Ghosh, A., Shin, D., Downs, D., Koelsch, G., Lin, X., Ermolieff, J., and Tang, J. (2000) Design of potent inhibitors for human brain memapsin 2 (β -secretase). *J. Am. Chem. Soc.* **122**: 3522-3523.

- Gilman, S., Koller, M., Black, R.S., Jenkins, L., Griffith, S.G., Fox, N.C., Eisner, L., Kirby, L., Boada Rovira, M., Forette, F., and Orgogozo, J.-M. (2005) Clinical effects of A β immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology* **64**: 1553-1562.
- Gong, Y., Chang, L., Viola, K.L., Lacor, P.N., Lambert, M.P., Finch, C.E., Krafft, G.A., and Klein, W.L. (2003) Alzheimer's disease-affected brain: Presence of oligomeric A β ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 10417-10422.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.-C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., and Binder, L.I. (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein τ (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 4913-4917.
- Hardy, J., and Higgins, G.A. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**: 184-185.
- Hardy, J. (1997) Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* **20**: 154-159.
- Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**: 353-356.
- Hartley, D.M., Walsh, D.M., Ye, C.P., Diehl, T., Vasquez, S., Vassilev, P.M., Teplow, D.B., and Selkoe, D.J. (1999) Protofibrillar intermediates of amyloid β -protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J. Neurosci.* **19**: 8876-8884.
- Hellström-Lindh, E. (2000) Modulation of β -amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation by acetylcholine receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **393**: 255-263.
- Henderson, V.W. (1997) The epidemiology of estrogen replacement therapy and Alzheimer's disease. *Neurology* **48**: 27S-35S.
- Hesse, L., Beher, D., Masters, C.L., and Multhaup, G. (1994) The β A4 amyloid precursor protein binding to copper. *FEBS Lett.* **349**: 109-116.
- Higgins, G.A., and Jacobsen, H. (2003) Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: phenotype and application. *Behav. Pharmacol.* **14**: 419-438.
- Higuchi, M., Iwata, N., and Saido, T.C. (2005) Understanding molecular mechanisms of proteolysis in Alzheimer's disease: Progress toward therapeutic interventions. *Biochim. Biophys. Acta* **1751**: 60-67.
- Hom, R.K., Fang, L.Y., Mamo, S., Tung, J.S., Guinn, A.C., Walker, D.E., Davis, D.L., Gailunas, A.F., Thorsett, E.D., Sinha, S., Knops, J.E., Jewett, N.E., Anderson, J.P., and John, V. (2003) Design and synthesis of statine-based cell-permeable peptidomimetic inhibitors of human β -secretase. *J. Med. Chem.* **46**: 1799-1802.
- Hong, L., Koelsch, G., Lin, X., Wu, S., Terzyan, S., Ghosh, A.K., Zhang, X.C., and Tang, J. (2000) Structure of the protease domain of memapsin 2 (β -secretase) complexed with inhibitor. *Science* **290**: 150-153.
- Hong, M., Chen, D.C.R., Klein, P.S., and Lee, V.M.-Y. (1997) Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J. Biol. Chem.* **272**: 25326-25332.

- Huang, X., Atwood, C.S., Moir, R.D., Hartshorn, M.A., Vonsattel, J.-P., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (1997) Zinc-induced Alzheimer's A β 1-40 aggregation is mediated by conformational factors. *J. Biol. Chem.* **272**: 26464-26470.
- Huang, X., Atwood, C.S., Hartshorn, M.A., Multhaup, G., Goldstein, L.E., Scarpa, R.C., Cuajungco, M.P., Gray, D.N., Lim, J., Moir, R.D., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (1999a) The A β peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry* **38**: 7609-7616.
- Huang, X., Cuajungco, M.P., Atwood, C.S., Hartshorn, M.A., Tyndall, J.D.A., Hanson, G.R., Stokes, K.C., Leopold, M., Multhaup, G., Goldstein, L.E., Scarpa, R.C., Saunders, A.J., Lim, J., Moir, R.D., Glabe, C., Bowden, E.F., Masters, C.L., Fairlie, D.P., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (1999b) Cu(II) potentiation of Alzheimer A β neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* **274**: 37111-37116.
- Hutter-Paier, B., Huttunen, H.J., Puglielli, L., Eckman, C.B., Kim, D.Y., Hofmeister, A., Moir, R.D., Domnitz, S.B., Frosch, M.P., Windisch, M., and Kovacs, D.M. (2004) The ACAT inhibitor CP-113,818 markedly reduces amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron* **44**: 227-238.
- Iwata, N., Takaki, Y., Fukami, S., Tsubuki, S., and Saido, T.C. (2002) Region-specific reduction of A β -degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse hippocampus upon aging. *J. Neurosci. Res.* **70**: 493-500.
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., and Ihara, Y. (1994) Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: evidence that an initially deposited species is A β 42(43). *Neuron* **13**: 45-53.
- Jacobsen, J.S., Reinhart, P., and Pangalos, M.N. (2005) Current concepts in therapeutic strategies targeting cognitive decline and disease modification in Alzheimer's disease. *NeuroRx* **2**: 612-626.
- Jankowsky, J.L., Slunt, H.H., Gonzales, V., Savonenko, A.V., Wen, J.C., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Younkin, L.H., Lester, H.A., Younkin, S.G., and Borchelt, D.R. (2005) Persistent amyloidosis following suppression of A β production in a transgenic model of Alzheimer disease. *PLoS Med.* **2**: e355.
- Jarrett, J.T., Berger, E.P., and Lansbury, P.T. (1993) The carboxy terminus of the β amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **32**: 4693-4697.
- Jick, H., Zornberg, G.L., Jick, S.S., Seshadri, S., and Drachman, D.A. (2000) Statins and the risk of dementia. *Lancet* **356**: 1627-1631.
- John, V., Beck, J.P., Bienkowski, M.J., Sinha, S., and Heinrichson, R.L. (2003) Human β -secretase (BACE) and BACE inhibitors. *J. Med. Chem.* **46**: 4625-4630.
- Karr, J.W., Akintoye, H., Kaupp, L.J., and Szalai, V.A. (2005) N-terminal deletions modify the Cu²⁺ binding site in amyloid- β . *Biochemistry* **44**: 5478-5487.
- Khlistunova, I., Biernat, J., Wang, Y., Pickhardt, M., von Bergen, M., Gazova, Z., Mandelkow, E., and Mandelkow, E.-M. (2006) Inducible expression of tau repeat domain in cell models of tauopathy. *J. Biol. Chem.* **281**: 1205-1214.

- Kim, D.S.H.L., Park, S.-Y., and Kim, J.-Y. (2001) Curcuminoids from *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) that protect PC12 rat pheochromocytoma and normal human umbilical vein endothelial cells from β A(1-42) insult. *Neurosci. Lett.* **303**: 57-61.
- Kivipelto, M., Helkala, E.-L., Laakso, M.P., Hänninen, T., Hallikainen, M., Alhainen, K., Soininen, H., Tuomilehto, J., and Nissien, A. (2001) Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *Br. Med. J.* **322**: 1447-1451.
- Klein, W.L., Krafft, G.A., and Finch, C.E. (2001) Targeting small A β oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci.* **24**: 219-224.
- Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., März, W., and Fahrenholz, F. (2001) Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the α -secretase ADAM 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 5815-5820.
- Kozikowski, A.P., Nowak, I., Petukhov, P.A., Etcheberrigaray, R., Mohamed, A., Tan, M., Lewin, N., Hennings, H., Pearce, L.L., and Blumberg, P.M. (2003) New amide-bearing benzolactam-based protein kinase C modulators induce enhanced secretion of the amyloid precursor protein metabolite sAPP α . *J. Med. Chem.* **46**: 364-373.
- Kremer, J.J., Pallitto, M.M., Sklansky, D.J., and Murphy, R.M. (2000) Correlation of β -amyloid aggregate size and hydrophobicity with decreased bilayer fluidity of model membranes. *Biochemistry* **39**: 10309-10318.
- LaFerla, F.M., and Oddo, S. (2005) Alzheimer's disease: A β , tau and synaptic dysfunction. *Trends Molec. Med.* **11**: 170-176.
- Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C.E., Krafft, G.A., and Klein, W.L. (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β ₁₋₄₂ are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 6448-6453.
- Lee, J.-Y., Cole, T.B., Palmiter, R.D., Suh, S.W., and Koh, J.-Y. (2002) Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish mutant APP transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 7705-7710.
- Lee, J.-Y., Friedman, J.E., Angel, I., Kozak, A., and Koh, J.-Y. (2004) The lipophilic metal chelator DP-109 reduces amyloid pathology in brains of human β -amyloid precursor protein transgenic mice. *Neurobiol. Aging* **25**: 1315-1321.
- Lichtenthaler, S.F., Dominguez, D.-I., Westmeyer, G.G., Reiss, K., Haass, C., Saftig, P., De Strooper, B., and Seed, B. (2003) The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1. *J. Biol. Chem.* **278**: 48713-48719.
- Lim, G.P., Yang, F., Chu, T., Chen, P., Beech, W., Teter, B., Tran, T., Ubeda, O., Hsiao Ashe, K., Frautschy, S.A., and Cole, G.M. (2000) Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer Disease. *J. Neurosci.* **20**: 5709-5714.
- Lim, G.P., Chu, T., Yang, F., Beech, W., Frautschy, S.A., and Cole, G.M. (2001) The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J. Neurosci.* **21**: 8370-8377.
- Lin, H., Bhatia, R., and Lal, R. (2001) Amyloid β protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *FASEB J.* **15**: 2433-2444.

- Lin, L., Georgievska, B., Mattsson, A., and Isacson, O. (1999) Cognitive changes and modified processing of amyloid precursor protein in the cortical and hippocampal system after cholinergic synapse loss and muscarinic receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 12108-12113.
- Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A., and Tang, J. (2000) Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the β -secretase site of β -amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 1456-1460.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., and Feeney, P.J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **46**: 3-26.
- Lipton, S.A. (2006) Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: Memantine and beyond. *Nature Rev. Drug Discov.* **5**: 160-170.
- Liu, S.T., Howlett, G., and Barrow, C.J. (1999) Histidine-13 is a crucial residue in the zinc ion-induced aggregation of the A β peptide of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **38**: 9373-9378.
- Lovell, M.A., Robertson, J.D., Teesdale, W.J., Campbell, J.L., and Markesbery, W.R. (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J. Neurol. Sci.* **158**: 47-52.
- Lührs, T., Ritter, C., Adrian, M., Riek-Loher, D., Bohrmann, B., Döbeli, H., Schubert, D., and Riek, R. (2005) 3D structure of Alzheimer's amyloid- β (1-42) fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 17342-17347.
- Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J., Gong, Y., Martin, L., Louis, J.-C., Yan, Q., Richards, W.G., Citron, M., and Vassar, R. (2001) Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's β -secretase, have normal phenotype and abolished β -amyloid generation. *Nature Neurosci.* **4**: 231-232.
- MacManus, A., Ramsden, M., Murray, M., Henderson, Z., Pearson, H.A., and Campbell, V.A. (2000) Enhancement of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx and voltage-dependent Ca^{2+} channel activity by β -amyloid-(1-40) in rat cortical synaptosomes and cultured cortical neurons. *J. Biol. Chem.* **275**: 4713-4718.
- Matsubara, E., Bryant-Thomas, T., Pacheco Quinto, J., Henry, T.L., Poeggeler, B., Herbert, D., Cruz-Sanchez, F., Chyan, Y.-J., Smith, M.A., Perry, G., Shoji, M., Abe, K., Leone, A., Grundke-Iqbal, I., Wilson, G.L., Ghiso, J., Williams, C., Refolo, L.M., and Pappolla, M.A. (2003) Melatonin increases survival and inhibits oxidative and amyloid pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **85**: 1101-1108.
- Mattson, M.P. (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* **430**: 631-639.
- Maynard, C.J., Cappai, R., Volitakis, I., Cherny, R.A., White, A.R., Beyreuther, K., Masters, C.L., Bush, A.I., and Li, Q.-X. (2002) Overexpression of Alzheimer's disease amyloid- β opposes the age-dependent elevations of brain copper and iron. *J. Biol. Chem.* **277**: 44670-44676.
- McLean, C.A., Cherny, R.A., Fraser, F., Fuller, S.J., Smith, M.J., Beyreuther, K., Bush, A.I., and Masters, C.L. (1999) Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **46**: 860-866.

- Mekmouche, Y., Coppel, Y., Hochgräfen, K., Guilloreau, L., Talmard, C., Mazarguil, H., and Faller, P. (2005) Characterization of the Zn^{II} binding to the peptide Amyloid- β^{1-16} linked to Alzheimer's disease. *ChemBioChem* **6**: 1663-1671.
- Miura, T., Suzuki, K., Kohata, N., and Takeuchi, H. (2000) Metal binding modes of Alzheimer's amyloid β -peptide in insoluble aggregates and soluble complexes. *Biochemistry* **39**: 7024-7031.
- Moechars, D., Dewachter, I., Lorent, K., Reversé, D., Baekelandt, V., Naidu, A., Tesseur, I., Spittaels, K., Van Den Haute, C., Checler, F., Godaux, E., Cordell, B., and Van Leuven, F. (1999) Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J. Biol. Chem.* **274**: 6483-6492.
- Moret, V., Laras, Y., Pietrancosta, N., Garino, C., Quéléver, G., Rolland, A., Mallet, B., Norreel, J.-C., and Kraus, J.-L. (2006) 1,1'-Xylyl bis-1,4,8,11-tetraaza cyclotetradecane: A new potential copper chelator agent for neuroprotection in Alzheimer's disease. Its comparative effects with clioquinol on rat brain copper distribution. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**: 3298-3301.
- Morgan, D., Diamond, D.M., Gottschall, P.E., Ugen, K.E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., Connor, K., Hatcher, J., Hope, C., Gordon, M., and Arendash, G.W. (2000) A β peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* **408**: 982-985.
- Mucke, L., Masliah, E., Yu, G.-Q., Mallory, M., Rockenstein, E.M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., and McConlogue, L. (2000) High-level neuronal expression of A β_{1-42} in wild type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J. Neurosci.* **20**: 4050-4058.
- Multhaup, G., Schicksupp, A., Hesse, L., Beher, D., Ruppert, T., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1996) The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I). *Science* **271**: 1406-1409.
- Murray, I.V.J., Sindoni, M.E., and Axelsen, P.H. (2005) Promotion of oxidative lipid membrane damage by amyloid β proteins. *Biochemistry* **44**: 12606-12613.
- Nakagami, Y., Nishimura, S., Murasugi, T., Kaneko, I., Meguro, M., Marumoto, S., Kogen, H., Koyama, K., and Oda, T. (2002) A novel β -sheet breaker, RS-0406, reverses amyloid β -induced cytotoxicity and impairment of long-term potentiation *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.* **137**: 676-682.
- Nicoll, J.A.R., Wilkinson, D., Holmes, C., Steart, P., Markham, H., and Weller, R.O. (2003) Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid- β peptide: a case report. *Nature Med.* **9**: 448-452.
- Nitsch, R.M., Slack, B.E., Wurtman, R.J., and Growdon, J.H. (1992) Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* **258**: 304-307.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., and LaFerla, F.M. (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: Intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron* **39**: 409-421.

- Oddo, S., Billings, L., Kesslak, J.P., Cribbs, D.H., and LaFerla, F.M. (2004) A β immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated Tau aggregates via the proteasome. *Neuron* **43**: 321-332.
- Ono, K., Hasegawa, K., Yoshiike, Y., Takashima, A., Yamada, M., and Naiki, H. (2002) Nordihydroguaiaretic acid potently breaks down pre-formed Alzheimer's β -amyloid fibrils *in vitro*. *J. Neurochem.* **81**: 434-440.
- Ono, K., Yoshiike, Y., Takashima, A., Hasegawa, K., Naiki, H., and Yamada, M. (2003) Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols *in vitro*: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **87**: 172-181.
- Opazo, C., Huang, X., Cherny, R.A., Moir, R.D., Roher, A.E., White, A.R., Cappai, R., Masters, C.L., Tanzi, R.E., Inestrosa, N.C., and Bush, A.I. (2002) Metalloenzyme-like activity of Alzheimer's disease β -amyloid. *J. Biol. Chem.* **277**: 40302-40308.
- Peretto, I., Radaelli, S., Parini, C., Zandi, M., Raveglia, L.F., Dondio, G., Fontanella, L., Misiano, P., Bigogno, C., Rizzi, A., Riccardi, B., Biscaili, M., Marchetti, S., Puccini, P., Catinella, S., Rondelli, I., Cenacchi, V., Bolzoni, P.T., Caruso, P., Villetti, G., Facchinetti, F., Del Giudice, E., Moretto, N., and Imbimbo, B.P. (2005) Synthesis and biological activity of Flurbiprofen analogues as selective inhibitors of β -amyloid₁₋₄₂ secretion. *J. Med. Chem.* **48**: 5705-5720.
- Perluigi, M., Joshi, G., Sultana, R., Calabrese, V., De Marco, C., Coccia, R., and Butterfield, D.A. (2006) In vivo protection by the xanthate tricyclodecan-9-yl-xanthogenate against amyloid β -peptide (1-42)-induced oxidative stress. *Neuroscience* **138**: 1161-1170.
- Permanne, B., Adessi, C., Saborio, G.P., Fraga, S., Frossard, M.-J., Van Dorpe, J., Dewachter, I., Banks, W.A., Van Leuven, F., and Soto, C. (2002) Reduction of amyloid load and cerebral damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by treatment with a β -sheet breaker peptide. *FASEB J.* **16**: 860-862.
- Petkova, A.T., Yau, W.-M., and Tycko, R. (2006) Experimental constraints on quaternary structure in Alzheimer's β -amyloid fibrils. *Biochemistry* **45**: 498-512.
- Piccini, A., Russo, C., Gliozzi, A., Relini, A., Vitali, A., Borghi, R., Giliberto, L., Armirotti, A., D'Arrigo, C., Bachi, A., Cattaneo, A., Canale, C., Torrassa, S., Saido, T.C., Markesbery, W., Gambetti, P., and Tabaton, M. (2005) β -amyloid is different in normal aging and in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **280**: 34186-34192.
- Pickhardt, M., Gazova, Z., Von Bergen, M., Khlistunova, I., Wang, Y., Hascher, A., Mandelkow, E.-M., Biernat, J., and Mandelkow, E. (2005) Anthraquinones inhibit tau aggregation and dissolve Alzheimer's paired helical filaments *in vitro* and in cells. *J. Biol. Chem.* **280**: 3628-3635.
- Porat, Y., Abramowitz, A., and Gazit, E. (2006) Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chem. Biol. Drug Des.* **67**: 27-37.
- Puglielli, L., Friedlich, A.L., Setchell, K.D.R., Nagano, S., Opazo, C., Cherny, R.A., Barnham, K.J., Wade, J.D., Melov, S., Kovacs, D.M., and Bush, A.I. (2005) Alzheimer's disease β -amyloid activity mimics cholesterol oxidase. *J. Clin. Invest.* **115**: 2256-2563.
- Rapoport, M., Dawson, H.N., Binder, L.I., Vitek, M.P., and Ferreira, A. (2002) Tau is essential to β -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 6364-6369.

- Refolo, L.M., Pappolla, M.A., Malester, B., LaFrancois, J., Bryant-Thomas, T., Wang, R., Tint, G.S., Sambamurti, K., and Duff, K. (2000) Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol. Dis.* **7**: 321-331.
- Reines, S.A., Block, G.A., Morris, J.C., Liu, G., Nessly, M.L., Lines, C.R., Norman, B.A., and Baranak, C.C. (2004) Rofecoxib - No effect on Alzheimer's disease in a 1-year, randomized, blinded, controlled study. *Neurology* **62**: 66-71.
- Reisberg, B., Doody, R., Stoffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., and Mobius, H.J. (2003) Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **348**: 1333-1341.
- Richardson, D.R., and Ponka, P. (1998) Development of iron chelators to treat iron overload disease and their use as experimental tools to probe intracellular iron metabolism. *Am. J. Hematol.* **58**: 299-305.
- Ritchie, C.W., Bush, A.I., Mackinnon, A., Macfarlane, S., Mastwyk, M., Macgregor, L., Kiers, L., Cherny, R.A., Li, Q.-X., Tammer, A., Carrington, D., Mavros, C., Volitakis, I., Xilinas, M., Ames, D., Davis, S., Beyreuther, K., Tanzi, R.E., and Masters, C.L. (2003) Metal-protein attenuation with Iodochlorohydroxyquin (Clioquinol) targeting A β amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **60**: 1685-1691.
- Roher, A.E., Lowenson, J.D., Clarke, S., Wolkow, C., Wang, R., Cotter, R.J., Reardon, I.M., Zurcher-Neely, H.A., Heinrikson, R.L., Ball, M.J., and Greenberg, B.D. (1993) Structural alterations in the peptide backbone of β -amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **268**: 3072-3083.
- Sano, M., Ernesto, C., Thomas, R.G., Klauber, M.R., Schafer, K., Grundman, M., Woodbury, P., Growdon, J., Cotman, C.W., Pfeiffer, E., Schneider, L.S., and Thal, L.J. (1997) A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **336**: 1216-1222.
- Sarkar, B. (1999) Treatment of Wilson and Menkes diseases. *Chem. Rev.* **99**: 2535-2544.
- Sayre, L.M., Perry, G., Harris, P.L.R., Liu, Y., Schubert, K.A., and Smith, M.A. (2000) In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals. *J. Neurochem.* **74**: 270-279.
- Scarpini, E., Scheltens, P., and Feldman, H. (2003) Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. *Lancet Neurol.* **2**: 539-547.
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandevent, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D., and Seubert, P. (1999) Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* **400**: 173-177.
- Schmidt, B. (2003) Aspartic proteases involved in Alzheimer's disease. *ChemBioChem* **4**: 366-368.
- Selkoe, D.J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* **81**: 741-766.
- Shin, R.-W., Kruck, T.P.A., Murayama, H., and Kitamoto, T. (2003) A novel trivalent cation chelator Feralex dissociates binding of aluminium and iron associated with hyperphosphorylated τ of Alzheimer's disease. *Brain Res.* **961**: 139-146.

- Shobab, L.A., Hsiung, G.-Y.R., and Feldman, H.H. (2005) Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* **4**: 841-852.
- Simons, M., Keller, P., De Stropper, B., Beyreuther, K., Dotti, C.G., and Simons, K. (1998) Cholesterol depletion inhibits the generation of β -amyloid in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 6460-6464.
- Smith, D.P., Smith, D.G., Curtain, C.C., Boas, J.F., Pilbrow, J.R., Ciccotosto, G.D., Lau, T.-L., Tew, D.J., Perez, K., Wade, J.D., Bush, A.I., Drew, S.C., Separovic, F., Masters, C.L., Cappai, R., and Barnham, K.J. (2006) Copper mediated amyloid- β toxicity is associated with an intermolecular histidine bridge. *J. Biol. Chem.* **281**: 15145-15154.
- Smith, M.A., Harris, P.L.R., Sayre, L.M., and Perry, G. (1997a) Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 9866-9868.
- Smith, M.A., Richey Harris, P.L., Sayre, L.M., Beckman, J.S., and Perry, G. (1997b) Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **17**: 2653-2657.
- Soto, C., Castano, E.M., Frangione, B., and Inestrosa, N.C. (1995) The α -helical to β -strand transition in the amino-terminal fragment of the amyloid β -peptide modulates amyloid formation. *J. Biol. Chem.* **270**: 3063-3067.
- Soto, C., Sigurdsson, E.M., Morelli, L., Kumar, A., Castano, E.M., and Frangione, B. (1998) β -sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: Implications for Alzheimer's therapy. *Nature Med.* **4**: 822-826.
- Sparks, D.L., and Schreurs, B.G. (2003) Trace amounts of copper in water induce β -amyloid plaques and learning deficits in a rabbit model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 11065-11069.
- Sparks, D.L., Sabbagh, M.N., Connor, J.D., Lopez, J., Launer, L.J., Browne, P., Wasser, D., Johnson-Traver, S., Lochhead, J., and Ziolkowski, C. (2005) Atorvastatin for the treatment of mild to moderate Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **62**: 753-757.
- Suh, Y.-H., and Checler, F. (2002) Amyloid precursor protein, presenilins, and α -synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol. Rev.* **54**: 469-525.
- Syme, C.D., Nadal, R.C., Rigby, S.E.J., and Viles, J.H. (2004) Copper binding to the amyloid- β (A β) peptide associated with Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **279**: 18169-18177.
- Syme, C.D., and Viles, J.H. (2006) Solution ^1H NMR investigation of Zn^{2+} and Cd^{2+} binding to amyloid-beta peptide (A β) of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1764**: 246-256.
- Tabner, B.J., Turnbull, S., El-Agnaf, O.M.A., and Allsop, D. (2002) Formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals from A β and α -synuclein as a possible mechanism of cell death in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.* **32**: 1076-1083.
- Takahashi, R.H., Milner, T.A., Li, F., Nam, E.E., Edgar, M.A., Yamagushi, H., Beal, M.F., Xu, H., Greengard, P., and Gouras, G.K. (2002) Intraneuronal Alzheimer A β 42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. *Am. J. Pathol.* **161**: 1869-1879.

- Takashima, A., Noguchi, K., Sato, K., Hoshino, T., and Imahori, K. (1993) Tau protein kinase I is essential for amyloid β -protein induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 7789-7793.
- Takeda, A., Smith, M.A., Avila, J., Nunomura, A., Siedlak, S.L., Zhu, X., Perry, G., and Sayre, L.M. (2000) In Alzheimer's disease, heme oxygenase is coincident with Alz50, an epitope of τ induced by 4-hydroxy-2-nonenal modification. *J. Neurochem.* **75**: 1234-1241.
- Tariot, P.N., Farlow, M.R., Grossberg, G.T., Graham, S.M., McDonald, S., and Gergel, I. (2004) Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving Donepezil: A randomized controlled trial. *JAMA* **291**: 317-324.
- Tjernberg, L.O., Näslund, J., Lindqvist, F., Johansson, J., Karlström, A.R., Thyberg, J., Terenius, L., and Nordstedt, C. (1996) Arrest of β -amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand. *J. Biol. Chem.* **271**: 8545-8548.
- Townsend, K.P., and Pratico, D. (2005) Novel therapeutic opportunities for Alzheimer's disease: focus on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *FASEB J.* **19**: 1592-1601.
- Turner, R.T., Koelsch, G., Hong, L., Castanheira, P., Ghosh, A., and Tang, J. (2001) Subsite specificity of memapsin 2 (β -secretase): implications for inhibitor design. *Biochemistry* **40**: 10001-10006.
- Vandenberghe, R., and Tournoy, J. (2005) Cognitive aging and Alzheimer's disease. *Postgrad. Med. J.* **81**: 343-352.
- Varadarajan, S., Yatin, S., Kanski, J., Jahanshahi, F., and Butterfield, D.A. (1999) Methionine residue 35 is important in amyloid β -peptide-associated free radical oxidative stress. *Brain Res. Bull.* **50**: 133-141.
- Wahrle, S., Das, P., Nyborg, A.C., McLendon, C., Shoji, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L.H., Younkin, S.G., and Golde, T.E. (2002) Cholesterol-dependant γ -secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol. Dis.* **9**: 11-23.
- Walsh, D.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Condron, M.M., and Teplow, D.B. (1997) Amyloid β -protein fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* **272**: 22364-22372.
- Walsh, D.M., Hartley, D.M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condron, M.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Selkoe, D.J., and Teplow, D.B. (1999) Amyloid β -protein fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* **274**: 25945-25952.
- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., and Selkoe, D.J. (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature* **416**: 535-539.
- Walsh, D.M., Townsend, M., Podlisny, M.B., Shankar, G.M., Fadeeva, J.V., El-Agnaf, O., Hartley, D.M., and Selkoe, D.J. (2005) Certain inhibitors of synthetic amyloid β -peptide (A β) fibrillogenesis block oligomerization of natural A β and thereby rescue long-term potentiation. *J. Neurosci.* **25**: 2455-2462.
- Weggen, S., Eriksen, J.L., Das, P., Sagi, S.A., Wang, R., Pietrzik, C.U., Findlay, K.A., Smith, T.E., Murphy, M.P., Bulter, T., Kang, D.E., Marquez-Sterling, N., Golde, T.E., and Koo, E.H. (2001) A subset of NSAIDs lower amyloidogenic A β 42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* **414**: 212-216.

- White, A.R., Reyes, R., Mercer, J.F.B., Camakaris, J., Zheng, H., Bush, A.I., Multhaup, G., Beyreuther, K., Masters, C., and Cappai, R. (1999) Copper levels are increased in the cerebral cortex and liver of APP and APLP2 knockout mice. *Brain Res.* **842**: 439-444.
- Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T., and Selkoe, D. (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity. *Nature* **398**: 513-517.
- Wolozin, B., Kellman, W., Ruosseau, P., Celesia, G.G., and Siegel, G. (2000) Decrease prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch. Neurol.* **57**: 1439-1443.
- Wong, G.T., Manfra, D., Poulet, F.M., Zhang, Q., Josien, H., Bara, T., Engstrom, L., Pinzon-Ortiz, M., Fine, J.S., Lee, H.-J., Zhang, L., Higgins, G.A., and Parker, E.M. (2004) Chronic treatment with the γ -secretase inhibitor LY-411,575 inhibits β -amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **279**: 12876-12882.
- Yang, D.-S., McLaurin, J., Qin, K., Westaway, D., and Fraser, P.E. (2000) Examining the zinc binding site of the amyloid- β peptide. *Eur. J. Biochem.* **267**: 6692-6698.
- Yang, F., Lim, G.P., Begum, A.N., Ubeda, O.J., Simmons, M.R., Ambegaokar, S.S., Chen, P., Kayed, R., Glabe, C.G., Frautschy, S.A., and Cole, G.M. (2005) Curcumin inhibits formation of amyloid β oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J. Biol. Chem.* **280**: 5892-5901.
- Yang, W., Lu, W., Lu, Y., Zhong, M., Sum, J., Thomas, A.E., Wilkinson, J.M., Fucini, R.V., Lam, M., Randal, M., Shi, X.-P., Jacobs, J.W., McDowell, R.S., Gordon, E.M., and Ballinger, M.D. (2006) Aminoethylenes: a tetrahedral intermediate isostere yielding potent inhibitors of the aspartyl protease BACE1. *J. Med. Chem.* **49**: 839-842.
- Yoshiike, Y., Tanemura, K., Murayama, O., Akagi, T., Murayama, M., Sato, S., Sun, X., Tanaka, N., and Takashima, A. (2001) New insights on how metals disrupt amyloid β -aggregation and their effects on amyloid- β cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **276**: 32293-32299.
- Zheng, H., Weiner, L.M., Bar-Am, O., Epsztejn, S., Cabantchick, Z.I., Warshawsky, A., Youdim, M.B.H., and Fridkin, M. (2005) Design, synthesis, and evaluation of novel bifunctional iron-chelators as potential agents for neuroprotection in Alzheimer's, Parkinson's, and other neurodegenerative diseases. *Bioorg. Med. Chem.* **13**: 773-783.
- Zirah, S., Kozin, S.A., Mazur, A.K., Blond, A., Cheminant, M., Ségalas-Milazzo, I., Debey, P., and Rebuffat, S. (2006) Structural changes of region 1-16 of the Alzheimer disease amyloid β -peptide upon zinc binding and in vitro aging. *J. Biol. Chem.* **281**: 2151-2161.

Chapitre II

Première étude :

**Stratégie de chélation *via* un bi-chélateur
hétérocyclique**

L'interaction des peptides β -amyloïdes avec les ions métalliques Cu^{II} et Zn^{II} est particulièrement importante dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Ces ions métalliques sont responsables de l'amplification de la précipitation d'A β sous la forme d'agrégats insolubles et de la production par celui-ci d'espèces oxygénées réactives toxiques. L'utilisation de chélateurs permettant de retirer les ions métalliques associés à A β est donc une stratégie thérapeutique intéressante et qui a montré des résultats positifs décrits au chapitre I.

I. Ligands 1,10 phénanthroline

Les premiers travaux sur les chélateurs d'ions métalliques en relation avec la maladie d'Alzheimer ont utilisé des ligands dérivés de la 1,10-phénanthroline (Phen), connue pour son affinité pour les ions métalliques tels que le cuivre ou le zinc.

Ainsi, la bathophénanthroline disulfonate (BP) et la bathocuproïne disulfonate (BC) (Fig. 1) permettent la dissolution de plaques amyloïdes issues de cerveaux humains *post mortem* (Cherny *et al.*, 1999; Cherny *et al.*, 2000). BP et BC conduisent également *in vitro* à l'inhibition de la production d' H_2O_2 par les systèmes A β + Fe et A β + Cu, respectivement (Huang *et al.*, 1999a; Huang *et al.*, 1999b).

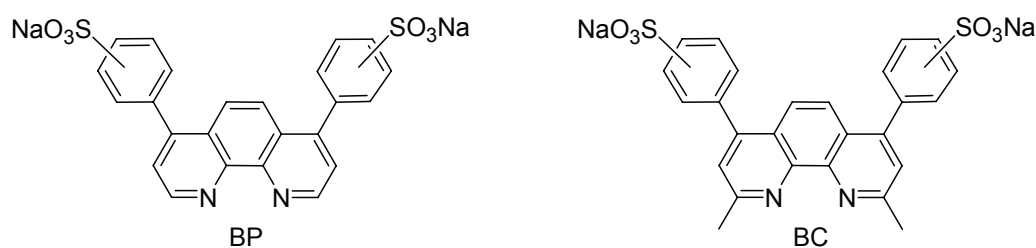


Fig. 1. Structure des composés bathophénanthroline disulfonate (BP) et bathocuproïne disulfonate (BC).

Ces effets sur le peptide A β ont été reliés à la capacité de BP et BC à chélater les ions métalliques associés aux plaques amyloïdes ou complexés par le peptide A β et responsables de la formation d' H_2O_2 par celui-ci.

BP présente une affinité relativement forte pour les ions métalliques Cu^{II} , Zn^{II} , Fe^{II} mais aussi Fe^{III} , alors que BC chélate préférentiellement le Cu^{I} pour former un complexe pratiquement rédox-inactif (Tableau 1). Ces propriétés de BC sont principalement

attribuables à la présence des groupements méthyle en α des azotes réalisant la chélation. Ces groupements méthyle créent une gêne stérique qui défavorise la chélation du Cu^{II} et empêche les changements de géométrie entre les espèces Cu^{I} tétraédriques et Cu^{II} (bipyramide à base carrée ou bipyramide trigonale).

	log K			
	Cu^{I}	Cu^{II}	Zn^{II}	Fe^{II}
BC	~ 20	7,5	~ 4	-
BP	-	20,9	17,3	21,2

Tableau 1. Logarithme décimal des constantes de stabilité de BC et BP pour les ions métalliques Cu^{I} , Cu^{II} , Zn^{II} et Fe^{II} (d'après Cherny et al., 2000).

Malgré ces résultats intéressants de BP et BC, leur utilisation ne peut être envisagée *in vivo* car la présence de fonctions sulfonates les rend trop hydrophiles pour passer la barrière hémato-méningée.

II. Stratégie bi-phénanthroline

Les ligands Phen (L), plus hydrophobes que BP et BC, sont affins pour les ions métalliques Cu^{II} et Zn^{II} (M) particulièrement impliqués dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Ils peuvent former des espèces LM et L_2M avec ces derniers (Fig. 2) (Sillen and Martell, 1971). Les espèces L_2M ont une structure tétradentate qui remplit la sphère de coordination des ions métalliques Cu^{II} et Zn^{II} et les stabilise.

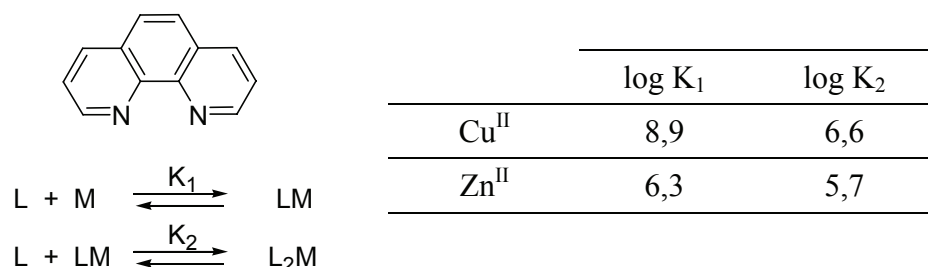


Fig. 2. Ligand 1,10-phénanthroline (Phen). Structure et logarithme décimal des constantes d'affinités pour les ions métalliques Cu^{II} et Zn^{II} (d'après Sillen and Martell, 1971).

Toutefois, une telle stœchiométrie est difficilement envisageable lorsque le ligand est administré *in vivo*, en raison de l'effet de la dilution et de la faible probabilité de trouver deux de ces molécules à proximité d'un même ion métallique.

Il a alors été envisagé de relier deux entités Phen par un (ou des) lien(s) covalent(s) afin de favoriser les structures tétradentates autour des ions Cu^{II} et Zn^{II} et ainsi d'améliorer les propriétés de chélation du ligand en milieu biologique.

Cette stratégie a conduit au composé Cyclo-bi-Phen, précédemment synthétisé au laboratoire par Christophe Boldron.

La Cyclo-bi-Phen (Fig. 3) a été conçue sur le modèle de la 3-propyl-Clip-Phen, molécule comportant deux motifs Phen reliés par un bras alkoxy en position 3 et dont le complexe de cuivre est très actif dans le domaine des coupures de l'ADN.

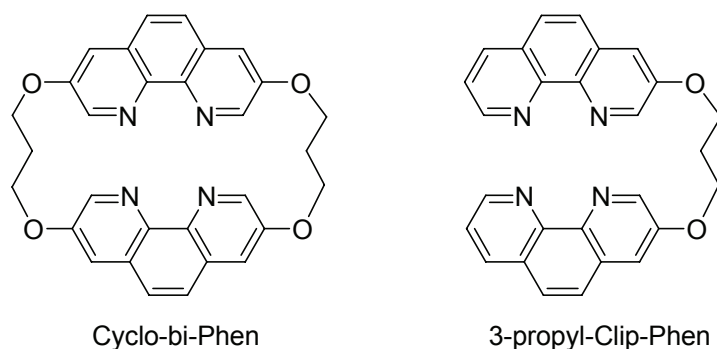


Fig. 3. Structure des composés Cyclo-bi-Phen et 3-propyl-Clip-Phen.

La Cyclo-bi-Phen possède un second bras de jonction identique au premier, de manière à former une molécule cyclique symétrique. L'intérêt de la cyclisation est de favoriser les structures de stœchiométrie métal / ligand de 1 / 1 (de type pince), et d'empêcher la formation de structures en hélicate (de stœchiométrie 2 / 2) envisageables pour la longueur de bras de la 3-propyl-Clip-Phen (Fig. 4).

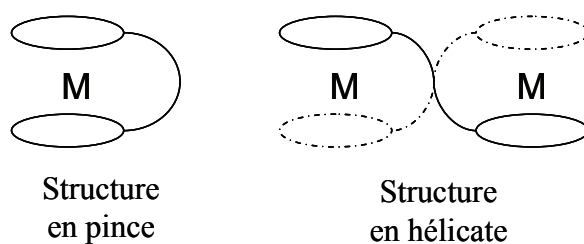


Fig. 4. Représentation schématique des structures en pince et en hélicate pour la chélation d'un ion métallique M.

Au cours de cette thèse, l'étude de l'hydrophobicité du ligand Cyclo-bi-Phen et de son affinité pour les ions Zn^{II} et Cu^{II} a été menée. La détermination des constantes d'affinité a été réalisée par une méthode de compétition suivie par spectroscopie UV-visible qui sera détaillée dans le chapitre IV.

II.1 Résumé d'un article paru dans *ChemBioChem*

Les composés Cyclo-bi-Phen et 3-propyl-Clip-Phen ont été évalués *in vivo* dans le cadre de la maladie d'Alzheimer. Le clioquinol, qui a montré une activité pour la réduction des dépôts amyloïdes *in vivo* (Cherny *et al.*, 2001), a été inclus dans les tests à titre de comparaison.

Dans une première étude, l'administration intra-péritonéale de ces trois composés sur souris saines a mis en évidence leur absence de toxicité à une concentration de $10 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$.

L'activité de ces ligands a été testée *in vivo* sur des souris transgéniques APP[V717I] $\times$ PS1[A246E] porteuses des gènes codant pour les protéines APP et PS1 humaines (ces gènes sont pourvus de mutations favorisant l'amylogenèse). Ces animaux modèles de la maladie d'Alzheimer développent les aspects majeurs de cette maladie : accumulation d'A β , formation de plaques amyloïdes et déficits de la mémoire. La Cyclo-bi-Phen ($5 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$), la 3-propyl-Clip-Phen ($5 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$) et le clioquinol ($10 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$) ont été injectés par voie intra-péritonéale trois fois par semaine pendant neuf semaines, et leurs effets sur les plaques amyloïdes ont été mesurés. Une détection de la charge globale en plaques amyloïdes (plaques denses et plaques diffuses) par des anticorps n'a pas montré d'effet de la Cyclo-bi-Phen ou du clioquinol. La 3-propyl-Clip-Phen a conduit quand à elle à une augmentation de la charge en plaques d'un facteur 1,8. Une détection spécifique des plaques amyloïdes denses a été menée par coloration à la thioflavine S, qui est un marqueur des structures en feuillets- β . La Cyclo-bi-Phen a permis une diminution de 38 % des plaques amyloïdes denses par rapport au contrôle, contre 28 % pour le clioquinol. Un effet négatif de la 3-propyl-Clip-Phen a également été trouvé dans ce test, avec une augmentation de 16 % du taux de ces plaques.

Cette étude a mis en évidence l'activité de la Cyclo-bi-Phen pour diminuer le taux de plaques amyloïdes denses *in vivo*. Ce résultat est d'autant plus important que ces

plaques pourraient être neurotoxiques en raison d'une production de stress oxydant, probablement généré par l'interaction d'A β avec des ions métalliques rédox-actifs (McLellan *et al.*, 2003; Urbanc *et al.*, 2002).

Cette étude montre également une forte relation structure-activité dans la série Phen sur les taux de plaques amyloïdes *in vivo*, avec la nécessité des deux bras de jonction entre les entités Phen pour avoir un effet favorable sur la réduction de ces plaques.

L'affinité de la Cyclo-bi-Phen pour les ions métalliques Cu^{II} et Zn^{II} les plus impliqués dans l'agrégation d'A β a été évaluée, afin de voir si la diminution du taux des plaques amyloïdes denses observée *in vivo* pouvait être reliée à une chélation efficace par le ligand testé. Les constantes d'affinité observées : $\log K = 10 \pm 1$ et 6 ± 1 pour le Cu^{II} et le Zn^{II}, respectivement, sont comparables à celles du clioquinol et, comme dans le cas de ce dernier, permettent d'envisager la chélation du Cu^{II} et du Zn^{II} fixés sur A β *in vivo*.

Enfin, le coefficient de partage de la Cyclo-bi-Phen entre l'octanol et une phase aqueuse tamponnée à pH = 7,4 a été mesuré : $\log D_{7,4} = 2,7$. Cette valeur traduit un caractère hydrophobe de la molécule. Cette propriété, ainsi que le faible poids moléculaire de la Cyclo-bi-Phen, sont favorables à son franchissement de la barrière hémato-méningée.

II.2 Article

"Preparation of Cyclo-Phen-type ligands: Chelators of metal ions as potential therapeutic agents in the treatment of neurodegenerative diseases". Christophe Boldron, Ingrid Van der Auwera, Céline Deraeve, Heinz Gornitzka, Stefaan Wera, Marguerite Pitie, Fred Van Leuven and Bernard Meunier. *ChemBioChem*, **2005**, 6, 1976-1980.

DOI: 10.1002/cbic.200500220

Preparation of Cyclo-Phen-Type Ligands: Chelators of Metal Ions as Potential Therapeutic Agents in the Treatment of Neurodegenerative Diseases

Christophe Boldron,^[a] Ingrid Van der Auwera,^[b]
Céline Deraeve,^[a] Heinz Gornitzka,^[c] Stefaan Wera,^[b]
Marguerite Pitié,^{*,[a]} Fred Van Leuven,^[d] and
Bernard Meunier^{*,[a]}

Many recent studies have shown the major role played by metal ions (copper, zinc, iron, ...) in the modification of the folding and/or the aggregation of proteins that leads to serious pathologies. Several neurodegenerative diseases (Alzheimer's disease, spongiform encephalopathies, Parkinson's disease, Huntington's disease, ...) involve similar disastrous interactions between metal ions and proteins.^[1]

In the case of Alzheimer's disease, the pathology is associated with the aggregation of β -amyloid peptides (A β) in the brain, which leads to the formation of amyloid plaques. The accumulation of redox-active metal ions in these amyloid plaques is probably responsible for the oxidative stress which induces neuronal lesions in the brain that result in irreversible loss of intellectual faculties.^[2]

The use of a metal ligand like Clioquinol led to improvements in patients suffering from Alzheimer's disease and indicated that therapeutic approaches are possible with metal ion chelators in neurodegenerative diseases.^[3] Among Cu/Zn chelators capable of solubilizing A β from post mortem brain tissue, interesting results were obtained with bathophenanthroline and bathocuproine, two ligands based on the 1,10-phenanthroline structure.^[4] However, due to the presence of sulfate residues, these chelators are too hydrophilic to cross the blood brain barrier; consequently their use in vivo cannot be envisaged.

[a] Dr. C. Boldron, C. Deraeve, Dr. M. Pitié, Dr. B. Meunier
Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS
205 route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex 4 (France)
Fax: (+33) 561-55-30-03
E-mail: pitie@lcc-toulouse.fr
bmeunier@lcc-toulouse.fr

[b] Dr. I. Van der Auwera, Dr. S. Wera
NV reMYND,
Minderbroederstraat 12, 3000 Leuven (Belgium)

[c] Dr. H. Gornitzka
Laboratoire d'Hétérochimie Fondamentale et Appliquée (UMR 5069)
Université Paul Sabatier,
118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 04 (France)

[d] Dr. F. Van Leuven
LEGT-EGG, K.U. Leuven
Herestraat 49, 3000 Leuven (Belgium)



Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.chembiochem.org> or from the author: crystal structure data and detailed protocol about double-transgenic mice.

COMMUNICATIONS

Chelators must indeed have particular properties in order to be used as potential drugs in the treatment of neurodegenerative diseases. They must have a low molecular weight and be poorly or not charged in order to be able to cross the blood brain barrier. They must also have a structure that can be altered to adjust the chelation selectivity in order to target certain metal ions (a strong nonspecific chelation would result in a general depletion of metal ions, including those of metalloenzymes, which are essential for the organism).

Once the chelator is in the brain, the molecule must be able to complex the metal ions present in excess in the pathogen proteins so as to allow their dissolution and their elimination. From here two evolutions can be proposed: i) if the metal-chelator complex is hydrophobic enough, it can be exported to the blood system, leading to its ultimate excretion;^[3] or ii) it has also been proposed that the complex will contribute to the redistribution within the brain of metal ions sequestered in the plaques in order to restore their normal homeostasis and thus to stop the amyloid cascade.^[5] Whatever the explanation of the role of chelator in brain, in both cases, the presence of an exogenous chelator will be beneficial and contribute to limiting the evolution of the disease.

Our recent work on Clip-Phen-type ligands and nucleic acid cleavage has demonstrated the benefit of complexing copper with two connected phenanthroline ligands.^[6] These ligands can be structurally modulated, and Clip-Phen ligands with two Phen entities linked at their C3 carbon by a three-methylene bridge were particularly active. Interestingly, their activity was not altered by the presence of a large excess

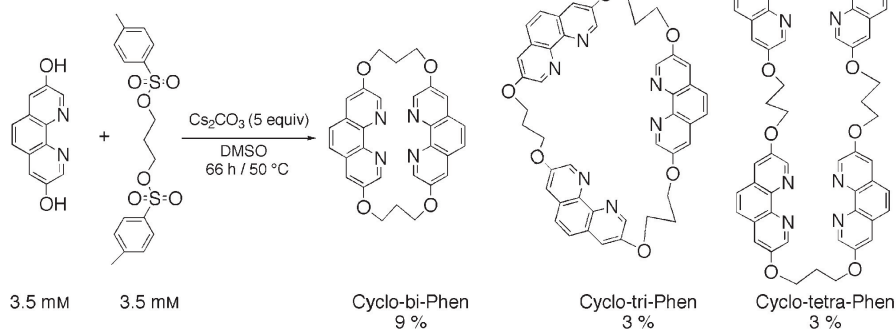
of physiological ions like Mg^{II} as was that of ligands that selectively chelate some metals (copper ions in our previous experiments). We therefore decided to prepare new cyclic uncharged ligands called "Cyclo-Phen", small and sufficiently hydrophobic to be able to cross the barriers: first the intestinal barrier, so that these molecules will be orally active, and then the blood brain barrier to finally coordinate the metal ions (copper in preference) that are present in excess in the pathogen amyloid aggregates.

We chose to connect two phenanthroline entities at the C3 and C8 positions with an alkoxy linker including three methylenes, in agreement with the structure of the most efficient linkage in the Clip-Phen series (on C3 of Phen). The second bridge is identical and is linked on the C8 carbon of Phen in order to obtain a compound with a C2 symmetry.

The Cyclo-bi-Phen macrocycle was prepared by using a bis-tosylate linker. The catalytic metathesis approach for macrocyclization cannot be used due to the structure of the desired

linker, and different attempts at other classical synthesis strategies failed in our hands:^[7] i) the reaction between 3,8-dihalo-phen and propanediolate through a synthetic strategy analogous to the preparation of Clip-Phen, although it is a classical method of preparing cyclic derivatives of 2,6-pyridine^[8] (due to the specific problems associated with the position of the substituents on the Phen that induce poor chemical reactivity and reduction ability under the experimental conditions used);^[6,9] ii) the fixation of one or two linker(s) on a first Phen derivative and, then, the reaction with a second Phen residue; iii) the use of a template effect by complexation of halogeno- (or hydroxy-)Phen precursor to different metals before the cyclization reaction in order to form (ligand)₂-metal entities favoring Cyclo-bi-Phen synthesis.

Cyclo-bi-Phen was successfully prepared by treatment of 1,10-phenanthroline-3,8-dihydroxylate with propane-1,3-diol-di-*para*-tosylate at high dilution (3.5 mM) in order to favor the synthesis of Cyclo-bi-Phen and to decrease polymerization reactions (Scheme 1).^[9,10] The replacement of propane-1,3-diol-di-



Scheme 1. Synthesis of "Cyclo-Phen".

para-tosylate by 1,3-dibromopropane or of Cs_2CO_3 by NaH, a change of solvent, or the use of higher concentrations decreased the yield. The structure of Cyclo-bi-Phen was confirmed by X-ray analysis of single crystals (Figure 1). Two other cyclic ligands, Cyclo-tri-Phen and Cyclo-tetra-Phen with, respectively, 3 and 4 phenanthroline residues, were also isolated as minor products. Both trimer and tetramer were also characterized by X-ray analysis.

Three different chelating agents were then tested in double-transgenic mice mimicking Alzheimer's disease: Cyclo-bi-Phen, 3-propyl-Clip-Phen^[6,9] (its analogue in the Clip-Phen series), and Clioquinol, chosen because it has shown activity in decreasing amyloid deposits *in vivo* (Figure 2).

Preliminary toxicity studies in wild-type male FVB/NCrI mice were performed. The drugs, initially dissolved in DMSO in the presence of 2.6 equivalents of HCl and then diluted in water, were tested at 10 mg kg^{-1} by intraperitoneal injection (i.p.) on three consecutive days. At day 4, all mice survived and they

CHEMBIOCHEM

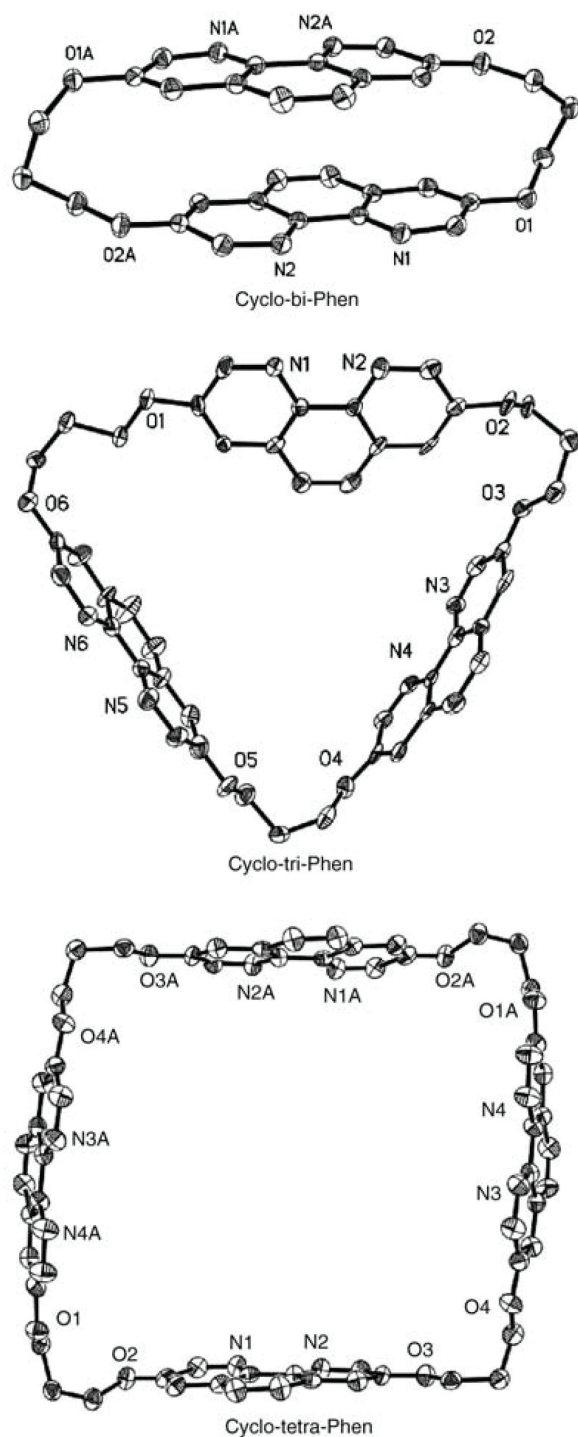


Figure 1. Molecular structures of Cyclo-bi-Phen (CCDC 268177), Cyclo-tri-Phen (CCDC 268178), and Cyclo-tetra-Phen (CCDC 268179).

were sacrificed and analyzed: no gross anatomical problems were observed in the stomach, spleen, kidneys, liver, heart, lungs, or peritoneum. Further tests included five wild-type mice treated on days 1 and 3 with 50 mg kg^{-1} per day by i.p.

injection that showed 100% survival after 30 days. Therefore the compounds appeared nontoxic under these conditions at a concentration of 10 mg kg^{-1} .

Subsequently, double-transgenic APP[V717I] $\times$ PS1[A246E] female mice were treated with the drugs. This well-established double-transgenic mouse model was chosen since it shows virtually all aspects of the amyloid pathology of Alzheimer's disease: accumulation of A β peptides in the brain and cerebrospinal fluid, memory deficit, and amyloid plaque formation.^[11] Moreover, diverse experimental therapies, ranging from vaccination to β -sheet breakers, have been shown to affect relevant parameters in this mouse model.^[12]

The molecules, dissolved in DMSO/groundnut oil (1:4), were administered by i.p. injection (5 mg kg^{-1} for both Phen derivatives or 10 mg kg^{-1} for Clioquinol) three times per week over a nine-week period to six-month-old double-transgenic mice. Ten double-transgenic animals were treated with each Phen derivative, whereas nine transgenic mice received vehicle and nine transgenic mice received Clioquinol. During the nine-week period, two animals were lost in each Phen-treatment group and three in the Clioquinol group, as opposed to none in the vehicle control group; this indicates some toxicity associated with longer-term metal-chelating therapy. Mean body weight increased by about 2 g in all groups, possibly due to the use of oil as vehicle.

After nine weeks of treatment, the animals were sacrificed, amyloid peptides levels were assayed in one brain hemisphere, and amyloid plaque load was determined in the other hemisphere. None of the treatments appeared to affect the levels of soluble A β 40 or A β 42. Remarkably, treatment with 3-propyl-Clip-Phen increased the brain levels of insoluble A β 40 and A β 42 about twofold (from $54.7 \pm 8.8 \text{ ng g}^{-1}$ to $112.6 \pm 13.1 \text{ ng g}^{-1}$, $p=0.005$ for A β 40 and from $265 \pm 43 \text{ ng g}^{-1}$ to $624 \pm 91 \text{ ng g}^{-1}$, $p=0.007$ for A β 42), whereas neither Clioquinol nor Cyclo-bi-Phen affected these parameters in a statistically significant way. A similar picture emerged from the immunohistochemical staining of amyloid plaques. Here all treatments remained without significant effect, except 3-propyl-Clip-Phen, which increased total plaque load from $8.8 \pm 1.6\%$ to $15.5 \pm 2.3\%$ ($p=0.03$). Thus, the previously observed ability of Clioquinol to reduce the load of insoluble A β and to increase the quantity of soluble β -amyloid peptide was not observed here.^[3] These differences were probably due to the differences between experimental conditions (mono- versus double-transgenic mice, i.p. versus oral drug administration, variations in dosing protocols, etc.).

Brain sections were subsequently analyzed by staining with Thioflavin-S, a dye with an affinity for β -sheet structures that specifically stains dense (so-called senile) amyloid plaques, as opposed to the immunological staining used above, which does not discriminate between senile and diffuse plaques.^[13] Surprisingly, both Clioquinol and Cyclo-bi-Phen specifically reduced Thioflavin-S-positive plaque load by about 30–40% (Figure 2), although this is statistically insignificant, probably due to the small number of mice included in this study (from control levels of $1.0 \pm 0.2\%$ to $0.7 \pm 0.2\%$; $p=0.26$ for Clioquinol and to $0.6 \pm 0.2\%$; $p=0.1$ for Cyclo-bi-Phen). 3-Propyl-Clip-

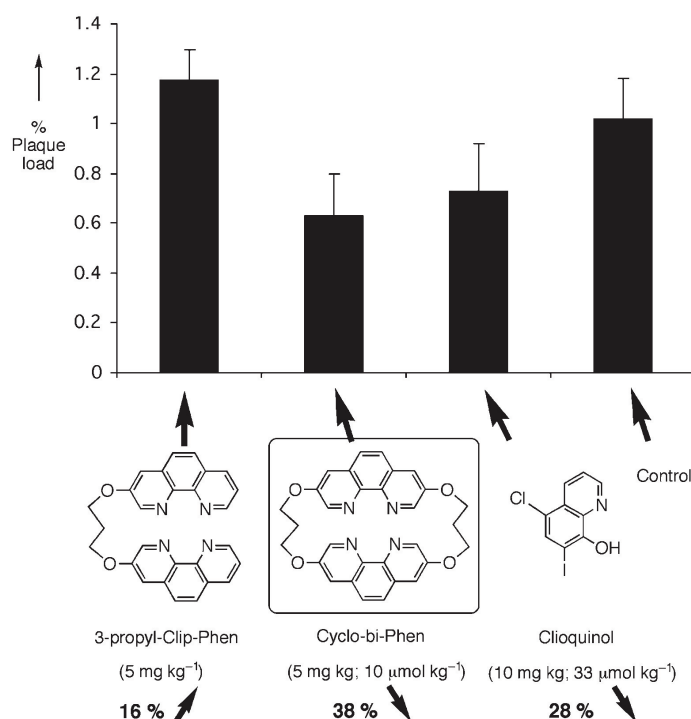


Figure 2. Quantitative analysis by histology of Thioflavin-S staining of the amyloid load in the subiculum of double-transgenic APP[V717I] × PS1[A246E] mice treated with 3-propyl-Clip-Phen, Cyclo-bi-Phen, or Clioquinol by intraperitoneal injection three times per week over nine-week periods.

Phen showed a tendency to increase Thioflavin-S-positive plaque load to $1.2 \pm 0.3\%$ ($p = 0.5$).

Hence chemically related metal chelators appear to affect plaque load in opposite directions. Moreover, taking into consideration the difference in molecular weight of the two chelators that both decrease plaque load (504 for Cyclo-bi-Phen and 305 for Clioquinol), these results were obtained with $9.9 \mu\text{mol kg}^{-1}$ of Cyclo-bi-Phen and $32.8 \mu\text{mol kg}^{-1}$ of Clioquinol. We therefore conclude that Cyclo-bi-Phen exerts its effect at a threefold lower level of the drug.

The data obtained on the reduction of Thioflavin-S-stained amyloid deposits are of particular interest since Thioflavin-S-stained plaques might be selectively neurotoxic^[14] through the induction of oxidative stress, a deleterious phenomenon, possibly related to the complexation of redox active metals by A β -peptides.^[15]

Selective chelation of Cu^{II}, Zn^{II}, and, to a lesser extent, Fe^{III} by A β -peptides has been related to an increase in amyloid deposition. Our strategy being aimed at the removal of these metal ions, we estimated the stability constants of Cyclo-bi-Phen (L) for Cu^{II} and Zn^{II} spectrophotometrically through competition experiments with different ligands with known binding constants for copper and zinc.^[16] Similar values to those obtained for Clioquinol were observed (Table 1) and were in accordance with our attempts to prepare a ligand that had a mildly “complexing ability”, capable of removing metals from A β and thereby decreasing the formation of amyloid plaques. After

treatment with one equivalent of CuCl₂ or of ZnCl₂, complex formation was confirmed by electrospray mass spectrometry, and $[M-\text{Cl}]^+$ complexes were observed ($m/z = 602$ and 603 for LCuCl₂ and LZnCl₂, respectively). The partition of Cyclo-bi-Phen between octanol and a physiological aqueous phase was also measured; this resulted in an observed $\log D_{7.4}$ value of 2.7, which is in accordance with our attempts to prepare a ligand exhibiting a significant hydrophobicity.

In conclusion, the reduction of the plaque load observed with Cyclo-bi-Phen indicates that the Cyclo-Phen derivatives can be considered as drug candidates in the treatment of neurodegenerative diseases in which an over-loading of metal ions in the brain has been evoked as being one of the main factors in the pathologies related to metal-related misfolding of proteins.

Experimental Section

Synthesis of Cyclo-Phen: Caesium carbonate (2.22 g, 6.83 mmol) was added to 3,8-dihydroxy-1,10-phenanthroline hydrobromide^[9] (0.40 g, 1.37 mmol) dissolved in anhydrous DMSO (310 mL) under nitrogen. Then a solution of 1,3-propanediol di-*para*-tosylate (0.53 g, 1.37 mmol) in anhydrous DMSO (80 mL) was added over 1 h, before the mixture was heated for 48 h at 50 °C under nitrogen and with vigorous stirring. The

Table 1. Comparison of some physicochemical properties of Cyclo-bi-Phen and Clioquinol. $D_{7.4}$ is the distribution coefficient of the ligands between octan-1-ol and Tris-HCl buffer (20 mM pH 7.4, 150 mM NaCl). $K_{\text{Cu}^{\text{II}}}$ and $K_{\text{Zn}^{\text{II}}}$ are the stability constants of the ligands.

	M_{W}	$\log D_{7.4}$	$\log K_{\text{Cu}^{\text{II}}}$	$\log K_{\text{Zn}^{\text{II}}}$
Cyclo-bi-Phen	504	2.7	10 ± 1	6 ± 1
Clioquinol	305	3.8	8.9 ^a	7 ^a

[a] From ref. [3].

volume was reduced to 100 mL, then aqueous ammonia (40 mL, pH 10) was added, and cyclized products were extracted with CH₂Cl₂ (2 × 40 mL). The organic phase was washed with aqueous ammonia (pH 10), evaporated, and dried under vacuum. Chromatography on silica gel (eluent 1% triethylamine (TEA) in CHCl₃) afforded Cyclo-bi-Phen (31 mg, 0.06 mmol, 9%) as a white powder. A mixture of Cyclo-tri-Phen and Cyclo-tetra-Phen was then eluted from the column with CHCl₃/CH₃OH/TEA (94:5:1). After evaporation of the solvent, the two products were dissolved in CHCl₃/CH₃OH (9:3), and Cyclo-tetra-Phen was precipitated by the addition of CH₃OH (6 volumes). The supernatant was evaporated, and a flash chromatography on silica gel (eluent 1% TEA in CHCl₃) afforded Cyclo-tri-Phen (14 mg, 0.013 mmol, 3%) as a white powder. Pure Cyclo-tetra-Phen was obtained from crystallization in CHCl₃/CH₃OH (3:1) as white crystals (10 mg, 0.01 mmol, 3%). For each ligand, white crystals suitable for X-ray analysis were obtained from recrystallization in CHCl₃/CH₃OH. Cyclo-bi-Phen: ¹H NMR (250 MHz in CDCl₃/CD₃OD 3:1): $\delta = 2.12$ (m, 4H), 4.15 (m, 4H), 4.35 (m, 4H), 6.98

CHEMBIOCHEM

(d, $^4J(\text{H,H}) = 3 \text{ Hz}$, 4H), 7.19 (s, 4H), 8.21 (d, $^4J(\text{H,H}) = 3 \text{ Hz}$, 4H); elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_4 \cdot 0.6\text{H}_2\text{O}$: C 69.92, H 4.93, N 10.87; found C 70.01, H 4.94, N 10.53; MS (ES > 0): 505 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Cyclo-tri-Phen: ^1H NMR (250 MHz in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1): $\delta = 2.21$ (quint, $^3J(\text{H,H}) = 5 \text{ Hz}$, 6H), 4.20 (t, $^3J(\text{H,H}) = 5 \text{ Hz}$, 12H), 7.26 (d, $^4J(\text{H,H}) = 3 \text{ Hz}$, 6H), 7.36 (s, 6H), 8.50 (d, $^4J(\text{H,H}) = 3 \text{ Hz}$, 6H); elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{45}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_6 \cdot \text{CHCl}_3$: C 63.05, H 4.23, N 9.59; found C 62.61, H 4.57, N 9.01; MS (ES > 0): 757 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Cyclo-tetra-Phen: ^1H NMR (250 MHz in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1): $\delta = 2.31$ (m, 8H), 4.20 (m, 16H), 7.37 (d, $^4J(\text{H,H}) = 3 \text{ Hz}$, 8H), 7.49 (s, 8H), 8.54 (d, $^4J(\text{H,H}) = 3 \text{ Hz}$, 8H); elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{60}\text{H}_{48}\text{N}_8\text{O}_8 \cdot 2\text{CHCl}_3$: C 59.68, H 4.04, N 8.98; found C 59.78, H 3.62, N 8.56; MS (ES > 0): 1009 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Animal studies were approved by the Ethical Commission on Animal Testing (K.U. Leuven, Belgium) under Project number P04026.

Acknowledgements

PALUMED S. A. and the CNRS are gratefully acknowledged for their financial support. We thank Dr. L. Azema for his technical help.

Keywords: amyloid • chelates • drug design • neurodegenerative diseases • phenanthroline

- [1] a) P. M. Doraiswamy, A. E. Finebrock, *Lancet Neurol.* **2004**, 3, 431–434; b) K. J. Barnham, C. L. Masters, A. I. Bush, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, 3, 205–214.
- [2] a) M. P. Mattson, *Nature* **2004**, 430, 631–639; b) M. Citron, *Nat. Rev. Neurosci.* **2004**, 5, 677–685.
- [3] R. A. Cherny, C. S. Atwood, M. E. Xilinas, D. N. Gray, W. D. Jones, C. A. McLean, K. J. Barnham, I. Volitakis, F. W. Fraser, Y.-S. Kim, X. Huang, L. E. Goldstein, R. D. Moir, J. T. Lim, K. Beyreuther, H. Zheng, R. E. Tanzi, C. L. Masters, A. I. Bush, *Neuron* **2001**, 30, 665–676.
- [4] a) R. A. Cherny, K. J. Barnham, T. Lynch, I. Volitakis, Q.-X. Li, C. A. McLean, G. Multhaup, K. Beyreuther, R. E. Tanzi, C. L. Masters, A. I. Bush, *J. Struct. Biol.* **2000**, 130, 209–216; b) R. A. Cherny, J. T. Legg, C. A. McLean, D. P. Fairlie, X. Huang, C. S. Atwood, K. Beyreuther, R. E. Tanzi, C. L. Masters, A. I. Bush, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 23223–23228.
- [5] T. A. Bayer, S. Schäfer, A. Simons, A. Kemmling, T. Kamer, R. Tepest, A. Eckert, K. Schüssel, O. Eikenberg, C. Sturchler-Pierrat, D. Abramowski, M. Staufenbiel, G. Multhaup, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 14187–14192.
- [6] M. Pitié, C. Boldron, H. Gornitzka, C. Hemmert, B. Donnadieu, B. Meunier, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003**, 8, 644–652.
- [7] a) C. Kaes, A. Katz, M. W. Hosseini, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 3553–3590; b) H. An, J. S. Bradshaw, R. M. Izatt, *Chem. Rev.* **1992**, 92, 543–572; c) G. R. Newkome, J. D. Sauer, J. M. Roper, D. C. Hager, *Chem. Rev.* **1977**, 77, 513–597.
- [8] G. R. Newkome, H. C. R. Taylor, F. R. Fronczek, V. K. Gupta, *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 970–974.
- [9] C. Boldron, M. Pitié, B. Meunier, *Synlett* **2001**, 10, 1629–1631.
- [10] E. Weber, H.-P. Josel, H. Puff, S. Franken, *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 3125–3132.
- [11] a) I. Dewachter, J. van Dorpe, L. Smeijers, M. Gilis, C. Kuipéri, I. Laenen, N. Caluwaerts, D. Moechars, F. Checler, H. Vanderstichele, F. Van Leuven, *J. Neurosci.* **2000**, 20, 6452–6458; b) I. Dewachter, J. van Dorpe, K. Spittaels, I. Tesseur, C. Van Den Haute, D. Moechars, F. Van Leuven, *Exp. Gerontol.* **2000**, 35, 831–841.
- [12] a) B. Permann, C. Adessi, G. P. Saborio, S. Fraga, M.-J. Frossard, J. van Dorpe, I. Dewachter, W. A. Banks, F. van Leuven, C. Soto, *FASEB J.* **2002**, 16, 860–862; b) R. Etcheberrigaray, M. Tan, I. Dewachter, C. Kuipéri, I. Van der Auwera, S. Wera, L. Qiao, B. Bank, T. J. Nelson, A. P. Kozikowski, F. van Leuven, D. L. Alkon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 11141–

11146; c) D. Frenkel, I. Dewachter, F. van Leuven, B. Solomon, *Vaccine* **2003**, 21, 1060–1065; d) R. Zurbruggen, *J. Mol. Neurosci.*, in press.

- [13] K. R. Bales, T. Verina, R. C. Dodel, Y. Du, L. Altstiel, M. Bender, P. Hyslop, E. M. Johnstone, S. P. Little, D. J. Cummins, P. Piccardo, B. Ghetti, S. M. Paul, *Nat. Genet.* **1997**, 17, 263–264.
- [14] B. Urbanc, L. Cruz, R. Le, J. Sanders, K. Hsiao Ashe, K. Duff, H. E. Stanley, M. C. Irizarry, B. T. Hyman *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 13990–13995.
- [15] a) M. E. McLellan, S. T. Kajdasz, B. T. Hyman, B. J. Bacskai, *J. Neurosci.* **2003**, 23, 2212–2217; b) Y. Matsuoka, M. Picciano, J. La Francois, K. Duff, *Neuroscience* **2001**, 104, 609–613.
- [16] The method for determining the stability constants will be reported elsewhere.

Received: May 26, 2005

Published online on October 6, 2005

Supporting Information

for

Preparation of Cyclo-Phen Type Ligands, Chelators of Metal Ions as Potential Therapeutic Agents in the Treatment of Neurodegenerative Diseases

Christophe Boldron, Ingrid Van der Auwera, Céline Deraeve, Heinz Gornitzka, Stefaan Wera, Marguerite Pitie, Fred Van Leuven, and Dr. Bernard Meunier*

S1: Crystal structures data

Cyclo-bi-phen: $C_{16}H_{13}Cl_3N_2O_2$, $M = 371.63$, monoclinic, $P2_1/c$, $a = 11.201(1) \text{ \AA}$, $b = 12.704(1) \text{ \AA}$, $c = 12.212(1) \text{ \AA}$, $\beta = 114.571(1)^\circ$, $V = 1580.3(3) \text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $T = 193(2) \text{ K}$. 12931 reflections (4011 independent, $R_{\text{int}} = 0.0201$) were collected. Largest electron density residue: $0.317 \text{ e \AA}^{-3}$, R_1 (for $I > 2\sigma(I)$) = 0.0310 and $wR_2 = 0.0867$ (all data) with $R_1 = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$ and $wR_2 = (\sum w (F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum w (F_o^2)^2)^{0.5}$.

Cyclo-tri-phen: $C_{50.75}H_{53}Cl_6N_6O_{9.75}$, $M = 1115.69$, triclinic, $P \bar{1}$, $a = 8.735(3) \text{ \AA}$, $b = 15.853(4) \text{ \AA}$, $c = 19.996(6) \text{ \AA}$, $\alpha = 84.812(5)^\circ$, $\beta = 88.499(6)^\circ$, $\gamma = 81.356(6)^\circ$, $V = 2726.0(13) \text{ \AA}^3$, $Z = 2$, $T = 193(2) \text{ K}$. 10985 reflections (6960 independent, $R_{\text{int}} = 0.0870$) were collected. Largest electron density residue: $0.841 \text{ e \AA}^{-3}$, R_1 (for $I > 2\sigma(I)$) = 0.0893 and $wR_2 = 0.2508$ (all data).

Cyclo-tetra-phen: $C_{36.75}H_{35.25}Cl_{11.25}N_{4.5}O_{5.26}$, $M = 1022.96$, orthorhombic, $Pccn$, $a = 31.481(4) \text{ \AA}$, $b = 17.686(2) \text{ \AA}$, $c = 18.942(2) \text{ \AA}$, $V = 10547(2) \text{ \AA}^3$, $Z = 8$, $T = 153(2) \text{ K}$. 25864 reflections (6404 independent, $R_{\text{int}} = 0.0807$) were collected. Largest electron density residue: $0.926 \text{ e \AA}^{-3}$, R_1 (for $I > 2\sigma(I)$) = 0.0923 and $wR_2 = 0.2651$ (all data).

All data for all structures represented in this paper were collected at low temperatures using an oil-coated shock-cooled crystal on a Bruker-AXS CCD 1000 diffractometer with MoK α radiation ($\lambda = 0.71073$ Å). The structure was solved by direct methods (SHELXS-97, G.M. Sheldrick, *Acta Crystallogr.* **1990**, A46, 467-473) and all non hydrogen atoms were refined anisotropically using the least-squares method on F^2 (SHELXL-97, Program for Crystal Structure Refinement, G. M. Sheldrick, University of Göttingen **1997**).

CCDC 268177 (Cyclo-bi-phen), CCDC 268178 (Cyclo-tri-phen), and CCDC 268179 (Cyclo-tetra-phen) contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.

S2: Detailed protocol about double-transgenic mice:

APP [V717I]C57B1/6 $\times$ PS1[A246E] FVB female mice of 6 months old were used. All mice were genotyped by PCR at an age of 3 weeks and double-checked at the onset of the study. All mice were blind randomized, age-matched. The mice were treated by 5 mg/kg of Cyclo-bi-Phen or 5 mg/kg of 3-propyl-Clip-Phen or 10 mg/kg for Clioquinol dissolved in DMSO / groundnut oil (1 / 4) by intra-peritoneal injection 3 $\times$ per week during a nine-week period. Injected drug concentration was 0.75 mg/mL. 9 animals were treated with each drug (control also included 9 animals that received only DMSO/groundnut oil). During the nine-week period, one animal was lost by unknown causes in each treatment group and none in the control group. All treated mice gained weight during treatment, possibly due to the composition of the vehicle solution, which consists of 80 % groundnut oil.

The mice were anesthetized with a mixture of Ketalar (Ketamin), Rompun (Xylazin 2 %) and Atropin (2/1/1, v/v/v) and flushed transcardially with physiological saline solution at 4 °C. The brain was removed from the cranium and hindbrain and forebrain were separated with a cut in the coronal/frontal plane. The forebrain was divided into left and right hemisphere by a sagittal cut. One hemisphere was snap-frozen in liquid nitrogen for biochemical analysis, and the other hemisphere was post-fixed overnight in 4 % paraformaldehyde for histology. All collected samples were labeled with the ID number of the mouse, without any reference to the treatment. Further processing of the samples was done in a blind way.

Sagittal vibratome sections (40 μm) were cut for free floating incubations and stored at 4°C until staining. 25 consecutive sections per brain in the region of the subiculum were selected. Five sections (2, 7, 12, 17 and 22) of each animal were stained with Thioflavin-S. Sections were randomized for staining and blind quantification.

For Thioflavin-S staining, floating sections were stored in PBS with 0.1 % azide and washed for 2×8 min in tap water before being stained 8 min in 1 % Thioflavin-S (Aldrich) in AD. Then they were fixed for 10 min in 4 % formaldehyde in PBS and washed for 2×8 min in tap water and stained for 4 min in 1 % Thioflavin-S in AD. After fixation for 8 min in 80 % ethanol and washing for 3×8 min in tap water, the sections were put on glass-slides and let to dry at 50 °C before being mounted in Mowiol (Calbiochem) with DABCO.

Images were acquired with a Leica DMR microscope equipped with a Sony DXC-9100P camera and analyzed with a computer using Leica Q-Win software. Light intensity and condenser settings for the microscope were kept constant throughout the image acquisition process. All acquired images were subjected to the same computer subroutines to minimize investigator bias. Density slice thresholding was applied uniformly throughout analysis.

The area of the subiculum was selected for automatic quantification of the amyloid load in the Thioflavin-S staining.

Immunohistochemistry was performed on five sections (1, 6, 11, 16 and 21) in the region of the subiculum of each animal. Sections were randomized for staining and blind quantification. Method was adapted from reference 11a. Floating sections were washed with PBS and, after quenching of endogenous peroxidase (1.5 % H_2O_2 in PBS/methanol (1/1, v/v), 15 min, room temperature), they were washed with PBS, 0.1 % Triton X100 (PBST) then incubated 30 min in PBST, 10 % fetal calf serum (FCS) before to be incubated overnight with Pan β -amyloid polyclonal rabbit primary antibody (Oncogene) 1/10 000 in PBST, 10 % FCS. After washing in PBST, they were incubated 1 hour with secondary antibody (goat anti rabbit, biotinylated, from Vectors) 1/500 in PBTS 10 % FCS and washed with PBST. Then another incubation was performed during 30 min with ABC kit, HRP-labeled (Vector) in PBTS 10% FCS. After washing in PBS then in Tris-HCl buffer (0.05 M, pH 7.6), immune complexes were detected with 3,3'-diaminobenzidine and H_2O_2 in Tris-HCl. Sections were washed with Tris-HCl then PBS, put on silanized glasses and let dry at 50 °C before

to be incubated with Mayers hematoxylin, washed with water and dehydrated with 50, 70, 95 then 100 % ethanol. After incubation with xylene, the glasses were mounted with Depex and analyzed as for Thioflavin-S staining.

Biochemical analyses of transgenic mouse brain were performed on the other hemisphere with a method adapted from reference 11a. In brief, brains were homogenized in 6.5 vol of ice cold 20 mM Tris-HCl, pH 8.5 buffer containing a mixture of proteinase inhibitors (CompleteTM, Roche). After centrifugation at 135000 g for 80 min at 4 °C, the supernatants were applied on reversed-phase columns (C18-Sep-pack cartridges; Waters) and washed with increasing concentrations of acetonitrile (5 %, 25 % and 50 %) containing 0.1 % trifluoroacetic acid. The last fraction containing the soluble amyloid peptides was dried in vacuum overnight and dissolved for measurements in ELISA. The pellet of centrifugation was suspended in TBS containing 2 % Triton X-100, 2 % Nonidet P-40 and proteinase inhibitors then centrifuged at 98000 g for 1 hour at 4 °C. The supernatant was removed and the residual pellet was resuspended in Tris-HCl buffer (80 mM, pH 8.0) containing 8 M guanidine and incubated 3 h in a thermomix at 25 °C. After centrifugation 1 min at 4000 rpm, the supernatant was used to measure levels of insoluble A β 40 and A β 42 by specified ELISA.

Sandwich ELISA for soluble or insoluble A β 40 and A β 42 were performed with specific ELISA kits from GENETICS company and quantification was obtained from standard curves made with synthetic β -amyloid peptides.

II.3 Commentaires

II.3.1 Stratégie bi-chélateur

Ces premiers résultats permettent de montrer que l'emploi d'un bi-chélateur dérivé de Phen, la Cyclo-bi-Phen, est efficace pour la réduction des dépôts amyloïdes denses. La structure du ligand bi-Phen est toutefois primordiale pour cette activité, dans la mesure où des effets antagonistes sont observés pour deux ligands de structures proches. La Cyclo-bi-Phen pourvue de deux bras de jonction est active alors que son analogue 3-propyl-Clip-Phen n'en comportant qu'un seul a un effet défavorable dans les mêmes conditions.

Cette première évaluation du ligand Cyclo-bi-Phen est prometteuse. Des études complémentaires doivent cependant être menées pour confirmer que les résultats positifs obtenus sont corrélés à la chélation des ions métalliques associés aux plaques amyloïdes. Dans ce but, l'évaluation de cette molécule a été poursuivie au laboratoire mais ne fera pas l'objet de ce manuscrit.

Suite à ces résultats, la synthèse de dérivés bi-chélateurs basés sur le noyau quinoléine, qui est un autre motif de chélation sélectif des ions Cu^{II} , Zn^{II} et Fe^{III} et qui est retrouvé dans le clioquinol, a été entreprise et fera l'objet du chapitre III.

II.3.2 Évaluation biologique de molécules

L'étude *in vivo* est un outil complet pour l'évaluation d'un composé à visée thérapeutique. Cependant, elle présente également des désavantages et est peu adaptée à l'évaluation d'une série de composés dans un but de sélection de molécules actives. D'autres tests sont possibles dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, possédant également des avantages et des inconvénients qui vont être discutés dans la suite de ce paragraphe. Dans un but de simplification, seuls les aspects en rapport avec l'étude seront abordés.

II.3.2.1 Souris transgéniques modélisant la maladie d'Alzheimer

L'utilisation de modèles animaux dans le cadre de la maladie d'Alzheimer ne peut être réalisée sur les rongeurs classiquement utilisés en laboratoire. En effet, ils ne développent pas naturellement de dépôts amyloïdes, probablement de part la séquence de leur protéine A β qui diffère de celle des humains au niveau de trois acides aminés. Il est

donc nécessaire d'utiliser des souris souvent doublement, voire triplement, transgéniques afin de mimer les aspects de la pathologie humaine (Higgins and Jacobsen, 2003). Ces modèles permettent :

- l'évaluation de l'efficacité d'un composé sur un organisme entier et vivant, avec la possibilité de réaliser des tests cognitifs,
- l'étude de la biodisponibilité des molécules et de leur toxicité (la réalisation de ces tests est également possible sur animaux sains).

Cependant, ils présentent un certain nombre d'inconvénients :

- les tests sont très coûteux car les animaux transgéniques sont chers et fragiles,
- ces tests sont longs, la maladie d'Alzheimer étant une maladie à évolution lente,
- les modèles sont partiels, les animaux ne développant pas tous les aspects de la maladie (par exemple, tous les modèles ne développent pas de taupathie),
- l'extrapolation à d'autres études est limitée car il est difficile de comparer les résultats obtenus sur des lignées différentes.

II.3.2.2 Extraits de cerveaux humains post mortem

Ces échantillons permettent en particulier l'étude de la solubilisation des plaques amyloïdes.

L'avantage majeur de ces extraits est :

- d'être constitués de plaques amyloïdes "authentiques", directement issues de cerveaux humains de malades d'Alzheimer.

Toutefois, plusieurs inconvénients sont à citer :

- ces extraits sont "morts". Bien qu'ils permettent d'étudier la solubilisation des plaques amyloïdes, l'inhibition de la formation de celles-ci ne peut être mesurée. Pour la même raison, ils ne permettent pas d'analyser les effets des composés testés sur le stress oxydant, ni sur la toxicité de A β ,
- les extraits de cerveau ne permettent pas l'étude du passage de la barrière hémato-méningée par les molécules testées ni leur toxicité,
- ces extraits sont peu accessibles : leur utilisation pour une première évaluation de composés est par conséquent difficilement envisageable.

II.3.2.3 Cultures cellulaires

Des cultures cellulaires (généralement de cellules de cerveaux d'embryons de rats ou de neuroblastomes humains) sont également utilisées, l'avantage dans le cas des cellules humaines étant de posséder la machinerie cellulaire adaptée à l'étude des phénomènes.

Les cultures cellulaires, traitées en présence d'A β , permettent d'étudier un point particulier de la maladie d'Alzheimer. Elles sont généralement utilisées pour évaluer l'inhibition, par les composés testés, de la mort neuronale induite par A β . L'étude des phénomènes oxydants peut également être menée sur ces cultures cellulaires.

Enfin, une première évaluation de la toxicité des molécules peut aussi être réalisée sur les cultures neuronales.

Ces tests présentent néanmoins des lacunes :

- ils ne permettent pas de mesurer les effets des molécules testées sur un tissu (et encore moins sur un organisme entier), ni d'étudier les relations entre les différents types de cellules,
- les cellules employées n'étant pas totalement différenciées, elles ne sont en fait qu'un modèle des neurones matures du cerveau,
- ces tests ne permettent pas d'étude claire du processus d'agrégation,
- ils ne traitent pas le phénomène de pénétration des molécules dans le cerveau.

II.3.2.4 Tests biochimiques

Des tests biochimiques *in vitro* sont également réalisés en présence d'A β . Les avantages de ces tests sont :

- leur simplicité, leur rapidité et leur faible coût,
- la possibilité d'étudier, à l'échelle moléculaire, un phénomène de façon "propre" (par exemple : fibrillation, agrégation en présence de métaux, formation d'EORs, ...), en l'isolant des événements auxquels il peut être relié.

Toutefois, ils ne permettent pas :

- d'étudier de façon globale les relations entre les différents paramètres de la cascade amyloïde,
- d'évaluer la toxicité des composés, leur biodisponibilité et leur pénétration dans le cerveau.

A ces tests spécifiques de la maladie d'Alzheimer viennent s'ajouter des tests classiques de toxicité, de stabilité métabolique ou de biodistribution des composés, réalisables quelle que soit la cible thérapeutique envisagée.

Ces différents outils n'étudient pas les mêmes aspects ou niveaux de fonctionnement de la maladie d'Alzheimer et sont complémentaires. Cependant, dans le but d'étudier un grand nombre de composés, les tests biochimiques semblent l'outil le plus adapté pour une étude préliminaire. Ils permettent en effet de sélectionner les composés les plus intéressants sur une batterie de tests ciblés sur des aspects bien précis de la maladie. Une évaluation plus complète des molécules retenues pourra alors être menée grâce à des tests plus contraignants mais plus informatifs quand à l'action globale de celles-ci.

Dans ce but, des tests *in vitro* sur le peptide β -amyloïde ont été développés au laboratoire. Ils consistent en l'étude de la capacité des chélateurs synthétisés à inhiber l'agrégation d'A β due à la présence d'ions métalliques et à inhiber la production d'H₂O₂ par de tels systèmes. Ces tests simples, qui permettent d'étudier les mécanismes d'action de ces composés à l'échelle moléculaire, seront détaillés au chapitre IV.

III. Bibliographie

- Cherny, R.A., Legg, J.T., McLean, C.A., Fairlie, D.P., Huang, X., Atwood, C.S., Beyreuther, K., Tanzi, R.E., Masters, C.L., and Bush, A.I. (1999) Aqueous dissolution of Alzheimer's disease A β amyloid deposits by biometal depletion. *J. Biol. Chem.* **274**: 23223-23228.
- Cherny, R.A., Barnham, K.J., Lynch, T., Volitakis, I., Li, Q.-X., McLean, C.A., Multhaup, G., Beyreuther, K., Tanzi, R.E., Masters, C.L., and Bush, A.I. (2000) Chelation and intercalation: complementary properties in a compound for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Struct. Biol.* **130**: 209-216.
- Cherny, R.A., Atwood, C.S., Xilinas, M.E., Gray, D.N., Jones, W.D., McLean, C.A., Barnham, K.J., Volitakis, I., Fraser, F.W., Kim, Y.S., Huang, X., Goldstein, L.E., Moir, R.D., Lim, J.T., Beyreuther, K., Zheng, H., Tanzi, R.E., Masters, C.L., and Bush, A.I. (2001) Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits β -amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* **30**: 665-676.
- Higgins, G.A., and Jacobsen, H. (2003) Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: phenotype and application. *Behav. Pharmacol.* **14**: 419-438.

- Huang, X., Atwood, C.S., Hartshorn, M.A., Multhaup, G., Goldstein, L.E., Scarpa, R.C., Cuajungco, M.P., Gray, D.N., Lim, J., Moir, R.D., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (1999a) The A β peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry* **38**: 7609-7616.
- Huang, X., Cuajungco, M.P., Atwood, C.S., Hartshorn, M.A., Tyndall, J.D.A., Hanson, G.R., Stokes, K.C., Leopold, M., Multhaup, G., Goldstein, L.E., Scarpa, R.C., Saunders, A.J., Lim, J., Moir, R.D., Glabe, C., Bowden, E.F., Masters, C.L., Fairlie, D.P., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (1999b) Cu(II) potentiation of Alzheimer A β neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* **274**: 37111-37116.
- McLellan, M.E., Kajdasz, S.T., Hyman, B.T., and Bacskai, B.J. (2003) In vivo imaging of reactive oxygen species specifically associated with Thioflavine S-positive amyloid plaques by multiphoton microscopy. *J. Neurosci.* **23**: 2212-2217.
- Sillen, L.G., and Martell, A.E. (1971) *Stability constants of metal-ions complexes*: The Chemical Society London Publication.
- Urbanc, B., Cruz, L., Sanders, J., Ashe, K.H., Duff, K., Stanley, H.E., Irizarri, M.C., and Hyman, B.T. (2002) Neurotoxic effects of thioflavine S-positive amyloid deposits in transgenic mice and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 13990-13995.

Chapitre III

Ligands polyquinoléine

-

Conception et synthèse

La stratégie polyphénanthroline ayant montré des résultats positifs en relation avec la maladie d'Alzheimer, il nous a semblé intéressant d'appliquer une stratégie similaire à une autre série de composés aromatiques *N*-hétérocycliques possédant des propriétés chélatantes : les ligands quinoléine. Nous nous sommes donc attachés à concevoir des dérivés polyquinoléine reliés par un bras de jonction dans le but d'améliorer les propriétés de chélation par rapport aux équivalents monomériques.

I. Introduction : ligands quinoléine et clioquinol

Le motif quinoléine est très employé en chimie thérapeutique. La quinine, un alcaloïde extrait de l'écorce de *Chincona*, est utilisée pour ses propriétés antipyrétiques, analgésiques et antipaludiques depuis plus de trois siècles. D'autres dérivés quinoléine sont employés en tant qu'agents antipaludiques, comme la chloroquine ou la primaquine. Des hydroxyquinoléines, possédant des propriétés antibiotiques et antifongiques, sont prescrites pour traiter des infections de la peau ou de l'estomac. Enfin, les fluoroquinolones sont très largement utilisées pour leur effet bactéricide, en particulier contre les bactéries gram-négatives, et sont prescrites dans le traitement de la lèpre ou d'autres infections mycobactériennes (Fretzner *et al.*, 1998).

Les dérivés quinoléine substitués en position 8 par un hétéroatome (comme les dérivés de la 8-hydroxyquinoléine ou de la 8-aminoquinoléine) peuvent être employés en tant que chélateurs. Leur utilisation dans le cadre des maladies neurodégénératives impliquant des ions métalliques a été envisagée. C'est le cas des dérivés VK-28 ou HLA-20 (cf. chapitre I, Fig. 37) qui peuvent chélater le fer et qui ont été testés dans le cadre de la maladie de Parkinson (Ben Shachar *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2005), mais également du clioquinol (Fig. 1).

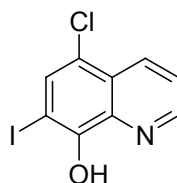


Fig. 1. Structure du clioquinol.

Le clioquinol (5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoléine) a été décrit dans le premier chapitre comme une molécule efficace vis-à-vis de la maladie d'Alzheimer, que ce soit chez des souris transgéniques APP2576 ou chez l'homme. Les effets observés ont été attribués à la capacité du clioquinol à chélater les ions métalliques séquestrés au niveau des plaques amyloïdes. Ainsi, la chélation par le clioquinol du Cu^{II} lié à $\text{A}\beta$ a été mise en évidence par RMN (Cherny *et al.*, 2001). Le clioquinol complexe le Cu^{II} et le Zn^{II} (Di Vaira *et al.*, 2004), avec une affinité pour ces métaux nettement supérieure à celle pour d'autres ions divalents tels que le Ca^{II} ou le Mg^{II} (Tableau 1) (Cherny *et al.*, 2001).

	Cu^{II}	Zn^{II}	Ca^{II}	Mg^{II}
log K	8,9	7,0	4,9	5,0

Tableau 1. Logarithme décimal des constantes d'affinité (log K) du clioquinol pour les ions divalents Cu^{II} , Zn^{II} , Ca^{II} et Mg^{II} (d'après Cherny *et al.*, 2001).

Ces valeurs doivent être comparées aux valeurs des constantes d'affinité d' $\text{A}\beta_{42}$ pour le Cu^{II} et le Zn^{II} . Ce peptide posséderait deux sites d'affinité pour le Cu^{II} à pH = 7,4: un premier de très haute affinité (log K = 17,2) pour une stœchiométrie $\text{A}\beta_2\text{Cu}$ et un second site d'affinité plus faible (log K = 8,3) pour une stœchiométrie $\text{A}\beta\text{Cu}_2$ (Atwood *et al.*, 2000). Dans le cas du Zn^{II} , les constantes d'affinité sont de l'ordre de 10^7 M^{-1} (stœchiométrie $\text{A}\beta\text{Zn}$) et 10^5 M^{-1} (stœchiométrie $\text{A}\beta\text{Zn}_2$) pour $\text{A}\beta_{40}$ (Bush *et al.*, 1994). Le clioquinol semble donc capable d'être un compétiteur de chélation pour le zinc et pour le cuivre lié au site de plus faible affinité du peptide. D'autres types de chélation peuvent également être envisagés. Ainsi, le clioquinol pourrait également se lier aux différents sites sous la forme de complexe ternaire.

Toutefois, il faut noter que le clioquinol, qui a été utilisé en tant qu'antibiotique jusqu'en 1970, a été retiré du marché lorsque son utilisation a été liée au Japon à des cas de neuropathie myélo-optique subaigüe (SMON) chez des patients déficients en vitamine B12. Le clioquinol a récemment été évalué en phases I et II d'essais cliniques en relation avec la maladie d'Alzheimer, associé à des compléments de vitamine B12 pour prévenir l'apparition des effets invalidants liés au SMON (troubles de la vision et paralysie des membres inférieurs notamment) (Konagaya *et al.*, 2004). Bien qu'aucun effet secondaire important n'a été rapporté lors de ces essais cliniques (Ritchie *et al.*, 2003), le processus d'évaluation a été suspendu pour cause de toxicité attribuée à un sous-produit diiodé

présent dans les lots de clioquinol. Les dérivés 5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoléine sont en effet sensibles à la déiodation et à la dismutation conduisant aux 5,7-dichloro- et 5,7-diiodo-8-hydroxyquinoléine (Nogradi, 1952; Talekar *et al.*, 2005).

II. Stratégie polyquinoléine

II.1 Ligands quinoléine substitués en position 8 par un hétéroatome et leurs complexes métalliques

Les ligands quinoléine (dont le clioquinol est un dérivé) présentent de nombreux avantages en synthèse organique : leur préparation est très documentée, elle se fait facilement et l'introduction de modifications est possible sur toutes les positions du noyau quinoléine.

D'autre part, les dérivés quinoléine substitués en position 8 par un hétéroatome possèdent des propriétés de chélation qui ont elles aussi été très largement étudiées. C'est le cas en particulier pour les 8-hydroxy- et 8-aminoquinoléine qui forment des complexes stables avec les ions métalliques impliqués dans la maladie d'Alzheimer.

La 8-hydroxyquinoléine forme des complexes avec un très grand nombre d'ions métalliques, avec pour ordre de stabilité décroissante : $\text{Pd}^{\text{II}} > \text{Fe}^{\text{III}} > \text{Cu}^{\text{II}} > \text{Ni}^{\text{II}} > \text{Co}^{\text{II}} > \text{Zn}^{\text{II}} > \text{Cd}^{\text{II}} > \text{Mn}^{\text{II}} > \text{Mg}^{\text{II}}$ (Phillips, 1956; Sillen and Martell, 1971). Cette observation est favorable à l'utilisation de la 8-hydroxyquinoléine comme motif chélatant sélectif du Fe^{III} , du Cu^{II} et du Zn^{II} dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, puisque son affinité pour les autres ions également présents dans le cerveau, Mn^{II} et Mg^{II} , est faible.

Les ions métalliques les plus impliqués au niveau des agrégats amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer sont les ions Cu^{II} et Zn^{II} . Avec ces derniers, les ligands 8-hydroxyquinoléine forment, comme les ligands Phen, des complexes métalliques de stœchiométrie LM mais également L_2M qui remplit la sphère de coordination de ces ions métalliques et les stabilise (Sillen and Martell, 1971). Les constantes d'affinité de la 8-hydroxyquinoléine pour ces ions métalliques sont reportées dans le tableau 2. Dans le cas du Fe^{III} , également retrouvé dans ces structures amyloïdes mais dans une moindre mesure, les complexes stables sont de type L_3M .

	Cu ^{II}		Zn ^{II}		Références
	K ₁	K ₂	K ₁	K ₂	
8-hydroxyquinoléine	12,0	11,0	8,5	7,3	Gershon <i>et al</i> , 1972 Sillen and Martell, 1971
8-aminoquinoléine	6,1	4,7	2,4	n.d.	Sillen and Martell, 1971
2-Me-8-hydroxyquinoléine	11,0	7,7	n.d.	n.d.	Gershon <i>et al</i> , 1972
5-Cl-8-hydroxyquinoléine	10,8	10,2	n.d.	n.d.	Gershon <i>et al</i> , 1972
7-Cl-8-hydroxyquinoléine	8,1	6,3	n.d.	n.d.	Gershon <i>et al</i> , 1972

Tableau 2. Logarithme décimal des constantes d'affinité ($\log K$) de la 8-hydroxyquinoléine et de quelques uns de ses dérivés, ainsi que de la 8-aminoquinoléine, pour les ions métalliques Cu^{II} et Zn^{II}. N.d. : non déterminé.

Les ions métalliques jouent le rôle d'acides de Lewis et conduisent à la déprotonation de la fonction phénolique de la 8-hydroxyquinoléine. Le composé 8-quinoléinate obtenu se coordine à ces ions métalliques par les atomes d'azote pyridinique et d'oxygène du phénolate.

Avec les ions métalliques divalents tels que le Cu^{II} ou le Zn^{II}, les complexes L₂M formés en milieu aqueux sont neutres et possèdent des structures de type plan carré (avec éventuellement des ligands "aqua" coordonnés en positions axiales). Deux géométries (*cis* ou *trans*), planaires, sont possibles pour les dérivés de la 8-hydroxyquinoléine (Fig. 2), la géométrie *trans* étant la plus favorisée pour des raisons de répulsion électronique (Phillips, 1956).

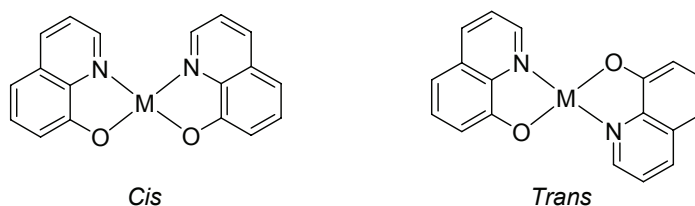


Fig. 2. Géométries *cis* et *trans* pour la complexation des ions métalliques par la 8-hydroxyquinoléine.

Dans le cas de la 8-aminoquinoléine, les données de la littérature concernant les complexes métalliques sont moins accessibles. Il est toutefois important de noter l'ordre de stabilité décroissante des complexes métalliques formés, qui est le suivant : Cu^{II} > Ni^{II} > Fe^{III} > Zn^{II} > Co^{II} > Cd^{II} > Mg^{II} ~ Ca^{II} (Sillen and Martell, 1971). De plus, la 8-aminoquinoléine (L) montre une forte sélectivité pour le Cu^{II} (Tableau 2), et forme des complexes L₂Cu^{II} stables.

L'influence de la substitution du noyau quinoléine sur la stabilité des complexes métalliques a de plus été étudiée dans le cas de la 8-hydroxyquinoléine et du Cu^{II} (Tableau 2). L'introduction d'un groupement méthyle en position 2 de la 8-hydroxyquinoléine a peu d'influence sur la valeur de K_1 . De même, la présence d'un atome d'halogène en position 5 ne diminue que faiblement la valeur de K_1 , alors que la substitution en position 7 est plus critique, pour des raisons de gêne stérique entre ce groupement en position 7 et le site de chélation en position 8 (Gershon *et al.*, 1972).

II.2 Stratégie polyquinoléine

Afin de favoriser ces espèces comportant deux ligands quinoléine pour un même ion métallique *in vivo*, nous avons cherché à développer des composés pour lesquels deux noyaux quinoléines, substitués en position 8 par un hétéroatome participant à la chélation, sont reliés par un bras covalent (Fig. 3).

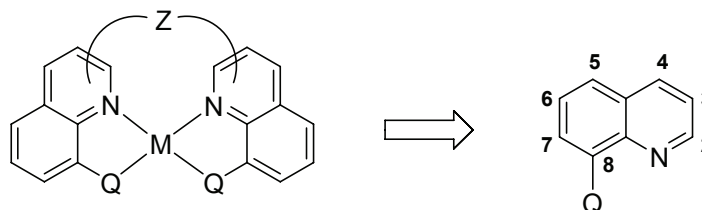


Fig. 3. Structure générale des composés bis-quinoléine substitués en position 8 par un hétéroatome Q.

Cette stratégie de chélation en "pince" doit permettre d'augmenter l'affinité des ligands tétrédentates formés pour les ions métalliques, de part la formation de complexes métalliques plus stables que pour les dérivés monoquinoléine.

Ces ligands devraient donc posséder une meilleure capacité à chélater les ions métalliques piégés par le peptide β -amyloïde.

II.3 Conception des molécules

Notre but étant de préparer des composés possédant une activité biologique potentielle, il a été nécessaire de prendre plusieurs points en compte concernant les propriétés générales des ligands.

Nous avons cherché à synthétiser des composés de poids moléculaire relativement faible (< 500) et neutres à l'état de ligands libres et de complexes avec les ions

métalliques Cu^{II} et Zn^{II} , de manière à faciliter leur passage de la barrière hémato-méningée. Nous nous sommes également attachés à synthétiser des ligands symétriques et dépourvus de centres chiraux de manière à faciliter leur étude biologique (l'étude de composés optiquement actifs nécessitant la séparation et l'évaluation séparée de chacun des isomères).

II.3.1 Nature de l'hétéroatome participant à la chélation

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à la synthèse de dérivés de la 8-hydroxyquinoléine, qui sont des chélateurs qui reprennent le motif de chélation du clioquinol et qui possèdent des affinités pour le Cu^{II} et le Zn^{II} relativement élevées (Tableau 2).

Par ailleurs, il nous a paru intéressant de développer des composés possédant une fonction amine en position 8, et ce pour deux raisons :

- ces ligands présentent une sélectivité marquée pour le Cu^{II} par rapport au Zn^{II} (Tableau 2) dont l'effet mérite d'être évalué,
- ils sont beaucoup moins étudiés que les dérivés 8-hydroxyquinoléine pour leurs propriétés de chélation dans le cadre de la maladie d'Alzheimer.

II.3.2 Bras de jonction : position et taille

Afin de favoriser la chélation sous la forme de complexes mononucléaires en "pince", le bras de jonction doit se situer à proximité du site de chélation. Plusieurs positions sont envisageables (Fig. 4) :

- *En positions 2,7* : un tel bras de jonction reprend la géométrie *trans* des complexes de monomères (Fig. 2). Cependant, il entraîne une perte de symétrie du ligand et présuppose que les deux précurseurs quinoléine sont de nature différente, ce qui augmente le nombre d'étapes lors de la synthèse.

- *En position 7* : cette position semble très défavorable. En effet, l'étude par Gershon *et al.* de l'influence des substituants du noyau quinoléine sur la chélation a montré que la présence d'un substituant en position 7 (comme un méthyle ou un halogène) pouvait défavoriser la chélation suite à des gênes stériques (Tableau 2)

(Gershon *et al.*, 1972). D'autre part, cette position implique l'utilisation d'un bras très long qui défavorise les structures de chélation en "pince".

- *En position 2* : bien qu'elle ne reprenne pas le motif de chélation en *trans* des complexes de monomères, la structure bisquinoléine avec ce bras de jonction semble intéressante. En effet, l'introduction d'un groupement alkyle en position 2 a peu d'influence sur la valeur de K_1 lors de la complexation avec le Cu^{II} (Tableau 2) (Gershon *et al.*, 1972). D'autre part, le bras de jonction pourra être court, facilitant la structure en "pince" pour la chélation. Enfin, un tel bras de jonction permet la synthèse de molécules symétriques possédant un axe C_2 intéressant à la fois pour la synthèse (un seul précurseur quinoléine pourra être utilisé) et pour la biologie.

- *En position 8* : une autre stratégie consiste à introduire le bras de jonction directement sur l'atome chélatant, avec ici aussi une géométrie de chélation en *cis* et un ligand symétrique (axe C_2). Dans ce cas, l'hétéroatome participant à la chélation sera de préférence un azote (plutôt qu'un oxygène qui ne disposera pas de fonction déprotonable s'il est engagé dans un lien éther).

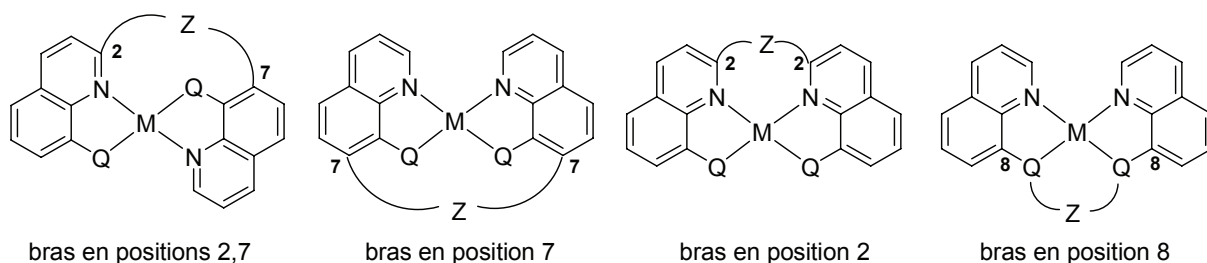


Figure 4. Positions possibles pour un bras de jonction reliant deux entités quinoléine.

Ainsi, les deux bras les plus intéressants pour la chélation sont ceux reliant deux noyaux quinoléine en position 2 et en position 8.

L'utilisation de modèles moléculaires a permis d'estimer la taille des bras de jonction pour favoriser la chélation. La modélisation de complexes plans possédant des longueurs de liaison compatibles avec celles retrouvées dans des structures cristallines (pour des complexes de 8-hydroxyquinoléine) indique que les bras de jonction les plus favorables sont des bras courts. ***Parmi ceux-ci, les liens comportant 1 chaînon semblent les plus intéressants.***

Dans le cas du bras en position 8, une longueur de bras de 1 chaînon signifie que c'est l'hétéroatome participant à la chélation (N) qui fait office de bras.

Ce modèle a été validé dans le cas de la bis(8-quinoléinyl)amine, qui complexe le Cu^{II} sous la forme d'une structure plan carré avec les atomes d'azotes pyridiniques, l'amine de jonction déprotonée et un ligand Cl^- (Fig. 5) (Puzas *et al.*, 1986).

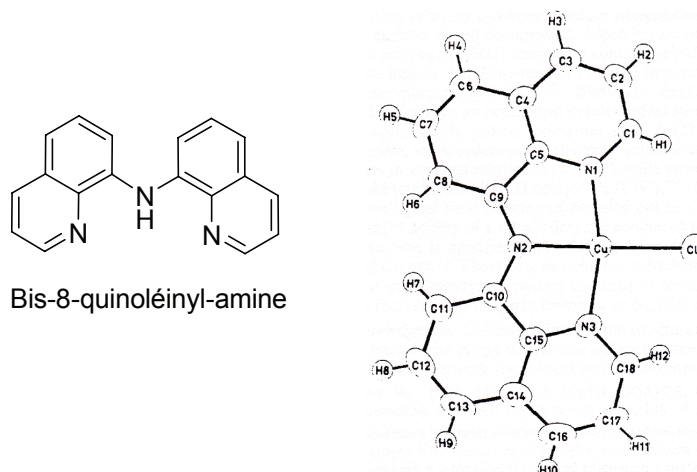


Figure 5. Ligand bis(8-quinoléinyl)amine et structure cristallographique de son complexe de Cu^{II} (d'après Puzas *et al.*, 1986).

Des bras de jonction plus longs, de type -NH-alkyl-NH-, peuvent également être envisagés en position 8. Dans ce cas, la longueur de bras optimale pour la chélation en pince est estimée à 5 chaînons d'après les modèles moléculaires.

Nos premiers essais se sont donc portés sur la synthèse de ligands reliés par un bras à un chaînon en position 2 et 8. La longueur des bras de jonction et leur nature (alkyle, amine, ...) ont également été modulées pour évaluer l'influence de ces paramètres sur la chélation et / ou sur l'activité biologique des composés.

II.3.3 Substitutions

L'introduction de substituants sur les hétérocycles ou sur le bras de jonction peut être réalisée dans plusieurs buts.

Le premier intérêt est d'aborder l'étude des relations structure / activité des molécules. En particulier, des atomes d'halogène chlore et iode en positions 5 et 7 du noyau quinoléine permettent d'étudier l'influence de ces substituants retrouvés sur le clioquinol. L'introduction d'une fonction méthoxy en position 7 fournit par ailleurs un homologue de structure avec de nombreux composés naturels possédant le motif 2-

méthoxyphénol qui est très classique en chimie thérapeutique. Un exemple en est la curcumine, molécule dimérique qui présente des propriétés antioxydantes et permet de dissoudre les dépôts amyloïdes (Yang *et al.*, 2005).

L'introduction de substituants sur le noyau quinoléine ou le bras de jonction peut également augmenter la stabilité du ligand en protégeant des sites potentiellement oxydables susceptibles de générer une perte d'activité biologique ou de la toxicité.

Enfin, certaines de ces modifications permettent également de moduler les propriétés physicochimiques des ligands et peuvent avoir des effets sur leur biodisponibilité. En particulier, l'introduction de substituants hydrophobes sur les ligands pourra favoriser leur passage de la barrière hémato-méningée.

III. Synthèse des ligands polyquinoléine

Plusieurs familles de ligands ont été synthétisées, classées ici en fonction de la nature et de la position du bras de jonction. Les ligands polyquinoléine qui ont fait l'objet de tests sur le peptide A β sont notés CTi (pour "Composé testé n° i") pour des facilités de lecture au niveau du chapitre IV.

III.1 Bras de jonction alkyle en position 2

III.1.1 Bras à une unité carbonée (bras C₁)

Nous nous sommes intéressés à la synthèse de dérivés bisquinoléine présentant un bras alkyle à un atome de carbone (bras C₁), qui semble le plus adapté pour la chélation d'après les modèles moléculaires.

Une seule méthode a été décrite, à notre connaissance, pour introduire un lien CH₂ en positions 2 et 2' de deux quinoléine. Elle a été décrite par Hamana *et al.* pour la quinoléine puis elle a été optimisée par Yamamoto *et al.* dans le cas de la 8-hydroxyquinoléine (Hamana and Yamazaki, 1963; Yamamoto *et al.*, 1978). Elle consiste à activer la position 2 par un dérivé *N*-oxyde, puis à faire réagir celui-ci sur le diméthylmalonate possédant des hydrogènes réactifs, en présence d'anhydride acétique utilisé comme solvant de la réaction (Schéma 1). D'un point de vue mécanistique, le groupe *N*-oxyde réagit avec l'anhydride acétique et est converti en groupement *N*⁺-

acétoxy, tout en libérant un équivalent d'acétate (Katritzky, 1985). Deux voies sont alors possibles.

- Soit le diméthylmalonate s'additionne successivement sur le carbone C2 de deux dérivés quinoléine N^+ -acétoxy, conduisant au départ du groupement N -acétoxy et libérant ainsi le cycle pyridine (voie i). Cette voie, sous contrôle cinétique, est favorisée lorsque la température est abaissée et conduit au produit attendu **1**. D'autre part, l'encombrement du malonate (diéthylmalonate au lieu de diméthylmalonate) défavorise cette voie (Yamamoto *et al.*, 1978).
- Soit un acétate s'additionne sur le carbone C2 du dérivé quinoléine N^+ -acétoxy, formant un intermédiaire 2-acétoxyquinoléine qui s'hydrolyse en milieu acide pour donner un dérivé secondaire de type amide **2** (voie ii) (Katritzky, 1985).

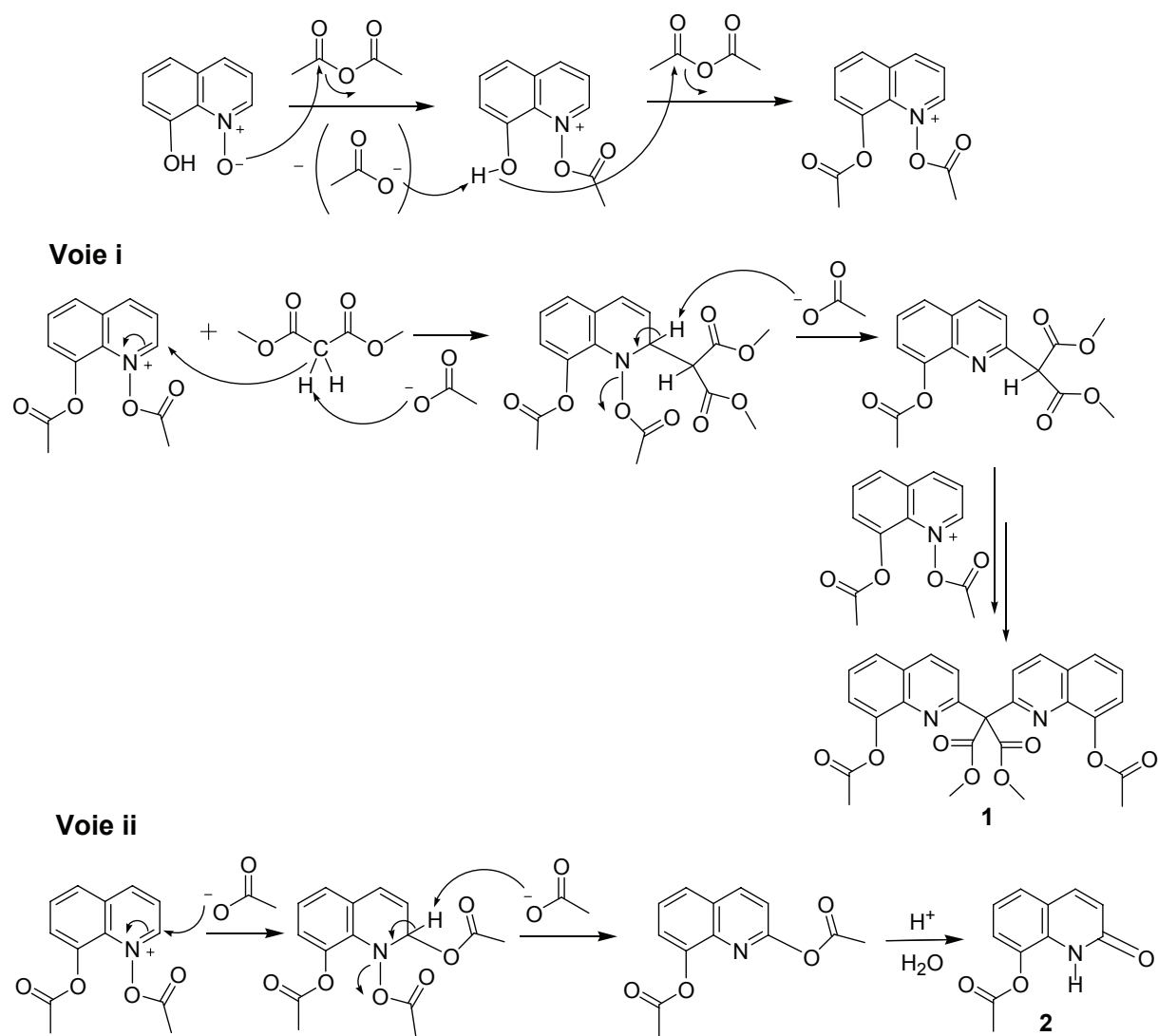
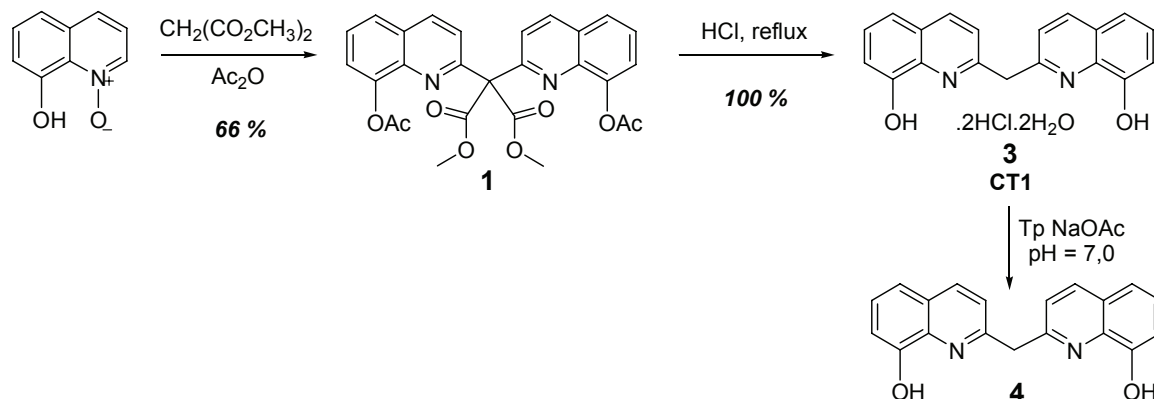


Schéma 1. Mécanisme de couplage du diméthylmalonate avec la 8-hydroxyquinoléine-N-oxyde en présence d'anhydride acétique (d'après Katritzky, 1985).

Le dérivé **1** a ainsi été préparé à partir de la 8-hydroxyquinoléine *N*-oxyde commerciale, avec un rendement de 66 %. L'hydrolyse des fonctions acétates en position 8 (formées lors de la synthèse) et des fonctions esters provenant du diméthylmalonate est réalisée au reflux de l'acide chlorhydrique. Dans ces conditions, la double décarboxylation des fonctions acides libérées se produit également, conduisant au composé **3** en une étape. Ce dernier peut être neutralisé en milieu tampon acétate (0,1 M) à pH = 7, pour donner **4**.

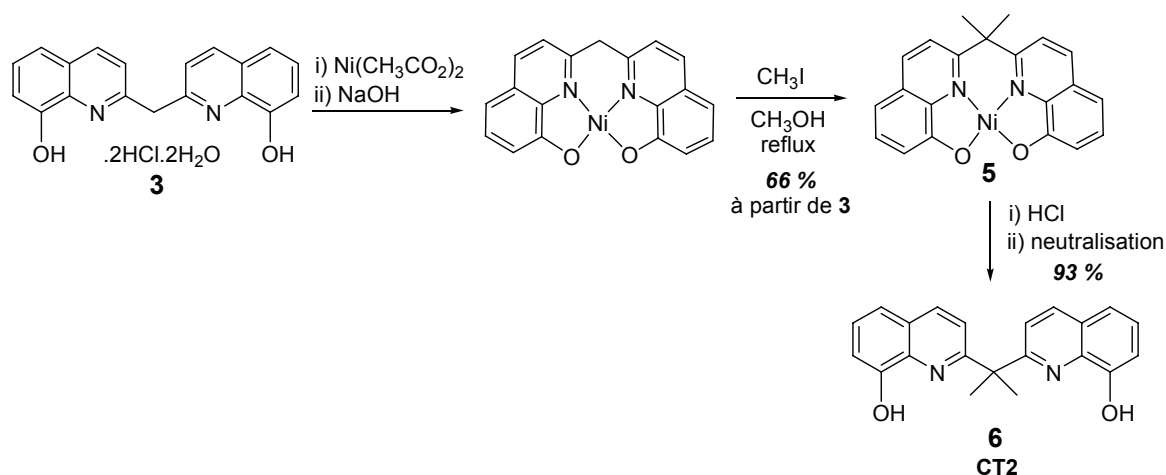
Schéma 2. Synthèse des composés **3** et **4**.

III.1.1.1 Substitutions du bras C_1

Les hydrogènes du bras CH_2 de **4** sont situés en position benzylique et sont par conséquent très acides. Nous avons mis à profit cette forte réactivité pour introduire des substituants au niveau du bras C_1 .

Substituants méthyle sur le bras C_1 :

Des substituants méthyle ont été introduits sur le bras CH_2 à partir d'iodure de méthyle, selon un schéma réactionnel également décrit par Yamamoto *et al.* (Schéma 3). Dans cette réaction, il est nécessaire de protéger les fonctions phénoliques qui seraient alkylées préférentiellement par l'iodure de méthyle. La protection a été réalisée par la formation d'un chélate de Ni^{II} , qui a pour avantages de se former quantitativement, d'être stable dans les conditions d'alkylation et de pouvoir être démétallé de façon quantitative en milieu acide. La réaction du chélate formé sur l'iodure de méthyle par substitution nucléophile conduit à **5**, qui est démétallé en milieu acide chlorhydrique pour donner **6** après une étape de neutralisation (Yamamoto *et al.*, 1978).



Des cristaux du complexe de Ni^{II} **5** ont été obtenus au cours de cette synthèse et ont été analysés par diffraction aux rayons X (Fig. 6).

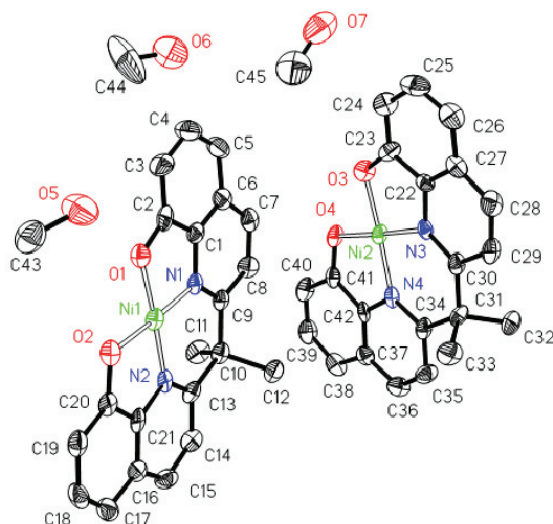


Fig. 6. Structure cristalline de **5** (réalisée par le Dr Heinz Gornitzka).

Le complexe de Ni^{II} , monomérique, est plan et symétrique, avec une géométrie plan carré autour du centre métallique. Ce premier point est très intéressant puisque le complexe formé n'est pas chiral.

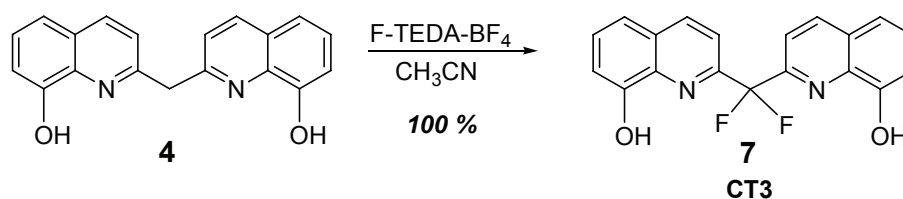
De plus, l'intérêt majeur de cette structure cristalline est d'accéder, pour la première fois, à la structure d'un ligand polyquinoléine complexé à un ion métallique divalent dont les propriétés sont proches de celles du Cu^{II} ou du Zn^{II} .

Elle correspond à l'arrangement attendu lors de la conception de cette série de ligands : **le complexe de Ni^{II} présente une structure tétradentate en "pince", avec les entités quinoléine du ligand chélatant le même ion métallique. Celles-ci sont orientées en cis autour de cet ion métallique.**

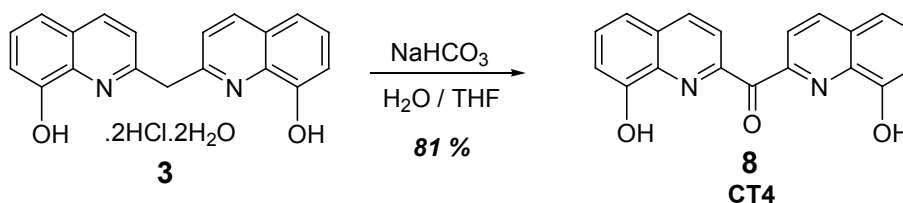
Fluoration du bras C₁ :

Afin d'augmenter la stabilité du composé **4** tout en restant au plus proche de sa structure, nous avons cherché à substituer les hydrogènes labiles par des atomes de fluor. L'intérêt du fluor est d'être un groupement isostérique de l'hydrogène, c'est-à-dire qu'il occupe un volume comparable et que son introduction ne crée pas d'encombrement stérique supplémentaire sur le ligand, mais avec une stabilité de la liaison C-F beaucoup plus importante que celle de la liaison C-H.

Compte tenu de la forte acidité des hydrogènes benzyliques, une réaction de fluoration électrophile a été envisagée pour introduire des substituants fluor géminaux sur le bras (Lal *et al.*, 1996; Tozer and Herpin, 1996). Un protocole dérivé d'une réaction de fluoration en position 2 de 1,3-dicétones, utilisant l'agent de fluoration électrophile F-TEDA-BF₄, a permis d'obtenir le composé **7** avec un rendement quantitatif (Schéma 4) (Banks *et al.*, 1994).

Schéma 4. Synthèse du composé **7**.**Oxydation du bras C₁ :**

D'autre part, le composé **3** a pu être oxydé en solution aqueuse alcaline aérée, en présence de THF pour permettre la solubilisation (Schéma 5).

Schéma 5. Synthèse du composé **8**.

Pour conclure, nous avons ainsi pu tirer profit de la réactivité des hydrogènes benzyliques du ligand **4** pour introduire divers groupements (alkyle, halogène, cétone) sur le bras C₁.

III.1.1.2 Substitutions du noyau quinoléine en positions 5 et 7

La fonction hydroxyle portée par le carbone C8 de la quinoléine oriente fortement en *ortho* et *para*, favorisant les substitutions en positions 5 et 7 (la position 5 étant la plus réactive) (Phillips, 1956). Ces positions sont particulièrement intéressantes puisque ce sont les positions substituées par des atomes de chlore et d'iode, respectivement, dans le cas du clioquinol.

Chloration en position 5 :

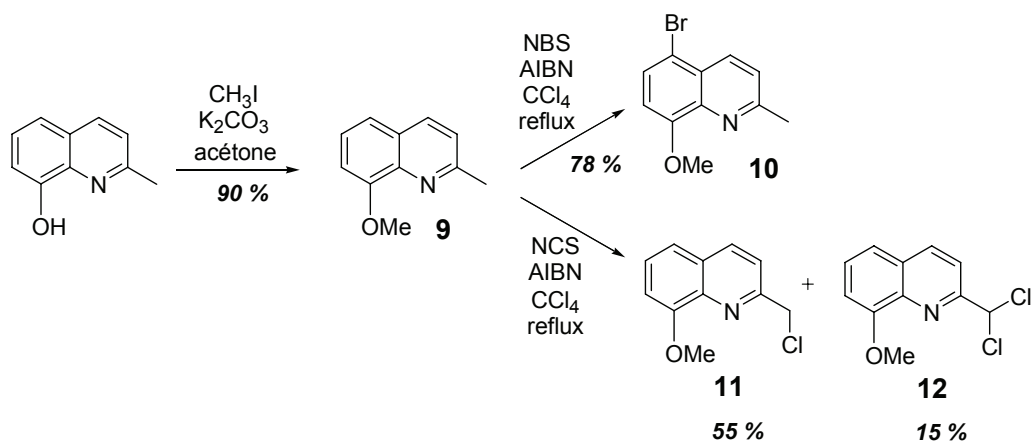
Par homologie avec le clioquinol, nous avons dans un premier temps cherché à développer des ligands substitués par un atome de chlore sur le carbone C5. Nous avons choisi de réaliser l'introduction de l'halogène par réaction sur les dérivés polyquinoléine formés plutôt que sur les précurseurs monomériques pour plusieurs raisons :

- le précurseur 5-chloro-8-hydroxyquinoléine-*N*-oxyde nécessaire à la préparation de l'analogue chloré du composé **4** n'est pas commercial et des essais de préparation de ce composé par oxydation de la 5-chloro-8-hydroxyquinoléine avec de l'acide *m*-chloroperbenzoïque ont échoué.
- la synthèse du dérivé polyquinoléine selon le schéma 1 est très longue, ce qui rend fastidieuse l'optimisation de nouvelles synthèses à partir des monomères.

Plusieurs types de réactions d'halogénéation sont envisageables pour des ligands 2-méthyl-8-hydroxyquinoléine, qui sont des modèles des dérivés polyquinoléine.

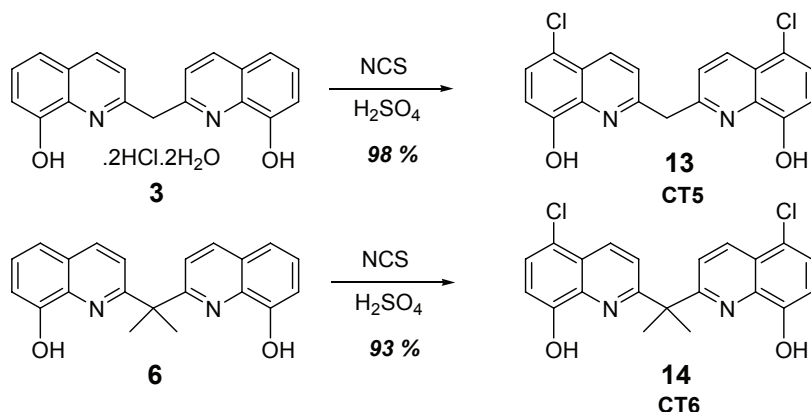
Un premier type de réaction est l'halogénéation radicalaire en présence de 2,2'-azobisisobutyronitrile comme initiateur de radicaux. Un protocole précédemment mis au point au laboratoire, utilisant le *N*-bromosuccinimide, avait permis de bromer sélectivement la 2-méthyl-8-méthoxyquinoléine en position 5 avec un bon rendement (Schéma 6).

Cependant, dans les mêmes conditions, l'utilisation du *N*-chlorosuccinimide comme agent de chloration apporte une régiosélectivité différente, puisque la chloration a lieu préférentiellement sur le bras alkyle.

Schéma 6. Halogénations radicalaires de **9** par le NBS et le NCS.

Un autre type de réaction envisageable est la réaction d'halogénéation électrophile. L'halogénéation électrophile par le *N*-chlorosuccinimide en milieu acide sulfurique concentré a été décrite dans le cas de la 2-méthyl-8-hydroxyquinoléine et permet d'introduire efficacement l'atome d'halogène en position 5 (Gershon and McNeil, 1972).

Nous avons donc appliqué la réaction d'halogénéation électrophile décrite par Gershon *et al.* aux composés bisquinoléine **3** et **6**. La réaction conduit aux produits dihalogénés (en position 5 de chaque noyau quinoléine) avec de très bons rendements (Schéma 7).

Schéma 7. Chloration de **3** et **6** en position 5.

Substituant méthoxy en position 7 :

Nous avons également cherché à introduire un groupement méthoxy en position 7 du noyau 8-hydroxyquinoléine, afin de former le motif 2-méthoxyphénol classique en chimie thérapeutique.

Ce type de fonction ne peut être introduit directement et une méthode classique de préparation consiste à utiliser un précurseur halogéné qui est ensuite transformé en méthoxy par substitution nucléophile avec du méthanolate de sodium. Cependant, la position 7 est moins réactive que la position 5 et l'halogénéation électrophile utilisée précédemment ne peut être appliquée ici. Une méthode décrite par Pearson *et al.* permet de favoriser la bromation en *ortho* du phénol par l'utilisation du *N*-bromosuccinimide à basse température (-70 °C) en présence d'une base forte (une amine aliphatique) qui piège l'acide libéré lors de la réaction (Pearson *et al.*, 1967).

Une difficulté supplémentaire apparaît alors : l'utilisation de bases lors de ce schéma de synthèse empêche son application directe au composé **3** qui s'oxyde en conditions basiques (Schéma 5). L'introduction du groupement méthoxy devra donc être réalisée sur le précurseur monomérique 8-hydroxyquinoléine.

Cette synthèse est décrite sur les schémas 8 et 9 et a été mise au point au laboratoire par Christophe Boldron.

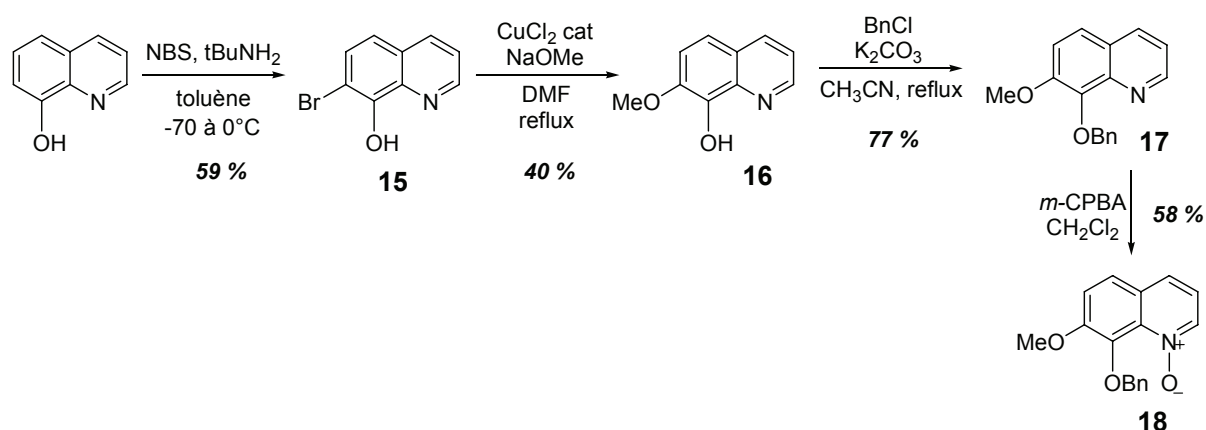


Schéma 8. Synthèse du composé **18**.

La réaction du *N*-bromosuccinimide sur la 8-hydroxyquinoléine en présence de *tert*-butylamine conduit à la bromation en *ortho* du -OH phénolique (Collis *et al.*, 2003; Pearson *et al.*, 1967). Une réaction de substitution nucléophile du brome par le méthanolate de sodium, en présence de sels de Cu^{II} catalysant la réaction, permet d'introduire le groupement méthoxy en position 7 (Numazawa and Ogura, 1983).

L'étape suivante va consister en la formation du dérivé *N*-oxyde précurseur de la réaction de couplage selon le protocole de Yamamoto *et al.* qui avait permis la synthèse de **3** (Yamamoto *et al.*, 1978). Cependant, l'oxydation de **16** en dérivé *N*-oxyde par l'acide *m*-chloroperbenzoïque a échoué et une étape de protection de la fonction hydroxyle de **16**

est nécessaire. Le groupement protecteur choisi est le groupement benzyle, qui pourra être déprotégé en milieu acide lors de l'étape d'hydrolyse des esters et de décarboxylation sur le dérivé bisquinoléine formé. Une réaction de substitution nucléophile du -OH phénolique sur le chlorure de benzyle en présence d'une base (K_2CO_3) conduit au composé **17**. L'oxydation de ce dernier par l'acide *m*-chloroperbenzoïque permet d'obtenir le dérivé *N*-oxyde **18** correspondant (Schrader *et al.*, 1988).

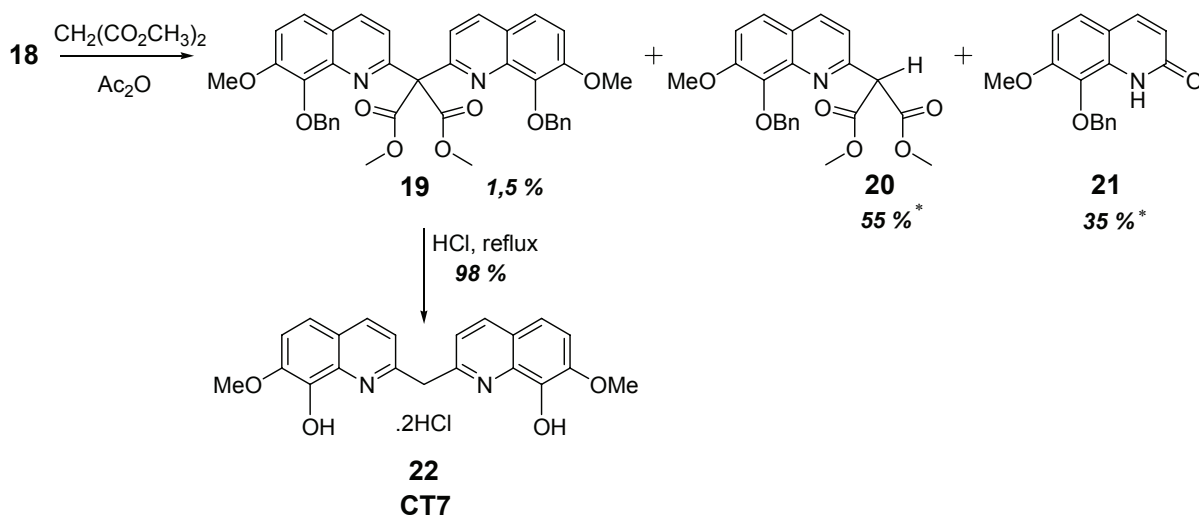


Schéma 9. Synthèse du composé **22** à partir de **18**. Les rendements portant la mention * sont des rendements estimés à partir de spectres RMN 1H réalisés sur le brut de synthèse.

La réaction de **18** sur le diméthylmalonate en solvant anhydride acétique a permis d'obtenir le dimère **19** (Schéma 9) (Yamamoto *et al.*, 1978). Néanmoins, le rendement de formation de ce dernier est très faible (autour de 10 %) et le produit majoritairement formé **20** correspond à l'intermédiaire pour lequel une seule quinoléine activée a réagi avec le diméthylmalonate. Une hypothèse pour expliquer l'arrêt de la réaction au niveau du produit de monocouplage **20** est l'encombrement stérique apporté par le groupement benzyloxy. Par ailleurs, des difficultés de purification de **19** viennent encore diminuer le rendement de la réaction.

Des cristaux de **19** ont été obtenus au cours de la synthèse et ont été analysés par diffraction aux rayons X. La structure obtenue (Fig. 7) permet de confirmer la position des substituants méthoxy en *ortho* des phénols.

Enfin, un chauffage de **19** au reflux de l'acide chlorhydrique concentré permet en une étape de déprotéger les fonctions hydroxyles des quinoléine, d'hydrolyser les esters de méthyle sur le bras de jonction et de décarboxyler les acides libérés pour donner **22**.

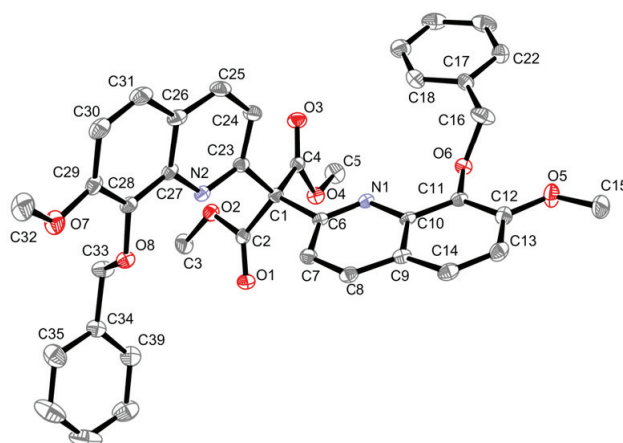


Fig. 7. Structure cristalline de **19** (réalisée par le Dr Laure Vendier).

III.1.1.3 Dérivés de la 8-aminoquinoléine

L'analogue de **4** pour lequel les fonctions hydroxyles sont remplacées par des fonctions amine est un composé présentant un intérêt majeur pour l'étude de la chélation et devrait présenter une sélectivité forte pour le Cu^{II} .

Nous avons tenté de le préparer selon le schéma de couplage utilisé dans la série 8-hydroxyquinoléine (Yamamoto *et al.*, 1978).

Plusieurs possibilités sont envisageables pour la nature du précurseur *N*-oxyde : il peut porter en position 8 un groupement nitro, qui peut être réduit en amine par hydrogénation catalytique en fin de synthèse, ou des fonctions amine ou amine protégée.

L'oxydation de l'azote en position 1 de la 8-nitroquinoléine par l'acide *m*-chloroperbenzoïque (Schrader *et al.*, 1988) a été tentée dans un premier temps. L'emploi d'un précurseur nitré nous a semblé préférable à celui d'un précurseur possédant une fonction amine potentiellement oxydable dans les conditions réactionnelles employées. Toutefois, en présence d'un équivalent d'acide *m*-chloroperbenzoïque à 0 °C, la 8-nitroquinoléine a été oxydée sur le cycle aromatique et le produit attendu n'a pu être isolé.

La préparation du dérivé *N*-oxyde en position 1 a alors été tentée dans le cas de la 8-aminoquinoléine, en espérant que l'oxydation de la fonction pyridine serait peut-être favorisée par rapport à celle de l'amine primaire de la molécule. Mais la fonction amine a été oxydée en premier et un mélange de produits a été observé en fin de réaction, traduisant des réactions d'oxydation supplémentaires sur le cycle (Schéma 10).

Nous avons donc protégé l'amine de la 8-aminoquinoléine sous la forme d'un carbamate d'éthyle, qui est un groupement facile à introduire et qui est stable dans les conditions réactionnelles utilisées pour l'oxydation (Watkins, 1952). Le composé **23** obtenu a pu être oxydé en position 1 par un équivalent d'acide *m*-chloroperbenzoïque. L'étape suivante a consisté en la déprotection sélective du carbamate sans réduction du *N*-oxyde. Celle-ci a échoué en milieu acide (HBr concentré) en raison de la réduction de la fonction *N*-oxyde et de l'incorporation de brome sur le noyau aromatique. Elle a par contre pu être réalisée en milieu basique (KOH, EtOH) (Treus *et al.*, 2000) pour donner le dérivé *N*-oxyde **25**.

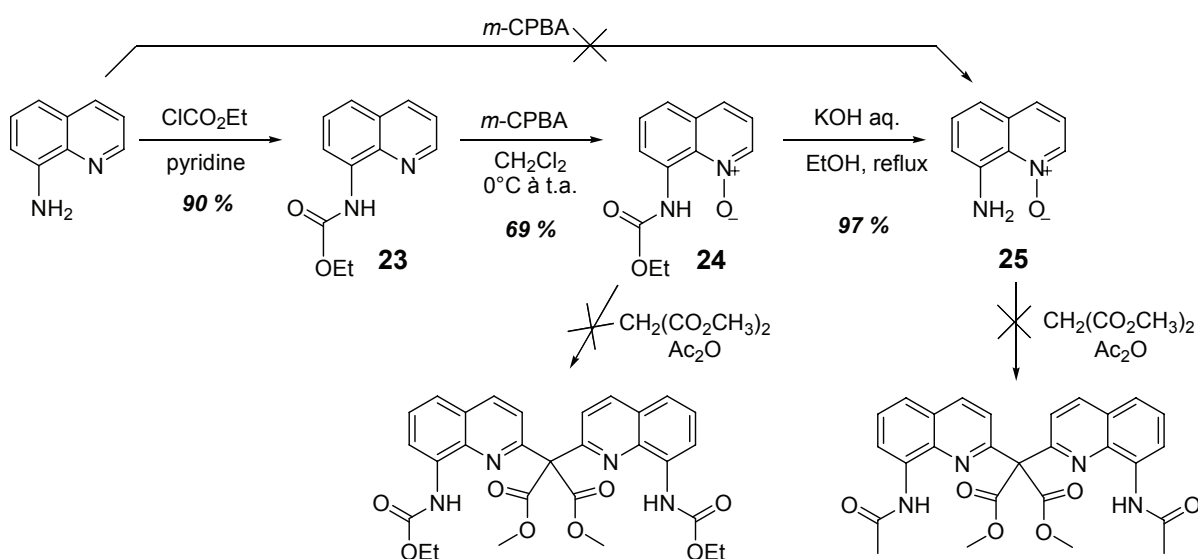
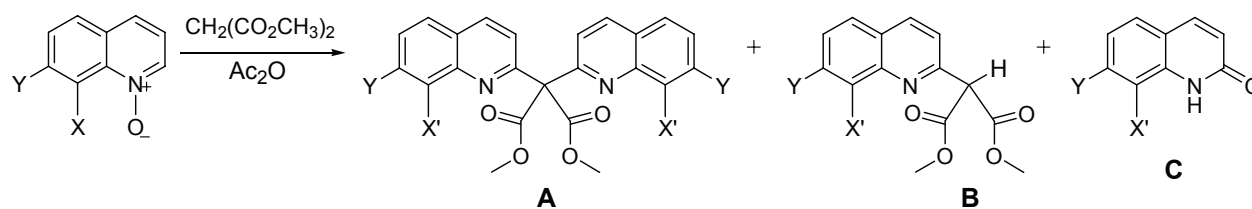


Schéma 10. Tentative de synthèse d'analogues de **3** dans la série 8-aminoquinoléine.

La réaction de couplage avec le diméthylmalonate selon le protocole de Yamamoto *et al.* a alors été tentée sur les *N*-oxydes **24** et **25**. Cependant, la réaction n'a pas conduit aux produits attendus. Seuls les composés de type lactame (Schéma 11), issus de la réaction du *N*-oxyde sur l'anion acétate provenant de l'anhydride acétique (Schéma 1, voie ii), ont été isolés. La disparition du H2 et le fort blindage des signaux de H3 et H4 en RMN ^1H par rapport au produit de départ, ainsi que l'apparition d'un pic correspondant au C=O en position C2 vers 165 ppm en RMN ^{13}C nous ont permis d'identifier les lactames **C**. L'intégration sur les spectres RMN ^1H des signaux correspondant aux méthyles et aux aromatiques a permis de mettre en évidence la présence des composés **A** et **B** en très faibles proportions.



N-oxyde	X	Y	X'	A, %	B, %	C, %
8-hydroxyquinoléine-N-oxyde	OH	H	OAc	1 , 66 % ^a	n.d.	2 , 25 % ^b
18	OBn	OMe	OBn	19 , 1,5 % ^a	20 , 55 % ^b	21 , 35 % ^b
24	NHCO ₂ Et	H	NHCO ₂ Et	< 5 % ^b	< 5 % ^b	26 , > 90 % ^b
25	NH ₂	H	NHAc	< 5 % ^b	< 5 % ^b	27 , > 85 % ^b

Schéma 11. Tentative de synthèse d'un analogue de **3** dans la série 8-aminoquinoléine. Description du produit attendu et des sous-produits majoritaires formés.

(a) Rendement en produit pur isolé. (b). Rendement calculé d'après un spectre RMN réalisé sur le brut de synthèse. n.d. non déterminé.

Afin de favoriser la voie i du Schéma 1, une baisse de la température en début de réaction et l'utilisation d'un excès de diméthylmalonate pour entrer en compétition avec l'anhydride acétique ont été tentées, mais sans amélioration du rendement.

Alors que dans le cas de **18** la faible réactivité pouvait être expliquée par une gêne stérique apportée par les groupements benzyle, cet argument ne peut être utilisé ici puisque les dérivés **24** et **25** (comportant des résidus carbamate d'éthyle et amine libre en position 8 respectivement) ont le même type de réactivité. Il semble donc que la présence d'un atome d'azote en position 8 empêche la réaction selon la voie i du schéma 1.

Devant ces échecs, nous avons tenté de former le lien CH₂ par une autre voie de synthèse consistant en une réaction de substitution nucléophile d'un chlore porté en position 2 de la quinoléine par un anion méthylure (Schéma 12).

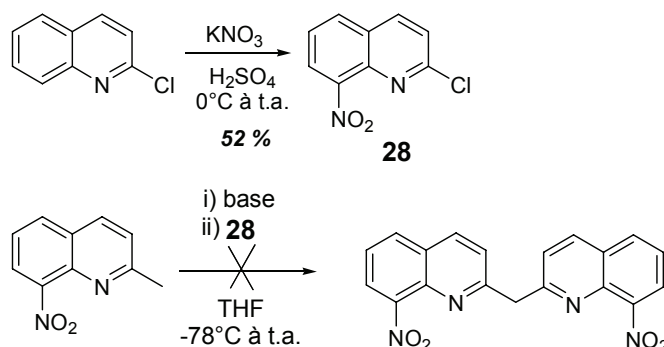


Schéma 12. Tentatives de synthèse d'un analogue de **3** dans la série 8-aminoquinoléine par substitution nucléophile.

La réaction a été menée sur des composés substitués en position 8 par une fonction nitro, la nucléophilie des fonctions amine nous ayant paru rédhibitoire pour réaliser cette réaction à partir de la 8-aminoquinoléine.

Le composé **28** a été préparé par nitration de la 2-chloroquinoléine, selon le protocole décrit par Kimber *et al.* (Schéma 12) (Kimber *et al.*, 2003). L'utilisation de KNO₃ en milieu H₂SO₄ conduit à un mélange de régioisomères, le composé majoritaire étant le produit **28** attendu, substitué en position 8. Cette position a pu être confirmée par la structure aux rayons X de cristaux de ce composé (Fig. 8).

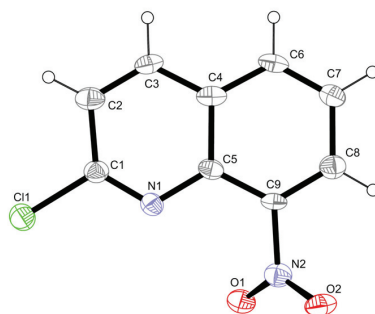


Fig. 8. Structure cristalline de **28** (réalisée par le Dr Laure Vendier).

Des réactions de couplage entre la 2-méthyl-8-nitroquinoléine et la 2-chloro-8-nitroquinoléine ont alors été tentées en présence de LDA ou de butyllithium (utilisés comme base pour générer l'anion méthylure), selon un protocole décrit pour former un lien méthylène entre deux pyridines (Mohr *et al.*, 2005). Les produits de départ ont malheureusement été retrouvés de façon majoritaire en fin de synthèse, ainsi qu'un produit alkylé en position 2 par une chaîne butyle. Ce dernier résulte probablement de l'attaque du butyllithium sur le chlore aromatique de **28**.

Ces essais ayant échoué, les tentatives de synthèse de l'analogue de **3** en série 8-aminoquinoléine ont été abandonnées.

III.1.2 Bras à deux unités carbonées (bras C₂)

Nous nous sommes ensuite intéressés à la synthèse de dérivés bisquinoléine présentant un bras alkyle plus long, à deux atomes de carbone (bras C₂).

Plusieurs méthodes de synthèse sont décrites dans la littérature dans le cas de deux entités 8-hydroxyquinoléine reliées par un bras éthyle.

Une première voie de synthèse décrite par Albrecht *et al.* fait intervenir comme étape clé un homo-couplage d'un dérivé bromure benzylique catalysé au Ni^{II} (Schéma 13) (Albrecht *et al.*, 1999). Cependant, les rendements de préparation du dérivé bromure benzylique (par bromation radicalaire) et de couplage sont relativement faibles.

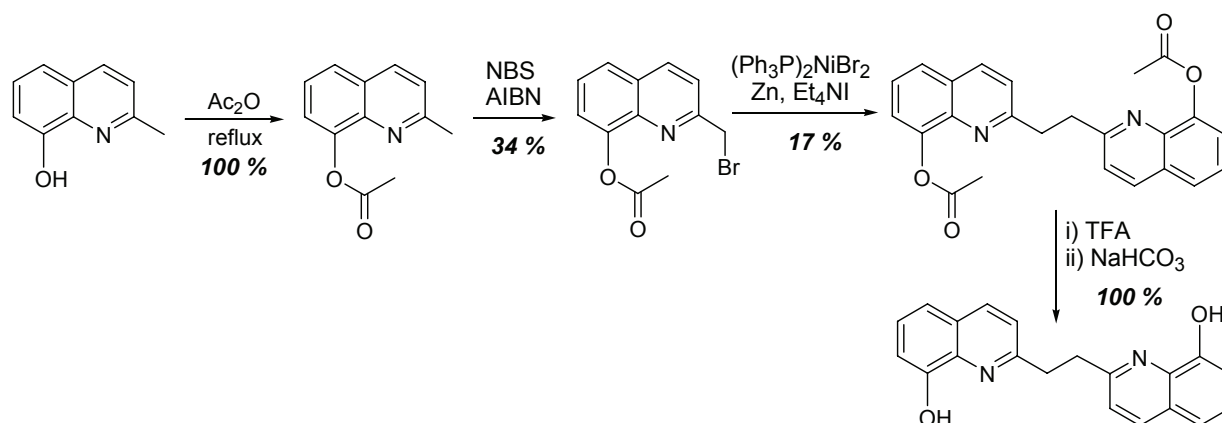


Schéma 13. Préparation de la 2,2'-(1,2-Éthanediy)-bis(8-hydroxyquinoléine) selon Albrecht *et al.*, 1999.

Un autre schéma de synthèse a été proposé par Kitamura *et al.* et fait intervenir un carbanion sur le bras méthyle en position 2 de la quinoléine **9**, généré en présence de LDA à 0 °C (Schéma 14) (Kitamura *et al.*, 2000).

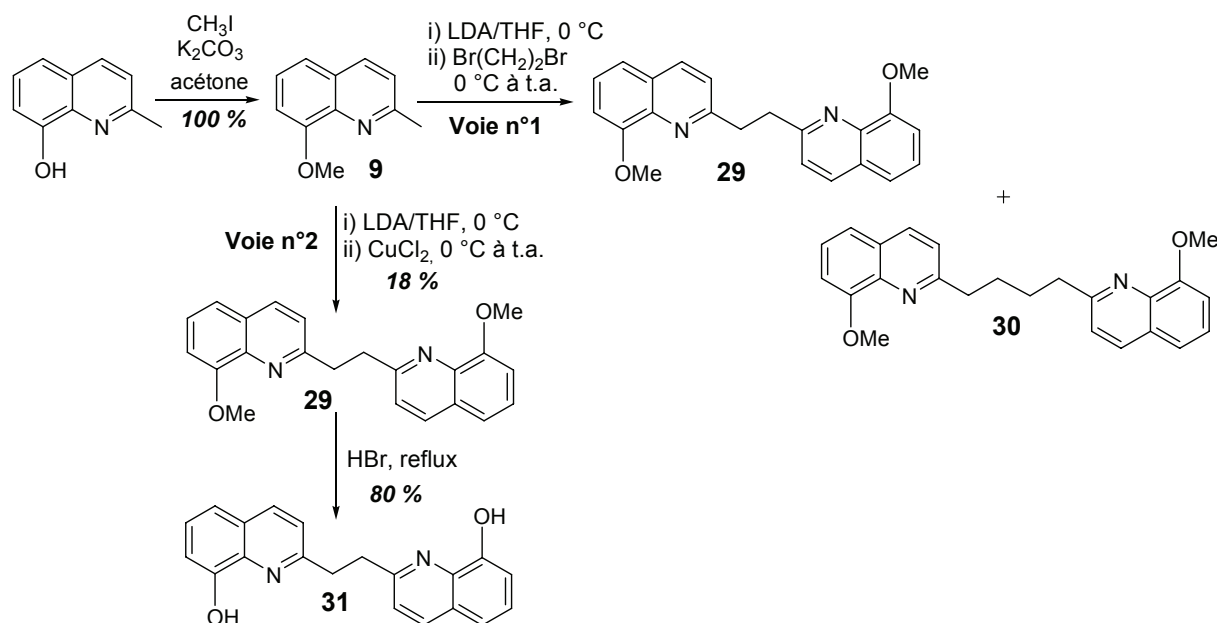


Schéma 14. Préparation de la 2,2'-(1,2-éthanediy)-bis(8-hydroxyquinoléine) selon Kitamura *et al.*, 2000.

Deux voies sont alors décrites par Kitamura *et al.* :

- Dans la voie n°1, cet anion méthylure est oxydé en radical méthyle en présence d'un électrophile : le 1,2-dibromoéthane. Une réaction d'homo-couplage radicalaire conduit alors au dérivé **29**, tandis que la réaction du radical méthyle sur le 1,2-dibromoéthane conduit au composé **30**.
- Dans la voie n° 2, l'anion méthylure est oxydé en radical méthyle par un sel de Cu^{II} puis une réaction d'homo-couplage donne **29** avec un rendement de 18 %.

Devant les faibles rendements obtenus pour ces diverses synthèses, nous avons tenté de développer une troisième voie, à partir d'un protocole décrit pour des bipyridines (Garber *et al.*, 1990) et qui diffère de la voie n° 1 de Kitamura *et al.* par les températures beaucoup plus basses lors de l'addition du LDA et du 1,2-dibromoéthane (Schéma 15).

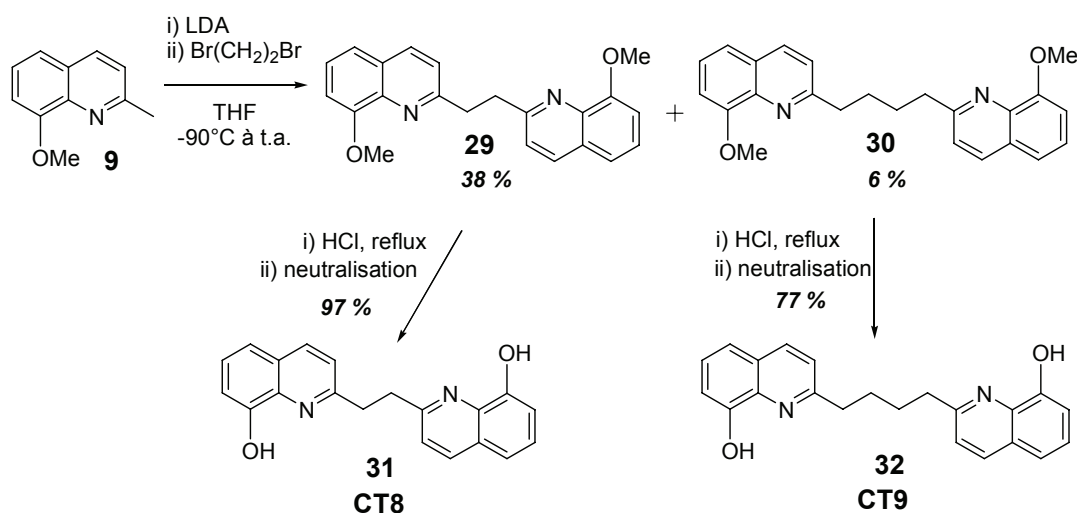


Schéma 15. Synthèse des composés **31** (voie A) et **32** à partir de la 2-méthyl-8-méthoxyquinoléine.

Dans ce schéma de synthèse, la fonction -OH phénolique de la 2-méthyl-8-hydroxyquinoléine est protégée sous forme de méthoxy, groupement stable en milieu basique. L'ajout de LDA à -90°C permet de générer l'anion méthylure de lithium et l'addition de 1,2-dibromoéthane comme accepteur d'électron conduit à la formation de **29** et de **30**. Alors que Kitamura *et al.* n'avaient pu les séparer par chromatographie (Kitamura *et al.*, 2000), une séparation par cristallisation sélective du dérivé **29** dans le méthanol a permis d'isoler les deux produits. Il est probable que cette cristallisation sélective soit due à la plus grande rigidité de **29** par rapport à **30** qui lui permet une meilleure pré-organisation dans le solvant de cristallisation. Les composés **29** et **30** ont enfin été déprotégés par hydrolyse acide des fonctions méthoxy pour donner **31** et **32**.

Ainsi, l'optimisation de la synthèse et de la purification a permis d'obtenir **31** avec un rendement nettement amélioré par rapport aux synthèses décrites précédemment.

Il est à noter que la stratégie utilisée ici pour l'obtention de **32** est peu efficace puisqu'il n'est formé qu'en tant que sous-produit de synthèse. Toutefois, les quantités obtenues sont suffisantes pour une évaluation préliminaire de ce composé. Celle-ci permettra d'étudier, par comparaison avec les résultats obtenus pour **4** et **31**, l'influence de la longueur du bras de jonction en position 2 du noyau 8-hydroxyquinoléine sur l'activité anti-Alzheimer potentielle de ces dérivés.

Par la suite, une démarche d'optimisation de cette voie de synthèse a permis de montrer que l'étape de protection de la fonction phénol de la 2-méthyl-8-hydroxyquinoléine n'était pas nécessaire. Le composé **31** a ainsi pu être préparé en une étape à partir de la 2-méthyl-8-hydroxyquinoléine non protégée, avec un rendement amélioré. Dans ce cas, 2 équivalents de LDA sont nécessaires, le premier équivalent réagissant sur les fonctions phénol en position 8 (Schéma 16).

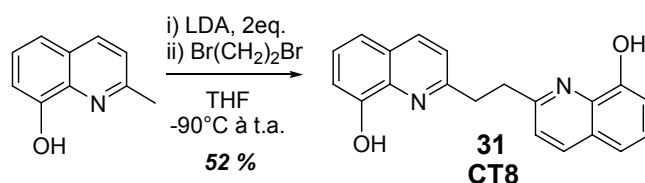


Schéma 16. Synthèse du composé **31** à partir de la 2-méthyl-8-hydroxyquinoléine (voie B).

D'autre part, un protocole inspiré de la voie n° 2 du schéma 14 et mettant en œuvre un ajout rapide de LDA sur **9** et l'emploi de CuCl₂ comme agent oxydant a permis d'obtenir le trimère **33** (Schéma 17). L'hydrolyse acide des fonctions méthoxy a conduit au composé **34**, qui sera testé pour étudier l'influence du nombre de noyaux quinoléine.

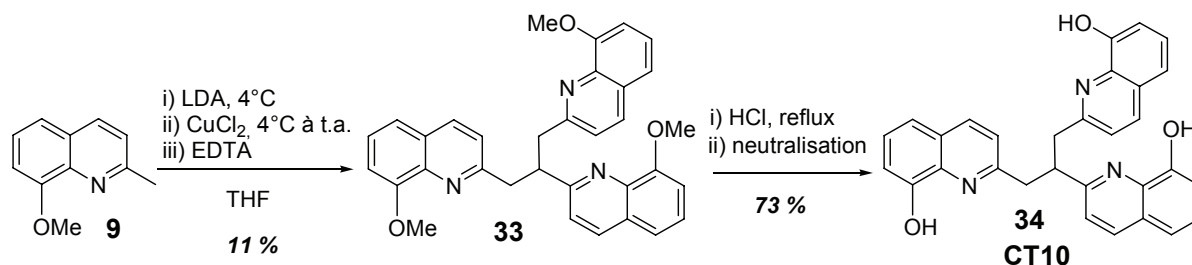


Schéma 17. Synthèse du composé **34**.

III.1.2.1 Substitutions du noyau quinoléine en positions 5 et 7

Comme dans le cas des polyquinoléine incluant un bras C₁, nous nous sommes intéressés à l'introduction de substituants sur les positions 5 et 7 du noyau quinoléine des dérivés comportant le bras C₂.

Chloration et iodation en positions 5 et 7, respectivement :

Par homologie avec le clioquinol, nous avons choisi de substituer le composé **31** par des atomes de chlore en position 5 et d'iode en position 7. La position 5 étant la plus réactive, elle sera substituée en premier.

La méthode de chloration utilisée pour la synthèse de **13** et **14** a été appliquée à **31** pour conduire au composé **35** dichloré en *para* des fonctions phénol (Schéma 18). La position de l'halogène a été confirmée par l'attribution complète des signaux RMN ¹H et ¹³C par des expériences de NOE 1D et de HMQC ¹H/¹³C, et notamment par la mise en évidence d'un couplage ³J entre le H4 et le C5 quaternaire. En effet, si la chloration s'était faite sur le carbone C7, qui est l'autre position envisageable pour cette réaction, le carbone C5 aurait été un carbone tertiaire.

Les positions 5 les plus réactives étant substituées, il est alors envisageable d'introduire un groupement en position 7 par une réaction du même type. Ainsi, une réaction de substitution électrophile en milieu acide en présence de *N*-iodosuccinimide a conduit au dérivé **36** diiodé (Gershon and McNeil, 1972).

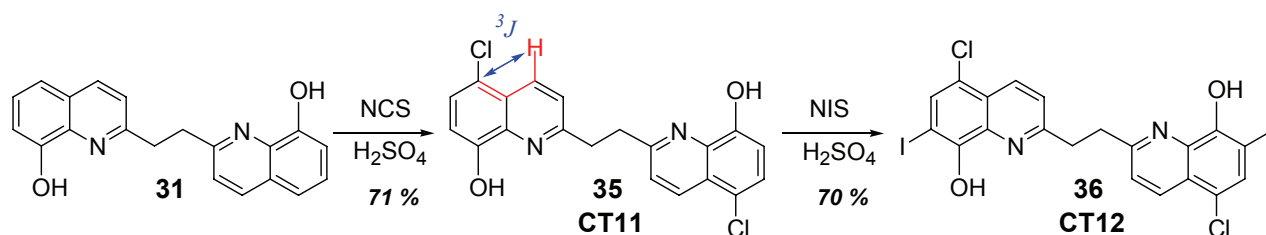


Schéma 18. Chloration et iodation régiosélectives du ligand **31**. Le couplage ³J ayant permis l'attribution de la position de chloration est indiqué sur le composé **35**.

Substituant méthoxy en position 7 :

Comme dans le cas des dérivés incluant le bras C₁, l'introduction d'un groupement méthoxy en position 7 a également été menée pour celui comportant le bras C₂. Elle a été

réalisée à partir du dérivé monomérique 2-méthyl-8-hydroxyquinoléine, selon un protocole mis au point au laboratoire par Christophe Boldron, qui reprend le même schéma réactionnel que dans le cas de **16**.

La réaction du *N*-bromosuccinimide sur la 2-méthyl-8-hydroxyquinoléine en présence de *tert*-butylamine conduit à la bromation en *ortho* de la fonction hydroxyle du cycle phénol (Schéma 19) (Collis *et al.*, 2003; Pearson *et al.*, 1967). Une réaction de substitution nucléophile du brome par le méthanolate de sodium, en présence de sels de Cu^{II} pour catalyser la réaction, permet d'introduire le groupement méthoxy en position 7 (Numazawa and Ogura, 1983). L'homo-couplage de **38** en présence de LDA et de 1,2-dibromoéthane a ensuite été réalisé sans protection du OH phénolique, comme lors de la voie B de synthèse de **31** (Schéma 16), pour conduire au dérivé **39**.

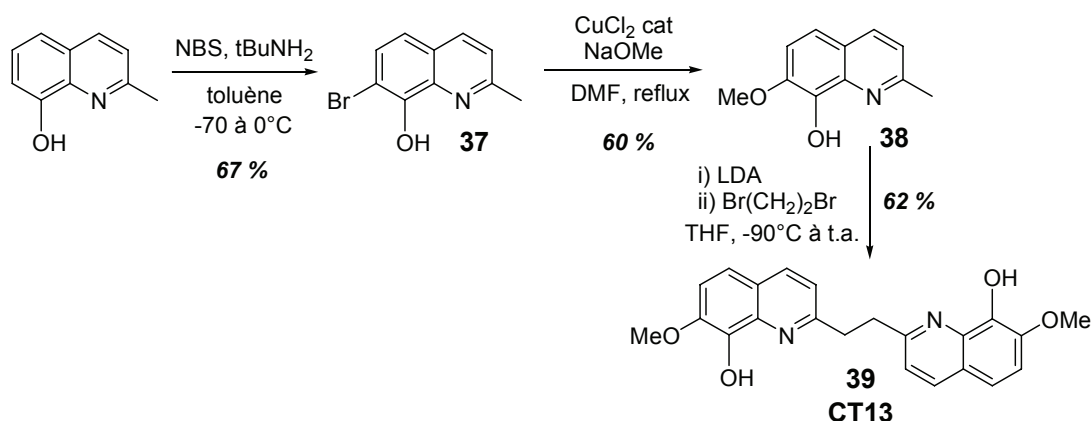


Schéma 19. Obtention du composé **39** à partir de la 2-méthyl-8-hydroxyquinoléine.

III.1.2.2 Dérivés de la 8-aminoquinoléine

L'analogue de **31** pour lequel les fonctions hydroxyles sont remplacées par des fonctions amines est un composé présentant un intérêt majeur pour l'étude de la chélation. Nous avons donc tenté d'appliquer le schéma de synthèse défini pour les dérivés 8-hydroxyquinoléine incluant le bras C₂ à leurs analogues en série 8-aminoquinoléine.

Plusieurs précurseurs ont été testés pour ce couplage. Le seul composé 2-méthylquinoléine commercial portant un azote en position 8 est la 2-méthyl-8-nitroquinoléine. Celui-ci peut être réduit en amine primaire par hydrogénation catalytique sur Pd/C (composé **40**) (Belser *et al.*, 1996; Fahrni and O'Halloran, 1999; Xue *et al.*, 2001).

Le composé **40** (Schéma 20) a dans un premier temps été utilisé sans protection de sa fonction amine primaire. Il a été mis en réaction en présence de LDA (2 ou 3 équivalents par rapport à **40**) et de 1,2-dibromoéthane, selon la voie B de synthèse de **31** (Schéma 16). Dans ces conditions, le produit attendu n'a pu être formé et le produit de départ est retrouvé très majoritairement en fin de réaction. Cette observation semble indiquer que l'anion méthylure est très peu réactif. Les composés **41** et **42** ont néanmoins pu être isolés en faibles pourcentages. Pour expliquer la formation de ces produits, il faut envisager que le LDA déprotone la fonction amine de la 2-méthyl-8-aminoquinoléine. Les amidures de lithium formés sur ce composé sont nucléophiles (alors que les phénolates ne l'étaient pas dans le cas de la 2-méthyl-8-hydroxyquinoléine, ce qui a permis d'obtenir le composé **31** dans les mêmes conditions). Deux réactions successives de substitution nucléophile de ces anions sur le 1,2-dibromoéthane conduisent alors à la formation des composés **41** et **42** suivant que la seconde réaction est inter- ou intramoléculaire.

Le composé **41** présente une structure bisquinoléine avec un bras de jonction en position 8, entre deux amines potentiellement chélatantes des ions métalliques. Il a donc été inclus dans nos tests de recherche de ligands polyquinoléine potentiellement actifs sur le peptide β -amyloïde en présence d'ions métalliques.

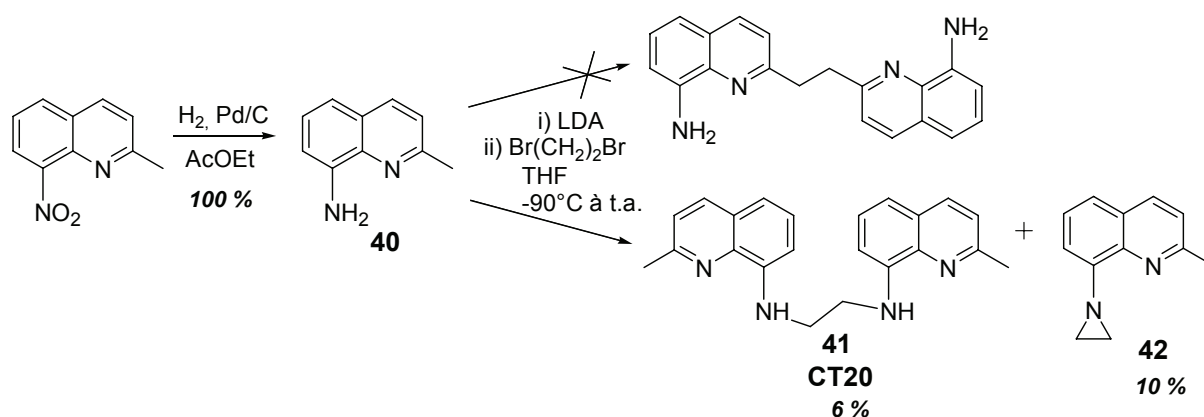


Schéma 20. Tentative de synthèse d'un analogue de **31** dans la série 8-aminoquinoléine.

Nous avons alors tenté de réduire le caractère nucléophile des amidures formés en cours de synthèse en convertissant l'amine primaire de **40** sous la forme d'une amine secondaire moins réactive et stable dans les conditions basiques de la réaction. Notre choix s'est porté vers la préparation d'un dérivé méthylamine peu encombrant et qui conserve une fonction susceptible d'être déprotonée en présence d'un ion métallique pour favoriser la complexation. Ce dérivé **43** a été préparé par réaction de substitution

nucléophile de l'amine primaire du composé **40** sur l'iodure de méthyle, en présence d'une base (NaH) (Schéma 21). L'addition de 1 ou 2 équivalents de LDA à une solution de **43** puis l'ajout de 1,2-dibromoéthane n'ont malheureusement pas permis d'obtenir le produit d'homo-couplage attendu et le produit retrouvé très majoritairement en fin de synthèse est le réactif **43**.

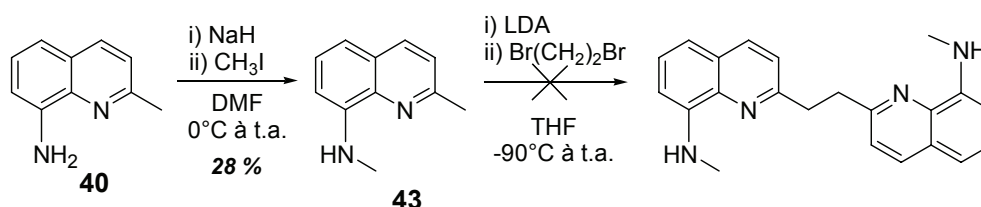


Schéma 21. Essai de synthèse d'un analogue de **31** dans la série *N*-méthyl-8-aminoquinoléine.

Enfin, nous avons utilisé la 2-méthyl-8-nitroquinoléine comme précurseur pour cette réaction de couplage (Schéma 22), une réactivité différente des cas précédents pouvant être attendue du fait des groupements nitro électroattracteurs sur le noyau quinoléine (effet mésomère attracteur) alors que les amines possèdent un caractère électrodonneur (par effet mésomère).

De nouveau, une très faible réactivité a été observée et le produit majoritaire est le réactif 2-méthyl-8-nitroquinoléine. Des variations de concentrations ou de stœchiométries des réactifs, ou de la température de réaction n'ont pas conduit à une amélioration de la conversion. La faible réactivité observée peut s'expliquer par le caractère électroattracteur du groupement nitro qui défavorise la réaction de transfert d'un électron de l'ion méthylure formé en présence de LDA vers le 1,2-dibromoéthane accepteur d'électron, et par la très faible solubilité de ce carbanion dans le solvant de la réaction (tétrahydrofurane).

Toutefois, la présence d'un singulet à 3,67 ppm (analogue à celui observé pour les protons éthyléniques de **31**) sur le spectre RMN ^1H (CDCl_3) du milieu réactionnel et l'observation d'un pic de masse de $m/z = 375$ pouvant correspondre au dimère attendu semblent indiquer que ce dernier a été formé avec un rendement de l'ordre de 10 %. Malheureusement, ce produit n'a pu être isolé à la suite de sa dégradation sur la colonne de silice employée pour le purifier.

Nous avons alors tenté de réduire ce produit (présent à 50 % dans des fractions chromatographiques enrichies) par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon, en espérant que le produit réduit serait plus stable ou plus facile à purifier.

Des données analytiques obtenues à l'issue de cette étape de réduction sembleraient indiquer la présence du produit attendu (singulet à 3,75 ppm sur le spectre RMN ^1H (CD_3OD) du milieu réactionnel et pic de masse de $m/z = 315$ correspondant au dimère réduit (MH^+). Cependant, les produits formés sont également instables et se sont décomposés sur la colonne de phase inverse C18 utilisée en vue de leur purification.

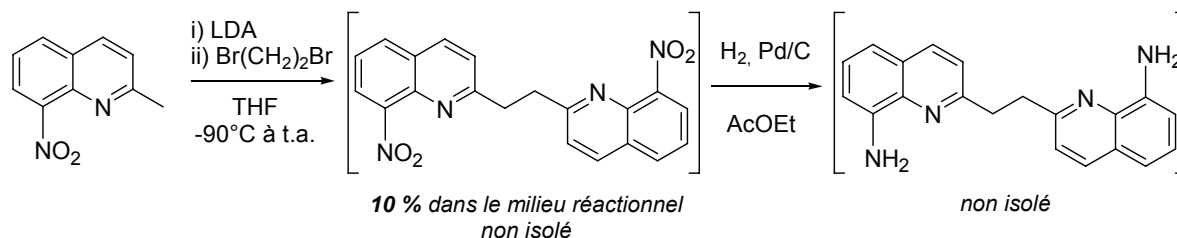


Schéma 22. Tentative de synthèse d'un analogue de **31** dans la série 8-aminoquinoléine à partir de la 2-méthyl-8-nitroquinoléine.

Devant l'échec de ces synthèses, les tentatives de préparation de l'analogue de **23** en série 8-aminoquinoléine ont été abandonnées.

III.2 Bras de jonction en position 2 comportant un hétéroatome

III.2.1 Bras amine

Afin d'étudier des dimères substitués en position 8 par une fonction amine, qui n'ont pu être obtenus dans les séries "bras C_1 " et "bras C_2 ", nous avons tenté de synthétiser un ligand bis-8-aminoquinoléine selon une voie de synthèse différente de celles utilisées précédemment. Pour cela, un bras de nature non alkyle a été envisagé. Notons qu'un dimère de quinoléine commercial, le composé **CT15** (Fig. 9) possède ce type de jonction aminée. Nous nous sommes donc intéressés à la synthèse de dérivés basés sur ce modèle et substitués en position 8 par une fonction amine.

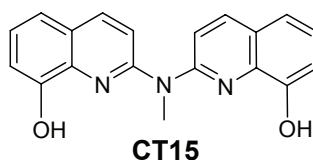


Fig. 9. Structure de **CT15**.

Le schéma réactionnel et le protocole de couplage mis en œuvre sont inspirés d'une synthèse décrite par Barnham *et al.* pour un dérivé de 8-hydroxyquinoléine comportant en position 2 une amine disubstituée (Barnham *et al.*, 2004).

Le réactif de départ est la 2-chloro-8-nitroquinoléine **28**, dont la synthèse par nitration a été décrite plus haut (Schéma 12). Une réaction de substitution nucléophile du chlore par la butylamine utilisée comme solvant conduit au dérivé **44** (Schéma 23). La butylamine a été préférée à la méthylamine utilisée pour le composé **CT15** car cette dernière est gazeuse et donc peu facile à manipuler. L'incorporation de butylamine permet également d'apporter une chaîne alkyle longue susceptible d'apporter de l'hydrophobicité au composé final. Une réaction de *N*-arylation entre l'amine **44** et le dérivé chloré **28**, catalysée par du Pd⁰ en présence de ligands *rac*-BINAP et d'une base, le *tert*-butylate de sodium, conduit au dimère **45** (Barnham *et al.*, 2004). Les fonctions nitro de ce composé sont ensuite réduites en amine par hydrogénation catalytique en présence de Pd/C (Fahrni and O'Halloran, 1999).

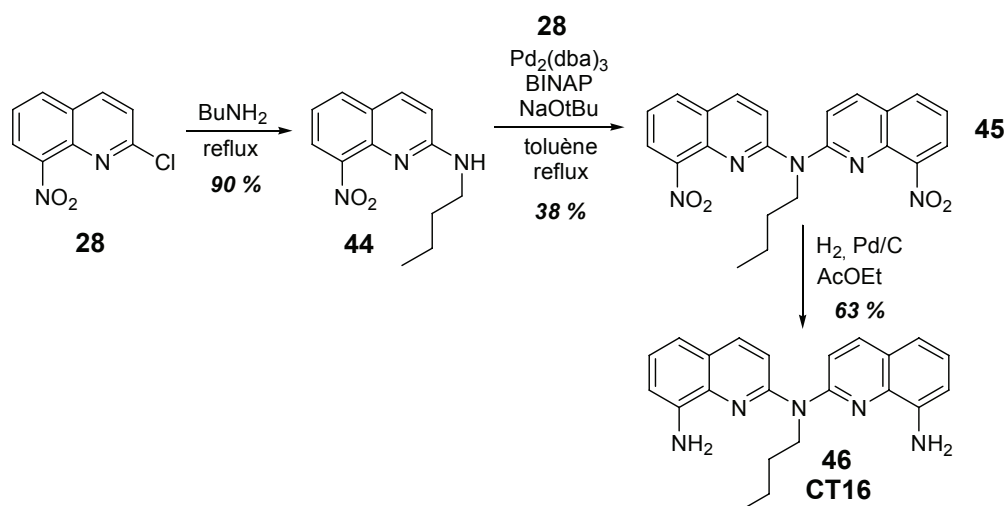


Schéma 23. Synthèse des composés **45** et **46**.

Le composé 46 est, à notre connaissance, le premier exemple de composé bisquinoléine relié en position 2 et substitué en position 8 par des fonctions amines.

Nous avons également cherché à synthétiser, selon la même approche, un ligand bisquinoléine possédant un bras de jonction aminé plus long de type -CH₂-NBu-CH₂-.

Un protocole décrit par Xue *et al.* pour la préparation d'éthers couronne substitués par le même type de dérivés de 8-nitroquinoléine (Schéma 24) nous a permis d'en établir le protocole de synthèse (Xue *et al.*, 2001).

Dans ce schéma réactionnel de Xue *et al.*, la 2-méthyl-8-nitroquinoléine est bromée sur le bras méthyle par bromation radicalaire en présence de *N*-bromosuccinimide. Le dérivé bromé en position benzylique subit alors une réaction de substitution nucléophile par les fonctions amine d'un diaza-éther-couronne en présence d'une base (triéthylamine). Enfin, les fonctions nitro du ligand sont réduites par du Fe^0 en milieu acétique. Cette réduction se fait toutefois avec un faible rendement qui a été attribué par Xue *et al.* à la chélation du fer par l'éther couronne.

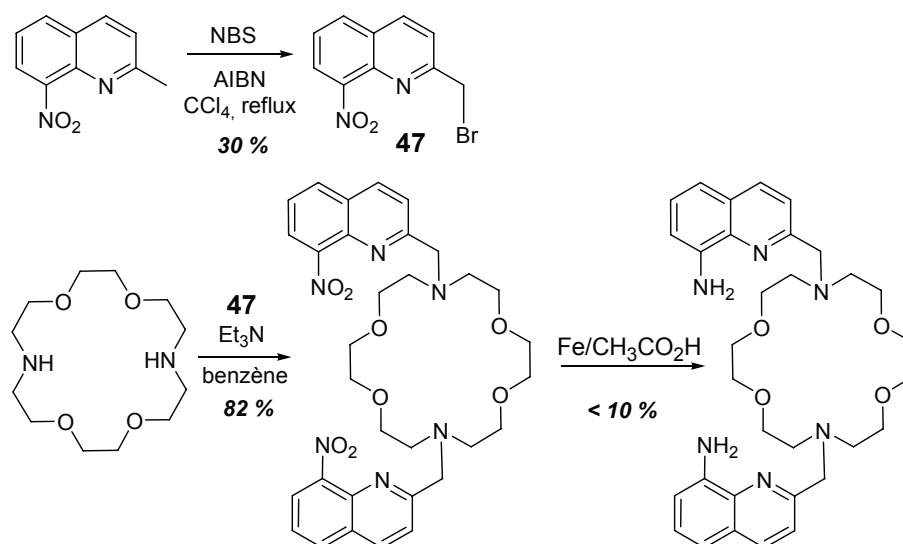


Schéma 24. Schéma de synthèse proposé par Xue *et al.*, 2001.

Nous avons donc adapté ce schéma à la synthèse de dimère de quinoléine reliés par un bras $-\text{CH}_2\text{-NBu-CH}_2-$, l'absence d'éther couronne, dans notre cas, devant empêcher le problème de réduction rencontré par Xue *et al.*.

La 2-méthyl-8-nitroquinoléine a été bromée sur le bras méthyle par la *N*-bromosuccinimide en présence d'azobisisobutyronitrile, *via* un mécanisme radicalaire (Schéma 25). Deux réactions successives de substitution nucléophile du brome porté par le dérivé 47 (2,2 équivalents) par la butylamine, en présence de triéthylamine, donnent le dérivé 48 en une étape. Cependant ce produit, dont le rendement de formation a été estimé à 90 % environ d'après l'analyse du spectre RMN ^1H du brut réactionnel, n'a pas

pu être isolé. Il s'est en effet décomposé sur colonne chromatographique de gel de silice pour libérer **49** et **50** selon une réaction de *N*-désalkylation.

Nous avons alors décidé de réduire les fonctions nitro de **48** et de réaliser la purification sur le produit réduit. Toutefois, l'hydrogénation catalytique sur Pd/C n'a pas permis d'obtenir le composé attendu. Xue *et al.* avaient rencontré un problème similaire lors de la réduction de leur composé par Fe/CH₃CO₂H et avaient expliqué ce manque de réactivité par la complexation du fer par le diaza-éther couronne (Schéma 24). Nous avons attribué le manque de réactivité pour la réduction de **48** à la présence du motif di-2-aminométhylpyridine (en rouge sur le schéma 25). On y retrouve en effet trois résidus azotés séparés par des liens à deux chaînons, comme pour de nombreux chélateurs. Ce motif doit malheureusement ici être suffisamment fort pour piéger le palladium catalyseur de la réaction d'hydrogénation qui, par conséquent, ne peut pas se faire.

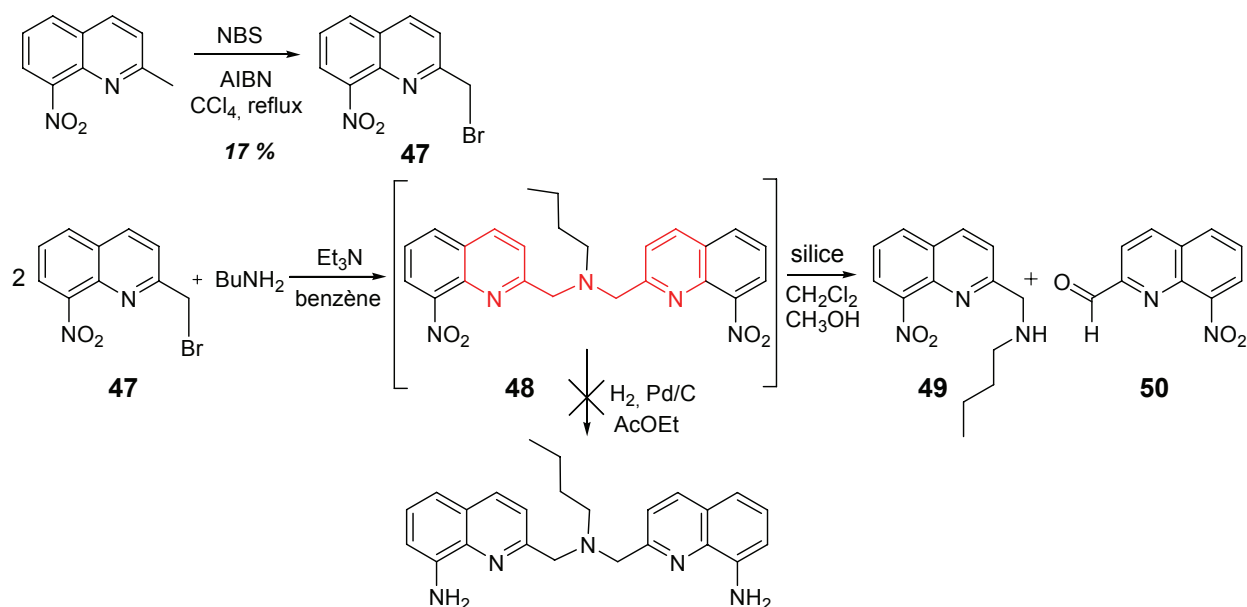


Schéma 25. Tentative de synthèse d'un analogue de **46** avec un bras $-CH_2-NBu-CH_2-$. Le motif di-2-aminométhylpyridine discuté dans le texte est représenté en rouge.

III.2.2 Bras amide en position 2

Afin d'aborder l'étude de l'influence de la nature du bras à deux chaînons entre les motifs quinoléine, le dérivé **51** a été préparé. Celui-ci comporte une fonction amide dans le bras de jonction, entre les positions 2 de deux motifs 8-hydroxyquinoléine.

La réaction conduisant à **51** a été réalisée au laboratoire par Sébastien d'Altério. Elle consiste en un couplage de type peptidique entre la 2-amino-8-hydroxyquinoléine et

l'acide 8-hydroxyquinoléine-2-carboxylique. La fonction acide de ce dernier a été activée par des agents classiques pour ce type de réaction : BOP et HOBT, et la réaction a été menée en présence d'une base, la triéthylamine (Schéma 26).

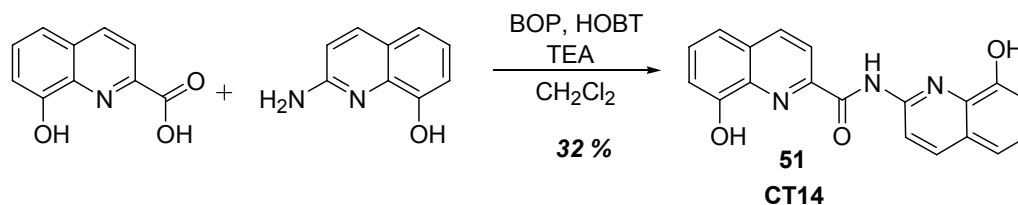


Schéma 26. Synthèse du composé 51.

III.3 Bras de jonction en position 8

La position 8 du noyau quinoléine est également un site de jonction intéressant entre deux résidus quinoléine. Il permet en effet l'incorporation de bras de jonction courts qui favorisent l'obtention de complexes métalliques mononucléaires d'après des modèles moléculaires.

III.3.1 Bras à un chaînon

En position 8, la longueur de bras la plus intéressante d'après les modèles moléculaires est une longueur de 1 chaînon, pour laquelle l'hétéroatome participant à la chélation sert de jonction entre les deux noyaux quinoléine.

Il en est ainsi du dérivé 52, pour lequel le complexe de Cu^{II} a été décrit et est mononucléaire et plan (Fig. 5). Il a été synthétisé à partir de la 8-bromoquinoléine et de la 8-aminoquinoléine selon un protocole décrit par Peters *et al.* (Schéma 27) (Peters *et al.*, 2001). La réaction consiste en un couplage par *N*-arylation catalysé par un complexe de Pd⁰, en présence de ligands *rac*-BINAP relativement labiles (pour apporter un certain déficit électronique sur le Pd⁰) et de *tert*-butylate de sodium comme base.

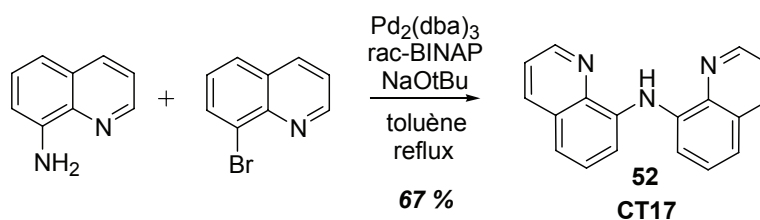


Schéma 27. Synthèse du composé 52 par *N*-arylation.

Afin d'étudier le rôle de la nature de l'hétéroatome en position 8 sur ce genre de dimère de quinoléine, nous avons également envisagé la synthèse de l'analogue de **52** possédant un bras de jonction éther.

La formation d'un lien éther entre deux motifs quinoléine a été réalisée par couplage entre la 8-bromoquinoléine et de la 8-hydroxyquinoléine en présence d'une base (Cs_2CO_3) (Schéma 28). Dans cette réaction, un sel de Cu^{II} est utilisé comme catalyseur et la 8-hydroxyquinoléine est à la fois réactif et ligand activateur (Fagan *et al.*, 2000).

On peut noter que des tentatives de synthèse de **53** par la méthode d'Ullmann de préparation d'éther (en présence de CuI et d'une base) (Fagan *et al.*, 2000) ou par catalyse au Pd^0 (avec du $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, du *rac*-BINAP et du NaOtBu employés pour la préparation du dérivé analogue **52**) s'étaient avérées inefficaces.

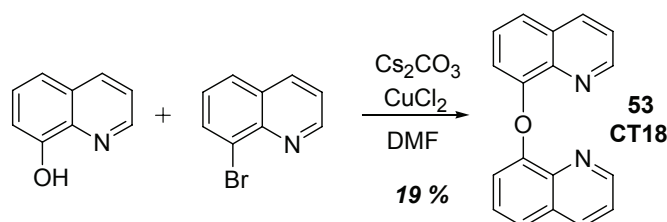


Schéma 28. Synthèse du composé **53**.

III.3.2 Augmentation de la longueur du bras

Nous nous sommes également intéressés à la synthèse de dérivés portant des bras plus longs, susceptibles d'apporter davantage de flexibilité au ligand.

Dans le but de former un bras à deux chaînons, et par analogie avec le composé **51** qui présente un bras de jonction de type amide entre deux résidus quinoléine, le composé **54**, comportant un bras de jonction amide en position 8, a été synthétisé.

Selon le même schéma que pour la synthèse de **51**, la réaction, mise en œuvre par Sébastien d'Altério, est un couplage de type peptidique entre la 8-aminoquinoléine et l'acide quinoléine-8-carboxylique activé par BOP et HOBT en présence de triéthylamine comme base (Schéma 29).

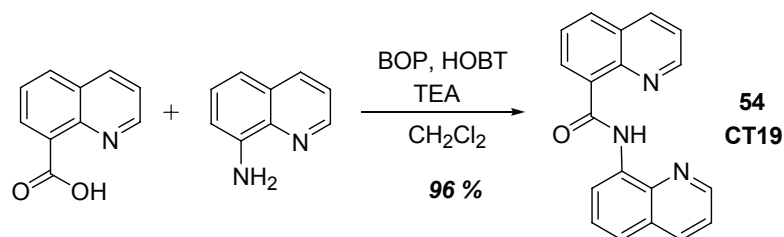
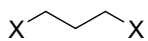
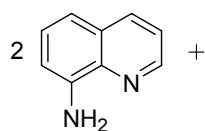


Schéma 29. Synthèse du composé **54**.

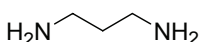
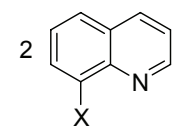
Enfin, un bras de type -NH-alkyl-NH- a été envisagé. La longueur de liaison la plus favorable d'après les modèles moléculaires est un bras à 5 chaînons, soit alkyle égal propyle.

Deux stratégies ont été envisagées pour cette synthèse (Schéma 30) :

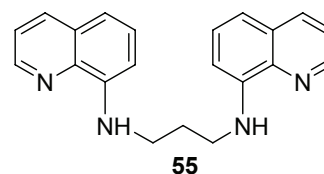
- la substitution d'un précurseur dihalogéné du bras de jonction par deux dérivés 8-aminoquinoléine (voie A),
- la réaction inverse de substitution, où c'est un précurseur diaminé du bras qui réagit sur deux dérivés 8-halogénoquinoléine (voie B).

Voie A

base

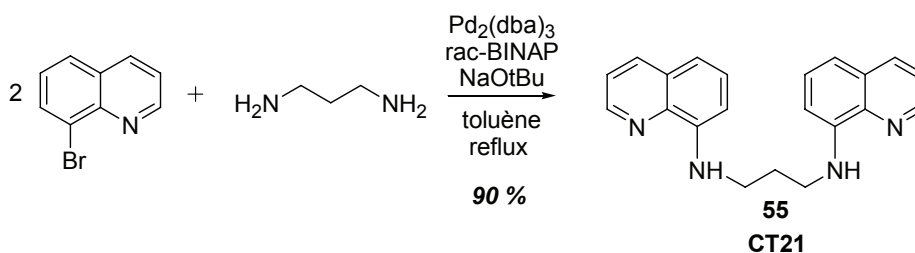
Voie B

base

**55**Schéma 30. Voies de synthèse possibles pour la préparation de **55**.

Des premiers essais de substitution nucléophile du groupement X = Br ou tosylate par l'amine aromatique en présence de diverses bases (en particulier Cs₂CO₃, NaH ou *N,N*-diisopropyléthylamine), dans le diméthylformamide ou le toluène et à diverses températures ont échoué (voie A).

La réaction de *N*-arylation de la 1,3-propanediamine par la 8-bromoquinoléine en présence de *tert*-butylate de sodium comme base (voie B) peut être catalysée par du Pd⁰, comme dans le cas de la synthèse du composé **52**. Cette réaction a permis d'obtenir **55** avec un très bon rendement (Schéma 31).

Schéma 31. Synthèse du composé **55** par *N*-arylation.

IV. Conclusion

Plus de 20 dérivés polyquinoléine ont été synthétisés, pour lesquels des entités 8-hydroxy- ou 8-aminoquinoléine ont été reliées par un bras de jonction de nature et de longueur variée en position 2 ou 8, au voisinage des sites de chélation, pour favoriser l'interaction en "pince" des deux résidus quinoléine sur le même ion métallique.

L'étude de leur affinité pour les deux principaux ions métalliques retrouvés dans les plaques amyloïdes, Cu^{II} et Zn^{II} , sera détaillée au cours du prochain chapitre. Les premières études concernant leur capacité à empêcher la précipitation d'A β due aux ions métalliques et à inhiber les réactions d'oxydation générées par A β en présence de cuivre seront également présentées dans ce chapitre.

V. Partie expérimentale

Remarques générales

L'acétonitrile, la pyridine et le DMF ont été séchés sur tamis moléculaire 4 Å. Le dichlorométhane a été séché sur alumine basique. Le THF a été distillé sur de la benzophénone en présence de sodium. CuCl_2 sec a été obtenu par chauffage sous vide à 50 °C. Les autres réactifs et solvants utilisés proviennent de fournisseurs standards en produits chimiques et ont été utilisés sans purification ultérieure. Les chromatographies sur couche mince ont été réalisées sur plaque de silice MERCK 60 F₂₅₄.

Les spectres RMN ont été enregistrés sur des appareils Bruker 200, 250 ou 500 MHz. Les spectres de masse ont été réalisés sur un appareil Perkin-Elmer SCIEX API 365 en ionisation électrospray (ES), et sur un appareil Thermoelectron TSQ 7000 en ionisation chimique (DIC).

Les spectres UV-visible ont été enregistrés sur un spectrophotomètre à barrette de diodes Hewlett Packard 8452A ou un spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda 35. Ils ont été réalisés sur les molécules dissoutes dans du tampon Tris-HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM en présence d'un solvant organique (CH_3OH , DMSO ou dioxane) pour améliorer leur solubilité. Ces milieux ont également été utilisés pour la détermination des constantes d'affinité des ligands pour les ions métalliques Cu^{II} et Zn^{II} . Ils ont été choisis

pour des raisons d'homogénéité avec les conditions utilisées lors des tests biologiques en présence du peptide A β ₄₂.

Diméthyl-bis[8-(acétoxy)-2-quinoléinyl]propanedioate (1) :

Une suspension de 8-hydroxyquinoléine-*N*-oxyde (4,47 g, 27,76 mmol) et de diméthylmalonate (3,35 mL, 29,12 mmol) dans de l'anhydride acétique (11,2 mL) est agitée durant 27 jours à température ambiante protégée de l'humidité (grâce à un tube de CaCl₂) et de la lumière. La suspension orange obtenue est refroidie à 0 °C et du CH₃OH (6,7 mL) est ajouté. Après 2 heures d'agitation à température ambiante, de l'eau (30 mL) est ajoutée en deux temps et le mélange est maintenu sous agitation 2 heures de plus. Un précipité est alors collecté par filtration et lavé avec un mélange CH₃CO₂H/eau (1/1, v/v, 30 mL) puis à l'eau avant d'être séché 15 heures à 110 °C. Il est alors dissous à chaud dans du chloroforme (15 mL) et précipité par addition de CH₃OH (45 mL) pour donner **1** sous la forme d'une poudre blanche (4,58 g, 9,12 mmol, rendement = 66 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 8,06 (d, ³*J* (H, H) = 9,0 Hz, 2 H); 7,87 (d, ³*J* (H, H) = 9,0 Hz, 2 H); 7,64 (dd, ³*J* (H, H) = 8,0 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,5 Hz, 2 H); 7,49 (m, 2 H); 7,41 (dd, ³*J* (H, H) = 7,5 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,5 Hz, 2 H); 3,94 (s, 6 H); 2,53 (s, 6 H).

RMN-¹³C (63 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 169,6 (Cq); 168,6 (Cq); 157,1 (Cq); 147,5 (Cq); 139,5 (Cq); 136,3 (CH); 128,4 (Cq); 126,7 (CH); 125,5 (CH); 123,8 (CH); 121,2 (CH); 74,4 (Cq); 52,7 (CH₃); 21,0 (CH₃).

SM (DIC, NH₃) *m/z* : 503 (MH⁺).

Analyse (%) pour C₂₇H₂₂N₂O₈·0,5H₂O : calculé C 63,40; H 4,53; N 5,48; trouvé C 63,46; H 4,10; N 5,56.

2-Oxo-1,2-dihydro-8-acétoxyquinoléine (2) :

Le produit est obtenu à partir du filtrat CH₃OH/eau éliminé lors de la synthèse de **1**. Ce filtrat est concentré sous pression réduite puis le produit est redissous à chaud dans 80 mL d'acétone. Le précipité blanc formé lors du refroidissement est filtré, lavé à l'acétone et séché sous vide pour donner **2** sous la forme d'une poudre blanche (0,18 g, 0,89 mmol, rendement = 3 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 10,24 (s large, 1 H); 7,78 (d, ³*J* (H, H) = 9,5 Hz, 1 H); 7,44 (dd, ³*J* (H, H) = 8,0 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,0 Hz, 1 H); 7,37 (dd, ³*J* (H, H) = 8,0 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,0 Hz, 1 H); 7,20 (m, 1 H); 6,66 (d, ³*J* (H, H) = 9,5 Hz, 1 H); 2,51 (s, 3 H).

SM (DIC, NH₃) *m/z* : 204 (MH⁺).

2,2'-Méthanediyl-bis(8-hydroxy-2-quinoléinium) dichlorure dihydrate (3, CT1) :

Une suspension de **1** (4,00 g, 7,97 mmol) dans de l'acide chlorhydrique à 20 % (295 mL) est chauffée à reflux durant 5 heures 30 minutes puis agitée 4 heures à température ambiante pour donner un précipité jaune qui est récupéré et séché sous vide. Le produit est alors dissous à chaud dans du CH₃OH (6,1 mL) contenant de l'acide chlorhydrique concentré (610 µL) puis cristallisé par addition d'acide chlorhydrique concentré (6,1 mL) pour donner **3** sous la forme de cristaux jaunes (3,27 g, 7,96 mmol, rendement quantitatif).

RMN-¹H (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ, ppm : 8,72 (d, ³*J*(H, H) = 9,0 Hz, 2 H); 7,89 (d, ³*J*(H, H) = 9,0 Hz, 2 H); 7,58 (m, 4 H); 7,39 (dd, ³*J*(H, H) = 7,5 Hz, ⁴*J*(H, H) = 2,0 Hz, 2 H); 5,14 (s, 2 H).

RMN-¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ, ppm : 156,5 (Cq); 151,3 (Cq); 142,7 (CH); 134,0 (Cq); 129,7(CH); 129,0 (Cq); 124,3 (CH); 118,9 (CH); 115,1 (CH); 42,2 (CH₂).

SM (DIC, NH₃) *m/z* : 302 (MH⁺).

Analyse (%) pour C₁₉H₁₂N₂O₂·2HCl·2H₂O : calculé C 55,49; H 4,90; N 6,81; trouvé C 55,95; H 4,79; N 6,66.

UV/vis [DMSO/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (8/2, v/v)] : λ nm (ε M⁻¹ cm⁻¹) = 256 (50 800), 312 (8 700), 454 (2 200), 480 (3500), 512 (2 700).

2,2'-Méthanediyl-bis(8-hydroxyquinoléine) (**4**) :

Du **3** (150 mg, 0,36 mmol), mis en suspension dans 20 mL de CH₂Cl₂, est lavé trois fois avec du tampon acétate de sodium (0,1 M, pH = 7,0) puis à l'eau. Le solvant de la phase organique est évaporé pour donner, après séchage sous vide, **4** sous la forme d'un solide orange (110 mg, 0,36 mmol, rendement quantitatif).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ, ppm : 8,20 (s large, 2 H); 8,08 (d, ³*J*(H, H) = 8,5 Hz, 2 H); 7,43 (d, ³*J*(H, H) = 8,5 Hz, 2 H); 7,42 (m, 2 H); 7,30 (dd, ³*J*(H, H) = 8,0 Hz, ⁴*J*(H, H) = 1,0 Hz, 2 H); 7,16 (dd, ³*J*(H, H) = 7,5 Hz, ⁴*J*(H, H) = 1,0 Hz, 2 H); 4,69 (s, 2 H).

[2,2'-(2,2-Propanediyl)-bis[8-quinoléinolato]nickel^{II} (**5**) :

A une solution chauffée à 60 °C de Ni(OAc)₂·4H₂O (3,27 g, 13,14 mmol) dans du CH₃OH (70 mL) est ajouté **3** (5,40 g, 13,14 mmol). Après 30 minutes d'agitation à 60 °C, une solution aqueuse d'acétate de sodium (130 mL, 0,3 M) chauffée à 85 °C est additionnée par portions. Le mélange est agité 2 heures à 60 °C et le précipité formé est filtré, lavé à l'eau chaude (85 °C) et séché à 110 °C. Il est ensuite resuspendu dans du CH₃OH (305 mL) et chauffé à 50 °C. De l'iodométhane (15,5 mL, 250 mmol) est ajouté, suivi par une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (140 mL, 0,27 M) et le mélange est agité au reflux pendant 30 minutes. La suspension est ensuite versée sur de l'eau à

80 °C (600 mL) sous agitation et le précipité résultant est collecté par filtration et séché à 110 °C. Il est ensuite redissous à chaud dans du méthanol (640 mL) et un solide résiduel est éliminé par filtration. Le solvant est évaporé pour donner, après séchage sous vide, **5** sous la forme d'une poudre rouge (3,32 g, 8,60 mmol, rendement = 66 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 8,15 (d, ³*J* (H, H) = 9,0 Hz, 2 H); 7,45 (d large, ³*J* (H, H) = 9,0 Hz, 2 H); 7,33 (m, 2 H); 6,91 (d large, ³*J* (H, H) = 7,5 Hz, 2 H); 6,81 (d large, ³*J* (H, H) = 6,5 Hz, 2 H); 1,93 (s, 6 H).

RMN-¹³C (63 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 166,4 (Cq); 159,1 (Cq); 144,3 (Cq); 138,7 (CH); 130,7 (CH); 127,7 (Cq); 119,3 (CH); 113,6 (CH); 110,4 (Cq); 50,7 (Cq); 32,4 (CH₃).

SM (DIC, NH₃) : *m/z* : 387 (MH⁺), 404 (MNH₄⁺).

La structure de la molécule a été confirmée par analyse par diffraction de rayons X sur les monocristaux issus d'une cristallisation du produit dans le méthanol.

Paramètres de l'analyse cristalline : Système cristallin triclinique, P-1.

a = 12,456(4) Å, *b* = 12,650(4) Å, *c* = 13,983(5) Å, α = 112,260(5)°, β = 105,956(5)°, γ = 90,115(6)°. *R*₁ = 0,0532.

2,2'-(2,2-Propanediyl)-bis(8-hydroxyquinoléine) (**6**, CT2) :

A une suspension de **5** (3,32 g, 8,60 mmol) dans 80 mL d'éthanol sont ajoutés 16 mL d'acide chlorhydrique concentré pour donner une solution verte à laquelle 320 mL d'eau bouillante sont ajoutés par portions pour former des cristaux jaunes. Après refroidissement, les cristaux sont collectés et lavés avec une solution d'acide chlorhydrique 1 M puis séchés à l'air à température ambiante durant 15 heures avant d'être redissous à chaud dans 32 mL d'éthanol. Une solution aqueuse bouillante d'acétate de sodium 18,4 mM est alors ajoutée par portions. Après refroidissement, un précipité est récupéré par centrifugation puis lavé à l'eau et extrait avec du CH₂Cl₂ pour donner, après évaporation du solvant et séchage sous vide, **6** sous la forme d'un solide blanc (1,81 g). Le surnageant de précipitation de l'étape précédente, qui contient une quantité résiduelle de **5**, est neutralisé avec une solution aqueuse de soude 6 M puis 1 L de CH₂Cl₂ est ajouté; le produit est démétallé par addition d'une solution aqueuse d'EDTA (2 × 10 g dans 500 mL) sous agitation durant 1 heure. La phase organique est récupérée, lavée à l'eau puis concentrée sous vide. Le mélange est alors purifié par chromatographie sur gel de silice grâce à un gradient de 0 à 1 % de CH₃OH dans du CH₂Cl₂ (v/v) pour donner 0,83 g supplémentaire de **6** sous la forme d'un solide blanc (*m*_{totale} = 2,64 g, 8,00 mmol, rendement = 93 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 8,30 (s large, 2 H); 8,02 (d, ³*J* (H, H) = 9,0 Hz, 2 H); 7,45 (m, 2 H); 7,30 (dd, ³*J* (H, H) = 7,5 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,0 Hz, 2 H); 7,22

(d, 3J (H, H) = 9,0 Hz, 2 H); 7,21 (dd, 3J (H, H) = 7,5 Hz, 4J (H, H) = 1,0 Hz, 2 H); 2,0 (s, 6 H).

RMN- ^{13}C (63 MHz, CDCl_3) δ , ppm : 164,7 (Cq); 152,1 (Cq); 136,8 (Cq); 136,5 (CH); 127,5 (CH); 126,8 (Cq); 121,2 (CH); 117,5 (CH); 110,3 (CH); 49,3 (Cq); 28,0 (CH_3).

SM (DIC, NH_3) m/z : 331 (MH^+).

Analyse (%) pour $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$: calculé C 76,34; H 5,49; N 8,48; trouvé C 75,80; H 5,30; N 8,38.

UV/vis [$\text{CH}_3\text{OH}/\text{Tris}\cdot\text{HCl}$ 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ , nm (ϵ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) = 203 (77 700), 251 (84 600), 308 (6 900).

2,2'-(Difluorométhanediyol)-bis(8-hydroxyquinoléine) (7, CT3) :

A une suspension orange de **4** (110 mg, 0,36 mmol) dans 30 mL d'acétonitrile sec est ajouté sous azote du 1-chlorométhyl-4-fluoro-1,4-diazoniabi-cyclo(2,2,2)octane de bis(tétrafluoroborate) (F-TEDA- BF_4 , SelectfluorTM, 258 mg, 0,73 mmol) par petites portions ce qui entraîne la solubilisation des produits sous la forme d'une solution jaune. Le mélange est agité 90 minutes à température ambiante. Après évaporation du solvant, le produit est solubilisé dans du CH_2Cl_2 et lavé deux fois à l'eau. La phase organique est concentrée et séchée sous vide pour donner **7** sous la forme d'une poudre jaune (123 mg, 0,36 mmol, rendement quantitatif).

RMN- ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ , ppm : 8,34 (d, 3J (H, H) = 8,5 Hz, 2 H); 8,00 (d, 3J (H, H) = 8,5 Hz, 2 H); 7,78 (s, 2 H); 7,52 (m, 2 H); 7,39 (dd, 3J (H, H) = 8,0 Hz, 4J (H, H) = 1,0 Hz, 2 H); 7,19 (dd, 3J (H, H) = 7,5 Hz, 4J (H, H) = 1,0 Hz, 2 H).

RMN- ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ , ppm : 152,3 (t, 2J (C, F) = 30,0 Hz, Cq); 152,3 (Cq); 137,6 (CH); 137,2 (Cq); 129,3 (CH); 128,5 (Cq); 118,7 (t, 3J (C, F) = 3,5 Hz, CH); 117,9 (CH); 117,0 (t, 1J (C, F) = 245,6 Hz, Cq); 111,0 (CH).

RMN- ^{19}F (188 MHz, CDCl_3 , référence : $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$) δ , ppm : - 22,2 (s).

SM (DIC, NH_3) m/z : 339 (MH^+); 356 (MNH_4^+).

Analyse (%) pour $\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 0,3 \text{ H}_2\text{O}$: calculé C 66,39 ; H 3,69 ; N 8,15; trouvé C 66,25 ; H 3,62 ; N 8,27.

UV/vis [$\text{CH}_3\text{OH}/\text{Tris}\cdot\text{HCl}$ 20 mM pH = 7,4; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ , nm (ϵ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) = 241 (50 000), 251 (55 600), 314 (4 700).

Bis(8-hydroxy-2-quinoléinyl)méthanone (8, CT4) :

Du **3** (60 mg, 0,16 mmol) est agité dans 8 mL d'un mélange THF/solution aqueuse saturée de NaHCO_3 (1/1, v/v) durant 48 heures. 10 mL de CH_2Cl_2 et 10 mL d'eau sont alors ajoutés et le mélange réactionnel est transféré dans une ampoule à décanter. La phase organique est récupérée et la phase aqueuse est ensuite extraite avec du CH_2Cl_2 (2 $\times$ 10 mL). Les phases organiques sont réunies et lavées à l'eau (1 $\times$ 10 mL) puis le solvant est évaporé sous vide. Le produit est alors purifié par filtration sur gel de silice

avec un mélange CH₂Cl₂/CH₃OH (97/3, v/v) comme solvant. L'évaporation du solvant du filtrat donne **8** sous la forme d'une poudre rouge (42 mg, 0,13 mmol, rendement = 81 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ, ppm : 8,36 (d, ³*J*(H, H) = 8,5 Hz, 2 H); 8,19 (d, ³*J*(H, H) = 8,5 Hz, 2 H); 8,04 (s large, 2 H); 7,59 (m, 2 H); 7,43 (dd, ³*J*(H, H) = 8,5 Hz, ⁴*J*(H, H) = 1,0 Hz, 2 H); 7,22 (dd, ³*J*(H, H) = 7,5 Hz, ⁴*J*(H, H) = 1,0 Hz, 2 H).

RMN-¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ, ppm : 192,2 (Cq); 153,1 (Cq); 151,4 (Cq); 137,1 (Cq); 137,0 (CH); 130,4 (CH); 129,5 (Cq); 121,8 (CH); 117,9 (CH); 111,2 (CH).

SM (DIC, NH₃) *m/z* : 317 (MH⁺).

Analyse (%) pour C₁₉H₁₂N₂O₃·0,5 H₂O : calculé C 70,15 ; H 4,03 ; N 8,61; trouvé C 70,11 ; H 3,83 ; N 8,94.

UV/vis [CH₃OH/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ_n nm (ε M⁻¹ cm⁻¹) = 254 (43 300), 273 (26 100), 310 (9 600, épaulement), 375 (2 300).

2-Méthyl-8-(méthyloxy)quinoléine (**9**) :

Il a été préparé selon la référence : Kitamura *et al.*, 2000. A une suspension de 2-méthyl-8-hydroxyquinoléine (11,3 g, 70,9 mmol) et de K₂CO₃ (55,7 g, 403,0 mmol) dans 100 mL d'acétone est ajoutée doucement et sous agitation de l'iodométhane (7,00 mL, 112,8 mmol) dans 30 mL d'acétone. Le milieu est agité à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 18 heures. Après élimination du K₂CO₃ par filtration, la solution résultante est concentrée sous pression réduite et le produit obtenu est purifié par filtration sur gel de silice éluée avec un gradient de 0 à 10 % de CH₃OH dans CHCl₃ (v/v). Après évaporation du solvant, le produit est recristallisé dans un mélange acétate d'éthyle/hexane (1/5, v/v) pour donner **9** sous la forme d'une poudre blanche (11,0 g, 63,6 mmol, rendement = 90 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ, ppm : 8,02 (d, ³*J*(H, H) = 8,5 Hz, 1 H); 7,43 (dd, ³*J*(H, H) = 7,5 Hz, ⁴*J*(H, H) = 2,0 Hz, 1 H); 7,40 (t, ³*J*(H, H) = 7,5 Hz, 1 H); 7,31 (d, ³*J*(H, H) = 8,5 Hz, 1 H); 7,02 (dd, ³*J*(H, H) = 7,5 Hz, ⁴*J*(H, H) = 2,0 Hz, 1 H); 4,08 (s, 3H), 2,80 (s, 3H).

SM (DIC, NH₃) *m/z* : 174 (MH⁺).

Analyse (%) pour C₁₁H₁₁NO : calculé C 76,28; H 6,40; N 8,09; trouvé C 76,55; H 6,23; N 7,89.

2-(Chlorométhyl)-8-(méthyloxy)quinoléine (**11**) :

A une solution sous argon de **9** (0,60 g, 3,47 mmol) dans du CCl₄ (5 mL) sont ajoutés du *N*-chlorosuccinimide (0,46 g, 3,47 mmol) puis du 2,2'-azobisisobutyronitrile (0,02 g, 0,11 mmol). Le mélange est chauffé à reflux pendant 10 heures puis, après refroidissement, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit est repris dans du CH₂Cl₂ (25 mL) et lavé avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ puis avec de l'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis concentrée sous

pression réduite. Le brut réactionnel est alors purifié par chromatographie sur gel de silice élué avec un gradient de 50 à 100 % de CHCl_3 dans de l'hexane (v/v). Le solvant des fractions contenant le produit est évaporé sous pression réduite pour donner, après séchage sous vide, **11** sous la forme d'une poudre blanche (0,39 g, 1,90 mmol, rendement = 55 %).

RMN- ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ , ppm : 8,15 (d, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8,5 \text{ Hz}$, 1 H); 7,65 (d, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8,5 \text{ Hz}$, 1 H); 7,45 (m, 1H); 7,37 (dd, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8,0 \text{ Hz}$, $^4J(\text{H}, \text{H}) = 1,5 \text{ Hz}$, 1 H); 7,05 (dd, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7,5 \text{ Hz}$, $^4J(\text{H}, \text{H}) = 1,5 \text{ Hz}$, 1 H); 4,90 (s, 2 H); 4,05 (s, 3 H).

SM (DIC, NH_3) : $m/z = 208 (\text{MH}^+)$.

2-(Dichlorométhyl)-8-(méthyloxy)quinoléine (**12**) :

Il est obtenu lors de la synthèse de **11**. A l'issue de la chromatographie du brut réactionnel, les fractions contenant le produit ont été réunies pour donner, après évaporation du solvant, **12** sous la forme d'une poudre jaune (0,13 g, 0,53 mmol, rendement = 15 %).

RMN- ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ , ppm : 8,25 (d, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8,5 \text{ Hz}$, 1 H); 7,96 (d, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8,5 \text{ Hz}$, 1 H); 7,52 (m, 1H); 7,40 (dd, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8,5 \text{ Hz}$, $^4J(\text{H}, \text{H}) = 1,5 \text{ Hz}$, 1 H); 7,05 (dd, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8,0 \text{ Hz}$, $^4J(\text{H}, \text{H}) = 1,5 \text{ Hz}$, 1 H); 6,99 (s, 1 H); 4,08 (s, 3 H).

SM (DIC, NH_3) : $m/z = 243 (\text{MH}^+)$.

2,2'-Méthanediyl-bis(5-chloro-8-hydroxyquinoléine) (**13**, CT5) :

A une suspension de **3** (500 mg, 1,22 mmol) dans H_2SO_4 à 97 % (12 mL), refroidie sur bain de glace, est ajouté du *N*-chlorosuccinimide (324 mg, 2,43 mmol) par petites portions. Le mélange est alors agité 15 minutes à 0 °C puis 4 heures à température ambiante. Il est ensuite versé sur de la glace pour donner une suspension rose qui est neutralisée avec une solution aqueuse de soude. Le mélange est alors centrifugé. Après avoir enlevé le surnageant, le précipité est suspendu dans de l'eau et extrait au CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée à l'eau puis le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner, après séchage sous vide, **13** sous la forme d'une poudre orange pâle (440 mg, 1,19 mmol, rendement = 98 %).

RMN- ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ , ppm : 8,45 (d, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8,5 \text{ Hz}$, 2 H); 8,12 (s large, 2 H); 7,56 (d, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8,5 \text{ Hz}$, 2 H); 7,48 (d, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8,0 \text{ Hz}$, 2 H); 7,10 (d, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8,0 \text{ Hz}$, 2 H); 4,74 (s, 2 H).

RMN- ^{13}C (63 MHz, CDCl_3) δ , ppm : 157,4 (Cq); 151,0 (Cq); 138,1 (Cq); 134,2 (CH); 127,2 (CH); 125,0 (Cq); 123,3 (CH); 120,4 (Cq); 110,3 (CH); 47,5 (CH_2).

SM (DIC, NH_3) m/z : 371 (MH^+).

Analyse (%) pour $C_{19}H_{12}Cl_2N_2O_2 \cdot 0,1Na_2SO_4$: calculé C 59,21; H 3,14; N 7,27; trouvé C 59,27; H 2,58; N 7,05.

UV/vis [dioxane/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 258 (59 900), 320 (7 000), 460 (2 000), 489 (2 900), 518 (2 100).

2,2'-(2,2-Propanediyl)-bis(5-chloro-8-hydroxyquinoléine) (14, CT6) :

A une solution de **6** (50 mg, 0,15 mmol) dans du H₂SO₄ à 97 % (1,5 mL) et refroidie sur bain de glace est ajouté du *N*-chlorosuccinimide (40 mg, 0,30 mmol) par petites portions. Le mélange est agité durant 15 minutes à 0 °C puis 3 heures à température ambiante. Il est ensuite versé sur de la glace pour donner une suspension jaune qui est neutralisée avec une solution aqueuse de soude 3 M. Le mélange est centrifugé, le surnageant est enlevé puis le précipité est suspendu dans de l'eau et extrait au CH₂Cl₂. La phase organique est lavée à l'eau puis le solvant est évaporé pour donner **14** sous la forme d'une poudre blanche (55 mg, 0,14 mmol, rendement = 93 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 8,37 (d, ³*J* (H, H) = 9,0 Hz, 2 H); 8,19 (s large, 2 H); 7,50 (d, ³*J* (H, H) = 8,0 Hz, 2 H); 7,32 (d, ³*J* (H, H) = 9,0 Hz, 2 H); 7,13 (d, ³*J* (H, H) = 8,0 Hz, 2 H); 2,00 (s, 6 H).

RMN-¹³C (63 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 165,2 (Cq); 151,1 (Cq); 137,3 (Cq); 134,0 (CH); 127,2 (CH); 124,7 (Cq); 121,9 (CH); 120,5 (Cq); 110,2 (CH); 49,4 (Cq); 27,9 (CH₃).

SM (DIC, NH₃) *m/z* : 399 (MH⁺).

Analyse (%) pour $C_{21}H_{16}Cl_2N_2O_2$: calculé C 63,17; H 4,04; N 7,02; trouvé C 63,02; H 3,76; N 6,87.

UV/vis [dioxane/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 258 (72 500), 315 (8 300).

7-Bromo-8-hydroxyquinoléine (15) :

Il a été préparé selon les références : Pearson *et al.*, 1967 et Collis *et al.*, 2003. De la *tert*-butylamine (3,23 mL, 30,78 mmol) est agitée sous argon dans 100 mL de toluène pendant 2 heures à température ambiante, en présence de tamis moléculaire 4 Å activé (10 g). Après refroidissement à -70 °C, du *N*-bromosuccinimide (5,48 g, 30,78 mmol) et de la 8-hydroxyquinoléine (5,48 g, 30,78 mmol) sont ajoutés successivement. Le mélange est lentement ramené à température ambiante. Le milieu réactionnel est filtré et le tamis moléculaire est lavé avec du diéthyléther (20 mL). Le filtrat est lavé à l'eau (3 × 50 mL), séché sur Na₂SO₄ anhydre puis le solvant est évaporé. Le produit est alors purifié par chromatographie sur gel de silice éluée avec le mélange CH₂Cl₂/CH₃CO₂H (96/4, v/v). Les fractions contenant le produit sont combinées et lavées avec une solution saturée de NaHCO₃ (3 × 100 mL). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ anhydre et le solvant

éaporé pour donner **15** sous la forme d'une poudre blanche (4,06 g, 18,13 mmol, rendement = 59 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 8,80 (dd, ³*J* (H, H) = 4,0 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,0 Hz, 1 H); 8,15 (dd, ³*J* (H, H) = 8,5 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,0 Hz, 1 H); 7,62 (d, ³*J* (H, H) = 9,0 Hz, 1 H); 7,47 (dd, ³*J* (H, H) = 8,5 Hz, ³*J* (H, H) = 4,0 Hz, 1 H); 7,25 (d, ³*J* (H, H) = 9,0 Hz, 1 H).

RMN-¹³C (63 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 149,7 (Cq); 148,6 (CH); 138,3 (Cq); 136,3 (CH); 131,3 (CH); 127,4 (Cq); 122,0 (CH); 118,6 (CH); 104,3 (Cq).

SM (DIC, NH₃) : *m/z* = 224 (MH⁺).

Analyse (%) pour C₉H₆BrNO : calculé C 48,25; H 2,70; N 6,25; trouvé C 48,20; H 2,61; N 6,46.

7-Méthoxy-8-hydroxyquinoléine (16) :

A une solution de **15** (2,00 g, 8,93 mmol) dans 125 mL de DMF est ajoutée une solution de CH₃ONa (30 % en masse) dans du CH₃OH (17 mL, 89,30 mmol). Le mélange est agité pendant 10 minutes sous argon. CuCl₂·2H₂O (0,46 g, 2,68 mmol) est additionné et le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 20 heures. Après refroidissement à température ambiante, de l'eau (100 mL) et de l'EDTA disodium dihydrate (7,83 g, 26,80 mmol) sont ajoutés et le milieu est agité pendant 1 heure. La solution est légèrement acidifiée à pH = 4-5 avec CH₃CO₂H (3 mL) et ensuite doucement basifiée avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (pH = 8-9). Le produit est extrait à l'aide de CH₂Cl₂ (3 × 100 mL), puis séché sur Na₂SO₄ anhydre et le solvant est évaporé. Le produit est alors purifié par chromatographie sur gel de silice élué à l'aide d'un gradient de CH₂Cl₂/CH₃OH/CH₃CO₂H (94/4/2, v/v) à CH₂Cl₂/CH₃OH (90/10, v/v). Les fractions contenant le produit sont combinées et lavées avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ anhydre et le solvant est évaporé pour donner **16** sous la forme d'une poudre blanche (0,65 g, 3,68 mmol, rendement = 40 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 8,77 (dd, ³*J* (H, H) = 4,0 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,5 Hz, 1 H); 8,11 (dd, ³*J* (H, H) = 8,5 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,5 Hz, 1 H); 7,36 (m, 2H), 7,31 (dd, ³*J* (H, H) = 8,5 Hz, ³*J* (H, H) = 4,0 Hz, 1 H), 4,06 (s, 3 H).

RMN-¹³C (63 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 148,6 (CH); 144,0 (Cq); 139,7 (Cq); 138,6 (Cq); 136,0 (CH); 123,5 (Cq); 119,7 (CH); 117,7 (CH); 116,4 (CH); 57,3 (CH₃).

SM (DIC, NH₃) : *m/z* = 176 (MH⁺).

Analyse (%) pour C₁₀H₉NO₂·0,1H₂O : calculé C 67,86; H 5,24; N 7,91; trouvé C 67,82; H 5,11; N 7,95.

8-Benzyloxy-7-(méthoxy)quinoléine (17) :

Du **16** (1,10 g, 6,29 mmol) et du K₂CO₃ (1,30 g, 9,43 mmol) dans 30 mL

d'acétonitrile sec sont agités 10 minutes sous argon. Du chlorure de benzyle (0,87 mL, 7,54 mmol) est alors ajouté et le milieu réactionnel est chauffé au reflux pendant la nuit. Après retour à température ambiante, le précipité est filtré, lavé avec du CH₂Cl₂ et le solvant du filtrat est évaporé sous pression réduite. L'huile obtenue est redissoute dans du CH₂Cl₂ (50 mL) et lavée successivement avec une solution de NaOH 2M (4 × 50 mL) et de l'eau (50 mL). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ anhydre et les solvants sont évaporés sous pression réduite pour donner **17** sous la forme d'une huile marron (1,28 g, 4,84 mmol, rendement = 77 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ, ppm : 8,94 (dd, ³J(H, H) = 4,0 Hz, ⁴J(H, H) = 1,5 Hz, 1 H); 8,06 (dd, ³J(H, H) = 8,5 Hz, ⁴J(H, H) = 1,5 Hz, 1 H); 7,59-7,51 (m, 3 H); 7,36-7,24 (m, 5 H); 5,40 (s, 2 H); 3,92 (s, 3 H).

RMN-¹³C (63 MHz, CDCl₃) δ, ppm : 151,3 (Cq); 149,5 (CH); 142,9 (Cq); 141,2 (Cq); 137,4 (Cq); 135,3 (CH); 127,9 (CH); 127,4 (CH); 127,1 (CH); 123,6 (Cq); 122,9 (CH); 118,5 (CH); 114,8 (CH); 75,2 (CH₂); 56,1 (CH₃).

SM (DIC, NH₃) : m/z = 266 (MH⁺).

Analyse (%) pour C₁₇H₁₅NO₂·0,05 CHCl₃ : calculé C 75,49; H 5,59; N 5,16; trouvé C 75,74; H 5,40; N 5,33.

8-Benzyloxy-7-(méthyloxy)quinoléine-N-oxyde (**18**) :

A du CH₂Cl₂ sec (11 mL) à 4 °C sous argon sont successivement ajoutés **17** (0,30 g, 1,13 mmol) et de l'acide *m*-chloroperbenzoïque à 77 % en masse (0,38 g, 1,69 mmol). Après 48 heures à température ambiante, du CH₂Cl₂ (40 mL) est ajouté. Le milieu réactionnel est lavé avec une solution saturée de NaHCO₃ (2 x 50 mL) et le solvant est évaporé sous pression réduite. L'huile résultante est purifiée par colonne chromatographique sur gel de silice éluée avec CH₂Cl₂/CH₃OH (95/5, v/v) pour donner **18** sous la forme d'une huile jaune (0,18 g, 0,64 mmol, rendement = 57 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ, ppm : 8,43 (dd, ³J(H, H) = 6,0 Hz, ⁴J(H, H) = 1,0 Hz, 1 H); 7,68-7,58 (m, 4 H); 7,41-7,30 (m, 4 H); 7,10 (dd, ³J(H, H) = 8,5 Hz, ³J(H, H) = 6,0 Hz, 1 H); 5,23 (s, 2 H); 3,96 (s, 3 H).

RMN-¹³C (63 MHz, CDCl₃) δ, ppm : 138,4; 128,9; 128,7; 128,2; 127,8; 127,6; 125,7; 124,9; 123,4; 119,5; 118,8; 116,8; 107,7; 75,2; 57,1.

SM (DIC, NH₃) : m/z = 282 (MH⁺).

Analyse (%) pour C₁₇H₁₅NO₃ : calculé C 72,58; H 5,37; N 4,98; trouvé C 72,74; H 4,91; N 4,87.

Diméthyl-bis{7-(méthyloxy)8-[phénylméthyl]oxy}-2-quinoléinyl}propanedioate (**19**) :

A une solution de **18** (0,72 g, 2,56 mmol) dans du CH₂Cl₂ sec (7 mL) sont ajoutés du diméthylmalonate (0,307 mL, 2,69 mmol) et de l'anhydride acétique (1,18 mL) et le milieu est agité durant 24 jours à température ambiante, à l'abri de l'humidité (grâce à un

tube de CaCl_2) et de la lumière. Du CH_3OH (20 mL) est additionné et, après 15 heures à $-20\text{ }^\circ\text{C}$, un précipité est éliminé par centrifugation. Le solvant du surnageant est évaporé, le produit obtenu est redissous dans du CH_3OH (0,5 mL) et précipité par addition d'eau (3 mL). Le surnageant est éliminé et le précipité est repris dans 40 mL de CH_2Cl_2 et lavé à l'eau ($2 \times 20\text{ mL}$). Après évaporation du solvant, le produit est purifié par chromatographie préparative sur couche mince éluée avec un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (99/1, v/v). Les impuretés résiduelles sont éliminées par cristallisation dans du CH_3OH pour donner **19** sous la forme de cristaux blancs (12 mg, 0,02 mmol, rendement = 1,5 %).

RMN- ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ , ppm : 7,93 (d, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8,5\text{ Hz}$, 2 H); 7,63 (d, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8,5\text{ Hz}$, 2 H); 7,59 (m, 4 H); 7,47 (d, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 9,0\text{ Hz}$, 2 H); 7,40-7,28 (m, 8 H); 5,41 (s, 4 H); 3,95 (s, 6 H); 3,84 (s, 6 H).

RMN- ^{13}C (63 MHz, CDCl_3) δ , ppm : 169,3 (Cq); 157,5 (Cq); 152,2 (Cq); 142,1 (Cq); 142,1 (Cq); 138,2 (Cq); 135,9 (CH); 128,4 (CH); 128,2 (CH); 127,7 (CH); 123,2 (Cq); 123,0 (CH); 121,1 (CH); 115,9 (CH); 75,8 (CH_2); 75,2 (Cq); 57,1 (CH_3); 53,0 (CH_3).

SM (DIC, NH_3) : $m/z = 659 (\text{MH}^+)$.

La structure de la molécule a été confirmée par analyse par diffraction de rayons X.

Paramètres de l'analyse cristalline : Système cristallin monoclinique, $P 1 2_1 1$.

$a = 10,2593(9)\text{ \AA}$, $b = 10,8311(10)\text{ \AA}$, $c = 15,2192(14)\text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 97,622(5)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$. $R_1 = 0,0437$.

Diméthyl-{7-(méthyloxy)-8-[(phénylméthyl)oxy]-2-quinoléinyl}propanedioate (20) :

Il est obtenu lors de la synthèse de **19**. Le composé **20** pur a été isolé dans le premier précipité formé en phase méthanolique, sous la forme d'une poudre blanche (0,16 g, 0,41 mmol, rendement = 16 %).

RMN- ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ , ppm : 7,60-7,53 (m, 4 H); 7,33-7,30 (m, 3 H); 7,23 (d, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 9,0\text{ Hz}$, 1 H); 6,92 (d, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 9,0\text{ Hz}$, 1 H); 5,24 (s, 2 H); 3,99 (s, 3 H); 3,82 (s, 6 H).

SM (DIC, NH_3) : $m/z = 396 (\text{MH}^+)$.

2-Oxo-1,2-dihydro-7-(méthyloxy)-8-[(phényléthyle) oxy] quinoléine (21) :

Il est obtenu lors de la synthèse de **19**. Le composé **21** a été purifié lors de la chromatographie préparatoire sur couche mince sous la forme d'une poudre blanche (0,04 g, 0,13 mmol, 5 %).

RMN- ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ , ppm : 8,87 (s, 1 H); 7,62 (d, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 9,5\text{ Hz}$, 1 H); 7,41-7,34 (m, 5 H); 7,25 (d, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 9,0\text{ Hz}$, 1 H); 6,86 (d, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 9,0\text{ Hz}$, 1 H); 6,44 (d, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 9,5\text{ Hz}$, 1 H); 5,15 (s, 2 H); 3,99 (s, 3 H).

SM (DIC, NH_3) : $m/z = 282 (\text{MH}^+)$.

2,2'-(Ethanediol)-bis (7-méthoxy-8-hydroxy-2-quinoléinium) dichloride (22, CT7)

Le composé **19** (40 mg, 0,06 mmol) est chauffé au reflux dans de l'acide chlorhydrique concentré (3 mL) pendant 90 minutes. Après refroidissement, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit obtenu est solubilisé dans du CH₃OH et versé sur 3 mL de diéther. Après centrifugation, le précipité obtenu est lavé avec 3 mL de diéther puis séché sous vide pour donner **22** sous la forme d'une poudre jaune (28 mg, 0,06 mmol, rendement = 98 %).

RMN-¹H (250 MHz, CD₃OD) δ , ppm : 8,97 (d, 3J (H, H) = 7,5 Hz, 2 H); 7,86 (s, 4 H); 7,68 (d, 3J (H, H) = 8,0 Hz, 2 H); 4,16 (s, 6 H).

RMN-¹³C (63 MHz, CD₃OD) δ , ppm : 152,5; 150,4; 147,6; 135,1; 129,8; 123,9; 120,4; 119,8; 117,2; 56,4 (CH₂); il manque le signal du CH₃ masqué par le pic du solvant RMN.

SM (DIC, NH₃) : m/z = 363 (MH⁺).

UV/vis [CH₃OH/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 203 (47 800), 246 (34 100, épaulement), 257 (49 800), 334 (3 500).

Ethyl(8-quinoléinyl)carbamate (23) :

A une solution sous azote de 8-aminoquinoléine (1,00 g, 6,94 mmol) dans de la pyridine sèche (20 mL) est ajouté du chloroformate d'éthyle (730 μ L, 7,64 mmol) et le mélange est agité 1 heure à température ambiante. La suspension obtenue est versée sur 200 mL d'eau, puis le précipité résultant est filtré, lavé à l'eau et séché sous vide pour donner **23** sous la forme d'une poudre beige (1,37 g, 6,34 mmol, rendement = 90 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 9,18 (s large, 1 H); 8,80 (dd, 3J (H, H) = 4,0 Hz, 4J (H, H) = 1,5 Hz, 1 H); 8,43 (d, 3J (H, H) = 7,5 Hz, 1 H); 8,14 (dd, 3J (H, H) = 8,0 Hz, 4J (H, H) = 1,5 Hz, 1 H); 7,53 (t, 3J (H, H) = 8,0 Hz, 1 H); 7,44 (m, 2 H); 4,30 (q, 3J (H, H) = 7,0 Hz, 2 H); 1,37 (t, 3J (H, H) = 7,0 Hz, 3 H).

RMN-¹³C (63 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 153,7 (Cq); 148,1 (CH); 138,2 (Cq); 136,2 (CH); 134,9 (Cq); 128,0 (Cq); 127,3 (CH); 121,6 (CH); 120,5 (CH); 114,6 (CH); 61,2 (CH₂); 14,6 (CH₃).

SM (DIC, NH₃) : m/z = 217 (MH⁺).

Analyse (%) pour C₁₂H₁₂N₂O₂·0,1 H₂O : calculé C 66,10; H 5,64; N 12,85; trouvé C 66,04; H 5,64; N 13,29.

Ethyl(8-quinoléinyl-N-oxyde)carbamate (24) :

Le composé **23** (7,00 g, 32,4 mmol) est ajouté à une solution refroidie à 0 °C d'acide *m*-chloroperbenzoïque à 77 % en masse (7,26 g, 32,4 mmol) dans du CH₂Cl₂ (500 mL). Le mélange est agité pendant 15 heures tout en laissant sa température remonter lentement jusqu'à la valeur ambiante. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ puis le solvant est évaporé. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice, élué par un gradient de 0 à 5 % de CH₃OH

dans CH₂Cl₂ (v/v) pour donner **24** sous la forme d'une poudre jaune pâle (5,17 g, 22,3 mmol, rendement = 69 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ, ppm : 8,66 (dd, ³*J* (H, H) = 8,0 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,5 Hz, 1 H); 8,34 (dd, ³*J* (H, H) = 6,0 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,0 Hz, 1 H); 7,73 (dd, ³*J* (H, H) = 7,5 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,0 Hz, 1 H); 7,55 (t, ³*J* (H, H) = 8,0 Hz, 1 H); 7,41 (dd, ³*J* (H, H) = 8,0 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,5 Hz, 1 H); 7,23 (m, 1 H); 4,25 (q, ³*J* (H, H) = 7,0 Hz, 2 H); 1,33 (t, ³*J* (H, H) = 7,0 Hz, 3 H).

RMN-¹³C (63 MHz, CDCl₃) δ, ppm : 153,7 (Cq); 137,1 (Cq); 134,7 (CH); 132,3 (Cq); 130,9 (Cq); 129,3 (CH); 128,6 (CH); 120,9 (CH); 120,5 (CH); 117,4 (CH); 60,9 (CH₂); 14,5 (CH₃).

SM (DIC, NH₃) : *m/z* = 233 (MH⁺).

Analyse (%) pour C₁₂H₁₂N₂O₃·0,1 H₂O : calculé C 61,58; H 5,25; N 11,97; trouvé C 61,40; H 5,19; N 12,28.

8-Aminoquinoléine-*N*-oxyde (**25**) :

A une solution de **24** (1,50 g, 6,47 mmol) dans l'éthanol (60 mL) est ajoutée 7,5 mL d'une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium 4,30 M. Le milieu réactionnel est chauffé au reflux durant 18 heures puis, après retour à température ambiante, il est ramené à pH neutre avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 0,1 M. Une partie du solvant est alors évaporée puis le produit est extrait avec du CH₂Cl₂ (3 × 100 mL) et lavé à l'eau. Le solvant des phases organiques réunies est évaporé pour obtenir, après séchage sous vide, **25** sous la forme d'une poudre brune (1,01 g, 6,31 mmol, rendement = 97 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ, ppm : 8,16 (dd, ³*J* (H, H) = 6,0 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,0 Hz, 1 H); 7,54 (dd, ³*J* (H, H) = 8,0 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,0 Hz, 1 H); 7,26 (dd, ³*J* (H, H) = 8,0 Hz, ³*J* (H, H) = 6,0 Hz, 1 H); 7,07 (m, 1 H); 6,97 (dd, ³*J* (H, H) = 8,0 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,0 Hz, 1 H); 6,69 (dd, ³*J* (H, H) = 8,0 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,0 Hz, 1 H); 6,45 (s large, 2H).

RMN-¹³C (63 MHz, CDCl₃) δ, ppm : 143,4 (Cq); 135,4 (CH); 133,5 (Cq); 131,0 (Cq); 129,4 (CH); 127,6 (CH); 120,4 (CH); 114,9 (CH); 113,2 (CH).

SM (DIC, NH₃) : *m/z* = 161 (MH⁺).

Analyse (%) pour C₉H₈N₂O : calculé C 67,49; H 5,03; N 17,49; trouvé C 67,34; H 5,01; N 17,33.

Ethyl(2-oxo-1,2-dihydro-8-quinoléinyl)carbamate (**26**) :

Une suspension de **24** (1,00 g, 4,31 mmol) et de diméthylmalonate (0,52 mL, 4,53 mmol) dans de l'anhydride acétique (2 mL) est agitée durant 27 jours à température ambiante protégée de l'humidité (grâce à un tube de CaCl₂) et de la lumière. Du CH₃OH (1 mL) est ajouté à la suspension orange obtenue. Après 90 minutes d'agitation à température ambiante, de l'eau (5 mL) est ajoutée en deux temps et le mélange est maintenu sous agitation 2 heures de plus. Un précipité est alors collecté par filtration et lavé avec un mélange CH₃CO₂H/H₂O (1/1, v/v, 30 mL) puis à l'eau avant d'être séché 15

heures à 110 °C pour donner **26** sous la forme d'une poudre blanche (0,64 g, 2,76 mmol, rendement = 64 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ, ppm : 10,31 (s, 1 H), 8,33 (s large, 1 H); 8,03 (d large, ³J(H, H) = 7,5 Hz, 1 H); 7,85 (d, ³J(H, H) = 9,5 Hz, 1 H); 7,37 (dd, ³J(H, H) = 8,0 Hz, ⁴J(H, H) = 1,5 Hz, 1 H); 7,25 (m, 1 H); 6,71 (d, ³J(H, H) = 9,5 Hz, 1 H); 4,28 (q, ³J(H, H) = 7,0 Hz, 2 H), 1,37 (t, ³J(H, H) = 7,0 Hz, 3 H).

RMN-¹³C (63 MHz, CDCl₃) δ, ppm : 164,3 (Cq); 155,0 (Cq); 142,0 (CH); 130,2 (Cq); 125,3 (Cq); 124,4 (Cq); 123,6 (CH), 123,0 (CH); 120,8 (CH); 120,7 (CH); 61,5 (CH₂); 14,6 (CH₃).

SM (DIC, NH₃) : m/z = 233 (MH⁺).

2-Oxo-1,2-dihydro-8-(acétamide)quinoléine (**27**) :

A une suspension de **25** (0,45 g, 2,81 mmol) et de diméthylmalonate (0,34 mL, 2,95 mmol) est ajouté de l'anhydride acétique (1,2 mL). Après 15 minutes, du CH₂Cl₂ sec (1,2 mL) est ajouté et la solution brune est agitée durant 26 jours à température ambiante protégée de l'humidité (grâce à un tube de CaCl₂) et de la lumière. Du CH₂Cl₂ (3 mL) est ajouté pour solubiliser la suspension obtenue, puis du CH₃OH (1,2 mL). Après 2 heures d'agitation à température ambiante, de l'eau (3 mL) est ajoutée en deux temps et le mélange est maintenu sous agitation 2 heures de plus. Un précipité est alors collecté par filtration et lavé avec un mélange CH₃CO₂H/eau (1/1, v/v, 30 mL) puis à l'eau avant d'être séché 15 heures à 110 °C pour donner **27** sous la forme d'une poudre blanche (0,31 g, 1,53 mmol, rendement = 55 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ, ppm : 9,08 (s, 1 H); 8,30 (dd, ³J(H, H) = 8,0 Hz, ⁴J(H, H) = 1,0 Hz, 1 H); 7,91 (d, ³J(H, H) = 9,5 Hz, 1 H); 7,41 (dd, ³J(H, H) = 8,0 Hz, ⁴J(H, H) = 1,0 Hz, 1 H); 7,29 (m, 1 H); 6,70 (d, ³J(H, H) = 9,5 Hz, 1 H); 2,44 (s, 3 H).

SM (DIC, NH₃) : m/z = 203 (MH⁺), 220 (MNH₄⁺).

2-Chloro-8-nitroquinoléine (**28**) :

Il a été préparé selon la référence : Kimber *et al.*, 2003. De la 2-chloroquinoléine (1,50 g, 9,17 mmol) est dissoute dans 6 mL d'H₂SO₄ concentré. La solution jaune obtenue est refroidie à 0 °C puis du nitrate de potassium (1,30 g, 12,84 mmol) est ajouté par petites portions. Le mélange est agité pendant 1 nuit avec un retour lent à température ambiante. La solution orange obtenue est versée sur de la glace et le précipité blanc formé est extrait à l'acétate d'éthyle (3 × 150 mL). La phase organique est concentrée sous pression réduite et le produit résultant est chromatographié sur gel de silice élué avec CH₂Cl₂/hexane (80/20, v/v) et le solvant est évaporé pour donner **28** sous la forme d'une poudre blanche (1,00 g, 4,80 mmol, rendement = 52 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 8,21 (d, ³*J* (H, H) = 8,5 Hz, 1 H); 8,10 (dd, ³*J* (H, H) = 7,5 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,5 Hz, 1 H); 8,05 (dd, ³*J* (H, H) = 8,0 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,5 Hz, 1 H); 7,65 (m, 1 H); 7,55 (d, ³*J* (H, H) = 8,5 Hz, 1 H).

RMN-¹³C (63 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 153,5 (Cq); 147,1 (Cq); 138,9 (Cq); 138,8 (CH); 131,9 (CH); 127,6 (Cq); 125,8 (CH); 125,0 (CH); 124,5 (CH).

SM (DIC, NH₃) : *m/z* = 209 (MH⁺), 226 (MNH₄⁺), 243 (MN₂H₇⁺).

Analyse (%) pour C₉H₅N₂O₂Cl : calculé C 51,82; H 2,42; N 13,43; trouvé C 51,76; H 2,37; N 13,24.

La structure de la molécule a été confirmée par analyse par diffraction de rayons X sur des monocristaux obtenus par cristallisation du produit dans du chloroforme deutéré.

Paramètres de l'analyse cristalline : Système cristallin orthorhombique, *P* c a 2₁.

a = 18,090(4) Å, *b* = 3,7781(7) Å, *c* = 12,581(2) Å, α = 90 °, β = 90 °, γ = 90 °. *R*₁ = 0,0629.

2,2'-(1,2-Ethanediy)-bis[8-(méthyloxy)quinoléine] (29) :

Une solution sous argon de **9** (5,32 g, 30,75 mmol) dans 47 mL de THF sec est refroidie à -95 °C à l'aide d'un mélange méthanol/azote liquide. Une solution 1,5 M de diisopropylamine de lithium·THF dans du cyclohexane (20,5 mL, 30,7 mmol) et de THF sec (63 mL) est ajouté sur 2 heures. La solution est agitée 2 heures de plus à -95 °C puis du 1,2-dibromoéthane (5,30 mL, 61,5 mmol) est ajouté. Le mélange est ramené à température ambiante et agité durant 15 heures. De l'eau (32 mL) est alors ajoutée entraînant la formation d'un précipité blanc qui est récupéré par filtration. Le filtrat est concentré sous vide et chromatographié sur une colonne de gel de silice élué avec un gradient de 0 à 90 % d'acétate d'éthyle dans CHCl₃ (v/v). Le produit obtenu par chromatographie et le précipité sont réunis et cristallisés à chaud dans du CH₃OH pour donner **29** sous la forme d'un solide blanc (2,04 g, 5,93 mmol, rendement = 38 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 8,04 (d, ³*J* (H, H) = 8,5 Hz, 2 H); 7,40 (d, ³*J* (H, H) = 8,5 Hz, 2 H); 7,39 (m, 2 H); 7,35 (dd, ³*J* (H, H) = 8,0 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,5 Hz, 2 H); 7,06 (dd, ³*J* (H, H) = 7,5 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,5 Hz, 2 H); 4,10 (s, 6 H); 3,61 (s, 4 H).

SM (DIC, NH₃) *m/z* (%) : 345 (MH⁺).

2,2'-(1,4-Butanediy)-bis[8-(méthyloxy)quinoléine] (30) :

Il est obtenu comme principal sous-produit dans le surnageant méthanolique de cristallisation de **29**. Une seconde cristallisation dans CH₃OH permet d'obtenir une solution méthanolique pure du produit désiré. Le solvant est alors évaporé pour donner, après séchage sous vide, **30** sous la forme d'une poudre blanche (0,68 g, 1,84 mmol, rendement = 6 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 8,01 (d, ³*J* (H, H) = 8,5 Hz, 2 H); 7,40 (d, ³*J* (H, H) = 8,5 Hz, 2 H); 7,39 (m, 2 H); 7,35 (dd, ³*J* (H, H) = 8,0 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,5 Hz, 2 H); 7,06 (dd, ³*J* (H, H) = 7,5 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,5 Hz, 2 H); 4,01 (s, 6H); 3,10 (m, 4 H); 1,95 (m, 4 H).
SM (DIC, NH₃) *m/z* : 373 (MH⁺).

2,2'-(1,2-Ethanediy)l-bis(8-hydroxyquinoléine) (31, CT8) :

Voie A : Une solution de **29** (2,83 g, 8,23 mmol) dans de l'acide bromhydrique à 48 % (150 mL) est chauffée à reflux durant 24 heures. Après refroidissement à température ambiante, le pH du mélange est neutralisé avec une solution aqueuse de soude 3 M entraînant la formation d'un précipité vert. Le produit est extrait au CH₂Cl₂ puis lavé à l'eau et à la saumure. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ anhydre et le solvant évaporé sous vide pour donner **31** sous forme d'une poudre vert pâle (2,53 g, 8,00 mmol, rendement = 97 %).

Voie B : Une solution sous argon de 8-hydroxyquinoléine (1,00 g, 6,29 mmol) dans 10 mL de THF sec est refroidie à -95 °C par un bain méthanol/azote liquide. Une solution 1,5 M de diisopropylamine de lithium·THF dans du cyclohexane (8,40 mL, 12,58 mmol) et de THF sec (12,5 mL) est ajoutée sur 45 minutes. La solution est agitée 90 minutes de plus à -95 °C puis du 1,2-dibromoéthane (1,08 mL, 12,58 mmol) est ajouté. Le mélange est ramené à température ambiante et agité durant 15 heures. De l'eau (12 mL) est alors ajoutée entraînant la formation d'un précipité beige qui est récupéré par filtration et lavé à l'eau. Le précipité est repris dans 150 mL de CH₂Cl₂ et quelques gouttes de CH₃CO₂H sont ajoutées pour solubiliser le produit. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (2 × 100 mL) puis à l'eau (100 mL) et le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner, après séchage sous vide, **31** sous la forme d'une poudre vert pâle (0,51 g, 1,62 mmol, rendement = 52 %).

RMN -¹H (250 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 9,35 (s large, 2 H); 8,20 (d, ³*J* (H, H) = 8,5 Hz, 2 H); 7,53 (d, ³*J* (H, H) = 8,5 Hz, 2 H); 7,37 (m, 2 H); 7,32 (dd, ³*J* (H, H) = 6,5 Hz, ⁴*J* (H, H) = 2,0 Hz, 2 H); 7,05 (dd, ³*J* (H, H) = 6,5 Hz, ⁴*J* (H, H) = 2,0 Hz, 2 H); 3,57 (s, 4H).

SM (DIC, NH₃) *m/z* : 317 (MH⁺).

Analyse (%) pour C₂₀H₁₆N₂O₂·0,1NaBr : calculé C 73,53; H 4,93; N 8,58; trouvé C 73,81; H 4,73; N 8,50.

UV/vis [CH₃OH/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 204 (71 800), 248 (74 200), 305 (5 200).

2,2'-(1,4-Butanediy)l-bis(8-hydroxyquinoléine) (32, CT9) :

Le composé **30** (50 mg, 0,13 mmol) est chauffé à reflux dans de l'acide bromhydrique à 48 % (2,7 mL) durant 24 heures. Après refroidissement à 4 °C à l'aide d'un bain de glace, le mélange réactionnel est basifié jusqu'à pH = 8 avec une solution aqueuse de soude 3 M (5 mL, 15 mmol) et une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (2 mL). Le volume est amené à 15 mL avec de l'eau et la phase aqueuse est extraite avec du CH₂Cl₂ (3 × 10 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées avec de l'eau (10 mL), puis le solvant est évaporé sous vide. Le produit est alors purifié par chromatographie flash sur gel de silice élué avec un mélange CH₂Cl₂/CH₃OH/CH₃COOH (96/3/1, v/v/v). Les dernières fractions sont réunies, le solvant est évaporé et elles sont redissoutes dans un mélange de 10 mL de CH₂Cl₂ et de tampon acétate de sodium (10 mL, 0,1 M, pH = 7,0). La phase organique est récupérée et donne après évaporation du solvant **32** sous la forme d'une poudre blanche (34 mg, 0,10 mmol, rendement = 77 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ, ppm : 8,04 (d, ³J (H, H) = 8,5 Hz, 2 H); 7,38 (m, 2 H); 7,31-7,25 (m, 4 H); 7,15 (dd, ³J (H, H) = 7,5 Hz, ⁴J (H, H) = 1,0 Hz, 2 H); 3,02 (m, 4 H); 1,93 (m, 4 H).

SM (DIC, NH₃) m/z : 345 (MH⁺).

Analyse (%) pour C₂₂H₂₀N₂O₂·0,25 H₂O : calculé C 75,73; H 5,92; N 8,35; trouvé C 75,39; H 5,69; N 8,63.

UV/vis [CH₃OH/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4, NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ε M⁻¹ cm⁻¹) = 202 (81 300), 244 (90 800), 303 (6 300).

2,2',2''-(1,2,3-Propanetriyl)-tris[8-(méthyloxy)quinoléine] (**33**) :

A une solution de **9** (1,41 g, 8,14 mmol) dans du THF sec (20 mL), sous argon et refroidie sur bain de glace, est ajoutée une solution 1,5 M de diisopropylamine de lithium·THF dans du cyclohexane (20 mL, 30,52 mmol) sur une période d'une minute. La solution est agitée 1 heure à 4 °C puis du CuCl₂ sec (1,32 g, 9,81 mmol) est ajouté et le mélange est agité 36 heures à température ambiante sous argon. De l'eau (100 mL) est alors ajoutée et le produit est extrait avec du CHCl₃, lavé avec de la saumure et le solvant est évaporé. Le produit est alors chromatographié sur une colonne de gel de silice élué avec un gradient de 20 à 100 % d'acétate d'éthyle dans du CHCl₃ (v/v). Le produit résultant est dissous dans du CH₂Cl₂ et lavé avec une solution aqueuse d'EDTA pour enlever des traces d'ions cuivriques puis de nouveau chromatographié selon les conditions précédentes pour donner **33** sous la forme d'une poudre blanche (0,15 g, 0,29 mmol, rendement = 11 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ, ppm : 7,81 (d, ³J (H, H) = 8,5 Hz, 1 H); 7,75 (d, ³J (H, H) = 8,5 Hz, 2 H); 7,37-7,18 (m, 9 H); 7,00 (dd, ³J (H, H) = 7,5 Hz, ⁴J (H, H) = 1,5 Hz, 1 H); 6,95 (dd, ³J (H, H) = 7,5 Hz, ⁴J (H, H) = 1,5 Hz, 1 H); 4,49 (système

ABX, $^3J_{AX}$ (H, H) = 8,0 Hz, $^3J_{BX}$ (H, H) = 7,0 Hz, 1 H); 4,05 (s, 3 H); 4,01 (s, 6 H); 3,78 (système ABX, $^2J_{AB}$ (H, H) = 14,0 Hz, $^3J_{AX}$ (H, H) = 8,0 Hz, 2 H); 3,62 (système ABX, $^2J_{AB}$ (H, H) = 14,0 Hz, $^3J_{BX}$ (H, H) = 7,0 Hz, 2 H).
SM (DIC, NH₃) : m/z = 516 (MH⁺).

2,2',2''-(1,2,3-Propanetriyl)-tris(8-hydroxyquinoléine) (34, CT10) :

Le composé **33** (30 mg, 0,058 mmol) est chauffé à reflux dans de l'acide bromhydrique à 48 % (1,2 mL) durant 36 heures. L'acide est évaporé sous vide et le résidu est dissous dans un mélange de 10 mL de CH₂Cl₂ et de 10 mL de tampon acétate de sodium (0,1 M; pH = 7,0). La phase organique est collectée et la phase aqueuse est ensuite extraite avec du CH₂Cl₂ (2 × 10 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées à l'eau (10 mL), puis le solvant est évaporé sous vide pour donner **34** sous la forme d'une poudre orange (20 mg, 0,042 mmol, rendement = 73 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 7,94 (d, 3J (H, H) = 8,0 Hz, 1 H); 7,91 (d, 3J (H, H) = 8,0 Hz, 2 H); 7,42-7,10 (m, 12 H) ; 4,47 (système ABX, $^3J_{AX}$ (H, H) = 8,0 Hz, $^3J_{BX}$ (H, H) = 6,5 Hz, 1 H); 3,71 (système ABX, $^2J_{AB}$ (H, H) = 14,5 Hz, $^3J_{AX}$ (H, H) = 8,0 Hz, 2 H); 3,57 (système ABX, $^2J_{AB}$ (H, H) = 14,5 Hz, $^3J_{BX}$ (H, H) = 6,5 Hz, 2 H).

SM (DIC, NH₃) : m/z = 474 (MH⁺).

Analyse (%) pour C₃₀H₂₃N₃O₃·0,5 H₂O : calculé C 74,67; H 5,01; N 8,71; trouvé C 74,54; H 5,09; N 9,19.

UV/vis [CH₃OH/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 204 (106 000), 248 (113 000), 302 (9 200).

2,2'-(1,2-Ethanediyol)-bis(5-chloro-8-hydroxyquinoléine) (35, CT11) :

A une solution de **31** (300 mg, 0,95 mmol) dans du H₂SO₄ à 97 % (9,5 mL) et refroidie sur bain de glace est ajouté du *N*-chlorosuccinimide (253 mg, 1,90 mmol) par petites portions. Le mélange est agité 15 minutes à 0 °C puis 3 heures à température ambiante. Il est ensuite versé sur de la glace pour donner une suspension jaune dont le pH est neutralisé avec une solution aqueuse de soude 3 M. Un précipité vert est alors filtré et séché sous vide avant d'être dissous dans 200 mL de DMF et précipité deux fois à 4 °C avec 200 mL d'eau et filtré pour donner après séchage **35** sous la forme d'un solide vert pâle (258 mg, 0,67 mmol, rendement = 71 %).

RMN-¹H (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ , ppm : 9,73 (s large, 2 H); 8,37 (d, 3J (H, H) = 8,5 Hz, H₄, 2 H); 7,70 (d, 3J (H, H) = 8,5 Hz, H₃, 2 H); 7,52 (d, 3J (H, H) = 8,0 Hz, H₆, 2 H); 7,06 (d, 3J (H, H) = 8,0 Hz, H₇, 2 H); 3,64 (s, 4H).

RMN-¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ , ppm : 161,5 (C₂); 153,0 (C₈); 139,2 (C₁₋₈); 133,5 (C₄); 127,4 (C₆); 125,4 (C₄₋₅); 124,4 (C₃); 119,6 (C₅); 112,1 (C₇); 37,1 (CH₂).
 L'attribution complète des signaux RMN ¹H et ¹³C par NOE 1D et HMQC ¹H/¹³C a permis d'attribuer la position de l'halogène.

SM (DIC, NH₃) m/z : 385 (MH⁺).

Analyse (%) pour C₂₀H₁₄Cl₂N₂O₂·0,1 Na₂SO₄ : calculé C 60,14; H 3,53; N 7,01; trouvé C 59,92; H 3,07; N 6,65.

UV/vis [dioxane/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ε M⁻¹ cm⁻¹) = 254 (75 000), 313 (7 200).

2,2'-(1,2-Ethanediy)-bis(5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoléine) (36, CT12) :

A une solution sous azote de **35** (300 mg, 0,78 mmol) dans 12 mL de CH₃OH est ajouté 250 μL de H₂SO₄ à 97 % pour donner une suspension jaune qui est refroidie sur bain de glace. Du *N*-iodosuccinimide (418 mg, 1,86 mmol) est alors ajouté lentement et le mélange est agité 15 minutes à 0° C puis 5 jours à température ambiante. Il est ensuite versé sur de la glace et décoloré par addition de Na₂S₂O₅ (450 mg). La suspension est ramenée à pH neutre avec de l'ammoniaque puis elle est centrifugée. Le surnageant est enlevé, le précipité est dissous dans du CH₂Cl₂ et lavé avec du tampon Tris·HCl (0,1 M; pH = 7,0). Le solvant de la phase organique est évaporé sous vide pour donner **36** sous la forme d'une poudre jaune (350 mg, 0,55 mmol, rendement = 70 %).

RMN-¹H (250 MHz, DMSO-d₆) δ, ppm : 8,36 (d, ³J (H, H) = 8,5 Hz, 2 H); 7,90 (s, 2 H); 7,70 (d, ³J (H, H) = 8,7 Hz, 2 H); 3,68 (s, 4 H).

RMN-¹³C (63 MHz, DMSO-d₆) δ, ppm : 162,1 (Cq); 153,1 (Cq); 137,3 (Cq); 134,4 (CH); 133,5 (CH); 124,6 (Cq); 124,5 (CH); 120,2 (Cq); 78,4 (Cq); 37,1 (CH₂).

SM (DIC, NH₃) m/z : 637 (MH⁺).

Analyse (%) pour C₂₀H₁₄Cl₂I₂N₂O₂ : calculé C 37,71; H 1,90; N 4,40; trouvé C 38,15; H 2,04; N 4,15.

UV/vis [DMSO/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (8/2, v/v)] : λ nm (ε M⁻¹ cm⁻¹) = 262 (69 500), 319 (7 900).

7-Bromo-2-méthyl-8-hydroxyquinoléine (37) :

De la *tert*-butylamine (3,23 mL, 30,78 mmol) est agitée sous argon dans 100 mL de toluène pendant 2 heures à température ambiante, en présence de tamis moléculaire 4 Å activé (10 g). Après refroidissement à -70 °C, du *N*-bromosuccinimide (5,48 g, 30,78 mmol) et de la 2-méthyl-8-hydroxyquinoléine (5,00 g, 30,78 mmol) sont ajoutés successivement. La température du mélange est lentement ramenée à la valeur ambiante. Le milieu réactionnel est filtré et le tamis moléculaire est lavé avec du diéthyléther (20 mL). Le filtrat est lavé à l'eau (3 × 50 mL), séché sur Na₂SO₄ anhydre et la phase organique est concentrée pour donner un solide qui est porté à reflux dans 100 mL d'hexane pendant 1 heure. Après 24 heures à température ambiante, le précipité est filtré

et séché sous vide pour donner **37** sous la forme d'une poudre blanche (4,85 g, 20,47 mmol, rendement = 67 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 8,00 (d, ³*J* (H, H) = 8,5 Hz, 1 H); 7,52 (d, ³*J* (H, H) = 9,0 Hz, 1 H); 7,31 (d, ³*J* (H, H) = 8,5 Hz, 1 H); 7,16 (d, ³*J* (H, H) = 9,0 Hz, 1 H); 2,72 (s, 3 H).

RMN-¹³C (63 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 157,9; 149,2; 137,7; 136,2; 130,1; 125,4; 122,9; 118,2; 103,9; 24,8;

SM (DIC, NH₃) : *m/z* = 238 (MH⁺).

Analyse (%) pour C₁₀H₈BrNO : calculé C 50,45; H 3,39; N 5,88; trouvé C 50,02; H 3,37; N 6,12.

7-Méthoxy-2-méthyl-8-hydroxyquinoléine (**38**) :

A une solution de **37** (1,00 g, 4,22 mmol) dans du DMF (60 mL) est ajoutée une solution de CH₃ONa (30 % en masse) dans du CH₃OH (8,04 mL, 42,2 mmol). Le mélange est agité pendant 10 minutes sous argon. CuCl₂·2H₂O (0,22 g, 1,27 mmol) est additionné et le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 30 heures. Après refroidissement, de l'eau (50 mL) et de l'EDTA disodium dihydrate (10 g, 27 mmol) sont ajoutés et le milieu est agité pendant 1 heure. La solution est légèrement acidifiée avec du CH₃CO₂H (3 mL, pH = 4-5) et ensuite doucement re-basifiée avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (3 mL, pH = 8-9). La phase aqueuse est extraite au CH₂Cl₂ (3 × 100 mL). Les phases organiques combinées sont séchées sur Na₂SO₄ anhydre et concentrées sous pression réduite. Le solide obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice élué à l'aide d'un gradient de CH₂Cl₂/CH₃OH/ CH₃CO₂H (94/4/2, v/v) à CH₂Cl₂/CH₃OH/CH₃CO₂H (94/5/1, v/v) puis à CH₂Cl₂/CH₃OH (94/6, v/v). Les fractions contenant le produit sont combinées et lavées avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (3 × 100 mL). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ anhydre et le solvant est évaporé pour donner **38** sous la forme d'une poudre blanche (0,48 g, 2,54 mmol, rendement = 60 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 7,95 (d, ³*J* (H, H) = 8,5 Hz, 1 H); 7,26 (s, 2 H); 7,15 (d, ³*J* (H, H) = 8,5 Hz, 1 H); 4,03 (s, 3 H); 2,69 (s, 3 H).

RMN-¹³C (63 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 157,6 (Cq); 143,9 (Cq); 139,3 (Cq); 138,0 (Cq); 136,0 (CH); 121,7 (Cq); 120,6 (CH); 117,3 (CH); 115,2 (CH); 57,2 (CH₃); 25,1 (CH₃).

SM (DIC, NH₃) : *m/z* = 190 (MH⁺).

Analyse (%) pour C₁₁H₁₁NO₂ : calculé C 69,83; H 5,86; N 7,40; trouvé C 69,40; H 5,85; N 7,47.

2,2'-(1,2-Ethanediylo)-bis(7-(méthoxy)-8-hydroxyquinoléine) (**39**, CT13) :

Du **38** (0,50 g; 2,64 mmol) est agité sous argon dans 10 mL de THF distillé pendant 30 minutes à température ambiante, en présence de tamis moléculaire 4 Å activé (2,0 g). Après refroidissement à -90 °C, une solution de diisopropylamine de lithium·THF 1,5 M dans le cyclohexane (3,70 mL, 5,56 mmol) est ajoutée goutte à goutte sur une période de 10 minutes. La température du mélange est ensuite ramenée lentement à -50 °C, puis refroidie à nouveau à -90 °C. Du 1,2-dibromoéthane (0,50 mL, 5,82 mmol) est ajouté et la température du mélange est ramené à la valeur ambiante en présence du bain froid. De l'eau (5 mL) et CH₃CO₂H (0,5 mL, pH = 4-5) sont ajoutés et le milieu est agité pendant 1 heure. Le tamis moléculaire est éliminé par filtration et est lavé successivement avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (10 mL), de l'eau (10 mL) et du diéthyléther (40 mL). Le filtrat biphasique est transféré dans une ampoule à décanter et la phase organique collectée. La phase aqueuse est extraite au diéthyléther (3 × 50 mL) et les phases organiques combinées sont séchées sur Na₂SO₄ anhydre puis le solvant est évaporé. Le solide résultant est dissous à chaud dans du CH₃OH (10 mL) et, après trois jours à température ambiante, un précipité blanc est collecté, donnant **39** pur après séchage sous vide (0,31 g, 0,81 mmol, rendement = 62 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ, ppm : 8,00 (d, ³J (H, H) = 8,5 Hz, 2 H); 7,28 (s, 4 H); 7,24 (d, ³J (H, H) = 8,5 Hz, 2 H); 4,04 (s, 6 H); 3,57 (s, 4 H).

RMN-¹³C (63 MHz, CDCl₃) δ, ppm : 160,1 (Cq); 144,0 (Cq); 139,3 (Cq); 137,9 (Cq); 136,3 (CH); 121,9 (Cq); 120,4 (CH); 117,5 (CH); 115,5 (CH); 57,2 (CH₃); 37,1 (CH₂).

SM (DIC, NH₃) : m/z = 377 (MH⁺).

Analyse (%) pour C₂₂H₂₀N₂O₄·0,2 H₂O : calculé C 69,53; H 5,41; N 7,37; trouvé C 69,40; H 5,30; N 7,47.

UV/vis [CH₃OH/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)]: λ nm (ε M⁻¹ cm⁻¹) = 204 (83 000), 208 (53 200, épaulement), 252 (97 200), 338 (6 600).

2-Méthyl-8-aminoquinoléine (**40**) :

Il a été préparé selon les références suivantes : Xue *et al.*, 2001 et Belser *et al.*, 1996. A une solution de 2-méthyl-8-nitroquinoléine (3,00 g, 15,96 mmol) dans 100 mL d'acétate d'éthyle est ajouté du palladium sur charbon à 10 % en masse (580 mg). Le milieu est placé sous atmosphère de dihydrogène (1 bar) et agité à température ambiante pendant 20 heures. Après élimination du palladium sur charbon par filtration sur célite, la phase organique est concentrée sous pression réduite et le produit est séché sous vide pour donner **40** sous la forme d'une poudre jaune (2,52 g, 15,96 mmol, rendement quantitatif).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ, ppm : 7,95 (d, ³J (H, H) = 8,5 Hz, 1 H); 7,25 (m, 2

H); 7,12 (dd, 3J (H, H) = 8,0 Hz, 4J (H, H) = 1,0 Hz, 1 H); 6,91 (dd, 3J (H, H) = 7,5 Hz, 4J (H, H) = 1,0 Hz, 1 H); 4,95 (s large, 2 H); 2,73 (s, 3 H).

RMN- ^{13}C (63 MHz, CDCl_3) δ , ppm : 156,2 (Cq); 143,3 (Cq); 137,9 (Cq); 136,1 (CH); 126,9 (Cq); 126,4 (CH); 122,2 (CH); 115,9 (CH); 110,2 (CH); 25,2 (CH_3).

SM (DIC, NH_3) : m/z = 159 (MH^+).

***N,N'*-Bis(2-méthyl-8-quinoléinyl)-1,2-éthanediamine (41, CT20) :**

Une solution sous argon de **30** (50 mg, 3,16 mmol) dans 5 mL de THF sec est refroidie à -90 °C à l'aide d'un mélange méthanol/azote liquide. Une solution de diisopropylamine de lithium·THF 1,5 M dans le cyclohexane (4,2 mL, 6,33 mmol) et de 7,5 mL de THF est ajoutée sur 30 minutes. La solution est agitée 90 minutes de plus à -90 °C puis du 1,2-dibromoéthane (0,55 mL, 6,33 mmol) est ajouté goutte à goutte. Le mélange est ramené à température ambiante et agité durant 15 heures. De l'eau (6 mL) est alors ajoutée et le mélange est agité 90 minutes à température ambiante. Le THF est évaporé sous pression réduite et la phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 (75 mL) puis avec de l'eau (75 mL) et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le brut de réaction est alors chromatographié sur une colonne de silice, élué avec un gradient de 0 à 100 % d'acétate d'éthyle dans CH_2Cl_2 (v/v). Le produit est ensuite redissous dans 1 mL de CH_2Cl_2 et précipité par l'ajout de 6 mL d'hexane. Il est alors filtré et rincé à l'hexane pour donner, après séchage sous vide, **31** sous la forme d'une poudre blanche (34 mg, 0,10 mmol, rendement = 6 %).

RMN- ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ , ppm : 7,95 (d, 3J (H, H) = 8,5 Hz, 2 H); 7,33 (m, 2 H); 7,24 (d, 3J (H, H) = 8,5 Hz, 2 H); 7,03 (d, 3J (H, H) = 8,0 Hz, 2 H); 6,78 (d, 3J (H, H) = 7,5 Hz, 2 H); 6,45 (s large, 2 H); 3,75 (m, 4 H); 2,68 (s, 6 H).

RMN- ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ , ppm : 155,7; 144,1; 137,5; 136,2; 126,8; 126,7; 122,2; 114,0; 105,0; 42,8; 25,0.

SM (DIC, NH_3) : m/z = 343 (MH^+).

Analyse (%) pour $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_4 \cdot 0,3\text{CH}_2\text{Cl}_2$: calculé C 72,80; H 6,19; N 15,23; trouvé C 72,41; H 6,02; N 14,87.

UV/vis [$\text{CH}_3\text{OH}/\text{Tris}\cdot\text{HCl}$ 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) = 254 (44 200), 341 (6 000).

8-(1-Aziridinyl)-2-méthylquinoléine (42) :

Il est obtenu lors de la synthèse de **41**. A l'issue de la chromatographie du brut réactionnel sur colonne de silice, les fractions contenant le produit sont réunies. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le produit est séché sous vide pour donner **42** sous la forme d'une poudre marron (58 mg, 0,31 mmol, rendement = 10 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 7,98 (d, ³*J* (H, H) = 8,5 Hz, 1 H); 7,40-7,30 (m, 3 H); 7,12 (dd, ³*J* (H, H) = 7,0 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,5 Hz, 1 H); 2,79 (s, 3 H), 2,32 (s, 4 H).

SM (DIC, NH₃) : *m/z* = 185 (MH⁺).

***N*-Méthyl -2-méthyl-8-quinoléineamine (43) :**

A une solution de **40** (1,00 g, 6,33 mmol) dans du DMF sec (30 mL) et refroidie à 0 °C est ajouté du NaH à 60 % dans l'huile (0,27 g, 6,65 mmol). Le mélange est agité 10 minutes à 0 °C, puis de l'iodure de méthyle (1,58 mL, 25,39 mmol) est ajouté goutte à goutte. L'agitation est poursuivie pendant 10 heures en laissant la température du milieu remonter lentement à la valeur ambiante. De l'eau (50 mL) est alors ajoutée et le précipité formé est récupéré par filtration. Le filtrat est évaporé, repris avec du CH₂Cl₂ (200 mL) et lavé à l'eau. Le solvant de la phase organique est évaporé, puis le solide obtenu et le précipité précédemment recueilli sont regroupés. Le produit est chromatographié sur une colonne de gel de silice élué avec un gradient de 0 à 1 % de CH₃OH dans du CH₂Cl₂ (v/v) pour donner, après évaporation du solvant, **43** sous la forme d'une poudre brune (0,31 g, 1,79 mmol, rendement = 28 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 7,94 (d, ³*J* (H, H) = 8,5 Hz, 1 H); 7,34 (t, ³*J* (H, H) = 8,0 Hz, 1 H); 7,24 (d, ³*J* (H, H) = 8,5 Hz, 1 H); 7,01 (dd, ³*J* (H, H) = 8,0 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,0 Hz, 1 H); 6,62 (d large, ³*J* (H, H) = 8,0 Hz, 1 H); 6,14 (s large, 1 H); 3,04 (s, 3 H); 2,70 (s, 3 H).

SM (DIC, NH₃) : *m/z* = 173 (MH⁺).

2-Butylamino-8-nitroquinoléine (44) :

Le composé **28** (0,20 g, 0,96 mmol) est mis en suspension dans 9,5 mL de 1-butylamine et le milieu est chauffé au reflux (78°C) pendant 15 heures. La solution jaune obtenue est ensuite concentrée sous vide. Le produit est repris dans un volume minimum de CH₃OH et versé sur 3 mL de diéthyléther. Après centrifugation, des cristaux de chlorure de butylammonium sont éliminés par filtration et le surnageant est concentré sous pression réduite pour donner **44** sous la forme d'une huile jaune (0,21 g, 0,86 mmol, rendement = 90 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 7,83 (dd, ³*J* (H, H) = 7,5 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,5 Hz, 1 H); 7,77 (d, ³*J* (H, H) = 9,0 Hz, 1 H); 7,69 (dd, ³*J* (H, H) = 8,0 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,5 Hz, 1 H); 7,14 (m, 1 H), 6,67 (d, ³*J* (H, H) = 9,0 Hz, 1 H); 5,07 (s large, 1 H); 3,47 (m, 2 H); 1,60 (m, 2 H); 1,39 (m, 2 H); 0,93 (t, ³*J* (H, H) = 7,5 Hz, 3 H).

RMN-¹³C (63 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 157,8 (Cq); 145,6 (Cq); 140,2 (Cq); 136,7 (CH); 131,5 (CH); 124,7 (CH); 124,1 (CH); 119,7 (CH); 113,3 (Cq); 41,3 (CH₂); 31,5 (CH₂); 20,2 (CH₂); 13,8 (CH₃).

SM (DIC, NH₃) : *m/z* = 246 (MH⁺).

Analyse (%) pour $C_{13}H_{15}N_3O_2$: calculé C 63,66; H 6,16; N 17,13; trouvé C 63,33; H 6,16; N 16,64.

***N*-Butyl-2,2'-imino-bis(8-nitroquinoléine) (45) :**

A une suspension violette de **44** (0,17 g, 0,690 mmol), de tris(dibenzylidène-acétone)-dipalladium(0) (13 mg, 0,014 mmol) et de *rac*-2,2'-bis(diphénylphosphino)-1,1',binaphthyl (17 mg, 0,027 mmol) dans 5 mL de toluène sous argon est ajouté le composé **28** (122 mg, 0,587 mmol) et du NaOtBu (77,5 mg, 0,81 mmol). Le milieu est chauffé au reflux pendant 3 heures, puis du **28** (22 mg, 0,106 mmol) est à nouveau ajouté. Le chauffage est poursuivi pendant 2 heures 30 minutes. Après refroidissement, 10 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure d'ammonium sont ajoutés. Le produit est extrait avec 3 × 30 mL de CH_2Cl_2 et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice éluée avec CH_2Cl_2 /hexane (80/20, v/v), puis le solvant est évaporé pour donner **45** sous la forme d'une poudre jaune (0,11 g, 0,259 mmol, rendement = 38 %).

RMN- 1H (250 MHz, $CDCl_3$) δ , ppm : 8,14 (d, $^3J(H, H) = 9,0$ Hz, 2 H); 7,99 (dd, $^3J(H, H) = 7,5$ Hz, $^4J(H, H) = 1,5$ Hz, 2 H); 7,93 (dd, $^3J(H, H) = 8,0$ Hz, $^4J(H, H) = 1,5$ Hz, 2 H); 7,73 (d, $^3J(H, H) = 9,0$ Hz, 2 H); 7,43 (m, 2 H); 4,45 (t, $^3J(H, H) = 7,5$ Hz, 2 H); 1,83 (m, 2 H); 1,47 (m, 2 H); 0,98 (t, $^3J(H, H) = 7,5$ Hz, 3 H).

RMN- ^{13}C (63 MHz, $CDCl_3$) δ , ppm : 156,2 (Cq); 146,4 (Cq); 138,7 (Cq); 137,0 (CH); 131,5 (CH); 126,2 (Cq); 124,2 (CH); 122,8 (CH); 117,3 (CH); 48,9 (CH_2); 30,4 (CH_2); 20,3 (CH_2); 13,9 (CH_3).

SM (DIC, NH_3) : $m/z = 418$ (MH^+).

Analyse (%) pour $C_{22}H_{19}N_5O_4$: calculé C 63,30; H 4,59; N 16,78; trouvé C 63,18; H 4,49; N 16,39.

UV/vis [$CH_3OH/Tris \cdot HCl$ 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ $M^{-1} cm^{-1}$) = 210 (91 400), 226 (53 500, épaulement), 270 (42 100), 294 (26 700, épaulement), 383 (28 400).

***N*-Butyl-2,2'-imino-bis(8-quinoléineamine) (46, CT16) :**

A une solution de **45** (32 mg, 0,08 mmol) dans 5 mL d'acétate d'éthyle est ajouté du palladium sur charbon à 10 % en masse (6 mg). Le milieu est placé sous atmosphère de dihydrogène (1 bar) et agité pendant 4 heures. Après élimination du palladium sur charbon par filtration sur célite, la phase organique est concentrée sous pression réduite. Le brut réactionnel est repris dans 1 mL de CH_2Cl_2 et précipité par 4 mL d'hexane. Après filtration, le surnageant est concentré sous pression réduite et le produit est séché sous vide pour donner **46** sous la forme d'une poudre brune (17 mg, 0,05 mmol, rendement = 63 %).

RMN- 1H (250 MHz, $CDCl_3$) δ , ppm : 7,90 (d, $^3J(H, H) = 9,0$ Hz, 2 H); 7,32 (d, 3J

(H, H) = 9,0 Hz, 2 H); 7,20 (m, 2 H); 7,10 (dd, 3J (H, H) = 8,0 Hz, 4J (H, H) = 1,0 Hz, 2 H); 6,93 (dd, 3J (H, H) = 7,5 Hz, 4J (H, H) = 1,0 Hz, 2 H); 4,60 (s large, 4 H); 4,48 (t, 3J (H, H) = 7,5 Hz, 2 H); 1,88 (m, 2 H); 1,47 (m, 2 H); 0,97 (t, 3J (H, H) = 7,5 Hz, 3 H).

RMN- ^{13}C (63 MHz, CDCl_3) δ , ppm : 154,1 (Cq); 142,1 (Cq); 137,2 (CH); 137,0 (Cq); 125,3 (Cq); 125,0 (CH); 116,3 (CH); 116,1 (CH); 111,3 (CH); 48,9 (CH_2); 30,6 (CH_2); 20,7 (CH_2); 14,1 (CH_3).

SM (DIC, NH_3) : m/z = 358 (MH^+).

Analyse (%) pour $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_5 \cdot 0,2\text{CH}_2\text{Cl}_2$: calculé C 71,21; H 6,30; N 18,70; trouvé C 71,03; H 6,51; N 18,17.

UV/vis [$\text{CH}_3\text{OH}/\text{Tris} \cdot \text{HCl}$ 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm ($\epsilon \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) = 211 (53 400, épaulement), 302 (40 300), 367 (20 000), 382 (14 600, épaulement).

8-Nitro-2-(bromométhyl)quinoléine (47) :

A une suspension sous argon de 2-méthyl-8-nitroquinoléine (3,00 g, 16,0 mmol) dans du CCl_4 (35 mL) sont ajoutés du *N*-bromosuccinimide (2,84 g, 16,0 mmol) puis du 2,2'-azobisisobutyronitrile (80,4 mg, 0,49 mmol). Le mélange est chauffé à reflux pendant 36 heures puis, après refroidissement, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit est repris dans du CH_2Cl_2 (200 mL) et lavé avec une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 puis avec de l'eau, et le solvant de la phase organique est évaporé. Le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice élué avec du CHCl_3 pour donner, après évaporation du solvant sous pression réduite et séchage sous vide, **47** sous la forme d'une poudre blanche (0,71 g, 2,66 mmol, rendement = 17 %).

RMN- ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ , ppm : 8,26 (d, 3J (H, H) = 8,5 Hz, 1 H); 8,01 (m, 2 H); 7,74 (d, 3J (H, H) = 8,5 Hz, 1 H); 7,62 (m, 1 H); 4,71 (s, 2 H).

RMN- ^{13}C (63 MHz, CDCl_3) δ , ppm : 159,5 (Cq); 148,6 (Cq); 138,5 (Cq); 137,2 (CH); 131,5 (CH); 128,0 (Cq); 125,7 (CH); 123,9 (CH); 123,1 (CH); 33,8 (CH_2).

SM (DIC, NH_3) : m/z = 267 (MH^+).

2,2'-[(Butylamino)diméthanediyl]di(8-nitroquinoléine) (48) :

A une solution sous argon de butylamine (42 μL , 0,43 mmol) et de triéthylamine (120 μL , 0,85 mmol) dans du benzène (6 mL) est ajoutée goutte à goutte une solution de **47** (250 mg, 0,94 mmol) dans du benzène (10 mL). La solution orangée obtenue est agitée à température ambiante pendant trois jours puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit est repris dans du CH_2Cl_2 puis lavé à l'eau. Le solvant est alors évaporé sous pression réduite. L'analyse des signaux du spectre RMN ^1H du produit a permis d'estimer que **48** a ainsi été obtenu avec une pureté de l'ordre de 90 %.

RMN- ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ , ppm : 8,23 (d, 3J (H, H) = 8,5 Hz, 2 H); 7,97 (m, 4 H); 7,87 (d, 3J (H, H) = 8,5 Hz, 2 H); 7,23 (m, 2 H); 4,05 (s, 4 H); 2,69 (m, 2H);

1,60 (m, 2 H); 1,28 (m, 2 H); 0,85 (t, 3J (H, H) = 7,5 Hz, 3 H).
SM (DIC, NH₃) : m/z = 446 (MH⁺).

[2-(Butylamino)méthyl]-8-nitroquinoléine (49) :

Ce produit est un produit de dégradation observé lors d'une tentative de purification de **48**. Le brut réactionnel contenant **48** a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice, élué avec un gradient de 0 à 100 % de CH₃OH dans CH₂Cl₂ (v/v). Les fractions contenant **49** ont été réunies et évaporées sous pression réduite pour donner, après séchage sous vide, **49** sous la forme d'une poudre jaune (80 mg, 0,31 mmol, rendement = 33 % à partir de **47**).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 8,24 (d, 3J (H, H) = 8,5 Hz, 1 H); 8,07-8,01 (m, 2 H); 7,64-7,57 (m, 2 H); 4,30 (s, 2 H); 4,03 (s, 1 H); 2,87 (t, 3J (H, H) = 7,5 Hz, 2H); 1,70 (m, 2 H); 1,43 (m, 2 H); 0,93 (t, 3J (H, H) = 7,5 Hz, 3 H).
SM (DIC, NH₃) : m/z = 260 (MH⁺).

8-Nitro-2-quinoléine carboxaldéhyde (50) :

Ce produit, comme **49**, est un produit de dégradation observé lors de la tentative de purification de **48**. Les fractions contenant **50** sont réunies, évaporées sous pression réduite pour donner **50** sous la forme d'une poudre jaune (90 mg, 0,45 mmol, rendement = 47 % à partir de **47**).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 10,21 (s, 1 H), 8,45 (d, 3J (H, H) = 8,5 Hz, 1 H); 8,15(m, 3 H); 7,78 (m, 1 H).
SM (DIC, NH₃) : m/z = 203 (MH⁺), 220 (MNH₄⁺).

8-Hydroxy-N-(8-hydroxy-2-quinoléinyl)-2-quinoléinecarboxamide (51, CT14) :

A une suspension d'acide 8-hydroxyquinoléine-2-carboxylique (50 mg, 0,26 mmol) dans 5 mL de CH₂Cl₂ sec sont ajoutés du 1-hydroxybenzotriazole monohydrate (71 mg, 0,53 mmol), du (benzotriazole-1-yloxy)tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate (177 mg, 0,40 mmol) et de la triéthylamine (0,037 mL, 0,26 mmol). Après 30 minutes d'agitation à température ambiante, de la 2-amino-8-hydroxyquinoléine (85 mg, 0,53 mmol) et de la triéthylamine (0,037 mL, 0,26 mmol puis, après 5 minutes d'agitation, 0,117 mL, 0,794 mmol) sont ajoutés. Après 18 heures d'agitation à température ambiante, 10 mL d'H₂O et 5 mL de CH₂Cl₂ sont ajoutés et la phase organique est récupérée par décantation. Le volume est réduit par évaporation sous pression réduite puis le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice, élué avec un mélange CH₂Cl₂/CH₃OH (99,5/0,5, v/v) et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit est dissous dans 30 mL de CH₂Cl₂ et 30 mL d'une solution aqueuse

saturée de NaHCO_3 sont ajoutés. Le produit est extrait 3 fois au CH_2Cl_2 puis les phases organiques sont réunies et le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner **51** sous la forme d'une poudre blanche (28 mg, 0,09 mmol, rendement = 32 %).

RMN- ^1H (250 MHz, DMSO- d_6) δ , ppm: 11,89 (s, 1 H); 10,89 (s, 1 H); 9,55 (s, 1 H); 8,60 (d, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8,5$ Hz, 1 H); 8,41 (s, 2 H); 8,32 (d, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8,5$ Hz, 1 H); 7,63 (dd, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7,0$ et 8,0 Hz, 1 H); 7,53 (dd, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8,0$ Hz, $^4J(\text{H}, \text{H}) = 1,0$ Hz, 1 H); 7,42 (dd, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8,0$ Hz, $^4J(\text{H}, \text{H}) = 2,0$ Hz, 1 H); 7,37 (dd, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7,0$ et 8,0 Hz, 1 H); 7,23 (dd, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7,0$ Hz, $^4J(\text{H}, \text{H}) = 1,0$ Hz, 1 H); 7,13 (dd, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7,0$ Hz, $^4J(\text{H}, \text{H}) = 2,0$ Hz, 1 H).

SM (DIC, NH_3): $m/z = 332$ (MH^+).

UV/vis [DMSO/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (8/2, v/v)] : λ nm ($\epsilon \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) = 259 (49 100), 332 (11 200, épaulement).

Bis(8-quinoléinyl)amine (**52**, CT17) :

Il a été préparé selon la référence suivante : Peters *et al.*, 2001. Une suspension sous argon de tris(dibenzylidène-acétone)-dipalladium(0) (4,4 mg, 5 μmol) et de *rac*-2,2'-bis-(diphénylphosphino)-1,1'-binaphthyl (6,0 mg, 10 μmol) dans 750 μL de toluène est agitée durant 5 minutes à température ambiante puis de la 8-bromoquinoléine (50 mg, 0,24 mmol), de la 8-aminoquinoléine (35 mg, 0,24 mmol) et 1,75 mL de toluène sont ajoutés à la solution. L'ajout de NaOtBu (28 mg, 0,29 mmol) entraîne la formation d'une solution rouge qui est agitée 3 jours à 110 °C. Après refroidissement, la solution est filtrée sur célite et extraite au CH_2Cl_2 . La phase organique est concentrée pour donner un solide rouge qui est purifié par chromatographie sur gel de silice élué à l'aide d'un mélange toluène/acétate d'éthyle (4/1, v/v) pour donner **52** sous la forme d'un solide orange (44,0 mg, 0,16 mmol, rendement = 67 %).

RMN- ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ , ppm : 10,62 (s large, 1 H); 8,96 (dd, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 4,0$ Hz, $^4J(\text{H}, \text{H}) = 1,5$ Hz, 2 H); 8,16 (dd, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8,5$ Hz, $^4J(\text{H}, \text{H}) = 1,5$ Hz, 2 H); 7,90 (dd, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7,5$ Hz, $^4J(\text{H}, \text{H}) = 1,0$ Hz, 2 H); 7,53 (m, 2 H); 7,46 (m, 2 H); 7,34 (dd, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 6,5$ Hz, $^4J(\text{H}, \text{H}) = 1,0$ Hz, 2 H).

SM (DIC, NH_3): $m/z = 272$ (MH^+).

UV/vis [DMSO/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (8/2, v/v)] : λ nm ($\epsilon \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) = 268 (43 700), 341 (5 100), 399 (16 900).

8,8'-Oxydiquinoléine (**53**, CT18) :

A une solution sous argon de 8-hydroxyquinoléine (71 mg, 0,49 mmol) dans 2 mL de DMF sec sont ajoutés du Cs_2CO_3 (156 mg, 0,48 mmol), de la 8-bromoquinoléine (32 μL , 50 mg, 0,24 mmol) et du $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4,1 mg, 0,02 mmol). Le mélange est chauffé à reflux pendant 72 heures. Après refroidissement, 5 mL de CH_2Cl_2 et 5 mL d'une solution aqueuse 0,12 M de sel di-sodique d'EDTA sont ajoutés. La phase organique est récupérée

puis la phase aqueuse est extraite avec CH_2Cl_2 (2×5 mL). Les phases organiques sont réunies et lavées une fois avec 5 mL d'EDTA 0,12 M dans H_2O puis à l'eau. Le volume est réduit sous pression réduite puis le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice, élué avec un gradient de 50 à 100 % d'acétate d'éthyle dans du toluène (v/v) puis avec 100 % de CH_3OH et le solvant est évaporé pour donner **53**, à partir de la phase méthanolique, sous la forme d'une poudre blanche (13 mg, 0,05 mmol, rendement = 19 %).

RMN- ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ , ppm: 8,95 (dd, 3J (H, H) = 4,0 Hz, 4J (H, H) = 1,5 Hz, 2 H); 8,21 (dd, 3J (H, H) = 8,5 Hz, 4J (H, H) = 1,5 Hz, 2 H); 7,61 (dd, 3J (H, H) = 8,0 Hz, 4J (H, H) = 1,0 Hz, 2 H); 7,46 (dd, 3J (H, H) = 4,0 Hz et 8,5 Hz, 2 H); 7,42 (dd, 3J (H, H) = 7,5 Hz et 8,0 Hz, 2 H); 7,14 (dd, 3J (H, H) = 7,5 Hz, 4J (H, H) = 1,0 Hz, 2 H).

SM (DIC, NH_3): m/z = 273 (MH^+).

UV/vis [$\text{CH}_3\text{OH}/\text{Tris}\cdot\text{HCl}$ 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) = 232 (53 300), 240 (42 900), 299 (9 400), 327 (5 800, épaulement).

N-8-Quinoléinyl-8-quinoléine carboxamide (54, CT19) :

A une solution d'acide quinoléine-8-carboxylique (50 mg, 0,29 mmol) dissous dans 5 mL de CH_2Cl_2 sec sont ajoutés du (benzotriazole-1-yloxy tris(diméthylamino)-phosphonium hexafluorophosphate (192 mg, 0,43 mmol), du 1-hydroxybenzotriazole monohydrate (79 mg, 0,59 mmol), et de la triéthylamine (0,20 mL, 1,44 mmol). Après 30 minutes d'agitation à température ambiante, de la 8-aminoquinoléine (84 mg, 0,58 mmol) est ajoutée et le mélange est agité 4 heures 30 minutes à température ambiante. De l'eau (10 mL) est ajoutée et le produit est extrait au CH_2Cl_2 (3×10 mL). Le volume est réduit et le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice, élué avec $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (0 à 2 %, v/v) puis le solvant est évaporé sous pression réduite et les fractions riches en produits sont repurifiées par chromatographie sur gel de silice, élué avec $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (99,5/0,5; v/v). **55** est obtenu après évaporation du solvant sous la forme d'une poudre blanche (83 mg, 0,28 mmol, rendement = 96 %).

RMN- ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ , ppm: 15,13 (s, 1 H); 9,25 (dd, 3J (H, H) = 4,0 Hz, 4J (H, H) = 2,0 Hz, 1 H); 9,19 (dd, 3J (H, H) = 7,5 Hz, 4J (H, H) = 1,5 Hz, 1 H); 9,00 (m, 2 H); 8,32 (dd, 3J (H, H) = 8,0 Hz, 4J (H, H) = 2,0 Hz, 1 H); 8,19 (dd, 3J (H, H) = 8,0 Hz, 4J (H, H) = 1,5 Hz, 1 H); 8,01 (dd, 3J (H, H) = 8,0 Hz, 4J (H, H) = 1,5 Hz, 1 H); 7,74 (dd, 3J (H, H) = 7,5 et 8,0 Hz, 1 H); 7,60 (m, 3 H); 7,48 (dd, 3J (H, H) = 4,5 et 8,0 Hz, 1 H).

RMN- ^{13}C (63 MHz, CDCl_3) δ , ppm: 164,28; 149,48; 148,57; 145,60; 140,12; 137,59; 136,65; 136,18; 134,02; 132,10; 129,85; 128,41; 128,28; 127,50; 126,63; 121,75; 121,34; 121,12; 118,18.

SM (DIC, NH_3): m/z = 300 (MH^+).

UV/vis [DMSO/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (8/2, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 261 (13 300, épaulement), 274 (14 800), 294 (12 200).

***N,N'*-Di-8-quinoléinyl-1,3-propanediamine (55, CT21) :**

Une suspension sous argon de tris(dibenzylidèneacétone)dipalladium(0) (55 mg, 0,06 mmol) et de *rac*-2,2'-bis(diphénylphosphino)-1,1',binaphthyl (75 mg, 0,12 mmol) dans 6 mL de toluène est agitée durant 5 minutes à température ambiante puis de la 8-bromoquinoléine (500 mg, 314 μ L, 2,40 mmol), du 1,3-diaminopropane (89 mg, 100 μ L, 1,20 mmol) et 6 mL de toluène sont ajoutés à la solution. L'ajout de NaOtBu (323 mg, 3,36 mmol) entraîne la formation d'une solution rouge qui est agitée 3 jours à 100 °C. Après refroidissement, la solution est filtrée sur célite et extraite au CH₂Cl₂. La phase organique est concentrée pour donner un solide violet qui est purifié par chromatographie sur gel de silice élué à l'aide d'un gradient de 0 à 5 % de CH₃OH dans du CH₂Cl₂ (v/v). Après évaporation du solvant, le produit est repris dans du dichlorométhane et précipité à 4 °C par ajout de 4 équivalents de HCl (sous forme d'une solution 1 M dans du diéthyléther). Le précipité est récupéré, redissous dans de l'eau, la solution est alcalinisée jusqu'à pH = 10 à l'aide d'ammoniaque et le produit est extrait au CH₂Cl₂ pour donner, après évaporation du solvant et séchage sous vide, **55** sous la forme d'une poudre marron (355 mg, 1,08 mmol, rendement = 90 %).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 8,70 (dd, ³*J* (H, H) = 4,0 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,5 Hz, 2 H); 8,06 (dd, ³*J* (H, H) = 8,0 Hz, ⁴*J* (H, H) = 1,5 Hz, 2 H); 7,37 (m, 4 H); 7,05 (dd, ³*J* (H, H) = 8,0 Hz, ⁴*J* (H, H) = 0,5 Hz, 2 H); 6,71 (dd, ³*J* (H, H) = 8,0 Hz, ⁴*J* (H, H) = 0,5 Hz, 2 H); 6,24 (t large, ³*J* (H, H) = 5,0 Hz, 2 H); 3,55 (m, 4H); 2,27 (quintuplet, ³*J* (H, H) = 7,0 Hz, 2 H).

RMN-¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ , ppm : 146,8 (CH); 144,8 (Cq); 138,3 (Cq); 136,0 (CH); 128,7 (Cq); 127,8 (CH); 121,4 (CH); 113,8 (CH); 104,7 (CH); 41,3 (CH₂); 29,0 (CH₂).

SM (DIC, NH₃) : *m/z* = 329 (MH⁺).

Analyse (%) pour C₂₁H₂₀N₄·0,1H₂O : calculé C 76,38; H 6,17; N 16,97; trouvé C 76,28; H 6,11; N 16,53.

UV/vis [CH₃OH/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 255 (44 400), 360 (6 200).

VI. Bibliographie

Albrecht, M., Blau, O., Witt, K., Wegelius, E., Nissinen, M., Rissanen, K., and Frölich, R. (1999) Di(8-hydroxyquinoline) derivatives for supramolecular chemistry: Syntheses and solid state superstructures. *Synthesis* **10**: 1819-1829.

- Atwood, C.S., Scarpa, R.C., Huang, X., Moir, R.D., Jones, W.D., Fairlie, D.P., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (2000) Characterization of copper interactions with Alzheimer amyloid β peptides: Identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid β 1-42. *J. Neurochem.* **75**: 1219-1233.
- Banks, R.E., Lawrence, N.J., and Popplewell, A.L. (1994) Efficient electrophilic fluorination of β -dicarbonyl compounds with the Selectfluor reagent F-TEDA-BF₄ {1-Chloromethyl-4-fluoro-1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octane bis(tetrafluoroborate)}. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*: 343-344.
- Barnham, K.J., Gautier, E.C.L., Kok, G.B., and Krippner, G. (2004) 8-Hydroxy quinoline derivatives. PCT /WO 2004/007461 A1, 149 pp.
- Belser, P., Bernhard, S., and Guerig, U. (1996) Synthesis of mono- and dialkylsubstituted 1,10-phenanthrolines. *Tetrahedron* **52**: 2937-2944.
- Ben Shachar, D., Kahana, N., Kampel, V., Warshawsky, A., and Youdim, M.B.H. (2004) Neuroprotection by a novel brain permeable iron chelator, VK-28, against 6-hydroxydopamine lesion in rats. *Neuropharmacology* **46**: 254-263.
- Bush, A.I., Pettingell, W.H., d Paradis, M., and Tanzi, R.E. (1994) Modulation of A β adhesiveness and secretase site cleavage by zinc. *J. Biol. Chem.* **269**: 12152-12158.
- Cherny, R.A., Atwood, C.S., Xilinas, M.E., Gray, D.N., Jones, W.D., McLean, C.A., Barnham, K.J., Volitakis, I., Fraser, F.W., Kim, Y.S., Huang, X., Goldstein, L.E., Moir, R.D., Lim, J.T., Beyreuther, K., Zheng, H., Tanzi, R.E., Masters, C.L., and Bush, A.I. (2001) Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits β -amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* **30**: 665-676.
- Collis, G.E., Burrell, A.K., John, K.D., and Plieger, P.G. (2003) 7-Bromoquinolin-8-ol. *Acta Cryst.* **C59**: o443-o444.
- Di Vaira, M., Bazzicalupi, C., Orioli, P., Messori, L., Bruni, B., and Zatta, P. (2004) Clioquinol, a drug for Alzheimer's disease specifically interfering with brain metal metabolism: structural characterization of its zinc(II) and copper(II) complexes. *Inorg. Chem.* **43**: 3795-3797.
- Fagan, P.J., Hauptman, E., Shapiro, R., and Casalnuovo, A. (2000) Using intelligent/random library screening to design focused libraries for the optimisation of homogeneous catalysts: Ullmann ether formation. *J. Am. Chem. Soc.* **122**: 5043-5051.
- Fahrni, C.J., and O'Halloran, T.V. (1999) Aqueous coordination chemistry of quinoline-based fluorescence probes for the biological chemistry of zinc. *J. Am. Chem. Soc.* **121**: 11448-11458.
- Fretzner, S., Tshisuaka, B., Lingens, F., Kappl, R., and Hüttermann, J. (1998) Bacterial degradation of quinoline and derivatives - Pathways and their biocatalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**: 576-597.
- Garber, T., Van Wallendaal, S., Rillema, D.P., Kirk, M., Hatfield, W.E., Welch, J.H., and Singh, P. (1990) A novel copper(II) complex containing the ligand 1,2-bis(2,2'-bipyridyl-6-yl)ethane: structural, magnetic, redox, and spectral properties. *Inorg. Chem.* **29**: 2863-2868.
- Gershon, H., and McNeil, M.W. (1972) 5- and 7-substituted 2-methyl-8-quinolinols (1). *Heterocycles* **9**: 659-667.

- Gershon, H., McNeil, M.W., Schulman, S.G., and Parkes, J.W. (1972) Stability constants of some sterically hindered bis(8-quinolinato)copper(II) complexes. *Anal. Chim. Acta* **62**: 43-47.
- Hamana, M., and Yamazaki, M. (1963) Amine oxides. XVI. Reactions of quinoline 1-oxides with compounds containing reactive hydrogens in the presence of acetic acid. *Chem. Pharm. Bull.* **11**: 415-421.
- Katritzky, A.R. (1985) *Handbook of heterocyclic chemistry*: Pergamon Press, p 174.
- Kimber, M.C., Geue, J.P., Lincoln, S.F., Ward, A.D., and Tiekink, E.R.T. (2003) A preparative and preliminary spectroscopic study of analogues of a zinc-related fluorophore. *Aust. J. Chem.* **56**: 39-44.
- Kitamura, C., Maeda, N., Kamada, N., Ouchi, M., and Yoneda, A. (2000) Synthesis of 2-(substituted methyl)quinolin-8-ols and their complexation with Sn(II). *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*: 781-785.
- Konagaya, M., Matsumoto, A., Takase, S., Mizutani, T., Sobue, G., Konishi, T., Hayabara, T., Iwashita, H., Ujihira, T., Miyata, K., Matsuoka, Y. (2004) Clinical analysis of longstanding subacute myelo-optico-neuropathy: sequelae of clioquinol at 32 years after its ban. *J. Neurol. Sci.* **218**: 85-90.
- Lal, G.S., Pez, G.P., and Syvret, R.G. (1996) Electrophilic NF fluorating agents. *Chem. Rev.* **96**: 1737-1755.
- Mohr, F., Binfield, S.A., Fettingner, J.C., and Vedernikov, A.N. (2005) A practical, fast, and high-yielding aziridination procedure using simple Cu(II) complexes containing N-donor pyridine-based ligands. *J. Org. Chem* **70**: 4833-4839.
- Nogradi, T. (1952) Notiz über die Dismutation von 5-Chlor-7-jod-8-oxy-chinolin. *Chem. Ber.* **85**: 104-106.
- Numazawa, M., and Ogura, Y. (1983) Efficient synthesis of 2-methoxy- and 4-methoxy-estrogens. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*: 533-534.
- Pearson, D.E., Wysong, R.D., and Breder, C.V. (1967) The *ortho* bromination of phenols. *J. Org. Chem* **32**: 2358-2360.
- Peters, J.C., Harkins, S.H., Brown, S.D., and Day, M.W. (2001) Pincer-like amido complexes of platinum, palladium, and nickel. *Inorg. Chem.* **40**: 5083-5091.
- Phillips, J.P. (1956) The reactions of 8-quinolinol. *Chem. Rev.* **56**: 271-297.
- Puzas, J.P., Nakon, R., and Petersen, J.L. (1986) Direct evidence for an SN_1CB mechanism. 4. Crystal and molecular structure of chloro(bis(8-quinolinyl)amido- N^1, N^2, N^3)copper(II), a metal chelate containing an sp^2 -hybridized deprotonated amine. *Inorg. Chem.* **25**: 3837-3840.
- Ritchie, C.W., Bush, A.I., Mackinnon, A., Macfarlane, S., Mastwyk, M., Macgregor, L., Kiers, L., Cherny, R.A., Li, Q.-X., Tammer, A., Carrington, D., Mavros, C., Volitakis, I., Xilinas, M., Ames, D., Davis, S., Beyreuther, K., Tanzi, R.E., and Masters, C.L. (2003) Metal-protein attenuation with Iodochlorohydroxyquin (Clioquinol) targeting A β amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **60**: 1685-1691.
- Schrader, W.D., Celebuski, J., Kline, S.J., and Johnson, D. (1988) Synthesis of a novel hexadentate chelating agent based on 8-hydroxyquinoline. *Tetrahedron Lett.* **29**: 1351-1354.

- Sillen, L.G., and Martell, A.E. (1971) *Stability constants of metal-ions complexes*: The Chemical Society London Publication.
- Talekar, R.S., Chen, G.S., Lai, S.-Y., and Chern, J.-W. (2005) Nonreductive deiodination of *ortho*-iodo-hydroxylated arenes using tertiary amines. *J. Org. Chem* **70**: 8590-8593.
- Tozer, M.J., and Herpin, T.F. (1996) Methods for the synthesis of *gem*-difluoromethylene compounds. *Tetrahedron* **52**: 8619-8663.
- Treus, M., Estevez, J.C., Castedo, L., and Estevez, R.J. (2000) A novel C-N cleavage in isoquinolines allowing the first direct transformation of 1-benzymisoquinolines into benzo[c]phenanthridines and a new route to 2-phenyl-1,4-naphthoquinones. *Tetrahedron Lett.* **41**: 6351-6353.
- Watkins, T.I. (1952) Trypanocides of the phenanthridine series. Part I. The effect of changing the quaternary grouping in diimidium bromide. *J. Chem. Soc.*: 3059-3064.
- Xue, G., Bradshaw, N.K., Dalley, N.K., Savage, P.B., Krakowiak, K.E., Izatt, R.M., Prodi, L., Montalti, M., and Zaccheroni, N. (2001) Convenient syntheses and preliminary photophysical properties of novel 8-aminoquinoline appended diaza-18-crown-6 ligands. *Tetrahedron* **57**: 7623-7628.
- Yamamoto, Y., Miura, A., Kawamata, A., Miura, M., and Takei, S. (1978) Syntheses and electronic spectra of 2,2'-isopropylidenedi-8-quinolinol, its nickel(II), and copper(II) chelates. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **51**: 3489-3495.
- Yang, F., Lim, G.P., Begum, A.N., Ubeda, O.J., Simmons, M.R., Ambegaokar, S.S., Chen, P., Kaye, R., Glabe, C.G., Frautschy, S.A., and Cole, G.M. (2005) Curcumin inhibits formation of amyloid β oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J. Biol. Chem.* **280**: 5892-5901.
- Zheng, H., Weiner, L.M., Bar-Am, O., Epsztejn, S., Cabantchick, Z.I., Warshawsky, A., Youdim, M.B.H., and Fridkin, M. (2005) Design, synthesis, and evaluation of novel bifunctional iron-chelators as potential agents for neuroprotection in Alzheimer's, Parkinson's, and other neurodegenerative diseases. *Bioorg. Med. Chem.* **13**: 773-783.

Chapitre IV

Ligands polyquinoléine

-

Propriétés de chélation et études sur A β

L'étape suivante de cette étude consiste en une première évaluation de l'action, sur les complexes métalliques d'A β , des ligands polyquinoléine synthétisés au chapitre III. Deux axes majeurs ont été étudiés. Le premier concerne la capacité des ligands à chélater les ions métalliques Cu^{II} et Zn^{II} impliqués dans la maladie d'Alzheimer. Dans le second, nous nous sommes intéressés aux capacités de ces composés à inhiber la précipitation du peptide A β induite par les ions métalliques et à empêcher la production d'H₂O₂ due à A β en présence de Cu^{II} et d'un réducteur.

I. Chélation des ions métalliques Cu^{II} et Zn^{II}

Nous avons tout d'abord voulu connaître les capacités des ligands polyquinoléine à chélater le Cu^{II} et le Zn^{II}, qui sont les deux principaux ions métalliques retrouvés associés à A β dans la maladie d'Alzheimer. Pour cela, la stœchiométrie des complexes ion métallique (M) / ligand (L) formés et l'affinité des ligands pour ces ions métalliques ont été étudiés par spectrophotométrie UV-visible.

Cette étude a été réalisée dans un mélange tampon Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM / solvant organique. En effet, il nous a paru important de réaliser les études physicochimiques de complexation dans un milieu proche de celui utilisé pour les tests d'inhibition de la précipitation d'A β (tampon Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM). Un solvant organique (CH₃OH, dioxane ou DMSO) a été ajouté pour les études de spectrophotométrie UV-visible afin d'avoir une bonne solubilité des ligands et des complexes métalliques aux concentrations utilisées dans ces expériences.

I.1 Principe de l'étude par spectrophotométrie UV-visible

I.1.1 Détermination de la stœchiométrie L / M

La formation d'un complexe métallique se traduit par un changement du spectre d'absorption de l'ion métallique et du ligand. En particulier, l'analyse de la région du spectre UV-visible comprise entre 190 et 550 nm, qui correspond à des transitions au niveau des orbitales du ligand, permet de suivre des transitions électroniques au sein du ligand et entre le ligand et le métal (de type L $\rightarrow$ M et M $\rightarrow$ L) dues à la complexation de l'ion métallique.

Une titration du nombre de Cu^{II} ou de Zn^{II} que peut chélater le ligand a été réalisée par spectroscopie UV-visible, en suivant la variation des spectres mesurés après chaque ajout de sel métallique. Le tracé des courbes $A = f$ (nombre d'équivalents d'ions métalliques ajoutés) a été effectué à différentes longueurs d'ondes. Il permet la détermination de la stœchiométrie maximale L / M des complexes métalliques formés dans les conditions de l'expérience. De plus, la superposition des spectres UV-visible obtenus permet de rechercher la présence éventuelle de points isobestiques. Ces points indiquent la transformation d'une espèce (le ligand) en une autre espèce unique, ce qui signifie qu'un seul type de complexe métallique est formé.

I.1.2 Estimation des constantes d'affinité par compétition

Dans le cas des ligands polyquinoléine formant uniquement des complexes LM de stœchiométrie $1 / 1$, l'étude des constantes d'affinité pour l'ion métallique M a pu être menée par spectrophotométrie UV-visible. Elle a été réalisée à l'aide d'expériences de compétition entre le ligand à étudier (L_s) et un chélateur compétiteur (L_c) pour la formation d'un complexe avec un ion métallique M ($M = \text{Cu}^{\text{II}}$ ou Zn^{II} pour cette étude).

I.1.2.1 *Choix des chélateurs compétiteurs (L_c)*

Les spectres d'absorption UV-visible des espèces L_s , L_c , ML_s et ML_c ont été réalisés. Nous avons vérifié que les ligands L_s et L_c et les complexes métalliques formés donnent des résultats en accord avec la loi de Beer-Lambert dans les conditions expérimentales utilisées, afin de pouvoir réaliser des quantifications à partir des spectres UV-visible.

Plusieurs critères ont été retenus pour sélectionner les chélateurs en vue de ces réactions de compétition avec les ligands polyquinoléine :

- pour un équivalent de L_c et un équivalent d'ion métallique M, 100 % de L_c doit être transformé en complexe ML_c dans les conditions de l'expérience, ce qui signifie que le solvant et / ou le tampon n'entrent pas en compétition avec L_c pour la métallation.
- les spectres d'absorption UV-visible de L_c et ML_c doivent permettre de quantifier, pour chaque expérience de compétition, une des espèces L_s , ML_s , L_c ou ML_c à une longueur d'onde du spectre UV-visible sans contamination des trois autres espèces.

- enfin, les ligands L_c ont été choisis en fonction de la valeur de leur constante d'affinité pour les ions métalliques Cu^{II} et Zn^{II} à $pH = 7,4$. Nous avons cherché à disposer d'une gamme de compétiteurs dont les logarithmes décimaux des constantes de stabilité pour l'ion métallique M présentent des intervalles d'à peu près un ou deux log.

La valeur de cette constante de stabilité $K = [ML]/([M][L])$ à $pH = 7,4$ est notée K_{app} (pour constante apparente). Elle a été déterminée comme suit pour les compétiteurs :

Les constantes de stabilité K sont issues de "The National Institute of Standards and Technology Standard Reference Data base 46" NIST (Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database, version 4.0, U. S. Department of Commerce) et de la référence "Sillen and Martell, 1971". Elles ont été choisies pour une température de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, une force ionique de $0,1-0,2\text{ v}$ et un rapport molaire M / L de $1 / 1$. Lorsque plus d'un complexe métallique peut se former entre l'ion métallique et le chélateur, le chélateur de compétition a seulement été sélectionné si le $\log K$ de son complexe métallique avec un rapport M / L de $1 / 1$ est supérieur à ceux de tous les autres complexes possibles.

D'autre part, le $\log K$ d'un chélateur pour un ion métallique varie avec le pH de la solution comme déterminé par les équations suivantes (Atwood *et al.*, 2000) :

$$\log K_{app} = \log K - \log \alpha \quad (\text{Eq. 1})$$

où :

$$\alpha = [H^+]^n / (K_{a1} \times K_{a2} \times K_{a3} \times \dots \times K_{an}) + [H^+]^{n-1} / (K_{a1} \times K_{a2} \times K_{a3} \times \dots \times K_{an-1}) + \dots + [H^+] / K_{a1} + 1 \quad (\text{Eq. 2})$$

et $K_a = 10^x$, où $x = -pK_a$ du chélateur (les valeurs K_a sont écrites dans un ordre décroissant des valeurs de pK_a), $n = n^{\circ}$ de la valeur de pK_a .

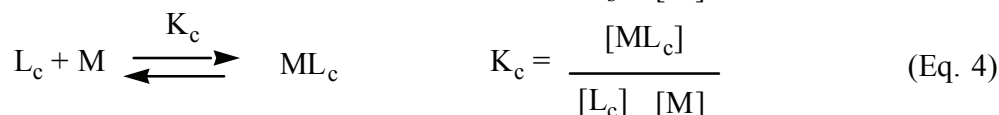
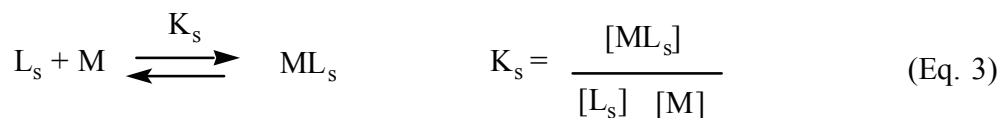
Les valeurs de $\log K_{app}$ ont été calculées selon ces deux équations, pour une valeur de $pH = 7,4$.

1.1.2.2 Expériences de compétition

Deux méthodes ont été employées pour les expériences de compétition entre le ligand à étudier L_s et le chélateur en compétition L_c pour un ion métallique M .

Méthode 1 : Les ligands L_s et L_c sont mis en solution en concentrations égales et l'ion métallique M est ajouté à la même stœchiométrie.

Lorsque L_s , L_c et M sont utilisés dans un rapport 1 / 1 / 1, et que L_s forme avec l'ion métallique un complexe ML_s et L_c forme avec l'ion métallique un complexe ML_c , on peut écrire :



où K_c est la valeur de K_{app} pour le chélateur en compétition L_c , déterminée avec les équations 1 et 2.

On peut en déduire qu'à l'équilibre :

$$K_s = K_c \frac{[ML_s][L_c]}{[ML_c][L_s]} \quad (\text{Eq. 5})$$

La concentration initiale C est la même pour L_s , L_c et M . Si les complexes ML_s et ML_c sont observés en même temps sur les spectres UV-visible et que $\log K_c > 6$, on peut considérer que tout l'ion métallique est complexé sous les formes ML_s ou ML_c et qu'à l'équilibre :

$$[ML_s] + [ML_c] = C = [ML_s] + [L_s] = [ML_c] + [L_c]$$

La concentration $[ML_s] = x \%$ de C étant mesurée sur les spectres UV-visible, on en déduit les concentrations $[L_s] = (1 - x) \%$ de C , $[ML_c] = (1 - x) \%$ de C et $[L_c] = x \%$ de C et :

$$\boxed{K_s = K_c \frac{x^2}{(1-x)^2}} \quad (\text{Eq. 6})$$

Cette méthode présente une limite : le tracé théorique a montré que l'équation 6 n'est pas exploitable pour des valeurs de x telles que $x < 10 \%$ ou $x > 90\%$, pour lesquelles une faible variation de la valeur expérimentale cause une grande variation de l'estimation de K_s .

Méthode 2 : Les valeurs obtenues par la méthode 1 peuvent être affinées selon une deuxième méthode, plus longue mais plus précise. Les expériences sont alors réalisées avec L_s et M dans un rapport 1 / 1 mais avec différentes stœchiométries de L_c .

Pour une concentration initiale $C = [L_s] = [M]$, la concentration de ligand compétiteur $[L_c] = y \%$ de C qui, à l'équilibre, permet d'obtenir le rapport de concentration $[ML_s] / [L_s] = 1$ et donc pour laquelle les concentrations $[ML_s] = [L_s] = 50 \%$ de C est déduite du tracé des courbes $A = f(\text{nombre d'équivalents de } L_c \text{ ajoutés})$.

Dans ces conditions $[ML_s] = [ML_c]$; $[ML_c] + [L_c] = Y$, $y \geq 50$ et :

$$K_s = K_c \frac{y - 50}{50} \quad (\text{Eq. 7})$$

Il est important pour cette méthode de choisir un compétiteur L_c possédant une valeur de K_c la plus proche possible de la valeur de K_s déterminée par la méthode 1. En effet, si $K_c \ll K_s$, il faudra ajouter un large excès de L_c pour atteindre la valeur $[ML_s] = [L_s] = 0,5 C$ et si $K_c \gg K_s$, une faible erreur expérimentale sur la valeur de y aura un effet majeur sur l'estimation de K_s .

Enfin, lorsque $\log K_s \leq 6$, ces équations ne peuvent pas être utilisées car les pourcentages d'ion métallique libre en solution ou chélaté par le solvant et / ou le tampon ne sont pas négligeables.

I.2 Exemple : cas du ligand CT2

I.2.1 Stœchiométrie L / Cu^{II}

La stœchiométrie de **CT2** pour Cu^{II} a été déterminée spectrophotométriquement lors de la titration de l'ion métallique (Fig. 1).

Le ligand **CT2** a été solubilisé dans un mélange Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM / CH_3OH (1 / 1). Des aliquots de $CuCl_2$ ont été ajoutés en solution concentrée, afin de n'induire que des variations négligeables de volume. Après chaque addition, des changements des spectres d'absorption sont immédiatement observés et sont stables entre deux additions, ce qui est en accord avec un processus rapide de complexation.

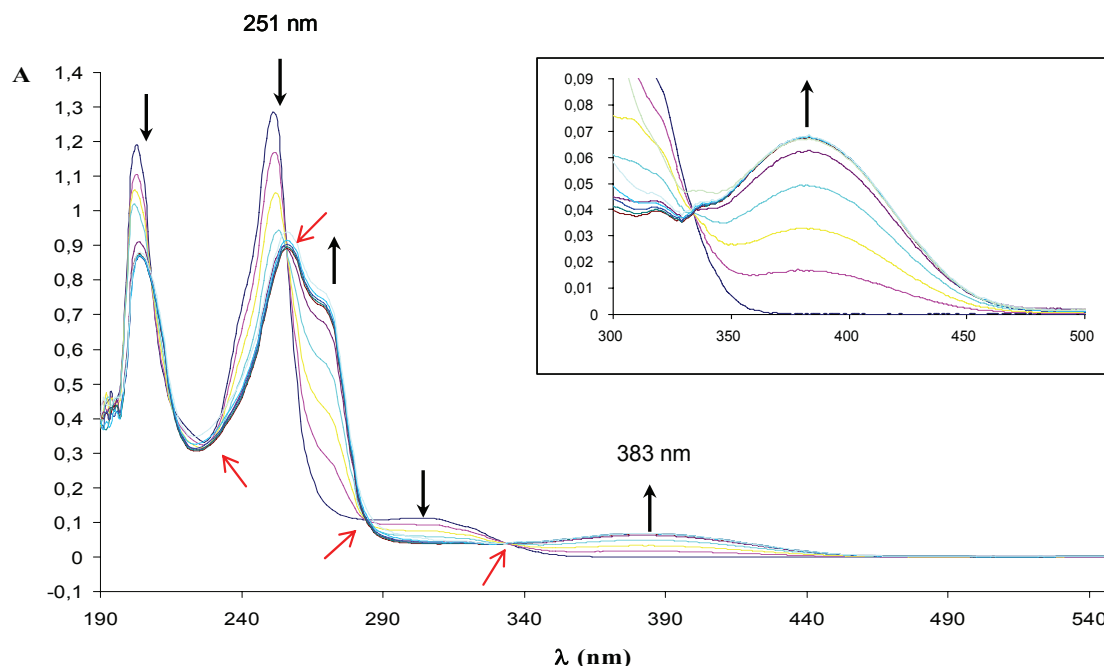


Fig. 1. Superposition des spectres UV-visible obtenus lors de la titration de Cu^{II} par le ligand **CT2**. Les spectres de titration sont obtenus avec $15 \mu\text{M}$ de **CT2** et différents rapports de CuCl_2 dans du $\text{Tris}\cdot\text{HCl}$ 20 mM $\text{pH} = 7,4$; NaCl 150 mM / CH_3OH (1/1). La direction des flèches noires indique les variations observées sur les spectres lorsque le rapport Cu^{II} / **CT2** augmente. Les flèches rouges indiquent la position des points isobestiques.

Dans cet exemple, on peut remarquer que pour un rapport M/L augmentant de 0 à 1, la transition $\pi \rightarrow \pi^*$, centrée à 251 nm pour le ligand libre, est déplacée vers une énergie plus basse lors de la complexation. On peut également noter l'apparition concomitante d'une bande d'absorption dans la région visible du spectre (λ_{max} à 383 nm) qui est probablement due à une transition MLCT. Pour des rapports M/L supérieurs, aucun changement supplémentaire dans les spectres d'absorption UV-visible n'est observé.

On peut également remarquer la présence de points isobestiques lors de la superposition des spectres UV-visible, en accord avec la transformation du ligand en un seul type de complexe.

Le tracé de l'absorbance à différentes longueurs d'onde ($\lambda = 383, 302, 265, 254$ et 251 nm) en fonction du nombre d'équivalents de CuCl_2 ajouté a été réalisé (Fig. 2, $\lambda = 383 \text{ nm}$).

Pour ces valeurs de longueur d'onde, un plateau est atteint à partir d'un équivalent de CuCl_2 ajouté, *indiquant la capacité du ligand CT2 à former un seul type de complexe de Cu^{II} avec une stœchiométrie L / Cu de 1 / 1.*

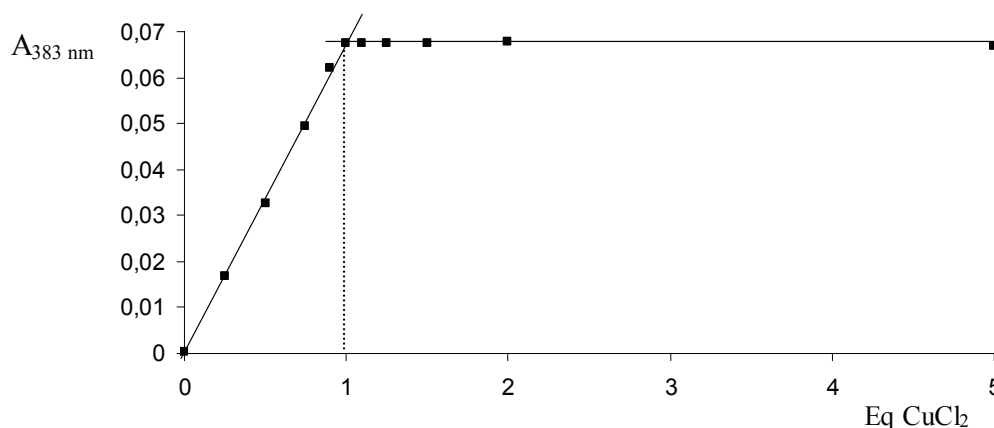


Fig. 2. Variation de l'absorbance à 383 nm en fonction du nombre d'équivalents de CuCl_2 ajouté sur une solution 15 μM de **CT2** dans du Tris-HCl 20 mM pH = 7,4; NaCl 150 mM / CH_3OH (1/1).

I.2.2 Constantes d'affinité pour le Cu^{II}

Dans le cas du ligand **CT₂** (L_s), qui forme uniquement un complexe de stœchiométrie 1 / 1 avec le Cu^{II} , des expériences complémentaires de compétition ont pu être menées afin d'estimer sa constante d'affinité pour cet ion métallique. Le compétiteur (L_c) utilisé est l'EDTA, qui possède une valeur de $\log K_{\text{app}} = 15,9$ pour le Cu^{II} à pH = 7,4.

Le suivi de la réaction de compétition a été effectué au niveau de la bande d'absorption du complexe **CT₂-Cu^{II}** (ML_s) de $\lambda_{\text{max}} = 383$ nm, qui est une zone pour laquelle ni le ligand (L_s), ni l'EDTA (L_c) et son complexe de Cu^{II} (ML_c) n'absorbent (Fig. 3).

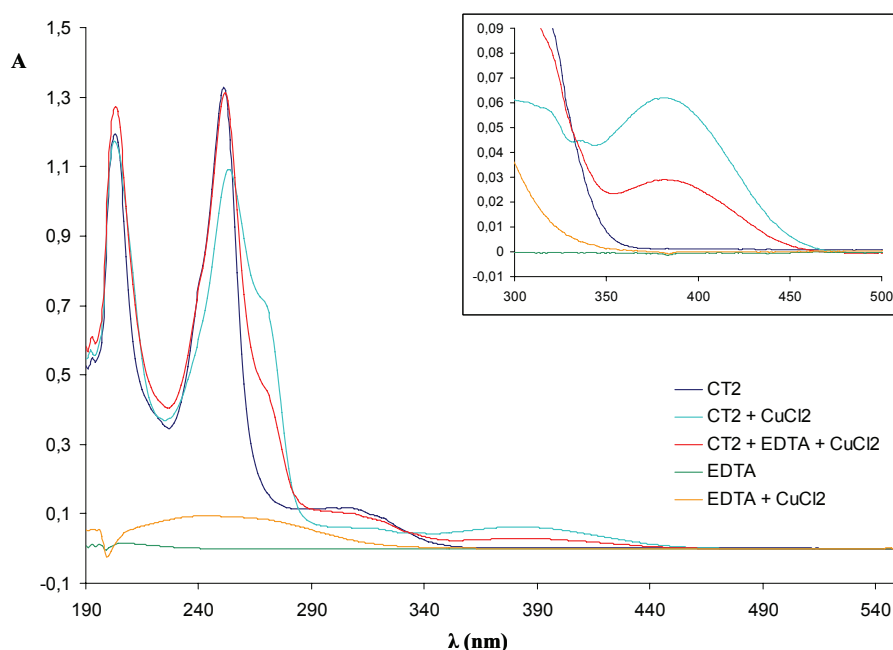


Fig. 3. Spectres UV-visible de **CT₂**, **CT₂ + CuCl₂**, **CT₂ + EDTA + CuCl₂**, **EDTA** et **EDTA + CuCl₂** à 15 μM dans le mélange Tris-HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM / CH_3OH (1/1).

Selon la méthode 1, le ligand **CT2** et le compétiteur EDTA ont été solubilisés dans un mélange Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM / CH₃OH à une concentration de 15 µM. Du CuCl₂ est alors ajouté, avec une concentration finale de 15 µM également. Le pourcentage d'espèce **CT2**-Cu^{II} (ML_s) à l'équilibre peut alors être déterminé à 383 nm : il est ici égal à 50 % de l'espèce **CT2** (L_s) introduite (Fig. 3).

L'équation 6 nous permet alors de calculer le log K_{app} de **CT2** pour le Cu^{II} : log K_{app} (Cu^{II}) = 15,9.

La même étude a été réalisée avec des compétiteurs possédant des constantes d'affinités pour le Cu^{II} plus faibles et plus fortes que celles de l'EDTA, afin de valider ce résultat. Des valeurs analogues de K_{app} (Cu^{II}) ont été retrouvées pour **CT2** (Tableau 1) et permettent de confirmer l'ordre de grandeur de la valeur du log K_{app} déterminée précédemment. Ces résultats permettent également de valider la méthode employée.

Compétiteur L _c	log K _{app} L _c (Cu ^{II})	% ML _s à l'équilibre	log K _{app} L _s (Cu ^{II})
EDDA	13,9	100	> 14,9
EDTA	15,9	50	15,9
Trien	16,0	30	15,3
CDTA	17,1	15	15,6
Tetren	17,9	0	< 16,9

Tableau 1. Valeurs de log K_{app} de **CT2** pour le Cu^{II} (log K_{app} L_s (Cu^{II})) d'après des expériences de compétition avec différents compétiteurs L_c pour un rapport L_s / L_c / M de 1 / 1 / 1 et une concentration de 15 µM. EDDA : acide éthylènediamine-N,N'-diacétique, EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique, Trien : triéthylènetétramine, CDTA, acide trans-1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tétraacétique, Tetren : tétraéthylènepentamine.

La méthode 2 a ensuite été appliquée dans le but d'affiner cette valeur. Elle consiste à métaller le ligand **CT2** en présence d'un équivalent de CuCl₂, à une concentration de 15 µM, dans le mélange Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM / CH₃OH (1 / 1). Un compétiteur de log K_{app} proche de celui déterminé pour **CT2** dans la première série d'expérience, l'EDTA, est alors ajouté par aliquots en solution concentrée, afin de n'induire que des variations négligeables de volume.

Le tracé de l'absorbance à 383 nm en fonction du nombre d'équivalents d'EDTA ajouté permet de déterminer le nombre d'équivalents d'EDTA nécessaires pour avoir 50

% de **CT2** métallé à l'équilibre ($A_{\max} / 2$) (Fig. 4), et par conséquent 50 % d'EDTA également métallé.

L'équation 7 nous permet de calculer le $\log K_{\text{app}}$ de **CT2** pour le Cu^{II} , avec $A_{\max} / 2$ obtenu pour 1,0 équivalent d'EDTA, soit $y = 100$ %. On obtient $\log K_{\text{app}} (\text{Cu}^{\text{II}}) = 15,9$.

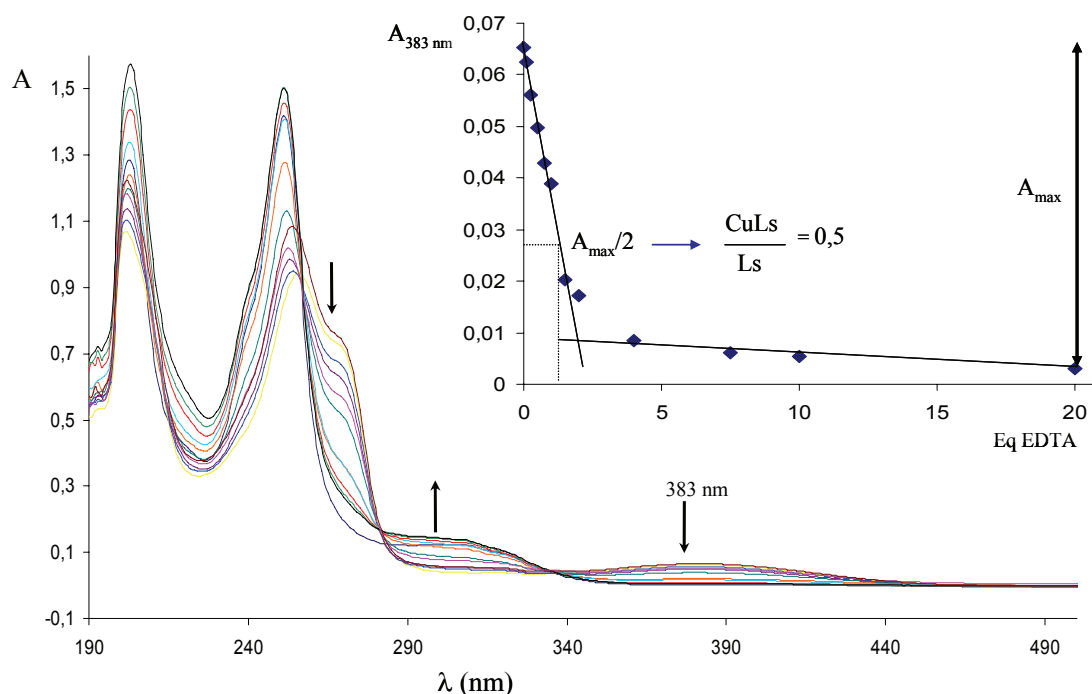


Fig. 4. Réaction de compétition pour la complexation de CuCl_2 par le ligand **CT2** et l'EDTA. Les spectres UV-visible sont obtenus avec 15 μM de **CT2** et de CuCl_2 et différents rapports d'EDTA dans du Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM / CH_3OH (1/1). La direction des flèches indique les variations observées sur les spectres lorsque le rapport EDTA / **CT2** augmente.

Suite à ces études, nous pouvons proposer une valeur de $\log K_{\text{app}}$ de **CT2** pour le Cu^{II} de $15,9 \pm 1$. Il faut noter que cette valeur expérimentale ne donne qu'un ordre de grandeur de la valeur de $\log K_{\text{app}}$ dans le milieu étudié (indiqué par l'incertitude de ± 1 unité de log). En effet, des erreurs expérimentales, mais également des variations dans la littérature concernant les valeurs de pK_a et de K_{aff} des compétiteurs (et donc de K_c), notamment en fonction du solvant, peuvent moduler les résultats obtenus.

I.3 Résultats

L'étude de la complexation de Cu^{II} et le Zn^{II} a été réalisée pour les ligands polyquinoléine, dans le milieu Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM / solvant organique et a été suivie par spectrophotométrie UV-visible (Tableau 2).

La stœchiométrie des complexes L / M observée en UV-visible a été confirmée par spectrométrie de masse sur des complexes préparés en solvant organique et, pour quelques exemples, par microanalyse (pour les complexes de Cu^{II} de **CT2**, **CT5**, **CT6**, **CT8**, **CT11** et **CT12**). Des expériences complémentaires ont montré que ces complexes formés en solvant organique et redissous dans le mélange Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM / solvant organique adéquat avaient les mêmes spectres UV-visible que ceux obtenus durant les expériences de titration pour la même stœchiométrie M / L.

Dans le cas des ligands formant uniquement des complexes métalliques de stœchiométrie L / M de 1 / 1, l'étude de l'affinité des ligands pour les ions métalliques a également été menée (Tableau 2). La méthode 1 (L_s / L_c / M dans un rapport 1 / 1 / 1) a été utilisée avec le compétiteur EDTA, et a été vérifiée pour les composés **CT2**, **CT6**, **CT12** et **CT13** avec d'autres compétiteurs de log K_{app} différents. La méthode 2 (ajout d'aliquots d'EDTA sur une solution de L_s / M dans un rapport 1 / 1), plus longue mais plus précise, a été appliquée aux composés **CT2**, **CT6**, **CT8**, **CT11** et **CT12** afin de confirmer les valeurs obtenues.

L'analyse UV-visible de complexation de Cu^{II} et Zn^{II} par les ligands **CT1**, **CT5** et **CT7**, comportant un bras méthylène entre les positions C2 de deux 8-hydroxyquinoléine n'a pas pu être menée, les résultats observés évoluant au cours du temps. Une analyse par spectrométrie de masse des complexes métalliques générés en présence d'un équivalent de ligand et d'un équivalent de sel métallique a toutefois permis de mettre en évidence l'unique présence de complexes de type LM pour ces trois ligands et ces deux ions métalliques.

Enfin, le composé **CT10** n'a pas été étudié car la présence de trois entités 8-hydroxyquinoléine est susceptible de favoriser la formation de plusieurs complexes avec des ratios L / M différents.

	Cu ^{II}		Zn ^{II}	
	Complexe observé	log K _{app}	Complexe observé	log K _{app}
CT2	LCu ^{II} a, b (f)	15,9 ± 1 ^c	LZn ^{II} a, b (f)	13,3 ± 1 ^c
CT3	LCu ^{II} a, b (f)	15,7 ± 1 ^d	LZn ^{II} a, b (f)	13,9 ± 1 ^d
CT4	LCu ^{II} a, b (f)	16,6 ± 1 ^d	LZn ^{II} a, b (f)	14,4 ± 1 ^d
CT6	LCu ^{II} a, b (g)	15,4 ± 1 ^c	LZn ^{II} a, b (h)	12,5 ± 1 ^d
CT8	LCu ^{II} a, b (f)	16,0 ± 1 ^c	LZn ^{II} a, b (f)	13,9 ± 1 ^d
CT9	LCu ^{II} a, b (f)	15,7 ± 1 ^d	LZn ^{II} a, b (f)	13,5 ± 1 ^d
CT11	LCu ^{II} a, b (g)	15,4 ± 1 ^c	LZn ^{II} a, b (h)	13,0 ± 1 ^d
CT12	LCu ^{II} a, b (e)	15,7 ± 1 ^c	LZn ^{II} a, b (e)	14,2 ± 1 ^d
CT13	LCu ^{II} a, b (f)	16,0 ± 1 ^d	LZn ^{II} a, b (f)	13,2 ± 1 ^d
CT14	Multi-espèces ^{b (e)}	-	LZn ^{II} a Stabilisation 10 eq. Zn ^{II} b (e)	< 6
CT15	LCu ^{II} a, b (f)	15,2 ± 1 ^d	LZn ^{II} a, b (f)	12,8 ± 1 ^d
CT16	LCu ^{II} a, b (f)	15,2 ± 1 ^d	Stabilisation 200 eq. Zn ^{II} b (f)	-
CT17	LCu ^{II} a, b (e)	16,0 ± 1 ^d	LZn ^{II} a Stabilisation 100 eq. Zn ^{II} b (e)	≈ 6
CT18	Pas de métallation ^{a, b (f)}	-	Pas de métallation ^{a, b (f)}	-
CT19	LCu ^{II} a Multi-espèces ^{b (e)}	-	Pas de métallation ^{a, b (e)}	-
CT20	LCu ^{II} a Multi-espèces ^{b (f)}	-	Stabilisation 1000 eq. Zn ^{II} b (f)	-
CT21	LCu ^{II} a, b (f)	14,7 ± 1 ^d	Stabilisation 200 eq. Zn ^{II} b (f)	-
8-hydroxy quinoléineⁱ	LCu ^{II}	12,0 (K ₁)	LZn ^{II}	8,5 (K ₁)
	L ₂ Cu ^{II}	11,0 (K ₂)	L ₂ Zn ^{II}	7,3 (K ₂)
		9,8 (K _{app})		6,3 (K _{app})
2-Me-8-hydroxy quinoléineⁱ	LCu ^{II}	11,0 (K ₁)	LZn ^{II}	9,1 (K ₁)
	L ₂ Cu ^{II}	7,7 (K ₂)	L ₂ Zn ^{II}	8,8 (K ₂)
		9,3 (K _{app})		6,4 (K _{app})
8-amino quinoléineⁱ	LCu ^{II}	6,1 (K ₁)	LZn ^{II}	2,4 (K ₁)
	L ₂ Cu ^{II}	4,7 (K ₂)	L ₂ Zn ^{II}	-
		6,1 (K _{app})		2,4 (K _{app})

Tableau 2 : Espèces formées lors des réactions de titration avec CuCl₂ ou ZnCl₂ et constantes d'affinité apparentes des différents ligands pour les ions Cu^{II} ou Zn^{II} à pH = 7,4, dans le milieu tampon Tris-HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM / solvant organique.

a. complexe métallique observé par spectrométrie de masse. b. stœchiométrie L / M observée par titration en UV-visible, la valeur entre parenthèse correspondant au milieu utilisé. c. d'après l'équation 7 (méthode 2). d. d'après l'équation 6 (méthode 1). e. Tampon / DMSO (2/8). f. Tampon / CH₃OH (1/1). g. Tampon / dioxane (1/1). h. Tampon / dioxane (2/8). i. d'après la référence "Sillen and Martell, 1971".

Plusieurs familles de composés apparaissent à l'issue de cette étude :

a. Ligands bisquinoléine substitués en position 8 par une fonction hydroxyle (CT1 à CT9, CT11 à CT15) : ces ligands présentent de fortes affinités pour le Cu^{II} et le Zn^{II}.

Excepté pour **CT14**, ces ligands forment avec les ions métalliques Cu^{II} et Zn^{II} un seul type de complexe, de stœchiométrie L / M : 1 / 1, qui a été confirmée par la présence de points isobestiques en spectroscopie UV-visible et par spectrométrie de masse.

Les valeurs de log K_{app} sont de l'ordre de 15-17 pour le Cu^{II} et 12,5-14,5 pour le Zn^{II}. Comme attendu d'après le tableau 2 du chapitre III, les substitutions en positions 5 et 7 du cycle quinoléine par des groupements chlore, iode ou méthoxy n'ont qu'une influence modérée sur la chélation (comparer **CT2** et son analogue chloré **CT6**, **CT8** et ses analogues chloré **CT11**, chloré et iodé **CT12** ou méthoxy **CT13**). La variation la plus nette est amenée par l'introduction d'un groupement chlore en position 5 du noyau quinoléine, qui entraîne une diminution de la stabilité des complexes étudiés.

La nature du bras de jonction induit des variations plus grandes concernant l'affinité pour les ions métalliques. Ainsi, pour un bras de jonction à un chaînon, les constantes d'affinité pour les deux ions métalliques étudiés varient fortement selon l'ordre : **CT15** (amine) < **CT2** (alkyle) < **CT4** (cétone).

La nature du bras de jonction semble même pouvoir entraîner des variations dans la nature du complexe formé. Ainsi, pour un bras de jonction à deux chaînons, le ligand **CT8** forme des complexes de type LCu^{II} et LZn^{II} de stœchiométrie L / M : 1 / 1, alors que le composé **CT14** comportant un lien amide n'a pas présenté, lors de la titration, de valeur nette de stabilisation des spectres UV-visible pour cette stœchiométrie. Des valeurs de stabilisation dépendant de la longueur d'onde étudiée semblent indiquer que plusieurs types de complexes métalliques peuvent se former. Toutefois, toutes ces espèces ne semblent pas avoir une stabilité comparable. En effet, seul le complexe **CT14-Zn^{II}** de stœchiométrie L / M : 1 / 1 a pu être détecté par spectrométrie de masse, ce qui est en accord avec une plus grande stabilité de ce complexe par rapport aux autres espèces que **CT14** peut former avec Zn^{II}.

Enfin, dans cette série, la longueur du bras de jonction semble avoir peu d'influence sur l'affinité pour les ions métalliques étudiés. Ainsi, pour un bras alkyle non substitué, **CT8** (avec un bras éthyle) présente des constantes d'affinité pour Cu^{II} et Zn^{II} voisines de celles de **CT9** (comportant un bras butyle). Dans le cas de **CT1** (bras méthyle), ces

valeurs n'ont pu être déterminées mais l'analyse des constantes d'affinité du ligand **CT2** (bras alkyle ramifié à un chaînon) pour le Cu^{II} et le Zn^{II} semble en accord avec une stabilité comparable des complexes formés avec ces ions métalliques.

Ces valeurs de constantes d'affinité pour le Cu^{II} et le Zn^{II} sont relativement élevées et sont plus fortes que pour le monomère parent 8-hydroxyquinoléine. La stratégie bi-chélateur favorise ainsi les complexes de stœchiométrie $L / M : 1 / 1$, en accord avec ce que l'on peut attendre si les deux résidus quinoléine du bi-chélateur chélatent le même ion métallique. Cette stratégie permet également d'améliorer de façon notable l'affinité pour les ions métalliques Cu^{II} et Zn^{II} .

b. Ligands bisquinoléine comportant un (ou deux) résidus amine en position 8 (CT16, CT17, CT20 et CT21) : ces ligands ont une forte affinité pour le Cu^{II} (avec des valeurs de $\log K_{\text{app}}$ comprises entre 14,5 et 16) mais ils complexent faiblement le Zn^{II} .

Les complexes de Cu^{II} de ces ligands sont de type LCu^{II} , sauf dans le cas du composé **CT20**. Pour ce dernier, plusieurs stœchiométries de stabilisation ont été observées en fonction de la longueur d'onde étudiée lors des expériences de titration en présence de CuCl_2 . Une analyse de modèles moléculaires a mis en évidence que dans le cas de **CT20**, la longueur du bras de jonction était trop courte pour permettre la chélation du Cu^{II} par les quatre azotes d'un même ligand, ce qui pourrait favoriser l'existence d'espèces comportant plusieurs ligands autour d'un même Cu^{II} . Toutefois, l'analyse par spectrométrie de masse des espèces formées a clairement mis en évidence la présence prépondérante de l'espèce **CT20- Cu^{II}** de stœchiométrie $L / M : 1 / 1$.

Dans le cas des titrations en présence de Zn^{II} , les variations des spectres UV-visible sont en accord avec une complexation de l'ion métallique mais celle-ci se fait difficilement. En effet, la stabilisation n'a été observée que pour de larges excès de ZnCl_2 (de 100 à 1000 équivalents par rapport au ligand étudié). Une estimation de la constante d'affinité pour Zn^{II} du ligand **CT17**, qui a montré par spectrométrie de masse la formation d'un complexe de type LZn en présence de ZnCl_2 dans du méthanol, a toutefois pu être réalisée. En effet, nous avons pu observer par spectroscopie UV-visible que la 2,2'-bipyridine ($\log K_{\text{app}} (\text{Zn}^{\text{II}}) \approx 5$) et la 1,10-phénanthroline ($\log K_{\text{app}} (\text{Zn}^{\text{II}}) = 6,3$) présentaient dans les mêmes conditions de solvant des stabilisations de leurs spectres de complexation pour 250 et 50 équivalents de ZnCl_2 , respectivement. Le ligand **CT17**

(stabilisation à 100 équivalents de $ZnCl_2$) a donc une affinité intermédiaire de l'ordre de $\log K_{app}(Zn^{II}) \approx 6$. Des phénomènes de compétition de chélation avec le tampon Tris ou le DMSO présents dans le milieu peuvent expliquer l'apparition tardive de spectres de complexation lors des titrations.

Ici encore, on peut conclure que dans le cas du Cu^{II} , la stratégie bi-chélateur permet d'améliorer efficacement la chélation.

Un second point intéressant est à noter : les dérivés bis-8-aminoquinoléine sont, comme leur équivalent monomérique, sélectifs du Cu^{II} par rapport au Zn^{II} .

c. Ligand CT19 :

Ce ligand, comportant un lien amide à deux chaînons entre les positions 8 de deux quinoléine, a montré lors des expériences de titration par $CuCl_2$ une affinité pour cet ion métallique sans toutefois qu'une espèce de stœchiométrie claire ait pu être caractérisée. Cependant, lorsque le ligand **CT19** a été mis en présence d'un équivalent de $CuCl_2$ en milieu organique, le complexe **CT19- Cu^{II}** a pu être observé par spectrométrie de masse, ce qui indique qu'une telle espèce peut se former.

D'autre part, aucune chélation du Zn^{II} n'a pu être mise en évidence par spectroscopie UV-visible, ni par spectrométrie de masse.

d. Ligand CT18 :

Ce ligand ne possède pas de résidus chélatants en position 8. Il n'a présenté aucune capacité à chélater les ions métalliques Cu^{II} et Zn^{II} dans les conditions d'analyse utilisées (spectroscopie UV-visible et spectrométrie de masse).

Remarque

Afin d'obtenir une bonne solubilité des ligands et de leurs complexes métalliques, les valeurs de $\log K_{app}$ ont été déterminées dans des milieux différents. Nous avons voulu vérifier que ces valeurs pouvaient être comparées entre elles. Pour cela, nous avons déterminé les valeurs des constantes d'affinité de **CT2** pour Cu^{II} et Zn^{II} dans les différents milieux utilisés (Tableau 3).

Le $\log K_s$ varie peu suivant la composition des milieux étudiés. Les valeurs déterminées dans ces milieux différents sont donc comparables.

M	Solvant	% ML _s	log K _{app} ^a
Cu ^{II}	Tampon / CH ₃ OH (1 / 1)	50	15,9
	Tampon / dioxane (1 / 1)	45	15,7
	Tampon / DMSO (2 / 8)	55	16,1
Zn ^{II}	Tampon / CH ₃ OH (1 / 1)	30	13,0
	Tampon / dioxane (2 / 8)	33	13,1
	Tampon / DMSO (2 / 8)	35	13,1
	CH ₃ OH	40	13,3

Tableau 3. Comparaison des réactions de compétition entre le ligand **CT2** (L_s), CuCl₂ ou ZnCl₂ (M) et le compétiteur EDTA (L_c) dans un rapport 1 / 1 / 1 à 15 μ M dans les différents solvants utilisés pour la détermination des constantes d'affinité apparentes (K_{app}) pour Cu^{II} et Zn^{II}. Le pourcentage de l'espèce ML_s à l'équilibre est indiqué. a. d'après l'équation 6.

II. Etudes *in vitro* sur le peptide A β

Les ions métalliques participent à l'agrégation du peptide A β dans le cerveau et à sa toxicité *via* la génération d'espèces réactives de l'oxygène. Nous avons donc cherché à évaluer la capacité des chélateurs synthétisés à empêcher la précipitation d'A β due aux ions métalliques et à inhiber la production d'H₂O₂ réalisée par A β en présence de Cu^{II} et de réducteur.

Nous avons choisi de mener les expériences sur la forme A β ₄₂, qui est la plus affine pour les ions métalliques et la plus amylogène. Ceci permet de se placer dans des conditions qui se rapprochent des pires conditions observées pour les agrégats amyloïdes dans l'environnement physiologique. Nous pensons ainsi pouvoir tirer des conclusions plus instructives concernant les effets des ligands sur les peptides A β impliqués dans la maladie d'Alzheimer.

Les ligands polyquinoléine testés ont été comparés à leurs équivalents monoquinoléine 8-hydroxyquinoléine et 8-aminoquinoléine. La 2-méthyl-8-hydroxyquinoléine a également été choisie pour comparaison puisqu'elle possède un groupement méthyl en position 2 qui peut modéliser le bras de jonction alkyle introduit en position 2 sur plusieurs dérivés polyquinoléine. Enfin, les tests ont également été réalisés sur le clioquinol et sur le composé bis-8-hydroxyquinoléine **CT15**, qui se sont tous deux révélés actifs sur A β (Barnham *et al.*, 2004; Cherny *et al.*, 2001).

II.1 Capacité des ligands à inhiber la précipitation d'A β induite par les ions métalliques

II.1.1 Description du test

Le but de cette étude est d'étudier la capacité des ligands à inhiber l'agrégation d'A β induite par les ions métalliques. Cette agrégation est caractérisée par une précipitation du peptide à la suite d'une étape de centrifugation.

II.1.1.1 *Conditions*

Le protocole a été établi à partir des travaux d'Atwood *et al.*, qui ont étudié, pour le chélateur EDTA, l'inhibition de la précipitation d'A β_{42} en présence de CuCl₂ (Atwood *et al.*, 2000). Le peptide A β_{42} (5 μ M) a été incubé dans le tampon 20 mM Tris·HCl (pH = 7,4), 150 mM NaCl, en présence de Cu^{II} (20 μ M) pendant une heure à 37 °C afin d'induire son agrégation. Le chélateur EDTA (200 μ M) a été ajouté au milieu réactionnel pendant une heure puis, après une étape de centrifugation, le taux de protéine dans le surnageant a été dosé pour déterminer la solubilité d'A β . Dans ces conditions, les auteurs ont observé que le taux d'A β_{42} soluble (dans le surnageant) était de 15 % en absence de chélateur et de 88 % en présence d'EDTA.

Dans ces conditions, et pour une incubation de 2 heures à 37 °C, 4 équivalents de Cu^{II} par A β semblent suffisants pour induire une précipitation forte d'A β_{42} et 10 équivalents d'EDTA par Cu^{II} permettent une inhibition efficace de cette agrégation.

Ces conditions nous ont paru intéressantes et ont donc été retenues pour l'étude des chélateurs synthétisés. Le choix du tampon est très important, sa nature, la présence de sels, la force ionique et le pH influençant considérablement la précipitation d'A β (Atwood *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1997; Raman *et al.*, 2005). L'avantage du tampon Tris·HCl, qui est un tampon couramment utilisé, est d'être accessible sous forme très pure, peu contaminée par les ions métalliques. Enfin, une valeur de pH = 7,4, qui correspond au pH physiologique, a été utilisée.

II.1.1.2 *Choix du réactif de quantification en protéine*

La quantification de la concentration en protéine a été réalisée à l'aide d'un kit Micro BCA Protein Assays (Pierce) à partir de gammes étalon réalisées avec des quantités connues d'albumine de sérum bovin (BSA) (Smith *et al.*, 1985).

Les composants du réactif de détection sont l'acide bicinchonique (BCA) et du Cu^{II} en milieu alcalin. Le principe du test repose sur la réaction de réduction du Cu^{II} en Cu^I par les protéines en milieu alcalin. Le Cu^I formé est alors chélaté par 2 ligands BCA, produisant un complexe qui absorbe à 562 nm et peut être détecté par spectrophotométrie à cette longueur d'onde (Schéma 1).

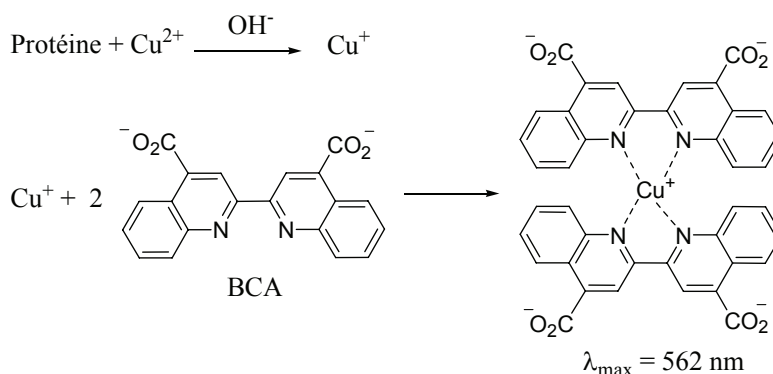


Schéma 1. Réactions conduisant à la détection colorimétrique des protéines par le BCA.

Ce test colorimétrique possède plusieurs avantages, puisqu'il est :

- quantitatif, sensible (détection à partir de 0,02 μM A β) et linéaire dans la gamme de concentration de protéine étudiée (jusqu'à 6 μM A β),
- peu dépendant de la séquence de la protéine, puisque ce sont les liens peptidiques qui réagissent lors du dosage et non les résidus, de nature variable, des acides aminés. L'étalonnage réalisé sur la BSA est donc applicable à A β ,
- compatible avec l'utilisation de Cu^{II} et de chélateurs d'ions métalliques aux concentrations de l'étude.

Des contrôles avec une quantité connue de protéine BSA (non agrégante), en présence de Cu^{II}, de ligands ou de ligands + Cu^{II} ont montré que la quantification du taux de protéine était correcte dans les conditions expérimentales utilisées. Ils ont également permis de vérifier que la précipitation observée pour A β était sélective de cette protéine puisqu'aucun effet sur la solubilité de BSA n'a été observé lors de ces contrôles.

II.1.1.3 Optimisation du test

La faible solubilité des composés synthétisés en solution aqueuse a nécessité l'emploi de DMSO pour la préparation de solutions concentrées de ligands. Les expériences ont alors été réalisées dans le milieu final 20 mM Tris·HCl (pH = 7,4), 150

mM NaCl + 9 % DMSO. Il faut noter que l'ajout de DMSO améliore la solubilité d'A β en diminuant la proportion de structures en feuillets- β favorables à l'agrégation du peptide (Huang *et al.*, 1997).

Le test Micro BCA étant sensible à la présence de DMSO, les gammes étalons à partir de la BSA et les expériences menées en absence de ligands ont été réalisées avec 9 % de DMSO de manière à pouvoir comparer les résultats entre eux.

D'autre part, les premiers essais réalisés avaient montré une absence de reproductibilité des résultats. Ce problème a été résolu en réalisant l'incubation sous agitation (1 400 t/min), de manière à favoriser le contact entre les différentes espèces en présence dans le milieu réactionnel, en particulier entre les chélateurs et les complexes métalliques d'A β .

II.1.2 Quantification de la précipitation d'A β par les ions métalliques

II.1.2.1 Précipitation d'A β par les ions Cu^{II}, Zn^{II} et Fe^{III}

Nous avons dans un premier temps cherché à déterminer les taux de précipitation d'A β ₄₂ (5 μ M) en présence d'ions métalliques (20 μ M) dans les conditions expérimentales mises en œuvre.

Les résultats (Tableau 4) ont été indiqués en pourcentage d'A β soluble, car nous nous intéresserons par la suite à la solubilisation d'A β par les ligands. Toutefois, le taux d'A β précipité peut être facilement déduit : dans toutes les expériences, la somme des pourcentages d'A β soluble et précipité est de l'ordre de 100 %.

% A β soluble			
A β	A β + Cu ^{II}	A β + Zn ^{II}	A β + Fe ^{III}
55 $\pm$ 4	18 $\pm$ 2	29 $\pm$ 3	47 $\pm$ 2

Tableau 4. Pourcentage d'A β ₄₂ soluble en absence ou en présence d'ions métalliques. A β ₄₂ (5 μ M) est incubé 2 heures à 37 °C dans du tampon 20 mM Tris·HCl (pH = 7,4), 150 mM NaCl + 9 % DMSO en absence ou en présence de Cu^{II}, Zn^{II} ou Fe^{III} (20 μ M). Les quantités d'A β ₄₂ soluble et précipité sont déterminées à l'aide d'un kit Micro BCA Protein Assays.

Dans les conditions utilisées, A β ₄₂ précipite partiellement, et seul 55 % de l'A β est retrouvé en solution après deux heures d'incubation à 37 °C. Cet effet peut être attribué à des traces de contaminants métalliques dans les solvants (malgré un passage sur résine

chélex pour piéger les ions métalliques) et / ou à la capacité du peptide à adopter spontanément des structures favorisant sa précipitation.

Le Cu^{II}, et dans une moindre mesure le Zn^{II}, accentuent fortement la précipitation du peptide, ne laissant respectivement que 18 et 29 % de l'A β en solution. Le Fe^{III}, par contre, n'a qu'une faible influence sur la précipitation d'A β .

II.1.2.2 Analyse de la précipitation d'A β en fonction du rapport Cu^{II} / A β

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au Cu^{II}, qui précipite fortement A β , et avons cherché analyser cette précipitation en fonction du ratio Cu^{II} / A β .

Le peptide A β ₄₂ (5 μ M) a été incubé 2 heures à 37 °C dans le tampon de réaction en présence de quantités variables de CuCl₂ (Fig. 5). En absence de Cu^{II}, 45 % de l'A β ₄₂ est précipité dans les conditions expérimentales utilisées.

L'agrégation augmente quand le rapport Cu^{II} / A β ₁₋₄₂ augmente jusqu'à 2,5 Cu^{II} par A β ₄₂ puis se stabilise pour une valeur de l'ordre de 80 % de peptide agrégé. Nous retrouvons ici la stœchiométrie maximale de 2,5 ions Cu^{II} coordonnés à A β ₄₂ qui a été proposée par Atwood *et al.* à pH = 7,4 (Atwood *et al.*, 2000).

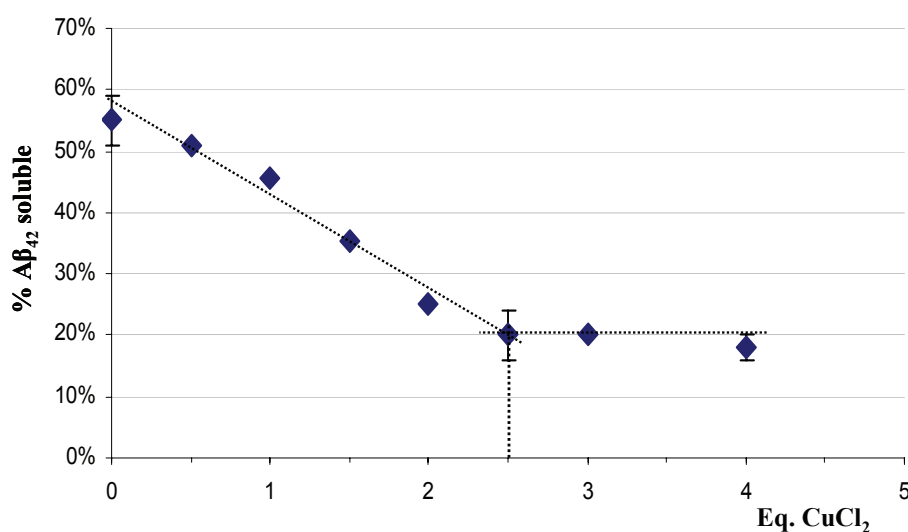


Fig. 5. Variation du pourcentage d'A β ₄₂ soluble en fonction de la stœchiométrie A β /Cu^{II}. A β ₄₂ (5 μ M) est incubé 2 heures à 37 °C dans du tampon 20 mM Tris·HCl (pH = 7,4), 150 mM NaCl + 9 % DMSO en présence de quantités variables de CuCl₂. Les quantités d'A β ₄₂ soluble et précipité sont déterminées à l'aide d'un kit Micro BCA Protein Assays.

Les conditions utilisées dans les tests, soit A β ₄₂ (5 μ M) en présence de 4 équivalents de CuCl₂, sont donc suffisantes pour induire le maximum de précipitation d'A β . De plus, la forte valeur de précipitation observée est intéressante car elle offre une large plage d'étude pour le phénomène d'inhibition de cette précipitation par les ligands.

II.1.3 Inhibition de la précipitation d'A β par l'ajout de ligands

Nous avons alors étudié l'effet des chélateurs polyquinoléine sur la solubilisation d'A β ₄₂ (Tableau 5).

	% A β soluble			
	sans métal	CuCl ₂	ZnCl ₂	FeCl ₃
sans ligand	55 $\pm$ 4	18 $\pm$ 2	29 $\pm$ 3	47 $\pm$ 2
CT1	63 $\pm$ 4	60 $\pm$ 5	63	61
CT2	56	47 $\pm$ 3	59	60
CT3	60	51 $\pm$ 1	50	52
CT4	56	58 $\pm$ 3	54	51
CT5	66	45 $\pm$ 5	57	58
CT6	55	30	49	45
CT7	53	48 $\pm$ 3	50	44 $\pm$ 6
CT8	59	35	60	40
CT9	52	42	43	43
CT10	48	48	45	43
CT11	59	36	58	41
CT12	36	19	47	38
CT13	63 $\pm$ 3	38 $\pm$ 4	42 $\pm$ 4	38
CT14	66	46 $\pm$ 3	62 $\pm$ 5	49
CT15	74	48 $\pm$ 3	49	49
CT16	73	60 $\pm$ 4	58 $\pm$ 4	62
CT17	69	69 $\pm$ 2	52	59
CT18	72	35	23	42
CT19	64	21	21	38
CT20	79 $\pm$ 3	45 $\pm$ 3	65	51
CT21	71 $\pm$ 2	55 $\pm$ 3	57	66
8-hydroxyquinoléine	85	70 $\pm$ 3	88	80
2-méthyl-8-hydroxyquinoléine	69	52	62	51
clioquinol	63	55 $\pm$ 3	37	51
8-aminoquinoléine	66 $\pm$ 3	40	67	58

Tableau 5. Analyse de la solubilisation par les ligands (200 μ M) d'A β ₄₂ (5 μ M) agrégé en absence ou en présence d'ions métalliques (Cu^{II}, Zn^{II} ou Fe^{III}, 20 μ M) dans du tampon 20 mM

Tris-HCl (pH = 7,4), 150 mM NaCl + 9 % DMSO. Les quantités d'A β ₄₂ soluble et précipité sont déterminées à l'aide d'un kit Micro BCA Protein Assays.

Le peptide A β ₄₂ (5 μ M) a été précipité par incubation dans le tampon de réaction, en présence (ou en absence) d'ions métalliques (Cu^{II}, Zn^{II} ou Fe^{III}, 20 μ M) pendant une heure à 37 °C. Les ligands (200 μ M) ont été ajoutés au milieu réactionnel pendant une heure puis les taux d'A β soluble et précipité ont été dosés après une étape de centrifugation.

Un premier point concerne le peptide agrégé en absence d'ions métalliques. Alors que le composé **CT12** amplifie l'agrégation du peptide, d'autres ligands (comme **CT1**, **CT5**, **CT13** à **CT21**) permettent d'améliorer la solubilité d'A β ₄₂. Ce phénomène est particulièrement important (solubilité d'A β supérieure à 70 %) pour les dérivés bisquinoléine comportant en position 2 un bras de jonction à un chaînon constitué par une amine (**CT15** et **CT16**) ou substitués en position 8 par une amine (**CT16**, **CT17**, **CT20** et **CT21**). Le dérivé **CT18** (comportant un lien éther en position 8 entre les deux résidus quinoléine) et la 8-hydroxyquinoléine produisent également cette augmentation de solubilisation d'A β .

Cette action peut être due à la chélation de traces résiduelles d'ions métalliques dans les milieux réactionnels ou encore à une capacité propre des ligands à déstabiliser les agrégats d'A β formés en absence d'ion métallique. Toutefois, la chélation de contaminants métalliques peut difficilement être proposée dans le cas de **CT18** qui, dans les expériences précédentes, n'a montré aucune capacité à chélater les métaux. Il en résulte que, dans son cas tout au moins, une déstabilisation des agrégats d'A β formés en absence d'ions métalliques pourrait être proposée.

*D'autre part, **en présence de Cu^{II} mais aussi de Zn^{II} et de Fe^{III}, la plupart des composés quinoléine testés sont capables d'augmenter la solubilité d'A β ₄₂.***

En effet, seuls les composés **CT18** (dérivé éther en position 8) et **CT19** (dérivé amide en position 8) sont pratiquement inactifs pour inhiber la précipitation d'A β induite par le Cu^{II}, le Zn^{II} ou le Fe^{III}. Ce fait peut être attribué à leur faible capacité à chélater les ions métalliques observée précédemment.

La nature des ligands module toutefois ces propriétés d'inhibition de la précipitation d'A β .

Une première analyse peut être faite dans la série 8-hydroxyquinoléine (composés **CT1** à **CT15**).

Si on excepte les dérivés halogénés **CT5** et **CT6**, les dérivés comportant un bras de jonction à un chaînon (**CT1** à **CT7** et **CT15**) ont une capacité à inhiber la précipitation d'A β qui est pratiquement la même quel que soit le métal utilisé pour induire l'agrégation.

Les dérivés comportant un bras à deux chaînons (**CT8** et **CT11** à **CT14**) ont une activité plus faible pour inhiber l'agrégation due à Cu^{II} et nulle dans le cas du Fe^{III}, alors qu'ils sont plus efficaces pour le peptide agrégé en présence de Zn^{II}.

Dans cette même série, l'allongement du bras de jonction (composé **CT9** avec un bras butyl) ou l'ajout d'un troisième résidu 8-hydroxyquinoléine (**CT10**) diminuent cette activité.

Il en va de même pour la substitution des cycles aromatiques par des halogènes en positions 5 et / ou 7 : une comparaison de **CT1** et **CT5**, **CT2** et **CT6**, ou **CT8**, **CT11** et **CT12** pour une même nature de bras de jonction entre les résidus 8-hydroxyquinoléine, ou la comparaison des dérivés 8-hydroxyquinoléine et clioquinol dans la série monoquinoléine permet de le visualiser. La présence d'un substituant méthoxy en position 7 du noyau quinoléine a un effet similaire de diminution de la capacité à inhiber l'agrégation de A β due aux ions métalliques (comparer **CT1** à **CT7** et **CT8** à **CT13**).

Une comparaison des résultats obtenus pour les composés **CT1** à **CT4** montre de plus que, pour une même longueur de bras de jonction, l'activité obtenue en fonction du métal peut être modulée par l'incorporation de substitutions au niveau de ce bras. C'est le cas des substituants méthyle (diminution de l'activité vis-à-vis de Cu^{II} pour **CT2** par rapport à **CT1**), fluoré (diminution de l'activité vis-à-vis de tous les ions métalliques testés pour **CT3**) ou oxo (diminution de l'activité vis-à-vis de Zn^{II} et Fe^{III} pour **CT4**).

Dans la série des dérivés bisquinoléine comportant un (ou deux) résidu(s) amine en position 8 (**CT16**, **CT17**, **CT20** et **CT21**), des activités fortes sont en général observées. Ce sont toutefois les ligands **CT16** et **CT17** qui sont les plus actifs. Malgré leur nature très différente (**CT17** est tridentate et possède un bras de jonction en position 8 alors que **CT16** est relié en position 2), il faut remarquer que ce sont les deux ligands de cette série qui possèdent le bras de jonction le plus court entre les entités chélatantes.

Le fait le plus surprenant concernant cette série de ligands est leur apparente capacité à inhiber l'agrégation du peptide par le Zn^{II}, pour lequel ils sont tous de mauvais chélatants. Une explication de ce phénomène est probablement à rechercher au niveau de leur capacité à faciliter la solubilité d'A β en absence d'ion métallique, mais un manque de temps nous a empêchés de mener cette étude.

D'autres remarques plus générales peuvent être faites, en plus de ces comparaisons, à partir du tableau 5.

Ainsi, certains ligands sont particulièrement actifs et permettent d'atteindre un niveau de solubilisation comparable à celui qu'ils produisent sur A β agrégé en absence d'ion métallique. C'est le cas par exemple de **CT1** et **CT4** (tous les deux sont des dérivés de 8-hydroxyquinoléine reliés par un bras à un chaînon en position 2) pour les trois ions métalliques étudiés. De même dans le cas du Cu^{II}, le ligand **CT17** (dans la série comportant des amines en position 8) permet d'atteindre, comme en absence d'ion métallique, la valeur particulièrement élevée de 69 % d'A β soluble.

D'autres dérivés polyquinoléine sont également intéressants pour resolubiliser A β ₄₂ agrégé en présence de Cu^{II}, qui est l'ion métallique le plus impliqué dans la précipitation d'A β . Ainsi **CT3**, **CT16** ou **CT21** possèdent également une activité comparable ou meilleure que celle du clioquinol, qui avait montré des capacités de solubilisation des plaques amyloïdes de cerveaux humains *ex vivo* (Cherny *et al.*, 1999).

Il faut également noter que la 8-hydroxyquinoléine, utilisée comme contrôle, semble elle aussi très efficace bien que cette propriété n'ait pas, à notre connaissance, été rapportée dans la littérature.

En conclusion, les meilleurs ligands bisquinoléine selon ce test sont les chélateurs CT1, CT4, CT16, CT17 et CT21.

Un test supplémentaire a mis en évidence qu'en présence de Cu^{II}, de Zn^{II} et de Fe^{III}, le taux de précipitation maximal du peptide était atteint au bout d'une heure d'incubation. Nous pouvons donc proposer que les ligands (qui sont rajoutés seulement après une heure d'incubation) ne fassent pas qu'empêcher l'agrégation du peptide mais peuvent probablement agir sur des agrégats préalablement formés.

II.1.4 Influence de la stœchiométrie métal / ligand

Nous avons ensuite cherché à analyser l'effet, sur la solubilisation d'A β , d'une stœchiométrie minimale (1 / 1) en ligand par rapport à l'ion métallique Cu^{II}. Nous nous sommes placés pour cela à la concentration minimale de Cu^{II} induisant le maximum de précipitation d'A β ₄₂, soit 2,5 équivalent de Cu^{II} par peptide (Fig. 5).

Les expériences ont été réalisées pour A β ₄₂ (5 μ M), CuCl₂ (12,5 μ M) et le ligand bisquinoléine (12,5 μ M). Pour les expériences contrôles en présence de composés monoquinoléine, 2 équivalents de ligand par Cu^{II} ont été ajoutés (25 μ M) car les complexes classiquement invoqués dans leur cas sont de type L₂Cu.

Pour les ligands ayant montré une forte inhibition de l'agrégation induite par Cu^{II}, les résultats obtenus ont été comparés à ceux des expériences précédentes, pour lesquelles les stœchiométries employées étaient de 4 équivalents de Cu^{II} par peptide et de 10 équivalents de ligand par Cu^{II} (Fig. 6).

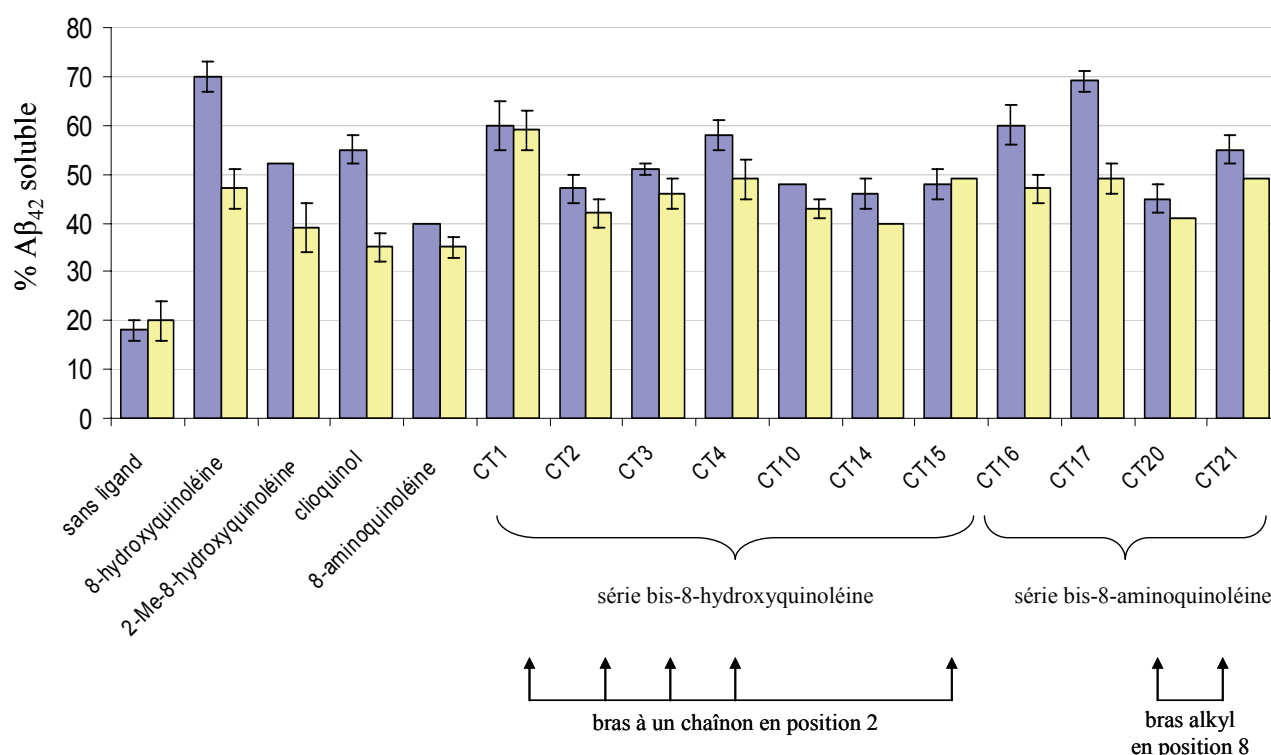


Fig. 6. Variation du pourcentage d'A β ₄₂ soluble en présence de différentes stœchiométries de CuCl₂ et de ligands. A β ₄₂ (5 μ M) est agrégé en présence de Cu^{II} (12,5 ou 20 μ M) puis les ligands (12,5 ou 25 μ M selon les ligands ou 200 μ M) sont ajoutés. Les quantités d'A β ₄₂ soluble et précipité sont déterminées à l'aide d'un kit Micro BCA Protein Assays.

Les valeurs en bleu correspondent à 20 μ M CuCl₂ / 200 μ M ligand. Les valeurs en jaune correspondent à 12,5 μ M CuCl₂ / 12,5 μ M ligand (ou 25 μ M pour les ligands monoquinoléine).

Un résultat remarquable est que l'activité des dérivés polyquinoléine substitués par une fonction hydroxyle en position 8 (CT1, CT2, CT3, CT4, CT10, CT14 et CT15) est statistiquement identique (en considérant les valeurs avec un écart type ≤ 5 %) quelles que soient les conditions employées. Ces ligands sont donc efficaces et permettent d'atteindre la solubilisation maximale d'A β pour une stœchiométrie ligand / Cu^{II} de 1 / 1.

Ce résultat est d'autant plus intéressant que dans le cas de leurs analogues monoquinoléine (8-hydroxyquinoléine, 2-méthyl-8-hydroxyquinoléine et clioquinol), la capacité de solubilisation diminue quand l'excès de ligand par rapport à A β et à Cu^{II} diminue. Il faut préciser que deux équivalents de ligands monomériques ont été employés afin de conserver le même nombre d'entités chélatantes disponibles par rapport au Cu^{II} que dans le cas des dérivés bisquinoléine et donc de permettre la comparaison. Ainsi, pour ces dérivés monomériques, des excès de ligands sont nécessaires pour atteindre une solubilisation maximale d'A β .

Dans le cas des ligands substitués par une fonction amine en position 8, on retrouve un résultat similaire pour CT20 et CT21 (comportant un bras de jonction alkyle en position 8) en comparant les deux conditions expérimentales mises en œuvre. Les composés CT16 et CT17 perdent de l'activité dans le cas de la stœchiométrie ligand / Cu^{II} de 1 / 1, mais restent toutefois plus actifs que leur analogue comportant un seul résidu quinoléine (8-aminoquinoléine).

Dans ce test, l'intérêt de la stratégie polyquinoléine apparaît très clairement. Pour des rapports ligand / Cu^{II} de 1 / 1, les dérivés polyquinoléine sont plus efficaces que leurs équivalents monoquinoléine pour inhiber l'agrégation d'A β ₄₂.

Ces résultats peuvent être corrélés à la plus grande affinité des ligands bisquinoléine pour le Cu^{II} comparé à leurs analogues monoquinoléine, qui permet d'enlever plus facilement le Cu^{II} sur A β et d'atteindre les valeurs de solubilité observées en absence de métal.

II.2 Capacité des ligands à inhiber la production d'H₂O₂ :

En présence d'un réducteur comme l'ascorbate, les complexes de Cu^{II} du peptide A β produisent du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à partir d'O₂, par l'intermédiaire d'un

mécanisme d'oxydoréduction au niveau de l'ion métallique. Nous avons cherché à étudier l'influence des ligands polyquinoléine sur cette production d'H₂O₂.

II.2.1 Description du test

II.2.1.1 Choix du réactif de détection d'H₂O₂

La production d'H₂O₂ a été quantifiée à l'aide d'un kit Amplex Red H₂O₂/HRP Assay (Molecular Probes), à partir de courbes étalons obtenues avec des quantités connues d'H₂O₂. Le principe du test est le suivant : l'H₂O₂ formé oxyde le réactif de détection Amplex Red en présence de la peroxydase de raifort (HRP pour Horseradish Peroxidase) qui catalyse cette réaction stœchiométrique. Le produit de la réaction, la résorufine, absorbe à 563 nm et peut être détecté par spectrophotométrie à cette longueur d'onde (Schéma 2) (Zhou *et al.*, 1997).

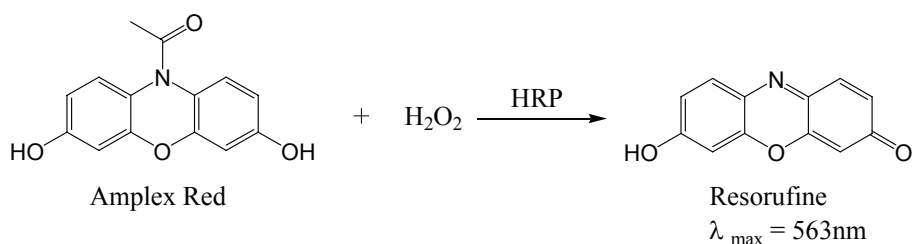


Schéma 2. Production de la résorufine à partir d'Amplex Red et d'H₂O₂ et en présence de HRP.

Les avantages de cette technique de détection d'H₂O₂ sont :

- une détection possible en spectroscopie UV-visible (contrairement aux autres méthodes qui nécessitent une détection par fluorimétrie),
- la rapidité de la réaction (à l'échelle de la minute),
- sa sensibilité (la valeur inférieure de détection est 10 pmol H₂O₂),
- une réponse linéaire dans la gamme de concentrations étudiées.

II.2.1.2 Choix des conditions de réaction

Le protocole a été établi à partir de différents travaux sur la production d'H₂O₂ par A β ₄₂ en présence de cuivre (Barnham *et al.*, 2003; Ciccotosto *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 1999a; Huang *et al.*, 1999b; Opazo *et al.*, 2002).

Globalement, la réaction de production d'H₂O₂ est menée par incubation du peptide A β ₄₂ en présence de Cu^{II} et d'un réducteur, l'ascorbate, mis en excès par rapport à l'ion métallique pour permettre plusieurs cycles rédox de production d'H₂O₂.

La sensibilité du test permet de travailler avec des concentrations plus faibles en A β_{42} (200 nM) que pour les expériences de précipitation.

Les expériences de précipitation d'A β en présence de Cu^{II} décrites plus haut, et les données de la littérature, indiquent qu'A β chélate jusqu'à 2,5 équivalents de Cu^{II} (Atwood *et al.*, 2000). La quantité maximale de Cu^{II} utilisée dans les expériences suivantes a été fixée à 2 équivalents de Cu^{II} par A β , de sorte que tout le Cu^{II} soit chélaté par le peptide. En effet, le Cu^{II} libre, en présence de réducteur, est rédox actif et produit de l'H₂O₂ susceptible de contaminer les mesures concernant le peptide A β . De plus, pour favoriser la complexation du Cu^{II} par le peptide, une étape de pré-incubation d'une heure, à 37 °C et sous agitation, est réalisée entre A β et le CuCl₂. Les ligands polyquinoléine (1 équivalent par Cu^{II}) sont alors ajoutés au bout d'une heure sur le système A β + Cu^{II} et incubés une heure pour favoriser la chélation du Cu^{II} par ceux-ci.

L'ascorbate (10 μ M) est ensuite ajouté au milieu et la réaction est menée à 37 °C pendant 5 minutes, avant l'ajout du système de quantification d'H₂O₂.

Enfin, le kit Amplex Red H₂O₂/HRP Assay est fourni avec un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH = 7,4 qui sera donc le milieu utilisé lors des expériences sur H₂O₂.

II.2.2 Quantification de la production d'H₂O₂ par le système A β + Cu^{II} + réducteur

Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à la production d'H₂O₂ par le système A β_{42} + Cu^{II} + réducteur, en fonction du ratio Cu / A β . En effet, le peptide A β peut chélater différentes stœchiométries de Cu^{II} et les différents complexes formés peuvent avoir des capacités variables à produire H₂O₂ en présence de dioxygène et de réducteur. Afin de pouvoir comparer directement les résultats, la quantité de Cu^{II} a été maintenue constante (0,4 μ M) et les quantités d'A β ont été variées (0,2 à 0,53 μ M A β). Ceci permet en effet de maintenir constant le rapport entre les espèces rédox actives (les ions cuivre) et leur activateur (l'ascorbate).

La quantification du H₂O₂ libéré par les systèmes A β ·Cu_n a été réalisée. Des expériences de contrôle ont montré que les espèces A β , Cu^{II} ou A β ·Cu_n ne forment pas d'H₂O₂ en absence d'ascorbate.

En présence d'ascorbate et d'air, les différents complexes de cuivre formés avec A β_{42} produisent tous du H $_2$ O $_2$, mais en quantités variables (Fig. 7).

La quantité d'H $_2$ O $_2$ produite augmente quand le rapport Cu / A β augmente.

Celle-ci atteint 2,8 nmol d'H $_2$ O $_2$ dans le cas d'A β Cu $_2$ (soit une concentration de 7,5 μ M d'H $_2$ O $_2$ à comparer aux 0,4 μ M de CuCl $_2$ introduits lors de la réaction) : la production d'H $_2$ O $_2$ par ce complexe (ainsi que par les autres complexes étudiés) est catalytique, en accord avec les résultats d'Opazo *et al.* (Opazo *et al.*, 2002).

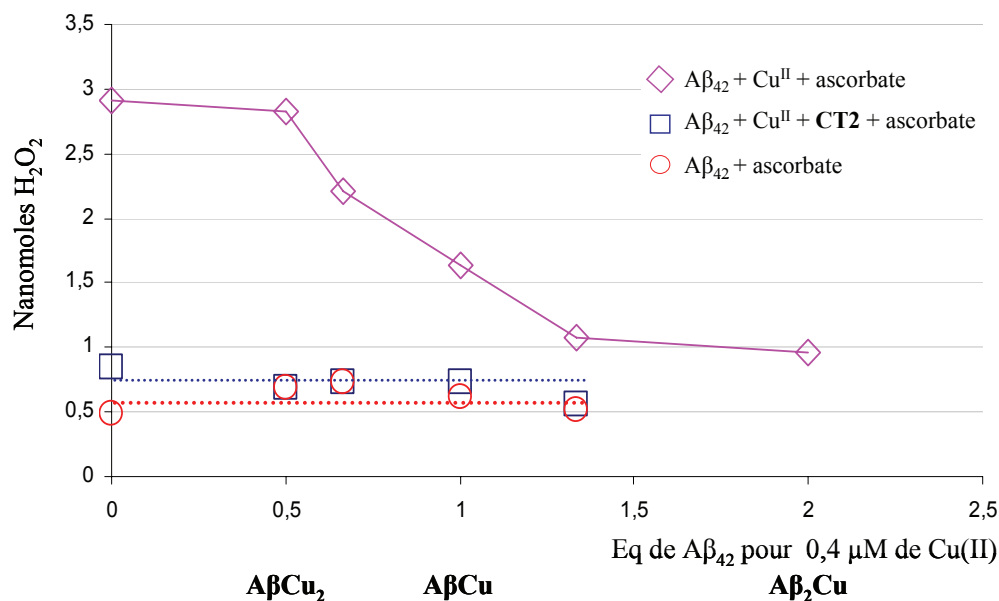


Fig. 7. Variation de la production d'H $_2$ O $_2$ par les complexes de cuivre d'A β_{42} en fonction de la stœchiométrie Cu II / A β . Les expériences sont réalisées dans du tampon phosphate de sodium 50 mM, pH = 7,4 en présence de CuCl $_2$ (0,4 μ M), d'ascorbate (10 μ M) et d'air, en absence ou en présence de CT2 (0,4 μ M). Les quantités d'H $_2$ O $_2$ libéré sont déterminées à l'aide d'un kit Amplex Red H $_2$ O $_2$ /HRP Assay.

Par ailleurs, les mêmes expériences ont été réalisées en présence d'un équivalent de CT2 par Cu. **Ce composé inhibe pratiquement toute la production d'H $_2$ O $_2$, avec des valeurs mesurées proches de celles observées pour A β en absence de Cu, quel que soit le rapport Cu / A β_{42} testé.**

II.2.3 Inhibition de la production d'H $_2$ O $_2$ par l'ajout de ligands

Les ligands polyquinoléine ayant montré des résultats intéressants pour inhiber la précipitation d'A β due à Cu II ont été évalués pour leur effet sur la production d'H $_2$ O $_2$ par les systèmes A β + Cu II + réducteur et Cu II + réducteur.

Les résultats obtenus figurent dans le tableau 6.

	n (H ₂ O ₂) (nmol)		
	sans A β ₄₂	0,2 μ M A β ₄₂ Cu/A β = 2	0,53 μ M A β ₄₂ Cu/A β = 0,75
sans ligand	2,93 $\pm$ 0,18	2,77 $\pm$ 0,16	1,08
CT1	0,54	0,75 $\pm$ 0,11	0,76
CT2 1 eq/Cu	0,84	0,71 $\pm$ 0,02	0,55
1,5 eq/Cu	-	0,49	-
CT3	0,39	0,55 $\pm$ 0,08	-
CT4	0,82	0,86 $\pm$ 0,11	-
CT5	0,56	0,80 $\pm$ 0,23	0,61
CT6	0,12	0,37 $\pm$ 0,09	0,35
CT7	-	0,70	-
CT8	0,75	0,89 $\pm$ 0,07	0,68
CT11	0,66	0,89 $\pm$ 0,09	0,64
CT12	0,66	0,82 $\pm$ 0,08	0,82
CT13	-	0,69	-
CT14	0,47	0,47	0,45
CT15	-	0,31	-
CT16	0,65	0,69	0,49
CT17	0,40	0,47 $\pm$ 0,09	-
CT19	0,49	0,62	0,47
CT20	0,74	1,99	0,78
CT21	0,89	2,10	0,70
8-hydroxyquinoléine			
1 eq/Cu	2,02	0,69	0,75
2 eq/Cu	0,62	0,71 $\pm$ 0,05	0,62
2-méthyl-8-hydroxyquinoléine			
1 eq/Cu	2,31	0,84	0,79
2 eq/Cu	0,72	0,77	0,79
clioquinol			
1 eq/Cu	2,07	0,89 $\pm$ 0,08	0,64
2 eq/Cu	0,54	0,78 $\pm$ 0,06	0,57
8-aminoquinoléine			
1 eq/Cu	2,28	0,97	0,93
2 eq/Cu	2,45	0,91	0,72
sans ligand et sans Cu	0,40 $\pm$ 0,05	0,69	0,51
sans ligand, sans ascorbate et sans Cu	0	0,06	-

Tableau 6. Comparaison de l'inhibition par les différents ligands (0,2, 0,4 ou 0,8 μ M) de la production d'H₂O₂ réalisée par A β ₄₂ (0,2 et 0,53 μ M) en présence de CuCl₂ (0,4 μ M), d'ascorbate (10 μ M) et d'air. La quantité d'H₂O₂ (en nanomoles) est dosée à l'aide d'un kit Amplex Red H₂O₂/HRP Assay.

La production d'H₂O₂ variant selon les complexes A β ·Cu_n en solution, deux concentrations d'A β ont été étudiées pour une concentration constante de Cu^{II} (0,4 μ M).

Pour un rapport Cu/A β = 0,75, le système A β + Cu + réducteur produit 1,08 nmol d'H₂O₂. La variation observée lorsque la réaction est réalisée en présence de ligand bisquinoléine est faible (0,35 à 0,82 nmol d'H₂O₂ par rapport à 1,08 nmol en absence de ligand). Toutefois, ces valeurs sont proches de la quantité d'H₂O₂ produite par A β à cette concentration et en absence de Cu (0,51 nmol d'H₂O₂). Dans ces conditions, même si on voit clairement une inhibition de la production d'H₂O₂ à la suite de l'ajout des ligands, l'analyse est difficile en raison d'une valeur initiale de production d'H₂O₂ relativement peu élevée.

L'analyse est plus aisée pour un rapport Cu/A β = 2, ainsi que dans le cas du sel de CuCl₂ seul. En effet, la production d'H₂O₂ par ces deux systèmes, en présence de réducteur, est beaucoup plus forte que pour le ratio Cu/A β = 0,75 et les variations apportées par la présence de ligand sont plus nettes.

A l'exception des ligands **CT20** et **CT21**, *les différents dérivés polyquinoléine testés dans un rapport ligand / Cu de 1 / 1 inhibent la production d'H₂O₂ due aux systèmes A β Cu₂ et Cu en présence de réducteur.*

L'inhibition de la production d'H₂O₂ est similaire en présence ou en absence d'A β . Cette observation est en accord avec le fait que le ligand a retiré l'ion métallique coordonné à A β , probablement en formant avec cet ion métallique un complexe de type LCu (d'après les travaux précédemment réalisés sur la chélation du Cu^{II} par ces ligands).

Le chélate formé semble de plus très peu efficace pour produire de l'H₂O₂ puisque les valeurs mesurées sont faibles. On peut remarquer que la valeur de production d'H₂O₂ résiduelle peut être due à deux phénomènes : soit il reste en solution des ions Cu non chélatés par le ligand et qui produisent de l'H₂O₂, soit les complexes LCu possèdent une faible activité de production d'H₂O₂. Or, l'ajout de 1,5 équivalent de **CT2** par Cu permet de ramener la valeur d'H₂O₂ produite à la valeur de 0,49 nmol d'H₂O₂, identique à celle des contrôles réalisés en absence de Cu. Ce résultat semble être en faveur d'une

chélation de traces de Cu qu'un équivalent de **CT2** n'avait pas suffi à piéger. Il semblerait également que, au moins dans le cas du ligand **CT2**, le complexe LCu ne produise pas d'H₂O₂.

Ces tests n'ont pas mis en évidence de variations importantes selon la nature du ligand testé, à l'exception des ligands **CT20** et **CT21** comportant un bras alkyle reliant les amines de deux résidus 8-aminoquinoléine. Ces deux ligands sont inefficaces pour inhiber la production d'H₂O₂ due à A β Cu₂ alors qu'ils sont actifs en absence d'A β .

On peut également relever une inhibition plus forte que pour la majorité des composés polyquinoléine pour les ligands **CT3**, **CT6**, **CT14**, **CT15** et **CT17**. Ils permettent une diminution importante de la quantité d'H₂O₂ produite pour un ratio Cu / A β = 2, avec des valeurs inférieures à 0,6 nmol d'H₂O₂. Pour ces composés et pour un ratio Cu / A β = 0,75, on retrouve également, lorsque l'expérience a été menée, cette inhibition forte de la production d'H₂O₂. Toutefois, aucune relation claire n'a pu être dégagée entre cette forte activité d'inhibition et la structure des composés cités, qui sont subsitués par des fonctions hydroxyle ou amine en position 8 et présentent des longueurs de bras de jonction variables.

En conclusion, hormis les ligands **CT20** et **CT21**, tous les dérivés polyquinoléine semblent intéressants d'après ce test, pour un rapport Cu / A β = 2 qui a été étudié pour l'ensemble des ligands et qui permet de plus la meilleure lisibilité des résultats obtenus en présence de A β ₄₂.

Dans le cas des dérivés monoquinoléine, deux stœchiométries L / Cu ont été testées : un équivalent de ligand par ion métallique, mais également deux équivalents, afin de conserver un ratio entre les entités quinoléine et le Cu identique à celui des ligands bisquinoléine. De façon intéressante, pour les dérivés 8-hydroxyquinoléine, un équivalent de ligand est suffisant pour inhiber la production d'H₂O₂ par les complexes de Cu d'A β , alors que cette stœchiométrie est insuffisante dans le cas de CuCl₂ (pour lequel deux équivalents de ligand sont nécessaires). La 8-aminoquinoléine a un comportement différent. En effet, l'ajout de ce ligand inhibe la production d'H₂O₂ due à A β Cu₂ mais semble inefficace lorsque A β n'est pas présent.

Ces résultats concernant les dérivés comportant une seule entité quinoléine seront détaillés dans le chapitre suivant.

II.2.4 Stabilité d'H₂O₂

La diminution de la quantité d'H₂O₂ observée à la suite de l'addition de ligand peut être due à deux phénomènes : soit à une diminution de la production d'H₂O₂, soit à une dégradation de celui-ci.

Afin d'étudier la stabilité d'H₂O₂ dans les conditions expérimentales utilisées, certaines expériences ont été réalisées en présence d'une quantité connue d'H₂O₂ (Tableau 7). L'addition d'H₂O₂ a été réalisée lors de l'incubation de cinq minutes entre les complexes de cuivre et l'ascorbate et qui précède l'ajout du système AmplexRed / HRP. Deux conditions ont été envisagées : l'ajout d'H₂O₂ a été fait (i) soit à la fin des cinq minutes, (ii) soit au début des cinq minutes d'incubation (juste avant l'ajout d'ascorbate). Le premier cas est intéressant puisqu'il permet de réduire les risques d'oxydation d'A β suite à l'ajout d'une quantité importante d'H₂O₂ dans le milieu, de par une plus faible durée d'incubation avec le peptide. Toutefois, les variations observées dans ce cas sont relativement faibles à cause de la compétition avec le système AmplexRed / HRP pour la consommation d'H₂O₂. Le second cas a été établi pour diminuer ce phénomène de consommation de l'H₂O₂ par le réactif AmplexRed / HRP, qui est susceptible de masquer la dégradation d'H₂O₂ par les systèmes Cu / A β / ligand. Dans ces conditions, des variations de quantités d'H₂O₂ seront plus facilement détectables.

Si le système étudié est incapable de réagir avec H₂O₂, la quantité de peroxyde ajoutée doit être retrouvée à la fin de l'expérience. Dans cette hypothèse, le système étudié se comporte comme en absence d'H₂O₂ ajouté et produit la même quantité d'H₂O₂ que lorsqu'il n'y a pas addition supplémentaire d'H₂O₂. Par conséquent, la quantité d'H₂O₂ observée à la fin de l'expérience doit être égale à la quantité d'H₂O₂ générée intrinsèquement par le système plus le nombre de nanomoles d'H₂O₂ ajouté. Si le système transforme H₂O₂, la quantité finale d'H₂O₂ observée sera inférieure à la quantité attendue.

Des expériences contrôle faites avec uniquement l'ascorbate ou de l'ascorbate en présence du ligand **CT2** ont permis de retrouver la quantité d'H₂O₂ initialement introduite dans le milieu, ce qui montre qu'H₂O₂ est suffisamment stable pour permettre ce type d'analyse.

	rapport Cu/A β	rapport ligand / Cu	H ₂ O ₂ (nmol)	H ₂ O ₂ ajouté (nmol)	H ₂ O ₂ observé avec addition	H ₂ O ₂ attendu avec addition	H ₂ O ₂ observé / Attendu
Sans	0	0	2,93 $\pm$ 0,18	1,5 ^a	4,0	4,4	91 %
Ligand				1,5 ^b	3,6	4,4	82 %
	2	0	2,77 $\pm$ 0,16	1,5 ^a	4,2	4,3	98 %
				1,5 ^b	4,1	4,3	95 %
	1	0	1,66 $\pm$ 0,03	1,5 ^a	3,0	3,2	94 %
				1,5 ^b	3,0	3,2	94 %
CT2	0	1	0,84	3,0 ^a	3,8	3,8	100 %
	2	1	0,71 $\pm$ 0,02	3,0 ^a	3,7	3,7	100 %
				3,0 ^b	3,8	3,7	103 %
CT3	2	1	0,55 $\pm$ 0,08	3,0 ^a	3,4	3,5	97 %
CT4	2	1	0,87 $\pm$ 0,11	3,0 ^a	3,6	3,9	92 %
CT6	2	1	0,36 $\pm$ 0,09	3,0 ^a	3,3	3,4	97 %
CT16	2	1	0,69	3,0 ^b	2,0	3,7	54 %
CT17	2	1	0,47 $\pm$ 0,09	3,0 ^b	1,7	3,5	49 %
CT20	2	1	1,99 $\pm$ 0,11	3,0 ^b	4,9	5,0	98 %
CT21	2	1	2,10	3,0 ^b	4,3	5,1	84 %

Tableau 7. Analyse de la stabilité d'H₂O₂ au cours des expériences d'inhibition par les ligands de la production d'H₂O₂ réalisée par A β ₁₋₄₂ (0,2 ou 0,4 μ M) en présence de CuCl₂ (0,4 μ M), d'ascorbate (10 μ M) et d'air. L'analyse est obtenue en comparant les résultats obtenus avec ou sans addition d'une quantité connue d'H₂O₂ dans le milieu réactionnel. a. H₂O₂ ajouté à la fin des 5 minutes de réaction en présence d'ascorbate. b. H₂O₂ ajouté juste avant l'ascorbate. H₂O₂ est dosé à l'aide d'un kit Amplex Red H₂O₂/HRP Assay.

En absence de ligand, on peut remarquer que le système A β Cu₂ dégrade très peu H₂O₂, quel que soit le rapport Cu / A β . En effet, 95 % de la valeur d'H₂O₂ attendue dans l'hypothèse où il n'y a pas dégradation est retrouvée (Tableau 7).

Dans le cas de CuCl₂, on observe une légère dégradation d'H₂O₂, qui est d'autant plus visible que l'H₂O₂ est ajouté au début de l'incubation en présence d'ascorbate (c'est-à-dire dans des conditions où il n'y a pas compétition avec HRP pour la consommation d'H₂O₂).

Dans les conditions expérimentales utilisées, les ligands testés peuvent être divisés en deux catégories :

- en général, les ligands incluant deux entités 8-hydroxyquinoléine (**CT2**, **CT3** et **CT6**) ne dégradent pas l'H₂O₂. Ces résultats, ajoutés aux résultats précédents (Tableau 6) confirment que ces ligands inhibent bien la production d'H₂O₂ et forment des complexes de Cu qui ne produisent pas d'H₂O₂.

Toutefois, dans le cas du ligand **CT4**, une très faible dégradation d'H₂O₂ est observée. La nature du bras de jonction (oxo dans le cas de **CT4**) semble importante pour cet effet.

- en général, les dérivés incluant deux entités 8-aminoquinoléine (**CT16**, **CT17** et **CT21**) donnent lieu à une dégradation d'H₂O₂. Il faut noter que cette capacité de dégradation d'H₂O₂ semble liée à la nature de la fonction (amine) en position 8 plutôt qu'au type de jonction entre les résidus quinoléine (bras en position 2 pour **CT16** mais jonction en position 8 pour **CT17** et **CT21**).

Cependant, le ligand **CT20** ne semble pas entraîner de dégradation d'H₂O₂. Par contre, il inhibe très peu la production d'H₂O₂ due à A β Cu₂ dans les conditions employées et il est difficile de conclure dans son cas. Ce manque d'effet pourrait en effet être tout simplement dû à sa faible capacité à retirer l'ion métallique d'A β Cu₂.

En conclusion, on peut donc noter que les conclusions issues du test d'inhibition, par les ligands polyquinoléine, de la production d'H₂O₂ due aux complexes métalliques d'A β en présence de réducteur (Tableau 6) semblent être exploitables dans la série bis-8-hydroxyquinoléine. En effet, l'H₂O₂ est stable en présence des complexes métalliques de ces ligands (Tableau 7). Toutefois, l'interprétation de ce test semble plus délicate dans la série bis-8-aminquinoléine puisque les ligands **CT16**, **CT17** et **CT21** dégradent H₂O₂ dans les mêmes conditions.

III. Tests complémentaires pour une utilisation *in vivo*

III.1 Hydrophobicité

Dans la perspective d'une éventuelle utilisation *in vivo*, les ligands synthétisés doivent être capables de franchir les différentes barrières : d'abord intestinale dans le cas

d'une molécule administrée par voie orale et ensuite, et de manière réversible, la barrière hémato-méningée pour aller chélater les ions métalliques en excès sur A β .

Pour cela, les composés doivent être de faible masse moléculaire (< 500). Ce point a été pris en compte lors de la conception des ligands polyquinoléine. De plus, ils doivent être suffisamment lipophiles (et donc hydrophobes) pour passer les barrières (coefficient de partage entre une phase octanol et une phase aqueuse : $\log P > 1,5$) (van de Waterbeemd and Gifford, 2003). Il faut cependant tenir compte du fait qu'une hydrophobicité trop élevée limite la solubilité des molécules en milieu biologique. Il est ainsi généralement proposé pour le $\log P$ une plage de valeurs comprises entre 2,5 et 5 pour le franchissement efficace de la barrière hémato-méningée par une molécule.

III.1.1 Principe

Nous avons donc cherché à mesurer l'hydrophobicité des ligands synthétisés. Pour cela, nous avons déterminé expérimentalement la valeur du coefficient de partage apparent entre une phase octanol et une phase aqueuse tamponnée (pH = 7,4) (noté $\log D_{7,4}$) (van de Waterbeemd and Gifford, 2003). Le protocole a été adapté d'une méthode décrite par Zhuang *et al.*, et réalisé dans le tampon Tris·HCl 20 mM ; NaCl 150 mM (pH = 7,4) utilisé pour les expériences d'inhibition de la précipitation d'A β_{42} par les ligands (Zhuang *et al.*, 2001).

Ce coefficient est exprimé comme le logarithme décimal de [(la concentration de ligand contenu dans la phase 1-octanol)/(la concentration de ligand contenu dans la phase aqueuse tamponnée à pH = 7,4)] = $\log D_{7,4}$.

III.1.2 Résultats

Les poids moléculaires des ligands synthétisés et les valeurs expérimentales de $\log D_{7,4}$ figurent dans le tableau 8.

Les ligands bisquinoléine synthétisés sont relativement hydrophobes, avec des valeurs souvent voisines de celles du clioquinol ($\log D_{7,4} = 3,8$) connu pour pénétrer dans le cerveau. En particulier, pour des substitutions identiques des macrocycles aromatiques, les dérivés comportant deux résidus quinoléine sont plus hydrophobes que ceux en comportant un seul.

Composé	PM	Log D_{7,4}
CT1	301	3,3 $\pm$ 0,1
CT2	330	4,4 $\pm$ 0,1
CT3	338	3,8 $\pm$ 0,1
CT4	316	3,9 $\pm$ 0,1
CT5	370	3,5 $\pm$ 0,1
CT6	398	4,9 $\pm$ 0,1
CT7	362	n.d.
CT8	316	3,5 $\pm$ 0,1
CT9	344	3,8 $\pm$ 0,1
CT10	474	3,7 $\pm$ 0,1
CT11	384	4,2 $\pm$ 0,1
CT12	636	5,6 $\pm$ 0,5
CT13	376	3,5 $\pm$ 0,1
CT14	331	3,0 $\pm$ 0,1
CT15	317	2,4 $\pm$ 0,1
CT16	357	2,5 $\pm$ 0,1
CT17	271	3,5 $\pm$ 0,1
CT18	272	2,0 $\pm$ 0,1
CT19	299	2,6 $\pm$ 0,1
CT20	342	1,8 $\pm$ 0,1
CT21	328	2,7 $\pm$ 0,1
8-hydroxyquinoléine	145	2,1 $\pm$ 0,1
2-méthyl-8-hydroxyquinoléine	159	2,4 $\pm$ 0,1
clioquinol	305	3,8 $\pm$ 0,1
8-aminoquinoléine	144	1,9 $\pm$ 0,1

Tableau 8. Poids moléculaire et valeur du logarithme décimal du coefficient de partage des ligands entre du 1-octanol (phase hydrophobe) et du tampon Tris-HCl 20 mM ; NaCl 150 mM (pH = 7,4) (phase hydrophile) (1/1).

La structure des ligands bisquinoléine permet également de moduler l'hydrophobité.

La longueur du bras de jonction entre les résidus quinoléine influence l'hydrophobicité, qui augmente avec la taille de la chaîne carbonée. Cela apparaît clairement pour des ligands possédant les mêmes substitutions et permettant donc une bonne comparaison des $\log D_{7,4}$. Ainsi, dans la série 8-hydroxyquinoléine, on a comme ordre d'hydrophobicité croissante : **CT1** (bras méthyle) < **CT8** (bras éthyle) < **CT9** (bras butyle).

D'autre part, la substitution des hydrogènes des cycles par des atomes d'halogène augmente l'hydrophobicité des composés obtenus (respectivement pour **CT1** et **CT5**, **CT2** et **CT6**, **CT8**, **CT11** et **CT12**).

La présence d'un bras amine à un chaînon en position 2 diminue l'hydrophobicité. Ainsi, on a $\log D_{7,4} \sim 2,5$ pour les composés **CT15** et **CT16**, alors que cette valeur est supérieure à 3,3 pour un bras alkyle.

De même, la présence d'une fonction amine en position 8 rend le dérivé moins hydrophobe que dans le cas d'un groupement hydroxyle. Cela est visible sur l'exemple des ligands monoquinoléine (8-aminoquinoléine comparée à la 8-hydroxyquinoléine). D'une manière générale, on peut également remarquer que les ligands possédant deux fonctions amines en position 8 (**CT16**, **CT20** et **CT21**) sont un peu moins hydrophobes ($\log D_{7,4}$ compris entre 1,8 et 2,7) que les composés possédant des fonctions hydroxyles en cette position.

Pour conclure, ce caractère hydrophobe des ligands polyquinoléine synthétisés, associé à poids moléculaire peu élevé pour la plupart d'entre eux, sont susceptibles d'être favorables à une bonne biodistribution des composés in vivo.

En particulier, les composés polyquinoléine **CT1** à **CT6**, **CT8** à **CT11**, **CT13**, **CT14**, **CT16**, **CT17**, **CT19** et **CT21** répondent favorablement au critère $2,5 < \log D_{7,4} < 5$.

III.2 Test de génotoxicité potentielle : Test d'Ames

L'étude de la toxicité des composés est une étape indispensable dans le développement d'un composé potentiellement utilisable *in vivo*. Après avoir démontré l'activité des ligands polyquinoléine *in vitro* sur le peptide A β , nous avons réalisé un test

préliminaire de toxicité sur quelques uns de ces composés : le test d'Ames. L'avantage de ce test est d'être un test bactérien sensible et facile à mettre en œuvre avant des études complémentaires de toxicité sur animaux.

Les composés testés, **CT2**, **CT3** et **CT17**, ont été sélectionnés parmi une première série de composés polyquinoléine (**CT1** à **CT12** et **CT17**), en fonction des résultats obtenus pour l'inhibition de la précipitation d'A β induite par les ions métalliques.

III.2.1 Principe

Le test d'Ames est un test de mutagenèse qui consiste à examiner si une substance est capable d'induire des mutations spécifiques chez différentes souches de *Salmonella typhimurium*. Les souches utilisées dans ce test sont porteuses d'une mutation dans un des gènes gouvernant la synthèse de l'histidine. Cette mutation His⁻ rend les souches incapables de pousser sur un milieu sans histidine. Avec une fréquence très faible, ces mutations His⁻ réversent spontanément vers His⁺ et les cellules retrouvent leur capacité à pousser sur un milieu dépourvu d'histidine. Cette fréquence de réversion peut augmenter suite à l'exposition des bactéries His⁻ à des agents mutagènes, et le test d'Ames permet de quantifier l'induction de ces mutations réverses His⁺.

Le test d'Ames est réalisé en présence ou non d'homogénat enzymatique de microsome de foie de rat (S9). La présence de S9 permet de réaliser une activation métabolique oxydante des produits testés et ainsi d'étudier la génotoxicité éventuelle des métabolites susceptibles de s'être formés à partir des ligands.

III.2.2 Résultats

Les expériences ont été réalisées par la société MDS Pharma Services (sous la responsabilité de Frédéric Cosledan de la société Palumed) sur deux lignées tests (TA98 et TA100) de *Salmonella typhimurium* mutant (His⁻), en présence ou non de S9 (Levin *et al.*, 1982a; Levin *et al.*, 1982b; Maron and Ames, 1983).

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 9.

Composé (valeur par plaque)	Ajout de S9	TA98		TA100	
		Effet mutagène	Cytotoxicité	Effet mutagène	Cytotoxicité
DMSO (solvant)	Non	> 100 μ L	> 100 μ L	> 100 μ L	> 100 μ L
	Oui	> 100 μ L	> 100 μ L	> 100 μ g	> 100 μ L
clioquinol	Non	-	0,3 mg	-	0,03 mg
	Oui	-	0,3 mg	-	0,03 mg
CT2	Non	> 3 mg	> 3 mg	> 3 mg	> 3 mg
	Oui	> 3 mg	> 3 mg	> 3 mg	> 3 mg
CT3	Non	> 3 mg	> 3 mg	-	0,3 mg
	Oui	> 3 mg	> 3 mg	> 3 mg	> 3 mg
CT17	Non	> 3 mg	> 3 mg	> 3 mg	> 3 mg
	Oui	> 3 mg	> 3 mg	> 3 mg	> 3 mg

Tableau 9. Résultats du test d'Ames de mutagénicité de *Salmonella* sur les souches TA98 et TA100 de salmonelle en absence ou en présence d'homogénat enzymatique S9 de microsome de foie de rat.

L'obtention de résultats attendus avec ces lignées pour les contrôles 4-nitro-*o*-phénylènediamine, azide de sodium, 2-anthramine et 2-aminofluorène a permis de confirmer la bonne qualité de l'étude.

Un effet bactéricide du clioquinol a été observé sur les deux lignées (Tableau 9).

Aucun effet mutagène n'a été observé pour les composés polyquinoléine testés même pour les plus fortes doses étudiées. Aucun effet bactéricide n'a été observé pour ces composés même pour les plus fortes doses testées à l'exception de **CT3** à partir de 0,3 mg/plaque, sur la lignée TA100 en absence de S9. Ce phénomène n'est pas rédhibitoire pour l'utilisation éventuelle du ligand **CT3** *in vivo* mais a empêché le calcul de son pouvoir mutagène potentiel.

Ces premiers résultats sont intéressants puisqu'ils n'ont pas démontré d'apparition de mutagénécité. L'évaluation pharmacologique de cette série de ligands pourra donc être poursuivie.

IV. Conclusion

La stratégie bisquinoléine consiste à relier deux motifs quinoléine par un bras de jonction afin de favoriser la chélation des ions métalliques Cu^{II} et Zn^{II}. Elle a été validée par l'étude des stœchiométries ligand / métal puisque la majeure partie des complexes formés sont de stœchiométrie 1 / 1 autour de l'ion métallique. Les ligands synthétisés présentent de plus une affinité beaucoup plus forte pour les ions métalliques Cu^{II} et Zn^{II} que leurs équivalents monoquinoléine.

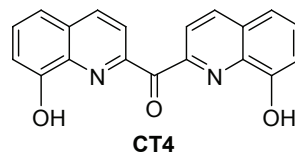
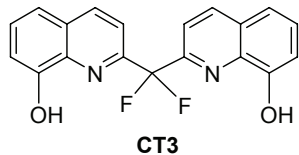
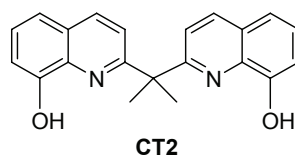
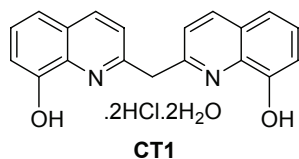
De premières études sur le peptide A β ont également fourni des résultats positifs. Ainsi, les composés polyquinoléine sont efficaces pour inhiber l'agrégation d'A β ₄₂ due à la présence d'ions métalliques. Certains composés sont plus actifs que le composé clioquinol de référence. Un point très intéressant est que, dans le cas du Cu^{II}, cette activité est observée pour une stœchiométrie métal / ligand de 1 / 1, alors que des excès de ligands sont nécessaires dans le cas des dérivés monoquinoléine.

D'autre part, les ligands polyquinoléine synthétisés inhibent la production d'H₂O₂ par le système A β ₄₂ + Cu^{II} + réducteur dans les conditions testées.

Enfin, la détermination de l'hydrophobicité des ligands et des études de toxicité, bien que très préliminaires, semblent encourageantes dans le but d'une éventuelle utilisation de ces molécules *in vivo*.

Ces premiers tests ont permis de réaliser une sélection parmi les ligands polyquinoléine synthétisés. Parmi les composés particulièrement actifs pour chélater les ions métalliques et inhiber la précipitation d'A β par les ions métalliques, les composés **CT1**, **CT2**, **CT3** et **CT4** dans la série 8-hydroxyquinoléine et les ligands **CT16**, **CT17** et **CT21** dans la série 8-aminoquinoléine ont été retenus (Fig. 8). La présence de deux séries distinctes dans cette sélection fournira un élément de comparaison intéressant lors de tests plus approfondis concernant l'activité de ces ligands vis-à-vis des agrégats amyloïdes de la maladie d'Alzheimer.

Série 8-hydroxyquinoléine



Série 8-aminoquinoléine

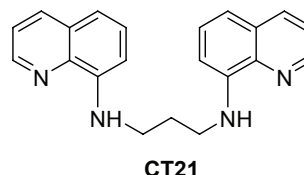
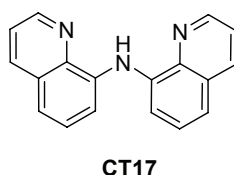
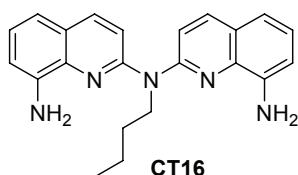


Fig. 8. Ligands bisquinoléine sélectionnés.

V. Partie expérimentale

Détermination de la stœchiométrie métal / ligand

Spectrophotométrie UV-visible

Les ligands ont été solubilisés dans un solvant organique (CH₃OH, dioxane ou DMSO) puis du tampon Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM est ajouté. Les proportions du mélange sont indiquées au niveau de chaque complexe. A la solution à 15 μ M de ligand (L) obtenue sont ajoutés des aliquots de solutions concentrées de CuCl₂ ou de ZnCl₂ (M) dans l'eau. La complexation est suivie par spectroscopie UV-visible entre 190 et 550 nm.

Préparation des complexes pour la spectrométrie de masse et la microanalyse

Les ligands, dissous dans du méthanol ou du dioxane, ont été métallés en présence d'un équivalent d'ion métallique durant une heure à température ambiante puis le solvant est évaporé. Du Cu(AcO)₂ ou du Zn(AcO)₂ ont été employés pour les ligands **CT1** à **CT6** et **CT8** à **CT12** et du CuCl₂ ou du ZnCl₂ pour les ligands **CT7** et **CT13** à **CT21**.

Pour la microanalyse, la métallation a été réalisée à 60 °C dans un mélange éthanol / eau (1/1). Les complexes formés ont été cristallisés à - 4 °C dans ce milieu, récupérés par filtration, lavés à l'eau puis séchés à 110 °C.

CT1-Cu^{II} :

SM (DIC, NH₃) m/z: 364 (LCu^{II} – 1 H), 381 (LCu^{II}NH₄ – 2 H).

UV/vis [dioxane/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 256 (41 900), 272 (32 200, épaulement), 304 (8 800), 338 (5 100), 376 (3 100).

CT2-Cu^{II} :

SM (DIC, NH₃) m/z: 392 (LCu^{II} – 1 H), 409 (LCu^{II}NH₄ – 2 H).

Analyse (%) pour C₂₁H₁₆N₂O₂Cu·0,3C₂H₄O₂: calculé C 63,33; H 4,16; N 6,84; trouvé C 63,30; H 3,50; N 6,82.

UV/vis [CH₃OH/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 202 (70 800), 254 (58 900), 268 (42 400, épaulement), 383 (4 300).

CT3-Cu^{II} :

SM (DIC, NH₃) m/z: 400 (LCu^{II} – 1 H), 417 (LCu^{II}NH₄ – 2 H).

UV/vis [CH₃OH/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 205 (64 000), 255 (47 600), 276 (34 400), 415 (2 900).

CT4-Cu^{II} :

SM (DIC, NH₃) m/z: 378 (LCu^{II} – 1 H), 395 (LCu^{II}NH₄ – 2 H).

UV/vis [CH₃OH/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 245 (41 100), 306 (27 900), 348 (12 100, épaulement), 485 (2 500).

CT5-Cu^{II} :

SM (DIC, NH₃) m/z: 434 (LCu^{II} – 1 H), 451 (LCu^{II}NH₄ – 2 H).

Analyse (%) pour C₁₉H₁₀N₂O₂Cl₂Cu: calculé C 52,73; H 2,33; N 6,47; trouvé C 52,52; H 1,64; N 6,48.

UV/vis [dioxane/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 256 (38 300), 278 (35 900), 310 (10 300), 342 (7 300), 398 (4 000).

CT6-Cu^{II} :

SM (DIC, NH₃) m/z: 462 (LCu^{II} – 1 H), 479 (LCu^{II}NH₄ – 2 H).

Analyse (%) pour C₂₁H₁₄N₂O₂Cl₂Cu: calculé C 54,74; H 3,06; N 6,08; trouvé C 54,50; H 2,84; N 5,92.

UV/vis [dioxane/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 261 (59 500), 274 (46 900, épaulement), 347 (4 700), 409 (5 800).

CT7-Cu^{II} :

SM (électrospray, > 0) m/z: 423 (LCu^{II} – 2 H).

UV/vis [CH₃OH/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 254 (34 400), 278 (35 900), 316 (9 700, épaulement), 380 (3 100).

CT8-Cu^{II} :

SM (DIC, NH₃) m/z: 378 (LCu^{II} – 1 H), 395 (LCu^{II}NH₄ – 2 H).

Analyse (%) pour $C_{20}H_{14}N_2O_2Cu \cdot 0,3 H_2O$: calculé C 62,67; H 3,84; N 7,31; trouvé C 62,68; H 2,91; N 7,21.

UV/vis [$CH_3OH/Tris \cdot HCl$ 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 202 (57 700), 259 (68 000), 268 (46 200, épaulement), 392 (4 900).

CT9-Cu^{II} :

SM (DIC, NH₃) m/z: 406 (LCu^{II} – 1 H), 423 (LCu^{II}NH₄ – 2 H).

UV/vis [$CH_3OH/Tris \cdot HCl$ 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 204 (56 000), 260 (71 800), 374 (4 800).

CT11-Cu^{II} :

SM (DIC, NH₃) m/z: 448 (LCu^{II} – 1 H), 465 (LCu^{II}NH₄ – 2 H).

Analyse (%) pour $C_{20}H_{12}N_2O_2Cl_2Cu \cdot 0,3 H_2O$: calculé C 53,12; H 2,81; N 6,20; trouvé C 53,09; H 2,37; N 6,08.

UV/vis [dioxane/ $Tris \cdot HCl$ 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 264 (64 700), 276 (46 700), 413 (5 300).

CT12-Cu^{II} :

SM (DIC, NH₃) m/z: 700 (LCu^{II} – 1 H), 717 (LCu^{II}NH₄ – 2 H).

Analyse (%) pour $C_{20}H_{10}N_2O_2Cl_2I_2Cu \cdot 2(C_2H_4O_2)$: calculé C 35,30; H 1,97; N 3,43; trouvé C 35,46; H 1,20; N 3,83.

UV/vis [DMSO/ $Tris \cdot HCl$ 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (8/2, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = (56 000), 340 (55 000), 392 (6 200), 420 (5 000).

CT13-Cu^{II} :

SM (électrospray, > 0) m/z: 438 (LCu^{II} – 1 H).

UV/vis [$CH_3OH/Tris \cdot HCl$ 20 mM pH = 7,4; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 212 (50 300), 263 (65 300), 275 (47 300, épaulement), 319 (4 500), 421 (5 900).

CT15-Cu^{II} :

SM (électrospray, > 0) m/z: 379 (LCu^{II} – 1 H).

UV/vis [$CH_3OH/Tris \cdot HCl$ 20 mM pH = 7,4; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 244 (40 900), 278 (32 900), 298 (25 400), 319 (27 700), 337 (20 100, épaulement).

CT16-Cu^{II} :

SM (électrospray, > 0) m/z: 419 (LCu^{II} – 1 H).

UV/vis [$CH_3OH/Tris \cdot HCl$ 20 mM pH = 7,4; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 211 (65 400); 235 (33 800, épaulement), 275 (37 000), 302 (5 900, épaulement), 329 (17 900), 352 (19 000), 366 (20 900).

CT17-Cu^{II}-Cl :

SM (DIC, NH₃) m/z: 369 (LCu^{II}Cl).

UV/vis [DMSO/ $Tris \cdot HCl$ 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (8/2, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 287 (40 700), 368 (3 300), 486 (14 100).

CT19-Cu^{II} :

SM (électrospray, > 0) m/z: 361 (LCu^{II} – 1 H).

CT20-Cu^{II} :

SM (électrospray, > 0) m/z: 405 (LCu^{II}).

CT21-Cu^{II} :

SM (électrospray, > 0) m/z: 390 (LCu^{II} – 1 H).

UV/vis [CH₃OH/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 230 (55 700); 303 (11 800), 315 (10 400), 360 (1 100, épaulement).

CT1-Zn^{II} :

SM (DIC, NH₃) m/z: 365 (LZn^{II} – 1 H), 382 (LZn^{II}NH₄ – 2 H).

CT2-Zn^{II} :

SM (DIC, NH₃) m/z: 393 (LZn^{II} – 1 H), 410 (LZn^{II}NH₄ – 2 H).

UV/vis [CH₃OH/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 202 (78 700), 258 (74 100), 268 (46 700), 378 (4 600).

CT3-Zn^{II} :

SM (DIC, NH₃) m/z: 401 (LZn^{II} – 1 H).

UV/vis [CH₃OH/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 205 (43 300), 258 (50 500), 274 (30 900), 404 (3 000).

CT4-Zn^{II} :

SM (DIC, NH₃) m/z: 379 (LZn^{II} – 1 H), 396 (LZn^{II}NH₄ – 2 H).

UV/vis [CH₃OH/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 238 (31 100), 298 (26 200), 346 (10 500, épaulement), 473 (3 000).

CT5-Zn^{II} :

SM (DIC, NH₃) m/z: 433 (MH⁺) (LZn^{II} – 1 H), 454 (LZn^{II}NH₄ – 2 H).

CT6-Zn^{II} :

SM (DIC, NH₃) m/z: 463 (LZn^{II} – 1 H), 482 (LZn^{II}NH₄ – 2 H).

UV/vis [dioxane/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 265 (69 200), 275 (45 700), 346 (5 800), 405 (6 100).

CT7-Zn^{II} :

SM (électrospray, > 0) m/z: 425 (LZn^{II} – 1 H).

UV/vis [CH₃OH/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 262 (44 700), 276 (22 300, épaulement), 308 (5 900), 390 (2 000).

CT8-Zn^{II} :

SM (DIC, NH₃) m/z: 379 (LZn^{II} – 1 H), 396 (LZn^{II}NH₄ – 2 H).

UV/vis [CH₃OH/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 202 (55 500), 258 (63 600), 268 (43 400, épaulement), 374 (4 000).

CT9-Zn^{II} :

SM (DIC, NH₃) m/z: 407 (LZn^{II} – 1 H), 424 (LZn^{II}NH₄ – 2 H).

UV/vis [CH₃OH/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 202 (63 600), 260 (65 600), 368 (4 400).

CT11-Zn^{II} :

SM (DIC, NH₃) m/z: 449 (LZn^{II} – 1 H), 466 (LZn^{II}NH₄ – 2 H).

UV/vis [dioxane/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 264 (57 800), 272 (43 600, épaulement), 390 (5 400).

CT12-Zn^{II} :

SM (ES-SM, < 0) m/z: 735 (LZn^{II}HCl).

UV/vis [DMSO/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4 ; NaCl 150 mM (8/2, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 276 (54 200), 340 (5 800), 352 (7 700), 397 (5 100).

CT13-Zn^{II} :

SM (électrospray, > 0) m/z: 439 (LZn^{II} – 1 H).

UV/vis [CH₃OH/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 202 (66 900); 264 (92 500), 276 (47 100, épaulement), 318 (5 500), 398 (6 700).

CT14-Zn^{II} :

SM (électrospray, > 0) m/z: 394 (LZn^{II} – 1 H).

UV/vis [DMSO/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4; NaCl 150 mM (8/2, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 273 (27 400); 309 (23 800), 332 (22 000); 4307 (3 800).

CT15-Zn^{II} :

SM (électrospray, > 0) m/z: 380 (LZn^{II} – 1 H).

UV/vis [CH₃OH/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 243 (38 600); 276 (41 000), 297 (34 300), 320 (28 100, épaulement), 334 (19 500, épaulement).

CT16-Zn^{II} :

UV/vis [CH₃OH/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 213 (47 000); 234 (24 800), 274 (25 600), 303 (10 900, épaulement), 330 (11 600), 348 (12 300), 363 (13 100).

CT17-Zn^{II}-Cl :

SM (DIC, NH₃) m/z: 370 (LZn^{II}Cl).

UV/vis (CH₃OH): λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 288 (31 800), 299 (27 900), 369 (3 400), 490 (13 200).

CT20-Zn^{II} :

UV/vis [CH₃OH/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 236 (43 900), 304 (8 700), 316 (8 000).

CT21-Zn^{II} :

UV/vis [CH₃OH/Tris·HCl 20 mM pH = 7,4; NaCl 150 mM (1/1, v/v)] : λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 232 (55 400); 300 (9 600), 314 (9 200), 364 (700, épaulement).

Estimation des constantes d'affinité des ligands pour les ions métalliques

Les solutions 15 μ M de ligands ont été préparées comme pour l'étude de la stœchiométrie métal / ligand, et les milieux de réaction sont les mêmes.

Méthode 1

A une solution de ligand (L_s) et de compétiteur (L_c) à une concentration $C = 15 \mu\text{M}$ est ajouté un équivalent de CuCl_2 ou de ZnCl_2 (M) en solution concentrée dans l'eau. Le pourcentage d'espèce L_s métallée en solution (x % de C) est déterminé par spectroscopie UV-visible entre 190 et 550 nm.

Méthode 2

A une solution de ligand (L_s) à une concentration $C = 15 \mu\text{M}$ en présence d'un équivalent de CuCl_2 ou de ZnCl_2 (M) sont ajoutés des aliquots de solution concentrée de compétiteur (L_c) dans l'eau. La variation du pourcentage d'espèce L_s métallée en solution (x % de C) est suivie par spectroscopie UV-visible entre 190 et 550 nm. Elle permet de déterminer la concentration de L_c (y % de C) pour laquelle 50 % de L_s est sous forme de complexe métallique.

Réactifs pour les expériences réalisées en présence du peptide amyloïde A β_{42}

Avant utilisation, l'eau (qualité MilliQ (Millipore)) et toutes les solutions tampons ont été traitées sur résine Chelex-100 (Biorad) (5 mg/mL) et filtrées à travers des filtres 0,2 μm (Whatman) pour enlever d'éventuelles traces d'ions métalliques ou de particules.

CuCl_2 , ZnCl_2 ou FeCl_3 , de qualité puriss p.a. proviennent de chez Fluka.

Les ligands sont employés sous la forme de chlorhydrates. Sauf dans le cas de **CT1** et **CT7** qui sont utilisés sous la forme chlorhydrate obtenue en cours de synthèse, les sels sont générés par addition d'un équivalent d'acide chlorhydrique par équivalent de fonction azotée du ligand dissous dans du DMSO. Après évaporation du solvant, ces sels sont dissous à une concentration de 2 mM avec du DMSO et conservés à -20°C .

Le peptide β -amyloïde A β_{42} a été synthétisé, purifié (jusqu'à une pureté supérieure à 95 %) et caractérisé par analyse sur HPLC et par spectrométrie de masse MALDI-TOF par le Dr. Honoré Mazarguil (IPBS, Toulouse). Les solutions de travail du peptide ont été préparées en solubilisant 1 mg de peptide lyophilisé dans 500 μL d'eau et 500 μL d'une solution aqueuse de NaOH pH = 12,0 ; sous agitation à 1400 t/min dans un Thermomixer Comfort (Eppendorf). Les préparations de peptide sont ensuite centrifugées 10 min à 5 500 g et le surnageant est utilisé comme solution "stock d'A β ". La concentration en peptide du "stock d'A β " est déterminée immédiatement par test colorimétrique avec un kit Micro BCA Protein Assays (Pierce) à partir de gammes étalon réalisées avec des quantités connues d'albumine de sérum bovin (BSA) puis la solution

de peptide A β est aliquotée et congelée rapidement dans de l'azote liquide avant d'être conservée à -20 °C jusqu'à son utilisation.

Toutes les expériences impliquant A β ont été réalisées en double lorsque moins de 5 % de différence entre les valeurs ont été obtenus, et la valeur donnée est une valeur moyenne. Pour des différences plus grandes, et pour les résultats les plus importants, les expériences ont été réalisées trois fois et les écarts type ont été calculés.

Analyse de la précipitation d'A β ₄₂ par les ions métalliques

Les concentrations indiquées sont les concentrations finales. A β ₄₂ (5 μ M, 500 μ L) est incubé dans du tampon Tris·HCl 20 mM ; NaCl 150 mM (pH = 7,4) durant 2 heures à 37 °C sous agitation à 1400 t/min en présence de différentes stœchiométries de CuCl₂, de ZnCl₂ ou de FeCl₃ dissous dans l'eau et dilués dans du DMSO (50 μ L). Les échantillons (volume final = 550 μ L) sont ensuite centrifugés durant 20 min à 5 500 g et 500 μ L de surnageant sont prélevés. Le tube contenant le culot de précipitation reçoit alors 450 μ L de mélange tampon d'expérience / DMSO (91/9, v/v). Puis la concentration en protéine est déterminée sur le surnageant et le culot par Micro BCA Protein Assays (Pierce) : chaque échantillon reçoit un volume de révélateur et est incubé 1 heure à 60°C sous agitation à 1 400 t/min puis l'absorbance à 562 nm est mesurée. Les quantifications sont réalisées à partir de gammes étalon de BSA. Les quantités d'A β ₄₂ réellement contenues dans le culot et le surnageant sont obtenues après une correction due à la présence d'une partie résiduelle du surnageant (50/550 μ L) dans la fraction contenant le culot. Pour toutes les expériences, le résultat de l'addition du pourcentage d'A β ₄₂ dans le surnageant avec le pourcentage d'A β ₄₂ dans le culot donne des valeurs proches de 100 %.

Inhibition de la précipitation d'A β ₄₂ par l'ajout de ligand

Les concentrations finales sont indiquées. 500 μ L d'A β ₄₂ (5 μ M) est incubé dans du tampon Tris·HCl 20 mM ; NaCl 150 mM (pH = 7,4) durant 1 heure à 37 °C sous agitation à 1400 t/min en l'absence ou en présence d'ions métalliques : CuCl₂, ZnCl₂ ou FeCl₃ (20 μ M). Puis 50 μ L de ligand à tester (200 μ M) dissous dans du DMSO sont alors ajoutés et les échantillons sont incubés 1 heure de plus à 37 °C sous agitation à 1 400 t/min. Les échantillons sans ligand reçoivent 50 μ L de DMSO. Les échantillons (volume final = 550 μ L) sont ensuite centrifugés durant 20 min à 5 500 g et 500 μ L de surnageant sont prélevés. Le tube contenant le culot de précipitation reçoit alors 450 μ L de mélange

tampon d'expérience/DMSO (91/9, v/v). Puis la concentration en protéine est déterminée sur le surnageant et le culot par Micro BCA Protein Assays (Pierce) comme décrit précédemment. Les quantités d'A β_{42} réellement contenues dans le culot et le surnageant sont obtenues après une correction due à la présence d'une partie résiduelle du surnageant (50/550 μ L) dans la fraction contenant le culot.

Dans le cas de CT1, CT4, CT5, CT7, CT13, CT14, CT16, CT17, CT20, CT21, de la 2-méthyl-8-hydroxyquinoléine et de la 8-aminoquinoléine, qui présentent une absorption à 562 nm dans les conditions de dosage, des blancs sont réalisés en présence du ligand testé et de l'ion métallique étudié.

Des expériences ont aussi été réalisées pour A β_{42} (5 μ M), CuCl $_2$ (12,5 μ M) et le ligand (12,5 μ M) (ou 25 μ M dans le cas des ligands monoquinoléine). Hormis les variations de concentrations, le protocole est identique à celui décrit ci-dessus.

Dosage du peroxyde d'hydrogène produit par A β_{42} en présence de CuCl $_2$, de réducteur, d'air et de ligand

Les concentrations indiquées sont les concentrations finales. Les réactions ont été réalisées dans le noir dans du tampon phosphate de sodium, 50 mM (pH = 7,4). A β_{42} (0,2 μ M à 0,53 μ M) et CuCl $_2$ (0,4 μ M) sont pré-incubés durant 1 heure à 37°C sous agitation à 1 400 t/min dans 375 μ L de tampon. Puis 2 μ L d'une solution de ligand à étudier (0,2; 0,4 ou 0,8 μ M) dans du DMSO sont alors ajoutés. Après incubation durant une heure supplémentaire, 2 μ L d'une solution aqueuse d'ascorbate de sodium (10 μ M) sont ajoutés et l'incubation est poursuivie durant 5 minutes toujours sous agitation. La quantité d'H $_2$ O $_2$ produite est alors quantifiée à l'aide d'un kit Amplex Red H $_2$ O $_2$ /HRP Assay (Molecular Probes) en ajoutant un volume de réactif de dosage sur les échantillons puis en les incubant durant 1 heure à 37 °C sous agitation à 500 t/min. Les détections d'H $_2$ O $_2$ sont alors réalisées spectrophotométriquement à 563 nm. Les quantifications sont réalisées à partir de courbes étalons obtenues avec des quantités connues d'H $_2$ O $_2$.

Des expériences ont aussi été réalisées en présence d'une quantité connue d'H $_2$ O $_2$, ajoutée juste avant ou juste après l'addition d'ascorbate de sodium, afin d'étudier la stabilité d'H $_2$ O $_2$ dans les conditions expérimentales utilisées.

Détermination des log D_{7,4}

Le ligand (2,0 mg) est dissous dans 2 mL de 1-octanol puis 2 mL de tampon Tris·HCl 20 mM, pH = 7,4 ; NaCl 150 mM sont ajoutés. Après un mélange au vortex durant 3 min à température ambiante suivi d'une centrifugation durant 5 min à 5 500 g, la concentration du ligand dans chaque phase est déterminée par spectrophotométrie UV-visible. Les fractions 1-octanol sont repartitionnées ainsi jusqu'à ce que des valeurs reproductibles de coefficient de partition soient obtenues. Les mesures ont été réalisées trois fois.

Analyse de la génotoxicité potentielle : Test d'AMES

Deux lignées test (TA98 et TA100) de *Salmonella typhimurium* mutant (His⁻) ont été utilisées de par leur déficience à synthétiser l'histidine et de la confirmation des caractéristiques de ces lignées par des tests de marqueurs génétiques. Le test consiste en l'évaluation du potentiel des molécules testées à induire une mutation réverse au locus histidine de ces lignées. Ces deux lignées ont été fournies par le Dr. Bruce N. Ames (University of California, Berkeley, USA). Elles sont résistantes à l'ampicilline et sensibles à la tétracycline. Elles ne sont pas mutantes pour *rfa*, *UvyB* et *UvyA*. La lignée TA98 (his D3052) contient une mutation de phase de lecture (GC) tandis que la lignée TA100 (his G46) contient une substitution de paire de base (GC). Le nombre de révertant spontané est de 37 ± 6 et 166 ± 15 colonies par plaques pour TA98 et TA100, respectivement.

Les composés à tester ont été dissous dans 100 % de DMSO et dilués logarithmiquement (d'un facteur 10) de façon à obtenir 4 concentrations test de 30 000 ; 3 000 ; 300 et 30 μ g/mL. Chaque série de 0,1 mL de solution stock à tester, 0,1 mL de lignée test et de milieu de culture avec ou pas 0,5 mL d'homogénat enzymatique (S9) de microsome de foie de rat ont été mélangés avec 2 mL d'agarose fondue (contenant 0,5 mM d'histidine et 0,5 mM de biotine). Ce mélange a été déposé à la surface d'une plaque de milieu agarose glucose minimal (30 mL pour chaque boîte de pétrie) de façon à obtenir des concentrations finales en composé à tester de 3 000; 300; 30 et 3 μ g/plaque. Les plaques ont alors été incubées à 37°C durant 48 heures. Les cultures ont été traitées ou non en présence d'une activation métabolique exogène par l'ajout de 0,5 mL de mélange S9 qui contenait 8 mM MgCl₂, 33 mM KCl, 4 mM NADP, 5 mM glucose-6-phosphate, 100 mM NaH₂PO₄ (pH = 7,4) et 4 % (v/v) d'homogénat enzymatique de microsome de foie de rat induit par Acrolor 1254 (S9). Les colonies révertantes des

lignées test ont été dénombrées avec un compteur de colonies (Sigma). Les résultats ont été considérés comme significatifs uniquement si les valeurs obtenues pour le solvant seul et des composés de référence étaient dans une fourchette précédemment établie. Un nombre de colonies ≥ 3 fois au nombre de colonies observé pour le solvant seul est considéré comme mutagène de façon significative. Un composé induisant un nombre de colonies $< 50\%$ de celles obtenues pour le solvant seul a été considéré comme toxique pour les bactéries testées. Tous les essais ont été réalisés trois fois. Ce travail a été effectué à l'initiative de la société PALUMED dans le cadre de la collaboration CNRS-PALUMED.

VI. Bibliographie

- Atwood, C.S., Moir, R.D., Huang, X., Scarpa, R.C., Bacarra, N.M.E., Romano, D.M., Hartshorn, M.A., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (1998) Dramatic aggregation of Alzheimer A β by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J. Biol. Chem.* **273**: 12817-12826.
- Atwood, C.S., Scarpa, R.C., Huang, X., Moir, R.D., Jones, W.D., Fairlie, D.P., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (2000) Characterization of copper interactions with Alzheimer amyloid β peptides: Identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid β 1-42. *J. Neurochem.* **75**: 1219-1233.
- Barnham, K.J., Ciccotosto, G.D., Tickler, A.K., Ali, F.E., Smith, D., Williamson, N.A., Lam, Y.-H., Carrington, D., Tew, D., Kocak, G., Volitakis, I., Separovic, F., Barrow, C.J., Wade, J.D., Masters, C.L., Cherny, R.A., Curtain, C.C., Bush, A.I., and Cappai, R. (2003) Neurotoxic, redox-competent Alzheimer's β -amyloid is released from lipid membrane by methionine oxidation. *J. Biol. Chem.* **278**: 42959-42965.
- Barnham, K.J., Gautier, E.C.L., Kok, G.B., and Krippner, G. (2004) 8-Hydroxy quinoline derivatives. PCT/WO 2004/007461 A1, 149 pp.
- Cherny, R.A., Legg, J.T., McLean, C.A., Fairlie, D.P., Huang, X., Atwood, C.S., Beyreuther, K., Tanzi, R.E., Masters, C.L., and Bush, A.I. (1999) Aqueous dissolution of Alzheimer's disease A β amyloid deposits by biometal depletion. *J. Biol. Chem.* **274**: 23223-23228.
- Cherny, R.A., Atwood, C.S., Xilinas, M.E., Gray, D.N., Jones, W.D., McLean, C.A., Barnham, K.J., Volitakis, I., Fraser, F.W., Kim, Y.S., Huang, X., Goldstein, L.E., Moir, R.D., Lim, J.T., Beyreuther, K., Zheng, H., Tanzi, R.E., Masters, C.L., and Bush, A.I. (2001) Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits β -amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* **30**: 665-676.
- Ciccotosto, G.D., Tew, D., Curtain, C.C., Smith, D., Carrington, D., Masters, C.L., Bush, A.I., Cherny, R.A., Cappai, R., and Barnham, K.J. (2004) Enhanced toxicity and cellular binding of a modified amyloid β peptide with a methionine to valine substitution. *J. Biol. Chem.* **279**: 42528-42534.

- Huang, X., Atwood, C.S., Moir, R.D., Hartshorn, M.A., Vonsattel, J.-P., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (1997) Zinc-induced Alzheimer's A β 1-40 aggregation is mediated by conformational factors. *J. Biol. Chem.* **272**: 26464-26470.
- Huang, X., Atwood, C.S., Hartshorn, M.A., Multhaup, G., Goldstein, L.E., Scarpa, R.C., Cuajungco, M.P., Gray, D.N., Lim, J., Moir, R.D., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (1999a) The A β peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry* **38**: 7609-7616.
- Huang, X., Cuajungco, M.P., Atwood, C.S., Hartshorn, M.A., Tyndall, J.D.A., Hanson, G.R., Stokes, K.C., Leopold, M., Multhaup, G., Goldstein, L.E., Scarpa, R.C., Saunders, A.J., Lim, J., Moir, R.D., Glabe, C., Bowden, E.F., Masters, C.L., Fairlie, D.P., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (1999b) Cu(II) potentiation of Alzheimer A β neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* **274**: 37111-37116.
- Levin, D.E., Hollstein, M., Christman, M.F., Schwiers, E.A., and Ames, B.N. (1982a) A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A-T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**: 7445-7449.
- Levin, D.E., Yamasaki, E., and Ames, B.N. (1982b) A new *Salmonella* tester strain, TA97, for the detection of frameshift hot-spot. *Mutat. Res.* **94**: 315-330.
- Maron, D.M., and Ames, B.N. (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**: 173-215.
- Opazo, C., Huang, X., Cherny, R.A., Moir, R.D., Roher, A.E., White, A.R., Cappai, R., Masters, C.L., Tanzi, R.E., Inestrosa, N.C., and Bush, A.I. (2002) Metalloenzyme-like activity of Alzheimer's disease β -amyloid. *J. Biol. Chem.* **277**: 40302-40308.
- Raman, B., Ban, T., Yamaguchi, K.-I., Sakai, M., Kawai, T., Naiki, H., and Goto, Y. (2005) Metal ion-dependent effects of Clioquinol on the fibril growth of an amyloid β peptide. *J. Biol. Chem.* **280**: 16157-16162.
- Sillen, L.G., and Martell, A.E. (1971) *Stability constants of metal-ions complexes*: The Chemical Society London Publication.
- Smith, P.K., Khrohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchonic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85.
- van de Waterbeemd, H., and Gifford, E. (2003) ADMET *in silico* modelling: towards prediction paradise? *Nature Rev. Drug Discov.* **2**: 192-204.
- Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N., and Haugland, R.P. (1997) A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: Applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal. Biochem.* **253**: 162-168.
- Zhuang, Z.P., Kung, M.P., Hou, C., Skovronsky, D.M., Gur, T.L., Plössl, K., Trojanswski, J.Q., Lee, V.M.Y., and Kung, H.F. (2001) Radioiodinated styrylbenzenes and thioflavins as probes for amyloid aggregates. *J. Med. Chem.* **44**: 1905-1914.

Chapitre V

**Mécanismes de production / dégradation
d'H₂O₂ par Aβ·M_n**

-

Rôle des chélateurs

Les travaux décrits au cours du chapitre précédent traitent de la production d'H₂O₂ par les complexes Aβ·Cu_n en présence de réducteur et de l'inhibition de cette production par des ligands quinoléine. Certains résultats nous ont semblé présenter un intérêt concernant (i) les mécanismes de production et de dégradation d'H₂O₂ par les différents complexes de cuivre étudiés et (ii) le mode d'action des chélateurs. Nous avons donc réalisé des expériences complémentaires dans le but d'affiner ces études.

Nous avons utilisé le protocole décrit au chapitre précédent, qui permet d'étudier la production d'H₂O₂, mais aussi sa dégradation. Brièvement, celui-ci consiste en l'ajout d'une quantité connue d'H₂O₂ associé à une étape de pré-incubation entre le réducteur et les complexes Aβ·Cu_n avant le dosage d'H₂O₂ à l'aide d'un kit Amplex Red / HRP. Des expériences complémentaires de précipitation d'Aβ₄₂ et de cinétique de production d'H₂O₂ ont été menées afin de préciser les résultats obtenus.

L'étude a été étendue au Fe^{III}, un autre métal à activité rédox dont l'interaction avec Aβ a été proposée, même si elle est sujette à débat (Bush, 2002). Par ailleurs, les résultats obtenus précédemment pour les ligands monoquinoléine ont été approfondis.

L'ensemble de cette étude a fait l'objet d'un article accepté pour publication dans le "*Journal of Inorganic Biochemistry*".

I. Production et dégradation d'H₂O₂ par les complexes de cuivre d'Aβ

I.1 Résumé de l'article

Les complexes de Cu^{II} d'Aβ₄₂ ont des capacités variables à produire H₂O₂ en présence de réducteur et d'air, et les complexes ayant les rapports Cu / Aβ les plus élevés sont les plus actifs. Ces complexes Aβ·Cu_n ne dégradent pas efficacement l'H₂O₂ produit. En absence d'Aβ, le sel de cuivre produit également H₂O₂ et le dégrade de façon plus significative que les complexes Aβ·Cu_n. Cette dégradation est fortement accrue dans le cas du Fe^{III}, en présence ou en absence d'Aβ. Ces réactions sont inhibées en absence d'ascorbate (réducteur), ce qui implique les espèces réduites Cu^I et Fe^{II} dans la production

et / ou la transformation d'H₂O₂. Dans le cas du système Aβ + Cu^{II} + Fe^{III} + ascorbate, la production d'H₂O₂ est significative mais sa dégradation est également forte. Par conséquent, nous pouvons proposer que la dégradation d'H₂O₂, pouvant conduire à la formation d'EORs plus toxiques (tels que OH^{*}), n'est pas due aux espèces Aβ·Cu_n (qui dégradent très peu H₂O₂ dans ces conditions) mais pourrait être attribuée aux complexes de fer (qui eux dégradent H₂O₂ de façon importante).

L'utilisation de chélateurs (L) pour piéger ces ions métalliques et inhiber la formation d'H₂O₂ réalisée par les complexes Aβ·Cu_n a été étudiée. Le chélateur EDTA forme un complexe LCu en présence de Cu^{II}. Pour un ratio L / Cu = 1, ce ligand inhibe la production d'H₂O₂ due à CuCl₂ et aux complexes Aβ·Cu_n en présence d'ascorbate. Pour un ratio L / Cu = 0,5, l'EDTA n'est pas aussi efficace pour inhiber cette production d'H₂O₂, probablement parce que ce ratio ne permet pas de piéger tout l'ion métallique sous la forme de chélate d'EDTA. Dans le cas du ligand clioquinol, l'inhibition de la production d'H₂O₂ due à CuCl₂ n'est efficace que pour un ratio L / Cu^{II} = 2 (mais pas pour un ratio L / Cu^{II} = 1). Ceci semble indiquer que l'ion métallique doit être piégé sous forme de complexe (clioquinol)₂Cu pour avoir une inhibition de la production d'H₂O₂. Par contre, de façon surprenante, le clioquinol est efficace pour inhiber la production d'H₂O₂ due aux complexes Aβ·Cu_n pour un rapport L / Cu = 1. Cette observation permet de proposer que ce ligand pourrait agir par la formation d'un complexe ternaire avec Aβ·Cu_n.

Par ailleurs, la comparaison de différents chélateurs monoquinoléine a montré que la dégradation d'H₂O₂ par ces systèmes peut être modulée en fonction des substituants présents sur le noyau quinoléine.

Pour conclure, la méthode présentée ici permet d'appréhender le mode d'action des chélateurs pour piéger les ions métalliques impliqués dans la maladie d'Alzheimer et est un outil intéressant pour la conception de telles molécules.

I.2 Article

"Influence of chelators and iron ions on the production and degradation of H₂O₂ by beta-amyloid-copper complexes". Céline Deraeve, Margurite Pitie and Bernard Meunier. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2006**, sous presse (doi:10.1016/j.jinorgbio.2006.08.005).



Influence of chelators and iron ions on the production and degradation of H₂O₂ by β-amyloid–copper complexes

Céline Deraeve, Marguerite Pitie *, Bernard Meunier ¹

Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse cedex 4, France

Received 14 June 2006; received in revised form 17 August 2006; accepted 21 August 2006

Abstract

β-Amyloid peptide (Aβ) 1–42, involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease, binds copper ions to form Aβ·Cu_n complexes that are able to generate H₂O₂ in the presence of a reductant and O₂. The production of H₂O₂ can be stopped with chelators. More reactive than H₂O₂ itself, hydroxyl radicals HO· (generated when a reduced redox active metal complex interacts with H₂O₂) are also probably involved in the oxidative stress that creates brain damage during the disease. We report in the present work a method to monitor the effect of chelating agents on the production of hydrogen peroxide by metallo-amyloid peptides. The addition of H₂O₂ associated to a pre-incubation step between ascorbate and Aβ·Cu_n allows to study the formation of H₂O₂ but also, at the same time, its transformation by the copper complexes. Aβ·Cu_n peptides produce but do not efficiently degrade H₂O₂. The reported analytic method, associated to precipitation experiments of copper-containing amyloid peptides, allows to study the inhibition of H₂O₂ production by chelators. The action of a ligand such as EDTA is probably due to the removal of the copper ions from Aβ·Cu_n, whereas bidentate ligands such as 8-hydroxyquinolines probably act via the formation of ternary complexes with Aβ·Cu_n. The redox activity of these bidentate ligands can be modulated by the incorporation or the modification of substituents on the quinoline heterocycle.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Alzheimer's disease; Beta-amyloid; H₂O₂; Copper; Chelator; Chelating

1. Introduction

In Alzheimer's disease (AD), the pathology is, in part, associated with the aggregation of beta-type amyloid peptides (Aβ) in the brain, leading to the formation of amyloid plaques [1]. The β-amyloid is an amphipathic peptide containing 39–43 amino acids that is produced by the digestion of the amyloid precursor protein (APP) by β- and γ-secretases. Aβ_{1–40} and Aβ_{1–42} amyloid peptides are the most frequently invoked in the disease. Pathogenesis has been related to the accumulation of these peptides and particularly of the highly amyloidogenic Aβ_{1–42} whose production is fostered by Alzheimer's disease-promoting mutations and risk factors.

Aβ peptides have high affinity for metal ions and form aggregates in particular in the presence of Cu(II) and Zn(II) [2,3]. Importantly, both Cu(II) and Zn(II) have been shown to affect the interactions of Aβ with lipid membranes [4,5]. Fe(III) [or Fe(II)] has also been proposed to interact with the Aβ-peptides although its effect on aggregation is less clearly defined [6]. Moreover, the accumulation of redox active metal ions such as Cu or Fe in the amyloid plaques is probably responsible for the oxidative stress which induces neuronal lesions in the brain, resulting in the irreversible loss of intellectual faculties [7–9]. It has been suggested that the redox activity of Cu(II)–Aβ (but also Fe(III)–Aβ) complexes can generate catalytically H₂O₂ in the presence of a reductant and dioxygen. It has also been proposed that HO· (generated through a Fenton reaction between Cu(I)–peptide complex and H₂O₂), which is more reactive than H₂O₂, is also involved in the oxidative stress induced by metal complexes of Aβ [10,11].

* Corresponding author. Fax: +33 05 61 55 30 03.

E-mail address: pitie@lcc-toulouse.fr (M. Pitie).

¹ Present address: Palumed, BP 28262, 31682 Labège cedex, France.

Different metal ion chelators are able to dissolve amyloid aggregates [12–20]. Such capacity can be used as possible therapeutic approach for the treatment of neurodegenerative diseases. In particular, a metal chelating ligand such as clioquinol dissolves brain amyloid plaques probably by capturing metal ions from the amyloid aggregates [15,19]. Clioquinol is also able to inhibit the production of hydrogen peroxide induced by $\text{A}\beta$ ·metal ion complexes [21]. Small scale clinical trials (phases I and II) of clioquinol have demonstrated a significant slowing of cognitive decline together with a lowering of plasma $\text{A}\beta_{1-42}$ levels in a subset of AD patients compared with matched placebo controls [22].

All β -amyloid peptides have similar effects but $\text{A}\beta_{1-42}$ is the peptide which is the most involved in Alzheimer's disease. This amyloid peptide is not only the most toxic, but also the most difficult to reverse from aggregates and consequently the most difficult to study. It should be noted that $\text{A}\beta_{1-42}$ exhibits the highest affinity for metal ions among all β -amyloid peptides.

$\text{A}\beta_{1-42}$ can bind up to 2.5 Cu(II) ions per peptide, but the effect of the number of redox active ions on the oxidative events has been poorly studied [14]. The major capacity to generate H_2O_2 has been proposed for species containing two copper ions per peptide, the system being catalytic [7]. However, the analysis of the production of hydrogen peroxide was conducted in the presence of the external chelator EDTA (which forms copper complex that neither produce significant amount of H_2O_2 nor transform it in these conditions) although it is known that a chelator with a lower affinity for copper than EDTA (e.g. clioquinol) can remove copper from amyloid aggregates and stop hydrogen peroxide production by $\text{A}\beta\cdot\text{Cu}_n$ (the logarithm of the affinity constants for Cu(II) are 18.8 for EDTA [23] and 8.9 for clioquinol [15]).

In order to understand this paradox, we decided to re-investigate these experiments in the absence of external chelator and confirmed that the hydrogen peroxide production was correlated to the number of copper ions fixed onto the peptide. The analyses of the H_2O_2 production in the presence of Cu(II) (or Fe(III) ions) and the addition of known quantities of H_2O_2 in the reaction mixture showed that $\text{A}\beta_{1-42}$ -copper complexes were poorly efficient in transforming H_2O_2 into other ROS. The reactions involving this degradation of H_2O_2 are probably due to iron ions associated or not with the peptide. The addition of chelators to the reaction medium containing the metallo-amyloid peptides, followed by a long incubation time in order to favor the removal of the metal ions from $\text{A}\beta$, allowed us to discuss a possible mechanism for the inhibition of H_2O_2 production by chelators.

Experiments were performed in the presence of the most amyloidogenic peptide $\text{A}\beta_{1-42}$ in order to mimic the worst conditions that can be observed for amyloid aggregates in physiological conditions and therefore to be more informative regarding the potential of the chelating ligands on amyloid peptides involved in AD.

2. Experimental part

2.1. General remarks

UV-visible (UV-Vis) spectra were recorded on a Hewlett Packard 8452A diode array spectrophotometer. CuCl_2 or FeCl_3 (puriss p.a. grade), EDTA disodium salt (Biochemica, Ultra) and L(+)-ascorbic acid sodium salt (Biochemica) were purchased from Fluka. Clioquinol, 8-hydroxyquinoline and 8-hydroxyquinoline were from Sigma-Aldrich. 8-Aminoquinoline was from Acros.

MilliQ water (Millipore) and buffers were treated before use with Chelex-100 resin (Biorad) (5.0 mg/mL) and filtered through a 0.2 mm filter (Whatman) to remove any metal ion or particulate matter. Stock solutions of clioquinol, 8-hydroxyquinoline, 8-hydroxyquinoline and 8-aminoquinoline were prepared in DMSO. EDTA was dissolved in water.

$\text{A}\beta_{1-42}$ amyloid peptide was synthesized, purified (up to 95% purity) and characterized by HPLC analysis and MALDI-TOF mass spectrometry by CNRS-IPBS (Toulouse, France). Peptide working solutions were prepared by dissolving 1.0 mg of lyophilized peptide in 500 μL water and 500 μL aqueous NaOH (pH 12) under stirring at 1400 rpm on a Thermomixer Comfort (Eppendorf). The peptide preparation was then centrifuged for 10 min at 5500 g and the supernatant was used. The $\text{A}\beta$ concentration in this supernatant was immediately determined by MicroBCA Assay (Pierce). The quantification was done from a Bovine Serum Albumin standard curve. The $\text{A}\beta$ solution was then aliquoted, fast frozen in liquid nitrogen and stored at -20°C .

All experiments involving the peptide were performed in duplicate when the discrepancy between experimental values was less than 5%. In the other cases and for major results triplicates were done and standard deviations were calculated.

Stirrings were performed with a Thermomixer.

2.2. Hydrogen peroxide assay

$\text{A}\beta_{1-42}$ (0.1–0.8 μM) and CuCl_2 (0.2 or 0.4 μM) were incubated for 1 h at 37°C under stirring at 1400 rpm in 375 μL of sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4). Then 2 μL of water or of stock solution of chelator (yielding a final concentration of 0.2, 0.4 or 0.8 μM for 375 μL of initial volume) were added. After another 1 h of incubation, 2 μL of sodium ascorbate (10 μM final concentration for 375 μL) were added and the reaction mixture was incubated 5 min under stirring. Then one volume of Amplex-Red/HRP mixture (Molecular Probes) in the same buffer was added. After one additional hour of incubation at 37°C with moderate stirring (500 rpm), the amount of H_2O_2 produced was quantified at 563 nm from an analytical grade H_2O_2 standard curve.

Some experiments received FeCl_3 (0.2 μM) at the time of the incubation with metal ions. Some experiments also

received known quantities of H₂O₂ just before the addition of ascorbate. Some experiments were performed with the addition of the volume of AmplexRed/HRP mixture just before the addition of ascorbate and/or H₂O₂. Then the kinetics of H₂O₂ formation were immediately analyzed by UV–Vis at 21 °C or the samples were incubated 1 h at 37 °C and the amount of H₂O₂ produced was quantified at 563 nm.

2.3. Inhibition of Aβ precipitation

Aβ_{1–42} (550 μL, 4.54 μM) in phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) was incubated without metal ion or with CuCl₂ or FeCl₃ (4.54 or 9.09 μM) for 1 h at 37 °C under stirring at 1400 rpm. EDTA or clioquinol (2 μL of 1.25, 2.5 or 5 mM solution) or 2 μL of water were added and the samples were incubated for 1 h at 37 °C under stirring at 1400 rpm. Samples were then centrifuged for 20 min at 5500 g and 500 μL of supernatant was removed. The test tube containing residual supernatant and pellet received 450 μL of the experimental buffer. Then both supernatant and pellet were analyzed for the determination of protein concentration by MicroBCA Assay (Pierce). This double quantification allowed to monitor the initial quantity of peptide and to confirm the validity of the measurements.

3. Results and discussion

3.1. Method to monitor the production/degradation of H₂O₂

3.1.1. Principle of the method

Aβ peptides can chelate different stoichiometries of copper and thus form different copper complexes. Each of these different copper–peptides species has its own capacity to generate H₂O₂ in the presence of a reductant (e.g. ascorbate) and dioxygen [7]. A titration of the amount of H₂O₂ generated in 1 h at 37 °C from 0.4 μM Cu(II) against Aβ_{1–42} concentration was performed (Fig. 1). The Aβ_{1–42} peptide has been described to chelate efficiently up to 2.5 equivalents of Cu(II), thus the different Cu/peptide ratios were studied up to two equivalents of copper ion per Aβ_{1–42} in order to avoid having free copper ions in solution [14]. To favor the efficiency of the copper ion uptake by the peptide, a pre-incubation step of two hours between the peptide and the copper salt was performed before the addition of the reductant. We chose to vary the quantity of peptide in order to maintain the ratio between the redox entities (the copper ions) and their activator (ascorbate) and therefore to favor a direct comparison of the results.

Horseshoe peroxidase (HRP) was used in the Amplex-Red based H₂O₂ assay for the quantification of H₂O₂ [24,25]. This enzyme catalyzes the reaction between one molecule of H₂O₂ and one molecule of AmplexRed detection reagent which is oxidized to colored resorufin, easily

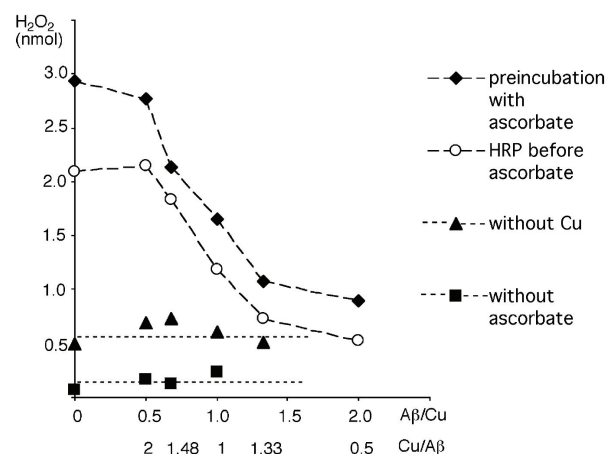


Fig. 1. Variation of the production of H₂O₂ by copper complexes of Aβ_{1–42} peptide as a function of Aβ/Cu stoichiometry. Experiments were performed in the presence of 0.4 μM CuCl₂, 10 μM ascorbate and air (the concentrations corresponding to the step before the addition of the detection system). H₂O₂ was quantified with AmplexRed Assay.

measured quantitatively at 563 nm. This reaction was rapid and efficient in the minute scale in the present reaction conditions. A control experiment showed that copper ions in the presence of ascorbate and air do not induce the 563 nm band in the absence of HRP (Fig. 2).

A pre-incubation step between ascorbate and Aβ_{1–42} metal complexes was performed before the addition of HRP/AmplexRed detecting system. It allowed to avoid competition between the studied metal–peptide system and the enzyme for the consumption of H₂O₂ and therefore to favor the maximal information on redox events involving Aβ · Cu_n and H₂O₂. This step was used to study the potential capacity of metal complexes or Aβ · Cu_n complexes to react with H₂O₂ and to potentially generate ROS more reactive than hydrogen peroxide. This pre-incubation step also allowed the observation of some particular effects of chelators on Aβ · Cu_n. To obtain the information about H₂O₂ degradation, a known quantity of H₂O₂ was added just before the addition of ascorbate. If the “metal–peptide + reductant” system is unable to react with H₂O₂ (or if it reacts very slowly with H₂O₂ when compared to the rate of production of H₂O₂ and therefore it is poor efficient for this reaction), this peroxide quantity should be recovered at the end of the experiment. In this hypothesis, the “metal–peptide + reductant” system works as in the absence of added H₂O₂ and produces the same H₂O₂ quantity as in the absence of initial addition of peroxide. Thus the quantity of H₂O₂ observed at the end of the experiment should be the addition of the quantity of H₂O₂ intrinsically generated by the “metal–peptide + reductant” system itself plus the number of nanomoles of H₂O₂ added in the pre-incubation step. If the system transforms H₂O₂, the final hydrogen peroxide quantity should be less than expected.

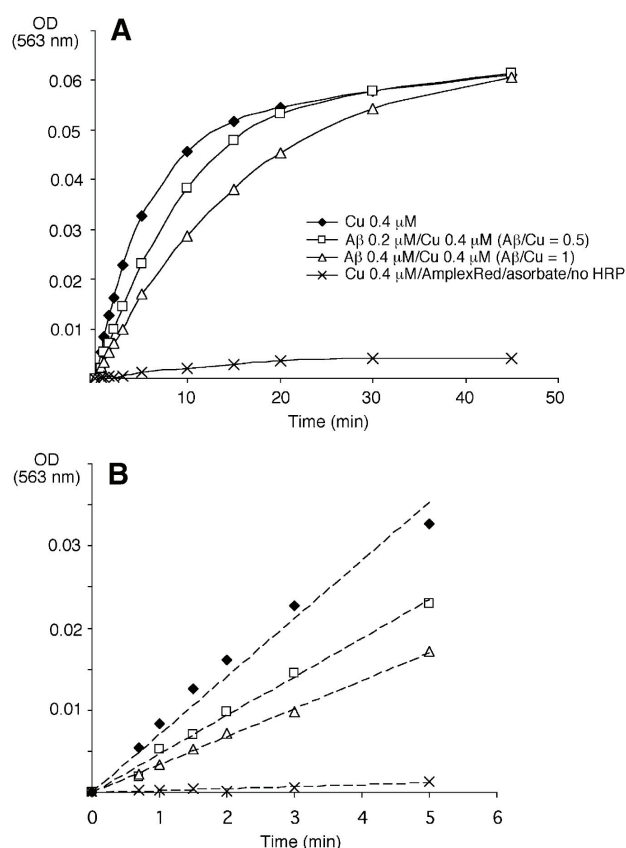


Fig. 2. Kinetics of production of H₂O₂ by CuCl₂, Aβ_{1–42}·Cu₂ and Aβ_{1–42}·Cu in the presence of ascorbate and air. The concentration in copper ion was 0.4 μM in all experiments (the concentration corresponding to the step before the addition of detection system). The peptide was incubated during two hours at 37 °C with the metal ion before the addition of the detection system. Then ascorbate (5 μM) was added and H₂O₂ was immediately quantified at 21 °C from the detection at 563 nm of resorufin due to quantitative reaction catalyzed by HRP between AmplexRed and H₂O₂. (A) Kinetics over 45 min; (B) Kinetics over the first 5 min where the H₂O₂ production was roughly linear.

3.1.2. Validation of the experimental conditions used during the analysis

Experiments performed without addition of exogenous H₂O₂ showed that all copper amyloid peptide complexes produced H₂O₂ in the presence of ascorbate for all tested Aβ/Cu stoichiometries (Fig. 1 and Table 1). The amount of H₂O₂ increased when Aβ_{1–42}/Cu ratio decreased (i.e. the number of equivalents of copper ions per Aβ_{1–42} increased).

For a ratio of two copper ions per Aβ_{1–42} (Aβ/Cu = 0.5), the production of H₂O₂ appeared to be close to the quantity produced by copper salts in the absence of peptide. Two facts allowed us to propose that this production was really associated to Aβ_{1–42}·Cu_n complexes and not to free copper ions: (i) the logarithm of association constant between the peptide and Cu(II) was described to be of 8.3 for Aβ_{1–42}·Cu₂ at pH 7.4 and thus all metal ions are complexed to the peptide at the presently used concen-

tration [14]; (ii) as control experiment, Aβ_{1–42} was aggregated in the same buffer in the presence of one or two equivalents of CuCl₂. A clear and classic increase of peptide precipitation was observed after a centrifugation step for two equivalents of Cu(II) per peptide when compared to one equivalent, in correlation to the binding of the two metal ions onto the peptide (Fig. 3) [11,14,15,28].

Importantly, for a Aβ/Cu ratio = 2 (corresponding to a possible Aβ₂Cu species), the quantity of H₂O₂ observed was close to the value obtained for control experiments performed in the absence of copper and thus practically no redox activity was observed. The data obtained here for Aβ/Cu ratio = 2 were in accordance with the antioxidant potency of Aβ peptide under particular conditions [26,27].

All these results reflect different abilities of the different (Aβ_{1–42})_m·Cu_n complexes to release H₂O₂ in the presence of reductant and air, the complexes having the lower Aβ_{1–42}/Cu ratios being the most active. We confirmed here the results previously obtained by Opazo et al. but with a major difference in the experimental conditions, since our data were obtained in the absence of the strong chelating agent EDTA that could potentially compete with Aβ_{1–42} for the chelation of copper ion and interact on the H₂O₂ production [7].

Experiments were also performed with the addition of the HRP/AmplexRed system before the addition of ascorbate. These conditions could be more favorable to protect the peptide against oxidation (the H₂O₂ being directly consumed by HRP as soon as it is formed and thus it cannot react with the copper complex to induce side oxidation reactions). The same profile of production of hydrogen peroxide was observed according to the Aβ/Cu ratio but the quantities were always lower (Fig. 1). These results probably reflect a decrease of the rate of the production of H₂O₂ in these more diluted conditions. On the other hand, it also indicates that when ascorbate was pre-incubated for five minutes before the detection step a large part of the hydrogen peroxide production had already occurred during these five minutes. It also shows that the pre-incubation step does not alter the reactivity when compared to a methodology closer to the previously published ones [7].

3.1.3. Refinement of the analysis from kinetic experiments

Kinetics of H₂O₂ production were studied for two concentrations of CuCl₂ and Aβ_{1–42} (see Fig. 2 for typical examples). In all cases, the results correlated with values obtained during quantification experiments of H₂O₂. Interestingly, for a given concentration of copper ions the kinetics of H₂O₂ formation at the beginning of the reaction was clearly faster for copper salts than for the Cu–peptide complex with a ratio of two copper ions per Aβ_{1–42} (Aβ/Cu = 0.5) showing a clear difference between the two species (Fig. 2). After several minutes, a plateau was observed in both cases for the H₂O₂ production, explaining why comparable values were observed when the quantification was performed after one hour of reaction. An estimation

Table 1
Analysis of the stability of H₂O₂ produced by Aβ_{1–42}–copper complexes; effect of iron ions

	Metal ion (μM)	H ₂ O ₂ (nmol)	H ₂ O ₂ observed (1.5 nmol added)	H ₂ O ₂ expected without degradation	Observed/expected (%)
Aβ · Cu ₂	0.4	2.77 ± 0.16	4.1	4.3	95
	0.2	1.78	3.2	3.3	97
Aβ · Cu	0.4	1.66 ± 0.03	3.0	3.2	94
	0.2	1.33 ± 0.08	2.4	2.8	86
Cu	0.4	2.93 ± 0.18	3.6	4.4	82
	0.2	2.62 ± 0.24	3.7	4.1	90
Aβ · Fe	0.2	0.65 ± 0.04	0.9	2.2	41
Fe	0.2	0.64 ± 0.09	1.0	2.1	48
Aβ · Cu · Fe	0.4 ^a	1.12 ± 0.11	2.2	2.6	85

The analysis was obtained by comparison of results obtained with or without the addition of a known quantity of H₂O₂ just before ascorbate in the reaction tanks. H₂O₂ was quantified with AmplexRed Assay.

^a Experiments were performed with Aβ/Cu/Fe in 1/1/1 ratio, all compounds were 0.2 μM, therefore the concentration in metal ions was 0.4 μM.

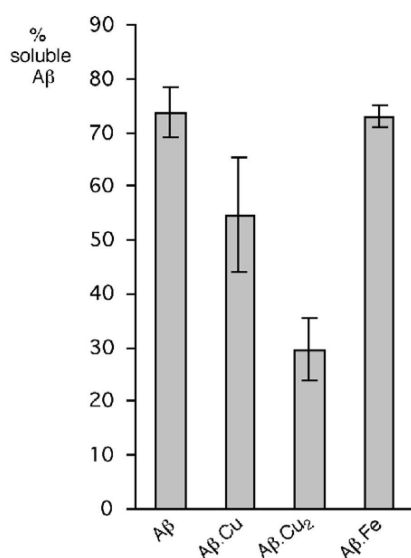


Fig. 3. Variation of the percentage of soluble Aβ_{1–42} peptide in the presence of different stoichiometries of CuCl₂ or FeCl₃. Aβ_{1–42} peptide (4.54 μM) was incubated for 2 h at 37 °C in the presence of one or two equivalent(s) of CuCl₂ or one equivalent of FeCl₃ then centrifuged. Percentage of peptide in the supernatant (soluble Aβ) and the precipitate (aggregated Aβ) were quantified with MicroBCA Assay.

of the initial rate of production of H₂O₂ was done in both cases from results obtained in the first five minutes of reaction, when the concentration of H₂O₂ increased linearly in the medium. This initial rate was of 61 and 48 mM/min for the copper salt in the absence of peptide and Aβ · Cu₂ (Aβ/Cu = 0.5), respectively. The same explanation can be proposed to explain why 0.2 μM of CuCl₂ produced 2.62 nmol of H₂O₂, a value close to the 2.93 nmol observed for 0.4 μM of the same copper salt on Table 1 (the initial reaction rate is lower for 0.2 μM than for 0.4 μM, but a plateau for the production of H₂O₂ was reached after some minutes, data not shown).

The fact that Aβ · Cu₂ was less efficient than copper salts to produce H₂O₂ was also confirmed by the quantification

of the H₂O₂ released when less CuCl₂ was introduced in the reaction. For 0.2 μM in Cu, the copper salt produced 2.62 nmol H₂O₂ in 1 h at 37 °C, whereas Aβ · Cu₂ produced only 1.78 nmol H₂O₂ in the same conditions (Table 1).

3.2. Analysis of the ability of Aβ–copper complexes to degrade H₂O₂. Effect of iron ions

Table 1 summarizes the obtained results.

3.2.1. Production/degradation of H₂O₂ by Aβ and copper ions

The ability of Aβ · Cu_n to react with H₂O₂ during the experiment was studied with the incorporation of a known quantity of H₂O₂ in the reaction (Table 1). A control experiment done in the absence of copper complex but in the presence of ascorbate showed that 95% of the hydrogen peroxide was recovered at the end of the reaction time. Importantly, for a ratio of two copper ions per Aβ_{1–42} (Aβ · Cu₂ species) a quantity of H₂O₂ corresponding to 95–97% of the quantity normally produced by the system plus the number of nmol of added H₂O₂ was found. Thus the Cu–peptide complex produced H₂O₂ in the presence of reductant and air but did not consume it. For a Aβ/Cu ratio of 1 (Aβ · Cu species), results were less clear since no degradation was observed for a 0.4 μM complex concentration, and limited degradation when the concentration was 0.2 μM (in these conditions, a difference of 0.4 nmol of H₂O₂ with the expected value was determined).

In the absence of peptide, results obtained with copper salts are in accordance with a higher capacity to degrade H₂O₂ since for 0.4 μM of CuCl₂, the difference between the expected value without degradation and the observed value was of 82%, corresponding to a difference of 0.8 nmol of H₂O₂. This value was significant since standard deviation did not exceed in any case 0.24 nmol of H₂O₂.

3.2.2. Production/degradation of H₂O₂ in the presence of iron ion and Aβ

The same type of experiment was performed in the presence of FeCl₃ instead of CuCl₂. This metal ion was detected

in amyloid plaques but the coordination of iron with amyloid peptide is subjected to debate. It has been proposed that the iron association with Aβ is possible only in particular conditions such as in mildly acidic conditions [28] or in fibril structures [29]. It has also been proposed that the presence of iron ions in the vicinity of Aβ can be explained by its coordination to other proteins such as ferritin trapped within the amyloid plaques [6].

Only a poor quantity of H₂O₂ was produced by the iron salt (0.65 nmol), compared to the same quantity of copper salt (2.62 nmol). When H₂O₂ was added at the beginning of the reaction, less H₂O₂ was found at the end of the experiment (1.0 nmol) than the initially introduced quantity (1.5 nmol). Therefore the iron system does not only produce but also degrades H₂O₂. It is noticeable that in the absence of ascorbate, no degradation of H₂O₂ was observed in the presence of FeCl₃. This fact confirms that it is a Fe(II) species, due to the reduction of Fe(III) by ascorbate, that transforms the hydrogen peroxide in the reaction medium.

For a ratio of Aβ/Fe = 1, strictly identical results were obtained. On the other hand tests of peptide aggregation in the presence of FeCl₃ showed no difference of solubility after a centrifugation step when compared to results obtained in the absence of metal ion (Fig. 3). Therefore these data are in agreement with an absence of coordination of iron to Aβ_{1–42} in the conditions used here.

3.2.3. Effect of iron ion on the degradation of H₂O₂ produced by Aβ·Cu

When Aβ_{1–42}, copper and iron ions were present, the production (1.12 nmol) and degradation of hydrogen peroxide were both observed. Since Aβ–copper complex does not degrade efficiently H₂O₂ in the same conditions, it can be proposed that the H₂O₂ degradation is not due to Aβ–copper complexes but more probably to iron complexes.

As control, the addition of a known quantity of H₂O₂ in the reaction medium was performed in experiments where the HRP/AmplexRed system was added before the reductant. As previously discussed, there are conditions where the peptide is more protected against oxidative modifications but where H₂O₂ decrease is less quantifiable due to the competition with HRP. In these conditions, the order of the ratio (in %) of observed/expected H₂O₂ values was also Aβ·Cu₂ ≥ Aβ·Cu > Cu ≫ Fe. Again in the case of iron ions, in the presence or in the absence of peptide, less H₂O₂ was found than the initial value introduced in the medium (data not shown).

3.2.4. Consequences

The incorporation of H₂O₂ during a pre-incubation step, before the addition of a reducing agent in a Aβ·Cu_n solution, allowed us to study not only the formation but also, at the same time, the degradation of H₂O₂ by the copper–amyloid complexes that have been invoked in Alzheimer's disease. Aβ·Cu_n produce but do not degrade efficiently H₂O₂. A degradation of H₂O₂ was observed in

the presence of iron ions. These experiments do not allow to know if the degradation of H₂O₂ was due to its transformation in H₂O and O₂ by a “catalase-effect” or if it was due to the production of other ROS (such as HO·) from H₂O₂. They show nevertheless that these other ROS derived from H₂O₂ that have been proposed to can be produced by Aβ–metal complexes [1,9,10] are probably generated by other redox metal complexes than Aβ·Cu_n. The copper–amyloid species should be considered as an efficient machinery only for the catalytic production of hydrogen peroxide when exposed to a reducing agent. Iron ions complexed or not by amyloid peptides might be responsible for the generation of ROS from the hydrogen peroxide produced by the copper–amyloids.

3.3. Effect of nature of chelators on the production/ degradation of H₂O₂ by Aβ·Cu_n

The effect of the presence of a chelator (EDTA or clioquinol) on Aβ·Cu_n has been analyzed. Other ligands similar to clioquinol were also tested to confirm or to refine the results obtained (Fig. 4).

EDTA is an hexadentate ligand (L) that was chosen because it is a classic chelator that form stable LCu complexes. Clioquinol is a bidentate ligand. It was selected since recent preclinical and clinical data indicated that this 8-hydroxyquinoline ligand is active against Alzheimer's disease and that its action results from its interaction with metal ions complexed to β-amyloid peptides [15,22]. Two clioquinol units are able to strongly chelate copper(II) [30]. This organization of ligand(s) in a tetradentate fashion around Cu(II) stabilize the coordination sphere of this metal ion but complexes with only one clioquinol per copper ion can also exist [23].

The chelator and the copper–amyloid peptide were incubated during one hour before the addition of the reductant in order to allow some time for the chelator to remove the metal ions from the peptide.

3.3.1. Ability of chelators to inhibit precipitation of Aβ induced by Cu(II)

The amyloid peptide was incubated in the presence of one or two equivalents of Cu(II) to form Aβ–copper complexes and its solubility was analyzed after the addition of chelator (Fig. 5). The loss of peptide solubility due to the addition of Cu(II) (observed after a centrifugation step) was inhibited by the addition of EDTA or clioquinol, in correlation with the chelation of the metal ion by the extra

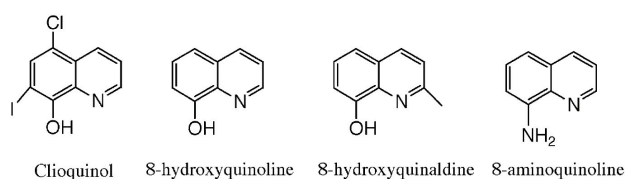


Fig. 4. Structure of quinoline derivatives used in the present study.

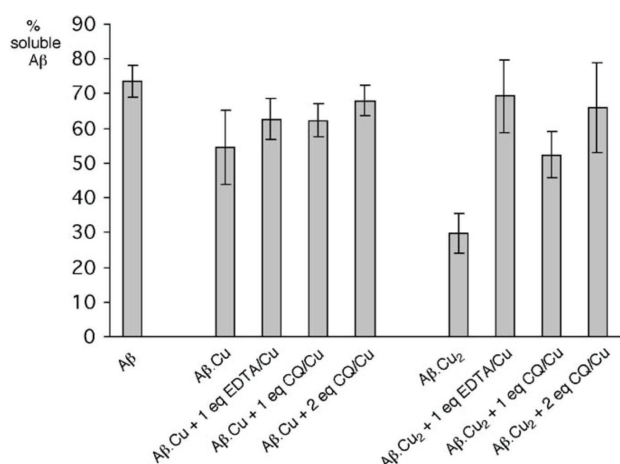


Fig. 5. Analysis of the inhibition of the aggregation of Aβ_{1–42} due to Cu(II) by EDTA or clioquinol. Aβ_{1–42} (4.54 μM) was incubated 1 h at 37 °C with or without one or two equivalent(s) of CuCl₂ then another 1 h in the presence of one or two equivalent(s) of chelator per copper ion then centrifuged. Quantities of soluble and precipitated Aβ_{1–42} were determined in the supernatant and the precipitate with MicroBCA Assay.

ligand liberating probably the more soluble apo-peptide in the medium.

One equivalent of EDTA per copper inhibited the loss of solubility of Aβ_{1–42} induced by one but also two equivalents of Cu(II) per peptide. In the case of clioquinol one equivalent or two equivalents of ligand were used since

8-hydroxyquinoline derivatives have been reported to form LCu complexes and also L₂Cu tetradentate complexes [23]. Clioquinol was also able to afford the complete solubility of Aβ_{1–42} but two equivalents of ligand per Cu(II) are required.

3.3.2. Inhibition of the production/degradation of H₂O₂ by chelators

The action of these chelators on the inhibition of the production of H₂O₂ provided rather unexpected results (Table 2).

In the absence of Aβ peptide, as expected, one equivalent of EDTA or two equivalents of clioquinol are necessary to inhibit efficiently the production of hydrogen peroxide generated by the copper salt in the presence of ascorbate and air. The resulting complexes formed with the added chelators seemed to be redox inactive and, in particular, they did not degrade H₂O₂ as shown by the addition of a known quantity of H₂O₂ during the pre-incubation step with ascorbate (Table 3). Such behavior is probably due to the fact that the coordination sphere of the copper(II) ions is filled by these chelating ligands.

One equivalent of EDTA per copper was able to induce the same inhibition on Aβ_{1–42}–copper complexes for two Aβ/Cu ratios tested: (i) for Aβ/Cu ratio = 0.5 (a ratio generating the maximum of hydrogen peroxide) and (ii) for Aβ/Cu ratio = 1.33 (a ratio for which the peptide is in excess with respect to Cu(II), in order to favor the complete complexation of copper ions by the peptide in the absence

Table 2
Comparison of the inhibition of the H₂O₂ production by chelators

	H ₂ O ₂ (nmol)			
	0 μM Aβ _{1–42} 0 μM Cu	No Aβ _{1–42} 0.4 μM Cu	0.2 μM Aβ _{1–42} 0.4 μM Cu [Cu/Aβ = 2]	0.53 μM Aβ _{1–42} 0.4 μM Cu [Cu/Aβ = 0.75]
No chelator	0.40 ± 0.05	2.93 ± 0.18	2.77 ± 0.16	1.08
<i>EDTA</i>				
0.2 μM [0.5 eq/Cu]	nd	1.82	1.21	0.80
0.4 μM [1 eq/Cu]	0.48	0.94	0.82	0.57
<i>Clioquinol</i>				
0.4 μM [1 eq/Cu]	nd	2.07	0.89 ± 0.08	0.64
0.8 μM [2 eq/Cu]	0.26	0.54	0.78 ± 0.06	0.57
<i>8-Hydroxyquinoline</i>				
0.4 μM [1 eq/Cu]	nd	2.02	0.69	0.75
0.8 μM [2 eq/Cu]	nd	0.62	0.71 ± 0.04	0.62
<i>8-Hydroxyquinoline</i>				
0.4 μM [1 eq/Cu]	nd	2.31	0.84	0.79
0.8 μM [2 eq/Cu]	nd	0.72	0.77	0.79
<i>8-Aminoquinoline</i>				
0.4 μM [1 eq/Cu]	nd	2.28	0.97	0.93
0.8 μM [2 eq/Cu]	nd	2.45	0.91	0.72
No ligand, no Cu	0.40 ± 0.05	–	0.69	0.51
No ascorbate, no Cu	0	0	0.06	nd

Experiments were performed in the presence of 0.4 μM CuCl₂, 10 μM ascorbate and air (the concentrations corresponding to the step before the addition of the detection system). H₂O₂ was quantified with AmplexRed Assay.

nd: not determined.

Table 3
Analysis of the stability of H₂O₂ during the inhibition of its production by chelators

	Aβ/ Cu	Chelator/ Cu	H ₂ O ₂ (nmol)	H ₂ O ₂ added (nmol)	H ₂ O ₂ observed with addition	H ₂ O ₂ expected without degradation	Observed/ expected (%)
EDTA		0	2.93	1.5	3.6	4.4	82
	0.5	0	2.77	1.5	4.1	4.3	95
		0.5	1.82	1.5	3.1	3.3	94
		1	0.94	1.5	2.4	2.4	100
	0.5	1	0.82	1.5	2.3	2.3	100
	1.33	1	0.57	1.5	2.1	2.1	100
Clioquinol		2	0.54	3.0	3.6	3.5	103
	0.5	1	0.89	1.5	2.1	2.4	88
	0.5	2	0.78	1.5	2.1	2.3	91
	0.5	2	0.78	3.0	3.2	3.8	84
	1.33	1	0.64	1.5	1.9	2.1	90
	1.33	2	0.57	1.5	1.9	2.1	90
8-Hydroxy quinoline		2	0.62	3.0	3.6	3.6	100
	0.5	2	0.71	3.0	3.5	3.7	94
8-Hydroxy quinaldine		2	0.72	3.0	3.8	3.7	103
	0.5	2	0.77	3.0	3.8	3.8	100
8-Amino quinoline		2	2.45	3.0	4.4	5.5	80
	0.5	2	0.9	3.0	2.7	3.9	70

The analysis was obtained by comparison to results obtained with or without the addition of a known quantity of H₂O₂ just before ascorbate in the reaction tanks. H₂O₂ was quantified with AmplexRed Assay.

of external chelator). Interestingly, for a Aβ/Cu ratio = 0.5 (corresponding to a putative Aβ·Cu₂ species involving 0.4 μM of Cu and 0.2 μM of peptide), and with the addition of only 0.5 equivalent of EDTA (0.2 μM) per copper, the production of H₂O₂ was 1.21 nmol, a value close to 1.33 nmol observed for 0.2 μM of Aβ·Cu (Table 1). This result is in accordance with the fact that EDTA removed only one equivalent of Cu(II) from the peptide to form a redox inactive EDTA·Cu complex that leaves in the medium a Aβ·Cu complex still able to produce H₂O₂.

Results are clearly different in the case of clioquinol and Aβ_{1–42}–copper complexes. One equivalent of clioquinol per Cu was sufficient to block efficiently the production of H₂O₂ whereas two equivalents were necessary for the copper salt alone. This phenomenon was observed for the two different Aβ/Cu ratios tested. Two other similar ligands, namely 8-hydroxyquinoline and 8-hydroxyquinaldine (Fig. 4) gave the same results (Table 2). One equivalent of these chelators was again sufficient to block the production of H₂O₂ by Aβ·Cu_n whereas two equivalents were necessary with the copper salt alone.

Kinetic analyses were also performed showing that the addition of one equivalent of clioquinol per copper ion onto Aβ·Cu₂ is sufficient to form species clearly less reactive than Aβ·Cu. This later species might be released if clioquinol removed only one copper ion from the copper peptide complex to form an L₂Cu species (Fig. 6).

Importantly, in the presence of Aβ, copper complexes formed in the presence of clioquinol seemed able to degrade poorly but significantly H₂O₂ when a known quantity of H₂O₂ was introduced in the experiment (Table 3). This phenomenon was also clearly observed by increasing

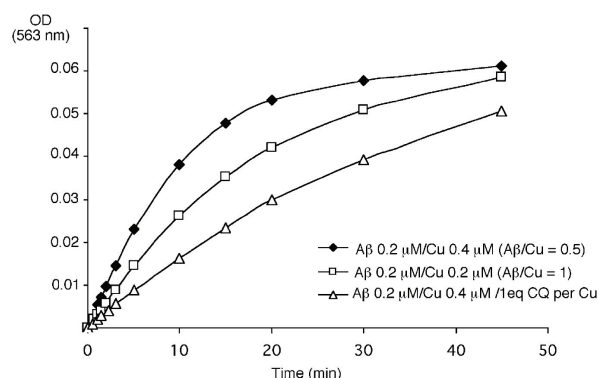


Fig. 6. Kinetics of the inhibition of the H₂O₂ production by clioquinol. The concentrations correspond to values observed before the addition of the detection system. The peptide was incubated at 37 °C during 1 h with the metal ion and another 1 h with or without the addition of one equivalent of clioquinol. The detection system then ascorbate (5 μM) were added and H₂O₂ was immediately quantified at 21 °C from the detection at 563 nm of resorufin due to quantitative reaction catalyzed by HRP between AmplexRed and H₂O₂.

the amount of introduced H₂O₂ (from 1.5 to 3.0 nmol). However, in the presence of 8-hydroxyquinaldine, no degradation was observed since the observed/expected ratio of H₂O₂ was of 100%, strongly suggesting that the copper complex formed with the extra chelator was redox inactive.

Interestingly, a small variation of the nature of the substituent on quinoline changes results as it can be observed in the case of 8-aminoquinoline (Fig. 4). This chelator seemed to inhibit poorly the production of H₂O₂ by the

copper salt, but is more efficient when the copper ions are complexed by the amyloid peptide (Table 2). As for the 8-hydroxyquinoline derivatives this inhibition seemed to require only one equivalent of chelator per copper ion on Aβ·Cu_n complexes. On the other hand, a major difference can be observed when a known quantity of hydrogen peroxide was added in the reaction: the system degraded efficiently H₂O₂ since less H₂O₂ was observed than the initial quantity introduced (2.7 nmol when 3.0 nmol were introduced, Table 3). This phenomenon was also observed in the case of complexes formed from copper salts.

As control, the same experiments were performed in the case of EDTA and clioquinol with the addition of ascorbate after the incorporation of the HRP/AmplexRed mixture and similar results were obtained (data not shown).

3.3.3. Consequences for the mechanism of action of chelators against Aβ·Cu_n

Two explanations can be proposed in order to explain these results for the Aβ/Cu = 0.5 ratio and 8-hydroxyquinoline ligands such as clioquinol: (i) there are two sites of chelation on Aβ_{1–42} for copper but only one is redox active and produces H₂O₂. The 8-hydroxyquinoline ligands are able to selectively remove copper from this active site to form an inactive L₂Cu species; (ii) both sites are redox active and they were blocked with only one equivalent of 8-hydroxyquinoline ligand per copper, forming probably a ternary complex between the Cu, the peptide and the chelator (this hypothesis has been previously proposed by Bush [6] and is in accordance with recent results obtained with clioquinol and Aβ–zinc(II) complexes [31] but, to our knowledge, without experimental evidences for Aβ–copper complexes).

The first proposition is not in accordance with results observed with EDTA and is hard to correlate with the fact that the same phenomenon was observed for Aβ/Cu = 0.5 but also 1.33 ratios. *The second proposition of a ternary complex peptide–copper–chelator seems therefore to be more reasonable.*

Results of peptide precipitation and of inhibition of H₂O₂ production show that a ligand like EDTA removed copper ion(s) from Aβ·Cu_n to form a redox inactive LCu complex and an apo-Aβ_{1–42} peptide. Besides these results were in accordance with bidentate ligands such as 8-hydroxyquinoline derivatives interacting with Aβ·Cu_n in a 1/1 L/Cu stoichiometry to form ternary copper–peptide–chelator complex having an increased solubility (Fig. 5). A minor variation on the 8-hydroxyquinoline moiety, like the incorporation of an alkyl substituent on the C2 of the nitrogen-containing heterocycle (a methyl group in the case of 8-hydroxyquinaldine) is sufficient to make such ternary complexes redox inactive. Other modifications, such as substitution of the hydroxyl group by an amine, can produce false positive in the inhibition of the H₂O₂ production by Aβ·Cu_n that can be easily detected by the introduction of a known quantity of hydrogen peroxide in the experiment.

In a strategy consisting in developing the use of chelators for the treatment of Alzheimer's disease, the reported results can be considered of importance to understand the action of these chelators and to optimize their design.

Besides the results summarized here, the method consisting in the addition of H₂O₂ during the analysis of the inhibition of its production can be considered as a reliable test that can be easily included during preliminary screening of ligands before more robust (but also more expensive and more time consuming) biological testing in vitro or in vivo to evaluate chelators in AD.

4. Conclusion

The incorporation of H₂O₂ during a pre-incubation step, before the addition of a reducing agent in a Aβ·Cu_n solution, allowed us to study not only the formation but also, at the same time, the degradation of H₂O₂ by the copper–amyloid complexes that have been invoked in Alzheimer's disease. Aβ·Cu_n produce but do not degrade efficiently H₂O₂, and ROS proposed to derive from H₂O₂ are probably generated with other redox metal complexes.

The presently reported method of analysis, associated to amyloid precipitation experiments, allowed us to understand the inhibition of the production of H₂O₂ by chelators. The action of a hexadentate ligand such as EDTA is probably due to the removal of the copper ions from Aβ·Cu_n, while bidentate ligands like 8-hydroxyquinoline derivatives could act through the formation of ternary complexes with Aβ·Cu_n. The redox activity of these species can be modulated by the incorporation or the modification of the substituents on the quinoline heterocycle. With the aim of developing chelators for the treatment of Alzheimer's disease, the reported results can be considered of importance to understand their potential action against Aβ.

5. Abbreviations

AD	Alzheimer disease
Aβ	β-type amyloid peptide
CQ	clioquinol
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
L	ligand
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight
ROS	reactive oxygen species.

Acknowledgements

Authors thank gratefully Dr. Honoré Mazarguil (CNRS-IPBS, Toulouse) for the Aβ_{1–42} peptide synthesis.

CNRS and Palumed were acknowledged for their financial support.

References

- [1] M.P. Mattson, Nature 430 (2004) 631–639.
- [2] P.M. Doraiswamy, A.E. Finefrock, Lancet Neurol. 3 (2004) 431–434.
- [3] K.J. Barnham, C.L. Masters, A.I. Bush, Nat. Rev. Drug Discovery 3 (2004) 205–214.
- [4] T.L. Lau, E.E. Ambroggio, D.J. Tew, R. Cappai, C.L. Masters, G.D. Fidelio, K.J. Barnham, F. Separovic, J. Mol. Biol. 356 (2006) 759–770.
- [5] C.C. Curtain, F. Ali, I. Volitakis, R.A. Cherny, R.S. Norton, K. Beyreuther, C.J. Barrow, C.L. Masters, A.I. Bush, K.J. Barnham, J. Biol. Chem. 276 (2001) 20466–20473.
- [6] A.I. Bush, Neurobiol. Aging 23 (2002) 1031–1038.
- [7] C. Opazo, X. Huang, R.A. Cherny, R.D. Moir, A.E. Roher, A.R. White, R. Cappai, C.L. Masters, R.E. Tanzi, N.C. Inestrosa, A.I. Bush, J. Biol. Chem. 277 (2002) 40302–40308.
- [8] G.D. Ciccotosto, D. Tew, C.C. Curtain, D. Smith, D. Carrington, C.L. Masters, A.I. Bush, R.A. Cherny, R. Cappai, K.J. Barnham, J. Biol. Chem. 279 (2004) 42528–42534.
- [9] X. Huang, C.S. Atwood, M.A. Harston, G. Multhaup, L.E. Goldstein, R.C. Scarpa, M.P. Cuajungco, D.N. Gray, J. Lim, R.D. Moir, R.E. Tanzi, A.I. Bush, Biochemistry 38 (1999) 7609–7616.
- [10] B.J. Tabner, S. Turnbull, O.M. El-Agnaf, D. Allsop, Free Radic. Biol. Med. 32 (2002) 1076–1083.
- [11] S.I. Dikalov, M.P. Vitek, R.P. Mason, Free Radic. Biol. Med. 36 (2004) 340–347.
- [12] R.A. Cherny, J.T. Legg, C.A. McLean, D.P. Fairlie, X. Huang, C.S. Atwood, K. Beyreuther, R.E. Tanzi, C.L. Masters, A.I. Bush, J. Biol. Chem. 274 (1999) 23223–23228.
- [13] R.A. Cherny, K.J. Barnham, T. Lynch, I. Volitakis, Q.X. Li, C.A. McLean, G. Multhaup, K. Beyreuther, R.E. Tanzi, C.L. Masters, A.I. Bush, J. Struct. Biol. 130 (2000) 209–216.
- [14] C.S. Atwood, R.C. Scarpa, X. Huang, R.D. Moir, W.D. Jones, D.P. Fairlie, R.E. Tanzi, A.I. Bush, J. Neurochem. 75 (2000) 1219–1233.
- [15] R.A. Cherny, C.S. Atwood, M.E. Xilinas, D.N. Gray, W.D. Jones, C.A. McLean, K.J. Barnham, I. Volitakis, F.W. Fraser, Y.-S. Kim, X. Huang, L.E. Goldstein, R.D. Moir, J.T. Lim, K. Beyreuther, H. Zheng, R.E. Tanzi, C.L. Masters, A.I. Bush, Neuron 30 (2001) 665–676.
- [16] J.Y. Lee, J.E. Friedman, I. Angel, A. Kozak, J.Y. Koh, Neurobiol. Aging 25 (2004) 1315–1321.
- [17] A. Dedeoglu, K. Cormier, S. Payton, K.A. Tseitlin, J.N. Kremsky, L. Lai, X. Li, R.D. Moir, R.E. Tanzi, A.I. Bush, N.W. Kowall, J.T. Rogers, X. Huang, Exp. Gerontol. 39 (2004) 1641–1649.
- [18] Z. Cui, P.R. Lockman, C.S. Atwood, C.H. Hsu, A. Gupte, D.D. Allen, R.J. Mumper, Eur. J. Pharm. Biopharm. 59 (2005) 263–272.
- [19] B. Raman, T. Ban, K.I. Yamaguchi, M. Sakai, T. Kawai, H. Naiki, Y. Goto, J. Biol. Chem. 280 (2005) 16157–16162.
- [20] C. Boldron, I. Van der Auwera, C. Deraeve, H. Gornitzka, S. Wera, M. Pitié, F. van Leuven, B. Meunier, ChemBioChem 6 (2005) 1976–1980.
- [21] K.J. Barnham, F. Haeflner, G.D. Ciccotosto, C.C. Curtain, D. Tew, C. Mavros, K. Beyreuther, D. Carrington, C.L. Masters, R.A. Cherny, R. Cappai, A.I. Bush, FASEB J. 18 (2004) 1427–1429.
- [22] C.W. Ritchie, A.I. Bush, A. Mackinnon, S. Macfarlane, M. Mastwyk, L. McGregor, L. Kiers, R. Cherny, Q.X. Li, A. Tammer, D. Carrington, C. Mavros, I. Volitakis, M. Xilinas, D. Ames, S. Davis, K. Beyreuther, R.E. Tanzi, C.L. Masters, Arch. Neurol. 60 (2003) 1685–1691.
- [23] L.G. Sillen, A.E. Martell, Stability Constants of Metal-ion Complexes, The Chemical Society London Publication, 1971.
- [24] <http://www.biotek.com>.
- [25] M. Zhou, Z. Diwu, N. Panchuk-Voloshina, R.P. Haugland, Anal. Biochem. 253 (1997) 162–168.
- [26] C.S. Atwood, M.E. Obrenovich, T. Liu, H. Chan, G. Perry, M.A. Smith, R.N. Martins, Brain Res. Rev. 43 (2003) 1–16.
- [27] K. Zou, J.S. Gong, K. Yanagisawa, M. Michikawa, J. Neurosci. 22 (2002) 4833–4841.
- [28] C.S. Atwood, R.D. Moir, X. Huang, R.C. Scarpa, N.M.E. Bacarra, D.M. Romano, M.A. Hartshorn, R.E. Tanzi, A.I. Bush, J. Biol. Chem. 273 (1998) 12817–12826.
- [29] A. Khan, J.P. Dobson, C. Exley, Free Radic. Biol. Med. 40 (2006) 557–569.
- [30] M. Di Vaira, C. Bazzicalupi, P. Orioli, B. Bruni, P. Zatta, Inorg. Chem. 43 (2004) 3795–3797.
- [31] C. Opazo, S. Luza, V.L. Villemagne, I. Volitakis, C. Rowe, K.J. Barnham, D. Stroszyk, C.L. Masters, R.A. Cherny, A.I. Bush, Aging Cell 5 (2006) 69–79.

I.3 Commentaire

Cette étude montre que les ligands monoquinoléine comme le clioquinol ou la 8-hydroxyquinoléine inhibent la production d'H₂O₂ due aux complexes Aβ·Cu_n en présence de réducteur.

Elle suggère de plus que le mode d'action de ces ligands consiste en la formation d'un complexe ternaire entre le chélateur, le cuivre et le peptide. L'hypothèse de la formation d'un complexe ternaire avec les espèces Aβ·Cu_n avait déjà été proposée par Bush mais, à notre connaissance, sans validation expérimentale (Bush, 2002). Elle est par ailleurs en accord avec les résultats d'une étude récente traitant de l'action du clioquinol sur des complexes de Zn^{II} d'Aβ (Opazo *et al.*, 2006).

Dans le cas des ligands bisquinoléine, cette interaction sous la forme de complexe ternaire est peu probable. On peut supposer que la structure tétradentate de ces ligands favorise un mode d'interaction comparable à celui de l'EDTA, qui consiste à retirer les ions cuivre fixés sur Aβ.

Cette étude a été abordée dans le cas du ligand **CT2** qui, comme l'EDTA, ne dégrade pas H₂O₂ (cf. chapitre précédent, Tableau 7). Les premiers résultats obtenus ne permettent cependant pas de conclure (Tableau 1).

En effet, pour un ratio **CT2** / Cu = 0,5, correspondant à une entité 8-hydroxyquinoléine par ion métallique, la diminution de la production d'H₂O₂ par Aβ·Cu₂ est moins forte que celle observée dans le cas de la 8-hydroxyquinoléine dans un ratio 1 / 1 avec le Cu. Cette observation est en défaveur de l'hypothèse du complexe ternaire pour **CT2**.

Toutefois, pour ce rapport L / Cu^{II} = 0,5, l'inhibition de la production d'H₂O₂ due à Aβ·Cu₂ est plus marquée pour **CT2** que pour l'EDTA dans des conditions identiques. De plus, la quantité d'H₂O₂ produite en présence de **CT2** (0,94 nmol d'H₂O₂) est relativement éloignée de la quantité d'H₂O₂ produite par 0,2 μM d'Aβ·Cu (1,33 nmol), qui serait l'espèce rédox-active présente dans le milieu dans l'hypothèse où **CT2** a retiré un des deux atomes de cuivre d'Aβ·Cu₂.

Des études complémentaires devront donc être menées pour tenter d'attribuer le mode d'interaction des ligands bisquinoléine tels que **CT2** avec les complexes Aβ·Cu_n lors de l'inhibition de la production d'H₂O₂ par ces derniers.

	n (H_2O_2) (nmol)		
	0,4 μM Cu^{II}	0,2 μM $A\beta_{42}$ 0,4 μM Cu^{II} Cu/ $A\beta$ = 2	0,2 μM $A\beta_{42}$ 0,2 μM Cu^{II} Cu/ $A\beta$ = 1
sans ligand	2,93 $\pm$ 0,18	2,77 $\pm$ 0,16	1,33 $\pm$ 0,08
8-hydroxyquinoléine			
1 eq/ Cu^{II}	2,02	0,69	-
2 eq/ Cu^{II}	0,62	0,71 $\pm$ 0,05	-
EDTA			
0,5 eq/ Cu^{II}	1,82	1,21	-
1 eq/ Cu^{II}	0,94	0,82	-
CT2			
0,5 eq/ Cu^{II}	2,12	0,94	-
1 eq/ Cu^{II}	0,84	0,71 $\pm$ 0,02	-

Tableau 1. Comparaison de l'inhibition par les différents ligands de la production de H_2O_2 réalisée par $A\beta_{42}$ (0,2 μM) en présence de $CuCl_2$ (0,4 μM), d'ascorbate (10 μM) et d'air. La quantité d' H_2O_2 (en nanomoles) est dosée à l'aide d'un kit Amplex Red H_2O_2 /HRP Assay.

II. Bibliographie

- Bush, A.I. (2002) Metal complexing agents as therapies for Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **23**: 1031-1038.
- Opazo, C., Luza, S., Villemagne, V.L., Volitakis, I., Rowe, C., Barnham, K.J., Strozzyk, D., Masters, C.L., Cherny, R.A., and Bush, A.I. (2006) Radioiodinated clioquinol as a biomarker for beta-amyloid: Zn complexes in Alzheimer's disease. *Aging Cell*. **5**: 69-79.

Conclusions générales et perspectives

Notre travail a consisté en la synthèse et l'évaluation de chélateurs de type bi-chélateur en relation avec la maladie d'Alzheimer.

Au cours du premier chapitre, nous avons évoqué les mécanismes de développement de la maladie d'Alzheimer, qui est complexe et multifactorielle. Nous nous sommes intéressés en particulier au peptide β -amyloïde, considéré comme une espèce clé dans le développement de cette maladie. Ce peptide s'agrège dans le cerveau à la suite d'un phénomène de repliement. Les ions métalliques (Cu^{II} , Zn^{II} et Fe^{III}) interagissant avec $\text{A}\beta$ accentuent cette précipitation et prennent part à sa toxicité, en particulier par la génération d'espèces réactives de l'oxygène à l'origine de dommages oxydants. Nous avons vu qu' $\text{A}\beta$ peut être inséré dans un processus plus global appelé "hypothèse de la cascade amyloïde". Celle-ci implique une cascade d'événements qui conduisent, à terme, à la dégénérescence des neurones, à la disparition des synapses et à la mort cellulaire responsables de l'altération de la mémoire et des fonctions cognitives chez les malades.

Cette complexité permet d'envisager le développement d'un large éventail de stratégies thérapeutiques pour traiter cette maladie. Ces stratégies, qui ont été détaillées dans ce chapitre, se partagent en deux groupes selon qu'elles ciblent les symptômes ou les causes de la maladie d'Alzheimer. Les deux types de traitements utilisés actuellement se situent dans la première catégorie. Parmi les voies de recherche ciblant les causes de la maladie d'Alzheimer, la stratégie de chélation des ions métalliques, qui a donné de premiers résultats positifs *in vivo*, est un axe de recherche intéressant. En effet, des molécules empêchant les interactions délétères entre $\text{A}\beta$ et les ions métalliques sont susceptibles d'inhiber l'agrégation d' $\text{A}\beta$ et de favoriser son élimination. Elles pourraient également permettre d'empêcher les phénomènes d'oxydation engendrant de la toxicité.

Une première étude basée sur cette stratégie de chélation des ions métalliques a été décrite dans le second chapitre. Elle concerne deux composés polyphénanthroline conçus dans le but d'améliorer l'affinité du ligand 1,10-phénanthroline pour les ions métalliques Cu^{II} et Zn^{II} en reliant deux de ces molécules de façon covalente. Nous avons pu confirmer cette proposition en déterminant les constantes d'affinité pour ces ions métalliques : le composé cyclique Cyclo-bi-Phen, possédant deux bras de jonction, chélate efficacement les ions Cu^{II} et Zn^{II} *in vitro*. En outre, il est apparu que ce ligand

possède une activité *in vivo* permettant la diminution de la quantité de plaques amyloïdes denses chez des souris transgéniques modélisant la maladie d'Alzheimer.

Dans le troisième chapitre, nous avons repris la stratégie bi-chélateur développée dans le cas de la Cyclo-bi-Phen, et nous l'avons adaptée à une autre série de molécules aromatiques *N*-hétérocycliques capables de se coordonner aux ions métalliques impliqués dans la maladie d'Alzheimer : les ligands quinoléine. Cette série a été établie sur le modèle du clioquinol, un ligand quinoléine actif *in vitro* et *in vivo* dans le cadre de cette maladie. Les entités 8-hydroxyquinoléine et 8-aminoquinoléine, connues pour leur affinité pour les ions métalliques Cu^{II} , mais également Zn^{II} pour la première, ont été utilisées comme motif de chélation. Nous avons présenté la conception et la synthèse d'une vingtaine de ces composés. La position du bras de jonction entre les noyaux quinoléine a été choisie au voisinage du site de chélation, en position 2 ou en position 8 du noyau quinoléine, de manière à permettre l'emploi de liens courts qui favorisent l'interaction des deux entités chélatantes sur le même ion métallique. Nous avons développé diverses voies de synthèse qui ont permis de faire varier la taille et la nature de ce bras de jonction. De plus, des substituants ont été introduits de manière contrôlée sur les noyaux quinoléine et sur le bras de jonction, de manière à apporter de la stabilité à ces ligands ou à moduler leurs propriétés.

Le quatrième chapitre a été consacré à l'évaluation de ces dérivés polyquinoléine. Dans un premier temps, l'affinité de ces ligands pour les ions métalliques Cu^{II} et Zn^{II} a été déterminée par spectroscopie UV-visible. Il est apparu que ces ligands polyquinoléine réalisent, dans la majorité des cas, des complexes de stœchiométrie métal/ligand de 1/1. Nous avons pu constater que leur affinité pour les ions métalliques étudiés est nettement améliorée par rapport aux équivalents monoquinoléine. Par ailleurs, les ligands bisquinoléine présentant un atome d'azote en position 8 sont, comme la 8-aminoquinoléine, sélectifs du Cu^{II} par rapport au Zn^{II} . Par la suite, nous avons détaillé les premières évaluations biologiques de ces ligands *in vitro*, en présence du peptide $\text{A}\beta_{42}$. Ces premiers tests ont révélé que certains composés inhibent la précipitation d' $\text{A}\beta$ induite par le Cu^{II} , le Zn^{II} ou le Fe^{III} . De façon importante, cette activité a été observée dès l'utilisation d'un équivalent de ligand par Cu^{II} . Il est apparu que cette activité est modulée par la structure des ligands testés. Nous avons également montré que ces ligands sont capables d'inhiber la production d' H_2O_2 due aux systèmes $\text{A}\beta\cdot\text{Cu}_n$ en présence de

réducteur. Enfin, des études complémentaires en vue d'une utilisation *in vivo* ont pu mettre en évidence que les ligands bisquinoléine possèdent un caractère hydrophobe favorable au passage de la barrière hémato-méningée, et sont dépourvus d'activité mutagène dans le cas de trois composés évalués par le test d'Ames.

Ces travaux nous ont conduits à nous intéresser aux mécanismes de production et de dégradation d' H_2O_2 par les systèmes $A\beta \cdot Cu_n$ en présence de réducteur. Cette étude fait l'objet du dernier chapitre. Il est apparu en particulier que les complexes $A\beta \cdot Cu_n$ produisent H_2O_2 , mais ne le dégradent pas de manière efficace. Les résultats obtenus nous ont amenés à proposer que la dégradation d' H_2O_2 , susceptible de conduire à la formation d' $OH^\bullet$ particulièrement toxique, pourrait être attribuée aux complexes de fer qui dégradent H_2O_2 de façon importante dans les conditions étudiées. Le protocole expérimental mis en place a également permis d'étudier le mode d'action des chélateurs vis-à-vis de la production d' H_2O_2 par les systèmes $A\beta \cdot Cu_n$. Cette étude laisse apparaître que le clioquinol et les autres dérivés monoquinoléine testés pourraient agir en formant des complexes ternaires avec le peptide et le cuivre.

En conclusion, l'ensemble de ces travaux a permis de montrer que la stratégie consistant à relier deux molécules chélatantes par un lien covalent est intéressante. En particulier, nous avons mis en évidence que les ligands bisquinoléine synthétisés ont une affinité accrue pour les ions métalliques impliqués dans la maladie d'Alzheimer, et sont actifs *in vitro* sur le peptide $A\beta$.

De nombreux travaux restent à faire pour approfondir cette étude.

Premièrement, les résultats préliminaires obtenus sur $A\beta$ devront être confirmés par d'autres tests (notamment dans le cas de l'inhibition de la formation des espèces oxygénées réactives) et complétés. Ainsi par exemple, l'étude de l'inhibition, sur culture neuronale, de la toxicité d' $A\beta$ pourra être menée sur les composés les plus intéressants. Si ces résultats sont positifs, l'étude, sur des souris transgéniques modèles de la maladie d'Alzheimer, des dérivés bisquinoléine les plus actifs est envisageable.

L'évaluation de l'hydrophobicité et du potentiel mutagène des ligands sont également des résultats préliminaires qu'il convient de compléter. Des tests de passage de

la barrière hémato-méningée devront être menés, de même que l'étude de la biodistribution et de la métabolisation des molécules les plus actives pour une éventuelle utilisation *in vivo*. D'autres tests de toxicité sont également nécessaires, par exemple sur culture neuronale mais surtout, *in vivo*, sur souris.

D'un point de vue mécanistique, il paraît nécessaire de poursuivre l'étude du mode d'action de ces ligands bisquinoléine sur les complexes métalliques d'A β . En particulier, l'analyse du mécanisme d'action de ces ligands lors de l'inhibition de la production d'H₂O₂ par les complexes A β -Cu_n, qui a été initiée au chapitre V, devra être poursuivie.

Il serait par ailleurs intéressant de réaliser d'autres modulations de structure sur les dérivés polyquinoléine, d'une part pour essayer d'améliorer l'activité biologique de ces ligands, mais également pour tenter de rationaliser cette activité à partir des structures des molécules testées.

La synthèse de ligands bisquinoléine cycliques pourrait également être envisagée, la cyclisation étant susceptible d'apporter des propriétés différentes à la molécule. Un exemple concerne les dérivés de Phen comportant un ou deux bras de jonction et qui ont montré des résultats antagonistes lors de l'étude de la solubilisation des plaques amyloïdes *in vivo* décrite au chapitre II.

Enfin, ces travaux pourraient trouver leur prolongement dans le cadre d'autres maladies neurodégénératives impliquant des ions métalliques, telles que la maladie de Parkinson ou les maladies liées au prion. Il pourrait être intéressant de tester les ligands polyquinoléine sur ces cibles, notamment dans le cas de la maladie de Parkinson pour laquelle des dérivés de 8-hydroxyquinoléine se sont déjà révélés actifs.