

Université de Montréal

**Synthèse et caractérisation physicochimique
de peptides de polyglutamines**

par

Martin Viau

Département de sciences biomédicales

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Sciences biomédicales

Juin 2011

© Martin Viau, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Synthèse et caractérisation physicochimique
de peptides de polyglutamines

présentée par :
Martin Viau

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Pierrette Gaudreau, présidente-rapporteure
Yvan Boulanger, directeur de recherche
Alain Fournier, codirecteur de recherche
James G. Omichinski, membre du jury
Normand Voyer, examinateur externe
Martin G. Sirois, représentant du doyen de la FES

Résumé

Neuf maladies neurodégénératives sont le produit de l'expression de gènes mutés, dans lesquels le codon CAG est répété au-delà d'un seuil pathologique. Ceci produit des protéines mutantes dans lesquelles sont insérés des segments de polyglutamines (polyGln), qui perdent leur activité et acquièrent une nouvelle fonction, ce qui est toxique pour le neurone. Ces altérations sont attribuables aux propriétés particulières de la polyGln. En effet, ces dernières possèdent la capacité de s'assembler pour former des corps d'inclusion intracellulaires. Cette propension à l'agrégation de la polyGln rend difficile l'étude de ces pathologies. C'est ainsi que l'utilisation de peptides peut s'avérer une approche avantageuse. Toutefois, la synthèse de polyGln est associée à de nombreuses délétions et nécessite l'ajout de groupements chargés afin de permettre leur purification. Cependant, ce prérequis donne lieu à des interactions électrostatiques qui biaisent la structure et la cinétique d'agrégation de ces peptides, en plus d'interférer avec l'évaluation d'éventuels agents thérapeutiques.

L'objectif du projet est de développer un système permettant l'étude de la polyGln en s'affranchissant des effets de charges. Pour ce faire, deux approches ont été explorées, la première utilise la polyGln non chargée et la seconde utilise une structure polyGln-morpholine ayant des charges labiles en fonction du pH. Ces peptides ont été produits en utilisant une approche linéaire de synthèse peptidique sur support solide avec protection maximale des chaînes latérales. La purification a été effectuée par chromatographie de haute performance en phase inverse en milieu acide. Ces stratégies ont permis de produire des peptides de polyGln de grande pureté avec des rendements acceptables. Une procédure de solubilisation des peptides alliant sonication et lyophilisation a été développée afin d'étudier chacun de ces peptides à l'aide de diverses techniques physicochimiques, telles que la diffusion de la lumière, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire, Raman et UV-visible, le dichroïsme circulaire et la microscopie optique polarisée.

La polyGln non chargée solubilisée dans le trifluoroéthanol-eau a montré que la taille des particules et la vitesse d'agrégation sont proportionnelles à la fraction volumique en eau. De plus, la structure secondaire en solution est à prédominance alpha et semble être peu sensible à la fraction d'eau jusqu'à un certain seuil (25%) après lequel la structure aléatoire prédomine. L'analyse des agrégats à l'état solide montre des structures hélicoïdales > aléatoires et ont les caractéristiques des fibrilles amyloïdes.

Le peptide de polyGln-morpholines a un pKa de 7,3 en milieu aqueux. Il demeure en solution lorsque le pH < pKa et à faible force ionique, alors qu'il s'autoassemble lorsque ces conditions ne sont pas respectées. Ceci suggère que la répulsion électrostatique est responsable de la stabilisation du peptide en solution. La dimension fractale nous indique que le peptide forme des agrégats compacts dont les constituants ont une taille de 2,5 nm, compatibles avec une conformation aléatoire compacte, en coude bêta ou hélicoïdale. Ceci est en accord avec l'étude structurale des peptides en solution qui a montré des espèces aléatoires > bêta > alpha. De plus, en RMN, l'élargissement des signaux du $^1\text{H}_\gamma$ en cours d'agrégation suggère une interaction via les chaînes latérales. Les analyses en phase solide ont plutôt montré une prédominance de structures bêta et alpha. L'inhibition de l'agrégation à pH 8 varie selon rouge de Congo > tréhalose, alors que le peptide liant la polyGln 1 et la thioflavine T ne semble pas avoir d'effet.

Ces approches ont donc permis pour la première fois de s'affranchir des effets de charges auparavant inhérents à l'étude de la polyGln en solution et par conséquent d'obtenir des informations inédites quant à la solubilité, la structure et la cinétique d'agrégation. Enfin, le dispositif à charges labiles permet d'évaluer l'efficacité d'éventuels agents thérapeutiques à pH quasi physiologique.

Mots-clés : Polyglutamine, peptide, synthèse sur phase solide, solubilisation, purification, agrégation, spectroscopie, microscopie, diffusion de la lumière, neurodégénération.

Abstract

Nine neurodegenerative diseases come from mutated genes expression in which the CAG codon is repeated above a pathological threshold. This is producing mutant proteins, in which are inserted polyglutamine (polyGln) segments, which lose their activity and acquire a new function that is toxic for the neuron. These alterations are related to the peculiar properties of the polyGln. Indeed, these polypeptides have the capacity of autoassemble to form intracellular inclusion bodies. This aggregation tendency of polyGln makes difficult the study of these pathologies. Thus, the use of peptides could constitute an advantageous approach. However, the synthesis of polyGln is associated with numerous deletions and necessitates the addition of charged moieties to achieve purification. Unfortunately, this requirement creates electrostatic interactions that modify the structure and aggregation kinetics of these peptides, in addition to interfering with the evaluation of potential therapeutical agents.

The aim of this project is to develop a system to study polyGln without the charge effects. To do so, two approaches were explored, the first used uncharged polyGln and the second used a polyGln-morpholine structure bearing pH-dependent labile charges. These peptides were produced by solid-support synthesis using a linear and maximal protection approach. Purification was performed by reverse phase high-performance liquid chromatography. These strategies allowed the production of peptides of high purity in good yields. A solubilization procedure combining sonication and lyophilization was developed to study each of these peptides by physicochemical techniques such as light scattering, magnetic resonance, Raman and UV-visible spectroscopies, circular dichroism and polarized optical microscopy.

The uncharged polyGln solubilized in trifluoroethanol-water showed that particle size and aggregation kinetics are proportional to volumetric water fraction. Furthermore, the secondary structure in solution is alpha-predominant and seems rather insensitive to

water fraction up to a threshold (25%) above which random coil structure predominates. The analysis of solid-state aggregates showed that helicoidal structures are more abundant than random structures and have the characteristics of amyloid fibrils.

The polyGln-morpholines peptide has a pKa of 7.3 in aqueous media. It is soluble when $\text{pH} < \text{pKa}$ and at low ionic strength, but it autoassociates when these conditions are not respected. This suggests that electrostatic repulsion is responsible for the stabilization of the peptide in solution. The fractal dimension indicates that the peptide forms compact aggregates whose constituents are 2.5 nm in size, in agreement with compact random coil, beta-hairpin or helicoidal structures. This is in agreement with the results of solution peptide structure studies showing that random coil $>$ beta $>$ alpha. Furthermore, the broadening of $^1\text{H}_\gamma$ NMR signals while the peptide is aggregating suggests an interaction between side-chains. Solid-phase studies showed predominant beta and alpha structures. The aggregation inhibition at pH 8.0 was higher for Congo red than for trehalose, while polyglutamine binding peptide 1 and thioflavine T did not seem to be effective.

These approaches permitted for the first time to overcome the charge effects that were previously inherent to polyGln solution studies and to obtain new information about solubility, structure and aggregation kinetics. Finally, the labile charge groups allow the evaluation of the efficiency of potential therapeutic agents at near physiological pH.

Keywords: Polyglutamine, peptide, solid-phase synthesis, solubilization, purification, aggregation, spectroscopy, microscopy, light scattering, neurodegeneration.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures.....	xiii
Liste des abréviations.....	xx
Chapitre I – Introduction.....	1
I.1. Maladies liées aux polyglutamines.....	1
I.1.1. Maladie de Huntington.....	1
I.1.2. Ataxies spinocérébelleuses (ASC).....	2
I.1.3. Atrophie dentato-rubro-pallido-luysienne (ADRPL).....	3
I.1.4. Atrophie musculaire spinale et bulbaire (AMSB).....	3
I.1.5. Similarités et divergences des maladies liées aux polyGln.....	5
I.2. Corps d’inclusions.....	5
I.3. Les protéines impliquées.....	7
I.4. Pathogénèse cellulaire : une multitude d’hypothèses.....	10
I.4.1. MH : six courants de pensée.....	10
I.4.2. Dysrégulation de la transcription.....	14
I.4.3. Les particularités de l’ASC6 et de l’AMSB.....	15
I.5. Études des polyGln : le problème se trouve dans la solution.....	16
I.5.1. Problématique de production des polyGln.....	16
I.5.2. Problématiques d’isolation et de purification.....	17
I.5.3. Biais associés au type d’espèce étudiée.....	17
I.6. Étude des peptides de polyGln.....	19
I.6.1. Peptides étudiés.....	19
I.6.2. Structures secondaires proposées.....	20
I.6.3. Organisation supramoléculaire des polyGln en cours d’agrégation.....	24
I.6.4. Cinétique d’agrégation des polyGln.....	26

I.6.5.	Lien entre la structure et la cinétique d'agrégation.....	27
I.7.	Approches thérapeutiques.....	28
I.7.1.	Rouge de Congo.....	30
I.7.2.	Le tréhalose.....	32
I.7.3.	Le peptide 1 liant la polyglutamine.....	32
I.7.4.	La thioflavine T.....	33
I.8.	Problématiques associées à l'étude des peptides de polyGln.....	33
I.9.	Objectifs du projet.....	34
I.10.	Approches utilisées.....	35
I.10.1.	Stratégies de synthèse et de protection.....	35
I.10.2.	Solubilisation des polyglutamines.....	36
I.10.3.	Caractérisation physicochimique des polyGln.....	39
Chapitre II –	Matériel et méthodes.....	64
II.1.	Synthèse du peptide de polyglutamine.....	64
II.1.1.	Réactifs et solvants.....	64
II.1.2.	Synthèse peptidique et clivages.....	65
II.1.3.	Synthèse peptidique linéaire.....	65
II.2.	Synthèse du peptide sensible au pH.....	67
II.2.1.	Synthèse peptidique sur support solide.....	67
II.2.2.	Synthèse peptidique en solution.....	68
II.3.	Purification des peptides.....	68
II.4.	Études des structures primaires.....	70
II.4.1.	Spectrométrie de masse.....	70
II.4.2.	Résonance magnétique.....	70
II.4.3.	Cinétique de formation de pyroglutamate.....	71
II.5.	Solubilisation des polyGln purifiées.....	71
II.5.1.	Solubilisation directe.....	71
II.5.2.	Solubilisation indirecte.....	72

II.6. Caractérisation physicochimique	72
II.6.1. Peptides étudiés.....	72
II.6.2. Mise en solution	72
II.6.3. Agrégation des polyglutamines.....	73
II.6.4. Étude d'inhibiteurs d'agrégation.....	77
Chapitre III – Résultats	79
III.1. Synthèse et purification de polyglutamines non chargées	79
III.1.1. Synthèse peptidique linéaire et convergente.....	79
III.1.2. Approches de protection minimale et maximale.....	79
III.2. Synthèse de polyGln non chargées	79
III.2.1. Synthèse peptidique linéaire	79
III.2.2. Synthèse peptidique convergente.....	82
III.2.3. Purification des polyglutamines.....	82
III.2.4. Formation de résidu pyroglutamyle	84
III.3. Synthèse de polyglutamines avec charges labiles.....	87
III.3.1. Stratégies de synthèse	87
III.4. Solubilisation	93
III.4.1. Solubilisation directe.....	93
III.4.2. Solubilisation directe suivie d'ajout de cosolvants.....	96
III.4.3. Solubilisation indirecte en milieu aqueux.....	98
III.4.4. Solubilisation indirecte en milieu organique.....	98
III.5. Étude physicochimique des polyglutamines	99
III.5.1. Polyglutamines non chargées.....	99
III.5.2. Polyglutamines sensibles au pH.....	113
III.5.3. Étude des inhibiteurs d'agrégation.....	125
Chapitre IV – Discussion	127
IV.1. Production du peptide non chargé.....	127
IV.1.1. Synthèse peptidique	127

IV.1.2.	Purification.....	128
IV.1.3.	Formation de pyroglutamyle.....	129
IV.2.	Production du peptide avec des charges labiles.....	130
IV.2.1.	Choix des unités sensibles au pH.....	130
IV.2.2.	Positionnement des unités sensibles au pH.....	130
IV.3.	Solubilisation de la polyGln.....	133
IV.3.1.	Méthodologie.....	133
IV.3.2.	Solubilisation directe.....	133
IV.3.3.	Solubilisation indirecte.....	137
IV.3.4.	Applications des solvants et adjuvants.....	138
IV.4.	La caractérisation.....	139
IV.4.1.	Techniques utilisées.....	139
IV.4.2.	PolyGln non chargées.....	142
IV.4.3.	PolyGln sensibles au pH.....	146
IV.4.4.	Comparaison des deux modèles.....	151
Chapitre V –	Conclusion.....	153
V.1.	Importance du sujet étudié.....	153
V.2.	Problématique dégagée.....	153
V.3.	Solution envisagée.....	153
V.3.1.	Méthodologie de recherche proposée.....	154
V.4.	Éléments ayant affecté le cours de la recherche.....	154
V.4.1.	Les approches méthodologiques.....	158
V.5.	Résolution de la problématique.....	158
V.5.1.	Biais associés.....	159
V.5.2.	Pistes de solutions.....	160
V.6.	Atteinte des objectifs.....	160
V.7.	Insertion des résultats dans le dogme actuel.....	161
V.8.	Originalité du travail.....	161

V.9. Application des résultats dans un contexte élargi	162
V.10. Approches expérimentales futures	163
Bibliographie.....	165
Annexe I – Caractérisation supplémentaire des dérivés de morpholine	194
Annexe II – Calcul de la surface et de l’ellipse de solubilité de Hansen.....	195
Annexe III – Paramétrisation du programme CONTIN utilisé en diffusion de la lumière	197

Liste des tableaux

Tableau I-1. Sommaire des différentes maladies liées aux polyglutamines	1
Tableau I-2. Espèces peptidiques étudiées.....	19
Tableau I-3. Types d'hélices proposés pour les polyGln.....	24
Tableau I-4. Structures de certains inhibiteurs d'agrégation des polyGln.....	29
Tableau I-5. Affinité de la thioflavine T pour la polyGln à pH physiologique	33
Tableau I-6. Tailles estimées des monomères de polyglutamines selon leur structure	48
Tableau I-7. Propriétés des noyaux importants en RMN des peptides	51
Tableau I-8. Dispersion des déplacements chimiques isotropes de Gln vs DSS selon la structure.....	57
Tableau III-1. Sommaire des différentes stratégies de SPSS et d'approches de protection	81
Tableau III-2. Conditions de couplage de AEM avec AcGlu ₂ Gln ₁₅ Glu ₂ NH ₂ (14) en solution	87
Tableau III-3. Assignation des déplacements chimiques de AcGln ₁₅ NH ₂ (11a) dans les solvants TFA-d et TFE-d ₃	105
Tableau III-4. Fractions (%) des composantes structurales de AcGln ₁₅ NH ₂ (11a) déterminées par spectroscopie Raman	111
Tableau III-5. Assignation des déplacements chimiques (δ) du ¹ H de Ac[Glu(AEM)] ₂ Gln ₁₅ [Glu(AEM)] ₂ NH ₂ (15) à trois valeurs de pH	116
Tableau III-6. Fractions (%) des composantes structurales de Ac[Glu(AEM)] ₂ Gln ₁₅ [Glu(AEM)] ₂ NH ₂ (15) déterminées par dichroïsme circulaire	121
Tableau III-7. Fractions (%) des composantes structurales de Ac[Glu(AEM)] ₂ Gln ₁₅ [Glu(AEM)] ₂ NH ₂ (15) déterminées par spectroscopie Raman	124

Liste des figures

- Figure I-1. Images de résonance magnétique. **A** et **B**, anatomie descriptive chez un sujet contrôle de 22 ans sans atrophie; 1, hémisphères cérébraux; 2, diencéphale; 3, mésencéphale; 4, protubérance; 5, cervelet; 6, bulbe médullaire; 7, moelle épinière et 8, striatum; **C**, patient de 37 ans atteint d'ASC2 avec une atrophie sévère de la protubérance et du cervelet; **D**, patient de 48 ans atteint d'ASC6 présentant une importante atrophie du cervelet (Viau et Boulanger 2004; Viau *et al.* 2005)..... 4
- Figure I-2. Agrégats de protéines retrouvés dans certaines amyloïdoses du SNC. **A**, Plaque sénile constituée de protéines amyloïdes- β dans le néocortex d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer; **B**, Corps de Lewy renfermant de l' α -synucléine retrouvée dans la substance noire d'un parkinsonien; **C**, protéine prion retrouvée dans le cervelet d'un patient atteint de la maladie de Creutzfeld-Jacob et **D**, corps d'inclusion intranucléaire formé de polyGln retrouvé dans le néocortex d'un patient atteint de la maladie de Huntington (Forman *et al.* 2004). 7
- Figure I-3. Comparaison des séquences d'a.a. retrouvées dans les protéines associées aux maladies des polyGln. Le nombre de répétitions des Gln est celui retrouvé dans les protéines sauvages..... 8
- Figure I-4. Pathogénèse de la maladie de Huntington à l'intérieur d'un neurone. La huntingtine est normalement contenue dans le cytoplasme. **A**, lorsque la protéine a un segment de polyGln de longueur pathologique (rouge), il pourrait se produire **B**, un changement de conformation résultant d'un repliement anormal qui peut être corrigé par les chaperons moléculaires ou **C**, conduire à un clivage protéolytique créant des monomères solubles ou **D**, une dégradation complète. Les monomères solubles peuvent former **E**, des oligomères intranucléaires ou **F**, intracytoplasmiques ou **I**, interagir avec les mitochondries. Les oligomères intranucléaires peuvent former **G**, des inclusions et **H**, interagir avec la transcription génique, alors que les oligomères intracytoplasmiques peuvent être ubiquitinés et acheminés au protéasome pour leur

dégradation entraînant J , une activation des capsases, formant K , des CI, entraînant L , un dysfonctionnement du transport vésiculaire ou M , de l'homéostasie du Ca au niveau du RE.....	13
Figure I-5. Représentation partielle des ponts H dans les structures de polyGln proposées par Perutz. A , parallèles et B , antiparallèles.	21
Figure I-6. Différentes structures secondaires proposées pour les polyglutamines. A , aléatoire; B , coude β ; C , brin β ; D , hélice (α , PPII, 3-10, μ ou π); E , hélices β parallèle ou antiparallèle.	23
Figure I-7. Organisations supramoléculaires proposées. A , association de coudes β ; B , association de brins β ; C , hélices α associées en superhélice; D , hélice β	25
Figure I-8. Modèle proposé pour l'agrégation des polyGln. A , structure aléatoire; B , brin ou coude β ; C , association des brins ou des coudes β pour former une protofibrille; D , assemblage de deux protofibrilles pour former une fibrille mature.....	27
Figure I-9. Représentation de la pseudomicelle de RC. A , avec des paramètres de translation (T) et de rotation (R) dans un référentiel cartésien tel que $(T_x, R_z, T_z) = (0, -13^\circ, 4 \text{ \AA})$; B , attribution des axes aux groupements phényles séparés par le seul degré de liberté de rotation.....	31
Figure I-10. Structure des peptides de polyGln étudiés. A , peptide neutre $\text{AcGln}_{15}\text{NH}_2$ (11a); B , peptide porteur de charges labiles $\text{Ac}[\text{Glu}(\text{AEM})]_2\text{Gln}_{15}[\text{Glu}(\text{AEM})]_2\text{NH}_2$ (15); C , variation des charges des unités morpholines de B en fonction du pH.	34
Figure I-11. Série de Hoffmeister étendue aux substances organiques.	38
Figure I-12. A , Distribution d'intensité du champ diffusé autour de la fréquence incidente (ν_0) pour un système de particules de taille identique. B , Transformation de Fourier de A	41
Figure I-13. A , Représentation des variations temporelles de l'intensité diffusée par un système de particules de taille identique. B , Représentation des fonctions d'autocorrélation d'intensité diffusée variant avec la taille du diffuseur.....	42

- Figure I-14. Noyau en précession à la fréquence de Larmor dans le champ magnétique principal \vec{B}_0 51
- Figure I-15. Vecteur de magnétisation macroscopique. Le vecteur de magnétisation macroscopique \vec{M}_0 est la somme des composantes vectorielles de chacun des noyaux composant le système. La somme des composantes transversales, \vec{M}_x et \vec{M}_y , respectivement, dans le plan X, Y est annulée. Il ne reste que la composante selon l'axe Z, \vec{M}_z qui est parallèle au champ magnétique principal \vec{B}_0 52
- Figure I-16. **A**, Représentation de la variation des temps de relaxation T_1 et T_2 en fonction du temps de corrélation; **B**, Effets sur l'aire et la largeur des signaux à mi-hauteur ($\Delta\nu_{1/2}$). 55
- Figure I-17. **A**, avant chaque impulsion, le vecteur de magnétisation macroscopique est aligné avec le champ magnétique principal dans la direction longitudinale (+Z). **B**, l'impulsion de $\pi/2$ transforme toute la magnétisation longitudinale en magnétisation transverse. **C**, étalement des fréquences dans le plan transverse causé par le processus de relaxation T_2 55
- Figure I-18. Représentation des courbes associées aux différentes structures secondaires obtenues en dichroïsme circulaire. **A**. Spectres de référence de Brahms & Brahms (Brahms et Brahms 1980) en ellipticité molaire (θ_M). **B**. Spectres de référence amycomp.dat en facteur g (McPhie 2004). 62
- Figure III-1. SPSS de la polyGln utilisant la stratégie **A**, linéaire et **B**, convergente. L est l'espaceur résine-polystyrène. R₁ et R₂ sont les groupements protecteurs en N-terminal et des chaînes latérales fonctionnalisées. R₃ est la fonction en C-terminal. 81
- Figure III-2. Spectres SM-MALDI/TOF (gauche) et chromatogrammes analytiques HPLC (droite) de la polyGln post-HF produite par SPSSL. **A-B**, FmocGln₁₀OH produit par l'approche de protection minimale; **C-D**, HGln₂₀NH₂ produit par l'approche de protection maximale. 83

Figure III-3. A , spectre SM-MALDI/TOF de AcGln ₂₅ NH ₂ (11a); B , chromatogramme analytique HPLC (215 nm) avant et après purification.	84
Figure III-4. Spectre SM-MALDI/TOF de A , HGln ₁₅ NH ₂ (11a) et B , pGluGln ₁₅ NH ₂	85
Figure III-5. Chromatogrammes analytiques HPLC (215 nm) montrant la cyclisation de Gln en pGlu. A , HGln ₁₅ NH ₂ (11a); B , après 2,5 h et C , après 24 h en solution aqueuse (pH 2,5).	85
Figure III-6. A , cinétique de pseudo-premier ordre de la formation du groupe pyroglutamyle à partir de la glutamine <i>N</i> -terminale en solution aqueuse (pH 2,5) et B , variance des résidus suivant chacune des régressions. [HGln ₁₅ NH ₂] ₀ et [HGln ₁₅ NH ₂] _{<i>t</i>} sont la concentration de HGln ₁₅ NH ₂ (11a) au temps <i>t</i> = 0 et <i>t</i> , respectivement.	86
Figure III-7. Couplage en solution des unités AEM sur le peptide 14 produit en phase solide.	87
Figure III-8. Synthèse en solution du résidu FmocGlu(AEM)OH (18a).	88
Figure III-9. Spectre SM-MALDI/TOF de la fraction soluble dans l'ACN du polymère de dibenzofulvyle, obtenu avec la matrice acide 2,5-dihydroxybenzoïque.	89
Figure III-10. Approches utilisées en SPSS pour synthétiser le peptide de glutamine sensible au pH Ac[Glu(AEM)] ₂ Gln ₁₅ [Glu(AEM)] ₂ NH ₂ (15). A , formation du dimère (18b) utilisé dans l'approche convergente (B). C , approche linéaire.	90
Figure III-11. FmocGln[Glu(AEM)] ₂ NH ₂ (17') brut (haut) et des produits isolés. A , chromatogrammes analytiques HPLC et B , spectres SM-MALDI/TOF.	91
Figure III-12. Spectres RMN du ¹ H des produits de masses M – 170, M – 85 et M Daltons (du haut vers le bas) résultant de la synthèse du FmocGln[Glu(AEM)] ₂ NH ₂ (17'). ...	92
Figure III-13. Structure des dérivés du segment FmocGln[Glu(AEM)] ₂ NH ₂ (17') porteur de délétions.	93
Figure III-14. Solubilité directe de AcGln ₁₅ NH ₂ (11a) à 1,0 mg/mL. ▲, insoluble; ▽, solubilité partielle; ○, soluble. A , paramètres de Catalan; B , décomposition du paramètre SPP en SP (polarisabilité) et en SdP (dipolarité).	95

- Figure III-15. Solubilité directe de AcGln₁₅NH₂ (**11a**) à 1,0 mg/mL. ▲, insoluble; ▽, soluble partiellement; ○, soluble. **A**, paramètres de Gutmann; **B**, Différence AN-DN avec ○ et ▽ identifiés..... 95
- Figure III-16. Solubilité directe de AcGln₁₅NH₂ (**11a**) à 1,0 mg/mL dans différents solvants selon les types d'interactions décrites par le modèle de Hansen. **A**, représentation 3D ($\delta_D, \delta_P, \delta_H$); **B**, 2D (δ_D, δ_P); **C**, 2D (δ_D, δ_H); **D**, 2D (δ_D, δ_H); **E**, enveloppe convexe et **F**, ellipse de solubilité de Hansen..... 98
- Figure III-17. Exemple représentatif des distributions de tailles pondérées en intensité, déterminées par différents algorithmes. 100
- Figure III-18 Distributions des tailles obtenues en diffusion de la lumière, pondérées en volume, de AcGln₁₅NH₂ (**11a**) (1,0 mg) dans le TFE (1,0 mL) après un traitement dans divers volumes de TFA. **A**, 0,5 mL, R_H moyen = 74 ± 4 nm; **B**, 1,0 mL, R_H moyen = $1,1 \pm 0,2$ nm et **C**, 1,5 mL de TFA, R_H moyen = 72 ± 12 nm. 102
- Figure III-19. Titration aqueuse d'une solution de AcGln₁₅NH₂ (**11a**) (1 mg/mL) dans le TFE. **A**, variation du rayon moyen-Z inverse et **B**, distribution des tailles pondérées en intensité selon la méthode des gradients ($\Lambda = 0,01$). 103
- Figure III-20. Cinétique d'agrégation d'une solution de AcGln₁₅NH₂ (**11a**) (1 mg/mL) dans le TFE après l'ajout de diverses quantités d'eau..... 104
- Figure III-21. Spectres RMN ¹H de AcGln₁₅NH₂ (**11a**) à divers % H₂O/TFE (v/v). **A**, 0 %; **B**, 15% et **C**, 25%..... 106
- Figure III-22. Titration aqueuse de AcGln₁₅NH₂ (**11a**) corrigé pour la dilution avec le ¹H résiduel du TFE-d₃. ■, ¹H _{$\beta+\gamma$} (2,45-2,95); ●, ¹H _{α} ($\delta = 4,36$ ppm); ○, ¹H _{α} ($\delta = 3,80$ ppm). 107
- Figure III-23. Titration aqueuse de AcGln₁₅NH₂ (**11a**) dans le TFE. **A**, représentation de l'ellipticité molaire (θ_M) variant de 0 à 90 % H₂O/TFE (v/v) représenté par la flèche. **B**, déconvolution avec CDSstr (RMSD moy. = 0,138). 108
- Figure III-24. Spectres RMN du ¹H en phase solide de AcGln₁₅NH₂ (**11a**) agrégé dans 50% TFE/H₂O (v/v). **A**, rotation à l'angle magique (30 kHz); **B**, CRAMPS (2 kHz). 109

Figure III-25. A , spectre CP-MAS du ^{13}C de AcGln $_{15}$ NH $_2$ (11a) agrégé dans 50% TFE/H $_2$ O (v/v) et B , expansion du signal du $^{13}\text{C}_\alpha$	110
Figure III-26. Décomposition en profils voightiens de la bande amide I de AcGln $_{15}$ NH $_2$ (11a). A , après purification et B , post-agrégation dans 50% TFE/H $_2$ O (v/v).....	111
Figure III-27. Déplacement de l'absorption UV-Vis du rouge de Congo (RC) avec AcGln $_{15}$ NH $_2$ (11a). A , différences spectrales et B , agrégation de AcGln $_{15}$ NH $_2$ dans le TFE à divers temps caractérisée par l'absorption à 540 nm du complexe AcGln $_{15}$ NH $_2$ -RC.....	112
Figure III-28. Microscopie optique polarisée montrant la biréfringence de couleur verte du rouge de Congo associée aux fibrilles de AcGln $_{15}$ NH $_2$ (11a) formées dans un mélange TFE-eau.....	113
Figure III-29. Cinétiques d'agrégation de Ac[Glu(AEM)] $_2$ Gln $_{15}$ [Glu(AEM)] $_2$ NH $_2$ (15) en fonction du pH. A , cinétiques et B , titrage évaluant le pKa à 7,3 pour les unités morpholine.....	114
Figure III-30. Cinétiques d'agrégation de Ac[Glu(AEM)] $_2$ Gln $_{15}$ [Glu(AEM)] $_2$ NH $_2$ (15). A , tracé log-log à divers pH et la dimension fractale (D_f) déterminée par régression linéaire et B , cinétiques d'agrégation à différentes forces ioniques (μ).....	115
Figure III-31. Spectres RMN du ^1H de Ac[Glu(AEM)] $_2$ Gln $_{15}$ [Glu(AEM)] $_2$ NH $_2$ (15) dans 90% H $_2$ O/D $_2$ O avec présaturation de l'eau enregistrés après ajustement du pH. A , pH 4,0; B , pH 6,0 et C , pH 8,0.....	117
Figure III-32. Cinétique d'agrégation de Ac[Glu(AEM)] $_2$ Gln $_{15}$ [Glu(AEM)] $_2$ NH $_2$ (15) selon A , la largeur de raie et B , l'aire sous le pic en RMN du ^1H . \circ , $^1\text{H}_\alpha$; \bullet , $^1\text{H}_\gamma$	118
Figure III-33. Spectres RMN du ^1H de Ac[Glu(AEM)] $_2$ Gln $_{15}$ [Glu(AEM)] $_2$ NH $_2$ (15) dans 90% H $_2$ O/D $_2$ O avec présaturation de l'eau. A , temps = 0 et B , temps = 12 h.....	119
Figure III-34. Élargissement et affaïssement du signal de RMN du ^1H associé au DSS en présence de Ac[Glu(AEM)] $_2$ Gln $_{15}$ [Glu(AEM)] $_2$ NH $_2$ (15) à divers pH et temps. A , pH 4,0 et $t = 0$; B , pH 8,0 et $t = 20$ min; C , pH 8,0 et $t = 12$ h.....	120

Figure III-35. A , spectre CP-MAS du ^{13}C de $\text{Ac}[\text{Glu}(\text{AEM})]_2\text{Gln}_{15}[\text{Glu}(\text{AEM})]_2\text{NH}_2$ (15) agrégé à pH 8,0 et B , expansion de signal du $^{13}\text{C}_\alpha$	122
Figure III-36. Décomposition en profils voightiens de la bande amide I de $\text{Ac}[\text{Glu}(\text{AEM})]_2\text{Gln}_{15}[\text{Glu}(\text{AEM})]_2\text{NH}_2$ (15) en spectroscopie Raman. A , à pH 4,0 et B , à pH 8,0.	123
Figure III-37. $\text{Ac}[\text{Glu}(\text{AEM})]_2\text{Gln}_{15}[\text{Glu}(\text{AEM})]_2\text{NH}_2$ (15) post-agrégation à pH 8,0 observé par microscopie optique en immersion dans l'eau. A , champ clair; B , polarisation croisée et C , avec plaque de retardement d'onde ($\lambda/4$).	125
Figure III-38. A-B. Cinétiques d'agrégation de $\text{Ac}[\text{Glu}(\text{AEM})]_2\text{Gln}_{15}[\text{Glu}(\text{AEM})]_2\text{NH}_2$ (15) (35 mM) à pH 8,0 suivies par diffusion dynamique de la lumière.	126
Figure V-1. Structure de différentes molécules sensibles au pH. A , AEM; B , (2-aminoéthyl)bis(2-hydroxyéthyl)amine et C , 2-[(2-aminoéthyl)amino]-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol.	160
Figure V-2. Organisation structurale de la polyGln agrégée avec indication de la position des noyaux marqués (ronds noirs et blancs) des glutamines terminales pour la structure des coudes β A , avant et B , après dilution isotopique et pour la structure en feuillets β , C , parallèles, D , antiparallèles et E , après dilution isotopique.	164

Liste des abréviations

<i>A</i>	absorption
a.a.	acide aminé
Ac	acétyle
ACN	acétonitrile
AcOH	acide acétique
ACTH	hormone adrénocorticotrope
ADRPL	atrophie dentato-rubro-pallido-luysienne
AMSB	atrophie musculaire spinale et bulbaire
AEM	2-aminoéthyl-4-morpholine
Ala	L-alanine
AN	accepteur d'électrons
<i>AR</i>	gène du récepteur d'androgène
Arg	L-arginine
ARN	acide ribonucléique
ASC	ataxie spinocérébelleuse
Asn	L-asparagine
Asp	acide L-aspartique
ATN1	atrophine 1
ATXN	protéine ataxine
<i>B</i>	biréfringence
\vec{B}_0	champ magnétique principal
\vec{B}_1	composante magnétique de l'impulsion électromagnétique provenant de l'antenne
BBO	sonde d'observation à bande large

BDNF	facteur neurothrophique dérivé du cerveau (<i>brain-derived neurothrophic factor</i>)
\vec{B}_{eff}	champ magnétique effectif
Boc	<i>t</i> -butyloxycarbonyle
BOP	hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris(diméthylamino)-phosphonium
c	concentration (mol/L)
CAG	cytosine-adénosine-guanine
CMC	concentration micellaire critique
CDCl ₃	deutérochloroforme
CDsstr	méthode de sélection variable et d'association par décomposition en valeurs singulières
CI	corps d'inclusions
CI ₅₀	concentration inhibitrice de 50% de l'agrégation
ClTrt-Cl	chlorure de 2-chlorotrityle
CoF ₃	trifluorure de cobalt (III)
CONTIN	inversion d'équations linéaires par régularisation avec contraintes
CONTINLL	CONTIN avec linéarisation locale
COSY	spectroscopie de corrélation simple
CP	polarisation croisée (<i>cross polarization</i>)
CRAMPS	spectroscopie à impulsions multiples et à rotation combinée
Cys	L-cystéine
δ	déplacement chimique (ppm)
δ	paramètre de solubilité de Hildebrand (cal/cm ³) ^{1/2}
Δ	différence
d	deutérium
D	dimension
Da	masse d'un proton (1,66 x 10 ⁻²⁷ kg)

DBF	dibenzofulvyle
DC	dichroïsme circulaire
DCC	<i>N,N</i> -dicyclohexylcarbodiimide
DCM	dichlorométhane
DCU	dicyclohexylurée
DEPT135	augmentation sans distorsion par transfert de polarisation (<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>) utilisant un angle d'impulsion de 135°
D_f	dimension fractale
DHT	dihydroxytestostérone
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DLCA	agrégation limitée par la diffusion
DMA	<i>N,N</i> -diméthylamine
DMAP	(<i>N,N</i> -diméthylamino)pyridine
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DN	donneur d'électrons
DSS	acide 2-diméthyl-2-silapentane-5-sulfonique
DTS	logiciel de la technologie de dispersion (<i>dispersion technology software</i>)
ϵ	coefficient d'absorption molaire (L/mol·cm)
e	électron ($1,602 \times 10^{-19}$ coulombs)
E	énergie
ESI	ionisation par jet d'électrons (<i>electron spray ionisation</i>)
Et ₂ O	diéthyléther
EtOH	éthanol
FID	signal de précession libre (<i>free induction decay</i>)
Fmoc	fluorénylméthoxy-carbonyle
γ	rapport gyromagnétique
g	gramme

g	facteur d'asymétrie ou d'anisotropie
Glu	acide L-glutamique
Gln	L-glutamine
Gly	L-glycine
GST	glutathione- <i>S</i> -transférase
η	viscosité (centipoise ou 10^{-3} Pa·s)
h	constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ joule·seconde)
\hbar	$h/2\pi$
H	enthalpie
HEAT	séquence commune à la <u>HTT</u> , au facteur d'élongation 3 (<u>EF3</u>), à la protéine phosphatase 2 <u>A</u> et à la phosphatidylinositol kinase 3 de la levure (<u>IOR</u>)
HETCOR	corrélacion hétéronucléaire
HF	acide fluorhydrique
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
His	L-histidine
HMBC	corrélacion hétéronucléaire à zéro et double quantum
HMQC	corrélacion hétéronucléaire à quanta multiples
HOBt	<i>N</i> -hydroxybenzotriazole
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
Hsp	protéines de choc thermique (<i>Heat shock proteins</i>)
Hsp3D	programme <i>Hansen solvent parameter 3D</i> implémenté sur MATLAB
<i>HTT</i>	gène codant pour la protéine huntingtine
HTT	protéine huntingtine chez l'Homo sapiens
Htt	protéine huntingtine d'une espèce autre que l'Homo sapiens ou indéterminée
i	nombre entier
I	intensité
\vec{l}	nombre quantique intrinsèque du moment angulaire
Ile	L-isoleucine

IP ₃	inositol 1,4,5-triphosphate
IR	infrarouge
J	constante de couplage (Hz)
k	kilo
K_a	constante de dissociation acide
K_B	constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23}$ joules/kelvin)
K_d	constante de dissociation
λ	longueur d'onde (nm)
λ_0	longueur d'onde incidente (nm)
Λ	paramètre de régularisation
l	longueur du trajet optique
L	litre
Leu	L-leucine
Lys	L-lysine
μ	force ionique
$\vec{\mu}$	vecteur du moment gyromagnétique
m	nombre quantique magnétique ($2I + 1$)
m	masse
\vec{M}_0	vecteur de magnétisation macroscopique
MAS	rotation à l'angle magique (<i>magic angle spinning</i>)
MALDI	désorption-ionisation au laser assisté par matrice (<i>matrix-assisted laser desorption-ionization</i>)
MBHA	hydrochlorure de 4-méthylbenzhydramine
min	minutes
Mb	myoglobine
MEM	méthode d'entropie maximale
MES	acide 2-(<i>N</i> -morpholino) éthanesulfonique
Met	L-méthionine

MH	maladie de Huntington
MOPS	acide 3-(<i>N</i> -morpholino) propanesulfonique
mu	mutante
$\vec{M}_X, \vec{M}_Y, \vec{M}_Z$	projection de \vec{M}_0 sur les axes X, Y, Z
ν	fréquence (Hz)
ν_L	fréquence de Larmor (Hz)
$\bar{\nu}$	nombre d'onde (cm^{-1})
n	nombre entier
N_α	nombre de spins dans le niveau α
N_β	nombre de spins dans le niveau β
n_D^{20}	indice de réfraction du dispersant à 293,15 K (20°C)
NMDA	<i>N</i> -méthyl-D-aspartate
NMF	<i>N</i> -méthylformamide
NMP	<i>N</i> -méthylpyrrolidone ou 1-méthyl-2-pyrrolidinone
NOESY	spectroscopie à effet Overhauser
OPfp	ester de pentafluorophényle
NR	nombre de répétitions
p	bras court d'un chromosome
\vec{P}	moment angulaire du noyau
PBS	tampon phosphate salin
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PDI	index de polydispersion (<i>polydispersity index</i>)
PEG	polyéthylène glycol ou $\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{OH}$
pGlu	pyroglutamate
pH	activité de l'ion H^+ sur une échelle logarithmique
PhCN	cyanobenzène
Phe	L-phénylalanine

PhF	fluorobenzène
PhNH ₂	aniline
PhNO ₂	nitrobenzène
PhOH	phénol
PhOMe	anisole
pI	point isoélectrique
<i>pK_a</i>	constante de dissociation acide sur une échelle logarithmique
P.M.	poids moléculaire
polyGln	polyglutamine
PPII	poly-L-proline type II
ppm	parties par million
Pro	L-proline
PTFE	polytétrafluoroéthylène
pyBOP	hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris(pyrrolidino)-phosphonium
q	bras long d'un chromosome
Q	charge électrique (coulombs)
QBP1	peptide 1 liant la polyglutamine (<i>polyglutamine binding peptide 1</i>)
QNP	sonde à quatre noyaux (<i>quattro nucleus probe</i>)
r	rayon
R6/2	modèle murin de la maladie de Huntington qui exprime 145-190 CAG
<i>R_a</i>	rayon de la sphère de solubilité de Hansen
RA	récepteur à l'androgène
RC	rouge de Congo
RE	réticulum endoplasmique
Rink AM	résine 4-(2',4'-diméthoxyphényl-Fmoc-aminométhyle)-phénoxyacétamido-norleucylaminométhyle
RLCA	agrégation limitée par la réaction

$R_{H,1/Z}$	rayon hydrodynamique moyen-Z inverse (nm)
RMN	résonance magnétique nucléaire
RMSD	racine carrée de la fluctuation
σ	constante de blindage
Σ	somme
S	entropie
SA	acidité du solvant
SB	basicité du solvant
SCFA	acétate de cellulose exempte de surfactants
SELCON3	méthode auto-cohérente (<i>self-consistent method</i>)
Ser	L-sérine
Si	silicium
SdP	dipolarité du solvant
SM	spectroscopie de masse
SNC	système nerveux central
SPP	polarité/polarisabilité du solvant
SPSS(L/C)	synthèse peptidique sur support solide (linéaire/convergente)
θ_d	angle de détection de la lumière diffusée
θ_M	ellipticité molaire (degrés·L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)
θ_P	angle d'impulsion
t	temps
T	température (Kelvin)
T	Tesla, unité d'induction magnétique (10 ⁴ Gauss)
T_1	temps de relaxation spin-réseau ou longitudinal
T_2	temps de relaxation spin-spin ou transversal
TBP	protéine liant la boîte-TATA
τ_C	temps de corrélation
TFA	acide trifluoroacétique

TFE	trifluoroéthanol
ThT	thioflavine T
TMS	tétraméthylsilane
TOCSY	spectroscopie de corrélation totale
TOF	temps de vol (<i>time-of-flight</i>)
τ_P	durée de l'impulsion électromagnétique
T_R	terme de régularisation
TR	temps de rétention (min)
Trp	L-tryptophane
Trt	trityle
Tyr	L-tyrosine
UV	ultraviolet
v	volume
wt	sauvage (<i>wild type</i>)

*À Mathilde, aux patients ataxiques côtoyés et
à ceux qui ont cru en ce projet, impliquant un
«peptide aussi soluble qu'une roche dans le
fleuve St-Laurent»**

** Citation : A. Fournier*

Remerciements

Yvan Boulanger, qui m'a soutenu dans la poursuite de recherches, avec une approche plus fondamentale, sur les maladies neurodégénératives, pour sa rigueur, ses judicieux conseils et son support dévoué.

Alain Founier, pour m'avoir permis d'entreprendre des études sur les peptides au sein de son laboratoire, son ouverture d'esprit, son expertise et son implication dans le projet.

Michel Lafleur, pour l'accès à ses laboratoires et à plusieurs appareils.

Jean-Christophe Leroux, pour l'accès à l'appareil de diffusion de la lumière.

Robert Emery Prud'Homme, pour l'accès au microscope optique polarisé et à Damien Maillard, pour la formation.

Myriam Létourneau, pour son expertise et sa générosité ainsi qu'aux autres membres du laboratoire David Chatenet, Steve Bourgeault, Kathy Turcotte, Duc N. Doan et Jacinthe Aubin pour ce qui serait trop long à énumérer.

Ariane Sirois-Deslongchamps, Artavazd Tadevosyan et Luta Luse Basambombo, étudiants d'été, ayant participé à la synthèse des polyglutamines.

Pascale Legault et Minh Tan Phan Viet pour des discussions très utiles sur les applications de la RMN dans mon projet. Sylvie Bilodeau, pour la formation en RMN en phase liquide et Cédric Malveau, pour l'aide avec les analyses de RMN en phase solide.

Samir Élouatik, pour la formation en spectroscopie Raman.

Abdesslem Khiat, pour la formation en modélisation moléculaire.

Thomas F. Turner, pour le programme Hsp3D-MATLAB.

John B. Applequist, pour les spectres de référence de Brahms & Brahms et Peter McPhie, pour les spectres de référence en facteur g utilisés en dichroïsme circulaire.

Ma famille, en particulier mon épouse, Marie, mon petit rayon de soleil, Mathilde, mon frère, Mathieu et sa copine, Chantal, mes parents, Monique et André, mes beaux-parents, Francine et Jean.

Mes amis, plus particulièrement Marjolaine Arsenault et Marie-Danielle Dionne, pour leur support indéfectible.

Aux directeurs successifs du programme M.D./Ph.D., Laurent Descarries, Yves Berthiaume et André Ferron, pour leur appui, ouverture d'esprit et pour leurs conseils.

Le soutien financier offert par le biais du programme de stagiaire de recherche des programmes M.D./Ph.D. des Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) et au programme de bourses d'excellence de la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal.

Chapitre I – Introduction

I.1. Maladies liées aux polyglutamines

Ces maladies neurodégénératives partagent une étiologie génétique commune, soit un nombre de répétitions (NR) anormalement élevé du codon cytosine-adénosine-guanine (CAG) (Tableau I-1). Ces trinuécléotides codent pour l'acide aminé (a.a.) glutamine (Gln). L'expression de ces gènes pathologiques dans le système nerveux central (SNC) est associée aux maladies de Huntington (MH), à certaines ataxies spinocérébelleuses (ASC), à l'atrophie dentato-rubro-pallido-luysienne (ADRPL) et à l'atrophie musculaire spinale et bulbaire (AMSB).

Tableau I-1. Sommaire des différentes maladies liées aux polyglutamines

Maladies	Nom du gène	Localisation	Nombre de répétitions de CAG	
			Normales (wt) ¹	Pathologiques (mu) ²
MH	<i>HTT</i>	4p16.3	6–35	36–121
ASC 1	<i>ATXN1</i>	6p23	6–44	39–82
ASC 2	<i>ATXN2</i>	12q24.1	15–31	36–63
ASC 3	<i>ATXN3</i>	14q32.1	12–40	55–84
ASC 6	<i>CACNA1A</i>	19p13	4–18	21–33
ASC 7	<i>ATXN7</i>	3p12–13	4–35	37–306
ASC 17	<i>TBP</i>	6q27	25–42	45–63
ADRPL	<i>DRPLA</i>	12p13.31	6–35	49–88
AMSB	<i>AR</i>	Xq13–21	9–36	38–62

I.1.1. Maladie de Huntington

La MH, dont la prévalence est actuellement estimée à 4-7/100000 personnes (Walker 2007), a été décrite pour la première fois par George Huntington en 1872 chez des habitants de Long Island (Bates *et al.* 2002). Cette description était d'une précision remarquable et prévaut encore à ce jour. Il s'agit d'une maladie à transmission autosomale dominante, mais chez 3-5% des cas elle apparaît de novo par expansion d'un allèle. Elle se

¹ wt, sauvage (*wild type*)

² mu, mutante

manifeste à l'âge adulte (30-40 ans), l'apparition est graduelle, le cours est progressif et est éventuellement fatal après 15-20 ans. Elle est accompagnée de symptômes psychiatriques (dépersonnalisation, psychose, apathie, comportements obsessionnels-compulsifs, dépressions et suicides), de démence (non reconnaissance des symptômes, atteinte du jugement, perte des capacités du raisonnement, troubles mnésiques, perte de flexibilité) et de symptômes physiques (diminution de la coordination, rigidité musculaire, mouvements choréiques, évoluant vers l'incapacité à marcher, une dysphagie et une dysarthrie) (Goetz 2007). Cette symptomatologie a été associée à l'atrophie du noyau caudé, du putamen (striatum) (Figure I-1B) et du cortex (Zuccato *et al.* 2010). Ces altérations morphologiques sont le reflet d'une importante mort neuronale, surtout GABAergique, liée à l'expression génique dans le système nerveux central (SNC), particulièrement au niveau du striatum. Nommé *HTT*, le gène a été isolé en 1993, par le *Huntington's Disease Collaborative Research Group* constitué de six groupes de recherche répartis aux États-Unis et en Grande-Bretagne (Bates *et al.* 2002). Lorsque le NR de CAG est supérieur à 36 le gène devient pathologique ou mutant et lorsque le NR de CAG est supérieur à 40, sa pénétrance est de 100% (Falush *et al.* 2001).

I.1.2. Ataxies spinocérébelleuses (ASC)

La nomenclature «ASC» est utilisée car elle réfère à une classification génotypique, plus utile dans le contexte de cet ouvrage, que les classifications phénotypiques telles que atrophie cérébelleuse autosomale dominante (ADCA) de types I-IV ou atrophie olivopontocérébelleuse (AOPC) de types I-V (Harding 1993; Viau et Boulanger 2004). Comme pour la MH, les ASC de type 1, 2, 3, 6, 7 et 17 sont transmises de façon autosomale dominante. La prévalence est estimée à 4,42 par 100000 personnes (Hirayama *et al.* 1994). Ces maladies apparaissent à l'âge adulte, autour de 30 ans, et sont progressives. La symptomatologie est caractérisée par des troubles de la coordination et de l'amplitude des mouvements, menant à des troubles de la marche, de la déglutition et une dysarthrie. Les patients se retrouvent en chaise roulante environ 13 années après le début de

la maladie, alors que le décès se produit dans les 5-7 années suivantes (Goetz 2007). Il existe une grande variabilité phénotypique intra et inter-ASC et ceci découle d'une expression variable des différents gènes pathologiques dans le SNC (Viau et Boulanger 2004). L'ASC 1 est caractérisée par une atrophie modérée de la protubérance et du cervelet, alors que l'ASC 2 montre une atrophie sévère du mésencéphale, de la protubérance et des pédoncules cérébelleux (Figure I-1C). L'ASC 3 est caractérisée par une atrophie légère du mésencéphale, de la protubérance et du cervelet, alors que l'ASC 6 se manifeste par une atrophie modérée du cervelet tout en préservant les structures mésencéphaliques et protubérantielles (Figure I-1D). Les ASC 7 et 17 sont associées à une atrophie modérée du tronc et du cervelet et à une dégénération rétinienne.

I.1.3. Atrophie dentato-rubro-pallido-luysienne (ADRPL)

La transmission de l'ADRPL est autosomale dominante. La prévalence est estimée à 0,11 par 100000 personnes (Hirayama *et al.* 1994). Cette maladie débute dans la vingtaine et se manifeste par une ataxie, une choréo-athétose, une dysarthrie, une épilepsie et une démence, suivies du décès dans la quarantaine (Naito et Oyanagi 1982). Elle est caractérisée par une atrophie sévère du mésencéphale, de la protubérance et des pédoncules cérébelleux (Viau et Boulanger 2004).

I.1.4. Atrophie musculaire spinale et bulbaire (AMSB)

L'AMSB est transmise de façon récessive par le chromosome X, ainsi les hommes sont affectés et très rarement des femmes homozygotes (Schmidt *et al.* 2002). La prévalence est de 13 sur 85 000 mâles en Finlande (Udd *et al.* 1998). La maladie se manifeste par des troubles de la déglutition et de la respiration (liés au bulbe rachidien), par une atrophie musculaire, une perte sensitive accompagnée de paresthésies, des tremblements essentiels, des crampes musculaires et des fasciculations (liées à la dégénérescence des neurones moteurs au niveau de la moelle) (Harding *et al.* 1982). Ces manifestations neuromusculaires découlent de l'atrophie du bulbe médullaire et de la

moelle épinière. Au niveau endocrinien, il se produit une atrophie testiculaire, une gynécomastie, une impuissance sexuelle et une faible production de spermatozoïdes entraînant des troubles de fertilité (Brooks et Fischbeck 1995).

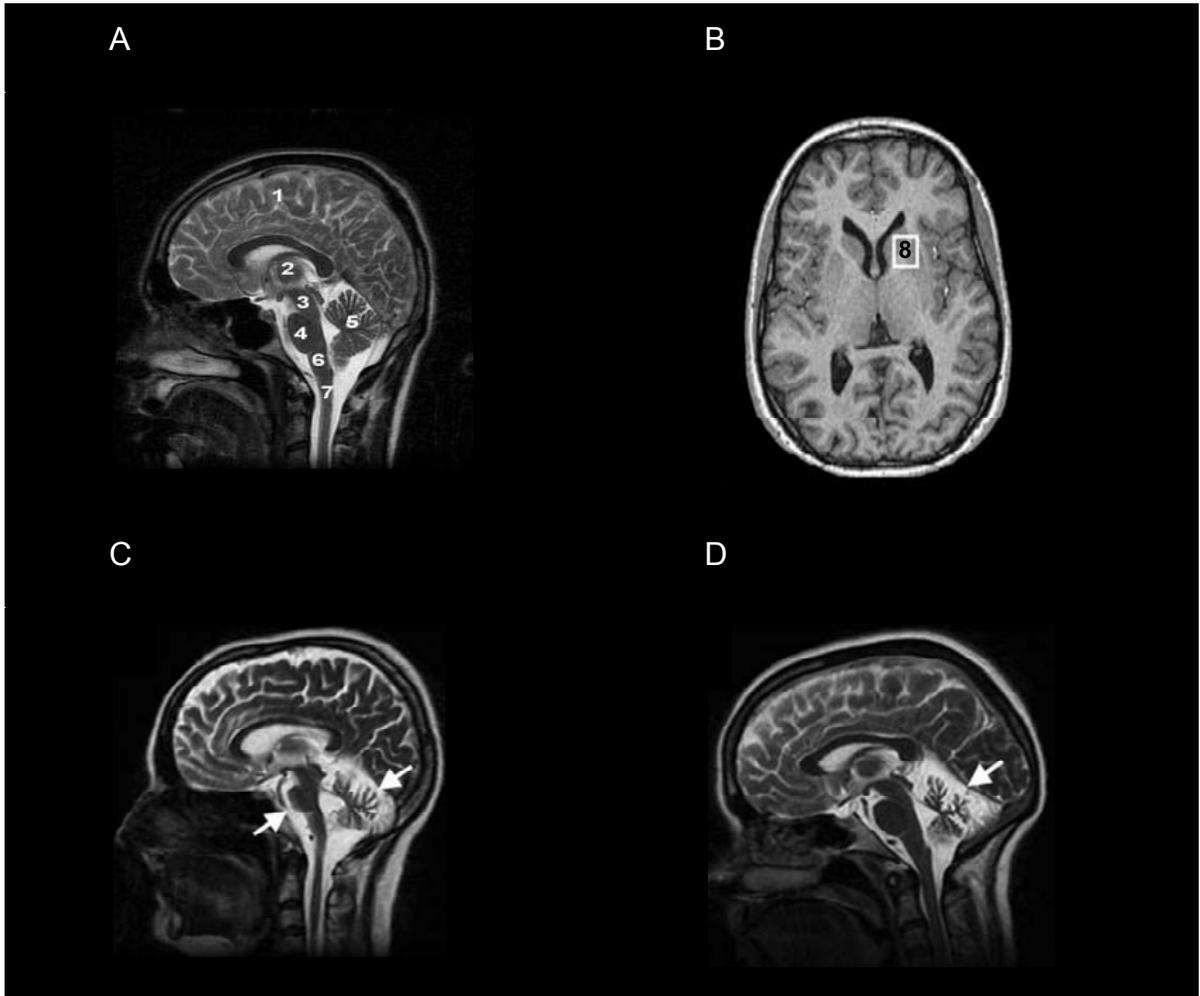


Figure I-1. Images de résonance magnétique. **A** et **B**, anatomie descriptive chez un sujet contrôlé de 22 ans sans atrophie; 1, hémisphères cérébraux; 2, diencéphale; 3, mésencéphale; 4, protubérance; 5, cervelet; 6, bulbe médullaire; 7, moelle épinière et 8, striatum; **C**, patient de 37 ans atteint d'ASC2 avec une atrophie sévère de la protubérance et du cervelet; **D**, patient de 48 ans atteint d'ASC6 présentant une importante atrophie du cervelet (Viau et Boulanger 2004; Viau *et al.* 2005).

I.1.5. Similarités et divergences des maladies liées aux polyGln

L'âge d'apparition et la sévérité de ces maladies sont inversement corrélés au NR (Snell *et al.* 1993; Koide *et al.* 1994; Ribai *et al.* 2007). Toutefois, ces maladies demeurent polymorphiques, c'est-à-dire que pour un NR identique le décours varie. Dans ces pathologies, à l'exception de l'ASC6, il se produit une anticipation génétique entraînant l'apparition de la maladie de plus en plus tôt d'une génération à l'autre. L'amplification génique, c'est-à-dire l'augmentation intergénérationnelle du nombre de répétitions de CAG, peut expliquer ce phénomène (Chung *et al.* 1993). Ceci explique pourquoi un parent avec un NR subpathologique peut transmettre la maladie.

I.2. Corps d'inclusions

L'examen neuropathologique de microtomes parenchymateux provenant du SNC de patients atteints des maladies liées aux polyGln, a permis de visualiser des amas granulaires intracellulaires, nommés corps d'inclusion (CI). Ces dépôts protéiques donnent lieu aux amyloïdoses du SNC, telles que les maladies liées aux polyGln. Lorsque les protéines β -amyloïdes, α -synucléine ou prion sont impliquées, elles causent la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et à l'encéphalopathie de Creutzfeld-Jacob respectivement (Figure I-2). Les amyloïdoses ne sont toutefois pas spécifiques au SNC et peuvent se retrouver dans différents tissus. Pour n'en nommer que quelques-uns, mentionnons le pancréas dans lequel se dépose l'amyline, causant le diabète de type II, et le rein affecté par le dépôt de chaînes légères d'immunoglobines produites dans le myélome multiple et qui contribuent à l'insuffisance rénale.

Les CI de polyGln sont majoritairement formés par des espèces associées de façon non covalente (Busch *et al.* 2003). Toutefois, certaines études suggèrent également une formation de liens covalents par la transglutaminase (Kahlem *et al.* 1996; Vig *et al.* 2007). Les CI peuvent être intracytoplasmiques ou intranucléaires et leur composition peut varier en fonction de leur localisation intracellulaire. Par exemple, dans la MH, les CI nucléaires

contiennent surtout des segments *N*-terminaux de la protéine impliquée alors que les CI cytoplasmiques contiennent un mélange de fragments *N*-terminaux et la protéine entière. Dans l'ASC 1, 3, 7 et 17, les inclusions sont intranucléaires, alors que dans l'ASC 2, ils sont surtout intracytoplasmiques (Matilla-Duenas *et al.* 2010). L'ASC 6 et l'ADPRL montrent à la fois des inclusions intracytoplasmiques et intranucléaires dans les cellules de Purkinje et granulaires du cervelet (Pietrobon 2002). Une polémique existe toujours quant au lien entre la présence de CI dans les différents compartiments cellulaires et la neurotoxicité.

Certaines données suggèrent que les CI sont délétères, car ils corrélerent avec la mort neuronale dans des modèles *in vitro* (Hackam *et al.* 1998; Ho *et al.* 2001; Yanai *et al.* 2006) et ils sont retrouvés dans les tissus chez le modèle murin de la maladie de Huntington (R6/2), avant même l'expression du phénotype (Davies *et al.* 1997). Cependant, des études chez l'humain ont montré que la présence de ces CI ne corréle pas avec la neurodégénération (Yoo *et al.* 2003), alors qu'une étude chez la souris R6/2 a démontré que la formation de corps d'inclusion intraneuronaux n'est pas un prérequis pour le développement du phénotype pathologique (Klement *et al.* 1998). À l'autre bout du spectre, une étude *in vitro* sur des cultures primaires de neurones, suggère que la formation de corps d'inclusion aurait même un effet protecteur (Arrasate *et al.* 2004). Bref, la place exacte qu'occupent les CI dans la pathologie n'est pas établie, mais ils ont permis d'effectuer le pont entre les gènes et le produit de leur expression, soit les protéines.

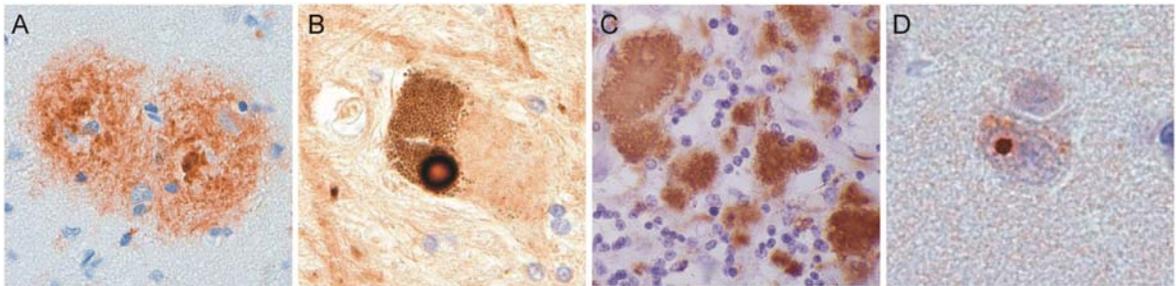


Figure I-2. Agrégats de protéines retrouvés dans certaines amyloïdoses du SNC. **A**, Plaque sénile constituée de protéines amyloïdes- β dans le néocortex d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer; **B**, Corps de Lewy renfermant de l' α -synucléine retrouvée dans la substance noire d'un parkinsonien; **C**, protéine prion retrouvée dans le cervelet d'un patient atteint de la maladie de Creutzfeld-Jacob et **D**, corps d'inclusion intranucléaire formé de polyGln retrouvé dans le néocortex d'un patient atteint de la maladie de Huntington (Forman *et al.* 2004).³

I.3. Les protéines impliquées

Le produit de l'expression génique forme différentes protéines qui ont en commun un segment de polyGln de longueur non-pathologique ou sauvage (wt) (Figure I-3). Toutefois, lorsque le segment de polyGln augmente au-delà d'un certain seuil, les protéines deviennent pathologiques ou mutées (mu).

La MH est liée à la protéine huntingtine (HTT, 3142 a.a., 348 kDa). Elle possède un domaine de sumolyation (a.a. 1 - 17) qui forme une hélice α amphipatique ayant une affinité membranaire pour s'associer avec le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les mitochondries. Les sites pour l'ubiquitination (Lys 6, 9 et 15) contrôlent la stabilité, la fonction et la localisation intracellulaire de la HTT, alors que les sites de phosphorylation (a.a. Ser 13 et 16) régulent sa clairance. La polyGln débute à l'acide aminé 18 et est de

³ Reproduit et adapté avec la permission des publications Macmillan Ltée: Nature Medicine, ©2004, www.nature.com/nm. No de licence: 2605100228190.

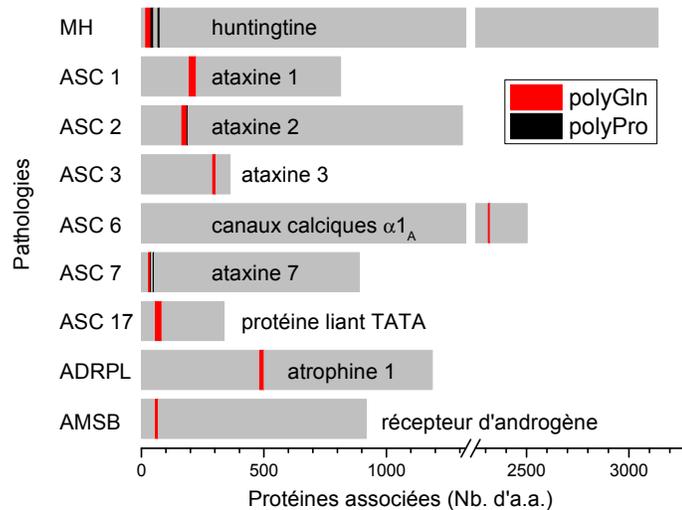


Figure I-3. Comparaison des séquences d'a.a. retrouvées dans les protéines associées aux maladies des polyGln. Le nombre de répétitions des Gln est celui retrouvé dans les protéines sauvages.

longueur variable (ici, a.a. 18 - 22). Suivant la polyGln, il y a deux segments de polyPro, le premier de 11 et le second de 10 résidus, séparés par un domaine de 20 a.a. riches en Pro et Gln (MacDonald *et al.* 1992). La polyPro pourrait servir à stabiliser la polyGln en favorisant sa solubilité (Zuccato *et al.* 2010). La HTT a un site de palmitoylation (Ser 214) impliqué dans le trafic vésiculaire (Yanai *et al.* 2006), alors que les sites de phosphorylation (a.a. 421 et 434) régulent le clivage, la formation d'agrégats et le transport vésiculaire. Un site d'acétylation (Lys 444) permet de diriger la HTT à la voie d'autophagie (Jeong *et al.* 2009). Les sites de clivage par les calpaïnes I, II et m (cystéines protéases Ca^{2+} -dépendantes) sont aux a.a. 469 et 536, alors que les sites de clivage de la capsase se trouvent aux a.a. 533, 552 (capsase 3 et 7) et 586 (capsase 2). Au niveau C-terminal, il y a des séquences d'exportation hors du noyau et de localisation nucléaire. La HTT a également 4 segments (160 a.a. / segment) contenant chacun 4 séquences HEAT (40 a.a. /

séquence, commune à la HTT, au facteur d'élongation 3 (EF3), à la protéine phosphatase 2A et à la phosphatidylinositol kinase 3 de la levure (TOR)) qui pourraient être impliquées dans les interactions protéine-protéine (Zuccato *et al.* 2010).

L'ASC1 est liée à l'ataxine 1 (ATXN1, 815 a.a./~87 kDa), une protéine ayant un segment variable de polyGln débutant à l'a.a. 186 (ici, a.a. 186 - 225) (Banfi *et al.* 1994). Il y aurait un site de phosphorylation par la protéine phosphatase 2 au niveau de Ser 776 (Chen *et al.* 2003). L'ASC 2 découle de l'ataxine 2 (ATXN2, 1313 a.a./~140 kDa), où les polyGln (ici, a.a. 166-187) sont suivies de 3 résidus Pro (Pulst *et al.* 1996). Cette protéine est très basique à l'exception de la région 254-475 où se situent des sites de liaison pour l'ARN (Albrecht *et al.* 2004). L'ASC 3 dépend de l'ataxine 3 (ATXN3, 364 a.a./~42 kDa) (Kawaguchi *et al.* 1994). En *N*-terminal, elle possède un domaine de déubiquitination (a.a. 1-170), nommé Joséphine. Elle possède un signal d'exportation nucléaire (a.a. 174-183) et de localisation nucléaire (a.a. 282-285). La polyGln (ici, a.a. 296-317) est bordée par une série de motifs interagissant avec l'ubiquitine (223-240; 243-260 et 334-351) (Albrecht *et al.* 2004). L'ASC 6 est liée à la sous-unité α 1A des canaux calciques voltage-dépendants de type P/Q ou Ca_v2,1 (i.e. sensibles à l' ω -agatoxine) (CACNA1A, 2505 a.a. /~150 kDa) (Zhuchenko *et al.* 1997). Cette protéine est constituée de 4 domaines formant chacun 6 segments transmembranaires et peut être clivée par la calpaïne I à l'a.a. 1535 et par la suite reclinée entre les a.a. 1685-1699 (De Jongh *et al.* 1994). Le segment de polyGln est de longueur variable (ici, a.a. 2314-2324). L'ASC 7 est associée à l'ataxine 7 (892 a.a./~55 kDa) dans laquelle le segment de polyGln (ici, a.a. 30-40) est suivi par un segment de polyPro composé de 10 résidus (David *et al.* 1997). L'ASC 17 découle d'une protéine composée d'un segment protéique liant la séquence TATA (339 a.a.) et la polyGln (ici a.a. 58-85) (Hoffman *et al.* 1990). L'ADPRL est associée à la protéine atrophine 1 (ATN1, 1190 a.a.), elle a une séquence de ciblage nucléaire (a.a. 16-32), un site de clivage par la capsase (Asp 109) et un segment variable de polyGln (ici, a.a. 484 - 501) (Ellerby *et al.* 1999; Suzuki *et al.* 2010). L'ASMB est liée à la protéine du récepteur de l'androgène (RA, 920 a.a.), ayant un segment de polyGln (ici, a.a. 58 - 70), un domaine liant l'ADN (a.a.

555-636), une zone de liaison du zinc (a.a. 569 – 616) et un domaine liant la dihydrotestostérone (a.a. 702-878) (Venter *et al.* 2001).

I.4. Pathogénèse cellulaire : une multitude d’hypothèses

La toxicité résultant d’une séquence de longueur pathologique de polyGln serait de deux ordres, soit par la perte de la fonction de la protéine native (wt) et par un gain fonctionnel en provenance de la protéine mutée (mu). Des hypothèses sont proposées indépendamment de la maladie. Ainsi, il a été suggéré que la polyGln pourrait former différentes sortes de canaux transmembranaires et ainsi altérer l’homéostasie ionique intracellulaire (Monoi 1995; Hirakura *et al.* 2000; Monoi *et al.* 2000; Perutz *et al.* 2002). D’autres hypothèses tentent de composer avec la spécificité des différentes pathologies.

I.4.1. MH : six courants de pensée

Le rôle de la huntingtine sauvage (HTTwt) n’est pas élucidé mais elle aurait une activité dans le développement neuronal lors de l’embryogénèse. Elle serait antiapoptotique et impliquée dans la production du facteur neurothrophique dérivé du cerveau (BDNF). Au niveau synaptique, elle aurait un rôle dans la formation et le transport vésiculaire ainsi que dans le recyclage de récepteurs. Finalement, elle aurait un rôle dans la régulation de la transcription et dans plusieurs voies de signalisation cellulaire (Zuccato *et al.* 2010). Les six hypothèses qui peuvent expliquer la toxicité de la HTTmu suivent (Figure I-4).

La première, découle du fait que l’inhibition des capsases et des calpaïnes diminue la neurotoxocité. Il est ainsi suggéré que le clivage protéolytique de la huntingtine mutante (HTTmu) pourrait relâcher des fragments de polyGln toxiques. Par le fait même, il a été suggéré que la huntingtine non-clivée pourrait être neuroprotectrice. Il a été suggéré que la polyGln pourrait dépléter des protéines essentielles au bon fonctionnement cellulaire (Cattaneo *et al.* 2001; Busch *et al.* 2003) ou séquestrer des facteurs de transcription et d’épissage intranucléaires (Waragai *et al.* 1999; Okazawa 2003).

La seconde hypothèse suggère une toxicité médiée par la formation des CI. La formation des espèces serait le résultat du dysfonctionnement des voies de macroautophagie et/ou du protéasome. La première voie deviendrait inopérante en raison d'une résistance à la phosphorylation au niveau de la Lys 144, nécessaire pour y acheminer la HTTmu (Jeong *et al.* 2009). La voie protéasomale pourrait être bloquée à cause d'un défaut de phosphorylation au niveau des Ser 13 et 16 ou d'ubiquitination au niveau des Lys 6, 9 et 15 et à l'association de la HTTmu avec des facteurs de dégradation tels que des chaperons moléculaires ou des protéines de choc thermique (Hsp) (Waelter *et al.* 2001). Ce dysfonctionnement du protéasome pourrait activer des protéases (Dorval et Fraser 2007) et déclencher la cascade apoptotique (Johnston *et al.* 1998; Jana *et al.* 2001). Outre l'interruption des voies de dégradation protéique favorisant la formation des CI, ces derniers pourraient séquestrer des facteurs ou des régulateurs de transcription (CREB et TFIID), qui pourraient interférer avec la synthèse du BDNF. De plus, les CI, en incorporant des protéines motrices solubles, pourraient empêcher le transport axonal et synaptique (dont celui du BDNF) (Gauthier *et al.* 2004). Il est toutefois à noter que les hypothèses de neurotoxocité liées aux CI sont réfutées par une autre école de pensée selon laquelle ils pourraient être bénéfiques. En effet, les CI pourraient stimuler la clairance de la HTTmu par autophagolysosomes (Ventruti et Cuervo 2007) et séquestrer les espèces oligomériques toxiques (Arrasate *et al.* 2004).

La troisième hypothèse propose que chez la HTTmu, il y aurait une diminution de la palmitoylation. L'attachement de l'acide gras palmitate au niveau de la Cys permettrait d'ancrer la protéine dans la membrane plasmique et cette dernière pourrait jouer son rôle dans le développement neuronal, la plasticité synaptique et réguler le ciblage protéique et le transport vésiculaire et axonal (dont le BDNF). La palmitoylation pourrait également aider au bon repliement protéique et diminuer l'agrégation (Yanai *et al.* 2006; Huang *et al.* 2009).

Quatrièmement, la HTTmu pourrait causer une excitotoxicité. En effet, elle mènerait à une augmentation de la sécrétion de glutamate, une diminution de sa

dégradation et une augmentation de l'activité de ses récepteurs. De plus, elle pourrait suractiver, par phosphorylation, le récepteur au *N*-méthyl-D-aspartate (NMDA) et perturber son endocytose médiée par la clathrine (Sun *et al.* 2001; Li *et al.* 2003; Estrada-Sanchez *et al.* 2009).

Cinquièmement, la théorie du dysfonctionnement du réticulum endoplasmique (RE) suggère que la HTTmu lie la partie *C*-terminale du récepteur 1 inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) au niveau du RE et rendrait ce dernier plus sensible à l'IP₃. La surexcitation des récepteurs NMDA aurait pour effet d'entraîner une surrégulation des voies IP₃ menant à un relâchement de calcium (Ca) du RE vers le cytoplasme. Dans une tentative de compensation, la mitochondrie absorberait une grande quantité de Ca, ce qui entraînerait son gonflement suivi d'un éventuel relâchement de cytochrome *c* et de d'autres facteurs proapoptotiques (Zeron *et al.* 2004; Lim *et al.* 2008).

Sixièmement, le postulat du dysfonctionnement mitochondrial suggère que la HTTmu pourrait se lier à la mitochondrie pour entraver son déplacement, son métabolisme énergétique, l'activité des facteurs de transcription (en liant et en augmentant les taux de p53) et augmenter le stress oxydatif (Bae *et al.* 2005; Goswami *et al.* 2006; Orr *et al.* 2008).

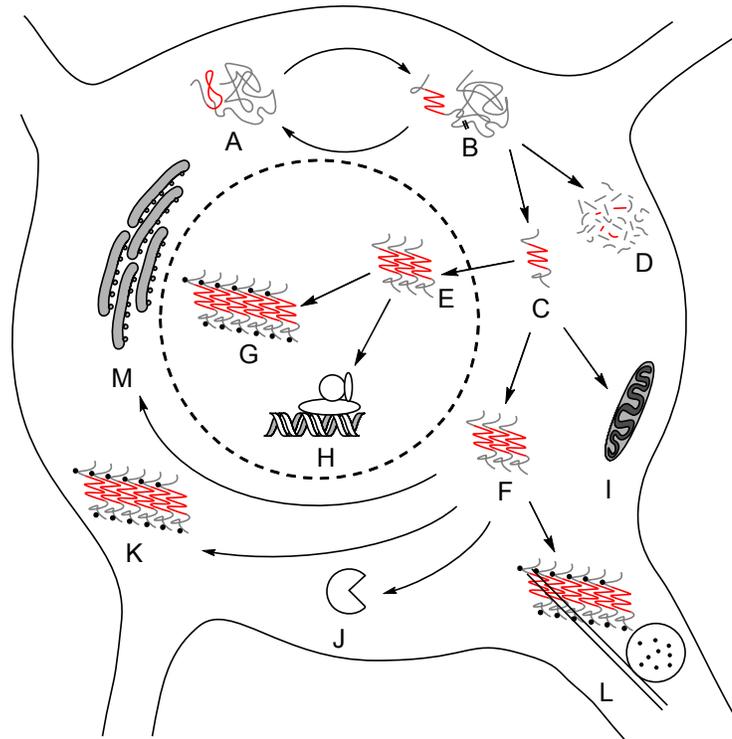


Figure I-4. Pathogénèse de la maladie de Huntington à l'intérieur d'un neurone. La huntingtine est normalement contenue dans le cytoplasme. **A**, lorsque la protéine a un segment de polyGln de longueur pathologique (rouge), il pourrait se produire **B**, un changement de conformation résultant d'un repliement anormal qui peut être corrigé par les chaperons moléculaires ou **C**, conduire à un clivage protéolytique créant des monomères solubles ou **D**, une dégradation complète. Les monomères solubles peuvent former **E**, des oligomères intranucléaires ou **F**, intracytoplasmiques ou **I**, interagir avec les mitochondries. Les oligomères intranucléaires peuvent former **G**, des inclusions et **H**, interagir avec la transcription génique, alors que les oligomères intracytoplasmiques peuvent être ubiquitinés et acheminés au protéasome pour leur dégradation entraînant **J**, une activation des capsases, formant **K**, des CI, entraînant **L**, un dysfonctionnement du transport vésiculaire ou **M**, de l'homéostasie du Ca au niveau du RE.

I.4.2. Dysrégulation de la transcription

Les ASC 1, 2, 7, 17 et de l'ADPRL ont en commun le fait que les produits de leurs gènes sont directement impliqués dans des complexes de régulation de la transcription (activateurs ou corépresseurs) (Matilla-Duenas *et al.* 2010).

La fonction de l'ATXN1 demeure inconnue. Toutefois, l'activité neurodégénérative de l'ATXN1mu serait augmentée lorsqu'elle est phosphorylée, car cela favoriserait la formation d'agrégats par l'augmentation probable de sa résistance à la dégradation (Chen *et al.* 2003). L'ATXN1mu altère l'expression de gènes menant à un changement des signaux des récepteurs *Wnt* (sans ailes), de l'acide rétinoïque, du signal de l'hormone thyroïdienne et de la liaison des acides nucléiques. L'ATXN1mu serait également responsable de l'altération de la neurotransmission et de l'homéostasie du Ca (Matilla-Duenas *et al.* 2010).

L'ATXN2, via ses domaines liant l'ARN, pourrait réguler l'épissage (Albrecht *et al.* 2004). De plus, elle pourrait s'associer, dans le cytosol, à la région C-terminale intracellulaire de canaux calciques induisant une dérégulation des voies modulées par le Ca.

L'ATXN3 est une cystéine protéase spécifique à l'ubiquitine et son rôle est la désubiquitination au niveau du protéasome. L'ataxine 3 pathologique produirait un dysfonctionnement du système protéasome-ubiquitine, ce qui mènerait à une accumulation anormale de protéines, y compris celles contenant des polyGln. Ceci interférerait avec de multiples processus cellulaires et mènerait à la mort neuronale (Albrecht *et al.* 2004).

La TBPmu entraînerait l'apoptose des neurones en activant les capsases 3, 7 et 9 en induisant la translocation du cytochrome *c* de la mitochondrie vers le cytosol (Matilla-Duenas *et al.* 2010).

L'atrophine 1 est un corépresseur de transcription au niveau nucléaire (Matilla-Duenas *et al.* 2010). L'ATN1mu est clivée par la capsase à l'Asp 109 pour donner un

fragment C-terminal contenant la polyGln. Le clivage protéolytique serait nécessaire pour l'agrégation et pour produire un effet proapoptotique (Ellerby *et al.* 1999; Suzuki *et al.* 2010).

I.4.3. Les particularités de l'ASC6 et de l'AMSB

La CACNA1A est une glycoprotéine membranaire qui forme des canaux calciques voltage dépendants responsables de la transmission synaptique. L'insertion de polyGln dans la sous-unité alpha n'interfère pas avec la fonction même de ces canaux, ce qui suggère un gain de fonction chez cette protéine pathologique (Saegusa *et al.* 2007). Néanmoins, la toxicité est augmentée lorsque le fragment C-terminal est clivé par la calpaïne et transloquée au niveau nucléaire, ce qui suggère une interférence délétère avec la signalisation nucléaire (Kordasiewicz et Gomez 2007).

Le RA est situé dans le cytoplasme, combiné avec les Hsp70 et 90. Lorsqu'il lie la dihydrotestostérone (DHT), il change de conformation et se dissocie des protéines Hsp pour se dimériser et migrer dans le noyau, pour se lier à l'élément de réponse de l'androgène au niveau du promoteur et induire leur transcription. L'ADPRL est la seule maladie liée aux polyGln dont l'agrégation est accélérée par un ligand, la DHT. Le RA est clivé par la capsase 3 et forme des CI en y incorporant plusieurs chaperons moléculaires et des facteurs de transcription. Le système d'ubiquitine-protéasome est incapable de détruire ces CI et ceux-ci interfèreraient avec le transport axonal et des vacuoles autophagiques médié par la dyénine. (Matilla-Duenas *et al.* 2010; Rusmini *et al.* 2010).

I.5. Études des polyGln : le problème se trouve dans la

solution Comme tous les composés amyloïdes, la faible solubilité et la propension des polyGln à l'agrégation sont à l'origine de plusieurs difficultés relatives à leur étude. Ceci explique pourquoi ces espèces ont été surnommées peptides de l'enfer (*peptides from hell*) (Zagorski *et al.* 1999)! Différentes stratégies ont été utilisées pour étudier les polyGln. Elles tentent toutes de surmonter les problématiques entourant leur production et leur purification. La première approche consiste à travailler avec les protéines pathologiques, la seconde fait appel aux protéines de fusion et la dernière utilise des peptides synthétiques.

I.5.1. Problématique de production des polyGln

La production des polyGln, sous forme de protéines pathologiques, de fusion ou de peptides, a été tentée *in vivo* et *in vitro*. Une première approche est de profiter de la synthèse *in vivo* des protéines pathologiques qui a naturellement lieu chez les humains ou chez des modèles animaux atteints de ces maladies. La seconde approche est l'utilisation de la synthèse *in vitro*, qui peut se faire par l'intermédiaire de différents micro-organismes, eucaryotes ou procaryotes. Ces méthodes se sont toutefois avérées ardues en raison de la formation de CI à l'intérieur des organismes et entraînent leur mort. L'utilisation de cette approche a toutefois permis de produire des protéines telles que l'HTT et l'ATXN3 (Chow *et al.* 2006), des protéines de fusion avec la glutathione *S*-transférase (GST), la myoglobine (Mb) ou l'inhibiteur de la chymotrypsine II (Chen *et al.* 1999; Bevivino et Loll 2001; Masino *et al.* 2002; Tanaka *et al.* 2003; Ignatova et Gierasch 2006). De plus, des peptides ont pu être générés à partir du clivage de protéines de fusion (Scherzinger *et al.* 1997; Muchowski *et al.* 2000). La troisième approche utilisée afin de produire de la polyGln est l'utilisation de réactions chimiques. L'utilisation de la polymérisation a permis de produire des homopolymères ou des copolymères de Gln de hauts poids moléculaires (Krull et Wall 1966; Ariely *et al.* 1969). L'utilisation de synthèse peptidique sur support solide (SPSS) a

permis de produire des polyGln de plus faibles poids moléculaires (Johnson 1995; Chen *et al.* 2001; Chen *et al.* 2002; Bhattacharyya *et al.* 2006).

I.5.2. Problématiques d'isolation et de purification

En raison de la propension à l'agrégation des polyGln, l'extraction des protéines pathologiques produites *in vivo* à partir des tissus humain ou animal est techniquement difficile et n'a été rapportée pour la première fois qu'en 2004 (Diaz-Hernandez *et al.* 2004). De la même façon, la purification des protéines de fusion et pathologiques produites *in vitro* est difficile. Différentes stratégies ont été développées dont l'utilisation de l'étiquette de type His₆ chez l'ATXN3 et la HTT (Chow *et al.* 2006).

Les peptides de polyGln sont également difficiles à purifier à cause de leur faible solubilité. Ainsi, lorsque produits par clivage protéolytique d'une protéine de fusion, ils sont utilisés sans purification subséquente, même si un mélange subsiste après dénaturation et filtration de la protéine hôte (Scherzinger *et al.* 1997; Heiser *et al.* 2000; Muchowski *et al.* 2000). La purification des peptides issus de la synthèse chimique est tout aussi problématique et doit au préalable avoir fait l'objet d'insertion de résidus chargés ou polaires afin d'augmenter leur solubilité (Perutz *et al.* 1994; Johnson 1995; Altschuler *et al.* 1997; Sharma *et al.* 1999; Chen *et al.* 2001; Chen et Wetzel 2001; Chen *et al.* 2002; Thakur et Wetzel 2002; Bhattacharyya *et al.* 2006; Lin *et al.* 2006; Slepko *et al.* 2006; Lee *et al.* 2007; Singh et Lapidus 2008).

I.5.3. Biais associés au type d'espèce étudiée

Plusieurs espèces peuvent être étudiées: les protéines pathologiques, les protéines de fusion ou les peptides. Le travail direct avec les protéines pathologiques apparaît à prime abord comme étant le choix le plus rigoureux qui puisse être fait. Toutefois, l'agrégation et la taille de ces protéines est un facteur limitant leur étude. Par exemple, la grande taille de la HTT, fait qu'il n'est pas possible de produire une structure cristalline ou d'élucider sa structure par spectrométrie de masse (Zuccato *et al.* 2010).

Les protéines de fusion sont des alternatives intéressantes aux protéines pathologiques pour étudier la polyGln. Toutefois, lorsque cette séquence a été insérée dans l'inhibiteur de la chymotrypsine II (Stott *et al.* 1995; Chen *et al.* 1999) et la GST (Masino *et al.* 2002), elle adoptait une structure aléatoire, alors que lorsqu'elle est insérée dans la Mb (Tanaka *et al.* 2001; Tanaka *et al.* 2003), elle était en feuillet β antiparallèle. Ainsi, il a été conclu que la conformation du segment de polyGln est influencée par la protéine hôte, ce qui empêche l'étude de ses propriétés structurales intrinsèques (Masino et Pastore 2002).

L'étude de peptides de polyGln peut s'avérer avantageuse car il est possible de cibler l'étude sur le segment de Gln. Toutefois, des biais découlent de la structure primaire utilisée. En effet, les peptides issus de clivages protéolytiques ont une séquence nécessaire à la reconnaissance du site de protéolyse qui peut influencer la structure secondaire de la polyGln (Popiel *et al.* 2004; Bhattacharyya *et al.* 2006; Chellgren *et al.* 2006). Des biais de nature similaire sont retrouvés chez les peptides provenant de synthèse chimique. En effet, une variété de résidus sont ajoutés à la polyGln afin d'augmenter sa solubilité, de créer un dispositif expérimental particulier ou d'accroître la ressemblance avec les protéines pathologiques. De plus, les peptides provenant de synthèse chimique sont caractérisés par une polydispersité, inhérente au processus de polymérisation ou secondaire aux cycles de couplage et de déprotection incomplets en synthèse peptidique sur support solide (SPSS) (Johnson 1995; Chen *et al.* 2001; Chen *et al.* 2002; Bhattacharyya *et al.* 2006). Cette polydispersion n'est pas compatible avec la plupart des études structurales (Ariely *et al.* 1969; Kazunori Ishikawa 1990; Chu et Orgel 2001). Ainsi, les stratégies utilisées pour produire et purifier les peptides de polyGln peuvent influencer leur structure secondaire et leur cinétique d'agrégation. Ces effets sont présentés dans la prochaine section.

I.6. Étude des peptides de polyGln

I.6.1. Peptides étudiés

Plusieurs espèces de peptides ont été étudiées pour tenter de comprendre le rôle des polyGln dans la pathogénèse des maladies qui lui sont associées (Tableau I-2). Ces peptides ont des résidus tels que Asp et Lys, souvent ajoutés afin d'augmenter leur solubilité. Les résidus His et Pro sont ajoutés afin d'augmenter la similarité avec la polyGln se trouvant dans certaines protéines pathologiques, alors que la séquence Pro-Gly est utilisée afin d'introduire un coude β .

Tableau I-2. Espèces peptidiques étudiées

Structures	Références
HAsp ₂ Gln ₁₅ Lys ₂ OH	(Perutz 1994; Perutz <i>et al.</i> 1994; Perutz 1995; Perutz <i>et al.</i> 2002; Sikorski et Atkins 2005)
AcAsp ₂ Gln ₁₅ Lys ₂ NH ₂	(Altschuler <i>et al.</i> 1997)
AcLys ₂ Gln ₁₇ TyrLys ₂ NH ₂	
Ac(Ala ₄ Lys) ₃ Gln ₉ LysAla ₄ LysAlaNH ₂	
AcTyrGlyAla ₂ LysAla ₄ LysGln ₁₇ LysAla ₄ LysAlaNH ₂	
HGln _n HisGlnHisGln _n OH, n = 8, 10	(Sharma <i>et al.</i> 1999)
Gln ₈ HisGln ₄ HisGln ₈ OH	
HAsp ₂ Gln ₁₅ Lys ₂ OH	(Chen <i>et al.</i> 2002)
HLys ₂ Gln ₁₅ Lys ₂ OH	
HAspLys ₂ Gln ₁₅ AspLys ₂ OH	
HLys ₂ (Gln _n ProGly) ₄ Lys ₂ OH n = 7, 8, 9, 10	(Thakur et Wetzel 2002)
Lieur-HttGln _n -Exon1-His ₆ OH ⁴ n = 16, 25, 39, 46	(Bennett <i>et al.</i> 2002)
AcGln ₈ NH ₂	(Sharma <i>et al.</i> 2005)
HAsp ₂ Gln ₁₅ Lys ₂ OH	
HLys ₂ Gln ₂₈ Lys ₂ OH	
HLys ₂ Gln ₄₅ Lys ₂ OH	
Biotin-PEG -Gln ₂₉ Lys ₂ OH	(Bhattacharyya <i>et al.</i> 2005)
HLys ₂ Gln ₄₉ Lys ₂ OH	

⁴ Lieur : H(GlySer)₂GlyGluArgGlnHisMetAspSerProAspLeuGlyThrAsp₄Lys-HttGln_n-Exon1 : MetAlaThrLeuGluLysLeuMetLysAlaPheGluSerLeuLysSerPheGln_nPro₁₁GlnLeuProGln-Pro₃GlnAlaGlnPro-Leu₂ProGlnProGlnPro₁₀GlyProAlaValAlaGlu₂Pro₂LeuHisArgProOH

HLys ₂ Gln ₄₀ Pro _n Lys ₂ , n = 3, 6, 10	(Bhattacharyya <i>et al.</i> 2006)
HLys ₂ Pro ₁₀ Gln ₄₀ Pro _n Lys ₂	
AcPro ₃ Gln _n Pro ₃ GlyTyrNH ₂ , n = 1-15	(Chellgren <i>et al.</i> 2006)
HLys ₂ Gln _n Lys ₂ OH, n = 7, 15, 23	(Lee <i>et al.</i> 2007)
HArg ₃ GlyGln _n GlyTyrNH ₂ , n = 3, 6, 9, 15	(Darnell <i>et al.</i> 2007)
HArg ₃ GlyGln _n Pro ₁₁ GlyTyrNH ₂	
HArg ₃ GlyPro ₁₁ GlyTyrNH ₂	
HArg ₃ GlyGln ₃ Gly ₁₁ GlyTyrNH ₂	
HLys ₂ CysGln _n TrpLys ₂ OH n = 4, 7, 10, 13, 16	(Singh et Lapidus 2008)
HLys ₂ TrpGln _n XLys ₂ OH n=8, 12, 16, 20, 24	(Walters et Murphy 2009)
X=Ala ou Dansyl-Lys	
HArg ₃ GlyGln ₃ GlyTyrOH	(Darnell <i>et al.</i> 2009)
HArg ₃ GlyGln ₃ Pro ₁₁ GlyTyrOH	
HArg ₃ GlyPro ₁₁ GlyTyrOH	
HArg ₃ Gln ₃ AlaTyrOH	
HTyrAlaGln ₃ AlaTyrOH	
HTyrAlaGln ₃ Pro ₁₁ AlaArgOH	
HTyrAlaPro ₁₁ AlaArgOH	
ATyrGlyGln ₃ GlyArgOH	
Inducteur de cristaux-Htt-Gln ₁₇ -Exon1 ⁵	(Kim <i>et al.</i> 2009)

I.6.2. Structures secondaires proposées

Les premières études structurales des polyglutamines proviennent de polymères. Une structure en feuillet β et l'implication de ponts H entre les chaînes latérales avaient alors été suggérées (Krull et Wall 1966). Plusieurs années plus tard, M.F. Perutz, prix Nobel de chimie (1962), a suggéré le terme *polar zipper* pour décrire les interactions des chaînes latérales des polyGln entre elles (Figure I-5). Il avait alors proposé des structures en feuillet β et en hélices α associées en superhélices. Depuis, plusieurs structures ont été proposées, les feuillets, la structure aléatoire et différents types d'hélices (Figure I-6).

⁵ Inducteur de cristaux : GlnSerTyrGlnIleThrAlaGlyLysLeuGlyThrGlyArg₂PheThr₂Ser-Htt-Gln₁₇-Exon1 : HMetAlaThrLeuGluLysLeuMetLysAlaPheGluSerLeuLysSerPheGln₁₇Pro₁₁GlnLeuProGlnPro₃GlnAlaGlnProLeu₂ProGlnProGlnPro₁₀GlyProAlaValAlaGlu₂Pro₂LeuHisArgProOH

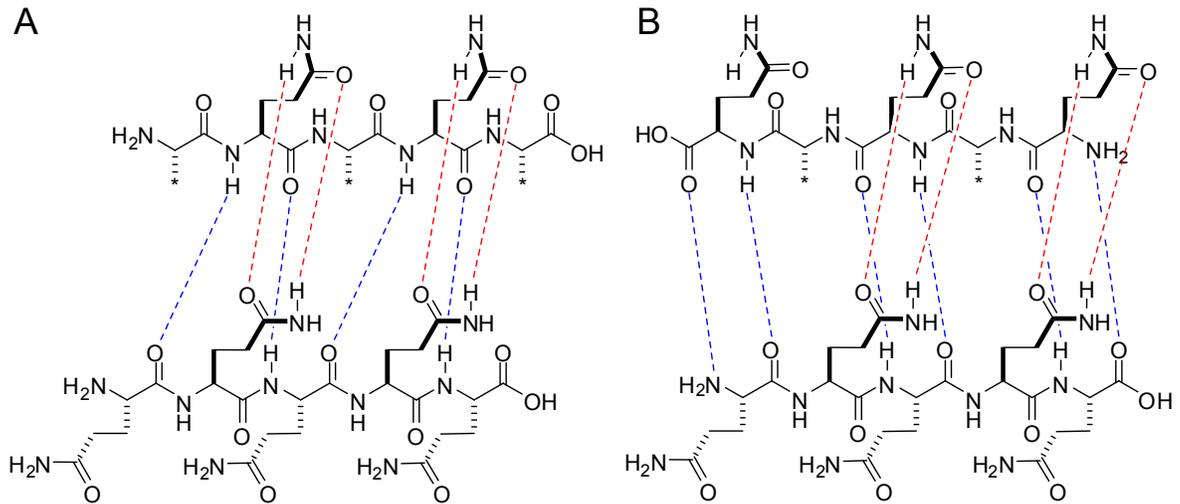


Figure I-5. Représentation partielle des ponts H dans les structures de polyGln proposées par Perutz. **A**, parallèles et **B**, antiparallèles.⁶

I.6.2.1. Feuilletts

Les données en faveur d'une conformation en feuillet β de la polyGln sont les plus prévalentes. En effet, l'étude du premier peptide HAsp₂Gln₁₅Lys₂OH par diffraction aux rayons X et par dichroïsme circulaire (DC) dans l'eau et le TFE ont montré une structure β (Perutz 1994; Perutz *et al.* 1994; Perutz 1995). L'analyse subséquente des données cristallographiques de Perutz a mené à la proposition d'une structure en épingle β (Sikorski et Atkins 2005). Ensuite, des peptides de polyGln interrompus par des résidus His, tel que retrouvé dans l'ATXN 1, ont montré une structure β (Sharma *et al.* 1999). Ultérieurement, l'utilisation de diverses longueurs de polyGln interrompues par GlyPro, afin de mimer une épingle β , a permis de montrer que le nombre de Gln nécessaires pour obtenir une cinétique d'agrégation équivalente au HLys₂Gln₄₅Lys₂OH était de 9 ou 10 Gln. Il a ainsi été suggéré que l'agrégation forme des feuilletts β antiparallèles (Thakur et Wetzel 2002). La diffraction par rayon X de polyGln de différentes longueurs a subséquemment

⁶ Les ponts H en rouge sont entre les chaînes latérales et ceux en bleu sont entre les squelettes.
*, Chaînes latérales omises pour plus de clareté.

montré que les polyGln adoptaient une structure en feuillet β (Sharma *et al.* 2005). Récemment, une étude de modélisation moléculaire a proposé une structure en feuillet α pour la polyGln (Babin *et al.* 2010).

I.6.2.2. Structure aléatoire

La structure aléatoire a également été observée chez les polyGln non agrégées en milieu aqueux et à pH physiologique (Altschuler *et al.* 1997; Chen *et al.* 2002; Chen *et al.* 2002; Lee *et al.* 2007; Walters et Murphy 2009). Des peptides ayant Htt-Gln_n-Exon1 (n = 16, 25, 39, 46) ont également montré une structure aléatoire (Bennett *et al.* 2002). Plus récemment, il a été montré, par annihilation de fluorescence avec le peptide modèle HLys₂CysGln_nTrpLys₂OH, n = 4-16, que la polyGln est rigide et peu encline à former une structure en épingle β (Singh et Lapidus 2008) et qu'elle n'adopte pas de structure particulière.

I.6.2.3. Structures hélicoïdales

Plusieurs types d'hélices ont été suggérés pour les polyGln et elles peuvent être décrites par la nomenclature de Bragg (Bragg *et al.* 1950) (Tableau I-3). La formation d'une hélice α a d'abord été suggérée par Perutz, mais ce n'est que tout récemment qu'elle a été observée par une étude cristallographique par diffraction de rayons X. Les 7 cristaux étudiés, contenant Htt-Gln₁₇-Exon1, ont montré que la région N-terminale était en hélice α , que le segment de polyPro était en PPII et que la région contenant Gln₁₇ adoptait de multiples conformations, soit une hélice α , aléatoire et une boucle étendue (Kim *et al.* 2009).

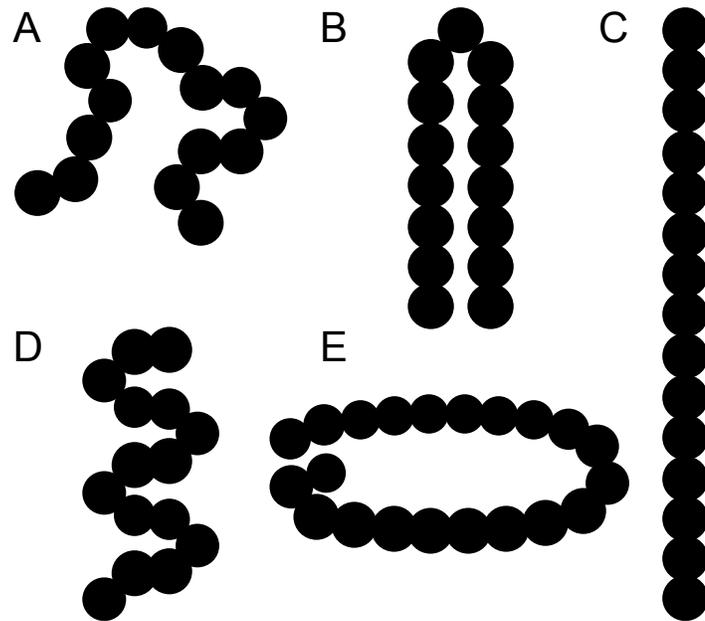


Figure I-6. Différentes structures secondaires proposées pour les polyglutamines. **A**, aléatoire; **B**, coude β ; **C**, brin β ; **D**, hélice (α , PPII, 3-10, μ ou π); **E**, hélices β parallèle ou antiparallèle.

L'organisation en hélice polyproline de type II (PPII) a été démontrée par la polyGln bordée de résidus Pro, en milieu aqueux et à pH physiologique (Chellgren *et al.* 2006). Cependant, le nombre de résidus de Gln doit être faible ($n = 3-6$), sans quoi il se produit une conversion en feuillet β lorsqu'il s'accroît ($n = 9-15$) (Darnell *et al.* 2007; Darnell *et al.* 2009). La localisation des résidus Pro a également une influence structurale, car lorsqu'ils sont positionnés en *N*-terminal, il y a peu d'effet structural et H_{Lys}₂Pro₁₀Gln₄₀Lys₂OH a une conformation similaire à H_{Lys}₂Gln₄₀Lys₂OH (Bhattacharyya *et al.* 2006). Toutefois, lorsque les résidus Pro sont présents en *C*-terminal, ils entraînent une diminution de l'hélicité α chez HGln₁₀Pro₁₀OH vs HLys₂Gln₁₀Lys₂OH.

Finalement, d'autres structures secondaires hélicoïdales ont été proposées sur la base d'études de modélisation moléculaire. On y retrouve les hélices 3-10 et π (Lathrop *et al.* 1998), μ (Monoi 1995; Monoi *et al.* 2000), β parallèle (Perutz *et al.* 2002; Stork *et al.* 2005) et antiparallèle (Laghaei et Mousseau 2010).

Tableau I-3. Types d'hélices proposés pour les polyGln

Hélice	Nomenclature de Bragg (n_R) ⁷	Translation axiale / résidu (Å)
α	$3,7_{13}$	1,50
PPII	3_0	3,10
3-10	3_{10}	2,00
π	$4,4_{16}$	1,15
μ	$6,2_{20}$	0,81
β parallèle	18_x ou 20_x	-
β antiparallèle	22_x	-

I.6.3. Organisation supramoléculaire des polyGln en cours d'agrégation

Des études par microscopie électronique et par microscopie à force atomique ont montré que l'agrégation des polyGln donne lieu à des fibrilles amyloïdes, des structures cylindriques qui sont de type fibrillaire (Chen *et al.* 2002; Perutz *et al.* 2002; Poirier *et al.* 2002; Thakur et Wetzel 2002; Legleiter *et al.* 2010). L'organisation vers ce type de structure requiert un autoassemblage des peptides (Figure I-7).

⁷ n et R sont le nombre de résidus et le nombre de ponts H par tour respectivement.

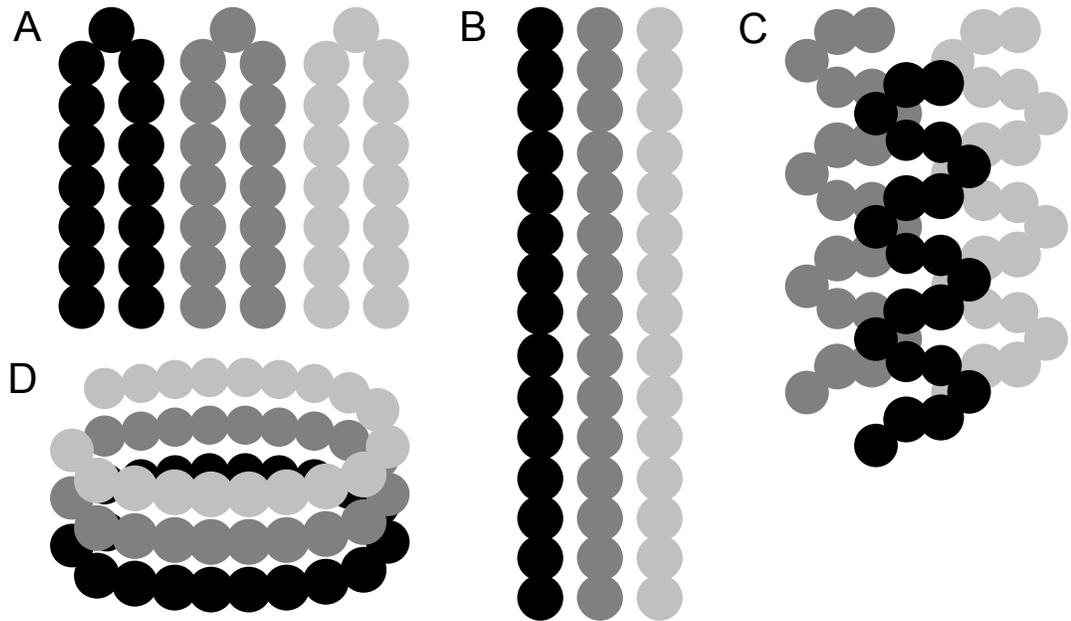


Figure I-7. Organisations supramoléculaires proposées. **A**, association de coudes β ; **B**, association de brins β ; **C**, hélices α associées en superhélice; **D**, hélice β .

La formation d'hélices mènerait directement à la formation de fibrilles, alors que l'assemblage de feuillets ou d'épingles β nécessiterait un nombre supplémentaire d'étapes. En effet, il est proposé que ces structures forment des oligomères, ensuite des globules intermédiaires, qui deviennent des protofibrilles pour enfin devenir des fibrilles matures. Ce processus pourrait impliquer la formation intramoléculaire d'épingles β suivie d'un assemblage de ces structures ou procéder directement via assemblage de brins β . Un débat se poursuit toujours à l'égard du parallélisme des feuillets formés. Les structures parallèles pourraient être plus stables que les antiparallèles en raison d'une géométrie permettant un plus grand nombre de ponts H. Malgré ces considérations, les peptides qui ont des charges pouvant s'apparier aux extrémités (HAsp₂Gln₁₅Lys₂OH) peuvent, par attraction électrostatique, favoriser la formation de structures en feuillet β antiparallèle ou en épingle β , alors que les peptides ayant des charges dont l'appariement est défavorable

(HLys₂Gln₁₅Lys₂OH) peuvent défavoriser la formation de structures en épingles β (Sikorski et Atkins 2005). À cet effet, il est possible de contrôler l'assemblage de peptides contenant des résidus Gln par attraction/répulsion électrostatique (Aggeli *et al.* 1997; Aggeli *et al.* 2001; Aggeli *et al.* 2003; Weiss et Terech 2006).

I.6.4. Cinétique d'agrégation des polyGln

Nombre d'études font état que la fibrillogénèse procède par une phase de latence suivie d'une période de croissance rapide des fibrilles. Cette phase de latence augmente lorsque les agrégats formés sont enlevés par centrifugation et peut être éliminée lorsque du peptide agrégé est ajouté (Chen *et al.* 2001; Chen *et al.* 2002; Chen *et al.* 2002). Ces observations ont mené à la proposition de la théorie de la nucléation, laquelle est caractérisée par une période de latence durant laquelle il doit se former un noyau, déclenchant une phase rapide de croissance fibrillaire. La phase rapide consisterait en l'addition linéaire de monomères ou en une distension de l'agrégat en exposant ainsi de nouveaux sites permettant l'incorporation de monomères. Cette phase serait également dépendante de la structure primaire des peptides utilisés.

La cinétique de la phase rapide de l'agrégation est décrite par la théorie de Smoluchowsky (Kissa 1999), basée sur la collision entre deux particules au hasard s'étant approchées l'une de l'autre par mouvement brownien (Rice *et al.* 1985). La fraction des collisions menant à une agrégation est décrite par Ω . À l'inverse, la stabilité des particules en solution est décrite par $W = 1/\Omega$ et dépend de la barrière d'énergie potentielle (cinétique = $K_B T$ ou électrostatique, résultant de la double couche électrique estimée par la longueur de Debye) (Shchukin 2001). Deux régimes sont utilisés pour décrire les cinétiques d'agrégation, celle limitée par la diffusion (DLCA) et celle limitée par la réaction (RLCA) (Lin *et al.* 1989; Lin *et al.* 1989). La DLCA se produit lorsque $\Omega = 1$, ainsi, l'agrégation est déterminée par la vitesse de diffusion. Les agrégats ainsi formés sont moins denses. La RLCA se produit lorsque $\Omega < 1$. Ainsi, plusieurs approches sont requises avant qu'une adhésion ne se produise et les agrégats formés sont plus denses.

I.6.5. Lien entre la structure et la cinétique d'agrégation

Dans une tentative de réunir les observations cinétiques et structurales, il est suggéré que le processus de nucléation correspond à la transition d'une structure aléatoire vers une structure de type épingle ou feuillet β (Figure I-8). Ce changement conformationnel, thermodynamiquement défavorable, serait responsable de la phase de latence (Chen *et al.* 2001; Chen *et al.* 2002; Chen *et al.* 2002). Ce modèle a toutefois été remis en doute lorsque réétudié avec des peptides identiques. En effet, la formation d'agrégats ne serait pas associée à une transition structurale ou à une structure secondaire particulière (Lee *et al.* 2007).

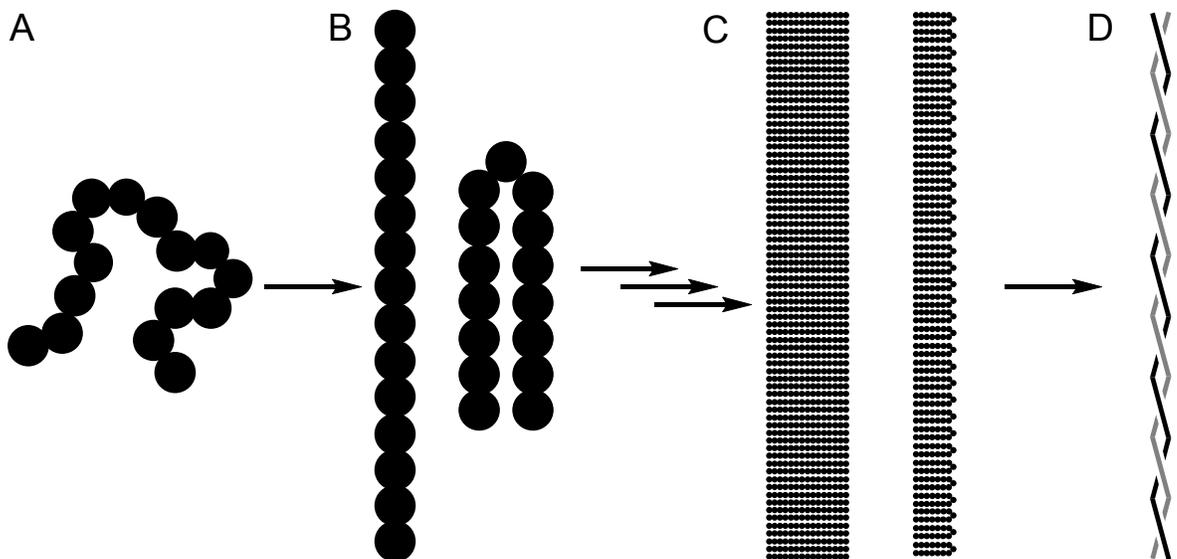


Figure I-8. Modèle proposé pour l'agrégation des polyGln. **A**, structure aléatoire; **B**, brin ou coude β ; **C**, association des brins ou des coudes β pour former une protofibrille; **D**, assemblage de deux protofibrilles pour former une fibrille mature.

La structure secondaire étant dépendante, en partie, de la structure primaire, celle-ci devrait influencer la cinétique d'agrégation. C'est en effet ce qui a été observé. La vitesse de formation d'agrégats est proportionnelle à la longueur de la polyGln dans le peptide à

l'étude (Chen *et al.* 2002), alors qu'elle est réduite par l'ajout d'une séquence de polyPro en C-terminal (Bhattacharyya *et al.* 2006). De plus, il a été observé que les vitesses d'agrégation varient tel que $\text{HAsp}_2\text{Gln}_{15}\text{Lys}_2\text{OH} > \text{HAspLys}_2\text{Gln}_{15}\text{AspLys}_2\text{OH} > \text{HLys}_2\text{Gln}_{15}\text{Lys}_2\text{OH}$. Ces interrelations permettent de mettre en relief l'influence de la structure primaire du peptide étudié sur la structure et la cinétique d'agrégation.

I.7. Approches thérapeutiques

Plusieurs approches thérapeutiques ont été proposées pour traiter les maladies liées aux polyGln. Parmi les plus répandues, il y a l'utilisation d'un ARN interférant qui pourrait bloquer la synthèse des protéines ayant des polyGln de longueur pathologique (McBride *et al.* 2008; Pfister *et al.* 2009). Dans une stratégie visant à réduire le nombre de CI, l'inhibition des protéases (Haacke *et al.* 2007) ou une modification de la voie ubiquitine-protéasome par une augmentation de la régulation des protéines Hsp40, Hsp70, HSP1 (*heat shock, DnaJ-like-1*) pourrait s'avérer efficace (Howarth *et al.* 2007). Finalement, il y a l'utilisation de petites molécules, qui pourraient agir en chaperons moléculaires afin d'aider au bon repliement des protéines pour ainsi augmenter la clairance des corps d'inclusion ou interagir avec les monomères/oligomères en solution. À cet effet, certaines petites molécules sont des inhibiteurs d'agrégation des polyGln, telles que le rouge de Congo (RC), certains benzothiazoles (Heiser *et al.* 2000; Heiser *et al.* 2002), le peptide 1 liant la polyGln (QBP1) (Nagai *et al.* 2000; Ren *et al.* 2001; Tomita *et al.* 2009) et le tréhalose (Tanaka *et al.* 2004). La structure de certaines de ces molécules est présentée au Tableau I-4 et leur mécanisme d'action est discuté dans les sections suivantes.

Tableau I-4. Structures de certains inhibiteurs d'agrégation des polyGln

Nom	Structure	CI ₅₀ ¹ (μM)	K _d ² (μM)	Références
Rouge de Congo (RC)		20	0,73 ([RC] < 3μM) > 10 ([RC] > 3μM)	(Heiser <i>et al.</i> 2000) (Okamoto <i>et al.</i> 2009)
Tréhalose		10	-	(Tanaka <i>et al.</i> 2004)
Peptide liant la polyGln (QBP1)	AcSerAsnTrpLysTrp ₂ ProGlyIlePheAspNH ₂	0,5	5,7	(Nagai <i>et al.</i> 2000)
Thioflavine T (ThT) ³		> 100	2,7 - 16,1	(Heiser <i>et al.</i> 2000) (Chen <i>et al.</i> 2002)

¹ CI₅₀ est la concentration inhibitrice de 50% de l'agrégation

² K_d est la constante de dissociation

³ Noyau benzothiazole représenté en rouge

I.7.1. Rouge de Congo

Le rouge de Congo a une structure particulièrement intéressante. Il est constitué en son centre d'un noyau biphényle, ce qui induit une interaction stérique entre les protons en position ortho, provoquant ainsi une torsion entre les deux phényles. Toutefois, de part et d'autre des groupements phényles se trouvent des unités planaires où peut se produire une délocalisation électronique. Cette délocalisation diminue le nombre de degrés de liberté de rotation de 5 à un seul, ce qui entraîne une augmentation de la rigidité du RC. Des études calorimétriques, de RMN et de dynamique moléculaire ont montré que le RC préfère éviter la conformation *cis* (Γ) dans laquelle il y a une forte répulsion électrostatique entre ses deux groupes sulfates (chargés négativement) pour adopter la conformation *trans* (N) qui est plus stable. De plus, à cause de son caractère planaire et lipophile, il a tendance à former, par empilement dû aux interactions π (π -stacking), une pseudomicelle de 8 molécules en milieu aqueux. Dans cette micelle, les molécules *trans* (N) peuvent adopter deux types de conformation l'une par rapport à l'autre, parallèle ou antiparallèle. Lorsque l'empilement serait parallèle (NN), il y aurait interaction électrostatique répulsive entre les groupements sulfates. Ainsi, l'empilement antiparallèle (NI) serait plus stable. De plus, toujours afin de minimiser la répulsion électrostatique, la pseudomicelle de RC aurait un empilement torsadé d'un angle de 13 degrés entre chaque molécule (Skowronek *et al.* 2000; Roterman *et al.* 2001; Stopa *et al.* 2003). Cet arrangement, avec une cage de solvant aqueuse de 5 Å, est représenté après minimisation par lieu de plus grande pente (*steepest descent*) avec le champ de force à valence consistante (CFF91) avec 10000 itérations et un critère de convergence défini par un RMSD < 0,01 Å (Figure I-9) (Maple *et al.* 1994; Maple *et al.* 1998).

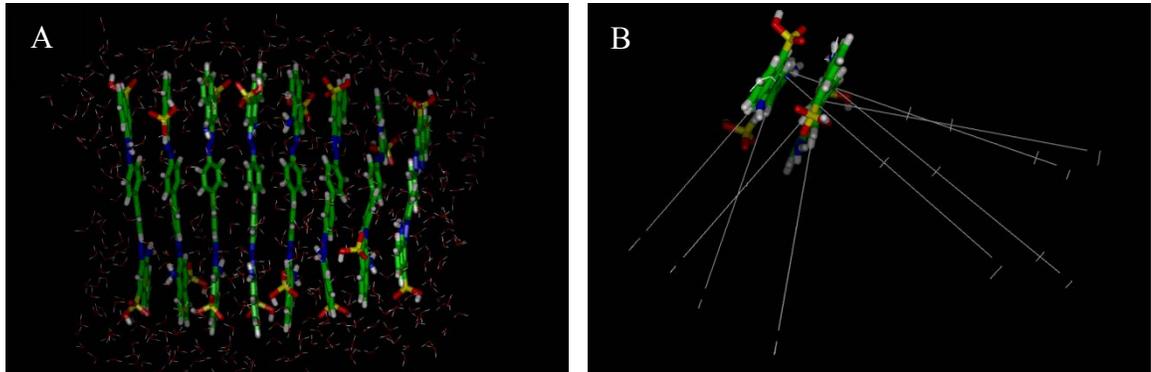


Figure I-9. Représentation de la pseudomicelle de RC. **A**, avec des paramètres de translation (T) et de rotation (R) dans un référentiel cartésien tel que $(T_x, R_z, T_z) = (0, -13^\circ, 4 \text{ \AA})$; **B**, attribution des axes aux groupements phényles séparés par le seul degré de liberté de rotation.

L'association du RC sous forme de micelles en fait un ligand non standard. Une étude par résonance plasmonique de surface utilisant la protéine de fusion thiorédoxine-Gln₆₂ a, à cet effet, proposé deux modes de liaison du RC par rapport à la concentration micellaire critique (CMC), déterminée à 3 μM . Lorsque la concentration du RC $<$ CMC, une liaison spécifique se produirait et le K_d serait de 0,73 μM , alors que lorsque la concentration du RC $>$ CMC, le type de liaison serait non spécifique avec un $K_d >$ 10 μM (Okamoto *et al.* 2009). La concentration de RC inhibant 50% de l'agrégation (CI_{50}) de la Gln₅₁ (clivée de la GST) a été déterminée être 20 μM (Heiser *et al.* 2000).

Le mode de liaison du RC sur les fibrilles amyloïdes fait toujours l'objet d'études. Il a été proposé qu'il puisse s'insérer entre les feuillets β et ainsi inhiber l'agrégation. Lors de l'étude du fragment Htt-exon 1 (Gln₄₄) par microscopie à force atomique, il a été suggéré que le RC pourrait agir au niveau des protofibrilles en empêchant leur association ultérieure en fibrilles matures (Poirier *et al.* 2002). Le RC pourrait également inhiber la capsase, préserver une synthèse normale des protéines et augmenter la clairance des polyglutamines *in vitro*, alors qu'il augmenterait la survie et diminuerait les symptômes

moteurs chez la souris R6/2 (Sanchez *et al.* 2003). Cependant, puisqu'il ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique, la seule thérapie envisageable serait par voie intra-thécale (Wood *et al.* 2007).

I.7.2. Le tréhalose

Le tréhalose est constitué de deux molécules de glucose liées entre elles par un lien α -1,1-glycosidique. Il y a 40 ans, le tréhalose était vu comme une forme de stockage de glucose. Sa perception a beaucoup changé depuis car on s'est aperçu qu'il avait plusieurs rôles. Il est en effet synthétisé par plusieurs organismes en réponse à différents stress environnementaux, probablement pour éviter une dégradation protéique. Le tréhalose serait un kosmotrope, c'est-à-dire qu'il stabilise les protéines dans leurs structures natives (Jain et Roy 2009). Il a été montré *in vitro*, par turbidimétrie de la Mb-Gln₃₅, que le tréhalose inhibe l'agrégation. Un effet positif aurait également été démontré *in vivo* chez des modèles cellulaires et chez la souris R6/2 (Tanaka *et al.* 2004; Tanaka *et al.* 2005). Le tréhalose serait également efficace chez le peptide amyloïde et la protéine prion (Jain et Roy 2009).

I.7.3. Le peptide 1 liant la polyglutamine

Le QBP1 a été identifié avec un criblage par exposition sur phage (Nagai *et al.* 2000). Il a été ultérieurement déterminé que la séquence TrpLysTrpTrp suivie d'un espaceur et d'une séquence GluIlePhe était nécessaire pour l'inhibition de l'agrégation de la polyGln (Ren *et al.* 2001). Une valeur de IC₅₀ de 0,5 μ M et un K_d de 5,7 μ M ont été déterminés pour le QBP1 (Nagai *et al.* 2000; Okamoto *et al.* 2009). Il a été suggéré, en utilisant la thiorédoxine-Gln₆₂, que le QBP1 inhibe la transformation de l'hélice α en feuillet β (Nagai *et al.* 2007).

I.7.4. La thioflavine T

La ThT est un ligand qui possède un noyau benzothiazole, un élément structural retrouvé chez les plus puissants inhibiteurs d'agrégation identifiés (Heiser *et al.* 2002). Toutefois, la ThT n'est pas un bon inhibiteur d'agrégation ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$), mais elle a la particularité de permettre le suivi de l'agrégation par fluorescence (Heiser *et al.* 2000). Le K_d de la ThT varie de 2,7 à 16,1 μM selon la structure primaire des peptides de polyGln étudiés (Chen *et al.* 2002) (Tableau I-5). L'affinité de la ThT, chargée positivement, diminue lorsque la charge nette (positive) des peptides de la polyGln augmente.

Tableau I-5. Affinité de la thioflavine T pour la polyGln à pH physiologique

Structure	Charge nette (e)	K_d (μM)
HAsp ₂ Gln ₁₅ Lys ₂ OH	0	2,7
HAspLys ₂ Gln ₁₅ AspLys ₂ OH	+ 2	7,2
HLys ₂ Gln ₁₅ Lys ₂ OH	+ 4	11,9
HLys ₂ Gln ₂₀ Lys ₂ OH	+ 4	5,6
HLys ₂ Gln ₂₈ Lys ₂ OH	+ 4	16,1
HLys ₂ Gln ₃₃ Lys ₂ OH	+ 4	16,0
HLys ₂ Gln ₃₇ Lys ₂ OH	+ 4	14,9

I.8. Problématiques associées à l'étude des peptides de polyGln

L'utilisation de peptides de Gln pour l'étude des maladies liées aux polyGln est limitée par différents biais, essentiellement causés par les résidus autres que la glutamine. En effet, la structure secondaire, les cinétiques d'agrégation et l'affinité pour de potentiels agents thérapeutiques sont altérées. Ceci peut conséquemment compromettre la compréhension du mode d'action des chaperons moléculaires et retarder la découverte d'une thérapie pour les patients atteints des maladies liées aux polyGln.

I.9. Objectifs du projet

Dans ce projet, nous avons voulu développer une stratégie pour étudier des peptides de polyGln et leurs interactions avec des chaperons chimiques en s'affranchissant des biais causés par des résidus radicalement différents de la Gln.

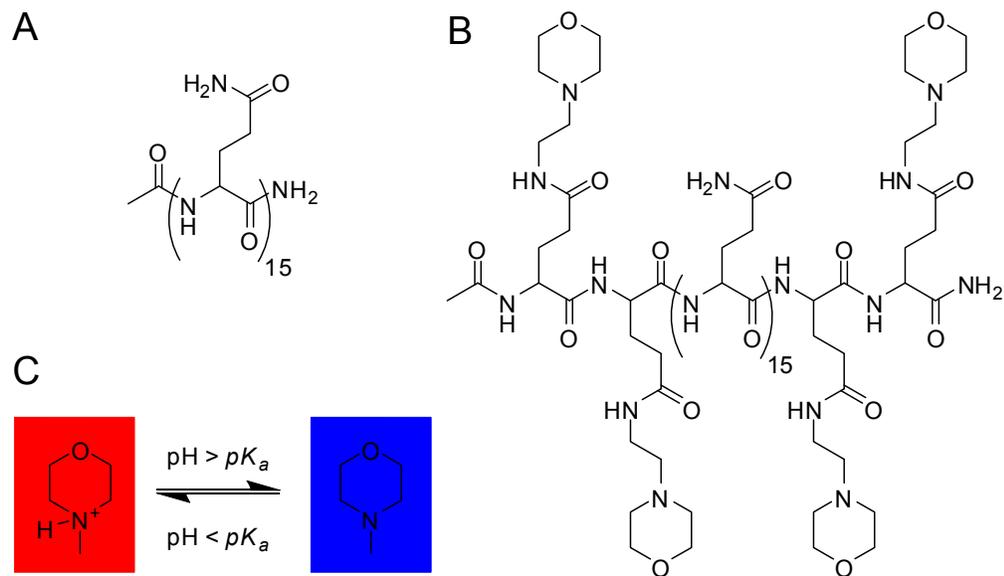


Figure I-10. Structure des peptides de polyGln étudiés. **A**, peptide neutre AcGln₁₅NH₂ (**11a**); **B**, peptide porteur de charges labiles Ac[Glu(AEM)]₂Gln₁₅[Glu(AEM)]₂NH₂ (**15**); **C**, variation des charges des unités morpholines de **B** en fonction du pH.

Pour ce faire, deux dispositifs expérimentaux ont été élaborés. Le premier est constitué de peptides de polyGln non chargés, c'est-à-dire acétylés en *N*-terminal et ayant une fonction amide en *C*-terminal. Ce peptide constitué uniquement de résidus de Gln et dépourvu de charges, doit permettre l'étude de la polyGln sous sa forme la plus pure. Le second système, est un peptide de polyGln bordé de résidus apparentés aux Gln, mais porteurs de charges labiles avec variation de pH (Figure I-10).

Les deux types de peptides étudiés ont d'abord été produits par synthèse sur support solide. Le peptide de polyGln neutre a, de plus, fait l'objet d'étude de solubilisation afin de permettre sa purification. L'étude de l'agrégation de ces peptides a été effectuée avec des techniques physicochimiques permettant l'étude de leur structure secondaire et de leur cinétique d'agrégation. Finalement, le peptide ayant des charges labiles a fait l'objet d'études en présence d'inhibiteurs d'agrégation tels que le RC, le QBP1, le tréhalose et la ThT.

I.10. Approches utilisées

Les différentes stratégies de synthèse et les techniques de caractérisation physicochimiques utilisées dans ce projet sont présentées dans les pages qui suivent. Il s'agit d'une base théorique, non-exhaustive, facilitant la compréhension des expériences, du traitement analytique et des résultats qui sont ultérieurement présentés.

I.10.1. Stratégies de synthèse et de protection

Deux stratégies de synthèse peptidique sur support solide (SPSS) peuvent être utilisées, linéaire (SPSSL) ou convergente (SPSSC). La SPSSL est la méthode classique qui consiste en l'introduction séquentielle de résidus Gln afin de produire des polyGln carboxamides ou avec un acide carboxylique en C-terminal pouvant être utilisés ultérieurement dans une stratégie de SPSSC. La SPSSC consiste en la condensation de segments polyGln ayant un acide carboxylique en C-terminal avec des segments de polyGln sur résine. Ces stratégies peuvent s'utiliser avec deux approches de protection différentes, minimale ou maximale. La protection minimale consiste en l'utilisation de résidus ou de segments de Gln n'ayant pas de protection sur la chaîne latérale, alors que la protection maximale utilise une protection des chaînes latérales. Lorsque la polyGln est synthétisée, elle est décrochée du support solide et doit être solubilisée pour être purifiée.

I.10.2. Solubilisation des polyglutamines

La solubilité d'un soluté dans différents solvants peut être décrite et prédite à l'aide de différents modèles théoriques. Ceux-ci se basent sur les interactions moléculaires solvant-solvant et soluté-solvant. Trois modèles sont applicables aux peptides, il s'agit de ceux de Catalan, de Gutmann et de Hansen.

Le modèle de Catalan permet de décrire la solubilité d'un peptide avec des échelles de propriétés des solvants, qui sont basées sur des paramètres comme leur acidité (SA), leur basicité (SB) et leur polarité/polarisabilité (SPP) (Catalan et Diaz 1999; Wypych 2001; Reichardt 2003). Cette échelle découle d'études spectroscopiques UV-Vis de colorants. Elle a été graduée en fonction de la variation de la longueur d'onde au maximum d'absorption du colorant dans divers solvants (effet solvatochromique). Récemment, le paramètre SPP a été décomposé en contribution de la dipolarité (SdP) et de la polarisabilité (SP) afin d'obtenir une description plus fine des interactions soluté-solvant (Catalan 2009).

Gutmann a effectué une gradation des solvants selon leur nucléophilicité (DN) (capacité à donner des électrons ou basicité de Lewis) et leur électrophilicité (AN) (capacité à accepter des électrons ou acidité de Lewis). Cette échelle a été développée par des mesures de variation d'enthalpie (ΔH) par calorimétrie ou par variation du déplacement chimique ($\Delta\delta$) par RMN de solutés de références dans différents solvants. La somme de ces deux propriétés (DN + AN) a été nommée constante amphotérique. Il s'est avéré que les peptides agrégés peuvent souvent être solubilisés par des solvants dont les valeurs de constante amphotérique sont élevées (Wypych 2001; Reichardt 2003; Malavolta et Nakaie 2004; Malavolta *et al.* 2006).

Le modèle de Hansen est une extension des paramètres de solubilité (δ) de Hildebrand. Les paramètres de Hildebrand sont une quantification de la densité d'énergie de cohésion qui mesure l'interaction solvant-solvant dans une mole de solvant. Cette énergie correspond à l'énergie molaire qui est nécessaire pour vaporiser une mole de

solvant à pression zéro et correspond à une valeur de δ^2 (cal/cm³). Les paramètres de solubilité de Hildebrand corrélerent et peuvent prédire la solubilisation de non électrolytes. Les valeurs de δ ne sont pas en lien avec l'interaction soluté-solvant, mais constituent plutôt l'énergie nécessaire pour créer une cavité à l'intérieur du solvant afin de solubiliser le soluté (Reichardt 2003). Hansen a développé un modèle qui permet de décrire la solubilité totale (δ_{totale}) à l'aide de la combinaison des interactions dispersives (δ_D), polaires (δ_P) et des ponts hydrogène (δ_H) (équation I-1).

$$\delta_{\text{totale}}^2 = \delta_D^2 + \delta_P^2 + \delta_H^2 \quad \text{équation I-1}$$

où les valeurs de δ sont des paramètres de solubilité caractéristiques de chacun des solvants (Wypych 2001; Hansen 2007).

La représentation tridimensionnelle (3D) des propriétés δ des bons solvants consiste en un volume à l'intérieur duquel le soluté est soluble, alors qu'à l'extérieur se trouvent les mauvais solvants. Ce volume est caractérisé par un rayon de solubilité (Ra) qui est utilisé pour prédire la solubilité de la polyGln (équation I-2).

$$(Ra)^2 = a(\delta_D - \delta_{D0})^2 + b(\delta_P - \delta_{P0})^2 + c(\delta_H - \delta_{H0})^2 \quad \text{équation I-2}$$

La solution de cette équation permet de définir la sphère et le Ra de solubilité pour les polyGln. Selon les contraintes sur les constantes a, b et c, il est possible d'obtenir une sphère ou une ellipse de solubilité.

Les trois modèles présentés sont certes utiles, mais ils sont limités par un domaine d'application restreint aux solvants purs. Toutefois, certaines molécules, dans le solvant, peuvent aider à la solubilisation. Celles-ci font l'objet d'une description dans la section suivante.

I.10.2.1. Solubilisation aqueuse à l'aide d'adjuvants

Certains adjuvants en milieu aqueux peuvent stabiliser ou déstabiliser les protéines et les peptides en solution. On y retrouve plusieurs molécules (Schein 1990; Bolen 2004)

dont celles qui constituent la série de Hoffmeister (Figure I-11) (Cacace *et al.* 1997; Chen *et al.* 2006). Hoffmeister, en 1888, a classifié des sels selon leur concentration minimale pour stabiliser ou déstabiliser les protéines en milieu aqueux. Cette classification, nommée série de Hoffmeister, a éventuellement été étendue aux molécules organiques. À l'extrémité du spectre se trouvent les espèces kosmotropes qui peuvent augmenter la tension de surface, rendant ainsi plus difficile la création d'une cavité dans l'eau pour solubiliser le peptide, causant une précipitation ou une agrégation. De plus, les agents kosmotropes diminuent la dénaturation et stabilisent les structures natives. À l'autre extrémité se trouvent les espèces chaotropes qui aident à la solubilisation en favorisant les ponts H avec les espèces en solution aux dépens des ponts H entre peptides. Ces espèces peuvent donc être un atout dans la solubilisation des polyGln.

Kosmotropes	Chaotropes
$\text{CO}_3^{2-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{S}_2\text{O}_3^{2-} > \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$	
$(\text{CH}_3)_4\text{N}^+ > (\text{CH}_3)_2\text{NH}_2^+ > \text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$	
$(\text{CH}_3)_3\text{N}=\text{O}, (\text{HO}-\text{CH}_2)_2\text{CH}-\text{OH}$	$(\text{NH}_2)\text{C}=\text{O}, (\text{NH}_2)\text{C}=\text{NH}$

Figure I-11. Série de Hoffmeister étendue aux substances organiques.

I.10.2.2. Solubilisation directe et indirecte

La solubilisation directe consiste à mettre en contact les polyGln avec un solvant donné, sans traitement préalable pouvant améliorer la solubilité. Par exemple, la solubilisation directe de la Htt dans l'acide formique a déjà été décrite (Hazeki *et al.* 2000).

La solubilisation indirecte consiste quant à elle en un prétraitement des polyGln afin de favoriser leur solubilisation. Un protocole de solubilisation indirecte en milieu aqueux a été décrit en utilisant un mélange TFA/HFIP (50/50; v/v) et plusieurs cycles d'évaporation du solvant avec un jet d'azote. Ce protocole est utilisé pour solubiliser le peptide β -amyloïde et a permis de préparer des solutions aqueuses de HLys₂Gln₄₄Lys₂OH (Chen et

Wetzel 2001). Le mode d'action du mélange TFA/HFIP n'est pas élucidé, mais les auteurs proposent qu'il puisse briser la structure interne des agrégats de polyGln.

I.10.3. **Caractérisation physicochimique des polyGln**

Différentes méthodes physicochimiques ont été utilisées afin d'étudier l'agrégation et la structure secondaire de la polyGln. Parmi celles-ci se trouvent la diffusion dynamique de la lumière et la spectroscopie RMN qui permettent d'évaluer la taille des particules en solution et leur structure secondaire, le dichroïsme circulaire de même que la spectroscopie Raman qui permettent l'étude de la structure secondaire et finalement la spectrophotométrie UV-visible et la microscopie optique polarisée qui permettent d'étudier le caractère fibrillaire de la polyGln. Ces techniques seront décrites dans les pages qui suivent.

I.10.3.1. **Diffusion de la lumière**

I.10.3.1.1. Mouvement brownien

Le produit de la constante de Boltzmann par la température ($K_B T$), définit l'énergie thermique contenue dans un système et est responsable du mouvement des particules. Il peut être démontré que le déplacement stochastique de chaque particule, dans un espace 3D, entre les temps $t = 0$ et $t = t$ se définit comme suit (équation I-3):

$$\langle [\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(0)]^2 \rangle = \langle \Delta \mathbf{r}^2 \rangle = 6D_s t \quad \text{équation I-3}$$

où \mathbf{r} est la position et D_s est le coefficient d'autodiffusion de chacune des particules. Toutefois, dans les solutions concentrées, le déplacement des particules est influencé par celui de ses voisines. Ainsi, la diffusion de la lumière ne permet que l'obtention d'un coefficient de diffusion apparent ou mutuel (D_M). Lorsque la concentration (c) tend vers zéro, le coefficient de diffusion représente celui d'une seule particule (D_0) (Teraoka 2002).

Le coefficient de diffusion D_0 peut être lié à la taille de particules sphériques par l'équation de Stokes-Einstein (équation I-4):

$$D_0 = \frac{K_B T}{6\pi\eta R_S} \quad \text{équation I-4}$$

dans laquelle η est la viscosité, K_B est la constante de Boltzmann et T est la température absolue. Dans le cas de particules sphériques, le rayon de Stokes (R_S) équivaut au rayon hydrodynamique (R_H).

I.10.3.1.2. Fonction d'autocorrélation du champ électrique

Le champ électrique de la lumière diffusée (E), durant une période de temps τ , par les particules sphériques d'une solution monodisperse, peut être relié au coefficient de diffusion à l'aide d'une fonction d'autocorrélation ($g_1(\tau)$) (équation I-5):

$$\frac{\langle E_s^*(t) E(t+\tau) \rangle}{\langle E_s^*(t) E(t) \rangle} = g_1(\tau) = \exp(-\Gamma \tau) \quad \text{équation I-5}$$

où Γ est le taux de décroissance de $g_1(\tau)$ (Bloomfield et Lim 1978) et est défini par l'équation I-6.

$$\Gamma = D_M \mathbf{q}^2 \quad \text{où} \quad |\mathbf{q}| = \frac{4n_D \pi}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta_d}{2}\right) \quad \text{équation I-6}$$

D_M est le coefficient de diffusion mutuelle qui, utilisant l'équation de Stokes-Einstein, permet d'obtenir le rayon hydrodynamique. Le vecteur de diffusion, $|\mathbf{q}|$, décrit par la formule de Bragg, varie avec l'indice de réfraction du dispersant (n_D), la longueur d'onde incidente (λ_0) et l'angle de diffusion (θ_d). La dépendance angulaire θ_d de l'intensité de diffusion se produit lorsque les diffuseurs sont de diamètre $> \lambda_0/20$ (Rudin 1999).

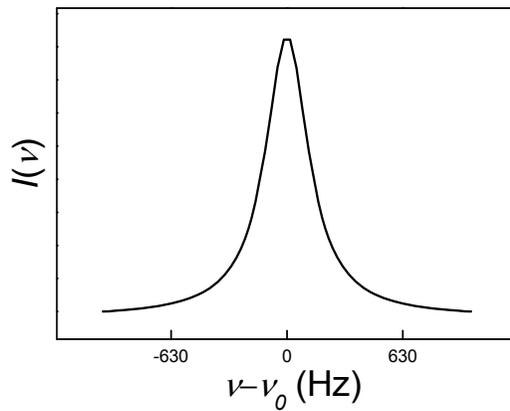
La fonction d'autocorrélation du champ électrique diffusé ($g_1(\tau)$) est accessible par des mesures d'intensité diffusée $I(\nu)$ autour de la fréquence incidente (ν_0) (équation I-7 et équation I-8). La diffusion étant élastique, l'étalement des fréquences est causé par le

mouvement brownien des particules (effet Doppler) (Figure I-12). Ceci explique pourquoi la diffusion quasi-élastique et la diffusion dynamique de la lumière sont des synonymes.

A

$$I(\nu) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{-2\pi i\nu\tau} g_1(\tau) d\tau$$

équation I-7



B

$$g_1(\tau) = 2\pi \int_{-\infty}^{+\infty} e^{2\pi i\nu\tau} I(\nu) d\nu$$

équation I-8

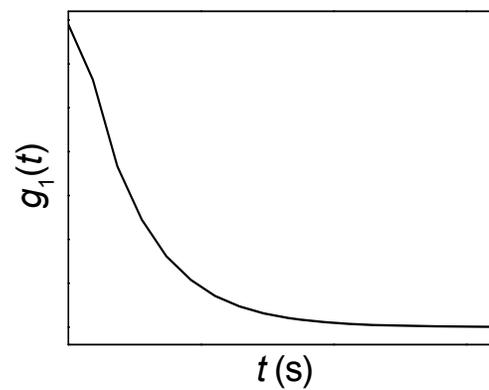


Figure I-12. **A**, Distribution d'intensité du champ diffusé autour de la fréquence incidente (ν_0) pour un système de particules de taille identique. **B**, Transformation de Fourier de **A**.

L'intensité diffusée est tributaire du champ diffusé ($g_1(\tau)$), mais également des fluctuations du nombre de particules dans le volume examiné. Ainsi, le détecteur fait la moyenne du produit des intensités diffusées aux temps $I(t)$ et $I(t+\tau)$, conduisant à une fonction d'autocorrélation $\langle I(t)I(t+\tau) \rangle$ (Figure I-13).

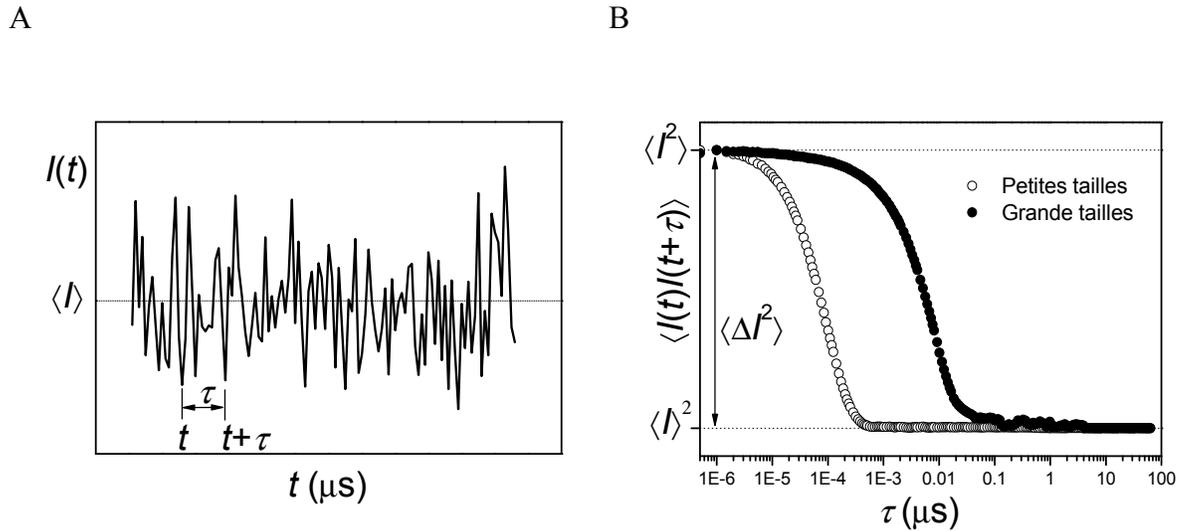


Figure I-13. **A**, Représentation des variations temporelles de l'intensité diffusée par un système de particules de taille identique.¹ **B**, Représentation des fonctions d'autocorrélation d'intensité diffusée variant avec la taille du diffuseur.

La fonction d'autocorrélation $\langle I(t)I(t+\tau) \rangle$ est accumulée sur une période de temps (T_A). En appliquant l'hypothèse ergodique, à l'effet que la moyenne effectuée sur un grand intervalle de temps ($T_A \rightarrow \infty$) est égal à l'ensemble des configurations du système, selon l'équation I-9 (Teraoka 2002) :

$$\begin{aligned} \langle I(t)I(t+\tau) \rangle &= G_2(\tau) = \lim_{T_A \rightarrow \infty} \frac{1}{T_A} \int_0^{T_A} I(t)I(t+\tau) dt \\ &= 1 + f_c g_2(\tau) \end{aligned} \quad \text{équation I-9}$$

¹ Le trait discontinu représente l'intensité diffusée moyenne $\langle I \rangle$.

En normalisant, on obtient la fonction d'autocorrélation d'intensité diffusée ($g_2(\tau)$) dans laquelle f_c est le facteur de cohérence de l'instrument. La fonction d'autocorrélation d'intensité diffusée est liée à la fonction d'autocorrélation du champ électrique selon la relation de Siegert par $g_2(\tau) = |g_1(\tau)|^2$. En résumé, la mesure de $g_2(\tau)$ permet donc de retrouver $g_1(\tau)$ afin de déterminer le coefficient de diffusion ainsi que le rayon hydrodynamique des particules (R_H).

I.10.3.1.3. Analyse des données

Pour les solutions de particules sphériques monodisperses, les données peuvent être directement analysées par l'équation I-3. Toutefois, les solutions polydisperses donnent une distribution continue de Γ et doivent donc être analysées selon l'équation I-10:

$$g_1(\tau) = \int_0^{\infty} G(\Gamma) \exp(-\Gamma\tau) d\Gamma \quad \text{équation I-10}$$

$$= \mathbf{G} \cdot \mathbf{K}$$

dans laquelle $G(\Gamma)$ représente la distribution pondérée en intensité comprenant une contribution de chaque Γ (Schärtl 2007). Cette distribution peut se représenter sous forme matricielle, dans laquelle \mathbf{G} est la matrice représentant les distributions de Γ et \mathbf{K} représente la variation temporelle de Γ .

I.10.3.1.3.1. Inversion de la transformée de Laplace

Mathématiquement, $|g_1(\tau)|$ est une intégrale de Fredholm de premier ordre ou une transformée de Laplace de $G(\Gamma)$. Ainsi, pour estimer $G(\Gamma)$, il faut prendre l'inverse de la transformée de Laplace (Provencher 1979).

I.10.3.1.3.2. Solution par cumulants

L'analyse par cumulants convertit la transformée de Laplace en série de MacLaurin autour de la moyenne des Γ (équation I-11):

$$\ln|g_1(\tau)| = K_0 - K_1\tau + \frac{K_2}{2!}\tau^2 - \frac{K_3}{3!}\tau^3 + \dots + (-1)^n \frac{K_n}{n!}$$

équation I-11

$$K_1 = \langle \Gamma \rangle = \int_0^{\infty} \Gamma G(\Gamma) d\Gamma$$

dans laquelle K_0 est un facteur d'amplitude, $K_2 = \langle (\Gamma - \langle \Gamma \rangle)^2 \rangle$ et $K_3 = \langle (\Gamma - \langle \Gamma \rangle)^3 \rangle$. K_1 permet de déterminer le coefficient de diffusion (moyen-Z) et le rayon moyen-Z inverse ($R_{H,1/Z}$) alors que le rapport K_2/K_1^2 correspond à l'index de polydispersité (PDI) (Dennis 1972). Ces variables sont obtenues par régression linéaire.

I.10.3.1.3.3. Solution par régularisation

La solution directe de la transformée de Laplace peut se faire par moindres carrés non négatifs d'un paramètre χ représentant l'accord entre les données expérimentales et la solution (équation I-12):

$$\chi^2 = \rho \|g_1 - \mathbf{K} \cdot \mathbf{G}\|^2$$

équation I-12

En minimisant χ , l'accord entre le modèle et les données expérimentales augmente. Un terme de pondération (ρ) proportionnel à l'intensité de corrélation est utilisé afin de mettre l'emphase sur les données fortement corrélées, à l'instar des données recueillies à des temps de corrélation plus élevés. Toutefois, l'algorithme peut devenir instable, osciller et donner des solutions irréalistes (Press 2007). C'est d'ailleurs pour aider à le stabiliser que la contrainte de non négativité a été utilisée et parce qu'une distribution négative de tailles n'a pas de sens physique.

Le problème peut être rendu encore plus stable par l'introduction d'un terme de régularisation (T_R) afin de donner une solution plus lisse et/ou probable. La pondération de T_R est effectuée avec un multiplicateur de Lagrange (i.e. paramètre de régularisation Λ ; $0 < \Lambda < \infty$). Ainsi, le choix de la meilleure solution se fait par une minimisation de $\chi(\Lambda)$ (équation I-13):

$$\chi^2(\Lambda) = \rho \|g_1 - \mathbf{K} \cdot \mathbf{G}\|^2 + \Lambda T_R \quad \text{équation I-13}$$

Lorsque la valeur de Λ est nulle, l'équation se simplifie en moindres carrés non négatifs. Ainsi, la meilleure solution représente toujours un compromis entre la solution la plus détaillée, la plus en accord avec les données expérimentales et la solution la plus lisse, stable ou probable (Press 2007). Les algorithmes disponibles diffèrent selon le choix du terme et du paramètre de régularisation afin de trouver la solution optimale. Parmi ceux-ci on retrouve ceux qui décomposent le problème en valeurs singulières (DynaLS) (Alango, Tirat Carmel, Israel) ou qui priorisent les solutions qui nécessitent le moins de lissage (GENDIST-REPES) (Jakes 1988) et ceux qui effectuent une inversion par régularisation avec contraintes (CONTIN) (Provencher 1979; Provencher 1982; Provencher 1982) et ceux intégrés au logiciel DTS de Malvern. De plus, il existe des méthodes qui permettent de trouver les solutions ayant un maximum d'entropie (SEDFIT) (Livesey *et al.* 1986; Schuck 2000). Seuls les trois derniers algorithmes seront discutés car les autres n'ont pas été utilisés.

I.10.3.1.3.3.1. Méthode des gradients

Cette méthode, utilisée par les programmes CONTIN et DTS, utilise un terme de régularisation (T_R) dans lequel le régularisateur (\mathbf{R}^n) est une dérivée du n ème ordre (équation I-14).

$$T_R = \|\mathbf{R}^n \cdot \mathbf{G}\|^2 \quad \text{où} \quad \mathbf{R}^n = \partial^n / \partial \Gamma^n \quad \text{équation I-14}$$

CONTIN permet des valeurs de n allant de 0 à 5. La valeur par défaut est $n = 2$, ce qui pénalise les solutions ayant des changements brusques de pente. L'utilisation d'une valeur de $n = 0$, transforme le problème en régression pseudo-orthogonale de Tikhonov, alors qu'une valeur de $n = 3$ tend à générer des oscillations et n'est pas recommandée. Le DTS utilise une valeur de $n = 1$. Le désavantage de la régularisation par gradients est qu'il n'y a pas de sens physique justifiant l'utilisation de ce type d'opérateur plutôt qu'un autre (Nyeo et Chu 1989).

I.10.3.1.3.3.2. Méthode d'entropie maximale

L'entropie maximale découle de l'entropie thermodynamique telle que décrite par la mécanique statistique qui a été transposée à la théorie de l'information par Shannon (Jaynes 1957). L'entropie d'un système macroscopique (S), telle qu'une distribution de $G(\Gamma)$, est la somme de tous les états microscopiques (Γ) compatibles avec l'état macroscopique associé (Amato et Hughes 1991). Ceci est représenté par l'équation I-15:

$$T_R = S = - \int G(\Gamma) \ln G(\Gamma) d\Gamma \quad \text{équation I-15}$$

Ainsi, la maximisation de l'entropie (ou de l'incertitude) favorisera les solutions ayant une distribution large par rapport aux distributions étroites (Schuck 2000).

I.10.3.1.3.3.3. Paramètre de régularisation

Le paramètre de régularisation (Λ) est habituellement inconnu et est déterminé *ad hoc*. Les valeurs de Λ découlent d'un test $F(\Lambda)$ de Fisher entre les valeurs de χ^2 des solutions avec ($\Lambda > 0$) et sans régularisation ($\Lambda = 0$). SEDFIT demande à l'utilisateur de fixer $F(\Lambda)$. CONTIN détermine les solutions les plus parcimonieuses, principe selon lequel la meilleure solution sera la plus simple, i.e. la solution qui révèle la moindre quantité de détails qui n'étaient pas déjà connus ou attendus. Pour ce faire, CONTIN détermine une probabilité de rejet $P(\Lambda)$ basée sur les valeurs de $F(\Lambda)$, donnant ainsi le meilleur compromis entre un modèle stable et convenant aux données expérimentales. Le DTS permet le choix

entre l'analyse générale ($\Lambda = 0,01$) et l'analyse de distributions étroites et multiples ($\Lambda = 0,001$) selon la connaissance *a priori* du système étudié.

I.10.3.1.3.3.4. Pondération des fonctions d'autocorrélation

Le pondérateur (ρ) a pour but de minimiser la contribution de la ligne de base à la fonction de corrélation. Une pondération quadratique est utilisée par le DTS, alors que CONTIN permet le choix de la fonction de pondération. Aucune pondération n'est utilisée dans SEDFIT ($\rho = 1$).

I.10.3.1.3.3.5. Correction de la poussière

Les données peuvent être corrigées pour les interférences provenant de la poussière dans les liquides. Le DTS enregistre les fractions des fonctions d'autocorrélation ayant les plus faibles intensités de diffusion, minimisant ainsi la contribution des grosses particules telles que les poussières. Ainsi, le DTS n'effectue pas de correction supplémentaire de la poussière contrairement à CONTIN et SEDFIT qui permettent le choix de termes de correction.

I.10.3.1.4. *Distribution de la taille des particules*

Les distributions des tailles des particules obtenues par l'analyse des fonctions d'autocorrélation sont pondérées en intensité de diffusion. Toutefois, l'intensité diffusée varie selon le rayon du diffuseur à la sixième puissance, ce qui biaise les distributions obtenues. Ainsi, l'aire sous les pics associés aux grosses particules est surestimé. Il est possible, à l'aide de la théorie de Mie (Hulst 1981), de transformer les distributions pondérées en intensité en distributions pondérées en volume ou en nombre. Des particules de tailles différentes peuvent en théorie être résolues lorsque leurs tailles diffèrent d'un facteur de 1,7.

I.10.3.1.5. Tailles des polyGln

La taille des polyGln dans leur grand axe (Tableau I-6) peut être obtenue avec l'axe principal des structures cristallographiques de HAsp₂Gln₁₅Lys₂OH rapportées (Sikorski et Atkins 2005) ou par une estimation avec des paramètres propres aux structures secondaires (Copeland 2000). Ces tailles varient en fonction de la structure secondaire et elles peuvent contribuer à déterminer la structure des monomères en solution.

Tableau I-6. Tailles estimées des monomères de polyglutamines selon leur structure

Structure	Taille estimée (nm)		Taille rapportée (nm)
	11a	15	HAsp ₂ Gln ₁₅ Lys ₂ OH
Hélice α	2,25	2,85	-
Feuillet β	5,1	6,46	7,1
Épingle β	-	-	3,6

I.10.3.1.6. Applications de la diffusion de la lumière aux polyGln

La diffusion dynamique permet donc l'étude de la taille des polyGln par obtention du coefficient de diffusion apparent ou par rayon hydrodynamique. Il est également possible d'étudier la variation de taille en utilisant d'autres paramètres tels que la variation de l'intensité diffusée ou la variation de l'index de polydispersité. Cette dernière approche a d'ailleurs été utilisée chez la GST-Htt (Georgalis *et al.* 1998).

La diffusion de la lumière est particulièrement utile afin d'effectuer des cinétiques d'agrégation, c'est-à-dire la mesure de la taille en fonction du temps. Ces données permettent d'étudier le processus d'agrégation à l'aide de la théorie des fractales. Ceci permet d'obtenir des informations sur le mécanisme d'agrégation (DLCA ou RLCA), sur la structure secondaire et les interactions des espèces étudiées avec le solvant (Dewey 1997; Gregory 2005; Heitjans et Kärger 2005). En effet, le rayon hydrodynamique (R_H) de

l'agrégat est cinétiquement lié au temps (t) à la puissance $1/D_f$ (dimension fractale) tel que représenté dans l'équation I-16.

$$R_H = t^{\frac{1}{D_f}} \quad \text{équation I-16}$$

Des expériences et des simulations ont montré que les agrégats formés par le mécanisme DLCA ont une $D_f \approx 1,8$ alors que ceux formés selon le mécanisme RLCA ont une $D_f \approx 2,1$ (Lin *et al.* 1989; Hemker et Frank 1990; Ju *et al.* 1992; Georgalis *et al.* 1998). De plus, les structures en hélice α ont une $D_f = 2,6$, alors que les structures en feuillet β (ou un mélange hélice α et feuillet β) ont une $D_f = 3,3$. De plus, l'interaction entre un polymère et le solvant dans lequel il est solubilisé, selon la théorie de Flory-Huggins, est décrite par les dimensions fractales. Ainsi, dans un solvant idéal, le polymère a une structure plus lâche, avec un $D_f = 2,0$, alors que dans un mauvais solvant, il est compact et a une $D_f = 3,0$ (Dewey 1997).

I.10.3.2. Concepts de spectroscopie RMN

I.10.3.2.1. Généralités

La description d'un phénomène depuis longtemps connu, la résonance magnétique, se fit simultanément par deux scientifiques indépendants, Bloch et Purcell. (Bloch et Hansen, 1946; Purcell *et al.* 1946) Les principes qui servent à expliquer la RMN proviennent de deux théories, la mécanique classique (Newton) et la mécanique quantique (Schrödinger). Ces deux théories seront utilisées, car elles possèdent chacune des avantages quant à l'explication des principes de résonance magnétique.

La plupart des noyaux possèdent un moment angulaire intrinsèque \vec{P} . Selon la description classique, un noyau atomique est décrit comme étant sphérique, et tourne autour d'un axe. Les considérations de mécanique quantique montrent que son moment angulaire est quantifié selon l'équation I-17 (Levitt 2001).

$$\vec{P} = \sqrt{I(I+1)}\hbar \quad \text{équation I-17}$$

Ici, $\hbar = h/2\pi$, où h est la constante de Planck et I le nombre quantique du moment angulaire ou spin nucléaire. Le spin nucléaire a des valeurs multiples de $\frac{1}{2}$ dans l'intervalle de 0 à 6. Le moment angulaire \vec{P} est associé à un moment gyromagnétique $\vec{\mu}$. Tous deux sont des quantités vectorielles et sont proportionnels entre elles tel que montré par l'équation I-18.

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{P} \quad \text{équation I-18}$$

La constante de proportionnalité est γ , le rapport gyromagnétique, qui est propre à chaque élément et ses isotopes (Tableau I-7). La sensibilité d'un noyau en RMN est proportionnelle à sa valeur de γ .

Lorsqu'un noyau est placé dans un champ magnétique statique \vec{B}_0 , créé par l'aimant de l'appareil de résonance magnétique, il s'oriente de façon à ce que son moment angulaire prenne une valeur multiple de \hbar (équation I-19).

$$\vec{P}_z = m\hbar \quad \text{équation I-19}$$

où m est le nombre quantique magnétique qui prend un nombre de $2I + 1$ valeurs entières de I sur l'intervalle $[I, -I]$. Le moment magnétique $\vec{\mu}$ selon la composante Z est donné par l'équation I-20.

$$\vec{\mu}_z = m\gamma\hbar \quad \text{équation I-20}$$

Dans la représentation classique, les dipôles nucléaires font précession autour de l'axe Z , à une fréquence de Larmor (ν_L) (équation I-21 et Figure I-14).

$$\nu_L = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| B_0 \quad \text{équation I-21}$$

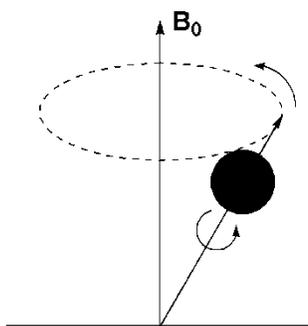


Figure I-14. Noyau en précession à la fréquence de Larmor dans le champ magnétique principal \vec{B}_0 .

Tableau I-7. Propriétés des noyaux importants en RMN des peptides

Noyaux	m	Abondance naturelle (%)	γ (s ⁻¹ T ⁻¹)	ν_L (9,396 T) ²
¹ H	½	99,98	42,6	400
² H	1	0,016	6,5	61,4
¹³ C	½	1,1	10,7	100,58
¹⁴ N	1	99,6	3,1	28,90
¹⁵ N	½	0,36	4,3	40,53

L'énergie du noyau dans le champ magnétique est définie par l'équation I-22:

$$E = -\vec{\mu}_z \cdot \vec{B}_0 \quad \text{équation I-22}$$

² T, Tesla

Chacun des états énergétiques est un niveau de Zeeman et la différence d'énergie entre deux niveaux adjacents est donnée par l'équation I-23:

$$\Delta E = -m \gamma \hbar \vec{B}_0 \quad \text{équation I-23}$$

La distribution énergétique des noyaux est décrite par la statistique de Boltzmann. Pour un noyau avec $m = 1/2$, le rapport du nombre de noyaux qui occupent le niveau de plus haute énergie, N_β et de ceux qui occupent le niveau de plus faible énergie, N_α est donné par équation I-24:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\Delta E / k_B T} \approx 1 - \frac{\Delta E}{k_B T} \quad \text{équation I-24}$$

où k_B est la constante de Boltzmann et T est la température absolue en Kelvin.

Selon le modèle classique, pour un noyau avec $m = 1/2$ placé dans un champ \vec{B}_0 , sa composante selon l'axe Z est le vecteur de magnétisation macroscopique \vec{M}_0 (Figure I-15).

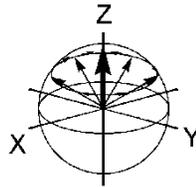


Figure I-15. Vecteur de magnétisation macroscopique. Le vecteur de magnétisation macroscopique \vec{M}_0 est la somme des composantes vectorielles de chacun des noyaux composant le système. La somme des composantes transversales, \vec{M}_X et \vec{M}_Y , respectivement, dans le plan X, Y est annulée. Il ne reste que la composante selon l'axe Z, \vec{M}_Z qui est parallèle au champ magnétique principal \vec{B}_0 .

Il se produira résonance lorsque les noyaux sont irradiés par une onde électromagnétique ayant une fréquence (ν_1) satisfaisant à l'égalité donnée par l'équation I-25.

$$h\nu_1 = \Delta E \quad \text{équation I-25}$$

Les transitions d'une basse énergie vers une haute énergie correspondent à une absorption énergétique tandis que l'inverse correspond à une émission énergétique.

Le processus d'irradiation s'effectue selon l'axe des X, à l'aide d'impulsions électromagnétiques provenant de l'antenne émettrice. Elles sont caractérisées par un temps d'impulsion, τ_p et une intensité. Le temps d'impulsion est inversement proportionnel à la plage de fréquences couverte par l'excitation. Cette plage s'appelle la fenêtre spectrale. L'intensité de l'impulsion sera modulée à la baisse lorsque sa fréquence ν_1 s'éloignera de la valeur du ν_L .

La composante magnétique \vec{B}_1 de l'irradiation électromagnétique alterne linéairement et peut être décrite comme étant la résultante de deux vecteurs ayant la même origine et amplitude, tournant en sens opposé à la fréquence de Larmor, ν_L . En changeant notre référentiel X, Y, Z en superposant l'axe X au vecteur tournant, X et Y sont devenus X' et Y' et tournent à la fréquence de Larmor. Les coordonnées de ce nouveau référentiel tournant sont X', Y', Z. La valeur de \vec{B}_1 demeure donc constante et tourne autour du vecteur de magnétisation macroscopique \vec{M}_0 . Une impulsion provenant de X' le fera basculer dans la plan Y', Z d'un angle θ_p défini par l'équation I-26.

$$\theta_p = \gamma \vec{B}_1 \tau_p \quad \text{équation I-26}$$

La production d'une composante \vec{M}_Y est essentielle pour la détection de signaux car l'antenne réceptrice est orientée selon l'axe Y'.

I.10.3.2.2. Relaxation et mouvements moléculaires

À l'instant où l'impulsion se termine, le vecteur \vec{M}_0 retourne à sa position initiale par un changement d'angle θ_p . Puisque \vec{M}_0 fait précession autour de l'axe des Z, le système possèdera des coordonnées \vec{M}_x , \vec{M}_y et \vec{M}_z qui varieront dans le temps. Lors du retour à l'équilibre, $\vec{M}_z = \vec{M}_0$ et $\vec{M}_x = \vec{M}_y = 0$. Cette relaxation a été décrite par les équations de Bloch (équation I-27 à l'équation I-29) (Bloch et Hansen, 1946).

$$\frac{d \vec{M}_z}{dt} = -\frac{\vec{M}_z - \vec{M}_0}{T_1} \quad \text{équation I-27}$$

$$\frac{d \vec{M}_{y'}}{dt} = -\frac{\vec{M}_{y'}}{T_2} \quad \text{équation I-28}$$

$$\frac{d \vec{M}_{x'}}{dt} = -\frac{\vec{M}_{x'}}{T_2} \quad \text{équation I-29}$$

Les paramètres T_1 et T_2 se nomment respectivement les temps de relaxation spin-réseau (ou longitudinal) et spin-spin (ou transverse). La variation des valeurs de T_1 et de T_2 sont décrites par la théorie des mouvements moléculaires (Bloembergen *et al.* 1948). Cette théorie fait appel au temps de corrélation τ_c , le temps requis pour qu'une molécule effectue une rotation d'un radian en fonction de la fréquence de résonance (Figure I-16).

L'agrégation des molécules en solution hausse le τ_c , ce qui conséquemment augmente le T_1 . Lorsque le temps de répétition entre deux impulsions ne permet pas la relaxation complète ($5 \cdot T_1$ pour un angle d'impulsion de $\pi/2$), une diminution de l'amplitude du signal se produit. De plus, la hausse du τ_c a également pour effet de diminuer le T_2 et donne lieu à un élargissement des signaux mesuré par la largeur à mi-hauteur ($\Delta\nu_{1/2}$) (Figure I-17) (Claridge 1999).

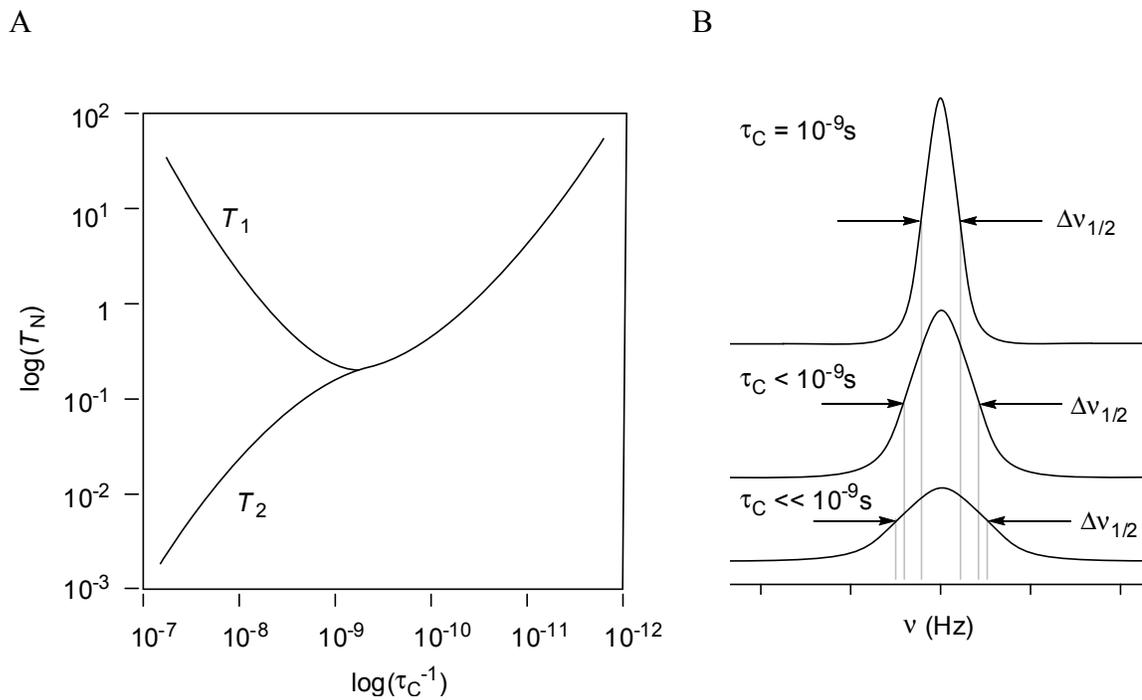


Figure I-16. **A**, Représentation de la variation des temps de relaxation T_1 et T_2 en fonction du temps de corrélation; **B**, Effets sur l'aire et la largeur des signaux à mi-hauteur ($\Delta\nu_{1/2}$).

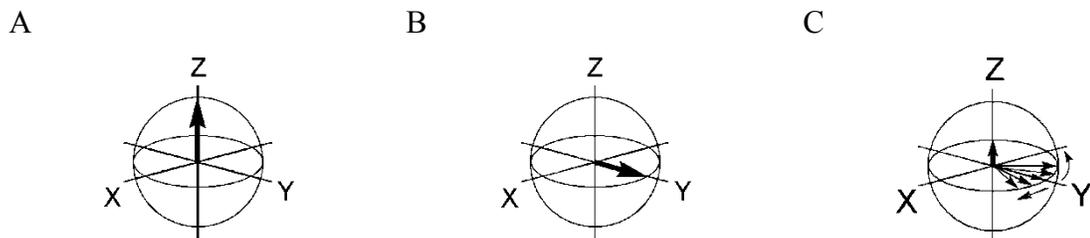


Figure I-17. **A**, avant chaque impulsion, le vecteur de magnétisation macroscopique est aligné avec le champ magnétique principal dans la direction longitudinale (+Z). **B**, l'impulsion de $\pi/2$ transforme toute la magnétisation longitudinale en magnétisation transverse. **C**, étalement des fréquences dans le plan transverse causé par le processus de relaxation T_2 .

Le signal enregistré provient de l'induction d'une force électromotrice dans la bobine réceptrice située dans l'antenne. La résultante est une diminution exponentielle de la magnétisation transverse (\mathbf{M}_{xy}) avec une constante de temps T_2 et une fonction périodique provenant de la précession. C'est le signal de précession libre (*FID – Free Induction Decay*). Un signal de précession libre contient beaucoup de fréquences si plusieurs signaux sont présents. L'application de la transformation de Fourier permet d'obtenir un spectre de fréquences.

I.10.3.2.3. Effet d'écran et déplacement chimique

Les informations recueillies dans une fenêtre spectrale sont dispersées selon leur déplacement chimique. Les noyaux étant entourés d'électrons, qui agissent comme un écran, ils ressentent un champ magnétique effectif (B_{eff}) décrit par l'équation I-30.

$$B_{eff} = (1 - \sigma)B_0 \quad \text{équation I-30}$$

Ici, σ est la constante d'écran qui dépend de l'environnement chimique du noyau observé. La fréquence de résonance change en fonction de σ tel que représenté dans l'équation I-31 et équation I-32.

$$\nu_1 = \frac{\gamma}{2\pi}(1 - \sigma)B_0 \quad \text{équation I-31}$$

où,

$$\sigma = \sigma_{dia} + \sigma_{para} + \sigma_N + \sigma_R + \sigma_e + \sigma_i \quad \text{équation I-32}$$

Ces termes sont respectivement les effets d'écran causés par le diamagnétisme (σ_{dia}), le paramagnétisme (σ_{para}), l'anisotropie des groupements voisins (σ_N), le courant cyclique (σ_R) dans les groupements aromatiques et les interactions intermoléculaires (σ_i) (ponts hydrogène, effets de solvant). Les signaux des divers groupements chimiques sont dispersés sur une échelle de déplacements chimiques (δ) en parties par millions (ppm)

indépendantes du champ magnétique utilisé. L'échelle est référencée avec l'acide 2-diméthyl-2-silapentane-5-sulfonique (DSS) à $\delta = 0$ ppm en milieu aqueux.

Les valeurs de σ variant avec la structure secondaire, cette dernière peut être déterminée avec les δ de la glutamine (Tableau I-8) (Williamson 1990; Spera et Bax 1991; Wishart *et al.* 1991; Wishart *et al.* 1992; Wishart et Sykes 1994; Wishart *et al.* 1995; Wishart et Case 2001).

Tableau I-8. Dispersion des déplacements chimiques isotropes de Gln vs DSS selon la structure

Noyau	Aléatoire	Hélice α	Feuillet β
	δ (ppm)	$\Delta \delta$ (ppm)	$\Delta \delta$ (ppm)
$^1\text{H}_\alpha$	4,33	-0,38	+0,38
$^1\text{H}_\beta$	2,12 / 1,99		
$^1\text{H}_\gamma$	2,36		
N- $^1\text{H}_\delta$	7,52 / 6,85		
N- ^1H	8,32	-0,19	+0,29
$^{13}\text{C}_\alpha$	55,7	+2,7	-2,0
$^{13}\text{C}_\beta$	29,4		
$^{13}\text{C}_\gamma$	33,7		
$^{13}\text{C}_\delta\text{O}$	180,5		
^{13}CO	176,0	+2,5	-1,0

En RMN de phase solide, l'étude de la structure des peptides par déplacement chimique isotrope se fait en utilisant des techniques visant à éliminer l'anisotropie, telle que la rotation à l'angle magique. Il est possible d'étudier le noyau ^1H avec une séquence à impulsions multiples et avec rotation (CRAMPS) ou par rotation rapide à l'angle magique (*fast magic angle spinning* (MAS)) et le noyau ^{13}C par polarisation croisée en rotation à

l'angle magique (CP-MAS) (Kricheldorf et Muller 1983; Shoji *et al.* 1996; Duer 2002; Saitô *et al.* 2006). Ainsi, l'étude du $^{13}\text{C}_\alpha$ de la Gln en phase solide a montré que les déplacements chimiques de 52,3, 54,0 et 56,8 ppm correspondent respectivement aux structures en feuillet β , aléatoire et hélicoïdale (Chan *et al.* 2005).

En solution, des études de corrélations homonucléaires entre ^1H séparés par des liaisons covalentes peuvent être effectuées par spectroscopie de corrélation simple ou totale (COSY ou TOCSY). Des corrélations hétéronucléaires (^1H - ^{13}C) peuvent être utilisées dont la corrélation à quanta multiples et la corrélation à zéro et double quantum optimisée pour le couplage avec liaisons multiples qui sont utiles pour déterminer le déplacement chimique des ^{13}C portant un ^1H et les ^{13}C quaternaires, respectivement. La distance interprotons peut être estimée par spectroscopie à effet Overhauser (NOESY) et ce dans le référentiel tournant (ROESY) (Claridge 1999).

Les techniques 2D sont beaucoup plus difficiles à effectuer en phase solide en raison de la rotation à l'angle magique. Ainsi, un nombre limité d'études de corrélations hétéronucléaires peuvent être utilisées, telles que le ^1H - ^{13}C 2D HETCOR (Ando et Asakura 1998; Ishii *et al.* 2001).

La variation du déplacement chimique avec la structure secondaire a été utilisée pour étudier la protéine de fusion myoglobine-polyglutamine (Mb-Gln_n, n = 0, 12, 28, 35 et 50), mais le profil spectral n'a pas changé suite à l'insertion de polyGln (Tanaka *et al.* 2001). L'étude de la protéine de fusion GST-Gln_n (n = 22 et 41) a montré que les déplacements chimiques isotropes (ppm) sont respectivement de 4,25 et 4,23 ppm pour les $^1\text{H}_\alpha$; de 56,3 et 56,7 ppm pour les $^{13}\text{C}_\alpha$ et de 176,3 et 176,7 ppm pour les ^{13}CO , correspondant à des structures aléatoires (Masino *et al.* 2002). Des protéines de fusion ^{15}N - (exon I du gène HD)-His₆ contenant des segments de Gln_n (n = 16, 25, 39, 46) ont montré que les ^1H -N des amides primaires et secondaires montrent une dispersion étroite des déplacements chimiques et correspondent à une structure secondaire aléatoire (Bennett *et al.* 2002).

I.10.3.3. Spectroscopie Raman

La diffusion Raman se produit lorsqu'une lumière incidente monochromatique (λ_0) entre en collision inélastique avec l'analyte. Il se produit alors des transitions entre les niveaux électroniques vibrationnels créant la diffusion d'une radiation de longueur d'onde dont la différence $\Delta\lambda$ est fonction des niveaux vibrationnels (Ferraro *et al.* 2003). Les fréquences recueillies permettent de déduire des informations structurales dans les peptides. La déconvolution de la bande amide I permet de quantifier l'hélice α ($\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$), les feuillets β ($\sim 1670 \text{ cm}^{-1}$), les coudes β (~ 1685 et $1695\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$) et les structures aléatoires ($\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$) (Susi et Byler 1988; Lefevre *et al.* 2007).

Une étude Raman de la protéine de fusion myoglobine-polyglutamine (Mb-Gln_n, n = 0, 12, 28, 35 et 50) n'a pas montré de changement du profil spectral avec des polyGln de différentes longueurs (Tanaka *et al.* 2001).

I.10.3.4. Absorption UV-Vis

La spectroscopie d'absorption UV-Vis est basée sur la loi de Beer-Lambert (équation I-33), selon laquelle la lumière est absorbée (A) lorsqu'elle traverse une solution de concentration (c) et ayant un coefficient d'extinction molaire (ϵ) sur un trajet d'une distance (l).

$$A = \epsilon cl \quad \text{équation I-33}$$

L'absorption de lumière crée une transition dans les niveaux électroniques et ceux-ci fluctuent avec l'environnement dans lequel se trouve le chromophore. Ainsi, le rouge de Congo est un chromophore qui permet d'objectiver la présence d'agrégats de type amyloïde lorsqu'il s'y lie. En effet, la soustraction du spectre du rouge de Congo de celui du complexe peptide-rouge de Congo produit une différentielle positive à 540 nm indicatrice d'agrégats de type amyloïde (Klunk *et al.* 1999; Nilsson 2004).

I.10.3.5. Dichroïsme circulaire

La lumière polarisée peut être décrite avec deux vecteurs d'égale intensité et tournant dans des directions opposées. Le dichroïsme circulaire prend naissance dans l'absorption différentielle de la lumière polarisée circulairement. L'absorption (A) de la lumière est décrite par la loi de Beer-Lambert. Les molécules chirales ont de particulier qu'elles ont des coefficients d'absorption pour la lumière polarisée circulairement vers la gauche (ϵ_g) et vers la droite (ϵ_d) tel que décrit par l'équation I-34:

$$\Delta\epsilon = (\epsilon_g - \epsilon_d) = (A_g - A_d)/cl \quad \text{équation I-34}$$

Il est possible de déterminer la fraction des structures secondaires présente lorsque la concentration des peptides en solution contribuant au signal n'est pas connue, comme dans le cas d'un peptide qui s'agrège. Une stratégie est l'utilisation du facteur d'asymétrie ou d'anisotropie (g) défini par Kuhn (équation I-35), dans lequel A est l'absorbance de la lumière non polarisée.

$$g = (A_g - A_d)/A \quad \text{équation I-35}$$

Le facteur g est une variable intensive, c'est-à-dire qu'il est indépendant de la concentration (c) et du trajet optique (l). De plus, il varie en fonction de la longueur d'onde et de la structure secondaire (McPhie 2001). La corrélation entre les spectres expérimentaux exprimés en facteur g et leur composition structurale (déduite à partir des coordonnées de *Protein Data Bank* (PDB) (Kabsch et Sander 1983)) permet de retrouver les spectres de référence. Cette méthode a été appliquée aux peptides et protéines amyloïdes (Figure I-18) (McPhie 2004; Lin *et al.* 2006).

Il est possible de déterminer le ratio des structures secondaires en minimisant la valeur de $\chi^2(\Lambda)$ (équation I-36 et équation I-37).

$$\chi^2(\Lambda) = \sum [\theta_M(\lambda) - \theta_{M,obs}(\lambda)]^2 + \Lambda T_R \quad \text{équation I-36}$$

$$\theta_M(\lambda) = \sum_{i=1}^n f_n X_n(\lambda) + C \quad \text{équation I-37}$$

L'ellipticité molaire à la longueur d'onde λ est $\theta_M(\lambda)$, f_n est la fraction du spectre de référence $X_n(\lambda)$ dans lequel se trouvent un nombre n de structures. T_R est un terme de régularisation et lorsque le paramètre de régularisation (Λ) est nul, l'équation devient une régression linéaire multiple (Greenfield 2004; Sreerama et Woody 2004). Lorsque la concentration n'est pas déterminée, cette équation peut s'utiliser avec des spectres de référence en ellipticité molaire (Figure I-18A) mais sans contraintes ($\sum f_n \neq 1$, $-\infty > f_n < \infty$ et $C \neq 0$). Des contraintes doivent toutefois être utilisées ($\sum f_n = 1$, $f_n \geq 0$ et $C = 0$) pour les analyses avec les spectres de référence en facteur g (Figure I-18B) (McPhie 2001; McPhie 2004). Lorsque $\Lambda > 0$ et que T_R est décrit par l'équation I-38, nous sommes en présence d'un problème de minimisation linéaire appliqué au dichroïsme circulaire qui peut être solutionné par CONTIN (Provencher et Glockner 1981).

$$T_R = \sum_{n=1}^n \left(f_n - \frac{1}{n} \right)^2 \quad \text{équation I-38}$$

Le programme CONTIN a été modifié pour effectuer une sélection variable de spectres de référence, nommé linéarisation locale (CONTINLL) (van Stokkum *et al.* 1990).

La sélection variable des spectres de référence suivie d'une association par décomposition en valeurs singulières constitue l'algorithme CDsstr (Sreerama *et al.* 1999), alors qu'une approche autocohérente est utilisée par SELCON3. Ces trois algorithmes, CONTINLL, CDsstr et SELCON3, sont retrouvés dans l'application CDPro (Sreerama et Woody 2004) qui a été adaptée pour utiliser des spectres de référence en facteur g (Baker et Garrell 2004).

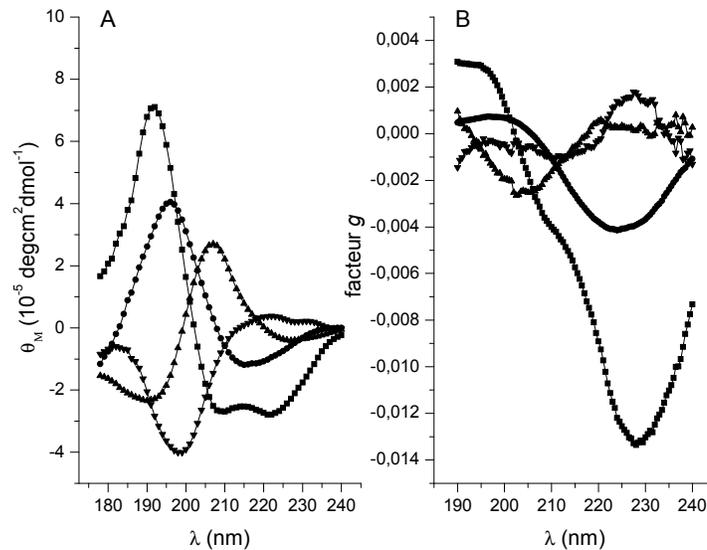


Figure I-18. Représentation des courbes associées aux différentes structures secondaires obtenues en dichroïsme circulaire. **A.** Spectres de référence de Brahms & Brahms (Brahms et Brahms 1980) en ellipticité molaire (θ_M).³ **B.** Spectres de référence amycomp.dat en facteur g (McPhie 2004).⁴

I.10.3.6. Microscopie optique polarisée

Le microscope optique polarisant est un microscope auquel on a ajouté un polariseur entre l'échantillon et la source lumineuse et un analyseur entre l'objectif et l'oculaire. Il permet d'étudier les matériaux anisotropes ou biréfringents. La biréfringence (B) est la différence entre l'indice de réfraction dans l'axe optique de l'échantillon et celui qui est perpendiculaire. L'intensité (I) de la lumière transmise dépend de l'épaisseur de l'échantillon (l) dans lequel la lumière incidente, d'une longueur d'onde λ , se décompose

³ ■, hélice α = myoglobine de sperme de baleine, corrigé pour la contribution des coudes et des structures aléatoires, dans 0,1 M NaF, pH 7; ●, feuillet β = poly(KL) dans 0,5 M NaF, pH 7; ▲, coude β = poly(A₂G₂) dans l'eau; ▼, aléatoire = poly(PKLLK) dans l'eau.

⁴ ■, hélice α ; ●, feuillet β ; ▲, coude β ; ▼, aléatoire, déterminés avec A β -(1-40), l'insuline, le polyE, le polyK et le polyT.

(équation I-39). Ceci produit un phénomène de retard (Bl) et une angulation (θ) entre l'axe optique de l'échantillon et celui de l'analyseur.

$$I \propto \sin^2(2\theta) \cdot \sin^2(\pi Bl/\lambda) \quad \text{équation I-39}$$

Il n'y a pas de lumière transmise lorsque le polariseur et l'analyseur sont en polarisation croisée ($\theta = \pi/2$) (Murphy 2001). L'utilisation d'une plaque retardatrice d'onde $\lambda/4$ permet de transformer la lumière polarisée linéairement en lumière polarisée circulairement et d'identifier des structures plus faiblement biréfringentes (Scharf 2007).

Le colorant le plus utilisé pour identifier la présence de dépôts amyloïdes est le rouge de Congo qui donne une coloration dichroïque vert-jaune-or en polarisation croisée (Nilsson 2004). L'étude des peptides chargés de type HLys₂Gln_nLys₂OH (n = 15, 28, 33, 37, 47) ne permet d'obtenir une coloration dichroïque qu'avec n = 47 (Chen *et al.* 2002), ce qui suggère des effets de charge sur la structure des polyGln.

Chapitre II – Matériel et méthodes

II.1. Synthèse du peptide de polyglutamine

II.1.1. Réactifs et solvants

Le α -fluorénylméthoxy-carbonyl-L-glutamine(γ -trityl) (Fmoc-Gln(Trt)), l'ester α -fluorénylméthoxy-carbonyl-L-acide glutamique (γ -*t*-butyle) (Fmoc-Gln(OtBu)), l'ester γ -*t*-butylique de α -fluorénylméthoxy-carbonyl-L-acide glutamique (Fmoc-Glu(OtBu)), le *N,N*-diisopropyléthylamine (DIEA) et l'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris(diméthylamino)-phosphonium (BOP) proviennent de Matrix Innovation Inc. (Montréal, QC). L'ester α -*t*-butylique de α -fluorénylméthoxy-carbonyl-L-acide glutamique (Fmoc-Glu-OtBu), l'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium (PyBOP), le *N*-hydroxybenzotriazole (HOBt) et la résine chlorure de 2-chlorotrityle (résine ClTrt-Cl, 1% DVB, 100-200 mesh) ont été obtenus de Calbiochem-Novabiochem Corp. (San Diego, CA). La résine chlorométhylpolystyrène-divinylbenzène (résine de Merrifield; 1% DVB; 200-400 mesh) a été achetée chez Bio-Rad (Mississauga, ON). Le α -fluorénylméthoxy-carbonyl-L-glutamine (Fmoc-Gln) et la résine hydrochlorure de 4-méthylbenzhydrylamine (MBHA.HCl, 0,57 mmol/g, 1% DVB, 100-200 mesh) ont été achetés chez Advanced Chemtech (Louisville, KY). Le α -*t*-butyloxy-carbonyl (Boc)-L-Gln, la résine hydrochlorure de 4-méthylbenzhydrylamine (résine MBHA, 0,8 mmol/g, 1% DVB, 100-200 mesh) de même que la résine 4-(2',4'-diméthoxyphényl)-Fmoc-aminométhyle)-phénoxyacétamido-norleucylaminométhyle (résine Rink Amide AM, 0,5 mmol/g, 1% DVB et 100-200 mesh) ont été achetés chez ChemImpex International (Wood Dale, IL). Le *N,N*-diméthylformamide (DMF), le dichlorométhane (DCM), l'éther diéthylique et l'acétonitrile (ACN) proviennent de Fisher Scientific (Ottawa, ON), l'acide fluorhydrique (HF) a été acheté chez Matheson Gas Products Inc. (Ottawa, ON) et l'acide trifluoroacétique (TFA) a été obtenu de Halocarbon (River Edge, NJ). L'anhydride acétique

a été acheté chez A & C American Chemicals Ltd. (Saint-Laurent, QC), tandis que le 4-(2-aminoéthyl)morpholine, le 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP, $\geq 99\%$), le 1-méthyl-2-pyrrolidinone (NMP) et tous les autres produits chimiques ont été obtenus de la compagnie Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

II.1.2. Synthèse peptidique et clivages

Tous les peptides ont été synthétisés à la température de la pièce avec un synthétiseur semi-automatique de conception locale. Deux stratégies de synthèse ont été étudiées simultanément : la synthèse peptidique sur support solide linéaire et convergente, nommées respectivement SPSSL et SPSSC. La stratégie de SPSSL ayant utilisé des Gln sans protection des chaînes latérales en combinaison avec la chimie Boc fait référence à l'approche avec protection minimale, alors que la chimie Fmoc ayant utilisé des résidus Gln avec des groupements protecteurs latéraux Trt fait référence à l'approche avec protection maximale. De façon similaire, la stratégie SPSSC utilisant des segments sans protection latérale fait référence à l'approche avec protection minimale, alors que l'utilisation de segments dont la totalité des chaînes latérales sont protégées fait référence à l'approche avec protection maximale.

II.1.3. Synthèse peptidique linéaire

La stratégie de SPSSL consiste en l'introduction séquentielle de résidus Gln afin de produire des polyGln carboxamide ou des polyGln avec un acide carboxylique en C-terminal, lesquels peuvent être utilisés ultérieurement dans la stratégie de SPSSC.

II.1.3.1. Approche avec protection minimale

Les peptides-COOH ont été produits avec la résine de Merrifield, alors que les peptides carboxamides ont été obtenus avec la résine MBHA. Le premier dérivé d'acide aminé (a.a.) Boc-Gln a été attaché sur la résine de Merrifield selon la méthode du sel de césium (Wang *et al.* 1977). Le taux de substitution (0,65 mmol/g) a été déterminé par

colorimétrie à l'acide picrique (Gisin 1972). Les cycles de couplage étaient composés de (i) déprotection avec 40% (v/v) TFA/DCM pour 20 min, (ii) neutralisation accomplie par le lavage successif de la résine avec DCM, EtOH, 1%(v/v) DIEA/DMF et DMF pour des périodes de 2 min, (iii) couplage avec 3 équivalents de résidu activé BOP-Gln et 5 équivalents de DIEA (Forest et Fournier 1990) dans 10% (v/v) de *N*-méthylpyrrolidone (NMP)/DMF pour 1 h, (iv) drainage de l'excédent de réactifs par lavage au DMF (2 x 2 min) et DCM (2 x 2 min) suivi (v) d'un test à la ninhydrine permettant une évaluation de la complétion du couplage (Kaiser *et al.* 1970). Avant le clivage, les complexes peptide-résine ont été lavés successivement avec DCM, EtOH, DCM, Et₂O et séchés *in vacuo* pour la nuit. Un système de clivage au HF du Peptide Institute Inc. (Osaka, Japon) a été utilisé pour cliver les complexes peptide-résine avec l'acide fluorhydrique (HF) fraîchement distillé à partir d'un vaisseau contenant du CoF₃. De l'éthanthiol et du *m*-crésol ont été ajoutés au réacteur afin de capter les carbocations (10 mL/g résine). La réaction s'est déroulée durant une période de 1 h à 0°C avec agitation magnétique. Le HF a été rapidement évaporé et la résine a été lavée au diéthyléther. Le peptide brut a été extrait avec du TFA et précipité avec de l'éther diéthylique après évaporation du TFA.

II.1.3.2. Approche avec protection maximale

Les segments ayant un acide carboxylique en *C*-terminal ont été produits sur une résine CITrt alors que la synthèse du segment ayant un carboxamide a utilisé une résine Rink AM. Le taux de substitution de la résine CITrt (0,64 mmol/g) a été déterminé par l'absorbance du Fmoc (290 nm) après un traitement à la pipéridine du premier acide aminé fixé à la résine (Gude *et al.* 2002). Pour ces synthèses, les cycles de couplage se composaient de (i) déprotection du Fmoc avec une solution 50% (v/v) pipéridine/DMF pour 10 min, (ii) élimination de la pipéridine par des lavages au DMF (3 x 2 min), (iii) couplage avec 3 équivalents de résidus FmocGln(Trt) activés au BOP (7) et 5 équivalents de DIEA (Forest et Fournier 1990) dans 10% (v/v) NMP/DMF, (iv) lavage avec du DMF (2 x 2 min) et du DCM (1 x 2 min) pour enlever l'excès de réactifs puis (v) test à la

ninhydrine (Kaiser *et al.* 1970). Les lavages des complexes peptide-résine ont été effectués tel que décrit précédemment pour l'approche avec protection minimale. Le clivage des complexes peptide-ClTrt résine a été effectué par deux traitements de 10 min avec une solution de 1% (v/v) TFA/DCM. Le TFA a été neutralisé par l'addition d'une solution de 10% (v/v) DIEA/méthanol suivie d'une réduction de volume par évaporation. Le fragment peptidique a été précipité avec de l'eau, récupéré et séché. Le clivage de la résine-peptide Rink AM a été effectué par un traitement de 2 h avec une solution TFA/phénol/eau (20 mL de réactifs/g de résine, 95/2,5/2,5; v/m/v). Les peptides ont été extraits en triturant la résine avec du TFA. Le matériel brut a été récupéré par précipitation avec de l'éther diéthylique après évaporation du TFA.

II.1.3.3. Synthèse peptidique convergente

La stratégie SPSSC a été utilisée afin d'évaluer la condensation de segments ayant un acide carboxylique en C-terminal avec des segments de polyGln sur résine. L'approche avec protection minimale a impliqué la condensation de segments *N*-Fmoc-polyGln synthétisés sur une résine de Merrifield et le peptide de polyGln *N*-déprotégé fixé sur la résine MBHA. Comme pour l'approche précédente, le segment *N*-Fmoc-[Gln(Trt)]_n synthétisé avec la résine ClTrt a été condensé avec les peptides de polyGln *N*-déprotégés fixés sur une résine Rink AM. Les réactions de condensation utilisaient typiquement 2 équivalents de segments activés au BOP par rapport au peptide-résine pour une période de 24 h. Les réactions ont été suivies par des tests à la ninhydrine et le clivage du complexe peptide-résine a été effectué selon le type de résine utilisée comme décrit précédemment.

II.2. Synthèse du peptide sensible au pH

II.2.1. Synthèse peptidique sur support solide

Généralement, le protocole décrit au deuxième chapitre a été utilisé. La production de fragments de dipeptides utilisés dans la stratégie de SPSSC a été effectuée en y attachant

le premier FmocGlu(OtBu) avec la méthode du sel de césium (Gisin, 1973; Wang *et al.*, 1977) sur une résine de Merrifield et le taux de substitution variait entre 0,48 et 0,59 mmol/g. Les groupements protecteurs OtBu ont été clivés avec une solution de TFA/phénol/eau (95/2,5/2,5; v/m/v) durant 1 h. Les couplages de l' aminoéthylmorpholine sur la chaîne latérale ont été effectués en utilisant le protocole BOP/DIEA pour 30 min et ont été suivis par un test au vert de Malachite (Attardi *et al.* 2000). Le clivage des complexes peptide-résine a été effectué au HF comme décrit précédemment.

II.2.2. Synthèse peptidique en solution

La production de FmocGlu(AEM)OH a été effectuée comme suit. À une solution de FmocGluOtBu (1,0 g, 2,35 mmol) dans différents solvants (NMP, TFE, pyridine, DMSO, THF-LiCl) (15 mL) est ajouté le *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (484 mg, 2,35 mmol) à la température de la pièce et dans des conditions anhydres. Le 2-aminoéthyl-4-morpholine a ensuite été ajouté goutte à goutte suivi de la (*N,N*-diméthylamino)pyridine (DMAP) (25 mg, 0,2 mmol). Après 2 h de réaction, le profil HPLC analytique montre la disparition à 90% de FmocGluOtBu et le FmocGlu(AEM)OtBu est présent (TR = 18,02 min, gradient de TFA/eau (0,06/99,94; v/v) à ACN/TFA/eau (30/0,06/69,94; v/v/v) en 30 min. La dicyclohexylurée (DCU) est retirée par filtration et le produit est concentré *in vacuo*. Une solution de 30 mL TFA/eau (95/5; v/v) est ajoutée au concentré et agitée à la température de la pièce durant 2 h. Le produit est concentré *in vacuo*, redissous dans l'acide acétique et lyophilisé. Le produit a été purifié par HPLC préparative avec un gradient linéaire de TFA/eau (0,06/99,94; v/v) à ACN/TFA/eau (40/0,06/59,94; v/v/v) en 2 h.

II.3. Purification des peptides

La solubilité de la polyGln brute dans des solvants organiques (ACN, benzène, *t*-butanol, DCM, dioxane, DMF, diméthylsulfoxyde (DMSO), hexafluoroisopropanol (HFIP), méthanol, *i*-propanol, pyridine, tétrahydrofurane) et des acides (acide acétique, TFA) a été évaluée qualitativement avec des aliquots de 2 mg dans 1

mL de solvant. La solubilisation dans un milieu aqueux a également été déterminée après une étape de lyophilisation.

Les conditions de purification en phase normale ont été évaluées sur phase régulière en utilisant la chromatographie sur couche mince avec des plaques de gel de silice. Une solution de polyGln (2 mg peptide/mL de 1% TFA/DCM) a été appliquée sur les plaques et une élution a été effectuée avec différents systèmes de solvants (100% ACN, 100% DCM, 100% MeOH, 100% *i*-PrOH, TFA/DCM (0,2/99,8; v/v), HFIP/ACN (10/90; v/v), MeOH/ACN (80/20; v/v) et MeOH/eau (80/20; v/v)). La purification par HPLC en phase inverse a été essayée avec une solution de peptide (0,2 mg peptide/mL de TFA/HFIP/H₂O (0,2/0,2/99,6; v/v/v)) en utilisant une colonne C₄ (300 Å, 10 µm, 250 mm x 4,6 mm) de Vydac (Hesperia, CA) ou une colonne Jupiter C₁₈ (300 Å, 5 µm, 250 mm x 4,6 mm) de Phenomenex (Torrance, CA). La purification a été finalement effectuée en utilisant une colonne Phenomenex Jupiter C₁₈ (300 Å, 15 µm, 250 mm x 21,2 mm) attachée à un système Varian ProStar (Palo Alto, CA) équipé de pompes modèle 215 et d'un détecteur UV-VIS modèle 320. Les peptides ont été élués avec un gradient linéaire de A (TFA/H₂O (0,2/99,8; v/v)) à B (TFA/ACN/H₂O (0,2/10/89,8; v/v/v)). Le débit a été maintenu à 10 mL/min et le produit a été détecté à 215 nm.

La pureté des fractions a été évaluée en utilisant un HPLC analytique Beckman (Fullerton, CA) avec un module à solvant modèle 128 et un détecteur photovoltaïque modèle 168. La séparation a été accomplie en utilisant une colonne Phenomenex Jupiter C₁₈ (300 Å, 5 µm, 250 mm x 4,6 mm). Le débit a été fixé à 1,0 mL/min et le gradient d'élution était composé d'une période initiale de 10 min en mode isocratique avec TFA/H₂O (0,06/99,94; v/v) suivie d'un gradient linéaire sur 15 min jusqu'à TFA/ACN/H₂O (0,06/30/69,94; v/v/v).

II.4. Études des structures primaires

II.4.1. Spectrométrie de masse

Les peptides ayant des masses supérieures à 500 Da ont été analysés par spectrométrie de masse avec un système Voyager DE de Applied Biosystems (Foster City, CA) utilisant une ionisation de type MALDI (*matrix-assisted laser desorption-ionization*) couplée à un analyseur de temps de vol de type TOF (*time-of-flight*) et une interface PerSeptive GRAMS/32. Un laser à l'azote (337 nm) avec un balayage à 20 impulsions/s et une matrice ionisante d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique ou d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque ont été utilisés (Beavis *et al.* 1992). Chaque spectre de masse a été enregistré en mode linéaire avec un potentiel d'accélération de 25 kV. Les masses obtenues ont été calibrées avec des références externes (angiotensine I, hormone adrénocorticotropique (ACTH) et insuline bovine). Les masses inférieures à 500 Da ont été analysées par SM à ionisation par jet d'électrons (ESI) à trappe ionique (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA).

II.4.2. Résonance magnétique

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) en phase liquide ont été enregistrés sur des appareils Bruker ARX 400 MHz ou Advance 400 MHz avec des sondes de 5 mm à bande large (BBO) ou à quatre noyaux (QNP - $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{19}\text{F}/^{31}\text{P}$) (Bruker Biospin Inc, Milton, ON). Des tubes RMN en borosilicate d'un diamètre 5 mm ont été utilisés (Wilmad, Vineland, NJ). La concentration des peptides était de 1,0 mg/mL (p/v) dans le TFA-d, TFE-d₃, et D₂O. Le pH a été ajusté avec du DCl et du NaOD. Les spectres de ^1H ont été acquis avec une séquence 1D et un angle d'impulsion (θ_p) de 30°. Les spectres de ^{13}C ont été acquis avec un $\theta_p = 30^\circ/135^\circ$ avec découplage du ^1H (Shaka *et al.* 1983). Les assignations ont été effectuées avec corrélations 2D homonucléaires ^1H - ^1H COSY (bibliothèque Bruker: cosygpqf), ^1H - ^1H TOCSY (dipsi2esgpph) (Bax et Davis 1985), ^1H - ^1H NOESY

(noesygpph) (Jeener *et al.* 1979; Wagner et Berger 1996) et hétéronucléaires ^1H - ^{13}C HMBC (inv4gplplrndqf) et ^1H - ^{13}C HMQC (inv4gpqf).

La rotation des tubes n'a pas été utilisée car le champ magnétique est suffisamment homogène. Une référence externe a été utilisée dans un tube coaxial contenant du tétraméthylsilane (TMS) dans le CDCl_3 ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$ $\delta = 0,048/2,66$ ppm) afin de ne pas contaminer le peptide (Wishart et Sykes 1994). Les spectres ont été transformés avec XWIN-NMR (v. 3,5) et analysés avec MestReC (Mestrelab Research, University of Santiago de Compostela, Espagne) ou SpinWorks (University of Manitoba).

II.4.3. Cinétique de formation de pyroglutamate

Le HGLn₁₅NH₂ produit par SPSSL en utilisant l'approche de protection maximale a été clivé et solubilisé dans un milieu aqueux comme décrit précédemment pour la purification des polyGln. Un pHmètre Radiometer PHM61 (Copenhague, DK) muni d'une électrode de verre Ag/AgCl (Canlab, Montréal, QC) a été utilisé pour mesurer le pH. Le changement de la concentration du peptide en fonction du temps a été suivi par HPLC analytique en phase inverse couplé à un détecteur à cellules photovoltaïques à 215 nm. La décroissance exponentielle de premier ordre des données a été évaluée par une régression non linéaire de Levenberg-Marquardt alors qu'une régression linéaire non pondérée a été utilisée pour les données exprimées sous forme réduite en utilisant Microcal Origin 6.0 (Northampton, MA).

II.5. Solubilisation des polyGln purifiées

II.5.1. Solubilisation directe

Une méthode de solubilisation non à l'équilibre a été employée. La dissolution des polyGln a été effectuée dans divers milieux à des concentrations de 1 mg/mL avec agitation suivie de traitement aux ultrasons (8852 de Cole-Palmer, Fisher Scientific, Springfield, NJ) pour une période de 15 min à la température ambiante. La solubilité a été déterminée par

observation de la turbidimétrie des solutions et la présence de précipité après centrifugation (15 min x 2990 g). La solubilité dans les divers solvants a été corrélée avec les propriétés des solvants selon les modèles de Catalan, de Gutmann et de Hansen (Catalan et Diaz 1999; Wypych 2001; Malavolta et Nakaie 2004; Malavolta *et al.* 2006; Hansen 2007; Catalan 2009). Le programme *Hansen solvent parameter 3D* (Hsp3D-MATLAB) (Western Research Institute, Laramie, WY) a été utilisé afin de représenter les paramètres de solubilité de Hansen.

II.5.2. Solubilisation indirecte

La désagrégation est effectuée par incubation du peptide dans le TFA (100%) ou l'acide formique (100%) (1 mg/mL) à la température ambiante et sous ultrasons pour une période de 90 min suivie de la lyophilisation (W.M. Welch Manufacturing Co., Chicago, IL) de l'acide. Les polyGln désagrégées ont été mises en solution dans différents solvants

II.6. Caractérisation physicochimique

II.6.1. Peptides étudiés

Les peptides AcGln₁₅NH₂ (**11a**) et Ac[Glu(AEM)]₂Gln₁₅[Glu(AEM)]₂NH₂ (**15**) ont été étudiés.

II.6.2. Mise en solution

II.6.2.1. Solubilisation

La solubilisation indirecte a été effectuée dans le TFA (1,0 mg/mL) et les polyGln désagrégées ont été mises en solution dans des solvants organiques ou dans l'eau à pH 4,0 (HCl).

II.6.2.2. Séparation des espèces réfractaires à la solubilisation

Une ultracentrifugeuse L-78M munie d'un rotor SW50,1C (Beckman, Mississauga, ON) a été utilisée. Les suspensions de peptides ont été centrifugées dans des tubes de polyallomères à parois minces (5,0 mL, 10,0 mm de diamètre) à 50 000 g durant une période de 3 h à une température de 4°C.

L'ultrafiltration des solutions des peptides a été effectuée avec un filtre à membrane inorganique de 10 mm de diamètre ayant des pores de 20 nm (Anatop Plus, Watham Inc., Florham Park, NJ).

II.6.3. Agrégation des polyglutamines

Toutes les expériences ont été effectuées à partir de polyGln fraîchement désagrégées. Les solutions de polyGln dans le TFE ont été titrées avec de l'eau (pH 5,5), alors que les polyGln pH 4,0 ont été titrées *ad* pH désiré avec NaOH 0,1M (aq). Toutes les solutions utilisées ont été préalablement ultrafiltrées.

II.6.3.1. Diffusion de la lumière

Des cuvettes de quartz UV (quartz HS, Hellma Inc.), rectangulaires et de 10 mm d'épaisseur, ayant les quatre faces transparentes, ont été préalablement lavées à l'acide formique concentré, rincées à l'eau déionisée, au méthanol puis séchées à l'azote. Les solutions de peptides ont été préparées à partir de polyGln fraîchement désagrégées et ultrafiltrées, mises dans des cuvettes de quartz recouvertes d'un couvercle de PTFE et scellées avec de la paraffine. Le rayon hydrodynamique (R_H , équation I-4) des particules a été déterminé par diffusion dynamique de la lumière en utilisant un appareil NanoZetasizer ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) muni d'un laser (He-Ne, 4mW) ayant une longueur d'onde $\lambda_0 = 632,8$ nm (équation I-6) et un angle de détection $\theta_d = 173^\circ$ (équation I-6) vs faisceau incident (rétro-diffusion non invasive). La température (T , équation I-4) a été ajustée à 20,0°C. Les fonctions d'autocorrélation ont été enregistrées sur

10 s. et moyennées avec le programme Dispersion Technology Software (DTS v.5,1). Entre les enregistrements, l'échantillon est demeuré dans l'appareil. Les expériences ont été effectuées en triplicata.

L'inversion des transformées de Laplace ont été effectuées par la méthode des cumulants (programme DTS) et par la méthode de régularisation, utilisant des gradients (programmes DTS et CONTIN (v.2DP) (<http://s-provencher.com/>) (Provencher 1979; Provencher 1982; Provencher 1982)) ou utilisant l'entropie maximale (programme SEDFIT (v.11.71) (www.analyticalultracentrifugation.com) (Schuck 2000)). Aucune correction pour la présence de poussière n'a été utilisée. La viscosité (η , équation I-4) à 20°C (η^{20}) a été ajustée pour la fraction volumique du TFE dans l'eau (χ_{TFE}) en utilisant une régression polynomiale ($\eta^{20}(\text{cP}) = 0,9 + 11,2 \chi_{\text{TFE}} - 44,3 \chi_{\text{TFE}}^2 + 77,6 \chi_{\text{TFE}}^3 - 64,4 \chi_{\text{TFE}}^4 + 20,8 \chi_{\text{TFE}}^5$) des données publiées (Palepu et Clarke 1989). L'indice de réfraction (n_D , équation I-6) à 20,0°C (n_D^{20}) a été ajusté selon la fraction volumique du TFE dans l'eau (χ_{TFE}) selon $n_D^{20} = (\chi_{\text{TFE}})(n_D^{20}_{\text{TFE}}) + (1-\chi_{\text{TFE}})(n_D^{20}_{\text{eau}})$. L'implémentation des méthodes d'analyse CONTIN et SEDFIT a été validée avec les fonctions d'autocorrélation de solutions de polystyrène de 60 et 220 nm (1% (p/v) dans NaCl 10 mM) de Malvern. Les dimensions fractales (D_f) sont déterminées par linéarisation des cinétiques en utilisant des graphiques log-log.

II.6.3.2. Résonance magnétique nucléaire

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) en phase liquide ont été enregistrés avec les appareils précédemment mentionnés. Les tubes RMN en borosilicate d'un diamètre de 5 mm ont été lavés à l'acide formique, à l'eau puis au méthanol et séchés à température de la pièce. La technique de présaturation de l'eau a été utilisée lorsque nécessaire (Hwang et Shaka 1995). Les spectres ont été référencés à l'aide d'un tube coaxial contenant des solutions de tétraméthylsilane (TMS) dans le CDCl_3 ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$ $\delta = 0,048/2,66$ ppm) et d'acide 2-diméthyl-2-silapentane-5-sulfonique (DSS) dans D_2O ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$ $\delta = 0,000/0,00$ ppm) (Wishart et Sykes 1994).

Les spectres RMN en phase solide ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Bruker Avance 600WB utilisant une sonde CP/MAS de 2,5 mm à double résonance $^1\text{H}/\text{BB}$ ($^2\text{H}-^31\text{P}$). Les expériences CP/MAS ont été effectuées avec une vitesse de rotation de 12 - 30 kHz, un temps de polarisation croisée de 2 ms, une séquence de découplage tppm15 (Bennett *et al.* 1995) et un délai de répétition de 5 s. Les expériences FSLG-HETCOR (van Rossum *et al.* 1997) ont été effectuées à une vitesse de rotation de 6 kHz, en utilisant la séquence de découplage tppm15. Les références externes, adamantane ($^1\text{H}_\alpha = 3,50$ ppm vs TMS pur) et glycine ($^{13}\text{CO } \delta = 176,03$ ppm vs TMS pur) ont été utilisées pour calibrer les spectres (Wishart et Sykes 1994).

Les spectres ont été transformés avec XWIN-NMR (v.3,5) et analysés avec MestReC (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Espagne) ou SpinWorks (University of Manitoba). Les largeurs des bandes et leurs aires ont été déterminées par l'utilisation d'un modèle lorentzien (Klauder et Anderson 1962; King et Jardetzky 1978).

II.6.3.3. Spectroscopie Raman

Les spectres Raman ont été obtenus avec un appareil Renishaw inVia utilisant l'interface WiRE (Gloucestershire, UK), muni d'un microscope Leica et d'un objectif de 50X. L'excitation a été effectuée à 488 nm avec un laser à ion argon (Ar^+) avec une puissance de 2 mW à l'échantillon sur un diamètre d'environ 2 μm . L'alignement de Köhler a été effectué et l'acquisition spectrale a utilisé un dispositif à couplage de charges (CCD) (15 x 576) avec une résolution de 2 cm^{-1} . Le déplacement Raman a été calibré avec une référence de Si. Les spectres ont été enregistrés à la température de la pièce sur des échantillons solides lyophilisés avant et après formation de fibrilles en mode statique avec un réseau de 1800 l/mm couvrant une plage de 1800 cm^{-1} à 400 cm^{-1} , avec un temps d'exposition de 240 s par scan et une moyenne de 20 scans. Aucun signe de détérioration de l'échantillon n'est apparu. Le filtre à rayons cosmiques n'a pas été utilisé. Les spectres ont été manipulés avec GRAMS 8,0 (ThermoGalactic, Salem, NH). Une ligne de base linéaire a été soustraite et un lissage Stavinsky-Golay (9 points) a été utilisé pour la région

amide I dans l'intervalle 1750-1570 cm^{-1} . Le nombre de composantes constituant la région amide a été déterminé par dérivée de second ordre de la région amide I. Les spectres ont été décomposés en profils voightiens. Les variables des fonctions voightiennes ont ensuite été ajustées par itération avec l'algorithme Levenberg-Marquardt afin de minimiser la valeur du chi-carré réduit (χ_{red}^2). Ce processus a été appliqué jusqu'à l'atteinte du critère de convergence $\chi_{\text{red}}^2 < 3$. La corrélation entre les données expérimentales et leur décomposition en profils voightiens est représenté par R^2 .

II.6.3.4. Absorption UV-Vis du rouge de Congo

Les spectres d'absorption ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis-NIR Cary 5E (Varian) en utilisant des cuvettes de quartz UV à double chemin optique (T-52, NSG Precision Cells Inc., Farmingdale, NY). Un balayage de 300-700 nm avec un déplacement de 600 nm/min, un pas de 1 nm et une largeur de fente de 2,00 nm a été effectué. Le tampon phosphate salin de Dulbecco (PBS) sans chlorure de calcium ni chlorure de magnésium a été acheté de Sigma-Aldrich. La solution a été filtrée avec un filtre ayant une membrane hydrophile d'acétate de cellulose exempte de surfactants (SCFA) de 25 mm de diamètre et des pores de 200 nm (Cole-Palmer, Anjou, QC). Les spectres ont été convertis avec le logiciel Varian File Utility v.2,29 (www.startek.com.au/cute/) (Startek Technology Pty Ltd., Boronia, Australie) et analysés avec GRAMS32 (ThermoGalactic, Salem, NH).

II.6.3.5. Dichroïsme circulaire

Un spectropolarimètre Dichrograph-CD6 (Jobin-Yvon, Longjumeau, France) avec largeur de bande de 2 nm et utilisant des cuvettes cylindriques de 1 mm (quartz HS, Hellma Inc.) a été utilisé pour les mesures de dichroïsme circulaire. Les spectres ont été transformés en ellipticité molaire ou en facteur g et multipliés par 1000 avant d'être analysés à l'aide du logiciel CDPro. Les spectres de référence de Brahms & Brahms (Brahms et Brahms 1980), incluant une hélice α (myoglobine de sperme de baleine dans

0,1 M NaF, pH 7 et corrigé pour la contribution des coudes et des structures aléatoires), un feuillet β (poly(LysLeu) dans 0,5 M NaF, pH 7), un coude β (poly(Ala₂Gly₂) dans l'eau) et une structure aléatoire (poly(ProLysLeuLysLeu) dans l'eau) ont été utilisés pour effectuer des analyses par moindres carrés sans contraintes, alors que les spectres de référence en facteur g , amycomp.dat (McPhie 2004), ont été utilisés lors d'analyses par moindres carrés avec contraintes (Greenfield 2004) avec le logiciel Origin 8,0. Les spectres de référence en facteur g (g6_26.ss et g6_26.cd) (Baker et Garrell 2004) ont été utilisés avec les algorithmes CONTINLL, SELCON3 et CDsstr contenus dans CDPro (<http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro/main.html>).

II.6.3.6. Microscopie optique polarisée

Les solutions utilisées pour l'absorption UV-Vis ont été centrifugées à 2990g pour 30 min (Megafuge, Baxter). La solution utilisée en absorption UV-Vis a été déposée sur des lamelles en verre de microscope et laissée sécher pour 12 h. L'excès de rouge de Congo a été retiré en rinçant les lames avec de l'éthanol. Les mesures de microscopie optique polarisée ont été effectuées avec un microscope Zeiss Axioscope 40 POL (Carl Zeiss MicroImaging Inc., Toronto, ON) muni d'une caméra QImaging MicroPublisher 3,3 RTV utilisant le logiciel Image Pro Plus 5,0. Les objectifs planachromatiques (POL 2,5X) ou achromatiques (POL 10X et POL 40X) ont été utilisés. L'alignement de Köhler a été effectué. Les valeurs d'exposition et d'intégration ont été réglées en mode automatique. Les images sont composées de lumière transmise en champ clair et en lumière polarisée avec et sans retard d'onde $\lambda/4$. De l'eau a été ajoutée au besoin pour solubiliser les sels de phosphate résiduels en provenance du PBS.

II.6.4. Étude d'inhibiteurs d'agrégation

II.6.4.1. Matériel

Le rouge de Congo, le tréhalose dihydraté et la thioflavine T proviennent de Sigma-Aldrich. Le QBP1 a été synthétisé avec des dérivés Fmoc obtenus chez Matrix Innovation

Inc., alors que les réactifs et solvants utilisés étaient identiques à ceux décrits précédemment.

II.6.4.2. Production du QBP1

La synthèse du QBP1 (Ac-Ser-Asn-Trp-Lys-Trp-Trp-Pro-Gly-Ile-Phe-Asp-NH₂) a été effectuée sur une résine Rink AM, en utilisant la stratégie linéaire avec protection maximale en chimie Fmoc standard tel que décrit précédemment, incluant une déprotection avec 20% pipéridine/DMF. La complétion des couplages a été confirmée avec le test de Kaiser, sauf dans le cas du couplage sur le résidu proline. Le couplage de Trp a donc d'emblée été répété. Le peptide a été acétylé en *N*-terminal. Le clivage a été effectué tel que décrit précédemment avec une solution TFA/éthanedithiol/phénol/eau (20 mL de réactifs/g de résine, 92,5/2,5/2,5/2,5; v/v/m/v). Le rendement de synthèse du peptide-résine est de > 95%. Le peptide brut a été dissout dans 100 mL d'EtOH, a été dilué avec 400 mL de TFA/H₂O (0,06/99,94; v/v) puis avec 300 mL de TFA/ACN/H₂O (0,06/10/89,94; v/v/v) ensuite injecté sur la colonne C₁₈. Un gradient linéaire de A (TFA/H₂O (0,2/99,8; v/v)) à B (TFA/ACN/H₂O (0,2/45/54,8; v/v/v)) a été utilisé sur 2 h. À partir de 770 mg de peptide brut, 291 mg de peptide pur ont été obtenus pour un rendement après purification de 38%. L'analyse par spectrométrie de masse a été effectuée comme décrit précédemment.

II.6.4.3. Cinétiques d'agrégation en présence d'inhibiteurs d'agrégation

Le peptide a été solubilisé à pH 4,0 (HCl) et filtré comme décrit précédemment. Les solutions ont été analysées en diffusion dynamique de la lumière, afin de s'assurer d'une désagrégation complète. Les solutions composées des différents inhibiteurs ont également été filtrées avant d'être ajoutées au peptide. Le pH a par la suite été ajusté à 8,0 et les cinétiques enregistrées comme décrit précédemment.

Chapitre III – Résultats

III.1. Synthèse et purification de polyglutamines non chargées

III.1.1. Synthèse peptidique linéaire et convergente

Deux stratégies de synthèse peptidique sur support solide (SPSS) peuvent être utilisées (Figure III-1). La stratégie linéaire (SPSSL) consiste en l'introduction séquentielle de résidus Gln afin de produire des polyGln carboxamides (**9a**, **11a**) ou avec un acide carboxylique en *C*-terminal (**8a**, **10a**) pouvant être utilisé ultérieurement dans une stratégie de SPSS convergente (SPSSC). La stratégie SPSSC consiste en la condensation de segments polyGln ayant un acide carboxylique en *C*-terminal avec des segments de polyGln sur résine.

III.1.2. Approches de protection minimale et maximale

L'approche de protection minimale consiste en l'utilisation de résidus ou de segments de Gln n'ayant pas de protection sur la chaîne latérale, alors que l'approche de protection maximale utilise une protection des chaînes latérales (Figure III-1).

III.2. Synthèse de polyGln non chargées

III.2.1. Synthèse peptidique linéaire

La stratégie de SPSSL a permis de produire des peptides carboxamides (**9a**, **11a**) et des segments avec un acide carboxylique en *C*-terminal pour explorer la stratégie de SPSSC (**8a**, **10a**). La stratégie SPSSL avec une approche de protection minimale a permis la production de segments polyGln (**8a**) avec de bons rendements (60-70% de peptides bruts à partir du peptide-résine) mais ayant beaucoup de délétions. De nombreuses

délétions ont été produites par des couplages/déprotections incomplets, comme suggéré par la présence de FmocGln_nOH (n = 2-10) sur le spectre de masse (Figure III-2A) et par l'absorption du Fmoc à 280 nm ($T_R > 14$ min) sur le chromatogramme provenant du HPLC analytique (Figure III-2B). De plus, des produits avec des temps de rétention moindres ($T_R < 14$ min) ont été observés à 215 nm dans le chromatogramme (Figure III-2B) et pourraient correspondre aux segments tronqués résultant de la formation d'un résidu pyroglutamyle en *N*-terminal puisque des masses correspondantes à pGluGln_nOH (n = 4-9) sont observées dans le spectre de masse (Figure III-1A). De plus, la présence d'un produit secondaire correspondant à HGln₁₀OH démontre le clivage d'une partie des groupements protecteurs Fmoc en *N*-terminal (Figure III-2). La stratégie SPSSL avec une approche de protection minimale a permis de préparer des polyGln carboxamides jusqu'à une longueur de 15 résidus (**9a**), malgré le fait que les cinq derniers couplages étaient ardues et ont nécessité des quantités plus élevées d'acides aminés préactivés et des temps de réaction plus longs. Étant donné la quantité élevée de délétions et des couplages difficiles, la synthèse linéaire utilisant l'approche de protection minimale n'a pas été poursuivie et les peptides (**9a**) n'ont pas fait l'objet de caractérisation plus approfondie.

La stratégie de SPSSL utilisant une approche de protection maximale a été utilisée pour produire des segments de polyGln ayant un acide carboxylique en *C*-terminal (**10a**) pour une utilisation ultérieure dans la SPSSC et pour produire des segments de polyGln carboxamides (**11a**). Cette méthode a permis de produire des polyGln contenant jusqu'à 30 résidus (**11a**) en utilisant un protocole de déprotection avec 50% pipéridine/DMF. Avec cette stratégie de synthèse et une protection maximale, les réactions de couplage ont été effectuées facilement même après l'incorporation de 25 glutamines. Sur la base des analyses de spectrométrie de masse, ces peptides sont exempts de délétions (Figure III-2C et Figure III-3A). Le rendement brut du peptide à partir du peptide-résine a été supérieur à 90%. Les résultats de SPSSL sont rapportés dans le Tableau III-1.

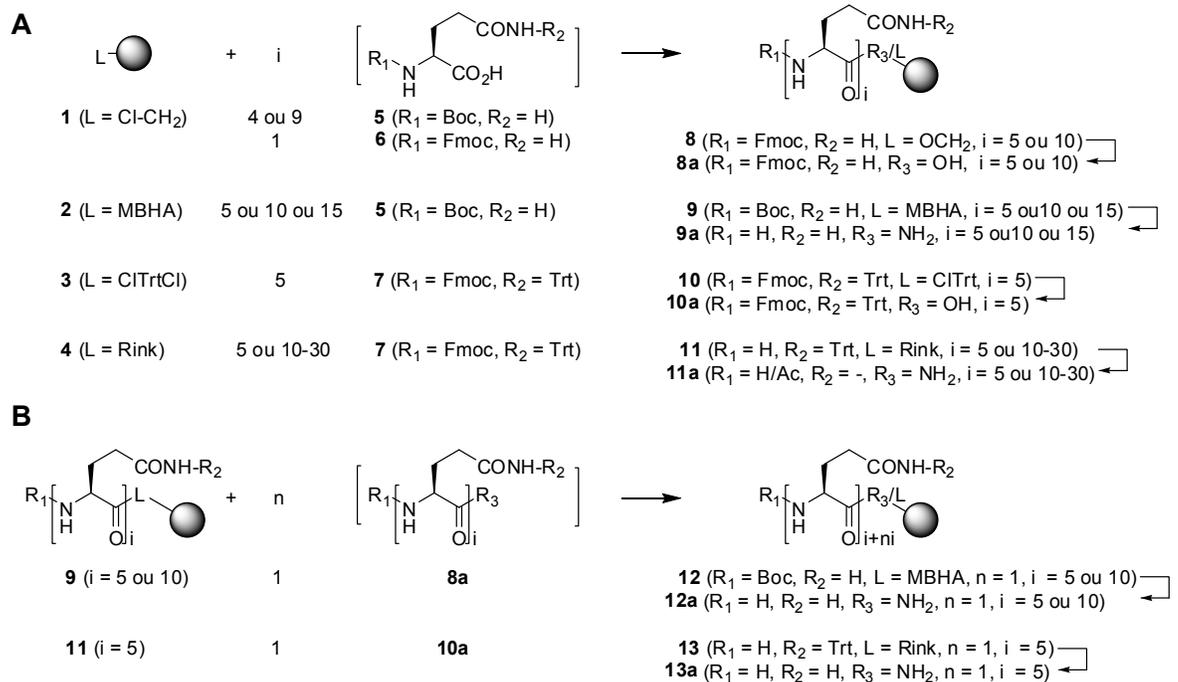


Figure III-1. SPSS de la polyGln utilisant la stratégie **A**, linéaire et **B**, convergente. L est l'espaceur résine-polystyrène. R₁ et R₂ sont les groupements protecteurs en N-terminal et des chaînes latérales fonctionnalisées. R₃ est la fonction en C-terminal.⁵

Tableau III-1. Sommaire des différentes stratégies de SPSS et d'approches de protection

PolyGln	Stratégie SPSS	Protection	Rendement (%) ^a	Délétions
9a	Linéaire	Minimale	60-70	Oui
11a	Linéaire	Maximale	≥90	Non
12a	Convergente	Minimale	N/D	N/D
13a	Convergente	Maximale	<10	N/D

^a Estimation d'après les analyses par HPLC du peptide brut. N/D, non-déterminé.

⁵ *i* et *n* sont des nombres entiers qui représentent le nombre de cycles de SPSS.

III.2.2. Synthèse peptidique convergente

Au départ, la stratégie SPSSC semblait plus avantageuse que la stratégie SPSSL car elle impliquait des temps de réaction plus courts et de purifications plus faciles puisque les couplages incomplets produisent des peptides qui diffèrent de cinq ou de dix acides aminés. Toutefois, aucun peptide de polyGln n'a été obtenu par cette approche. L'approche par protection minimale (**8a**) n'a pas permis d'effectuer de condensation entre les fragments de polyGln car ils étaient insolubles dans tous les milieux de couplage usuels. Ceci explique pourquoi le rendement n'a pas été déterminé (Tableau III-1). Par ailleurs, l'utilisation de l'approche à protection maximale a permis de solubiliser facilement le fragment *N*- α -Fmoc[Gln(Trt)]₅-OH (**10a**) dans le DMF. Toutefois, le rendement des couplages était bas (estimé à <10%) même après l'utilisation d'une double quantité de fragments activés au BOP pour deux périodes consécutives de 24 h.

III.2.3. Purification des polyglutamines

La purification des polyGln non chargées en phase régulière a d'abord été envisagée car certaines combinaisons d'acides et de solvants organiques se sont avérées efficaces pour solubiliser les polyGln. Toutefois, aucune migration n'a été observée sur chromatographie sur couche mince avec plusieurs systèmes de solvants polaires tels que DCM, ACN, méthanol ou avec des mélanges de solvants tels que TFA/DCM (0,2/99,8; v/v), HFIP/ACN (10/90; v/v), MeOH/ACN (80/20; v/v) et MeOH/eau (80/20; v/v).

Une méthode de solubilisation aqueuse des polyGln a été développée permettant la purification par HPLC en phase inverse. Les peptides n'ont pas été retenus par la phase stationnaire C₄ et faiblement retenus par la phase stationnaire C₁₈. Néanmoins, avec un débit diminué à 50% de sa valeur nominale (de 20 à 10 mL/min) et avec un gradient linéaire d'une durée de 2 h du solvant A (TFA/H₂O (0,2/99,8; v/v)) à B (TFA/ACN/H₂O (0,2/10/89,8; v/v)), une bonne efficacité de séparation a été obtenue, ce qui a permis la purification du peptide. La purification des polyGln était plus facile avec un nombre

croissant de résidus de glutamine dans le peptide car les temps de rétention s'accroissaient. Les rendements de purification obtenus (*vs* peptide brut) se situaient entre 20 et 40% et leur pureté était de plus de 95% selon les résultats de HPLC analytique (Figure III-3B).

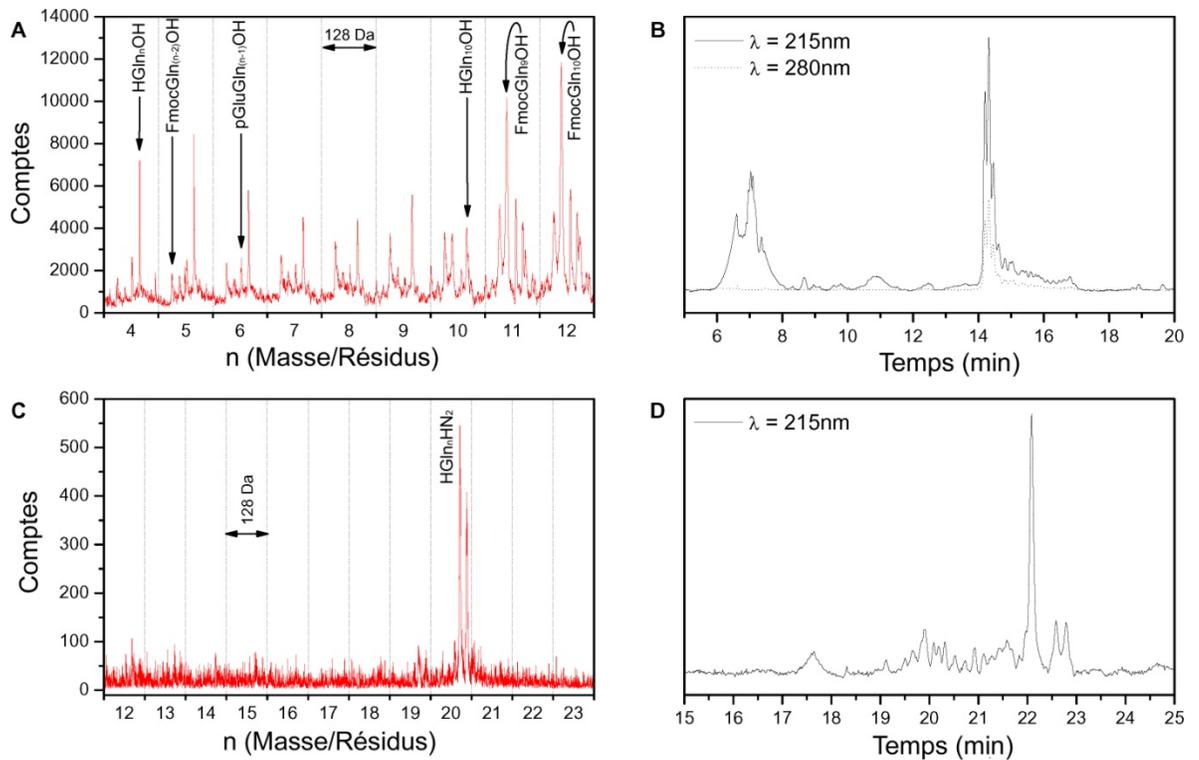


Figure III-2. Spectres SM-MALDI/TOF (gauche) et chromatogrammes analytiques HPLC (droite) de la polyGln post-HF produite par SPSSL. **A-B**, FmocGln₁₀OH produit par l'approche de protection minimale; **C-D**, HGln₂₀NH₂ produit par l'approche de protection maximale.⁶

⁶ P.M. du résidu Gln= 128 Da.

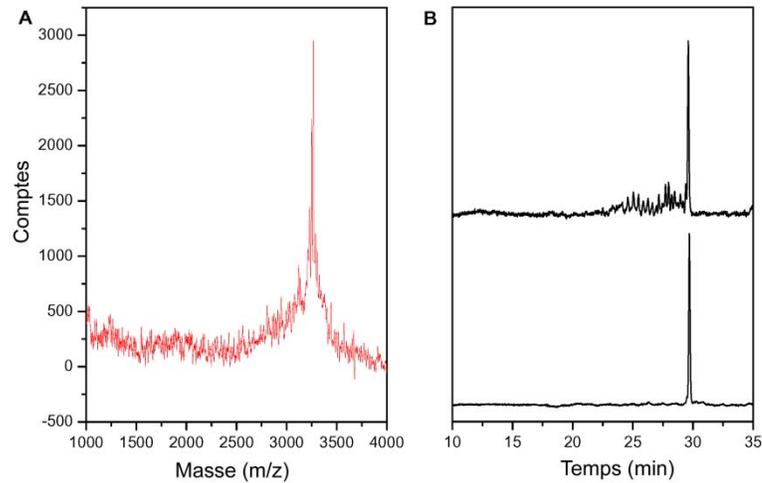


Figure III-3. **A**, spectre SM-MALDI/TOF de AcGln₂₅NH₂ (**11a**); **B**, chromatogramme analytique HPLC (215 nm) avant et après purification.

III.2.4. Formation de résidu pyroglutamyle

Lors de la purification, deux produits ont été obtenus alors que l'analyse HPLC du peptide brut n'avait montré qu'un seul produit. Les analyses par SM-MALDI/TOF ont montré que le produit majeur était le peptide attendu alors que l'autre produit avait une masse diminuée de 17 Da (Figure III-4). La cyclisation des résidus glutamine terminaux en pyroglutamate (pGlu) élimine NH₃ ce qui correspond à la différence de masse observée (Figure III-5). L'acétylation en *N*-terminal des peptides polyGln a prévenu toute modification chimique du peptide dans les mêmes conditions.

Après une période de 24 h en milieu aqueux (pH 2,5), la formation de pGlu a atteint 43% selon l'analyse HPLC et suit une décroissance mono-exponentielle. La constante de vitesse pour cette cinétique (\pm SE) a été de $66 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ ($r^2 = 0,98$) pour la régression

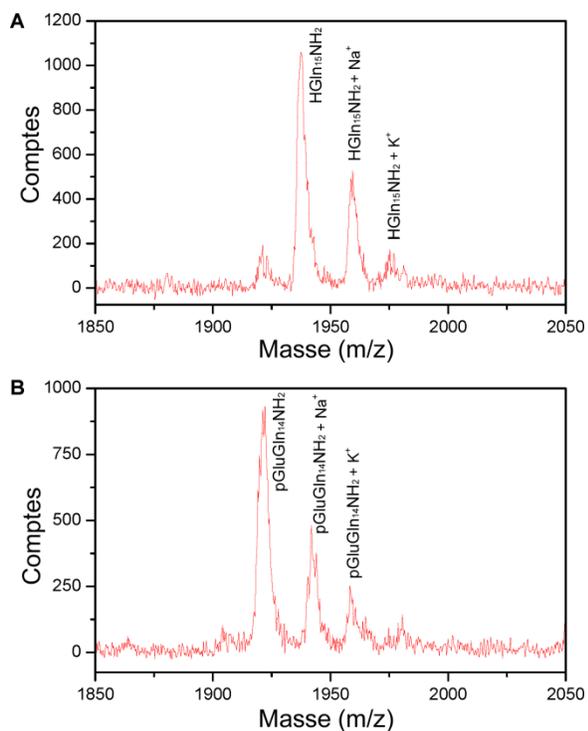


Figure III-4. Spectre SM-MALDI/TOF de **A**, HGln₁₅NH₂ (**11a**) et **B**, pGluGln₁₅NH₂.⁷

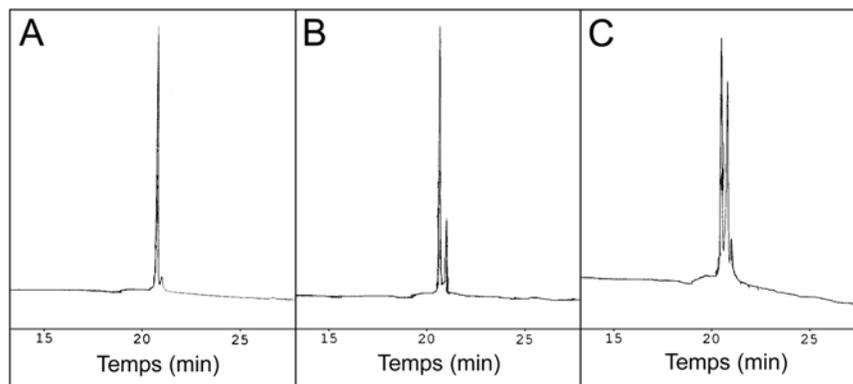


Figure III-5. Chromatogrammes analytiques HPLC (215 nm) montrant la cyclisation de Gln en pGlu. **A**, HGln₁₅NH₂ (**11a**); **B**, après 2,5 h et **C**, après 24 h en solution aqueuse (pH 2,5).⁸

⁷ La différence de masse entre ces deux produits est de 17 Da.

⁸ Les temps de rétention sont respectivement de 20,6 et de 21,0 min pour HGln₁₅NH₂ et pGluGln₁₄NH₂.

exponentielle et de $65 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ ($r^2 = 0,98$) en utilisant une régression linéaire selon la méthode de réduction des données. La représentation de la décroissance exponentielle sur une échelle logarithmique népérienne permet la comparaison entre les deux méthodes analytiques utilisées (Figure III-6). Cette analyse cinétique a été réalisée sur une seule expérience.

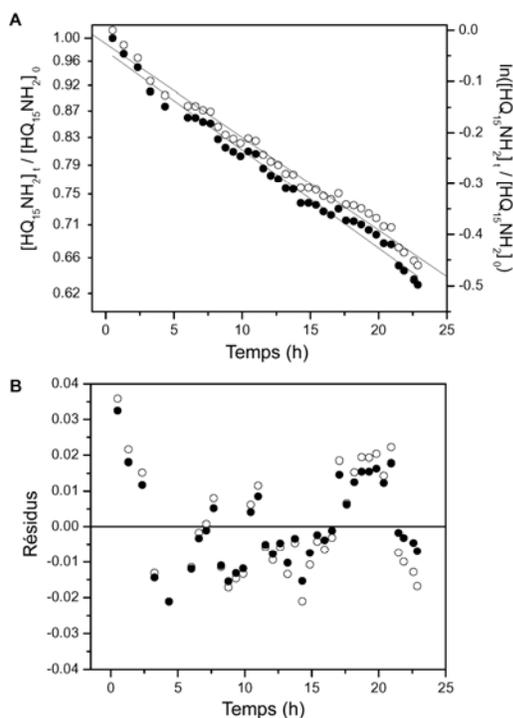


Figure III-6. **A**, cinétique de pseudo-premier ordre de la formation du groupe pyroglutamyle à partir de la glutamine *N*-terminale en solution aqueuse (pH 2,5) et **B**, variance des résidus suivant chacune des régressions. $[\text{HGln}_{15}\text{NH}_2]_0$ et $[\text{HGln}_{15}\text{NH}_2]_t$ sont la concentration de $\text{HGln}_{15}\text{NH}_2$ (**11a**) au temps $t = 0$ et t , respectivement.⁹

⁹ ●, décroissance mono-exponentielle de la concentration de $\text{HGln}_{15}\text{NH}_2$ représentée sur une échelle logarithmique népérienne afin de faciliter la comparaison avec ○, l'analyse linéaire.

III.3. Synthèse de polyglutamines avec charges labiles

III.3.1. Stratégies de synthèse

III.3.1.1. Synthèse diphasique

La stratégie de synthèse diphasique (en phases liquide et solide) a fait l'objet de deux approches distinctes. La première approche se résume au couplage des unités sensibles au pH (2-aminoéthyl-4-morpholine ou AEM) au peptide de glutamines AcGlu₂Gln₁₅Glu₂NH₂ (**14**) obtenu par SPSSL avec protection maximale (Figure III-7). Contrairement au peptide de polyGln non chargé, le peptide bordé de résidus Glu est soluble dans les solvants organiques tels que le DMSO et le TFE. Ceci a permis d'explorer les couplages des unités AEM en solution (Figure III-8)

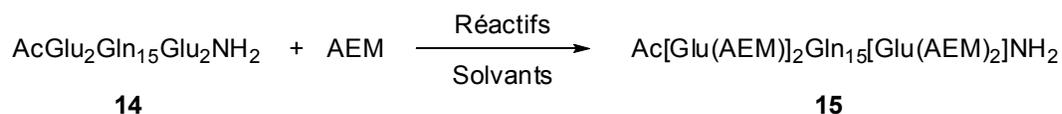


Figure III-7. Couplage en solution des unités AEM sur le peptide **14** produit en phase solide.¹⁰

Tableau III-2. Conditions de couplage de AEM avec AcGlu₂Gln₁₅Glu₂NH₂ (**14**) en solution

Réactifs	Solvants (v/v)	Résultats
BOP/DIEA	NMP/DMSO	Produit de départ
DCC/HOBt	TFE	Produit de départ
DCC/HOBt	TFE / pyridine (1/1)	Produit de départ
DCC/HOBt	TFE / DMSO (1/1)	Produit de départ
DCC/HOBt	DMSO	< 5 % de 15
DCC/HOBt	THF-LiCl	Produit de départ

¹⁰ AEM, 2-aminoéthyl-4-morpholine

Les résultats (

Tableau III-2) n'ont pas été suffisamment positifs pour que cette approche soit retenue et que cette méthodologie soit utilisée.

La seconde approche explorée dans la stratégie diphasique est la synthèse de dérivés de glutamates porteurs de l'unité sensible au pH pouvant être incorporée sur phase solide (Figure III-8).

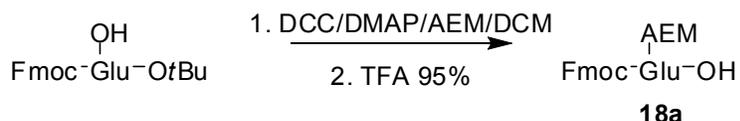


Figure III-8. Synthèse en solution du résidu FmocGlu(AEM)OH (**18a**).

La synthèse de dérivés de glutamates porteurs d'unités morpholine FmocGlu(AEM)OH (**18a**) a été facilement effectuée. Toutefois, de grandes quantités sont nécessaires afin d'obtenir des couplages complets sur la résine MBHA. De plus, un composé blanc, peu soluble dans plusieurs solvants organiques, se forme dans les réacteurs après les couplages de **18a**, empêchant leur vidange. Le produit a été analysé par spectrométrie de masse (Figure III-9) et semble correspondre à un polymère de dibenzofulvyle. Cette procédure a donc été abandonnée au profit d'une procédure faisant appel uniquement à la synthèse en phase solide.

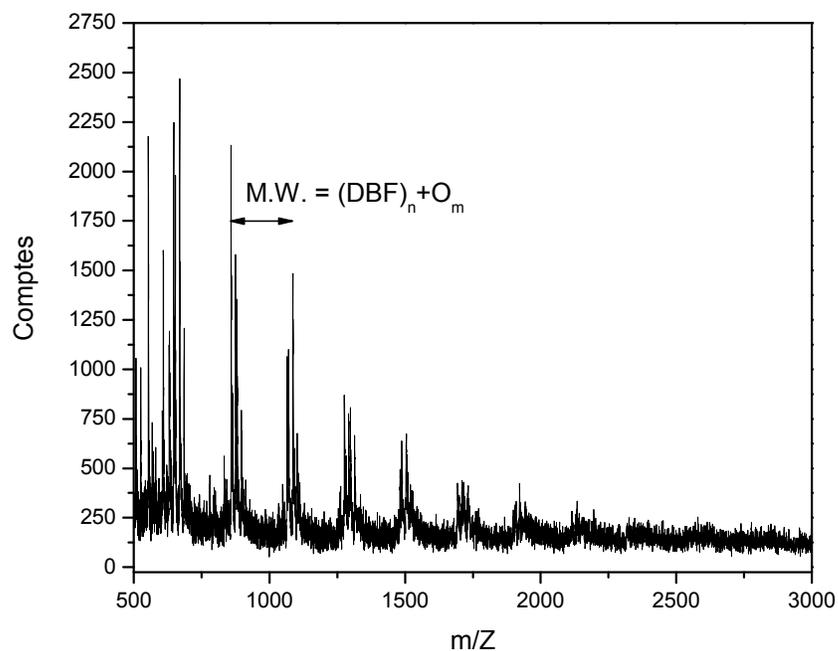


Figure III-9. Spectre SM-MALDI/TOF de la fraction soluble dans l'ACN du polymère de dibenzofulvyne, obtenu avec la matrice acide 2,5-dihydroxybenzoïque.¹¹

III.3.1.2. Synthèse sur phase solide

Deux approches ont été étudiées en utilisant la synthèse exclusivement sur phase solide. La première approche est convergente et implique la condensation de dimères contenant les unités AEM (**18b**) (Figure III-10A) sur le peptide-résine (**17**) (Figure III-10B). Dans cette approche, toutes les chaînes latérales de Gln sont protégées avec le groupement protecteur Trt, ce qui empêche l'agrégation interchaînes. La seconde approche est le couplage des unités sensibles au pH sur les résidus Glu après déprotection des groupements *t*Bu ester (Figure III-10C).

¹¹ P.M. (DBF) = 180 Da. P.M. (O) = 16 Da. m et n sont des entiers.

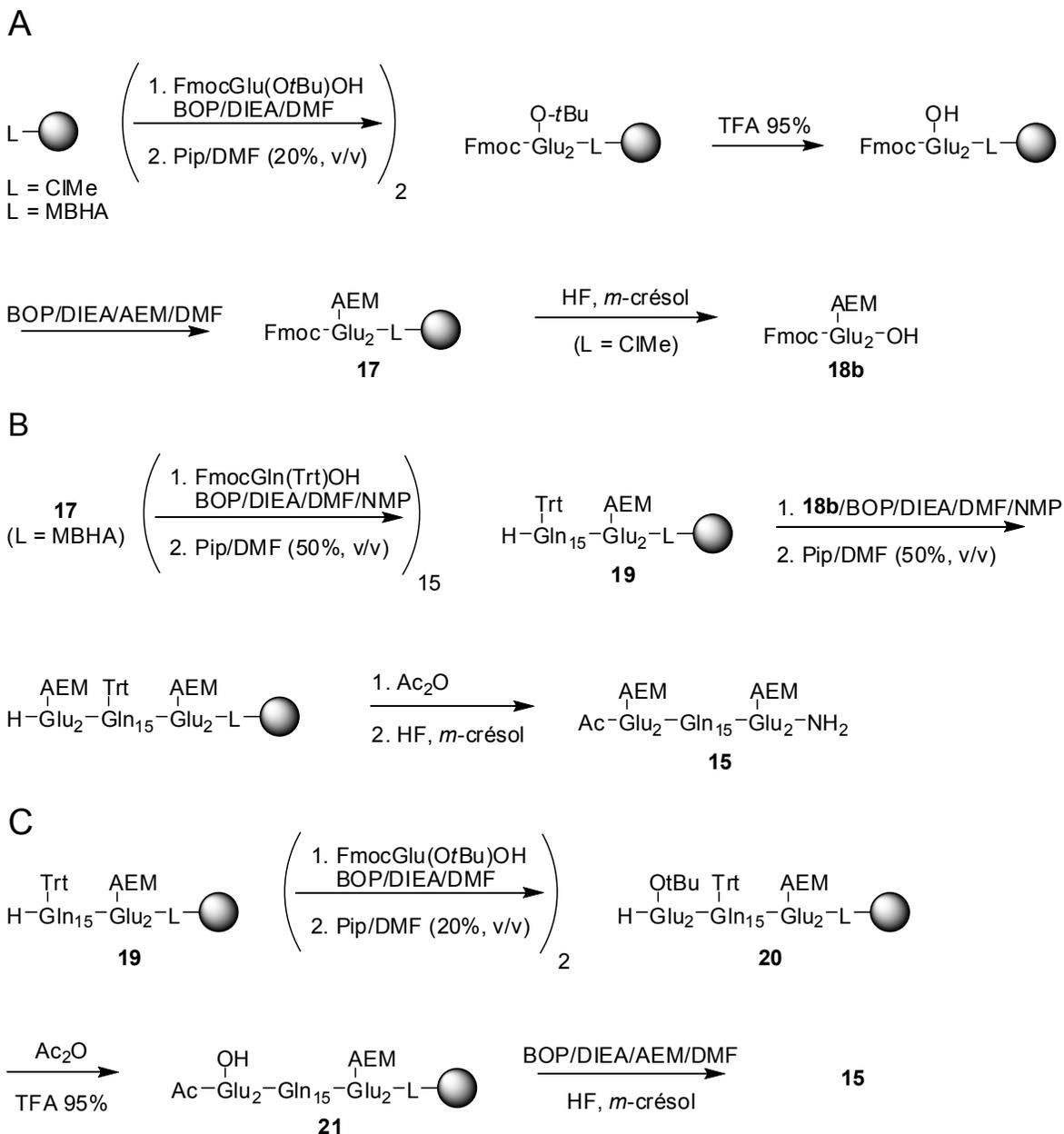


Figure III-10. Approches utilisées en SPSS pour synthétiser le peptide de glutamine sensible au pH $\text{Ac}[\text{Glu}(\text{AEM})]_2\text{Gln}_{15}[\text{Glu}(\text{AEM})]_2\text{NH}_2$ (**15**). **A**, formation du dimère (**18b**) utilisé dans l'approche convergente (**B**). **C**, approche linéaire.¹²

¹² Le cercle ombragé représente la résine. L est l'espaceur peptide-résine.

Le couplage des unités sensibles au pH sur les résidus Glu, après déprotection des groupements *t*Bu ester, a permis de produire le segment dipeptidique (**18b**). Toutefois, un certain nombre de fractions du peptide obtenu montrait des délétions de masses de $n \times 85$ Da ($n = 1$, ou 2). Les délétions ont été étudiées avec le FmocGln[Glu(AEM)]₂NH₂ (**17'**) qui provient de **17** sur lequel a été couplé un seul résidu FmocGln(Trt)OH. Les peptides **17'** porteurs de délétions étaient obtenus en plus grande quantité lorsque les équivalents d'AEM et de BOP étaient plus élevés au moment du couplage de l'AEM. L'isolation nous a permis de déterminer la nature des délétions.

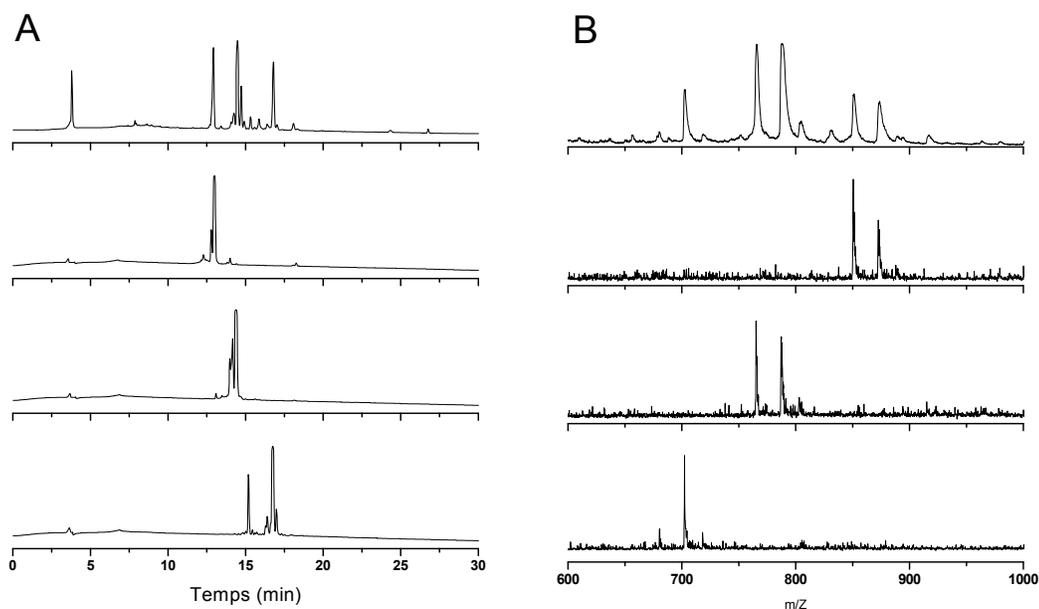


Figure III-11. FmocGln[Glu(AEM)]₂NH₂ (**17'**) brut (haut) et des produits isolés.¹³ **A**, chromatogrammes analytiques HPLC et **B**, spectres SM-MALDI/TOF.

¹³ Correspondant aux masses M (**17'a**), M-85 (**17'b**) et M - 170 (**17'c**) Daltons (de haut en bas).

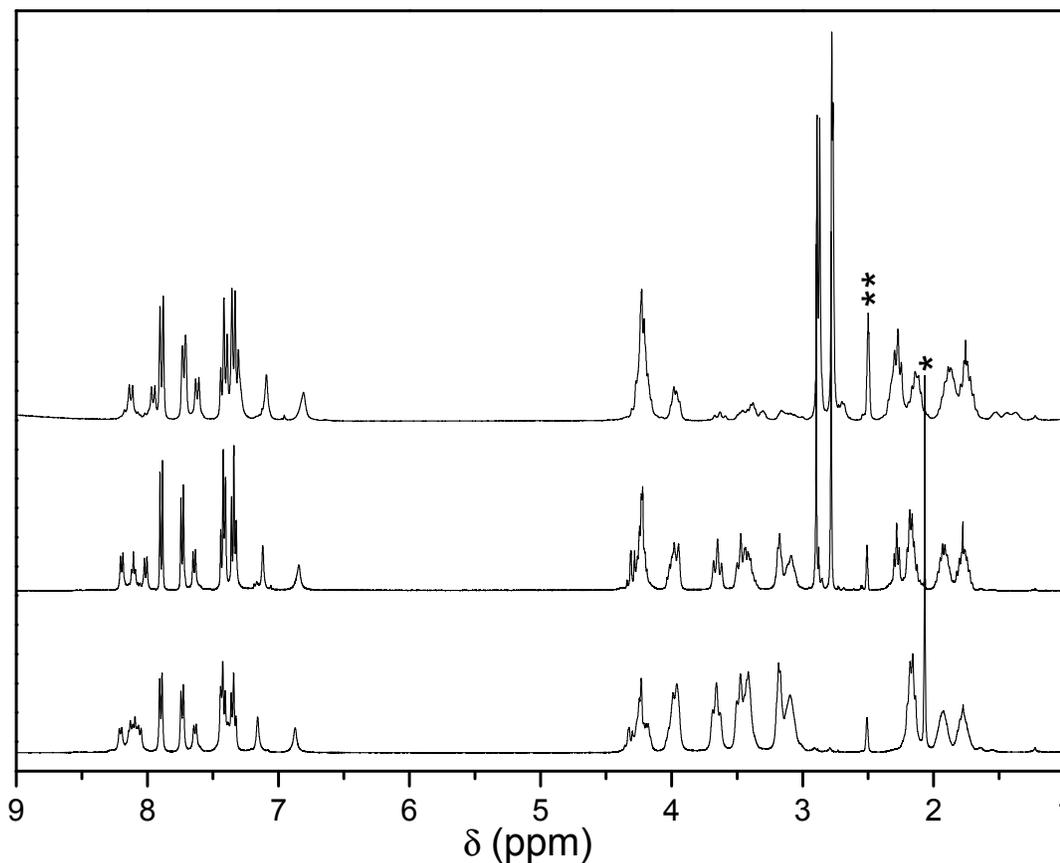


Figure III-12. Spectres RMN du ^1H des produits de masses $M - 170$, $M - 85$ et M Daltons (du haut vers le bas) résultant de la synthèse du $\text{FmocGln}[\text{Glu}(\text{AEM})]_2\text{NH}_2$ (**17'**).¹⁴

Les caractérisations par RMN du ^{13}C , $^1\text{H}-^1\text{H}$ 2D COSY, $^1\text{H}-^1\text{H}$ 2D TOCSY, $^1\text{H}-^1\text{H}$ 2D NOESY, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ 2D HMQC et $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ 2D HMBC montrent que les molécules (**17'a**, **17'b** et **17'c**) ont été isolées et que les singulets autour de 2,8 ppm sont attribuables au groupement NMe_2 . Les structures des produits obtenus sont illustrées à la Figure III-13.

¹⁴ *, ACN-d_3 résiduel et **, DMSO-d_5 .

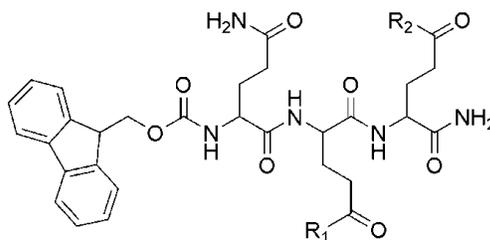


Figure III-13. Structure des dérivés du segment FmocGln[Glu(AEM)]₂NH₂ (**17'**) porteur de délétions.¹⁵

Ces délétions ont été évitées en utilisant les couplages dans un mélange de NMP/DCM (50/50) et avec le PyBOP. Toutefois, la condensation du segment Fmoc[Glu(AEM)]₂OH (**18b**) sur le peptide-résine **19** avec 1,5 équivalent de **18b** pour deux périodes de 24 h n'est pas arrivée à complétion.

Le peptide voulu, Ac[Glu(AEM)]₂Gln₁₅[Glu(AEM)]₂NH₂ (**15**), a finalement été produit en utilisant une stratégie linéaire (Figure III-10C) au cours de laquelle les AEM sont couplées sur **21** en présence des Gln déprotégées. Le rendement estimé à partir du HPLC du peptide brut est d'environ 85%.

III.4. Solubilisation

III.4.1. Solubilisation directe

Les essais de solubilisation avec la polyGln non chargée ont montré que cette dernière était insoluble dans les solvants organiques aliphatiques (*n*-hexane), les alcools (méthanol, éthanol, *i*-propanol, *t*-butanol, éthylène glycol, glycérol), les éthers (diéthyléther, tétrahydrofurane, *p*-dioxane), les esters (acétate d'éthyle, γ -butyrolactone), les cétones (acétone), l'acétonitrile, les solvants halogénés aliphatiques (dichlorométhane, chloroforme), les amines (hydrazine, morpholine, 2,4,6-collidine, éthanolamine), les amides (*N*-méthylformamide, *N,N*-diméthylformamide, *N,N*-diméthylacétamide, *N*-

¹⁵ Peptide de masse M, R₁ = R₂ = AEM. Peptide de masse M – 85, R₁/R₂ = AEM/DMA (R₁ ≠ R₂). Peptide de masse M – 170, R₁ = R₂ = DMA. AEM, 2-aminoéthyl-4-morpholine. DMA, *N,N*-diméthylamine.

méthylpyrrolidone, acétamide), l'hexaméthylphosphoramide, le diméthylsulfoxyde, les urées (tétraméthylurée, diméthyléthylèneurée, *N,N'*-diméthyltriméthylèneurée) et les solvants aromatiques (benzène, pyridine, pyrimidine, fluorobenzène, pentafluorophénol), de même que le disulfure de carbone.

Une solubilisation partielle a été obtenue avec les fluoroalcools (2,2,2-trifluoroéthanol et 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol), l'acide acétique et l'anisole.

Une solubilisation complète a été obtenue avec des solvants aromatiques (phénol/H₂O 80%), *m*-crésol, aniline, nitrobenzène) et des acides (acide formique, TFA).

La solubilisation aqueuse de pH 2 jusqu'à pH 12 n'a pas été possible et cela, même à la suite d'une dissolution dans le TFA ou l'acide formique. L'utilisation d'agents chaotropes tels que le NaSCN (*ad* 10 M), le LiCl (*ad* 10 M), l'urée (*ad* 8 M), la thiourée (*ad* 8 M), la guanidine-HCl (*ad* 6 M) et le sulfolane (6 M) n'a pas amélioré la solubilité. Diverses molécules aromatiques ont été utilisées en milieu aqueux, soit la L-phénylalanine, la L-tyrosine, le L-tryptophane, le diaminobenzène, le 1-méthylimidazole acide phénylboronique, l'imidazole, l'acide coumarique, l'acide dihydroxybenzoïque et l'acide salicylique, mais sans succès. Toutefois, le rouge de Congo (10 mM), la curcumine (50 mM à pH 12) et la coumarine 6 (20 mM) se sont avérés de bons adjuvants pour solubiliser les polyGln.

La rationalisation de la solubilité directe a d'abord fait l'objet d'analyses avec la constante diélectrique et le moment dipolaire des solvants, mais aucune corrélation n'a été observée (données non présentées). La solubilité a ensuite été analysée avec les paramètres de Catalan, Gutmann et Hansen en fonction de chacun des solvants.

Le premier modèle, celui de Catalan (Figure III-14), indique qu'un bon solvant est caractérisé par une faible basicité (SB) et une polarité/polarisabilité élevée (SPP), alors que son acidité importe peu. De plus, la décomposition du SPP indique que la contribution de la dipolarité du solvant est légèrement plus importante que la composante de polarisabilité.

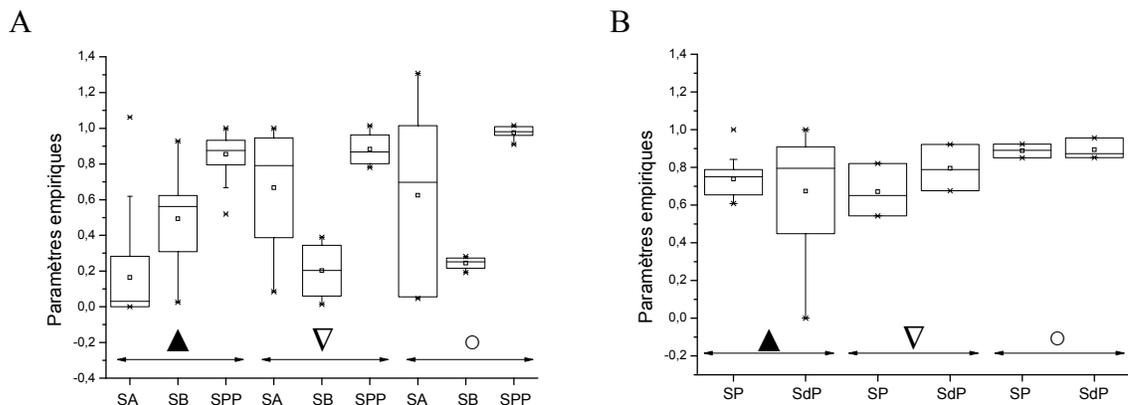


Figure III-14. Solubilité directe de AcGln₁₅NH₂ (**11a**) à 1,0 mg/mL. ▲, insoluble; ▽, solubilité partielle; ○, soluble. **A**, paramètres de Catalan¹⁶; **B**, décomposition du paramètre SPP en SP (polarisabilité) et en SdP (dipolarité).

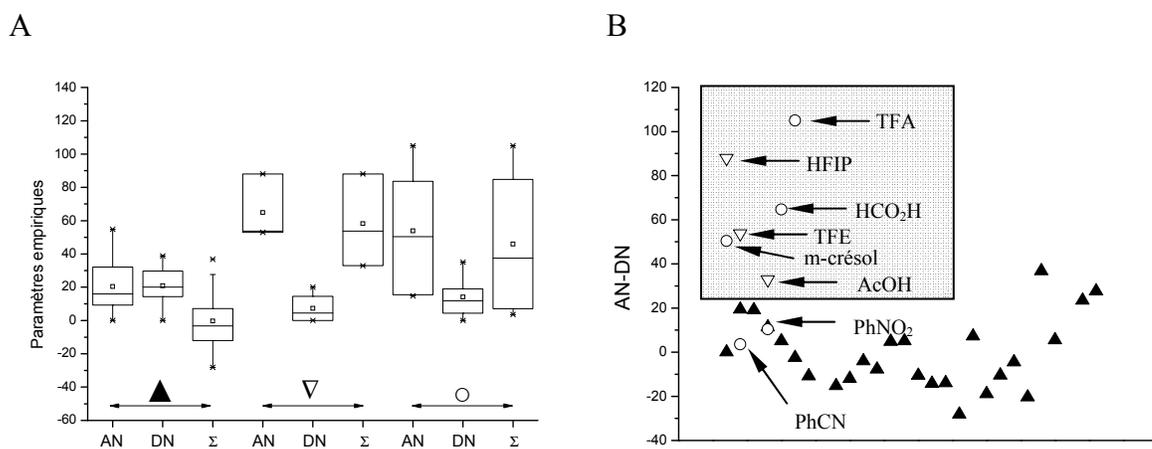


Figure III-15. Solubilité directe de AcGln₁₅NH₂ (**11a**) à 1,0 mg/mL. ▲, insoluble; ▽, soluble partiellement; ○, soluble. **A**, paramètres de Gutmann¹⁷; **B**, Différence AN-DN avec ○ et ▽ identifiés.

¹⁶ SA, acidité du solvant. SB, basicité du solvant. SPP, polarité/polarisabilité du solvant.

¹⁷ AN, électrophilicité. DN, nucléophilicité. Σ, constante amphotérique (AN+DN).

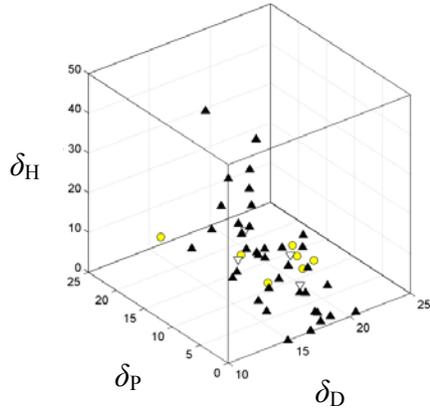
Le modèle de Gutmann indique (Figure III-15) qu'un bon solvant pour les polyGln doit être électrophile (accepteur d'électrons) et posséder une grande amphotéricité (AN+DN), alors que la nucléophilicité (donneur d'électrons) est un paramètre moins caractéristique des bons solvants. De plus, presque tous les bons solvants ont des valeurs AN-DN supérieures à 30 alors que celles des mauvais solvants sont inférieures à 30.

Le modèle de Hansen nous permet la visualisation en 3D des interactions dispersives (δ_D), polaires (δ_P) et des ponts hydrogène (δ_H) (Figure III-16). Il est possible de constater que les bons solvants se distribuent dans trois espaces distincts. À une extrémité se trouvent les acides (acétique et formique) et à l'opposé se trouvent les aromatiques (PhOH, PhCN, PhNH₂, PhNO₂, *m*-crésol et anisole). Entre ces extrêmes se trouvent les halogénés (TFA, TFE et HFIP). L'enveloppe convexe exclut tous les non solvants à l'exception de la pyridine et de la morpholine. L'ellipse de solubilité de Hansen s'avère être peu discriminante car elle englobe un bon nombre de mauvais solvants.

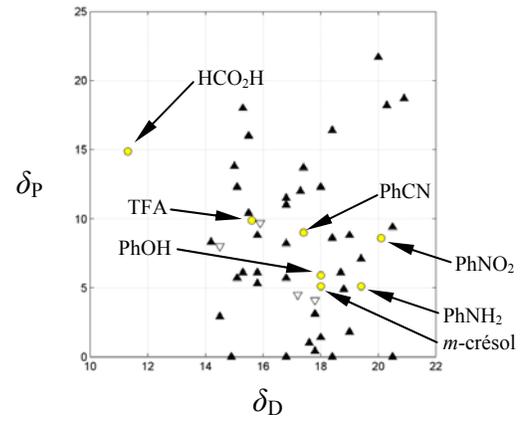
III.4.2. Solubilisation directe suivie d'ajout de cosolvants

Les polyGln non chargées, lorsque préalablement solubilisées dans le TFA (1 mg/mL), ont pu être maintenues en solution même après l'addition de solvant organique, jusqu'à une dilution à TFA 1% (v/v) dans DCM ou ACN et dans les solutions d'ACN avec du HFIP 2% (v/v) ou du DMSO 2% (v/v). Toutefois des agrégats sont apparus environ 3 heures après la mise en solution dans le TFA/DCM. L'addition de HFIP (10%, v/v) à ces trois mélanges organiques a permis de prévenir l'agrégation pour une période allant jusqu'à 24 h. Par ailleurs, lorsque solubilisées dans le phénol aqueux (80%, p/v), l'ajout de tout solvant organique mène à la précipitation des polyGln.

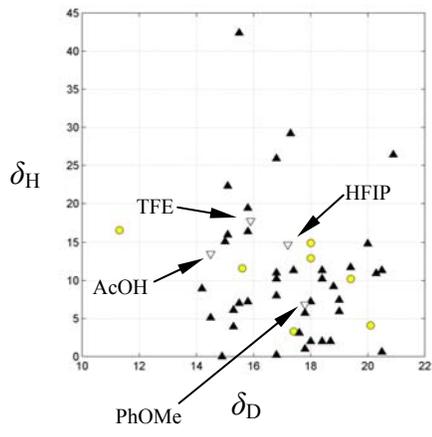
A



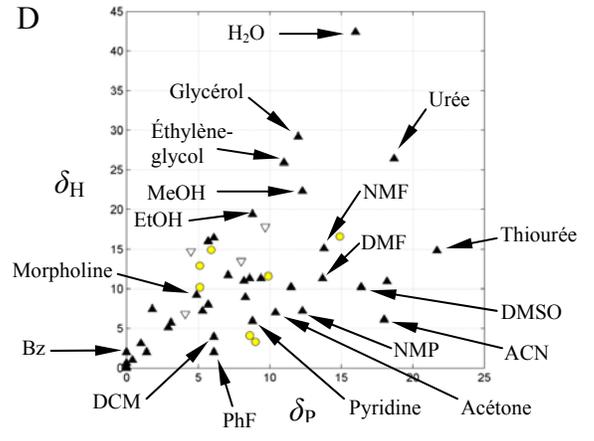
B



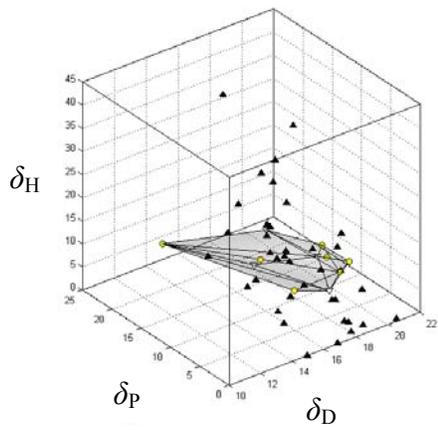
C



D



E



F

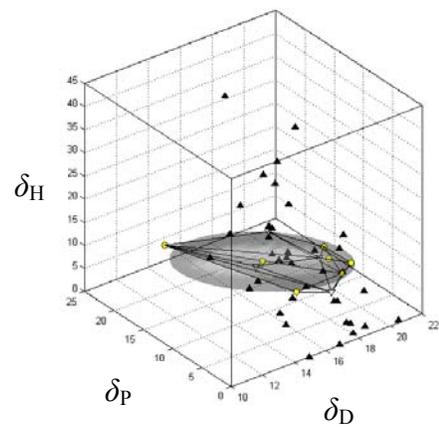


Figure III-16. Solubilité directe de AcGln₁₅NH₂ (**11a**) à 1,0 mg/mL dans différents solvants selon les types d'interactions décrites par le modèle de Hansen¹⁸. **A**, représentation 3D ($\delta_D, \delta_P, \delta_H$); **B**, 2D (δ_D, δ_P)¹⁹; **C**, 2D (δ_D, δ_H)²⁰; **D**, 2D (δ_D, δ_H)²¹; **E**, enveloppe convexe²² et **F**, ellipse de solubilité de Hansen²³.

III.4.3. Solubilisation indirecte en milieu aqueux

L'utilisation de l'approche développée par Chen (Chen et Wetzel 2001) pour les polyGln chargées a été appliquée également aux polyGln non chargées. Cependant, l'addition de petites quantités d'eau a mené invariablement à la précipitation du peptide. Un protocole a été développé afin de solubiliser le peptide en milieu aqueux soit la dissolution du peptide dans l'acide acétique glacial ou l'acide formique, suivie d'une lyophilisation. Le peptide a été ensuite dissout dans le TFA avec l'addition subséquente de HFIP et finalement d'eau. Ce protocole a ainsi permis la purification des polyGln par HPLC.

III.4.4. Solubilisation indirecte en milieu organique

La dissolution du peptide à 1,0 mg/mL dans le TFA suivie de sa lyophilisation a permis de solubiliser le peptide de polyGln dans le TFE, HFIP et DMSO. Toutefois, la lyophilisation de la polyGln non chargée préalablement dissoute dans l'acide formique n'a pas permis une solubilisation ultérieure dans les alcools fluorés.

¹⁸ ○, solubilité totale. ▽, solubilité partielle. ▲, insolubilité.

¹⁹ Avec ○ identifiés.

²⁰ Avec ▽ identifiés

²¹ Avec ▲ identifiés

²² Espace composé des ▽ et ○, volume = 191,0 (cal/cm³)^{3/2}.

²³ Volume = 423,9 (cal/cm³)^{3/2} et $Ra = 4,66$ (cal/cm³)^{1/2}. Les caractéristiques de tous les solvants et solutions se trouvent en annexe II.

III.5. Étude physicochimique des polyglutamines

III.5.1. Polyglutamines non chargées

III.5.1.1. Diffusion de la lumière

III.5.1.1.1. Généralités

Le protocole expérimental ayant servi pour étudier l'agrégation des polyGln a été développé à l'aide d'expériences en diffusion dynamique de la lumière avec AcGln₁₅NH₂ (**11a**) pour ensuite être transposé à l'étude de Ac[Glu(AEM)]₂Gln₁₅[Glu(AEM)]₂NH₂ (**15**). Les tailles sont directement rapportées sous forme de R_H moyen-Z inverse ($R_{H,1/Z}$) alors que l'utilisation de paramètres indirects tel que l'intensité de diffusion n'a pas donné des résultats tangibles pour nos systèmes. Des distributions pondérées en intensité de diffusion ont également été obtenues par inversion de la transformée de Laplace. L'objectif était de déterminer si certaines populations de tailles étaient plus importantes que d'autres afin de nous informer sur le mécanisme d'agrégation. Ces vérifications ont été effectuées avec les deux méthodes de régularisation du DTS et par la méthode d'entropie maximale, alors que les distributions de CONTIN étaient trop étalées (Figure III-17). Les distributions obtenues par le DTS sont similaires à celles obtenues par entropie maximale, alors que l'utilisation d'une valeur de $\Lambda = 0,001$ permet parfois d'obtenir des distributions plus étroites et la résolution de sous-populations. Ces analyses n'ont cependant pas fait ressortir de patrons suggérant que certaines tailles sont plus impliquées que d'autres dans l'agrégation de la polyGln.

III.5.1.1.1. Solubilisation

La solubilisation directe de AcGln₁₅NH₂ (**11a**) dans le TFA, même après 90 min de traitement par ultrasons, a produit des particules dont le $R_{H,1/Z}$ varie entre 45 et 90 μm . Une analyse HPLC a d'ailleurs montré que le peptide est stable dans ces conditions. L'ultracentrifugation a ensuite permis d'obtenir un surnageant dont le rayon hydrodynamique variait entre 12 et 15 μm .

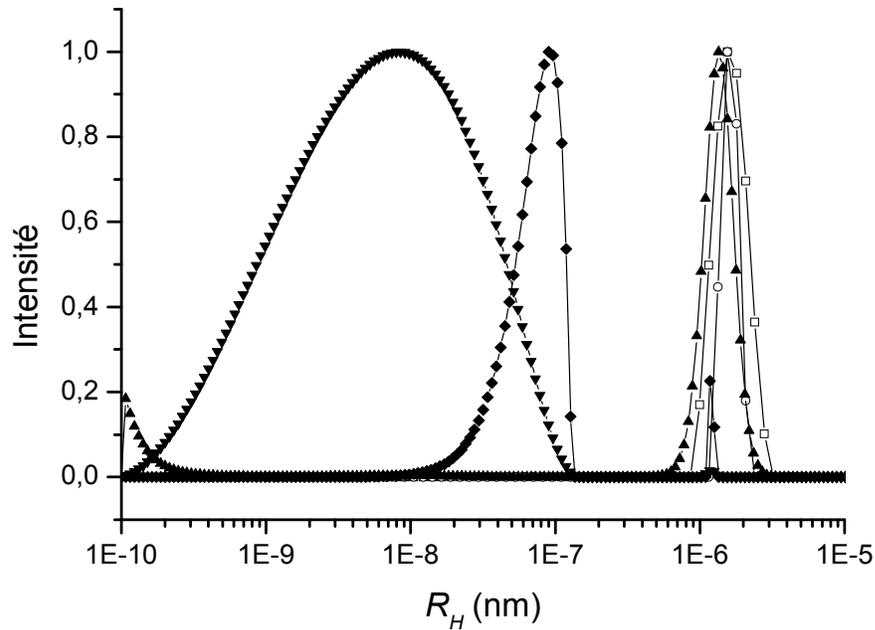


Figure III-17. Exemple représentatif des distributions de tailles pondérées en intensité, déterminées par différents algorithmes.³⁴

La solubilisation indirecte en milieu aqueux a été tentée avec le peptide prétraité par ultrasons suivie de cycles de solubilisation-évaporation dans un mélange TFA/HFIP (50/50; v/v) ou TFA (100%). Les tailles produites par ce mélange aqueux étaient plus petites pour l'échantillon prétraité avec le TFA que pour ceux prétraités avec le mélange HFIP-TFA. La filtration à 200 nm a cependant éliminé toute trace de peptide en solution.

³⁴ Il s'agit de la polyGln (**15**) à pH 10,0 à $t = 3\text{h}15$. La valeur de n correspond à l'ordre du terme de régularisation (T_R) et Λ au paramètre de régularisation utilisé. Le DTS utilise $n = 1$ avec $\Lambda = 0,01(\square)/0,001(\circ)$ selon le mode de distribution générale/multiple et étroit. L'algorithme CONTIN avec $n = 0(\blacktriangledown)/2(\blacklozenge)$, avec Λ variable et optimisé ($\Lambda = 3,1 \times 10^{-10}/2,5 \times 10^{-10}$) est associé aux probabilités de rejet $P(0,499/0,502)$. MEM (\blacktriangle) est la méthode d'entropie maximale ($F = 0,68$). Aucune correction pour la poussière n'a été utilisée pour ces analyses.

Une lyophilisation de ces solutions a été tentée mais la solution de TFA/HFIP (50/50; v/v) ne s'est pas lyophilisée mais plutôt évaporée. La lyophilisation du peptide dans le TFA n'a pas aidé sa solubilisation en milieu aqueux, mais elle a permis sa solubilisation dans le TFE. Le prétraitement consiste donc en la solubilisation du peptide dans le TFA à l'aide d'ultrasons pour une durée de 90 min suivie de la lyophilisation du TFA. L'effet de la concentration du peptide lors du prétraitement dans le TFA a été étudié avec trois concentrations, 0,5, 1,0 et 1,5 mg/mL (Figure III-18). La concentration de 1,0 mg/mL a été optimale pour la formation de monomères en solution. Il est à noter que la lyophilisation de 1500 μ l de TFA est plutôt associée à une évaporation puisque le TFA se liquéfie lors de l'opération, ce qui ne semble pas être le cas avec le plus petit volume. Cette observation a été corroborée par la lyophilisation à une concentration de 1,0 mg/mL sur glace carbonique, effectuée en duplicata, qui a donné un R_H moyen pondéré en volume de $1,33 \pm 0,03$ nm. La lyophilisation à -78 °C étant longue et laborieuse, l'ajout d'un cosolvant a été tenté afin d'augmenter la température de fusion du mélange peptide-TFA afin de permettre l'utilisation d'une plus grande quantité de solvant. À 1 mg de peptide prétraité dans 1 ml TFA, des quantités équivalentes de AcOH et de benzène ont été ajoutées et ce, sans apparition d'agrégats. Le premier mélange s'est liquéfié lors de la lyophilisation alors que le peptide en provenance du second mélange n'était pas soluble dans le TFE. Le protocole de prétraitement retenu est donc celui d'une solubilisation de 1 mg de peptide dans 1 mL de TFA avec ultrasons pour 90 min, congélation dans l'azote liquide et lyophilisation à température de la pièce.

Malgré le prétraitement avec le TFA, il subsiste des agrégats de grande taille ($R_H = 700 - 6000$ nm), réfractaires à la dissolution. L'ultracentrifugation de la solution de AcGln₁₅NH₂/TFE a permis d'enlever ces agrégats de grande taille, mais des particules d'environ 30 nm subsistaient. L'ultrafiltration avec des filtres en téflon (pores de 200 nm de diamètre) a été tentée, mais ce n'est qu'avec des filtres inorganiques (pores de 20 nm de diamètre) que des résultats reproductibles ont été obtenus en diffusion de la lumière.

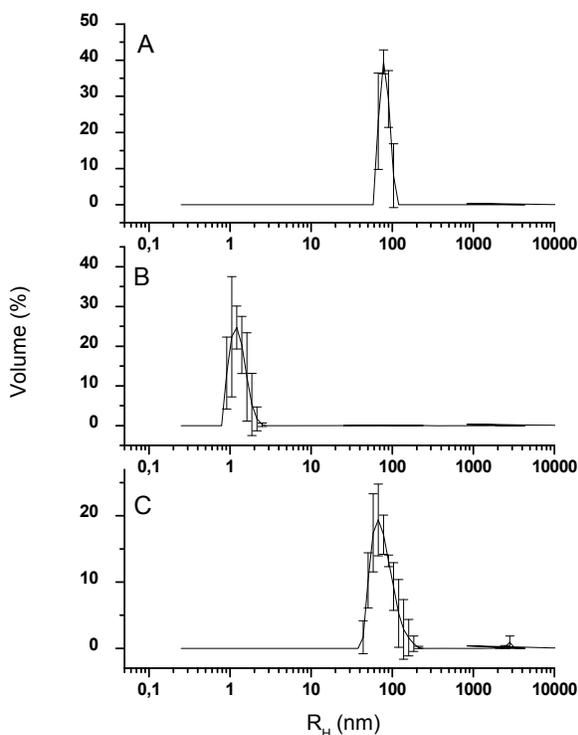


Figure III-18 Distributions des tailles obtenues en diffusion de la lumière, pondérées en volume, de AcGln₁₅NH₂ (**11a**) (1,0 mg) dans le TFE (1,0 mL) après un traitement dans divers volumes de TFA. **A**, 0,5 mL, R_H moyen = 74 ± 4 nm; **B**, 1,0 mL, R_H moyen = $1,1 \pm 0,2$ nm et **C**, 1,5 mL de TFA, R_H moyen = 72 ± 12 nm.³⁵

Il a été montré que le peptide ne change pas de taille dans 100% TFE sur une période de 12 h. Il a été possible d'induire et de quantifier l'agrégation par titrage aqueux de solutions de polyGln dans le TFE (Figure III-19). À 25% d'eau dans le TFE, la séparation du précipité et du surnageant par filtration (200 nm), évaporation du solvant, resolubilisation et analyse par HPLC analytique a montré que 80% du peptide qui demeurait en solution avait une taille inférieure à 200 nm.

³⁵ Les barres d'erreur sur les distributions et l'incertitude des R_H représentent l'écart-type provenant de trois expériences indépendantes.

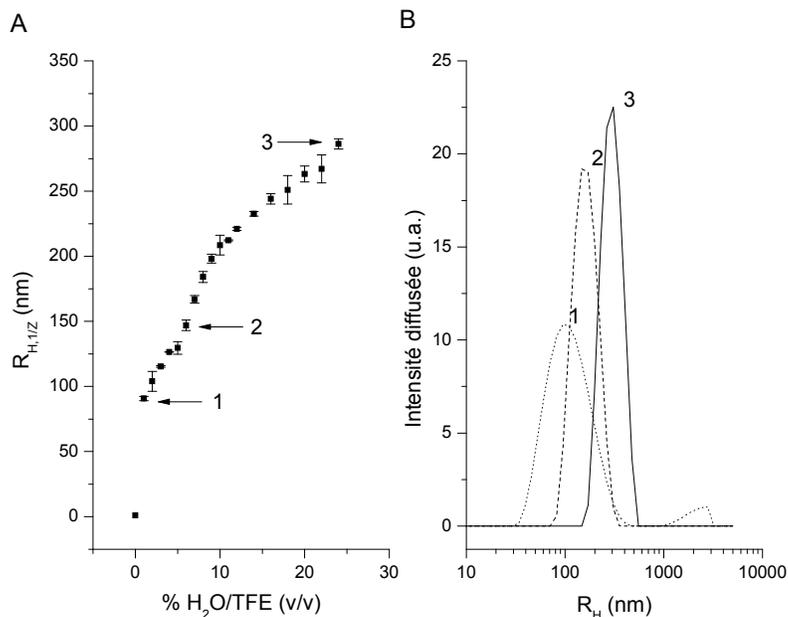


Figure III-19. Titrage aqueux d'une solution de AcGln₁₅NH₂ (**11a**) (1 mg/mL) dans le TFE. **A**, variation du rayon moyen-Z inverse et **B**, distribution des tailles pondérées en intensité selon la méthode des gradients ($\Lambda = 0,01$).³⁶

Puisque l'agrégation de la polyGln dans des mélanges eau/TFE semble se produire à de très faibles concentrations d'eau, des cinétiques d'agrégation ont été tentées avec 0,5 - 5% H₂O/TFE (v/v) (Figure III-20). Il est possible d'observer que le temps de latence avant le début de l'agrégation est réduit par l'augmentation du pourcentage d'eau dans le TFE. L'index de polydispersion (PDI), un marqueur indirect de l'agrégation est présenté seulement pour l'expérience contenant 5% H₂O/TFE (v/v), car il semble varier aléatoirement avec des concentrations plus faibles en eau. Il se produit également une variation de tailles lors de titrage aqueux du peptide solubilisé dans le DMSO (résultats non-présentés).

³⁶ 1, 2 et 3 représentent respectivement 1, 5 et 25% H₂O/TFE (v/v). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur deux lectures indépendantes. Expérience effectuée en duplicata.

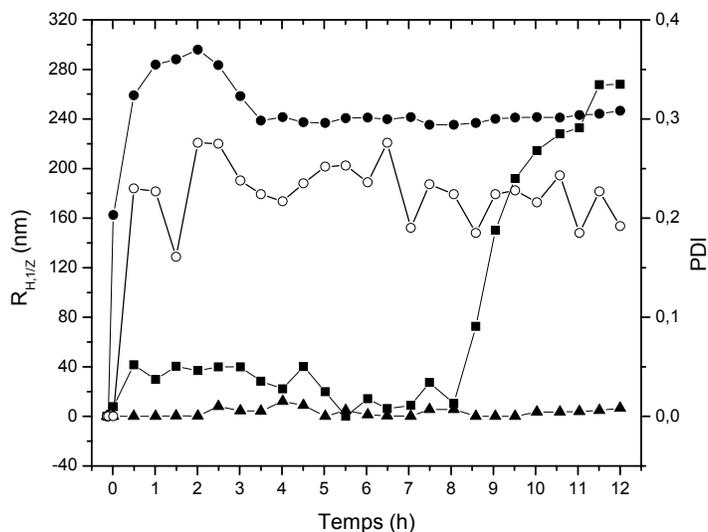


Figure III-20. Cinétique d'agrégation d'une solution de AcGln₁₅NH₂ (**11a**) (1 mg/mL) dans le TFE après l'ajout de diverses quantités d'eau.³⁷

III.5.1.1.2. Spectroscopie RMN

Le peptide AcGln₁₅NH₂ (**11a**) a été caractérisé dans le TFA-d (COSY, TOCSY, NOESY) afin de s'assurer que la structure correspondait à ce qui était attendu (Tableau III-3). La distinction des ¹H_δ et des ¹H-N se fait avec le TOCSY car les ¹H_δ ont une corrélation croisée entre eux mais pas avec les autres systèmes de spins alors que les ¹H-N corrélient avec les ¹H_α. Les déplacements chimiques du ¹³C ont été déterminés par HMQC, HMBC et DEPT135.

³⁷ Rayon hydrodynamique moyen-Z inverse dans ▲, 0,5% H₂O/TFE (v/v); ■, 2,5% H₂O/TFE (v/v) et ●, 5% H₂O/TFE (v/v). ○, index de polydispersion (PDI) dans 5% H₂O/TFE (v/v). Il s'agit d'une expérience unique.

Tableau III-3. Assignation des déplacements chimiques de AcGln₁₅NH₂ (**11a**) dans les solvants TFA-d et TFE-d₃

Structure	TFA-d δ (ppm)	TFE-d ₃ δ (ppm)
¹ H _α	5,17	4,36+3,80
¹ H _β	2,80+2,67	2,77+2,54
¹ H _γ	3,14	2,85
¹ H-N	8,62	8,61+8,44
¹ H _{δ-trans}	8,11	8,02
¹ H _{δ-cis}	8,28	7,88
¹ H-Ac	2,65	2,43
¹³ C _α	56,6	-
¹³ C _β	21,5	-
¹³ C _γ	30,2	-
¹³ C-Ac	19,1	-
¹³ CO	184	-

Il a été possible de bien distinguer le groupement *N*-acétyle des ¹H_{β+γ} par l'ajout de benzène-d₆ dans le TFA-d (benzène-d₆/TFA-d; 25/75; v/v).

Le peptide a fait l'objet d'une solubilisation indirecte dans le TFE après lyophilisation dans le TFA. En utilisant l'index de dispersion des déplacements chimiques, il est possible de remarquer que le ¹H_α se divise probablement en deux populations, une prédominante attribuable à une structure aléatoire à 4,36 ppm et l'autre attribuable à une structure hélicoïdale à 3,80 ppm (Figure III-21).

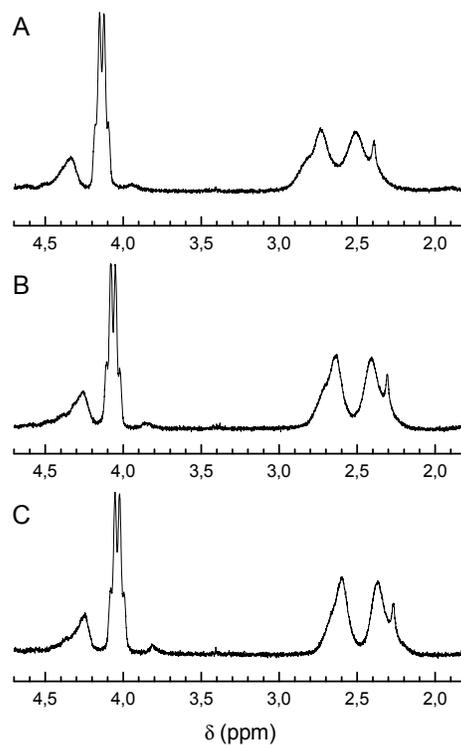


Figure III-21. Spectres RMN ^1H de $\text{AcGln}_{15}\text{NH}_2$ (**11a**) à divers % $\text{H}_2\text{O}/\text{TFE}$ (v/v). **A**, 0 %; **B**, 15% et **C**, 25%.

L'agrégation est induite par titrage aqueux, durant lequel il est possible de voir une très légère augmentation de la population hélicoïdale ($\delta = 3,80$ ppm). Les bandes attribuées aux $^1\text{H}_{\beta+\gamma}$ ont subi une diminution de leur aire et de leur largeur à mi-hauteur (Figure III-22).

Les agrégats formés ont été redissous dans le TFA et leur spectre du ^1H comparé à celui du produit de départ afin de s'assurer que les agrégats étaient bien formés de $\text{AcGln}_{15}\text{NH}_2$ (**11a**).

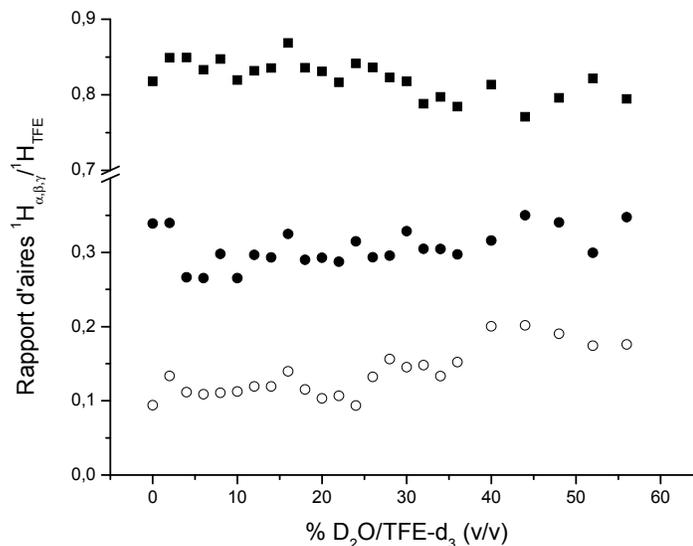


Figure III-22. Titration aqueux de AcGln₁₅NH₂ (**11a**) corrigé pour la dilution avec le ¹H résiduel du TFE-d₃. ■, ¹H_{β+γ} (2,45-2,95); ●, ¹H_α (δ = 4,36 ppm); ○, ¹H_α (δ = 3,80 ppm).

III.5.1.1.3. Dichroïsme circulaire

Lorsque solubilisé dans le TFE, le peptide ne change pas de structure secondaire pour une période d'au moins 24 h. L'aggrégation a été induite par titrages aqueux. Les spectres ont été analysés par moindres carrés, sans contraintes, avec les spectres de référence de Brahms & Brahms (Brahms et Brahms 1980). Les courbes obtenues ont montré un excellent accord avec les données expérimentales avec un $r^2 > 0,99$, mais leur interprétation s'avère difficile.

Ensuite, les spectres expérimentaux transformés en facteur g ont fait l'objet d'une analyse par moindres carrés, avec contraintes, en utilisant les spectres de référence amycomp.dat (McPhie 2004). Cependant, il y avait un écart considérable entre les courbes obtenues et les données expérimentales. Finalement, les spectres ont été analysés avec CDPPro (CONTINLL, SELCON et CDsstr). Les résultats des trois algorithmes étant très

semblables, ceux de CDsstr, ayant le plus bas RMSD, sont présentés (Figure III-23). La structure hélicoïdale prédomine, suivie de la structure aléatoire. Leurs proportions demeurent stables de 0 à 10% d'eau dans le TFE. Avec une fraction volumique d'eau croissante, l'hélice α laisse graduellement place aux autres structures.

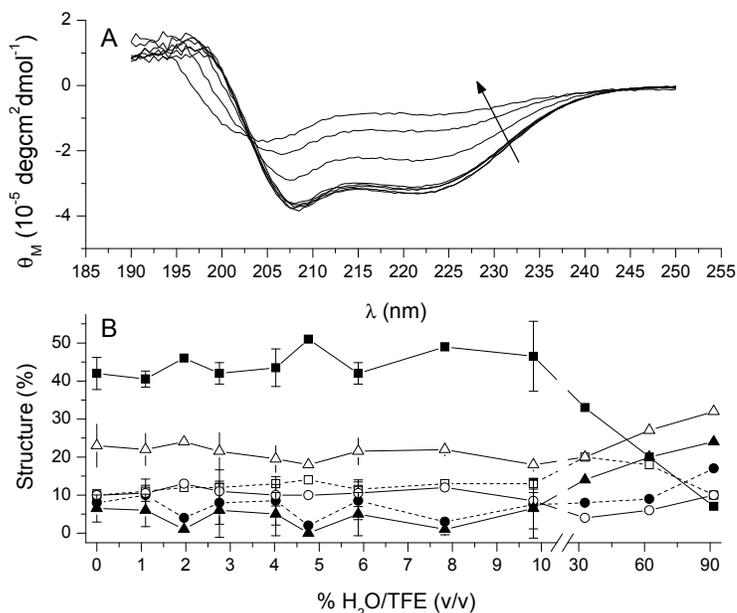


Figure III-23. Titration aqueuse de AcGln₁₅NH₂ (**11a**) dans le TFE. **A**, représentation de l'ellipticité molaire (θ_M) variant de 0 à 90 % H₂O/TFE (v/v) représenté par la flèche. **B**, déconvolution avec CDsstr (RMSD moy. = 0,138).³⁸

III.5.1.1.1. RMN en phase solide

Les agrégats formés à partir d'une solution de 50% eau/TFE (v/v) ont été étudiés par RMN en phase solide. Deux techniques ont été utilisées, la rotation rapide à l'angle magique et la séquence CRAMPS (Figure III-24). La largeur des signaux du ¹H ne permet pas la détermination de la structure secondaire des agrégats.

³⁸ ■, Hélice α . □, Hélice 3-10. ●, Feuillet β . ○, Coudes β . ▲, Polyproline type II. △, Aléatoire. Les barres d'erreur représentent l'écart-type associés à deux expériences indépendantes.

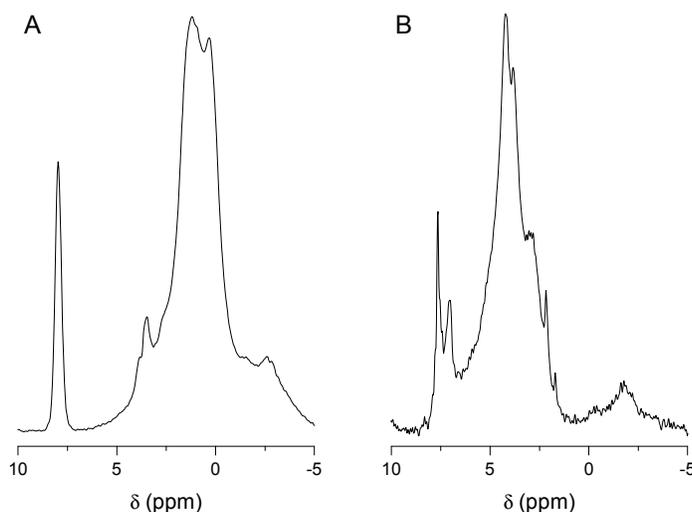


Figure III-24. Spectres RMN du ^1H en phase solide de AcGln $_{15}$ NH $_2$ (**11a**) agrégé dans 50% TFE/H $_2$ O (v/v). **A**, rotation à l'angle magique (30 kHz); **B**, CRAMPS (2 kHz).

Malgré la faible abondance isotopique, les bandes plus fines du ^{13}C ont dû être utilisées. Le spectre du ^{13}C montre des bandes à 180 ppm qui sont associées aux amides primaires et secondaires ($^{13}\text{C}_\delta\text{O}$ et ^{13}CO), alors que celles vers 55 ppm correspondent au $^{13}\text{C}_\alpha$ et celles autour de 30 ppm sont attribuables aux $^{13}\text{C}_\beta$ et $^{13}\text{C}_\gamma$ (Figure III-25A). Le $^{13}\text{C}_\alpha$ montre deux bandes à 54,4 et 55,9 ppm (Figure III-25B) et selon l'index des déplacements chimiques, ces bandes sont respectivement attribuables à des structures aléatoires et hélicoïdales. L'information contenue dans le ^1H - ^{13}C HETCOR n'augmente pas la résolution dans la dimension du ^1H alors que la dimension du ^{13}C est identique au CP-MAS, sans augmentation notable de la sensibilité.

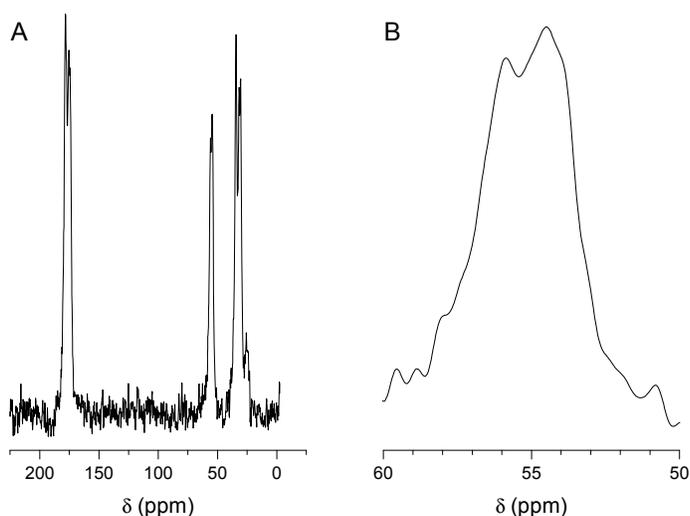


Figure III-25. **A**, spectre CP-MAS du ^{13}C de AcGln $_{15}$ NH $_2$ (**11a**) agrégé dans 50% TFE/H $_2$ O (v/v) et **B**, expansion du signal du $^{13}\text{C}_{\alpha}$.

III.5.1.1.1. Spectroscopie Raman

La détermination de la structure secondaire du peptide agrégé a été tentée par spectroscopie vibrationnelle. La spectroscopie infrarouge a d'abord été utilisée, en mode de réflexion totale atténuée, mais le signal intense des trifluoroacétates se superposait à la bande amide I. La spectroscopie Raman a donc été utilisée. Les structures du peptide post-purification ont été comparées à celles obtenues après agrégation dans le mélange TFE-eau (Figure III-26). Dans les deux spectres, la contribution majeure était située autour de 1655 cm^{-1} , ce qui correspond à une structure hélicoïdale (Tableau III-4).

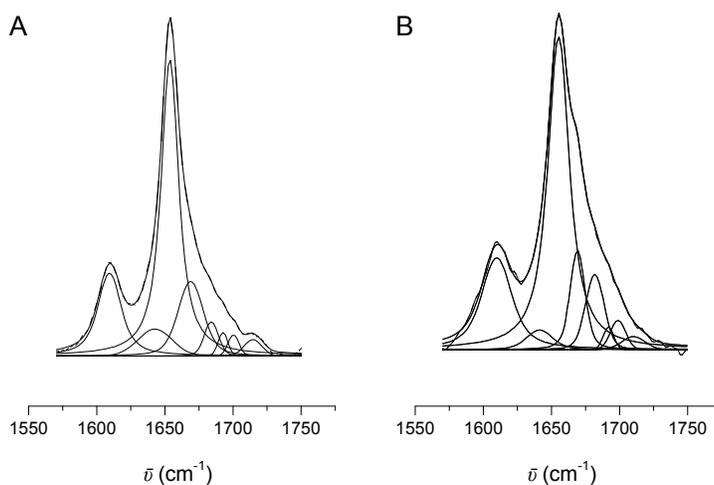


Figure III-26. Décomposition en profils voightiens de la bande amide I de AcGln₁₅NH₂ (**11a**). **A**, après purification et **B**, post-agrégation dans 50% TFE/H₂O (v/v).

Tableau III-4. Fractions (%) des composantes structurales de AcGln₁₅NH₂ (**11a**) déterminées par spectroscopie Raman

Structure	Pré-agrégation		Post-agrégation	
	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	%	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	%
Hélice α	1653	68,9	1655	65,9
Feuillet β	1668	20,1	1669	12,1
Coude β	1683	4,7	1681	10,7
Coude β	1699	1,9	1698	3,2
Aléatoire	1642	4,4	1641	8,1
Corrélation (R ²)		99,3		98,0

III.5.1.1.2. Spectroscopie UV-visible

Le déplacement spectral du rouge de Congo a permis de s'assurer que le peptide agrégé dans le système TFE-eau avait bien les caractéristiques d'un peptide de type amyloïde, comme rapporté avec les polyGln chargées en milieu aqueux. La formation d'un complexe entre le rouge de Congo et le peptide amyloïde montre un épaulement vers 540 nm lequel a été mis en évidence par soustraction spectrale (Figure III-27A). Cette procédure a également montré qu'il est possible de suivre l'agrégation du peptide dans le TFE sans y ajouter d'eau (Figure III-27B).

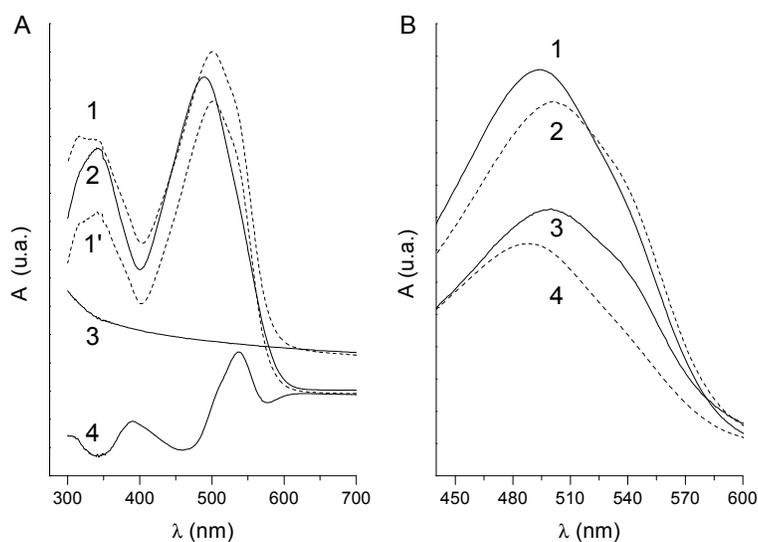


Figure III-27. Déplacement de l'absorption UV-Vis du rouge de Congo (RC) avec AcGln₁₅NH₂ (**11a**). **A**, différences spectrales³⁹ et **B**, agrégation de AcGln₁₅NH₂ dans le TFE à divers temps caractérisée par l'absorption à 540 nm du complexe AcGln₁₅NH₂-RC.⁴⁰

³⁹ 1, AcGln₁₅NH₂ avec RC. 1', soustraction de AcGln₁₅NH₂ de 1. 2, RC seul. 3, AcGln₁₅NH₂ seul. 4, soustraction du RC de AcGln₁₅NH₂ avec RC qui présente un maximum d'absorption à 541 nm.

⁴⁰ 1 = 0 min; 2 = 48 h; 3 = 7 jours; 4 = RC seul.

III.5.1.1.3. Microscopie optique polarisée

Cette technique s'avère également utile afin d'identifier la présence d'agrégats de type amyloïde. La présence de biréfringence à la lumière polarisée permet de confirmer que les agrégats formés en présence de TFE sont de type amyloïde (Figure III-28).

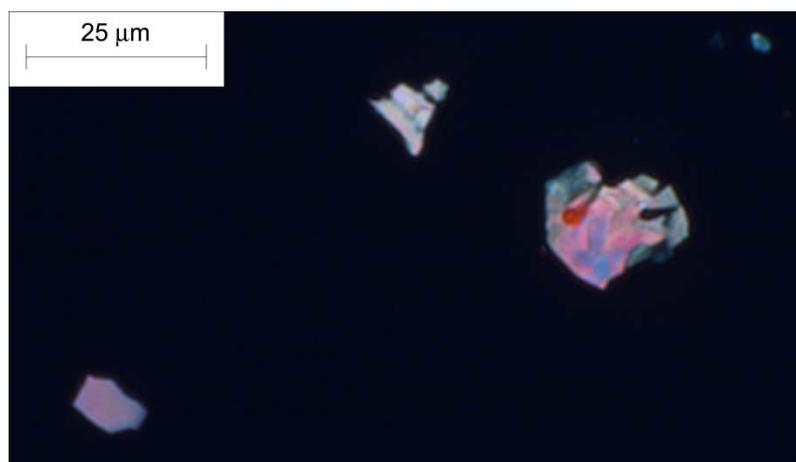


Figure III-28. Microscopie optique polarisée montrant la biréfringence de couleur verte du rouge de Congo associée aux fibrilles de AcGln₁₅NH₂ (**11a**) formées dans un mélange TFE-eau.

III.5.2. Polyglutamines sensibles au pH

La solubilisation de Ac[Glu(AEM)]₂Gln₁₅[Glu(AEM)]₂NH₂ (**15**) a été effectuée en milieu aqueux après un prétraitement consistant en une solubilisation dans le TFA, ultrasons et lyophilisation du solvant. Le peptide est totalement soluble dans une solution de HCl (aq) à pH 4,0. Le peptide est ensuite titré au pH désiré avec NaOH 0,1M (aq).

III.5.2.1. Diffusion de la lumière

Le peptide en solution à pH 4,0 a été filtré avec un filtre inorganique ayant des pores de 20 nm de diamètre. Il a ensuite été titré avec une solution de NaOH (aq.), préalablement filtrée à 200 nm avec un filtre en PTFE. Les cinétiques d'agrégation à différents pH sont présentées à la Figure III-29.

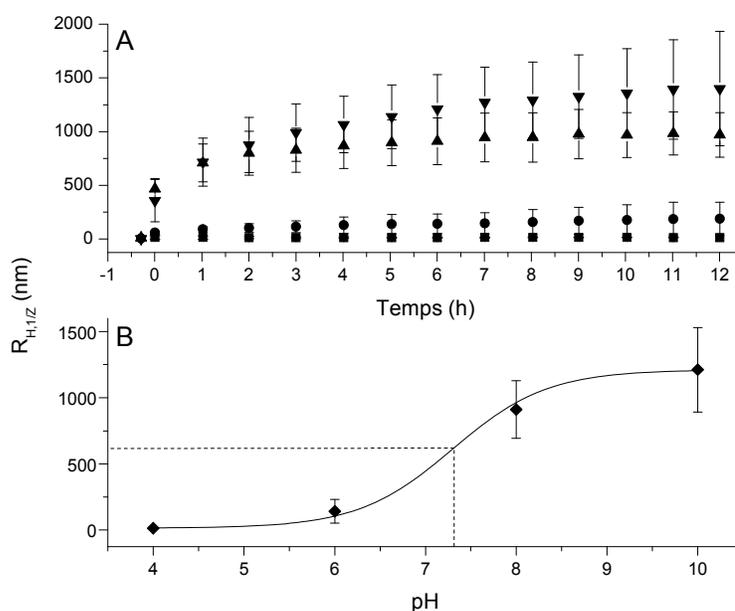


Figure III-29. Cinétiques d'agrégation de Ac[Glu(AEM)]₂Gln₁₅[Glu(AEM)]₂NH₂ (**15**) en fonction du pH.⁴¹ **A**, cinétiques et **B**, titrage évaluant le pK_a à 7,3 pour les unités morpholine.

L'analyse des distributions de taille a été effectuée par les méthodes de régularisation du DTS et d'entropie maximale, mais n'a pas révélé de patrons pouvant suggérer l'implication de certaines tailles plus que d'autres. Toutefois, le mécanisme

⁴¹ ■, pH 4,0; ●, pH 6,0; ▲, pH 8,0 et ▼, pH 10,0. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois expériences indépendantes.

d'agrégation a pu être étudié avec la théorie des fractales. En effet, le graphique log-log (Figure III-30A) produit une linéarisation des cinétiques et la détermination des dimensions fractales. Les valeurs des dimensions fractales ne sont pas changées par l'utilisation de régression non linéaire avec une fonction de puissance. De plus, l'extrapolation des droites (ordonnée à l'origine) permet d'obtenir la taille du monomère qui est de 2,5 ($\pm 0,5$) nm. Le mécanisme d'agrégation est également étudié par des cinétiques d'agrégation à force ionique élevée. (Figure III-30B)

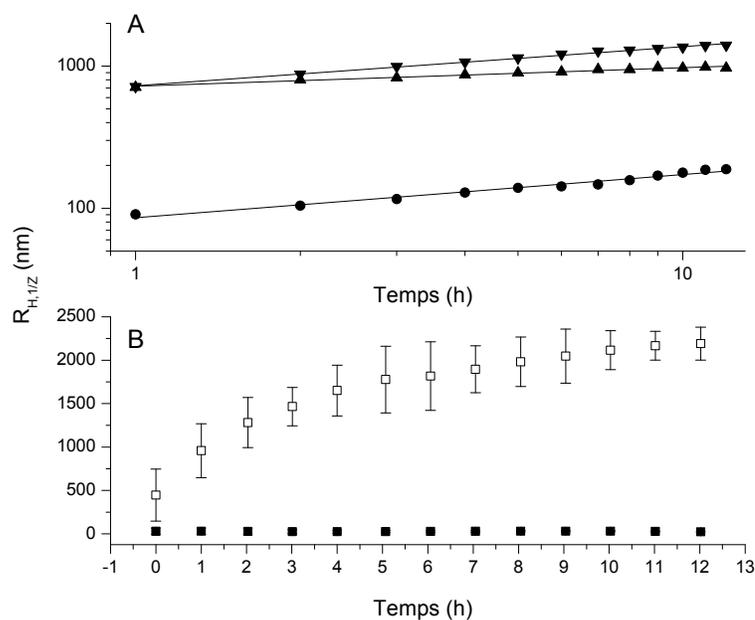


Figure III-30. Cinétiques d'agrégation de Ac[Glu(AEM)₂Gln₁₅[Glu(AEM)₂NH₂ (**15**). **A**, tracé log-log à divers pH et la dimension fractale (D_f) déterminée par régression linéaire⁴² et **B**, cinétiques d'agrégation à différentes forces ioniques (μ).⁴³

⁴² ●, pH 6,0 et $D_f = 3,65$; ▲, pH 8,0 et $D_f = 7,63$; ▼, pH 10,0 et $D_f = 3,58$.

⁴³ ■, $\mu < 20$ mM et □, $\mu = 154$ mM. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois expériences indépendantes.

III.5.2.2. Spectroscopie RMN

Le peptide est stable dans un milieu aqueux à pH 4,0 et aucun changement de structure secondaire n'est noté sur une période de 48 h. La transition de pH 4,0 à pH 8,0 entraîne une variation marquée du déplacement chimique des unités morpholine, mais qui n'affecte pas les δ $^1\text{H}_{\alpha,\delta,\gamma}$, ce qui ne suggère pas de changement de la structure secondaire (Figure III-31). On peut toutefois remarquer qu'il se produit un rétrécissement des bandes associées aux unités morpholine ($\delta = 2,57$ et $3,76$ ppm à pH 8,0) lorsque le pH augmente (Tableau III-5).

Tableau III-5. Assignation des déplacements chimiques (δ) du ^1H de $\text{Ac}[\text{Glu}(\text{AEM})]_2\text{Gln}_{15}[\text{Glu}(\text{AEM})]_2\text{NH}_2$ (**15**) à trois valeurs de pH

Structure	4,0 δ (ppm)	6,0 δ (ppm)	8,0 δ (ppm)
Morpholine			
$^1\text{H}_2\text{C-N}$	3,22	2,75	2,57
$^1\text{H}_2\text{C-O}$	3,93	3,82	3,76
Éthyle			
$^1\text{H}_2\text{C-N}$	3,22	2,75	2,57
$^1\text{H}_2\text{C-CH}_2\text{-N}$	3,56	3,43	3,37
Peptide			
$^1\text{H}_\alpha$	4,27	4,30	4,30
$^1\text{H}_\beta$	1,90-1,95	1,90-1,95	1,90-1,95
$^1\text{H}_\gamma$	2,37	2,39	2,40
$^1\text{H-N}$	8,44; 8,15	8,46; 8,03	7,98
$^1\text{H}_\delta$	6,87	6,88	6,89
$^1\text{H}_\delta$	7,52	7,55	7,56
$^1\text{H}_3\text{C-CO}$	2,03	2,06	2,06

Nous notons une diminution du signal sur bruit causée par l'agrégation. Il y a également une diminution du signal plus marquée pour le proton amide *trans* au C=O (plus haut déplacement chimique) que pour le proton de l'amide *cis* (plus faible déplacement chimique) (Figure III-31).

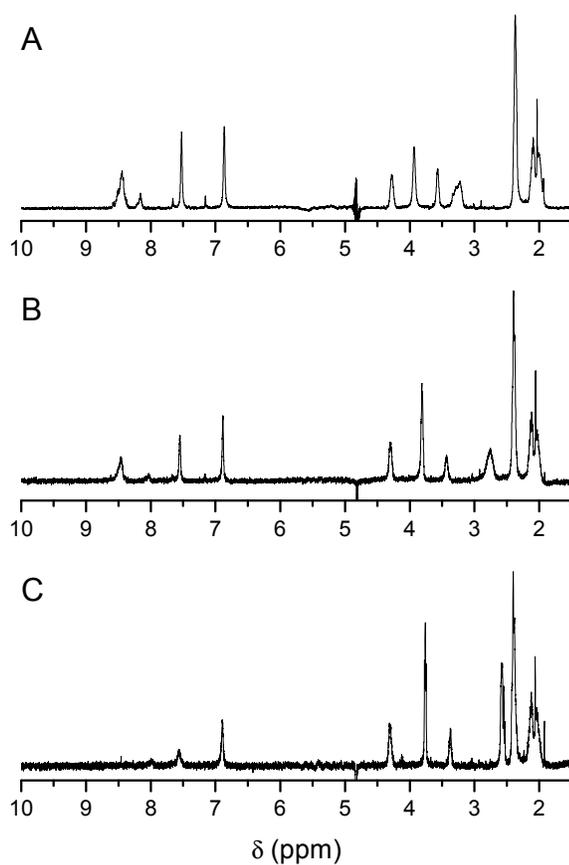


Figure III-31. Spectres RMN du ¹H de Ac[Glu(AEM)]₂Gln₁₅[Glu(AEM)]₂NH₂ (**15**) dans 90% H₂O/D₂O avec présaturation de l'eau enregistrés après ajustement du pH. **A**, pH 4,0; **B**, pH 6,0 et **C**, pH 8,0.

Le changement de pH entraîne une diminution et une augmentation de la largeur à mi-hauteur pour les $^1\text{H}_\alpha$ et $^1\text{H}_\gamma$, respectivement (Figure III-32). Toutefois, les aires associées à ces deux ^1H diminuent pour ré-augmenter légèrement par la suite.

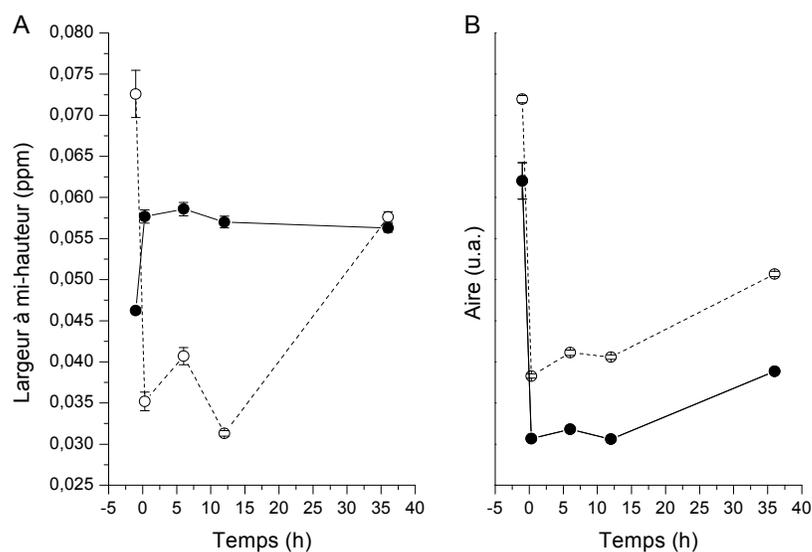


Figure III-32. Cinétique d'agrégation de $\text{Ac}[\text{Glu}(\text{AEM})]_2\text{Gln}_{15}[\text{Glu}(\text{AEM})]_2\text{NH}_2$ (**15**) selon **A**, la largeur de raie et **B**, l'aire sous le pic en RMN du ^1H . ○, $^1\text{H}_\alpha$; ●, $^1\text{H}_\gamma$.⁴⁴

⁴⁴ À $t = 0$, une transition de pH 4,0 à pH 8,0 s'est produite. Les barres d'erreur proviennent de l'ajustement de courbe lorentzien.

Après 12 h à pH 8,0, le déplacement chimique du $^1\text{H}_\alpha$ correspond à une structure aléatoire. Il n'y a pas de signal pour le $^1\text{H}_\alpha$ qui correspond au déplacement chimique des structures β ou en hélice α (Figure III-33). Nous calculons toutefois une légère diminution du ratio signal/bruit de 28,5% à 27,2% en passant de 0 à 12h.

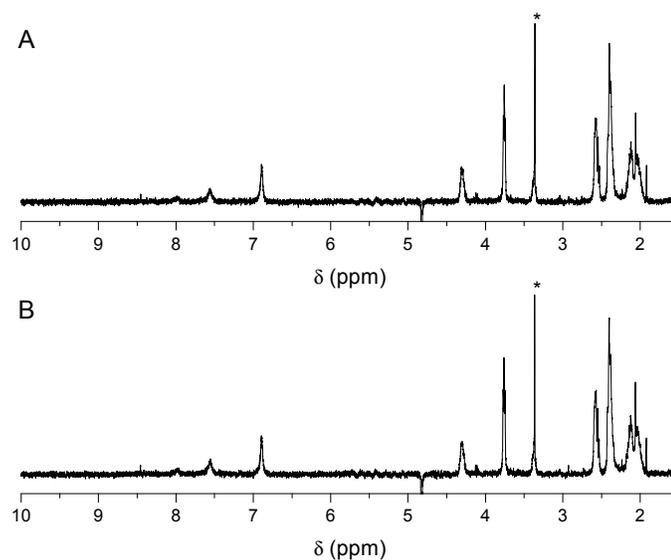


Figure III-33. Spectres RMN du ^1H de $\text{Ac}[\text{Glu}(\text{AEM})]_2\text{Gln}_{15}[\text{Glu}(\text{AEM})]_2\text{NH}_2$ (**15**) dans 90% $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ avec présaturation de l'eau. **A**, temps = 0 et **B**, temps = 12 h.⁴⁵

⁴⁵ Les $^1\text{H}_\alpha$ sont tous deux à $\delta = 4,30$ ppm. * Impureté: MeOH.

Lors d'une cinétique d'agrégation à pH 8,0, il a été observé que le signal du DSS s'élargissait et s'affaiblissait (Figure III-34). Ceci suggère une participation du DSS dans l'agrégation.

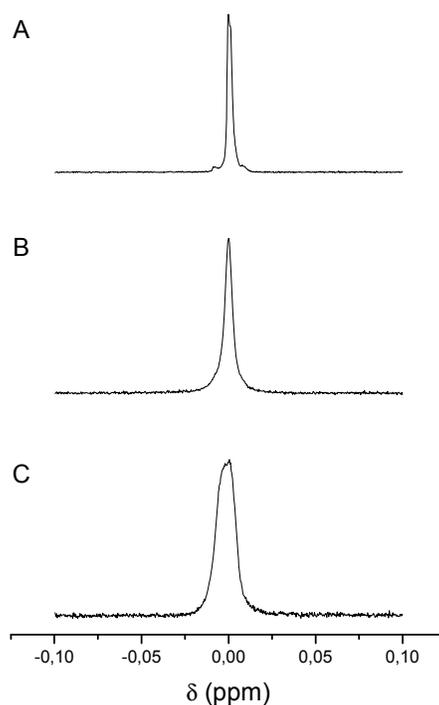


Figure III-34. Élargissement et affaïssissement du signal de RMN du ^1H associé au DSS en présence de $\text{Ac}[\text{Glu}(\text{AEM})]_2\text{Gln}_{15}[\text{Glu}(\text{AEM})]_2\text{NH}_2$ (**15**) à divers pH et temps. **A**, pH 4,0 et $t = 0$; **B**, pH 8,0 et $t = 20$ min; **C**, pH 8,0 et $t = 12$ h.

III.5.2.3. Dichroïsme circulaire

Les analyses par régression multiple, avec ou sans contraintes, sont associées aux mêmes problématiques décrites pour le peptide AcGln₁₅NH₂ (**11a**). Ainsi, les résultats des algorithmes de déconvolution utilisant les spectres de référence en facteur *g* adaptés pour CDPro sont présentés dans le Tableau III-6. Il est possible de voir le bon accord entre les trois algorithmes, CONTINLL offrant cette fois le meilleur accord avec les données expérimentales. La transition de pH 4,0 à pH 8,0 engendre des variations minimales de structures secondaires avec une prédominance des espèces aléatoires.

Tableau III-6. Fractions (%) des composantes structurales de Ac[Glu(AEM)]₂Gln₁₅[Glu(AEM)]₂NH₂ (**15**) déterminées par dichroïsme circulaire

Structure	pH 4,0			pH 8,0		
	CONTINLL	SELCON3	CDsstr	CONTINLL	SELCON3	CDsstr
Hélice α	6 (6)	0 (1)	0 (0)	10,1	6,2	0
Hélice 3-10	2(2)	2,6 (0,3)	3 (2)	3,4	2,7	1
Feuillet β	22 (7)	26 (5)	24 (6)	19,4	13,5	20
Coude β	13 (5)	15,3 (0,7)	16 (3)	16,1	18,7	17
PPII	11 (15)	17 (5)	11 (1)	0	14,8	17
Aléatoire	45 (8)	43 (7)	46 (1)	50,9	45,9	44
RMSD	0,129	0,398	0,181	0,099	0,211	0,196

Moyenne et écart-type entre parenthèses.

III.5.2.4. RMN en phase solide

Les expériences ^1H -CRAMPS et ^1H -MAS rapides n'ont pas permis une différenciation suffisamment bonne des bandes du ^1H pour permettre une analyse structurale. Le ^1H - ^{13}C HETCOR ne s'est pas avéré plus sensible que le ^{13}C CP-MAS. Les agrégats formés à pH 8,0 ont été analysés par RMN en phase solide. Le spectre montre des bandes à 180 ppm qui sont associées aux amides primaires et secondaires ($^{13}\text{C}_{\delta\text{O}}$ et ^{13}CO), alors que celles vers 55 ppm correspondent au $^{13}\text{C}_{\alpha}$ et celles autour de 30 ppm sont attribuables aux $^{13}\text{C}_{\beta}$ et $^{13}\text{C}_{\gamma}$ (Figure III-35A). La bande du $^{13}\text{C}_{\alpha}$ présente un maximum à 54,6 ppm avec un épaulement à 56,5 ppm (Figure III-35B). De plus, cette bande montre une grande dispersion des déplacements chimiques. Ceci correspond à une prédominance de structure aléatoire ($\delta = 55,7$ ppm) et/ou de feuilletts β ($\delta = 53,7$ ppm) en présence de structures hélicoïdales ($\delta = 58,4$ ppm). Il est possible de voir le TFA résiduel autour de 164 ppm ($^{13}\text{CF}_3$) et 116 ppm ($^{13}\text{CO}_2^-$).

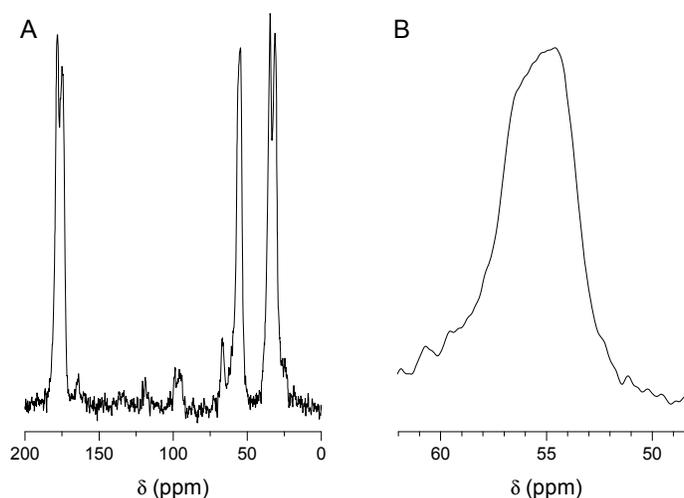


Figure III-35. **A**, spectre CP-MAS du ^{13}C de $\text{Ac}[\text{Glu}(\text{AEM})]_2\text{Gln}_{15}[\text{Glu}(\text{AEM})]_2\text{NH}_2$ (**15**) agrégé à pH 8,0 et **B**, expansion de signal du $^{13}\text{C}_{\alpha}$.

III.5.2.5. Spectroscopie Raman

L'analyse par spectroscopie Raman du peptide lyophilisé à pH 4,0 et des agrégats formés à pH 8,0 montre un faible changement de structure avec la variation de pH et la prédominance des structures hélicoïdales (Figure III-36). Dans les deux spectres, la contribution majeure se situe également autour de 1655 cm^{-1} , ce qui correspond à une structure hélicoïdale (Tableau III-7).

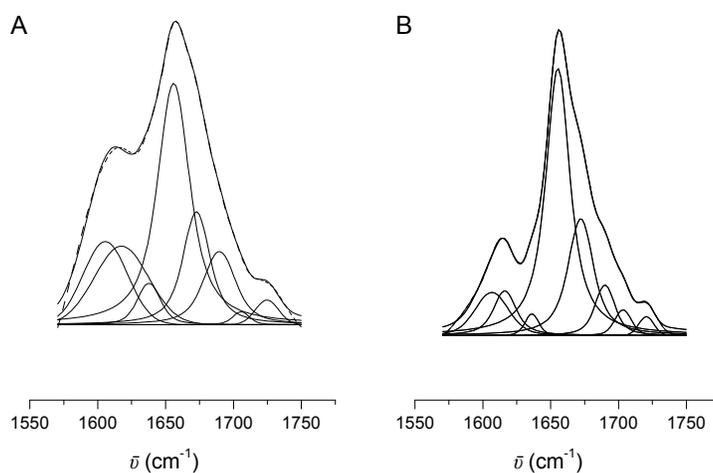


Figure III-36. Décomposition en profils voightiens de la bande amide I de $\text{Ac[Glu(AEM)}]_2\text{Gln}_{15}[\text{Glu(AEM)}]_2\text{NH}_2$ (**15**) en spectroscopie Raman. **A**, à pH 4,0 et **B**, à pH 8,0.

Tableau III-7. Fractions (%) des composantes structurales de Ac[Glu(AEM)]₂Gln₁₅[Glu(AEM)]₂NH₂ (**15**) déterminées par spectroscopie Raman

Structure	pH 4,0		pH 8,0	
	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	%	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	%
Hélice α	1656	55,3	1655	60
Feuillet β	1672	21,4	1672	26
Coude β	1690	15,6	1690	8,4
Coude β	1705	1,4	1703	3,3
Aléatoire	1638	6,3	1637	2,3
Corrélation (R ²)		97,9		99,9

III.5.2.6. Spectroscopie UV-Vis

Une solution de Ac[Glu(AEM)]₂Gln₁₅[Glu(AEM)]₂NH₂ (**15**), post-agrégation à pH 8,0, a été étudiée. Un maximum d'absorption à 541 nm a été obtenu par soustraction du spectre du rouge de Congo de celui du mélange contenant le peptide sensible au pH avec le rouge de Congo. Toutefois, une légère variation du profil d'absorption UV-Vis du rouge de Congo a été observée en variant le pH et ceci constitue un obstacle à l'application de cette méthode aux autres valeurs de pH.

III.5.2.1. Microscopie optique polarisée

On voit le peptide coloré en rouge par le rouge de Congo en champ clair (Figure III-37), alors qu'il montre une biréfringence de couleur or en polarisation croisée, caractéristique des fibrilles amyloïdes. De plus, l'utilisation de la plaque de retardement d'onde permet d'observer des zones orientées dans le sens de la plaque (couleur jaune, addition) et d'autres perpendiculaires (couleur bleu, retard). Ceci indique que l'agrégat est composé de microdomaines de différentes orientations.

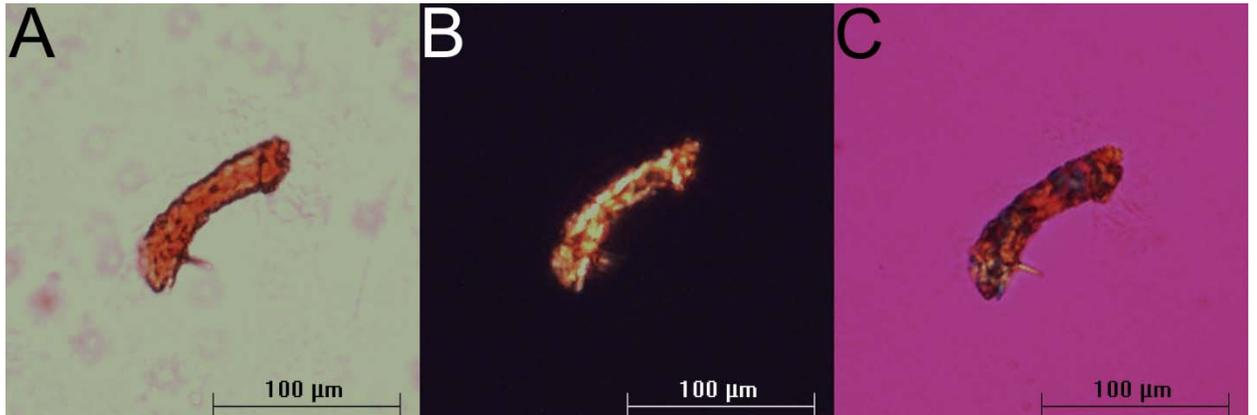


Figure III-37. Ac[Glu(AEM)₂Gln₁₅[Glu(AEM)₂NH₂ (**15**) post-agrégation à pH 8,0 observé par microscopie optique en immersion dans l'eau. **A**, champ clair; **B**, polarisation croisée et **C**, avec plaque de retardement d'onde ($\lambda/4$).

III.5.3. Étude des inhibiteurs d'agrégation

Le peptide amide se liant aux polyglutamines (QBP1) a été synthétisé afin de vérifier son efficacité pour inhiber l'agrégation de la polyGln (**15**). Le QBP1 ne semble pas retarder l'agrégation, ni la taille des fibrilles formées (Figure III-38A). Le tréhalose a également été utilisé (Figure III-38A). À plus faible concentration (3,5 μM) le tréhalose n'altère pas la cinétique d'agrégation, mais semble augmenter la taille des agrégats. Toutefois, à 35 μM, il aurait un effet modeste sur la cinétique et la taille des agrégats. Le rouge de Congo, lorsque mis en présence du peptide (pH 4,0) passe de la couleur rouge à la couleur violet, mais lorsque le pH est ajusté à 8,0, il redevient rouge. Ce dernier aurait une excellente capacité à inhiber l'agrégation des polyGln alors que la thioflavine T n'a pas d'effet sur l'agrégation des polyGln (Figure III-38B).

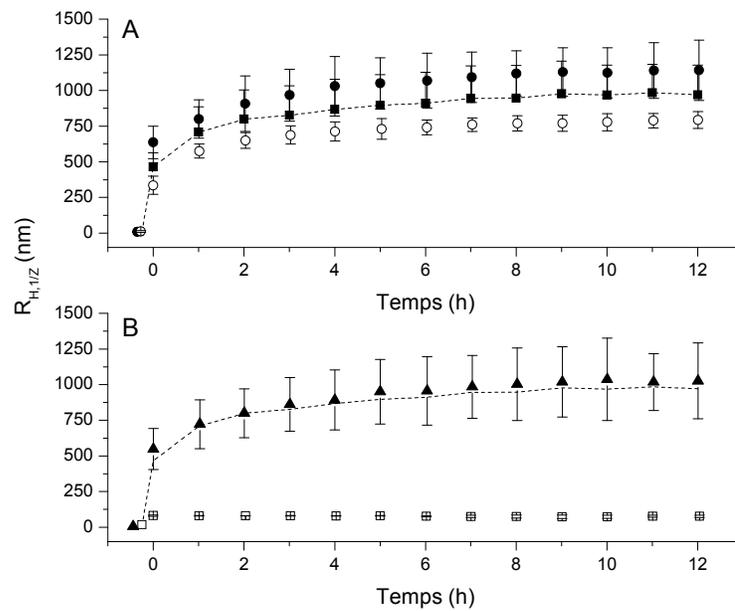


Figure III-38. A-B. Cinétiques d'agrégation de Ac[Glu(AEM)₂Gln₁₅[Glu(AEM)₂NH₂ (15) (35 mM) à pH 8,0 suivies par diffusion dynamique de la lumière.⁴⁶

⁴⁶ ---, aucun inhibiteur; ■, avec QBP1 (25 μM); ●, avec le tréhalose (3,5 μM); ○, avec le tréhalose (35 μM); ▲, avec la thioflavine T (35 μM); □, avec le rouge de Congo (3,5 μM). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur trois expériences indépendantes.

Chapitre IV – Discussion

IV.1. Production du peptide non chargé

IV.1.1. Synthèse peptidique

La SPSSL avec protection minimale dans laquelle les chaînes latérales des Gln sont libres a probablement mené à des structures en feuillets β stabilisées par des ponts hydrogène entre les peptides en croissance, créant ainsi une agrégation sur phase solide pouvant expliquer le nombre important de délétions observées. La présence du produit secondaire HQ₁₀OH (Figure III-2) résultant du clivage d'une partie des groupements protecteurs Fmoc en *N*-terminal est probablement liée aux temps de couplage prolongés et aux réactifs en excès (Fields et Noble 1990). La SPSSL avec protection maximale a permis d'effectuer la synthèse de polyGln jusqu'à 30 résidus. Pour ce faire, un protocole de déprotection plus efficace a été employé, utilisant 50% pipéridine/DMF (Pedroso *et al.* 1986), afin de pallier au faible rendement de déprotection associé à la synthèse des polyGln (Johnson 1995). En effet, une stratégie similaire avait déjà été rapportée en utilisant des acides aminés préactivés avec le OPfp (O-pentafluorophényle) afin de produire des polyGln de 15 résidus contenant des résidus chargés (Perutz *et al.* 1994; Johnson 1995). Toutefois, pour des polyGln plus longues, Chen *et al.* ont observé un nombre significatif de délétions (Chen *et al.* 2001; Chen *et al.* 2002; Chen *et al.* 2002; Chen *et al.* 2006). Notre stratégie a de plus permis une charge élevée de la résine (0,5 mmol/g) et n'a pas nécessité un blocage partiel des sites avec des acides aminés (Lee *et al.* 2007). De plus, notre méthode permet d'éviter l'utilisation d'acides aminés préactivés de type OPfp qui sont dispendieux et peu réactifs (Albericio *et al.* 1997). Finalement, la protection des chaînes latérales a permis de prévenir la formation de pyroglutamyles et de dérivés nitriles. En effet, les amides primaires lorsque non protégés, peuvent être déshydratés par le BOP et se transformer en dérivés nitriles. Cependant une réhydratation est généralement observée lors d'un clivage à l'acide fluorhydrique (Shumpei 1995; Ignatova et Gierasch 2006).

La SPSSC en protection minimale (**12**) a été particulièrement limitée par l'insolubilité des segments de polyGln (**8a**) dans les solvants usuels et ce, malgré la

présence d'un Fmoc et d'un acide carboxylique pouvant favoriser la solubilisation. Malgré la piètre solubilité, les couplages ont été tentés dans une variété de solvants et de mélanges de solvants. À la suite des couplages, le clivage du peptide-résine a donné un mélange de fragments des peptides carboxamides (**12a**) n'ayant pas réagi et de segments de polyGln protégés au *N*-terminal avec Fmoc (**8a**). Ainsi, les différents lavages (DMF, DCM, EtOH, Et₂O) qui précèdent le clivage du peptide-résine n'ont pas permis d'extraire le segment Fmoc-polyGln (**8a**) alors qu'il n'était pas attaché de façon covalente à la résine. Cette observation suggère que l'interaction entre les polyGln non protégées persiste dans plusieurs solvants organiques et qu'elle peut contribuer aux faibles rendements de couplage et des déprotections observées dans les stratégies linéaires et convergentes utilisant l'approche de protection minimale.

L'utilisation de protection maximale en SPSSC n'a pas davantage été couronnée de succès bien qu'elle ait été utilisée afin d'assembler des segments de peptides protégés sur un segment de peptide-résine pour générer des protéines associées à la maladie d'Alzheimer (Quibell *et al.* 1995). L'utilisation de groupes protecteurs trityles sur les chaînes latérales des fragments a permis de majorer la surface hydrophobe favorisant ainsi la solubilisation en plus d'empêcher la formation de ponts H et d'agrégats. Toutefois, la taille des groupes trityles peut empêcher, par encombrement stérique, le couplage entre les segments, ce qui expliquerait le faible rendement obtenu.

L'utilisation de la stratégie SPSSC n'ayant pas eu de succès, le cycle de synthèse n'a pas été répété plus d'une fois ($n = 1$ dans la Figure III-2B), ce qui explique que l'occurrence des délétions n'a pas été déterminée (Tableau III-1). Toutefois, si le cycle de synthèse devait être répété, nous anticipons un grand nombre de délétions de segments.

IV.1.2. Purification

La purification des polyGln par HPLC en phase inverse n'a pas été effectuée facilement. En effet, il était attendu que la polarité élevée des polyGln diminue de beaucoup leur affinité avec la phase stationnaire hydrophobe. Nous avons néanmoins tenté

en premier une purification avec C₄. Toutefois, ce n'est que sur la phase stationnaire C₁₈ et avec un débit diminué que nous avons pu obtenir une rétention suffisante pour la purification.

IV.1.3. Formation de pyroglutamyle

La cyclisation de résidus glutamine *N*-terminaux en pyroglutamyle est un phénomène connu en SPSS (Dimarchi *et al.* 1982; Orłowska *et al.* 1987) et dans des solutions de peptides avec des rendements variant avec le pH, la température et la pression. À l'exception de la SPSS, où la formation de pyroglutamyle est favorisée en milieu faiblement acide, la cyclisation du résidu glutamine se produit généralement plus rapidement dans les solutions alcalines, à des températures et pressions élevées (Khandke *et al.* 1989; Ghiso *et al.* 2001). Toutefois, avec nos peptides, cette réaction a eu lieu lors de la purification par HPLC, soit en milieu aqueux et acide (pH 2,5) à la température de la pièce. La formation de pyroglutamyle pourrait avoir été catalysée par des ions trifluoroacétate via un mécanisme similaire à celui qui génère des acides carboxyliques à partir d'esters glutamiques. Le rôle possible de ces catalyseurs explique pourquoi la cyclisation est considérée comme étant une cinétique de pseudo-premier ordre en dépit du fait que la dégradation de la glutamine en pGlu suit une décroissance mono-exponentielle caractéristique des cinétiques de premier ordre (Connors 1990). De plus, la grande dispersion des résidus autour de la courbe mono-exponentielle indique que cette fonction est appropriée pour décrire cette cinétique et supporte ainsi l'hypothèse d'une cinétique de premier ordre (Wolberg 2006).

Il est intéressant de noter que la formation de résidus pyroglutamyles a été observée chez les peptides et protéines amyloïdes associés à certaines maladies neurodégénératives (Saido 2000; Russo *et al.* 2002). Il a déjà été suggéré que des modifications du segment *N*-terminal pourraient être reliées au rôle délétère des peptides β amyloïdes (Schlenzig *et al.* 2009) et des polyGln en augmentant leur stabilité, leur hydrophobicité et leur capacité d'agrégation, entraînant ainsi une augmentation de la neurotoxicité (Saido 2000).

IV.2. Production du peptide avec des charges labiles

IV.2.1. Choix des unités sensibles au pH

La mise en solution des polyGln nécessite une désagrégation acide (chapitre suivant). Ainsi, des éléments chargés positivement dans les conditions de désagrégation ont été retenus afin de faciliter la formation de monomères.

Les unités sensibles au pH ont été sélectionnées afin que le pKa corresponde de près au pH physiologique. L'unité morpholine a été choisie car le pKa de l'amine tertiaire est de $6,86 \pm 0,10$, alors que celui des tampons organiques 2-(*N*-morpholino) acide éthanesulfonique (MES) et 3-(*N*-morpholino) acide propanesulfonique (MOPS) sont respectivement de 6,1 et 7,2.

IV.2.2. Positionnement des unités sensibles au pH

Les unités chargées sont positionnées aux extrémités afin de profiter de la répulsion électrostatique intramoléculaire.

Les unités ont été greffées à des résidus glutamate afin de former des glutamines substituées au niveau des chaînes latérales et ainsi minimiser l'impact de l'addition de ces segments sur la structure des polyglutamines.

Plusieurs stratégies répondant à divers signaux chimiques ou physiques peuvent être envisagées pour déclencher l'agrégation des polyGln (Chockalingam *et al.* 2007; Channon et MacPhee 2008). La première stratégie était de coupler la polyGln avec un segment solubilisateur et de rattacher ensuite ce complexe à une molécule photosensible qui pourrait relarguer la polyGln en solution après irradiation UV. Cette approche a d'ailleurs été appliquée à l'étude des prions (Bosques et Imperiali 2003). Toutefois, l'irradiation est techniquement lourde à effectuer et le peptide produit est souvent irrécupérable. De plus, le segment solubilisateur demeure en solution et peut interagir avec la polyGln une fois que cette dernière est clivée.

L'ajout de molécules polaires aux extrémités telles que la citrulline et le polyéthylène glycol (PEG) a été envisagé (Veronese 2001). Bien que ces modèles soient très similaires à celui ayant des résidus lysine à chaque extrémité du peptide, ils offrent l'opportunité de s'affranchir des effets de charge.

Le modèle retenu est un peptide dont les charges sont labiles avec la variation du pH. L'objectif étant que la charge disparaisse au moment de l'agrégation afin que cela n'affecte pas la structure obtenue ou l'affinité avec de potentiels inhibiteurs d'agrégation. Le but était de sélectionner une petite molécule ayant un pKa près de pH 7,4 afin de permettre l'étude des polyGln à un pH avoisinant le pH physiologique. Les charges positives ont été retenues car un protocole de désagrégation des polyGln a été développé en milieu acide. L'utilisation de la morpholine est venue des travaux dans lesquels une unité sensible au pH, le poly(2-(*N*-morpholino) éthyl méthacrylate, était utilisée dans un copolymère pour améliorer la biodisponibilité d'un médicament insoluble (dipyridamole) à pH physiologique (Tang *et al.* 2003). Les charges permettent de bénéficier de la répulsion électrostatique intermoléculaire; toutefois, lorsqu'elles sont aux extrémités des peptides, elles permettent également une répulsion intra-moléculaire. Des approches semblables ont été développées avec des polyGln permettant une agrégation contrôlée par attraction électrostatique (Aggeli *et al.* 1997; Aggeli *et al.* 2001; Aggeli *et al.* 2003; Weiss et Terech 2006).

La préparation du peptide réagissant aux variations de pH a fait l'objet de stratégies de synthèse en solution et en phase solide. La synthèse en solution a utilisé le DCC car l'urée produite par le DCC est insoluble et peut être retirée par simple filtration. Le HOBt a également été utilisé afin d'éviter la formation de composés nitrile par déshydratation des chaînes latérales des Gln (Sewald et Jakubke 2002). Nous n'avons pas obtenu les résultats escomptés, bien que cette procédure ait été utilisée avec succès sur des polyglutamates (Sato *et al.* 1992).

Malgré le fait que le peptide chargé négativement (**14**) ait une solubilité remarquablement supérieure à celle de la polyGln non chargée, le couplage en solution n'a pas donné les résultats espérés. En effet, le rendement de couplage était très faible, voire nul et résultait en un mélange de produits de départ et de molécules contenant de 1 à 4 unités d'AEM dans différentes positions, rendant la purification très ardue. Cette méthode a par conséquent été abandonnée.

La synthèse de FmocGlu(AEM)OH (**18a**) en solution a très bien fonctionné, mais c'est le couplage en phase solide sur la résine MBHA qui n'a pas donné les résultats escomptés. En effet, les couplages n'étaient pas complets malgré des temps de réaction prolongés. Ceci s'explique par la déprotection du Fmoc qui se transforme en dibenzofulvène et par la suite polymérise pour former un polymère de dibenzofulvyle (DBF) insoluble dans la plupart des solvants organiques (Nakano *et al.* 2003). Ceci peut être dû au fait que la structure de l'AEM est très semblable à celle de la *N*-méthylmorpholine qui peut être utilisée pour déprotéger le Fmoc. En effet, lors d'une déprotection standard avec la pipéridine, le produit formé est le dibenzofulvène qui est trappé par la pipéridine. Toutefois, lorsque la déprotection est effectuée au moyen d'une amine tertiaire, le dibenzofulvène formé n'est pas trappé et il demeure en solution. Les longs temps de réaction avec une quantité appréciable de dibenzofulvène et la présence potentielle d'oxygène malgré une atmosphère d'azote, mènent à la formation d'un polymère insoluble de dibenzofulvyle. La déprotection du Fmoc peut expliquer pourquoi le test de Kaiser indiquait des réactions incomplètes. Il faut également noter qu'étant donné le prix élevé des résidus FmocGlu(OH)OtBu utilisés pour la synthèse en solution du FmocGlu(AEM)OH (**18a**), les temps de réaction ont été prolongés afin d'obtenir un rendement maximum. Le coût et la présence de réactions secondaires ont forcé le changement de stratégie.

La stratégie convergente en phase solide a montré que la formation de dimères Fmoc[Glu(AEM)]₂OH (**18b**) est possible. Toutefois, les produits obtenus consistaient en un mélange de peptides ayant soit la masse désirée soit des masses diminuées de multiples de

85 Da. La purification des intermédiaires et la caractérisation par RMN a montré le remplacement d'un ou des deux groupes AEM par des groupements diméthylamine (DMA). Les couplages repris dans un mélange de NMP/DCM et l'utilisation du PyBOP ont permis d'éliminer toute source de DMA et d'obtenir quantitativement le produit pur. La condensation du dernier segment de dipeptide n'est jamais allée jusqu'à complétion, probablement à cause de l'encombrement stérique des groupements protecteurs Trt des Gln sur le peptide-résine. Afin de solutionner ce dernier problème, la stratégie a été modifiée une dernière fois en couplant deux FmocGlu(OtBu)OH, en acétylant le peptide, puis en effectuant une déprotection acide des Trt et *t*Bu, après laquelle le couplage des AEM a réussi permettant d'obtenir le Ac[Glu(AEM)]₂Gln₁₅[Glu(AEM)]₂NH₂ (**15**) (Figure III-10).

IV.3. Solubilisation de la polyGln

IV.3.1. Méthodologie

La solubilisation des polyGln non chargées a été effectuée selon un protocole semi-quantitatif faisant appel à un système non à l'équilibre. Cependant, l'utilisation d'ultrasons a pour effet d'accélérer la solubilisation en réduisant la taille des particules et en augmentant la surface accessible au solvant (Liu 2008). Toutefois, il importe peu que la méthode soit quantitative puisque le but est d'arriver à identifier les différences de comportement entre les différents solvants (Hansen 2007).

IV.3.2. Solubilisation directe

La présente étude a permis d'observer que les fluoroalcools sont des molécules qui possèdent un bon pouvoir dissolvant direct pour les polyGln. En effet, ces solvants sont connus pour altérer la structure secondaire des peptides en solution en favorisant une structure en hélice α (Storrs *et al.* 1992; Vieira *et al.* 2003).

Les acides formique, trifluoroacétique et dans une moindre mesure l'acide acétique, se sont avérés également de très bons solvants pour les polyGln. Il est admis que leur mode d'action est la protonation des amides de la chaîne peptidique ce qui entraîne un bris des ponts H et une répulsion électrostatique (Hanlon et Klotz 1965; Bradbury et Yuan 1972). Par exemple, l'utilisation d'acide formique a déjà été décrite pour la protéine huntingtine (Hazeki *et al.* 2000). La solubilisation dans le TFA ou un mélange de TFA-HFIP a aussi été rapportée pour des peptides de polyGln chargées (Chen et Wetzel 2001). De plus, il a été rapporté que le TFA et l'acide formique sont de bons solvants de l'albumine bovine (BSA) et de la lysozyme (Houen 1996) et ce, même après leur agrégation suite à une dénaturation thermique (Houen *et al.* 1999).

Les solvants aromatiques (PhX) possèdent également un bon pouvoir dissolvant lorsque X = NH₂, NO₂, OH, CN. Toutefois, lorsque X = OMe le solvant est moins bon et lorsque X = F ou H, il n'a aucune capacité de solubilisation. Ceci suggère que ces groupements sont importants dans l'interaction avec les polyGln. Malgré leur aromaticité, le pentafluorophénol et la pyridine ne sont pas de bons solvants pour les polyGln. L'effet électroattracteur des atomes de fluor diminue la disponibilité des électrons sur le phénol et rend l'alcool acide, ce qui limite la formation de ponts H (Vermerris et Nicholson 2006). Il a été rapporté que le phénol induit une transition de l'hélice α en feuillet β dans l'insulinotropine, ce qui a pour effet de diminuer sa solubilité (Kim *et al.* 1994).

Une étude a démontré que la lysozyme du blanc d'œuf est solubilisée par le phénol (Chin *et al.* 1994) alors que le poly(γ -benzyle-L-glutamate) est solubilisé par le *m*-crésol qui induit une structure hélicoïdale (Matsumoto et Teramoto 1974). Par ailleurs, en dépit du fait que le DMSO et le glycérol ne sont pas de bons solvants pour les polyGln non chargées, des études ont montré qu'ils pouvaient diminuer le nombre d'agrégats d'ataxine-Gln₇₇ et réduire la mortalité de neurones (Yoshida *et al.* 2002) et des bactéries qui expriment la huntingtine (Nagao *et al.* 2000).

Le choix des adjuvants pour la solubilisation en milieu aqueux a été influencé par les espèces étudiées par Hoffmeister et par le fait que certains solvants aromatiques permettent une solubilisation des polyGln. À cet effet, le *trans*-resvératrol réduit la toxicité des polyglutamines chez les nématodes (Parker *et al.* 2005). Il a été découvert que des petites molécules composées de phénol, dont le salicylate de sodium, permettaient de diminuer l'apoptose et l'agrégation dans des cellules modèles pour étudier les maladies reliées aux polyGln (Ishihara *et al.* 2004; Yamagishi *et al.* 2006). Les polyphénols permettraient également de réduire l'agrégation et la cytotoxicité des polyGln (Ehrnhoefer *et al.* 2006).

Heiser *et al.* 2002 ont démontré que les benzothiazoles sont de bons solubilisateurs des polyGln. Ceci corrobore l'observation à l'effet que la coumarine 6, un benzothiazole, est très efficace dans la dissolution des polyGln non chargées. Des molécules aromatiques, dont une contenant un phénol et l'autre un benzothiazole se sont montrées efficaces pour diminuer l'agrégation et la neurodégénération *in vivo* (Zhang *et al.* 2005). De plus, les aromatiques tels que le RC, la thioflavine S, la chrysamine G et le *direct fast yellow* sont de bons inhibiteurs d'agrégation (Heiser *et al.* 2000). Il a été rapporté que le rouge de Congo réduit la formation d'agrégats *in vivo* chez les souris R6/2 (Smith *et al.* 2001). La similarité structurale entre ce dernier et la curcumine étant frappante, cet adjuvant a été utilisé. Cependant, la curcumine est peu soluble en milieu aqueux à pH physiologique. À pH élevé toutefois, ($\text{pH} > \text{pKa}$), la curcumine s'est montrée un excellent solubilisateur des polyglutamines non chargées en milieu aqueux. Il existe cependant des dérivés de la curcumine plus solubles qui pourraient s'avérer de bons adjuvants à pH physiologique. Il est à noter que l'effet de la curcumine sur l'agrégation des polyGln semble mitigé (Dikshit *et al.* 2006; Yang *et al.* 2007).

IV.3.2.1. Rationalisation de la solubilisation directe

L'analyse de nos résultats n'a pas montré de lien entre la solubilité des polyGln et la constante diélectrique ou le moment dipolaire du solvant. Ceci est en accord avec ce qui a été observé avec la lysozyme du blanc d'œuf (Chin *et al.* 1994).

L'utilisation des descripteurs de Catalan permet de mettre en évidence l'étroite distribution des valeurs qui sont associées aux SB et SPP. Les bons solvants sont donc peu basiques et très polaires ou polarisables, alors que leur acidité peut varier. De plus, la décomposition du SPP produit également des distributions étroites de dipolarité et de polarisabilité, indiquant que ces deux caractéristiques sont essentielles pour un bon solvant et que la faiblesse d'une de ces caractéristiques ne peut pas être compensée par l'élévation de sa contrepartie. La faible basicité des bons solvants peut s'expliquer par la faible acidité des amides, primaires et secondaires, composant les polyGln ($pK_a = 16,6$ et $16,3$ respectivement) (Copeland, 2000).

L'utilisation du modèle de Gutmann (Figure III-15) est également intéressant car il indique que les bons solvants sont très électrophiles (accepteurs d'électrons) et amphotères (AN + DN), alors qu'ils sont peu nucléophiles (donneurs d'électrons). Remarquons qu'à l'exception du nitro- et du cyanobenzène, les bons solvants ont tous des valeurs au-delà de 30 pour le terme (AN - DN) alors que les mauvais solvants ont des valeurs en deçà de 30. Ceci est en accord avec ce qui a été rapporté à l'effet que des grandes valeurs de (AN - DN) correspondent à de bons solubilisateurs de peptides ayant tendance à s'agréger (Malavolta *et al.* 2006).

Le modèle de Hansen est une représentation dans l'espace permettant d'identifier de bons solvants. Il est intéressant de remarquer que la pyridine et la morpholine se retrouvent à l'intérieur de l'espace de Hansen. La similarité structurale entre la pyridine et les solvants aromatiques solubilisant les polyGln est grande en termes d'aromaticité et de polarité. Toutefois, la pyridine possède des électrons sur l'azote qui sont localisés dans une orbitale sp^2 perpendiculaire et ne peuvent pas être délocalisés dans le cycle aromatique

contrairement aux électrons des solvants aromatiques solubilisant les polyGln non chargées. Il est difficile d'expliquer pourquoi la morpholine se retrouve dans l'espace de solubilité de Hansen, près de la pyridine et des aromatiques qui solubilisent la polyGln, car elle apparaît structurellement différente de ces solvants. Par ailleurs, l'ellipse de solubilité de Hansen regroupe plusieurs solvants qui s'avèrent ne pas être de bons solubilisateurs des polyGln. On remarque aussi que l'ellipse de Hansen ne contient pas l'acide formique, un excellent solvant. Cette confusion serait due au fait que l'acide formique est une très petite molécule et que le pouvoir de dissolution des petites molécules est souvent meilleur que ce que prédisent les paramètres δ . En effet, une quatrième dimension pourrait être introduite dans le modèle de Hansen afin de tenir compte de la taille des solvants étudiés (Hansen 2007).

La rationalisation de la solubilisation avec certains paramètres propres aux solvants tels que ceux de Catalan, Gutmann et Hansen peuvent permettre d'outrepasser les difficultés techniques liées à la solubilité des polyglutamines, un facteur qui limite encore aujourd'hui l'étude de ces espèces. Par exemple, les stratégies liées à la synthèse des polyGln, *in vivo* ou *in vitro*, sont limitées par la formation d'agrégats. Les propriétés propres aux solvants permettant la solubilisation des polyGln peuvent également apporter une compréhension plus approfondie des déterminants structuraux nécessaires à la dissolution des polyGln et ainsi aider la recherche de chaperons chimiques dans une visée thérapeutique.

IV.3.3. Solubilisation indirecte

La méthode de solubilisation utilisant des cycles de solubilisation - évaporation de polyGln chargées dans TFA/HFIP (Chen et Wetzel 2001) - permet de dissocier les peptides en protonant les résidus, empêchant ainsi la formation de ponts H. Toutefois, l'évaporation du solvant mène à une concentration élevée du peptide faisant que l'ajout d'eau, qui provoque une neutralisation des charges, a conduit à la formation de ponts H entre les peptides et provoque une agrégation spontanée des polyGln non chargées. La lyophilisation

d'une solution de polyGln en milieu acide permet de garder dissociées les polyGln et ainsi de favoriser la resolubilisation; en effet, il y a une rétention de charges et de la structure lors de la lyophilisation (Costantino *et al.* 1997; Scanlon *et al.* 2007). De plus, cela diminue la proximité entre les peptides et ralentit la cinétique d'agrégation pour assurer la dissolution dans un milieu aqueux. Il faut noter que la lyophilisation du peptide en milieu acide réduit la concentration des résidus volatiles, générés lors du clivage, ce qui aide à la solubilisation ultérieure des polyGln lors de leur purification. La dissolution du peptide lyophilisé dans le TFA est immédiate et permet l'ajout de HFIP, ce qui n'est pas le cas si le HFIP est ajouté avant le TFA. Cette solution de peptide peut ensuite être dispersée dans un grand volume, ce qui décroît la fréquence des contacts entre les molécules peptidiques et l'agrégation, une condition facilitant la purification par HPLC en phase inverse.

La lyophilisation du peptide en solution dans le TFA, en raison de son point de fusion, requiert un vide poussé. Toutefois, cette procédure a permis de mettre en solution le peptide dans le TFE, ce qui n'a pas été possible lorsqu'il est lyophilisé à partir de solutions d'acide acétique ou d'acide formique. Ceci s'explique par une solubilité accrue du peptide dans le TFE lorsque les contreions sont de type trifluoroacétate plutôt que de type acétate ou formate. Toutefois, il n'est pas exclu que la structure de la polyGln soit différente dans le TFA que dans l'acide acétique ou l'acide formique et que cette différence structurale soit responsable de la différence de solubilité (Klibanov 1995). À cet effet, il a été rapporté que la lyophilisation de protéines dans des solutions au pH éloigné de leur pI permet de favoriser leur solubilisation dans des solvants organiques.

IV.3.4. Applications des solvants et adjuvants

Outre l'utilisation des solvants et adjuvants comme chaperons chimiques dans une optique thérapeutique, ceux-ci peuvent servir en SPSS de la polyGln. À cet effet, des mélanges de phénol et de chloroforme (Inui *et al.* 2001) de même que des mélanges TFE/DCM ou HFIP/DCM (Kuroda *et al.* 1992) ont été efficaces pour la synthèse de peptides peu solubles. Les solvants aromatiques peuvent être utilisés dans l'extraction, la

séparation, la purification, la modification et le séquençage de protéines ayant de longs segments de polyGln. À cet effet, il a été rapporté que le phénol est un bon solvant pour extraire des protéines végétales utilisées pour effectuer des études de protéomique (Faurobert *et al.* 2007). De plus, les polyGln pourraient servir de vecteur de médicaments et en nanomédecine, rendant les données de solubilité indispensables (De Winne *et al.* 2004; Webber *et al.* 2010).

IV.4. La caractérisation

IV.4.1. Techniques utilisées

L'utilisation de la diffusion de la lumière a nécessité l'utilisation de cuvettes de verre car leur limite inférieure de détection est un diamètre de 0,6 nm, contrairement à 3,0 nm pour les cuvettes de polystyrène. Les cuvettes ont été lavées à l'acide formique afin de s'assurer qu'aucun agrégat de polyGln ne subsiste. De plus, tous les contenants et instruments utilisés ont été rincés avec de l'eau filtrée afin d'éliminer toute trace de poussière et les solutions ont été filtrées pour éliminer la polyGln non-dissoute. Comme discuté auparavant, l'appareil utilise également un procédé de rejet de la poussière en n'enregistrant que les fonctions d'autocorrélation ayant la plus faible intensité de diffusion. Ce dispositif ne peut être désactivé qu'avec le programme de recherche *Malvern advanced processing software*. Ceci explique probablement pourquoi l'agrégation n'a pas pu être quantifiée par l'augmentation de l'intensité diffusée.

L'analyse des données en diffusion de la lumière a permis d'obtenir des rayons hydrodynamiques moyens inverses ($R_{H,1/Z}$) en utilisant l'analyse par cumulants. Il faut mentionner que cette analyse est toutefois imprécise car elle ne tient pas compte de la polydispersité de l'échantillon, comme attendu lors d'un phénomène d'agrégation (Xu 2002). Ainsi, en dépit de ses limites, la taille moyenne inverse est la mesure utilisée pour

les cinétiques d'agrégation des polyGln. Cette mesure a d'ailleurs été utilisée avec les polyGln chargées (Lee *et al.* 2007).

Les analyses par inversion de l'équation de Laplace permettent d'obtenir des distributions de taille pouvant mieux représenter les solutions ayant une grande polydispersité. Cependant, les distributions de taille sont biaisées par la méthode de pondération. Lorsque pondérée en intensité, la distribution sera dominée par les grandes particules puisque l'intensité diffusée varie avec le rayon du diffuseur à la sixième puissance. L'utilisation de la théorie de Mie permet de pallier ce problème en pondérant les distributions en nombre ou en volume. Par contre, la transformée de Laplace étant déjà un problème dont l'inversion engendre une distribution plus large que la réalité, l'application subséquente de la théorie de Mie aurait pour effet d'accentuer la distorsion de la distribution résultante (Stanley-Wood *et al.* 1992). Les distributions de taille ont été utilisées pour déterminer si une transition entre les populations, c'est-à-dire d'une taille vers une autre taille, pouvait être suivie. Pour ce faire, les corrélogrammes ont été analysés avec les algorithmes du DTS, en mode général et en mode de distributions multiples et étroites, et avec SEDFIT. L'algorithme CONTIN n'a pas été utilisé à cette fin car les distributions générées sont trop larges pour discerner toute transition de population (Figure III-17). En effet, la recherche de la solution la plus parcimonieuse en utilisant la dérivée secondaire ne permet pas de résoudre plusieurs distributions étroites (Morrison *et al.* 1985). De plus, les distributions obtenues par CONTIN diffèrent trop de celles obtenues par les deux autres méthodes, dont celle utilisant l'entropie maximale (SEDFIT) qui est la moins biaisée, car cette analyse se base purement sur l'information provenant des paramètres expérimentaux et non sur un opérateur différentiel arbitraire tel que retrouvé dans les méthodes régularisées (Xu 2002). L'élargissement des distributions de CONTIN est observé lorsque le solvant utilisé n'est pas un bon solvant (loin de la température θ selon la théorie de Flory) et pourrait être dû à des mouvements moléculaires de basses fréquences ou lorsque des zones de l'échantillon sont de concentrations différentes. De plus, l'estimation *a priori* de la valeur Λ en fonction des propriétés de notre échantillon pourrait certainement

diminuer la largeur de la distribution obtenue par CONTIN, mais cette méthode plutôt fastidieuse n'a pas été utilisée (Langowski et Bryan 1991; Hansen et O'leary 1993). Finalement, l'analyse des distributions de taille n'a pas révélé de patrons suggérant l'implication prédominante de certaines tailles dans le processus d'agrégation et ce, pour les deux systèmes étudiés. En effet, si l'agrégation avait procédé selon une série géométrique ($R_H = 1/2 \sum_n a^n$), avec un monomère de taille a , il aurait été possible d'y observer des tailles correspondantes (Costas *et al.* 1995).

Il est à noter que le dichroïsme circulaire est très sensible aux hélices α et beaucoup moins aux feuillets β . L'utilisation d'une technique complémentaire, telle que la spectroscopie RMN permet de pallier cette faiblesse. Par ailleurs, la détermination des structures secondaires a été tentée par régression linéaire multiple utilisant les spectres de référence en facteur g (amylcomp.dat) développée pour les peptides amyloïdes (McPhie 2004). L'utilisation de contraintes de non négativité (fraction de structure secondaire positive) n'a pas permis de bien reproduire les spectres expérimentaux. Toutefois, l'omission des contraintes de non négativité a permis une excellente reproduction des spectres expérimentaux, mais cette technique, même si elle a déjà été utilisée, n'a pas été retenue à cause du manque de sens physique (Greenfield 2004). De plus, l'utilisation du facteur g permet d'ignorer la variation de concentration des particules en solution causée par l'agrégation. Les résultats des déconvolutions ont pour la plupart un RMSD inférieur à 0,25 ce qui est considéré acceptable et montre un bon accord entre les spectres expérimentaux et recomposés (Johnson 1999).

La spectroscopie Raman a été choisie plutôt que la spectroscopie IR car les ions TFA résiduels contribuent fortement au signal de la bande amide I en IR alors qu'ils ne contribuent pas en Raman (Hernandez *et al.* 2006). La soustraction spectrale aurait été une option, mais il a été jugé préférable d'éviter cette technique dans une région servant à la détermination de la structure secondaire. Par ailleurs, la spectroscopie Raman en solution

n'a pas été utilisée car la concentration du peptide utilisée dans nos dispositifs expérimentaux n'était pas suffisamment élevée pour obtenir un bon ratio signal/bruit.

Les déplacements chimiques isotropes ont été utilisés dans la présente étude car ils permettent d'élucider la structure secondaire d'homopolypeptides de différentes longueurs et ils peuvent être utilisés avec les mélanges eau-TFE (Wray *et al.* 1993; Merutka *et al.* 1995) et sur une plage de pH étendue (Carlisle *et al.* 2007). En RMN en phase liquide, les bandes attribuables au ^{13}CO et $^{13}\text{C}_\delta$ ont été étudiées par HMBC, mais elles n'ont pas donné des résultats permettant la détermination des structures secondaires.

La RMN en phase solide a été utilisée pour investiguer les agrégats. Les spectres ^1H CRAMPS et ^1H MAS ont été obtenus, mais la largeur des bandes n'a pas permis d'élucider la structure secondaire. En ^{13}C , les bandes à 170-185 ppm sont la superposition des signaux ^{13}CO des amides secondaires et primaires, alors que seule la bande $^{13}\text{C}_\alpha$ peut être utilisée pour déterminer la structure secondaire. Une étude ^1H - ^{13}C HETCOR a été effectuée car il a été montré que cela augmente la sensibilité du spectre du ^{13}C lorsque appliqué au peptide amyloïde β (Ishii *et al.* 2001).

Le rouge de Congo permet de déterminer la présence de structures de type amyloïde. En microscopie optique polarisée, la biréfringence observée peut s'expliquer par une association du rouge de Congo aux fibrilles. Ce faisant, il se crée une orientation du rouge de Congo dont l'anisotropie permet sa visualisation en polarisation croisée (Scharf 2007). Il faut noter que la spécificité du rouge de Congo pour les structures β n'est pas absolue, car il peut également lier des protéines ayant des structures natives ou partiellement dénaturées (Khurana *et al.* 2001).

IV.4.2. PolyGln non chargées

La solubilisation de la polyGln non chargée (**11a**) a nécessité l'utilisation de solvants non aqueux. Le peptide a d'abord été caractérisé dans le TFA, ce qui a permis de constater la pureté et l'intégrité de notre produit. L'utilisation du benzène- d_6 a permis la

résolution des signaux du *N*-Ac de ceux des $^1\text{H}_\beta$. Cette méthode est utilisée pour étudier les extrémités de chaînes de polymères (Liu 1968).

L'utilisation d'une solubilisation avec ultrasons de même que la lyophilisation du TFA se sont avérées un prérequis pour solubiliser la polyGln dans le TFE et obtenir des résultats reproductibles en diffusion de la lumière. La lyophilisation a été utilisée car elle permet de retirer les molécules de solvants sans concentrer le peptide ou changer sa structure, favorisant ainsi un peptide sous forme monomérique (Scanlon *et al.* 2007). Une meilleure solubilisation était attendue à 1 mg/1500 μl qu'à 1 mg/500 μl . Toutefois, c'est à 1 mg/mL que les meilleurs résultats ont été obtenus, c'est-à-dire un $R_{\text{H},1/\text{Z}}$ d'environ $1,1 \pm 0,2$ nm lorsque solubilisé dans le TFE. Ceci peut s'expliquer par la difficulté technique de lyophiliser le TFA (point de fusion = $-15,4^\circ\text{C}$) qui requiert un excellent vide, de faibles volumes et une isolation de l'échantillon de tout matériel conducteur de chaleur. Dans le protocole expérimental développé, l'échantillon est congelé dans l'azote liquide avant d'être mis au lyophilisateur à température de la pièce. Malgré le réchauffement de l'échantillon avec le temps, il y a une plage temporelle durant laquelle la température est suffisamment élevée pour permettre la lyophilisation du TFA, mais suffisamment basse pour éviter le dégel du TFA. Un volume de 1,5 mL de TFA, requérant un temps de lyophilisation plus long, explique la fonte du TFA. La liquéfaction du TFA a pour effet de concentrer le peptide et favoriser la formation d'oligomères lorsque subséquemment solubilisé dans le TFE pur. Le protocole développé implique donc une lyophilisation non à l'équilibre, qui fonctionne très bien, mais sa transférabilité d'un laboratoire à l'autre devra faire l'objet d'adaptations.

Il se produit une agrégation lorsque de l'eau est ajoutée au peptide solubilisé dans le TFE ou le DMSO, ce qui permet d'étudier l'agrégation. Le DMSO n'a pas été retenu pour étudier les polyGln non chargées car sa lyophilisation est difficile, il peut oxyder les peptides et est opaque en dichroïsme circulaire et spectroscopie UV-Vis. De plus, il a été rapporté que le TFE permet l'étude de l'agrégation des peptides amyloïdes tels que

l'isoforme de la protéine prion de la tremblante du mouton (PrP^{Sc}) et le peptide amyloïde β (Buck 1998). De surcroît, la structure de HAsp₂Gln₁₅Lys₂OH dans le TFE 95% est la même que celle dans l'eau/NaCl (0,2 M), soit en feuillet β (Perutz *et al.* 1994).

La caractérisation par RMN en utilisant l'index des déplacements chimiques, permet d'observer deux populations de peptides en solution; la majeure fraction du signal correspond à une structure aléatoire alors que la seconde correspond à une structure hélicoïdale. Ceci est attendu car le TFE est un solvant inducteur d'hélicité (Storrs *et al.* 1992; Buck 1998; Vieira *et al.* 2003). Lors du titrage aqueux, il ne se produit qu'une modeste augmentation de la population hélicoïdale selon les aires des signaux des $^1\text{H}_\alpha$. Cette augmentation d'aire n'est pas causée par l'évaporation du TFE car le rapport des aires des $^1\text{H}_{\beta+\gamma}$ diminue en cours de titrage. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une diminution de la mobilité des $^1\text{H}_{\beta+\gamma}$ en cours d'agrégation, supportant ainsi l'hypothèse d'une interaction entre les chaînes latérales des polyGln.

Par ailleurs, nous avons observé que les signaux RMN en cours d'agrégation sont devenus plus étroits, alors qu'on s'attendait à ce qu'ils s'élargissent. Cette observation suggère que les spectres RMN du ^1H sont composés d'une superposition de signaux en provenance de différentes populations en solution. La population qui contribue aux signaux larges et de faible intensité est probablement de taille élevée, alors que celle contribuant aux signaux plus étroits serait de plus petite taille. Lors de l'ajout d'eau, la population de grande taille pourrait s'agréger pour ne plus contribuer au signal RMN en solution. Toutefois, la population de petite taille ne serait pas beaucoup affectée par l'ajout d'eau.

Les résultats de dichroïsme circulaire abondent dans la même direction et révèlent une composition à prédominance hélicoïdale et aléatoire dont les proportions demeurent inchangées jusqu'à 30% d'eau. Il est donc raisonnable de penser que seules les plus petites particules contribuent au signal dichroïque alors que les plus grosses particules diffusent plutôt la lumière incidente. Ceci va de pair avec le fait que les agrégats formés à 25% d'eau ne sont composés que de 20% du peptide en solution selon une analyse en HPLC

analytique. Ces résultats sont surprenants car il a été rapporté que la structure de HAsp₂Gln₁₅Lys₂OH, obtenue par dichroïsme circulaire, était sous forme de feuillet β dans 95% TFE/eau (Perutz *et al.* 1994). Ceci pourrait s'expliquer par l'attraction électrostatique qui favoriserait la formation de brins antiparallèles ou en épingle.

Chez les agrégats formés dans 50% eau/TFE, le déplacement chimique du $^{13}\text{C}_\alpha$ de la RMN en phase solide montre que le peptide aurait une structure de type hélicoïdal et aléatoire. La prédominance de structures hélicoïdales est en accord avec les résultats en spectroscopie Raman. Toutefois, il y a discordance entre ces deux techniques, car il y a la présence de structures aléatoires en RMN solide et β en Raman. En dépit de cette discordance, ces résultats sont en accord avec l'étude proposant qu'il ne se produit pas de changement de structure lors de l'agrégation (Lee *et al.* 2007). La présence de structures β suggérée par la spectroscopie Raman est en accord avec ce qui a été décrit chez les Gln_n (n = 28, 44) chargées en milieu aqueux (Chen *et al.* 2001; Chen *et al.* 2002).

Les agrégats de polyGln sont habituellement de type amyloïde, c'est-à-dire qu'ils montrent une absorption différentielle à 540 nm lorsqu'en solution avec le rouge de Congo et montrent une biréfringence en polarisation croisée (Klunk *et al.* 1999; Nilsson 2004). Nos agrégats de polyGln non chargées formés dans le système eau-TFE ont les caractéristiques de fibrilles amyloïdes. Bien que l'interaction spécifique entre le rouge de Congo et les fibrilles amyloïdes ne soit pas encore comprise, il a été suggéré que le rouge de Congo interagirait avec les feuillets β (Carter et Chou 1998). Nos résultats indiquent donc que le rouge de Congo peut interagir avec des structures hélicoïdales ou qu'il y a présence d'une fraction suffisamment élevée de structures β (> 25%) pour obtenir des résultats indiquant la production de fibrilles de type amyloïde.

Les cinétiques d'agrégation réalisées par l'ajout de très faibles quantités d'eau dans le TFE nous ont montré que ce dispositif est très sensible à de petites variations de concentration d'eau. L'utilisation d'un solvant fortement hygroscopique (Gente et La Mesa 2000) et des conditions expérimentales anhydres n'étaient pas pratiques, surtout pour des

études devant s'effectuer dans plusieurs laboratoires différents. De plus, les chaperons moléculaires qui devaient être étudiés avec la polyGln non chargée étaient le tréhalose, insoluble dans le TFE, le QBP1 et le rouge de Congo, qui n'avaient été rapportés efficaces qu'en milieu aqueux. Pour ces multiples raisons, l'étude des polyGln dans le système eau-TFE fut abandonnée au profit d'un peptide pouvant s'étudier en milieu aqueux.

IV.4.3. PolyGln sensibles au pH

Le protocole de solubilisation indirecte développé pour AcGln₁₅NH₂ a été appliqué au peptide sensible au pH, Ac[Glu(AEM)]₂Gln₁₅[Glu(AEM)]₂NH₂ (**15**). Il est à noter que pour un peptide porteur de résidus chargés, le protocole solubilisation-évaporation du mélange TFA-HFIP (Chen et Wetzel 2001) aurait probablement été suffisant.

La solution de NaOH utilisée pour titrer la solution au pH désiré n'a pas été filtrée à 20 nm avec le filtre inorganique en raison d'une limitation d'utilisation en fonction du pH, mais un filtre à 200 nm en PTFE a été utilisé. Ceci pourrait avoir eu comme effet d'introduire des particules de tailles inférieures à 200 nm. Les cinétiques se sont déroulées sur une période de 12 h, un choix justifié par l'atteinte d'un plateau. Comme prévu, l'augmentation du pH au-dessus du pKa mène à une agrégation. Le pKa déterminé expérimentalement (7,3) est près de celui du tampon organique MOPS (7,2) qui possède également une unité morpholine. Les valeurs de pH étudiées sont de 4, 6, 8 et 10. Ces valeurs ont été choisies parce que des expériences tentées à pH 7,4 (résultats non-présentés) ont montré des cinétiques d'agrégation peu reproductibles, ressemblant parfois à celles obtenues à pH 6 alors qu'en d'autres occasions, elles étaient semblables à celles obtenues à pH 8. Cette faible reproductibilité à pH physiologique a été attribuée au faible écart entre le pH expérimental et le pKa des unités morpholines. En effet, près du pKa, une très faible erreur de pH entraîne une grande variation du ratio $[AEM-H^+] / [AEM]$ et par conséquent de la cinétique d'agrégation. Ceci explique donc pourquoi un pH quasi physiologique de 8 a été utilisé au lieu du pH physiologique de 7,4.

L'application des fractales nécessite un polymère composé de plus de dix segments (ou monomères) afin d'obtenir un comportement d'échelle pouvant être généralisé avec la théorie des fractales (Dewey 1997). Le peptide sensible au pH est composé de 19 résidus, ce qui est au-delà de la limite inférieure et le mécanisme d'agrégation peut être étudié par linéarisation des cinétiques via des graphiques log-log. Il était attendu que la dimension fractale (D_f), à pH 6,0 indique une agrégation limitée par la réaction (RLCA) car la majorité des polyGln sont chargées positivement. En effet, il était anticipé que la répulsion électrostatique réduise la fraction des collisions menant à une agrégation. À l'inverse, à pH $>$ pKa, les polyGln étant neutres, on s'attendait à ce que l'agrégation soit limitée par la diffusion (DLCA). Toutefois, peu importe le pH, les D_f obtenues sont élevées et suggèrent plutôt un mécanisme d'agrégation de type RLCA. Les biopolymères ont des valeurs de D_f élevées, comparativement aux polymères non-biologiques (polystyrène, polypropylène, polyacrylonitrile...). En effet, les biomolécules peuvent se réorganiser après leur agrégation, ce qui augmente leur dimension fractale (Dewey 1997). Les D_f obtenues suggèrent une structure β ou un mélange de structures β et α . De plus, la dimension fractale est également liée à la qualité du solvant selon la théorie de Flory. Ainsi, une D_f élevée suggère que l'eau n'est pas un bon solvant et que la polyGln pourrait adopter une structure compacte et grandement repliée sur elle-même (Dewey 1997). Par ailleurs, les valeurs d'ordonnées à l'origine donnent les valeurs de $R_{H,1/Z} = 2,5 \pm 0,5$ nm pour la taille des monomères impliqués dans l'agrégation. Cette taille est plus faible que celle de HAsp₂Gln₁₅Lys₂OH en feuillet β (7,1 nm) (Tableau I-6) alors qu'elle s'approche de la taille de la structure en épingle β (3,6 nm). La taille du monomère serait plus en accord avec celle d'une hélice α (2,85 nm) ou celle d'une structure aléatoire compacte. Bref, les dimensions fractales élevées et la taille du monomère en solution suggèrent soit un mélange de structures α et β ou une structure aléatoire très compacte.

Il faut mentionner que la force ionique (concentration de NaCl et autres ions) n'a pas été contrôlée. Ainsi, il y a une augmentation de la force ionique proportionnelle au pH, provenant de la neutralisation du HCl par le NaOH, ce qui pourrait contribuer à accélérer

l'agrégation du peptide en solution. Afin de prouver que l'inhibition de l'agrégation en fonction du pH est liée à la répulsion électrostatique, une étude cinétique d'agrégation a été tentée avec une force ionique plus élevée, soit 154 mM. L'augmentation des ions en solution permet la formation d'une double couche électrique diminuant ainsi la répulsion électrostatique des unités AEM chargées positivement à pH 4,0. Cet effet d'écran permet à la polyGln de s'agréger comme si elle était une particule neutre. Cet effet a d'ailleurs été décrit chez un modèle peptidique s'autoassemblant avec des variations de pH (Carrick *et al.* 2007).

La structure de la polyGln n'est pas sensible au changement de pH si l'on se fie au déplacement chimique du signal RMN du $^1\text{H}_\alpha$ ($\delta = 4,30$ ppm) qui suggère une structure aléatoire (Tableau III-5). Toutefois, il est possible de remarquer des diminutions des déplacements chimiques des unités morpholines correspondant au passage de l'état protoné à pH 4,0 à l'état non-protoné à pH 8,0. Avec l'agrégation induite par le changement de pH, il était attendu que les bandes s'élargissent, en raison d'une augmentation de l'anisotropie en solution causée par l'augmentation du temps de corrélation. Ce faisant, tous les signaux devraient s'élargir. Ce n'est toutefois pas ce qui est observé (Figure III-32). Il y eut un élargissement des signaux du $^1\text{H}_\gamma$ alors que la largeur de ceux du $^1\text{H}_\alpha$ a diminué. Ceci pourrait s'expliquer par une restriction de mobilité plus marquée pour le $^1\text{H}_\gamma$ que pour le $^1\text{H}_\alpha$. Ceci est en accord avec une interaction entre les chaînes amide latérales des glutamines, réduisant ainsi la mobilité du $^1\text{H}_\gamma$. De plus, les bandes associées aux unités morpholine ($\delta = 2,57$ et $3,76$ ppm à pH 8,0) diminuent de largeur avec l'augmentation du pH. La transition de pH cause probablement une augmentation de la vitesse d'échange entre les protons en solution et ceux liés à l'amine tertiaire ce qui rend possible une inversion plus rapide de l'azote (Delpuech et Deschamps 1970). Il est également possible de remarquer un transfert de magnétisation de l'eau vers les ^1H amide (Figure III-33). Toutefois ce transfert est moins important pour le ^1HN (amides secondaires) que pour les $^1\text{H}_\delta$ (amides primaires) car ils échangent moins rapidement. Lors de la transition de pH, il est possible de noter une diminution d'échange plus marquée pour le $^1\text{H}_\delta$ *trans* que pour le

$^1\text{H}_\delta$ *cis*, correspondant à une diminution de la vitesse d'échange. Ceci est en accord avec l'observation de Tuchsén (Tuchsén et Woodward 1987) à savoir que les protons *trans* sont plus impliqués dans la formation de ponts H que les protons *cis*. Finalement, la cinétique d'agrégation à pH 8,0 ne montre pas de différence des déplacements chimiques entre les spectres enregistrés immédiatement après l'ajustement à pH 8,0 et 12 h suivant cet ajustement.

L'augmentation temporelle de la largeur de la raie du DSS à pH 8,0, lorsque mis en référence interne, suggère qu'il est impliqué dans l'agrégation (Figure III-34). Ceci a nécessité l'utilisation d'une référence externe dans un tube coaxial. Similairement, des études en RMN suggèrent que le DSS serait impliqué dans l'agrégation du peptide amyloïde- β où il favoriserait la formation de micelles (Laurents *et al.* 2005).

L'analyse structurale par dichroïsme circulaire montre une bonne concordance entre les trois algorithmes, ce qui indique que la méthode d'analyse utilisée est reproductible. Il est à noter qu'ici, contrairement à l'analyse de la polyGln non chargée où CDstr avait mieux épousé les données expérimentales, l'algorithme CONTINLL donne des courbes avec le plus bas RMSD. Il est possible d'observer que la structure aléatoire prédomine largement, suivie de structures β , puis hélicoïdales. De plus, la proportion de ces espèces est grandement conservée lors de la transition de pH.

La RMN en phase solide permet de constater une grande dispersion des déplacements chimiques, allant du feuillet β à l'hélice α . La comparaison avec la spectroscopie Raman montre encore une fois une faible variation entre le peptide lyophilisé à pH 4,0 et après agrégation à pH 8,0. On retrouve une prédominance de structures α et une bonne proportion de feuillets β . Cette apparente discordance entre les résultats en provenance de la spectroscopie RMN en phase solide et la spectroscopie Raman peut s'expliquer. En effet, en RMN, la structure aléatoire semble être majoritaire, mais en prenant en considération la grande dispersion des déplacements chimiques et le fait que la structure aléatoire se trouve entre les structures α et β , il se pourrait que le signal observé

soit plutôt une somme des contributions de ces deux structures. Il faut toutefois mentionner que les résultats obtenus par la spectroscopie Raman, en comparaison avec les autres techniques, semblent diverger. En effet, chez les deux peptides étudiés, il y a surestimation de la fraction hélicoïdale et sous-estimation de la fraction aléatoire, alors les bandes qui y sont associées se chevauchent fortement. Ainsi, les solutions générées par ajustement peuvent être biaisées (Maddams, 1980).

L'analyse par spectroscopie UV-visible des agrégats produits à pH 8,0 en présence de rouge de Congo montre qu'ils sont de type amyloïde. L'analyse à pH 4,0 était impossible étant donné l'insolubilité du rouge de Congo à ce pH. Une biréfringence dorée est obtenue en microscopie optique polarisée et l'utilisation d'une lame de retard d'onde a permis d'observer la présence de plusieurs microdomaines affichant différentes orientations, ce qui suggère la présence de fibrilles.

Quelques inhibiteurs d'agrégation ont été étudiés en diffusion de la lumière par cinétiques d'agrégation à pH 8,0. Les inhibiteurs ont été choisis pour leur différence structurale, dans l'optique d'une éventuelle étude des effets de ces molécules sur les polyGln. Ceci pourrait ultimement permettre la conception rationnelle d'agents thérapeutiques pour les maladies reliées aux polyGln.

Le rouge de Congo a été étudié, en dépit du faible potentiel thérapeutique de cette molécule qui résulte de son activité cancérigène probable et de la faible capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique. Toutefois, le rouge de Congo est utilisé à titre de référence dans plusieurs études ciblant la recherche d'inhibiteurs par criblage. Lorsque le RC a été mis en contact avec le peptide à pH 4,0, la solution est devenue violette, ce qui s'explique par le pKa du RC qui est de 4,0 (Hu *et al.* 2009). À pH 8,0, une inhibition frappante de l'agrégation a été observée, ce qui confirme l'utilité du dispositif pour étudier divers inhibiteurs. Cependant, la liaison du rouge de Congo à la protéine de fusion thiorédoxine-Gln₆₂ ne serait pas spécifique (Okamoto *et al.* 2009). Une autre étude suggère

que le rouge de Congo agirait *in vivo* surtout au niveau de l'association des oligomères lors de l'agrégation de GFP-Gln_n (n = 19, 45, 81) (Takahashi *et al.* 2007).

Le peptide QBP1 auparavant identifié comme inhibiteur de l'agrégation et de la mort cellulaire (Nagai *et al.* 2000; Ren *et al.* 2001; Takahashi *et al.* 2007; Okamoto *et al.* 2009; Tomita *et al.* 2009), n'a pas démontré, dans notre système, de capacité à ralentir ou à diminuer la taille finale des agrégats en solution. Il est même possible que la taille de ceux-ci soit plus grande que celle obtenue à pH 8,0 sans inhibiteur. Ceci suggère par contre une association entre le QBP1 et les polyGln d'où l'observation d'une taille plus élevée.

Il a été rapporté que le tréhalose permet d'inhiber l'agrégation des polyGln *in vitro* et *in vivo* (Tanaka *et al.* 2004). Les concentrations de tréhalose étudiées (50 - 1000 µM) sont toutes efficaces pour inhiber l'agrégation de Mb-Gln₃₅ (150 µM). Ces ratios tréhalose:Mb-Gln₃₅ varient de 1:3 à 20:3. La première concentration étudiée, à l'intérieur de l'intervalle considéré efficace, est dans un rapport 1:1 (3,5 µM), mais n'a pas montré d'effet sur la cinétique d'agrégation. Toutefois, à 10 fois cette concentration (35 µM) de tréhalose, il y a eu un effet modeste qui a diminué la vitesse d'agrégation et la taille finale des agrégats. Le tréhalose semble donc avoir un effet, mais à concentration plus élevée que celle déterminée avec le système Mb-Gln₃₅. Ceci peut s'expliquer par le fait que la polyGln sensible au pH n'est pas identique et que son comportement n'est pas influencé par la protéine de fusion dans laquelle la polyGln est insérée. Finalement la thioflavine T a été étudiée. Cette molécule n'a pas d'effet sur l'agrégation des polyGln, mais pourrait permettre le suivi de l'agrégation par fluorescence, une technique plus simple que la diffusion de la lumière.

IV.4.4. Comparaison des deux modèles

La polyGln non chargée (**11a**) dans le système eau-TFE adopte de façon prédominante des structures hélicoïdales, tant en solution qu'en phase solide. La polyGln ayant des charges labiles (**15**) adopte majoritairement une structure aléatoire en solution

aqueuse alors qu'en phase solide elle semble demeurer sous forme aléatoire, malgré que la présence de structures α et β ne puissent pas être exclues. La nature des peptides étudiés étant semblable, les différences structurales observées entre ces deux systèmes sont probablement liées aux milieux dans lesquels ces études ont été réalisées. Toutefois, l'étude de la polyGln ayant des charges labiles dans le milieu eau-TFE serait de mise pour valider cette affirmation. Ceci n'a pas été tenté faute de temps.

Chapitre V – Conclusion

V.1. Importance du sujet étudié

Les maladies découlant de l'insertion d'un segment pathologique de polyGln dans diverses protéines sont au nombre de huit. Elles sont neurodégénératives et ainsi associées à la perte progressive de fonctions motrices et parfois cognitives selon la maladie. Il est suggéré que ces processus sont en lien avec l'agrégation des polyGln au niveau neuronal. En dépit de leur faible prévalence, la symptomatologie de ce groupe de maladies fait qu'elles ont un grand impact sur la société. Ceci explique pourquoi des efforts de recherche considérables ont présentement lieu afin de mieux comprendre l'agrégation de la polyGln.

V.2. Problématique dégagée

Le modèle peptidique est utilisé afin d'investiguer le processus d'agrégation de la polyGln. En raison des caractéristiques physicochimiques des polyGln, des stratégies ont dû être développées afin de produire, de solubiliser et d'étudier l'agrégation des polyGln. Toutefois, ces stratégies produisent un mélange de polyGln de différentes longueurs et ayant des groupements solubilisateurs dont la structure est très différente de la Gln. L'utilisation de ces peptides peut biaiser les résultats obtenus. L'information générée à partir de tels systèmes serait d'une utilité limitée car elle ne pourrait pas être généralisée au contexte pathologique, ni contribuer le développement d'une cure. Une tentative de solution à cette problématique a fait l'objet de cette thèse.

V.3. Solution envisagée

L'objectif de cette étude était la préparation des peptides de polyGln non chargés. La Gln₁₅ a été retenue car elle n'était pas trop dispendieuse à produire et son potentiel d'agrégation était documenté. Ce peptide modèle devait servir à étudier l'agrégation et l'interaction avec des petites molécules de structures différentes, soit le RC, le tréhalose et le QBP1. Ces résultats devaient fournir les données nécessaires pour identifier *in silico*, les

déterminants moléculaires conférant une inhibition de l'agrégation de la polyGln. La poursuite de ces objectifs a fait appel à une méthodologie variée.

V.3.1. Méthodologie de recherche proposée

L'approche méthodologique choisie était d'abord la production de la polyGln par SPSS. La synthèse chimique a été choisie car le laboratoire avait une expertise dans ce domaine et permet d'obtenir des peptides de structure homogène. Une approche de protection minimale fut privilégiée car elle avait l'avantage de réduire les coûts de production des polyGln. Cette approche devait être jumelée à la condensation de fragments afin de diminuer le temps requis et faciliter la purification des peptides produits. Toujours pour des raisons d'expertise du laboratoire, les méthodes de caractérisations physicochimiques envisagées étaient la RMN et le dichroïsme circulaire. Toutefois, les choix méthodologiques ont été changés en fonction des problèmes rencontrés.

V.4. Éléments ayant affecté le cours de la recherche

Les difficultés rencontrées dans cette étude furent multiples. Premièrement, au niveau de la production de la polyGln, la combinaison de la stratégie convergente et de l'approche de protection minimale a donné des fragments insolubles et cela nous a contraints à utiliser une stratégie linéaire. Cette approche a cependant donné une grande polydispersion. L'approche avec protection maximale a ensuite été tentée. La condensation de fragments n'a pas fonctionné, alors que l'addition linéaire a finalement été couronnée de succès. Cette dernière stratégie a été adoptée mais la polyGln ainsi produite allait se révéler tout aussi difficile à purifier.

Une recherche de systèmes de solvants pouvant à la fois solubiliser la polyGln brute et être compatible avec les méthodes chromatographiques en phase directe ou inverse a fait l'objet de multiples essais. Plusieurs colonnes de HPLC ont été bouchées par la polyGln, inadéquatement solubilisée, c'est pourquoi une lyophilisation dans l'acide acétique a été développée pour faciliter une meilleure solubilisation. L'autre principale cause de blocage

des colonnes HPLC a été la précipitation en cours de purification, causée par un changement trop subit des solvants en termes de pH et/ou de polarité. À l'opposé, certains systèmes de solvants ont mené à la dissolution de la phase stationnaire. Une méthode de purification a finalement pu être élaborée, ce qui a permis d'obtenir des peptides de grande pureté et des rendements de purifications acceptables. Le peptide brut ayant été purifié, la faible solubilité de la polyGln allait compliquer l'étude de son agrégation.

La solubilisation du peptide a été tentée dans différents milieux. Le médium aqueux, même avec l'utilisation d'adjuvants chaotropes réputés pour leur pouvoir solubilisant, n'a pas donné le succès escompté. En dépit du fait que les solvants organiques sont moins physiologiques, leur pouvoir de solubilisation a été exploré. Certains de ces solvants ont montré un certain potentiel de solubilisation et une rationalisation a été tentée à l'aide de différents modèles théoriques. Toutefois, ces solvants ne permettaient que rarement une dissolution complète du peptide et une étape de sonication suivie de lyophilisation dans le TFA s'est avérée un prérequis. Cependant, cette méthode de solubilisation dans les solvants organiques, tels que le TFE et le DMSO, n'était pas compatible avec certaines méthodes de caractérisation physicochimiques.

La spectroscopie infrarouge ne s'est pas avérée une bonne technique pour étudier l'agrégation de la polyGln solubilisée. En effet, les ions trifluoroacétate résiduels provenant de la lyophilisation du peptide dans le TFA avaient une absorption si forte au niveau de la bande amide II que la détermination de la structure secondaire devenait impossible en IR. De plus, l'opacité du DMSO a empêché l'utilisation du dichroïsme circulaire et l'absorption UV. Ainsi, après avoir initialement caractérisé le système dans le DMSO, un changement pour le TFE a été nécessaire. Cependant, les propriétés de ce solvant allaient également s'avérer problématiques.

Le TFE n'est pas seulement un bon solvant pour solubiliser la polyGln, il est également excellent pour solubiliser différents polymères ou pour extraire les plastifiants. Ainsi, le verre et le téflon sont devenus les seuls matériaux avec lesquels les solutions de

polyGln pouvaient entrer en contact. Les solutions ont donc dû être filtrées avec des coûteux filtres en PTFE ou à membrane inorganique. Il a été découvert, à l'aide de diffusion de la lumière, que l'agrégation de la polyGln, lorsque solubilisée dans le TFE, pouvait être induite par l'ajout d'eau. Les expériences ont par la suite montré qu'une quantité d'eau plus grande était nécessaire pour causer une agrégation lorsque le peptide était solubilisé dans le TFE en provenance d'une nouvelle bouteille. Le TFE est en effet hygroscopique. La quantification de l'eau dans le TFE après chacune des expériences a fait l'objet d'une revue de la littérature, mais cela n'était simple. L'expérimentation dans des conditions anhydres a été envisagée, mais cela était techniquement difficile à réaliser car les appareils utilisés se trouvaient dans une multitude de lieux physiques différents (INRS à Pointe-Claire puis Laval, Université de Montréal dans les pavillons Roger-Gaudry, J.-A. Bombardier et Jean-Coutu). L'utilisation d'un autre fluoroalcool, le HFIP a été envisagée, mais comme il doit être conservé au réfrigérateur, il était sujet à beaucoup de condensation et ce n'était donc pas une alternative valable. Finalement, le fait que le TFE était non-physiologique et inducteur d'hélicité, que des résultats obtenus étaient en désaccord avec le dogme actuel liant agrégation et changement conformationnel et que le tréhalose n'y était pas soluble, m'ont obligé à retourner à la planche à dessin. Après mûre réflexion, le design d'un peptide réagissant au pH a été envisagé.

La synthèse de ce peptide a été difficile et différentes stratégies monophasiques ou diphasiques ont été tentées afin de le produire. Finalement, c'est une stratégie uniquement sur phase solide qui a permis de le synthétiser. Cette stratégie utilise une déprotection simultanée des deux résidus glutamates suivie d'un couplage des unités AEM. Toutefois, en raison de réactions secondaires, le DMF et le BOP ont été substitués. Ainsi, les couplages ont lieu en *N*- et en *C*-terminal, alors que la synthèse de la polyGln était identique à celle précédemment développée. La purification et les études physicochimiques devaient être les mêmes que celles utilisées avec la polyGln non chargée.

Des expériences de titrage acide-base du peptide sensible au pH ont été d'abord effectuées. Toutefois, les résultats étaient moins reproductibles que les expériences de

titrage aqueux du peptide non chargé dans le TFE, avec une très grande variabilité lorsque le pH était près du pKa. C'est ainsi qu'il a été compris que des petites variations de pH entraînaient de grandes variations dans la cinétique d'agrégation. En effet, pour prendre en compte les effets cinétiques, la variation de pH lors du titrage devait être identique d'une expérience à l'autre, ce qui s'est avéré être au-delà de mes habiletés expérimentales. Ainsi, l'étude par titrage acide-base d'un phénomène cinétique induit par changement de pH comportait trop de variables, lesquelles n'ont pu être fixées, même avec de multiples essais et une grande rigueur. L'approche par titrage devait laisser place à une approche purement cinétique.

Les expériences de cinétique se sont au départ avérées peu reproductibles jusqu'au jour où j'ai découvert que l'échantillon devait demeurer dans l'appareil de diffusion de la lumière pour toute la durée de l'expérience, soit 12h. L'achalandage de l'appareil de diffusion de la lumière et le non-respect des consignes m'ont forcé à effectuer les mesures de cinétique durant la nuit. Après coup, il était tout à fait logique que le fait de bouger l'échantillon altérerait le mouvement brownien des particules et pouvait induire l'agrégation ou remettre en suspension des particules ayant flocculé. De plus, le processus d'agrégation est dynamique et implique des états métastables, lesquels sont probablement impliqués dans des réorganisations et ultimement à un changement de phase qui sont beaucoup plus complexes qu'imaginé lors de la conception de ce projet. Ce processus est assujéti à de multiples variables, lesquelles doivent être contrôlées avec la plus grande rigueur possible. Ceci explique d'ailleurs pourquoi les instruments ont été lavés à l'acide formique, que les solutions de peptide fraîchement désagrégées devaient être utilisées pour toutes les expériences, que les solutions de polyGln devaient être filtrées par des membranes dont le diamètre des pores était de 10 μm plutôt que de 200 μm . Ces détails, à première vue insignifiants, se sont avérés être d'une grande importance. Ainsi, pour procéder à l'étude de ce type de système, il faut travailler avec une extrême minutie et être très méthodique afin d'identifier la variable pouvant rendre inopérant notre devis expérimental.

V.4.1. Les approches méthodologiques

Au cours de ce travail, il m'est apparu que les stratégies utilisées pour résoudre un problème en recherche peuvent se diviser en deux. Une approche est orientée vers les techniques et l'autre orientée vers la problématique. En effet, l'approche orientée vers les techniques, vise à utiliser un nombre limité de techniques faisant partie d'un domaine d'expertise afin de résoudre diverses problématiques. À l'opposé, une autre philosophie peut être utilisée, mettant la problématique à l'avant-plan et les techniques sont choisies en fonction de leurs potentiels à fournir des éléments de réponse. L'objectif de mon projet faisait partie de ce dernier groupe. Toutefois, la méthodologie envisagée était plutôt basée sur l'utilisation de techniques spécifiques telles que la RMN en phase liquide et la modélisation moléculaire. Ainsi, en voulant prendre de l'avance pour les parties ultérieures de ce projet, une approche en parallèle a été utilisée. Par conséquent, des efforts considérables ont été mis dans la synthèse de Gln marquées pouvant être ultérieurement utilisées dans la synthèse de la polyGln et étudiées par RMN. De plus, le candidat a investi dans une formation en modélisation moléculaire. Cependant, la poursuite de l'objectif du projet a fait que les investissements dans la maîtrise de certaines techniques ont été faits en vain, car le projet ne s'est jamais rendu aux étapes requérant l'utilisation de Gln marquée ou de modélisation moléculaire. Ainsi, lorsqu'un projet est conçu, il faut bien identifier si l'approche prédominante est basée sur la technique ou sur la problématique. Il faut ensuite concevoir une méthodologie allant dans le sens du projet. Lorsque le projet est basé sur la problématique, il faut se concentrer sur la résolution de la problématique actuelle, avoir une approche séquentielle et demeurer flexible car les résultats obtenus dicteront la direction à prendre et les techniques à utiliser.

V.5. Résolution de la problématique

Des stratégies ont été mises sur pied afin de répondre à la problématique soulevée. En effet, deux systèmes peptidiques ont été conçus afin d'étudier l'agrégation des polyGln

en s'affranchissant des biais causés par les résidus radicalement différents de la Gln. Il a été démontré qu'il est possible de stimuler l'agrégation du peptide non chargé solubilisé dans un des solvants organiques par titrage aqueux. Il est également possible de stimuler l'agrégation par altération du pH de la solution aqueuse dans lequel se trouve le peptide sensible au pH. De plus, il est possible d'étudier l'effet de certains inhibiteurs d'agrégation avec ce peptide. Toutefois, comme tout modèle utilisé afin d'étudier un système plus complexe, ce dernier comporte de multiples biais.

V.5.1. Biais associés

Les résultats obtenus avec ces systèmes peptidiques demeurent biaisés. Les sources de biais sont inhérentes au fait qu'un peptide modèle a été utilisé. Ce faisant, il y a des différences entre les peptides étudiés et la polyGln retrouvée dans les protéines pathologiques quant au nombre de résidus de Gln et à la nature des résidus les bordant. De plus, le modèle non chargé a été étudié dans un solvant non-aqueux et inducteur d'hélicité alors que le ratio réel H₂O/TFE nécessaire à l'agrégation n'a pas été rigoureusement déterminé dans le contexte où le TFE est hygroscopique.

Le peptide sensible au pH a des résidus dont les chaînes latérales sont des amides secondaires à cause des unités AEM qui y sont fixées. Ainsi, ces résidus ne peuvent pas faire deux ponts H comme les amides primaires des chaînes latérales des Gln. Ceci, jumelé au fait que les unités morpholine sont volumineuses, une altération de la structure des agrégats formés peut en résulter. Par ailleurs, ce dispositif permet l'étude d'inhibiteurs d'agrégation à pH 8,0, ce qui n'est pas à pH physiologique. Avec un pKa déterminé à 7,3 pour les AEM, à pH 8,0 il subsiste une faible proportion de morpholines protonées. Ainsi, l'étude de l'agrégation en présence d'inhibiteurs à pH 8,0 ne s'affranchit pas totalement des biais de charges. La nature du système étudié fait en sorte que les stratégies développées permettent une résolution partielle de la problématique, car elles en induisent des nouvelles.

V.5.2. Pistes de solutions

Différentes approches peuvent être imaginées afin d'améliorer les modèles créés. Premièrement, il y a l'étude de peptides ayant un nombre plus élevé de polyGln et ayant un certain nombre de résidus retrouvés dans les protéines afin d'évaluer leur pouvoir structurant. L'étude du peptide non chargé pourrait se faire dans des conditions totalement anhydres ou en déterminant la concentration d'eau se trouvant dans ces systèmes. Un peptide sensible au pH pourrait être conçu en remplaçant les unités AEM par des unités ayant un pKa plus faible telles que le (2-aminoéthyl)bis(2-hydroxyéthyl)amine ou le 2-[(2-aminoéthyl)amino]-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol (Figure V-1). Ceci permettrait de travailler à pH physiologique en plus de favoriser l'électroneutralité. Il est également possible d'envisager des éléments qui solubilisent la polyGln et qui pourraient être photolabiles. Ces approches auraient peut-être pu aider à rencontrer les objectifs fixés au départ.

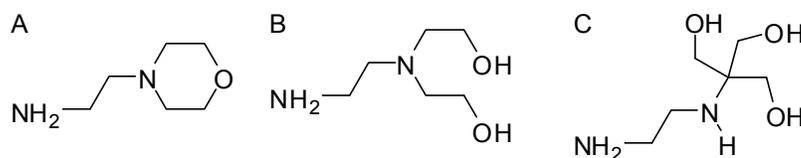


Figure V-1. Structure de différentes molécules sensibles au pH. **A**, AEM; **B**, (2-aminoéthyl)bis(2-hydroxyéthyl)amine et **C**, 2-[(2-aminoéthyl)amino]-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol.

V.6. Atteinte des objectifs

Les objectifs fixés au départ n'ont pas tous été rencontrés. Ceci peut se justifier de plusieurs façons. La première explication tient à l'inexpérience du candidat en matière de conception et de réalisation d'un projet de recherche. Le projet était beaucoup trop ambitieux au départ. Ensuite, les difficultés rencontrées en cours de projet ont fait basculer l'approche méthodologique dans un domaine qui n'était pas nécessairement le champ

d'expertise du laboratoire. De plus, le projet n'a pas pu être poussé aussi loin que prévu en raison d'un retour à la case départ afin de concevoir le peptide sensible au pH. À cet effet, les investissements dans la synthèse de glutamines marquées et protégées pouvant être utilisées en SPSS de même que l'apprentissage de la modélisation moléculaire n'ont pas été rentabilisés. C'est donc sans avoir atteint tous les objectifs que ce projet a pris fin. Cependant, la réalisation de ce projet a apporté de multiples avancées quant à la synthèse, purification, solubilisation, l'élucidation des structures et des fonctionnalités impliquées dans l'agrégation des polyGln. Ces données sont des éléments essentiels au design d'agents thérapeutiques pour les multiples maladies causées par ces homopolypeptides.

V.7. Insertion des résultats dans le dogme actuel

Les résultats obtenus contredisent le dogme actuel voulant que l'agrégation de la polyGln procède par un changement conformationnel. En effet, nos résultats montrent qu'une agrégation se produit sans grande modification structurale. Ce résultat avait d'abord été trouvé avec la polyGln non chargée dans le TFE. Ce comportement avait été associé au caractère inducteur d'hélicité du TFE. Toutefois, l'obtention des mêmes résultats avec le peptide sensible au pH en milieu aqueux était inexplicable et potentiellement controversée. Depuis, un nombre croissant d'études font état de données en accord avec les nôtres. Ceci porte à réfléchir sur l'influence que les dogmes établis peuvent avoir sur l'interprétation et la dissémination de résultats de recherche contraires à ce qui est attendu.

V.8. Originalité du travail

Ce travail est original en ce sens qu'il a mis sur pied une méthode de production de polyGln sans délétions, ce qui n'avait jamais été rapporté. De plus, ce travail établit la première stratégie de purification de la polyGln non chargée. L'étude de la solubilité de ce peptide a permis de produire des données qui n'ont jamais été publiées. De plus, ces données ont été rationalisées à l'aide de différents modèles, ce qui n'a jamais été rapporté avec les peptides de polyGln. L'utilisation de la lyophilisation du TFA, dans le but de

produire des monomères, n'a également jamais été rapportée pour la polyGln. La polyGln ayant des charges labiles est un dispositif unique et l'utilisation d'une morpholine n'a jamais été utilisée pour contrôler l'agrégation d'un peptide. Le fait que les deux peptides caractérisés sont uniques, les données qui en découlent le sont tout autant. L'utilisation de la RMN en phase solide est également une première dans l'étude de la polyGln, alors que la spectroscopie Raman n'avait jamais été utilisée sur un peptide de polyGln, mais seulement sur une protéine de fusion. L'analyse des données obtenues en DC avec les spectres de référence en facteur g est utilisée pour la première fois chez les peptides de polyGln. La détermination de la dimension fractale est une nouvelle approche pour étudier la cinétique d'agrégation de la polyGln. L'obtention d'un test positif de déplacement spectral du RC d'un peptide agrégé dans le TFE indique pour la première fois que ce test est applicable avec des quantités modérées de fluoroalcools. Finalement, il s'agit de la première indication obtenue par RMN en solution que les chaînes latérales des Gln sont impliquées dans l'agrégation.

V.9. Application des résultats dans un contexte élargi

Les techniques développées pour la production, la purification et la solubilisation de la polyGln, permettront de constituer un ensemble de connaissances de base qui n'avaient pas été publiées auparavant et qui permettra la démocratisation de la recherche avec ce type de peptides. Ceci permettra aux nouveaux chercheurs dans le domaine de la polyGln de gagner beaucoup de temps. De plus, les connaissances générées pourront également être appliquées aux peptides riches en Gln ou en Asn tels que ceux retrouvés chez le prion Sup135 ou au développement d'excipients pharmaceutiques à base de polyGln. L'utilisation d'unités sensibles au pH n'est pas couramment utilisée dans la chimie des peptides et pourrait être appliquée dans une multitude de contextes.

L'application des résultats obtenus afin de permettre une meilleure compréhension de la physiopathologie ou dans le traitement des maladies liées aux polyGln est toutefois limitée. En effet, même si l'agrégation de la polyGln joue une place importante dans ces

maladies, il demeure une incertitude quant à son rôle exact dans la pathogénèse. Ainsi, dans l'état actuel des connaissances, l'utilisation d'une approche moins fondamentale, ciblant certaines voies intracellulaires par exemple, pourrait générer des résultats plus susceptibles de contribuer dans l'immédiat à la compréhension de ces maladies.

V.10. Approches expérimentales futures

La nature homopolymérique de la polyGln, contrairement aux autres peptides amyloïdes, représente un défi supplémentaire. En effet, les techniques usuelles de RMN, en phases solide et liquide, ne peuvent pas s'appliquer à ces espèces. L'approche utilisée pour étudier ces peptides repose ainsi sur les stratégies utilisées avec les polymères, qui fournit une description statistique plutôt qu'une description précise. Cette problématique pouvait être solutionnée par une approche qui était prévue dès la conception du présent projet, soit le marquage isotopique des peptides de polyGln (Figure V-2). En effet, des expériences de NOE en RMN liquide et de REDOR en RMN solide (Chan *et al.* 2005), pourraient aider à répondre à la polémique qui subsiste quant au fait que la polyGln adopte une structure en coude ou en feuillet β et si ce dernier est constitué de brins parallèles ou antiparallèles.

Cette méthode pourrait ainsi donner des informations structurales de base sur la structure secondaire qu'adopte la polyGln, ce qui serait une percée majeure. En présence de ces données, d'autres techniques pourraient être envisagées afin d'étudier l'interaction des inhibiteurs d'agrégation. À cet effet, l'utilisation de Gln deutérées pourrait donner des informations en RMN du ^2H sur la mobilité des segments de la polyGln et ainsi fournir de l'information sur l'interaction avec les agents désagrégants.

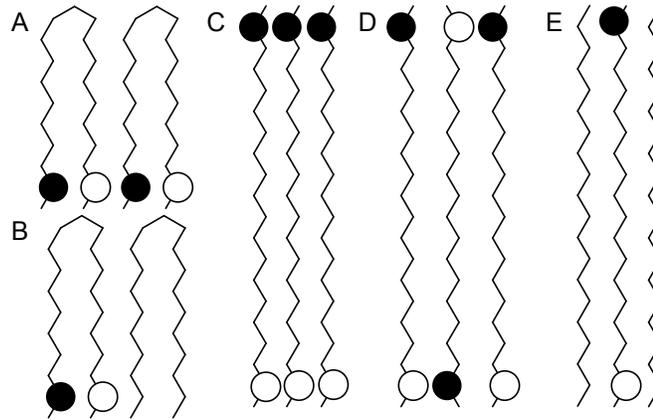


Figure V-2. Organisation structurale de la polyGln agrégée avec indication de la position des noyaux marqués (ronds noirs et blancs) des glutamines terminales pour la structure des coudes β **A**, avant et **B**, après dilution isotopique et pour la structure en feuillets β , **C**, parallèles, **D**, antiparallèles et **E**, après dilution isotopique.

Bibliographie

- Aggeli, A., Bell, M., Boden, N., Keen, J.N., Knowles, P.F., McLeish, T.C., Pitkeathly, M. et Radford, S.E. Responsive gels formed by the spontaneous self-assembly of peptides into polymeric beta-sheet tapes. *Nature* (1997); **386**: 259-262.
- Aggeli, A., Bell, M., Carrick, L.M., Fishwick, C.W.G., Harding, R., Mawer, P.J., Radford, S.E., Strong, A.E. et Boden, N. pH as a trigger of peptide beta-sheet self-assembly and reversible switching between nematic and isotropic phases. *Journal of the American Chemical Society* (2003); **125**: 9619-9628.
- Aggeli, A., Nyrkova, I.A., Bell, M., Harding, R., Carrick, L., McLeish, T.C., Semenov, A.N. et Boden, N. Hierarchical self-assembly of chiral rod-like molecules as a model for peptide beta-sheet tapes, ribbons, fibrils, and fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2001); **98**: 11857-11862.
- Albericio, F., Lloyd-Williams, P., Giralt, E. et Gregg, B.F. Convergent solid-phase peptide synthesis. *Methods in Enzymology*. Academic Press. (1997); **289**: 313-336.
- Albrecht, M., Golatta, M., Wullner, U. et Lengauer, T. Structural and functional analysis of ataxin-2 and ataxin-3. *European Journal of Biochemistry* (2004); **271**: 3155-3170.
- Altschuler, E.L., Hud, N.V., Mazrimas, J.A. et Rupp, B. Random coil conformation for extended polyglutamine stretches in aqueous soluble monomeric peptides. *The Journal of Peptide Research* (1997); **50**: 73-75.
- Amato, U. et Hughes, W. Maximum-entropy regularization of Fredholm integral-equations of the 1st kind. *Inverse Problems* (1991); **7**: 793-808.
- Ando, I. et Asakura, T. *Solid State NMR of Polymers*. Elsevier. Amsterdam ; New York. (1998): xvi, 1000 p.
- Ariely, S., Fridkin, M. et Patchornik, A. Synthesis of poly-L-asparagine and poly-L-glutamine. *Biopolymers* (1969); **7**: 417-422.
- Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E.S., Segal, M.R. et Finkbeiner, S. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* (2004); **431**: 805-810.

- Attardi, M.E., Porcu, G. et Taddei, M. Malachite green, a valuable reagent to monitor the presence of free COOH on the solid-phase. *Tetrahedron Letters* (2000); **41**: 7391-7394.
- Babin, V., Roland, C. et Sagui, C. The alpha-sheet: A missing-in-action secondary structure? *Proteins* (2010).
- Bae, B.I., Xu, H., Igarashi, S., Fujimuro, M., Agrawal, N., Taya, Y., Hayward, S.D., Moran, T.H., Montell, C., Ross, C.A., Snyder, S.H. et Sawa, A. p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. *Neuron* (2005); **47**: 29-41.
- Baker, B.R. et Garrell, R.L. g-Factor analysis of protein secondary structure in solutions and thin films. *Faraday Discussions* (2004); **126**: 209-222.
- Banfi, S., Servadio, A., Chung, M.Y., Kwiatkowski, T.J., Jr., McCall, A.E., Duvick, L.A., Shen, Y., Roth, E.J., Orr, H.T. et Zoghbi, H.Y. Identification and characterization of the gene causing type 1 spinocerebellar ataxia. *Nature Genetics* (1994); **7**: 513-520.
- Bates, G., Harper, P.S. et Jones, L. *Huntington's Disease*. Oxford University Press. Oxford; New York. (2002): xvi, 558 p.
- Bax, A. et Davis, D.G. Mlev-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance* (1985); **65**: 355-360.
- Beavis, R.C., Chaudhary, T. et Chait, B.T. Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption mass-spectrometry. *Organic Mass Spectrometry* (1992); **27**: 156-158.
- Bennett, A.E., Rienstra, C.M., Auger, M., Lakshmi, K.V. et Griffin, R.G. Heteronuclear decoupling in rotating solids. *The Journal of Chemical Physics* (1995); **103**: 6951-6958.
- Bennett, M.J., Huey-Tubman, K.E., Herr, A.B., West, A.P., Jr., Ross, S.A. et Bjorkman, P.J. A linear lattice model for polyglutamine in CAG-expansion diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2002); **99**: 11634-11639.
- Bevivino, A.E. et Loll, P.J. An expanded glutamine repeat destabilizes native ataxin-3 structure and mediates formation of parallel beta -fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2001); **98**: 11955-11960.

- Bhattacharyya, A., Thakur, A.K., Chellgren, V.M., Thiagarajan, G., Williams, A.D., Chellgren, B.W., Creamer, T.P. et Wetzel, R. Oligoproline effects on polyglutamine conformation and aggregation. *Journal of Molecular Biology* (2006); **355**: 524-535.
- Bhattacharyya, A.M., Thakur, A.K. et Wetzel, R. Polyglutamine aggregation nucleation: Thermodynamics of a highly unfavorable protein folding reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2005); **102**: 15400-15405.
- Bloomfield, V.A. et Lim, T.K. Quasi-elastic laser light scattering. *Methods in Enzymology*. Academic Press. (1978); **48**: 415-494.
- Bolen, D.W. Effects of naturally occurring osmolytes on protein stability and solubility: issues important in protein crystallization. *Methods*. Elsevier. (2004); **34**: 312-322.
- Bosques, C.J. et Imperiali, B. Photolytic control of peptide self-assembly. *Journal of the American Chemical Society* (2003); **125**: 7530-7531.
- Bradbury, J.H. et Yuan, H.H. Proof of the charging of polypeptides and polyamides in organic acids. *Biopolymers* (1972); **11**: 661-665.
- Bragg, L., Kendrew, J.C. et Perutz, M.F. Polypeptide chain configurations in crystalline proteins. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences* (1950); **203**: 321-357.
- Brahms, S. et Brahms, J. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *Journal of Molecular Biology* (1980); **138**: 149-178.
- Brooks, B.P. et Fischbeck, K.H. Spinal and bulbar muscular atrophy: a trinucleotide-repeat expansion neurodegenerative disease. *Trends in Neurosciences* (1995); **18**: 459-461.
- Buck, M. Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics* (1998); **31**: 297-355.
- Busch, A., Engemann, S., Lurz, R., Okazawa, H., Lehrach, H. et Wanker, E.E. Mutant huntingtin promotes the fibrillogenesis of wild-type huntingtin: a potential mechanism for loss of huntingtin function in Huntington's disease. *The Journal of Biological Chemistry* (2003); **278**: 41452-41461.
- Cacace, M.G., Landau, E.M. et Ramsden, J.J. The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena. *Quarterly Reviews of Biophysics* (1997); **30**: 241-277.

- Carlisle, E.A., Holder, J.L., Maranda, A.M., de Alwis, A.R., Selkie, E.L. et McKay, S.L. Effect of pH, urea, peptide length, and neighboring amino acids on alanine alpha-proton random coil chemical shifts. *Biopolymers* (2007); **85**: 72-80.
- Carrick, L.M., Aggeli, A., Boden, N., Fisher, J., Ingham, E. et Waigh, T.A. Effect of ionic strength on the self-assembly, morphology and gelation of pH responsive [beta]-sheet tape-forming peptides. *Tetrahedron* (2007); **63**: 7457-7467.
- Carter, D.B. et Chou, K.C. A model for structure-dependent binding of Congo red to Alzheimer beta-amyloid fibrils. *Neurobiology of Aging* (1998); **19**: 37-40.
- Catalan, J. Toward a generalized treatment of the solvent effect based on four empirical scales: dipolarity (SdP, a new scale), polarizability (SP), acidity (SA), and basicity (SB) of the medium. *The Journal of Physical Chemistry B* (2009); **113**: 5951-5960.
- Catalan, J. et Diaz, C. Extending the solvent acidity scale to highly acidic organic solvents: The unique photophysical behaviour of 3,6-diethyltetrazine. *European Journal of Organic Chemistry* (1999): 885-891.
- Cattaneo, E., Rigamonti, D., Goffredo, D., Zuccato, C., Squitieri, F. et Sipione, S. Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. *Trends in Neurosciences* (2001); **24**: 182-188.
- Chan, J.C., Oyler, N.A., Yau, W.M. et Tycko, R. Parallel beta-sheets and polar zippers in amyloid fibrils formed by residues 10-39 of the yeast prion protein Ure2p. *Biochemistry* (2005); **44**: 10669-10680.
- Channon, K. et MacPhee, C.E. Possibilities for 'smart' materials exploiting the self-assembly of polypeptides into fibrils. *Soft Matter* (2008); **4**: 647-652.
- Chellgren, B.W., Miller, A.F. et Creamer, T.P. Evidence for polyproline II helical structure in short polyglutamine tracts. *Journal of Molecular Biology* (2006); **361**: 362-371.
- Chen, H.K., Fernandez-Funez, P., Acevedo, S.F., Lam, Y.C., Kaytor, M.D., Fernandez, M.H., Aitken, A., Skoulakis, E.M., Orr, H.T., Botas, J. et Zoghbi, H.Y. Interaction of Akt-phosphorylated ataxin-1 with 14-3-3 mediates neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 1. *Cell* (2003); **113**: 457-468.
- Chen, J.X., Wu, H.Y., Zheng, Z.G., Jin, C., Zhang, X.X. et Su, W.K. An approach to the Paal-Knorr pyrroles synthesis catalyzed by Sc(OTf)₃ under solvent-free conditions. *Tetrahedron Letters* (2006); **47**: 5383-5387.

- Chen, S., Berthelie, V., Hamilton, J.B., O'Nuallain, B. et Wetzel, R. Amyloid-like features of polyglutamine aggregates and their assembly kinetics. *Biochemistry* (2002); **41**: 7391-7399.
- Chen, S., Berthelie, V., Yang, W. et Wetzel, R. Polyglutamine aggregation behavior in vitro supports a recruitment mechanism of cytotoxicity. *Journal of Molecular Biology* (2001); **311**: 173-182.
- Chen, S.M., Ferrone, F.A. et Wetzel, R. Huntington's disease age-of-onset linked to polyglutamine aggregation nucleation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2002); **99**: 11884-11889.
- Chen, S.M. et Wetzel, R. Solubilization and disaggregation of polyglutamine peptides. *Protein Science* (2001); **10**: 887-891.
- Chen, Y.W., Stott, K. et Perutz, M.F. Crystal structure of a dimeric chymotrypsin inhibitor 2 mutant containing an inserted glutamine repeat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1999); **96**: 1257-1261.
- Chin, J.T., Wheeler, S.L. et Klibanov, A.M. On protein solubility in organic solvent. *Biotechnology and Bioengineering* (1994); **44**: 140-145.
- Chockalingam, K., Blenner, M. et Banta, S. Design and application of stimulus-responsive peptide systems. *Protein Engineering, Design & Selection* (2007); **20**: 155-161.
- Chow, M.K., Ellisdon, A.M., Cabrita, L.D. et Bottomley, S.P. Purification of polyglutamine proteins. *Methods in Enzymology*. Academic Press. (2006); **413**: 1-19.
- Chu, B.C.F. et Orgel, L.E. Inhibition of oligo(glutamine) precipitation by glutamine-containing peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2001); **283**: 351-355.
- Chung, M.Y., Ranum, L.P.W., Duvick, L.A., Servadio, A., Zoghbi, H.Y. et Orr, H.T. Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type-I. *Nature Genetics* (1993); **5**: 254-258.
- Claridge, T.D.W. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. Pergamon. Amsterdam ; New York. (1999): xiv, 382 p.
- Connors, K.A. *Chemical Kinetics : The Study of Reaction Rates in Solution*. VCH. New York, N.Y. (1990): xiii, 480 p.

- Copeland, R.A. *Enzymes : A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. Wiley. New York. (2000): xvi, 397 p.
- Costantino, H.R., Griebenow, K., Langer, R. et Klivanov, A.M. On the pH memory of lyophilized compounds containing protein functional groups. *Biotechnology and Bioengineering* (1997); **53**: 345-348.
- Costas, M.E., Moreau, M. et Vicente, L. Some analytical and numerical-solutions for colloidal aggregation with fragmentation. *Journal of Physics A: Mathematical and General* (1995); **28**: 2981-2994.
- Darnell, G., Orgel, J.P., Pahl, R. et Meredith, S.C. Flanking polyproline sequences inhibit beta-sheet structure in polyglutamine segments by inducing PPII-like helix structure. *Journal of Molecular Biology* (2007); **374**: 688-704.
- Darnell, G.D., Derryberry, J., Kurutz, J.W. et Meredith, S.C. Mechanism of cis-inhibition of polyQ fibrillation by polyP: PPII oligomers and the hydrophobic effect. *Biophysical Journal* (2009); **97**: 2295-2305.
- David, G., Abbas, N., Stevanin, G., Durr, A., Yvert, G., Cancel, G., Weber, C., Imbert, G., Saudou, F., Antoniou, E., Drabkin, H., Gemmill, R., Giunti, P., Benomar, A., Wood, N., Ruberg, M., Agid, Y., Mandel, J.L. et Brice, A. Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nature Genetics* (1997); **17**: 65-70.
- Davies, S.W., Turmaine, M., Cozens, B.A., DiFiglia, M., Sharp, A.H., Ross, C.A., Scherzinger, E., Wanker, E.E., Mangiarini, L. et Bates, G.P. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* (1997); **90**: 537-548.
- De Jongh, K.S., Colvin, A.A., Wang, K.K.W. et Catterall, W.A. Differential proteolysis of the full-length form of the L-type calcium channel $\alpha 1$ subunit by calpain. *Journal of Neurochemistry* (1994); **63**: 1558-1564.
- De Winne, K., Vanderkerken, S., Hoste, K., Dubruel, P., Schacht, E., Jelinkova, M. et Rihova, B. Dendritic poly-[N-(2-hydroxyethyl)-L-glutamine] as potential drug carrier. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* (2004); **19**: 367-382.
- Delpuech, J.J. et Deschamps, M.N. Transferts protoniques de sels d'ammonium substitués--III : Spectrographie par résonance magnétique nucléaire de sels de N-méthylpipéridinium. *Tetrahedron* (1970); **26**: 2723-2738.

- Dennis, E.K. Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: The method of cumulants. *The Journal of Chemical Physics* (1972); **57**: 4814-4820.
- Dewey, T.G. *Fractals in Molecular Biophysics*. Oxford University Press. Oxford ; New York. (1997): xii, 276.
- Diaz-Hernandez, M., Moreno-Herrero, F., Gomez-Ramos, P., Moran, M.A., Ferrer, I., Baro, A.M., Avila, J., Hernandez, F. et Lucas, J.J. Biochemical, ultrastructural, and reversibility studies on huntingtin filaments isolated from mouse and human brain. *The Journal of Neuroscience* (2004); **24**: 9361-9371.
- Dikshit, P., Goswami, A., Mishra, A., Nukina, N. et Jana, N.R. Curcumin enhances the polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin-induced cell death by promoting proteasomal malfunction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2006); **342**: 1323-1328.
- Dimarchi, R.D., Tam, J.P., Kent, S.B.H. et Merrifield, R.B. Weak acid-catalyzed pyrrolidone carboxylic-acid formation from glutamine during solid-phase peptide-synthesis - minimization by rapid coupling. *International Journal of Peptide and Protein Research* (1982); **19**: 88-93.
- Dorval, V. et Fraser, P.E. SUMO on the road to neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta* (2007); **1773**: 694-706.
- Duer, M.J. *Solid-State NMR Spectroscopy : Principles and Applications*. Blackwell Science. Malden, MA. (2002): xvii, 567 p.
- Ehrhoefer, D.E., Duennwald, M., Markovic, P., Wacker, J.L., Engemann, S., Roark, M., Legleiter, J., Marsh, J.L., Thompson, L.M., Lindquist, S., Muchowski, P.J. et Wanker, E.E. Green tea (-)-epigallocatechin-gallate modulates early events in huntingtin misfolding and reduces toxicity in Huntington's disease models. *Human Molecular Genetics* (2006); **15**: 2743-2751.
- Ellerby, L.M., Andrusiak, R.L., Wellington, C.L., Hackam, A.S., Propp, S.S., Wood, J.D., Sharp, A.H., Margolis, R.L., Ross, C.A., Salvesen, G.S., Hayden, M.R. et Bredesen, D.E. Cleavage of atrophin-1 at caspase site aspartic acid 109 modulates cytotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry* (1999); **274**: 8730-8736.
- Estrada-Sanchez, A.M., Montiel, T., Segovia, J. et Massieu, L. Glutamate toxicity in the striatum of the R6/2 Huntington's disease transgenic mice is age-dependent and correlates with decreased levels of glutamate transporters. *Neurobiology of Disease* (2009); **34**: 78-86.

- Falush, D., Almqvist, E.W., Brinkmann, R.R., Iwasa, Y. et Hayden, M.R. Measurement of mutational flow implies both a high new-mutation rate for Huntington disease and substantial underascertainment of late-onset cases. *American Journal of Human Genetics* (2001); **68**: 373-385.
- Faurobert, M., Pelpoir, E. et Chaib, J. Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. *Methods in Molecular Biology*. Springer. (2007); **355**: 9-14.
- Ferraro, J.R., Nakamoto, K. et Brown, C.W. *Introductory Raman Spectroscopy*. Academic Press. Amsterdam ; Boston. (2003): xiii, 434 p.
- Fields, G.B. et Noble, R.L. Solid-phase peptide-synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-acids. *International Journal of Peptide and Protein Research* (1990); **35**: 161-214.
- Forest, M. et Fournier, A. BOP reagent for the coupling of pGlu and Boc-His(Tos) in solid phase peptide synthesis. *International Journal of Peptide and Protein Research* (1990); **35**: 89-94.
- Forman, M.S., Trojanowski, J.Q. et Lee, V.M. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nature Medicine* (2004); **10**: 1055-1063.
- Gauthier, L.R., Charrin, B.C., Borrell-Pages, M., Dompierre, J.P., Rangone, H., Cordelieres, F.P., De Mey, J., MacDonald, M.E., Lessmann, V., Humbert, S. et Saudou, F. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* (2004); **118**: 127-138.
- Gente, G. et La Mesa, C. Water-trifluoroethanol mixtures: Some physicochemical properties. *Journal of Solution Chemistry* (2000); **29**: 1159-1172.
- Georgalis, Y., Starikov, E.B., Hollenbach, B., Lurz, R., Scherzinger, E., Saenger, W., Lehrach, H. et Wanker, E.E. Huntingtin aggregation monitored by dynamic light scattering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1998); **95**: 6118-6121.
- Georgalis, Y., Umbach, P., Soumpasis, D.M. et Saenger, W. Dynamics and microstructure formation during nucleation of lysozyme solutions. *Journal of the American Chemical Society* (1998); **120**: 5539-5548.

- Ghiso, J., Revesz, T., Holton, J., Rostagno, A., Lashley, T., Houlden, H., Gibb, G., Anderton, B., Bek, T., Bojsen-Moller, M., Wood, N., Vidal, R., Braendgaard, H., Plant, G. et Frangione, B. Chromosome 13 dementia syndromes as models of neurodegeneration. *Amyloid* (2001); **8**: 277-284.
- Gisin, B.F. The monitoring of reactions in solid-phase peptide synthesis with picric acid. *Analytica Chimica Acta* (1972); **58**: 248-249.
- Goetz, C.G. *Textbook of Clinical Neurology*. Saunders Elsevier. Philadelphia. (2007): xvii, 1364 p.
- Goswami, A., Dikshit, P., Mishra, A., Mulherkar, S., Nukina, N. et Jana, N.R. Oxidative stress promotes mutant huntingtin aggregation and mutant huntingtin-dependent cell death by mimicking proteasomal malfunction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2006); **342**: 184-190.
- Greenfield, N.J. Analysis of circular dichroism data. *Methods in Enzymology* (2004); **383**: 282-317.
- Gregory, J. *Particles in Water : Properties and Processes*. IWA Pub. ; Taylor & Francis. London Boca Raton, FL. (2005): 180 p.
- Gude, M., Ryf, J. et White, P.D. An accurate method for the quantitation of Fmoc-derivatized solid phase supports. *Letters in Peptide Science* (2002); **9**: 203-206.
- Haacke, A., Hartl, F.U. et Breuer, P. Calpain inhibition is sufficient to suppress aggregation of polyglutamine-expanded ataxin-3. *The Journal of Biological Chemistry* (2007); **282**: 18851-18856.
- Hackam, A.S., Singaraja, R., Wellington, C.L., Metzler, M., McCutcheon, K., Zhang, T., Kalchman, M. et Hayden, M.R. The influence of huntingtin protein size on nuclear localization and cellular toxicity. *The Journal of Cell Biology* (1998); **141**: 1097-1105.
- Hanlon, S. et Klotz, I.M. Protonation of polypeptides in "helix-breaking" solvents: Spectral and optical-rotatory properties in solutions containing strong organic acids. *Biochemistry* (1965); **4**: 37-48.
- Hansen, C.M. *Hansen Solubility Parameters : A User's Handbook*. CRC Press. Boca Raton ; London. (2007): 519 p.
- Hansen, P.C. et O'Leary, D.P. The use of the L-curve in the regularization of discrete ill-posed problems. *SIAM Journal on Scientific Computing* (1993); **14**: 1487-1503.

- Harding, A.E. Clinical features and classification of inherited ataxias. *Advances in Neurology* (1993); **61**: 1-14.
- Harding, A.E., Thomas, P.K., Baraitser, M., Bradbury, P.G., Morgan-Hughes, J.A. et Ponsford, J.R. X-linked recessive bulbospinal neuronopathy: a report of ten cases. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* (1982); **45**: 1012-1019.
- Hazeki, N., Tukamoto, T., Goto, J. et Kanazawa, I. Formic acid dissolves aggregates of an N-terminal huntingtin fragment containing an expanded polyglutamine tract: applying to quantification of protein components of the aggregates. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2000); **277**: 386-393.
- Heiser, V., Engemann, S., Brocker, W., Dunkel, I., Boeddrich, A., Waelter, S., Nordhoff, E., Lurz, R., Schugardt, N., Rautenberg, S., Herhaus, C., Barnickel, G., Bottcher, H., Lehrach, H. et Wanker, E.E. Identification of benzothiazoles as potential polyglutamine aggregation inhibitors of Huntington's disease by using an automated filter retardation assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2002); **99 Suppl 4**: 16400-16406.
- Heiser, V., Scherzinger, E., Boeddrich, A., Nordhoff, E., Lurz, R., Schugardt, N., Lehrach, H. et Wanker, E.E. Inhibition of huntingtin fibrillogenesis by specific antibodies and small molecules: implications for Huntington's disease therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2000); **97**: 6739-6744.
- Heitjans, P. et Kärger, J. *Diffusion in Condensed Matter : Methods, Materials, Models*. Springer. Berlin ; New York. (2005): xxvi, 965 p.
- Hemker, D.J. et Frank, C.W. Dynamic light-scattering-studies of the fractal aggregation of poly(methacrylic acid) and poly(ethylene glycol). *Macromolecules* (1990); **23**: 4404-4410.
- Hernandez, B., Boukhalifa-Heniche, F.Z., Seksek, O., Coic, Y.M. et Ghomi, M. Secondary conformation of short lysine- and leucine-rich peptides assessed by optical spectroscopies: effect of chain length, concentration, solvent, and time. *Biopolymers* (2006); **81**: 8-19.
- Hirakura, Y., Azimov, R., Azimova, R. et Kagan, B.L. Polyglutamine-induced ion channels: a possible mechanism for the neurotoxicity of Huntington and other CAG repeat diseases. *Journal of Neuroscience Research* (2000); **60**: 490-494.
- Hirayama, K., Takayanagi, T., Nakamura, R., Yanagisawa, N., Hattori, T., Kita, K., Yanagimoto, S., Fujita, M., Nagaoka, M., Satomura, Y., Sobue, I., Iizuka, R.,

- Toyokura, Y. et Satoyoshi, E. Spinocerebellar degenerations in Japan - a nationwide epidemiologic and clinical-study. *Acta Neurologica Scandinavica* (1994); **89**: 1-22.
- Ho, L.W., Brown, R., Maxwell, M., Wyttenbach, A. et Rubinsztein, D.C. Wild type huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in mammalian cell models of Huntington's disease. *Journal of Medical Genetics* (2001); **38**: 450-452.
- Hoffman, A., Sinn, E., Yamamoto, T., Wang, J., Roy, A., Horikoshi, M. et Roeder, R.G. Highly conserved core domain and unique N terminus with presumptive regulatory motifs in a human TATA factor (TFIID). *Nature* (1990); **346**: 387-390.
- Houen, G. The solubility of proteins in organic solvents. *Acta Chemica Scandinavica* (1996); **50**: 68-70.
- Houen, G., Svaerke, C. et Barkholt, V. The solubilities of denatured proteins in different organic solvents. *Acta Chemica Scandinavica* (1999); **53**: 1122-1126.
- Howarth, J., Kelly, S., Keasey, M., Glover, C., Lee, Y.B., Mitrophanous, K., Chapple, J., Gallo, J., Cheetham, M. et Uney, J. Hsp40 molecules that target to the ubiquitin-proteasome system decrease inclusion formation in models of polyglutamine disease. *Molecular Therapy* (2007); **15**: 1100-1105.
- Hu, J., Cheng, Y., Wu, Q., Zhao, L. et Xu, T. Host-guest chemistry of dendrimer-drug complexes. 2. Effects of molecular properties of guests and surface functionalities of dendrimers. *The Journal of Physical Chemistry B* (2009); **113**: 10650-10659.
- Huang, K., Sanders, S., Singaraja, R., Orban, P., Cijssouw, T., Arstikaitis, P., Yanai, A., Hayden, M.R. et El-Husseini, A. Neuronal palmitoyl acyl transferases exhibit distinct substrate specificity. *The FASEB Journal* (2009); **23**: 2605-2615.
- Hulst, H.C.v.d. *Light Scattering by Small Particles*. Dover Publications. New York. (1981): 470 p.
- Hwang, T.L. et Shaka, A.J. Water suppression that works - Excitation sculpting using arbitrary wave-forms and pulsed-field gradients. *Journal of Magnetic Resonance. Series A* (1995); **112**: 275-279.
- Ignatova, Z. et Gierasch, L.M. Inhibition of protein aggregation in vitro and in vivo by a natural osmoprotectant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2006); **103**: 13357-13361.
- Inui, T., Bodi, J., Nishio, H., Nishiuchi, Y. et Kimura, T. Synthesis of amyloid beta-peptides in solution employing chloroform-phenol mixed solvent for facile segment

- condensation of sparingly soluble protected peptides. *Letters in Peptide Science* (2001); **8**: 319-330.
- Ishihara, K., Yamagishi, N. et Hatayama, T. Suppression of heat- and polyglutamine-induced cytotoxicity by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *European Journal of Biochemistry* (2004); **271**: 4552-4558.
- Ishii, Y., Yesinowski, J.P. et Tycko, R. Sensitivity enhancement in solid-state C-13 NMR of synthetic polymers and biopolymers by H-1 NMR detection with high-speed magic angle spinning. *Journal of the American Chemical Society* (2001); **123**: 2921-2922.
- Jain, N.K. et Roy, I. Effect of trehalose on protein structure. *Protein Science* (2009); **18**: 24-36.
- Jakes, J. Testing of the constrained regularization method of inverting Laplace transform on simulated very wide quasielastic light scattering autocorrelation functions. *Czechoslovak Journal of Physics* (1988); **38**: 1305-1316.
- Jana, N.R., Zemskov, E.A., Wang, G. et Nukina, N. Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Human Molecular Genetics* (2001); **10**: 1049-1059.
- Jaynes, E.T. Information theory and statistical mechanics. *Physical Review* (1957); **106**: 620.
- Jeener, J., Meier, B.H., Bachmann, P. et Ernst, R.R. Investigation of exchange processes by 2-dimensional NMR-spectroscopy. *The Journal of Chemical Physics* (1979); **71**: 4546-4553.
- Jeong, H., Then, F., Melia, T.J., Jr., Mazzulli, J.R., Cui, L., Savas, J.N., Voisine, C., Paganetti, P., Tanese, N., Hart, A.C., Yamamoto, A. et Krainc, D. Acetylation targets mutant huntingtin to autophagosomes for degradation. *Cell* (2009); **137**: 60-72.
- Johnson, T. Chemical synthesis of polar zipper peptides: motifs for potential protein association in inherited neurodegenerative diseases. *Biomedical Peptides, Proteins & Nucleic Acids : Structure, Synthesis & Biological Activity* (1995); **1**: 247-249.
- Johnson, W.C. Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. *Proteins* (1999); **35**: 307-312.

- Johnston, J.A., Ward, C.L. et Kopito, R.R. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *The Journal of Cell Biology* (1998); **143**: 1883-1898.
- Ju, R.T.C., Frank, C.W. et Gast, A.P. Contin analysis of colloidal aggregates. *Langmuir* (1992); **8**: 2165-2171.
- Kabsch, W. et Sander, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* (1983); **22**: 2577-2637.
- Kahlem, P., Terre, C., Green, H. et Djian, P. Peptides containing glutamine repeats as substrates for transglutaminase-catalyzed cross-linking: relevance to diseases of the nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1996); **93**: 14580-14585.
- Kaiser, E., Colescott, R.L., Bossinger, C.D. et Cook, P.I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical Biochemistry* (1970); **34**: 595-598.
- Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Nishimura, M., Akiguchi, I. et al. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genetics* (1994); **8**: 221-228.
- Kazunori Ishikawa, T.E. Functional polypeptide: First synthesis of polyglutamine with high molecular weight. *Journal of Polymer Science. Part A-1, Polymer Chemistry* (1990); **28**: 3525-3527.
- Khandke, K.M., Fairwell, T., Chait, B.T. et Manjula, B.N. Influence of ions on cyclization of the amino terminal glutamine residues of tryptic peptides of streptococcal pepm49 protein - Resolution of cyclized peptides by HPLC and characterization by mass-spectrometry. *International Journal of Peptide and Protein Research* (1989); **34**: 118-123.
- Khurana, R., Uversky, V.N., Nielsen, L. et Fink, A.L. Is Congo red an amyloid-specific dye? *The Journal of Biological Chemistry* (2001); **276**: 22715-22721.
- Kim, M.W., Chelliah, Y., Kim, S.W., Otwinowski, Z. et Bezprozvanny, I. Secondary structure of huntingtin amino-terminal region. *Structure* (2009); **17**: 1205-1212.
- Kim, Y., Rose, C.A., Liu, Y., Ozaki, Y., Datta, G. et Tu, A.T. FT-IR and near-infrared FT-Raman studies of the secondary structure of insulinotropin in the solid state: alpha-helix to beta-sheet conversion induced by phenol and/or by high shear force. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (1994); **83**: 1175-1180.

- King, R. et Jardetzky, O. A general formalism for the analysis of NMR relaxation measurements on systems with multiple degrees of freedom. *Chemical Physics Letters* (1978); **55**: 15-18.
- Kissa, E. *Dispersions : Characterization, Testing, and Measurement*. M. Dekker. New York. (1999): vii, 708 p.
- Klauder, J.R. et Anderson, P.W. Spectral diffusion decay in spin resonance experiments. *Physical Review* (1962); **125**: 912.
- Klement, I.A., Skinner, P.J., Kaytor, M.D., Yi, H., Hersch, S.M., Clark, H.B., Zoghbi, H.Y. et Orr, H.T. Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell* (1998); **95**: 41-53.
- Klibanov, A.M. Enzyme memory. What is remembered and why? *Nature* (1995); **374**: 596.
- Klunk, W.E., Jacob, R.F. et Mason, R.P. Quantifying amyloid by congo red spectral shift assay. *Methods in Enzymology*. Academic Press. (1999); **309**: 285-305.
- Koide, R., Ikeuchi, T., Onodera, O., Tanaka, H., Igarashi, S., Endo, K., Takahashi, H., Kondo, R., Ishikawa, A. et Hayashi, T. Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). *Nature Genetics* (1994); **6**: 9-13.
- Kordasiewicz, H.B. et Gomez, C.M. Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 6. *Neurotherapeutics* (2007); **4**: 285-294.
- Kricheldorf, H.R. et Muller, D. Secondary structure of peptides. 3. C-13 NMR cross polarization magic angle spinning spectroscopic characterization of solid polypeptides. *Macromolecules* (1983); **16**: 615-623.
- Krull, L.H. et Wall, J.S. Synthetic polypeptides containing side-chain amide groups. Water-soluble polymers. *Biochemistry* (1966); **5**: 1521-1527.
- Kuroda, H., Chen, Y.N., Kimura, T. et Sakakibara, S. Powerful solvent systems useful for synthesis of sparingly-soluble peptides in solution. *International Journal of Peptide and Protein Research* (1992); **40**: 294-299.
- Laghaei, R. et Mousseau, N. Spontaneous formation of polyglutamine nanotubes with molecular dynamics simulations. *The Journal of Chemical Physics* (2010); **132**: 165102.

- Langowski, J. et Bryan, R. Maximum-entropy analysis of photon-correlation spectroscopy data using a bayesian estimate for the regularization parameter. *Macromolecules* (1991); **24**: 6346-6348.
- Lathrop, R.H., Casale, M., Tobias, D.J., Marsh, J.L. et Thompson, L.M. Modeling protein homopolymeric repeats: possible polyglutamine structural motifs for Huntington's disease. *Proceedings of the International Conference of Intelligent Systems for Molecular Biology* (1998); **6**: 105-114.
- Laurents, D.V., Gorman, P.M., Guo, M., Rico, M., Chakrabartty, A. et Bruix, M. Alzheimer's A β 40 studied by NMR at low pH reveals that sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate (DSS) binds and promotes beta-ball oligomerization. *The Journal of Biological Chemistry* (2005); **280**: 3675-3685.
- Lee, C.C., Walters, R.H. et Murphy, R.M. Reconsidering the mechanism of polyglutamine peptide aggregation. *Biochemistry* (2007); **46**: 12810-12820.
- Lefevre, T., Rousseau, M.E. et Pezolet, M. Protein secondary structure and orientation in silk as revealed by Raman spectromicroscopy. *Biophysical Journal* (2007); **92**: 2885-2895.
- Legleiter, J., Mitchell, E., Lotz, G.P., Sapp, E., Ng, C., DiFiglia, M., Thompson, L.M. et Muchowski, P.J. Mutant huntingtin fragments form oligomers in a polyglutamine length-dependent manner in vitro and in vivo. *The Journal of Biological Chemistry* (2010); **285**: 14777-14790.
- Levitt, M.H. *Spin Dynamics : Basics of Nuclear Magnetic Resonance*. John Wiley & Sons. Chichester ; New York. (2001): xxiv, 686 p.
- Li, H., Wyman, T., Yu, Z.X., Li, S.H. et Li, X.J. Abnormal association of mutant huntingtin with synaptic vesicles inhibits glutamate release. *Human Molecular Genetics* (2003); **12**: 2021-2030.
- Lim, D., Fedrizzi, L., Tartari, M., Zuccato, C., Cattaneo, E., Brini, M. et Carafoli, E. Calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in striatal neurons of Huntington disease. *The Journal of Biological Chemistry* (2008); **283**: 5780-5789.
- Lin, M.Y., Lindsay, H.M., Weitz, D.A., Ball, R.C., Klein, R. et Meakin, P. Universality in colloid aggregation. *Nature* (1989); **339**: 360-362.
- Lin, M.Y., Lindsay, H.M., Weitz, D.A., Ball, R.C., Klein, R. et Meakin, P. Universality of fractal aggregates as probed by light-scattering. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences* (1989); **423**: 71-87.

- Lin, X.J., Zhang, F., Xie, Y.Y., Bao, W.J., He, J.H. et Hu, H.Y. Secondary structural formation of alpha-synuclein amyloids as revealed by g-factor of solid-state circular dichroism. *Biopolymers* (2006); **83**: 226-232.
- Liu, K.J. NMR studies of polymer solutions. VI. Molecular weight determination of poly(ethylene glycol) by NMR analysis of near-end groups. *Die Makromolekulare Chemie* (1968); **116**: 146-151.
- Liu, R. *Water-Insoluble Drug Formulation*. CRC Press. Boca Raton, FL. (2008): 669 p.
- Livesey, A.K., Licinio, P. et Delaye, M. Maximum-entropy analysis of quasi-elastic light-scattering from colloidal dispersions. *The Journal of Chemical Physics* (1986); **84**: 5102-5107.
- MacDonald, M.E., Novelletto, A., Lin, C., Tagle, D., Barnes, G., Bates, G., Taylor, S., Allitto, B., Altherr, M. et Myers, R. The Huntington's disease candidate region exhibits many different haplotypes. *Nature Genetics* (1992); **1**: 99-103.
- Malavolta, L. et Nakaie, C.R. Peptide dissociation in solution or bound to a polymer: comparative solvent effect. *Tetrahedron* (2004); **60**: 9417-9424.
- Malavolta, L., Pinto, M.R.S., Cuvero, J.H. et Nakaie, C.R. Interpretation of the dissolution of insoluble peptide sequences based on the acid-base properties of the solvent. *Protein Science* (2006); **15**: 1476-1488.
- Maple, J.R., Hwang, M.J., Jalkanen, K.J., Stockfisch, T.P. et Hagler, A.T. Derivation of class II force fields: V. Quantum force field for amides, peptides, and related compounds. *Journal of Computational Chemistry* (1998); **19**: 430-458.
- Maple, J.R., Hwang, M.J., Stockfisch, T.P., Dinur, U., Waldman, M., Ewig, C.S. et Hagler, A.T. Derivation of class II force-fields. 1. Methodology and quantum force-fields for the alkyl functional-group and alkane molecules. *Journal of Computational Chemistry* (1994); **15**: 162-182.
- Masino, L., Kelly, G., Leonard, K., Trottier, Y. et Pastore, A. Solution structure of polyglutamine tracts in GST-polyglutamine fusion proteins. *FEBS Letters* (2002); **513**: 267-272.
- Masino, L. et Pastore, A. Glutamine repeats: structural hypotheses and neurodegeneration. *Biochemical Society Transactions* (2002); **30**: 548-551.
- Matilla-Duenas, A., Sanchez, I., Corral-Juan, M., Davalos, A., Alvarez, R. et Latorre, P. Cellular and molecular pathways triggering neurodegeneration in the spinocerebellar ataxias. *Cerebellum* (2010); **9**: 148-166.

- Matsumoto, T. et Teramoto, A. Solution properties of synthetic polypeptides. XVII. Stability of the alpha-helical conformation of poly (gamma-benzyl L-glutamate) in helicogenic solvents. *Biopolymers* (1974); **13**: 1347-1356.
- McBride, J.L., Boudreau, R.L., Harper, S.Q., Staber, P.D., Monteys, A.M., Martins, I., Gilmore, B.L., Burstein, H., Peluso, R.W., Polisky, B., Carter, B.J. et Davidson, B.L. Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: implications for the therapeutic development of RNAi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2008); **105**: 5868-5873.
- McPhie, P. Circular dichroism studies on proteins in films and in solution: estimation of secondary structure by g-factor analysis. *Analytical Biochemistry* (2001); **293**: 109-119.
- McPhie, P. CD studies on films of amyloid proteins and polypeptides: quantitative g-factor analysis indicates a common folding motif. *Biopolymers* (2004); **75**: 140-147.
- Merutka, G., Jane Dyson, H. et Wright, P. 'Random coil' ¹H chemical shifts obtained as a function of temperature and trifluoroethanol concentration for the peptide series GGXGG. *Journal of Biomolecular NMR* (1995); **5**: 14-24.
- Monoï, H. New tubular single-stranded helix of poly-L-amino acids suggested by molecular mechanics calculations: I. Homopolypeptides in isolated environments. *Biophysical Journal* (1995); **69**: 1130-1141.
- Monoï, H., Futaki, S., Kugimiya, S., Minakata, H. et Yoshihara, K. Poly-L-glutamine forms cation channels: relevance to the pathogenesis of the polyglutamine diseases. *Biophysical Journal* (2000); **78**: 2892-2899.
- Morrison, I.D., Grabowski, E.F. et Herb, C.A. Improved techniques for particle-size determination by quasi-elastic light-scattering. *Langmuir* (1985); **1**: 496-501.
- Muchowski, P.J., Schaffar, G., Sittler, A., Wanker, E.E., Hayer-Hartl, M.K. et Hartl, F.U. Hsp70 and Hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2000); **97**: 7841-7846.
- Murphy, D.B. *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. Wiley-Liss. New York. (2001); xii, 368 p.
- Nagai, Y., Inui, T., Popiel, H.A., Fujikake, N., Hasegawa, K., Urade, Y., Goto, Y., Naiki, H. et Toda, T. A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nature Structural & Molecular Biology* (2007); **14**: 332-340.

- Nagai, Y., Tucker, T., Ren, H., Kenan, D.J., Henderson, B.S., Keene, J.D., Strittmatter, W.J. et Burke, J.R. Inhibition of polyglutamine protein aggregation and cell death by novel peptides identified by phage display screening. *The Journal of Biological Chemistry* (2000); **275**: 10437-10442.
- Nagao, Y., Ishiguro, H. et Nukina, N. DMSO and glycerol reduce bacterial death induced by expression of truncated N-terminal huntingtin with expanded polyglutamine tracts. *Biochimica et Biophysica Acta* (2000); **1502**: 247-256.
- Naito, H. et Oyanagi, S. Familial myoclonus epilepsy and choreoathetosis: hereditary dentatorubral-pallidolusian atrophy. *Neurology* (1982); **32**: 798-807.
- Nakano, T., Nakagawa, O., Yade, T. et Okamoto, Y. Solid-state polymerization of dibenzofulvene leading to a copolymer with oxygen. *Macromolecules* (2003); **36**: 1433-1435.
- Nilsson, M.R. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods*. Elsevier, (2004); **34**: 151-160.
- Nyeo, S.L. et Chu, B. Maximum-entropy analysis of photon-correlation spectroscopy data. *Macromolecules* (1989); **22**: 3998-4009.
- Okamoto, Y., Nagai, Y., Fujikake, N., Akiko Popiel, H., Yoshioka, T., Toda, T. et Inui, T. Surface plasmon resonance characterization of specific binding of polyglutamine aggregation inhibitors to the expanded polyglutamine stretch. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2009); **378**: 634-639.
- Okazawa, H. Polyglutamine diseases: a transcription disorder? *Cellular and Molecular Life Sciences* (2003); **60**: 1427-1439.
- Orlowska, A., Witkowska, E. et Izdebski, J. Sequence dependence in the formation of pyroglutamyl peptides in solid-phase peptide-synthesis. *International Journal of Peptide and Protein Research* (1987); **30**: 141-144.
- Orr, A.L., Li, S., Wang, C.-E., Li, H., Wang, J., Rong, J., Xu, X., Mastroberardino, P.G., Greenamyre, J.T. et Li, X.-J. N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *The Journal of Neuroscience* (2008); **28**: 2783-2792.
- Palepu, R. et Clarke, J. Viscosities and densities of 2,2,2-trifluoroethanol + water at various temperatures. *Thermochimica Acta* (1989); **156**: 359-363.

- Parker, J.A., Arango, M., Abderrahmane, S., Lambert, E., Tourette, C., Catoire, H. et Neri, C. Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons. *Nature Genetics* (2005); **37**: 349-350.
- Pedroso, E., Grandas, A., de las Heras, X., Eritja, R. et Giralt, E. Diketopiperazine formation in solid phase peptide synthesis using p-alkoxybenzyl ester resins and fmoc-amino acids. *Tetrahedron Letters* (1986); **27**: 743-746.
- Perutz, M. Polar zippers: their role in human disease. *Protein Science* (1994); **3**: 1629-1637.
- Perutz, M.F. Polar zippers: their role in human disease. *Pharmaceutical Acta Helvetica* (1995); **69**: 213-224.
- Perutz, M.F., Finch, J.T., Berriman, J. et Lesk, A. Amyloid fibers are water-filled nanotubes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2002); **99**: 5591-5595.
- Perutz, M.F., Johnson, T., Suzuki, M. et Finch, J.T. Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1994); **91**: 5355-5358.
- Pfister, E.L., Kennington, L., Straubhaar, J., Wagh, S., Liu, W., DiFiglia, M., Landwehrmeyer, B., Vonsattel, J.P., Zamore, P.D. et Aronin, N. Five siRNAs targeting three SNPs may provide therapy for three-quarters of Huntington's disease patients. *Current Biology* (2009); **19**: 774-778.
- Pietrobon, D. Calcium channels and channelopathies of the central nervous system. *Molecular Neurobiology* (2002); **25**: 31-50.
- Poirier, M.A., Li, H., Macosko, J., Cai, S., Amzel, M. et Ross, C.A. Huntingtin spheroids and protofibrils as precursors in polyglutamine fibrilization. *The Journal of Biological Chemistry* (2002); **277**: 41032-41037.
- Popiel, H.A., Nagai, Y., Onodera, O., Inui, T., Fujikake, N., Urade, Y., Strittmatter, W.J., Burke, J.R., Ichikawa, A. et Toda, T. Disruption of the toxic conformation of the expanded polyglutamine stretch leads to suppression of aggregate formation and cytotoxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2004); **317**: 1200-1206.
- Press, W.H. *Numerical Recipes : The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press. New York. (2007): xxi, 1235.

- Provencher, S.W. Inverse problems in polymer characterization - Direct analysis of polydispersity with photon correlation spectroscopy. *Makromolekulare Chemie - Macromolecular Chemistry and Physics* (1979); **180**: 201-209.
- Provencher, S.W. A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral-equations. *Computer Physics Communications* (1982); **27**: 213-227.
- Provencher, S.W. Contin - a general-purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral-equations. *Computer Physics Communications* (1982); **27**: 229-242.
- Provencher, S.W. et Glockner, J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* (1981); **20**: 33-37.
- Pulst, S.M., Nechiporuk, A., Nechiporuk, T., Gispert, S., Chen, X.N., Lopes-Cendes, I., Pearlman, S., Starkman, S., Orozco-Diaz, G., Lunkes, A., DeJong, P., Rouleau, G.A., Auburger, G., Korenberg, J.R., Figueroa, C. et Sahba, S. Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nature Genetics* (1996); **14**: 269-276.
- Quibell, M., Packman, L.C. et Johnson, T. Synthesis of the 3-repeat region of human Tau-2 by the solid-phase assembly of backbone amide-protected segments. *Journal of the American Chemical Society* (1995); **117**: 11656-11668.
- Reichardt, C. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. Wiley-VCH. Weinheim. (2003): xxiv, 629 p.
- Ren, H., Nagai, Y., Tucker, T., Strittmatter, W.J. et Burke, J.R. Amino acid sequence requirements of peptides that inhibit polyglutamine-protein aggregation and cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2001); **288**: 703-710.
- Ribai, P., Nguyen, K., Hahn-Barma, V., Gourfinkel, I., Vidailhet, M., Legout, A., Dode, C., Brice, A. et Durr, A. Psychiatric and cognitive difficulties as indicators of juvenile Huntington disease onset in 29 patients. *Archives of Neurology* (2007); **64**: 813-819.
- Rice, S.A., Bamford, C.H., Tipper, C.F.H. et Compton, R.G. *Diffusion-Limited Reactions*. Elsevier. Amsterdam ; New York. (1985): 404.
- Roterman, I., KrUl, M., Nowak, M., Konieczny, L., Rybarska, J., Stopa, B., Piekarska, B. et Zemanek, G. Why Congo red binding is specific for amyloid proteins - model

- studies and a computer analysis approach. *Medical Science Monitor* (2001); **7**: 771-784.
- Rudin, A. *The Elements of Polymer Science and Engineering : An Introductory Text and Reference for Engineers and Chemists*. Academic Press. San Diego. (1999): xvii, 509.
- Rusmini, P., Bolzoni, E., Crippa, V., Onesto, E., Sau, D., Galbiati, M., Piccolella, M. et Poletti, A. Proteasomal and autophagic degradative activities in spinal and bulbar muscular atrophy. *Neurobiology of Disease* (2010); **40**: 361-369.
- Russo, C., Violani, E., Salis, S., Venezia, V., Dolcini, V., Damonte, G., Benatti, U., D'Arrigo, C., Patrone, E., Carlo, P. et Schettini, G. Pyroglutamate-modified amyloid beta-peptides - A beta N3(pE)-strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. *Journal of Neurochemistry* (2002); **82**: 1480-1489.
- Saegusa, H., Wakamori, M., Matsuda, Y., Wang, J., Mori, Y., Zong, S. et Tanabe, T. Properties of human Cav2.1 channel with a spinocerebellar ataxia type 6 mutation expressed in Purkinje cells. *Molecular and Cellular Neurosciences* (2007); **34**: 261-270.
- Saido, T.C. Involvement of polyglutamine endolysis followed by pyroglutamate formation in the pathogenesis of triplet repeat/polyglutamine-expansion diseases. *Medical Hypotheses* (2000); **54**: 427-429.
- Saitô, H., Ando, I. et Naito, A. *Solid State NMR Spectroscopy for Biopolymers : Principles and Applications*. Springer. Dordrecht. (2006): xiii, 464 p.
- Sanchez, I., Mahlke, C. et Yuan, J. Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders. *Nature* (2003); **421**: 373-379.
- Sato, M., Morikawa, H., Yoshimoto, M., Nakahira, T. et Iwabuchi, S. Secondary structure and side-chain orientation of poly(L-glutamines) having naphthalene chromophores. *Nippon Kagaku Kaishi* (1992): 1368-1373.
- Scanlon, S., Aggeli, A., Boden, N., Koopmans, R.J., Brydson, R. et Rayner, C.M. Peptide aerogels comprising self-assembling nanofibrils. *Micro & Nano Letters* (2007); **2**: 24-29.
- Scharf, T. *Polarized Light in Liquid Crystals and Polymers*. Wiley-Interscience. Hoboken, N.J. (2007): 400 p.
- Schärftl, W. *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*. Springer. Berlin. (2007): 191.

- Schein, C.H. Solubility as a function of protein structure and solvent components. *Bio/Technology* (1990); **8**: 308-317.
- Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., Bates, G.P., Davies, S.W., Lehrach, H. et Wanker, E.E. Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* (1997); **90**: 549-558.
- Schlenzig, D., Manhart, S., Cinar, Y., Kleinschmidt, M., Hause, G., Willbold, D., Funke, S.A., Schilling, S. et Demuth, H.U. Pyroglutamate formation influences solubility and amyloidogenicity of amyloid peptides. *Biochemistry* (2009); **48**: 7072-7078.
- Schmidt, B.J., Greenberg, C.R., Allingham-Hawkins, D.J. et Spriggs, E.L. Expression of X-linked bulbospinal muscular atrophy (Kennedy disease) in two homozygous women. *Neurology* (2002); **59**: 770-772.
- Schuck, P. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling. *Biophysical Journal* (2000); **78**: 1606-1619.
- Sewald, N. et Jakubke, H.-D. *Peptides : Chemistry and Biology*. Wiley-VCH. Weinheim. (2002): 562 p.
- Shaka, A.J., Keeler, J., Frenkiel, T. et Freeman, R. An improved sequence for broad-band decoupling - Waltz-16. *Journal of Magnetic Resonance* (1983); **52**: 335-338.
- Sharma, D., Sharma, S., Pasha, S. et Brahmachari, S.K. Peptide models for inherited neurodegenerative disorders: conformation and aggregation properties of long polyglutamine peptides with and without interruptions. *FEBS Letters* (1999); **456**: 181-185.
- Sharma, D., Shinchuk, L.M., Inouye, H., Wetzel, R. et Kirschner, D.A. Polyglutamine homopolymers having 8-45 residues form slablike beta-crystallite assemblies. *Proteins* (2005); **61**: 398-411.
- Shchukin, E.D. *Colloid and Surface Chemistry*. Elsevier. Amsterdam ; New York. (2001): 747 p.
- Shoji, A., Kimura, H., Ozaki, T., Sugisawa, H. et Deguchi, K. Conformational study of solid polypeptides by H-1 combined rotation and multiple pulse spectroscopy NMR. *Journal of the American Chemical Society* (1996); **118**: 7604-7607.
- Shumpei, S. Synthesis of large peptides in solution. *Biopolymers* (1995); **37**: 17-28.

- Sikorski, P. et Atkins, E. New model for crystalline polyglutamine assemblies and their connection with amyloid fibrils. *Biomacromolecules* (2005); **6**: 425-432.
- Singh, V.R. et Lapidus, L.J. The intrinsic stiffness of polyglutamine peptides. *The Journal of Physical Chemistry B* (2008); **112**: 13172-13176.
- Skowronek, M., Roterman, Konieczny, L., Stopa, B., Rybarska, J., Piekarska, B., Gorecki, A. et Krol, M. The conformational characteristics of Congo red, Evans blue and Trypan blue. *Computers & Chemistry* (2000); **24**: 429-450.
- Slepko, N., Bhattacharyya, A.M., Jackson, G.R., Steffan, J.S., Marsh, J.L., Thompson, L.M. et Wetzel, R. Normal-repeat-length polyglutamine peptides accelerate aggregation nucleation and cytotoxicity of expanded polyglutamine proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2006); **103**: 14367-14372.
- Smith, D.L., Portier, R., Woodman, B., Hockly, E., Mahal, A., Klunk, W.E., Li, X.J., Wanker, E., Murray, K.D. et Bates, G.P. Inhibition of polyglutamine aggregation in R6/2 HD brain slices-complex dose-response profiles. *Neurobiology of Disease* (2001); **8**: 1017-1026.
- Snell, R.G., Macmillan, J.C., Cheadle, J.P., Fenton, I., Lazarou, L.P., Davies, P., Macdonald, M.E., Gusella, J.F., Harper, P.S. et Shaw, D.J. Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nature Genetics* (1993); **4**: 393-397.
- Spera, S. et Bax, A. Empirical correlation between protein backbone conformation and C-alpha and C-beta C-13 nuclear-magnetic-resonance chemical-shifts. *Journal of the American Chemical Society* (1991); **113**: 5490-5492.
- Sreerama, N., Venyaminov, S.Y. et Woody, R.W. Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Science* (1999); **8**: 370-380.
- Sreerama, N. et Woody, R.W. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Methods in Enzymology* (2004); **383**: 318-351.
- Stanley-Wood, N., Lines, R.W. et Royal Society of Chemistry (Great Britain). Particle Characterisation Group. *Particle Size Analysis*. Royal Society of Chemistry. Cambridge. (1992): xix, 538.

- Stopa, B., Piekarska, B., Konieczny, L., Rybarska, J., Spolnik, P., Zemanek, G., Roterman, I. et Krol, M. The structure and protein binding of amyloid-specific dye reagents. *Acta Biochimica Polonica* (2003); **50**: 1213-1227.
- Stork, M., Giese, A., Kretzschmar, H.A. et Tavan, P. Molecular dynamics simulations indicate a possible role of parallel beta-helices in seeded aggregation of poly-Gln. *Biophysical Journal* (2005); **88**: 2442-2451.
- Storrs, R.W., Truckses, D. et Wemmer, D.E. Helix Propagation in Trifluoroethanol Solutions. *Biopolymers* (1992); **32**: 1695-1702.
- Stott, K., Blackburn, J.M., Butler, P.J. et Perutz, M. Incorporation of glutamine repeats makes protein oligomerize: implications for neurodegenerative diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1995); **92**: 6509-6513.
- Sun, Y., Savanenin, A., Reddy, P.H. et Liu, Y.F. Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density. *The Journal of Biological Chemistry* (2001); **276**: 24713-24718.
- Susi, H. et Byler, D.M. Fourier deconvolution of the amide-I Raman band of proteins as related to conformation. *Applied Spectroscopy* (1988); **42**: 819-826.
- Suzuki, Y., Nakayama, K., Hashimoto, N. et Yazawa, I. Proteolytic processing regulates pathological accumulation in dentatorubral-pallidoluysian atrophy. *The FEBS Journal* (2010); **277**: 4873-4887.
- Takahashi, Y., Okamoto, Y., Popiel, H.A., Fujikake, N., Toda, T., Kinjo, M. et Nagai, Y. Detection of polyglutamine protein oligomers in cells by fluorescence correlation spectroscopy. *The Journal of Biological Chemistry* (2007); **282**: 24039-24048.
- Tanaka, M., Machida, Y., Nishikawa, Y., Akagi, T., Hashikawa, T., Fujisawa, T. et Nukina, N. Expansion of polyglutamine induces the formation of quasi-aggregate in the early stage of protein fibrillization. *The Journal of Biological Chemistry* (2003); **278**: 34717-34724.
- Tanaka, M., Machida, Y., Niu, S., Ikeda, T., Jana, N.R., Doi, H., Kurosawa, M., Nekooki, M. et Nukina, N. Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nature Medicine* (2004); **10**: 148-154.
- Tanaka, M., Machida, Y. et Nukina, N. A novel therapeutic strategy for polyglutamine diseases by stabilizing aggregation-prone proteins with small molecules. *Journal of Molecular Medicine* (2005); **83**: 343-352.

- Tanaka, M., Morishima, I., Akagi, T., Hashikawa, T. et Nukina, N. Intra- and Intermolecular beta -pleated sheet formation in glutamine-repeat inserted myoglobin as a model for polyglutamine diseases. *The Journal of Biological Chemistry* (2001); **276**: 45470-45475.
- Tang, Y., Liu, S.Y., Armes, S.P. et Billingham, N.C. Solubilization and controlled release of a hydrophobic drug using novel micelle-forming ABC triblock copolymers. *Biomacromolecules* (2003); **4**: 1636-1645.
- Teraoka, I. *Polymer Solutions : An Introduction to Physical Properties*. Wiley. New York. (2002): xv, 338.
- Thakur, A.K. et Wetzel, R. Mutational analysis of the structural organization of polyglutamine aggregates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2002); **99**: 17014-17019.
- Tomita, K., Popiel, H.A., Nagai, Y., Toda, T., Yoshimitsu, Y., Ohno, H., Oishi, S. et Fujii, N. Structure-activity relationship study on polyglutamine binding peptide QBP1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2009); **17**: 1259-1263.
- Tuchsen, E. et Woodward, C. Hydrogen exchange of primary amide protons in basic pancreatic trypsin inhibitor: evidence for NH₂ group rotation in buried asparagine side chains. *Biochemistry* (1987); **26**: 8073-8078.
- Udd, B., Juvonen, V., Hakamies, L., Nieminen, A., Wallgren-Pettersson, C., Cederquist, K. et Savontaus, M.L. High prevalence of Kennedy's disease in western Finland -- is the syndrome underdiagnosed? *Acta Neurologica Scandinavica* (1998); **98**: 128-133.
- van Rossum, B.J., Forster, H. et de Groot, H.J.M. High-field and high-speed CP-MAS C-13 NMR heteronuclear dipolar-correlation spectroscopy of solids with frequency-switched Lee-Goldburg homonuclear decoupling. *Journal of Magnetic Resonance* (1997); **124**: 516-519.
- van Stokkum, I.H., Spoelder, H.J., Bloemendal, M., van Grondelle, R. et Groen, F.C. Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. *Analytical Biochemistry* (1990); **191**: 110-118.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W. et al. The sequence of the human genome. *Science* (2001); **291**: 1304-1351.
- Ventruiti, A. et Cuervo, A.M. Autophagy and neurodegeneration. *Current Neurology and Neuroscience Reports* (2007); **7**: 443-451.

- Vermerris, W. et Nicholson, R.L. *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer. Dordrecht. (2006): xii, 276 p.
- Veronese, F.M. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials* (2001); **22**: 405-417.
- Viau, M. et Boulanger, Y. Characterization of ataxias with magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Parkinsonism & Related Disorders* (2004); **10**: 335-351.
- Viau, M., Marchand, L., Bard, C. et Boulanger, Y. ¹H magnetic resonance spectroscopy of autosomal ataxias. *Brain Research* (2005); **1049**: 191-202.
- Vieira, E.P., Hermel, H. et Mohwald, H. Change and stabilization of the amyloid-beta(1-40) secondary structure by fluorocompounds. *Biochimica et Biophysica Acta* (2003); **1645**: 6-14.
- Vig, P.J., Wei, J., Shao, Q., Hebert, M.D., Subramony, S.H. et Sutton, L.T. Role of tissue transglutaminase type 2 in calbindin-D28k interaction with ataxin-1. *Neuroscience Letters* (2007); **420**: 53-57.
- Waelter, S., Boeddrich, A., Lurz, R., Scherzinger, E., Lueder, G., Lehrach, H. et Wanker, E.E. Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Molecular Biology of the Cell* (2001); **12**: 1393-1407.
- Wagner, R. et Berger, S. Gradient-selected NOESY - A fourfold reduction of the measurement time for the NOESY experiment. *Journal of Magnetic Resonance. Series A* (1996); **123**: 119-121.
- Walker, F.O. Huntington's disease. *Seminars in Neurology* (2007); **27**: 143-150.
- Walters, R.H. et Murphy, R.M. Examining polyglutamine peptide length: a connection between collapsed conformations and increased aggregation. *Journal of Molecular Biology* (2009); **393**: 978-992.
- Wang, S.S., Gisin, B.F., Winter, D.P., Makofske, R., Kulesha, I.D., Tzougraki, C. et Meienhofer, J. Facile synthesis of amino acid and peptide esters under mild conditions via cesium salts. *The Journal of Organic Chemistry* (1977); **42**: 1286-1290.
- Waragai, M., Lammers, C.H., Takeuchi, S., Imafuku, I., Udagawa, Y., Kanazawa, I., Kawabata, M., Mouradian, M.M. et Okazawa, H. PQBP-1, a novel polyglutamine tract-binding protein, inhibits transcription activation by Brn-2 and affects cell survival. *Human Molecular Genetics* (1999); **8**: 977-987.

- Webber, M.J., Kessler, J.A. et Stupp, S.I. Emerging peptide nanomedicine to regenerate tissues and organs. *Journal of Internal Medicine* (2010); **267**: 71-88.
- Weiss, R.G. et Terech, P. *Molecular Gels : Materials with Self-Assembled Fibrillar Networks*. Springer. Dordrecht. (2006): xv, 978 p.
- Williamson, M.P. Secondary-structure dependent chemical-shifts in proteins. *Biopolymers* (1990); **29**: 1428-1431.
- Wishart, D.S., Bigam, C.G., Holm, A., Hodges, R.S. et Sykes, B.D. ^1H , ^{13}C and ^{15}N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *Journal of Biomolecular NMR* (1995); **5**: 67-81.
- Wishart, D.S. et Case, D.A. Use of chemical shifts in macromolecular structure determination. *Nuclear Magnetic Resonance of Biological Macromolecules. Part. A* (2001); **338**: 3-34.
- Wishart, D.S. et Sykes, B.D. Chemical shifts as a tool for structure determination. *Methods in Enzymology*. Academic Press. (1994); **239**: 363-392.
- Wishart, D.S., Sykes, B.D. et Richards, F.M. Simple techniques for the quantification of protein secondary structure by ^1H NMR spectroscopy. *FEBS Letters* (1991); **293**: 72-80.
- Wishart, D.S., Sykes, B.D. et Richards, F.M. The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry* (1992); **31**: 1647-1651.
- Wolberg, J.R. *Data Analysis Using the Method of Least Squares : Extracting the Most Information from Experiments*. Springer. Berlin ; New York. (2006): xiii, 250 p.
- Wood, N.I., Pallier, P.N., Wanderer, J. et Morton, A.J. Systemic administration of Congo red does not improve motor or cognitive function in R6/2 mice. *Neurobiology of Disease* (2007); **25**: 342-353.
- Wray, V., Kakoschke, C., Nokihara, K. et Naruse, S. Solution structure of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* (1993); **32**: 5832-5841.
- Wypych, G. *Handbook of Solvents*. ChemTec. Toronto ; New York ;. (2001): xxix, 1675 p.
- Xu, R. *Particle Characterization : Light Scattering Methods*. Kluwer Academic. New York. (2002): xv, 397.

- Yamagishi, N., Tokunaga, S., Ishihara, K., Saito, Y. et Hatayama, T. The phenyllic hydroxyl group is essential for the induction of stress response by sodium salicylate. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2006); **350**: 131-137.
- Yanai, A., Huang, K., Kang, R., Singaraja, R.R., Arstikaitis, P., Gan, L., Orban, P.C., Mullard, A., Cowan, C.M., Raymond, L.A., Drisdell, R.C., Green, W.N., Ravikumar, B., Rubinsztein, D.C., El-Husseini, A. et Hayden, M.R. Palmitoylation of huntingtin by HIP14 is essential for its trafficking and function. *Nature Neuroscience* (2006); **9**: 824-831.
- Yang, Z., Chang, Y.J., Yu, I.C., Yeh, S., Wu, C.C., Miyamoto, H., Merry, D.E., Sobue, G., Chen, L.M., Chang, S.S. et Chang, C. ASC-J9 ameliorates spinal and bulbar muscular atrophy phenotype via degradation of androgen receptor. *Nature Medicine* (2007); **13**: 348-353.
- Yoo, S.Y., Pennesi, M.E., Weeber, E.J., Xu, B., Atkinson, R., Chen, S., Armstrong, D.L., Wu, S.M., Sweatt, J.D. et Zoghbi, H.Y. SCA7 knockin mice model human SCA7 and reveal gradual accumulation of mutant ataxin-7 in neurons and abnormalities in short-term plasticity. *Neuron* (2003); **37**: 383-401.
- Yoshida, H., Yoshizawa, T., Shibasaki, F., Shoji, S. et Kanazawa, I. Chemical chaperones reduce aggregate formation and cell death caused by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Neurobiology of Disease* (2002); **10**: 88-99.
- Zagorski, M.G., Yang, J., Shao, H., Ma, K., Zeng, H., Hong, A. et Wetzel, R. Methodological and chemical factors affecting amyloid [beta] peptide amyloidogenicity. *Methods in Enzymology*. Academic Press. (1999); **309**: 189-204.
- Zeron, M.M., Fernandes, H.B., Krebs, C., Shehadeh, J., Wellington, C.L., Leavitt, B.R., Baimbridge, K.G., Hayden, M.R. et Raymond, L.A. Potentiation of NMDA receptor-mediated excitotoxicity linked with intrinsic apoptotic pathway in YAC transgenic mouse model of Huntington's disease. *Molecular and Cellular Neurosciences* (2004); **25**: 469-479.
- Zhang, X., Smith, D.L., Meriin, A.B., Engemann, S., Russel, D.E., Roark, M., Washington, S.L., Maxwell, M.M., Marsh, J.L., Thompson, L.M., Wanker, E.E., Young, A.B., Housman, D.E., Bates, G.P., Sherman, M.Y. et Kazantsev, A.G. A potent small molecule inhibits polyglutamine aggregation in Huntington's disease neurons and suppresses neurodegeneration in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2005); **102**: 892-897.

- Zhuchenko, O., Bailey, J., Bonnen, P., Ashizawa, T., Stockton, D.W., Amos, C., Dobyns, W.B., Subramony, S.H., Zoghbi, H.Y. et Lee, C.C. Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nature Genetics* (1997); **15**: 62-69.
- Zuccato, C., Valenza, M. et Cattaneo, E. Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease. *Physiological Reviews* (2010); **90**: 905-981.

Annexe I – Caractérisation supplémentaire des dérivés de morpholine

Le FmocGlu(AEM)OH (**18a**) a été caractérisé par HPLC analytique en phase inverse (C₁₈) (TR = 15,3 min, gradient de 0-30% ACN/0,06%TFA/eau (v/v/v) sur 30 min) et par SM MALDI/TOF. [MH⁺] calculé pour C₂₆H₃₁N₃O₆: 482,54, trouvé (SM MALDI/TOF, matrice acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB), calibration avec Mix1): 482,55.

Le Fmoc[Glu(AEM)]₂OH (**18b**) a été caractérisé par HPLC analytique en phase inverse (C₁₈) (TR = 14,4 min, gradient de 0-30% ACN/0,06%TFA/eau (v/v/v) sur 30 min). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) (multiplicité, intégration, constante de couplage (Hz)): 9,93 (s, 1H), 8,27 (d, 1H, J = 7,8), 8,14 (t, 1H, J = 5,8), 8,10 (t, 1H, J = 5,8), 7,90 (d, 2H, J = 7,6), 7,73 (dd, 2H, J = 7,3, 2), 7,58 (d, 1H, J = 8,2), 7,42 (t, 2H, J = 7,4), 7,33 (t, 2H, J = 7,5), 4,25 (m, 5H), 4,05 (m, 2H), 3,95 (m, 4H), 3,65 (m, 4H), 3,41 (m, 7H), 3,17 (m, 7H), 2,20 (m, 4H), 1,98 (m, 2H), 1,78 (m, 2H); RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 173,3, 172,5, 172,2, 171,9, 156,1, 143,9, 143,9, 140,8, 127,8, 127,2, 125,4, 120,3, 65,9, 63,4, 63,4, 55,4, 55,3, 54,1, 51,5, 51,4, 51,4, 51,3, 46,7, 33,3, 33,3, 31,9, 31,6, 27,9, 26,9, 26,9; M (C₃₇H₅₀N₆O₉) = 722,83, MH⁺ (SM MALDI/TOF) = 725,89.

Annexe II – Calcul de la surface et de l'ellipse de solubilité de Hansen

CALCULATED SOLUBILITY BODIES FOR POLYGLN

Solvent points: 49

Convex hull

Center of mass= 16.6(D) 8.4(P) 10.9(H) Volume=191.0 Vertices= 9

Vertices:

Solvent	Coordinates (D P H)		
HFIP	17.2	4.5	14.7
TFE	15.9	9.7	17.8
Benzonitrile	17.4	9.0	3.3
Anisole	17.8	4.1	6.8
Acide acétique	14.5	8.0	13.5
Phénol	18.0	5.9	14.9
Aniline	19.4	5.1	10.2
Nitrobenzène	20.1	8.6	4.1
Acide formique	11.3	14.9	16.6

Hansen sphere

D=18.6 P=13.8 H=10.8 RAD=9.01 Outliers=16 Hfit=0.064

True Volume=1532.8 True Radius=7.15

Axis-aligned ellipsoid

D=16.5 P= 7.4 H= 9.1 a=6.22 b=2.67 c=7.34 Outliers=11 Hfit=0.128

Volume= 511.2 Equivalent Radius=4.96

Rotated ellipsoid

D=15.6 P= 9.9 H=11.6 a=2.20 b=5.68 c=8.11
Xr=+0.414 Yr=+0.181 Zr=-0.630 Outliers= 8 Hfit=0.232

Volume= 423.9 Equivalent Radius=4.66

Ellipsoid: convex hull center and volume

D=16.6 P= 8.4 H=10.9 a=3.44 b=3.86 c=3.43
Xr=-0.003 Yr=-0.003 Zr=-0.003 Outliers= 8 Hfit=0.015

Volume= 191.0 Equivalent Radius=3.57

Minimum enclosing ellipsoid

D=15.6 P=10.0 H=11.4 a=5.49 b=6.67 c=8.75
Xr=+0.415 Yr=+0.383 Zr=-0.329 Outliers=18 Hfit=0.073

Volume=1341.3 Equivalent Radius=6.84

SOLVANTS ET PARAMÈTRES

NO	SOLVANT	D	P	H	Reduced Distances (RED)					
					SOL*	HN	EL	RE	CH	ME
1	hexane	14.9	0.0	0.0	0(00000)	2.106	3.059	4.126	3.884	2.117
2	DCM	15.3	6.1	3.9	0(01000)	1.355	0.892	1.971	2.159	1.141
3	CHCl ₃	17.8	3.1	5.7	0(00000)	1.326	1.700	1.885	2.076	1.188
4	méthanol	15.1	12.3	22.3	0(00000)	1.501	2.567	1.890	3.500	1.428
5	éthanol	15.8	8.8	19.4	0(00000)	1.266	1.492	1.174	2.493	1.087
6	i-propanol	15.8	6.1	16.4	0(00001)	1.224	1.112	1.102	1.731	0.913
7	t-butanol	15.1	5.7	16.0	0(00001)	1.318	1.158	1.305	1.706	0.908
8	HFIP	17.2	4.5	14.7	1(11111)	1.162	1.337	1.245	1.515	1.001
9	diéthyléther	14.5	2.9	5.1	0(00000)	1.635	1.812	2.924	2.296	1.395
10	tétrahydrofuran	16.8	5.7	8.0	0(01001)	1.028	0.668	1.193	1.101	0.733
11	dioxane	19.0	1.8	7.4	0(00000)	1.388	2.159	1.866	2.111	1.292
12	acétate d'éthyle	15.8	5.3	7.2	0(01001)	1.193	0.848	1.650	1.367	0.868
13	acétonitrile	15.3	18.0	6.1	0(00000)	1.003	3.985	2.232	2.871	1.418
14	NMF	15.0	13.8	15.1	0(10001)	0.924	2.532	1.275	1.912	0.703
15	DMF	17.4	13.7	11.3	0(10001)	0.264	2.371	1.686	1.390	0.671
16	DMA	16.8	11.5	10.2	0(10111)	0.471	1.532	0.801	0.823	0.334
17	NMP	18.0	12.3	7.2	0(10001)	0.448	1.859	1.341	1.526	0.708
18	HMPA	18.4	8.6	11.3	0(11111)	0.583	0.609	0.793	0.535	0.488
19	benzène	18.4	0.0	2.0	0(00000)	1.816	2.963	2.941	3.427	1.802
20	pyridine	19.0	8.8	5.9	0(11101)	0.782	0.787	0.953	1.615	0.756
21	fluorobenzène	18.7	6.1	2.0	0(00000)	1.297	1.148	1.473	2.729	1.248
22	diméthylsulfoxyde	18.4	16.4	10.2	0(10000)	0.296	3.376	2.731	2.139	1.132
23	Acétone	15.5	10.4	7.0	0(10101)	0.883	1.162	0.688	1.286	0.585
24	tétraméthylurée	16.8	8.2	11.0	0(11111)	0.736	0.387	0.343	0.086	0.309
25	eau	15.5	16.0	42.4	0(00000)	3.583	5.553	5.611	9.396	4.117
26	CS ₂	20.5	0.0	0.6	0(00000)	1.952	3.083	2.640	3.876	1.904
27	morpholine	18.8	4.9	9.2	0(00001)	1.006	1.016	1.026	1.216	0.851
28	TFE	15.9	9.7	17.8	1(11110)	1.079	1.457	1.008	2.051	0.863
29	m-crésol	18.0	5.1	12.9	-1(00000)	1.003	1.039	1.000	1.117	0.856
30	benzotrile	17.4	9.0	3.3	-1(00000)	1.019	1.000	1.102	2.230	1.001
31	anisole	17.8	4.1	6.8	1(11111)	1.177	1.303	1.515	1.672	1.001
32	acide acétique	14.5	8.0	13.5	1(10000)	1.149	0.708	0.817	0.983	0.446
33	phénol	18.0	5.9	14.9	-1(00000)	0.999	1.000	1.000	1.399	0.916
34	aniline	19.4	5.1	10.2	-1(00000)	0.987	0.999	1.000	1.199	0.877
35	nitrobenzène	20.1	8.6	4.1	-1(00000)	1.000	0.999	1.275	2.225	1.001
36	acide formique	11.3	14.9	16.6	-1(00000)	1.740	3.092	1.152	2.820	1.001
37	TFA	15.6	9.9	11.6	-1(00000)	0.792	0.995	0.013	0.524	0.036
38	éthylène glycol	16.8	11.0	25.9	0(00000)	1.752	2.645	2.642	4.425	1.980
39	glycérol	17.3	12.0	29.2	0(00000)	2.074	3.226	3.434	5.420	2.454
40	cyclohexanne	16.8	0.0	0.2	0(00000)	1.969	3.037	3.547	3.804	1.994
41	toluène	18.0	1.4	2.0	0(00000)	1.691	2.470	2.664	3.192	1.653
42	xylène	17.6	1.0	3.1	0(00000)	1.671	2.550	2.758	2.989	1.621
43	urée	20.9	18.7	26.4	0(00000)	1.890	4.882	5.708	5.390	2.766
44	triéthylamine	17.8	0.4	1.0	0(00000)	1.849	2.864	3.086	3.570	1.848
45	thiouree	20.0	21.7	14.8	0(00000)	1.033	5.429	5.102	3.752	2.098
46	sulfolane	20.3	18.2	10.9	0(10000)	0.622	4.086	3.922	2.749	1.562
47	acide salicilique	19.4	7.1	11.7	0(11011)	0.775	0.594	1.001	0.910	0.738
48	hydrazine	14.2	8.3	8.9	0(01011)	1.163	0.495	1.173	0.911	0.540
49	pyrimidine	20.5	9.4	11.3	0(10001)	0.655	1.021	1.714	1.163	0.819

* Outliers

0 = not an outlier

1 = outlier

Position indicates fit type

1 = Hansen

2 = Axis-aligned ellipsoid

3 = Rotated ellipsoid

4 = Ellipsoid with same volume and center as convex hull

5 = Minimum enclosing ellipsoid around soluble points

Annexe III – Paramétrisation du programme

CONTIN utilisé en diffusion de la lumière

```

// Paramètres
TEST DATA SET      1                               // No. de l'analyse en cours
LAST                1                               // Dernière analyse à effectuer
GMNMX      1      5.00E-09                          // RH minimal (m)
GMNMX      2      5.00E-04                          // RH maximal (m)
NG                                // Nombre de points dans la grille GMNMX
IWT          5                               // Analyse sans et avec pondération
NERFIT       10                               // Nb. de résidus calculés
NINTT        24                               // Nb. d'entrées NSTEND
NLINF         0                               // Pas de correction pour la poussière
NORDER       0 (ou 2)                         // Ordre du régulateur (TR)
DOUSNQ        1                               // Contrainte de non-négativité
IUSER         10      3                       // Emploi de la relation Stokes-Einstein
RUSER         15      1.33                    // Index de refraction (nD20)
RUSER         16      632                    // Longueur d'onde (nm)
RUSER         17      173                    // Angle du détecteur (degrés)
RUSER         18      298                    // Température (°K)
RUSER         19      0.8872                 // Viscosité (cP)
RUSER         10      0                      // Pas de correction pour le fond
END                                                    // Fin de la paramétrisation

// Temps de corrélation sur une échelle logarithmique (τ ou abscisse du corrélogramme à la Figure I-13B)
NSTEND      8      5.00E-07      4.00E-06      // 8 points équidistants entre ces bornes
NSTEND      8      4.50E-06      1.20E-05      // 8 points équidistants entre ces bornes
NSTEND      8      1.30E-05      2.70E-05      // 8 points équidistants entre ces bornes
NSTEND      8      2.90E-05      5.70E-05      // 8 points équidistants entre ces bornes
NSTEND      8      6.10E-05      1.20E-04      // 8 points équidistants entre ces bornes
NSTEND      8      1.30E-04      2.40E-04      // 8 points équidistants entre ces bornes
NSTEND      8      2.50E-04      4.80E-04      // 8 points équidistants entre ces bornes
NSTEND      8      5.10E-04      9.60E-04      // 8 points équidistants entre ces bornes
NSTEND      8      1.00E-03      1.90E-03      // 8 points équidistants entre ces bornes
NSTEND      8      2.00E-03      3.80E-03      // 8 points équidistants entre ces bornes
NSTEND      8      4.10E-03      7.70E-03      // 8 points équidistants entre ces bornes
NSTEND      8      8.20E-03      1.50E-02      // 8 points équidistants entre ces bornes
NSTEND      8      1.60E-02      3.10E-02      // 8 points équidistants entre ces bornes
NSTEND      8      3.30E-02      6.10E-02      // 8 points équidistants entre ces bornes

```

NSTEND	8	6.60E-02	1.20E-01		// 8 points équidistants entre ces bornes
NSTEND	8	1.30E-01	2.50E-01		// 8 points équidistants entre ces bornes
NSTEND	8	2.60E-01	4.90E-01		// 8 points équidistants entre ces bornes
NSTEND	8	5.20E-01	9.80E-01		// 8 points équidistants entre ces bornes
NSTEND	8	1.1	2		// 8 points équidistants entre ces bornes
NSTEND	8	2.1	3.9		// 8 points équidistants entre ces bornes
NSTEND	8	4.2	7.9		// 8 points équidistants entre ces bornes
NSTEND	8	8.4	1.60E+01		// 8 points équidistants entre ces bornes
NSTEND	8	1.70E+01	3.20E+01		// 8 points équidistants entre ces bornes
NSTEND	8	3.40E+01	6.30E+01		// 8 points équidistants entre ces bornes

// Intensité moyenne de diffusion ($G_2(\tau)$) ou ordonnée du corrélogramme à la Figure I-13B)

0.831	0.831	0.825	0.819	0.817	0.812
0.81	0.803	0.8	0.79	0.785	0.775
0.766	0.76	0.75	0.742	0.735	0.72
0.705	0.69	0.676	0.662	0.647	0.635
0.621	0.595	0.57	0.547	0.525	0.502
0.481	0.461	0.443	0.407	0.375	0.345
0.317	0.292	0.269	0.248	0.228	0.193
0.164	0.139	0.119	0.101	0.086	0.0737
0.0635	0.0472	0.035	0.0263	0.0201	0.0152
0.0118	0.00967	0.0077	0.00511	0.00418	0.00432
0.00496	0.00518	0.00477	0.00423	0.00398	0.00414
0.00466	0.0039	0.00317	0.00262	0.00395	0.00403
0.0045	0.00359	0.00257	0.00167	0.00207	0.00219
0.00353	0.00379	0.00272	0.00344	0.00512	0.00366
0.00258	0.00211	0.00289	0.00323	0.00312	0.00279
0.00285	0.00338	0.00371	0.00362	0.00439	0.00299
0.00337	0.00277	0.00243	0.0034	0.00425	0.00369
0.00376	0.00343	0.00289	0.0029	0.00331	0.00334
0.00299	0.00272	0.00272	0.0028	0.00272	0.00357
0.00307	0.0032	0.00303	0.00286	0.00257	0.0031
0.00319	0.00262	0.00319	0.00262	0.00258	0.00293
0.0027	0.00294	0.00272	0.00239	0.00244	0.00236
0.00237	0.0022	0.00228	0.00219	0.00171	0.00158
0.00129	0.00133	0.00133	0.00078	0.00092	0.00052
0.00058	0.00054	0.00058	0.00044	0.0004	0.00049
0.00021	0.00016	0.00105	0.00127	0.00114	0.00106
0.00103	0.0015	0.00125	0.00064	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0

0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0