



Les amyloïdoses : détection à l'aide de nanoparticules et propriétés optiques originales

Jonathan Pansieri

► To cite this version:

Jonathan Pansieri. Les amyloïdoses : détection à l'aide de nanoparticules et propriétés optiques originales. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAY105 . tel-02955695

HAL Id: tel-02955695

<https://theses.hal.science/tel-02955695>

Submitted on 2 Oct 2020

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ
GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Physique pour les Sciences du Vivant**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Jonathan PANSIERI

Thèse dirigée par **Vincent FORGE**
Co-encadrée par **Christel MARQUETTE**

préparée au sein du **Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux**
dans l'**Ecole doctorale de Physique de Grenoble**

Les amyloïdoses : détection à l'aide de nanoparticules et propriétés optiques originales

Thèse soutenue publiquement le **19 Mai 2017**, devant le jury
composé de :

Mme Christelle HUREAU

Directrice de recherche CNRS, LCC Toulouse, Rapporteur

Mr Human REZAEI

Directeur de recherche INRA, INRA Jouy-en-Josas, Rapporteur

Mr Eric ALLEMANN

Professeur, Université de Genève, Examineur

Mr Joël CHOPINEAU

Professeur, Université de Nîmes, Examineur

Mme Lucie SANCEY

Chargé de recherche CNRS, IAB Grenoble, Examinatrice

Mme Marianne WEIDENHAUPT

Maître de conférences, Grenoble INP, Présidente

Mr Vincent FORGE

Chercheur CEA, CEA Grenoble, directeur de thèse

Mme Christel MARQUETTE

Chercheur CEA, CEA Grenoble, co-encadrante de thèse



Table des matières

AVANT-PROPOS	5
REMERCIEMENTS	8
ABREVIATIONS	10
INTRODUCTION GENERALE	13
I. LES AMYLOÏDOSES	15
I.1. <i>Définition</i>	15
I.2. <i>La maladie d'Alzheimer</i>	17
I.3. <i>Le diabète de type 2</i>	19
I.4. <i>Les polyneuropathies familiales associées à la transthyrétine</i>	21
II. LES FIBRES AMYLOÏDES	24
II.1. <i>Structure des fibres</i>	24
II.2. <i>Mécanismes de formation fibrillaire</i>	27
II.3. <i>Particularités fonctionnelles</i>	29
II.4. <i>Les oligomères de protéines amyloïdes</i>	30
II.5. <i>Structure des protéines d'intérêt</i>	31
II.5.1. Le peptide A β ₁₋₄₂	31
II.5.2. La protéine IAPP	33
II.5.3. La protéine TTR-V30M.....	34
III. STRATEGIES DIAGNOSTIQUES	36
III.1. <i>Les ligands des amyloïdoses</i>	37
III.1.1. Ciblage générique des amyloïdoses	37
III.1.2. Ciblage spécifique des amyloïdoses	42
III.2. <i>Les nanoparticules dans le domaine biomédicale</i>	43
III.2.1. Les nanoparticules AGuIX	45
III.3. <i>L'imagerie médicale</i>	46
III.3.1. L'IRM	46
III.3.2. La TEP.....	48
III.3.3. Autres imageries et multimodalité	49
PROJET DE RECHERCHE	51
CHAPITRE 1 : DETECTION GNERIQUE DES AMYLOÏDOSES	55
I. INTRODUCTION	57
II. RESULTATS	61
III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	91

CHAPITRE 2 : DETECTION SPECIFIQUE DES AMYLOÏDOSES.....	93
I. INTRODUCTION	95
II. RESULTATS	97
II.1. <i>Ciblage des dépôts $A\beta_{1-42}$ (Alzheimer).....</i>	<i>97</i>
II.2. <i>Ciblage des dépôts IAPP (diabète de type 2).....</i>	<i>124</i>
II.3. <i>Ciblage des dépôts TTR-V30M (PNF-TTR).....</i>	<i>124</i>
III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	126
CHAPITRE 3 : DETECTION IN VIVO DES AMYLOÏDOSES	129
I. INTRODUCTION	131
II. MATERIEL ET METHODES	133
II.1. <i>Tests de mémoires</i>	<i>133</i>
II.2. <i>L'ouverture de la BHE.....</i>	<i>133</i>
II.3. <i>L'imagerie IRM.....</i>	<i>134</i>
II.4. <i>Immunohistochimie et microscopie.....</i>	<i>134</i>
III. RESULTATS	135
IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	139
CHAPITRE 4 : PROPRIETES OPTIQUES DE FIBRES AMYLOÏDES .	141
I. INTRODUCTION	143
II. MATERIEL ET METHODES	145
II.1. <i>Formation des fibres amyloïdes.....</i>	<i>145</i>
II.2. <i>Mesures en temps résolu</i>	<i>146</i>
II.3. <i>Mesures des effets NIR et UV-vis in vitro</i>	<i>147</i>
II.4. <i>Microscopie sur les fibres alignées.....</i>	<i>147</i>
III. RESULTATS	148
III.1. <i>Mise en évidence des propriétés lumineuses</i>	<i>149</i>
III.2. <i>Résultats complémentaires.....</i>	<i>166</i>
III.2.1. <i>Effet dans l'UV-vis.....</i>	<i>166</i>
III.2.2. <i>Effet dans le NIR</i>	<i>168</i>
IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	171
CONCLUSION GENERALE.....	173
ANNEXES.....	177
BIBLIOGRAPHIE	207

Avant-propos

Ce travail a été effectué sous la direction du Dr. Vincent FORGE, co-encadré par le Dr Christel MARQUETTE dans l'équipe Amyloïde : des FOLDopathies au NanoDesign (AFFOND), du Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux (LCBM) de l'Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble (BIG), CEA/CNRS UMR 5249, Département de Recherche Fondamentale, Université Grenoble Alpes, Grenoble. Ce projet a été financé par la Fondation de la Recherche Médicale (FRM DBS2013112844<0).

Ce travail a donné lieu à la publication suivante :

Pansieri J, Plissonneau M, Heinrich-Balard L *et al.* Gd-nanoparticles functionalization with specific peptides for β -amyloid plaques targeting. *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1), 60. (2016)

Trois manuscrits sont en cours de soumission ou en voie de soumission, un dernier en cours d'écriture :

Pansieri J, Plissonneau M, Stransky-Heikron N *et al.* Multimodal imaging Gd-nanoparticles functionalized with Pittsburgh compound B or a nanobody for amyloid plaques targeting. Soumis à *Nanomedicine*.

Pansieri J, Marquette C & Forge V. Detection of amyloid deposits within the diagnostic window without labeling. Prêt à être soumis à *Nature*.

Pansieri J, Halim MA, Vendrely C *et al.* Mass and charge distributions of entire amyloid fibers involved in neurodegenerative diseases: Mapping polymorphism effects and population heterogeneity. Prêt à être soumis à *Science*.

Pansieri J, Imbert D, Forge V *et al.* General intrinsic luminescence properties of amyloid fibrils for non-invasive *in vivo* imaging. En cours de rédaction.

Communications orales effectuées :

Pansieri J, Plissonneau M, Stransky-Heikron N, Allémann E, Dumoulin M, Lux F, Tillement O, Forge V, Marquette C. Amyloïdoses: early diagnostic with functionalized nanoparticles. **27 janvier 2017**, *Séminaire jeune chercheur*, Grenoble, France.

Pansieri J, Plissonneau M, Stransky-Heikron N, Allémann E, Dumoulin M, Lux F, Tillement O, Forge V, Marquette C. Nanoparticles functionalisation for amyloid plaques detection. **12-14 Décembre 2016**, *3rd annual meeting of SFNano*, Paris, France.

Pansieri J, Plissonneau M, Stransky-Heikron N, Allémann E, Chartier E, Forge V, Marquette C. Preliminary results for early diagnostic of amyloidoses with functionalized nanoparticles, **8-11 Mai 2016**, *Nanohybrides XIII meeting*. Porquerolles, France

Pansieri J, Stransky-Heikron N, Imbert D, Chartier E, Forge V, Marquette C - Les amyloïdoses: diagnostic précoce à l'aide de nanoparticules et propriétés optiques intrinsèques. **14 Mars 2016**, *seminary of LCBM*. Grenoble, France

Communications par poster effectuées à des congrès :

Pansieri J, Mowat P, Chartier E, Forge V, Marquette C - Early diagnostic of amyloidoses with functionalized nanoparticles, **8-11 Mai 2016**, *Nanohybrides XIII meeting*. Porquerolles, France

Pansieri J, Plissonneau M, Stransky-Heikron N, Allémann E, Dumoulin M, Lux F, Tillement O, Forge V, Marquette C - Functionalized nanoparticles for Amyloidosis diagnosis. **2 Décembre 2014**. Oslo, Norvège.

Plan du manuscrit, apports collaboratifs et personnels :

Ce manuscrit de thèse, sur articles, s'articule autour de cinq parties différentes, concernant la détection des amyloïdoses par des nanoparticules fonctionnalisées et leurs propriétés originales : une introduction générale, et 4 chapitres de résultats. Les chapitres 1, 2 & 4 sont des résumés d'articles qui précèdent une étude exhaustive, valorisée donc par un article scientifique publié ou en voie de soumission. Le travail effectué, par moi-même ou par nos collaborateurs, consigné ici, ne concerne que ce manuscrit et ne décrit en rien leur contribution *in extenso* dans le projet global.

L'introduction est un travail de recherche bibliographique présentant l'état de l'art concernant les amyloïdoses, et s'attarde sur trois d'entre elles d'intérêts : la maladie d'Alzheimer et le peptide amyloïde β_{1-42} ($A\beta_{1-42}$), le diabète de type 2 et la protéine Islet Amyloid PolyPeptide (IAPP), la polyneuropathie familiale et la protéine transthyrétine (TTR) ; s'en suit une présentation des fibres amyloïdes ainsi que les stratégies diagnostiques mises en œuvres à ce jour pour leur prise en charge.

Le chapitre 1 se concentre sur la détection générique de dépôts amyloïdes, *via* des nanoparticules décorées par des molécules de ciblage de type *Pittsburgh compound B* (PIB) ou nanocorps. Ma part de travail concerne la formation (et le contrôle de formation) des fibres amyloïdes $A\beta_{1-42}$, IAPP et TTR *in vitro*, les mesures d'affinités *in vitro via* les constantes de dissociations, le prélèvement et les coupes de sections de tissus pathologiques *ex vivo*, les colorations/incubations avec les AGuIX fonctionnalisées et l'observation de ces tissus par microscopie. La synthèse des nanoparticules a été réalisée par nos collaborateurs de l'ILM de Lyon (Marie Plissonneau, François Lux et Olivier Tillement). La caractérisation des nanoparticules et la quantification des entités PIB et nanocorps à la surface des nanoparticules ont été réalisées par nos collaborateurs de l'ILM et du *Laboratory of Enzymology and Protein Folding centre for Protein Engineering* de l'Université de Liège (Mireille Dumoulin).

Le chapitre 2 concerne le ciblage spécifique de chaque type de dépôts amyloïdes, par l'intermédiaire de peptides synthétiques particuliers, induisant la sélectivité. J'ai effectué la formation (et le contrôle de formation) des fibres amyloïdes $A\beta_{1-42}$, IAPP et TTR, la quantification des peptides à la surface des nanoparticules, les mesures d'affinités *in vitro via* les partitions pour le PIB seul et les nanoparticules avec divers peptides, le contrôle de toxicité des nanoparticules *in vitro*, les coupes de sections de tissus pathologiques *ex vivo*, les colorations/incubations avec les AGuIX fonctionnalisées et l'observation de ces tissus par microscopie. La synthèse et la caractérisation des nanoparticules ont été réalisées par nos

collaborateurs de l'Institut Lumière Matière (ILM) de Lyon (Marie Plissonneau, François Lux et Olivier Tillement). Les mesures d'affinités des différents peptides ont été réalisées en collaboration avec Marie Plissonneau de l'ILM, Laurence Heinrich-Balard, Pascaline Rivory de l'Université Claude Bernard de Lyon, Eric Allémann, Nathalie Stransky-Heikron de l'Université de Genève, et moi-même.

Le chapitre 3 met à contribution la nanoparticule AGuIX greffée avec le PIB, et sa détection *in vivo* et *post-mortem* après injection rétro-orbital chez la souris modèle de la maladie d'Alzheimer. J'ai réalisé les coupes et l'observation *post-mortem* par microscopie des coupes de sections de cerveaux de souris pathologiques injectées. Les tests de mémoires sur les souris modèles ainsi que le suivi IRM *post-mortem* ont été réalisés par Benoit Larrat et Matthieu Gerstenmayer de l'Institut d'Imagerie Biomédicale (I₂B) de Saclay. Le suivi IRM *in vivo* a été fait en collaboration avec Benoit Larrat, Matthieu Gerstenmayer de l'I₂B, Christel Marquette et moi-même.

Le dernier chapitre s'intéresse aux propriétés optiques luminescentes des fibres amyloïdes autour du spectre visible de la lumière. J'ai réalisé la formation, la cinétique et le contrôle de formation des 13 types de fibres amyloïdes, les mesures systématiques par fluorescence *in vitro* sur ces dernières, la visualisation des propriétés luminescentes par microscopie de fibres de Het-s alignées, les sections de tissus pathologiques (et contrôle) murins et leurs observations par microscopie à fluorescence. Les fibres amyloïdes hTau ont pu être analysées grâce à leur synthèse par Marcelle Moulin, Sabine Chierici et Simona Denti du groupe Radiopharmaceutiques Biocliniques de l'INSERM de Grenoble. J'ai effectué la spectroscopie de fluorescence résolue en temps en collaboration avec Daniel Imbert de l'Institut Nanosciences et Cryogénie du CEA de Grenoble, tandis que la microscopie en temps résolu a été rendue possible grâce à Marcelina Cardoso Dos Santos et Niko Hildebrandt de l'Université Paris-Sud. L'alignement des fibres de Het-s a été fait par Anaëlle Rongier, appartenant à mon équipe (AFFOND/LCBM/BIG).

Enfin, concernant l'Annexe 7 et la distribution de masse et de charge des fibres amyloïdes impliquées dans les maladies neurodégénératives, j'ai réalisé la formation de fibres amyloïdes A β ₁₋₄₂, α -synuclein et hTau, leur contrôle de formation, ainsi qu'une étude de distribution en taille, diamètre et en population par MET. La production de la protéine hTau a été faite par Marcelle Moulin, Sabine Chierici et Simona Denti du groupe Radiopharmaceutiques Biocliniques de l'INSERM de Grenoble, l'expression et la formation d' α -synucleine par Mireille Dumoulin du *Laboratory of Enzymology and Protein Folding centre for Protein Engineering* de l'Université de Liège, tandis que la spectroscopie de masse par détection de charge a été possible grâce à Rodolphe Antoine et Mohammad A. Halim de l'ILM de Lyon.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'organisme qui a financé généreusement mon travail : la Fondation pour la Recherche médicale (FRM), mais aussi tous les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer cette thèse : Christelle Hureau et Human Rezaie en tant que rapporteurs, Marianne Weidenhaupt, Lucie Sancey, Eric Allémann et Joël Chopineau (qui fut également mon maître de stage en M2) en tant qu'examineurs, Christel Marquette et Vincent Forge en tant que membres invités.

Dans ce cadre, je tiens à remercier particulièrement mes deux encadrants de thèse, qui ont observé des rôles complémentaires par leurs approches différentes, et m'ont permis d'apprendre dans un cadre de travail qui me convenait parfaitement : Vincent Forge, pour ta confiance et la liberté d'initiative que j'ai pu avoir, tout en me stimulant à toujours me poser des questions, et me formant dans un domaine assez nouveau aux vues de mon parcours, la biophysique (mais aussi pour les paris sportifs qui ont tourné en ma faveur) ; Christel Marquette, pour tes compétences qui m'ont largement profitées en biologie, et ton sens de l'écoute à des étapes cruciales de la thèse, qui m'a permis de valoriser mon travail tout en respectant mon avis. Je remercie également tous nos collaborateurs, que cela soit de Grenoble (Karin, Anne, Wong, Hervé, Laetitia...), Genève, Liège (Mireille), Lyon (Marie, Laurence, François & Olivier), Nantes (Sandrine), Paris, et de Strasbourg (Luc & Joan), pour nos nombreuses discussions scientifiques, des fois passionnées, toujours enrichissantes. Je tiens dans ce cadre à remercier tout particulièrement Benoit Larrat et Matthieu Gerstenmayer de l'Institut d'Imagerie Biomédicale de Saclay, ainsi qu'Eric Allémann et Nathalie Stransky-Heikron de l'Université de Genève, qui se sont montrés particulièrement disponibles et accueillants tout au long de ma thèse.

Un grand et chaleureux merci à toute mon équipe, qui a su me supporter durant ces trois années : à ma co-thésarde Anaëlle, avec qui nous avons pu médire sur le reste du monde dans notre pièce 213A, à Carole, ton caractère bien trempé, nos discussions border-lines et biokinergie (sans commentaire), à Lucas, pour ton savoir et nos discussions politiques, mais aussi pour ton « Non, non, non mon p'tit veau » qui va me hanter encore longtemps, à Justine et ta culpabilité ressentie après avoir mangé des gâteaux au chocolat, à Babeth, qui m'a techniquement beaucoup apporté quand je suis arrivé, à Phong et ta bonne humeur, à Nicolas pour tes conseils, et enfin à Henri et Damien pour les frites, et les conversations de bonhommes. Sans compter les membres du CBM, à commencer par son directeur Stéphane Ménage et son directeur adjoint Patrice Catty, qui ont toujours été disponibles, techniquement et scientifiquement parlant. Aux autres thésards et post-doc du CBM, pour les discussions de couloirs et/ou les (trop rares) apéros, Amal, Marianne, Nathan, Xavier, Khemary, Jérôme...et tous les autres, permanents ou non, car comme le disait le philosophe Bilbon Sacquet, « *Je ne connais pas la moitié d'entre vous à moitié autant que je le voudrais ; et j'aime moins que la moitié d'entre vous à moitié aussi bien que vous le méritez* ».

Sur un plan plus personnel, à Mme Christine Varon et Mr Philippe Lehours, mes anciens maîtres de stages de M1 à Bordeaux, qui m'ont redonné l'envie à une époque où je pensais tout arrêter. Du fond du cœur, merci. Merci également aux responsables de la formation Microbiologie de Bordeaux représentés par Thierry Noël, de m'avoir mis au pied du mur sans aucun respect assumé, et de n'avoir pas cru en moi, ce qui m'a permis de partir vers des horizons moins étriqués d'esprit.

A mes parents, Marc & Martine Pansieri, qui malgré votre infection au *Toxoplasma gondii* vous rendant beaucoup trop amoureux de ces onze chats, êtes toujours là pour me

soutenir, m'écouter, mais aussi me dire sans détours quand j'ai tort. Gardez précieusement ce livre jusqu'à mon prix Nobel, il prendra de la valeur ! A mon frère, Alexandre, pour mes quelques passages Parisiens et nos longues discussions sur le cinéma, sur la déification de James Cameron et Steven Moffat, tout au long de ces longues années d'études, et plus particulièrement de la thèse. A mes grands-parents de Normandie, Papi et Mamie, décédés durant ma thèse, et à ma grand-mère Putti, pour nos discussions sur ce monde qui va trop vite.

A mes amis médecins Bordelais, qui même si vous êtes insupportables, m'avez beaucoup fait rire et soutenu à votre façon *via* les internets, ainsi que lorsque nous nous sommes trop rarement vus : Alice, Audrey, Chlamy, Coco, Fanny, Jeanne, Julie, Lucia, Marine, Marta, Sara, Zozo, Antoine, Anwaner304, Clément Babin, Clément Buhry, Doubi, Gouach, Guetron, Igor, Marc, Noucouille, Noyo, Polo, Quentin, Regis, Sam et Tutu. Une pensée émue pour le camarade Kurt tombé au combat.

A mes amis Bordelais tout court, qui m'ont démontré que loin des yeux ne voulait pas forcément dire loin du cœur : Julia, Matthieu & mon fils Martin, PQ & Marie pour nos appels manqués (mais toujours sincères !), Jerem notre infirmière en chef, Alexis, Greg & Amanda pour globalement la marrade. Mention spéciale et évidente au mec qui ne pleure pas à son mariage, et à sa femme pour le soutien mutuel freeletics, Zuko & Marine.

A mes amis de l'OCO et Montpellierains : Mat & Nat pour l'ensemble de votre œuvre, passée et à venir, les vacances à l'étranger, les soirées et les s'pizzas, Jeff pour toutes ces histoires de canoë, et nos délires sans fins, Armand pour le soutien important que tu m'as apporté ces six derniers mois notamment, Julien & Julie pour nos discussions toujours enrichissantes et votre capacité à tout surmonter, La rubiette et ta force tranquille, Pascal pour avoir beaucoup d'argent et ton engagement sans faille, Sylvain, Amandine, Julie B, Erwan, Sandrine et tous ceux que j'oublie de citer et qui n'oublieront pas de me le rappeler.

Aux seuls amis Grenoblois, Lucie et Matthieu, bientôt Lyonnais, pour ces après-midi Bò bún / Cinéma / Bastille / Kfée des jeux.

Last but not the least (comme nous aimons le dire en Recherche), à ma compagne Alexine et à l'accueil que m'a toujours offert sa famille (Jacky, Jacqueline et Adrien). Alexine, tu as été présente chaque jour de ce travail de trois ans, à ta manière et mieux que tu ne le penses, ce malgré mes sautes d'humeur et la distance qui nous séparait. Pour tout ça, et bien plus encore, merci.

Abréviations

AA	acide aminé
A β ₁₋₄₂	peptide bêta amyloïde de 42 acides aminés
A β ₁₋₄₀	peptide bêta amyloïde de 40 acides aminés
AGuIX	<i>activation and guiding of irradiation by X-ray</i>
AL	amyloïdose à chaîne légère
AP	phosphatase alcaline
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
APTES	3-aminopropyltriéthoxysilane
ARN	acide ribonucléique
BHE	barrière hémato-encéphalique
B10AP	nanocorps B10 lié à la phosphatase alcaline
CH	domaine constant de la chaîne lourde d'anticorps
CL	domaine constant de la chaîne légère d'anticorps
Cu	cuivre
Cy5.5	cyanine 5.5
DC	dichroïsme circulaire
DDL	diffusion dynamique de la lumière
D _H	diamètre hydrodynamique
DNID	diabète non insulino-dépendant
Fc	fragment constant d'anticorps
FDG	2-deoxyglucose
Gd	gadolinium
IAPP	<i>islet amyloid polypeptide</i>
IHC	immunohistochimie
IRM	imagerie à résonance magnétique
K _d	constante de dissociation
LIBS	spectroscopie sur plasma induit par laser
MA	maladie d'Alzheimer
MET	microscopie électronique à transmission

Abréviations

MFA	microscopie à force atomique
MTT	bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
MS	spectroscopie de masse
NIR	proche infra-rouge
NP	nanoparticule
OSHP	oligomère soluble de haut poids moléculaire
PEG	polyéthylène glycol
PFA	paraformaldéhyde
PFA _n	Protofibres annulaires
PIB	<i>Pittsburgh compound B</i>
PNF-TTR	polyneuropathie familiale associée aux dépôts à transthyrétine
PSEN1	préséniline 1
PSEN2	préséniline 2
QD	<i>quantum dot</i>
RC	rouge congo
RMN	résonance magnétique nucléaire
RPS	résonance plasmonique de surface
SAH	sérum de l'albumine humaine
SDS-PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide avec dodécysulfate de sodium
SPION	<i>superparamagnetic iron oxide</i>
TEMP	tomographie par émission mono-photonique
TEOS	tétraéthoxysilane
TEP	tomographie à émission de positons
ThS	thioflavine S
ThT	thioflavine T
TTR	transthyrétine
TTR-V30M	transthyrétine à mutation Val30Met
USPIO	<i>ultrasmall superparamagnetic iron oxide</i>
UV	ultraviolet
UV-vis	proche ultraviolet
VH	domaine variable de la chaîne lourde d'anticorps
VHH	domaine variable de la chaîne lourde d'anticorps de <i>Camelidae</i> s

Abréviations

WT	<i>wild type</i>
YS-11	peptide YSTIAALSPYS issue de TTR-V30M
VL	domaine variable de la chaîne légère d'anticorps
¹¹ C	carbone 11
¹⁸ F	Fluor 18

Introduction générale

I. Les amyloïdoses

I.1. Définition

Les amyloïdoses peuvent être définies comme un vaste groupe de maladies caractérisées par l'agrégation de protéines ou de peptides normalement solubles, en structures insolubles et très stables. Ces agrégats sont composés de fibres amyloïdes, à l'aspect filamenteux rectiligne sans ramification, d'un diamètre de l'ordre de la dizaine de nanomètres et de longueurs variables pouvant atteindre plusieurs microns. Les dépôts amyloïdes sont composés à 95 % de ces protéines fibrillaires, et à 5% de glycoprotéines, constituées notamment du composant P-amyloïde, commun à l'ensemble des amyloïdoses¹. A ces dépôts insolubles, s'ajoutent des dérivés protéiques relativement peu structurés et solubles, composés de 2 à 6 peptides ou protéines, appelés oligomères. Un rapport récent incrimine majoritairement ces derniers dans la cytotoxicité induite par les amyloïdoses².

La première observation publiée d'amyloïdose (ou amylose) fut probablement décrite par Nicolaus Fontanus au XVII^{ème} siècle, qui remarqua la présence de « cailloux blancs » au niveau de la rate d'un patient atteint de jaunisse et d'hépatomégalie³ (augmentation pathologique du foie). Cependant, il faudra attendre le XIX^{ème} siècle et le travail de Rudolph Virchow pour que le terme d'amylose soit employé⁴. En effet, il attribua cette dénomination par homonymie, en constatant des propriétés tinctoriales communes entre les dépôts amyloïdes et l'amidon, celui-ci constitué d'un polymère nommé amylose.

En pathologie humaine, 36 protéines ont été identifiées à ce jour comme ayant la capacité de s'agréger sous forme de dépôts amyloïdes⁵. Chaque protéine est associée à une maladie, et son accumulation peut se faire au niveau intra-cellulaire ou extra-cellulaire. Ces pathologies peuvent être aussi bien neurodégénératives (maladie de Parkinson, chorée de Huntington, maladie d'Alzheimer), métaboliques (diabète de type 2), ou cardiaques (cardiomyopathie). Compte tenu de cette diversité, une classification des dépôts amyloïdes est proposée en fonction de leurs lieux de dépositions, de leur caractère héréditaire ou acquis, et de leurs diffusions à travers le corps humain (**Table 1**). Ainsi, on séparera les amyloses systémiques (cardiopathie amyloïde, polyarthrite rhumatoïde) qui peuvent présenter des dépôts fibrillaires dans de multiples organes, des amyloses localisées (diabète de type 2, maladie d'Alzheimer) où l'agrégation se produit dans un seul tissu, le plus souvent au niveau de l'organe où la protéine est produite.

En définitive, les amyloïdoses concernent la quasi-totalité des organes, et sont associées à des maladies pour la plupart sans lien structural ou fonctionnel. L'approche clinique de ces dépôts repose donc sur un panel de symptômes non spécifiques, d'où la difficulté de les diagnostiquer. A l'inverse, le ciblage d'agrégats amyloïdes représente un marqueur intéressant de diverses pathologies.

amyloïdose	Protéine amyloïde	Systémique ou localisée	Héréditaire ou acquise	Organes cibles
AL	Ig à chaîne légère	S, L	A, H	Tous, sauf SNC
AH	Ig à chaîne lourde	S, L	A	Tous, sauf SNC
AA	Sérum amyloïde A	S	A	Tous, sauf SNC
ATTR	Transthyrétine	S	A	Cœur, ligaments et tendons
	Transthyrétine, variants	S	H	SNP, SNA, cœur, yeux, leptoméniges
A β ₂ M	β ₂ -microglobuline	S	A	Système musculo-squelettique
	β ₂ -microglobuline, variants	S	H	SNA
AApoAI	Apolipoprotéine A I, variants	S	H	Cœur, foie, reins, SNP, testicules, larynx, peau
AApoAII	Apolipoprotéine A II, variants	S	H	Reins
AApoAIV	Apolipoprotéine A IV	S	A	Reins médullaires
AApoCII	Apolipoprotéine C II, variants	S	H	Reins
AApoCIII	Apolipoprotéine C III, variants	S	H	Reins
AGel	Gelsoline, variants	S	H	SNP, cornée
ALys	Lysozyme, variants	S	H	Reins
ALECT2	Facteur-2 des leucocytes	S	A	Reins
Afib	Fibrinogène α , variants	S	H	Reins
ACys	Cystatine C, variants	S	H	SNP, peau
ABri	ABriPP, variants	S	H	SNC
ADan	ADanPP, variants	L	H	SNC
A β	APP	L	A	SNC
	APP, variants	L	H	SNC
A α Syn	A-synucléine	L	A	SNC
ATau	Tau	L	A	SNC
APrP	Protéine prion	L	A	MCJ
Acal	(Pro)calcitonine	L	A	Tumeur de la thyroïde
AIAPP	Islet Amyloid PolyPeptide	L	A	Îlots de Langerhans, insulinome
AANF	Facteur natriurétique auriculaire	L	A	Cœur
APro	Prolactine	L	A	Prolactinome, hypophyse
AIns	Insuline	L	A	Injection locale, iatrogénique
ASPC	Protéine surfactante du poumon	L	A	Poumon
AGal7	Galectine 7	L	A	Peau
ACor	Corneodesmosine	L	A	Follicules capillaires, cornée
AMed	Lactadherine	L	A	Aorte
AKer	Kerato-epitheline	L	A	Cornée
ALac	Lactoferrine	L	A	Cornée
AOAAP	Protéine odontogénique	L	A	Tumeurs odontogéniques
ASem1	Semenogeline	L	A	Vésicule séminale
AEnf	Enfuvirtide	L	A	iatrogénique

Table 1. Protéines amyloïdes impliquées en pathologie humaine et organe(s) cible(s) ; SNC : système nerveux central ; **SNP :** système nerveux périphérique ; **SNA :** système nerveux autonome ; **MCJ :** maladie de Creutzfeld-Jacob. (adapté de Sipe et al. 2016)⁵

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au diagnostic de trois dépôts amyloïdes formés de trois polypeptides particuliers: le peptide amyloïde β de 42 acides aminés (A β ₁₋₄₂) associé à la maladie d'Alzheimer, Le peptide *Islet Amyloid PolyPeptide* (IAPP, ou amyline), impliqué dans le diabète de type 2, et la protéine transthyrétine mutée Val30Met (TTR-V30M), engagée dans la polyneuropathie familiale.

I.2. La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative connue pour être la forme la plus commune de démence. Cette pathologie provoque un déclin progressif des facultés cognitives, et s'accompagne d'une destruction définitive des cellules nerveuses dans les régions du cerveau impliquées dans la mémoire et le langage^{6,7}, conduisant à la mort.

La MA existe sous une forme sporadique ou héréditaire⁸: la première forme est la plus répandue et touche les personnes âgées (à partir d'environ 70 ans), la seconde est plus rare et est associée à des adultes plus jeunes (à partir de 40 ans). En 2016, la maladie d'Alzheimer concernait plus de 47 millions de personnes de façon relativement homogène à travers le monde⁹, et elle est estimée à 131 millions d'individus d'ici 2050. Le diagnostic et le traitement de cette pathologie représentent donc des enjeux médicaux importants : le diagnostic précoce pour une meilleure prise en charge des patients, et le traitement car il n'existe à ce jour aucune thérapie efficace¹⁰.

Historiquement, c'est le médecin Alois Alzheimer¹¹ qui découvrit cette maladie en 1906. Il décrivit ainsi ses deux marqueurs caractéristiques, utilisés encore aujourd'hui pour l'identifier : les dégénérescences fibrillaires et les plaques séniles.

D'une part, les dégénérescences fibrillaires sont attribuées à une protéine amyloïde, la protéine Tau, sous une forme liant énormément le phosphate. Sous sa forme fonctionnelle, elle favorise la formation des microtubules par l'intermédiaire des filaments d'actine. Or, ce phénomène est régulé par la phosphorylation contrôlée de la protéine Tau. Dans le cas des maladies neurodégénératives, Tau est hyper-phosphorylée et s'accumule sous forme de paires de filaments hélicoïdaux, dans le cytoplasme des cellules nerveuses¹². Elle déstabilise les microtubules, provoquant des perturbations du cytosquelette et l'apoptose neuronale¹³. Contrairement aux plaques séniles, ce phénomène est commun à une vingtaine de maladies neurodégénératives, et constitue donc un marqueur moins spécifique de la MA¹⁴.

D'autre part, les plaques séniles sont dues à l'accumulation de peptides amyloïdes A β sous différentes formes (notées A β , A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂). Ce sont ces dépôts qui permettent de discriminer la MA vis-à-vis d'autres démences (démence à corps de Lewy, syndromes Parkinsoniens, etc). C'est une amyloïdose cérébrale localisée, où les dépôts s'accumulent notamment au niveau de zones cérébrales spécifiques, telles que l'hippocampe et le cortex entorhinal (**Figure 1**). Ces dépôts extracellulaires sont composés de fibres amyloïdes, mais aussi d'oligomères. Ces derniers semblent d'ailleurs jouer un rôle central dans la cytotoxicité induite au niveau des cellules nerveuses¹⁵.

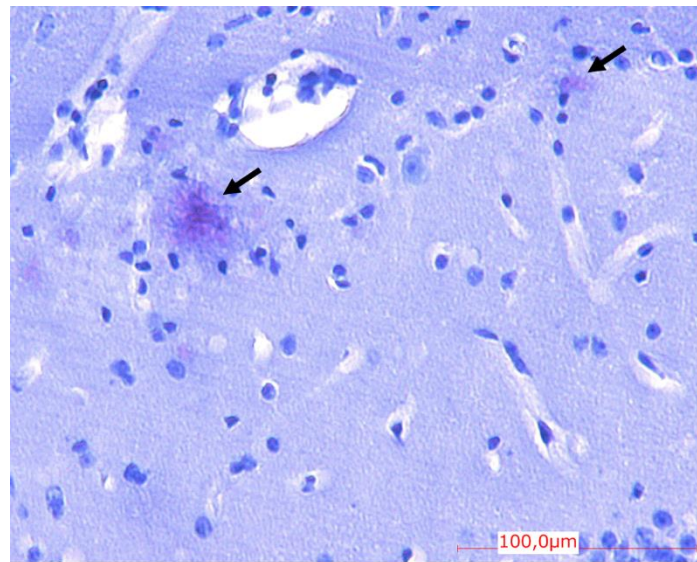


Figure 1. Coupe d'un hippocampe cérébral atteint de la maladie d'Alzheimer présentant des plaques séniles composées de fibres d'Aβ (zones violettes).

D'un point de vue physiopathologique, l'accumulation d'Aβ résulte de l'altération protéolytique de la protéine transmembranaire *Amyloid Precursor Protein*¹⁶ (APP). Cette dernière assure de nombreuses fonctions, au niveau des systèmes de signalisation impliqués dans la maturation des axones et des cellules dendritiques¹⁷. La protéine APP possède ainsi un rôle fonctionnel dans le transport antérograde d'hormones axonales¹⁸, favorisé par l'enzyme α -sécrétase (rôle neuro-protecteur). Au niveau pathologique, le clivage anormal de l'APP est dû aux enzymes β -sécrétase et γ -sécrétase. En effet, des mutations sur les gènes préséniline 1 (PSEN1) et préséniline 2 (PSEN2), liés à la γ -sécrétase, conduisent à la formation de peptides Aβ de différentes longueurs (entre 39 et 43 acides aminés), dont notamment les peptides Aβ₁₋₄₀ et Aβ₁₋₄₂. Le peptide Aβ₁₋₄₂ est majoritairement impliqué dans l'agrégation sous formes de plaques séniles au niveau extra-cellulaire¹⁹ (voir Introduction générale-II.5.1.), conduisant à la perturbation des communications entre cellules. Du fait de la présence pathologique et prématurée d'agrégats formés de ces peptides, ils représentent un intérêt croissant dans le diagnostic et le traitement de la maladie d'Alzheimer.

A ce jour, aucun traitement efficace de la MA n'est disponible, et l'état de dégénérescence est irréversible. On parle d'ailleurs de traitements de confort ou de soins palliatifs, c'est-à-dire visant à atténuer les douleurs et les symptômes, plutôt que leur(s) source(s). L'une des principales difficultés dans les domaines thérapeutiques et diagnostiques provient de la barrière hémato-encéphalique (BHE), barrière physiologique qui sépare la circulation sanguine du parenchyme cérébral. La BHE est un filtre extrêmement efficace contre tout agent exogène, et est assuré par les pieds astrocytaires (prolongements de cellules gliales) et les péricytes, qui entourent les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins passant dans le cerveau. Ce rôle de filtre du sang vers le cerveau, est donc extrêmement efficace contre toute atteinte par un agent pathogène, mais empêche également l'accès aux médicaments et aux vecteurs pour le diagnostic. Ainsi, les médicaments atténuant les troubles cognitifs ou de mémoire sont indirects.

A ce jour, les médicaments les plus utilisés agissent comme inhibiteurs de l'acétylcholinestérase²⁰. Leur but est de diminuer la dégénérescence neuronale, au niveau de l'hippocampe. Une autre stratégie thérapeutique, plus prometteuse, met en jeu l'inhibition de formation des formes oligomériques d'A β , révélées très toxiques (voir Introduction générale-II.4.). Cependant, que cela soit par l'intermédiaire de l'APP et des rôles inhibiteurs/stimulateurs respectifs des enzymes α et γ -sécrétases²¹⁻²², ou le ciblage direct des oligomères²³, ces traitements n'ont que rarement dépassé l'étude comparative d'efficacité clinique (phase III). De plus, même si le traitement de la MA par diminution de la charge amyloïde chez la souris a montré des résultats encourageants, beaucoup d'études cliniques en découlant ont échoué²⁴. En Novembre 2016, un anticorps monoclonal permettant de réduire la formation de plaques A β chez l'animal (le Solanezumab)²⁵, a coûté plus de 3 milliards de dollars à la société le développant, étalés sur trois décennies, pour échouer en phase III clinique²⁶. Pourtant, des résultats prometteurs chez des souris modèles de la MA, montraient une récupération des facultés mémorielles après traitement, accompagnée d'une disparition des plaques séniles. Ces résultats supposent chez l'Homme que la réduction des plaques amyloïdes est une condition nécessaire, mais non suffisante pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.

I.3. Le diabète de type 2

Le diabète de type 2, ou diabète non insulino-dépendant (DNID), est une maladie métabolique chronique caractérisée par un taux trop élevé de glucose dans le sang. L'hyperglycémie chronique qui en résulte est la cause de nombreuses complications^{27,28}, allant de lésions angiopathiques (au niveau des veines et des artères, favorisant les obstructions artérielles, se détériorant en gangrène), à des maladies cardio-vasculaires (angine de poitrine, infarctus du myocarde) et cérébro-vasculaire (accident vasculaire cérébral).

Le DNID représente environ 90% des cas de diabète, et survient en général chez l'adulte à partir de 40 ans²⁹. La prévalence de cette maladie dépend de nombreux facteurs environnementaux (hygiène de vie, surpoids, origine ethnique, etc.) et génétiques (hérédité et/ou prédispositions)³⁰. En 2015, sachant que 415 millions de personnes étaient touchés par le diabète en général³¹, plus de 370 millions de personnes étaient donc atteintes du DNID, soit 7.9% des adultes âgés de 20 à 79 ans à travers le monde. Ce nombre pourrait augmenter jusqu'à 550 millions de personnes d'ici 2040³¹. Il est également important de souligner qu'on estime que plus du tiers des personnes atteintes de cette maladie n'en serait pas conscientes, et ce de manière homogène à travers le monde³²⁻³⁴. Cela est notamment dû à l'absence de signes cliniques évidents dans les étapes précoces de la maladie : l'enjeu médical en matière de diagnostic est donc considérable.

Historiquement, la première mention de diabète est attribuée aux Egyptiens il y a plus de 5000 ans, mais il a fallu attendre 1921 et la découverte de l'insuline, par Frédéric Banting et Charles Best³⁵, pour permettre une meilleure compréhension de cette maladie. En effet, deux anomalies majeures liées à l'insuline sont à l'origine de l'hyperglycémie observée chez les patients : un déficit en insuline (insulinopénie), et une résistance des cellules à son action (insulinorésistance). Ces deux facteurs sont liés : l'insulinorésistance est dans un premier temps compensée par une sécrétion massive d'insuline, régulant la glycémie à des taux normaux,

provoquant l'insulinopénie. C'est d'ailleurs pour ces raisons que les taux de glycémies ne sont pas un bon marqueur diagnostique dans des stades précoces de DNID.

L'insuline est une hormone sécrétée par les cellules β dans les îlots de Langerhans du pancréas, et joue un rôle fonctionnel central dans le métabolisme du glucose, en favorisant son absorption par les cellules cibles (rôle hypo-glycémiant). Elle est co-sécrétée avec la protéine IAPP, qui joue en temps normal un rôle synergique dans la régulation de la glycémie³⁶. Or, dans 90% des cas de DNID³⁷, des dépôts amyloïdes formés de la protéine IAPP s'accumulent progressivement au niveau des îlots de Langerhans (**Figure 2**), impactant la régulation de la glycémie des patients.

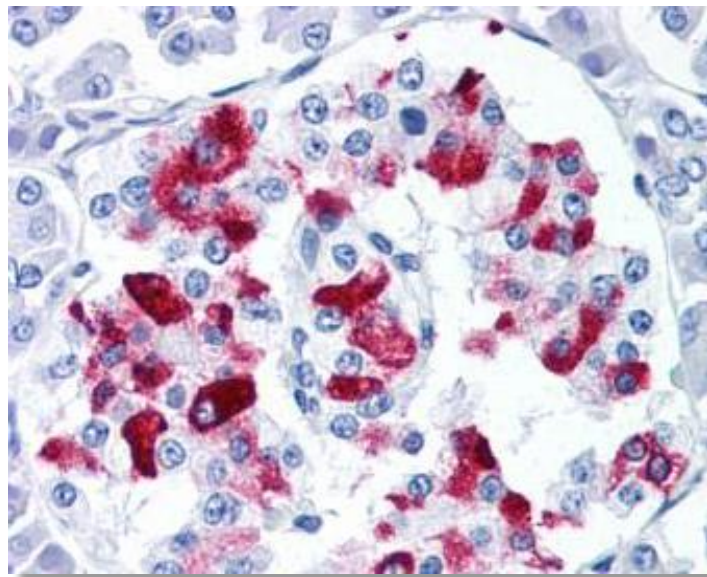


Figure 2. Coupe d'îlots de Langerhans atteints de diabète de type 2, présentant des dépôts amyloïdes IAPP humains (anticorps monoclonal [clone R10/99] (IgG1), marquage rouge). (D'après <https://www.mybiosource.com/prods/Antibody/Monoclonal/IAPP-Amylin/IAPP/>).

Les dépôts amyloïdes composés de la protéine IAPP constituent une amyloïdose localisée acquise, affectant la viabilité et la fonction sécrétoire des cellules β , productrices d'insuline. Les agrégats d'IAPP provoquent leur apoptose³⁸⁻⁴⁰ et/ou leur autophagie³⁷, favorisant l'hyper-glycémie par insulinopénie. Outre ces effets délétères, il semblerait que l'IAPP agit directement sur l'insulinorésistance⁴¹, empêchant le passage intracellulaire du glucose pour sa métabolisation.

En effet, il a été observé que des souris produisant de l'IAPP humaine, présentaient une forte insulinorésistance³⁷ et une réduction du taux plasmatique en insuline, contrairement à des souris diabétiques mais sans le gène IAPP humain, présentant une hyper-insulinémie et des valeurs de glycémie normales. La détection (et la diminution de la charge amyloïde) de ces amyloïdoses *via* les agrégats d'IAPP représente donc un intérêt notable pour le diagnostic du DNID.

A ce jour, aucun traitement ne permet de guérir définitivement du DNID, du fait de sa chronicité. Un mode de vie sain (meilleure alimentation, pratique physique, perte de poids),

semble avoir un impact non négligeable, et des traitements à vie permettent une bonne prise en charge. Parmi eux, des médicaments augmentant la sécrétion d'insuline⁴², ou de diminuer l'insulinorésistance (metformine)⁴³, sont aujourd'hui prescrits en clinique. Le cas échéant, Le traitement à l'insuline par injection reste efficace.

I.4. Les polyneuropathies familiales associées à la transthyrétine

Les polyneuropathies familiales associées à la transthyrétine (PNF-TTR) sont un groupe de maladies héréditaires rares, dues à une transmission autosomique dominante. Elles sont liées à la présence de dépôts amyloïdes formés de la protéine TTR⁴⁴. Les PNF-TTRs se traduisent par des dysfonctionnements du système nerveux autonome et/ou de nerfs périphériques. Cette atteinte est globale (sensorielle, motrice, autonome et/ou viscérale), caractérisée par des symptômes variés et variants⁴⁵, sans rapports évidents, sinon l'atteinte nerveuse. Ces troubles sont précédés d'une période asymptomatique souvent longue. Cependant, dès l'apparition des symptômes cliniques, ceux-ci empirent mortellement en une dizaine d'années. Cette aggravation est décrite en trois étapes⁴⁶⁻⁴⁷, celles-ci notées de 1 à 3 selon leur gravité: de simples sensations désagréables (paresthésies) et des nausées, suivies par des pertes importantes de sensibilité aux extrémités (notamment au niveau des pieds), se concluant par des pertes complètes des capacités motrices, pouvant être accompagnées d'une insuffisance rénale.

Les PNF-TTRs touchent l'adulte entre 18 et 80 ans, avec une moyenne relative autour de 30 ans⁴⁸. Ces pathologies ont longtemps été considérées exclusivement endémiques de certaines régions du Portugal⁴⁹, du Japon⁵⁰ et de la Suède⁵¹, mais des études sur les dix dernières années présentent des cas dans plus de 15 pays aux 4 coins du globe, tels que la France, les Etats-Unis ou encore l'Australie⁴⁷. La prévalence est donc variable, mais on estime environ que 8 000 à 10 000 personnes sont touchées à travers le monde⁵², toutes mutations confondues. Toutefois, ce nombre semble être sous-estimé⁴⁸.

Le diagnostic précoce des PNF-TTRs représente une étape clé pour un traitement efficace de la maladie, mais l'inconvénient majeur provient de la longue période asymptomatique et des difficultés à identifier la protéine TTR incriminée (plus d'une centaine de mutations possibles ont été identifiées à ce jour)⁴⁷. De plus, la TTR non mutée est également liée à d'autres pathologies, notamment les cardiomyopathies séniles.

Contrairement aux autres maladies étudiées, les polyneuropathies familiales liées à la TTR n'ont été découvertes que récemment, en 1952, par le neurologue Mário Corino da Costa Andrade⁵³. Elles sont exclusivement dues aux dépôts amyloïdes de TTR, découverts en 1956, avant que différentes mutations de cette protéine soient présentées comme pathologiques. La transthyrétine fonctionnelle, quant à elle, joue un rôle dans la croissance axonale et la neurogénèse⁵⁴, par l'intermédiaire de sa liaison à la thyroxine, une hormone thyroïdienne. La déstabilisation de sa structure, qui empêche également la fixation de la thyroxine, est à l'origine de l'accumulation pathologique de la TTR en général, et de la TTR-V30M en particulier (voir Introduction générale-II.5.3.).

Dans ce contexte, il existe plus de 100 mutations différentes de TTR⁴⁷, pouvant être plus ou moins impliquées dans des formes de neuropathies. Nous nous sommes intéressés à la TTR

ayant subi une substitution de son 30^{ème} acide aminé (AA), de la Valine à la Méthionine, d'où son nom TTR-V30M. Elle représente la forme la plus commune des polyneuropathies dues aux amyloïdoses, touchant plus de 50% d'entre elles^{46,54}. Cette protéine mutée possède la capacité de s'agréger sous forme de fibres dans différents organes : dans le système nerveux périphérique, mais aussi l'estomac (**Figure 3**), le foie et les plexus choroïdes où elle est synthétisée.

A des étapes précoces de la maladie, les dépôts amyloïdes extracellulaires, composés de fibres de TTR-V30M, sont observables dans l'estomac mais surtout dans le système nerveux périphérique, plus particulièrement dans les ganglions nerveux sensitifs⁵⁵. Cependant, des études *in vitro*⁵⁵⁻⁵⁶ ont montré que la cytotoxicité cellulaire et la neurodégénérescence, impliquées dans la PNF-TTR-V30M, sont essentiellement provoquées par la présence d'oligomères solubles de TTR-V30M. Ainsi, dans un cadre thérapeutique, il est nécessaire de séparer le diagnostic (ciblage des fibres amyloïdes), des traitements envisagés (diminution de la toxicité due aux oligomères).

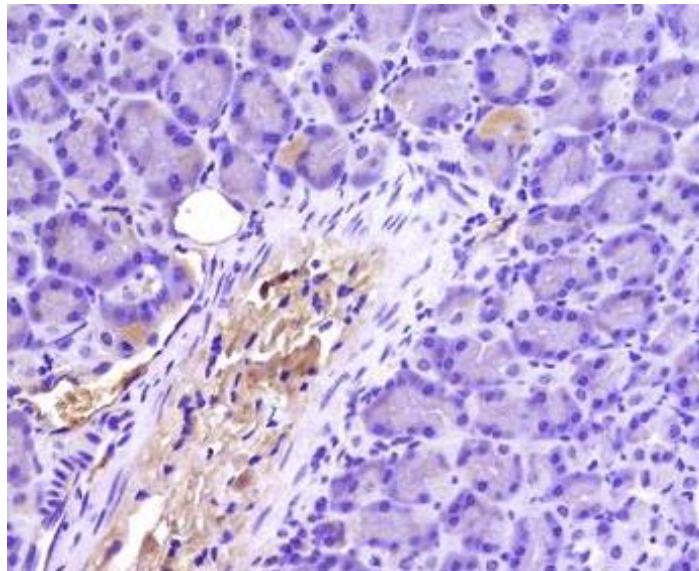


Figure 3. Coupe d'estomac pathologique atteint de PNF-TTR, présentant des dépôts amyloïdes TTR-V30M. (marron, d'après Teixeira *et al.* 2016)⁵⁷

Le traitement de la PNF-TTR-V30M est aujourd'hui bien établi, et permet la réduction, voire l'élimination, de nouveaux dépôts amyloïdes à TTR-V30M. Cependant, ces traitements ne permettent pas une réversibilité des agrégats déjà formés et de leurs effets délétères, d'où l'importance d'un diagnostic précoce.

Depuis les années 1990, la transplantation hépatique est le traitement le plus admis⁵⁸, prévenant à la source la sécrétion de TTR mutée pathologique, notamment concernant la mutation V30M⁵⁹. Cette opération n'est cependant pas préconisée dans des stades tardifs, et requiert une intervention lourde. D'autre part, des médicaments visent à stabiliser la structure homo-tétramérique (voir Introduction générale-II.5.3.), afin d'empêcher la formation des fibres amyloïdes. Le plus admis aujourd'hui est le Tafamidis, médicament très étudié concernant les dépôts à TTR-V30M⁶⁰. Son action est liée à l'inhibition de la dissociation des tétramères de TTR-V30M en monomères, empêchant ainsi la formation des dépôts amyloïdes. D'un point de vue physiologique, son action se traduit par la diminution des troubles neurologiques et sensitifs à court terme, mais semble ne faire que ralentir la progression de la maladie⁶¹. Enfin, des

résultats prometteurs *in vitro* sur des souris exprimant la TTR-V30M, montrent une inhibition importante de son agrégation sous formes d'oligomères, par la molécule CLR01. Cette dernière semble être depuis quelques années un nouvel inhibiteur intéressant de formes amyloïdes⁶².

II. Les fibres amyloïdes

Dans les trois types d'amyloïdoses d'intérêts, nous avons mentionné des symptômes très hétérogènes (démence, angiopathie, déficience motrice...), différents déclencheurs (clivage enzymatique, hyper-insulinémie, mutation génétique...) et de multiples modes d'action (perturbation des communications cellulaires, déstabilisation du cytosquelette, modification des fonctions sécrétrices...). Cependant, elles ont toutes en commun la présence en grande quantité de protéines sous une forme agrégée et structurée : les fibres amyloïdes.

II.1. Structure des fibres

Les fibres amyloïdes sont des agrégats structurés et insolubles de protéines amyloïdes. Elles se présentent généralement sous formes de tiges ou de rubans. Dès 1927, elles ont été identifiées en lumière polarisée³. Dans ce cas, elles apparaissent sous différentes couleurs suivant l'angle d'inclinaison de l'échantillon, révélant des propriétés biréfringentes jaune-vert (diffusion anisotrope de la lumière). Par la suite, des méthodes biophysiques⁶³⁻⁶⁴ (diffraction des rayons X, dichroïsme circulaire, diffusion dynamique de la lumière) ont montré que les fibres amyloïdes ont toutes en commun des structures secondaires en feuillets β , composées de un ou plusieurs brins β . Ainsi, les premières informations structurales concernant les fibres amyloïdes ont été publiées en 1935, par diffraction des rayons X⁶⁵. Cette étude a mis en exergue l'existence de deux modèles de diffractions concernant les fibres amyloïdes : l'un horizontal de 4.7 Å et l'autre vertical de 10 Å (**Figure 4a**). Ces profils sont identifiés, comme correspondant respectivement à la distance entre deux brins β , et à la distance entre deux feuillets β .

Par la suite, des procédés microscopiques^{63,66}, tels que la microscopie à force atomique (MFA) et la microscopie électronique à transmission (MET), ont révélé qu'une fibre amyloïde était la résultante de l'association de structures torsadées. Elles s'enlacent les unes avec les autres, pour former des protofilaments, ou protofibres (**Figure 4b-d**). L'assemblage de deux ou plusieurs protofibres forment ensuite une fibre amyloïde mature. Les feuillets β s'empilent perpendiculairement à l'axe d'élongation de la protofibre, tandis que les liaisons hydrogènes, stabilisateurs de ces feuillets β , s'arrangent parallèlement à cet axe⁶⁷.

Les structures en feuillets β interagissent donc entre elles par l'intermédiaire de leurs brins β . Ces associations forment des sous-unités qui s'assembleront entre elles pour constituer les fibres. Cette construction complexe leur confère une stabilité et une rigidité exceptionnelle, tout en leur permettant une certaine flexibilité. Il faut donc comprendre que ce système est une cascade d'événements concomitants: l'appariement des brins β d'un peptide, puis des feuillets β de plusieurs peptides pour former des monomères (**Figure 5a**), l'association de monomères pour former des protofibres (**Figure 5b**), et l'association de protofibres pour former des fibres amyloïdes (**Figure 5c**).

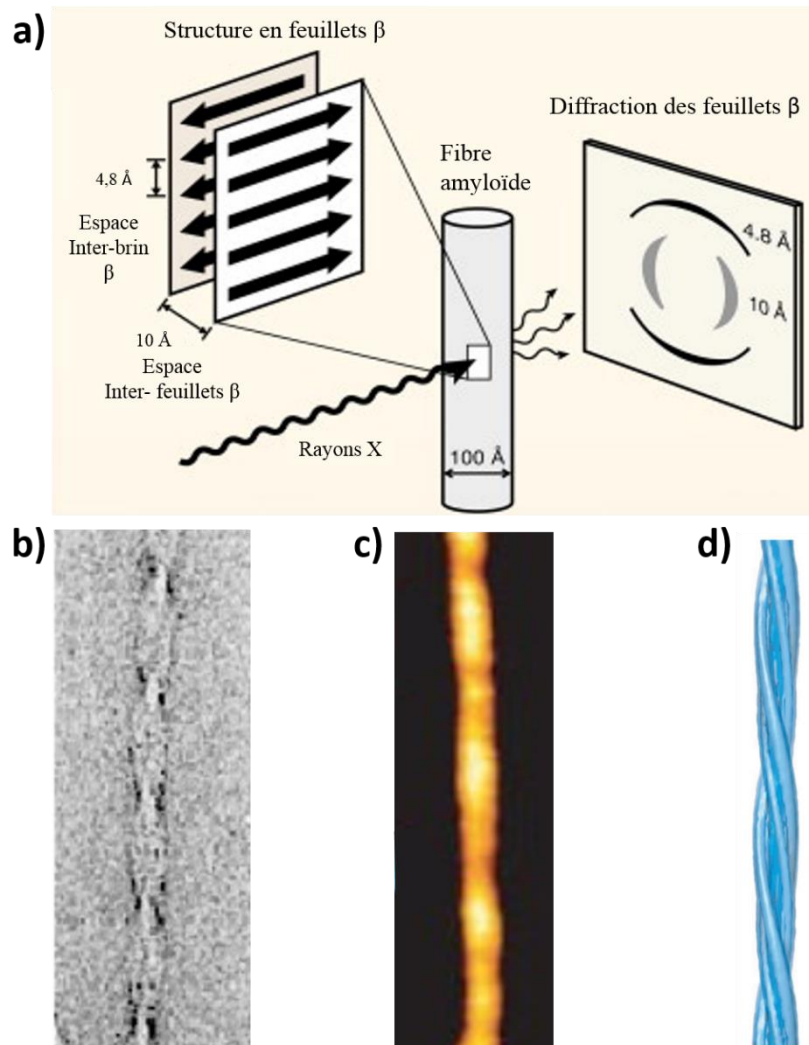


Figure 4. Les premières déterminations structurales des fibres amyloïdes ; a) Représentation du profil de diffraction rayon X d'une fibre amyloïde (d'après Eisenberg *et al.* 2012)⁶⁸ ; b) Imagerie en MET d'une fibre amyloïde composée d'insuline (d'après Jiménez *et al.* 2002)⁶⁹ ; c) imagerie en MFA d'une fibre amyloïde composée d'α-synucléine (d'après Khurana *et al.* 2003)⁷⁰ ; d) représentation d'une fibre composée de quatre protofilaments (d'après Makin *et al.* 2005)⁷¹.

Même si tous ces agrégats amyloïdes partagent cette structure en feuillets β, ils présentent de grandes différences d'assemblages⁷², et donc d'aspects d'une fibre à une autre (longueurs de 0.05 μm à plusieurs microns, diamètre de 3 nm à 12 nm, formation de superstructures, etc). Par exemple, les fibres amyloïdes formées de la protéine Het-s (voir Introduction générale-II.3.) ont un diamètre apparent moyen de 6 nm pour une longueur moyenne de 12 μm⁷³, alors que les fibres de TTR-V30M ont un diamètre moyen de 12 nm et des longueurs résolument plus courtes (moins d'un micron)⁷⁴. Cette diversité est également observée au niveau de dépôts amyloïdes issus d'une même protéine, par la présence de différentes populations (on parle dans ce cas de polymorphisme fibrillaire). Par exemple, 5 formes d'appariements des feuillets β ont été démontrées pour la formation de fibres de glucagon⁷⁵, et plus de 25 pour les protéines amyloïdes en général⁶⁸. Toutefois, des études récentes par spectrométrie de masse, suggèrent des populations dominantes malgré ce polymorphisme (voir **Annexe 7**).

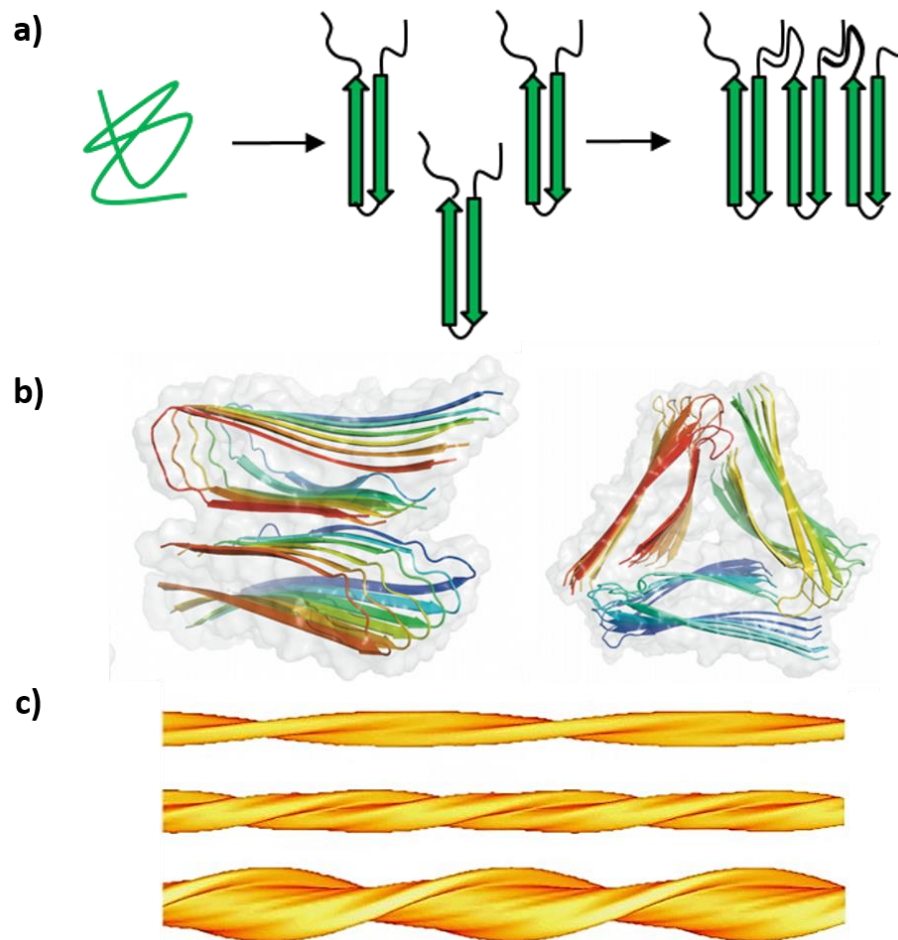


Figure 5. Les différentes structures composant les fibres amyloïdes ; a) Représentation d'empilement de brins β antiparallèles constituant les monomères amyloïdes (d'après Pansieri *et al* 2016)⁷⁶ ; b) Représentation de deux interactions monomériques entre brins β formant des protofibres amyloïdes composées du peptide β amyloïde de 40 résidus (d'après Lemkul *et al* 2012)⁷⁷ ; c) Représentation d'arrangements entre protofibres (2, 4 et 6 protofibres) formant des fibres d'insuline (d'après Jiménez *et al* 2002)⁵⁶.

L'exemple présenté en **Figure 5b** illustre les différences d'appariements des feuilletts β concernant les fibres amyloïdes $A\beta_{1-40}$, sous une forme d'un empilement « standard » de feuilletts β les uns au-dessus des autres, ou sous forme « d'hélices parallèles β »⁷⁸ où 3 feuilletts β s'apparient. D'autre part, l'arrangement de deux à six protofibres d'insuline dans un même échantillon, met en avant des morphologies fibrillaires différentes sous les mêmes conditions (**Figure 5c**). Il existe donc de multiples assemblages possibles, impactant leur diamètre et leur taille, dues essentiellement à 2 phénomènes: la diversité d'assemblage des feuilletts β entre eux, et le nombre de protofibres composant les fibres.

De ce fait, afin de mieux caractériser ces structures complexes, il est rapidement apparu essentiel d'analyser leurs mécanismes de formation (fibrillogénèse).

II.2. Mécanismes de formation fibrillaire

Les mécanismes de formations des fibres amyloïdes sont largement étudiés, et plusieurs processus ont été proposés dans la littérature. Ces procédés peuvent être concomitants, et ne dépendent pas forcément des mêmes structures en solution (**Figure 6a**). Ainsi, la fibrillogénèse peut être initiée par des protéines dénaturées, globulaires ou partiellement repliées, des fibres préformées (*seeding*) et/ou à partir d'agrégats amorphes.

De plus, les mécanismes et les cinétiques de formations sont intimement liés, et ne suivent pas de loi unique. Malgré cela, de manière similaire à l'agrégation de micelles, de la cristallisation de protéines, ou encore de la formation de certaines résines phénoliques, un grand nombre de modèles admet une cinétique en trois phases⁷⁹, suivant un phénomène de nucléation-polymérisation (**Figure 6b**) :

- i. **Une étape de nucléation**, ou phase de latence, durant laquelle on n'observe que peu de changements. C'est le temps dont le système a besoin pour amorcer la réaction d'empilement des feuillet β . L'interaction thermodynamiquement favorable entre deux monomères de protéines amyloïdes est la voie de nucléation la plus admise. On parle alors de noyau permettant l'élongation de la fibre. Par ailleurs, les monomères peuvent interagir entre eux sous des formes partiellement structurées, mais ne concernent pas l'agrégation sous formes de fibres.
- ii. **Une étape d'élongation**, durant laquelle on assiste à la polymérisation rapide et exponentielle des protofibres, qui vont s'associer pour former les fibres matures. La cinétique de fibrillation est aisément observable *in vitro* à l'aide de marqueurs connus, telle que la Thioflavine (voir Introduction générale-III.1.1.). Ce colorant a la capacité de se lier spécifiquement aux fibres amyloïdes et de les visualiser par une augmentation importante de sa fluorescence post-liaison.
- iii. **Une étape d'équilibre**, correspondant à une fin d'élongation, dû à la consommation de l'ensemble des formes monomériques pour former les fibres.

Par ailleurs, la phase de latence peut être négligée par la technique d'ensemencement (*seeding*), consistant à ajouter dans la préparation des fibres amyloïdes préformées (noyau) jouant le rôle de déclencheur. L'initiation de polymérisation se fera immédiatement, par association des monomères sur les fibres, et la cinétique sera bien plus rapide⁸⁰.

Dans ce cadre, il a longtemps été admis que la polymérisation se réalisait seulement aux extrémités des fibres par empilement des monomères. Dans certains cas, l'utilisation de l'ensemencement a fortuitement permis de s'intéresser à l'existence d'une seconde voie d'agrégation, indépendante ou dépendante des monomères⁸¹⁻⁸⁴. La première concerne la capacité des fibres à se fragmenter spontanément lorsqu'elles deviennent trop longues (longueur de persistance)⁸³, permettant d'augmenter la quantité et la vitesse de formation des fibres. La seconde, appelée nucléation secondaire, implique l'interaction entre des monomères intra-fibres et des monomères en solution, dépendante de leurs concentrations respectives. Cette nucléation secondaire a été notamment démontrée dans le cas des fibres A β et IAPP, avec un effet rétroactif positif sur la fibrillogénèse⁸¹. Ce phénomène a été décrit il y a plus de trente

ans⁸⁴, mais son rôle supposé critique dans la formation d'oligomères amyloïdes très toxiques n'est apparu que récemment⁸¹.

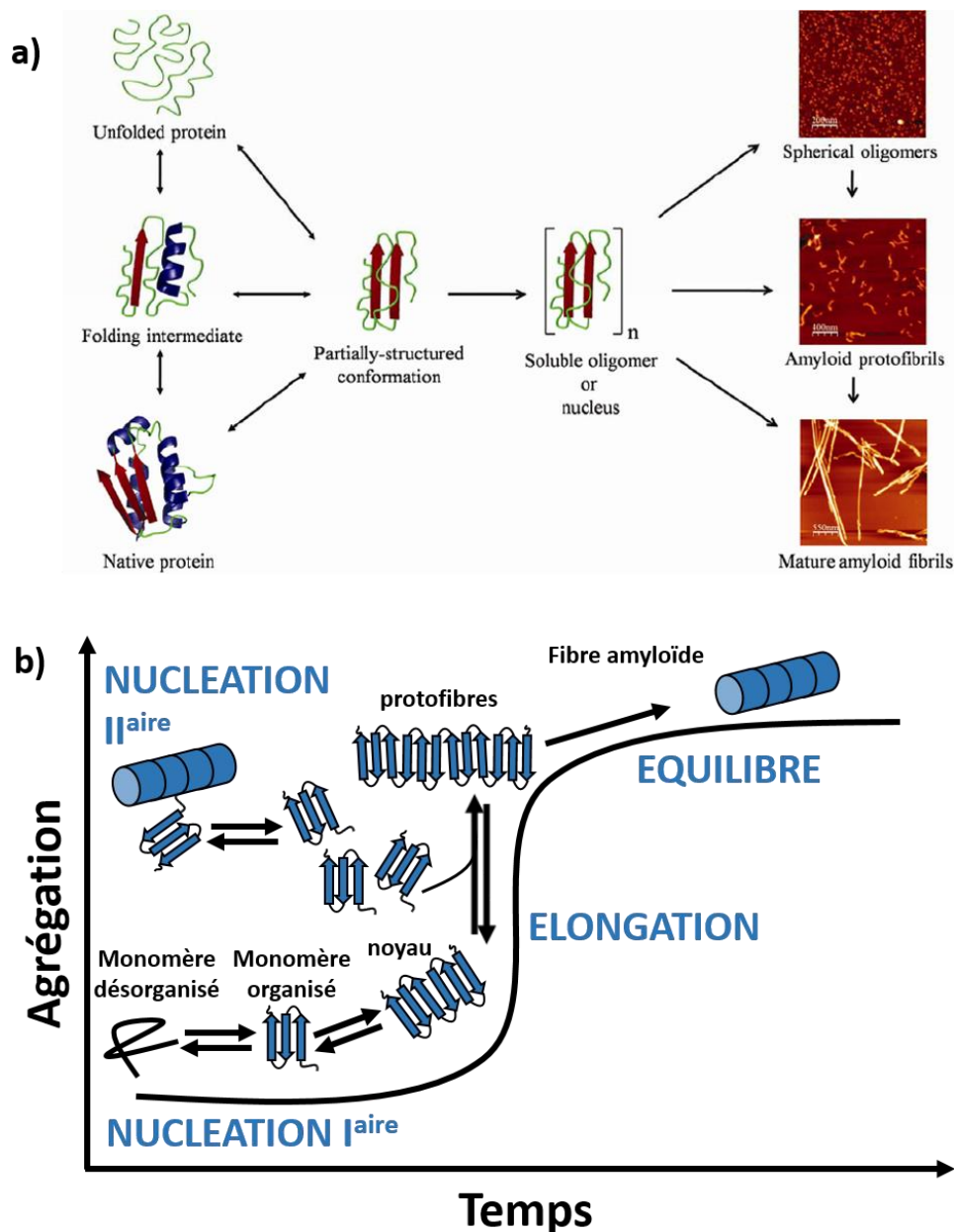


Figure 6. Mécanismes de fibrillogénèse ; a) Représentation simple des mécanismes possibles de formations de fibres amyloïdes (d'après Kumar *et al.* 2010)⁸⁵, via l'association des feuilletts β : où le noyau (*nucleus*), formé de protéines partiellement structurées, peut conduire à la formation d'oligomères, de protofibrilles et/ou de fibres amyloïdes ; b) Représentation d'une cinétique de formation des fibres amyloïdes, avec l'aggrégation structurée des monomères en fonction du temps.

Compte tenu de ces informations, de nombreuses études s'accordent à dire que la formation de fibres amyloïdes est stochastique, due notamment à l'observation de cinétiques très variables entre plusieurs échantillons provenant de la même préparation. De multiples facteurs endogènes, tels que la composition en acide aminés, les interactions de surface, ou la structure native de la protéine, mais aussi exogènes comme la température, l'agitation et la

concentration en protéine, jouent également un rôle significatif. A ce jour, les facteurs favorables et la diversité des mécanismes d'interaction entre les différentes architectures menant à leur formation ne sont pas clairement établis⁸². Cette pluralité peut s'appliquer aux protéines amyloïdes associées à des maladies, mais également à certaines protéines s'agrégeant sous formes fibrillaires, et assurant des fonctions biologiques.

II.3. Particularités fonctionnelles

Contrairement aux idées reçues, il existe de très nombreuses fonctions non pathologiques associées aux structures amyloïdes. En effet, la conformation fibrillaire n'est pas forcément délétère, bien au contraire. Ces architectures particulières en feuillets β peuvent même leur conférer des propriétés exceptionnelles, et assurent:

- i. **Des fonctions de sélection** : certaines protéines de champignons ou de levures peuvent s'agréger en fibres amyloïdes. Les mycéliums de *Podospora anserina* peuvent par exemple naturellement fusionner entre eux par l'intermédiaire de leurs hyphes. Cette fusion somatique est contrôlée par la formation de fibres amyloïdes, et dépend d'un ensemble de gènes particuliers, dont deux allèles appelés *het-s* et *het-S*. La protéine traduite *Het-s* a la capacité de former des fibres amyloïdes⁸⁶, pas la protéine *Het-S*. Si les deux protéines sont présentes lors de la fusion de deux hyphes, un mécanisme de mort cellulaire est déclenché par incompatibilité. Le champignon est ainsi préservé de fusions avec des colonies non compatibles.
- ii. **Des fonctions physiologiques** : la protéine *Pmel17* forme des dépôts amyloïdes qui favorisent la production de mélanine⁸⁷, pigment biologique qui protège du rayonnement ultraviolet (UV).
- iii. **Des fonctions dans les biofilms** : les protéines *CsgA* sécrétées par *Escherichia coli* peuvent s'associer pour former des fibres amyloïdes, sous forme de pilis particuliers, appelés *curlis*. Ils permettent les interactions entre les cellules et les surfaces, mais aussi l'adhésion de bactéries entre elles pour former des biofilms bactériens⁸⁸. Le peptide *R₂T* (NNLAITVA) utilisé dans ce travail, est un dérivé synthétique de ces protéines (voir Chapitre 4-III.2.)
- iv. **Des fonctions dans la mémoire à long terme** : Les agrégats amyloïdes de la protéine *CPEB* du mollusque *Aplysia californica* peuvent induire la transcription d'ARNs messagers impliqués dans les connexions synaptiques de la mémoire à long terme⁸⁹.

Il ne faut donc pas confondre protéine amyloïde et amyloïdose. Afin de les différencier, on parle de voies amyloïdogènes concernant les protéines amyloïdes liées à des pathologies. De plus, malgré leur organisation semblable, les procédés amenant à la fibrillogénèse sont très souvent différents. Par ailleurs, contrairement aux fibres, les oligomères que les protéines amyloïdes forment, s'avèrent dans une grande majorité, toxiques pour les cellules : ils sont donc quasiment exclusivement amyloïdogènes.

II.4. Les oligomères de protéines amyloïdes

Il a longtemps été admis que les fibres amyloïdes étaient à l'origine des pathologies (ou du moins de la mort cellulaire induite) qui leurs étaient associées. En effet, des résultats *in vitro* impliquant des agrégats d'A β attestaient de leur toxicité cellulaire⁹⁰. Toutefois, le concept seul de tissus pathologiques étouffés par d'importantes concentrations en fibres amyloïdes est aujourd'hui obsolète ; ces dix dernières années, de plus en plus d'études désignent les oligomères de protéines amyloïdes (eux aussi riches en feuillets β), comme toxiques en première instance⁹¹⁻⁹⁶. De plus, ils peuvent eux-mêmes former des agrégats plus ou moins denses⁹⁷.

Dans le cas de la MA, les oligomères d'A β_{1-42} peuvent agir sur les membranes cellulaires des neurones en perturbant leur fonctionnement^{93,95}. En s'enchâssant dans les membranes, ces oligomères peuvent créer un pore, qui provoque un déséquilibre ionique conduisant le système immunitaire à recourir aux voies de morts cellulaires. La sévérité de la démence et de la neurodégénérescence serait également corrélée, au-delà des stress oxydants engendrés par les plaques séniles, à la présence d'oligomères stables, dans le cerveau et le liquide cébrospinal⁹⁴ (**Figure 7**). Dans le cas du DNID, L'absence de cholestérol, jouant un rôle crucial dans l'internalisation et la dégradation d'oligomères d'IAPP⁹⁶, augmente de manière significative la mort des cellules β des îlots de Langerhans. Par conséquent, les oligomères d'IAPP agissent indirectement sur la diminution de sécrétion d'insuline. Pire encore, dans les PNF-TTR-V30M, les monomères et les oligomères de TTR-V30M semblent être les seuls responsables de cytotoxicité pro-apoptotique pour les cellules nerveuses⁹¹.

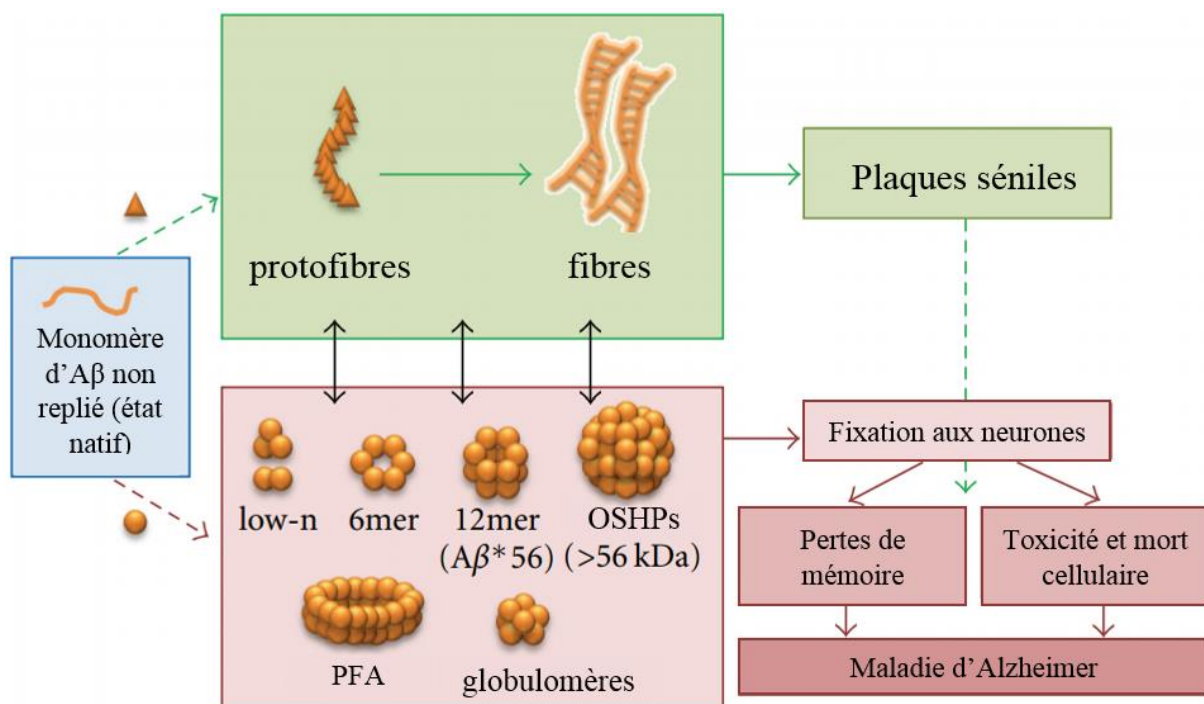


Figure 7. Représentation de l'implication différente entre oligomères et fibres d'A β dans la maladie d'Alzheimer. Protofibrilles annulaires (PFA) ; oligomères solubles de haut poids moléculaire (OSHPs). (Adapté de Rushworth et al. 2010)⁹⁵

Compte tenu de l'ensemble de ces données, il faut donc être conscient que le ciblage de fibres amyloïdes et d'oligomères amyloïdes représentent des objectifs différents, respectivement diagnostiques et thérapeutiques. Dans notre étude nous avons choisi de cibler les fibres amyloïdes impliquées dans les amyloïdoses pour leur diagnostic.

II.5. Structure des protéines d'intérêt

Nous avons mis en avant que les fibres amyloïdes partagent une structure commune en feuillet β , mais qu'elles présentaient de grandes variabilités en termes de tailles, d'arrangements, et de mode d'actions. Afin de les détecter efficacement et spécifiquement, de nombreux travaux ont été menés sur la composition des protéines amyloïdes, en lien avec leurs structures secondaires. Par exemple, il est admis que l'interaction entre acides aminés aromatiques n'est pas fondamentale pour former des fibres amyloïdes, mais qu'elle en influence grandement la morphologie⁹⁸. Dans le cadre de ce travail de thèse, l'enjeu était donc d'utiliser les séquences cruciales, préalablement identifiées dans la littérature, pour l'auto-assemblage fibrillaire et la formation des structures β et/ou des fibres amyloïdes $A\beta_{1-42}$, IAPP et TTR-V30M. Ces protéines représentent des modèles, pour l'étude des amyloïdoses en général.

II.5.1. Le peptide $A\beta_{1-42}$

Le polypeptide $A\beta_{1-42}$ est composé de 42 AAs, pour une masse moléculaire de 4 514.4 Daltons (Da), ce qui en fait une protéine de taille relativement faible. C'est la protéine amyloïde la plus étudiée en raison de son incidence majeure dans la MA (voir Introduction générale-I.2.). Les plaques séniles sont composées en majeure partie du peptide $A\beta_{1-42}$, dû à la présence des deux résidus en position 41 et 42, qui augmentent significativement son insolubilité⁹⁹, comparativement au peptide $A\beta_{1-40}$. Un monomère d' $A\beta_{1-42}$ peut être décomposée en deux zones distinctes (**Figure 8a**): la région du 1^{er} au 16^{ème} AA en partie N-terminal ($A\beta_{1-16}$), et la région en C-terminal du 17^{ème} au 42^{ème} AA ($A\beta_{17-42}$).

La partie $A\beta_{1-16}$ est connue essentiellement pour lier des métaux (le cuivre, le zinc ou le fer) promulguant l'agrégation en fibres amyloïdes. En particulier, ces résidus sont impliqués dans la fixation et la réduction du cuivre Cu(II). Ce dernier, au-delà de favoriser l'élongation fibrillaire, permettrait la production d'espèces oxygénées réactives (EOR), liées à la toxicité cellulaire¹⁰⁰. Des interactions électrostatiques sont également facilitées grâce à la présence d'histidines (positions 6, 13 et 14), chargées positivement.

La partie $A\beta_{17-42}$, quant à elle, est composée de deux régions très hydrophobes¹⁰¹, et comporte principalement des brins β reliés par un pont salin (ou coude). Ces deux caractéristiques sont complémentaires, car les brins β s'apparient pour permettre l'élongation de la fibre, et le nombre important de résidus hydrophobes empêche leur solubilisation.

Les AAs aux positions 19 à 28 ($A\beta_{19-28}$) ont été identifiés, par diffraction des rayons X et microscopie électronique à transmission (MET), comme suffisants pour former des fibres identiques à celles composées par la protéine native¹⁰². Pourtant, cette étude fut révisée par la suite, et la taille minimale pour former des fibres fut attribuée à la zone du 14^{ème} au 23^{ème} acide aminé¹⁰³, incriminant ces séquences dans les brins β . D'autres travaux montrent que les neuf

AAs en partie C-terminale ($A\beta_{34-42}$), et plus particulièrement la méthionine en position 35, sont importantes dans l'élongation des fibres amyloïdes¹⁰⁴⁻¹⁰⁵, tandis que le peptide $A\beta_{29-35}$ est considéré comme un stabilisateur d'agrégats¹⁰⁶. Cependant, dû à la forte hydrophobicité de cette région, il est difficile de synthétiser ce peptide pour des études de ciblage (instabilité).

La région $A\beta_{16-20}$ (notée KLVFF), est considéré comme fondamentale pour l'appariement des brins β et la polymérisation des fibres d' $A\beta_{1-42}$ entre elles¹⁰⁷. L'utilisation dans certaines études des pentapeptides KLVFF et de son dérivé le LPFFD, a montré une interaction avec les fibres $A\beta_{1-42}$, tout en inhibant leur prolifération¹⁰⁸ (rôle de β -breaker). Il est donc un candidat prometteur dans les approches diagnostiques (voir Introduction générale-III.1.2).

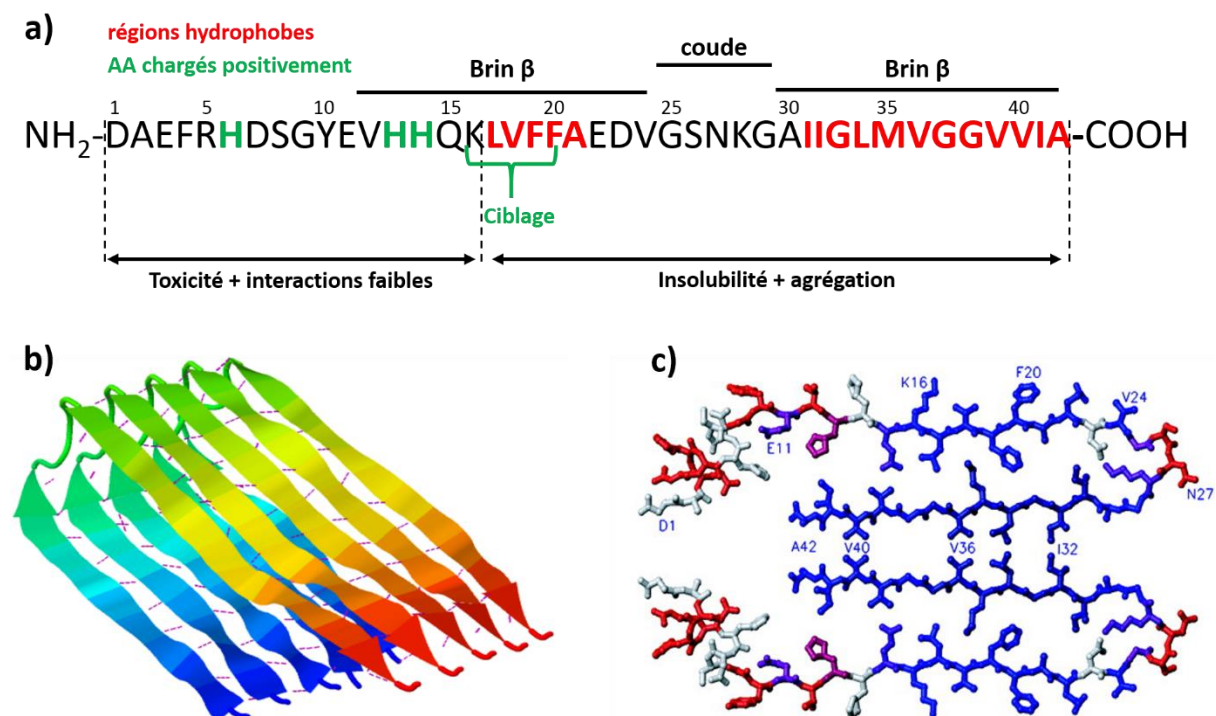


Figure 8. La protéine $A\beta_{1-42}$; a) Séquence de la protéine $A\beta_{1-42}$; **b)** Modèle de structure en feuillets β d'un monomère d' $A\beta_{1-42}$ (PDB : 2BEG, d'après Lhürs *et al.* 2013)¹⁰⁹. Rose : ponts hydrogènes, flèches : brins β ; **c)** Représentation d'appariement de brins β entre deux monomères d' $A\beta_{1-42}$. (D'après Olofsson *et al.* 2006)⁹⁹

En revanche, il est plus difficile d'être catégorique sur la position exacte des brins β , compte tenu du polymorphisme fibrillaire et de l'incidence importante de facteurs environnementaux¹¹⁰⁻¹¹¹ (pH, température, concentration en métaux...). Le cas le plus admis est celui de 2 brins β ^{99,108,112}, entre les positions 12 à 42, reliés par un coude de 3 à 5 AAs entre les positions 25 et 29. Deux monomères interagissent alors en C-terminal, formant un cœur hydrophobe perpendiculaire à l'axe d'élongation de la fibre. Cet appariement peut être parallèle (**Figure 8c**), soit antiparallèle. Cependant, des analyses réalisées par RMN en 2015, montrent l'association possible de 3 brins β (résidus 12-18, 24-33, 36-40) reliés par deux coudes¹¹³. Ces informations marquent une rupture avec ce qui était admis pour $A\beta_{1-42}$, à savoir l'association de seulement 2 brins β , et met en avant l'hypothèse de nombreuses associations existantes.

II.5.2. La protéine IAPP

La protéine IAPP, de 3922 Da est composée de 37 AAs (**Figure 9**). Elle peut-être décomposée en 2 zones distinctes : la première concernant les sept premiers AAs en N-ter (1-7), et la seconde correspondant aux 30 AAs suivants (8-37).

Les résidus en position 1 à 7 en N-terminal sont plutôt désorganisés, mais jouent un rôle dans la stabilité conformationnelle des monomères par la présence d'un pont disulfure entre le 2^{ème} et le 7^{ème} acide aminé¹¹⁴.

Le fragment 8-37 d'un monomère d'IAPP présente quant à lui les caractéristiques importantes pour l'agrégation et la toxicité des dépôts amyloïdes ; les modélisations moléculaires admettent une forme « brin β -coude-brin β » : la présence de deux brins β ¹¹⁴⁻¹¹⁵, en position 8-17 et 28-37 reliés par un coude en position 18-27 (**Figure 9b**). De plus, une étude de 2016 a montré l'existence de cinq associations supplémentaires basées sur la même forme (mais en quantité moins abondante), favorables à leur dimérisation¹¹⁶. La protéine IAPP est composée de 6 Asparagines (symbole N), ce qui représente un nombre important, compte tenu de sa faible quantité d'acides aminés. Ceci implique que ces AAs polaires jouent des rôles diverses dans l'agrégation sous forme de fibres amyloïdes¹¹⁷⁻¹¹⁹, par des modifications post-transcriptionnelles favorisant la formation de fibres IAPP. Leur présence joue également un rôle dans la stabilité des protofibres, en facilitant la formation des liaisons hydrogènes.

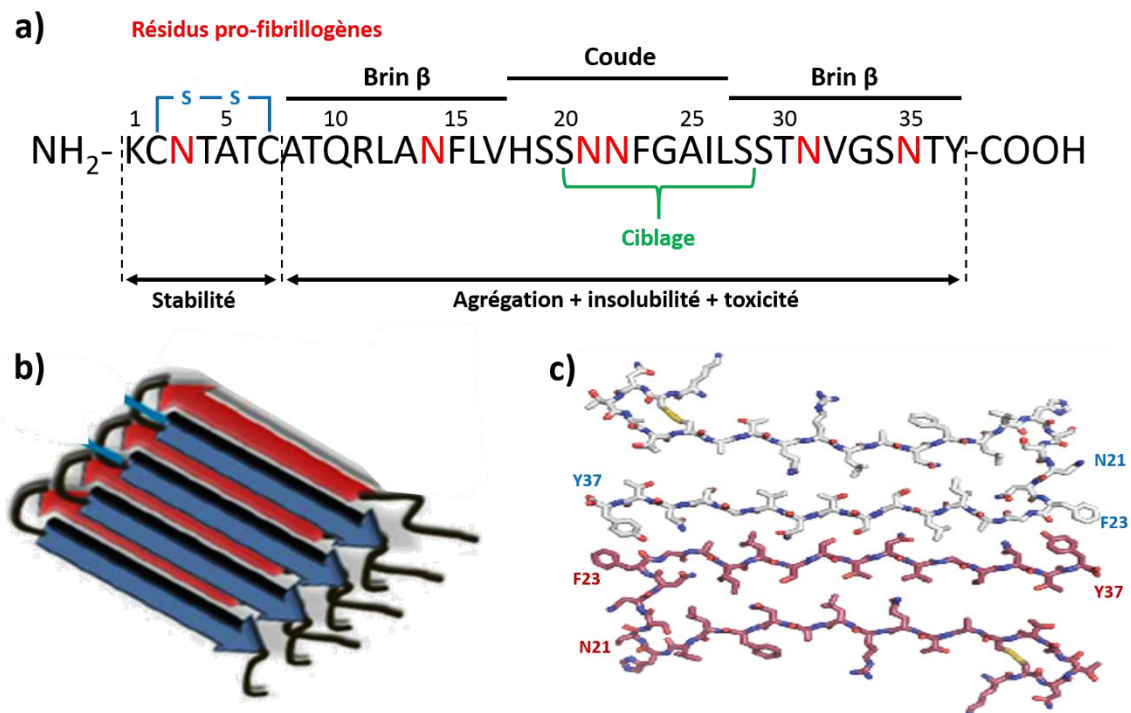


Figure 9. La protéine IAPP humaine ; a) Séquence de la protéine IAPP humaine ; b) Modèle d'interaction de feuillets β d'IAPP ; c) Représentation d'appariement de brins β entre deux monomères d'IAPP. (D'après Wang *et al.* 2012)¹²⁰

Par ailleurs, les AAs en positions 20-29 semblent fondamentaux pour l'agrégation¹²¹. En effet, leur substitution ou leur délétion implique une baisse significative, voire même

l'absence de la fibrillation (résidus 23-27, β -breaker). Ces régions semblent donc intéressantes pour le ciblage des fibres IAPP, mais s'opposent à beaucoup de modèles amyloïdes (dont A β ₁₋₄₂ et TTR-V30M), par le fait que la région critique pour la fibrillogénèse ne soit pas située dans un feuillet β , mais dans le coude qui les lie¹¹⁵.

Concernant l'interaction entre monomères d'IAPP, une des formations les plus classiques admet un appariement de brins β antiparallèles (aussi appelée structure en fermeture éclair stérique), perpendiculairement à l'axe d'élongation de la protofibre (**Figure 9c**). En revanche, les interactions régissant ces appariements sont encore aujourd'hui mal établis¹²², ceci notamment dû au polymorphisme fibrillaire, mettant en cause des interactions entre certains résidus (ou d'autres) suivant les études. Le peptide SSTNVG issue des positions 28-33 peut d'ailleurs s'agréger en formant des brins β spontanément, tout comme le peptide NNFGAIL (21-27)¹²². Pourtant, ces deux derniers forment un ensemble « coude-brin β » dans la protéine entière.

II.5.3. La protéine TTR-V30M

La protéine TTR, aussi connue sous le nom de pré-albumine, est composée de 127 acides aminés (**Figure 10a**). Sous sa forme non mutée, elle s'associe pour former un tétramère de 55 000 Da. Ses quatre sous-unités sont identiques, et forment deux dimères qui présentent un cœur hydrophobe à leur interface, servant de liaison à la thyroxine, une hormone thyroïdienne. Chaque dimère est composé de deux monomères, formant deux feuillets β de quatre brins β (notés de A à H, DAGH et CBEF), contribuant à la stabilité de la molécule. Structuralement, les monomères de TTR-V30M ne sont pas très différents de la TTR.

En effet, on retrouve les 8 brins β organisés en deux feuillets β ainsi qu'une hélice α , leurs positions déterminées par diffraction des rayons X¹²³⁻¹²⁴ (**Figure 10b**). Le potentiel amyloïdogéniques de variants tels que TTR-V30M, provient d'une modification structurale perturbant la structure et la stabilité des monomères¹²⁵. Cela diminue sans empêcher totalement la formation de tétramères (d'où des affinités encore élevés pour la thyroxine¹²⁶), et facilite l'insolubilité des monomères. La mutation Val30Met agit sur le groupe thiol de la cystéine en position 10, se traduisant essentiellement par une diminution de protection de la structure tétramérique, inhibant leur formation¹²⁷. Des homotétramères de TTR-V30M sont quand même présents mais en plus faible concentration. Certaines études s'accordent pour dire qu'il existerait en solution un équilibre dynamique entre les homotétramères de TTR-V30M malgré quelques changements conformationnels¹²⁸, et des formes monomériques et oligomériques conduisant à des dépôts fibrillaires^{124,126}.

Les mécanismes d'interactions entre monomères afin de former des fibres de TTR-V30M sont aujourd'hui mal connus, mais une représentation de leur structure est proposée par empilement des monomères, dans l'axe d'élongation des fibres¹²³ (**Figure 10c**). Dans ces modèles, chaque fibre de TTR-V30M est composée de deux à cinq protofibres.

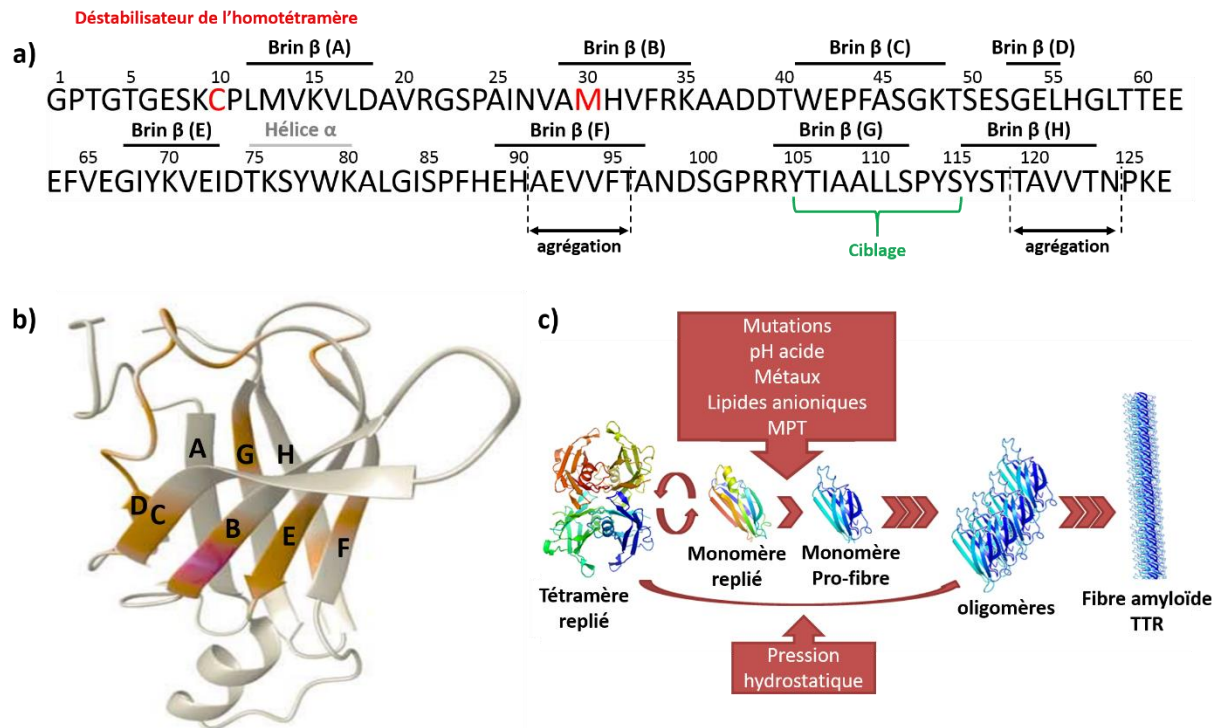


Figure 10. La protéine TTR-V30M humaine ; a) Séquence de la protéine TTR-V30M humaine ; b) Modèle d'un monomère de TTR-V30M (d'après Liu *et al.* 2002)¹²³, avec ses 8 feuillets β ; c) Représentation d'appariement de monomères de TTR formant des protofibrilles (adapté de Azevedo *et al.* 2013)¹²⁹ ; MPT : modifications post-transcriptionnelles.

Contrairement à la protéine IAPP et au peptide Aβ₁₋₄₂, plusieurs séquences sont importantes pour l'agrégation de TTR-V30M sous forme de fibres^{124,130-132}. Des études récentes ont montré que ces séquences sont situées dans les brins F, G ou H (séquences en positions 91-96, AEVVFT, et en position 119-124, TAVVTN)¹²⁴. En effet, la substitution d'un des AAs de AEVVFT ainsi que de TAVVTN empêche l'agrégation sous formes de fibres amyloïdes. L'utilisation d'inhibiteurs d'agrégation, les ciblant sur la protéine TTR-V30M entière, procure le même effet.

Enfin, les séquences issues des positions 105-115 (notées YS-11, YTIAAL, LLSPYS)^{127,133} ont été identifiées dans la littérature, comme significatives dans la fibrillogénèse^{131,133-134}. Plus particulièrement, le peptide YTIAALLSPYS une fois isolé, a été étudié comme modèle pour comprendre l'agrégation fibrillaire en général. Il s'agrège spontanément sous forme de fibres *in vitro*, et correspond à une région en brin β de TTR-V30M selon certains modèles moléculaires.

III. Stratégies diagnostiques

Nous avons pu voir que les fibres amyloïdes sont complexes, organisées, et qu'elles ont autant de points communs que de divergences structurales. Nous ne parlerons ni de ciblage des oligomères amyloïdes (voir Introduction générale-II.4.), ni de l'utilisation des ARNs interférents diminuant la production de protéine amyloïde *via* leur ARN messager, car ils relèvent essentiellement du domaine thérapeutique.

Lors d'une suspicion d'amyloïdose en clinique, la stratégie diagnostique la plus utilisée est basée sur une méthode invasive et longue : des biopsies, suivies d'une identification de la maladie par coloration (Rouge Congo), et une troisième étape pour déterminer la protéine amyloïde impliquée, par spectrométrie de masse. Idéalement, l'essentiel de la progression dans le domaine diagnostique est de simplifier et systématiser les méthodes, tout en les rendant moins invasives, avec une approche théranostique (diagnostic et traitement en même temps, ou du moins précocement dans l'évolution de la maladie pour un traitement efficace). L'imagerie clinique peut combiner différentes techniques (imagerie multimodale, voir Introduction générale-III.3.), devenant l'approche privilégiée dans ce contexte. Cependant, encore faut-il pouvoir discriminer les dépôts amyloïdes des autres structures biologiques. Cette approche multimodale implique donc la mise au point de ligands discriminants, de leur greffage à la surface d'agents détectables par imagerie médicale, et la sélection des imageries nécessaires et suffisantes pour le diagnostic clinique (par addition de données fonctionnelles et structurales).

Tout d'abord, une multitude de molécules ont déjà été sélectionnées et testées dans la littérature afin de cibler les fibres amyloïdes. Certaines d'entre elles peuvent interagir avec l'ensemble ou une partie des amyloïdoses (on parlera dans la suite de ce travail de ciblage générique), pendant que d'autres sont capables de cibler une amyloïdose en particulier (ciblage spécifique).

Dans un second temps, ce ciblage doit être accompagné d'une interface de détection adaptée à l'imagerie médicale : le développement d'objets à l'échelle du nanomètre, appelés nanoparticules, permet de combiner différentes techniques d'imageries, pour des applications cliniques. Les nanotechnologies étant un domaine en plein essor, nous ferons un bref résumé des nanoparticules les plus utilisées.

Enfin, la progression des technologies modernes en matière d'imagerie médicale depuis vingt ans, a permis leur utilisation pour visualiser différentes sortes de pathologies, dont les amyloïdoses. Deux techniques sont principalement pratiquées, et idéalement combinées dans une même machine: l'Imagerie à Résonance Magnétique (IRM), et la Tomographie à Emission de Positons (TEP).

III.1. Les ligands des amyloïdoses

Il existe deux types de ciblage possibles : le ciblage passif et le ciblage actif. Le ciblage passif, est la capacité d'un produit (dont certaines nanoparticules) à s'accumuler spontanément au niveau de tissus ou de structures caractéristiques. Par exemple, les tumeurs sont des structures hyper-vascularisées, avec une perméabilité provoquée par une inflammation locale (effet EPR, ou *enhanced permeability and retention effect*), favorisant leur accès à certains cibles particuliers. Ce type d'adressage ne concerne pas les amyloïdoses que nous ciblons. Nous parlerons seulement de ciblage actif dans ce travail, c'est-à-dire la capacité de certains composés actifs, appelées ligands, à interagir spécifiquement avec une cible donnée (**Table 2**). Nous détaillerons les plus utilisées, en présentant leurs avantages et leurs défauts.

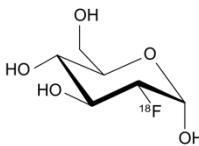
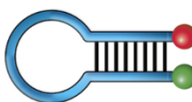
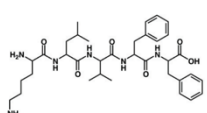
Type	Petite Molécule	nanocorps	Aptamère	Peptide
Taille	<1nm <0.5kDa	≈ 15kDa	5-15 kDa	≈ 1 – 4 nm ≈ 0.5 – 2 kDa
Exemple	 [¹⁸ F]-FDG	 B10	 Aptamère β55	 KLVFF
Avantages	Affinité Toxicité faible Passage des barrières biologiques	Affinité Toxicité Faible	Affinité Petite taille	Spécifique Toxicité faible Petite taille Facile à produire
Inconvénients	Non spécifique Production	Non spécifique Taille	Non spécifique Production	Affinité faible Dégradé <i>in vivo</i>

Table 2. Différentes classes de ligands pour les amyloïdoses, selon leurs types, leurs tailles et leurs spécificités communes. (Adapté de James *et al.* 2012)¹³⁵

III.1.1. Ciblage générique des amyloïdoses

- Le Rouge Congo

Une majeure partie des fibres amyloïdes possède la propriété d'interagir avec certains colorants organiques, tels que le Rouge Congo (RC). Cette molécule diazoïque est la première molécule qui a été identifiée comme interagissant sélectivement avec les dépôts amyloïdes. Initialement, le RC permettait de visualiser les agrégats par une augmentation de leurs propriétés dichroïques³ en lumière polarisée. Il est également très utilisé *in vitro* pour montrer la présence de fibres amyloïdes qui prennent une forte coloration rouge, avec un déplacement

du maximum d'absorbance du RC de 490 à 540 nm. Le RC aurait également un rôle inhibiteur sur la formation des oligomères et des fibres, tout en stabilisant des formes monomériques et partiellement repliées¹³⁶⁻¹³⁷.

Les interactions du RC avec les fibres amyloïdes sont non-ioniques, mais les mécanismes les régissant sont aujourd'hui mal compris et sujets à interprétations (parallèlement ou perpendiculairement à l'axe d'élongation de la fibre¹³⁶⁻¹³⁸ par exemple). De plus, le RC est de moins en moins utilisé car potentiellement toxique *in vivo*¹⁴⁶, et son interaction avec des formes natives en fait un outil de diagnostic à utiliser avec grande précaution¹³⁸. Même si une multitude de dérivés ont été mis au point pour pallier à certains de ces défauts¹³⁹⁻¹⁴⁰ (FSB, X-34, BSB...), l'étude d'autres ligands, comme la Thioflavine, est privilégiée depuis les années 2000 pour l'étude *in vivo* des maladies associées.

- La Thioflavine T

La Thioflavine T (ThT) est une molécule organique chargée qui interagit avec les fibres amyloïdes sans en inhiber la formation. Ce benzothiazole est utilisé depuis les années 1960 pour caractériser la présence des dépôts fibrillaires¹⁴¹, en formant un complexe fluorescent avec ceux-ci et avec une bonne affinité (de l'ordre du micromolaire). Ce complexe se traduit par le passage d'une conformation dite « libre » de la ThT, à une conformation dite restreinte, en empêchant la rotation d'un cycle aromatique autour d'une liaison entre deux carbones (**Figure 11a**). Ce phénomène a deux implications sur la ThT : un déplacement des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission, respectivement de 385 à 440 nm et de 485 à 490 nm, et une importante augmentation du rendement quantique due à la diminution des degrés de libertés, se traduisant par une exaltation significative de sa fluorescence (**Figure 11b**). Par ailleurs, la ThT est substituable pour le ciblage des agrégats amyloïdes par la Thioflavine S (ThS).

La ThT peut interagir avec des formes partiellement structurées, telles que les oligomères, mais l'augmentation de l'intensité de fluorescence est beaucoup plus faible, tandis qu'aucun changement dans l'intensité de fluorescence n'est observable avec des formes seulement monomériques¹⁴². La ThT est également utilisée pour des tests de compétitions avec de nouveaux ligands supposés plus affins (tels que le Fullerene¹⁴³).

De la même manière que pour le RC, de nombreux modèles d'interactions entre les fibres et la ThT ont été proposés, mais une interaction de type électrostatique avec les résidus aromatiques des peptides amyloïdes semble être la plus admise¹⁴⁴⁻¹⁴⁵. Dans ce cas, l'orientation est probablement parallèle à l'axe d'élongation des fibres (**Figure 11c**).

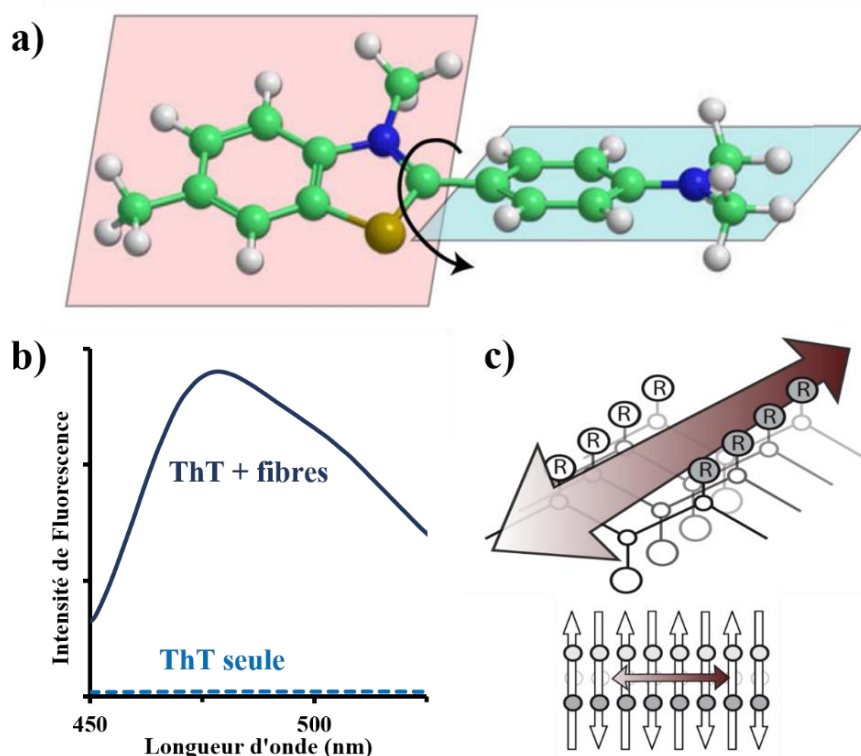


Figure 11. Représentation structurale d'interaction ThT-fibres. a) Représentation de la ThT, avec une rotation autour de deux cycles aromatiques (plan rose et plan bleu) en conformation « libre » ; b) Intensité de fluorescence de la ThT avec ou sans fibres $A\beta_{1-42}$ en fonction de la longueur d'onde d'émission ; c) Représentation possible d'interaction entre les feuillets β de fibres amyloïdes et la ThT (flèche marron). (a et c adaptés de Biancalana *et al.* 2010)¹⁴⁵

Ainsi, La ThT est un candidat intéressant pour le ciblage de fibres amyloïdes *in vivo*, mais l'est encore plus concernant certains de ses dérivés. En effet, des modifications chimiques ont permis de la rendre plus affine, et plus stable pour le ciblage des fibres amyloïdes.

- Le *Pittsburgh compound B*

Le *Pittsburgh compound B* (PIB) est un dérivé neutre de la ThT, par le retrait de trois groupes méthyles et de la charge positive du colorant d'origine (**Figure 12**).

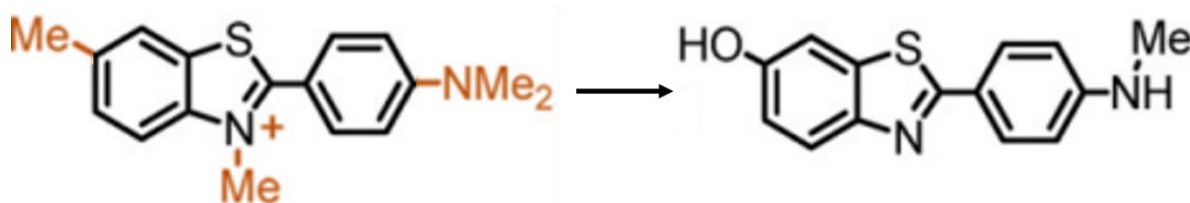


Figure 12. Structures comparées de la ThT (gauche) et du PIB (droite).

Les modélisations d'interaction sont sensiblement les mêmes que ceux de la ThT, mais les modifications apportées semblent augmenter la profondeur d'insertion du PIB au niveau de

ses sites de fixations, et favorisent ainsi les interactions hydrophobes et stériques¹⁴⁶. Le PIB est très important aujourd'hui en clinique lorsqu'il est associé au carbone 11 (voir Introduction générale-III.3.1.). En effet, il est très affiné pour plusieurs types de fibres¹⁴⁷⁻¹⁴⁹, ne présente pas de toxicité pour les tissus cibles, peut traverser certaines barrières biologiques, et sa fixation est corrélée à l'atrophie cérébrale engendrée chez les patients atteints de MA¹⁵⁰. De plus, il est capable d'interagir avec toutes sortes de structures amyloïdes, et notamment celles présentes précocement dans les amyloïdoses¹⁵¹⁻¹⁵³. Une évaluation *in vitro* de 2017 a montré que le PIB peut se lier aux fibres, protofibres et oligomères d'A β ₁₋₄₂ avec une affinité décroissante¹⁵¹.

En revanche, le PIB ne semble pas permettre de suivre l'évolution clinique des amyloïdoses¹⁵⁴, et le ciblage générique qu'il représente, oblige une seconde étape d'identification de la protéine impliquée. De plus, la fixation du PIB dans le cerveau de patients non atteints de démence voire même complètement sains¹⁵⁵⁻¹⁵⁶, pose la question de l'efficacité de ce cibleur (une étude rétrospective montre qu'une partie des patients appartenant au groupe supposé contrôle non dément, est PIB-positifs au moment de l'étude, et que seulement 25 % d'entre eux seront diagnostiqués atteints de la MA dans les trois ans¹⁵⁷).

Quoi qu'il en soit, le PIB reste à ce jour, l'une des références (*gold standard*) utilisée pour caractériser les dépôts amyloïdes *in vivo* et *post mortem*¹⁵⁸, mais n'est pas exempt d'inconvénients. Pour pallier à ces défauts, de récentes études menées sur des fragments d'anticorps, offrent des perspectives innovantes pour la détection des agrégats amyloïdes, et pourraient à terme remplacer ce *gold standard*.

- Les nanocorps

Un nanocorps, ou *nanobody*, est un fragment d'anticorps correspondant à un seul domaine variable d'un anticorps à chaîne lourde. Leur découverte récente s'avère très intéressante dans le domaine des nanotechnologies, combiné aux stratégies diagnostiques. En effet, un anticorps conventionnel (détaillé en **Figure 13**), est une glycoprotéine multi-domaines du système immunitaire qui, utilisé dans le domaine de la recherche biomédicale, a l'inconvénient d'être très immunogène. Or, ceci n'est pas le cas des nanocorps. Les premiers d'entre eux à avoir été utilisés proviennent d'anticorps de faible poids moléculaires, appartenant à des animaux de la famille des *Camelidae*¹⁵⁹ (chameaux, lamas et vicuñas). Ils correspondent aux domaines variables de la chaîne lourde, notés VHH. Ces domaines VHH sont les plus petits fragments clivables sans perte d'interaction antigénique. Ils présentent plusieurs avantages¹⁶⁰⁻¹⁶¹ comparé aux constructions d'anticorps existantes : ils sont tout autant spécifiques et stables, plus faciles à produire et à sélectionner (immunisation d'animaux suivi de sélection par phage display), et de plus petites tailles (environ 15 kDa contre 150 kDa pour un anticorps entier et 50 kDa pour le fragment Fab). De plus, certains d'entre eux sont intéressants de par leur capacité à passer à travers certaines membranes biologiques (reconnaissance d'antigènes spécifiques membranaires)¹⁶².

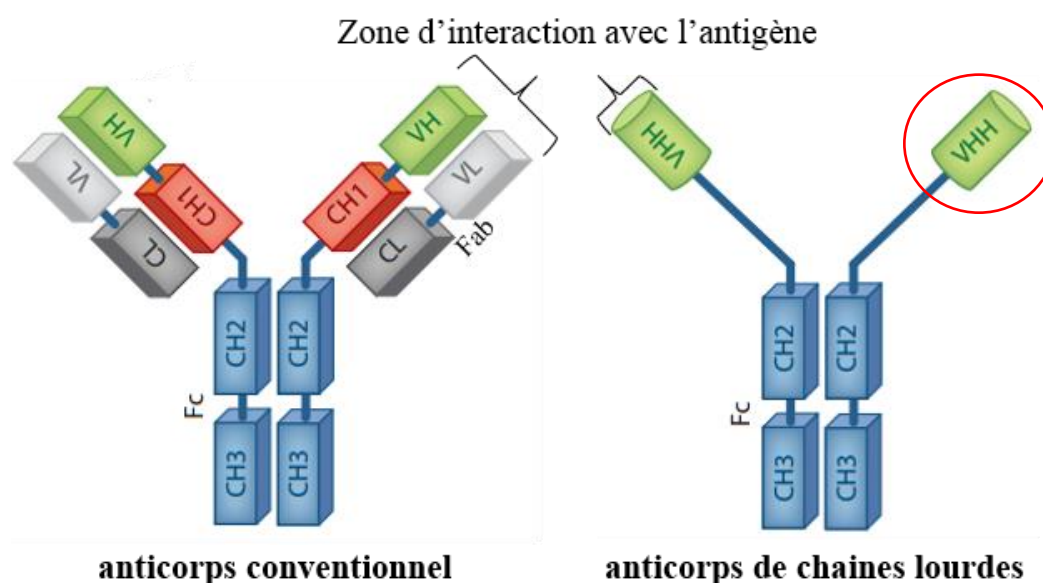


Figure 13. Représentation schématique de deux anticorps ; un anticorps classique (gauche), composé de deux chaînes légères (L pour *light*) et de deux chaînes lourdes (H pour *heavy*), formant des fragments constants (Fc), composés des domaines constants des chaînes lourdes (C pour constant, CH2 et CH3) et des fragments Fab, constitués des parties variables de la chaîne lourde, de la chaîne légère (V pour *variable*, VH et VL), et des parties CH1 et CL ; l'anticorps sans chaîne légère (droite) est composé de deux chaînes lourdes à seulement trois domaines, formant également un fragment Fc (CH2 et CH3), et une partie variable VHH qui correspond au nanocorps (cercle rouge, d'après Muyldermans *et al.* 2013)¹⁶⁰.

Une grande variété de nanocorps provenant d'anticorps de *Camelidae* a été sélectionnée ces dix dernières années pour interagir avec des protéines amyloïdes sous des formes fibrillaires (Nb23 contre la β 2-microglobuline¹⁶³, cAb-HuL6 contre le lysozyme¹⁶⁴, NbSyn2 contre l' α -synucléine¹⁶⁵, etc.). L'un d'entre eux, le nanocorps B10, semble prometteur pour des applications biomédicales¹⁶⁶.

Le B10 est un domaine VHH de *Camelidae* (≈ 15 kDa), généré par phage display, d'une librairie de domaines VHH recombinants, afin d'interagir avec la protéine $A\beta_{1-40}$ sous forme de fibres¹⁶⁶. Sa constante de dissociation (K_d) est estimée à 475 ± 54 nM pour les fibres $A\beta_{1-40}$. Elle est considérablement augmentée ($K_d = 7.22 \pm 0.97$ nM)¹⁶⁶, par la dimérisation du B10, dû à la liaison avec l'enzyme phosphatase alcaline (AP), formant un complexe nommé B10AP. Il a été montré que le B10AP est également affiné pour un large panel d'autres fibres amyloïdes *in vitro*¹⁶⁷, et ne reconnaît pas les formes monomériques et oligomériques. Ce dernier point en fait un excellent candidat pour le diagnostic des amyloïdoses par l'intermédiaire de leurs agrégats. De plus, ces études mettent en avant le fait qu'il puisse reconnaître plusieurs morphologies fibrillaires (formes linéaires, en curls, avec feuillets β parallèles ou antiparallèles, etc.). Ces études montrent aussi que le B10AP ne reconnaît pas toutes les fibres amyloïdes¹⁶⁷ : sa reconnaissance des agrégats amyloïdes est probablement due à plusieurs facteurs allant au-delà de la sélection conformationnelle¹⁶⁶⁻¹⁶⁷, tels que la charge de surface (interaction électrostatique)¹⁶⁸. Cependant, ce ligand reste à ce jour un candidat intéressant pour le diagnostic des maladies associées aux amyloïdoses, de par sa forte affinité pour les dépôts fibrillaires.

- Les autres molécules

Une grande diversité de petites molécules, de peptides et de nucléotides, ont été décrites comme ayant la capacité de cibler les dépôts amyloïdes, mais sont, soit moins appropriées aux stratégies cliniques, soit encore trop peu avancées en terme de recherche appliquée. Parmi elles, on peut citer :

- i. **les polyphénols tels que la curcumine et dérivés**, ciblant les dépôts amyloïdes d'A β et de TTR, inhibant leurs formations et retardant la dégénérescence neuronale¹⁶⁹. Ils sont composés de nombreux phénols interagissant avec les groupes aromatiques des fibres amyloïdes organisées, en plus de propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires. En particulier, la curcumine est la plus utilisée, mais présente des risques cytotoxiques, avec une affinité moindre pour les fibres que d'autres molécules. En revanche, elle semble plus prometteuse dans le domaine du traitement¹⁷⁰ (par encapsulation dans des nanoparticules par exemple).
- ii. **les porphyrines**, capables de se lier aux fibres d'A β et d' α -synucléine (impliquée dans la maladie de Parkinson) *in vitro*, tout en inhibant leur formation. Elles sont en revanche très toxiques *in vivo* et ne sont donc plus très utilisées, malgré la mise au point de dérivés moins toxiques¹⁷¹.
- iii. **les brucelles moléculaires, telles que CLR01 et CLR03**, des petites molécules utilisées très récemment, ayant un potentiel intéressant dans une approche théranostique des amyloïdoses en général¹⁷²⁻¹⁷³. Elles ciblent les dépôts fibrillaires tout en inhibant précocement la formation d'oligomères, et donc la toxicité associée aux amyloïdoses¹⁷².
- iv. **les aptamères d'ARN**, comme l'aptamère β 55¹⁷⁴, qui sont des oligonucléotides synthétiques antisens. Ils ont été sélectionnés pour cibler différentes architectures amyloïdes d'A β et d' α -synucléine, allant des oligomères, en passant par les protofibres, jusqu'aux fibres matures¹⁷⁴⁻¹⁷⁵. Cette non-spécificité est problématique en termes de diagnostic, en créant des potentiels faux positifs.

Quoi qu'il en soit, l'ensemble de ces molécules ciblent au moins deux amyloïdoses. Il a donc été intéressant, en seconde intention, d'identifier des molécules capables de cibler un seul type de dépôt amyloïde associé à des pathologies.

III.1.2. Ciblage spécifique des amyloïdoses

De la même manière que pour le ciblage générique, de nombreuses molécules ont été testées et sont encore améliorées aujourd'hui pour cibler efficacement les dépôts amyloïdes spécifiquement. Cette stratégie permettrait, à terme, de simplifier les méthodes diagnostiques existantes, en une seule étape d'identification de la protéine amyloïde (simplification, et réduction des coûts et du temps d'examen).

- Les anticorps

Les anticorps, comme l'anticorps anti-A β -Mab¹⁷⁶, greffé sur des liposomes, ciblent spécifiquement les peptides A β ₁₋₄₂ *in vitro*. Ils présentent cependant un grand risque d'immunogénicité *in vivo*, et leur taille importante ne permet pas un greffage efficace sur des nanoparticules pour la multimodalité. Ils n'ont pas grand intérêt dans l'approche diagnostique, mais montrent encore leur utilité pour comprendre les interactions et les passages des peptides amyloïdogènes à travers les membranes biologiques¹⁷⁶.

- Les peptides

L'étude précise des structures des protéines amyloïdes (voir Introduction générale-II.5.), a rapidement conduit à la mise au point de polypeptides de 5 à 10 AAs, homologues de séquences de fibres amyloïdes, avec une reconnaissance spécifique des dépôts amyloïdes correspondants. Ces peptides ont été sélectionnés selon deux critères principaux : leur reconnaissance spécifique des fibres, et/ou leur capacité à empêcher cette agrégation (zone β -*breaker*).

A la base de la stratégie théranostique spécifique de la maladie d'Alzheimer, on trouve le peptide KLVFF¹⁷⁷ et ses dérivés¹⁷⁸, séquence β -*breaker* de fibres A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂. Ce peptide a montré la capacité de cibler les fibres amyloïdes tout en inhibant leur formation. Ces deux critères sont d'ailleurs souvent corrélés, puisqu'une relation entre affinité et inhibition a été établie. Par exemple, le peptide FGAIL se lie aux extrémités des fibres IAPP *in vitro*¹¹⁵, et inhibe leur formation.

D'autres peptides ont été sélectionnés *in vitro* par phage display contre les fibres d'A β ₁₋₄₂, comme le peptide IFALMG¹⁷⁹ ou certains peptides plus longs de 20 AAs¹⁸⁰, sans homologie structurale.

Cependant, les peptides peuvent présenter l'inconvénient d'être dégradées par les protéases endogènes *in vivo*¹⁸¹, et avoir des affinités limitées pour les structures amyloïdes (de l'ordre de la dizaine de micromolaires dans les meilleurs cas¹⁸²). Pour pallier à ces défauts, certains procédés ont été envisagés : la cyclisation des peptides permet de les stabiliser et augmente leur pouvoir inhibiteur¹⁸³, tandis que l'encapsulation ou le greffage à des nanoparticules, peuvent jouer un rôle protecteur¹⁸⁴⁻¹⁸⁵.

III.2. Les nanoparticules dans le domaine biomédicale

Les nanoparticules, dont les trois dimensions doivent être à l'échelle nanométrique (inférieur à 100 nm), sont énormément utilisées de nos jours, et ce dans des domaines très différents (peinture, cosmétique, électronique, etc.). Elles sont rapidement devenues des éléments incontournables en médecine moderne de par leurs nombreux avantages et de par leurs compositions, variables et contrôlables : diffusion dans le corps, détection par imagerie médicale¹⁸⁶, délivrance de médicaments¹⁸⁷, potentialisation des radiothérapies¹⁸⁸, etc.

Un grand nombre de ces nanostructures, organiques et inorganiques, modifiées ou non avec différentes molécules, ont été utilisées pour cibler le cerveau et les plaques amyloïdes¹⁸⁹. En effet, il s'avère que les nanoparticules sont dans certains cas des moyens de détection

versatiles, sensibles et à faible coûts. A ce jour, la plupart des études incriminant les plaques amyloïdes et les nanoparticules sont menées sur la maladie d'Alzheimer et les dépôts A β , faisant intervenir des NPs de différentes natures :

- i. **Les particules magnétiques d'oxyde de fer** sont utilisées comme agents de contraste T₂ en IRM¹⁹⁰. Selon leurs tailles, leurs propriétés magnétiques diffèrent¹⁹¹ ; on discrimine les *Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide* (USPIOS, moins de 30 nm de diamètre), des *SuperParamagnetic Iron Oxide* (SPIONS, environ 100 nm de diamètre). Elles ont été par exemple fonctionnalisées avec le peptide A β ₁₋₄₀ afin de détecter des plaques séniles sur des modèles murins de la maladie d'Alzheimer¹⁹².
- ii. **Les nanoparticules d'or** sont également prometteuses. Elles absorbent fortement la lumière vers le proche infra-rouge, mais également les rayons X, très intéressant pour un usage en tomodensitométrie à rayons X¹⁹³. Couplées avec du cobalt(II), elles sont également utiles comme agents de contraste T₂ en IRM afin de cibler les dépôts A β ¹⁹⁴. L'usage de ces NPs a même permis de suivre l'auto-agrégation réversible du peptide A β ₁₋₄₀ en protofibres par IRM.
- iii. **Les nanocristaux semi-conducteurs fluorescents**, comme les boîtes quantiques (ou *quantum dots*, notées QD), ont permis l'étude de la formation des oligomères et des fibres *in vitro* d'A β ¹⁹⁵ (même chose pour IAPP). Les QDs ont la particularité de changer de propriétés optiques selon leurs tailles, et sont observés par microscopie à fluorescence ou à absorption.
- iv. **Les nanoparticules à base de polymères**, dans certains cas, ont été utilisées afin d'inhiber, voire arrêter la formation de fibres à partir des protéines amyloïdes A β et IAPP¹⁹⁶⁻¹⁹⁷. Les études existantes sont pour la plupart *in vitro* et utilisent la MET.
- v. **Les nanoparticules de silice**, présentent les surfaces les plus intéressantes, en matière de fonctionnalisation par un large panel d'agents de contraste (multimodalité) ou de biomarqueurs¹⁹⁸. Des recherches récentes usant de nanoparticules de silices vectorisées avec des peptides A β , ont permis une détection et une quantification précise des oligomères d'A β dans le liquide cébrospinal¹⁹⁹. Elles sont observées par MET et microscopie à fluorescence.
- vi. **Les nanoparticules à base de lanthanides**, et notamment de gadolinium, d'euprium ou de terbium, greffées avec les ligands adéquats, possèdent des propriétés intrinsèques permettant de suivre la fibrillation du peptide A β ₁₋₄₂. Cela pourrait être utile afin de suivre leur inhibition de fibrillation par des traitements expérimentaux²⁰⁰.

Ainsi, grâce à leurs propriétés intrinsèques et les possibilités de greffages, les NPs permettent d'entrevoir un potentiel important dans le diagnostic multimodal des pathologies en général, et des amyloïdoses en particulier. Le contrôle de leur biodistribution est une étape cruciale pour le diagnostic précoce de ces maladies, tout en diminuant les risques dus à leurs éventuels effets sur l'organisme. En effet, nous commençons à peine à entrevoir les effets des NPs sur la santé et l'environnement, du fait de notre manque de recul. Quoiqu'il en soit, notre projet de diagnostic précoce nécessitait l'usage de nanoparticules multimodales déjà testées, ayant une bonne biodistribution, et éliminées efficacement par le corps.

III.2.1. Les nanoparticules AGuIX

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons utilisé des nanoparticules inorganiques qui présentent les caractéristiques appropriées pour le diagnostic précoce des amyloïdoses par imagerie multimodale. Ces nanoparticules, appelées AGuIX (*Activation and Guiding of Irradiation by X-ray*), ont été développées par nos collaborateurs de Nano-H et de l'Institut Lumière Matière (Olivier Tillement et son équipe). Elles sont formées à partir d'un cœur d'oxyde de gadolinium, celui-ci enrobé par une couche de polysiloxane, cette dernière composée de tétraéthoxysilane (TEOS) et de 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES). Au cours de leurs synthèses, des ligands DOTA chélatant des ions gadolinium (Gd^{3+}) se situent à leurs surfaces, ce qui en font des agents de contraste de haute qualité pour l'IRM. En termes de dimensions, la taille finale de l'AGuIX est inférieure à 5 nm. De plus, ces NPs peuvent être détectées par plusieurs techniques biophysiques et d'imagerie, affiliées à la recherche et au domaine médical (**Figure 14**), et possèdent un fort pouvoir radiosensibilisant²⁰¹ (très pratique pour potentialiser les traitements par radiothérapie).

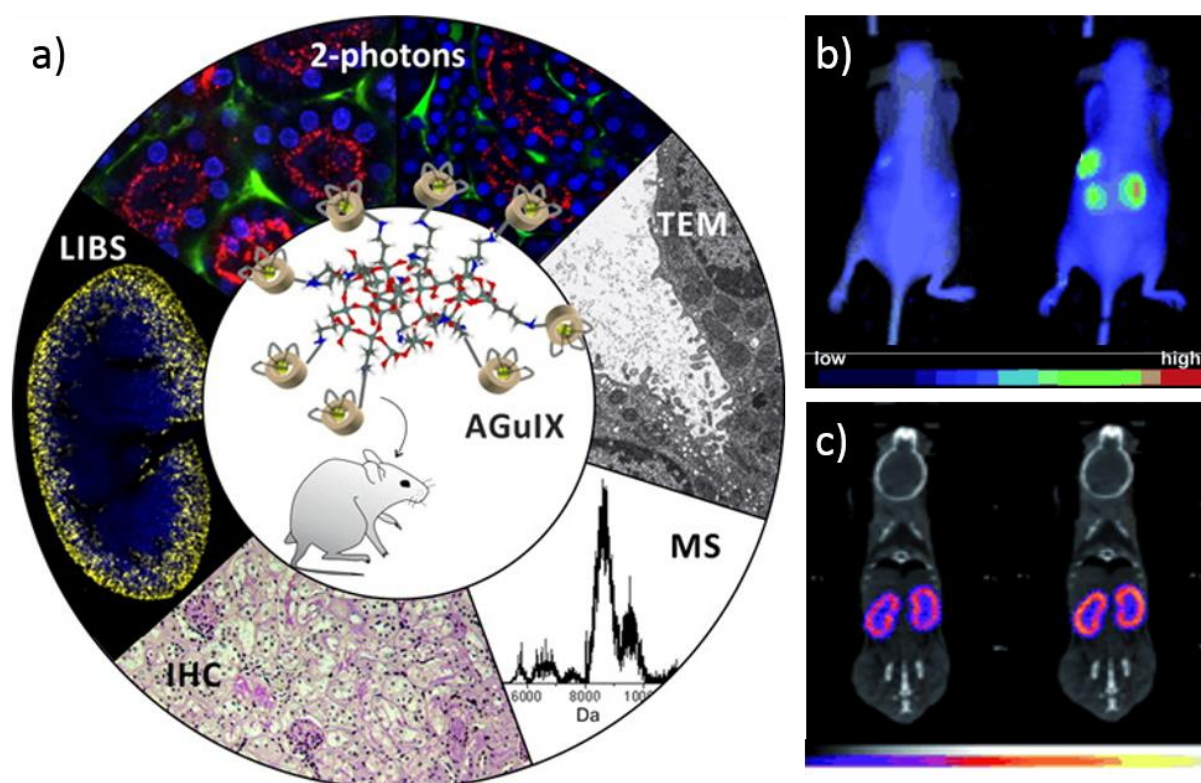


Figure 14. Représentation des différentes possibilités de détection de l'AGuIX en recherche biomédicale ; a) de l'*in vitro* à l'*in vivo* chez la souris (d'après Sancey *et al.* 2015)²⁰² ; 2-photon : microscopie biphotonique ; TEM : microscopie électronique à transmission ; MS : spectrométrie de masse ; IHC : immunohistochimie ; LIBS : spectroscopie sur plasma induit par laser. b) Fluorescence par onde évanescente avant (gauche) et après injection (droite) d'AGuIX sur une souris femelle swiss nude (d'après Lux *et al.* 2011)²⁰³ ; c) Imagerie *in vivo* par TEMP, 15 minutes (gauche) et 60 minutes (droite) post-injection d'AGuIX sur une souris mâle c57Bl/6J (d'après Lux *et al.* 2011)²⁰³.

Les études réalisées montrent que les AGuIX présentent une bonne biocompatibilité et une biodistribution adéquate²⁰³ (validée par fluorescence, scintigraphie et IRM). Elles sont également bien évacuées par l'organisme, ce qui a été montré par une excellente clairance rénale post-injection, suivie d'une élimination par les urines chez la souris²⁰², dont les temps d'élimination sont comparables aux agents de contrastes déjà utilisés dans le domaine médical. Une étude clinique est d'ailleurs en cours depuis quelques mois, utilisant les AGuIX dans le cas de traitement de glioblastomes par radiosensibilisation des NPs²⁰⁴.

Concernant les techniques d'imagerie médicale, les AGuIX peuvent donc être utilisées en IRM²⁰¹ (excellents agents de contraste grâce aux chélates de Gd^{3+}), mais également pour la tomographie par émission de position (TEP / TEMP)²⁰⁵ par complexation de gallium-68 ou de l'indium-111, ainsi que pour l'imagerie par fluorescence⁷⁶ (greffage de Cyanine 5.5 à leurs surfaces). Ces techniques présentent chacune des avantages et des inconvénients, suivant leurs domaines de compétences, décrites dans la suite de ce travail.

III.3. L'imagerie médicale

III.3.1. L'IRM

L'IRM est une technique d'imagerie radiologique et de diagnostic médical, basée sur la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), produisant des images bi- et tridimensionnelles. Son principe est détaillé en **Figure 15**. Théoriquement, cette technique a besoin que les spins des protons composant un noyau d'élément (le plus simple étant l'hydrogène) s'alignent grâce à un champ magnétique, fourni par un aimant. Un ajout d'énergie *via* une onde électromagnétique (ou onde radio) a deux conséquences : la synchronisation des protons (résonance), et une légère bascule de leur axe par rapport à l'axe de l'aimant. Après arrêt de l'onde radio, ils se désynchronisent et reviennent dans l'axe de l'aimant, en rendant l'énergie qui leur a été fournie. Une antenne capte ce signal restitué, et permet d'établir une image matricielle des protons. Ainsi, les images sont dites pondérées en T_1 lorsqu'on regarde le temps que mettent les protons à revenir dans l'axe de l'aimant (temps de relaxation), et dites pondérées en T_2 lorsqu'on regarde le temps que les protons mettent à se désynchroniser. Il existe également des examens particuliers, appelés cartographies T_1 et T_2 , qui permettent d'associer l'intensité de chaque pixel obtenu, à sa valeur de temps de relaxation T_1 ou T_2 . Ces examens admettent des différences après l'injection de produits de contraste avec une excellente résolution. Par ailleurs, les signaux issus de différents tissus du corps ne sont pas les mêmes: par exemple, dans la gamme de pondération T_1 , l'eau a un temps de relaxation long d'une seconde (hypo-signal, noir), contrairement à la graisse estimé à 250 millisecondes (hyper-signal, blanc).

Cette technique présente l'avantage d'être non invasive, sans effets secondaires connus et non irradiante (contrairement au scanner). L'IRM permet une étude des tissus mous (muscles et vaisseaux sanguins) avec une excellente résolution spatiale. Par ailleurs, l'utilisation des agents de contraste permet une meilleure observation de zones d'intérêts, dont le plus utilisé est le gadolinium. Cela permet par exemple de discriminer une zone vascularisée (ex : tumeur) d'une zone non vascularisée (ex : cavité liquidienne.). Cependant, cette technique d'imagerie présente des limites de sensibilité ce qui requiert des concentrations importantes en agents de

contraste (de l'ordre du micromolaire)²⁰⁶⁻²⁰⁷ et des risques dans le cas de corps étrangers métalliques chez le patient, notamment dans le cas d'anciennes prothèses. De plus, le traitement des images est générateur de nombreux artefacts²⁰⁸, et cette technique est plutôt onéreuse.

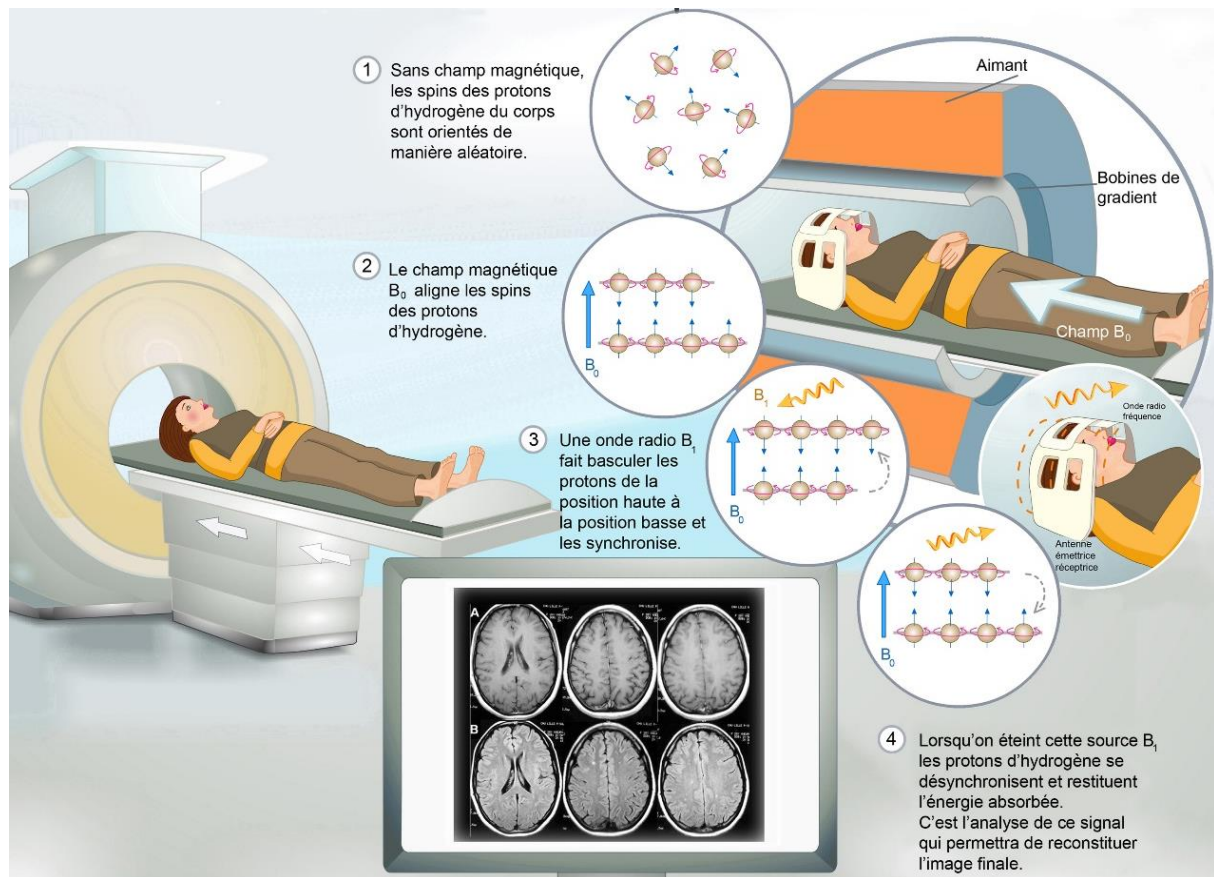


Figure 15. Représentation du principe d'IRM. (D'après <http://www.cea.fr/comprendre/Pages/sante-sciences-du-vivant/essentiel-sur-imagerie-medicale.aspx>)²⁰⁹

Concernant les amyloïdoses, l'IRM est principalement utilisée pour le diagnostic des maladies neurodégénératives, telle que la maladie d'Alzheimer. Cela est possible soit par observation d'une atrophie cérébrale²¹⁰, soit par détection de dépôts amyloïdes $A\beta$ ²¹¹. En effet, ces observations sont possibles tardivement dans la maladie, et ce sans agent de contraste, mais donnent une meilleure résolution et une détection plus précoce par injection de biomarqueurs associés au fluor (^{19}F)²¹². Par ailleurs, les injections de produits de contrastes sont limitées, ce qui est dû à la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui empêche leur passage. Trois inconvénients existent donc en utilisant l'IRM seule, dans le cadre de l'étude des amyloïdoses : les mesures *in vivo* usant d'agents de contraste requièrent une ouverture artificielle de la BHE (applicables à ce jour seulement chez l'animal²¹³, et en cours d'expérimentation chez l'Homme), l'observation possible des plaques séniles est souvent trop tardive dans la maladie²¹⁰ (voire *post mortem*), et elle requiert des tests complémentaires pour la confirmer (par des analyses psychiatriques, les *mild cognitive impairment*²¹⁴, ou par d'autres techniques d'imagerie, comme la TEP).

III.3.2. La TEP

La TEP est une méthode d'imagerie médicale, basée sur le principe de la scintigraphie, c.à.d. la détection de rayonnements d'isotopes radioactifs post-injection. On parle de méthode fonctionnelle car elle permet d'obtenir des images du fonctionnement des organes ou des tissus, par opposition aux imageries structurales basées sur l'anatomie (comme l'IRM). Son principe est résumé en **Figure 16**. L'isotope radioactif le plus utilisé est le Fluor 18 (^{18}F), fixé sur un analogue du glucose, le 2-deoxyglucose (FDG). En effet, le composé ^{18}F -[FDG] est un rapporteur du métabolisme du glucose, très actif au niveau du cerveau²¹⁵. Or, les cellules nerveuses en utilisent beaucoup moins dans un état dégénératif²¹⁶. La TEP est donc principalement utilisée en neurologie.

Cette technique est rapide (20 minutes environ), non-invasive, expose le patient à des rayonnements très faibles, et permet également un examen du corps entier si nécessaire, sans limite de pénétration. Elle permet des mesures quantitatives avec une excellente sensibilité (de l'ordre du picomolaire)²⁰⁷. Cependant, sa résolution spatiale est plus faible que l'IRM²¹⁵. Elle est contre-indiquée chez la femme enceinte, et peut présenter de très nombreux artefacts chez les patients diabétiques (dérégulation de la glycémie). De plus, le patient reste exposé à un rayonnement ionisant (même faible), et l'examen est relativement cher (autour de 1200 euros).

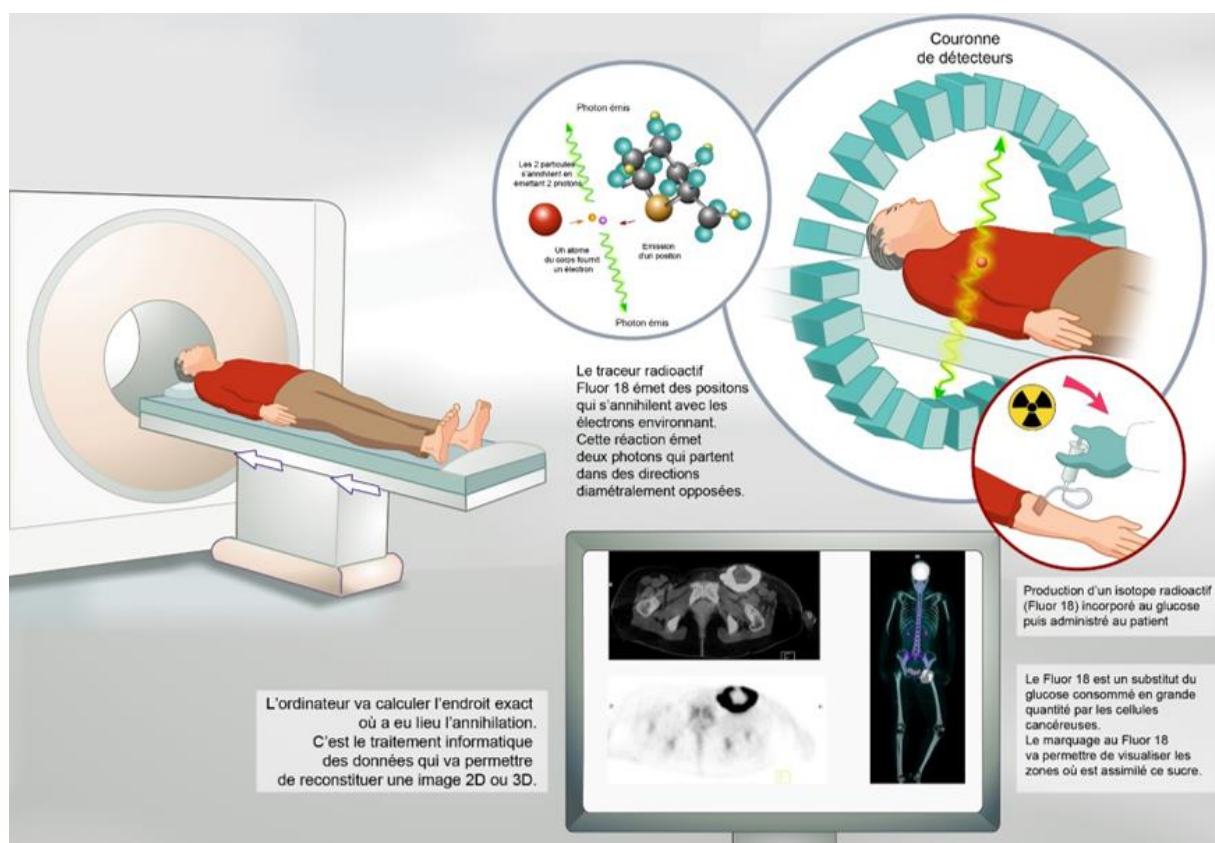


Figure 16. Représentation du TEP par injection de l'isotope radioactif ^{18}F . (D'après [http://www.ccea.fr/comprendre/Pages/sante-sciences-du-vivant/essentiel-sur-imagerie-medicale.aspx](http://www cea.fr/comprendre/Pages/sante-sciences-du-vivant/essentiel-sur-imagerie-medicale.aspx))²⁰⁹

Dans notre cadre de travail, La TEP est employée dans le diagnostic de la MA, par la diminution du métabolisme du glucose (observé par le ^{18}F -[FDG]), et surtout par le ciblage des plaques amyloïdes $\text{A}\beta^{217-218}$, par le PIB (**Figure 17**). Ce ciblage met en jeu principalement le radio-isotope carbone 11 (^{11}C) associé au PIB, le biomarqueur le plus utilisé en imagerie à ce jour²¹⁷ (voir Introduction générale-III.1.1.). La TEP a également été utilisée récemment dans le diagnostic d'amyloïdoses cardiaques liées à la TTR²¹⁹, et un large panel de molécules radiomarquées (isoformes du PIB) ont été testées *in vitro* interagissant avec des amyloïdoses à chaîne légères (AL) dans le pancréas et le foie²²⁰. Il est également possible, de par l'aspect quantitatif de la TEP, de suivre l'efficacité d'un traitement par la réduction de la charge amyloïde. Cependant, la limitation de l'usage du PIB en TEP provient également du temps de demi-vie très court du ^{11}C -[PIB] (20 minutes), ce qui implique un centre de production à proximité. Pour pallier à ce problème, des composés tels que le ^{18}F -[FDDNP], avec un temps de demi-vie plus long, ont été testés, mais montrent une fixation non-spécifique dans les tissus cibles²²¹.

III.3.3. Autres imageries et multimodalité

Même si ces techniques sont les plus triviales, notamment pour les maladies neurodégénératives, plusieurs autres techniques d'imagerie sont utilisées : la scintigraphie pour les dépôts à TTR-V30M¹⁵⁶, l'autoradiographie dans le cas des dépôts IAPP²²², la tomographie par émission monophotonique (TEMP), ou encore l'imagerie photoacoustique *in vivo* pour les plaques séniles²²³⁻²²⁴.

Tous ces types d'imagerie médicale ont leurs propres avantages et limitations¹³⁵ (**Table 3**), et il en ressort que l'imagerie unimodale n'est pas suffisante pour établir le diagnostic précoce des maladies associées aux amyloïdoses.

Type	Excitation	Résolution temporelle	Résolution spatiale	Sensibilité avérée	Quantité d'agents de contrastes	Avantages / inconvénients
Tomographie à Emission de Position (TEP)	Rayons γ	< 30 minutes	1 - 2 mm	1 pM	nanogramme	- Quantitative - Sensible - Production difficile de radioisotopes
Tomographie à émission monophotonique (TEMP)	Rayons γ	< 30 minutes	1 - 2 mm	10 pM	nanogramme	- sondes peu disponibles
Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)	Ondes radio	Quelques minutes à quelques heures	0,025 - 0,1 mm	10 μM	Microgramme au milligramme	- Haute résolution - Imagerie morphologique et fonctionnelle - Lente et de basse sensibilité
Tomodensitométrie	Rayons X	< 30 minutes	0,05 - 0,2 mm		Non appliquée	- Efficace pour les os ou tumeur mais pas pour les tissus mous
Imagerie photoacoustique	optique	Analyse en temps réel	$\approx 0,5$ mm		Non appliquée	- Non ionisant - Non invasif - Pas d'info fonctionnelles - Contraste faible

Table 3. Comparaison de différentes techniques d'imagerie médicale par leurs caractéristiques.

En effet, il s'avère de plus en plus important de combiner ces différentes techniques, afin de confirmer ou non un diagnostic, sans avoir recours à des techniques invasives. Cette multimodalité est devenue, depuis les années 2010, un secteur de la recherche médicale en plein développement²²⁵⁻²²⁷. La combinaison de la TEP et de l'IRM, est notamment séduisante, du fait de leurs nombreux avantages complémentaires, permettant des corrélations anatomo-fonctionnelles²²⁸ (**Figure 17**). Pour permettre cela avec une seule interface, les NPs peuvent combiner à leur surface des biomarqueurs, avec des agents de contraste et des isotopes radioactifs.

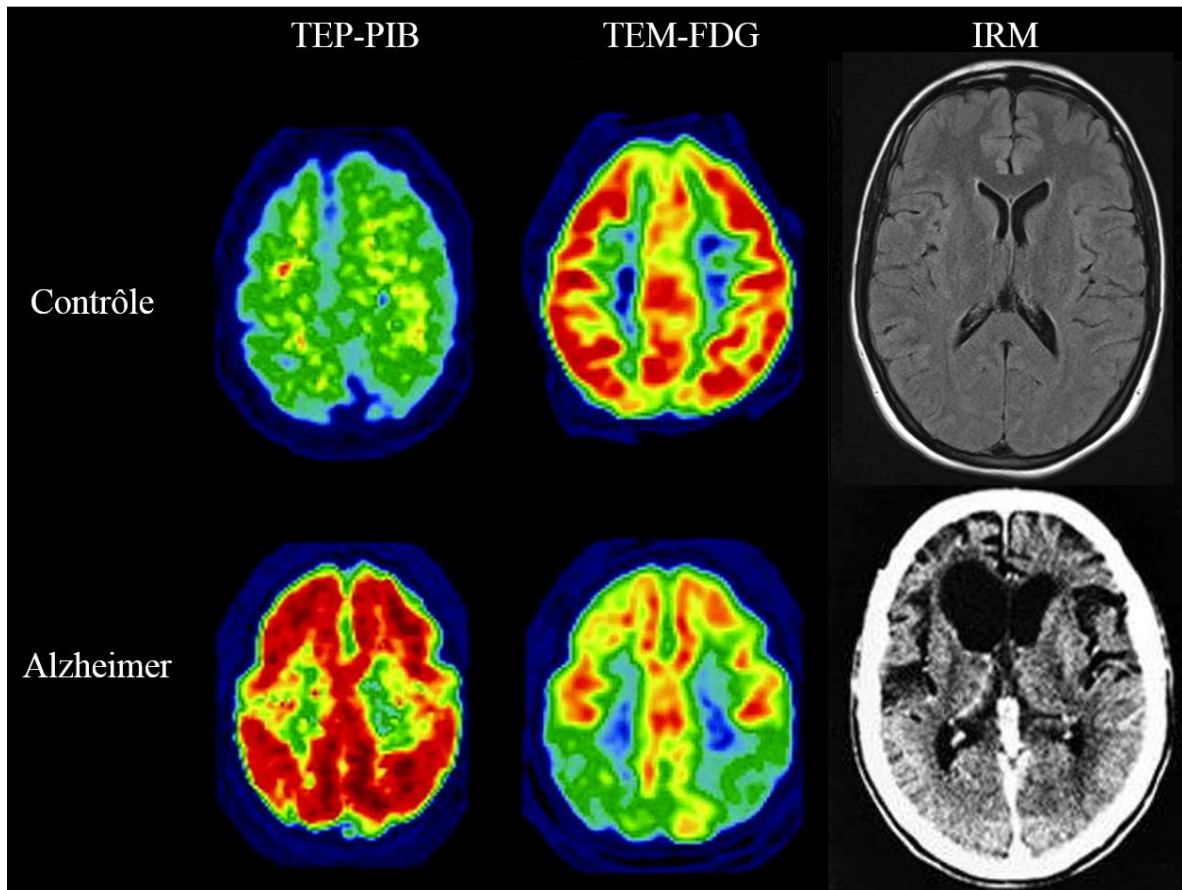


Figure 17. Imagerie multimodale de la maladie d'Alzheimer Vs patient sain sur des cerveaux ; la TEP-PIB montre l'accumulation de dépôts amyloïdes ; la TEP-FDG présente le déclin métabolique cortical du glucose (d'après Boxer *et al.* 2007)²²⁹ ; l'IRM met en avant l'atrophie cérébrale chez les patients Alzheimer âgées.

Projet de recherche

Nous avons vu que le diagnostic des amyloïdoses était invasif et difficile, dû à l'absence ou la non spécificité des symptômes, et qu'il représentait dans de nombreux cas, un enjeu de santé publique important. Il requiert des biopsies au niveau des tissus suspectés, suivi d'une identification en deux étapes : la reconnaissance non spécifique de l'amyloïdose, suivie du typage de la protéine concernée. Dans ce contexte, afin de simplifier une méthode de diagnostic spécifique et précoce, nous avons recherché dans ce travail des méthodes simples et non-invasives de détection des dépôts amyloïdes (**Figure 18**), basées sur des techniques d'imagerie à visée médicale. Pour cela, nous avons travaillé sur 12 types de fibres amyloïdes différentes.

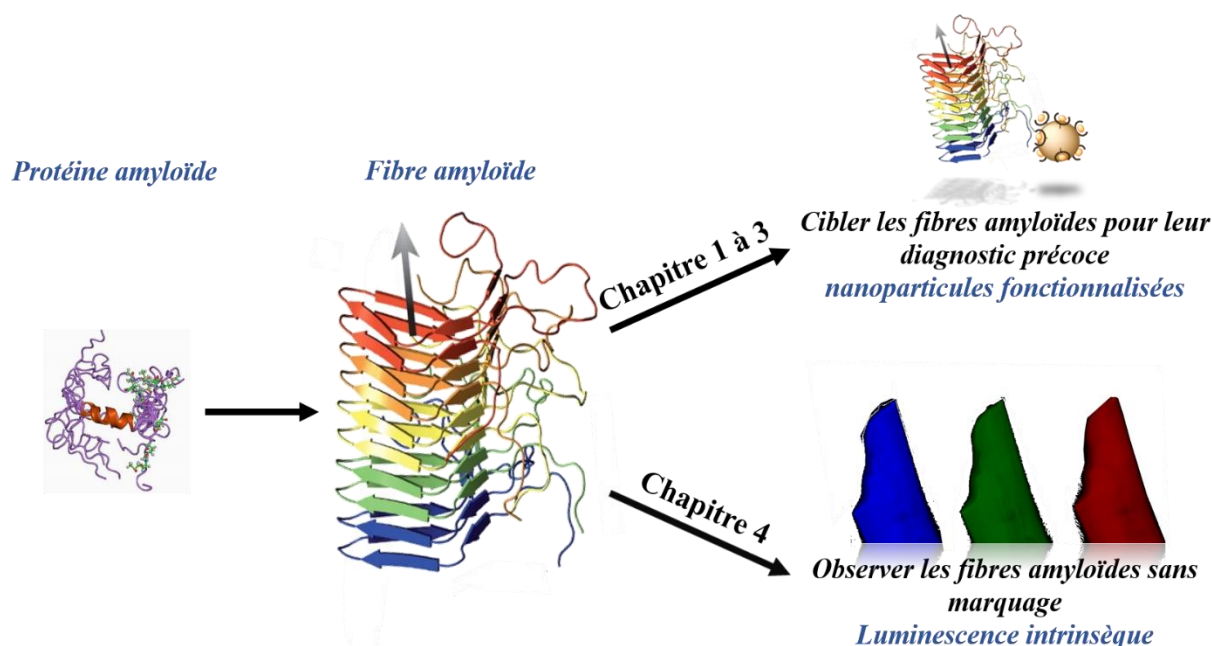


Figure 18. Schéma du projet de recherche en 2 parties.

Parmi les stratégies développées pour détecter les amyloïdoses, la mise au point de molécules ciblant des structures communes aux fibres, les feuillets β , a été largement étudiée ces dernières années. Ces molécules, génériques des feuillets β ou spécifiques de certaines séquences peptidiques, ont déjà montré leur potentiel diagnostique, et leur liaison à des nanoparticules multimodales pourraient, à terme, être extrêmement utiles en imagerie médicale.

La première partie de mes travaux de thèse a consisté à établir une preuve de concept concernant la détection de trois types de fibres amyloïdes, liées à des pathologies diverses, composées du peptide $A\beta_{1-42}$ (MA), de la protéine IAPP (DNID), et de la protéine TTR-V30M (PNF-TTR). Ces analyses ont été menées à l'aide d'un agent d'imagerie sur lequel ont été greffés des ligands des fibres amyloïdes (Chapitre 1 à 3). Notre approche repose sur l'utilisation d'une particule à l'échelle du nanomètre (< 4 nm), comme plateforme de greffage, permettant l'observation d'interactions par différentes techniques d'imagerie (multimodalité). L'interaction de ces nanoparticules AGuIX fonctionnalisées, avec des molécules connues pour reconnaître un large panel de fibres amyloïdes (Chapitre 1), ou avec des peptides spécifiques de chaque type de dépôts amyloïdes (Chapitre 2), a été établie. Ces résultats ont requis des

méthodes biophysiques *in vitro* pour la détermination d'affinités, histologiques sur des tissus pathologiques de souris *ex vivo*, et par imagerie *in vivo* sur ces modèles murins (Chapitre 3).

La seconde stratégie adoptée au cours de ma thèse a consisté à montrer l'existence de propriétés optiques, originales et communes entre les fibres amyloïdes, utiles pour leur détection. Pour cela, nous avons effectué une étude systématique *in vitro* par spectrophotométrie au niveau du spectre visible (de 300 à 800 nm), sur 13 protéines différentes formant des fibres amyloïdes. Nous avons isolé plusieurs effets propres aux structures fibrillaires, et établi des propriétés communes de phosphorescence dans l'UV-vis mais aussi de luminescence dans le proche infra-rouge (Chapitre 4). Ces résultats prometteurs ont été prolongés sur des tissus pathologiques *ex vivo* de modèles murins, ainsi que par des tests *in vivo* concernant des souris modèles de la maladie d'Alzheimer.

D'autre part, la découverte et la caractérisation de propriétés remarquables associées aux fibres amyloïdes représentent encore aujourd'hui un vaste domaine de recherche, tant en recherche fondamentale qu'en recherche appliquée. En particulier, leurs propriétés optiques originales pourraient permettre leur observation directe sans l'intervention de quelconque marqueur. A ce jour, seules des propriétés de luminescence au niveau du proche ultraviolet (UV-vis) ont été constatées.

Chapitre 1 : Détection générique des amyloïdoses

I. Introduction

Dans un premier temps, nous avons voulu établir une première preuve de concept de ce projet de thèse : la construction d'un complexe contenant une nanoparticule avec des propriétés multimodales d'imagerie (IRM, TEP, fluorescence), celle-ci fonctionnalisée par un cibleur générique des fibres amyloïdes, ayant la capacité d'interagir avec les fibres *in vitro* et des dépôts *ex vivo* (**Figure 19**). Pour confirmer l'utilité de cette stratégie, ces complexes originaux doivent remplir plusieurs conditions : leurs affinités pour les fibres doivent être au moins équivalentes à celles de produits déjà utilisés, ils doivent garder leurs propriétés multimodales post-greffage, et cibler les dépôts amyloïdes des tissus pathologiques sans ciblage non spécifique pour d'autres structures biologiques.

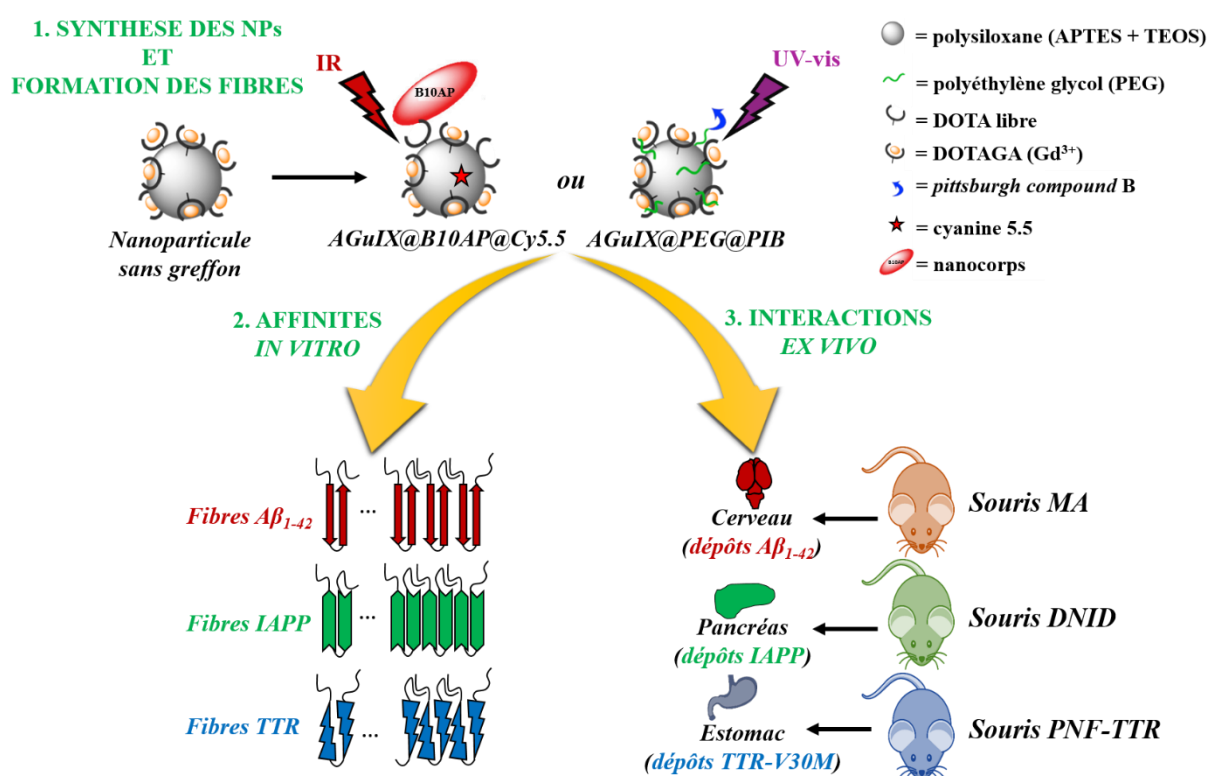


Figure 19. Représentation de la stratégie de ciblage générique des amyloïdoses. Les AGuIX une fois fonctionnalisées, sont incubées soit avec les fibres *in vitro*, soit sur les coupes de tissus *ex vivo*. Les méthodes sont basées sur la fluorescence des nanoparticules après excitation dans l'UV visible via le PIB (UV-vis, $\lambda_{ex} = 350$ nm) ou vers le proche infra-rouge via la Cyanine 5.5 (IR, $\lambda_{ex} = 655$ nm).

Nous avons choisi d'utiliser les nanoparticules AGuIX, sur lesquelles nous avons greffé indépendamment deux cibleurs génériques des amyloïdoses : soit le PIB, soit le nanocorps B10AP. En accord avec la littérature, ces molécules ont la capacité de cibler de nombreuses

protéines amyloïdes sous des formes fibrillaires, avec de bonnes affinités (déterminées par l'intermédiaire d'une constante de dissociations, notées K_d). Dans le but de cibler l'éventail le plus large de maladies associées aux amyloïdoses, nous avons testé ces deux types de constructions sur les trois amyloïdoses d'intérêts : les dépôts $A\beta_{1-42}$ impliqués dans la MA, les dépôts IAPP associés au DNID, et les dépôts TTR-V30M responsables de la PNF-TTR-V30M.

Concernant les cibles, le PIB est la molécule la plus utilisée dans le diagnostic clinique (voir Introduction générale-III.1.1.), et représente donc un témoin logique pour une preuve de concept. Etant un analogue de la ThT, il possède également des propriétés optiques très utiles pour sa détection, ne nécessitant pas l'ajout d'un marqueur fluorescent supplémentaire à la surface de nos NPs (avec un maximum d'excitation à $\lambda_{ex} = 350$ nm et un maximum d'émission à $\lambda_{em} = 420$ nm). Cette nanoparticule est notée AGuIX@PEG@PIB dans la suite de ce travail, car il est nécessaire de greffer un « bras » de polyéthylène glycol (PEG) à la surface de l'AGuIX ; ce PEG joue le rôle « d'espaceur moléculaire » (*spacer*), afin de garantir l'accessibilité du ou des sites d'interactions du PIB pour les fibres amyloïdes.

Le nanocorps B10AP, quant à lui, représente un biovecteur prometteur, du fait de sa meilleure affinité supposée pour les fibres amyloïdes que le *gold standard* PIB ($K_d = 7$ nM contre $K_d = 50$ nM pour les fibres $A\beta$ *in vitro*)^{166,231}. Une meilleure affinité des NPs avec le B10AP impliquerait donc l'utilisation de nanoparticules en plus faible quantité pour une sensibilité équivalente. Le nanocorps a été également utilisé dans ce travail afin de tester les propriétés versatiles de l'AGuIX : le greffage de cette molécule de haut poids moléculaire, est en général difficile à réaliser. A titre d'exemple, le PIB a une masse moléculaire de 250 Da, contre plus de 60 000 Da pour le B10AP. Cette nanoparticule est notée AGuIX@B10AP@Cy5.5, car il est nécessaire de greffer sur l'AGuIX un marqueur fluorescent, rapporteur de l'interaction du B10AP avec les fibres amyloïdes. Pour cela, nous avons utilisé la Cyanine 5.5 (Cy5.5, $\lambda_{ex} = 655$ nm et $\lambda_{em} = 685$ nm).

Concernant les pathologies ciblées, les trois amyloïdoses ont été sélectionnées selon l'enjeu diagnostique qu'elles représentent, leur caractère représentatif de l'ensemble des amyloïdoses, les connaissances acquises à leur sujet, ainsi que les modèles murins disponibles pour leur analyse *ex vivo*.

Les étapes de synthèses des NPs ont été suivies par diffusion dynamique de la lumière (DDL) pour leur taille, relaxométrie pour leurs propriétés liées au gadolinium, par absorption et électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) pour quantifier les molécules à leur surface, et ont été réalisées en collaboration avec nos collègues de l'Institut Lumière matière de Lyon (équipe d'Olivier Tillement). Par ailleurs, la synthèse des AGuIX avant greffage a été décrite dans la littérature, avec environ 10 gadolinium par nanoparticule²⁰³.

La formation de fibres requiert 3 jours ($A\beta_{1-42}$), 7 jours (IAPP) et 10 jours (TTR-V30M), et est contrôlée par dichroïsme circulaire (DC) et MET (**Annexe 1**).

Les tests d'affinités *in vitro* ont été réalisés par Résonance Plasmonique de Surface (RPS) par Biacore (**Figure 20a**), et par partition par centrifugation (**Figure 20b**). Les interactions NPs-dépôts amyloïdes *ex vivo* ont été observées par microscopie optique à fluorescence (**Figure 20c**).

Afin d'interpréter les résultats présentés dans ce travail de thèse, il est important de comprendre les principes de bases des techniques utilisées.

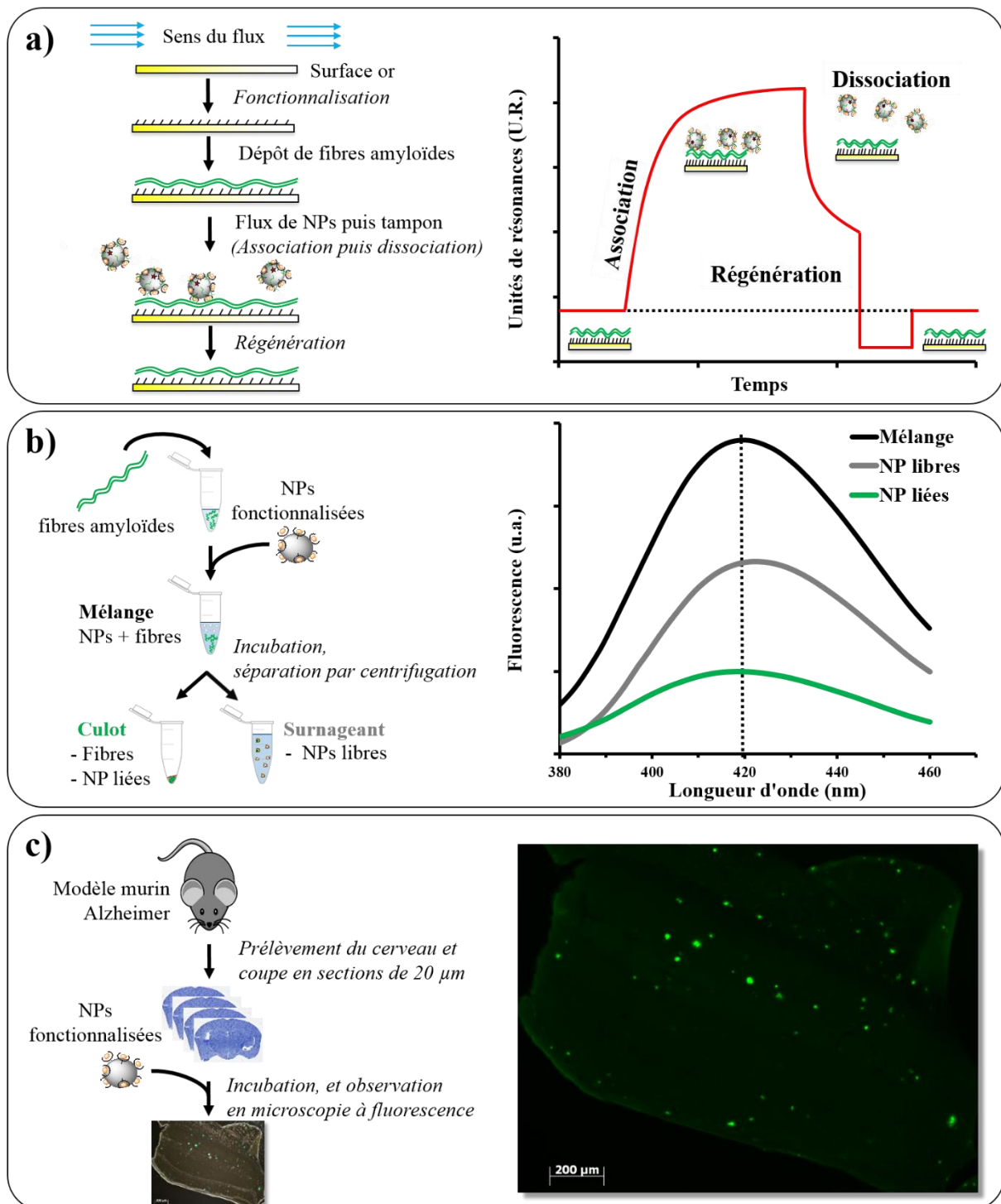


Figure 20. Techniques d'interactions *in vitro* et *ex vivo* ; a) Principe de la RPS par Biacore ; b) Principe de la partition par centrifugation et spectres de fluorescences de l'AGuIX@PEG@PIB associés ($\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$) ; c) Exemple de préparation de tissus prélevés sur des modèles murins Alzheimer et microscopie à fluorescence d'une coupe d'hippocampe avec des dépôts amyloïdes marqués à la ThS ($\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 488 \text{ nm}$).

La RPS est basée sur la formation d'une onde évanescente à l'interface d'un milieu diélectrique et d'un métal (notamment l'or). Cette onde évanescente est due à un phénomène de résonance entre les nombreux électrons libres d'une surface en or (appelés aussi plasmons),

et les photons d'un faisceau laser monochromatique. L'onde évanescente joue alors le rôle de sonde moléculaire, car l'adsorption de molécules sur la surface métallique modifie sa propagation. Autrement dit, il est possible de quantifier les interactions entre molécules près de l'interface métallique: entre les fibres et la surface en or, mais aussi entre les fibres et les nanoparticules, sans besoin de marquages. Le Biacore utilise la RPS dans un système microfluidique, où l'interaction est calculée en Unités de Résonances (U.R.), et présente l'avantage de pouvoir injecter des quantités croissantes de nanoparticules sur un même échantillon de fibres (calculs de Kds).

La partition par centrifugation permet de séparer les AGuIX en interaction avec les fibres, et celles qui sont libres. Ce résultat est garanti par le fait que les AGuIX ne culottent pas et ne se dégradent pas spontanément après centrifugation. Les temps d'incubation sont mieux contrôlés, mais cette technique nécessite des marqueurs (fluorescents dans notre cas) pour quantifier cette affinité. Dans nos études, nous utilisons les propriétés fluorescentes du PIB ($\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$) et de la cyanine 5.5 ($\lambda_{\text{ex}} = 655 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 685 \text{ nm}$).

L'observation par microscopie optique à fluorescence de sections de cerveaux pour la MA, de pancréas pour DNID ou d'estomac pour la PNF-TTR-V30M, a été réalisée après incubation avec les AGuIX fonctionnalisées. Différents marquages ont été faits afin de discriminer les structures biologiques par rapport aux dépôts amyloïdes ciblés: la ThS pour marquer les fibres amyloïdes¹⁴¹, le Hoechst pour marquer les noyaux²³¹, la cyanine 5.5, l'activité de la phosphatase alcaline couplée au B10 et le PIB pour les AGuIX fonctionnalisées, et la phalloïdine pour les filaments d'actine²³². Cette étape est primordiale pour la suite de ce projet, en confirmant le ciblage des dépôts uniquement.

II. Résultats

Les fibres amyloïdes d'intérêts ont été formées *in vitro* et leur formation a été contrôlée, tandis que les deux NPs fonctionnalisées ont été synthétisées et caractérisées en collaboration avec Marie Plissonneau de l'Institut Lumière Matière. Les interactions entre ces deux constructions et les trois types de fibres amyloïdes ont été quantifiées par leur affinité, *via* leurs Kds respectives. Dans un dernier temps, Nous avons observé l'interaction de l'AGuIX@PEG@PIB et de l'AGuIX@B10AP@Cy5.5 avec chacun des dépôts amyloïdes *ex vivo*, sur des sections de tissus pathologiques murins présentant chaque type de dépôt amyloïde humain.

La formation des fibres amyloïdes *in vitro*, a été contrôlée par DC, révélant les structures en feuillets β pour IAPP et A β_{1-42} ou leur réorganisation pour TTR-V30M (**Annexe 1**), et par observation directe en MET, avec des fibres de diamètres apparents autour de 10 nm (Figure 2 de l'article 1). La caractérisation des nanoparticules AGuIX@PEG@PIB et AGuIX@B10AP@Cy5.5 présente des populations homogènes en taille (Figure 1 de l'article 1), avec des diamètres hydrodynamiques (D_H) respectivement de 6.5 ± 1.5 nm et de 13.9 ± 2.6 nm. Le nombre de cibles PIB et B10AP ont également été quantifiés à leur surface, et on considère dans chaque cas environ 1 cibleur toutes les 5 nanoparticules. Il est préférable d'avoir 1 greffon (ou moins) par NP pour éviter les encombrements stériques. Par ailleurs, chaque nanoparticule a préservé ses propriétés multimodales, que cela soit pour l'IRM pondérée en T_1 (temps de relaxation r_1 du gadolinium adéquat pour l'étude IRM et calculé à $12.9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour l'AGuIX@PEG@PIB), ou pour la fluorescence (propriétés optiques de la Cy5.5 ou du PIB post-greffage). Au niveau du PIB, nous avons également pris en compte les effets des solvants, qui modifient ses maximums d'émission et d'absorption ainsi que leurs intensités (résultats non montrés).

Les calculs d'affinités *in vitro* par partition (Figure 3 et 4 de l'article 1), entre les trois types fibres et les deux nanoparticules, montrent que la nanoparticule avec le B10AP possède une meilleure affinité que celle greffée avec le PIB. Concernant l'AGuIX@PEG@PIB, les Kds sont relativement homogènes, et respectivement de $15 \pm 3 \mu\text{M}$, $21 \pm 8 \mu\text{M}$ et $57 \pm 27 \mu\text{M}$ pour les fibres A β_{1-42} , IAPP et TTR-V30M. Dans le cas de l'AGuIX@B10AP@Cy5.5, les Kds sont dans le même ordre de grandeur pour les fibres A β_{1-42} et IAPP (respectivement de $46 \pm 7 \text{ nM}$ et $21 \pm 4 \text{ nM}$), mais différentes pour les fibres TTR ($K_d = 264 \pm 51 \text{ nM}$). Ceci est en accord avec la littérature, qui met en avant plusieurs modes d'interactions possibles du B10AP avec plusieurs types de fibres amyloïdes¹⁶⁷⁻¹⁶⁸ (voir Introduction générale-III.1.). Par ailleurs, nous avons démontré que ce ciblage est bien dû exclusivement aux cibleurs B10AP et PIB, car les AGuIX sans cibleurs ne montrent aucune affinité significative pour les fibres (voir les résultats supplémentaires de l'article 1).

De plus, des analyses complémentaires ont été menées en utilisant le PIB seul contre les trois fibres amyloïdes (méthodes identique de partition par centrifugation, voir Chapitre 2), et le B10AP seul contre des fibres A β_{1-42} (RPS par Biacore, **Annexe 2**). On obtient des Kd de 6

μM ($\text{A}\beta_{1-42}$), 20 μM (IAPP) et 10 μM (TTR-V30M) pour le PIB seul, et 10 nM ($\text{A}\beta_{1-42}$) pour le B10AP seul. Ces Kds, en accord avec celles obtenues dans la littérature^{151,166} (même si plus faible concernant le PIB, probablement dû à des études plus sensibles basées sur le PET et non sur la fluorescence intrinsèque du PIB), sont dans le même ordre de grandeur que celles calculées avec les AGuIX. Ces résultats mettent en exergue que le greffage du PIB ou du B10AP aux AGuIX n'altèrent pas leurs affinités pour les fibres.

Concernant les résultats *ex vivo* (présentés en figure 5 et 6 de l'article 1), le co-marquage fluorescent observable (couleur bleue intense), de la Thioflavine S (ThS, couleur verte) utilisée comme témoin de marquage des dépôts amyloïdes, et des AGuIX@PEG@PIB (couleur bleue), montre bien une interaction spécifique de la nanoparticule fonctionnalisée pour les agrégats amyloïdes. Ce résultat a été observé pour les dépôts $\text{A}\beta_{1-42}$ sur les coupes de cerveau des modèles de MA, les dépôts IAPP sur les coupes de pancréas de modèles du DNID, et pour les dépôts TTR-V30M dans l'estomac de modèles murins de la PNF-TTR. Malgré une concentration plus faible en cibles (81 nM en B10AP contre 5 μM en PIB), ces constatations sont équivalentes concernant les AGuIX@B10AP@Cy5.5, par observation d'une co-localisation des trois marqueurs fluorescents d'intérêts (couleur jaune intense). En effet, les fibres amyloïdes (par la ThS, couleur verte,) sont bien ciblées par les AGuIX@B10AP@Cy5.5, détectées par l'intermédiaire de la Cy5.5 (couleur jaune) et de l'activité de l'AP (couleur rouge).

Aucun marquage n'a été déploré sur des tissus témoins sans dépôts amyloïdes.

L'ensemble des résultats et des méthodes sont détaillés dans l'article 1, en cours de soumission dans *nanobiomedicine*, journal international avec comité de lecture et de sélection.

Nanomedicine

Nanomedicine

Multimodal imaging Gd-nanoparticles functionalised with Pittsburgh compound B or nanobody for amyloid plaques targeting

Journal:	<i>Nanomedicine</i>
Manuscript ID	NNM-2017-0079
Manuscript Type:	Research Article
Keywords:	Amyloid fibrils, Gd-based nanoparticles, PIB, nanobody

SCHOLARONE™
Manuscripts<https://mc04.manuscriptcentral.com/fm-nnm>

Multimodal imaging Gd-nanoparticles functionalised with Pittsburgh compound B or a nanobody for amyloid plaques targeting

Jonathan Pansieri^{1*}, Marie Plissonneau^{2,3*}, Nathalie Stransky-Heilkron⁴, Mireille Dumoulin⁵, Laurence Heinrich-Balard⁶, Pascaline Rivory⁶, Jean-François Morfin⁷, Eva Toth⁷, Maria Joao Saraiva⁸, Eric Allémann⁴, Olivier Tillement³, Vincent Forge¹, François Lux^{3*}, Christel Marquette^{1*#}

1 Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, Université Grenoble Alpes, CEA Life Sciences Division, CNRS, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France

2 Nano-H S.A.S, 38070 Saint Quentin Fallavier, France

3 University of Lyon, University of Claude Bernard Lyon 1, CNRS, Institut Lumière Matière, F-69622, Lyon, France.

4 School of Pharmaceutical Sciences, University of Geneva, University of Lausanne Pharmaceutical technology, Quai Ernest-Ansermet 30, 1211 Geneva, Switzerland.

5 Laboratory of Enzymology and Protein Folding Centre for Protein Engineering, InBioSy, B6 University of Liege Sart Tilman, 4000 Liege, Belgium.

6 University of. Lyon, University of Claude Bernard Lyon 1, ISPB Faculté de Pharmacie, MATEIS UMR CNRS 5510, 69373 Lyon, France.

7 Molecular Biophysics Center, UPR 4301, Rue Charles Sadron CS 80054, 45071 Orléans Cedex 2, France.

8 Instituto de Inovação e Investigação em Saúde (i3S), University of Porto, Portugal; Molecular Neurobiology Group, IBMC – Institute for Molecular and Cell Biology, University of Porto, 4150-180 Porto, Portugal; Maria João Saraiva, i3S – Instituto de Investigação e Inovação em Saúde da Universidade do Porto ; Rua Alfredo Allen, 208, 4200 – 135 Porto, Portugal;

* J. Pansieri and M. Plissonneau contributed equally to this work

* C. Marquette and F. Lux contributed equally to this work

#corresponding: christel.marquette@cea.fr

Abstract:

Aims: As a promising strategy for the diagnostic of amyloidosis, Gadolinium-based nanoparticles were functionalized with either the Pittsburgh compound B or a nanobody (B10AP). **Material & methods:** Their ability to target amyloid fibrils composed of β -amyloid peptide, amylin or Val30Met mutated-transferrin, was compared by spectroscopic and biophysics techniques and on pathological tissues using fluorescence microscopy. **Results:** Both nanoparticles efficiently interacted with the three amyloid fibrils, with KD values in 10-micromolar or 10-nmolar range respectively for PIB and B10AP nanoparticles. They allowed also the detection of amyloid deposits on pathological tissue. **Conclusion:** Such nanoparticles could represent promising flexible devices for multimodal imaging in early diagnostic of amyloid plaques, i.e. Alzheimer's disease, Type 2 diabetes mellitus and the familial amyloidotic polyneuropathy.

Key words: amyloid imaging, amyloidosis, nanobody, PIB, Gadolinium based nanoparticles.

Introduction

Amyloidoses are diseases caused by the auto-aggregation of normally soluble proteins or peptides into insoluble and very stable filamentous structures, called amyloid fibrils. These self-associated aggregates are rich in cross β -sheets [1-2], and concern today 36 proteins *in vivo*, associated with as many disorders [3], including systemic amyloidoses (e.g. familial polyneuropathy, myeloma) and localised amyloidoses (e.g. Type 2 diabetes mellitus, Alzheimer's disease). The detection of these deposits represents a medical challenge: the $A\beta$ -amyloid peptide ($A\beta$) aggregation in the brain, linked to Alzheimer's disease (AD) [4], affects around 44 million people worldwide [5], while the Islet Amyloid PolyPeptide (IAPP) deposition in Langerhans Islet is implicated in Type 2 diabetes mellitus (T2DM), with 415 million people affected [6], and the familial amyloidotic polyneuropathy (FAP), an autosomal hereditary disease associated to systemic extracellular amyloid deposition of Val30Met-Transthyretin variant (V30M-TTR) [7] affects around 10 thousand people worldwide.

In recent years, a better understanding of the structures of amyloid fibrils and their mechanisms of formation [8-9] induced extensive studies on various approaches to target them, for early diagnosis of associated diseases and ideally for their treatment. However, with the diversity of the symptoms and their lack of specificity, the diagnosis of amyloidosis is generally hard to make and requires several invasive examinations [10-11]. So, there is a need of sensitive tools for complementary tests with none or minimally invasive tools to detect amyloidoses in medicine, for diagnosis of diseases like cardiomyopathy [12], as well as to follow treatment efficiency via the evolution of the amyloid load [13]. Nowadays, imaging techniques seem to satisfy these requirements and are already used: Positron Emission Tomography (PET) or Magnetic Resonance Imaging (MRI) for the evaluation of $A\beta$ accumulation in the brain of AD patients [14-15], scintigraphy for identification of V30M-TTR implicated in cardiac amyloidosis [16], autoradiography for IAPP targeting in T2DM [17], etc. However, imaging techniques presents its own advantages and limitations: for example, MRI allows to obtain an outstanding spatial resolution but strongly lacks in sensitivity (millimolar range) [18] while PET offers excellent sensitivity with a lower spatial resolution [19]. In order to by-pass the limitations of each technique, multimodal imaging approaches with combination of PET and MRI within the same tool will represent a breakthrough in modern medicine [20-21]. In this context, nanoparticles have emerged in the past decades as a very promising tool to enhance the contrast and the sensitivity of these different imaging techniques, and allowing access to metabolic and anatomic data with the same device. In this work, we have used Gadolinium (Gd) based multimodal nanoparticles (NPs), so-called AGuIX, which are made of a polysiloxane network surrounded by DOTAGA (Gd³⁺) chelates [22-23]. These NPs have a diameter smaller than 5 nm and allow both MRI imaging and radiosensitisation [24]. By chelating radioisotopes (e.g. ⁶⁸Ga³⁺ or ¹¹¹In³⁺) with free ligands available at the NP surface, it is also possible to perform PET or Single-photon emission computed tomography (SPECT) imaging [18,25]. Moreover, the covalent grafting of near infrared dye like cyanine5.5 (Cy5.5) permits to follow the NPs thanks to optical imaging [26]. Finally, the relevance of using these nanoparticles for amyloid imaging comes from their potential functionalisation by molecules to target specific amyloidosis [27]. Based on this background, the aim of this work was to functionalise, with specific molecules, these multimodal imaging nanoparticles, for early and sensitive detection of amyloidoses regardless of the protein nature forming the fibrils.

Among the numerous molecules showing an affinity toward fibrils, thioflavin (ThS or ThT) has been the most used probe for amyloid aggregates, both in vitro for biochemical characterisation and ex vivo as histological agent [28]. Later, several organic molecules derived from thioflavin have been optimised for a better affinity in order to enable PET applications [15]. In particular, one thioflavin derivative, Pittsburgh compound B (PIB) shows an affinity on the nanomolar range toward β -amyloid deposits [15,29-30] and successfully targets Alzheimer senile plaques in humans [31]. Previously, this compound has also been functionalised with metal based imaging probes to allow imaging by chelating either Gd^{3+} (MRI), $^{111}In^{3+}$ (SPECT) [32], or using radioisotopes like ^{11}C or ^{18}F (PET), and it is nowadays considered as the gold standard against amyloidoses like AD.

Another approach consists in grafting antibodies on the surface of nanoparticles like SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) and detects them by MRI [33]. For this work, we have chosen to use the so-called nanobodies [34], corresponding to VHH domains of Camelidae heavy-chain antibodies. These nanobodies are particularly promising for the development of new diagnosis and therapeutic antibody-based approaches. In particular their small size, compare to full antibodies, should make them more suitable for grafting to NPs. More specifically, our strategy is based on a known nanobody, called B10, which has been selected by phage display from a synthetic library using $A\beta(1-40)$ fibrils as bait [35]. B10 recognizes also (both in vitro and in vivo) amyloid fibrils of several proteins including insulin, glucagon, $\beta 2$ -microglobulin, serum amyloid A (SAA) protein and immunoglobulin light chain (AL) [36]. Instead of B10, we have rather used a chimeric construct, termed B10AP made of B10 (~15.7 kDa) fused to E. coli alkaline phosphatase (AP, ~47.9 kDa), which binds to $A\beta(1-42)$ amyloid fibrils with a better dissociation constant (K_D : 7 nM vs 475 nM) [36]. AP forms homodimers which provides a bivalent binding B10AP to amyloid fibrils. Moreover, the phosphatase activity of AP can be used to monitor the binding of B10AP to amyloid fibrils. In this work, we used these two targeting approaches by functionalising AGuIX nanoparticles with either PIB or B10AP, in order to perform active targeting on the $A\beta(1-42)$, IAPP and V30M-TTR fibrils in vitro, and on ex vivo pathological tissues.

Methods

Nanoparticles synthesis

AGuIX were synthesised as previously described [22-23] (Nano-H SAS, Saint-Quentin Fallavier, France). These NPs are composed of a polysiloxane network surrounded by covalently grafted DOTAGA (1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-1-glutaric anhydride-4-7-10-triacetic acid, CheMatech, Dijon, France) and Gd^{3+} chelates, with 5 or 7% free DOTA. Nanoparticles concentrations are stated in mol.L⁻¹ of gadolinium element.

Pittsburgh compound B nanoparticles synthesis

The Pittsburgh compound B derivative was synthesised according to the procedure already described in literature [37]. In order to functionalise AGuIX with PIB, first we have grafted a polyethylene glycol bis-carboxymethyl (PEG) on nanoparticle as previously described [27]. Then, for PIB grafting, after AGuIX@PEG purification, these freeze-dried nanoparticles were

dispersed at a Gd³⁺ concentration of 500 mM in ultrapure water and diluted ten folds with diethylene glycol (DEG, SDS Carlo Erba, France) at 80°C and then diluted twice with dry dimethyl sulfoxide (DMSO), leading to a final 25 mM Gd³⁺. The carboxylic functions of the NPs were activated by N-(3-Dimethylaminopropyl)-N0-ethylcarbodiimidehydrochloride (EDC) and pentafluorophenol (PFP) at EDC/PFP/Gd³⁺ molar ratio 10:20:1 for 15 min. PIB at 200 mg.mL⁻¹ in dry DMSO was added to the nanoparticles suspension and the mixture was stirred for 6 hours (PIB/Gd³⁺ molar ratio 1:1). Finally, the NPs were precipitated in acetone (Sodipro, France), centrifuged and the supernatant was removed; the operation was repeated 3 times to allow the removal of the upmost ungrafted PIB. After redispersion of the precipitate in water, acetone was evaporated overnight at 40°C in open vials. EDC/PFP activators, the unreacted chemicals and the degraded nanoparticles were eliminated (by a factor 10000) by repeated concentration/dilution using tangential filtration cycles with a 5 kDa molecular cutoff membrane. Full experimental characterisation of the AGuIX@PEG@PIB samples are described in the supplementary information.

Nanobody nanoparticles synthesis

The nanobody B10AP was produced in E.coli and purified as described previously [35], from the plasmid ptetB10pA6H kindly provided by Prof Horn, Jena University, Germany. To functionalise nanoparticles with AGuIX, freeze-dried AGuIX with 7% of free DOTA (AGuIX@DOTAfree7%) were first labelled with 1 Cy5.5 dye molecule for 1000 Gd³⁺ as previously described²⁷, and then were dispersed at 100 mM in Gd³⁺ in ultrapure water. The carboxylic acid functions of the free DOTA ligand were activated thanks to 100 fold excess of EDC and N-hydroxysuccinimide. After 15 min of incubation, at room temperature under mild agitation, the activated AGuIX NPs were added in large excess (100 fold excess) to the nanobody suspension at 41 µM in PBS buffer. Ungrafted AGuIX were also added to the suspension in order to reach a Gd³⁺ concentration of 10 mM for stability. After 30 min of incubation, the ungrafted NPs are removed by tangential filtration on a 50kDa cut-off membrane. Then, the AGuIX@B10AP@Cy5.5 were freeze-dried and stored away from light. Full experimental characterisation of the AGuIX@B10AP@Cy5.5 samples are described in the supplementary information.

EDC, PFP, PEG, NHS and DMSO were purchased from Aldrich Chemical (France).

Amyloid fibrils formation

Aβ(1-42) fibrils were obtained with Aβ(1-42) peptide (Genecust, Luxembourg), controlled at 100 µM by absorption spectroscopy, and the V30M-TTR fibrils from protein production in E.coli were prepared at 32.3 µM as previously described [27].

IAPP fibrils (48 µM) were prepared using lyophilised IAPP peptide (Genecust, Luxembourg) by dissolution in 100% 1, 1, 1, 3, 3, 3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) before incubation in Tris-HCl 20 mM, based on previous studies [38]. Full experimental details of IAPP fibrils are described in the supplementary information.

All fibrils morphologies formations were confirmed using Transmission Electronic Microscopy (TEM) analysis (JEOL1200EX / Tecnai 12).

In vitro assays and equilibrium constant determination

Constant affinities were obtained by partition binding tests between fibrils and functionalised nanoparticles and performed as previously described [27]. Each type of fibrils, at 20 μM or 40 μM , were respectively incubated with a range of concentrations of AGuIX@PEG@PIB, between 0.01 μM and 4 μM in PIB, or AGuIX@B10AP@Cy5.5, between 0.16 nM and 132 nM in B10. According to the fluorescence properties of PIB ($\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$) or cyanine5.5 ($\lambda_{\text{ex}} = 655 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 685 \text{ nm}$), spectrum of each sample was recorded on a JASCO J-815 spectrophotometer. Michaelis binding model was used to calculate the equilibrium constant affinity (KD) following the equation:

$$y = Y_m / (1 + (K_D/x)),$$

where (Y_m) is the fluorescence intensity maximum, (y) the fluorescence intensity measured for a given concentration in probes within functionalised nanoparticles (x).

Animal models

As model for Alzheimer's disease, brain sections were prepared from 18 months APPswe/PSEN1dE9 mouse models (kindly provided by Dr M. Dhenain, Fontenay aux Roses, France). These models were previously described in the literature [39-40], and a short description is provided within "supplementary information". As control, brain sections from C57/Bl6 mice were used.

As model for T2DM, pancreas sections were prepared from males of mice homozygous for RIPHAT transgene expressing human-IAPP transgenic mice [41]. Pancreas from S/FVB/NJ mice were used as control tissue without amyloid burden.

As model for FAP, stomach tissue sections were extracted from a transgenic mice expressing human V30M-TTR and lacking endogenous mouse TTR [42]. Similar tissue from knock-down mice for transthyretin gene was used as control [43].

All the procedures involving animals were carried out in accordance with the European community council directives. The different procedures to deeply anaesthetise the animals, to extract and fix the organs/tissues, and to prepare the sections are described in details within "supplementary information". Tissue sections were mounted on slides for the immunostaining experiments.

Immunohistochemistry

Frozen sections were processed for immunohistochemistry staining with AGuIX@PEG@PIB and AGuIX@B10AP@Cy5.5 as previously described with other functionalised AGuIX27. AGuIX@PEG@PIB were used at [PIB] = 5 μM and AGuIX@B10AP@cy5.5 at [B10] = 81 nM. To each suspension of grafted NPs, 3 mM of ungrafted nanoparticles were added to insure their stability. In the case of AGuIX@PEG@PIB, the PIB fluorescence was used to monitor their binding ($\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ - $\lambda_{\text{em}} = 405 \text{ nm}$). TRITC conjugate- phalloidin (Sigma, #P1951) was used to detect the actin network ($\lambda_{\text{ex}} = 545 \text{ nm}$ - $\lambda_{\text{em}} = 605 \text{ nm}$). In the case of AGuIX@PEG@B10AP@Cy5.5, nanoparticles binding to amyloid plaque was detected through either Cy5.5 fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 650 \text{ nm}$ - $\lambda_{\text{em}} = 670 \text{ nm}$) or red permanent ($\lambda_{\text{ex}} = 595 \text{ nm}$ - $\lambda_{\text{em}} = 613 \text{ nm}$) for revealing alkaline phosphatase fused to B10. In all tissue sections, amyloid burden were stained with ThS ($\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$ - $\lambda_{\text{em}} = 488 \text{ nm}$) (Sigma, #T1892) according to standard practice. Fluorescent images were recorded using either Zeiss confocal

LSM800 microscope for pancreas sections or Zeiss microscope Axiovert 200 M for brain and stomach tissues. Images were analysed using Carl Zeiss AxioVision software and Image J 1.50f software.

Results

Grafted nanoparticles characterisation

The synthesis of functionalised AGuIX nanoparticles was achieved through a bottom-up process described previously [22-23], with around ten DOTAGA per nanoparticle. Two different strategies were used to graft PIB and B10AP, mainly due to their sizes (Fig. 1a). The addition of small PEG chains at the surface of AGuIX was necessary to guarantee the accessibility of PIB, i.e. without steric hindrance due to the proximity of the NP, for the interaction with amyloid aggregates. The hydrodynamic diameter (DH) of AGuIX showed an increase from 2.9 ± 0.7 nm to 4.3 ± 1.0 nm after addition of PEG chains and to 6.5 ± 1.5 nm after PIB grafting (Fig. 1b, Table 1). In addition, relaxometric characterisation r_1 slightly increased from naked AGuIX to AGuIX@PEG@PIB (Table S1), from 10 mM⁻¹s⁻¹ to 12.9 mM⁻¹s⁻¹. The number of molecules of PIB grafted on nanoparticles was estimated by absorption spectroscopy (Fig. 1c). On that purpose a standard curve, i.e. absorbance at 338 nm (A₃₃₈) as a function of [PIB], was established with known solutions of PEG@PIB. Please note here that we have taken in account the sensitivity of the PIB optical properties to the solvent polarity to measure the standard curve [44-45]. Then, the PIB concentrations were estimated for two dilutions of the AGuIX@PEG@PIB stock solution (known [Gd³⁺]) to get the ratio between PIB and Gd³⁺. It was evaluated to one PIB for 50 Gd³⁺, i.e. at least one PIB for 5 NPs.

The strategy to graft B10AP was to use NPs with about 7% of their DOTA kept free. Then, B10AP was directly bound to free carboxylic acid functions of these DOTA (Fig. 1a). To allow their detection by fluorescence microscopy, Cy5.5 was grafted before B10AP. The hydrodynamic diameters for AGuIX@DOTA7%free, B10AP and AGuIX@B10AP@Cy5.5, are 4.2 ± 0.7 nm, 9.2 ± 2.9 nm and 13.9 ± 2.6 nm, respectively (Fig. 1d). The concentration of B10AP within the nanoparticles suspension was estimated by SDS-PAGE. A standard curve was built with a series of known B10AP suspensions (see “Material and Methods” within “supplementary information”). Then a series of three dilutions of AGuIX@B10AP@Cy5.5 stock solution was used to estimate the ratio between [B10AP] and [Gd³⁺]. It was evaluated at 1 B10AP for 54 Gd³⁺, i.e. 1 B10AP for 5.4 NPs (Fig. 1e, Table 1).

Affinities of functionalised nanoparticles for amyloid fibrils

The formation of A β (1-42), IAPP and V30M-TTR amyloid fibrils in vitro was assessed by TEM (Fig. 2). NPs-fibrils interactions were monitored by partition assays. Amyloid fibrils and NPs were incubated for 1.5 hour. Then, the NPs bound to amyloid fibrils were separated from the free ones by centrifugation, and the supernatants and the pellets were collected separately. At last, fluorescence spectra were recorded for the supernatants and the resuspended pellets. The fact that the sum of these two spectra was close to that of the suspension before centrifugation indicated that no NPs were lost during the experiments (Fig. 3a & Fig. 4a). The

fluorescence intensity of the pellets increased with the NP concentration at constant concentration of amyloid fibrils, showing that we were able to monitor the binding of the NPs (Fig. 3b-d & Fig. 4b-d).

In the case of AGuIX@PEG@PIB (Fig. 3b-d), the fluorescence changes at 420 nm allowed to estimate KD values of these NPs for the three types of amyloid fibrils. We were not able to use NP concentrations high enough to reach a plateau for the binding (Fig. 3b-d). However, the use of such simple Michaelis model, which assumed that the binding was non-cooperative, allowed a fair estimation of the KD: $15 \pm 3 \mu\text{M}$ for A β (1-42) fibrils, $21 \pm 8 \mu\text{M}$ for IAPP fibrils and $57 \pm 27 \mu\text{M}$ for V30M-TTR fibrils. In the case of AGuIX@B10AP@Cy5.5 (Fig. 4b-d), the KD values are: $46 \pm 7 \text{ nM}$ for A β (1-42), $21 \pm 4 \text{ nM}$ for IAPP and $264 \pm 51 \text{ nM}$ for V30M-TTR fibrils.

For all nanoparticles tested, we checked that the binding was really due to B10AP and PIB. Partition experiments performed with nanoparticles but in the absence of fibrils, showed that no significant amount of nanoparticles were pelleted due to aggregation (Fig. S2a). On the other hand, partitions with AGuIX@Cy5.5 and amyloid fibrils (Fig. S2b), with less than 5% of total fluorescence collected in pellet, meant that we had no interaction between amyloid fibrils and nanoparticles in the absence of targeters. Those results indicated that both nanoparticles bound with the three-types of amyloid fibrils tested, due to the targeter, and that B10AP nanoparticles had a better affinity for amyloid fibrils compared to PIB nanoparticles.

Tissue amyloid burden targeting

Thereafter, we have tested the capacity of each NPs to detect amyloid burden on ex vivo tissue sections for each pathology model: the brain of AD mice (Fig. 5a-e, Fig. 6a-e), the pancreas of T2DM mice (Fig. 5f-g, Fig. 6f-g) and the stomach of FAP mice (Fig. 5h-i, Fig. 6h-i). In AD mice brain, amyloid burden are expected mainly within the hippocampus and the cortex [46]. Upon staining with AGuIX@PEG@PIB of an AD brain slice, spots with strong fluorescent signal due to PIB could be detected within the hippocampus (Fig. 5c; blue color). They co-localised with ThS staining (Fig. 5d; green color). A staining with phalloidin was also done to help at the structure visualisation by labeling actin networks (Fig. 5e). The merging image highlighted the colocalisation of AGuIX@PEG@PIB and ThS staining, showing that AGuIX@PEG@PIB selectively recognized the amyloid burden (Fig. 5a). On pancreas sections from T2DM mice, PIB and ThS signal co-localised and were detected at the level of Langherans islets, as expected for this type of aggregate [17], within selective and discrete areas (Fig. 5f). Similar features were also obtained with stomach sections of FAP mice (Fig. 5h) where V30M-TTR deposits have been described [47]. These results showed selective binding of AGuIX@PEG@PIB on amyloid plaques for the three pathologies investigated here. Same experiments performed on control tissue sections, prepared from control mice who do not develop the diseases, did not display such fluorescent staining (Fig. 5b,g,i).

Same experiments realised with AGuIX@B10AP@Cy5.5 displayed also specific staining of amyloid deposits in all three tissues (Fig. 6a,f,h). Moreover, AGuIX@B10AP@Cy5.5 can be detected through the alkaline phosphatase activity (Fig. 6c; red color) and the Cy5.5 fluorescence (Fig. 6d; yellow color). In brain sections of AD mice, these signals co-localised with ThS labelling (Fig. 6e; green color) within the hippocampus. On the merge picture (Fig. 6a), this resulted in intense spots (yellow color). Such co-localisation of the three stainings were also observed in pancreas tissue, and in particular in the Langherans islets of T2DM mice (Fig. 6f). To help in identifying Langherans islet, a labeling of the cellular

nucleus with Hoechst dye was also realised on these samples (Fig. 6f&g; blue color). Finally, with stomach tissue sections of FAP mice, typical signal due to the co-location of AGuIX@B10AP@Cy5.5 with ThS were also detected and assigned to amyloid deposits (Fig. 6h). Specificity of AGuIX@B10AP@Cy5.5 binding were confirmed by similar experiments on control tissues which did not contain amyloid deposition (Fig. 6b,g,i).

Discussion

The aim of this work was to develop a specific, versatile and non-invasive tool that target amyloid deposits, detectable by various medical imaging, for a more sensitive and early diagnostic of amyloidosis.

One of the important feature of functionalisation of nanoparticles is the control of the synthesis in terms of chemical reaction, quality of grafting and size of the final product. The grafting of PIB to AGuIX nanoparticles increases their hydrodynamic diameter (Table 1). However, their size remains homogenous (Fig. 1a) and their relaxometric characterisation showed good relaxivity at 12.9 mM-1.s-1 allowing MRI detection. Therefore, the Gd3+ relaxation properties of the NPs are not altered by the grafting.

AGuIX@PEG@PIB has a dissociation constant for amyloid fibrils around 10 μ M, close to the value we have previously reported for PIB alone [27]. The presence of the PEG linker between PIB and the nanoparticle allows enough mobility to PIB in a way that the nanoparticle proximity does not alter its recognition ability. One can note here, that the dissociation constants we have measured for PIB are several orders of magnitude higher than those reported in the literature [15,29-30]. The reasons for this apparent discrepancy are unknown; the most likely being that the conditions and the methods used are drastically different. As PIB has kept both its optical properties and its ability to recognize amyloid aggregates, the multimodality of the nanoparticles has been confirmed.

A further milestone for the development of these multimodal nanoparticles has been reached with the grafting of B10AP. This was a challenge because of constraints implied by the use of proteins and, moreover, the size of this dimeric multidomain protein. The dissociation constants we have measured for AGuIX@B10AP@Cy5.5: around 10 nM for A β and IAPP (Fig. 4b-c), are similar to that we have measured for B10AP alone (8.3 nM for A β (1-42), not shown) and to those reported in the literature [36], showing that the nanobody remains functional upon grafting to the nanoparticles. Therefore, AGuIX nanoparticle also constitutes an interesting platform for high molecular weight molecules.

Thereafter, the equilibrium dissociation constant evaluation of these nanoparticles is important for estimating their potential as diagnosis tools in the future. Both AGuIX@PEG@PIB, in 10-micromolar range, and AGuIX@B10AP@Cy5.5, with 10-nanomolar range, show acceptable affinities for in vivo studies for the three amyloid fibrils tested (Fig.3-4). One can notice that the dissociation constant of AGuIX@B10AP@Cy5.5 for V30M-TTR fibrils is significantly larger than for the other fibrils. The reason for that is unknown. However, it has been reported that B10 does not recognize all amyloid fibrils with the same efficiency [36], and this may constitute a drawback compare to PIB. Peptides with better affinity already exist and could have been grafted on AGuIX (KD in 10-nanomolar range [48-49]). Nevertheless, they could present important drawbacks because they can induce toxicity for cells [48] or facilitate the fibril formation through the stabilisation of protofibrils

[49]. PIB and B10AP do not have these problems [31,35]. It also exists peptides with specific targeting for AD showing low toxicity levels for cells, but their affinities should be increased (100- μ molar range) [27]. AGuIX@B10AP@Cy5.5 displays stronger affinity than AGuIX@PEG@PIB, up to 3 orders of magnitude between micro and nanomolar ranges, which means that AGuIX@B10AP@Cy5.5 is a better candidate for in vivo detection of amyloid burden.

To go further and to evaluate the efficient in vivo targeting of both NPs, immunohistochemistry experiments have been performed on pathological tissues of each disorder. AGuIX@PEG@PIB or AGuIX@B10AP@Cy5.5 fluorescence is still observed in all tested pathological tissues on distinct amyloid spots (Fig. 5 & 6). These observations confirm again the integrity of AGuIX@B10AP@Cy5.5, by co-localisation of Cy5.5 and AP activity signal in the same restricted zones. In addition, the fact that both NPs co-localised only with ThS staining, confirms their specific targeting of amyloid burden.

Conclusions

In this work, we have synthesised AGuIX nanoparticles labelled with specific targeters of amyloid deposits with potential in vivo use, by keeping its full contrast agents properties. Thus, the NPs tested in this work provide complementary tools: stronger affinity of AGuIX@B10AP@Cy5.5 will be helpful to detect early amyloid deposits, when the smaller size of AGuIX@PEG@PIB should diffuse more quickly, interesting notably for systemic amyloidosis (V30M-TTR). In the case of AD diagnostic, we must take into account that such NPs have to reach their target inside the brain, despite the presence of blood brain barrier (BBB), which constitute a hermetic barrier. However, the flexibility of AGuIX NPs may allow chemical modifications for diffusion through this barrier, or addition of molecules to improve active transport through specific receptor of the BBB.

In any case, these safe multimodal imaging constructions are very promising to target several types of amyloid deposits in vivo, because of their very low levels of toxicity, previously established in vivo with good clearance [50], and to diagnose pathologies by complementary imaging techniques with great sensitivity and spatial resolution.

Executive summary

- To achieve the diagnostic of amyloidosis, multimodal imaging nanoparticles were functionalised with either the Pittsburgh compound B or a nanobody.
- Efficient active targeting was tested by spectroscopic and biophysics techniques on A β (1-42), IAPP and Val30MetTTR fibrils.
- Both nanoparticles efficiently interacted with the three amyloid fibrils, with KD values in 10-micromolar range for AGuIX@PIB or 10-nmolar range for AGuIX@B10AP.
- Both functionalised nanoparticles are able to interact specifically with amyloid deposits localised in pathological tissue.
- These functionalised nanoparticles represent promising flexible devices for multimodal imaging in early diagnostic of amyloid plaques, i.e. Alzheimer's disease, Type 2 diabetes mellitus and the familial amyloidotic polyneuropathy.

Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all animal experimental investigations.

References

1. Knowles TP, Vendruscolo M & Dobson CM. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nature reviews Molecular cell biology* 15(6), 384-396 (2014).
2. Tycko R. Solid State NMR Studies of Amyloid Fibril Structure. *Annu Rev Phys Chem* 62, 279–299 (2011).
3. Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN et al. Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid* 23, 209–213 (2016).
4. Golde TE. Alzheimer disease: Host immune defence, amyloid- β peptide and Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology* 12, 433-434 (2016).
5. World Alzheimer Report 2014: Dementia and Risk Reduction | Alzheimer's Disease International. Available at: <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2014>. (Accessed: 7th December 2016)
6. IDF diabetes atlas - Home. Available at: <http://www.diabetesatlas.org/>. (Accessed: 7th December 2016)
7. Saraiva MJM, Birken S, Costa PP & Goodman DS. Amyloid Fibril Protein in Familial Amyloidotic Polyneuropathy, Portuguese Type Definition of Molecular Abnormality in Transthyretin (Prealbumin). *The Journal of Clinical Investigation* 74, 104-119 (1984).
8. Wälti MA, Ravotti F, Arai H et al. Atomic-resolution structure of a disease-relevant A β (1–42) amyloid fibril. *PNAS* 113, E4976–E4984 (2016).
9. Kurouski D, Van Duyne RP & Lednev IK. Exploring the structure and formation mechanism of amyloid fibrils by Raman spectroscopy: a review. *Analyst*, 140(15), 4967-4980 (2015).
10. Perrin RJ, Fagan AM & Holtzman DM. Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease. *Nature* 461, 916–922 (2009).
11. Gilbertson JA, Botcher NA, Rowczenio D et al. Diagnostic value of fat aspirates for amyloidosis in 950 patients. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 10(Suppl 1):P50 (2015).
12. Liu PP & Smyth D. Wild Type Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy: A Missed Etiology of HFpEF with Evolving Treatment Implications, *Circulation* 133(3):245-7 (2015).
13. Jacobsen H, Ozmen L, Caruso A. et al. Combined Treatment with a BACE Inhibitor and Anti-A β Antibody Gantenerumab Enhances Amyloid Reduction in APPLondon Mice. *J. Neurosci.* 34, 11621–11630 (2014).
14. Seo SW, Ayakta N, Grinberg LT, et al. Regional correlations between [11 C] PIB PET and post-mortem burden of amyloid-beta pathology in a diverse neuropathological cohort. *NeuroImage: Clinical*, 13, 130-137 (2017).
15. Higuchi M, Iwata N, Matsuba Y et al. 19F and 1H MRI detection of amyloid β plaques in vivo. *Nat Neurosci* 8, 527–533 (2005).
16. Rapezzi C, Quarta CC, Guidalotti PL et al. Role of 99mTc-DPD Scintigraphy in Diagnosis and Prognosis of Hereditary Transthyretin-Related Cardiac Amyloidosis. *J Am Coll Cardiol Img* 4, 659–670 (2011).
17. Yoshimura M, Ono M, Watanabe H, Kimura H & Saji H. Feasibility of Amylin Imaging in Pancreatic Islets with β -Amyloid Imaging Probes. *Scientific Reports* 4, 6155 (2014).
18. Knight MJ, McCann B, Kauppinen RA & Coulthard EJ. Magnetic Resonance Imaging to Detect Early Molecular and Cellular Changes in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8 (2016).
19. Moses WW. Fundamental Limits of Spatial Resolution in PET. *Nucl Instrum Methods Phys Res A* 648 Supplement 1, S236–S240 (2011).
20. Martí-Bonmatí L, Sopena R, Bartumeus P & Sopena P. Multimodality imaging techniques. *Contrast Media Mol Imaging* 5, 180–189 (2010).
21. Huang WY & Davis J. Multimodality and nanoparticles in medical imaging. *Dalton Transactions* 40, 6087–6103 (2011).
22. Lux F, Mignot A, Mowat P et al. Ultrasmall Rigid Particles as Multimodal Probes for Medical Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 12299–12303 (2011).
23. LeDuc G, Roux S, Paruta-Tuarez A et al. Advantages of gadolinium based ultrasmall nanoparticles vs molecular

- gadolinium chelates for radiotherapy guided by MRI for glioma treatment. *Cancer Nanotechnology* 5, 4 (2014).
24. Sancey L, Lux F, Kotb S et al. The use of theranostic gadolinium-based nanoprobe to improve radiotherapy efficacy. *BJR* 87, 20140134 (2014).
25. Truillet C, Bouziotis P, Tsoukalas C et al. Ultrasmall particles for Gd-MRI and ⁶⁸Ga-PET dual imaging. *Contrast Media Mol. Imaging* 10, 309–319 (2015).
26. Bianchi A, Moncelet D, Lux F et al. Orotracheal administration of contrast agents: a new protocol for brain tumor targeting. *NMR Biomed.* 28, 738–746 (2015).
27. Pansieri J, Plissonneau M, Heinrich-Balard L et al. Gd-nanoparticles functionalization with specific peptides for β -amyloid plaques targeting. *Journal of Nanobiotechnology* 14, 60 (2016).
28. Biancalana M & Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1804, 1405–1412 (2010).
29. Ng S, Villemagne VL, Berlangieri S et al. Visual Assessment Versus Quantitative Assessment of ¹¹C-PIB PET and ¹⁸F-FDG PET for Detection of Alzheimer's Disease. *J Nucl Med* 48, 547–552 (2007).
30. Maezawa I, Hong HS, Liu R et al. Congo red and thioflavin-T analogs detect A β oligomers. *Journal of Neurochemistry* 104, 457–468 (2008).
31. Ni R, Gillberg PG, Bergfors A, Marutle A & Nordberg A. Amyloid tracers detect multiple binding sites in Alzheimer's disease brain tissue. *Brain* 136, 2217–2227 (2013).
32. Lux F, Sancey L, Bianchi A et al. Gadolinium-based nanoparticles for theranostic MRI-radiosensitization. *Nanomedicine* 10, 1801–1815 (2015).
33. Sillerud LO, Solberg NO, Chamberlain R et al. SPION-Enhanced Magnetic Resonance Imaging of Alzheimer's Disease Plaques in A β PP/PS-1 Transgenic Mouse Brain. *J Alzheimers Dis* 34, 349–365 (2013).
34. Siontorou CG. Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy. *Int J Nanomedicine* 8, 4215–4227 (2013).
35. Habicht G, Haupt C, Friedrich RP et al. Directed selection of a conformational antibody domain that prevents mature amyloid fibril formation by stabilizing A β protofibrils. *PNAS* 104, 19232–19237 (2007).
36. Haupt C, Bereza M, Kumar ST et al. Pattern recognition with a fibril-specific antibody fragment reveals the surface variability of natural amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.* 408, 529–540 (2011).
37. Martins AF, Morfin JF, Kubickova A et al. PiB-Conjugated, Metal-Based Imaging Probes: Multimodal Approaches for the Visualization of β -Amyloid Plaques. *ACS Med. Chem. Lett.* 4, 436–440 (2013).
38. Cao P, Tu LH, Abedini A et al. Sensitivity of Amyloid Formation by Human Islet Amyloid Polypeptide to Mutations at Residue 20. *Journal of Molecular Biology* 421, 282–295 (2012).
39. Borchelt DR, Davis J, Fischer M et al. A vector for expressing foreign genes in the brains and hearts of transgenic mice. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 13, 159–163 (1996).
40. Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB et al. Familial Alzheimer's Disease-Linked Presenilin 1 Variants Elevate A β 1–42/1–40 Ratio In Vitro and In Vivo. *Neuron* 17, 1005–1013 (1996).
41. Janson J, Soeller WC, Roche PC et al. Spontaneous diabetes mellitus in transgenic mice expressing human islet amyloid polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7283–7288 (1996).
42. Kohno K, Palha JA, Miyakawa K et al. Analysis of amyloid deposition in a transgenic mouse model of homozygous familial amyloidotic polyneuropathy. *Am J Pathol* 150, 1497–1508 (1997).
43. Palha JA, Episkopou V, Maeda S, Shimada K, Gottesman ME & Saraiva MJM. Thyroid hormone metabolism in a transthyretin-null mouse strain. *J. Biol. Chem.* 269, 33135–33139 (1994).
44. Maskevich AA, Stsiapura VI, Kuzmitsky VA et al. Spectral properties of thioflavin T in solvents with different dielectric properties and in a fibril-incorporated form. *J. Proteome Res.* 6, 1392–1401 (2007).
45. Rodina NP, Sulatsky MI, Sulatskaya AI, Kuznetsova IM, Uversky VN & Turoverov KK. Photophysical Properties of Fluorescent Probe Thioflavin T in Crowded Milieu. *Journal of Spectroscopy*, vol. 2017 (2017).
46. Petiet A, Santin M, Bertrand A et al. Gadolinium-staining reveals amyloid plaques in the brain of Alzheimer's transgenic mice. *Neurobiol. Aging* 33, 1533–1544 (2012).
47. Terazaki H, Ando Y, Fernandes R, Yamamura KI, Maeda S & Saraiva MJM. Immunization in familial amyloidotic polyneuropathy: counteracting deposition by immunization with a Y78F TTR mutant. *Lab Invest* 86, 23–31 (2005).
48. Xiong N, Dong XY, Zheng J, Liu FF & Sun Y. Design of LVFFARK and LVFFARK-Functionalized Nanoparticles for Inhibiting Amyloid β -Protein Fibrillation and Cytotoxicity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7, 5650–5662 (2015).

49. Moss MA, Nichols MR, Reed DK, Hoh JH & Rosenberry TL. The peptide KLVFF-K(6) promotes beta-amyloid(1-40) protofibril growth by association but does not alter protofibril effects on cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). *Mol. Pharmacol.* 64, 1160–1168 (2003).

50. Sancey, L, Kotb B, Truillet C et al. Long-term in vivo clearance of gadolinium-based AGuIX nanoparticles and their biocompatibility after systemic injection. *ACS Nano* 9, 2477–2488 (2015).

Figures:

Figure 1 :

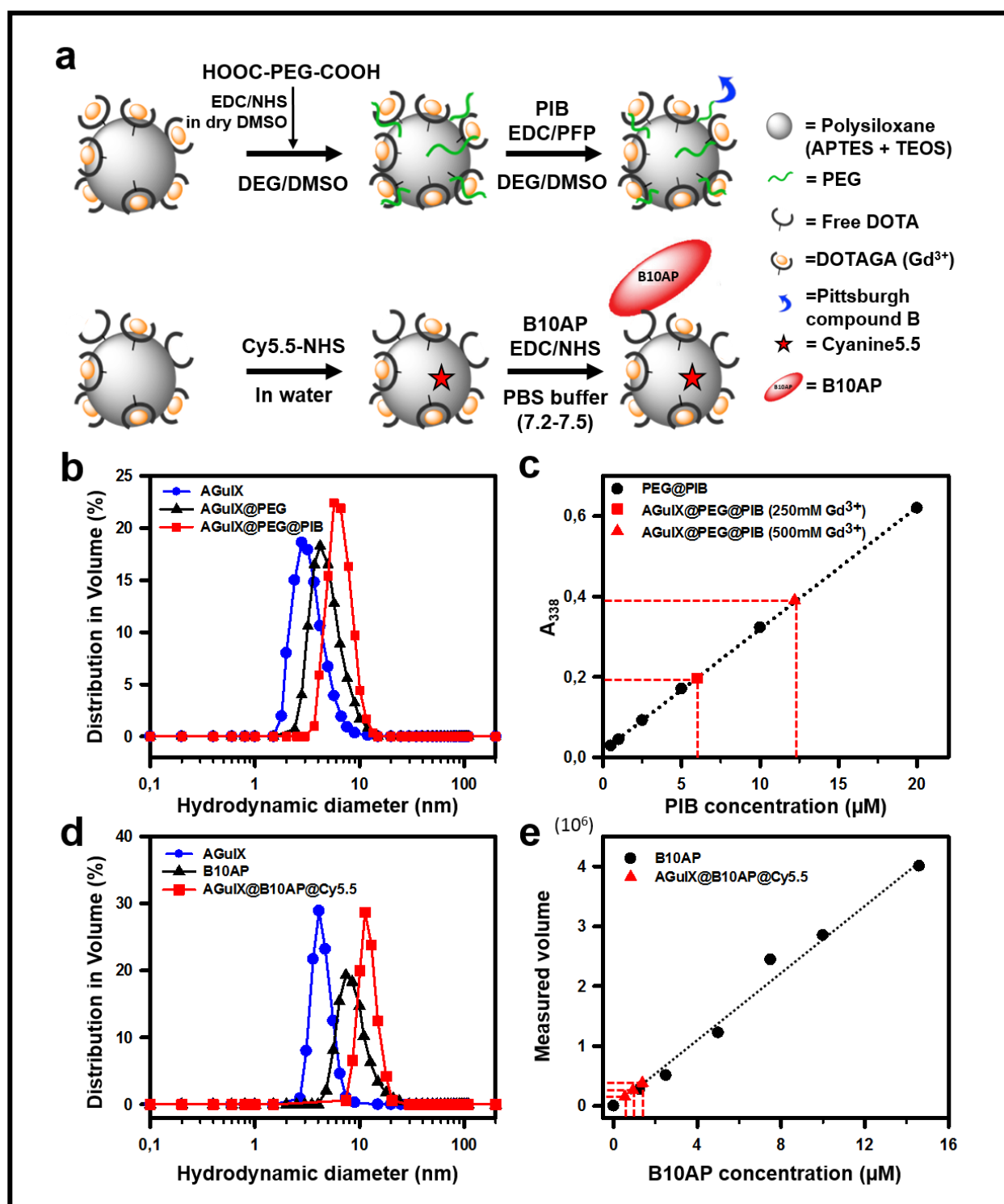


Table 1 :

	AGuIX	AGuIX@PEG	AGuIX@PEG@PIB	AGuIX (DOTA _{free} 7%)	AGuIX@B10AP
Hydrodynamic Diameter (D _H)	2.9 ± 0.7	4.3 ± 1.0	6.5 ± 1.5	4.2 ± 0.7	13.9 ± 2.6
Quantification of grafting	-	-	1 PIB : 5 NPs	-	1 B10AP : 5.4 NPs

Figure 2:

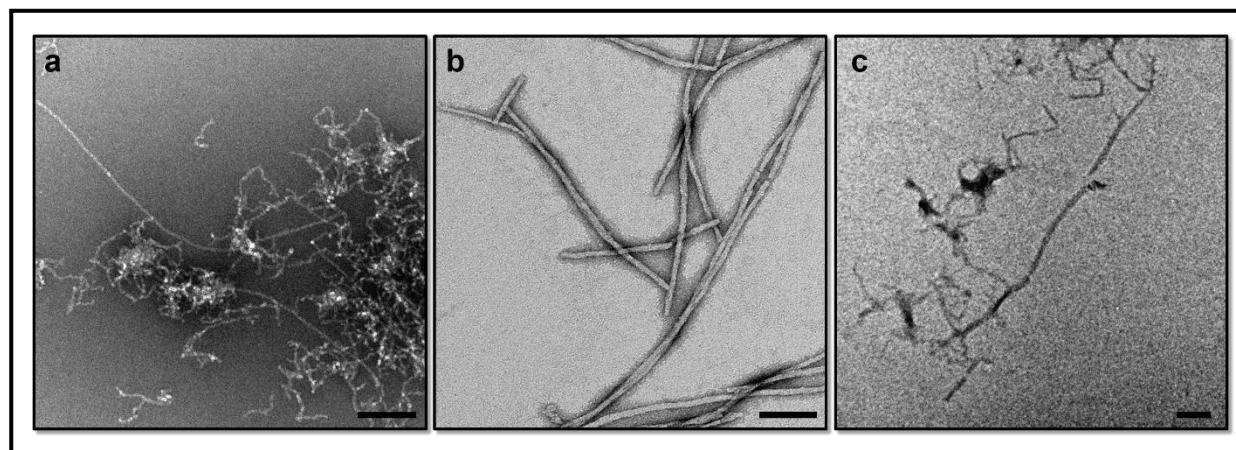


Figure 3:

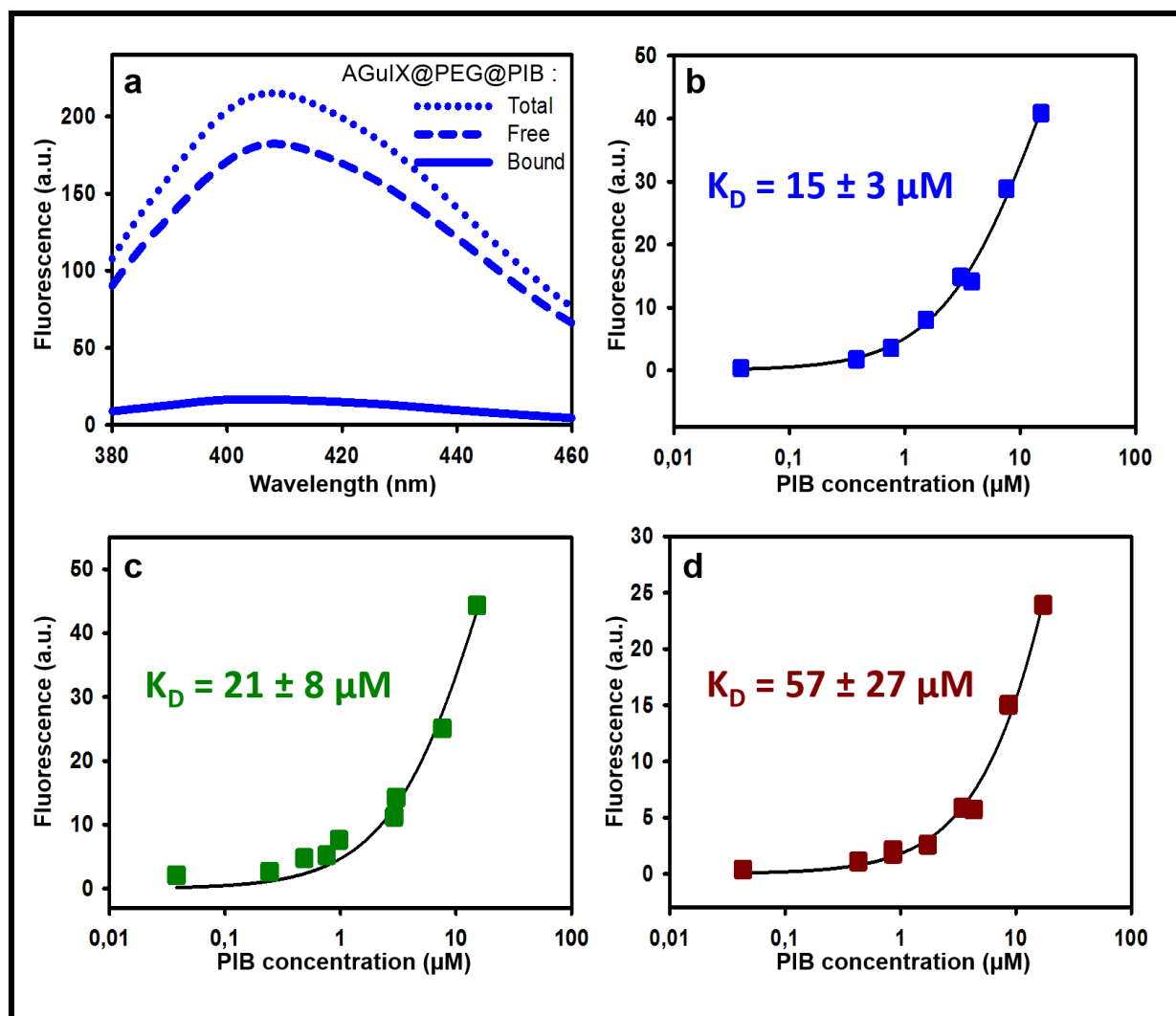


Figure 4:

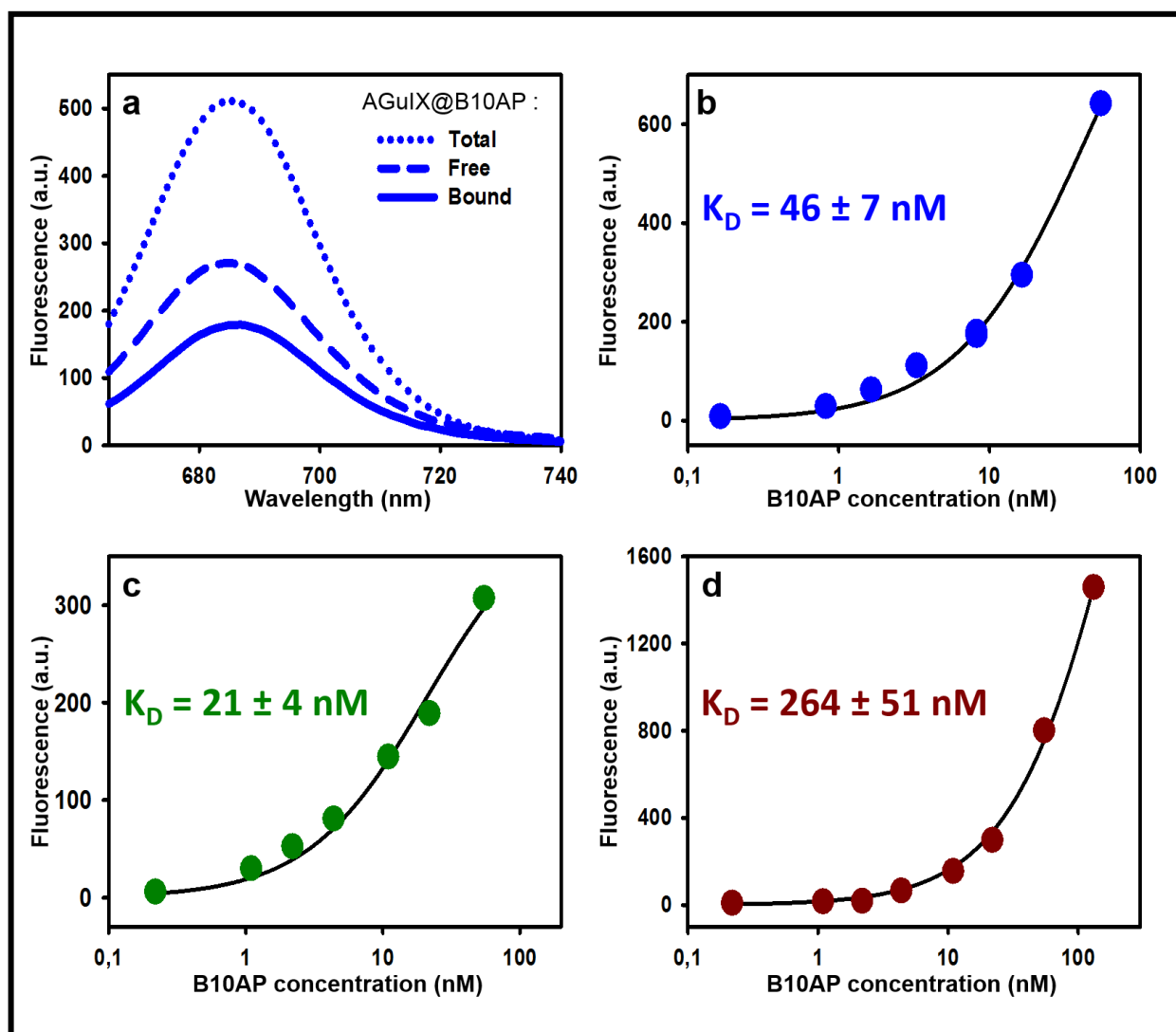


Figure 5:

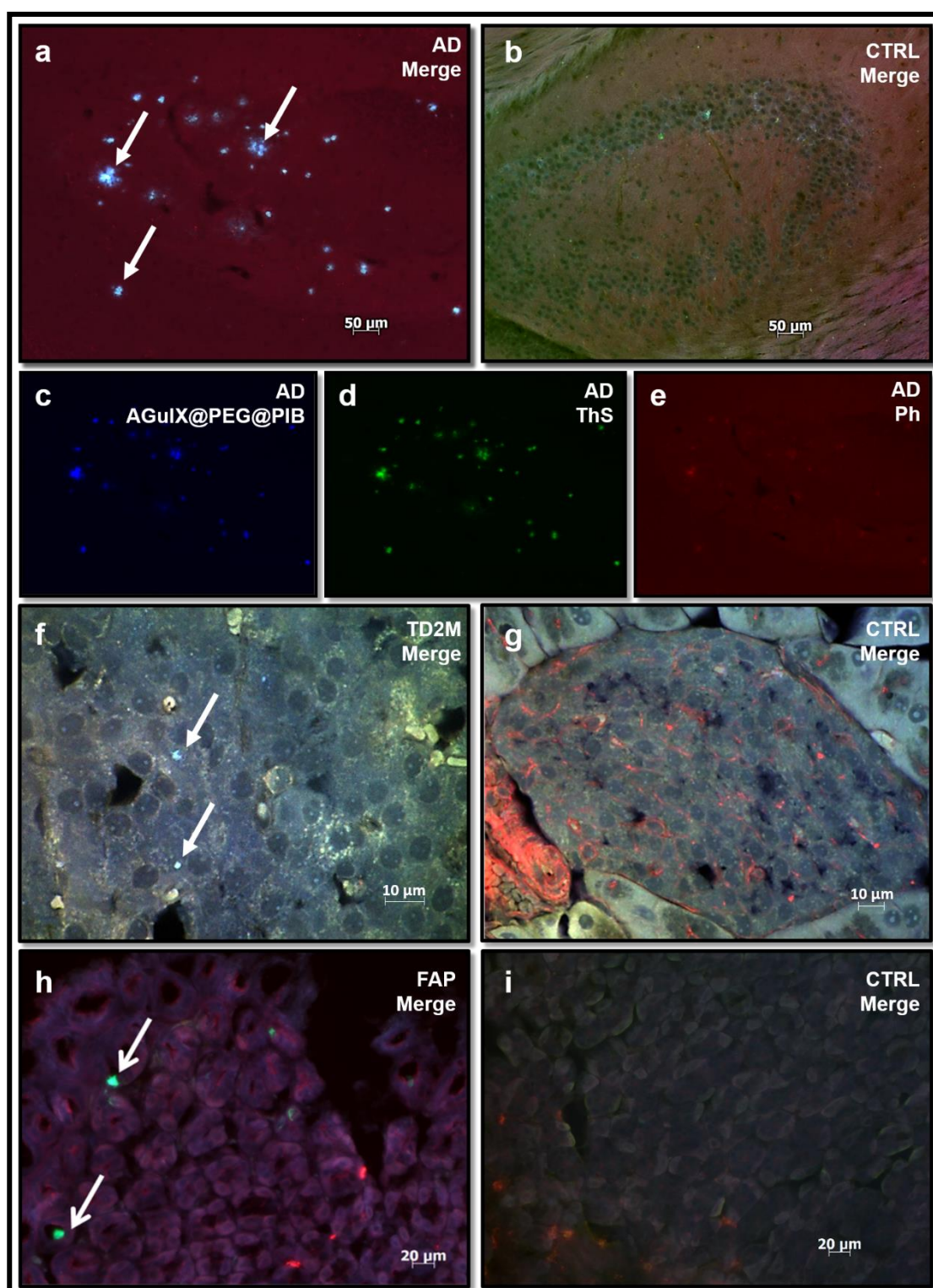
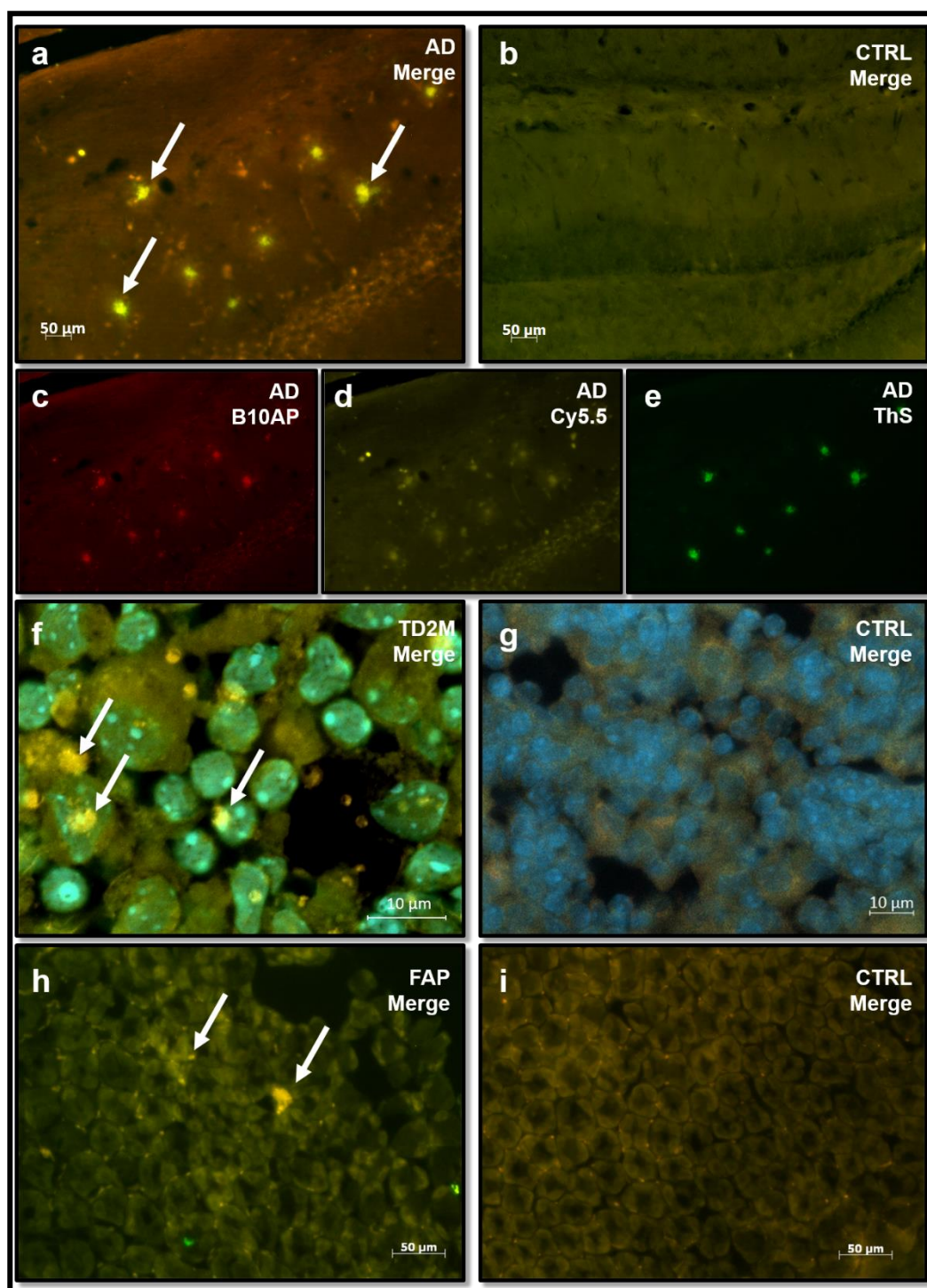


Figure 6:



Figures legends:

Figure 1: Synthesis and Characterization of AGuIX@PEG@PIB and AGuIX@B10AP@Cy5.5
 a. Reaction schemes of AGuIX nanoparticles PEGylation followed by PIB grafting (upper scheme) and AGuIX cyanination followed by nanobody B10AP grafting (lower scheme). b. Dynamic light scattering measurements of AGuIX (blue circle), AGuIX@PEG (black triangle) & AGuIX@PEG@PIB nanoparticles (red square). c. Absorption quantification of PIB grafted on AGuIX@PEG (red markers) using standard curve of PEG@PIB (black circle) at $\lambda_{\text{max}} = 338 \text{ nm}$ (A338). d. Dynamic light scattering measurements of AGuIX@DOTAfree7% (blue circle), B10AP (black triangle) & AGuIX@B10AP@Cy5.5 (red square). e. SDS-PAGE quantification of B10AP in AGuIX@DOTAfree7% suspension using standard curve of B10AP.

Table 1: Average hydrodynamic diameter of the AGuIX, AGuIX@PEG, AGuIX@PEG@PIB, AGuIX@DOTAfree7% and AGuIX@B10AP nanoparticles and the grafting yield of targeting agent (PIB or B10AP, grafted per NPs).

Figure 2. Transmission Electron Microscopy for A β (1-42) (a), IAPP (b) and V30M-TTR (c) fibrils. Fibrils with mean apparent diameter of respectively 5, 10 and 12 nm for A β (1-42), IAPP and V30M-TTR are observed. Scale bar 100 nm.

Figure 3. Interaction in vitro between amyloid fibrils and AGuIX@PEG@PIB by partition experiments (a). Representative example of a partition experiment. 800 nM in PIB of AGuIX@PEG@PIB was added to 20 μM of A β (1-42) fibrils and the fluorescence of the suspension was measured (dotted line); then after 60 min of incubation, the suspension was centrifuged and the fluorescence of NPs bound to the amyloid fibrils (i.e. present in the pellet, solid line) and that of unbound NPs (i.e. present in the supernatant, big dotted line) was measured (b,c,d). Determination of the KD using Michaelis model (1:1). The fluorescence intensity of NPs bound at $\sim 420 \text{ nm}$ is plotted as function of the total concentration of PIB functionalized on NPs, with A β (1-42) (b), IAPP (c) or V30M-TTR (d). The solid line represent the ajustement of the data to the Michaelis model (1:1) increasing concentration of PIB and fitted with.

Figure 4. Interaction in vitro between amyloid fibrils and AGuIX@B10AP@cy5.5 by partition experiments a. Representative example of a partition experiment. 11 nM in B10AP of AGuIX@B10AP@Cy5.5 was added to 40 μM of A β (1-42) fibrils and the fluorescence of the suspension was measured (dotted line); then after 60 min of incubation, the suspension was centrifuged and the fluorescence of NPs bound to the amyloid fibrils (i.e. present in the pellet, solid line) and that of unbound NPs (i.e. present in the supernatant, big dotted line) was measured (b,c,d). Determination of the KD using Michaelis model (1:1). The fluorescence intensity of NPs bound at $\sim 685 \text{ nm}$ (Cy5.5 fluorescence) is plotted as function of the total concentration of B10AP functionalized on NPs, with A β (1-42) (b), IAPP (c) or V30M-TTR (d). The solid line represent the ajustement of the data to the Michaelis model (1:1) increasing concentration of B10AP and fitted with.

Figure 5. Specific targeting of amyloid plaques with AGuIX@PEG@PIB nanoparticles on brain sections of APP^{swE}/PSE1d9 mice (a, c-e), on pancreas sections of S/FVB/N-Tg/(ins2-

hIAPP) mice (f) or stomach sections of transgenic V30M-TTR mice (h) and on respective negative control tissues: C57/Bl6 mice (b), S/FVB/NJ mice (g), and KO-TTR mice (i). Nanoparticles targeting were detected via the PIB fluorescent signal (c, blue color). Amyloid plaques were visualized using Thioflavin-S staining (d, green color). Co-localization between nanoparticles and amyloid plaques were obtained by merging PIB and ThS fluorescent staining (a, f, h, white arrows). TRITC-conjugate of phalloidin was used to label cellular actin filament (e, red color).

Figure 6. Specific targeting of amyloid plaques with AGuIX@B10AP@Cy5.5 nanoparticles on brain slices of APPswe/PSE1d9 mice (a, c-e), on pancreas sections of S/FVB/N-Tg/(ins2-hIAPP) mice (f) or stomach section of transgenic V30M-TTR mice (h) and on respective sections of negative control tissues: C57/Bl6 mice (b), S/FVB/NJ mice (g), and KO-TTR mice (i). Nanoparticles targeting were detected due to both red permanent reaction with alkaline phosphatase (c, red color) and Cy5.5 fluorescent signal (d, yellow color). Amyloid plaques were visualized using Thioflavin-S dye staining (e, green color). Co-localization between nanoparticles and amyloid plaques were obtained by merging red permanent, Cy5.5 and Thio-S fluorescent staining (a, f, h, white arrows). Cellular nucleus of the tissue were stained with Hoechst dye (f, g, blue color).

Acknowledgments

This work used the platforms of the Grenoble Instruct centre (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). We thank Mrs FENEL Daphna, Dr MORISCOT Christine and Dr SCHOEHN Guy, from the Electron Microscopy platform of the Integrated Structural Biology of Grenoble (ISBG, UMI3265). Others TEM images were obtained at the electronic microscopy platform, Neurosciences Institute of Grenoble thanks to Dr Karin Pernet Gallay, 38700 Grenoble. The authors thank Prof Horn from Jena University (Germany) for the kind gift of the plasmid ptetB10pA6H. The authors thank Pr Richard Cohen for his helpful expertise in affinity experiments.

- This work was supported by Euronanomed ENMII JTC2012 (project 2011-ERA-002-01- Dia-Amyl) and the French National Research Agency (ANR): ANR-12-RPIB Multimage.

- J.Pansieri is granted by FRM DBS2013112844<0.

- M. Plissonneau and N. Stransky-Heilkron were granted by ENMII JTC2012 (project 2011-ERA-002-01).

- M. Dumoulin is a FRS-FNRS research associate. This work was also supported by the Belgian program of Interuniversity Attraction Poles administered by the Federal Office for Scientific Technical and Cultural Affairs to M.D. (PAI 7/44).

- F. Lux and O. Tillement have one patent to disclose: WO2011135101. This patent protects the synthesis of the AGuIX® nanoparticles for imaging, used in this publication. The other authors do not have conflict of interest in this work.

Supplementary Materials

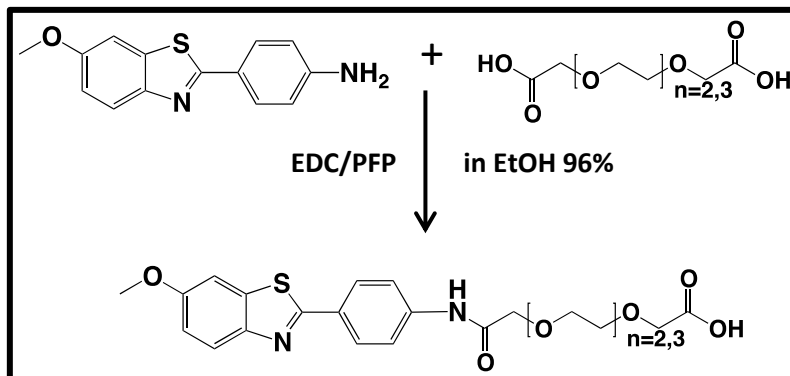
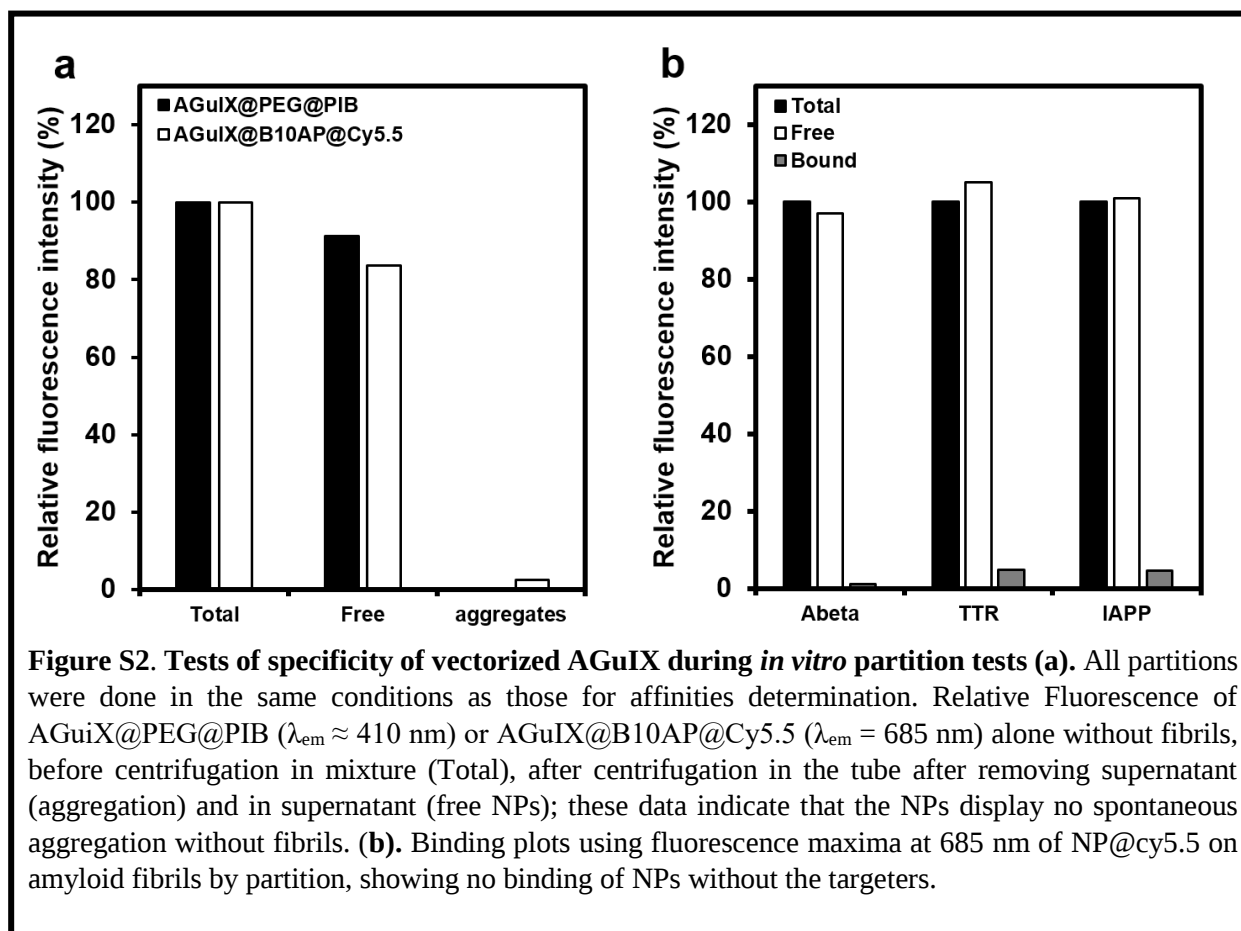


Figure S1. Reaction scheme of the pegylation of the Pittsburgh Compound B. A solution of PEG ($M_n = 250 \text{ g.mol}^{-1}$) at 50 mM in EtOH 96% was activated by EDC and PFP and reacted with PIB at 5mM for 4 hours under magnetic stirring and at room temperature. (PIB/EDC/PFP/PEG molar ratio 1 : 20 : 20 : 10). As the PEG chains and the activators EDC and PFP present no absorption and fluorescence in the PIB wavelength range, the following experiments were performed without prior purification.

	AGuIX	AGuIX@PEG	AGuIX@PEG@PIB
$r_1 \text{ (s}^{-1}.\text{mM}^{-1}\text{)}$	10	11.6	12.9
$r_2 \text{ (s}^{-1}.\text{mM}^{-1}\text{)}$	13.6	18.6	19.3
r_2/r_1	1.4	1.6	1.5

Table S1. Relaxometry measurement of AGuIX, AGuIX@PEG, and AGuIX@PEG@PIB nanoparticles at 37°C with a magnetic field of 1.4 T. These measurements show an increase in relaxometry as we functionalized the AGuIX, indirectly correlated with molecular weight, which means PEG and PIB are grafted on AGuIX.



Methods

Chemicals

N-(3-Dimethylaminopropyl)-N0-ethylcarbodiimidehydrochloride(EDC, >98.0%), Pentafluorophenol (PFP, >99.0%), N-hydroxysuccinimide (NHS, >97.0%), gadolinium chloride hexahydrate ($[\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$, 99%), sodium hydroxide (NaOH, 99.99%), hydrochloric acid (HCl, 36.5–38%), sodium chloride (NaCl, >99.5%), dimethyl sulfoxide (DMSO, >99.5%), acetonitrile (CH_3CN , >99.9%), trifluoroacetic acid (TFA, >99%), trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 1M in water, Sodium dodecyl sulfate (SDS, >99%), (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES, >98%), tetraethyl orthosilicate (TEOS, >98%) and PEG Poly(ethylene glycol) bis(carboxymethyl) ether average molecular weight (M_n) 250 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ were purchased from Aldrich Chemical (France) and used without further purification. Diethylene glycol (DEG, 99%) was purchased from SDS Carlo Erba (France). Acetone (reagent grade) was purchased from Sodipro (France) and was used as received. Purification system Vivaspin® were purchased from Sartorius Stedim Biotech (France). The AGuIX NPs were purchased from Nano-H SAS (Saint-Quentin, France) and the DOTAGA anhydride (1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-1-glutaric anhydride-4-7-10-triacetic acid) was purchased from CheMatech (Dijon, France). For the preparation of an aqueous solution of nanoparticles, only milli-Q water was used.

Techniques of nanoparticles characterization

Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES) analysis.

The determination of the accurate concentration in Gd^{3+} in the nanoparticles samples were performed by ICP-OES with a Varian® 710-ES spectrophotometer. Aliquots of nanoparticles suspension in water were diluted and heated at 80°C for 3 hours in 5 mL of concentrated nitric acid (67% $\text{HNO}_3(\text{w/w})$). Subsequently, the volume of the mixture was completed to 50 mL with diluted nitric acid (5% $\text{HNO}_3(\text{w/w})$). For the calibration of ICP-OES Gd^{3+} standard solution was used and prepared from 1000 ppm Gd-standard from SCP Science® by successive dilutions with a nitric acid diluted solution (5% $\text{HNO}_3(\text{w/w})$).

Relaxivity measurements

Relaxivity measurements were performed on a Bruker® mq60NMR analyzer at 37°C under a magnetic field of 1.4 T. Samples were measured at a specific Gd^{3+} concentration, calculated from ICP-OES. Measurements were plotted as $1/T_1$ vs Gd^{3+} concentration (mM). Then the relaxivity r_1 was obtained according to the following formula:

$$(1/T_1)_{\text{measured}} = (1/T_1)_{\text{water}} + r_1[\text{Gd}^{3+}]$$

Dynamic Light Scattering (DLS) measurements

Hydrodynamic diameters (DH) of the Nps were determined with a Zetasizer NanoS (laser He-Ne 633 nm) from Malvern Instrument® (5 mW, with 173° NIBS detector and narrow band filter). Attenuator was optimized by the device and position was set to the center of the cell. To perform the measurement, 1 mL of nanoparticles suspension at 10 mM Gd³⁺ was poured in a 12 mm square polystyrene disposable cuvette after filtration on a 0.2 µm nylon filter. Each measurement was repeated 8 times.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Sample aliquots of 20 µL were loaded in a 95% solvent A – 5% solvent B (A = Milli-Q water/TFA 99,9:0,1 v/v; B = CH₃CN/Milli-Q water/TFA 90 : 9,9 : 0,1 v/v/v) onto a Jupiter C4 column (150 x 4,60 mm, 5 µm, 300 Å, Phenomenex®) at a flow rate of 1 mL.min⁻¹ over 5 minutes. In a second step, samples were eluted by a gradient developed from 5% to 90% of solvent B in solvent A over 30 minutes. Finally, the concentration of solvent B was maintained over 10 min. Then, the concentration of solvent B was decreased to 5% over a period of 10 min to re-equilibrate the system, followed by additional 10 min at this final concentration. Before each sample measurement, a baseline was performed following the same conditions by loading Milli-Q water onto the injection loop. The UV-Visible detectors were set respectively at 295 nm and 345 nm. The fluorescence detection was enabled with an excitation at 350 nm and an emission at 420 nm.

Ultraviolet-Visible Absorption spectra

UV-Visible spectrum were recorded using a UV-Vis spectrophotometer (Varian Cary50) in the range of 200 to 800 nm, with a Hellma semi-micro cell, 10 mm light path, 1400 µL, manufactured from Suprasil quartz.

Fluorescence spectroscopy

Measurements were carried out on a Varian Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer. Samples were poured in a Hellma Analytics quartz high Precision cell with a light path of 10 x 4 mm. The spectra were recorded from 350 to 600 nm, with a medium Voltage, automatic excitation and emission filters, a scan rate of 600 nm.min⁻¹ and an averaging time of 0.1 s.

SDS-page assays

Determination of the concentration of B10AP within the NP suspension by SDS-PAGE

The concentration of B10AP in the suspension of silica-made nanoparticles (AGuIX@B10AP@Cy5.5) was estimated by SDS-PAGE (15%). Different known amounts of B10AP were loaded in order to build a calibration curve. To reach this aim, the volume of each band was determined using Gel Doc™ EZ System scanner (Bio-Rad), and was plotted as function of the B10AP concentration. In the same gel, diluted suspensions of AGuIX@B10AP@Cy5.5 were also loaded and the concentration in B10AP-Nps was calculated from the calibration curve using the the volume of the bands observed. The quantification is possible as nanoparticles are degraded in SDS so B10AP from the AGuIX@B10AP@Cy5.5 migrates similarly to the free B10AP. The images were analyzed with the program Bio-Rad's Image Lab software provided by the manufacturer and the calibration curve was done on Excel 2007.

Amyloid fibrils characterization *in vitro* and *ex vivo*

Amyloid fibril formation

Lyophilized IAPP peptide (Genecust, Luxembourg) was dissolved in 100% HFIP (1, 1, 1, 3, 3, 3-Hexafluoro-2-propanol) at 6.25g.L⁻¹. The solution was filtrated through a spin 0.2 µm membrane filter (Millipore, n°146560) to remove any aggregated species, and stored at -20 °C. IAPP fibrils were prepared by incubating monomer IAPP peptide solution (final concentration at 48 µM) in Tris-HCl buffer (Tris-HCl 20mM, pH=7.4) at 37 °C in a 1 mL reaction volume on a rotating shaker (300 rpm) for 5 days.

Animals

AD transgenic animals overexpressed human presenilin 1 (PSEN1) carrying the exon-9-deleted variant (PSEN1dE9) associated with familial AD and chimeric amyloid precursor protein APP-695 with mutations linked to familial AD. Both are under the control of the mouse prion protein promoter, directing transgene expression predominantly to the CNS neurons. Mice were deeply anesthetized with a mixture of xylazine/ketamine before sampling. Animals were intracardiacally perfused with PBS buffer, followed by 4% PFA (paraformaldehyde) fixative solution. Brains were removed from the skull and post-fixed for 24 hours at 4 °C in PFA 4% and afterward transferred in PBS buffer with 0.1% NaN₃, before microtom sectioning (20 µm, Leica, VT 1000E) for immunohistochemical analyses.

T2DM mouse model expresses human islet amyloid polypeptide (h-IAPP) under the regulatory control of the rat insulin II promotor. Male spontaneously develop T2DM due to beta-cell death, associated with abnormal intracellular aggregates of h-IAPP. Mice were anaesthetized with isoflurane 4%, and pancreases were dissected and fixed in 4% PFA fixative solution for 72 hours, and afterward transferred in PBS buffer with 0.1% NaN₃. Pancreas sections (20 µm) were obtained with a cryostat, stored at -20°C and were mounted on slice for the immunostaining experiment.

Stomach sections from FAP mice were kept in periodate-lysine-paraformaldehyde buffer and they were mounted on slides for the immunostaining experiment.

III. Conclusion et perspectives

Nous avons établi une preuve de concept mettant en avant des complexes multimodaux, ciblant plusieurs dépôts amyloïdes à l'aide de ligands particuliers. Les deux complexes mis au point possèdent des avantages complémentaires : l'AGuIX@PEG@PIB est plus petite, tandis que l'AGuIX@B10AP@Cy5.5 est plus affine.

De plus, des études antérieures ont montré que les AGuIX sont peu toxiques et très bien éliminées par le système rénal, tandis que le PIB et le B10AP ne présentent pas de toxicité significative^{166,233}.

A court terme, il serait intéressant de mesurer quantitativement les limites de détection de chaque nanoparticule sur des dépôts amyloïdes de différents types *ex vivo* (détermination des doses minimales et efficaces à injecter). Il serait également intéressant de généraliser notre approche à d'autres dépôts amyloïdes impliqués dans des pathologies, notamment en utilisant l'AGuIX@B10AP@Cy5.5, car sa meilleure affinité pour les fibres implique des quantités injectées moins importantes, pour une meilleure détection. Néanmoins, il est important de noter que les ligands génériques comme le PIB ou le B10AP, ne permettent pas de discriminer avec sensibilité une amyloïdose par rapport à une autre ; en clinique, ceci oblige à effectuer une seconde étape d'identification de la protéine (spectrométrie de masse) en aval pour s'assurer du diagnostic. La mise au point de cibles spécifiques, greffés à la nanoparticule, représente donc une perspective utile (voir Chapitre 2).

Concernant l'étude diagnostique *in vivo*, il serait logique de tester, dans un premier temps, la nanoparticule greffée avec le PIB par injection sur des modèles animaux (souris puis chimpanzés), car sa plus petite taille implique qu'elle soit diffusée plus rapidement dans le corps. Dans ce cadre, les modèles murins de la MA, du DNID et la PNF-TTR devraient être les premiers testés. Néanmoins, étant donné que l'AGuIX seule ne peut traverser spontanément la BHE, son usage pour le diagnostic de la MA s'avère difficile. Certaines technologies existent afin de contourner cette limite, comme l'utilisation d'ultrasons, ouvrant de manière transitoire la BHE, et autorisant le passage d'agents exogènes pendant un temps donné (voir Chapitre 3). Si les résultats s'avéraient concluants, les nanoparticules avec le PIB ou le B10AP pourraient alors être testées indépendamment, ce qui représenterait une étape importante vers les tests chez l'Homme. Ces nanoparticules représentent donc des outils prometteurs pour le ciblage de nombreuses amyloïdoses *in vivo* et leur détection par plusieurs techniques d'imagerie, additionnant résolution spatiale et sensibilité.

Chapitre 2 : Détection spécifique des amyloïdoses

I. Introduction

La suite de ce travail de thèse a consisté à établir une seconde preuve de concept, par la mise au point et la synthèse d'AGuIX fonctionnalisées avec des séquences peptidiques spécifiques d'un seul type de fibre amyloïde *in vitro*, ce dernier associé à un seul type d'agrégat *ex vivo* (**Figure 21**). Notre stratégie est fondée sur la sélection de polypeptides de 5 à 11 AAs, provenant des brins β d' $A\beta_{1-42}$, IAPP ou TTR-V30M, et correspondants aux parties amyloïdogéniques de ces protéines, fondamentales pour l'agrégation, et spécifiques pour chaque pathologie. Nous avons vu précédemment que les séquences centrées sur la région β -breaker du peptide $A\beta_{1-42}$ (positions 16-20, notés KLVFF) font partie intégrante d'un brin β , et sont fondamentales pour l'agrégation naturelle et spontanée de ce peptide amyloïde sous forme de fibres (voir Introduction générale-II.5.1.). Le peptide KLVFF synthétique a donc été le premier à être greffé sur les nanoparticules pour l'étude du ciblage spécifique.

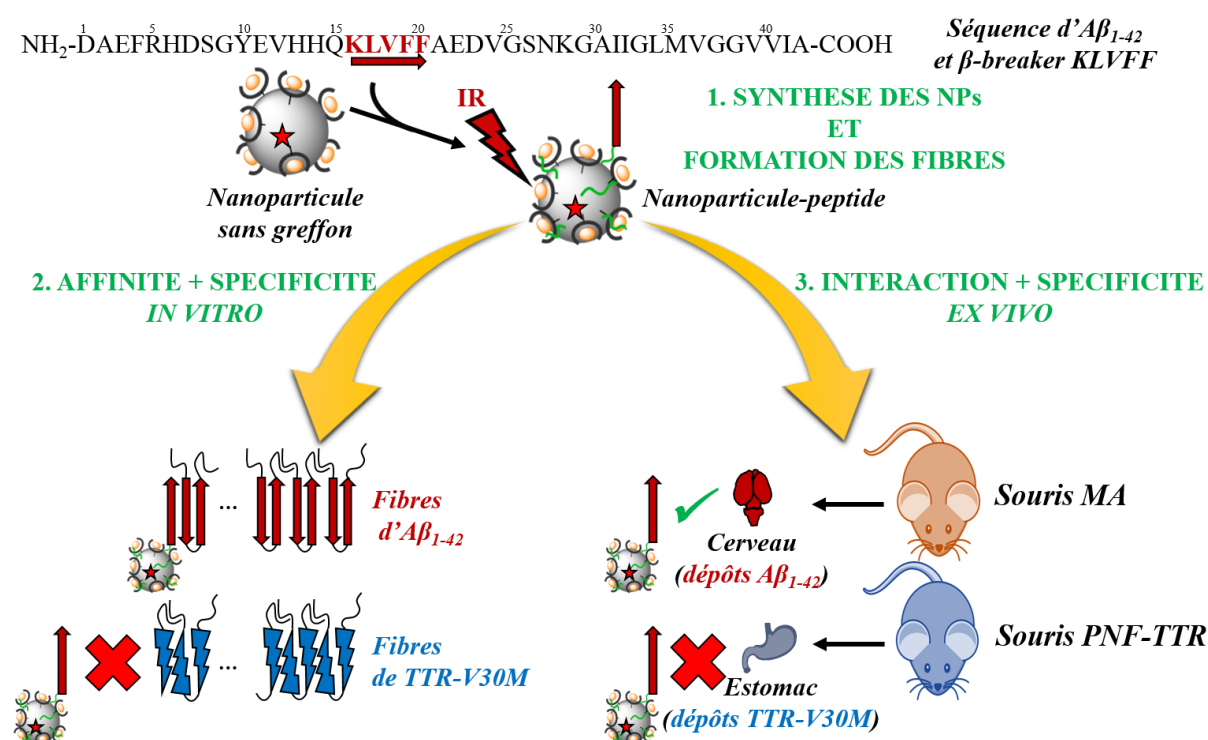


Figure 21. Représentation de la stratégie de ciblage spécifique : exemple de la MA via les dépôts $A\beta_{1-42}$ et résultats attendus. Les NP-peptides sont supposées cibler seulement les agrégats $A\beta_{1-42}$, et non les agrégats TTR-V30M. Les méthodes sont basées sur la fluorescence des nanoparticules après excitation vers le proche infra-rouge via la Cy5.5 (IR, $\lambda_{ex} = 655$ nm).

Nous avons procédé par analogie au niveau des deux autres amyloïdoses. Même si cette stratégie a été largement testée pour les protéines impliquées dans la MA, elle est relativement

inédite concernant le DNID et la PNF-TTR, et se base sur les données structurales connues de ces protéines amyloïdes d'intérêts.

Ainsi, Nous avons choisi les pentapeptides KLVFF et LPFFD pour cibler spécifiquement les dépôts $A\beta_{1-42}$ (voir introduction générale-II.5.2.). Le peptide LPFFD est un dérivé de KLVFF, présentant une meilleure affinité pour les fibres tout en prévenant leur auto-agrégation.

Concernant les dépôts IAPP, nous avons choisi des peptides se situant autour de la région 20-29, considérée fondamentale pour l'agrégation, et également β -breaker (voir introduction générale-II.5.2.). Ainsi, nous avons sélectionné puis greffé les peptides SNNFGA, NFGAIL et CSNNFGA sur les NPs.

En ce qui concerne les dépôts TTR-V30M, la littérature décrit le peptide aux positions 105-115 (YS-11, voir Introduction générale-II.5.3.) comme signifiant dans l'agrégation sous formes de fibres. En effet, une fois synthétisé, ce peptide s'auto-agrège rapidement sous des formes fibrillaires. Nous avons donc choisi différentes zones de ce décapeptide pour nos tests d'affinités : YTIAAL, LLSPYS, IAALLSP.

De la même manière que pour le B10AP, la Cy5.5 a été greffée sur chaque nanoparticule d'intérêt, afin de pouvoir détecter et quantifier l'interaction entre ces complexes et les fibres amyloïdes *in vitro*. Un *spacer* a été ajouté afin de permettre l'accessibilité des zones d'interactions des peptides. Nous nous sommes servis principalement de la diffusion dynamique de la lumière (DDL) pour suivre les diamètres hydrodynamiques des NPs après greffage des peptides, et du dichroïsme circulaire (DC) pour quantifier les peptides à leurs surfaces. La non toxicité cellulaire des NPs fonctionnalisées avec chaque peptide ciblant les fibres $A\beta_{1-42}$, a été contrôlée sur des cellules neuronales par un test au bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (test MTT). Comme précédemment, les tests *in vitro* d'interactions, mettant en commun chaque type de fibres amyloïdes et les AGuIX vectorisées, ont été réalisés par partition par centrifugation, et par résonance plasmonique de surface (RPS, Biacore). Le ciblage des dépôts amyloïdes *ex vivo* par les AGuIX fonctionnalisées a été observé par microscopie à fluorescence. Toutes ces méthodes sont identiques à celles utilisées dans le chapitre 1 (**Figure 20**).

II. Résultats

Trois étapes sont nécessaires pour confirmer le ciblage spécifique des AGuIX pour les trois types de fibres :

- i. **La synthèse contrôlée** et reproductible des nanoparticules vectorisées ainsi qu'une formation maîtrisée *in vitro* des fibres amyloïdes.
- ii. **La détermination de l'affinité** *in vitro* des NPs pour les fibres *via* les Kds, et la spécificité de chaque NP pour un seul type de fibre amyloïde.
- iii. **La détection spécifique** des agrégats amyloïdes *ex vivo* d'une seule pathologie.

Dans l'ensemble de ces résultats, la formation de fibres A β_{1-42} , IAPP ou TTR-V30M *in vitro* a été contrôlée par DC pour leurs structures en feuillets β , et observées par MET (voir **Annexe 1**).

II.1. Ciblage des dépôts A β_{1-42} (Alzheimer)

Les deux nanoparticules synthétisées pour interagir spécifiquement avec les dépôts A β_{1-42} ont été greffées soit avec le peptide KLVFF, notée AGuIX@PEG@KLVFF, soit avec le peptide LPFFD, notée AGuIX@PEG@LPFFD (Figure 2 de l'article 2). Elles ont été toutes les deux marquées avec la Cy5.5 pour leur détection par fluorescence. Toutes les étapes de synthèse sont contrôlées : on estime 10 gadoliniums par nanoparticule (analyse élémentaire), 1 Cy5.5 pour 200 AGuIX@PEG@KLVFF, et 1 Cy5.5 pour 167 AGuIX@PEG@LPFFD (spectroscopie de fluorescence). Le succès de greffage du *spacer* PEG est contrôlé par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. Le greffage des peptides implique une légère augmentation des diamètres hydrodynamiques, de 2.9 ± 0.8 nm (AGuIX@PEG) à 3.5 ± 0.9 nm (AGuIX@PEG@KLVFF) et 3.2 ± 0.8 nm (AGuIX@PEG@LPFFD). La réussite de ce greffage est confortée par chromatographie par absorption UV, montrant une augmentation des temps de rétention de 11.4 min pour les AGuIX@PEG, à 11.9 min pour les deux NP-peptides (voir Figure S4 de l'article 2). Les AGuIX@PEG@KLVFF et AGuIX@PEG@LPFFD présentent également une légère augmentation de leurs relaxivités après greffage des peptides, valeurs en rapport direct avec les temps de relaxation, garantissant leur utilité en IRM : ces valeurs sont dans les normes pour les considérer comme agents de contraste positifs (r_1 respectifs calculés à 14.1 et 13.2 s⁻¹.mM⁻¹ à 60 Hz et 37°C, Table 1 de l'article 2). Le nombre de peptides greffés ont été estimé grâce au DC dans l'UV lointain, où chaque peptide possède un signal spécifique. Ainsi, 2.25 ± 0.1 peptide KLVFF et 1.6 ± 0.2 peptide LPFFD ont été évalués par nanoparticule : ces résultats sont satisfaisants pour le ciblage tout en garantissant l'absence d'encombrement stérique.

Par ailleurs, avec plus de 80 % des cellules neuronales testées encore en vie, après 1h d'incubation avec les AGuIX@PEG@KLVFF ou les AGuIX@PEG@LPFFD à hautes

concentrations (5mM en gadolinium), nous pouvons confirmer que ces NPs sont peu toxiques et semblent compatibles pour les tests *in vivo* (Figure S7 de l'article 2).

Les Kds des peptides, seuls ou greffés aux AGuIX, ont été calculées et comparées à celles du PIB seul pour les fibres A β ₁₋₄₂ et TTR-V30M, dans des conditions d'études similaires (Figure 3,4 et 5 de l'article 2). Ces tests *in vitro* permettent de conclure que l'affinité des peptides n'est pas impactée significativement par le greffage, et que les deux nanoparticules sont spécifiques des fibres A β ₁₋₄₂. Les Kds calculées sont de $393 \pm 23 \mu\text{M}$ (KLVFF seul) contre $534 \pm 134 \mu\text{M}$ (AGuIX@PEG@KLVFF), et de $317 \pm 48 \mu\text{M}$ (LPFFD seul) contre $261 \pm 59 \mu\text{M}$ (AGuIX@PEG@LPFFD). La Kd du *gold standard* PIB est évaluée à $6 \mu\text{M}$ pour les fibres A β ₁₋₄₂, son affinité est donc bien supérieure à celles des NPs-peptides. Cependant, les deux AGuIX-peptides (sans Cy5.5) ne montrent aucune affinité pour les fibres de TTR-V30M, contrairement au PIB avec une affinité de $10 \mu\text{M}$: les AGuIX greffées avec les deux peptides A β ciblent donc spécifiquement les fibres amyloïdes A β ₁₋₄₂.

Ces résultats prometteurs ont été confirmés par des tests *ex vivo* sur des coupes de cerveaux de souris modèles de la MA (présentés en figure 6 & 7 de l'article 2), et montrent la reconnaissance des plaques amyloïdes A β par les deux nanoparticules vectorisées. En effet, on a pu observer par microscopie optique, une forte fluorescence de la Cy5.5, due à l'interaction des AGuIX@PEG@KLVFF ou AGuIX@PEG@LPFFD (couleur jaune) avec les dépôts amyloïdes, localisée au niveau de l'hippocampe de souris modèles de la MA. Cette fluorescence est restreinte à des zones spécifiques autour de $10 \mu\text{m}$ de diamètre, avec une diffusion du signal autour de ces structures, qui ont été identifiées comme étant des plaques séniles, formées essentiellement de fibres d'A β ₁₋₄₂. En revanche, on peut voir dans le gyrus denté un marquage par les AGuIX-peptides de manière non spécifique, celui-ci dû à la Cy5.5 (voir Figure S9 de l'article 2). Or, il est envisagé à terme de supprimer ce fluorochrome pour se concentrer sur les techniques d'IRM et de PET *in vivo* chez l'Homme. Le ciblage spécifique des dépôts amyloïdes est confirmé par l'absence de marquage des AGuIX-peptides sur des coupes de cerveaux de souris non pathologiques, et également par l'absence d'interaction entre les AGuIX sans les peptides, et les plaques séniles de souris Alzheimer.

L'ensemble des résultats et des méthodes est présenté dans l'article 2, publié en 2016 dans le journal international *Journal of Nanobiotechnology*, avec comité de lecture et de sélection.

RESEARCH

Open Access

Gd-nanoparticles functionalization with specific peptides for β -amyloid plaques targeting



Marie Plissonneau^{2,3†}, Jonathan Pansieri^{1†}, Laurence Heinrich-Balard^{4,5}, Jean-François Morfin⁶, Nathalie Stransky-Heilkron⁷, Pascaline Rivory^{4,5}, Pierre Mowat¹, Mireille Dumoulin⁸, Richard Cohen^{4,5,9}, Éric Allémann⁷, Éva Tóth⁶, Maria Joao Saraiva¹⁰, Cédric Louis², Olivier Tillement³, Vincent Forge¹, François Lux³ and Christel Marquette^{1*}

Abstract

Background: Amyloidoses are characterized by the extracellular deposition of insoluble fibrillar proteinaceous aggregates highly organized into cross- β structure and referred to as amyloid fibrils. Nowadays, the diagnosis of these diseases remains tedious and involves multiple examinations while an early and accurate protein typing is crucial for the patients' treatment. Routinely used neuroimaging techniques such as magnetic resonance imaging (MRI) and positron emission tomography (PET) using Pittsburgh compound B, [¹¹C]PIB, provide structural information and allow to assess the amyloid burden, respectively, but cannot discriminate between different amyloid deposits. Therefore, the availability of efficient multimodal imaging nanoparticles targeting specific amyloid fibrils would provide a minimally-invasive imaging tool useful for amyloidoses typing and early diagnosis. In the present study, we have functionalized gadolinium-based MRI nanoparticles (AGuIX) with peptides highly specific for A β amyloid fibrils, LPFFD and KLVFF. The capacity of such nanoparticles grafted with peptide to discriminate among different amyloid proteins, was tested with A β (1–42) fibrils and with mutated-(V30M) transthyretin (TTR) fibrils.

Results: The results of surface plasmon resonance studies showed that both functionalized nanoparticles interact with A β (1–42) fibrils with equilibrium dissociation constant (K_d) values of 403 and 350 μ M respectively, whilst they did not interact with V30M-TTR fibrils. Similar experiments, performed with PIB, displayed an interaction both with A β (1–42) fibrils and V30M-TTR fibrils, with K_d values of 6 and 10 μ M respectively, confirming this agent as a general amyloid fibril marker. Thereafter, the ability of functionalized nanoparticle to target and bind selectively A β aggregates was further investigated by immunohistochemistry on AD like-neuropathology brain tissue. Pictures clearly indicated that KLVFF-grafted or LPFFD-grafted to AGuIX nanoparticle recognized and bound the A β amyloid plaque localized in the mouse hippocampus.

Conclusion: These results constitute a first step for considering these functionalized nanoparticles as a valuable multimodal imaging tool to selectively discriminate and diagnose amyloidoses.

Keywords: Beta-amyloid fibrils, MRI contrast agent, Gadolinium based nanoparticles, Amyloid imaging, Peptide-targeting, Alzheimer's disease

*Correspondence: christel.marquette@cea.fr

[†]Marie Plissonneau and Jonathan Pansieri contributed equally to this work

¹ Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, Université Grenoble Alpes, CEA Life Science Division, CNRS, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France

Full list of author information is available at the end of the article



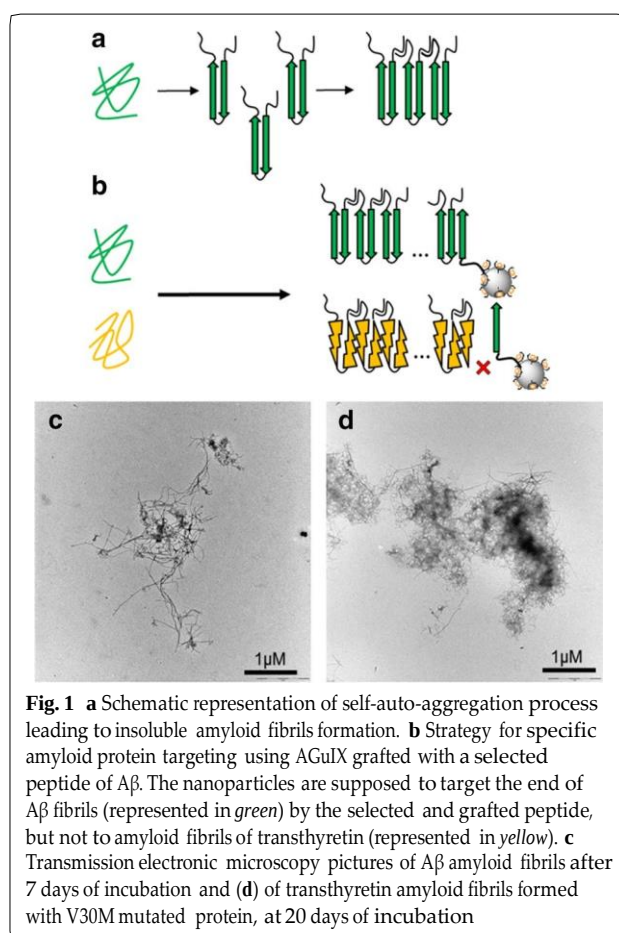
Background

Amyloidoses constitute a wide range of human diseases which are related to the conversion of soluble proteins into well-organized and insoluble fibrillar deposits, due to protein misfolding and self-association into amyloid aggregates enriched with cross- β sheet structures [1] (Fig. 1a). There are approximately 40 disorders associated with amyloid fibril formation and deposition in the extracellular space of various organs and tissues. They include neurodegenerative diseases (e.g. Alzheimer's disease, AD), systemic amyloidoses (e.g. familial amyloid polyneuropathy, FAP) and localized amyloidoses (e.g. type II diabetes). Each disorder has a distinct clinical profile and is associated with the aggregation of a predominant peptide or protein [2], i.e. amyloid- β peptide (A β) in AD, transthyretin (TTR) in FAP, or amylin in type II diabetes. Currently, the diagnosis of amyloidoses is established from the results of multiple invasive examinations [3, 4], and is complicated by the involvement of several organs, and by the fact that symptoms are unspecific. In recent years, amyloidoses attracted considerable interest from scientists in different disciplines, resulting in a better

understanding of their pathogenesis and of the molecular mechanisms of amyloid formation. This knowledge has led to important advances useful for designing new tools to achieve early and reliable diagnosis of these pathologies.

Among amyloidosis, the major cause of dementia in the elderly population, Alzheimer's disease is the most common age-related neurodegenerative disease. The number of people living with dementia worldwide is estimated at 44 million, and is set to almost double by 2030 and more than triple by 2050 [5]. Establish AD diagnosis needs long and exhaustive cognitive test, completed by neuroimaging examination in order to be differentiated from other causes of dementia: vascular dementia, dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease with dementia, frontotemporal dementia and reversible dementias. The neuropathological hallmarks of AD include extracellular plaques of A β peptide, intracellular neurofibrillary tangles and dystrophic neurites, which constitute the final markers attesting definitively of the disease. These histopathologic lesions are restricted to selective brain regions involved in memory and language, i.e. the hippocampus and the cortex [6]. The progressive aggregation of A β peptides into plaque structures is one of the critical events leading to the progressive dismantling of synapses, neuronal circuits and networks [7–9], and to neurodegeneration [10, 11]. Interestingly, the appearance of amyloid plaques occurs years before the appearance of cognitive symptoms [12, 13] and is considered to be the distinct hallmark of early onset of the disease activating the sequential lesion events. Therefore, the *in vivo* detection and quantification of amyloid species within the brain of patients at risk constitutes a promising strategy for the early diagnosis and treatment of Alzheimer's disease.

Currently, magnetic resonance imaging (MRI) is the preferred neuroimaging examination for AD as it allows an accurate measurement of brain structures' volume, although a decrease of this latter appears to be a non-specific and late feature of cerebral vascular diseases' progression [14]. Thus, studies are under way to develop specific imaging markers for different types of dementia, including markers of senile plaques for very-high-field MRI and positron emission tomography (PET) [15]. A better characterization of the amyloid plaque presence and load in the brain can be also expected from imaging approaches using amyloid ligands as imaging agents [16]. One of the most extensively used is the Pittsburgh compound B (PIB, [^{11}C]2-(4'-methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole), which binds with high affinity to any amyloid fibrils [17–21] and displays a PET signal *in vivo*, and correlates strongly with the amyloid burden [20]. Although several PET probes are currently under



clinical investigation, and preliminary results indicate that these tracers cannot differentiate between amyloid plaques at various stages and of different nature [17, 19–23]. Indeed, irrespective of the neurodegenerative disease investigated, none of these studies have mapped A β pathologies in sufficient details to allow a quantitative correlation between the PET signal and the amyloid burden in different regions of the brain. Thus, novel non-invasive A β binding substances suitable for in vivo imaging, with high protein specificity and detection sensitivity, need to be elaborated.

The development of multifunctional nanoparticles represents a breakthrough in medical imaging since these nanoobjects can meet the requirements of several imaging techniques such as MRI, optical imaging or single photon emission CT (SPECT)/PET scintigraphy while offering excellent resolution and sensitivity. For instance, functionalization of such nanoparticles with specific biovectors allows their active targeting to tumors leading to a more accurate diagnosis [24]. Likewise, small A β peptides were coupled to gold nanoparticles in order to inhibit A β fibrillogenesis [25] or to ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles in order to design contrast agents for A β plaque MRI imaging [26].

Recently, sub-5 nm gadolinium-based nanoparticles [27, 28] (AGuIX) have been developed that are suitable for multimodal detection: (1) in MRI, DOTAGa(Gd³⁺)-grafted AGuIX nanoparticles led to significantly higher positive contrast when compared to classical molecular agents such as DOTAREM® [27, 29, 30]; (2) SPECT/PET can be carried out following radiolabeling; and (3) in vivo near infrared fluorescence imaging can be performed following the grafting of an appropriate fluorophore. Such multimodal imaging platform, gathering multi-detection possibilities, allows achieving, in vivo, a sensitive and reliable imaging. Furthermore, their functionalization with RGD peptides was realized in order to target and detect tumors [30, 31]. Due to their small size and biodegradability, AGuIX are efficiently eliminated from the body through renal clearance with no evidence of toxicity [32].

With the aim to develop a sensitive imaging tool which target amyloid fibrils and able to discriminate between different protein amyloid aggregates, we have focused on A β (1–42) fibrils as a proof of concept for amyloidosis. To this end, AGuIX nanoparticles were grafted with two small peptides derived from the sequence of A β (1–42). The peptide KLVFF (corresponding to the hydrophobic core short A β (16–20) fragment) which is crucial for the formation of the β -sheet structures [33, 34] and binds to the full-length A β peptide via atypical antiparallel β -sheet motif [35, 36], and the peptide LPFFD which binds to the central hydrophobic region of A β [37]. The rationale behind our investigation is that thanks to their

capacity to co-aggregate with A β (1–42), KLVFF and LPFFD grafted on AGuIX are expected to target specifically the fibril ends of A β (1–42) deposits (Fig. 1b), their interaction is reported by fluorescence detection of a near infrared fluorophore (cyanine 5.5) also chemically grafted on AGuIX.

Results and discussion

In this work, we have optimized the functionalization of AGuIX nanoparticles with peptides in order to selectively target A β (1–42) fibrils and detect amyloid plaque in AD animal tissue. AGuIX synthesis were firstly modified and optimized by addition of a PEG chain for LPFFD and KLVFF grafting optimization, the two selected A β (1–42) pentapeptides. Then, AGuIX@PEG@LPFFD and AGuIX@PEG@KLVFF were labeled with the near infrared fluorescent compound cyanine 5.5, allowing in vitro and ex vivo experiments. The binding specificity was tested using amyloid fibril: (1) A β amyloid (1–42) fibrils, implicated into plaque amyloid burden in AD, and (2) Val>30->Met mutated transthyretin (V30M-TTR) fibrils [38, 39], one of the more than 80 identified mutations on TTR as causative gene abnormality in FAP [40]. The efficiency of the selective interaction was also compared with the PIB-binding to each amyloid fibril. Finally, the specificity of recognition of A β -grafted nanoparticles was achieved by immunohistochemistry experiments on brain sections of Alzheimer's disease mouse model.

Nanoparticles functionalization with targeting peptides
AGuIX nanoparticles (Nps) were synthesized by an original top-down process as previously described [29]. This synthesis led to the formation of Nps displaying a hydrodynamic diameter of 2.7 ± 0.7 nm and an average molecular weight of 8.5 ± 1.0 kDa as judged by DLS and HPLC respectively (Additional file 1). The skeleton of the nanoparticles is composed of a polysiloxane network containing free amino functions obtained by the use of APTES ((3-Amino)propyltriethoxy silane) precursor during sol/gel process. The primary amine of APTES allows covalent grafting of about ten DOTAGa (Gd³⁺) chelates per particle through amide bond formation resulting from the reaction of the amines with the anhydride function. Small chains of polyethylene glycol diacid (PEG) were added to nanoparticles with one end to be grafted covalently to the nanoparticle, the other remaining available for peptide coupling (Additional file 1). The nanoparticles surface modification was monitored and characterized by complementary techniques, including Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR) and measurement of the ζ -potential (Additional file 1). Altogether, the results clearly indicated that PEG chains have been grafted to the nanoparticles, leading to about 5 carboxylic acid

functions per Np. Therefore, these AGuIX@PEG are suitable for peptides coupling (Additional file 1).

KLVFF and LPFFD were grafted to nanoparticles by amide formation thanks to classical carbodiimide chemistry between their N-terminal and the carboxylic acid function of the AGuIX@PEG (Additional file 1). Dynamic light scattering measurement (Fig. 2a) showed a slight increase of the Nps hydrodynamic diameter after peptide grafting: 3.2 ± 0.8 nm for the AGuIX@PEG@LPFFD and 3.5 ± 0.9 nm for the AGuIX@PEG@KLVFF compared to 2.9 ± 0.9 nm for the AGuIX@PEG. The shifts observed in relaxometry (Table 1), HPLC (Additional file 1), and DLS (Fig. 2a) are also in accordance with an efficient grafting of the peptides on AGuIX@PEG. The number of A β -peptides grafted to the nanoparticles was evaluated by far UV-circular dichroism at 1.6 ± 0.2 LPFFD-peptide per AGuIX@PEG and 2.25 ± 0.10 KLVFF-peptide per AGuIX@PEG (Fig. 2b). In parallel, elementary analyses were performed on the vectorized nanoparticles and confirmed the presence of about two peptides per nanoparticle (Additional file 1). These findings were validated by the quantification of free amine in the nanoparticles using the

trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) method [41] (Additional file 1).

The quality of both AGuIX@PEG@LPFFD and AGuIX@PEG@KLVFF as MRI contrast agent was verified according to their relaxivity values. Both longitudinal (r_1) and transversal (r_2) relaxivities increased after peptide grafting. These high values are due to the important molecular weight of the Nps and to the rigidity induced by the Nps skeleton, leading to an increase of the rotation correlation time [42, 43]. Thus, the AGuIX@PEG showed a $r_1 = 12.0 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ and $r_2 = 18.7 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, when these values rose for the AGuIX@PEG@LPFFD ($r_1 = 13.2 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ and $r_2 = 20.1 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) and for the AGuIX@PEG@KLVFF ($r_1 = 14.1 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ and $r_2 = 23.0 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$). The r_2/r_1 ratios tend to one (Table 1). These values are significantly higher than those of the molecular contrast agents (DOTAREM[®]: $r_1 = 3.4 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ and $r_2 = 4.8 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ at 60 MHz) confirming the MRI positive contrast imaging feature of AGuIX nanoparticles [44] (Table 1). These measures indicated that the two distinct nanoparticles grafted with specific A β

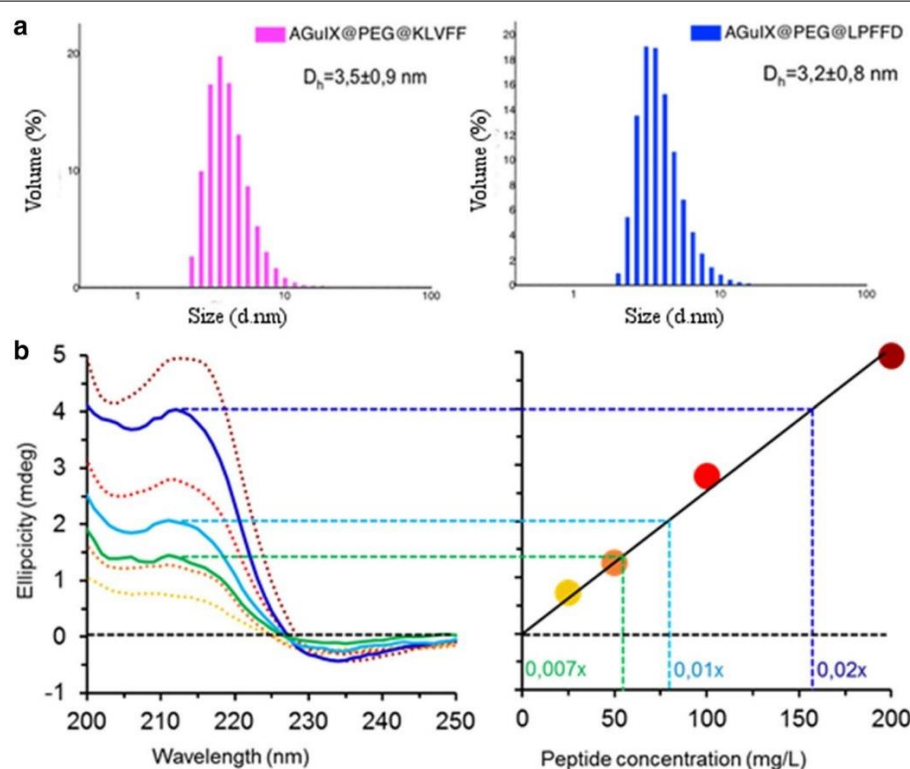


Fig. 2 Amyloid peptide-targeted AGuIX characterization: **a** hydrodynamic diameter measurements of AGuIX@PEG@KLVFF (pink) and AGuIX@PEG@LPFFD (blue) by dynamic light scattering measurements ($\lambda = 532$ nm). **b** Quantification of the number of peptides grafted on AGuIX[®] nanoparticles. Circular dichroism signal of free KLVFF at 25, 50, 100, 200 mg L⁻¹ at 212 nm (dotted lines) were reported on standard curve with reporting ellipticity of peptide on nanoparticles in concentration function. To quantify the number of KLVFF grafted per nanoparticle, various dilution (from 50 to 150 times) (continuous lines) were measure and reported on the graph with a number of peptide correspondence

Table 1 Transversal and longitudinal relaxivities of the nanoparticles and the molecular contrast agent DOTAREM®, and the ratio between their transversal and their longitudinal relaxivities at 60 MHz and 37 °C

	AGuIX	AGuIX@PEG	AGuIX@PEG@LPFFD	AGuIX@PEG@KLVFF	DOTAREM®
r_1 (s ⁻¹ mM ⁻¹)	10	12	13.2	14.1	3.4
r_2 (s ⁻¹ mM ⁻¹)	13.6	18.7	20.1	23.0	4.8
r_2/r_1	1.4	1.6	1.5	1.6	1.4

peptide have been obtained while maintaining appropriate MRI characteristics.

Cyanine 5.5 was chosen as dye-label for AGuIX@PEG@LPFFD and AGuIX@PEG@KLVFF, to allow biophysics and ex vivo experiments due to absorption and emission wavelengths in the near infrared ($\lambda_{\text{abs.max}} = 675$ nm and $\lambda_{\text{em.max}} = 695$ nm). The grafting yield was estimated by comparing the Cy5.5 fluorescence intensity before and after purification and led to an amount of 1 dye for 170 Np and 1 dye for 200 Np for AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 respectively (Additional file 1).

In order to envisage these functionalized nanoparticles as a safety contrast agent for a translation to in vivo, especially following the addition of small peptides which could introduce cytotoxicity changes of the nanoparticles [45], innocuousness of functionalized nanoparticles has been assessed against neuronal cells. Cytotoxicity assays were performed using the viability test of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) [46] on SH-SY5Y, and the results showed that AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5, AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 and AGuIX@PEG, do not exhibit any toxic effects on cells (Additional file 1). Indeed, more than 80 % of cells were alive after 1 h of incubation in the presence of nanoparticles corresponding to Gd^{3+} concentrations between 0.5 and 2 mM in Gd^{3+} . It is also interesting to note that even at higher concentration (5 mM Gd^{3+}) more than 75 % of cells were still alive. Previous biocompatibilities assays showed no adverse effects upon systemic AGuIX administration in healthy rodent [32] and those bearing melanoma, carcinoma [47] or gliosarcoma [48], and bio-distribution studies indicated their renal excretion within few hours [32].

A β peptide grafted to AGuIX target specifically A β (1–42) fibrils

Formation of amyloid fibrils were obtained by incubation of A β (1–42) peptide and V30M-TTR protein under conditions favorable to aggregation in 3 and 10 days respectively. The final state of amyloid-fibril formation is controlled by transmission electron microscopy as illustrated on Fig. 1c and d: A β (1–42) fibrils are at least 2 μm long with a wide of 10–15 nm (Fig. 1c), whereas the

V30M-TTR amyloid fibrils form bundles of about several μm long and 20 nm wide (Fig. 1d).

In order to define an amyloid interaction “gold” standard, K_d values were evaluated using the PIB marker with A β (1–42) and V30M-TTR fibrils by partition experiments. Following incubation of PIB with A β (1–42) or V30M-TTR fibrils, a first measure of the total fluorescence present in the mixture was realized as the total amount of PIB (Fig. 3a, dashed line). Then after centrifugation of the mixture, the PIB fluorescence signal associated to the pellet was measured (Fig. 3a double line), indicating thereof the PIB bound to the fibrils. Similar measure was performed with the supernatant allowing the evaluation of the unbound fluorescence (Fig. 3a, solid line). Experiments were performed with a range of concentrations of PIB (0.01–4 μM) and the results of fluorescent measurements associated with A β (1–42) (Fig. 3b) and V30M-TTR (Fig. 3c) fibrils were plotted. The fit of the experimental data with the Michaelis binding model (1:1) displayed K_d values equal to 6 μM for A β (1–42) fibrils (Fig. 3b) and 10 μM for V30M-TTR fibrils (Fig. 3c). These observations confirm that PIB binds different types of amyloid fibrils making it a general amyloid marker without protein discrimination (Fig. 3b, c). Similar experiments were then performed with AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5, on A β (1–42) fibrils, by measuring the related-Cy5.5 fluorescence. For both nanoparticles, no fluorescence has been detected associated with fibrils (data not shown). Although partition method was adapted for the evaluation of the interaction of PIB marker with fibrils, these latter results indicate that the amyloid fibrils interaction-tests, with both functionalized nanoparticles, displayed certainly a lower detection sensitivity.

Therefore the ability of AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 and of AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 to target amyloid fibrils was tested using surface plasmon resonance (SPR). This technique allows the observation of interaction in real-time on a sensor chip functionalized with 800 Resonance Unit (R.U.) of V30M-TTR fibrils or 1200 R.U. of A β (1–42) fibrils.

As KLVFF and LPFFD were described to interact with monomer forms of A β [37, 49], we ensured first that they interact with A β (1–42) fibrils. Then SPR experiments

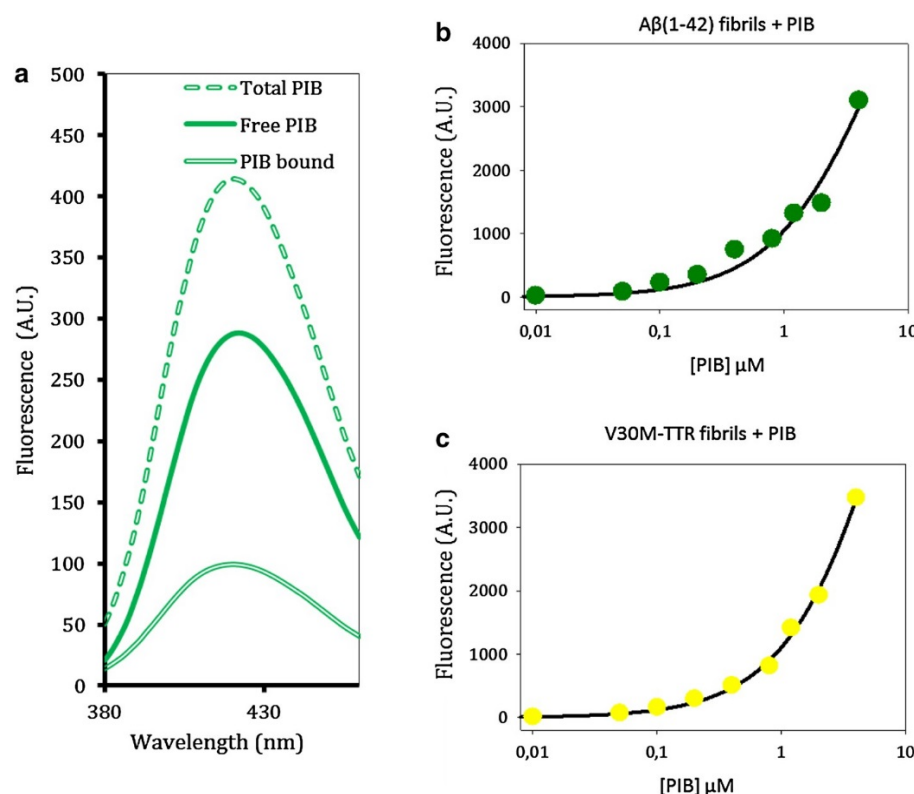


Fig. 3 Spectrofluometry measurement of PIB binding to Aβ(1-42) fibrils or V30M-TTR fibrils following partition experiments ($\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 420$ nm). **a** 2 μM of PIB was added to 20 μM of amyloid fibrils (dotted line) and after 60 min., a pellet with fibrils and PIB bound (double lines) was separated from a supernatant with PIB alone (solid line). **(b, c)** Binding plots by fluorescence response at 420 nm of PIB bound on Aβ(1-42) fibrils (b) or V30M-TTR fibrils (c) increasing concentration of PIB, fitted as Michaelis model (1:1)

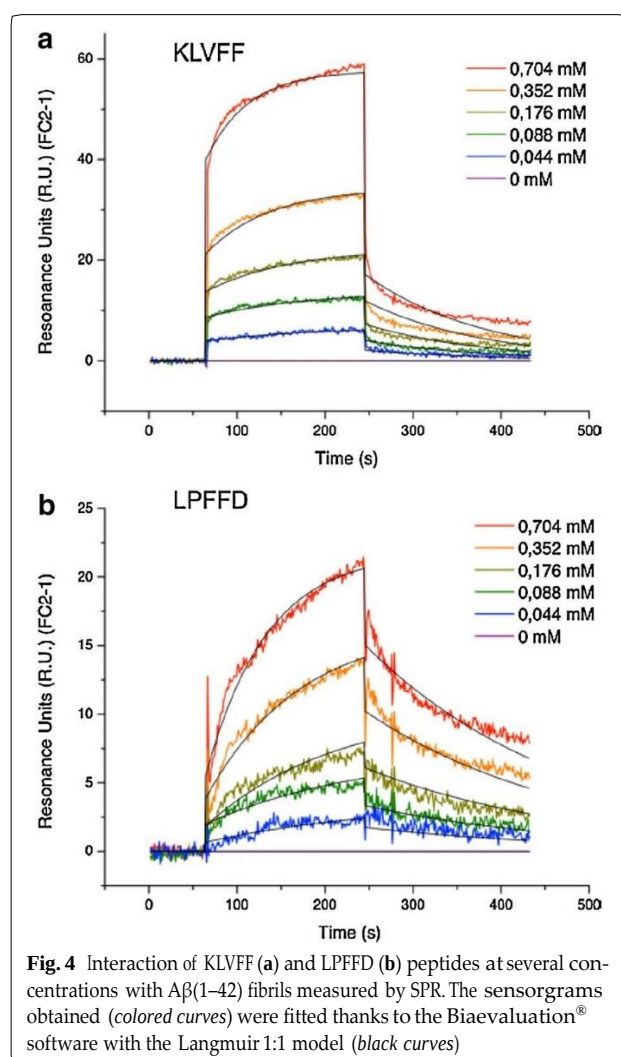
were carried out with peptide alone, to determine their affinity onto Aβ(1-42) fibrils (Fig. 4a, b). These results indicate that both selected peptides recognize and interact with Aβ(1-42) fibrils. The K_d calculated with the Biaevaluation® software were 393 ± 23 μM for KLVFF and 317 ± 48 μM for LPFFD.

Thereafter, to insure that the pegylation step of the Nps and the cyanine dye grafting did not induced unexpected binding, the number of R.U. remaining 141 s after the end of the nanoparticles injection was compared to those obtained with AGuIX@PEG, AGuIX@PEG@Cy5.5, AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 at 2.5 mM in Gd^{3+} on Aβ(1-42) fibrils. As illustrated by histograms in Fig. 5a, while both AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 interact with Aβ(1-42) fibrils, AGuIX@PEG and AGuIX@PEG@Cy5.5 do not interact with amyloid fibrils.

Then, similar SPR experiments carried out with a range of nanoparticles concentrations (from 0.02 up to 6.4 mM expressed in peptide concentrations) showed that both AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 (Fig. 5b1) and AGuIX@

PEG@KLVFF@Cy5.5 (Fig. 5b2) interact with Aβ(1-42) fibrils. The sensorgrams obtained were fitted with the Biaevaluation® software (Langmuir 1:1). Each experiment was repeated three times and led to the dissociations constants in the range of 534 ± 134 μM for AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 and of 261 ± 59 μM for AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5. Although the K_d values are of several of hundred μM , these results demonstrate that the capacity of KLVFF and LPFFD to bind Aβ(1-42) fibrils is conserved after their grafting on AGuIX, with affinity of the same order of magnitude than those obtain with free peptides.

The specificity of these interactions for Aβ(1-42) fibrils was assessed in the same range of concentration of nanoparticles on a chip coated with V30M-TTR fibrils. As illustrated on Fig. 5c, 141 s after the end of nanoparticles injection, whereas both AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 displayed an interaction on Aβ(1-42) fibrils (blue curves) dependent on nanoparticle concentrations injected, no specific interaction of any functionalized nanoparticles was recorded on V30M-TTR fibrils (red curves). This confirms the



discriminatory feature of AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 for A β (1–42) fibrils, supporting that the interactions between AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 with A β (1–42) fibrils are indeed mediated by the targeting peptides KLVFF and LPFFD.

Altogether, these *in vitro* experiments demonstrate that AGuIX nanoparticles functionalized with LPFFD or KLVFF, are able to bind and to discriminate A β (1–42) amyloid fibrils. Interestingly, it can be noticed that the grafting step of peptides on nanoparticles does not drastically modify the affinity of both peptide for the targeted fibrils.

Vectorized-nanoparticles recognize A β plaques in AD mice brain

As next step, the ability of both AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 to detect A β amyloid plaques into the brain of Alzheimer's disease

animal model was tested. For this purpose, immunohistochemical experiments were performed on APPswe/PS1A246E/TTR(–/–) transgenic mouse brain sections. Such 10 months old transgenic mice display amyloid plaques in the cortex and the hippocampus [50]. Similar experiments were performed on control animals of APPswe/PS1A246E/TTR(±), which do not contain amyloid deposits in the cortex and the hippocampus (Fig. 6b, d). AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 or AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 was incubated on brain sections with or without amyloid deposits and visualized, owing to the grafted-Cy5.5 fluorescence by optic microscopy in the near infrared, while cellular nucleus were located using Hoechst dye.

As illustrated on Fig. 6, strong Cy5.5 fluorescence was visualized in AD brain sections, in specific structure (zoomed in a square Fig. 6a, c), with a core surrounded by diffuse fluorescence and by dots. These observations are characteristic of AD lesions constituted by amyloid plaque with cored and diffused deposits and dystrophic neurites in the vicinity of the plaque [51]. These structures are mainly constituted by A β (1–42) peptide into fibrillar β -sheet structure [52]. Similar experiments, on control brain sections without amyloid plaques, did not display such fluorescent staining as visualized in Fig. 6b and d.

The specificity of functionalized nanoparticles binding was verified, by incubating nanoparticles without grafted-peptides, AGuIX@PEG@Cy5.5, on brain section containing amyloid burden. As expected, no amyloid plaque was stained by Cy5.5 fluorescence in hippocampus region (Fig. 6e). Although, some yellow dots were noticeable on the vessels and in the CA3 cell layer of the hippocampus and control immunostaining experiments with Cy5.5 alone indicated this staining constitutes a background due to the Cy5.5 restricted to blood vessels (Additional file 1). Whereas, various other cyanine derivative dyes [53] can bind amyloid fibrils, the Cy5.5 molecule does not stain fibrils as observed *in vitro* on fibrils (personal data) and on brain section of AD mouse model [54].

The selectivity of AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 for A β (1–42) amyloid deposits was also assessed using a nanoparticle grafted with a peptide non related to A β (1–42) fibrils, AGuIX@PEG@TTR-peptide@Cy5.5. Immunohistochemistry performed on AD brain sections with this non related A β -peptide grafted nanoparticle, showed a low background related to cyanine5.5 fluorescence (Fig. 6f).

The A β burden of AD mouse model was evaluated using PIB for immunohistochemical staining as fluorescent ligand on AD brain. Figure 6g resulted from the merge of both staining and revealed robust fluorescent dots with diffusing labeling localized in AD mouse

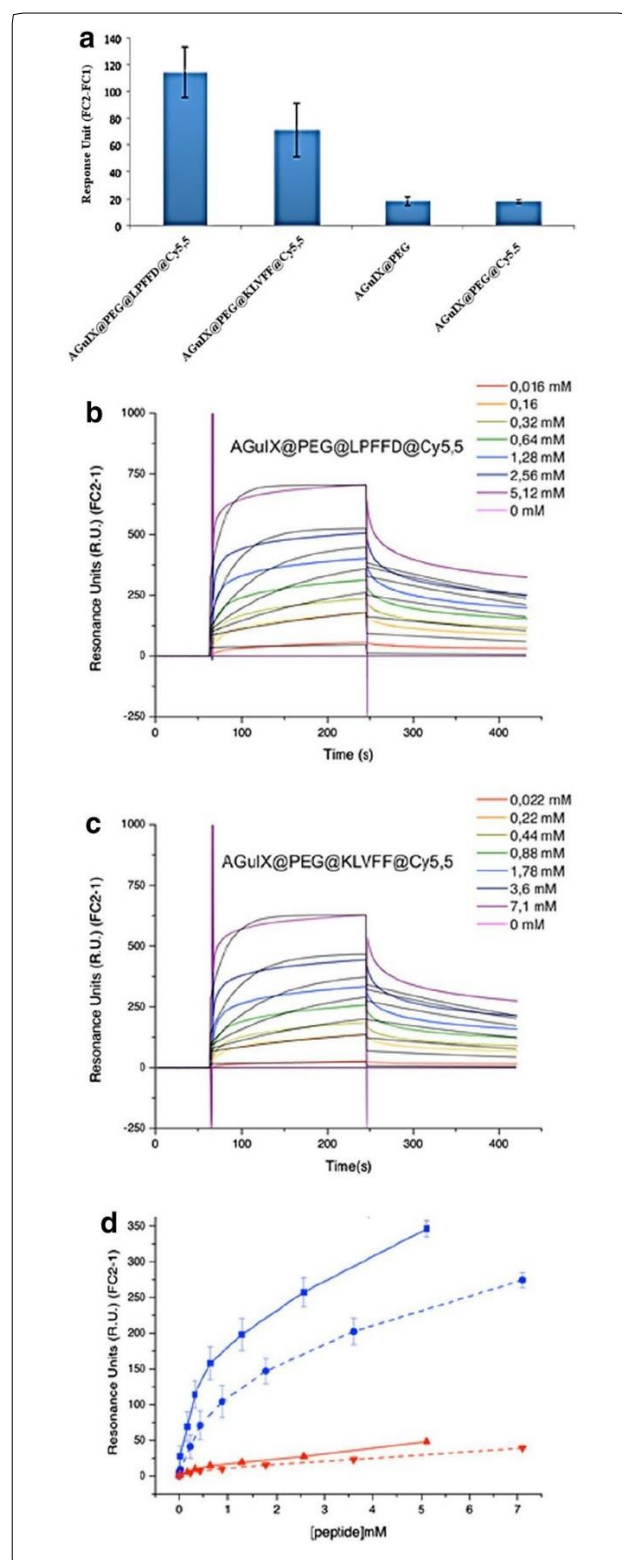


Fig. 5 Interaction of functionalized nanoparticles for Aβ(1-42) fibrils or V30M-TTR fibrils assessed by SPR experiments. **a** Remaining signal of AGuIX@PEG, AGuIX@PEG@Cy5.5, AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 at 2.5 mM in Gd³⁺ on Aβ(1-42) fibrils. The R.U. were measured 141 s after the end of the analyte injection. **b**, **c** The sensorgrams (colored curves) obtained for AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 (**b**) and for AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 (**c**) on Aβ(1-42) fibrils were fitted thanks to the Biaevaluation® software with the Langmuir 1:1 model (black curves). **c** Remaining signal of AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 (plain curves) and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 (dashed curves) on Aβ(1-42) fibrils (blue) and V30M-TTR fibrils (red). The R.U. values plotted on the graph correspond to the measures at the time-point 141 s after the end of nanoparticles injection

Altogether, these results indicated that both AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5, bind selectively amyloid plaque constituted by Aβ protein on ex vivo AD mouse hippocampus.

Conclusions

In this work, ultra-small gadolinium-nanoparticles were successfully grafted with two peptides targeting Aβ(1-42) fibrils (KLVFF and LPFFD). Although these peptides are described as β-breakers due to their ability to interact with Aβ monomer and to inhibit the formation of amyloid oligomers [56] and fibrils [36, 56, 57], they were shown to selectively interact with Aβ(1-42) amyloid fibrils as well. The binding affinity of the grafted peptide for Aβ(1-42) fibrils is in the range of the hundredth of μM, this remaining compatible with the injected dose usually used in clinical MRI applications and particularly for diagnosis. Histological examination of the nanoparticles proved their ability to preferentially interact with amyloid plaques present in the brain of AD mouse model confirming their targeting potential. The selective interaction of the functionalized nanoparticles with Aβ(1-42) fibrils was confirmed by the lack of affinity for V30M-TTR fibrils, amyloid fibrils implicated in FAP, another type of amyloidosis.

Characterization of these new nanoparticles confirms that they possess several of the features needed for biomedical neuroimaging: relaxivity's measures showed that functionalized AGuIX conserve high positif MRI contrast allowing MRI signal enhancement, facilitating image interpretation [58]; the absence of AGuIX accumulation in certain organs [32], such as the liver or spleen, and their rapid renal elimination allow their consideration for in vivo injection, as it's well known that such phenomena may constitute a limit to the use of certain contrast agents, as reported for iron oxide nanoparticles [59], where their long lasting presence can be associated with cellular cytotoxic effects [60, 61].

Besides the high MRI contrast of AGuIX, due to their enrichment in gadolinium chelates, these nanoparticles can be formulated to create a multimodal imaging

hippocampus (see in zoom square Fig. 6g). Such picture could be correlated with compact/cored amyloid plaque [55] and diffuse plaques [53].

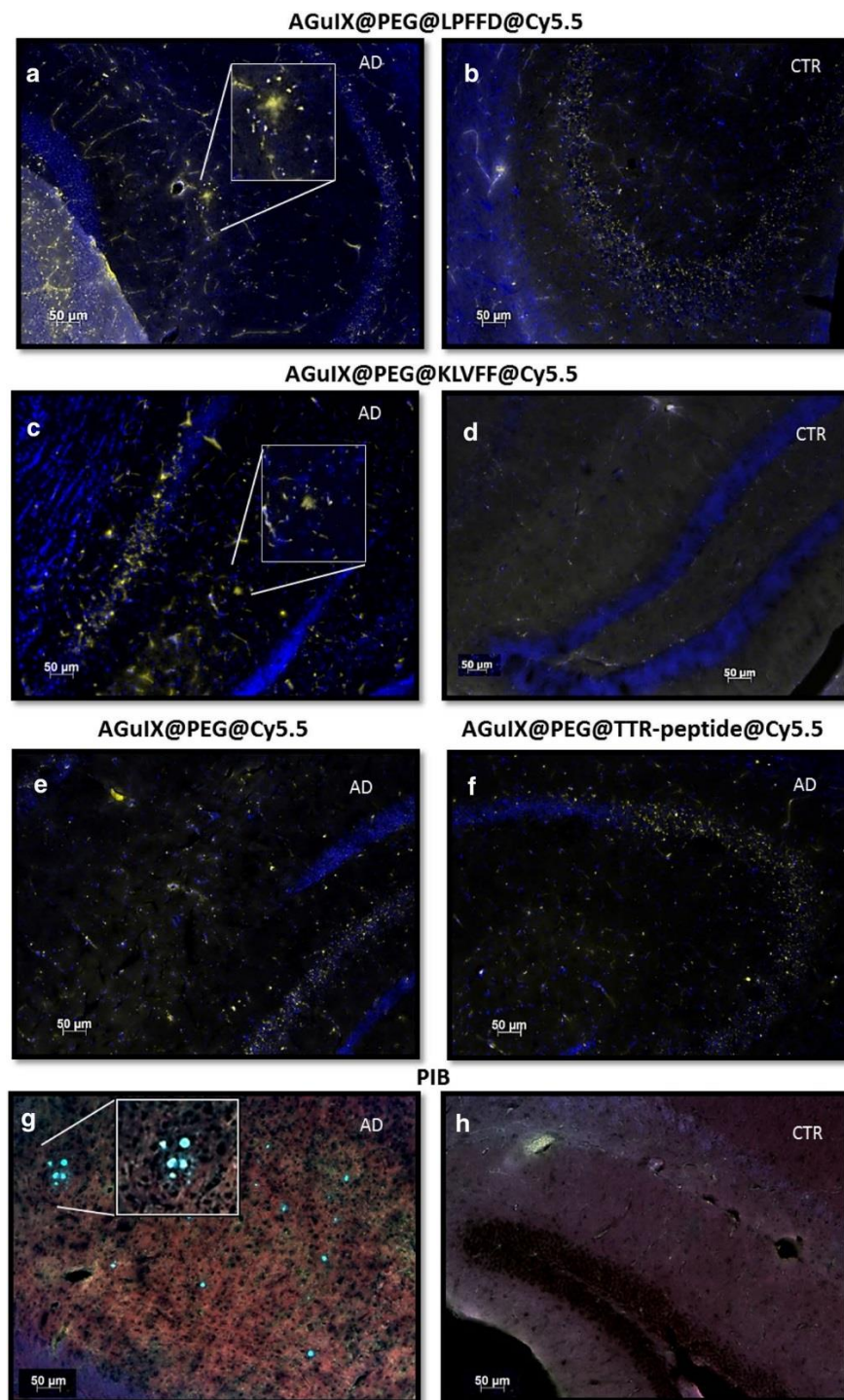


Fig. 6 LPFFD and KLVFF vectorized nanoparticles hybridization on brain slices of APPswe/PS1A246/TTR transgenic (**a, c, e, f, g**) and control (**b, d, h**) mice. Imaging beta-amyloid plaques were visualized owing to Cy5.5 fluorescence grafted to AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 (zoom in **a**), and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 (zoom in **c**), in the near-infra red (yellow color, $\lambda_{exc} = 620 \text{ nm}$ - $\lambda_{em} = 642 \text{ nm}$). Cellular nucleus of brain sections were located using Hoechst dye staining (blue color $\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$ - $\lambda_{em} = 405 \text{ nm}$). AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 binding specificity test were performed on brain section without amyloid plaques (**b, d**), and with nanoparticle without peptides, AGuIX@PEG@Cy5.5 (**e**), or with a non-related A β (1-42) peptide, AGuIX@PEG@TTR-peptide@Cy5.5 (**f**) on brain section with amyloid plaques. Positive control of amyloid burden was performed using PIB staining on brain sections with (**g**) and without amyloid plaques (**h**). Ligands binding are detected by fluorescence imaging of PIB at 400 nm (blue color, **g**). Tissue architecture was highlighted by imaging actin-phalloidin staining (**g, h**, red color, $\lambda_{exc} = 540 \text{ nm}$ - $\lambda_{em} = 570 \text{ nm}$)

platform, and/or by coupling ^{68}Ga derivatives for PET detection [62] and for instance by covalently grafting a near infrared fluorophore for small animal. In conclusion, the ability of targeting and typing amyloid fibrils, by these new multifunctional nanoparticles, constitutes a first step of a promise and powerful strategy for a reliable early detection and identification of amyloidoses. Their future development will constitute a diagnostic and theranostic tool for the monitoring of the disease progression and the biochemical effects of drugs.

Methods

Chemicals

N-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC, >98.0 %), *N*-hydroxysuccinimide (NHS, >97.0 %), gadolinium chloride hexahydrate ($[\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$, 99 %), sodium hydroxide (NaOH, 99.99 %), hydrochloric acid (HCl, 36.5–38 %), sodium chloride (NaCl, >99.5 %), dimethyl sulfoxide (DMSO, >99.5 %), acetonitrile (CH_3CN , >99.9 %), trifluoroacetic acid (TFA, >99 %), trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 1 M in water, sodium dodecyl sulfate (SDS, >99 %), (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES, >98 %), tetraethyl orthosilicate (TEOS; >98 %) and Poly(ethylene glycol) bis(carboxymethyl) ether (PEG) with an average molecular weight $M_n = 250 \text{ g mol}^{-1}$ were purchased from Aldrich Chemical (France) and used without further purification. Diethylene glycol (DEG, 99 %) was purchased from SDS Carlo Erba (France). Acetone (reagent grade) was purchased from Sodipro (France) and was used as received. Freeze-dried full peptides $\text{A}\beta(1-42)$, small $\text{A}\beta$ specific-peptide (LPFFD and KLVFF) (>98 %) and small TTR targeter peptide (>98 %) were purchased from Genecust (Luxembourg). Recombinant human V30M-TTR protein was obtained following cloning its gene in the plasmid pQE81L and its expression in *Escherichia coli* (M15). Briefly, bacterial cultures were performed in LB medium, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin and $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ kanamycin, at 37°C , under constant orbital shaking. Protein production was pursued for 7 h after IPTG induction when the absorbance was 0.700 at 600 nm. The bacterial pellet of 50 mL of culture was resuspended in sodium phosphate 50 mM, pH 8, sodium chloride 300 mM, imidazole 10 mM, beta-mercaptoethanol 10 mM, supplemented with 500 μL of a protease inhibitor, phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma, #78830), at 1 mM final and a cocktail of protease inhibitor EDTA-free (Roche, #11873580001). The suspension was sonicated during a total time of 6 min with repeated cycles of 5/7 s off with an amplitude of 20 %, then centrifuged during 30 min at $100,000g$, to pellet cellular debris. The supernatant was filtered on $0.2 \mu\text{m}$ cut

off filters. The purification of the protein was performed on immobilized metal ion chromatography (Chelating Fast Flow, Amersham #17057501), and dialyzed against $20 \text{ mM} \cdot \text{NH}_4\text{HCO}_3$ (membrane cutoff 1/10,000; 3500 MWCO Spectrapore). Finally, the protein was freeze-dried. The protein quality was checked by SDS PAGE gel 15 %. The Pittsburgh compound-B (PIB) derivative molecule was synthesized according to the procedure already described in the literature [63]. Starting from the *p*-anisidine, the *p*-nitrobenzoyl amide was readily obtained and then the corresponding thioamide was prepared by reaction with Lawesson's reagent. Finally, an oxidative cyclization was done to lead to the benzothiazole derivative, and the nitro function was reduced to give compound (Synthesis' details in Additional file 1).

Nanoparticles synthesis and functionalization

The AGuIX Nps were provided by Nano-H SAS (Saint-Quentin Fallavier, France) and the DOTAGA anhydride (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-glutaric anhydride-4-7-10-triacetic acid) was purchased from CheMatech (Dijon, France). AGuIX syntheses were performed at room temperature. Nanoparticles concentrations are stated in mol L^{-1} of Gd^{3+} . AGuIX were synthesized as previously described [29] (see Additional file 1). These Nps are composed of a polysiloxane network which is surrounded by covalently grafted DOTAGA(Gd^{3+}) chelate. During the first step, Poly(ethylene glycol) bis(carboxymethyl) ether (PEG) was grafted on AGuIX. The freeze-dried AGuIX nanoparticles were dispersed in water to reach a concentration of Gd^{3+} of 500 mM and then diluted ten times with a solution of diethylene glycol (DEG) at 80°C . In parallel, the carboxylic acid functions of the PEG chains were activated with EDC and NHS coupling reagents (EDC/NHS/PEG molar ratio 10:20:1). The NHS-ester formation was performed in anhydrous DMSO at 100 mM in PEG under stirring at room temperature for 30 min. Then, the NHS-ester PEG solution was added to the nanoparticles suspension (PEG/Gd molar ratio 3:1) and the reaction mixture left for 12 h at room temperature. Finally, the Nps were diluted in ultrapure water in order to reach a volume percentage (%v) of DMSO below 5 %. Purification of the nanoparticles was performed by tangential flow filtration on a 5 kDa molecular cutoff membrane. This step allows removing the unreacted reagents and the degraded nanoparticles. The AGuIX@PEG nanoparticles were freeze-dried using a Christ Alpha 1–2 lyophilizer until the covalent conjugation of the $\text{A}\beta$ amyloid peptides. In a second time, freeze-dried AGuIX@PEG nanoparticles were first dispersed in water to reach a concentration of Gd^{3+} of 500 mM, and then successively diluted ten times with DEG at 80°C and then two times

with anhydrous DMSO, leading to final concentration of Gd^{3+} of 25 mM. The carboxylic functions of the NPs were activated by EDC and NHS (EDC/NHS/Gd molar ratio 10:20:1) under stirring at room temperature for 30 min. The activated Nps suspension was divided into two aliquots: one to be grafted with each of the two A β specific peptides. Each peptide, dissolved at 100 mg mL⁻¹ in anhydrous DMSO, was added to the Nps suspension and stirred for 12 h at room temperature. The nanoparticles were then diluted in ultrapure water in order to reach a concentration in DMSO below 5 %v and purified by tangential filtration on a 5 kDa molecular cutoff membrane. This step allows removing the EDC/NHS activators, the unreacted peptides and the degraded nanoparticles. The suspension of purified AGuIX@PEG@Peptide nanoparticles was set at 100 mM of Gd^{3+} in ultrapure water and the pH was adjusted to 7. Finally, AGuIX@PEG@Peptide Nps were grafted with the fluorophore, Cyanine 5.5 NHS, which was dissolved in anhydrous DMSO at 2.5 mg mL⁻¹. This mixture was slowly added to the nanoparticles suspension (Cy5.5/Gd molar ratio 1:1000). After 4 h of reaction, the mixture was purified by tangential filtration with a Vivaspin® tube with a cutoff of 5 kDa in order to remove the ungrafted cyanine molecules, the NHS formed and the degraded particles. Finally the nanoparticles AGuIX@PEG@Peptide@Cy5.5 were freeze-dried for storage using a Christ Alpha 1–2 lyophilizer. They are stable for months without alteration at room temperature.

Relaxivity measurements

Relaxivity measurements were performed on a Bruker® minispec mq60NMR analyzer (Bruker, USA) at 37 °C at 1.4 T (60 MHz). Samples were measured at a specific Gd^{3+} concentration (mM), calculated from ICP-OES. The longitudinal relaxation time T_1 and the transverse relaxation time T_2 (s) were measured at 60 MHz and at 37 °C. Then the relaxivities r_i (s⁻¹ mM⁻¹) were obtained according to the following formula:

$$\frac{1}{T_i} \text{ measured} = \frac{1}{T_i} \text{ water} + r_i \text{ Gd}^{3+}$$

where $i = 1$ or 2 .

Dynamic light scattering (DLS)

Hydrodynamic diameters (D_H) of the Nps were determined with a Zetasizer NanoS (laser He–Ne 532 nm) from Malvern Instrument® (5 mW, with 173° NIBS detector and narrow band filter). Attenuator was optimized by the device and position was set to the center of the cell. To perform the measurement, 1 mL of nanoparticles suspensions at 10 mM Gd^{3+} was poured in a 12 mm square polystyrene disposable cuvette after filtration on a 0.2 μm cut-off nylon filter. Each measurement was repeated 8 times.

High performance liquid chromatography (HPLC)

Gradient HPLC analysis was carried out using the Shimadzu® Prominence series UFLC system equipped with a CBM-20A controller bus module, an LC-20AD liquid chromatograph, a CTO-20A column oven, a SPD-20A UV–Visible detector allowing absorption measurement at two chosen wavelengths and a RF-20A fluorescence detector allowing fluorescence measurements at specific excitation and emission wavelengths. For all measurements, the UV–visible detectors were set respectively at 295 and 350 nm. Sample aliquots of 20 μL were injected in a 95 % solvent A—5 % solvent B (A = Milli-Q water/TFA 99.9:0.1 v/v; B = CH_3CN /Milli-Q water/TFA 90:9.9:0.1 v/v/v) into a Jupiter C4 column (150 $\times$ 4.60 mm, 5 μm , 300 Å, Phenomenex®) at a flow rate of 1 mL min⁻¹ over 5 min. In a second step, samples were eluted by a gradient from 5 to 90 % of solvent B in solvent A over 15 min. Finally, the concentration of solvent B was maintained over 5 min. Then, the concentration of solvent B was decreased to 5 % over a period of 5 min to re-equilibrate the system, followed by additional 5 min at this final concentration. Before each sample measurement, a baseline was recorded following the same conditions by loading Milli-Q water onto the injection loop.

Inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy (icp-oes) analysis

Determination of the gadolinium content in a sample was performed by ICP-OES analysis with a Varian 710-ES spectrometer. Before measuring Gd^{3+} concentration, samples of colloidal solution were dissolved in HNO_3 67 % at 80 °C for 2 h. The samples were then diluted 10-fold in HNO_3 5 %. Chemical analysis were also performed on the as-prepared samples at the Service Central d'Analyses du CNRS (Villeurbanne, France) by ICP-MS and enabled determining the C, N, Si contents with a precision of 0.5 %.

Circular dichroism

Circular dichroism was used in order to determine the number of A β peptide grafted on the nanoparticles. Standard curves of peptide KLVFF and LPFFD are obtained by successive dilutions in distilled water (300 μL), respectively at 25, 50, 100 200 mg L⁻¹ and 20, 50, 100, 200, 300 mg L⁻¹. The freeze-dried nanoparticles were dissolved in distilled water at 5 mM, and diluted in 300 μL of distilled water at 0.03, 0.05 and 0.1 mM. Spectra of each sample were recorded in a 1 mm path length quartz cell on a JASCO J-815 CD spectrometer using a response time of 1 s, a scan speed of 200 nm min⁻¹ and a bandwidth of 4 nm. Thirty spectra were accumulated and averaged in far UV (200–250 nm) at 20 °C and quantification was done at 212 nm (KLVFF) and 219 nm

(LPFFD). These wavelengths were selected on each peptide spectrum as the more characteristic point obtained in function of their concentrations. The molar ellipticity reported as a function of the peptide concentration and allowed determining the number of peptide per nanoparticles.

Beta-amyloid fibrils growth

Freeze-dried A β (1–42) peptide (Genecust) was dissolved in distilled water at pH 11.0. The solution was filtrated through a spin 0.2 μ m membrane filter (Millipore, #146560) to remove any aggregated species. The solution was stored at -20°C . A β (1–42) fibrils were prepared by incubating monomer A β (1–42) peptide solution (final concentration at 100 μ M) in Tyrode's buffer (150 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM HEPES pH 7.4, 10 mM glucose; pH 6.5) at 37°C in 500 μ L reaction volume on a rotating shaker (300 rpm) for 72 h. Fibril morphology formation was confirmed by TEM analysis (JEOL 1200EX).

V30M-TTR amyloid fibrils growth

The protein V30M-TTR was directly dissolved in buffer A (KH_2PO_4 10 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, adjusted to pH 7 and filtrated with a spin 0.2 μ m) and buffer B ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ 200 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, adjusted to pH 4.4, filtrated with a spin 0.2 μ m), with the same volume of each buffer to obtain a final concentration at 32.3 μ M of V30M-TTR protein (pH 4.6) in a 1 mL reaction volume. It was incubated on a rotating shaker (300 rpm) during 10 days at 70°C . Fibril morphology formation was confirmed by TEM analysis.

Transmission electronic microscopy

10 μ L of A β (1–42) or V30M-TTR fibrils samples were adsorbed on to the clean face of a carbon film on mica sheet (carbon/mica interface) and negatively stained with 1 % (w/v) uranyl acetate. Micrographs were recorded at 80 kV using a JEOL 1200EX equipped with a Veleta camera (Olympus) and iTEM software or at 200 kV on a FEI TecnaiTM G2 Sphera.

Binding assays

Twenty μ M of A β (1–42) or V30M-TTR fibrils were incubated with PIB at 0.01, 0.1, 0.4, 0.8, 1.2, 2 and 4 μ M, or 2 μ M of AGuIX@PEG@KLVVF@Cy5.5 or AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5, saturated with 3 mM AGuIX, for 60 min at room temperature in 500 μ L of each prepared fibril buffer. A first measure of fluorescence was carried out on the mixture, which was then centrifuged for 25 min at 14000 rpm and 25°C to obtain a pellet (containing fibrils) and a supernatant (containing free nanoparticles or PIB). The pellet was dispersed in 500 μ L of fibril buffer. A second measure of fluorescence was realized both on

the supernatant and the re-suspended pellet. According to the fluorescence properties of PIB ($\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 420$ nm) or cyanine 5.5 ($\lambda_{\text{exc}} = 600$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 655$ nm) spectrum of each sample was recorded in a 1 cm path length quartz cell on a CD-spectrophotometer (JASCO J-815) using a response time of 1 s, a scan speed of 100 nm min^{-1} , an excitation bandwidth of 5 nm and an emission bandwidth of 10 nm. Three spectra were accumulated at 25°C and averaged. Spectra are treated by subtracting of the spectrum recorded for the buffer. Michaelis binding model was used to determine the dissociation constant (K_D) following the equation:

$$y = Y_m / (1 + (K_D/x)),$$

where Y_m is the maximum of fluorescence (A.U).

Surface plasmon resonance assays

The surface plasmon resonance assays were performed using a BIAcore[®] 2000 biosensor. The instrument was equipped with a CM3 sensor chip (GE Healthcare[®], Uppsala, Sweden). The interaction studies took place on a gold chip functionalized with carboxymethylated dextran. The sensor surface itself form one wall of a flow cell, which is an integral part of the microfluidic system. All SPR experiments were performed at 25°C . HEPES buffer (HBS-P, GE Healthcare[®], 0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 0.005 % surfactant p20) was used as running buffer.

For immobilization, amine coupling reagents were obtained from the GE Healthcare[®] kit containing 0.2 M EDC in water, 0.05 M NHS in water and ethanolamine-HCl pH 8.5. Prior immobilization, the size of the A β (1–42) fibrils was reduced using an ultrasonic disruptor Sonoplus HD 2070 (Banderlin, Germany). The sonication was performed on ice at 40 W during 20 s (pulse of 0.6 s; interval of 0.4 s; mode PULS, cycle 6) [64]. A β (1–42) and V30M-TTR fibrils were immobilized on the flow cell 2 and 4 respectively of a CM3 sensor chip with an amine coupling reaction. After the chip activation by EDC/NHS during 7 min, the fibrils were injected at: 10 μ M in 10 mM sodium acetate pH 4 at a flow rate of 5 μ L min^{-1} during 20 min for A β (1–42) fibrils or at 0.36 μ M in 10 mM sodium acetate pH 5.5 at a flow rate of 5 μ L min^{-1} during 100 min for V30M-TTR fibrils. The immobilization levels were around 1200 respond units (R.U.) for the A β (1–42) fibrils and 800 R.U. for the V30M-TTR fibrils. The flow cell 1 and 3 from this chip were activated by EDC/NHS during 7 min and then deactivated by ethanolamine during 7 min and used as reference surface.

Biacore[®] experiments gathered data from 3 cycles for each studied analyte. One cycle consisted in the injection of the compound to be tested for 3 min. A waiting period of 2.5 min under running buffer (HBS-P) followed this step. Then the surface was regenerated, using the GE

Healthcare® regeneration scouting kit, to remove the analyte from the chip by injection of 2 M NaCl and 5 mM NaOH during 60 s. A stabilization period of 2 min under running buffer finished the cycle. For the kinetic assays, the nanoparticles were injected at the concentration of 0.02; 0.2; 0.4; 0.8; 1.6; 3.2 and 6.4 mM in peptide (corresponding to 0.1; 1; 2; 4; 8; 16 and 32 mM in Gd^{3+}) in running buffer (HBS-P) with 10 % liquid dextran (non specific binding reducer, GE Healthcare®) to reduce unspecific interaction. The free peptides were injected at concentrations ranging from 44 to 704 μ M. Each experiment began with five cycles injecting running buffer instead of analyte to stabilize the baseline of the apparatus. On the other hand, channel 1 or 3 were maintained in their carboxymethylated dextran native form to serve as a reference and observe possible non-specific interactions. Results of the interaction between the analytes and the A β (1–42) or V30M-TTR fibrils were represented on a sensorgram expressed as respectively FC2-1 or FC4-3 (RU-RUdextran) versus time. The data were processed by Biaevaluation software (Biacore) and fitted using the 1:1 Langmuir binding model to obtain the equilibrium dissociation constant (K_d). The step was performed for each of the three sets of experiments. The value of R.U. obtained 141 s after the end of the injection was compared for the AGuIX@PEG, AGuIX@PEG@Cy5.5, AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 at 2.5 mM in Gd^{3+} on A β (1–42) fibrils and V30M-TTR fibrils.

Animal models

APPswe/PS1A246E/TTR mouse model was generated in JM Saraiva's lab by crossing APPswe/PS1A246E mice (B6/C3H background) with TTRnull mice (TTR $-/-$) (SV129 background) [65]. These transgenic mice co-express a chimeric mouse-human amyloid-protein precursor (APP) bearing a human A domain with mutations (K595N and M596L) linked to Swedish (Swe) familial AD (FAD) pedigrees and human presenilin 1 (PS1) bearing a mutation (A246E) which also causes FAD. Expression of both transgenes is under the control of the mouse prion protein promoter (PrP). Animals used in this work were female APP/PSEN/TTR($-/-$) 10 months old, displaying a dramatic amyloid plaques burden. Six months old male APP/PSEN/TTR($\pm$), displaying rare plaques and very low levels of detergent- and formic acid-soluble A β 40 and A β 42 proteins in the transgenic male brain [66] were used as control. Animals were housed in a controlled environment (12-h light/dark cycle; temperature, 22 ± 2 °C; humidity, 45–65 %), with food and water freely available. All procedures involving animals were carried out in accordance with the European Communities Council Directive.

Immunohistochemistry and microscopy

Mice were deeply anesthetized with a mixture of ketamine and medetomidine. Brains were removed from the skull and bisected longitudinally: each half was fixed for 24 h at 4 °C in 10 % neutral buffered formalin and then transferred to a 30 % sucrose solution for cryoprotection before cryostat sectioning (10 μ m) for immunohistochemical analyses. Sections were mounted on glass slides and allowed to dry at room temperature for a few minutes. They were washed three times in phosphate buffer saline (PBS), and incubated into permeabilization-saturation buffer [PBS 1X, 0.3 % triton, 1 % bovine serum albumin] for 1 h at RT. Then incubation with, AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5, AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5, AGuIX@Cy5.5 or AGuIX@PEG@TTR@Cy5.5 nanoparticles at 3 nM of Cy5.5 (corresponding to 2 mM Gd^{3+}) with, for non-specific saturation, 3 mM ungrafted nanoparticles, or PIB at 1 μ M were incubated on section in the same buffer for 1h30 at RT. For amyloid burden control, sections were directly stained with Thioflavin-S (at 0.05 % in EtOH 50 %, Sigma, #T1892) according to standard practice. Cell staining was performed using the phalloidin-TRITC (Sigma, #P1951) in the case of slices treated with PIB. After the PBS wash, all the other sections were coverslipped with dabco-mowiol mounting medium with additional Hoechst to stain cell nucleus. Fluorescent images were observed using the proper filter for each marker: cyanine 5.5: $\lambda_{excitation} = 620$ nm- $\lambda_{emission} = 642$ nm, PIB or Hoechst: $\lambda_{excitation} = 350$ nm- $\lambda_{emission} = 405$ nm, phalloidin: $\lambda_{excitation} = 540$ nm- $\lambda_{emission} = 570$ nm and Thioflavin-S: $\lambda_{excitation} = 450$ nm- $\lambda_{emission} = 488$ nm using a Zeiss microscope Axiovert 200 M. Images were analyzed using Carl Zeiss AxioVision software.

Additional file

Additional file 1: Figure S1. Characterization of functionalized nanoparticles. **Figure S2.** Zeta potential versus pH of AGuIX (black) and AGuIX@PEG (red). **Figure S3.** Reaction scheme for the synthesis of AGuIX@PEG@Peptide@Cy5.5. **Figure S4.** Chromatograms obtained with at UV-Visible absorption at $\lambda = 295$ nm of the AGuIX@PEG, AGuIX@PEG@LPFFD and AGuIX@PEG@KLVFF. **Table S1.** Elementary Analyses of grafted nanoparticles: **Table S1.** Molar ratio deduced from experimental weight percentage; **Table S2.** Elementary analyses given in weight percent of element in the compound; **Table S3.** Comparison of the primary amine content evaluated by elementary analysis and TNBS assays. These results allow assessing the molecular formula obtained by elementary analysis. **Figure S5.** Standard curves of amine quantification in APTES/TEOS equimolar mixture by TNBS assays. **Figure S6.** The cyanine 5.5 presents characteristic absorption and emission wavelength $\lambda_{exc max Cy5.5} = 675$ nm and $\lambda_{em max Cy5.5} = 692$ nm. **Table S4.** The yield of the grafting was calculated thanks to the comparison of the cyanine fluorescence and the DOTA(Gd^{3+}) chelate before and after removal of the ungrafted dye by tangential purification. **Figure S7.** Effect of nanoparticles on cell viability. **Figure S8.** PIB derivative synthesis details. **Figure S9.** Control of the non-binding of Cy5.5 dye to amyloid plaque in brain section of AD mouse model.

Abbreviations

A β : amyloid-beta protein; AD: Alzheimer's disease; FAP: familial amyloid polyneuropathy; TTR: transthyretin protein; V30M-TTR: mutated-(V30M) transthyretin protein; MRI: magnetic resonance imaging; PET: positron emission tomography; SPECT: single photon emission CT; PIB: Pittsburgh compound B; Cy5.5: cyanine 5.5; APTES: (3-Amino)propyltriethoxy silane; PEG: polyethylene glycol diacid; FTIR: Fourier Transform Infrared spectroscopy; MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; SPR: surface plasmon resonance; R.U.: resonance Unit.

Authors' contributions

MP participated in the design of the studies, performed chemical optimization of functionalized nanoparticles synthesis, chemical and biophysics characterization of nanoparticles, participated to SPR studies, and helped to draft the paper. JP participated in the design of the studies, performed biophysics characterization of functionalized nanoparticles, amyloid fibrils synthesis, partition interaction studies, and helped to draft the paper. PM conducted biological assays and preliminary partition studies. LHB, PR and NSH designed, performed and analyzed SPR studies. J-FM and ÉT synthesized and provided Pittsburgh compound B. MJS provided Alzheimer's disease and control model mice brains. MD participated in the study design studies and helped to draft the paper. RChelped to analyze SPR studies. CL is the SME's president which synthesizes and provides AGuIX nanoparticles. ÉA participated in the study design studies and helped to draft the paper. OT and FL participated in the studies design and data analysis, conducted chemical synthesis, functionalization and characterization of the nanoparticles, and participated to draft the paper. VF participated in the studies design and data analysis, conducted and oversaw biophysics and partition experiments, and helped to draft the paper. CM participated in the studies design and data analysis, conducted biological assays, performed immunohistochemistry experiments, and drafted the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, Université Grenoble Alpes, CEA Life Science Division, CNRS, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France. ² Nano-H S.A.S, 38070 Saint Quentin Fallavier, France. ³ Institut Lumière Matière, UMR5306 CNRS Université Claude Bernard Lyon 1, Domaine Scientifique de La Doua, 2 rue Victor Grignard, 69622 Villeurbanne Cedex, France. ⁴ Université de Lyon, Lyon, France. ⁵ ISPB Faculté de Pharmacie, 4bis-MATEIS UMR CNRS 5510, 69373 Lyon, France. ⁶ Centre de biophysique moléculaire, UPR 4301, Rue Charles Sadron CS 80054, 45071 Orléans Cedex 2, France. ⁷ School of pharmaceutical Sciences, University of Geneva, University of Lausanne Pharmaceutical technology, Quai Ernest-Ansermet 30, 1211 Geneva, Switzerland. ⁸ Centre for Protein Engineering, Laboratory of Enzymology and Protein Folding Institut of Chemistry, B6 University of Liege Sart Tilman, 4000 Liege, Belgium. ⁹ Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. ¹⁰ Molecular Neurobiology Group, Institute of Biology, Molecular and Cellular, R. Campo Alegre 823, 4150 Porto, Portugal.

Acknowledgements

We thank Pr. X. Montet for helpful discussion on the nanoparticles development for medical imaging. TEM images were obtained at the electronic microscopy platform, Neurosciences Institute of Grenoble, 38700 La Tronche.

Competing interests

F. Lux and O. Tillement have one patent to disclose: WO2011135101. This patent protects the synthesis of the AGuIX nanoparticles used in this publication.

Funding

This work was supported by Euronanomed ENMII JTC2012 (project 2011-ERA-002-01- Dia-Amyl) and the French National Research Agency (ANR): ANR-12-RP1B Multiméga. M. Plissonneau, N. Stransky-Heilkron and P. Mowat were granted by ENMII JTC2012 (project 2011-ERA-002-01) and J. Pansieri by FRM DBS20131128440. M. Dumoulin is a research associate from FRS-FNRS.

Received: 3 May 2016 Accepted: 6 July 2016

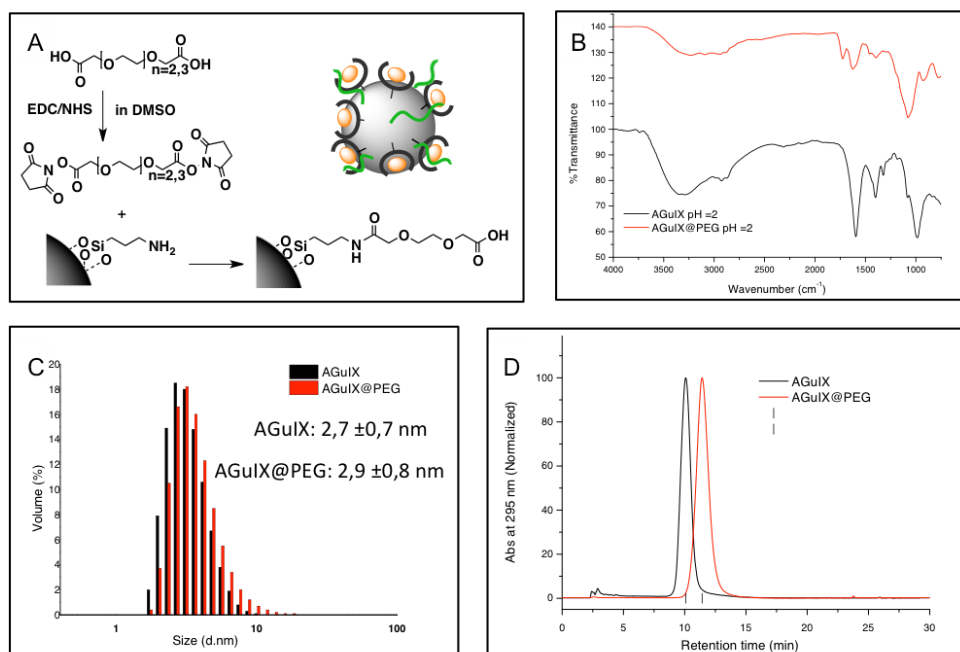
Published online: 25 July 2016

References

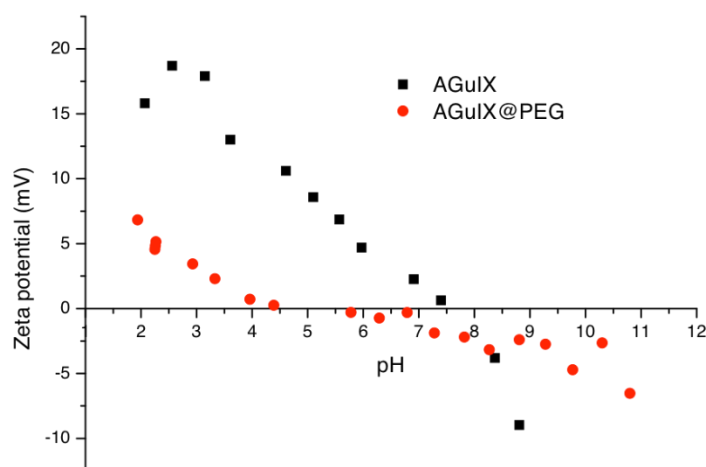
- Knowles TP, Vendruscolo M, Dobson CM. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15:384–96.
- Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:333–66.
- Ueda M, Ando Y. Recent advances in transthyretin amyloidosis therapy. *Transl Neurodegener*. 2014;3:19.
- Perrin RJ, Fagan AM, Holtzman DM. Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease. *Nature*. 2009;461:916–22.
- Dementia and risk reduction: an analysis of protective and modifiable factors. *World Alzheimer Report* 2014.
- Ferreira IL, Resende R, Ferreira E, Rego AC, Pereira CF. Multiple defects in energy metabolism in Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets*. 2010;11:1193–206.
- Hsia AY, Masliah E, McConlogue L, Yu GQ, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Malenka RC, Nicoll RA, Mucke L. Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:3228–33.
- Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, Younkin L, Good MA, Bliss TV, Hyman BT, et al. Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci*. 1999;2:271–6.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*. 2002;416:535–9.
- Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992;256:184–5.
- Selkoe DJ. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*. 1991;6:487–98.
- Braak H, Braak E. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol Aging*. 1997;18:351–7.
- Thal DR, Rub U, Orantes M, Braak H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*. 2002;58:1791–800.
- Frisoni GB, Laakso MP, Beltramello A, Geroldi C, Bianchetti A, Soininen H, Trabucchi M. Hippocampal and entorhinal cortex atrophy in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Neurology*. 1999;52:91–100.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's disease. *Neurology*. 1984;34:939–44.
- Nordberg A. Amyloid imaging in early detection of Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis*. 2010;7:136–8.
- Coimbra A, Williams DS, Hostetler ED. The role of MRI and PET/SPECT in Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem*. 2006;6:629–47.
- Mosconi L, Berti V, Glodzik L, Pupi A, De Santi S, de Leon MJ. Pre-clinical detection of Alzheimer's disease using FDG-PET, with or without amyloid imaging. *J Alzheimers Dis*. 2010;20:843–54.
- Mistur R, Mosconi L, Santi SD, Guzman M, Li Y, Tsui W, de Leon MJ. Current challenges for the early detection of Alzheimer's disease: brain imaging and CSF studies. *J Clin Neurol*. 2009;5:153–66.
- Rabinovici GD, Jagust WJ. Amyloid imaging in aging and dementia: testing the amyloid hypothesis in vivo. *Behav Neurol*. 2009;21:117–28.
- Hellstrom-Lindahl E, Westermarck P, Antoni G, Estrada S. In vitro binding of [(3)H]PIB to human amyloid deposits of different types. *Amyloid*. 2014;21:21–7.
- Kadir A, Marutle A, Gonzalez D, Scholl M, Almkvist O, Mousavi M, Mustafiz T, Darreh-Shori T, Nennesmo I, Nordberg A. Positron emission tomography imaging and clinical progression in relation to molecular pathology in the first Pittsburgh compound B positron emission tomography patient with Alzheimer's disease. *Brain*. 2011;134:301–17.
- Kantarci K, Yang C, Schneider JA, Senjem ML, Reyes DA, Lowe VJ, Barnes LL, Aggarwal NT, Bennett DA, Smith GE, et al. Antemortem amyloid imaging and beta-amyloid pathology in a case with dementia with Lewy bodies. *Neurobiol Aging*. 2012;33:878–85.
- Bao G, Mitragotri S, Tong S. Multifunctional nanoparticles for drug delivery and molecular imaging. *Annu Rev Biomed Eng*. 2013;15:253–82.
- Gao N, Sun H, Dong X, Ren J, Qu X. Gold-nanoparticle-based multifunctional amyloid-beta inhibitor against Alzheimer's disease. *Chemistry*. 2015;21:829–35.

26. Larbanoix L, Burtea C, Laurent S, Van Leuven F, Toubeau G, Vander Elst L, Muller RN. Potential amyloid plaque-specific peptides for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2010;31:1679–89.
27. Lux F, Mignot A, Mowat P, Louis C, Dufort S, Bernhard C, Denat F, Boschetti F, Brunet C, Antoine R, et al. Ultrasmall rigid particles as multimodal probes for medical applications. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2011;50:12299–303.
28. Mignot A, Truillet C, Lux F, Sancey L, Louis C, Denat F, Boschetti F, Bocher L, Gloter A, Stephan O, et al. A top-down synthesis route to ultrasmall multifunctional Gd-based silica nanoparticles for theranostic applications. *Chemistry*. 2013;19:6122–36.
29. Le Duc G, Roux S, Paruta-Tuarez A, Dufort S, Brauer E, Marais A, Truillet C, Sancey L, Perriat P, Lux F, Tillement O. Advantages of gadolinium based ultrasmall nanoparticles vs molecular gadolinium chelates for radiotherapy guided by MRI for glioma treatment. *Cancer Nanotechnol*. 2014;5:4.
30. Bianchi A, Moncelet D, Lux F, Plissonneau M, Rizzitelli S, Ribot EJ, Tassali N, Bouchaud V, Tillement O, Voisin P, Cremillieux Y. Orotracheal administration of contrast agents: a new protocol for brain tumor targeting. *NMR Biomed*. 2015;28:738–46.
31. Morlieras J, Chezal JM, Miot-Noirault E, Vidal A, Besse S, Kryza D, Truillet C, Mignot A, Antoine R, Dugourd P, et al. In vivo evidence of the targeting of cartilaginous tissue by pyridinium functionalized nanoparticles. *Chem Commun (Camb)*. 2013;49:3046–8.
32. Sancey L, Kotb S, Truillet C, Appaix F, Marais A, Thomas E, van der Sanden B, Klein JP, Laurent B, Cottier M, et al. Long-term in vivo clearance of gadolinium-based AGuX nanoparticles and their biocompatibility after systemic injection. *ACS Nano*. 2015;9:2477–88.
33. Lowe TL, Strzelec A, Kiessling LL, Murphy RM. Structure-function relationships for inhibitors of beta-amyloid toxicity containing the recognition sequence KLVFF. *Biochemistry*. 2001;40:7882–9.
34. Hilbich C, Kisters-Woike B, Reed J, Masters CL, Beyreuther K. Substitutions of hydrophobic amino acids reduce the amyloidogenicity of Alzheimer's disease beta A4 peptides. *J Mol Biol*. 1992;228:460–73.
35. Soto C, Kindy MS, Baumann M, Frangione B. Inhibition of Alzheimer's amyloidosis by peptides that prevent beta-sheet conformation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;226:672–80.
36. Soto C, Sigurdsson EM, Morelli L, Kumar RA, Castano EM, Frangione B. Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nat Med*. 1998;4:822–6.
37. Tjernberg LO, Naslund J, Lindqvist F, Johansson J, Karlstrom AR, Thyberg J, Terenius L, Nordstedt C. Arrest of beta-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand. *J Biol Chem*. 1996;271:8545–8.
38. Tojo K, Sekijima Y, Kelly JW, Ikeda S. Diflunisal stabilizes familial amyloid polyneuropathy-associated transthyretin variant tetramers in serum against dissociation required for amyloidogenesis. *Neurosci Res*. 2006;56:441–9.
39. Lashuel HA, Lai Z, Kelly JW. Characterization of the transthyretin acid denaturation pathways by analytical ultracentrifugation: implications for wild-type, V30M, and L55P amyloid fibril formation. *Biochemistry*. 1998;37:17851–64.
40. Ikeda S, Nakazato M, Ando Y, Sobue G. Familial transthyretin-type amyloid polyneuropathy in Japan: clinical and genetic heterogeneity. *Neurology*. 2002;58:1001–7.
41. Sashidhar RB, Capoor AK, Ramana D. Quantitation of epsilon-amino group using amino acids as reference standards by trinitrobenzene sulfonic acid. A simple spectrophotometric method for the estimation of hapten to carrier protein ratio. *J Immunol Methods*. 1994;167:121–7.
42. Helm L, Merbach A, Toth E. The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging. Hoboken: Wiley; 2013.
43. Lauffer RB. Paramagnetic metal-complexes as water proton relaxation agents for Nmr imaging—theory and design. *Chem Rev*. 1987;87:901–27.
44. Xiao N, Gu W, Wang H, Deng YL, Shi X, Ye L. T-1-T-2 dual-modal MRI of brain gliomas using PEGylated Gd-doped iron oxide nanoparticles. *J Colloid Interface Sci*. 2014;417:159–65.
45. Xiong N, Dong XY, Zheng J, Liu FF, Sun Y. Design of LVFFARK and LVFFARK- functionalized nanoparticles for inhibiting amyloid beta-protein fibrillation and cytotoxicity. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7:5650–62.
46. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett*. 2006;160:171–7.
47. Sancey L, Lux F, Kotb S, Roux S, Dufort S, Bianchi A, Cremillieux Y, Fries P, Coll JL, Rodriguez-Lafrasse C, et al. The use of theranostic gadolinium-based nanoprobe to improve radiotherapy efficacy. *Br J Radiol*. 2014;87:20140134.
48. Miladi I, Le Duc G, Kryza D, Berniard A, Mowat P, Roux S, Taleb J, Bonazza P, Perriat P, Lux F, et al. Biodistribution of ultra small gadolinium-based nanoparticles as theranostic agent: application to brain tumors. *J Biomater Appl*. 2013;28:385–94.
49. Liu J, Wang W, Zhang Q, Zhang S, Yuan Z. Study on the efficiency and interaction mechanism of a decapeptide inhibitor of beta-amyloid aggregation. *Biomacromolecules*. 2014;15:931–9.
50. Oliveira SM, Ribeiro CA, Cardoso I, Saraiva MJ. Gender-dependent transthyretin modulation of brain amyloid-beta levels: evidence from a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2011;27:429–39.
51. Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol*. 2009;118:5–36.
52. Glabe C. Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci*. 2001;17:137–45.
53. Volkova KD, Kovalska VB, Balanda AO, Vermeij RJ, Subramaniam V, Slominskii YL, Yarmoluk SM. Cyanine dye-protein interactions: looking for fluorescent probes for amyloid structures. *J Biochem Biophys Methods*. 2007;70:727–33.
54. Medarova Z, Bonner-Weir S, Lipes M, Moore A. Imaging beta-cell death with a near-infrared probe. *Diabetes*. 2005;54:1780–8.
55. Ikonovic MD, Klunk WE, Abrahamson EE, Mathis CA, Price JC, Tsopelas ND, Lopresti BJ, Ziolk S, Bi W, Paljug WR, et al. Post-mortem correlates of in vivo PiB-PET amyloid imaging in a typical case of Alzheimer's disease. *Brain*. 2008;131:1630–45.
56. Lockhart A, Lamb JR, Osredkar T, Sue LI, Joyce JN, Ye L, Libri V, Leppert D, Beach TG. PiB is a non-specific imaging marker of amyloid-beta (A β) peptide-related cerebral amyloidosis. *Brain*. 2007;130:2607–15.
57. Viet MH, Ngo ST, Lam NS, Li MS. Inhibition of aggregation of amyloid peptides by beta-sheet breaker peptides and their binding affinity. *J Phys Chem B*. 2011;115:7433–46.
58. Wengenack TM, Jack CR, Garwood M, Poduslo JF. MR Microimaging of amyloid plaques in Alzheimer's disease transgenic mice. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008;35:S82–8.
59. Austen BM, Paleologou KE, Ali SA, Qureshi MM, Allsop D, El-Agnaf OM. Designing peptide inhibitors for oligomerization and toxicity of Alzheimer's beta-amyloid peptide. *Biochemistry*. 2008;47:1984–92.
60. Elias A, Tsourkas A. Imaging circulating cells and lymphoid tissues with iron oxide nanoparticles. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2009;1:720–6.
61. Singh N, Jenkins GJ, Asadi R, Doak SH. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Rev*. 2010; 1.
62. Truillet C, Bouziotis P, Tsoukalas C, Brugiere J, Martini M, Sancey L, Brichart T, Denat F, Boschetti F, Darbost U, et al. Ultrasmall particles for Gd-MRI and (68) Ga-PET dual imaging. *Contrast Media Mol Imaging*. 2015;10:309–19.
63. Martins AF, Morfin JE, Kubickova A, Kubicek V, Buron F, Suzenet F, Salerno M, Lazar AN, Duyckaerts C, Arlicot N, et al. PiB-conjugated, metal-based imaging probes: multimodal approaches for the visualization of beta-amyloid plaques. *ACS Med Chem Lett*. 2013;4:436–40.
64. Hasegawa K, Ono K, Yamada M, Naiki H. Kinetic modeling and determination of reaction constants of Alzheimer's beta-amyloid fibril extension and dissociation using surface plasmon resonance. *Biochemistry*. 2002;41:13489–98.
65. Episkopou V, Maeda S, Nishiguchi S, Shimada K, Gaitanaris GA, Gottesman ME, Robertson EJ. Disruption of the transthyretin gene results in mice with depressed levels of plasma retinol and thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:2375–9.
66. Borchelt DR, Ratovitski T, van Lare J, Lee MK, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Sisodia SS. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron*. 1997;19:939–45.

Additional file:

**Figure S1: Characterization of functionalized nanoparticles:**

(A) Reaction scheme of AGuiX Nps pegylation. (B) FTIR spectrum of AGuiX (black) and AGuiX@PEG (red) dried at pH=2. The FTIR spectrum of the dry products were acquired on IR-Affinity-1, Shimadzu® with an ATR platform by applying attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy from 800 to 4000 cm⁻¹. The Nps suspensions were dried at 80 °C overnight after adjusting the pH at 2 with HCl 0.12 M. The apparition of a peak at 1716 cm⁻¹ (ν_{C=O} stretch) observed by FTIR is characteristic of the introduction of carboxylic acid moiety. (C) AGuiX (black) and AGuiX@PEG (red) hydrodynamic diameter measurements by DLS (λ= 532 nm); the hydrodynamic diameter (D_H) of the AGuiX@PEG (2.9 ± 0.9 nm) showed a slight increase compared to the D_H of the AGuiX (2.7 ± 0.7 nm), (D) HPLC chromatograms obtained with detection by UV-Visible absorption (λ = 295 nm) for AGuiX (black) and the AGuiX@PEG (red). The retention time shift from 10.1 min. to 11.4 min. is observed in accordance with the Nps surface modification by PEG chains.

Figure S2: Zeta potential versus pH of AGuIX (black) and AGuIX@PEG (red).

ζ -Potential measurements were performed with a Zetasizer NanoZS (laser He-Ne 633 nm) equipped with a MPT-2 autotitrator device from Malvern Instrument®. The colloidal solutions were firstly diluted at 10 mM of Gd^{3+} in an aqueous solution containing 5 mM of NaCl. One measurement was performed starting at pH 5.5 and going to pH 2 by 0.12M HCl addition and another one starting from pH 5.5 and going to pH 12 by 0.1M NaOH addition.

The isoelectric point of the nanoparticles slightly decreased (from pH 7.5 to pH 6) in accordance with a modification of the nanoparticles surface charge obtained by changing an amine into a carboxylic acid.

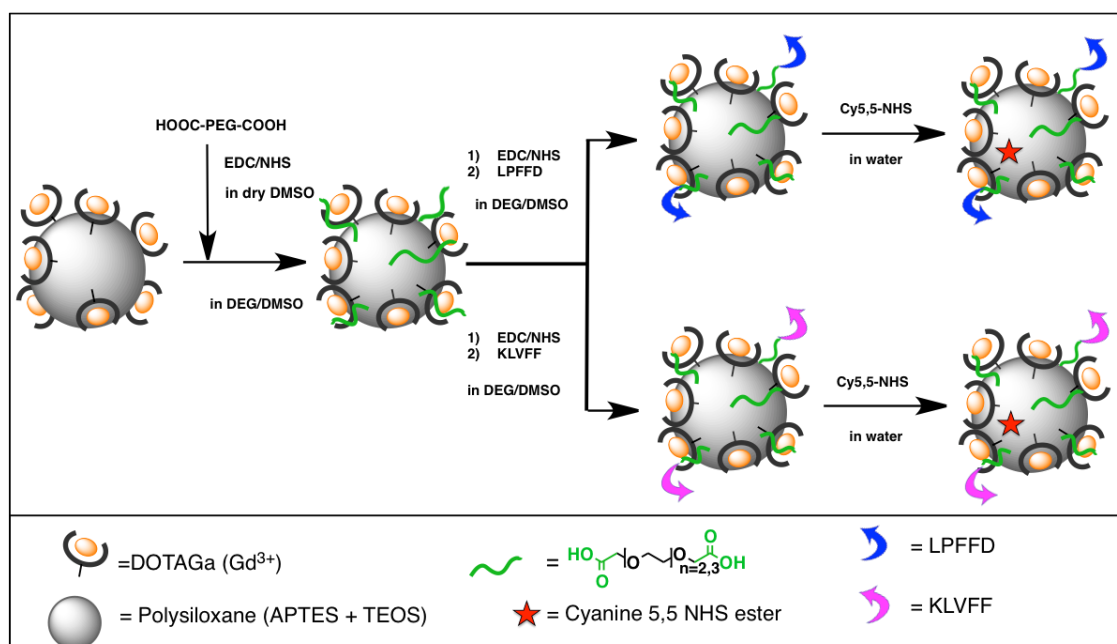


Figure S3: Reaction scheme for the synthesis of AGuIX@PEG@Peptide@Cy5.5

The AGuIX nanoparticles are very hydrophilic. On the contrary, peptides present a hydrophobic character due to their two phenylalanines residues. The coupling occurred in a DEG/DMSO mixture, allowing i) the limitation of the NHS ester hydrolysis, ii) the proper dispersion of both the nanoparticles and the hydrophobic peptides.

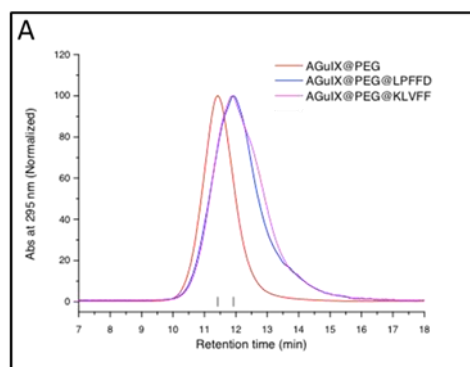


Figure S4: Chromatograms obtained with at UV absorption at $\lambda = 295$ nm of the AGuIX@PEG (red), AGuIX@PEG@LPFFD (blue) and AGuIX@PEG@KLVFF (pink). A slight shift of the retention time confirmed the grafting (11.9 min. for both peptide vectorized nanoparticles, against 11.4 min. for the PEG-nanoparticles). Besides, the Full Width at Half Maximum (FWHM) is almost twice larger for the peptide vectorized nanoparticles (1.6 min. for the AGuIX@PEG@LPFFD and 1.8 min. for the AGuIX@PEG@KLVFF versus 1.1 min. for the AGuIX@PEG). These results suggest that the distribution of nanoparticles is wider after peptide grafting.

Elementary Analyses :

To evaluate the number of PEG chains grafted to the nanoparticles, elementary analyses were performed on the nanoparticles. The hypothesis that about 10 DOTA molecules are displayed on one nanoparticle was made. The molar ratio (i.e. Si/Gd, C/Gd and N/Gd) deduced from weight percentage allowed tracing back the approximate molecular formula of each nanoparticles.

	AGuIX@PE			
	AGuIX	G	AGuIX@PEG@LPFFD	AGuIX@PEG@KLVFF
Si/Gd	4.9	5.7	5.6	5.9
C/Gd	26.6	33.2	40.8	40.0
N/Gd	6.5	7.1	9.0	8.9

Table S1: Molar ratio deduced from experimental weight percentage

Only gadolinium, silicon, carbon and nitrogen weight percentage were measured. Thus, water molecules and counter ions such as Na⁺ or OH⁻ were taken into account. The molecular formulas were deduced with an absolute error below 0.5% of the weight percentage supplied by elementary analyses (Table S2).

	AGuIX		AGuIX@PEG		AGuIX@PEG@LPFFD		AGuIX@PEG@KLVFF	
	Exp.	Theo.	Exp.	Theo.	Exp.	Theo.	Exp.	Theo.
%Gd	13.1	13.1	11.4	11.5	10.3	10.3	10.2	10.1
%Si	11.5	11.5	11.7	11.7	10.3	10.3	10.7	10.7
%N	7.6	7.6	7.2	7.2	8.3	8.0	8.1	7.9
%C	26.6	26.6	28.9	28.6	32.0	31.9	31.1	31.2

Table S2: Elementary analyses given in weight percent of element in the compound. For each sample, first the experimental weight percentages (carried out by the “Service Central d’Analyses”, CNRS and delivered with an absolute error of 0.5%), then the theoretical weight percentage deduced from the estimated molecular ratio.

-NH ₂ per Gd	AGuIX X	AGuIX@PE G	AGuIX@PEG@LPFF D	AGuIX@PEG@KLVF F
Elementary analysis	1.45	1.15	2.2	2.2
TNBS quantif.	1.55	1.15	2.2	2.2

Table S3: Comparison of the primary amine content evaluated by elementary analysis and TNBS assays. These results allow assessing the molecular formula obtained by elementary analysis.

Altogether, these calculations are leading to the following formulas:

AGuIX: DOTAGa(Gd)₁₀(SiO_{1.5}amin.opropyl)_{24,5}(SiO₂)₂₅;

AGuIX@PEG: DOTAGa(Gd)₁₀(SiO_{1.5}amin.opropyl)₃₀(SiO₂)_{27,3}PEG₅.

AGuIX@PEG@LPFFD: DOTAGa(Gd)₁₀(SiO_{1.5}amin.opropyl)₃₆(SiO₂)₂₀PEG_{3,5}LPFFD₂;

AGuIX@PEG@KLVFF: DOTAGa(Gd)₁₀(SiO_{1.5}amin.opropyl)₃₄(SiO₂)₂₅PEG_{3,5}KLVFF₂.

Finally, these molecular formulas were assayed by measuring the number of free amines remaining in the nanoparticles thanks to TNBS assay.

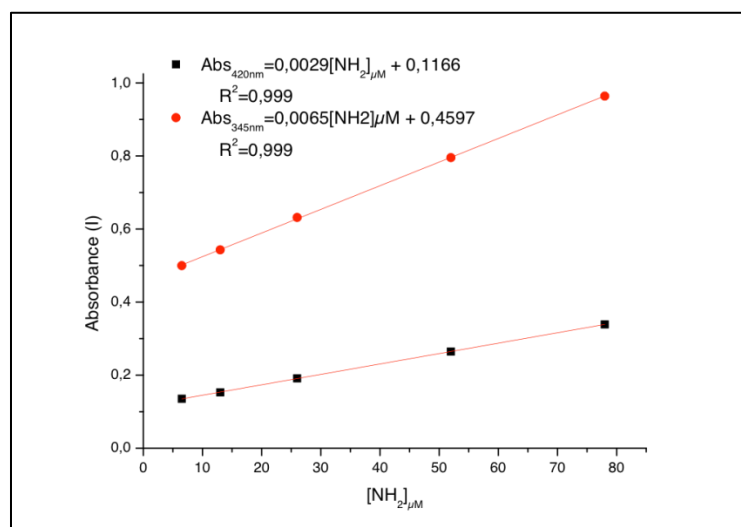


Figure S5: Standard curves of amine quantification in APTES/TEOS equimolar mixture by TNBS assays. i) Absorbance at 420 versus amine concentration (black), ii) Absorbance at 345 nm versus amine concentration (red). UV-Visible spectra were recorded using a UV-Vis spectrophotometer (Varian Cary50) in the range of 200 to 800 nm, with a Hellma semi-micro cell, 10 mm light path, 1400 μL , manufactured from Suprasil quartz.

The quantification of free amines in nanoparticles solutions was conducted using trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) assays⁶⁰. The solutions to be assayed (10-500 μM Gd^{3+}) and a negative control containing only bicarbonate buffer were performed into 1 mL of 0.1M sodium bicarbonate, pH 8.5. A volume of 500 μL of freshly prepared solution of TNBS at 2.5 mM was poured into each sample, well mixed and incubated for 2 h at 37°C, leading to the formation of a highly chromogenic derivative. The reaction was then stopped by adding 500 μL of 10%SDS and 250 μL of 1N HCl. Finally, the absorbance spectrums of the samples were measured respectively at 345 and 420 nm.

Therefore, 2,4,6-trinitrobenzene 1-sulfonic acid reacts with primary amines to form a chromogenic compound with specific absorption wavelength (345 nm and 420 nm)^{61,62}. The results were compared to the number of free amine deduced from the proposed molecular formulas, as expressed in the following formulas:

$$AGuIX: nNH_2 = n(SiO_{1,5}amin.opropyl) - nDOTA$$

$$AGuIX@PEG: nNH_2 = n(SiO_{1,5}amin.opropyl) - nPEG - nDOTA$$

$$AGuIX@PEG@LPFFD: nb(NH_2) = nb(SiO_{1,5}amin.opropyl) - nb(DOTAGa) - nb(PEG)$$

$$AGuIX@PEG@KLVFF: nb(NH_2) = nb(SiO_{1,5}amin.opropyl) - nb(DOTAGa) - nb(PEG) + nb(KLVFF)$$

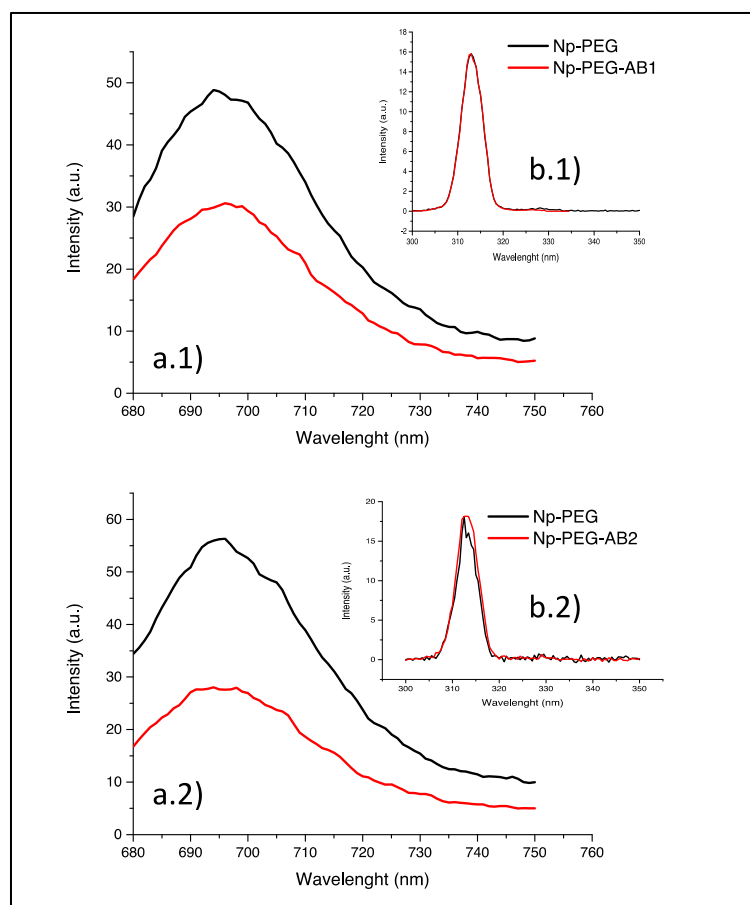


Figure S6: The cyanine 5.5 presents characteristic absorption and emission wavelength $\lambda_{\text{ex.max cy5.5}} = 675 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em.max cy5.5}} = 692 \text{ nm}$. The DOTAGA(Gd^{3+}) chelate grafted at the Np surface present phosphorescence properties: $\lambda_{\text{ex.max DOTAGA}(\text{Gd}^{3+})} = 275 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em.max DOTAGA}(\text{Gd}^{3+})} = 312 \text{ nm}$. a) Fluorescence spectra of cyanine 5.5 before and after removal of ungrafted dye ($\lambda_{\text{ex}} = 675 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 694 \text{ nm}$) respectively for AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 (a.1) and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 (a.2). After normalization at the same DOTA(Gd) phosphorescence intensity. b) Normalized phosphorescence spectrums of DOTA(Gd) for AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 (b.1) and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 (b.2).

	Cyanine 5.5 grafting yield	Cya5.5/ Gd^{3+}	Cya5.5/Np
AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5	61 %	0.6/1000	1/167
AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5	50 %	0.5/1000	1/200

Table S4: The yield of the grafting was calculated thanks to the comparison of the cyanine fluorescence and the DOTA(Gd^{3+}) chelate before and after removal of the ungrafted dye by tangential purification.

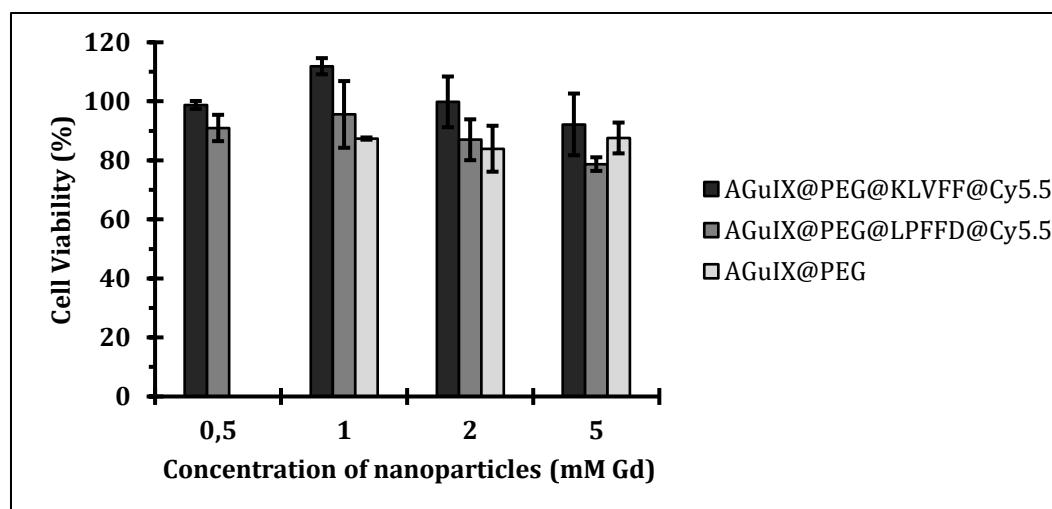
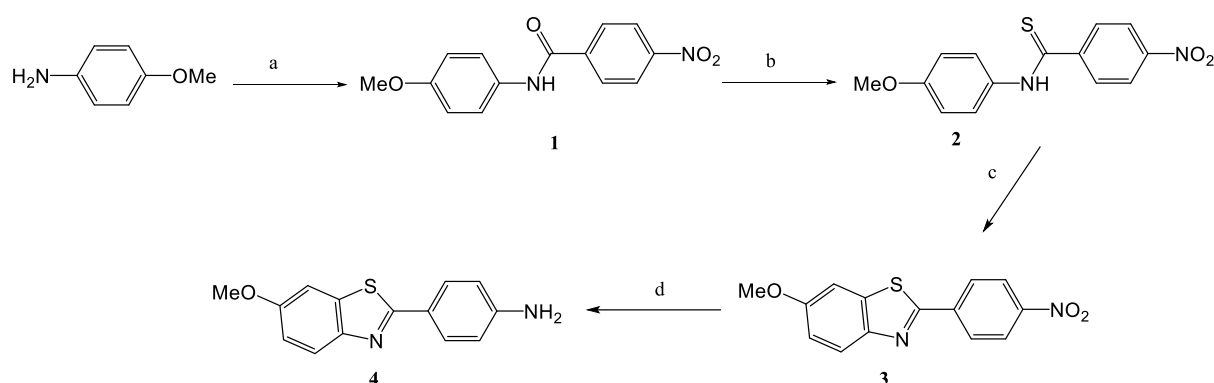


Figure S7: Effect of nanoparticles on cell viability. The innocuousness of the grafted Nps was assessed using a neuronal cell line SH-SY5Y. The cell viability was assessed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay⁶³. SH-SY5Y cells were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with 10 % fetal bovine serum and 1 % penicillin -streptomycin /amphotericin B. For the assay, the cells were plated at a density of 50 000 cells/well in 200 μ L of medium. Twenty four hours later, 0.5, 1, 2 or 5 mM of AGuIX@PEG@KLVFF (dark gray histograms) or AGuIX@PEG@LPFFD (gray histograms) or 1, 2 or 5mM of AGuIX@PEG (light gray histograms). Nps were added to the cells and incubated at 37 °C, 5 % CO₂. One hour later, 10 μ L of MTT solutions (12 mM) was added into each well, and the plates were incubated for another 2 h at 37°C, 5% CO₂. The culture medium was removed, and the precipitated cells were lysed using DMSO. After 10 minutes, the purple crystals were dissolved completely; the cell viability was calculated from the absorbance signals measured by a plate reader (Tecan Infinite M200) at 540 nm. The absorbance of the wells containing medium-only, corresponding to the background, were subtracted from the value of each reading. Data are expressed in % of cell viability, each MTT analysis was carried out on triplicate samples. As expected, the amount of live cells decrease with the augmentation of nanoparticles concentration, and more than 80 % are alive when they were incubated in the presence of up to 2 mM of nanoparticles, and more than 70 % at 5 mM of nanoparticles.

Figure S8: PIB derivative synthesis details

Schematic synthesis of PIB derivative.

Reagents and conditions: a) Nitrobenzoyl chloride, triethylamine, THF, 0 °C, 96 %. b) Lawesson's reagent, chlorobenzene, reflux, 85 %. c) K₃Fe(CN)₆, NaOH_{aq}, reflux, 52 %. d) SnCl₂, Ethanol, reflux, 92 %.

Synthesis protocol: N-(4'-methoxyphenyl)-4-nitrobenzamide (1): To a solution of 60 mL of p-anisidine (3.08 g, 25 mmol) and dry triethylamine (3.48 mL, 25 mmol) in freshly distilled THF, was added dropwise at 0 °C, 30 mL of a solution of 4- nitrobenzoyl chloride (3.03 mL, 25 mmol) in distilled THF over 20 min.. The mixture was stirred for 1 h at 0 °C and then for 1 h at room temperature. The white precipitate was filtered and the solution was concentrated under vacuum to 30 mL. Then 50 mL of water was added and the solution was allowed to stand overnight at 4 °C. The yellow-green precipitate was filtered and dried under vacuum to give 6.53 g of compound 1 (96 %). ¹H NMR (CDCl₃, 25 °C, 500 MHz): δ (ppm) 3.75 (s, 3H), 6.95 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.67 (d, 3J = 9.0 Hz, 2H), 8.17 (d, 3J = 8.8 Hz, 2H), 8.36 (d, 3J = 8.8 Hz, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃, 25 °C, 126 MHz): δ (ppm) 55.2 (1C), 113.8 (2C), 122.1 (2C), 123.5 (2C), 129.1 (2C), 131.8 (1C), 140.7 (1C), 149.0 (1C), 155.9 (1C), 163.4 (1C). HRMS (ESI): m/z: calcd for C₁₄H₁₃N₂O₄: 273.08698, found 273.08697.

N-(4'-methoxyphenyl)-4-nitrothiobenzamide (2): compound 1 (6 g, 22 mmol) was dissolved in 15 mL of chlorobenzene. Then, Lawesson's reagent (5.34 g, 13.2 mmol) was added to the solution and the mixture was refluxed 4 h. After cooling, the solution was allowed to stand overnight at 0 °C. The orange precipitate was filtered and then dissolved with acetone to separate the residue of Lawesson's reagent. The solution was evaporated to dryness to give 5.40 g of the compound 2 (85 %). ¹H NMR (DMSO, 25 °C, 500 MHz): δ (ppm) 3.37 (s, 1H), 3.78 (s, 3H), 7.02 (d, 3J = 8.8 Hz, 2H), 7.76 (d, 3J = 8.8 Hz, 2H), 7.99 (d, 3J = 8.6 Hz, 2H), 8.30 (d, 3J = 8.6 Hz, 2H). ¹³C NMR (DMSO, 25 °C, 126 MHz): δ (ppm) 55,3 (1C), 113.7 (C-1,5), 123.3 (2C), 125.3 (2C), 128.6 (2C), 132.6 (1C), 147,9 (1C), 148.1 (1C), 157.5 (1C), 194.1 (1C). HRMS (ESI): m/z: calcd for C₁₄H₁₃N₂O₃S : 289.06414 , found 289.06421.

2-(4'-nitrophenyl)-6-methoxybenzothiazol (3): Compound 2 (5 g, 17.3 mmol) was wetted with 3 mL of ethanol and then 15 mL of 10 % aqueous NaOH was added. The mixture was diluted with water to provide a final suspension of 5 % aqueous NaOH. The mixture was slowly added over 45 min. into a refluxed solution of potassium hexacyanoferrate(III) (22.8 g, 69.4 mmol). Then the mixture was refluxed 3 h. The brown precipitate was filtered and dried under vacuum and 100 mL of a mixture of dichloromethane-methanol (75/25 v/v) was added. The solid was

filtered off and the solvent was evaporated. Then a 100 mL of a mixture of chloroform-methanol (20/80 v/v) was added to the residue and the brown-yellow precipitate was filtered to give 2.56 g of compound 3 (52 %). ^1H NMR (CDCl_3 , 25 °C, 500 MHz): δ (ppm) 3.93 (s, 3H), 7.16 (dd, 1H, $3J = 8.9$ Hz, $4J = 2.4$ Hz), 7.40 (d, 1H, $4J = 2.4$ Hz), 8.02 (d, $3J = 8.9$ Hz, 1H, H-4), 8.22 (d, $3J = 8.9$ Hz, 2H), 8.35 (d, $3J = 8.9$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 25 °C, 126 MHz): δ (ppm) 55.2 (1C), 104.2 (1C), 116.8 (1C), 124.5 (2C), 124.7 (1C), 128.0 (1C), 137.3 (1C), 139.6 (1C), 148.9 (1C), 148.9 (1C), 158.8 (1C), 162.8 (1C). HRMS (ESI): m/z : calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: 287.04849, found 287.04854.

2-(4'-aminophenyl)-6-methoxybenzothiazol (4): To a solution of 3 (2.3 g, 8 mmol) in 120 mL of ethanol was added Sn(II) chloride dihydrate (5.87 g, 48.2 mmol) and the mixture was refluxed for 4 h. The ethanol was evaporated and the residue was dissolved in ethyl acetate. The resulting solution was washed 3 times with an aqueous solution of 1M of NaOH and the organic phase was collected and washed 2 times with 25 mL of water. The organic phase was collected, dried over MgSO_4 and the solvent was evaporated. The crude product was purified by flash chromatography with dichloromethane-ethyl acetate (8/1). 1.89 g of compound 4 (92 %) was obtained. ^1H NMR (CDCl_3 , 25 °C, 500 MHz): δ (ppm) 3.88 (s, 3H), 3.98 (s, 1H), 6.73 (d, $3J = 8.5$ Hz, 2H), 7.05 (dd, 1H, $3J = 8.9$ Hz, $4J = 2.4$ Hz), 7.32 (d, $4J = 2.4$ Hz, 1H), 7.85 (d, $3J = 8.5$ Hz, 2H), 7.87 (d, $3J = 8.9$ Hz, 1H). HRMS (ESI): m/z : calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: 257.07431, found 257.07442.

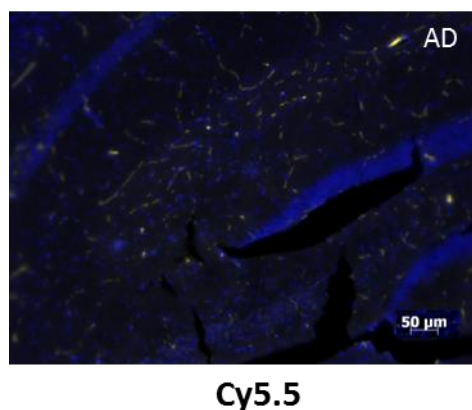


Figure S9: Control of the non-binding of Cy5.5 dye to amyloid plaque in brain section of AD mouse model. Pictures were photographed in the CA3-dentate gyrus area of the hippocampus

II.2. Ciblage des dépôts IAPP (diabète de type 2)

Concernant le ciblage des dépôts d'IAPP dans la pathologie du DNID, les NPs préalablement greffées avec un *spacer* PEG, ont été fonctionnalisées avec les peptides SNNFGA (AGuIX@PEG@SNNFGA) et CSNNFGA (AGuIX@PEG@CSNNFGA). Ces nanoparticules ont également été vectorisées avec la Cy5.5 (1 Cy5.5 / 100 NPs), afin d'évaluer leurs affinités pour les fibres IAPP *in vitro* par partition.

De la même manière que pour les NPs fonctionnalisées avec les peptides A β , nous avons quantifié le nombre de peptides à la surface des AGuIX@PEG@CSNNFGA@Cy5.5, grâce au DC dans l'UV lointain, évalué à 2.7 ± 0.3 peptides par NP. En revanche, le greffage des peptides SNNFGA ne semble pas avoir fonctionné, présentant des profils de dichroïsme circulaire différents entre le peptide seul et les AGuIX@PEG@SNNFGA@Cy5.5 (résultats non montrés).

Des tests de partition par centrifugation ont montré une interaction entre les AGuIX@PEG@CSNNFGA@Cy5.5 et les fibres IAPP, mais probablement trop faible pour déterminer un Kd dans nos conditions d'études. En effet, les résultats d'interaction de ces nanoparticules semblaient dans un premier temps encourageants, mais une affinité inattendue due à la Cy5.5 pour les fibres IAPP empêche une interprétation cohérente des résultats (**Annexe 3a**). En effet, l'interaction observée entre la NP fonctionnalisée et les fibres IAPP est probablement due au peptide, mais aussi à la Cy5.5, ce qui ne permet pas une approche quantitative. En conclusion, on peut donc affirmer que l'AGuIX@PEG@CSNNFGA@Cy5.5 interagit bien avec les fibres IAPP grâce au peptide CSNNFGA, mais avec une affinité trop faible. En conséquences, ces nanoparticules n'ont pas été testées *ex vivo*.

II.3. Ciblage des dépôts TTR-V30M (PNF-TTR)

Plusieurs peptides TTR-V30M ont été greffés sur les NPs, munies du *spacer* PEG et du marqueur fluorescent Cy5.5. Comme pour les autres AGuIX, la quantification du greffage peptidique a été suivie par DC. Le greffage du peptide IAALLSP s'avère insuffisant pour notre étude (9 peptides pour 100 NPs), mais les greffages des peptides LLSPYS et IAALLSP ont été respectivement évalués à 3.7 ± 0.5 peptides par NP et 0.75 ± 0.09 peptides par NP. Ces deux NPs ont donc été utilisées *in vitro* par les tests de partitions par centrifugation.

Dans un premier temps, les AGuIX@PEG@LLSPYS@Cy5.5 présentent une affinité pour les fibres TTR-V30M, mais comme pour les AGuIX@PEG@CSNNFGA@Cy5.5 dirigées contre les fibres IAPP, leur affinité semble très faible et difficilement exploitable en l'état pour leur utilisation *in vivo*. L'interaction fortuite de la Cy5.5, est également observée pour les fibres TTR-V30M. De cette conclusion découle le fait que le peptide LLSPYS semble trop peu affiné, et a été écarté dans la suite de ce projet.

Concernant l'AGuIX@PEG@IAALLSP@Cy5.5, même si une interaction spécifique supérieure à celle de l'AGuIX@PEG@LLSPYS@Cy5.5 a été observée pour les fibres TTR-V30M (**Annexe 3b**), l'interaction inattendue due à la Cy5.5 empêche encore une fois une interprétation fiable et quantitative des résultats.

Ces résultats s'avèrent donc décevants, pour les deux peptides greffés sur les AGuIX. Cependant, l'affinité observée de l'AGuIX@PEG@IAALLSP@Cy5.5 pour les fibres TTR-V30M, en fait une candidate possible pour le ciblage spécifique, mais il est nécessaire de la détecter par d'autres moyens que la Cy5.5, et d'optimiser le peptide pour garantir son utilité. Des études additionnelles par RPS, en utilisant des AGuIX avec le peptide IAALLSP mais sans Cy5.5, permettraient rapidement de déterminer si leur affinité est suffisante pour une utilisation future *in vivo*.

III. Conclusion et perspectives

A terme, ce travail a pour but de simplifier le diagnostic des amyloïdoses en une seule étape d'identification, tout en gardant la multimodalité des AGuIX. Pour cela, sept nanoparticules différentes, greffées avec des peptides spécifiques d'un type de fibres amyloïdes, ont été synthétisées. Cinq nanoparticules ont pu être utilisées pour des tests d'interaction *in vitro*, deux d'entre elles ont été testées avec succès *ex vivo*. Dans l'ensemble des résultats, il a été observé un ciblage spécifique de chaque type de fibre amyloïde.

Pour les fibres A β_{1-42} , le ciblage spécifique par les AGuIX@PEG@KLVFF et AGuIX@PEG@LPFFD a été confirmé *ex vivo*, et des études *in vivo* sur des modèles murins sont envisagées.

Pour les fibres IAPP et TTR-V30M, une interaction gênante due à la Cy5.5 n'a permis, dans le cadre de cette thèse, ni la détermination précise des affinités de nos produits, ni une étude *ex vivo*. L'affinité de l'AGuIX@PEG@CSNNFGA@Cy5.5 pour les fibres IAPP, et l'affinité de l'AGuIX@PEG@LLSPYS@Cy5.5 pour les fibres TTR-V30M, semblent trop faibles en l'état pour poursuivre leurs utilisations. En revanche, les études concernant l'interaction entre les fibres TTR-V30M et l'AGuIX@PEG@IAALLSP@Cy5.5 doivent être approfondies par d'autres méthodes de caractérisation *in vitro*. Si les résultats s'avéraient concluants, des tests *ex vivo* sur tissus PNF-TTR-V30M seraient également à considérer.

Par ailleurs, il est important de s'affranchir de la Cy5.5 pour les tests concernant les fibres IAPP et TTR-V30M. Ainsi, la RPS par Biacore semble indiquée pour évaluer les Kds *in vitro* de l'AGuIX@PEG@IAALLSP pour les fibres TTR-V30M, mais aussi pour d'autres NPs, où le peptide NFGAIL dirigé contre les fibres IAPP, a été greffé à hauteur de 1.2 ± 0.06 peptide par NP (AGuIX@PEG@NFGAIL, sans Cy5.5).

Les nanoparticules greffées avec les peptides présentent donc des affinités bien plus faibles que dans le cas des nano-objets génériques, ce qui implique à terme des injections de nanoparticules *in vivo* en plus grande quantité. Néanmoins, le ciblage spécifique, confirmé sur des tissus pathologiques, présente l'avantage d'une identification directe de l'amyloïdose concernée, tandis que la taille plus faible des NPs (environ 3 nm pour les deux nanoparticules spécifiques, contre 6.5 et 14 nm respectivement pour celles décorées par le PIB et le B10AP) permet à priori une meilleure diffusion dans le corps en général, et en particulier à travers la BHE (moyennant son ouverture, voir Chapitre 3).

Dans tous les cas, il est important d'augmenter les affinités de nos nano-objets par l'intermédiaire des peptides. Par exemple, la cyclisation des peptides KLVFF a été expérimentée¹⁸³, et permet d'augmenter l'affinité pour les fibres A β_{1-42} , tout comme l'ajout de certains acides aminés¹⁷⁸ (KLVFF-KKKKKK, avec un Kd = 180 nM pour les protofibres d'A β_{1-40}). En ce sens, nous avons également recherché de nouveaux peptides pour chaque pathologie, correspondants aux séquences entières de brins β (voir Introduction générale-II.5.) :

HHQKLVFFAED pour les fibres A β ₁₋₄₂, ATQRLANFLV et SSTNVGSNTY pour les fibres IAPP, et YS-11 pour les fibres TTR-V30M. Des tests par RPS, en désorption-ionisation laser assistée par matrice, ELISA, et fractionnement par couplage flux force sont ou ont été envisagés pour l'étude d'affinité qualitative et quantitative. Une autre possibilité est d'augmenter le nombre de peptides à la surface des nanoparticules, tout en garantissant un accès à leurs domaines de fixations: pour cela, des nanoparticules auto-fluorescentes à base de terbium²³⁴ (de diamètre d'environ 35 nm), semblent adaptées pour augmenter ce greffage de façon contrôlée, de deux à plusieurs milliers (!) de cibleurs par nanoparticule.

Chapitre 3 : Détection *in vivo* des amyloïdoses

I. Introduction

Afin de confirmer l'intérêt de nos NPs pour le diagnostic précoce des amyloïdoses chez l'Homme, l'étape suivante a consisté à suivre la capacité de ciblage des AGuIX fonctionnalisées *in vivo*, dans le cerveau de souris modèles pour la MA (**Figure 22**). Notre stratégie a mis à contribution une technologie d'ultrasons²³⁵⁻²³⁶, appliquée grâce à Benoit Larrat et Matthieu Gerstenmayer de l'Institut d'Imagerie Biomédicale de Saclay. Cette méthode permet l'ouverture transitoire de la BHE, pour le passage des AGuIX vers leurs cibles amyloïdes, situées au niveau du cortex et de l'hippocampe. En effet, les ultrasons perméabilisent temporairement les vaisseaux sanguins cérébraux, permettant ainsi une diffusion de molécules incapables de passer spontanément. Cette technique particulière possède des applications diagnostiques et/ou thérapeutiques dans les domaines du cancer (tumeurs cérébrales)²³⁷ et des maladies neurodégénératives.

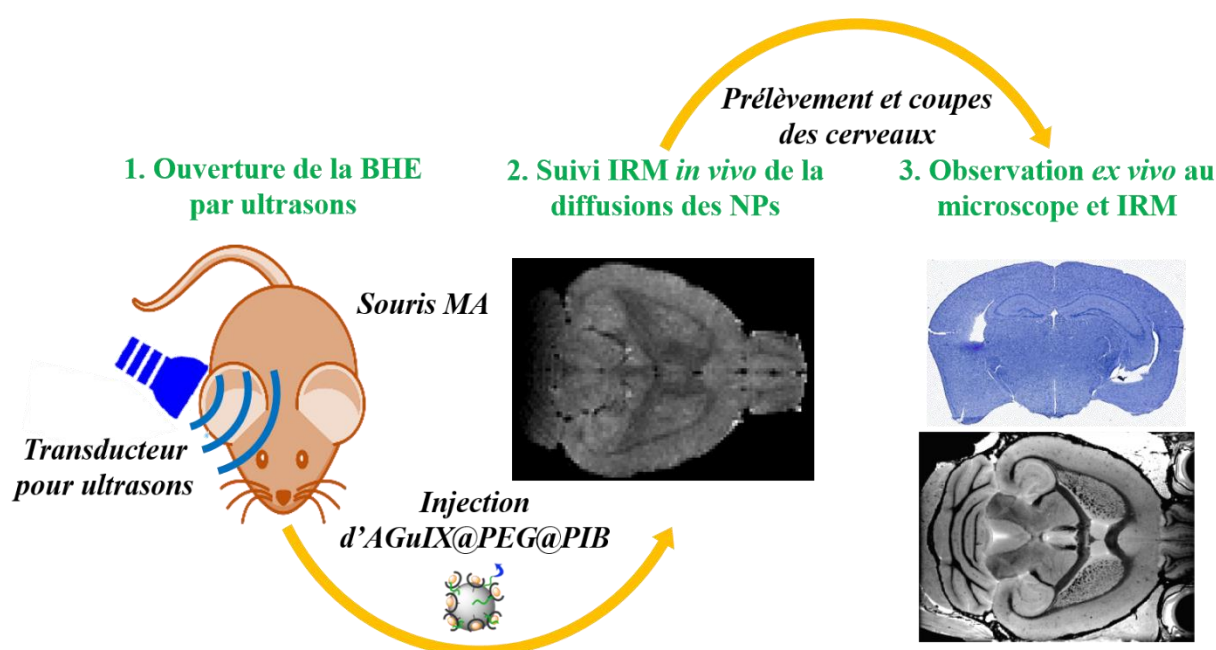


Figure 22. Représentation de la stratégie de suivi de diffusion des nanoparticules dans le cerveau de souris modèles de la MA.

Dans le cadre de cette première étude, nous avons choisi le modèle de souris Alzheimer APPswe/PSEN1dE9, qui est l'un des modèles les plus étudiés à ce jour, concernant les agrégats amyloïdes sur des modèles animaux. Les plaques séniles sont très abondantes dès 12 mois, ce qui permet d'avoir de multiples cibles pour nos NPs. De plus, l'étude du passage des AGuIX dans le cerveau reste une plus-value intéressante, comparativement à des organes plus faciles d'accès. Nous avons utilisé une souris sauvage en guise de contrôle, notée WT par la suite

(*wild-type*), et trois souris pathologiques, toutes âgées de 22 à 24 mois, que nous notons dans la suite de ce travail #2701, #2704, et #1337. Des tests de mémoires ont été réalisés en amont sur ces souris, confirmant l'atteinte neurodégénérative.

Concernant l'usage des ultrasons, nous avons utilisé un transducteur pour ultrasons, qui permet de convertir une énergie électrique en énergie acoustique, avec une fréquence de 1.5 MHz. Ce transducteur est alors appliqué sur la tête de l'animale, avant l'injection des NPs. Nous avons ainsi pu tester et comparer trois conditions différentes, concernant l'ouverture de la BHE : une ouverture globale modérée, une ouverture ponctuelle au niveau des zones d'intérêts, et une ouverture globale importante. Compte tenu des propriétés d'agents de contraste de l'AGuIX (par le biais du gadolinium), le suivi de diffusion est rendu possible par IRM pondérée en T_1 . Par la suite, les cerveaux des souris ont été prélevés, et des études *ex vivo* par IRM pondérée en T_2^* et par microscopie ont été réalisées.

Au niveau des NPs fonctionnalisées, Les AGuIX@PEG@PIB ont été choisies car elles représentent les meilleures candidates pour le passage de la BHE et le ciblage des agrégats : le PIB est le produit le plus utilisé à ce jour pour le diagnostic des amyloïdoses, et les AGuIX@PEG@PIB ont montré une bonne affinité *in vitro* pour les fibres $A\beta_{1-42}$ ($K_d = 15 \pm 3 \mu M$, voir Chapitre 1) tout en étant de petite taille ($6.5 \pm 1.5 \text{ nm}$). Une quantité identique de nanoparticules a été utilisée dans chaque test et les différentes procédures de synthèses sont détaillées dans le Chapitre 1. Les modèles murins, fournies gracieusement par Benoit Larrat, et les méthodes de coupes de sections de cerveaux ont également été décrits dans le Chapitre 1.

II. Matériel et méthodes

II.1. Tests de mémoires

Deux tests de mémoires sont effectués sur les modèles murins Alzheimer, au sein de l'Institut d'Imagerie Biomédicale de Saclay : le labyrinthe de Barnes et le labyrinthe en Y.

Le labyrinthe de Barnes est un plateau circulaire avec 20 trous tout autour. Sous un des trous, se trouve une boîte dans laquelle l'animal peut descendre se cacher (ce qu'il cherche à faire car il est en état de stress sur le plateau). L'animal doit apprendre où est le trou par rapport aux indices visuels extérieurs. Le test est réalisé plusieurs fois et le temps que la souris met à retrouver la boîte est mesuré. Ce temps diminue normalement avec les tests, ce qui n'est pas le cas de souris développant la maladie d'Alzheimer.

Le labyrinthe en Y est un labyrinthe à trois branches. A la 1^{ère} session, l'animal ne peut en explorer que deux (une est fermée), à la session suivante il peut explorer les trois. Son instinct explorateur le pousse à explorer ce qu'il ne connaît pas, et s'il a bonne mémoire, il doit donc explorer de préférence le nouveau bras.

II.2. L'ouverture de la BHE

Le système d'ultrasons est composé d'un générateur et amplificateur de signaux (*Image Guided Therapy*, France) et d'un transducteur concave (diamètre 25 mm, distance focal 20 mm, fréquence centrale 1,5 MHz, Imasonic, France), couplé à la tête de l'animal par un ballon rempli d'eau dégazée. Le transducteur a été calibré à la fois en cuve et par simulation. Les animaux sont endormis par une anesthésie gazeuse (Isoflurane 3 % avec un mélange air-oxygène à 1 L.min⁻¹) et leur crâne est rasé. 100 µL de microbulles (diamètre 2-8 µm, Sonovue, Bracco) sont injectées dans le sinus rétro-orbitaire, puis les ultrasons sont immédiatement appliqués manuellement, avec les paramètres suivant :

- i. **Conditions n° 1 : sur les souris # 2701 et WT**, 0.6 MPa de pression à la focal, un cycle de 99 msec de tir / 100 msec, 1200 cycles, ouverture globale (déplacement manuel continu du transducteur sur l'ensemble de la tête de l'animal).
- ii. **Conditions n° 2, sur la souris #2704**, 0.6 MPa de pression à la focal, un cycle de 3 msec de tir / 100 msec, 3000 cycles, ouverture ponctuelle.
- iii. **Conditions n° 3 : sur la souris #1337**, 0.8 MPa de pression à la focal, un cycle de 99 msec de tir / 100 msec, 2400 cycles, ouverture globale.

Une fois les ultrasons appliqués, 10 μmol d'AGuIX@PEG@PIB, dissoutes dans 200 μL d' H_2O pour préparation injectable, sont ensuite injectées dans le sinus rétro-orbitaire.

II.3. L'imagerie IRM

Les animaux sont endormis par une anesthésie gazeuse (Isoflurane 2% avec un mélange air-oxygène à 1 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) et imagés avec un appareil d'IRM (11.7 Tesla, Brüker, Allemagne), lui-même équipé d'une antenne cryogénique de surface optimisée pour la souris. Leur température et fréquence respiratoire sont suivies et contrôlées. Une séquence d'imagerie *in vivo* pré-ouverture de la BHE, une autre post-ouverture et une séquence *ex vivo* après sacrifice et fixation du cerveau dans le paraformaldéhyde (PFA) sont effectuées. La séquence *in vivo* est une MSME (*Multi Slices Multi Echoes*, 2D, écho de spin), pondérée en T_1 de façon à voir la prise de contraste du gadolinium, avec une résolution de $130*130*250\ \mu\text{m}$, une taille de matrice de $140*110*28\ \mu\text{m}$, un ratio temps d'écho / temps de répétition (TE/TR) de 6 msec / 290 msec, un temps d'acquisition de 2.5 min pour 5 moyennes. La séquence *ex vivo* est une MGE (*Multi Gradient Echo*, 3D) pondérée en T_2^* de façon à voir les dépôts sanguins liés à de potentielles hémorragies, avec une résolution de $40*40*40\ \mu\text{m}$, une taille de matrice de $400*270*180\ \mu\text{m}$, un ratio TE/TR de 4 msec / 90 msec, 8 échos, un intervalle inter écho de 4.75 msec, un temps d'acquisition de 12 heures pour 10 moyennes.

II.4. Immunohistochimie et microscopie

Les cerveaux sont prélevés du crâne des souris et transférés pendant 24 heures à 4 °C dans 10 % PFA, puis dans du tampon PBS 0.1% NaN_3 avant d'être coupés en section sur un microtome (20 μm ; Leica, VT 1000E) pour les analyses immunohistochimiques (IHC). Les sections sont montées sur des lames en verres et sont séchées quelques minutes à température ambiante. Elles sont ensuite lavées trois fois dans un tampon PBS avant d'être incubées dans un tampon de perméabilisation-saturation (PBS, 0.3 % Triton, 1 % sérum de l'albumine bovine) pendant 1h à température ambiante. Les sections sont incubées pendant deux minutes avec l'hématoxyline (colorant nucléaire, bleu/violet), puis rincées à l' H_2O distillée. Les sections sont ensuite incubées pendant deux minutes avec l'éosine (colorant cytoplasmique, rose), puis rincées à l' H_2O distillée. Le marquage des PEG des nanoparticules est réalisé au Dab (Dako #K3468, France). Les sections de tissus sont ensuite déshydratées dans des solutions d'éthanol de plus en plus concentrées (30 %, 50 % et 100 %) puis dans du xylène, avant d'être montée entre lame et lamelle dans un milieu eukitt (Chem lab #11948494, Belgique).

III. Résultats

Le but de cette étude préliminaire est de confirmer le passage des AGuIX@PEG@PIB à l'intérieur du cerveau par suivi IRM *in vivo*, de constater l'ouverture de la BHE par l'ouverture des vaisseaux sanguins cérébraux, et d'évaluer si les AGuIX fonctionnalisées avec le PIB atteignent leurs cibles amyloïdes.

Le suivi par IRM après application d'ultrasons, montre un passage des AGuIX@PEG@PIB dans certaines conditions. Chez la souris WT en conditions n°1, on observe un passage des AGuIX@PEG non fonctionnalisées, à l'intérieur du cerveau par cartographie T₁ (**Figure 23**), dû à une baisse du temps de relaxation T₁ post-injection dans les régions d'intérêts, de 1570 msec à 1390 msec. Ceci indique que les AGuIX@PEG sont passées dans le cerveau, avec un passage plus important dans les ventricules (hypo-signal). L'application du même protocole sur la souris #2701, montre un passage limité des AGuIX@PEG@PIB dans le cerveau, car on observe que peu de différences entre les signaux IRM pondérés en T₁ avant et après injection des AGuIX@PEG@PIB (**Figure 24a**). La cartographie T₁ présente une baisse du temps de relaxation T₁ post-injection, moins prononcée (de 1600 msec à 1520 msec), mais suffisamment significative pour l'attribuer à la présence de NPs (**Annexe 4**). On en déduit que les AGuIX@PEG@PIB passent la BHE difficilement dans ces conditions, probablement en raison de l'augmentation de la taille de l'AGuIX après greffage du PIB (de 2.9 ± 0.7 nm à 6.5 ± 1.5 nm selon notre précédente étude, voir Chapitre 1).

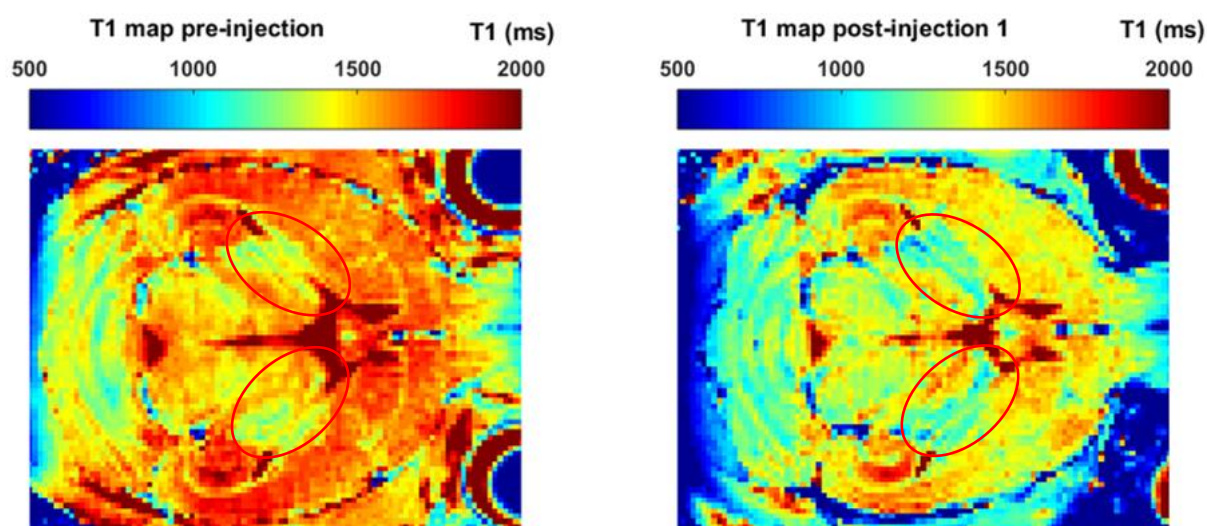


Figure 23. Résultats d'IRM *in vivo* par cartographie T₁, réalisé sur la souris WT après ouverture de la BHE en conditions n°1, pré et post-injection des AGuIX@PEG. Le passage des NPs se traduit par une diminution du temps T₁, notamment dans les ventricules (zones entourées). Le calcul du T₁ global au niveau du cerveau et du cervelet montre une baisse de 1500 à 1390 msec.

Par ailleurs, les deux autres méthodes utilisées valident la technique d'ultrasons pour le passage des AGuIX@PEG@PIB.

En effet, en conditions n°2, avec une ouverture ponctuelle de la BHE, des cycles d'ultrasons plus courts (3 msec toutes les 100 msec contre 99 msec toutes les 100 msec) mais étalées sur des temps plus longs (3000 cycles contre 1200 cycles), l'hyper-signal post-injection observé chez #2704, comparativement au signal pré-injection, montre le passage localisé de NPs fonctionnalisées avec le PIB (**Figure 24b**).

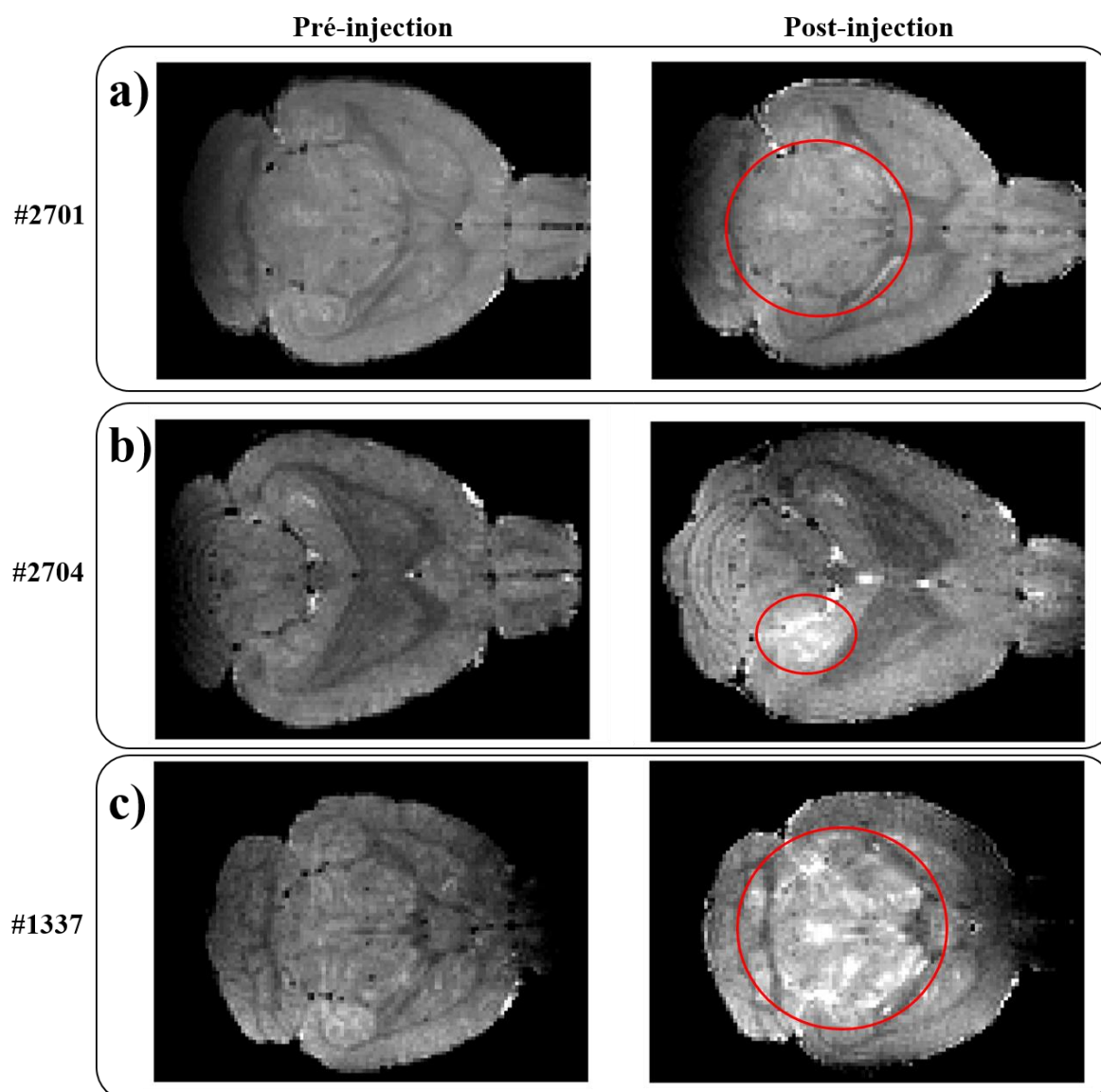


Figure 24. Résultats d'IRM pondérée en T_1 , réalisés sur les cerveaux de souris modèles de la MA après ouverture de la BHE, avant et après injection des AGuIX@PEG@PIB. L'hyper-signal dû aux AGuIX@PEG@PIB est notamment visible pour les souris #2704 et #1337 (cercles rouges).

En conditions n°3, et comparativement aux conditions de départ, cette constatation est encore plus visible, avec une ouverture globale de la BHE, et une pénétration plus profonde des ultrasons. Ceci est probablement dû à l'augmentation de la pression à la focale (de 0.6 MPa à 0.8 MPa), avec des cycles équivalents mais sur une période deux fois plus

longue. Ainsi, on peut voir un hyper-signal généralisé, avec une diffusion globale des AGuIX@PEG@PIB (**Figure 24c**).

Par la suite, les cerveaux ont été prélevés, et observés une nouvelle fois par IRM, pondérée en T_2^* , afin de visualiser si les ultrasons provoquent des lésions cérébrales par l'intermédiaire de l'ouverture des vaisseaux sanguins (hypo-signaux pathologiques, **Figure 25**).

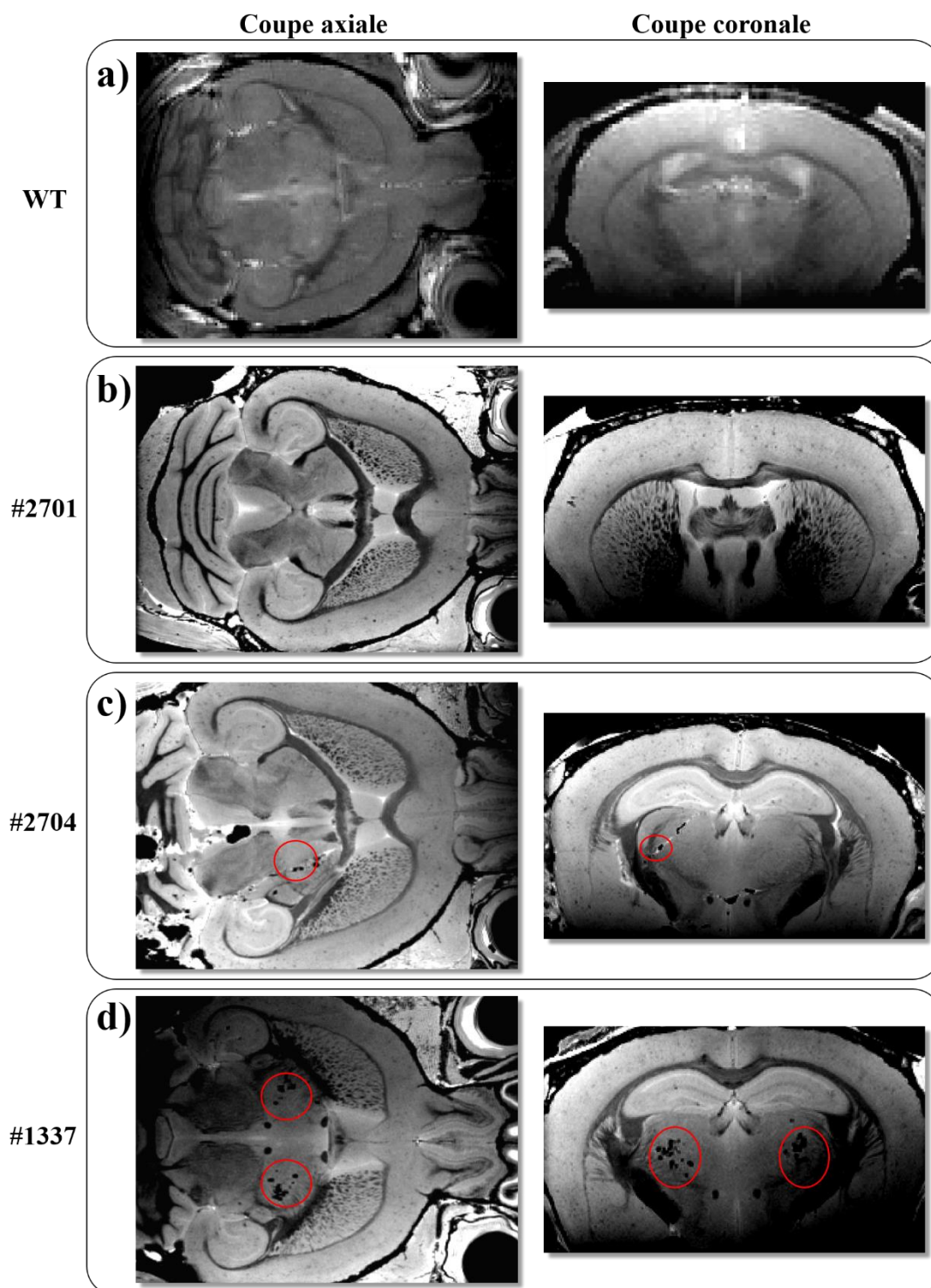


Figure 25. Résultats d'IRM pondérée en T_2^* , réalisées sur les cerveaux *post-mortem* des souris d'intérêt. Des lésions hémorragiques caractéristiques sont visibles pour les souris #2704 et #1337 (cercles rouges).

Aucune lésion due à l'ouverture de la BHE n'est à déplorer dans les cas des souris WT et #2701 (**Figure 25a & 25b**).

En revanche, des lésions hémorragiques sont visibles en faible quantité dans le cerveau de la souris #2704 (présence anormale d'hypo-signaux localisés, **Figure 25c**), correspondantes aux zones d'applications des ultrasons. Ces hémorragies sont présentes en plus grand nombre sur #1337 (**Figure 25d**). Elles sont probablement dues à l'augmentation de la pression à la focale exercée, potentialisant le risque de former des lésions importantes au niveau des vaisseaux sanguins cérébraux.

Par ailleurs, la présence des AGuIX@PEG@PIB dans le cerveau a été confirmée sur les sections de cerveaux, par microscopie optique *ex vivo*. En effet, un grand nombre de nanoparticules sont visibles sur les coupes de cerveaux, chez le modèle #2701, notamment dans le thalamus (marquage marron, **Figure 26**). Il est intéressant de noter que les dépôts amyloïdes sont visibles sans marquage, identifiables par des zones caractéristiques, foncées et diffuses (**Figure 2 & 26**). Une partie des AGuIX@PEG@PIB se situe au voisinage des dépôts amyloïdes A β (**Figure 26b**) ce qui peut laisser penser à un ciblage spécifique. De plus, des premières observations prometteuses sur le cerveau de la souris #2704, dont l'ouverture ponctuelle a permis un meilleur passage des NPs, ont montré un marquage important de zones restreintes, dont l'aspect filamenteux est associé à des agrégats amyloïdes (**Annexe 5**).

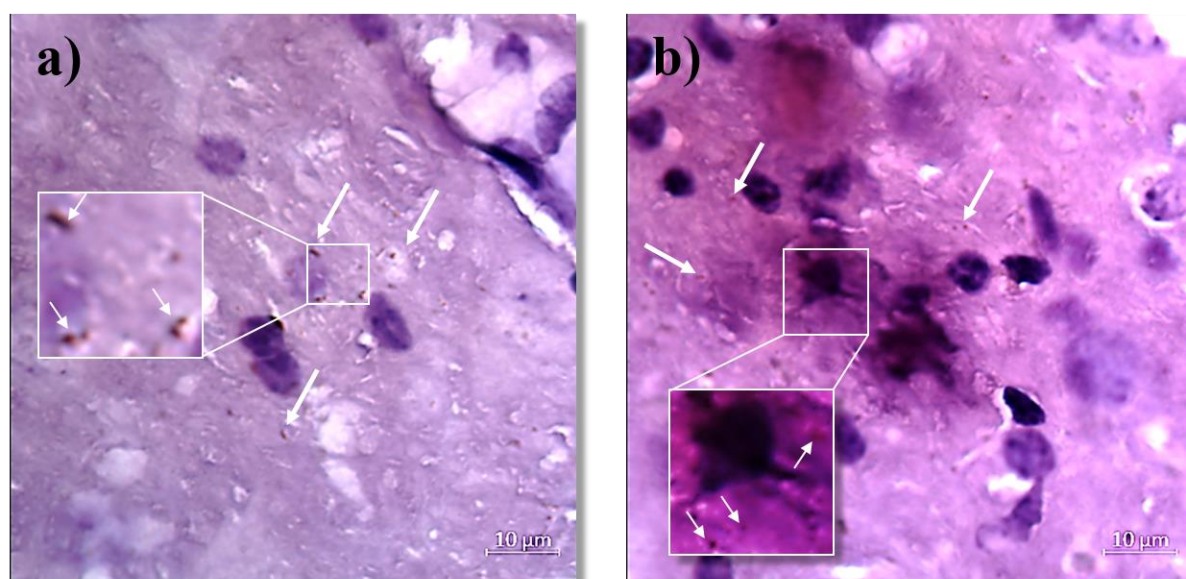


Figure 26. Coupe du thalamus de la souris #2701 modèle de la MA, après colorations. Marquages du cytoplasme (violet clair), des noyaux (violet foncé), et des AGuIX@PEG@PIB (flèches, marron). Les zones diffuses correspondent à des dépôts amyloïdes.

On peut en conclure que les AGuIX@PEG@PIB ont pu être diffusées jusqu'aux cibles amyloïdes, même chez #2701 qui paraissait avoir une diffusion limitée des NPs, avec un ciblage possible des dépôts amyloïdes A β dans ce cas. Ce ciblage se confirme lorsque le passage des NPs est meilleur, avec des AGuIX@PEG@PIB observables seulement sur des zones restreintes associées à des dépôts (**Annexe 5**). Cette affirmation doit cependant être confirmée par d'autres méthodes d'imagerie, ainsi que sur le dernier cerveau de souris injectée.

IV. Conclusion et perspectives

L'ensemble de ces résultats prometteurs montrent que la technique basée sur l'utilisation d'ultrasons pour ouvrir la BHE fonctionne dans le cadre de notre stratégie, et permet le passage des AGuIX@PEG@PIB à l'intérieur du cerveau des souris pathologiques. De plus, les NPs ont pu atteindre les zones d'intérêts où se forment les plaques séniles, et on peut supposer un ciblage des dépôts amyloïdes A β ₁₋₄₂ malgré un passage limité à travers la BHE. Ces conjectures doivent être confirmées par des analyses complémentaires *ex vivo*, par exemple par spectroscopie sur plasma induit par laser (LIBS), permettant la détection des métaux constituant l'AGuIX. Même si le ciblage exclusif des agrégats a été observé après une ouverture ponctuelle de la BHE, cette ouverture transitoire a impliqué des lésions hémorragiques importantes. Il existe dans ce cadre des méthodes, différentes de l'utilisation des ultrasons, pouvant pallier à ces effets délétères. En effet, certaines d'entre elles mettent à contribution des molécules qui ont la capacité d'interagir directement avec la BHE, par l'intermédiaire d'une transcytose médiée par des récepteurs particuliers (par exemple, entre l'apolipoprotéine E et les récepteurs à lipoprotéines de faible densité), par l'activation de récepteurs facilitant le passage d'agents exogènes (tels que les récepteurs à adénosine), ou en modulant la perméabilité des cellules endothéliales *via* les jonctions serrées entre cellules. On peut donc imaginer des nanoparticules, décorées avec certaines de ces molécules afin de faciliter leur passage.

Cependant, la technique d'ultrasons reste tout à fait indiquée et complémentaire, présentant plusieurs avantages comparativement à ces stratégies : elle est indépendante des NPs (et ne nécessite donc pas d'étapes supplémentaires de synthèse, coûteuses en temps et en argent), les paramètres d'ouvertures sont directement modulables, et elle est aujourd'hui en phase de test chez l'Homme. Il est toutefois nécessaire, dans le cadre de nos recherches, d'adapter ces paramètres, en garantissant le passage des NPs pour le ciblage des amyloïdoses, tout en ne provoquant pas de lésions.

Dans un premier temps, il sera nécessaire de procéder à l'analyse par microscopie du dernier cerveau #1337 *post-mortem*, qui présentait une meilleure diffusion globale des AGuIX@PEG@PIB par IRM, et qui devrait apporter des informations supplémentaires. Cependant, la technique d'utilisation des ultrasons doit être adaptée, par l'intermédiaire des différents paramètres modulables (fréquence, temps d'application des ultrasons, application locale ou générale), afin de garantir un passage optimal des AGuIX@PEG@PIB, tout en évitant des lésions cérébrales fortuites, rédhibitoires pour l'étude chez l'Homme en aval. En complément, l'étude de la cinétique d'élimination des NPs post-injection est importante (*via* le système rénal) pour la suite de ce projet. Une étude sur un nombre plus important de souris, et en faisant varier les concentrations en nanoparticules injectées, semble également nécessaire. Enfin, il serait intéressant d'appliquer l'ensemble de ces tests à d'autres nanoparticules que nous avons à notre disposition, et notamment les AGuIX greffées avec le nanocorps B10AP (voir Chapitre 1), ou les peptides spécifiques KLVFF et LPFFD (voir Chapitre 2).

Par ailleurs, les tests *in vivo* effectués lors de ce travail de thèse ne concernent que la MA et ses modèles murins associés : il sera donc intéressant, à l'avenir de tester les nanoparticules correspondantes sur les modèles murins du DNID et de la PNF-TTR-V30M.

Chapitre 4 : Propriétés optiques de fibres amyloïdes

I. Introduction

Dans notre recherche de stratégies diagnostiques systématiques et non-invasives, il semble possible, du moins *in vitro*, de détecter les dépôts amyloïdes sans la nécessité de marqueurs spécifiques. Dans la dernière partie de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux propriétés d'absorption et de luminescence (fluorescence, phosphorescence) des fibres amyloïdes.

Tout d'abord, la luminescence est une émission de lumière qui résulte d'interactions entre particules électriquement chargées. Elle peut provenir de transitions électroniques dans certains molécules après absorption d'énergie *via* un rayonnement lumineux incident (ou excitation)²³⁸. Le diagramme de Jablonski (**Figure 27**) permet de comprendre ces phénomènes : une molécule stable (état fondamental), devient instable après absorption d'un photon (état excité, singulet ou triplet, dû à une transition radiative). Schématiquement, elle peut retourner à son état fondamental de plus basse énergie très rapidement (de l'ordre de 10^{-10} seconde), soit par conversion interne ou externe d'énergie, soit en réémettant un photon d'énergie plus faible (ou émission) : c'est la fluorescence, où la longueur d'onde d'émission sera plus grande que celle d'excitation, selon la relation de Planck-Einstein. Lorsque ce retour à l'état fondamental est plus lent, l'émission dure beaucoup plus longtemps et on parle alors de phosphorescence (jusqu'à plusieurs secondes pour retourner à l'état fondamental).

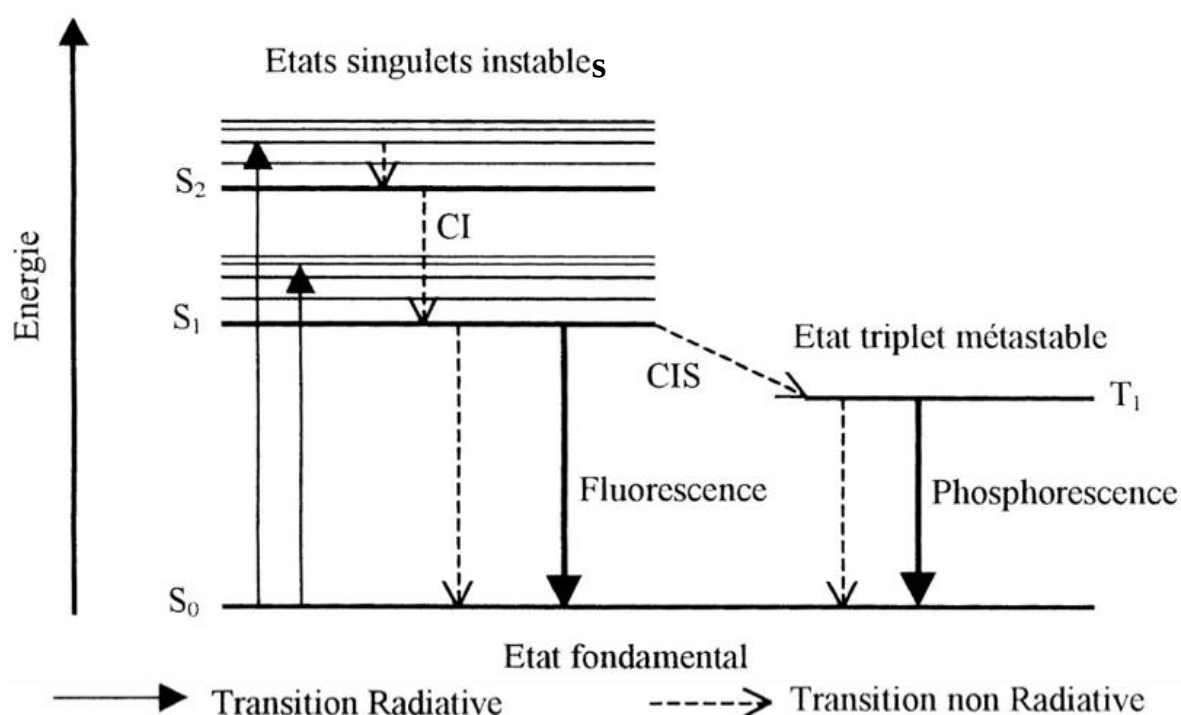


Figure 27. Diagramme de Jablonski ; S : états singulets instables ; T : état triplet métastable ; CI : conversion interne ; CIS : conversion inter-systèmes (d'après <http://www.ptibc-imaging.fr/notions-diverses/phenomene-de-fluorescence-diagramme-de-jablonsky/>).

Concernant les amyloïdoses, des études récentes ont montré une absorption de la lumière des fibres formées à partir d'A β ₁₋₄₀ et d' α -synucléine, autour de 360 nm, avec une émission de fluorescence autour de 440 nm²³⁹⁻²⁴¹. Cette émission a également été observée sous des formes monomériques, mais avec une intensité beaucoup plus faible. Ainsi, l'augmentation significative de l'intensité lumineuse, au voisinage de l'ultraviolet (UV-vis), des fibres amyloïdes vis-à-vis des monomères, permet de suivre l'agrégation des fibres amyloïdes²⁴⁰. Pourtant, même si ce phénomène est admis et semble offrir des perspectives intéressantes pour la recherche fondamentale, il est aujourd'hui encore mal compris, et ce dû à la diversité des processus proposés y conduisant²⁴¹⁻²⁴² : structuration des AAs aromatiques stabilisant un état triplet²⁴³, délocalisations de charges par les nombreuses liaisons hydrogènes formées autour des feuillets β ²⁴¹, confinement de l'eau au voisinage ou à l'intérieur des fibres²⁴⁴, etc. Quoi qu'il en soit, ces propriétés originales pourraient être utiles pour la détection des agrégats amyloïdes.

Le but de cette étude a été de mieux comprendre ces propriétés optiques, et nous avons étendu nos investigations sur l'ensemble du spectre visible. Pour cela, nous avons observé des coupes de tissus pathologiques de souris modèles de la MA, à différentes longueurs d'ondes d'excitations (λ_{ex}). Nous avons alors détecté plusieurs signaux fluorescents dus aux agrégats amyloïdes, que nous avons analysés par spectroscopie *in vitro*, sur des fibres formées à partir du peptide A β ₁₋₄₂, de la protéine Tau humaine (notée par la suite hTau), toutes deux associées à la MA, et à partir de la protéine α -synucléine, liée à la maladie de Parkinson. Les spectres d'absorption, d'excitation et d'émission entre 320 et 800 nm, ont été analysés et comparés pour affiner notre recherche de propriétés particulières. Cette étude a été prolongée, dans un second temps, sur un total de 12 fibres amyloïdes différentes. Par ailleurs, la formation des fibres amyloïdes a été suivie de la même manière que précédemment par DC et MET (**voir Annexe 1 & 6**).

II. Matériel et méthodes

Le matériel et méthodes de la partie Chapitre 4-III.1. est décrit dans l'article 3.

II.1. Formation des fibres amyloïdes

La formation des fibres amyloïdes d'IAPP sont décrites dans l'article 1, celles d'A β ₁₋₄₂ et de TTR-V30M dans l'article 2, celles d' α -synucléine et de hTau dans l'article 3.

Les fibres composées du peptide CSNNFGA ou du peptide HD-11, suivent respectivement les mêmes protocoles que ceux des fibres IAPP et A β ₁₋₄₂.

Les fibres d'insuline sont préparées à partir de lyophilisats (Sigma-Aldrich, # I6634), dans un tampon de réaction (acide acétique 20 %, chlorure de sodium NaCl 100 mM) à une concentration finale de 200 μ M à pH = 1.7, à 40 °C dans un volume de réaction d'1 mL pendant 24 h sur un agitateur rotatif (300 rpm).

L'albumine humaine lyophilisée (Sigma-Aldrich, #A3782) est utilisée pour former des fibres dans un tampon de réaction (Glycine 50 mM 88 mM NaCl) à 250 μ M et pH = 2.7, à 55 °C dans un volume réactionnel d'1 mL pendant 3 jours sur un agitateur rotatif (300 rpm).

Le lysozyme lyophilisé (Sigma-Aldrich, #629705GF) est préparée pour former des fibres dans un tampon de réaction (Glycine 50 mM 88 mM NaCl) à 1 mM et pH = 2.7, à 45 °C dans un volume réactionnel d'1 mL pendant 2 jours sur un agitateur rotatif (300 rpm), puis un choc thermique à 65 °C est effectué pendant 3 heures.

La β -lactoglobuline lyophilisée (Sigma-Aldrich, #7880) est préparée sous forme de fibres dans un tampon H₂O déionisé (pH = 2) à 2 mM, dans un volume réactionnel d'1 mL, à 65 °C pendant 15 jours, sans agitation.

Le peptide R₂T (séquence NNLAITVA) est préparé sous forme fibrillaire dans un tampon HEPES 10 mM à 50 μ M et pH = 7.4 dans un volume réactionnel de 1 mL, pendant 5 jours.

La protéine Het-s a été purifiée et produite selon des méthodes décrites précédemment dans la littérature⁷³. Les fibres de Het-s sont formées dans un tampon HCl 0.1 mM à 50 μ M et à pH = 4, pendant 5 jours. Les monomères/oligomères de Het-s sont formés dans un tampon d'Acide acétique 5 % à 50 μ M et à pH = 2.8.

Les fibres de Het-s ont été alignées selon la méthode décrite dans la littérature⁷³.

II.2. Mesures en temps résolu

Les mesures de luminescence basse résolution (spectres et temps de vie) ont été réalisées par Daniel Imbert de l'institut Nanosciences et Cryogénie, sur un spectromètre Fluorolog FL-32 modulaire de chez Spex-Jopin-Yvon-Horiba. Il est équipé d'un double monochromateur d'excitation (réseaux holographiques 1200 g.nm⁻¹ blasés à 300 nm) et d'un imageur iHR320 (réseaux holographiques 1200 g.nm⁻¹ blasés à 500 nm et 600 g.nm⁻¹ blasés à 1000 nm) couplé à un photomultiplicateur Hamamatsu R928P (300-850 nm) pour les mesures dans le spectre visible. Pour les mesures dans le domaine proche infrarouge, un second photomultiplicateur Hamamatsu R5509 (300-1700 nm) refroidi à 80 K (soit -193 °C) est utilisé en sortie de l'imageur par l'intermédiaire d'un deuxième canal de mesure. La source d'excitation est une lampe au xénon de 450 Watts, tous les spectres sont corrigés pour la détection et la réponse spectrale du spectrophotomètre (fonction instrumentale). Les temps de vie de phosphorescence ont été mesurés en temps résolu avec une lampe pulsée Xenon 450 Watts comme source d'excitation. Les valeurs données pour les temps de vie représentent la moyenne de trois expériences indépendantes, réalisées en mode phosphorescence en faisant varier le délai d'acquisition au maximum du spectre d'émission. La décroissance mono, bi ou tri-exponentielle est analysée avec Origin 7.0 et le programme Labview® 7. Les temps de vie courts sont obtenus en utilisant des sources nanoled 275, 350, 390 et 450 nm de HoribaScientific et couplées à un contrôleur de diode Jobin Yvon NL-C2 et un second contrôleur incluant une sortie SpectraLED. Les temps de vies sont la moyenne de 3 mesures indépendantes avec un Chi-square calculé inférieur à 2. Toutes les mesures sont effectuées en utilisant des tubes capillaires en quartz de 4 mm de diamètre avec pour support un dewar en quartz refroidi à l'azote liquide pour les mesures à basse température et en utilisant une sphère d'intégration modifiée pour les mesures à température ambiante.

La microscopie en temps résolu a été réalisée à Orsay, par Marcelina Cardoso Dos Santos de l'*Institute for Integrative Biology of the Cell* de l'Université Paris-Sud. Les images des coupes de cerveaux provenant des modèles murins de la MA et des fibres alignées de Hets ont été acquises en utilisant un microscope inversé à luminescence en temps résolu à champ large (Olympus IX71), couplé à un laser dans l'UV [$\lambda_{\text{ex}} = 349$ nm, 200 Hz, Nd:YLF (neodymium-doped yttrium lithium fluoride), Triton, Spectra-Physics] en configuration à épifluorescence pour l'excitation pulsée, et une caméra ICCD (PI-MAX3, Princeton Instruments) pour la détection. Le signal de phosphorescence est collecté avec un objectif h-NA (*high numeric aperture* = 1.35, UPLSAPO 60XO, Olympus). Tous les filtres ont été achetés chez Semrock Inc. Les paramètres d'acquisitions ont été réglés à l'aide du logiciel WinView, contrôlant la caméra : temps de délai 5 µsec, avec ouverture de 200 µsec ; ouverture/exposition 200/500 ; et un gain d'intensificateur à 100 V. Les images ont été traitées avec le logiciel Ivy (Quantitative Image Analysis, Institut Pasteur).

II.3. Mesures des effets NIR et UV-vis *in vitro*

Les mesures par spectroscopie sur le spectre visible, effectuées sur l'ensemble des fibres sont identiques à celles décrites dans l'article 3.

Concernant le suivi de cinétique fibrillaire, un volume de 4 mL de protéines d'insuline à 200 μM ont été divisées dans deux tubes de 2 mL, avec ou sans ajout de 30 μM de ThT. Le suivi spectroscopique a été réalisé pour suivre la cinétique de formation des fibres par l'évolution de fluorescence de la ThT ($\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 480 \text{ nm}$) et de l'effet NIR ($\lambda_{\text{ex}} = 640 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 696 \text{ nm}$), pendant 18 h sur un spectrophotomètre JASCO J-815, avec agitation (300 rpm) à 50 °C. La bande passante d'excitation est de 5 nm, celle d'émission de 10 nm, avec une réponse d'une seconde et une vitesse de scan de 100 nm/min.

II.4. Microscopie sur les fibres alignées

Les fibres alignées de Het-s ont été montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage Moewiol (Sigma-Aldrich #324590). Elles ont été observées avec différents filtres, avec une émission dans l'UV-vis ($\lambda_{\text{ex}} = 390 \pm 10 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \pm 50 \text{ nm}$), le vert ($\lambda_{\text{ex}} = 475 \pm 10 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \pm 50 \text{ nm}$), le rouge ($\lambda_{\text{ex}} = 545 \pm 25 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 605 \pm 70 \text{ nm}$), et le NIR ($\lambda_{\text{ex}} = 620 \pm 60 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 700 \pm 75 \text{ nm}$). Les images ont été prises sur un microscope Zeiss Axiovert 200 M, et analysées à l'aide du logiciel Carl Zeiss AxioVision et du logiciel Image J 1.50.

III. Résultats

Dans un premier temps, nous avons observé sur des tissus pathologiques de souris sans marquage, une luminescence due aux dépôts amyloïdes, à différentes longueurs d'ondes. Nous avons constaté ce phénomène lors de nos études du Chapitre 1 à 3, en observant un signal fluorescent dans les tissus pathologiques sans marquage. En ce sens, nous avons voulu mieux établir ces propriétés optiques, et tenter une étude représentative des fibres amyloïdes, par spectroscopie *in vitro*, sur de nombreuses protéines amyloïdes sous formes de fibres. Nous avons investigué l'ensemble du spectre visible, car il était intéressant, d'un point de vue médical, de voir si les fibres amyloïdes possédaient des propriétés inédites autour du rouge et du proche infra-rouge (ou NIR). Effectivement, les tissus biologiques absorbent principalement la lumière dans la région infra-rouge (au-dessus de 1 μm , via l'eau présente en abondance dans le corps), et autour du spectre visible (entre 350 et 600 nm, dû à l'hémoglobine et la mélanine). On constate en **Figure 28** que le rouge et le NIR (de 0.6 à 1.2 μm) sont peu absorbés : autrement dit, dans cette gamme de longueur d'onde (appelée aussi fenêtre diagnostique), des propriétés optiques des fibres pourraient être utiles pour la détection *in vivo* des amyloïdoses, car la lumière peut pénétrer à l'intérieur des tissus biologiques, et ce sur plusieurs millimètres²⁴⁵.

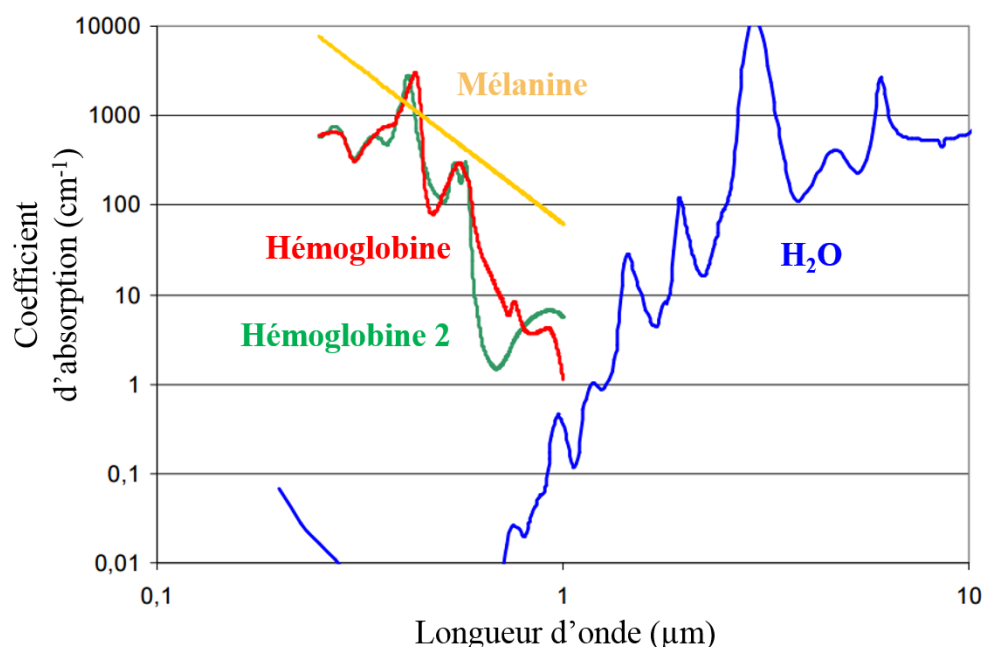


Figure 28. Représentation des principaux chromophores endogènes des tissus biologiques (d'après <http://omlc.org/spectra/index.html>).

De manière inattendue, les fibres amyloïdes émettent une luminescence particulière dans cette gamme de longueur d'onde. Comme ces effets sont, pour certains, inédits, il est important de noter que nous avons procédé par analogie pour l'interprétation de nos résultats,

en constatant notamment des similitudes avec les propriétés optiques inhérentes aux boîtes quantiques (ou *quantum dots*, semi-conducteurs utilisés dans les diodes électroluminescentes et les panneaux photovoltaïques).

Concernant l'étude *ex vivo*, une analyse par microscopie à fluorescence, avec différents filtres dans le spectre visible, a été réalisée sur des sections de cerveaux de souris avec des dépôts A β , sans aucun marquage préalable. Des analyses spectroscopiques ont été réalisées et comparées sur ces trois protéines amyloïdes, de leurs formes monomériques à leurs formes fibrillaires. Par la suite, diverses dépendances et tests ont été réalisés afin de mieux caractériser ces propriétés communes (température, concentration, délai après excitation, etc). Enfin, une étude systématique a été effectuée sur 12 modèles différents de fibres amyloïdes (caractérisées par MET, **Annexe 6**), afin de confirmer ces similitudes.

III.1. Mise en évidence des propriétés lumineuses

La microscopie à fluorescence sur les coupes de cerveaux révèle que les fibres amyloïdes émettent une luminescence plus ou moins intense, tout le long du spectre visible (Figure 1 de l'article 3). L'effet le plus important en intensité est observé dans l'UV-visible ($\lambda_{\text{ex}} = 390 \pm 10 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \pm 50 \text{ nm}$), avec une fluorescence bleue compacte au niveau du cœur des agrégats amyloïdes. A partir de la couleur verte jusqu'au NIR, l'émission observée est moins importante, et co-localise également avec les dépôts amyloïdes. Il est important de noter que l'ajout de ThS, masque complètement la fluorescence intrinsèque des fibres, observée vers le rouge ($\lambda_{\text{ex}} = 620 \pm 60 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 700 \pm 75 \text{ nm}$). Ce masquage est probablement dû à sa liaison à la surface des fibres amyloïdes¹⁴⁵. Ceci expliquerait pourquoi ces phénomènes ne sont pas remarqués dans les études classiques sur les fibres amyloïdes.

Cette constatation nous a amené à étudier les spectres d'excitation et d'émission des fibres d'A β_{1-42} sur l'ensemble du spectre visible de la lumière. Afin d'attribuer ces effets aux structures fibrillaires, nous les avons comparés aux formes monomériques. Ces analyses ont permis d'isoler quatre zones distinctes, dépendantes des λ_{ex} (Figure 2 de l'article 3) :

- i. **La zone $\lambda_{\text{ex}} = 320\text{-}420 \text{ nm}$ (notée zone UV-vis).** Elle correspond à l'effet déjà décrit partiellement dans la littérature²³⁹⁻²⁴¹. Cette luminescence est présente dans des états monomériques, mais augmente considérablement en intensité sous formes de fibres. De plus, on remarque que le pic d'émission (λ_{max}) augmente avec le décalage de λ_{ex} vers le rouge sous les deux formes.
- ii. **La zone $\lambda_{\text{ex}} = 440\text{-}500 \text{ nm}$.** Elle présente un λ_{max} relativement stable à 518 nm, sous forme de fibres ou de monomères. L'intensité de luminescence semble légèrement plus importante sous forme de monomères, tout en diminuant avec le déplacement de λ_{ex} vers le rouge.
- iii. **La zone $\lambda_{\text{ex}} = 520\text{-}580 \text{ nm}$.** Le λ_{max} est stable à 606 nm sous les deux formes, mais l'intensité est légèrement plus faible pour les fibres amyloïdes. Dans les deux cas, l'intensité diminue avec le déplacement d'excitation vers le rouge.
- iv. **La zone $\lambda_{\text{ex}} = 600\text{-}680 \text{ nm}$ (notée zone NIR).** Cette zone est celle qui montre les différences les plus marquées, car l'émission de luminescence est

seulement présente chez les fibres amyloïdes. De plus, le décalage vers le rouge entre le maximum d'excitation et le maximum d'émission associé (appelé déplacement de Stokes) est relativement constant (autour de 55 nm).

Nous nous sommes concentrés sur les zones UV-vis et NIR, présentant les différences les plus marquées et reproductibles. En opérant aux mêmes analyses spectroscopiques sur l' α -synucléine et hTau, les constatations sont identiques : les fibres amyloïdes possèdent des propriétés dans l'UV-vis par augmentation considérable de leur intensité lumineuse, mais également de manière inédite autour du NIR, avec l'apparition d'un signal caractéristique (Figure 3 de l'article 3).

Concernant la zone UV-vis, deux profils ont été identifiés : le premier où l'intensité de luminescence diminue avec le décalage vers le rouge, le second avec un maximum d'intensité à $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm, qui diminue jusqu'à $\lambda_{\text{ex}} = 420$ nm. Ces effets sont souvent attribués à la seule fluorescence des acides aminés aromatiques chez les protéines, mais ce n'est pas la seule explication, puisque des fibres formées de peptides sans AA aromatique possèdent cette propriété²⁴¹. D'ailleurs, ces deux profils optiques ont été observés au niveau de boîtes quantiques composées de carbone²⁴⁶⁻²⁴⁸, dus à des compositions en surface variées (charge des PEG de surface, richesse en groupes aminés, etc.). En se référant uniquement aux spectres d'absorbance des trois fibres amyloïdes, les propriétés dans l'UV-vis se confirment par un épaulement d'absorption autour de $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm.

Concernant la zone NIR, le plus impressionnant provient de l'absence totale de ce signal sous des formes non fibrillaires, et la stabilité de cet effet en termes de λ_{max} , d'une fibre amyloïde à une autre. Par exemple, on obtient $\lambda_{\text{max}} = 696$ nm pour les fibres d'A β_{1-42} , et $\lambda_{\text{max}} = 699$ nm pour les fibres d' α -synucléine et hTau, avec $\lambda_{\text{ex}} = 640$ nm. Cette propriété inédite dans la zone NIR est attribuée exclusivement aux fibres, puisqu'il disparaît lorsqu'on dénature ces structures. On peut également remarquer que les pertes d'énergie, de λ_{max} par rapport à λ_{ex} , dans le NIR sont très faibles et stables dans le NIR (< 0.2 eV), contrairement aux pertes enregistrées dans l'UV-vis.

On peut donc conclure que nous avons identifié deux propriétés optiques propres aux fibres amyloïdes, dans l'UV-vis et le NIR.

L'ensemble de ces résultats est détaillé dans l'article 3, en cours de soumission dans *Nature*, avec comité de lecture et de sélection.

Detection of amyloid deposits within the diagnostic window without labeling

Jonathan Pansieri¹, Christel Marquette¹, Vincent Forge¹

*Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, Université Grenoble Alpes, CEA Life Sciences Division, CNRS,
17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France*

An early diagnostic for Alzheimer and Parkinson diseases is needed not only for a better medical care but also for the development of new therapies¹. Nowadays, indeed, no unambiguous early diagnostic is available and this impairs for instance the establishment of clearly defined patient pools for clinical trials. The early diagnostic is based on the detection of mild cognitive impairment (MCI). However, MCIs can be due to several other reasons than the development of the Alzheimer or Parkinson diseases. As a consequence, biomarkers are sought to complete the diagnostic and targeting the amyloid deposits seems to be promising for that purpose^{1,2}. Alzheimer and Parkinson diseases are associated to the accumulation of A β , tau and α -synuclein, within either intra or extra cellular deposits, depending on the protein and the stage of the disorder²⁻⁴. Here we show that amyloid deposits can be detected within the diagnostic window⁵⁻⁷, i.e. in the near infrared (NIR), without labeling. Indeed, amyloid deposits can be detected on brain sections of “Alzheimer” (AD) mice without staining by fluorescence microscopy on the UV/Vis/NIR ranges. This observation can be related to optical properties of amyloid fibers prepared *in vitro*, which show luminescence on these various wavelength ranges depending on the excitation light. These optical properties must be related to the generic structure of amyloid fibers: high aspect-ratio structures due to the stacking of β -sheets stabilized by a dense network of H-bonds⁸⁻¹⁰. The near infrared luminescence is particularly promising for a new and non-invasive diagnostic approach for the age related neurodegenerative disorders.

Brain sections of old AD mice (18 months), expressing human A β together with presenilin 1, display several features within the cortex area that can be observed without staining by fluorescence microscopy (Fig. 1), while nothing noticeable can be seen by transmission (Fig. 1A). These objects are not seen on brain section of middle age control mice (Extended data Fig. 1). Two different patterns can be distinguished: sharp spots and much

broader stains with a dense center and a more diffuse periphery. The last pattern is typical of amyloid deposits^{11,12}. They show luminescence all over the visible light, up to the near infrared, depending on the excitation wavelength. The most intense signal is a blue luminescence upon an excitation in the near UV (Fig. 1B). Green (Fig. 1C), red (Fig. 1D) and near infrared (Fig. 1E) signals are also detected. These signals are likely to be due to the amyloid deposits that can be detected within the cortex area of these AD mice upon Thioflavin S labeling (Extended data Fig. 2). The nature of the sharper spots is uncertain, maybe some cellular debris due to the age of mice. One can notice that they are barely detectable in the blue range, suggesting a nature different from amyloid deposits.

All of these optical features observed on AD mice brain sections can be related to optical properties of amyloid fibers prepared *in vitro* with the A β ₁₋₄₂ peptide (Fig. 2). In the range corresponding to the “blue” filter, upon excitation around 360 nm, an intense blue luminescence (with a maximum around 440 nm) is detected. A green luminescence is also detected in the range corresponding to the “green” filter, with a maximum of emission around 515 nm (with an excitation around 480 nm). A red luminescence is detected at 610 nm, when excited around 560 nm (“red” filter range). At last, but not the least, luminescence in the near infrared is detected upon excitation above 600 nm; the position of the emitted light being highly sensitive to the excitation wavelength. When the spectral properties of the amyloid are compared to those of the monomer (Fig. 2; dashed lines), it appears that depending on the wavelength range the signal of amyloid fibers is not systematically higher. It is even lower in the green and red range. The fact that the amyloid deposits are detectable in these color ranges shows that the brightness due to the accumulation of the peptides within the deposits is an important factor for their detection within biological samples. From now we will focus on the signals highlighted upon fibril formation, i.e. blue and NIR luminescence, and the *in vitro* characterization will be extended to other proteins involved in amyloid deposits related to neurodegenerative diseases: tau and α -synuclein²⁻⁴.

All of the three proteins form amyloid fibers *in vitro* (Fig. 3A-C), and this is correlated with an enhancement of the blue luminescence and the appearance of a signal in the near infrared (Fig. 3). The observation of a blue luminescence in relation with the formation of amyloid fibers has been already reported *in vitro*¹³⁻¹⁷. This luminescence has been observed also with the microbial pili system known to form amyloid fibers¹⁸. The phenomenon at the origin of this luminescence is not established yet, and several explanations, such as quantum confinement¹⁹ or generation of aromatics due to light induced chemical reactions¹⁴, have been

proposed. As the luminescence is also observed in the absence of aromatic sidechain, it has been proposed that charge delocalization within the H-bond network that stabilizes the fibers could be responsible for this blue luminescence^{20,21}. Interestingly, the position of the luminescence peak shifts with the excitation wavelength. This effect, so-called the giant red-edge effect (GRS), is commonly observed with carbon quantum dots (CQD) and is related to environment effects on the charge delocalization at the origin of the luminescence²²⁻²⁴. In the case of amyloid fibers, beside solvent influence, the local environment depends on the chemical functions present on the surface, therefore on the amino acid content of the protein. As a consequence, the evolution of the blue luminescence with the excitation wavelength differs depending on the protein (Fig. 3D-F).

The proteins used for this work contain aromatic amino acids such as tryptophans, as a consequence a contribution of their triplet states to the blue luminescence cannot be excluded. Indeed, the splitting of singlet and triplet energy levels has been described when chromophores are confined into aggregates²⁵. Such phenomenon could be at the origin of the luminescence shift with the excitation wavelength through the selection of transitions by the incident energy. This could be also the reason for the decrease of the energy changes calculated from the Stokes shift (Extended data Fig. 3 A&B). As the incident energy decreases (red shift of the excitation), the most excited states are not reached anymore and this limits the energy lost (Stokes shift) before relaxation toward the basal state. Interestingly, the energy change reaches a minimum around 400 meV (Extended data Fig. 3 A), which must correspond to the smallest energy gap between excited singlet states and triplet states. Such confinement of chromophores into aggregates can also induce the increase triplet state occupancy²⁵⁻²⁷ and, as a consequence, the blue luminescence intensity when tryptophans are present. At last, tryptophan's triplet states can provide contributions also in the green and red ranges^{28,29}.

The intrinsic near infrared luminescence of amyloid fibers is of high interest because it is within the so-called “diagnostic windows”, particularly propitious to the use of fluorescence imaging to monitor biological functions/dysfunctions within tissues⁵⁻⁷. This signal seems specific to the amyloid fiber structure, since it is not observed in the case of the monomeric proteins, at the exception of tau which shows a weak signal before the fiber formation (Fig. 3I). The origins of this luminescence are unknown at that stage. One can notice that, upon ThS labeling (Extended data Fig. 2), the NIR luminescence is not detected anymore, suggesting that the binding of Thioflavin interferes with this luminescence. Several explanations can be envisaged such as further splitting of the singlet-triplet energy levels due to particular

confinement within the fibers for instance. This luminescence is also present within amyloid fibers which do not contain aromatic side chains (data not shown). As a consequence, it is also possible that it is related to charge delocalization within the hydrogen bonds, as proposed already for the blue luminescence²¹. The NIR luminescence peak is highly sensitive to the excitation wavelength within the range investigated here: 620-680 nm. It shifts continuously with a constant Stokes shift around 50 nm (Extended data Fig. 3B); the corresponding energy loss is constant on the investigated wavelength range and quite small: around 150 meV (Extended data Fig. 3C). It is notable, that the Stokes shift of this luminescence, which can be directly related to the amyloid structure, does not depend on the aspect of the amyloid fibers. Indeed, the three proteins investigated here form quite different amyloid fibers according to the electron microscopy clichés (Fig. 3A-C), and the only noticeable difference is that the NIR luminescence reaches its maximum at different excitation wavelength (Extended data Fig. 4). The NIR luminescence intensity, as the blue one, is proportional to the protein concentration within the investigated concentration range: 0 – 100 μ M (Extended data Fig. 3D), showing that this signal is not due to light scattering. Moreover, excitation spectra possess a well define maximum and their position shift with the emission wavelength (Extended data Fig. 4). Altogether, these observations confirm that the NIR luminescence is due to energy transitions within the amyloid fibers.

In conclusion, despite the fact that the physical phenomenon at their origin are mostly unknown and will require special attention, the optical properties of amyloid fibers are of high interest. In particular, the NIR luminescence that can be directly related to the amyloid structure can be used to monitor amyloid fiber formation both *in vitro* (Extended data Fig. 4D) and *in vivo*. Considering the need for complimentary diagnostic tools for neurodegenerative diseases, this is of particularly high interest because this luminescence is within the diagnostic window. We think that this possibility to detect amyloid deposits by taking advantage of their intrinsic optical properties must be explored. Moreover, the approach suggested here for Alzheimer and Parkinson diseases could be extended to other amyloidosis, since these optical properties are shared by all amyloid fibers.

Material and methods

Fibril growth formation

A β ₁₋₄₂ fibril were formed with lyophilized A β ₁₋₄₂ (Genecust, Luxembourg), controlled at 100 μ M as previously described³⁰.

Fibrils of α -synuclein were formed using lyophilized α -synuclein (gift of M. Dumoulin, Belgium), at 51 μ M in reaction buffer (10 mM NaP, 100 mM NaCl with 0.1% NaN₃, pH = 7.5), during 5 days.

Proteins of hTau were produced using transformed Escherichia coli (BL21 DE3) harboring full-length cDNA encoding for htau40 protein isoform (gift of INSERM UMR 788 - CHU de Bicêtre France) following the procedure described by Goedert et al. (Goedert et al., 1990). After being collected by centrifugation (2500 g for 20 min at 4°C), the cells were suspended in 10 mL of lysis buffer (50 mM PIPES pH 6.8, 50 mM NaCl, 1 mM EGTA, 5 mM DTT, 0.1 mM PMSF) and sonicated on ice (10 times for 20 s, 50 W power). The homogenate was clarified by centrifugation (19000 g for 20 min at 4°C), and the lysate was filtered through successive 0.45 μ m and a 20 μ m membrane filter before injection on column. Purification of the lysate was performed as described by Csokoda et al. (Csokoda et al., 2004) by both cation-exchange and size-exclusion chromatography. Proteins of hTau containing fractions were pooled, submitted to dialysis against 2x2 L of 10 mM ammonium acetate (6 h at 4°C under stirring) and lyophilized. Lyophilized hTau40 was dissolved at 110 μ M, in MOPS buffer (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid), 20mM pH 7.4. The fibrils were prepared in MOPS by adding heparin to hTau40 monomers (molar ratio 1:4.4) at 310°K in a 600 μ L reaction volume on a rotating shaker (300rpm), pH 7.4 for 72 hours. Heparin (average molecular mass of 7 kDa), sodium chloride (NaCl, >99.5%), sodium hydroxide (NaOH, 99.99%), 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS, >99.5%) and 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES, 99.5%), were purchased from Sigma-Aldrich (France). Potassium chloride (KCl, 99.5%) was purchased from SDS Carlo Erba (France).

All fibrils morphologies were confirmed using Transmission Electronic Microscopy (TEM) analysis (performed on a Tecnai 12).

Microscopy on Alzheimer's mice model

Brain sections of APP^{swe}/PSEN1^{dE9} mice model (kindly provided by B.Larrat, Saclay, France) with Alzheimer's disease, aged 18 months, and were mounted on slice without labelling. These models were previously described in the literature³¹, as standard practice to do brain sections. Intrinsic fluorescence properties were recorded with a Zeiss microscope Axiovert 200 M, at various wavelength, with emission in blue ($\lambda_{\text{ex}} = 390 \pm 10$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 460 \pm 50$ nm), green ($\lambda_{\text{ex}} = 475 \pm 10$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 530 \pm 50$ nm), red ($\lambda_{\text{ex}} = 545 \pm 25$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 605 \pm 70$ nm) and in NIR with false yellow color ($\lambda_{\text{ex}} = 620 \pm 60$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 700 \pm 75$ nm). Images were analysed with Carl Zeiss software and Image I 1.50 software. As control, brain sections from C57/Bl6 mice were used from 12 months.

Fluorescence spectroscopy

Measurements were carried out on a JASCO FP-8500 spectrofluorometer, for A β ₁₋₄₂, hTau and α -synuclein monomers and fibrils. Each spectrum was recorded with no filter, in a 1 cm path length quartz cell, with a response time of 1 sec, an excitation bandwidth of 5 nm and an emission bandwidth of 10 nm. Emission spectra of amyloid fibrils (or in monomer form) were recorded each 20 nm, between 340-380 nm, 340-440 nm, 440-480 nm, 520-560 nm, 640-680 nm, or each 10 nm, at 620-680 nm. Emission spectra of A β ₁₋₄₂ fibrils, with 1.8 % HFIP were recorded during 120 min at $\lambda_{\text{ex}} = 640$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 695$ nm, with same parameters. Excitation spectra of A β ₁₋₄₂ and α -synuclein fibrils were recorded at emission peak for $\lambda_{\text{ex}} = 620-680$ nm each 20 nm, with same parameters. Absorption spectra were analysed with a JASCO J-815 CD-spectrophotometer, using a 1 cm path length quartz cell, with a response time of 1 sec, a bandwidth of 4 nm, each 1 nm between 250 and 700 nm.

Acknowledgments

This work used the platforms of the Grenoble Instruct centre (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). We thank Mrs FENEL Daphna, Dr MORISCOT Christine and Dr SCHOEHN Guy, from the Electron Microscopy platform of the Integrated Structural Biology of Grenoble (ISBG, UMI3265).

References:

- Cummings, J.L., Doody, R. & Clark, C. Disease-modifying therapies for Alzheimer disease: challenges to early intervention. *Neurology* **69**, 1622-1634 (2007)
- Kovacs, G.G. Molecular Pathological Classification of Neurodegenerative Diseases: Turning towards Precision Medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 189 (2016)
- Jucker, M. & Walker, L. C. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *nature* **501**, 45-51 (2013)
- Goedert, M. NEURODEGENERATION. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A β , tau, and α -synuclein. *Science* **349**, 601 (2015)
- Aswathy, R.G., Yoshida, Y., Maekawa, T. & Kumar, D.S. Near-infrared quantum dots for deep tissue imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 1417-1435 (2010)
- Altinoğlu, E.I. & Adair, J.H. Near infrared imaging with nanoparticles. *Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2**, 461-477 (2010)
- Hilderbrand, S.A. & Weissleder, R. Near-infrared fluorescence: application to in vivo molecular imaging. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 71-79 (2010)
- Eisenberg, D. & Jucker, M. The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell* **148**, 1188-1203 (2012)
- Knowles, T. P., Vendruscolo, M. & Dobson, C. M. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **15**, 384-396 (2014)
- Doussineau, T. *et al.* Mass Determination of Entire Amyloid Fibrils by Using Mass Spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **55**, 2340-2344 (2016)
- Kuo, Y. M. *et al.* Comparative analysis of amyloid-beta chemical structure and amyloid plaque morphology of transgenic mouse and Alzheimer's disease brains. *J. Biol. Chem.* **276**, 12991-12998 (2001)
- Matsuoka, Y. *et al.* Inflammatory responses to amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **158**, 1345-1354 (2001)
- Del Mercato, L. L. *et al.* Charge transport and intrinsic fluorescence in amyloid-like fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **104**, 18019-18024 (2007)
- Tcherkasskaya, O. Photo-activity induced by amyloidogenesis. *Protein Sci.* **16**, 561-571 (2007)
- Sharpe, S., Simonetti, K., Yau, J. & Walsh, P. Solid-State NMR Characterization of Autofluorescent Fibrils Formed by the Elastin-Derived Peptide GVGAGVG. *Biomacromolecules* **12**, 1546-1555 (2011)
- Chan, F. T. *et al.* Protein amyloids develop an intrinsic fluorescence signature during aggregation. *Analyst.* **138**, 2156-2162 (2013)
- Pinotsi, D., Buell, A. K., Dobson, C. M., Kaminski Schierle, G. S. & Kaminski, C. F. A label-free, quantitative assay of amyloid fibril growth based on intrinsic fluorescence. *ChemBiochem.* **14**, 846-850 (2013)
- Zhong, C. *et al.* Strong underwater adhesives made by self-assembling multi-protein nanofibres. *Nat. Nanotechnol.* **9**, 858-866 (2014)
- Handelman, A., Beker, P., Amdursky, N. & Rosenman, G. Physics and engineering of peptide supramolecular nanostructures. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 6391-6408 (2012)
- Shukla, A. *et al.* A novel UV laser-induced visible blue radiation from protein crystals and aggregates: scattering artifacts or fluorescence transitions of peptide electrons delocalized through hydrogen bonding? *Archives of Biochemistry and Biophysics* **428**, 144-153 (2004)
- Pinotsi, D. *et al.* Proton Transfer and Structure-Specific Fluorescence in Hydrogen Bond-Rich Protein Structures. *Journal of the American Chemical Society* **138**, 3046-3057 (2016)
- Cushing, S. K., Li, M., Huang, F. & Wu, N. Origin of Strong Excitation Wavelength Dependent Fluorescence of Graphene Oxide. *ACS Nano* **8**, 1002-1013 (2014)
- Khan, S., Gupta, A., Verma, N. C. & Nandi, C. K. Time-Resolved Emission Reveals Ensemble of Emissive States as the Origin of Multicolor Fluorescence in Carbon Dots. *Nano Letters* **15**, 8300-8305 (2015)
- Sciortino, A. *et al.* Solvatochromism Unravels the Emission Mechanism of Carbon Nanodots. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **7**, 3419-3423 (2016)
- Scholes, G. D. & Rumbles, G. Excitons in nanoscale systems. *Nat. Mater.* **5**, 683-696 (2006)
- Sung, J., Kim, P., Fimmel, B., Würthner, F. & Kim, D. Direct observation of ultrafast coherent exciton dynamics in helical π -stacks of self-assembled perylene bisimides. *Nat. Commun.* **6**, 8646 (2015)
- An, Z. *et al.* Stabilizing triplet excited states for ultralong organic phosphorescence. *Nat. Mater.* **14**, 685-690 (2015)
- Song, P.-S. & Kurtin, W. E. Photochemistry of the model phototropic system involving flavines and indoles. III. A spectroscopic study of the polarized luminescence of indoles. *Journal of the American Chemical Society* **91**, 4892-4906 (1969)
- Bent, D. V. & Hayon, E. Excited state chemistry of aromatic amino acids and related peptides. III. Tryptophan. *Journal of the American Chemical Society* **97**, 2612-2619 (1975)
- Pansieri, J. *et al.* Gd-nanoparticles functionalization with specific peptides for β -amyloid plaques targeting. *Journal of Nanobiotechnology* **14**, 60 (2016).
- Borchelt, D. R. *et al.* A vector for expressing foreign genes in the brains and hearts of transgenic mice. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* **13**, 159-163 (1996).

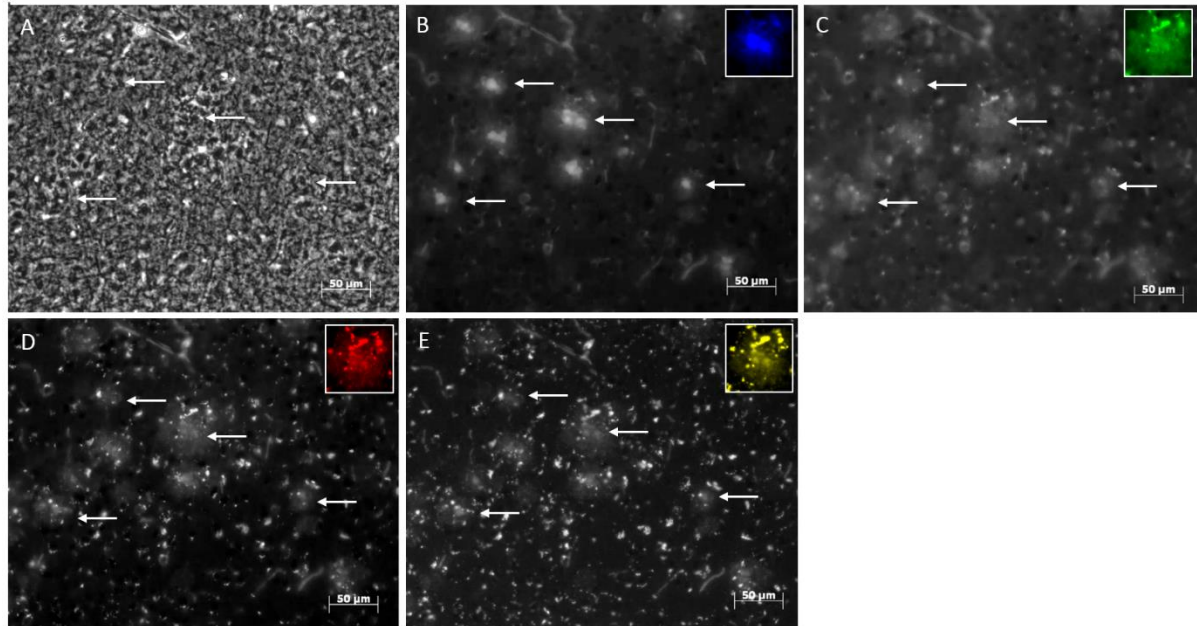
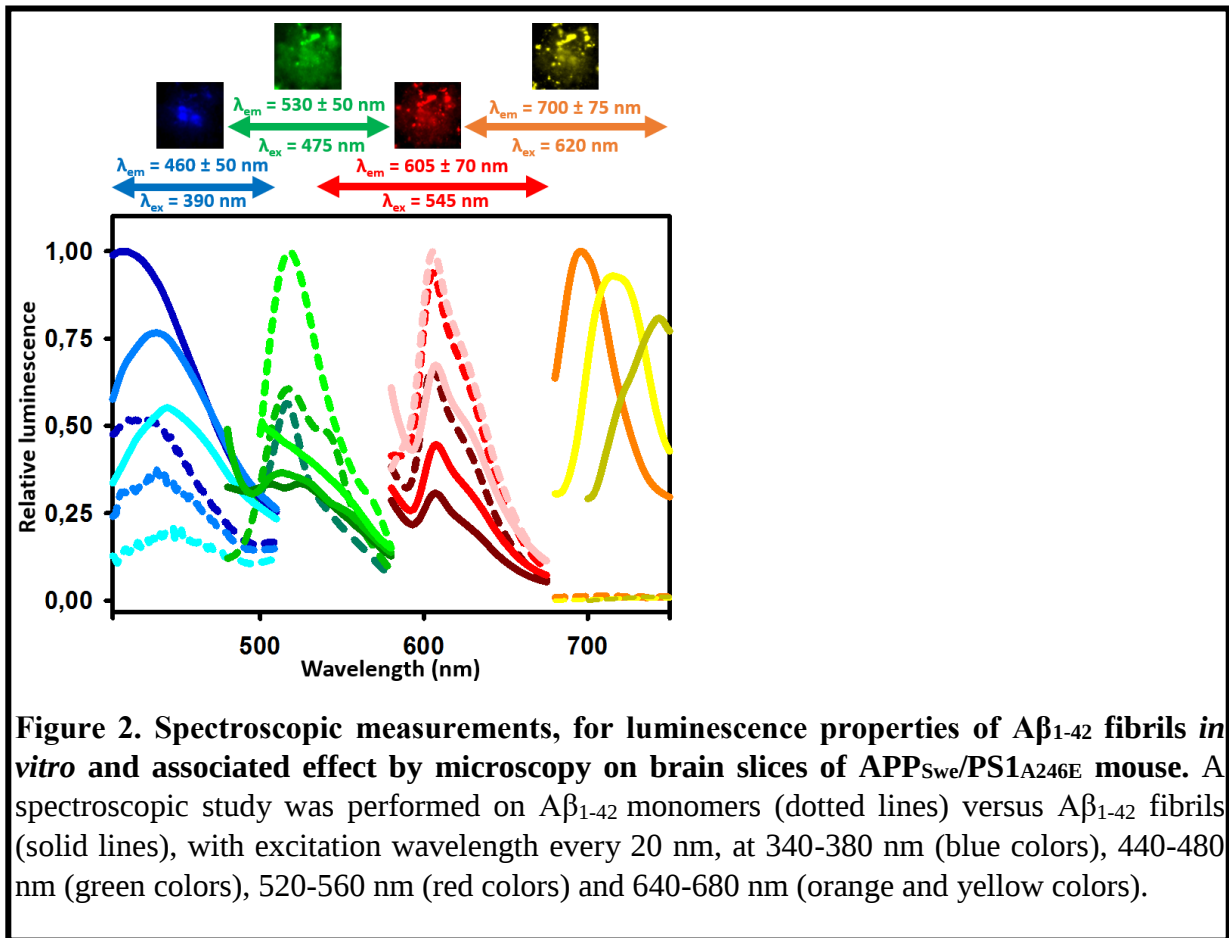
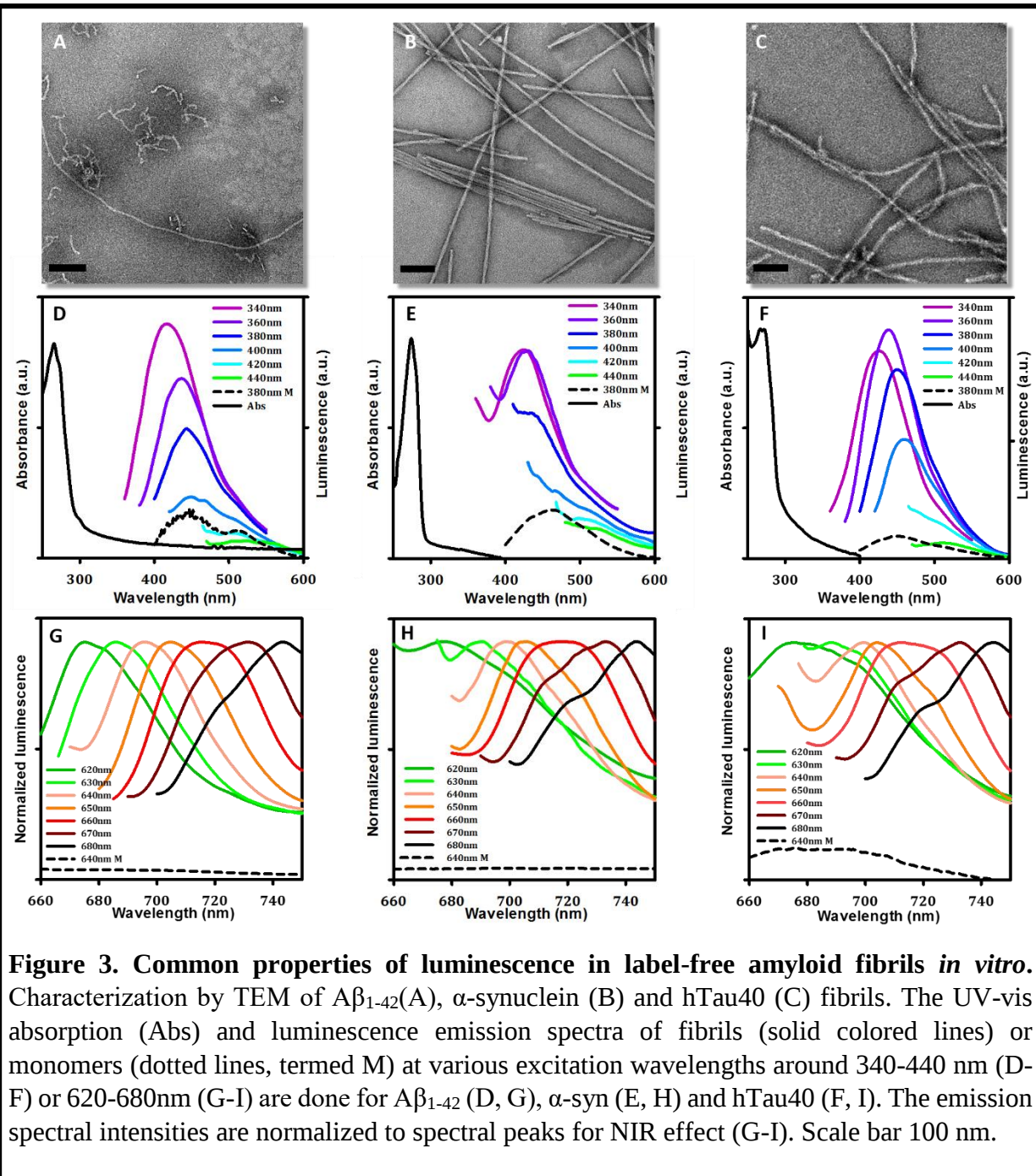
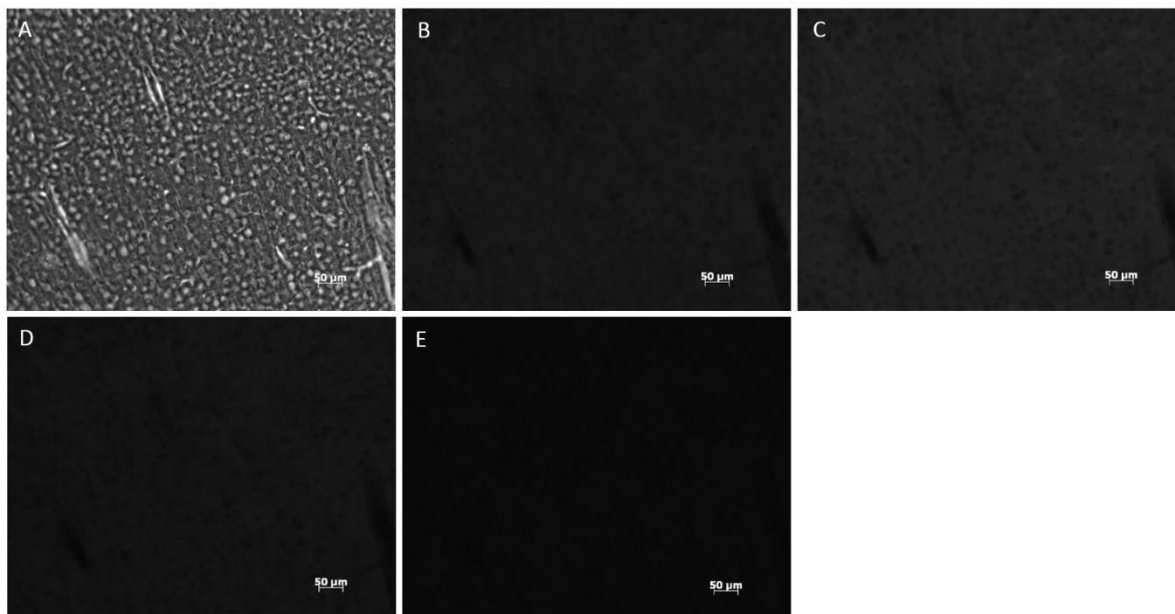


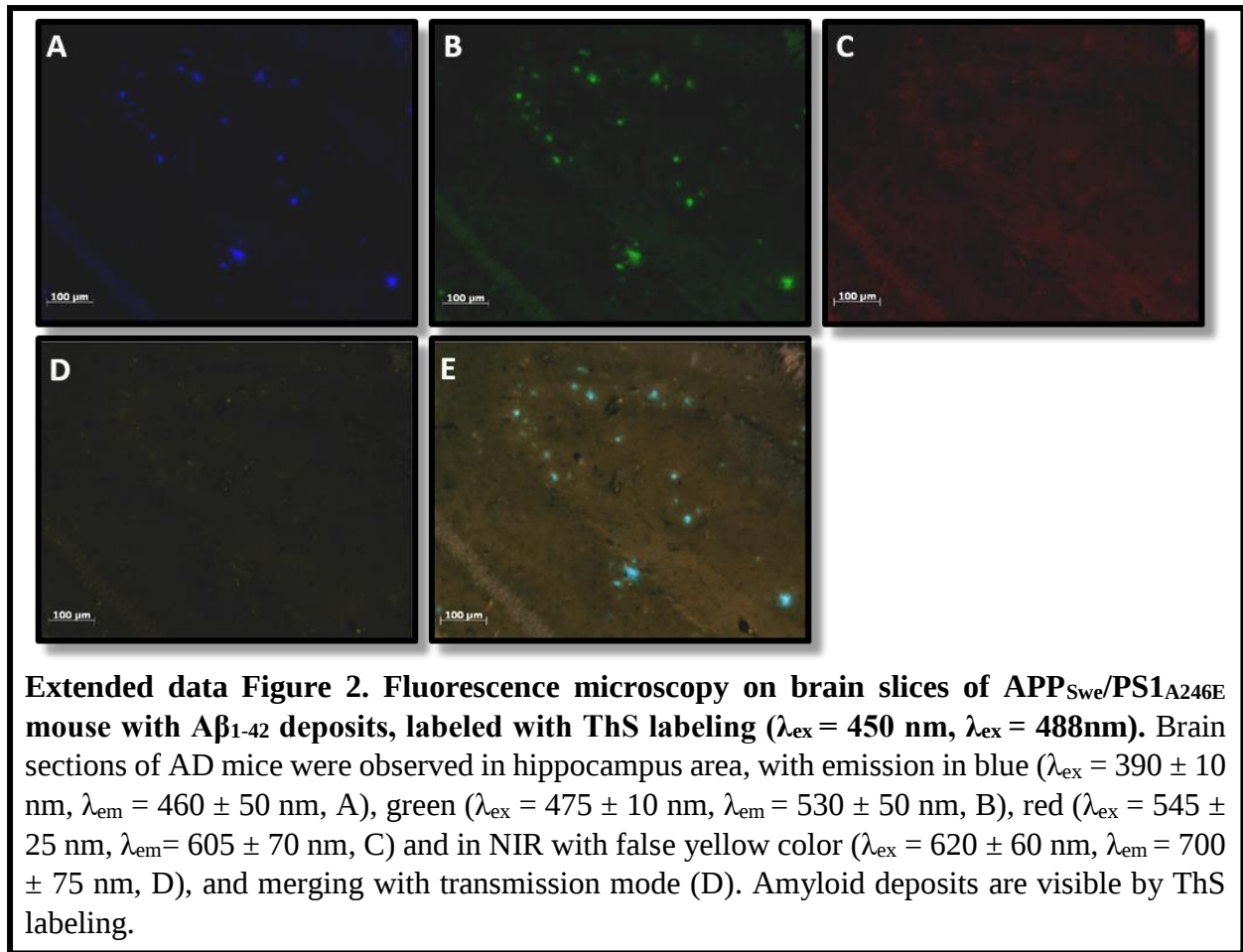
Figure 1. Fluorescence microscopy of A β amyloid deposits *ex vivo* on brain slices of APP_{Swe}/PS1_{A246E} mouse. Brain sections of AD mice were observed in cortex area, in transmission mode (A), with emission in blue ($\lambda_{\text{ex}} = 390 \pm 10$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 460 \pm 50$ nm, B), green ($\lambda_{\text{ex}} = 475 \pm 10$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 530 \pm 50$ nm, C), red ($\lambda_{\text{ex}} = 545 \pm 25$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 605 \pm 70$ nm, D) and in NIR with false yellow color ($\lambda_{\text{ex}} = 620 \pm 60$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 700 \pm 75$ nm, E). Amyloid deposits are visible by fluorescence without extrinsic fluorophores (arrows).

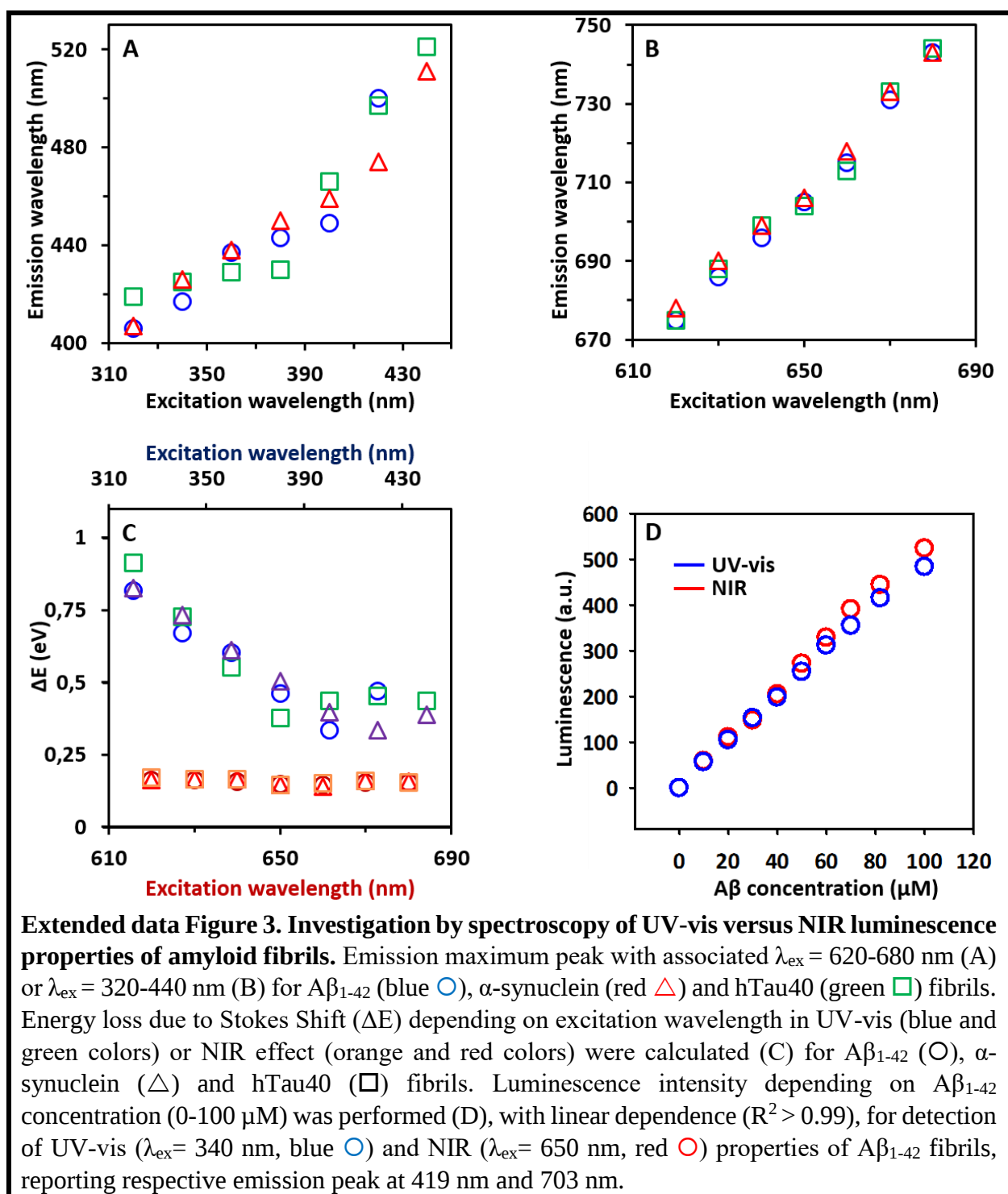


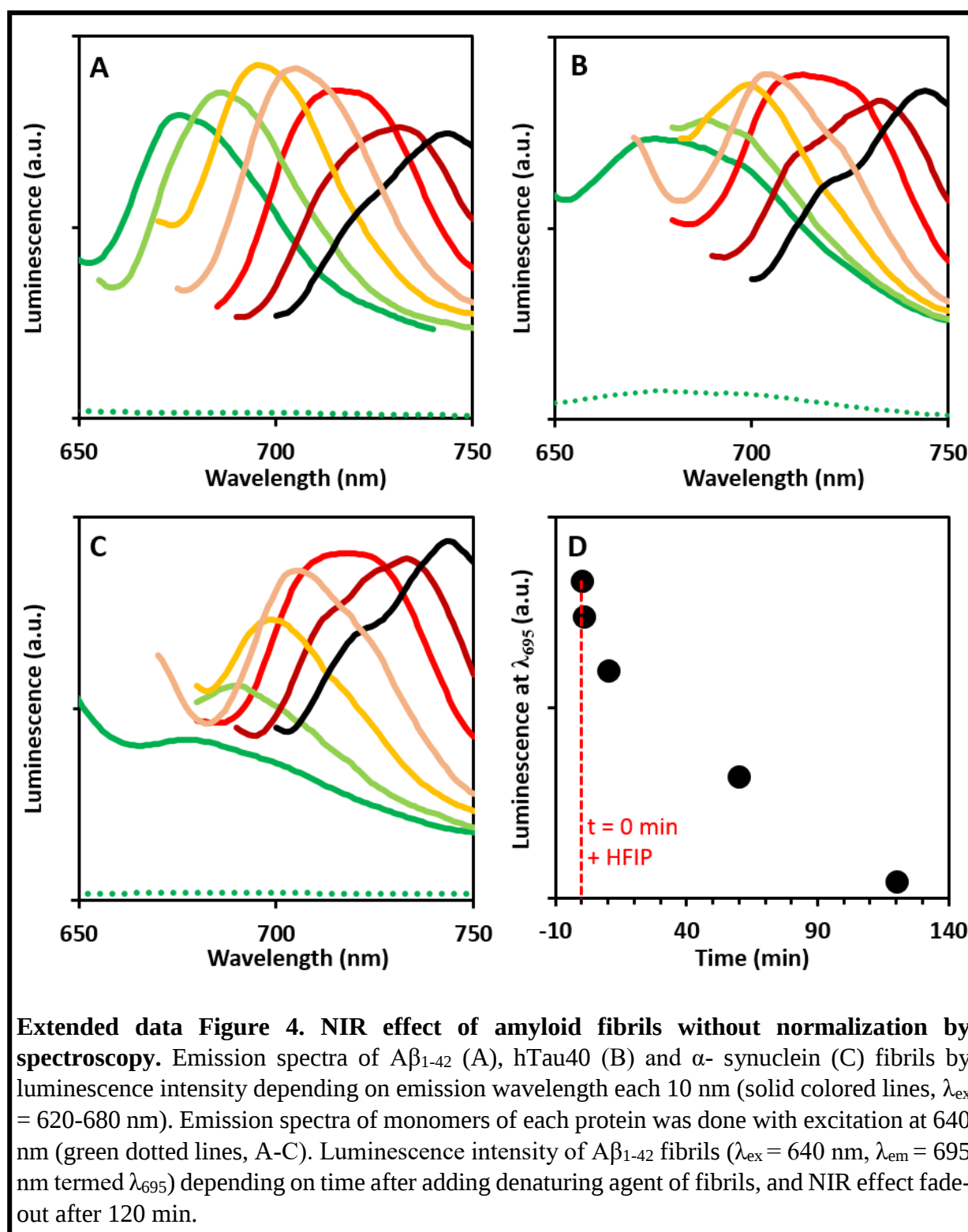


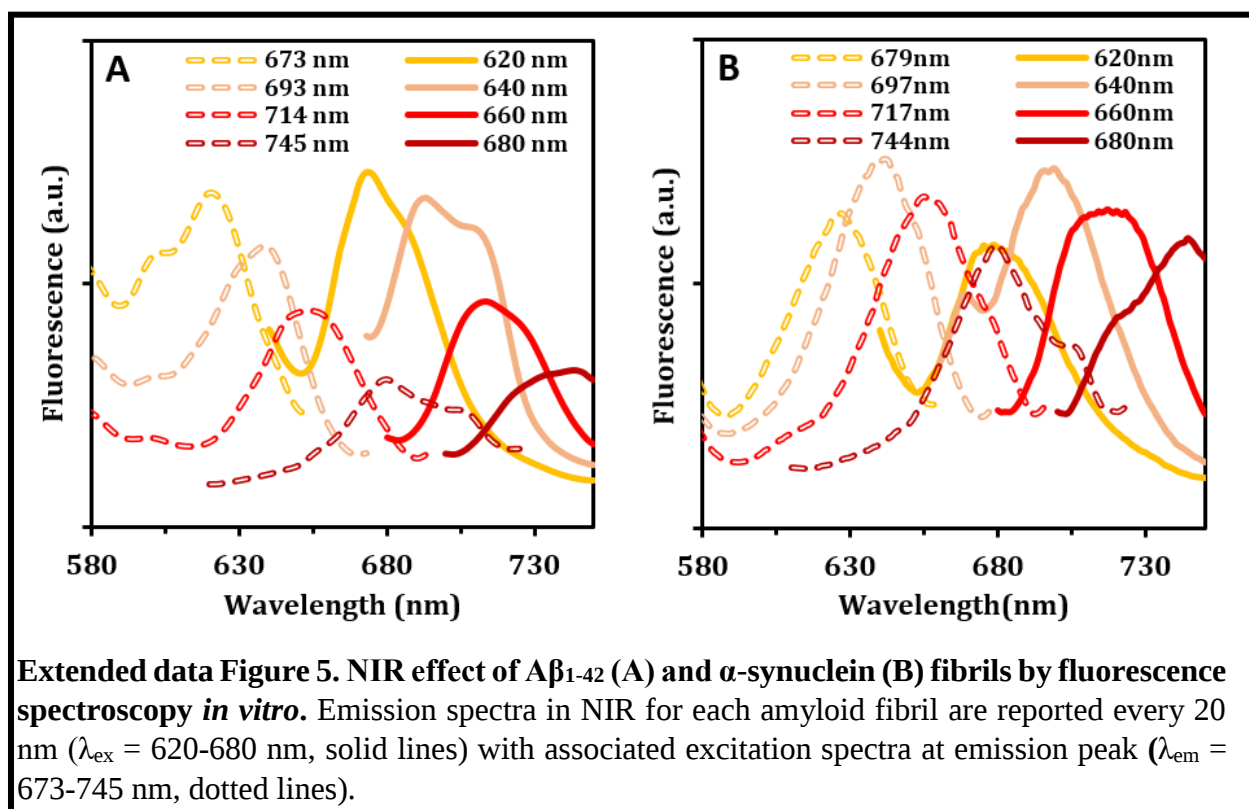


Extended data Figure 1. Fluorescence microscopy *ex vivo* on brain slices of control mouse without A β aggregates. Brain sections were observed in cortex area, in transmission mode (A), with emission in blue ($\lambda_{\text{ex}} = 390 \pm 10$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 460 \pm 50$ nm, B), green ($\lambda_{\text{ex}} = 475 \pm 10$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 530 \pm 50$ nm, C), red ($\lambda_{\text{ex}} = 545 \pm 25$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 605 \pm 70$ nm, D) and in NIR with false yellow color ($\lambda_{\text{ex}} = 620 \pm 60$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 700 \pm 75$ nm, E).









III.2. Résultats complémentaires

D'autres analyses ont été menées, afin de confirmer nos hypothèses. Nous avons donc utilisé neuf fibres amyloïdes supplémentaires étudiées dans les zones optiques d'intérêts, par des mesures de spectroscopie identiques aux précédentes (voir matériel et méthodes de l'article 3). Des analyses en temps résolu ont été effectuées (spectroscopie, microscopie) et des cinétiques de formation fibrillaire ont également été réalisées.

III.2.1. Effet dans l'UV-vis

Outre l'augmentation d'intensité lumineuse dans le bleu, pour chaque protéine amyloïde testée (de 1.5 à 36 fois plus pour les fibres par rapport aux monomères, **Table 4**), on a remarqué que certaines d'entre elles ne présentent que peu d'AAs aromatiques, et notamment aucun tryptophane, principal responsable en général de la fluorescence des protéines²⁴⁹. Paradoxalement, il semble même que les fibres amyloïdes avec le moins d'AAs aromatiques, aient une intensité de fluorescence plus importante par rapport à leurs formes monomériques. On en déduit donc que les propriétés de luminescences dans le bleu des fibres amyloïdes ne sont pas dues exclusivement à leurs compositions en AA aromatiques et que d'autres phénomènes interviennent.

	Intensité $\lambda_{\max}$ des fibres / $\lambda_{\max}$ des monomères	AA aromatiques		
		Tryptophane	Tyrosine	Phénylalanine
Insuline	x 36	0	3	3
Het-s	x 7.8	1	1	1
hTau	x 6.2	0	1	1
β-lactoglobuline	x 3.5	2	4	3
α-synucléine	x 3.5	0	4	2
TTR-V30M	x 3	2	5	4
Lysozyme	x 2.8	6	3	3
IAPP	x 2.6	0	1	2
Aβ₁₋₄₂	x 1.5	0	1	3
SAH	x 1.1	3	21	30

Table 4. Propriétés dans l'UV-vis des fibres amyloïdes. Rapport d'intensité de luminescence, dans la zone UV-vis ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$) des fibres amyloïdes par rapport aux monomères et compositions en AA aromatiques associées.

Dans un second temps, nous avons voulu caractériser le temps de vie, à l'état excité, des fibres amyloïdes, *via* leurs AAs aromatiques. En se référant au diagramme de Jablonski (voir Chapitre 4-I.), cela nous permet de déterminer si les fibres amyloïdes ont des propriétés fluorescences (état dit singulet instable, temps de vie de 10^{-10} à 10^{-7} sec) ou phosphorescentes (état dit triplet métastable, temps de vie de 10^{-6} à 1 sec). Des études préliminaires, par spectroscopie en temps résolu, ont été réalisées *in vitro* sur des fibres de lysozyme, en récupérant les signaux luminescents pendant l'excitation (sans délai) ou en arrêtant la source lumineuse et en regardant avec un temps de retard, après la fin de l'excitation (avec délai), à $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm, maximum d'excitation des AAs aromatiques. Contrairement à ce qui a été établi dans la littérature (avec des temps de vie ne dépassant pas les 10^{-9} sec pour les fibres de lysozyme²⁴⁰), un signal phosphorescent probablement dû à un état triplet métastable, est obtenu avec un délai de 5.10^{-5} sec ($\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm et $\lambda_{\text{max}} = 400$ nm, **Figure 29a**).

On remarque également vers le bleu un autre pic d'émission ($\lambda_{\text{max}} = 350$ nm) sans délai, probablement dû à un état singulet instable, qui disparaît logiquement lorsque l'on éteint la source lumineuse (avec délai).

Par la suite, ces propriétés phosphorescentes ont été confirmées sur des fibres amyloïdes Het-s alignées en grand nombre (alignement effectué par Anaëlle Rongier du Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux de Grenoble, selon une méthode déjà décrite dans la littérature^{73,250}), mais également par des analyses *ex vivo* par microscopie en temps résolu, au niveau de plaques séniles sur des coupes de cerveaux de souris modèles de la MA. En effet, avec un délai de 5.10^{-6} sec, on observe respectivement une luminescence propre aux fibres de Het-s (**Figure 29b**), et propre aux plaques séniles (**Figure 29c-d**).

Dans un futur proche, il semble donc important de confirmer ou d'infirmer l'implication des AAs aromatiques dans la phosphorescence des fibres amyloïdes. La détermination des temps de vie des états excités des fibres amyloïdes, formées à partir de protéines avec ou sans AAs aromatiques, fait partie des analyses à effectuer à court terme.

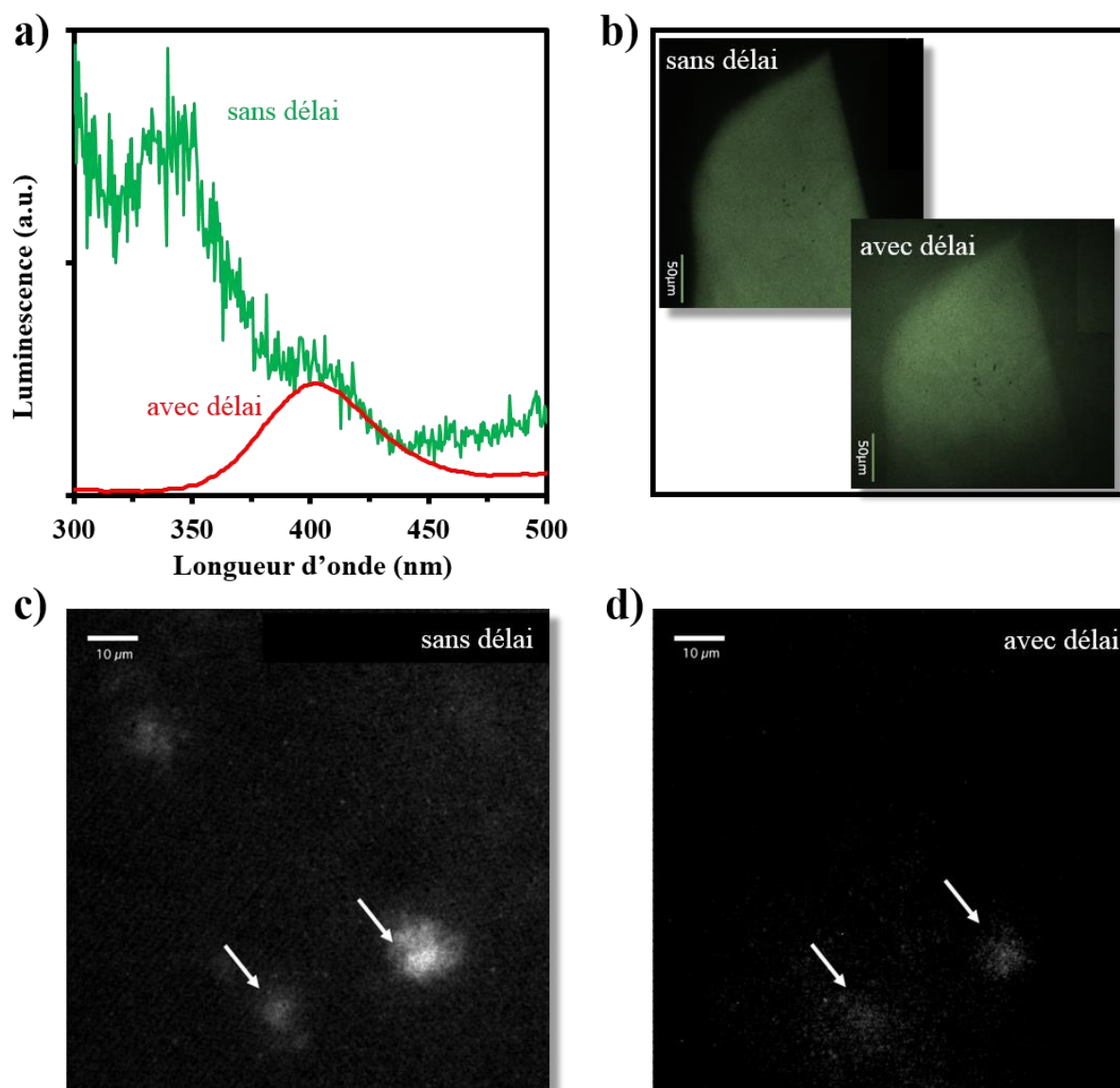


Figure 29. Propriétés phosphorescentes des fibres amyloïdes ; a) Luminescence des fibres de lysozyme *in vitro* en fonction de la longueur d'onde d'émission avec $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm par spectroscopie en temps résolu, sans délai (ligne verte) ou avec un délai de $5 \cdot 10^{-5}$ sec ; (b-d) microscopie en temps résolu sur des fibres alignées de Het-s (fausse couleur verte, $\lambda_{\text{ex}} = 349$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 494 \pm 10$ nm, b) et sur une coupe de cerveau de souris modèle de la MA (dépôts amyloïdes montrés par les flèches, c-d) sans délai ou avec un délai ($5 \cdot 10^{-6}$ sec).

III.2.2. Effet dans le NIR

En comparant les propriétés optiques dans le NIR d'un total de 12 fibres amyloïdes, vis-à-vis de leurs formes monomériques respectives (**Table 5**), nous avons confirmé que seules les structures fibrillaires montrent une luminescence à $\lambda_{\text{ex}} = 600$ -680 nm, avec des profils et des λ_{max} (variant de moins de 7 nm), comparables d'une fibre à une autre.

Fluorescence dans le NIR			
	monomères	fibres	λ_{max} des fibres à $\lambda_{\text{ex}} = 640 \text{ nm (nm)}$
Insuline	×	✓	694
CSNNFGA	×	✓	694
TTR-V30M	×	✓	694
IAPP	×	✓	694
R2T	×	✓	695
A β ₁₋₄₂	×	✓	696
Het-s	×	✓	697
hTau	×	✓	699
α -synucléine	×	✓	699
SAH	×	✓	699
Lysozyme	×	✓	700
β -lactoglobuline	×	✓	701

Table 5. Propriétés dans le NIR des fibres amyloïdes. Absence (×) ou présence (✓) d'intensité lumineuse dans le NIR ($\lambda_{\text{ex}} = 600 - 680 \text{ nm}$) et maximum d'émission associé aux fibres amyloïdes.

Compte tenu de ces résultats, et que l'intensité du signal NIR est proportionnelle à la concentration en fibres amyloïdes (Chapitre 4-III.1.), nous avons suivi la cinétique de fibrillation *in vitro* en fonction du signal des fibres dans le NIR. Pour cela, nous avons suivi en parallèle dans le temps sur deux échantillons dans les mêmes conditions et provenant du même lot, la luminescence intrinsèque dans le NIR ($\lambda_{\text{ex}} = 640 \text{ nm}$) et la fluorescence de la ThT ajoutée ($\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$), à partir de monomères d'insuline (**Figure 30**).

Les profils obtenus sont identiques, et caractéristiques de la fibrillogénèse⁷⁹ : une phase de latence (5 h), une phase de polymérisation exponentielle (5-9 h) et un plateau symbolisant la fin de fibrillation (à partir de 12 h). Par ailleurs, des mesures similaires ont été réalisées dans l'UV-vis, mais la diffusion de la lumière due à la formation des fibres gêne l'interprétation des résultats (données non montrées). On peut donc conclure que le suivi de fibrillogénèse *in vitro* peut-être fait sans aucun marquage, via les propriétés optiques intrinsèques dans le NIR des fibres amyloïdes.

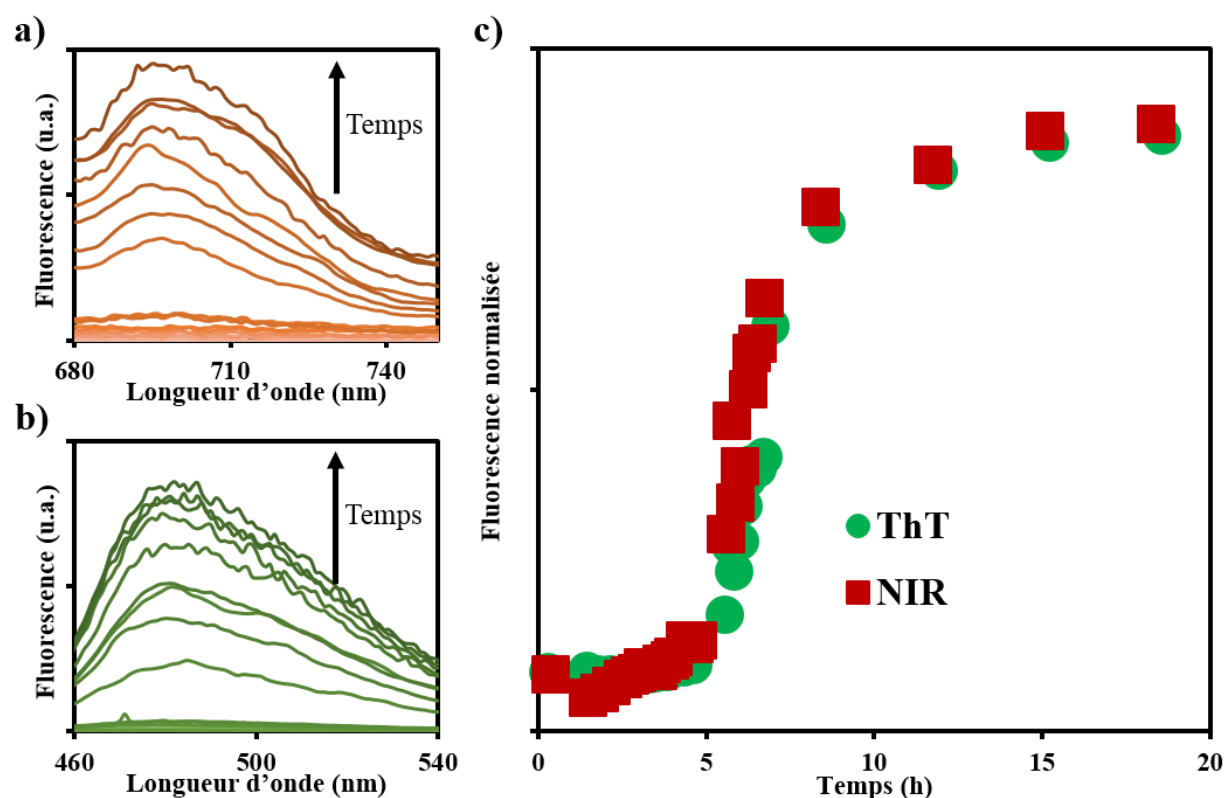


Figure 30. Cinétique de formation de fibres d'insuline ; (a, b) Suivi spectroscopique par fluorescence des propriétés des fibres dans le NIR ($\lambda_{\text{ex}} = 640 \text{ nm}$, a) et de la ThT ($\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$, b) en fonction de la longueur d'onde d'émission ; c) Fibrillogénèse suivi par la fluorescence normalisée de la ThT (cercle vert, $\lambda_{\text{max}} = 480 \text{ nm}$) et des propriétés NIR des fibres ($\lambda_{\text{max}} = 697 \text{ nm}$) en fonction du temps.

L'ensemble de ces résultats seront valorisés dans un article en cours d'écriture. (Pansieri J, Imbert D, Forge V *et al.* General intrinsic luminescence properties of amyloid fibrils for non-invasive *in vivo* imaging).

IV. Conclusion et perspectives

Nous avons montré que les fibres amyloïdes possédaient plusieurs propriétés optiques sur l'ensemble du spectre visible (**Figure 33**), aussi bien observables *in vitro*, que sur des tissus pathologiques, avec des effets spécifiques dans l'UV-vis et le NIR. Dans les deux cas, il est important de mieux caractériser les phénomènes responsables de ces propriétés optiques exceptionnelles. Les hypothèses existantes mettent en jeu la délocalisation de charge le long des nombreuses liaisons hydrogènes et/ou la structuration de leurs AAs aromatiques, mais cela doit encore être confirmé.

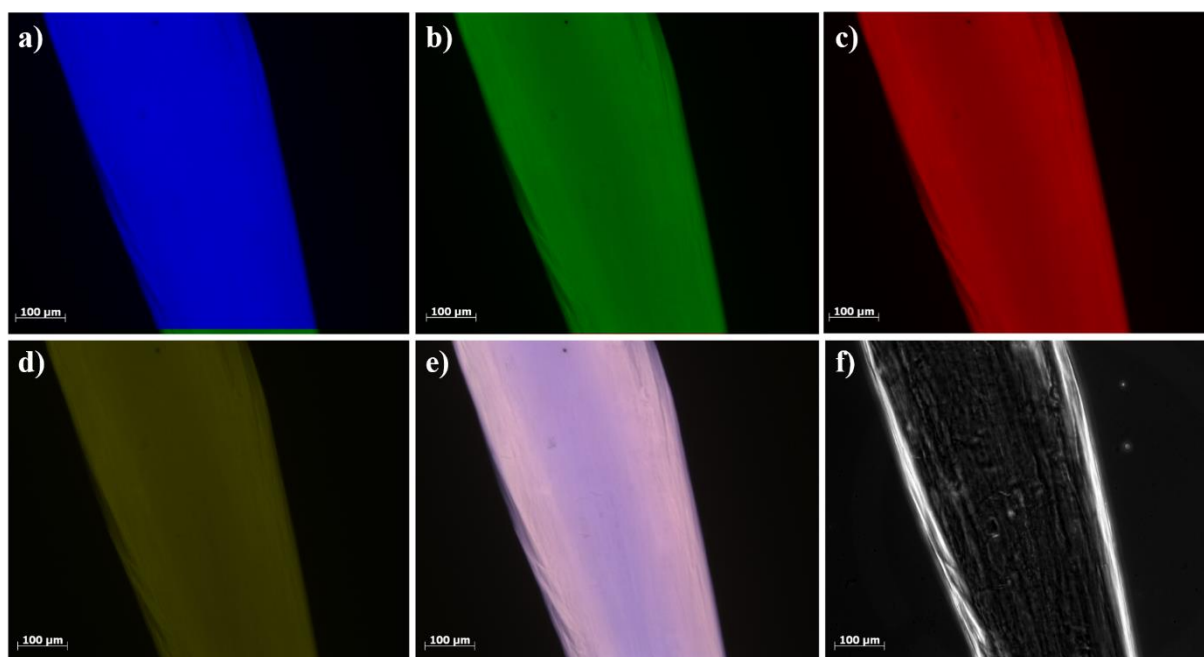


Figure 33. Luminescence intrinsèque des fibres amyloïdes de Het-s alignées. Observation par microscopie à fluorescence avec une émission dans l'UV-vis ($\lambda_{\text{ex}} = 390 \pm 10$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 460 \pm 50$ nm, a), le vert ($\lambda_{\text{ex}} = 475 \pm 10$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 530 \pm 50$ nm, b), le rouge ($\lambda_{\text{ex}} = 545 \pm 25$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 605 \pm 70$ nm, c), et le NIR ($\lambda_{\text{ex}} = 620 \pm 60$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 700 \pm 75$ nm, fausse couleur jaune, d), le mélange de l'ensemble des fluorescences (e), et en mode transmission (f).

Concernant l'UV-vis, les propriétés probablement phosphorescentes des fibres montrées dans ce travail de thèse doivent être mieux caractérisées (temps de vie). Elles sont potentiellement utiles aussi bien en recherche fondamentale (contrôle d'agrégation, détection

sans marquage *in vitro* des fibres) qu'en recherche appliquée (élimination de l'auto-fluorescence de tissus pathologiques, intérêt pour les semi-conducteurs).

Concernant le NIR, nous avons vu que la fibrillogénèse peut être suivie simplement et sans aucun marquage, ce qui représente une méthode inédite et très utile en recherche fondamentale. La détection de dépôts amyloïdes est également possible sur des tissus pathologiques ; se situant dans la fenêtre diagnostique, l'ajustement de cette détection chez l'Homme pourrait s'avérer dans le futur être la plus adaptée pour un diagnostic simple, non invasif et systématique des amyloïdoses. Enfin, compte tenu de l'analogie entre les propriétés optiques des QDs et des fibres amyloïdes, il serait intéressant et novateur de tester ces fibres, entièrement biologiques, dans des domaines variés (médecine, électronique, informatique, etc.).

Conclusion générale

Le but de ma thèse était d'étudier la détection des amyloïdoses, par l'intermédiaire de des fibres amyloïdes. Ce travail constitue la première étape d'un projet plus vaste, visant à établir un diagnostic précoce des amyloïdoses chez l'Homme, par plusieurs techniques d'imagerie médicale. Notre stratégie s'est basée sur deux approches différentes : l'utilisation de nanoparticules pour cibler ainsi que détecter les fibres amyloïdes, et l'investigation de propriétés optiques intrinsèques à ces fibres. La première approche a mis à contribution des analyses *in vitro* pour confirmer l'affinité des nanoparticules pour les fibres, suivies par des analyses *ex vivo* et *in vivo* sur des modèles murins des trois amyloïdoses. La seconde approche était basée sur l'analyse *in vitro* des propriétés spectrales des fibres amyloïdes, afin de mieux comprendre ces objets et d'établir l'intérêt de ces caractéristiques pour la détection des amyloïdoses.

Concernant le ciblage, nous avons utilisé des nanoparticules multimodales pour l'imagerie médicale (AGuIX), ciblant de manière générique (le *Pittsburgh compound B* et le nanocorps B10AP) ou de manière spécifique (peptides KLVFF et LPFFD) les fibres amyloïdes.

Au niveau des propriétés optiques des fibres, une étude systématique sur l'ensemble du spectre visible, a été réalisée sur de nombreux types de fibres amyloïdes, afin de dégager des caractéristiques communes. Nous avons montré l'existence de plusieurs effets, et notamment l'un d'entre eux totalement inédit dans la fenêtre diagnostique.

Un ciblage et une détection des fibres amyloïdes discriminants et affins

Nous avons établi avec succès, de manière qualitative et quantitative, que nos différentes constructions multimodales interagissaient avec les fibres amyloïdes. En effet, les informations obtenues *in vitro* pour chaque type de nanoparticules fonctionnalisées, ont montré des interactions entre les nanoparticules greffées avec les cibles génériques et les trois types de fibres étudiées (associées à la MA, le DNID, et la PNF-TTR-V30M) ainsi qu'entre les cibles spécifiques et les fibres amyloïdes associées à la MA et les PNF-TTRs, mais avec une moindre affinité. Ainsi, même s'il est envisagé d'améliorer l'affinité des molécules spécifiques, chaque nanoparticule possède ses propres avantages : celles avec le *Pittsburgh compound B* sont les plus indiquées *in vivo*, par l'utilisation contemporaine de ce produit en clinique, celles avec le B10AP représentent une solution innovante pour une détection plus sensible des dépôts amyloïdes, et celles avec les peptides admettent une identification directe de la pathologie associée. De plus, nous avons montré l'utilité de nos nano-objets dans le domaine médical, de par la possibilité de greffer des molécules très différentes en taille et en forme à leur surface (exemple : 525 Da pour le peptide KLVFF contre 60 000 Da pour le nanocorps B10AP), tout en préservant leurs propriétés d'imagerie post-greffage. Enfin la détection des amyloïdoses sur des tissus pathologiques, sans non spécificité pour d'autres structures biologiques, en font des outils prometteurs pour les études futures, sur un large éventail de pathologies liées aux amyloïdoses (ou du moins pour les trois pathologies étudiées ici).

Des nanoparticules qui passent la barrière hémato-encéphalique après ouverture transitoire

L'un des enjeux les plus importants en matière de diagnostic de la médecine moderne concerne les maladies neurodégénératives. Nous avons mis en évidence le passage des nanoparticules fonctionnalisées avec le *Pittsburgh compound B* à l'intérieur du cerveau de souris modèles de la maladie d'Alzheimer, après ouverture de la barrière hémato-encéphalique par des ultrasons. En faisant varier des paramètres d'ouverture, le passage des nano-objets a été modulé avec réussite, présentant une diffusion limitée, globale ou localisée. Nous pouvons supposer, qu'en plus du passage à travers la barrière, les nanoparticules ont pu atteindre leurs cibles. Le travail à venir dans ce domaine consistera dans un premier temps à confirmer nos conjectures de ciblage *in vivo*, à contrôler les paramètres d'ouverture en limitant les lésions hémorragiques tout en optimisant le passage des nanoparticules, et à tester ensuite les autres types de nanoparticules fonctionnalisées, afin d'en confirmer le potentiel diagnostique. De plus, le suivi a été possible par IRM et fluorescence, et il sera possible à l'avenir de l'établir par TEP, avec le concours de radio-isotopes complexés sur les AGuIX (gallium-68 et indium-111 en particuliers)²⁰⁵, confirmant la combinaison de plusieurs techniques cliniques.

Des propriétés originales dans le proche ultraviolet et le proche infra-rouge, conservées par l'ensemble des fibres amyloïdes

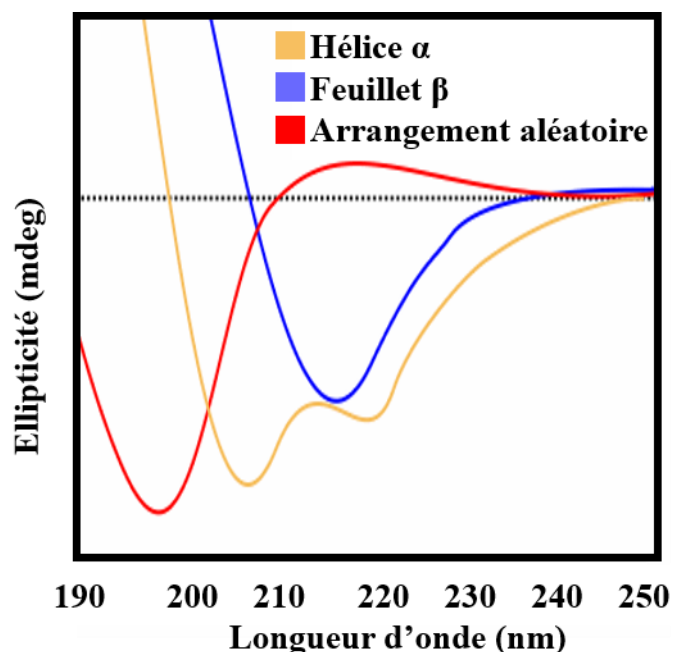
La seconde partie de mon projet a été de caractériser les propriétés spectrales spécifiques des fibres, au niveau du spectre visible de la lumière. Pour cela, 12 types de fibres amyloïdes ont été testés, à partir de protéines amyloïdes amyloïdogènes, fonctionnelles et/ou synthétiques. De ces analyses nous avons déterminé plusieurs effets, et avons identifié deux propriétés optiques originales inhérentes aux fibres : une propriété de phosphorescence dans le proche ultraviolet, et une propriété de fluorescence dans le proche infrarouge. Au niveau du proche ultraviolet, l'exaltation d'un signal préexistant a été démontrée, et représente un intérêt dans l'observation des fibres amyloïdes, notamment en recherche fondamentale. Concernant l'effet dans le proche infra-rouge, celui-ci est d'autant plus remarquable, qu'il n'existe que lorsque les protéines amyloïdes sont sous des formes fibrillaires. Nous avons mis en évidence que ce signal se situait dans la fenêtre diagnostique, c.-à-d. la gamme de longueur d'ondes où le corps absorbe peu la lumière, et est visualisable sur des coupes de tissus présentant des amyloïdoses. De plus, un travail de suivi par imagerie *in vivo* sur des modèles murins Alzheimer, est actuellement en cours pour déterminer si les plaques séniles peuvent être détectées, suivant ces propriétés. Quoi qu'il en soit, l'approfondissement de nos connaissances concernant les propriétés spectrales des fibres amyloïdes semble très prometteur, en recherche fondamentale (caractérisation de ces phénomènes), et en recherche appliquée (diagnostic complètement non invasif des amyloïdoses).

Que cela soit par l'intermédiaire d'interfaces nanométriques, ou de propriétés inhérentes aux structures amyloïdogènes, l'exploration et l'adaptation de ces deux stratégies chez l'Homme sont innovantes pour la suite de ce projet dans sa globalité.

Annexes

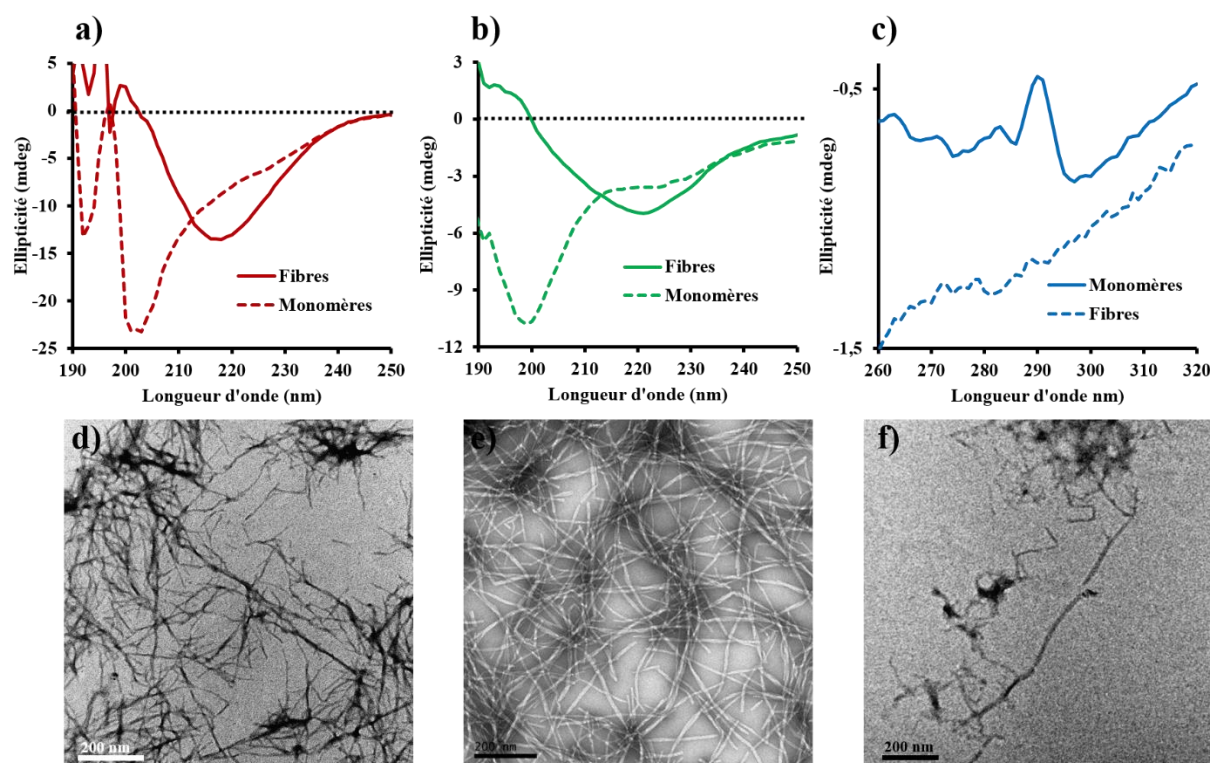
❖ Annexe 0 et 1 : Caractérisation des fibres amyloïdes

L'utilisation des spectres de dichroïsme circulaire renseigne sur les structures secondaires des protéines, car chacune d'entre elles possède un spectre d'ellipticité caractéristique en fonction de la longueur d'onde (**Annexe 0**). Ce phénomène est dû à la chiralité des protéines incriminées (c.à.d. non superposables à leur image dans un miroir)²⁵¹. Parmi elles, la présence d'un pic négatif à 218-220 nm est spécifique de structures en feuillets β .



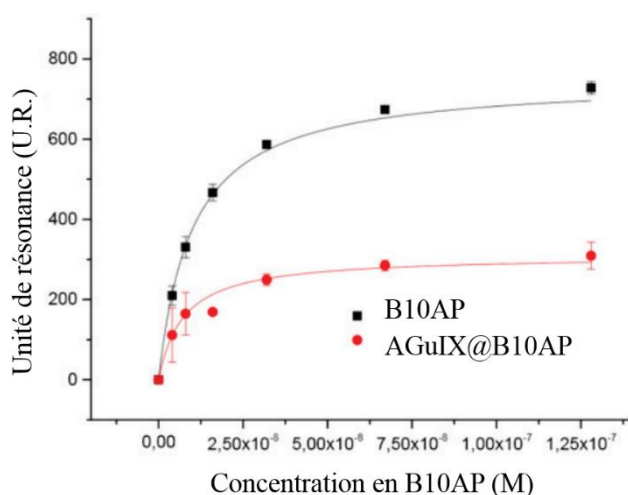
Annexe 0. Spectres typiques de DC des protéines, associés à leurs structures secondaires.

Le DC est donc un outil de caractérisation pour la formation des fibres amyloïdes, adapté dans la plupart des cas. L'apparition des feuillets β est visible par DC pour les fibres A β ₁₋₄₂ et IAPP (**Annexe 1a-b**). Cependant, certaines protéines, comme la TTR-V30M, présentent des feuillets β dans un état non fibrillaire, et il devient alors difficile de déterminer la formation des fibres de cette façon. La caractérisation par DC est tout de même réalisable, mais les informations recherchées sont différentes. En effet, on sait que certains AAs de la TTR-V30M s'enfouissent à l'intérieur de la fibre lors de leurs formations, et notamment les acides aminés aromatiques qui la compose¹²³. Or, Ces derniers possèdent un signal caractéristique autour de 290 nm : l'absence de ce signal montre donc la formation de structures fibrillaires de TTR-V30M (**Annexe 1c**). Par ailleurs, la MET permet d'accéder aux données morphologiques des trois types de fibres, en termes de longueurs et de diamètres apparents (**Annexe 1d-e**).



Annexe 1. Caractérisation des fibres amyloïdes $A\beta_{1-42}$ (a & d), IAPP (b & e) et TTR-V30M (c & f). (a-c) Spectres de DC en fonction de la longueur d'onde. Le pic négatif à 218-220 nm est caractéristique de la structuration en feuillets β (a, b) tandis que la disparition du signal des acides aminés aromatiques à 290 nm, indique leur enfouissement à l'intérieur de la structure fibrillaire TTR-V30M (c) ; (d-f) Photographies de MET sur chaque type de fibre.

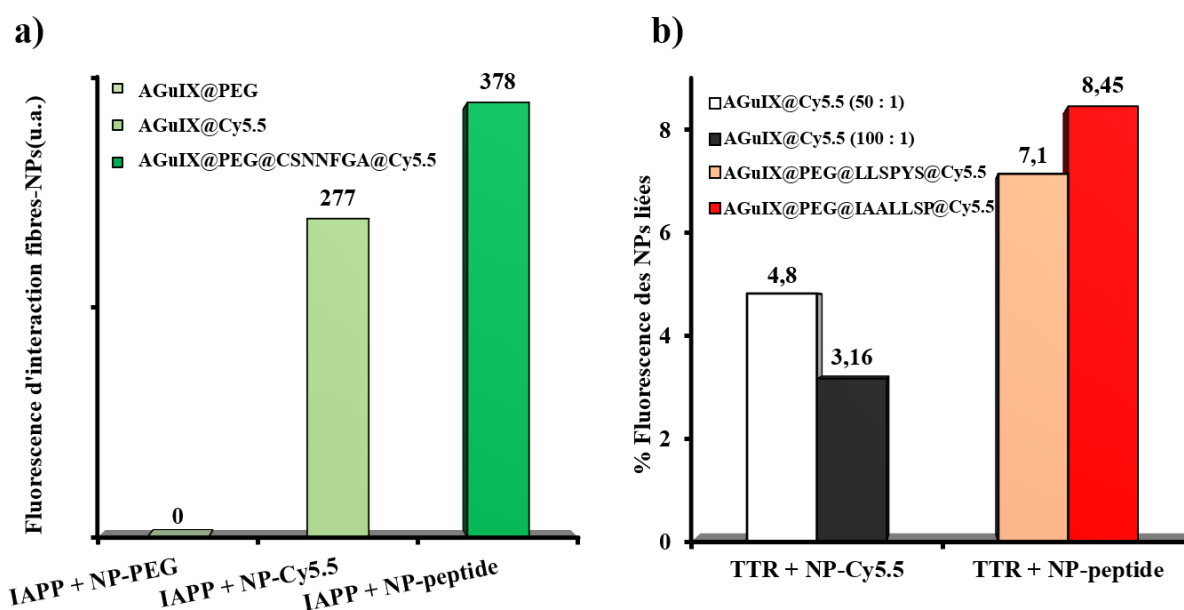
❖ **Annexe 2 : affinité du B10AP et de l'AGuIX@B10AP pour les fibres amyloïdes $A\beta_{1-42}$ par Biacore**



Fibres $A\beta_{1-42}$		
	R_{max} (U.R.)	K_d (nM)
B10AP	760	9.9
AGuIX@B10AP	345	14.5

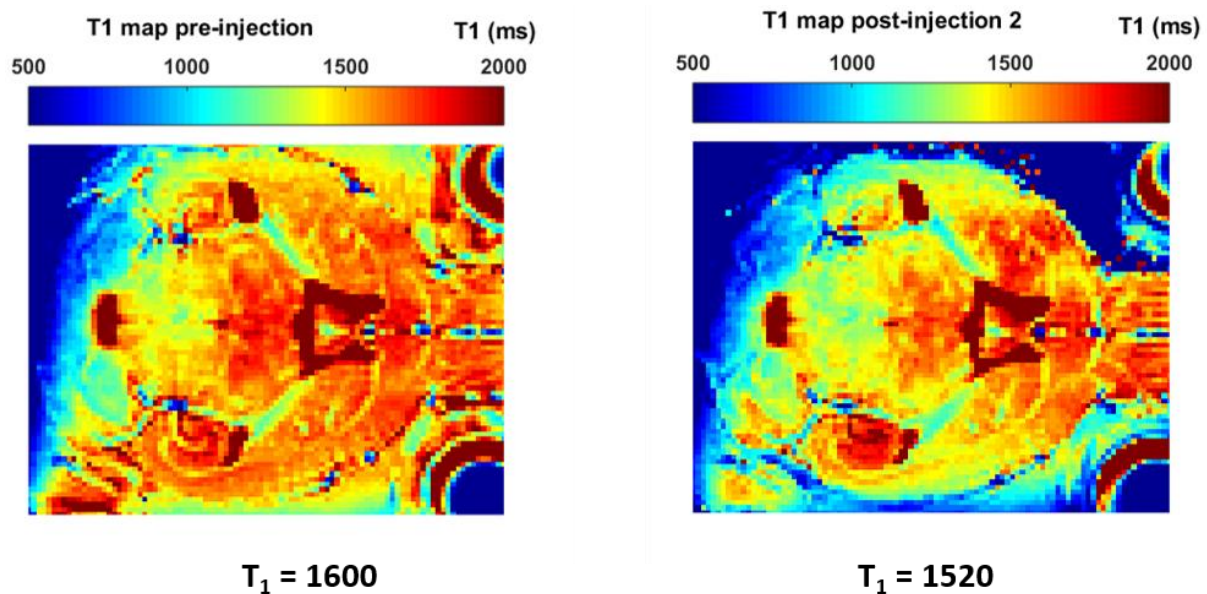
Annexe 2. Modélisation par le modèle de Michaelis-Menten de la réponse du B10AP par rapport à sa concentration (a), sur les fibres $A\beta_{1-42}$, préalablement fixées sur une puce de Biacore, et calculs des constantes de dissociations associées (b) (d'après Plissonneau M.)²⁵²

❖ Annexe 3 : interaction entre NPs due à la cyanine 5.5 et/ou les peptides dirigés contre les dépôts amyloïdes IAPP et TTR



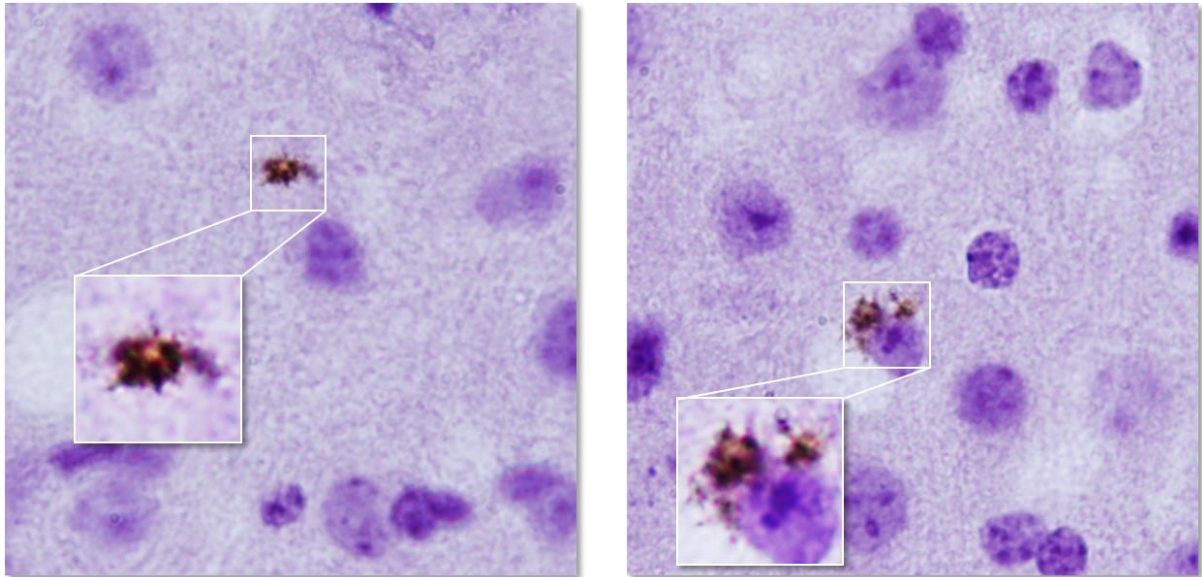
Annexe 3. Ciblage *in vitro* des fibres amyloïdes avec les AGuIX fonctionnalisées après partition par centrifugation ; a) Comparaison de l'intensité de fluorescence (à $\lambda_{em} = 685$ nm) des NPs liées (300 nM en Cy5.5) aux fibres IAPP (20 μ M) en fonction de leur fonctionnalisation (avec PEG, ou la Cy5.5, ou le peptide CSNNFGA) ; b) Comparaison de l'intensité de fluorescence (à $\lambda_{em} = 685$ nm) des NPs liées (100 nM en Cy5.5) aux fibres TTR-V30M (20 μ M) en fonction de leur fonctionnalisation (avec la Cy5.5 à 1 Cy5.5 pour 50 NPs ET & Cy5.5 pour 100 NPs, le peptide LLSPYS, ou le peptide IAALLSP) .

❖ Annexe 4 : cartographie T_1 sur la souris #2701, avant et après injection des AGuIX@PEG@PIB



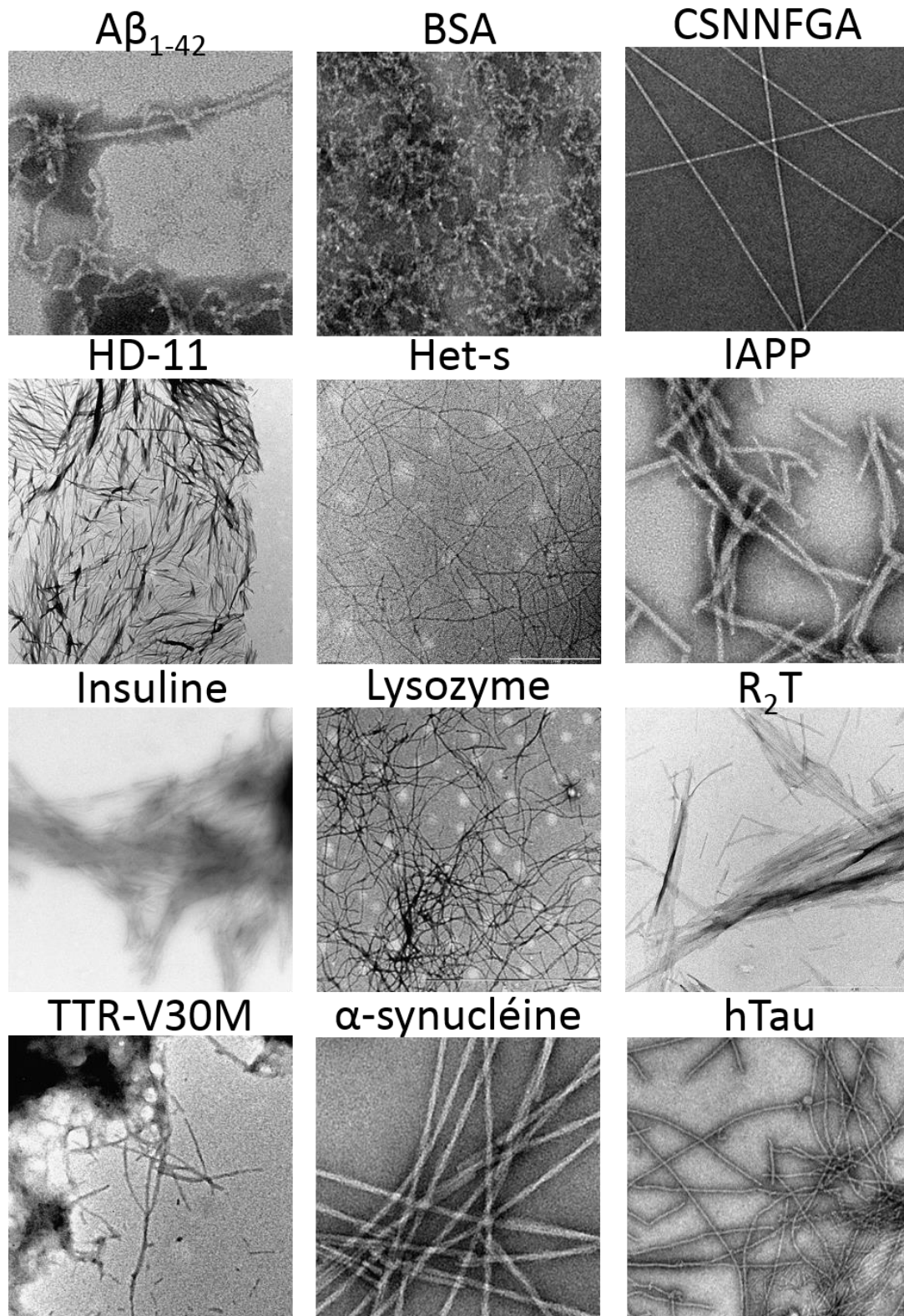
Annexe 4. Résultats d'IRM *in vivo* par cartographie T_1 , réalisées sur la souris #2701 après ouverture de la BHE en conditions n°1, pré et post-injection des AGuIX@PEG@PIB. Le passage limité des AGuIX@PEG@PIB se traduit par une diminution faible du temps T_1 . Le calcul du T_1 global au niveau du cerveau et du cervelet montre une baisse de 1600 à 1520 msec.

❖ Annexe 5 : Microscopie sur tissus murins après injection d'AGuIX@PEG@PIB et ouverture ponctuelle de la BHE



Annexe 5. Coupe du thalamus de la souris #2704 modèle de la MA, après colorations. Marquage du cytoplasme (violet clair), des noyaux (violet foncé), et des AGuIX@PEG@PIB (marron).

❖ Annexe 6 : MET des 12 fibres amyloïdes analysées dans le Chapitre 4



Annexe 6. Microscopie électronique à transmission sur 12 types de fibres amyloïdes testées pour leurs propriétés optiques dans le spectre visible de la lumière.

- ❖ Annexe 7 : Distribution de masse et de charge des fibres amyloïdes impliquées dans les maladies neurodégénératives (article 4, incomplet)

Mass and charge distributions of entire amyloid fibers involved in neurodegenerative diseases: Mapping polymorphism effects and population heterogeneity

Jonathan Pansieri^{1,§}, Mohammad A. Halim^{2,§}, Charlotte Vendrely³, Mireille Dumoulin⁴, François Legrand⁵, Marcelle Moulin⁶, Sabine Chierici⁷, Simona Denti⁷, Xavier Dagany², Philippe Dugourd², Christel Marquette¹, Rodolphe Antoine^{2,*}, Vincent Forge^{1,*}

[§] JP and MAH contributed equally to this work

* Correspondence should be addressed to RA (rodolphe.antoine@univ-lyon1.fr) or VF (vincent.forge@cea.fr)

¹ Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux (UMR 5249: Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA), Biosciences and Biotechnology Institute of Grenoble, CEA Grenoble, F-38000 Grenoble, France

² Institut Lumière Matière, UMR5306 Université Lyon 1-CNRS, Université de Lyon, 5 rue de la Doua, Villeurbanne, F-69622, France

³ ERRMECe, I-MAT FD4122, Université de Cergy-Pontoise, 2 avenue Adolphe Chauvin, F-95302 Cergy-Pontoise Cedex, France and LMGP, CNRS UMR 5628, 3 parvis Louis Néel, F-38016 Grenoble, France

⁴ Enzymology and Protein Folding, Centre for Protein Engineering, InBIOS, University of Liège, B6c, Quartier Agora, allée du six Août 11, 4000 Liège 1, Belgium

⁵ Centre de Recherches des Instituts Groupés, Haute Ecole Libre Monsane, Mont Saint-Martin, 41, 4000 Liège, Belgium

⁶ Radiopharmaceutique biocliniques (INSERM U1039), Faculté de Médecine de Grenoble, F-38700 La Tronche, France

⁷ Département de Chimie Moléculaire, CNRS, UMR 5250, F-38000 Grenoble, France

Abstract

We report here the characterization by charge detection mass spectrometry of amyloid fibers made of the proteins: A β ₁₋₄₂ peptides, tau protein and α -synuclein, involved in neurodegenerative diseases. Beside the mass of individual fibers, this technique enables to characterize the homogeneity of the population, of prime importance with amyloid fiber samples, well-known to be highly heterogeneous and, as a consequence, difficult to accurately characterize. In the case of A β ₁₋₄₂ peptide, it was possible to distinguish and characterize two populations of amyloid fibers within a sample. In the case of α -synuclein, we show how the polymorphism affect the mass and charge distributions. In the near future, this technique will allow to investigate the mechanisms of formation and maturation of amyloid fibers, so important to get insight into the development of the neurodegenerative diseases. At last, this technique should be particularly powerful to characterize amyloid deposits extracted from patients.

The most frequent age-related neurodegenerative diseases, Alzheimer's and Parkinson's diseases, are related to the accumulation of amyloid deposits due to the aggregation of few specific proteins **(1,2)**. In the case of Alzheimer's disease, A β peptides form extracellular plaques and tau protein accumulates as intraneuronal inclusion bodies **(3,4)**. This leads to synaptic dysfunction, neuron death, brain shrinkage and, ultimately, dementia. The Parkinson's disease is associated to the appearance of intracellular deposits made of α -synuclein, so-called Lewy bodies, leading to neuron dysfunction (lack of DOPA synthesis) and to movement disorder **(5-7)**. The proteins involved in these deposits are in the so-called amyloid state, with common structural features whatever the protein involved **(8-12)**. Proteins in the amyloid state form elongated fibers, with diameters of a few nanometers and lengths around a micrometer. Their structure is stabilized by hydrogen-bonded β -strands perpendicular to the fiber axis and forming β -sheets, either parallel or anti-parallel, along the fiber axis.

According to the classical view, the formation of amyloid fibers follows a nucleation/growth mechanism, i.e. a primary nucleation mechanism **(13)**. The initial step, which is also the slowest one, is the formation of oligomers which act as nuclei for the growth of the fibers. This lag phase can be avoided when starting the fiber formation in the presence of preformed fibers. In that case, however, a second nucleation mechanism can occur also **(14-16)**. Then, the surface of the preformed fibers acts as template for the formation of new protofibrils. The fragmentation of preformed fibrils can also interfere with the nucleation mechanism by generating new growth sites. At high ratio of preformed fibers, the second nucleation mechanism can surpass the primary nucleation **(15,17)**. One of the consequences is a significant polymorphism **(18)**, which can be related to that observed within *in vivo* amyloid deposits **(19-22)**. Another consequence is that the formation of oligomers and protofibrils is facilitated. Such phenomenon could be of prime importance to understand the relationship between the accumulation of amyloid deposits and toxicity *in vivo*. Indeed, an increasing set of evidence shows that the most toxic species are not the amyloid deposits but the oligomers and/or protofibrils **(23-26)**. These toxic species could be continuously produced by the interactions between newly generated monomeric peptides (A β ₁₋₄₂ peptide) and amyloid fibers accumulated within the amyloid deposits **(14)**. This could explain the relationship between the accumulation of amyloid deposits and the neuronal death.

We recently showed that CDMS is capable of measuring masses of amyloid fibrils **(27)**. Previous MS-based studies of fibrillation have been limited to the early steps in aggregation

(28,29). The CDMS measurements provided rapid access to information like average mass and mass distribution, and when coupled with measurements of the average length of the fibrils from TEM/AFM, the mass per unit length (MPL) was determined. The mass and length distributions were found to be log-normal which is characteristic of nonspecific aggregation. We report here the characterization by charge detection mass spectrometry (CDMS) of amyloid fibers made of the proteins involved in neurodegenerative diseases. We report the mass distribution for amyloid fibers made of A β ₁₋₄₂ peptides, tau protein and α -synuclein. Beside the mass distribution for the different amyloid fibers, this technique allows to highlight and characterize the heterogeneity of the populations, with the possibility to distinguish several populations, as illustrated with A β ₁₋₄₂ peptide and tau, and to quantify the polymorphism, as illustrated with α -synuclein. In that case, we show how the polymorphism affect the mass and charge distributions.

Characterization of coexisting amyloid species: tau and A β ₁₋₄₂ peptide

The formation of amyloid fibers by tau was triggered by the addition of heparin at a molar ratio of 2.2 (29-31). Although well-defined straight fibers were observed by electron microscopy (Fig. 1A); the length distribution was quite broad (Fig. S1). Despite this length heterogeneity, it was not possible to distinguish different types of fiber within the samples. Only small more-or-less spherical oligomers could be distinguished (Fig. 1A), but they were not considered for the length distribution estimation. Within the CDMS 2D-graph (Fig. 1B), a small population of low mass (around 13 MDa) could be observed. The two populations: “low” and “high” mass populations, could be distinguished by their times of flight (Fig. 1C). The main population, the “high” mass population, had a mean mass of 113.5 MDa (Fig. 1C). As the presence of heparin was essential for the formation of fiber by tau, mostly for screening charges, the estimation of the number of proteins per fibrils was not straightforward. Only an estimation can be given, if we hypothesize that the ratio tau/heparin is the same within the fibers and in the bulk, i.e. 2.2. This gives around 1835 proteins per fiber on average ($M_{\text{tau}} = 45.85$ kDa and $M_{\text{heparin}} = 8$ kDa). The most probable was that the “low” mass population, on the bottom detection limit of the CDMS experiment, was due to the spherical oligomers seen in the electron microscopy image (Fig. 1A). Based on a protein density at 1.41 g.cm^{-3} , a mean molar mass of 13 kDa corresponds to spherical oligomers of about 30 nm, in agreement with the size of the oligomers observed by electron microscopy. Interestingly, the Rayleigh limit of a water droplet is ~ 232 e. However, here we observed higher charge for the mass distribution: ~ 450 e (Fig. 1B).

This indicated that the oligomers are highly charged; much more than the fibers, as evidenced also by the differences of the Charge vs molar mass slopes corresponding to the two populations (Fig. 1B). This suggests that no heparin is bound to the oligomers, while the binding of heparin is required for the formation of the fibers by screening the charges present within the fuzzy coat of the tau fibers (3, 30,31). If we consider that no heparin was bound to the spherical oligomers, then they contained 283 proteins. Moreover, based on the size of the two populations (364 vs 6836), they represent 5 % of the detected macro-ions, and the long fibers 95% of them (Fig. 1C).

Amyloid fibers made of A β ₁₋₄₂ peptides were obtained upon incubation at pH 6.5 and 37°C. At least two fiber populations: short protofibrils and elongated fibers, can be distinguished on the electron microscopy cliché (Fig. 2A). On lower magnification images (Fig. S2), the predominant population was the protofibrils which had the tendency to aggregate. Our sample showed strong similarities with the observations reported earlier (18); branching on the fiber sides (Fig. 2A, arrows) showed that some secondary nucleation was occurring. Therefore, the final state of our sample was the result of a competition between primary and secondary nucleation mechanisms. Mass measurements have been performed on 9642 single A β fiber macro-ions and the results were gathered into a 2D graph (charge vs mass) (Fig. 2B). Although less evident than in the case of tau, two different charge vs mass dependencies could be seen on the 2D graph. Then, based on their time-of-flight, two populations could be extracted from the 2D-graph: a “low” mass (centered on 20 MDa) and a “high” mass population (centered on 55 MDa) (Fig. 2C). According to number of macro-ions counted for each population: 759 for “low” mass vs 9642 for “high” mass, the “low” mass population counted for 8 % of the macro-ions. Based on the obvious ratio of populations within the electron microscopy images (Fig. S2), the “low” mass population can be assigned to the elongated fibers, and the “high” mass population to protofibrils, more exactly to protofibrils aggregates.

For the elongated fibers, a molar mass of 20 MDa gives 4400 peptides per fibers ($M_{A\beta}$ = 4.51 kDa). Their length distribution is centered on 0.9 μ m (Fig. S2), this gives a mass-per-length (MPL) value around 22 kDa/nm, in agreement with the values based on electron cryomicroscopy image processing, i.e. $\sim$ 20 kDa/nm (32). These parameters cannot be determined in the case of the “high” mass population which corresponds to aggregates of protofibrils. Nevertheless, the fact that their charge density is lower (weaker slope of the charge vs mass dependency) indicates either that they are less electrically charged or that their aggregation occurs through electrostatic interactions, i.e. inducing some charge screening.

Polymorphism effect on amyloid fiber population: α -Synuclein

Two types of α -synuclein fibers have been obtained (33-36). In one case regular isolated fibers were formed, referred to as type I, (Fig. 3A), while irregular ribbons, referred to as type II, were observed in the other case (Fig. 3B). These ribbons were made of the heterogeneous association of fibrils of variable lengths. Moreover, fibers involved in ribbon were obviously shorter than those observed in the sample with isolated fibers. According to their respective length distributions (Fig. S3), isolated fibers of the first sample type had a mean length of 0,9 μm , while those involved within ribbons had a mean length of 0,5 μm . The number of fibers involved in the ribbons was counted every 300 nm along the irregular ribbons (Fig. S3). The most probable was to observe the association of two fibers, and the probability decreased when the number of associated fibers increased. Obviously, the probability to have even numbers of fibers was much higher than for odd numbers, suggesting that the fibers associated by pairs. Both types of fibers were further characterized by Atomic Force Microscopy (AFM) (Fig. S4). The height profiles of isolated fibers showed a single maximum around 8 nm. In the case of the ribbons, the profiles were much broader, with several peaks corresponding to aligned fibers. At the exception of regions with overlapping fibers, the average height of the ribbons was around 6-8 nm. This was close to the isolated fiber height showing that the ribbons were mostly the results of the lateral association of fibers into 2D structures. The reasons for the differences between the two samples are not understood (37). The only notable difference is the initial concentration of monomeric protein: 51 μM in the case of the isolated fibers and 83 μM for the ribbons. As a consequence the fiber formation was faster at higher concentration (data not shown). This could have an effect on the formation mechanism, by enabling some secondary nucleation for instance. Another possibility is that significant structure changes have been reported during the maturation of α -synuclein fibers, i.e. after their formation. The total incubation time being the same for both samples, the maturation phase must have been longer in the case of the higher protein concentration sample, because of a faster fibrillation, allowing more reorganization (38).

The CDMS 2D graph recorded with the isolated fibers showed a well-defined charge vs mass dependency (Fig. 3C). According to the mass distribution (Fig. 3D), the mean mass was 85.4 MDa. Hence, these α -synuclein amyloid fibers were made of 5900 proteins on average ($M_{\alpha\text{-syn.}} = 14.46 \text{ kDa}$). According to the length distribution estimated from electron microscopy (Fig. S3), the average fiber length was 0.90 μm , giving a MPL value around 95 kDa/nm, fairly close to that determined from electron microscopy image processing, i.e. 60 kDa/nm. In the

case of the ribbons, the charge vs mass dependency was not so well defined anymore (Fig. 3E), resulting in a much broader mass distribution, with a mean mass at 147.8 kDa (Fig. 3F). The broadness reflected the heterogeneity of the sample, with ribbons of varying length and width. It was obvious on the 2D-graph that the charge of the ribbons was significantly lower than in the case of the isolated fibers; a dashed line corresponding to the charge vs mass dependency of the isolated fibers was reported on both 2D-graphs for comparison. The pH being identical for both types of sample, this suggested that charges were at least partially hidden due to the organization of the fibers into ribbons. Therefore, electrostatic interactions were likely to be involved in the lateral association of fibrils into ribbons. According to the electron microscopy and AFM images, the ribbons are due to the 2D association of the fibers. This allows to use a simple model that enables us to estimate the amount of charges involved in the interaction based on the ratio between the slopes of the charge vs mass graphs (supplementary information scheme 1). The ratio between the slopes being around 1.7, about 20 % of the charges are involved in the interaction; the value of $N_{\text{int}}/N_{\text{tot}}$ tends toward 0.206 for high values of n (Fig. S3). As reported earlier, the fact that the newly formed fiber are propitious to electrostatic interactions on their sides could be an important feature for their toxicity through the disruption of neuron extracellular cell membranes (39).

In conclusion, charge-detection-mass-spectrometry provides a wealth of information on amyloid fiber samples. Beside the mass and charge of individual fibers, this technique enables to characterize the homogeneity of the population and to detect the presence of different types of fibers. This is of prime importance with amyloid fiber samples, well-known to be highly heterogeneous and, as a consequence, difficult to accurately characterize. In association with time-resolved experiment, this will allow to investigate the mechanisms of formation and maturation of amyloid fibers, so important to get insight into the development of the neurodegenerative diseases. At last, this technique should be particularly powerful to characterize amyloid deposits extracted from patients. However, the structure and heterogeneity in the fibril formation process remain difficult to assess by any MS-based methods. A further step will require coupling between charge-detection mass spectrometry and separation techniques. In asymmetrical flow field-flow fractionation AF4, there is no stationary phase able to induce mechanical or shear stress on the protein molecules, and the mobile phase composition can be chosen to preserve the native state. In particular, *in vitro* A β ₁₋₄₂ peptide aggregation was recently monitored by AF4 (40). A possibility would be to couple asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) with charge detection mass spectrometry to

profile the time-dependent aggregation pattern, in order to better decipher population heterogeneity. Work along these lines is currently underway in our laboratory.

Acknowledgment

This work was supported by Euronanomed ENMII JTC2012 (project 2011-ERA-002-01- Dia-Amyl) and the French National Research Agency (ANR): ANR-12-RPIB Multimage. J.Pansieri was granted by FRM DBS2013112844.

Bibliography

1. Jakob-Roetne, R., Jacobsen, H.: Alzheimer's Disease: From Pathology to Therapeutic Approaches. *Angew. Chemie Int. Ed.* 48, 3030–3059 (2009).
2. Makin, O.S., Serpell, L.C.: Structures for amyloid fibrils. *FEBS J.* 272, 5950–5961 (2005).
3. Ballatore, C., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q.: Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci.* 8, 663–672 (2007)
4. Wegmann, S., Jung, Y.J., Chinnathambi, S., Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E., Muller, D.J.: Human Tau Isoforms Assemble into Ribbon-like Fibrils That Display Polymorphic Structure and Stability. *J. Biol. Chem.* . 285 , 27302–27313 (2010).
5. Conway, K.A., Harper, J.D., Lansbury, P.T.: Fibrils Formed in Vitro from α -Synuclein and Two Mutant Forms Linked to Parkinson's Disease are Typical Amyloid. *Biochemistry.* 39, 2552–2563 (2000).
6. Jakes, R., Spillantini, M.G., Goedert, M.: Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett.* 345, 27–32 (1994).
7. Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M., Goedert, M. α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* . 95 , 6469–6473 (1998)
8. Pedersen, J.S., Andersen, C.B., Otzen, D.E.: Amyloid structure – one but not the same: the many levels of fibrillar polymorphism. *FEBS J.* 277, 4591–4601 (2010).
9. Chiti, F., Dobson, C.M.: Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 333–366 (2006)
10. Chiti, F., Dobson, C.M.: Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nat. Chem. Biol.* 5, 15–22 (2009)
11. Fändrich, M., Schmidt, M., Grigorieff, N.: Recent progress in understanding Alzheimer's Beta-amyloid structures. *Trends Biochem. Sci.* 36, 338–345 (2017).
12. Ahmed, M., Davis, J., Aucoin, D., Sato, T., Ahuja, S., Aimoto, S., Elliott, J.I., Van Nostrand, W.E., Smith, S.O.: Structural conversion of neurotoxic amyloid-[beta]1-42 oligomers to fibrils. *Nat Struct Mol Biol.* 17, 561–567 (2010)

13. Lomakin, A., Chung, D.S., Benedek, G.B., Kirschner, D.A., Teplow, D.B.: On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 1125–1129 (1996)
14. Cohen, S.I.A., Linse, S., Luheshi, L.M., Hellstrand, E., White, D.A., Rajah, L., Otzen, D.E., Vendruscolo, M., Dobson, C.M., Knowles, T.P.J.: Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 9758–9763 (2013).
15. Eden K, Morris R, Gillam J, MacPhee CE & Allen RJ. Competition between Primary Nucleation and Autocatalysis in Amyloid Fibril Self-Assembly. *Biophysical J.* **108**, 632–643 (2015).
16. Knowles TP et al. An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly. *Science* **326**, 1533-1537 (2009).
17. Buell AK *et al.* Solution conditions determine the relative importance of nucleation and growth processes in α -synuclein aggregation. *PNAS* **111**, 7671-7676 (2014).
18. Jeong JS, Ansaloni A, Mezzenga R, Lashuel HA & Dietler G. Novel mechanistic insight into the molecular basis of amyloid polymorphism and secondary nucleation during amyloid formation. *J Mol Biol.* **425**, 1765-1781 (2013).
19. Eichner, T., Radford, S.E.: A Diversity of Assembly Mechanisms of a Generic Amyloid Fold. *Mol. Cell.* **43**, 8–18 (2011).
20. Fändrich, M., Meinhardt, J., Grigorieff, N.: Structural polymorphism of Alzheimer A β and other amyloid fibrils. *Prion.* **3**, 89–93 (2009). doi:10.4161/pri.3.2.8859
21. Meinhardt, J., Sachse, C., Hortschansky, P., Grigorieff, N., Fändrich, M.: A β (1-40) Fibril Polymorphism Implies Diverse Interaction Patterns in Amyloid Fibrils. *J. Mol. Biol.* **386**, 869–877 (2009).
22. Wetzel, R., Shivaprasad, S., Williams, A.D.: Plasticity of Amyloid Fibrils. *Biochemistry.* **46**, 1–10 (2007).
23. Qiang, W., Yau, W.-M., Lu, J.-X., Collinge, J., Tycko, R.: Structural variation in amyloid- β fibrils from Alzheimer’s disease clinical subtypes. *Nature.* **541**, 217–221 (2017)
24. Caughey, B., Lansbury, P.T.: PROTOFIBRILS, PORES, FIBRILS, AND NEURODEGENERATION: Separating the Responsible Protein Aggregates from The Innocent Bystanders. *Annu. Rev. Neurosci.* **26**, 267–298 (2003).
25. Glabe, C.G.: Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiol. Aging.* **27**, 570–575 (2017).
26. Goldsbury, C., Frey, P., Olivieri, V., Aebi, U., Müller, S.A.: Multiple Assembly Pathways Underlie Amyloid- β Fibril Polymorphisms. *J. Mol. Biol.* **352**, 282–298 (2005).
27. Doussineau, T., Mathevon, C., Altamura, L., Vendrely, C., Dugourd, P., Forge, V., Antoine, R.: Mass Determination of Entire Amyloid Fibrils by Using Mass Spectrometry. *Angew. Chemie.* **128**, 2386–2390 (2016).
28. Bleiholder, C., Dupuis, N.F., Wyttenbach, T., Bowers, M.T.: Ion mobility–mass spectrometry reveals a conformational conversion from random assembly to β -sheet in amyloid fibril formation. *Nat Chem.* **3**, 172–177 (2011)

29. Hoffmann, W., von Helden, G., Pagel, K.: Ion mobility-mass spectrometry and orthogonal gas-phase techniques to study amyloid formation and inhibition. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 46, 7–15 (2017).
30. Barghorn, S., Mandelkow, E.: Toward a Unified Scheme for the Aggregation of Tau into Alzheimer Paired Helical Filaments. *Biochemistry*. 41, 14885–14896 (2002).
31. Ramachandran, G., Udgaonkar, J.B.: Understanding the Kinetic Roles of the Inducer Heparin and of Rod-like Protofibrils during Amyloid Fibril Formation by Tau Protein. *J. Biol. Chem.* 286 , 38948–38959 (2011).
32. Schmidt, M., Sachse, C., Richter, W., Xu, C., Fändrich, M., Grigorieff, N.: Comparison of Alzheimer A β (1–40) and A β (1–42) amyloid fibrils reveals similar protofilament structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. .* 106 , 19813–19818 (2009).
33. van Raaij, M.E., Segers-Nolten, I.M.J., Subramaniam, V.: Quantitative Morphological Analysis Reveals Ultrastructural Diversity of Amyloid Fibrils from α -Synuclein Mutants. *Biophys. J.* 91, L96–L98 (2006).
34. Hoyer, W., Antony, T., Cherny, D., Heim, G., Jovin, T.M., Subramaniam, V.: Dependence of α -Synuclein Aggregate Morphology on Solution Conditions. *J. Mol. Biol.* 322, 383–393 (2002).
35. Bousset, L., Pieri, L., Ruiz-Arlandis, G., Gath, J., Jensen, P.H., Habenstein, B., Madiona, K., Olieric, V., Böckmann, A., Meier, B.H., Melki, R.: Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat. Commun.* 4, 2575 (2013)
36. Gath, J., Bousset, L., Habenstein, B., Melki, R., Böckmann, A., Meier, B.H.: Unlike Twins: An NMR Comparison of Two α -Synuclein Polymorphs Featuring Different Toxicity. *PLoS One.* 9, e90659 (2014)
37. Hoyer, W., Antony, T., Cherny, D., Heim, G., Jovin, T.M., Subramaniam, V.: Dependence of α -Synuclein Aggregate Morphology on Solution Conditions. *J. Mol. Biol.* 322, 383–393 (2002).
38. Guilliams T *et al.* Nanobodies raised against monomeric α -synuclein distinguish between fibrils at different maturation stages. *J Mol Biol.* 425, 2397-2411 (2013).
39. Mahul-Mellier AL *et al.* Fibril growth and seeding capacity play key roles in α -synuclein-mediated apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 22, 2107-2122 (2015).
40. Rambaldi, D.C., Zattoni, A., Reschiglian, P., Colombo, R., De Lorenzi, E.: In vitro amyloid A β 1-42 peptide aggregation monitoring by asymmetrical flow field-flow fractionation with multi-angle light scattering detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 2145–2149 (2009).

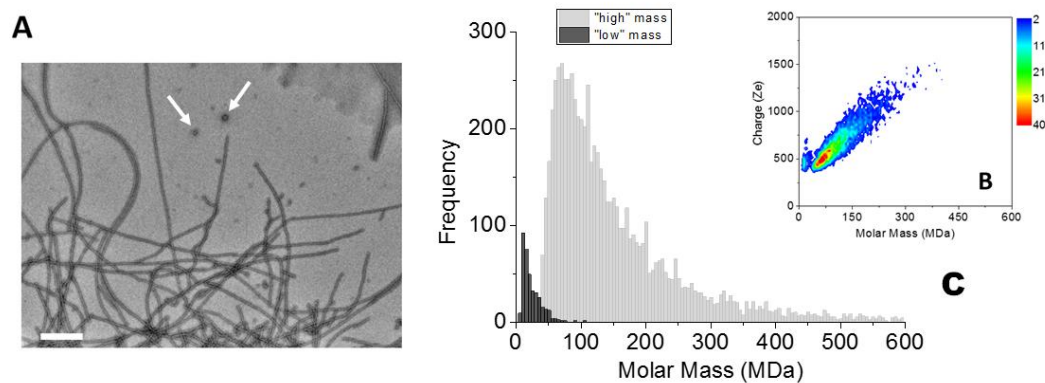


Figure 1: tau fibers. **A)** TEM image of Tau amyloid fibers, scale bar: 200 nm. Typical spherical oligomers are shown with white arrows. **B)** 2D-graph of CD-MS measurements performed on Tau amyloid fiber sample. **C)** Mass distribution drawn from **B)**. The two populations have been distinguished thanks to their different time of flight. The mass distribution is histogrammed using a given bin-size (5 MDa). Each bar represents the number of measured ions whose masses correspond to the mass range of the bin.

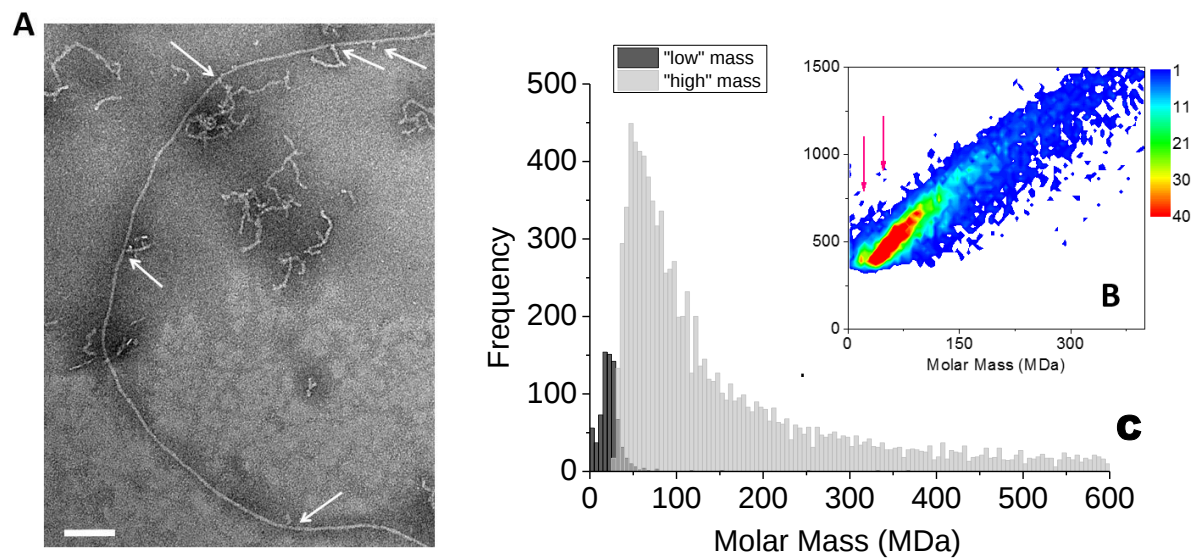


Figure 2: A β ₁₋₄₂ amyloid fibers. **A)** TEM image of A β ₁₋₄₂ amyloid fibers, scale bar: 200 nm. **B)** 2D-graph of CD-MS measurements performed on A β ₁₋₄₂ amyloid fiber sample. **C)** Mass distribution drawn from **B)**. The two populations have been distinguished thanks to their different time of flight. The mass distribution is histogrammed using a given bin-size (5 MDa). Each bar represents the number of measured ions whose masses correspond to the mass range of the bin.

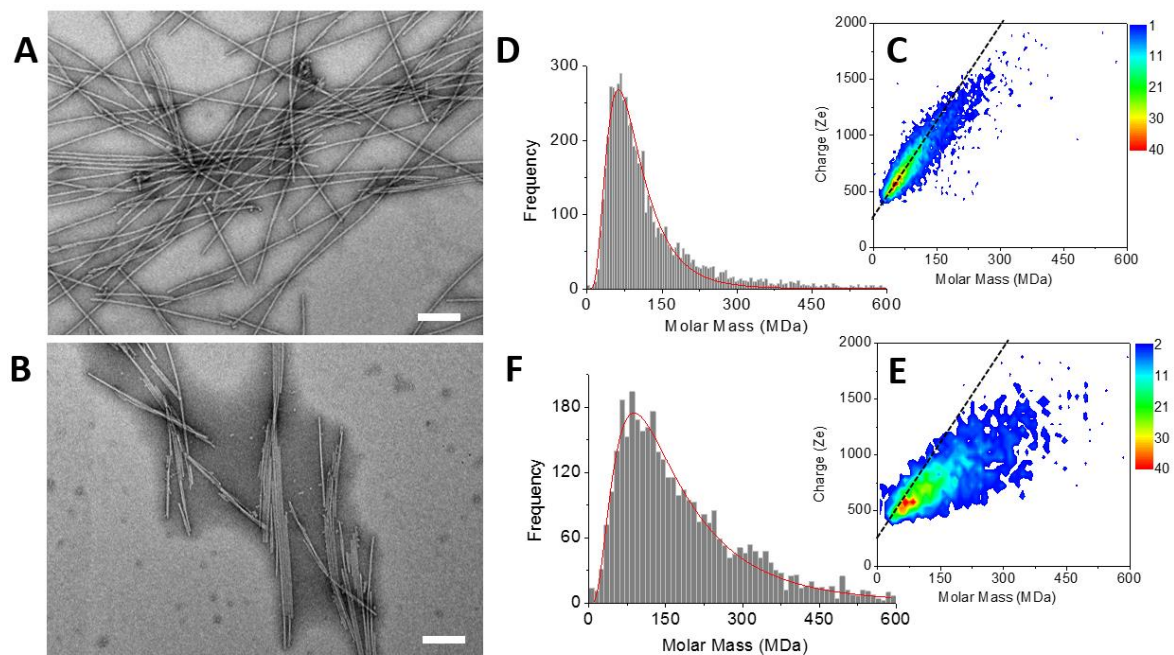


Figure 3: α -synuclein amyloid fibers. (A&B) TEM image of type I (A) and type II (B) α -synuclein amyloid fibers, scale bar: 200 nm. (C&E) 2D-graph of CD-MS measurements performed on type I (C) and type II (E) α -synuclein amyloid fiber sample. (D&F) Mass distribution drawn from C&E for type I (D) and type II (F) α -synuclein amyloid fibers. The mass distribution is histogrammed using a given bin-size (10 MDa). Each bar represents the number of measured ions whose masses correspond to the mass range of the bin.

Material & Methods

A β ₁₋₄₂ peptide: Lyophilized A β ₁₋₄₂ peptide (Genecust, Luxembourg) was dissolved in distilled water at pH 12.0, adjusted with 5 M NaOH. The solution was filtrated through a spin 0.2 μ m membrane filter (Millipore, n°146560) to remove any aggregated species. The solution was stored at -20 °C. A β ₁₋₄₂ fibrils were prepared by incubating monomer A β ₁₋₄₂ peptide solution (final concentration at 100 μ M) in Tyrode's buffer (150 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM HEPES pH 7.4, 10 mM glucose filtrated with a spin 0.2 μ m) at 310°K in a 500 μ L reaction volume on a rotating shaker (300 rpm) at pH 6.5 for 72 hours.

Tau protein: Tau protein was produced using transformed Escherichia coli (BL21 DE3) harbouring full-length cDNA encoding for htau40 protein isoform (gift of INSERM UMR 788 - CHU de Bicêtre France) following the procedure described by Goedert et al. (Goedert et al., 1990 M. Goedert and Jakes / EMBO J. 9 (1990) 4255–4230). After being collected by centrifugation (2500 g for 20 min at 4°C), the cells were suspended in 10 mL of lysis buffer (50 mM PIPES pH 6.8, 50 mM NaCl, 1 mM EGTA, 5 mM DTT, 0.1 mM PMSF) and sonicated on ice (10 times for 20 s, 50 W power). The homogenate was clarified by centrifugation (19000 g for 20 min at 4°C), and the lysate was filtered through successive 0.45 μ m and a 20 μ m membrane filter before injection on column. Purification of the lysate was performed as described by Csokoda *et al.* (*Protein Expression and Purification* 35 (2004) 366–372) by both cation-exchange and size-exclusion chromatography. Tau containing fractions were pooled, submitted to dialysis against 2x2 L of 10 mM ammonium acetate (6 h at 4°C under stirring) and lyophilized.

Fiber formation: Lyophilized hTau40 was dissolved at 110 μ M, in MOPS buffer (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid), 20 mM pH 7.4. The fibrils were prepared in MOPS by adding heparin to hTau40 monomers (molar ratio 1:2.2) at 310°K in a 600 μ L reaction volume on a rotating shaker (300 rpm), pH 7.4 for 72 hours.

Heparin (average molecular mass of 7 kDa), sodium chloride (NaCl, >99.5%), sodium hydroxide (NaOH, 99.99%), 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS, >99.5%) and 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES, 99.5%), were purchased from Sigma-Aldrich (France). Potassium chloride (KCl, 99.5%) was purchased from SDS Carlo Erba (France).

α -Synuclein: Wt human α -Synuclein was expressed in *E coli* and purified according to previously published protocol with few modifications (J Mol Biol. 2002 Sep 13;322(2):383-93.

Dependence of α -synuclein aggregate morphology on solution conditions. Hoyer W1, Antony T, Cherny D, Heim G, Jovin TM, Subramaniam V.). First, *E. coli* cells were lysed by three passages on a French press instead of by successive freeze-thaw cycles and sonication. Secondly, the ammonium sulphate precipitation step was omitted. Finally after the ion-exchange chromatography, the protein was further purified by gel filtration using a Sephacryl-S100HR column and milliQ water was used as running buffer. The protein was lyophilized and stored at -20°C. The integrity of the protein was checked by SDS-PAGE and MS. The purity of the protein was estimated to be higher than 95% based on the densitometry analysis of the SDS-PAGE.

Fibril formation: Lyophilized protein was dissolved into 3mL of 10 mM NaP buffer pH 7,5 containing 100 mM NaCl and 0.1% sodium azide. The solution was filtered through a 0.22 μ m cut-off syringe filter and the concentration of the protein was determined by absorbance measurement at 280 nm from the extinction coefficient ($5960 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$). The protein solution was incubated in a 14 mL polypropylene round-bottom corning falcon tube on a New Brunswick Innova 44 incubator at 37°C under orbital agitation at 226 rpm for 12 days. At given time points (roughly every 24 or 48 h), an aliquot was taken to monitor the formation of amyloid fibrils by thioflavin-T fluorescence using previously published protocol (PLoS One. 2012;7(3):e31253. doi: 10.1371/journal.pone.0031253. Epub 2012 Mar 9. Amyloid-like fibril formation by polyQ proteins: a critical balance between the polyQ length and the constraints imposed by the host protein. Scarafone N1, Pain C, Fratamico A, Gaspard G, Yilmaz N, Filée P, Galleni M, Matagne A, Dumoulin M.)

Negative stain electron microscopy: Fibril suspensions were diluted in buffer to around 1 mg/mL concentration and adsorbed into glow-discharged carbon-coated copper grid for 30 seconds. Grids were stained with 2 % uranyl acetate, dried with filter paper and observed with Phillips CM12 transmission electron microscope.

Atomic Force Microscopy: (AFM). Fibrils were diluted to a final concentration of 17 μ M in ultrapure 18.2 M Ω water and let adsorb over night at 4°C onto plasma O₂ cleaned glass slides. After removal of the solution, the samples were left to dry. Images were recorded at a scanning speed of 0.4 or 0.5 Hz in the tapping mode in air with a Dimension 3100 (Bruker) using Si₃N₄ cantilevers of a spring constant of 0.4 N.m⁻¹, and were analysed using Nanoscope (Bruker).

CDD instrument: In the charge detection device (CDD), the image charge is collected by the "pick-up" tube (high impedance) and is transmitted to a field effect transistor (2SK152). This JFET associated with a preamplifier, converts the current induced voltage. In order to lower the link impedances, the JFET transistor, the preamplifier and the first amplification stage are

mounted on an integrated circuit to the tube. The association with the JFET transistor is provided by a brass screw. And the transmission between the mechanics of the CDD and the PCB is made by a copper rigid connector: in addition to limit ground currents, this rigid link allows to minimize noise. The equivalent capacity of the link between the pick-up tube and the JFET is approximately 1 pF. The entrance and the exit of the pickup tube (stainless tube along 37,5mm and 6 mm in diameter) are capped by tubes of the same inner diameter and 8 mm long. The gap between the end caps and the pick-up tube is 1 mm and allows a fast rise time for the charge image signal.

After the differential amplifier, the resulting output for each ion is a double pulse signal. The first pulse signal is due to the ion entering the detector and the second to the ion exiting the detector. The duration of the signal corresponds to the time of flight (TOF) of the ion through the detector. The TOF of the ion in the 3.75 cm tube is proportional to its m/z value and this gives the ion velocity. The mass m of each macro-ion is obtained from a combination of both z (the charge) and m/z values.

Data processing and analysis: We used a home-developed, VISUAL C++, Windows-based software to record chromatograms. The program calculates the time between the maxima of the positive and negative pulses, the amplitudes of the two pulses and the ratio between their absolute values. A high-frequency filter was added to the data processing of traces in order to remove peak artefacts. Residual droplets are excluded by using post-processing thresholds for TOF ($> 80 \mu\text{s}$). In this work, only ions (with charges higher than $\sim 300 e$) that both enter and exit the tube are counted. Events for which the absolute value of the amplitude ratio between the first and the second pulses is greater than 1.5 or less than 0.75 are automatically excluded. These events may result either from an ion that enters but does not exit the detector (due to fragmentation or loss in the charge detector) or from non-single events including two or more different ions entering the charge detector during a time-of flight measurement. This procedure precludes, in particular, the detection of more than one ion with the charge-detection device. Finally, the corresponding ion counting rate ranges around 100 ions per second.

For each ion, the mass is deduced from its m/z and z values. Each displayed mass distribution compiles about 8,000-10,000 individual ion measurements. The mass distributions are histogrammed using a given bin-size (5 MDa). Each bar represents the number of counted ions having mass corresponding to the mass range of the bar. The shape of the molecular weight distribution (MWD) of fibrils was fitted by a lognormal distribution (

$$P(\ln M) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left[-\frac{\ln^2(M/m_0)}{2\sigma^2}\right], \text{ where } m_0 \text{ is the median and } \sigma \text{ is the width of the distribution.}$$

m_{max} is the mass corresponding to the maximum of the lognormal distribution.

ESI conditions: Briefly, buffered aqueous mother dispersions of fibrils were diluted in a 75/25 water: methanol solvent mixture before injection into the ESI source. Final concentrations range between 25-50 μ M in fibrils. Dispersions were injected at flow rates of typically 0.2-0.6 mL/h, and entered the electrospray chamber through a 0.1 mm internal diameter stainless steel capillary tube located inside the needle tip. Nitrogen gas was injected between the end cap and the transfer glass capillary and was flown through a heater typically set at 200 °C. The vacuum interface was composed of a glass transfer capillary that passes the ions into the first stage of the vacuum system, an end cap, a skimmer between the first and second vacuum stages, a hexapole ion guide and an exit lens. The ESI source generates highly charged macro-ions which are guided by an ionic train to the mass spectrometer. Ions are guided up to a vacuum stage chamber ($\sim 10^{-6}$ mbar) and directed through the CDD.

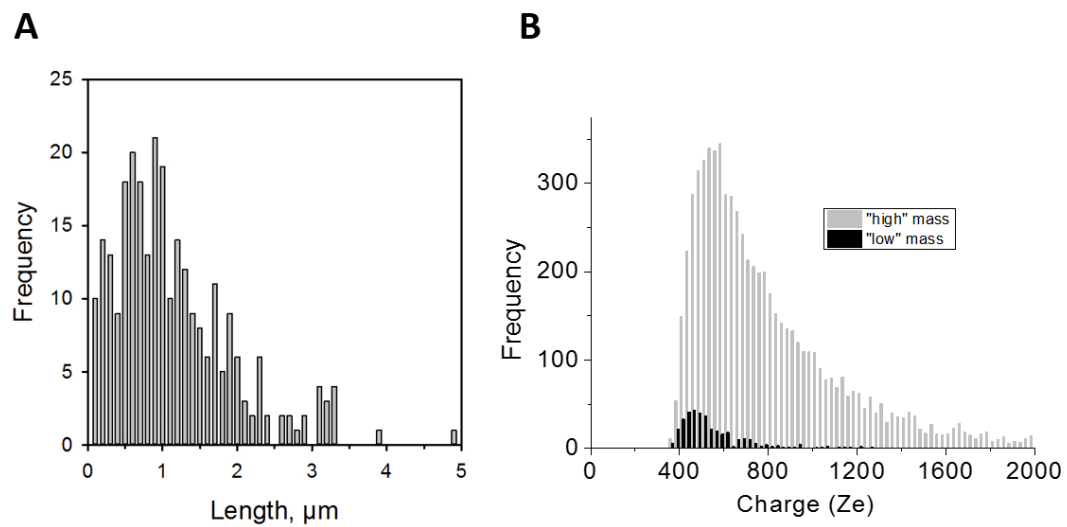


Figure S1: A) Length distribution of Tau amyloid fibers extracted from TEM clichés. **B)** Charge distribution drawn from Figure 1B. The two populations have been distinguished thanks to their different time of flight. The charge distribution is histogrammed using a given bin-size (25 e). Each bar represents the number of measured ions whose charges correspond to the charge range of the bin.

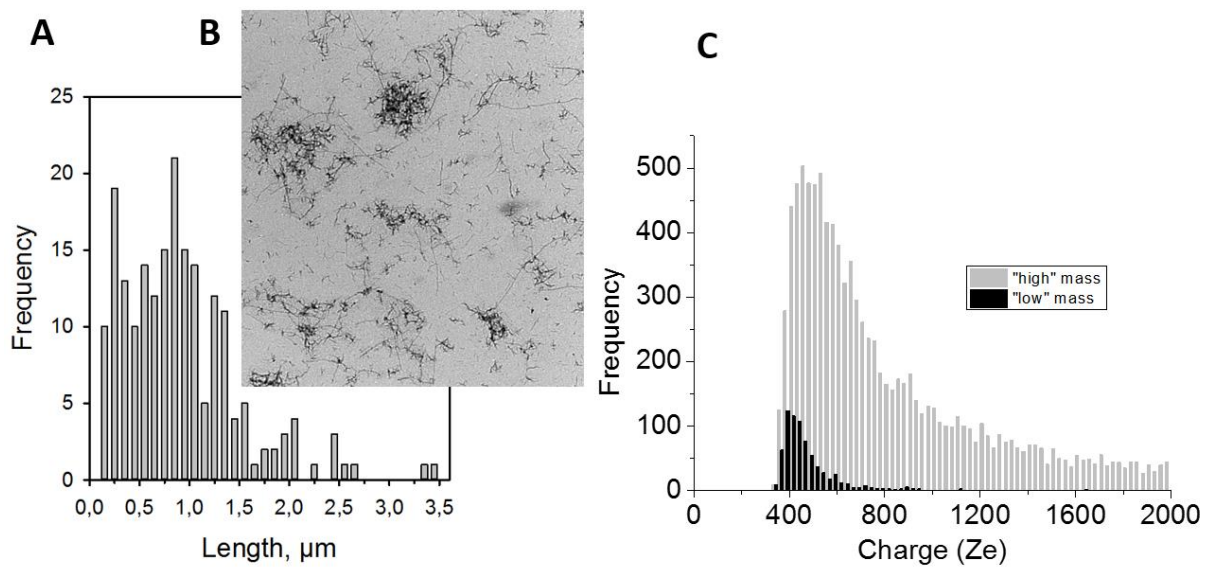


Figure S2: A) Length distribution of $A\beta_{1-42}$ amyloid fibers extracted from TEM clichés. The two types of fibrils were not distinguished for the length distribution. **B)** Low magnification TEM image used for the length distribution; the protofibrils aggregates were not considered for the length distribution. **C)** Charge distribution drawn from Figure 2B. The two populations have been distinguished thanks to their different time of flight. The charge distribution is histogrammed using a given bin-size (25 e). Each bar represents the number of measured ions whose charges correspond to the charge range of the bin.

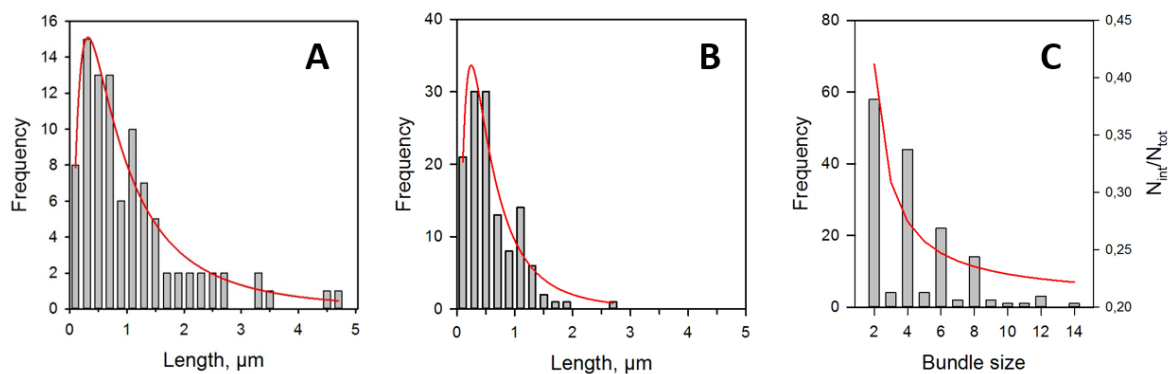


Figure S3: Length distribution of type I (A) and type II (B) α -synuclein amyloid fibers extracted from TEM clichés. The red curve represent the LogNormal function fitting the experimental distribution from which mean length values were extracted (see main text). C) Number of fibers involved in the ribbons. Along well defined ribbons, the number of fibers were determined every 300 nm; this is to overcome the width heterogeneity of the ribbons. The red line corresponds to the evolution of $N_{\text{int}}/N_{\text{tot}}$ as a function of the number of fibers involved in the ribbons, considering a ratio between the two ‘charge vs mass’ graphs equal to 1.7 (see main text).

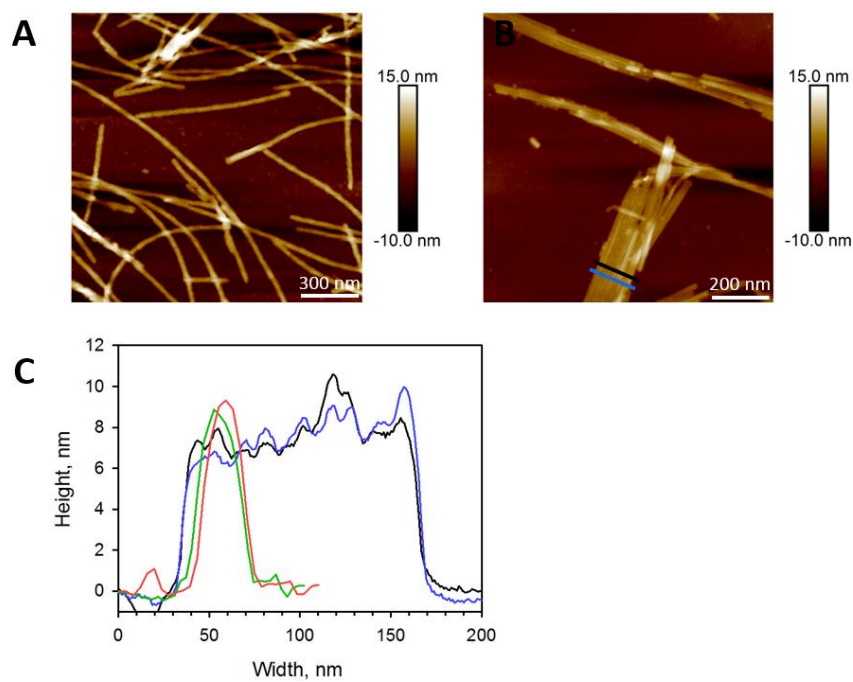


Figure S4: (A&B) AFM images of type I (A) and type II (B) α -synuclein amyloid fibers. C) Typical height profiles extracted from images shown on A) (green and red lines) and B) (black and blue lines).

N_{tot} is the total number of charges on a single fiber

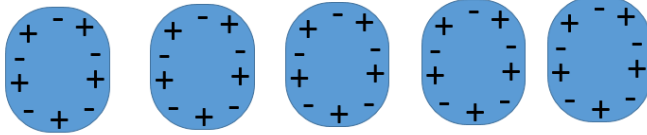
N_{int} is the number of charges within the interface

n is the number of fibers

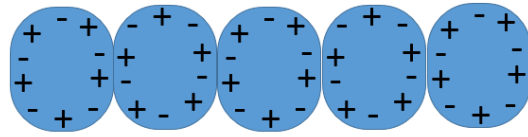
r is the ratio of individual fiber charges/ 2D associated fiber (ribbons) charges;

it is equivalent to the ratio between the slopes of the two associated 'charge vs mass' graphs

Isolated fibers: total charge = $N_{\text{tot}} * n$



Ribbons: total charge = $N_{\text{tot}} + (N_{\text{tot}} - 2 * N_{\text{int}}) * (n - 1)$



$$r = \frac{N_{\text{tot}} * n}{N_{\text{tot}} + (N_{\text{tot}} - 2 * N_{\text{int}}) * (n - 1)}$$

$$\text{then: } \frac{N_{\text{int}}}{N_{\text{tot}}} = \frac{n * (r - 1)}{2 * r * (n - 1)}$$

$$\text{which tends toward: } \frac{(r - 1)}{2 * r} \text{ for } n \gg 1$$

Scheme 1: Effect of ribbon formation on charge density

Bibliographie

1. Pepys, M. B. *et al.* Amyloid P component. A critical review. *Amyloid* **4**, 274–295 (1997).
2. Amyloid Formation, Protein Homeostasis, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annual Review of Biochemistry* **86**, null (2017).
3. Jd, S. & As, C. Review: history of the amyloid fibril. *J Struct Biol* **130**, 88–98 (2000).
4. Cohen, A. S. in *Amyloidosis* (eds. Marrink, J. & M.D, M. H. V. R.) 3–19 (Springer Netherlands, 1986).
5. Sipe, J. D. *et al.* Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid* **23**, 209–213 (2016).
6. Finch, C. E. & Cohen, D. M. Aging, Metabolism, and Alzheimer Disease: Review and Hypotheses. *Experimental Neurology* **143**, 82–102 (1997).
7. Carney, J. M. *et al.* Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl-alpha-phenylnitron. *PNAS* **88**, 3633–3636 (1991).
8. Murrell, J., Farlow, M. *et al.* A Mutation in the Amyloid Precursor Protein Associated with Hereditary Alzheimer's Disease. *Science* **254**, 97 (1991).
9. World Alzheimer Report 2016 | Alzheimer's Disease International. Available at: <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2016>. (Accessed: 9th March 2017)
10. Sink, K. M., Holden, K. F. & Yaffe, K. Pharmacological Treatment of Neuropsychiatric Symptoms of Dementia: A Review of the Evidence. *JAMA* **293**, 596–608 (2005).
11. Berchtold, N. C. & Cotman, C. W. Evolution in the Conceptualization of Dementia and Alzheimer's Disease: Greco-Roman Period to the 1960s. *Neurobiology of Aging* **19**, 173–189 (1998).
12. Lewis, J. *et al.* Enhanced Neurofibrillary Degeneration in Transgenic Mice Expressing Mutant Tau and APP. *Science* **293**, 1487–1491 (2001).
13. Bennett, D. A., Schneider, J. A., Wilson, R. S., Bienias, J. L. & Arnold, S. E. Neurofibrillary Tangles Mediate the Association of Amyloid Load With Clinical Alzheimer Disease and Level of Cognitive Function. *Arch Neurol* **61**, 378–384 (2004).
14. Feany, M. B. & Dickson, D. W. Neurodegenerative disorders with extensive tau pathology: A comparative study and review. *Ann Neurol*. **40**, 139–148 (1996).

15. Butterfield, S. M. & Lashuel, H. A. Amyloidogenic Protein–Membrane Interactions: Mechanistic Insight from Model Systems. *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 5628–5654 (2010).
16. Mattson, M. P. Pathways towards and away from Alzheimer’s disease. *Nature* **430**, 631–639 (2004).
17. Van der Kant, R. & Goldstein, L. S. B. Cellular Functions of the Amyloid Precursor Protein from Development to Dementia. *Developmental Cell* **32**, 502–515 (2015).
18. Kamal, A., Almenar-Queral, A., LeBlanc, J. F., Roberts, E. A. & Goldstein, L. S. B. Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing β -secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* **414**, 643–648 (2001).
19. Iwatsubo, T. *et al.* Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: Evidence that an initially deposited species is A β 42(43). *Neuron* **13**, 45–53 (1994).
20. Singh, M. *et al.* Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection. *European Journal of Medicinal Chemistry* **70**, 165–188 (2013).
21. Chang, W.-P. *et al.* In vivo inhibition of A β production by memapsin 2 (β -secretase) inhibitors. *Journal of Neurochemistry* **89**, 1409–1416 (2004).
22. Désiré, L. *et al.* Blood Transcriptomic Biomarkers of Alzheimer’s Disease Patients Treated with EHT 0202. *Journal of Alzheimer’s Disease* **34**, 469–483 (2013).
23. Izzo, N. J. *et al.* Alzheimer’s Therapeutics Targeting Amyloid Beta 1–42 Oligomers II: Sigma-2/PGRMC1 Receptors Mediate Abeta 42 Oligomer Binding and Synaptotoxicity. *PLOS ONE* **9**, e111899 (2014).
24. Franco, R. & Cedazo-Minguez, A. Successful therapies for Alzheimer’s disease: why so many in animal models and none in humans? *Front. Pharmacol.* **5**, (2014).
25. Imbimbo, B. P. *et al.* Solanezumab for the treatment of mild-to-moderate Alzheimer’s disease. *Expert Review of Clinical Immunology* **8**, 135–149 (2012).
26. Lilly Announces Top-Line Results of Solanezumab Phase 3 Clinical Trial (NYSE:LLY). Available at: <https://investor.lilly.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=1000871>. (Accessed: 9th March 2017)
27. Schlienger, J.-L. Complications du diabète de type 2. *La Presse Médicale* **42**, 839–848 (2013).

28. Group, T. A. to C. C. R. in D. S. Effects of Intensive Glucose Lowering in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine* **358**, 2545–2559 (2008).
29. Goldstein, B. J. & Mueller-Wieland, D. *Type 2 Diabetes: Principles and Practice, Second Edition*. (CRC Press, 2016).
30. Sladek, R. *et al.* A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* **445**, 881–885 (2007).
31. IDF diabetes atlas - Home. Available at: <http://www.diabetesatlas.org/>. (Accessed: 9th March 2017)
32. Yin, M., Augustin, B., Shu, C., Qin, T. & Yin, P. Probit Models to Investigate Prevalence of Total Diagnosed and Undiagnosed Diabetes among Aged 45 Years or Older Adults in China. *PLOS ONE* **11**, e0164481 (2016).
33. Harris, M. I. & Eastman, R. C. Early detection of undiagnosed diabetes mellitus: a US perspective. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **16**, 230–236 (2000).
34. Nouwen, A. *et al.* Prevalence of Depression in Individuals With Impaired Glucose Metabolism or Undiagnosed Diabetes. *Diabetes Care* **34**, 752–762 (2011).
35. Am, A. History of diabetes mellitus. *Saudi Med J* **23**, 373–378 (2002).
36. Ludvik, B., Kautzky-Willer, A., Prager, R., Thomaseth, K. & Pacini, G. Amylin: History and Overview. *Diabet. Med.* **14**, S9–S13 (1997).
37. Shigihara, N. *et al.* Human IAPP-induced pancreatic β cell toxicity and its regulation by autophagy. *J Clin Invest* **124**, 3634–3644 (2014).
38. Lorenzo, A., Razzaboni, B., Weir, G. C. & Yankner, B. A. Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus. *Nature* **368**, 756–60 (1994).
39. O'Brien, T. D., Butler, P. C., Westermarck, P. & Johnson, K. H. Islet Amyloid Polypeptide: A Review of Its Biology and Potential Roles in the Pathogenesis of Diabetes Mellitus. *Veterinary Pathology* **30**, 317–332 (1993).
40. Costes, S., Langen, R., Gurlo, T., Matveyenko, A. V. & Butler, P. C. β -Cell Failure in Type 2 Diabetes: A Case of Asking Too Much of Too Few? *Diabetes* **62**, 327–335 (2013).
41. Molina, J. M., Cooper, G. J. S., Leighton, B. & Olefsky, J. M. Induction of Insulin Resistance In Vivo by Amylin and Calcitonin Gene-Related Peptide. *Diabetes* **39**, 260–265 (1990).

42. F, L., F, L., N, P., M, B. & A, Z. Chronic kidney disease in type 2 diabetic patients followed-up by primary care physicians in Switzerland: prevalence and prescription of antidiabetic drugs. *Swiss Med Wkly* **146**, w14282–w14282 (2016).
43. Inzucchi, S. E., Lipska, K. J., Mayo, H., Bailey, C. J. & McGuire, D. K. Metformin in Patients With Type 2 Diabetes and Kidney Disease: A Systematic Review. *JAMA* **312**, 2668–2675 (2014).
44. Adams, D., Théaudin, M., Cauquil, C., Algalarrondo, V. & Slama, M. FAP Neuropathy and Emerging Treatments. *Curr Neurol Neurosci Rep* **14**, 435 (2014).
45. Holmgren, G., Ando, Y., Wikström, L., Rydh, A. & Suhr, O. Discordant symptoms in monozygotic twins with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) (TTR Met 30). *Amyloid* **4**, 178–180 (1997).
46. Reinés, J. B. *et al.* Epidemiology of transthyretin-associated familial amyloid polyneuropathy in the Majorcan area: Son Llàtzer Hospital descriptive study. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **9**, 29 (2014).
47. Ando, Y., Nakamura, M. & Araki, S. Transthyretin-Related Familial Amyloidotic Polyneuropathy. *Arch Neurol* **62**, 1057–1062 (2005).
48. Parman, Y., Adams, D., Obici, L. *et al.* Sixty years of transthyretin familial amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) in Europe: where are we now? A European network approach to defining the epidemiology and management patterns for TTR-FAP. *Current opinion in neurology*, **29**(Suppl 1), S3. (2016)
49. Sousa, A., Coelho, T., Barros, J. & Sequeiros, J. Genetic epidemiology of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP)-type I in Póvoa do Varzim and Vila do Conde (north of Portugal). *Am. J. Med. Genet.* **60**, 512–521 (1995).
50. Araki, S., Mawatari, S., Ohta, M., Nakajima, A. & Kuroiwa, Y. Polyneuritic Amyloidosis in a Japanese Family. *Arch Neurol* **18**, 593–602 (1968).
51. Holmgren, G. *et al.* Geographical distribution of TTR met30 carriers in northern Sweden: discrepancy between carrier frequency and prevalence rate. *Journal of Medical Genetics* **31**, 351–354 (1994).
52. DEFINING TTR-FAP: EPIDEMIOLOGY. Available at: <http://www.recognizingttr-fap.com/epidemiology>. (Accessed: 9th March 2017)
53. Andrade, C. A peculiar form of peripheral neuropathy. *Brain*, **75**(3), 408-427 (1952).

54. Vieira, M. & Saraiva, M. J. Transthyretin: a multifaceted protein. *BioMolecular Concepts* **5**, 45–54 (2014).
55. Mendes Sousa, M., Cardoso, I., Fernandes, R., Guimarães, A. & Saraiva, M. J. Deposition of Transthyretin in Early Stages of Familial Amyloidotic Polyneuropathy: Evidence for Toxicity of Nonfibrillar Aggregates. *The American Journal of Pathology* **159**, 1993–2000 (2001).
56. Sörgjerd, K., Klingstedt, T., Lindgren, M., Kågedal, K. & Hammarström, P. Prefibrillar transthyretin oligomers and cold stored native tetrameric transthyretin are cytotoxic in cell culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **377**, 1072–1078 (2008).
57. Teixeira, C. A., Almeida, M. do R. & Saraiva, M. J. Impairment of autophagy by TTR V30M aggregates: in vivo reversal by TUDCA and curcumin. *Clinical Science* **130**, 1665–1675 (2016).
58. Holmgren, G. *et al.* Clinical improvement and amyloid regression after liver transplantation in hereditary transthyretin amyloidosis. *The Lancet* **341**, 1113–1116 (1993).
59. Coelho, T. *et al.* Safety and Efficacy of RNAi Therapy for Transthyretin Amyloidosis. *New England Journal of Medicine* **369**, 819–829 (2013).
60. Bulawa, C. E. *et al.* Tafamidis, a potent and selective transthyretin kinetic stabilizer that inhibits the amyloid cascade. *PNAS* **109**, 9629–9634 (2012).
61. Planté-Bordeneuve, V. *et al.* Long-term treatment of transthyretin familial amyloid polyneuropathy with tafamidis: a clinical and neurophysiological study. *J Neurol* **264**, 268–276 (2017).
62. Sinha, S. *et al.* Lysine-Specific Molecular Tweezers Are Broad-Spectrum Inhibitors of Assembly and Toxicity of Amyloid Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 16958–16969 (2011).
63. Sumner Makin, O. & Serpell, L. C. Structural Characterisation of Islet Amyloid Polypeptide Fibrils. *Journal of Molecular Biology* **335**, 1279–1288 (2004).
64. Modler, A. J., Gast, K., Lutsch, G. & Damaschun, G. Assembly of Amyloid Protofibrils via Critical Oligomers—A Novel Pathway of Amyloid Formation. *Journal of Molecular Biology* **325**, 135–148 (2003).
65. Astbury, W. T., Dickinson, S. & Bailey, K. The X-ray interpretation of denaturation and the structure of the seed globulins. *Biochem J* **29**, 2351–2360.1 (1935).

66. Harper, J. D., Wong, S. S., Lieber, C. M. & Lansbury, P. T. Observation of metastable A β amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chemistry & Biology* **4**, (1997).
67. Wetzel, R. Ideas of Order for Amyloid Fibril Structure. *Structure* **10**, 1031–1036 (2002).
68. Eisenberg, D. & Jucker, M. The Amyloid State of Proteins in Human Diseases. *Cell* **148**, 1188–1203 (2012).
69. Jiménez, J. L. *et al.* The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *PNAS* **99**, 9196–9201 (2002).
70. Khurana, R. *et al.* A General Model for Amyloid Fibril Assembly Based on Morphological Studies Using Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal* **85**, 1135–1144 (2003).
71. Makin, O. S. & Serpell, L. C. Structures for amyloid fibrils. *FEBS Journal* **272**, 5950–5961 (2005).
72. Balbirnie, M., Grothe, R. & Eisenberg, D. S. An amyloid-forming peptide from the yeast prion Sup35 reveals a dehydrated β -sheet structure for amyloid. *PNAS* **98**, 2375–2380 (2001).
73. Altamura, L. *et al.* A synthetic redox biofilm made from metalloprotein–prion domain chimera nanowires. *Nat Chem* **9**, 157–163 (2017).
74. Serpell, L. C. *et al.* The protofilament substructure of amyloid fibrils1. *Journal of Molecular Biology* **300**, 1033–1039 (2000).
75. Pedersen, J. S., Andersen, C. B. & Otzen, D. E. Amyloid structure – one but not the same: the many levels of fibrillar polymorphism. *FEBS Journal* **277**, 4591–4601 (2010).
76. Pansieri, J. *et al.* Gd-nanoparticles functionalization with specific peptides for β -amyloid plaques targeting. *Journal of Nanobiotechnology* **14**, 60 (2016).
77. Lemkul, J. A. & Bevan, D. R. The Role of Molecular Simulations in the Development of Inhibitors of Amyloid β -Peptide Aggregation for the Treatment of Alzheimer’s Disease. *ACS Chem. Neurosci.* **3**, 845–856 (2012).
78. Liou, Y.-C., Tocilj, A., Davies, P. L. & Jia, Z. Mimicry of ice structure by surface hydroxyls and water of a β -helix antifreeze protein. *Nature* **406**, 322–324 (2000).
79. Jahn, T. R. & Radford, S. E. Folding versus aggregation: Polypeptide conformations on competing pathways. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **469**, 100–117 (2008).

80. O’Nuallain, B., Williams, A. D., Westermarck, P. & Wetzel, R. Seeding Specificity in Amyloid Growth Induced by Heterologous Fibrils. *J. Biol. Chem.* **279**, 17490–17499 (2004).
81. Cohen, S. I. A. *et al.* Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *PNAS* **110**, 9758–9763 (2013).
82. Kell, D. B. & Pretorius, E. Proteins behaving badly. Substoichiometric molecular control and amplification of the initiation and nature of amyloid fibril formation: lessons from and for blood clotting. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **123**, 16–41 (2017).
83. Danielsson, J., Andersson, A., Jarvet, J. & Gräslund, A. 15N relaxation study of the amyloid β -peptide: structural propensities and persistence length. *Magn. Reson. Chem.* **44**, S114–S121 (2006).
84. Ferrone, F. A., Hofrichter, J. & Eaton, W. A. Kinetics of sickle hemoglobin polymerization:II. A double nucleation mechanism. *Journal of Molecular Biology* **183**, (1985).
85. Kumar, S. & Udgaonkar, J. B. Mechanisms of amyloid fibril formation by proteins. *Current Science (00113891)* **98**, 639–656 (2010).
86. Greenwald, J. *et al.* The Mechanism of Prion Inhibition by HET-S. *Molecular Cell* **38**, 889–899 (2010).
87. Fowler, D. M. *et al.* Functional Amyloid Formation within Mammalian Tissue. *PLOS Biology* **4**, e6 (2005).
88. Chapman, M. R. *et al.* Role of Escherichia coli Curli Operons in Directing Amyloid Fiber Formation. *Science* **295**, 851–855 (2002).
89. Si, K., Choi, Y.-B., White-Grindley, E., Majumdar, A. & Kandel, E. R. Aplysia CPEB Can Form Prion-like Multimers in Sensory Neurons that Contribute to Long-Term Facilitation. *Cell* **140**, 421–435 (2010).
90. Pike, C. J., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G. & Cotman, C. W. In vitro aging of β -amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Research* **563**, 311–314 (1991).
91. Reixach, N., Deechongkit, S., Jiang, X., Kelly, J. W. & Buxbaum, J. N. Tissue damage in the amyloidoses: Transthyretin monomers and nonnative oligomers are the major cytotoxic species in tissue culture. *PNAS* **101**, 2817–2822 (2004).

92. Kaye, R. *et al.* Common Structure of Soluble Amyloid Oligomers Implies Common Mechanism of Pathogenesis. *Science* **300**, 486–489 (2003).
93. Hardy, J. & Selkoe, D. J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* **297**, 353–356 (2002).
94. Lue, L.-F. *et al.* Soluble Amyloid β Peptide Concentration as a Predictor of Synaptic Change in Alzheimer's Disease. *The American Journal of Pathology* **155**, 853–862 (1999).
95. Rushworth, J. V. & Hooper, N. M. Lipid Rafts: Linking Alzheimer's Amyloid- β ; Production, Aggregation, and Toxicity at Neuronal Membranes. *International Journal of Alzheimer's Disease* **2011**, e603052 (2010).
96. Tripathi, S. & Jeremic, A. M. Clustering and Internalization of Toxic Amylin Oligomers in Pancreatic Cells Require Plasma Membrane Cholesterol. *J. Biol. Chem.* **286**, 36086–36097 (2011).
97. Kaye, R. & Lasagna-Reeves, C. A. Molecular Mechanisms of Amyloid Oligomers Toxicity. *Journal of Alzheimer's Disease* **33**, S67–S78 (2013).
98. Marek, P. *et al.* Aromatic Interactions Are Not Required for Amyloid Fibril Formation by Islet Amyloid Polypeptide but Do Influence the Rate of Fibril Formation and Fibril Morphology. *Biochemistry* **46**, 3255–3261 (2007).
99. Olofsson, A., Sauer-Eriksson, A. E. & Öhman, A. The Solvent Protection of Alzheimer Amyloid- β -(1–42) Fibrils as Determined by Solution NMR Spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **281**, 477–483 (2006).
100. Hureau, C. Coordination of redox active metal ions to the amyloid precursor protein and to amyloid- β peptides involved in Alzheimer disease. Part 1: An overview. *Coordination Chemistry Reviews* **256**, 2164–2174 (2012).
101. Hou, L. *et al.* Solution NMR Studies of the A β (1–40) and A β (1–42) Peptides Establish that the Met35 Oxidation State Affects the Mechanism of Amyloid Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 1992–2005 (2004).
102. Gorevic, P. D., Castano, E. M., Sarma, R. & Frangione, B. Ten to fourteen residue peptides of Alzheimer's disease protein are sufficient for amyloid fibril formation and its characteristic x-ray diffraction pattern. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **147**, (1987).
103. Tjernberg, L. O. *et al.* A Molecular Model of Alzheimer Amyloid β -Peptide Fibril Formation. *J. Biol. Chem.* **274**, 12619–12625 (1999).

104. Lansbury, P. T. *et al.* Structural model for the β -amyloid fibril based on interstrand alignment of an antiparallel-sheet comprising a C-terminal peptide. *Nat Struct Mol Biol* **2**, 990–998 (1995).
105. Halverson, K., Fraser, P. E., Kirschner, D. A. & Lansbury, P. T. Molecular determinants of amyloid deposition in Alzheimer's disease: conformational studies of synthetic beta-protein fragments. *Biochemistry* **29**, 2639–2644 (1990).
106. Pike, C. J., Burdick, D., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G. & Cotman, C. W. Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J. Neurosci.* **13**, 1676–1687 (1993).
107. Hilbich, C., Kisters-Woike, B., Reed, J., Masters, C. L. & Beyreuther, K. Substitutions of hydrophobic amino acids reduce the amyloidogenicity of Alzheimer's disease beta A4 peptides. *J. Mol. Biol.* **228**, 460–473 (1992).
108. Hetényi, C., Körtvélyesi, T. & Penke, B. Mapping of Possible Binding Sequences of Two Beta-Sheet Breaker Peptides on Beta Amyloid Peptide of Alzheimer's Disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **10**, 1587–1593 (2002).
109. Lührs, T. *et al.* 3D structure of Alzheimer's amyloid- β (1–42) fibrils. *PNAS* **102**, 17342–17347 (2005).
110. Jiang, D., Rauda, I., Han, S., Chen, S. & Zhou, F. Aggregation Pathways of the Amyloid β (1–42) Peptide Depend on Its Colloidal Stability and Ordered β -Sheet Stacking. *Langmuir* **28**, 12711–12721 (2012).
111. Tomaselli, S. *et al.* The α -to- β Conformational Transition of Alzheimer's A β -(1–42) Peptide in Aqueous Media is Reversible: A Step by Step Conformational Analysis Suggests the Location of β Conformation Seeding. *ChemBioChem* **7**, 257–267 (2006).
112. Petkova, A. T. *et al.* A structural model for Alzheimer's β -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *PNAS* **99**, 16742–16747 (2002).
113. Xiao, Y. *et al.* A β (1-42) fibril structure illuminates self-recognition and replication of amyloid in Alzheimer's disease. *Nat Struct Mol Biol* **22**, 499–505 (2015).
114. Cao, P. *et al.* Islet amyloid: From fundamental biophysics to mechanisms of cytotoxicity. *FEBS Letters* **587**, 1106–1118 (2013).
115. Buchanan, L. E. *et al.* Mechanism of IAPP amyloid fibril formation involves an intermediate with a transient β -sheet. *PNAS* **110**, 19285–19290 (2013).

116. Mo, Y., Lei, J., Sun, Y., Zhang, Q. & Wei, G. Conformational Ensemble of hIAPP Dimer: Insight into the Molecular Mechanism by which a Green Tea Extract inhibits hIAPP Aggregation. *Sci Rep* **6**, (2016).
117. Dunkelberger, E. B. *et al.* Deamidation Accelerates Amyloid Formation and Alters Amylin Fiber Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 12658–12667 (2012).
118. Koo, B. W., Hebda, J. A. & Miranker, A. D. Amide inequivalence in the fibrillar assembly of islet amyloid polypeptide. *Protein Eng Des Sel* **21**, 147–154 (2008).
119. Ramirez-Alvarado, M., Kelly, J. W. & Dobson, C. M. *Protein Misfolding Diseases: Current and Emerging Principles and Therapies*. (John Wiley & Sons, 2010).
120. Wang, C. *et al.* Observation of molecular inhibition and binding structures of amyloid peptides. *Nanoscale* **4**, 1895–1909 (2012).
121. Westermark, P., Engström, U., Johnson, K. H., Westermark, G. T. & Betsholtz, C. Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation. *PNAS* **87**, 5036–5040 (1990).
122. Wiltzius, J. J. W. *et al.* Atomic structure of the cross- β spine of islet amyloid polypeptide (amylin). *Protein Science* **17**, 1467–1474 (2008).
123. Liu, K., Kelly, J. W. & Wemmer, D. E. Native State Hydrogen Exchange Study of Suppressor and Pathogenic Variants of Transthyretin. *Journal of Molecular Biology* **320**, 821–832 (2002).
124. Saelices, L. *et al.* Uncovering the Mechanism of Aggregation of Human Transthyretin. *J. Biol. Chem.* **290**, 28932–28943 (2015).
125. Quintas, A., Saraiva, M. j. . & Brito, R. M. . The amyloidogenic potential of transthyretin variants correlates with their tendency to aggregate in solution. *FEBS Letters* **418**, 297–300 (1997).
126. Das, J. K., Mall, S. S., Bej, A. & Mukherjee, S. Conformational Flexibility Tunes the Propensity of Transthyretin to Form Fibrils Through Non-Native Intermediate States. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 12781–12784 (2014).
127. Takaoka, Y. *et al.* Cysteine 10 Is a Key Residue in Amyloidogenesis of Human Transthyretin Val30Met. *The American Journal of Pathology* **164**, 337–345 (2004).
128. Terry, C. J. *et al.* Structure of Met30 variant of transthyretin and its amyloidogenic implications. *EMBO J* **12**, 735–741 (1993).

129. Azevedo, E., Silva, P. F., Palhano, F., A. Braga, C. & Foguel, D. Transthyretin-Related Amyloidoses: A Structural and Thermodynamic Approach. doi:10.5772/53148 (2013).
130. Hammarström, P., Jiang, X., Hurshman, A. R., Powers, E. T. & Kelly, J. W. Sequence-dependent denaturation energetics: A major determinant in amyloid disease diversity. *PNAS* **99**, 16427–16432 (2002).
131. Jaroniec, C. P. *et al.* High-resolution molecular structure of a peptide in an amyloid fibril determined by magic angle spinning NMR spectroscopy. *PNAS* **101**, 711–716 (2004).
132. Lim, K. H. *et al.* Structural Changes Associated with Transthyretin Misfolding and Amyloid Formation Revealed by Solution and Solid-State NMR. *Biochemistry* **55**, 1941–1944 (2016).
133. Jarvis, J. A., Craik, D. J. & Wilce, M. C. J. X-ray diffraction studies of fibrils formed from peptide fragments of transthyretin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **192**, 991–998 (1993).
134. Paci, E., Gsponer, J., Salvatella, X. & Vendruscolo, M. Molecular Dynamics Studies of the Process of Amyloid Aggregation of Peptide Fragments of Transthyretin. *Journal of Molecular Biology* **340**, 555–569 (2004).
135. James, M. L. & Gambhir, S. S. A Molecular Imaging Primer: Modalities, Imaging Agents, and Applications. *Physiological Reviews* **92**, 897–965 (2012).
136. Frid, P., Anisimov, S. V. & Popovic, N. Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Brain Research Reviews* **53**, 135–160 (2007).
137. Wu, C., Wang, Z., Lei, H., Zhang, W. & Duan, Y. Dual Binding Modes of Congo Red to Amyloid Protofibril Surface Observed in Molecular Dynamics Simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 1225–1232 (2007).
138. Khurana, R., Uversky, V. N., Nielsen, L. & Fink, A. L. Is Congo Red an Amyloid-specific Dye? *J. Biol. Chem.* **276**, 22715–22721 (2001).
139. Hasegawa, M. in *Dementia with Lewy Bodies* (ed. Kosaka, K.) 41–55 (Springer Japan, 2017).
140. Styren, Scot D., Hamilton, R. L., Styren, G. C. & Klunk, W. E. X-34, A Fluorescent Derivative of Congo Red: A Novel Histochemical Stain for Alzheimer's Disease Pathology. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **48**, 1223–1232 (2000).
141. Vassar, P. S. & Culling, C. F. Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues. *Archives of pathology* **68**, 487–498 (1959).

142. Sigurdsson, E. M., Frangione, B. & Wisniewski, T. Immunization for Alzheimer's disease. *Drug Dev. Res.* **56**, 135–142 (2002).
143. Kim, J. E. & Lee, M. Fullerene inhibits β -amyloid peptide aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **303**, 576–579 (2003).
144. Krebs, M. R. H., Bromley, E. H. C. & Donald, A. M. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *Journal of Structural Biology* **149**, 30–37 (2005).
145. Biancalana, M. & Koide, S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1804**, 1405–1412 (2010).
146. Wu, C., Bowers, M. T. & Shea, J.-E. On the Origin of the Stronger Binding of PIB over Thioflavin T to Protofibrils of the Alzheimer Amyloid- β Peptide: A Molecular Dynamics Study. *Biophysical Journal* **100**, 1316–1324 (2011).
147. Lee, S.-P. *et al.* 11C-Pittsburgh B PET Imaging in Cardiac Amyloidosis. *JACC: Cardiovascular Imaging* **8**, 50–59 (2015).
148. Golde, T. E., Petrucelli, L. & Lewis, J. Targeting A β and tau in Alzheimer's disease, an early interim report. *Experimental Neurology* **223**, 252–266 (2010).
149. Eberling, J. L., Dave, K. D. & Frasier, M. A. α -synuclein Imaging: A Critical Need for Parkinson's Disease Research. *Journal of Parkinson's Disease* **3**, 565–567 (2013).
150. Becker, J. A. *et al.* Amyloid- β associated cortical thinning in clinically normal elderly. *Ann Neurol.* **69**, 1032–1042 (2011).
151. Yamin, G. & Teplow, D. B. Pittsburgh Compound-B (PiB) binds amyloid β -protein protofibrils. *J. Neurochem.* **140**, 210–215 (2017).
152. Lemoine, L., Ingelsson, M., Nennesmo, I., Gillberg, P.-G. & Nordberg, A. In vitro characterization of fibrillar amyloid, tau deposits, and activated astrocytes in Arctic APP and sporadic Alzheimer's disease brain using, 3H-PIB and 3H-THK5117 and 3H-Deprenyl in comparison to immunostaining. *Neurobiology of Aging* **39**, S15 (2016).
153. Beckett, T. L. *et al.* Postmortem Pittsburgh Compound B (PiB) Binding Increases with Alzheimer's Disease Progression. *Journal of Alzheimer's Disease* **32**, 127–138 (2012).
154. Jack, C. R. *et al.* 11C PiB and structural MRI provide complementary information in imaging of Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Brain* **131**, 665–680 (2008).

155. Aizenstein, H. J. *et al.* Frequent Amyloid Deposition Without Significant Cognitive Impairment Among the Elderly. *Arch Neurol* **65**, 1509–1517 (2008).
156. Rapezzi, C. *et al.* Role of ^{99m}Tc-DPD Scintigraphy in Diagnosis and Prognosis of Hereditary Transthyretin-Related Cardiac Amyloidosis. *JACC: Cardiovascular Imaging* **4**, 659–670 (2011).
157. Villemagne, V. L. *et al.* Longitudinal assessment of A β and cognition in aging and Alzheimer disease. *Ann Neurol* **69**, 181–192 (2011).
158. Krantic, S. Editorial (Thematic Issue: From Current Diagnostic Tools and Therapeutics for Alzheimer’s Disease Towards Earlier Diagnostic Markers and Treatment Targets). *Current Alzheimer Research* **14**, 2–5 (2017).
159. Hamers-Casterman, C. *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**, 446–448 (1993).
160. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annual Review of Biochemistry* **82**, 775–797 (2013).
161. Siontorou, C. G. Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy. *Int J Nanomedicine* **8**, 4215–4227 (2013).
162. Caljon, G. *et al.* Using microdialysis to analyse the passage of monovalent nanobodies through the blood–brain barrier. *British Journal of Pharmacology* **165**, 2341–2353 (2012).
163. Domanska, K. *et al.* Atomic structure of a nanobody-trapped domain-swapped dimer of an amyloidogenic β 2-microglobulin variant. *PNAS* **108**, 1314–1319 (2011).
164. Muyldermans, S. Single domain camel antibodies: current status. *Reviews in Molecular Biotechnology* **74**, 277–302 (2001).
165. Vuchelen, A. *et al.* ¹H, ¹³C and ¹⁵N assignments of a camelid nanobody directed against human α -synuclein. *Biomol NMR Assign* **3**, 231 (2009).
166. Habicht, G. *et al.* Directed selection of a conformational antibody domain that prevents mature amyloid fibril formation by stabilizing A β protofibrils. *PNAS* **104**, 19232–19237 (2007).
167. Haupt, C. *et al.* Pattern Recognition with a Fibril-Specific Antibody Fragment Reveals the Surface Variability of Natural Amyloid Fibrils. *Journal of Molecular Biology* **408**, 529–540 (2011).

168. Haupt, C. *et al.* Amyloid Fibril Recognition with the Conformational B10 Antibody Fragment Depends on Electrostatic Interactions. *Journal of Molecular Biology* **405**, 341–348 (2011).
169. Mishra, S. & Palanivelu, K. The effect of curcumin (turmeric) on Alzheimer's disease: An overview. *Annals of Indian Academy of Neurology* **11**, 13 (2008).
170. Yang, F. *et al.* Curcumin Inhibits Formation of Amyloid β Oligomers and Fibrils, Binds Plaques, and Reduces Amyloid in Vivo. *J. Biol. Chem.* **280**, 5892–5901 (2005).
171. Horrobin, D. F. U.S. Patent No. 4,996,233. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. Method of reducing porphyrin toxicity using fatty acids (1991).
172. Zheng, X. *et al.* Amyloid β -Protein Assembly: The Effect of Molecular Tweezers CLR01 and CLR03. *J. Phys. Chem. B* **119**, 4831–4841 (2015).
173. Attar, A., Chan, W.-T. C., Klärner, F.-G., Schrader, T. & Bitan, G. Safety and pharmacological characterization of the molecular tweezer CLR01 – a broad-spectrum inhibitor of amyloid proteins' toxicity. *BMC Pharmacology and Toxicology* **15**, 23 (2014).
174. Farrar, C. T., William, C. M., Hudry, E., Hashimoto, T. & Hyman, B. T. RNA Aptamer Probes as Optical Imaging Agents for the Detection of Amyloid Plaques. *PLOS ONE* **9**, e89901 (2014).
175. Tsukakoshi, K., Abe, K., Sode, K. & Ikebukuro, K. Selection of DNA Aptamers That Recognize α -Synuclein Oligomers Using a Competitive Screening Method. *Anal. Chem.* **84**, 5542–5547 (2012).
176. Markoutsas, E., Papadia, K., Clemente, C., Flores, O. & Antimisiaris, S. G. Anti-A β -MAB and dually decorated nanoliposomes: Effect of A β 1-42 peptides on interaction with hCMEC/D3 cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **81**, 49–56 (2012).
177. Aileen Funke, S. & Willbold, D. Peptides for Therapy and Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Current Pharmaceutical Design* **18**, 755–767 (2012).
178. Moss, M. A., Nichols, M. R., Reed, D. K., Hoh, J. H. & Rosenberry, T. L. The Peptide KLVFF-K6 Promotes β -Amyloid(1–40) Protofibril Growth by Association but Does Not Alter Protofibril Effects on Cellular Reduction of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT). *Mol Pharmacol* **64**, 1160–1168 (2003).

179. Larbanoix, L. *et al.* Design and evaluation of a 6-mer amyloid-beta protein derived phage display library for molecular targeting of amyloid plaques in Alzheimer's disease: Comparison with two cyclic heptapeptides derived from a randomized phage display library. *Peptides* **32**, 1232–1243 (2011).
180. Kang, C. K., Jayasinha, V. & Martin, P. T. Identification of peptides that specifically bind A β 1–40 amyloid in vitro and amyloid plaques in Alzheimer's disease brain using phage display. *Neurobiology of Disease* **14**, 146–156 (2003).
181. Wei, C.-W. *et al.* Synthesis and evaluation of ferrocenoyl pentapeptide (Fc-KLVFF) as an inhibitor of Alzheimer's A β 1–42 fibril formation in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **21**, 5818–5821 (2011).
182. Cairo, C. W., Strzelec, A., Murphy, R. M. & Kiessling, L. L. Affinity-Based Inhibition of β -Amyloid Toxicity. *Biochemistry* **41**, 8620–8629 (2002).
183. Kino, R., Araya, T., Arai, T., Sohma, Y. & Kanai, M. Covalent modifier-type aggregation inhibitor of amyloid- β based on a cyclo-KLVFF motif. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **25**, 2972–2975 (2015).
184. Breitenkamp, K., Skaff, H., & Sill, K. N. *U.S. Patent No. 7,618,944*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office (2009).
185. Olmedo, I. *et al.* How Changes in the Sequence of the Peptide CLPFFD-NH₂ Can Modify the Conjugation and Stability of Gold Nanoparticles and Their Affinity for β -Amyloid Fibrils. *Bioconjugate Chem.* **19**, 1154–1163 (2008).
186. Jang, H. *et al.* In vivo magnetic resonance and fluorescence dual imaging of tumor sites by using dye-doped silica-coated iron oxide nanoparticles. *J Nanopart Res* **18**, 41 (2016).
187. Banerjee, A., Qi, J., Gogoi, R., Wong, J. & Mitragotri, S. Role of nanoparticle size, shape and surface chemistry in oral drug delivery. *Journal of Controlled Release* **238**, 176–185 (2016).
188. Reymond, S. *et al.* Internalization of iron nanoparticles by macrophages for the improvement of glioma treatment. in (2016).
189. Modi, G. *et al.* Nanotechnological applications for the treatment of neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology* **88**, 272–285 (2009).
190. De Vries, I. J. M. *et al.* Magnetic resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy. *Nat Biotech* **23**, 1407–1413 (2005).

191. Estelrich, J., Escribano, E., Queralto, J. & Busquets, M. A. Iron Oxide Nanoparticles for Magnetically-Guided and Magnetically-Responsive Drug Delivery. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 8070–8101 (2015).
192. Wadghiri, Y. Z. *et al.* Detection of Alzheimer's amyloid in transgenic mice using magnetic resonance microimaging. *Magn. Reson. Med.* **50**, 293–302 (2003).
193. Xi, D. *et al.* Gold nanoparticles as computerized tomography (CT) contrast agents. *RSC Advances* **2**, 12515–12524 (2012).
194. Choi, J., Jae Choi, H., Chul Jung, D., Lee, J.-H. & Cheon, J. Nanoparticle assisted magnetic resonance imaging of the early reversible stages of amyloid β self-assembly. *Chemical Communications* **0**, 2197–2199 (2008).
195. Tokuraku, K., Marquardt, M. & Ikezu, T. Real-Time Imaging and Quantification of Amyloid- β Peptide Aggregates by Novel Quantum-Dot Nanoprobes. *PLOS ONE* **4**, e8492 (2009).
196. Cabaleiro-Lago, C. *et al.* Inhibition of Amyloid β Protein Fibrillation by Polymeric Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 15437–15443 (2008).
197. Cabaleiro-Lago, C., Quinlan-Pluck, F., Lynch, I., Dawson, K. A. & Linse, S. Dual Effect of Amino Modified Polystyrene Nanoparticles on Amyloid β Protein Fibrillation. *ACS Chem. Neurosci.* **1**, 279–287 (2010).
198. Liong, M. *et al.* Multifunctional Inorganic Nanoparticles for Imaging, Targeting, and Drug Delivery. *ACS Nano* **2**, 889–896 (2008).
199. Hülsemann, M. *et al.* Biofunctionalized Silica Nanoparticles: Standards in Amyloid- β Oligomer-Based Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* **54**, 79–88 (2016).
200. Pihlasalo, S. *et al.* Luminometric Nanoparticle-Based Assay for High Sensitivity Detection of β -Amyloid Aggregation. *Anal. Chem.* **89**, 2398–2404 (2017).
201. Sancey, L. *et al.* The use of theranostic gadolinium-based nanoprobes to improve radiotherapy efficacy. *BJR* **87**, 20140134 (2014).
202. Sancey, L. *et al.* Long-Term in Vivo Clearance of Gadolinium-Based AGuIX Nanoparticles and Their Biocompatibility after Systemic Injection. *ACS Nano* **9**, 2477–2488 (2015).
203. Lux, F. *et al.* Ultrasmall Rigid Particles as Multimodal Probes for Medical Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 12299–12303 (2011).

204. Radiosensitization of Multiple Brain Metastases Using AGuIX Gadolinium Based Nanoparticles - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02820454>. (Accessed: 10th March 2017)
205. Truillet, C. *et al.* Ultrasmall particles for Gd-MRI and 68Ga-PET dual imaging. *Contrast Media Mol. Imaging* **10**, 309–319 (2015).
206. Boesch, C. Molecular aspects of magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Molecular Aspects of Medicine* **20**, 185–318 (1999).
207. Rosa-Neto, P., & Leuzy, A. Imagerie moléculaire en TEP dans la maladie d’Alzheimer. http://www.stacomcommunications.com/customcomm/Backissue_pages/AD_Review/adPDFs/2008/janvier2008/18.pdf. (Accessed: 10th March 2017)
208. Erasmus, L. J., Hurter, D., Naude, M., Kritzing, H. G. & Acho, S. A short overview of MRI artefacts : review article. *SA Journal of Radiology* **8**, 13–17 (2004).
209. CEA. L’imagerie médicale. *CEA/Découvrir & Comprendre* (2017). Available at: <http://www.cea.fr/comprendre/Pages%2fsante-sciences-du-vivant%2fessentiel-sur-imagerie-medecale.aspx>. (Accessed: 10th March 2017)
210. Frisoni, G. B., Fox, N. C., Jack, C. R., Scheltens, P. & Thompson, P. M. The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* **6**, 67–77 (2010).
211. Higuchi, M. *et al.* 19F and 1H MRI detection of amyloid β plaques in vivo. *Nat Neurosci* **8**, 527–533 (2005).
212. Lee, S.-P., Falangola, M. F., Nixon, R. A., Duff, K. & Helpert, J. A. Visualization of β -amyloid plaques in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease using MR microscopy without contrast reagents. *Magn. Reson. Med.* **52**, 538–544 (2004).
213. Marty, B. *et al.* Dynamic Study of Blood–Brain Barrier Closure after its Disruption using Ultrasound: A Quantitative Analysis. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **32**, 1948–1958 (2012).
214. Tonini, A., Dusart, L. & Ponchaux, F. Reconnaissance des émotions faciales et raisonnement social dans le vieillissement normal, le MCI et la maladie d’Alzheimer. *NPG Neurologie - Psychiatrie - Gériatrie* **16**, 171–176 (2016).
215. Moses, W. W. Fundamental limits of spatial resolution in PET. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* **648**, Supplement 1, S236–S240 (2011).

216. Small, G. W. *et al.* Apolipoprotein E Type 4 Allele and Cerebral Glucose Metabolism in Relatives at Risk for Familial Alzheimer Disease. *JAMA* **273**, 942–947 (1995).
217. Mallik, A., Drzezga, A. & Minoshima, S. Clinical Amyloid Imaging. *Seminars in Nuclear Medicine* **47**, 31–43 (2017).
218. Rodell, A. B., O’Keefe, G., Rowe, C. C., Villemagne, V. L. & Gjedde, A. Cerebral Blood Flow and A β -Amyloid Estimates by WARM Analysis of [11C]PiB Uptake Distinguish among and between Neurodegenerative Disorders and Aging. *Front. Aging Neurosci.* **8**, (2017).
219. Trivieri, M. G. *et al.* 18F-Sodium Fluoride PET/MR for the Assessment of Cardiac Amyloidosis. *Journal of the American College of Cardiology* **68**, 2712–2714 (2016).
220. Nordeman, P. *et al.* 11C and 18F Radiolabeling of Tetra- and Pentathiophenes as PET-Ligands for Amyloid Protein Aggregates. *ACS Med. Chem. Lett.* **7**, 368–373 (2016).
221. Dupont, A.-C., Santiago Ribeiro, M.-J., Guilloteau, D. & Arlicot, N. β -amyloid PET neuroimaging: A review of radiopharmaceutical development. *Médecine Nucléaire* doi:10.1016/j.mednuc.2016.12.002 (2017).
222. Yoshimura, M., Ono, M., Watanabe, H., Kimura, H. & Saji, H. Feasibility of Amylin Imaging in Pancreatic Islets with β -Amyloid Imaging Probes. *Sci Rep* **4**, (2014).
223. Maya, Y. *et al.* Preclinical properties and human in vivo assessment of 123 I-ABC577 as a novel SPECT agent for imaging amyloid- β . *Brain* **139**, 193–203 (2016).
224. Hu, S., Yan, P., Maslov, K., Lee, J.-M. & Wang, L. V. Intravital imaging of amyloid plaques in a transgenic mouse model using optical-resolution photoacoustic microscopy. *Opt. Lett., OL* **34**, 3899–3901 (2009).
225. Martí-Bonmatí, L., Sopena, R., Bartumeus, P. & Sopena, P. Multimodality imaging techniques. *Contrast Media Mol Imaging* **5**, 180–189 (2010).
226. McMillan, C. T. *et al.* Multimodal imaging evidence of pathology-mediated disease distribution in corticobasal syndrome. *Neurology* **87**, 1227–1234 (2016).
227. Cabeza, C. for C. N. R., Nyberg, L. & Park, D. C. *Cognitive Neuroscience of Aging: Linking Cognitive and Cerebral Aging*. (Oxford University Press, 2016).
228. Teipel, S. *et al.* Multimodal imaging in Alzheimer’s disease: validity and usefulness for early detection. *The Lancet Neurology* **14**, 1037–1053 (2015).

229. Boxer, A. L. *et al.* Amyloid imaging in distinguishing atypical prion disease from Alzheimer disease. *Neurology* **69**, 283–290 (2007).
230. Maezawa, I. *et al.* Congo red and thioflavin-T analogs detect A β oligomers. *Journal of Neurochemistry* **104**, 457–468 (2008).
231. Vivès, E., Brodin, P. & Lebleu, B. A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus. *J. Biol. Chem.* **272**, 16010–16017 (1997).
232. Wulf, E., Deboben, A., Bautz, F. A., Faulstich, H. & Wieland, T. Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin. *PNAS* **76**, 4498–4502 (1979).
233. Ni, R., Gillberg, P.-G., Bergfors, A., Marutle, A. & Nordberg, A. Amyloid tracers detect multiple binding sites in Alzheimer's disease brain tissue. *Brain* **136**, 2217–2227 (2013).
234. Goetz, J. *et al.* Ultrabright Lanthanide Nanoparticles. *ChemPlusChem* **81**, 526–534 (2016).
235. Larrat, B., Pernot, M., Montaldo, G., Fink, M. & Tanter, M. MR-guided adaptive focusing of ultrasound. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* **57**, 1734–1747 (2010).
236. Marsac, L. *et al.* MR-guided adaptive focusing of therapeutic ultrasound beams in the human head. *Med. Phys.* **39**, 1141–1149 (2012).
237. Carpentier, A. *et al.* Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound. *Science Translational Medicine* **8**, 343re2–343re2 (2016).
238. Lichtman, J. W. & Conchello, J.-A. Fluorescence microscopy. *Nat Meth* **2**, 910–919 (2005).
239. Pinotsi, D., Buell, A. K., Dobson, C. M., Kaminski Schierle, G. S. & Kaminski, C. F. A label-free, quantitative assay of amyloid fibril growth based on intrinsic fluorescence. *Chembiochem* **14**, 846–850 (2013).
240. S. Chan, F. T. *et al.* Protein amyloids develop an intrinsic fluorescence signature during aggregation. *Analyst* **138**, 2156–2162 (2013).
241. Pinotsi, D. *et al.* Proton Transfer and Structure-Specific Fluorescence in Hydrogen Bond-Rich Protein Structures. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 3046–3057 (2016).
242. Valeur, B. *Invitation à la fluorescence moléculaire.* (De Boeck Supérieur, 2004).

243. Hanczyc, P., Samoc, M. & Norden, B. Multiphoton absorption in amyloid protein fibres. *Nat Photon* **7**, 969–972 (2013).
244. Thirumalai, D., Reddy, G. & Straub, J. E. Role of Water in Protein Aggregation and Amyloid Polymorphism. *Acc. Chem. Res.* **45**, 83–92 (2012).
245. Bordier, C. Diffusion de la lumière par des tissus biologiques : Etude expérimentale et modélisation par l'équation de transfert radiatif vectorielle. (Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2007).
246. Sun, Y.-P. *et al.* Quantum-Sized Carbon Dots for Bright and Colorful Photoluminescence. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 7756–7757 (2006).
247. Li, X., Zhang, S., Kulinich, S. A., Liu, Y. & Zeng, H. Engineering surface states of carbon dots to achieve controllable luminescence for solid-luminescent composites and sensitive Be²⁺ detection. *Sci Rep* **4**, (2014).
248. Liu, R. *et al.* An Aqueous Route to Multicolor Photoluminescent Carbon Dots Using Silica Spheres as Carriers. *Angewandte Chemie* **121**, 4668–4671 (2009).
249. Peptide and Amino Acid Quantification Using UV Fluorescence in Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader. Available at: <http://www.biotek.com/resources/articles/peptides-amino-acids-fluorescence.html>. (Accessed: 10th March 2017)
250. Pujadas, L. *et al.* Reelin delays amyloid-beta fibril formation and rescues cognitive deficits in a model of Alzheimer's disease. *Nature Communications* **5**, 3443 (2014).
251. Whitmore, L. & Wallace, B. A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* **32**, W668–W673 (2004).
252. Plissonneau, M. Vectorisation de nanoparticules d'imagerie multimodale à base de gadolinium pour un ciblage actif des plaques amyloïdes et de cellules hépatocytes. (Université Claude Bernard - Lyon I, 2015).

Résumé

Les amyloïdoses sont des maladies caractérisées par l'agrégation structurée de protéines, sous forme de fibres amyloïdes. Le diagnostic précoce de ces maladies représente un enjeu important, pour la prise en charge de nombreuses pathologies associées. Dans ce travail, nous avons montré le ciblage et la détection de plusieurs fibres amyloïdes, de l'*in vitro* à l'*in vivo*. Pour cela, nous avons utilisé des nanoparticules multimodales pour l'imagerie médicale (TEP, IRM), greffées avec diverses molécules ciblant les fibres. Trois types de fibres amyloïdes ont été testées, formées à partir du peptide amyloïde β (maladie d'Alzheimer), d'amyline (diabète de type 2), et de la transthyréine (polyneuropathie familiale). Comme montré par des techniques de spectroscopie et de résonance plasmonique de surface (fluorescence et Biacore), des nanoparticules génériques (dû au greffage du Pittsburgh compound B ou d'un nanocorps) ciblent avec une bonne affinité les trois types de fibres *in vitro*, tandis que des nanoparticules spécifiques (dû au greffage de peptides) ciblent avec une affinité moindre les fibres d'amyloïde β ou de transthyréine. Le ciblage et la détection des dépôts amyloïdes par les nanoparticules ont été confirmés par microscopie à fluorescence, sur des tissus de souris présentant chacune des trois maladies. Le suivi par imageries *in vivo* (par IRM) et *post-mortem* (par microscopie optique), après injection de nanoparticules génériques chez la souris Alzheimer, supposent un ciblage des dépôts amyloïdes intracérébraux. Par ailleurs, nous avons détecté les fibres amyloïdes sans aucun marquage. Des études spectroscopiques *in vitro* ont permis de montrer des propriétés luminescentes intrinsèques des fibres amyloïdes, dans l'UV-visible et le proche infrarouge. Ces caractéristiques ont été observées sur des coupes de tissus de cerveau de souris Alzheimer par microscopie à fluorescence, et les études *in vivo* en cours semblent prometteuses (par imagerie photoacoustique, et en temps résolu). Que cela soit par l'utilisation de nanoparticules fonctionnalisées multimodales, ou de propriétés intrinsèques des fibres amyloïdes suggérant une détection complètement non-invasive, ces deux stratégies innovantes semblent adaptées pour le diagnostic précoce des amyloïdoses chez l'Homme.

Abstract

Amyloidosis are diseases characterized by self-aggregation of misfolded proteins in fibrillary forms, called amyloid fibrils. They are associated with many diseases, and their early diagnosis remains a clinical challenge. In this work, we show the targeting and the detection of amyloid fibrils, from *in vitro* to *in vivo* experiments in mice models, useful for early diagnostic of amyloidosis. For that purpose, we use multimodal nanoparticles, further functionalized with specific molecules against amyloid fibrils. This multimodality for imaging (fluorescence, MRI, PET) represent a breakthrough in modern medicine, to add structural and functional information. After negative toxicity tests on various cell lines, these nanoparticles have been tested on three different amyloid fibrils, formed with amyloid β (1-42) peptide (Alzheimer's disease), amylin (type II diabetes mellitus), or mutated Val30Met transthyretin (familial polyneuropathy). As it is shown by spectroscopy and surface plasmon resonance experiments, nanoparticles grafted with generic targeters (Pittsburgh compound B or a nanobody) target the three amyloid fibrils, with good affinity, whereas nanoparticles vectorised with peptides show specific targeting for amyloid β (1-42) or Val30Met mutated transthyretin, but with lower affinity. The targeting by nanoparticles have been confirmed *ex vivo* on pathological tissues with each amyloid burden, thanks to fluorescence microscopy. Generic nanoparticles have been injected in Alzheimer's mice model, and the monitoring *in vivo* by IRM and *post-mortem* by optical microscopy supposed a targeting of amyloid β (1-42) aggregates in brain. Furthermore, we demonstrate the possibility to detect amyloid fibrils without labelling. Spectroscopic measurements show original, and specific optical properties of amyloid fibrils, around the UV-visible and the near infra-red regions. Interestingly, these properties are also observed on pathological tissues by *ex vivo* fluorescence microscopy, and *in vivo* ongoing analysis by photoacoustic imagery and real-time imaging seems to be very promising. By multimodality of non-toxic grafted nanoparticles or by intrinsic properties of amyloid fibrils suggesting completely non-invasive tests, these two strategies can be useful for early diagnostic of amyloïdoses in humans.