



HAL
open science

Développement de techniques physiques et chimiques pour l'étude et l'inhibition de l'oligomérisation et de l'agrégation de IAPP : intérêt dans le diabète de type II

Corentin Berardet

► To cite this version:

Corentin Berardet. Développement de techniques physiques et chimiques pour l'étude et l'inhibition de l'oligomérisation et de l'agrégation de IAPP : intérêt dans le diabète de type II. Chimie analytique. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS445 . tel-03030245

HAL Id: tel-03030245

<https://theses.hal.science/tel-03030245>

Submitted on 30 Nov 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.

Développement de techniques physiques et chimiques pour l'étude et l'inhibition de l'oligomérisation et de l'agrégation de hIAPP : intérêt dans le diabète de type II

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°569 - Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : Chimie thérapeutique

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 29 Novembre 2018, par

Corentin Berardet

Composition du Jury :

Sophie LECOMTE <i>Directeur de recherches, Université de Bordeaux (UMR CNRS 5248)</i>	Rapporteur
Yannis FRANCOIS <i>Maître de conférences, Université de Strasbourg (UMR CNRS 7140)</i>	Rapporteur
Virginie REDEKER <i>Chargée de recherches, Université Paris-Sud (UMR CNRS 9197)</i>	Examineur
Olivier LEQUIN <i>Professeur, Sorbonne Université (UMR CNRS 7203)</i>	Président
Sandrine ONGERI <i>Professeur, Université Paris-Sud (UMR CNRS 8076)</i>	Directrice de thèse
Myriam TAVERNA <i>Professeur, Université Paris-Sud (UMR CNRS 8612)</i>	Co-directrice de thèse
Julia KAFFY <i>Maître de conférences, Université Paris-Sud (UMR CNRS 8076)</i>	Invitée

Remerciements

Je tiens tout d'abord à adresser mes plus sincères remerciements à mes deux directrices de thèse, les professeurs Sandrine Onger et Myriam Taverna pour leur confiance et leur écoute attentive tout au long de ce projet à la thématique très actuelle. Vos expertises scientifiques et le temps précieux que vous m'avez consacré m'ont été d'une grande aide pour ce travail. La complémentarité de vos compétences m'a permis de mêler le domaine de la chimie thérapeutique et celui de la chimie analytique afin de mener à bien ce captivant projet. Merci pour tout ce que vous m'aurez apporté tant sur le plan scientifique que sur le plan personnel de par votre expérience, votre bienveillance et votre écoute.

Je remercie les membres de mon jury qui me font l'honneur d'avoir accepté de juger ce travail de thèse, et tout particulièrement le Dr Yannis François pour m'avoir conseillé sur les directions à prendre pour ce travail durant mon comité de mi-thèse.

Un projet de thèse interdisciplinaire comme celui-ci est loin d'être un travail individuel. Il a principalement été mené entre deux équipes de recherches, ainsi qu'en collaboration avec deux autres, et je souhaite ainsi remercier toutes les personnes que j'ai pu côtoyées et qui ont rendu ce travail possible.

Je tiens à remercier le Dr Julia Kaffy pour son aide au quotidien. Tes conseils et ta patience m'ont aidé à faire les bons choix dans ce travail.

Ce projet de thèse a été pour moi l'occasion d'encadrer deux étudiants : Sébastien Oster et Arnold Takam. Je vous remercie pour votre aide dans ce travail, et vous souhaite le meilleur pour la réalisation de vos différents projets.

Un grand merci au Pr Guillaume Van der Rest et au Dr Frédéric Halgand pour l'aide précieuse que vous m'avez apportée en mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse. Merci pour le temps que vous avez consacré à m'apprendre cette technique et à m'aider avec les nombreux résultats obtenus.

Merci au Pr Sylviane Lesieur pour son aide pour la synthèse des liposomes. Merci à Julien Massiot (futur docteur à l'heure où j'écris ces lignes) pour son aide pratique lors de la synthèse.

Merci à Cédric Crosnier de Lassichère pour son aide et son expertise dans le marquage fluorescent de peptide amyloïde.

Ces trois années de thèse m'ont également permis de rencontrer de nombreuses personnes au sein des différents laboratoires. Des avancées scientifiques, idées, perspectives ont été le fruit de ces rencontres, tant sur le plan scientifique qu'humain.

Merci aux membres de l'équipe FLUOPEPIT « Molécules fluorées et peptides d'intérêt thérapeutique » : Jean-Louis Soulier, Benoît Crousse, Thierry Milcent et Tâp Ha-Duong. Vos conseils avisés m'ont permis

de mieux intégrer les problématiques de la chimie thérapeutique dans mon projet. Même si ma présence au laboratoire a été limitée, j'ai beaucoup appris lors de nos discussions.

Merci également aux membres de l'équipe PNAS « Proteins and Nanotechnology in Analytical Sciences » : Claire Smadja, Thuy Tran et Duc Mai. Ce fut un immense plaisir de partager ces trois années avec vous, tant sur le plan scientifique qu'humain (et culinaire). Les enseignements dispensés à vos côtés ont été très formateurs pour moi.

Je remercie d'ailleurs tous les membres des équipes pédagogiques qui m'ont accueilli pour leur soutien et leur confiance lors de ces trois années de monitorat, qui resteront comme une des excellentes expériences de ma thèse.

Merci aux personnels administratifs qui nous simplifient la vie au quotidien : Marie-Claude Anmella et Agnès Berton.

Merci à Yasmine pour la formation sur l'électrophorèse capillaire, tu m'as fait gagner un temps précieux. Bonne chance pour ta thèse ! Merci à Faustine pour la collaboration fructueuse que nous avons eue dans ce projet. Merci pour avoir contribué à donner une dimension supplémentaire à ma thèse. Je te souhaite beaucoup de réussite pour tes projets futurs, scientifiques ou non.

Merci aux doctorants qui m'ont accueilli lors de mon arrivée au laboratoire et qui m'ont intégré à son fonctionnement : Nacéra, Jeanne, Nicolò, Monica et Duc (à une époque où tu n'étais « que » post-doc et déjà si précieux au laboratoire). Je tiens à remercier également tous les étudiants stagiaires, doctorants et post-doctorants que j'ai pu côtoyer au cours de ma thèse avec qui j'ai pu collaborer de près ou de loin durant ces trois années : Emmanuel, Cédric, Minh, Marta, Maud, Etienne et Grégory. Bon courage à ceux qui approchent de la rédaction finale et aux petits nouveaux Marco et Émilie. La relève du labo est assurée avec vous ! Un grand merci à JB, Julien et Alex qui sont devenus de réels amis au-delà du laboratoire, ainsi qu'à Marion qui m'a accompagné dans cette jolie aventure qu'est la thèse.

Merci à mes compatriotes lyonnais Coralie et Arthur qui ont partagé ces trois ans avec moi. Après près de 10 ans à se côtoyer et à forger une belle amitié, il est désormais temps pour chacun de découvrir de nouveaux horizons. Je vous souhaite beaucoup de réussite pour tous vos projets, et je ne doute pas qu'on se reverra très prochainement.

Je souhaite adresser un immense merci à mes parents et à ma petite sœur. Merci de m'avoir laissé évoluer librement jusqu'à ce doctorat et de m'avoir fait confiance. Merci pour votre soutien sans faille. Je vous avais bien dit que « *ça irait* » ! Justine, bon courage pour la fin de tes études !

Merci à tous mes amis d'être restés proches malgré la distance : Toinou, Philou, Mass, Co, Kek, Lélé, Guillaume, Lucile (bon courage pour la fin de ta rédaction !), Ju, Nico... Merci d'avoir toujours été là même si mon temps sur Lyon a été plus que limité depuis trois ans. Merci à mes cousins/cousines pour leur présence et tous les bons moments que nous partageons à Paris, Lyon ou la Boissière : Virginie, Steph, Mélanie, Charles, Emilie, Bertrand...

Curriculum Vitae

Formation :

- **Ingénieur** CPE Lyon (2009-2015), dont un an à Scynexis, Inc (Caroline du Nord, Etats-Unis, 2013-2014)
- **Master 2** Analyse et Contrôle à l'Université Claude Bernard Lyon 1 (2014-2015)
- **Doctorat** et enseignements (192h, TP et TD) en Chimie analytique à la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay (2015-2018)

Communications orales :

- *A CE-based method for the analysis of hIAPP oligomers involved in type 2 diabetes and the screening of aggregation inhibitors* ; Microscale Separations and Bioanalysis (MSB) conference ; Noordwijkerhout, Pays-Bas (26-29 Mars 2017)
- *Dissociation of hIAPP oligomers during mass spectrometry analysis: an obstacle to the study of toxic species in type 2 diabetes* ; LabEx LERMIT symposium ; Orsay, France (14 Décembre 2017)

Posters :

- *A set of analytical tools for the screening of hIAPP anti-aggregation compounds: towards new treatments of type 2 diabetes* ; Copenhagen Symposium on Separation Sciences (CSSS) ; Copenhagen, Danemark (26-27 Juin 2018)
- *Développement de techniques analytiques basées sur l'électrophorèse capillaire pour l'identification des espèces impliquées dans le processus pathologique du diabète de type 2* ; Journées scientifiques du club CE ; Paris, France (17-18 Mai 2018)
- *A set of analytical tools for the study of the oligomerization and aggregation of hIAPP: interest in type 2 diabetes* ; ULLA summer school ; Leuven, Belgique (8-15 Juillet 2017)

Publication scientifique :

- C. Berardet, J. Kaffy, S. Ongeri, M. Taverna, A capillary zone electrophoresis method to investigate the oligomerization of the human Islet Amyloid Polypeptide involved in Type 2 Diabetes, *J Chrom A* (2018), doi: 10.1016/j.chroma.2018.10.006

Activité professionnelle : Chercheur en chimie analytique chez Adocia (Lyon) à partir du 5 Novembre 2018

Table des abréviations

Toutes les abréviations utilisées ont été conservées en anglais.

AA	Acide aminé
ACN	Acétonitrile
A β	Amyloïde β
AFM	Microscopie à force atomique
BPA	Bisphénol A
CCS	Section de collision efficace
CD	Dichroïsme circulaire
CE	Electrophorèse capillaire
COSY	Correlation spectroscopy
CR	Rouge Congo
CSF	Liquide céphalo-rachidien
CZE	Electrophorèse capillaire de zone
DHPC	1,2-diheptanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DMPC	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOPC	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DOPE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
DOPG	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol
DOPS	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoserine
EGCG	Epigallocatechine gallate
ESI	Ionisation électrospray
FDA	Food & Drug administration
FGAIL	Séquence de nucléation de hIAPP
HCl	Acide chlorhydrique
HFIP	Hexafluoroisopropanol
hIAPP	Islet Amyloid Polypeptide (humain)
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HPGO	Hyperglycémie provoquée orale
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
IMS	Spectroscopie de mobilité ionique
KLVFF	Séquence de nucléation de A β ₁₋₄₂
LIF	Fluorescence induite par laser
mIAPP	Islet Amyloid Polypeptide (souris)
MS	Spectrométrie de masse

NEB	4-[2-(2-naphthyl)-(E)-ethenyl]-benzyl(triphenyl)phosphonium bromide
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy
PAGE	Gel polyacrylamide
PBS	Tampon phosphate salin
p-FTAA	Forme pentamérique du formyl thiophène acide acétique
PM	Pramlintide
ppm	Partie par million
rIAPP	Islet Amyloid Polypeptide (rat)
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RT	Température ambiante
RX	Rayons X
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique
T2D	Diabète de type 2
TDA	Dispersion de Taylor
TEM	Microscopie électronique à transmission
ThT	Thioflavine T
UV	Ultra-violet
WT	Wild type

Table des matières

Remerciements	
Tables des abréviations	
Tables des matières	
Introduction générale	1
Références bibliographiques – Introduction générale	6
Partie bibliographique	9
Chapitre I. Les pathologies amyloïdes ou l'impact d'un mauvais repliement protéique	11
1. Définition d'une pathologie amyloïde	11
1.1. Rappels sur la structure des protéines	11
1.2. Impact de la structure tri-dimensionnelle sur la fonctionnalité	14
1.3. Fibrillation de protéines et pathologies amyloïdes associées	16
2. Physiopathologie du Diabète de Type 2	21
2.1. Introduction	21
2.2. Facteurs influençant la pathologie	21
2.3. Conséquences	23
2.4. hIAPP : human Islet Amyloid PolyPeptide	24
2.4.1. Rôle de hIAPP chez un patient sain	24
2.4.2. Fibrillation de hIAPP suivant la cascade amyloïde et structures associées	25
2.4.3. Toxicité des espèces impliquées dans la cascade amyloïde	27
2.5. Diagnostic	28
2.6. Approches thérapeutiques	29
2.6.1. Solutions actuelles	29
2.6.2. Voies de recherches	32
2.6.2.1. Les inhibiteurs peptidiques	32
2.6.2.2. Les polyphénols	34
2.6.2.3. Les métaux	35
Références bibliographiques – Chapitre I	37
Chapitre II. Méthodes d'étude <i>in vitro</i> des phénomènes d'oligomérisation et d'agrégation pathologiques de protéines	45
1. Introduction	45
2. Importance de la préparation d'échantillon	45
3. Les méthodes non séparatives	47
3.1. Les méthodes spectroscopiques	47
3.1.1. La spectrofluorimétrie	47
3.1.1.1. Le rouge Congo	48
3.1.1.2. La thioflavine T	49
3.1.2. La turbidimétrie	53

3.1.3. La diffusion dynamique de la lumière	54
3.1.4. La spectroscopie RAMAN	56
3.1.5. Le dichroïsme circulaire	59
3.1.6. La résonance magnétique nucléaire	61
3.2. Les méthodes de microscopie	64
3.2.1. En transmission électronique	64
3.2.2. A force atomique	66
4. Les méthodes séparatives	67
4.1. L'électrophorèse sur gel	67
4.2. L'électrophorèse capillaire	69
4.3. La chromatographie d'exclusion stérique	74
4.4. La spectrométrie de masse couplée à la mobilité ionique	76
Références bibliographiques – Chapitre II	80
<i>Partie expérimentale</i>	89
Chapitre III. Préparation des échantillons pour les études de cinétiques d'oligomérisation	91
1. Introduction	91
1.1. Importance du milieu d'incubation sur la cinétique d'oligomérisation de hIAPP	91
1.1.1. Influence du pH	91
1.1.2. Intérêt des liposomes comme mimes de membranes cellulaires	92
1.2. Importance de la préparation des échantillons	92
2. Article 1 : "Evidence for different quality and <i>in vitro</i> oligomerization behavior for synthetic hIAPP obtained from different sources"	94
3. Etude complémentaire - Impact de la présence des liposomes sur la cinétique d'oligomérisation de hIAPP	108
3.1. Matériels et méthodes	108
3.1.1. Matériels	108
3.1.2. Préparation des liposomes	108
3.2. Résultats	109
4. Conclusions	112
Références bibliographiques – Chapitre III	113
Chapitre IV. Développement d'une méthode de suivi de l'oligomérisation de hIAPP	115
1. Matériels et méthodes	115
1.1. Mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse (IMS-MS)	115
1.2. Chromatographie d'exclusion stérique couplée à la détection UV	116
1.3. Chromatographie d'exclusion stérique couplée à l'IMS-MS	117
1.4. Marquage de hIAPP avec un fluorophore	117
2. La mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse (IMS-MS)	117
2.1. Etude de l'IMS-MS pour le suivi de l'oligomérisation en temps réel	117
2.2. Etude du phénomène de dissociation des oligomères lors de l'IMS-MS	121
2.2.1. Couplage de l'IMS-MS à la chromatographie d'exclusion stérique	122
2.2.1.1. Développement de la méthode de séparation par SEC-UV	122
2.2.1.2. Couplage de la SEC à l'IMS-MS	126

2.2.2. Mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse en tandem sans énergie de collision	129
2.2.2.1. Méthodologie employée	129
2.2.2.2. Analyses par IMS-MS en tandem sans énergie de collision	130
2.3. Conclusion	135
3. Article 2 : "A capillary zone electrophoresis method to investigate the oligomerization of the human Islet Amyloid Polypeptide involved in Type 2 diabetes"	136
4. Etude complémentaire – Marquage de hIAPP par une sonde fluorescente pour diminuer la limite de détection en électrophorèse capillaire	154
4.1. Introduction	154
4.2. Résultats	154
5. Conclusions	158
Références bibliographiques – Chapitre IV	159
Chapitre V. Évaluation de l'activité de nouveaux composés anti-agrégation de hIAPP	161
1. Introduction	161
2. Article 3 : "Helical foldamers of thiazole-based γ -amino acid as dual inhibitors of amyloid- β peptide and islet amyloid polypeptide oligomerization and fibrillization"	162
3. Compléments d'études – inhibiteurs peptidomimétiques mimes de β -hairpin.	186
4. Conclusion	192
Références bibliographiques – Chapitre V	193
Conclusion générale	195
Annexes I. Principes de base de l'électrophorèse capillaire	199
1. L'électroosmose	199
2. La migration électrophorétique	200
3. Séparation en électrophorèse capillaire de zone	201
3.1. Principe de séparation	201
3.2. Stratégies pour limiter les phénomènes de dispersion	202
Annexes II. Principe de la chromatographie d'exclusion stérique	204
4. Séparation en chromatographie d'exclusion stérique	204
5. Cas particulier des protéines et peptides	204
5.1. Correspondance volume hydrodynamique – masse moléculaire	204
5.2. Phénomènes d'adsorption	205
Annexe III. Supplementary informations Article 3	206
Références bibliographiques – Annexes	223

Introduction générale

De nombreuses maladies sont à l'heure actuelle toujours incurables, en grande partie en raison de nos limites sur la connaissance des mécanismes pathologiques qui leur sont associés. Parmi ces pathologies, environ une quarantaine s'accompagnent de dépôts amyloïdes comme la polyneuropathie amyloïde familiale, la maladie de Creutzfeldt-Jakob, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou le diabète de type 2 (Chiti & Dobson, 2006; Sipe *et al.*, 2016). Bien que les protéines impliquées soient différentes pour chaque pathologie, leur point commun se trouve dans la mauvaise conformation qu'adopte une protéine donnée. Cette conformation altérée qui peut survenir brutalement ou progressivement, ou être présente dès la naissance, peut être due à une mutation, mais également à d'autres phénomènes encore non-élucidés qui conduisent à la présence d'agrégats protéiques. Le processus de formation de ces agrégats est commun pour toutes ces pathologies : une protéine soluble et physiologique s'oligomérisent et s'agrègent pour former des amas riches en feuillets β , caractéristiques des pathologies amyloïdes (Close *et al.*, 2018; Fitzpatrick *et al.*, 2013). Face au nombre de pathologies amyloïdes et de patients concernés, la compréhension du mécanisme physiopathologique qui conduit à la formation des dépôts amyloïdes est un réel enjeu de santé publique que tentent de relever maintenant de nombreux chercheurs.

Le diabète de type 2, caractérisé par une hyperglycémie, touche par exemple plus de 400 millions de personnes, et bien que découvert depuis un siècle, il est toujours à l'heure actuelle incurable (Zheng *et al.*, 2018). Cette maladie entraîne souvent des complications sévères. On estime par exemple que le risque d'infarctus est multiplié par 5 pour un patient diabétique. Cette pathologie représente un véritable défi, notamment pour les pays développés dont l'alimentation et la sédentarité sont deux facteurs de risques importants. Le diabète de type 2 est une pathologie amyloïde dite localisée et à progression lente, s'étalant sur plusieurs décennies. Le diagnostic précoce est en revanche compliqué. La première phase de la pathologie est en effet caractérisée par un épuisement des cellules β pancréatiques permettant la régulation de la glycémie (Chen *et al.*, 2017). Lorsque le diabète progresse, on observe alors dans le pancréas des dépôts amyloïdes extracellulaires constitués du peptide impliqué sous forme fibrillaire (Westermarck, 2011). Dans le cas du diabète de type 2, le peptide responsable est le peptide amyloïde des îlots de Langerhans (human Islet Amyloid Polypeptide, hIAPP) (Westermarck *et al.*, 1987). Ces dépôts de hIAPP sont observés dans plus de 90% des pancréas de patients diabétiques après autopsie (Tomita, 2012). Seuls des traitements chroniques et symptomatiques existent (insuline, RA-GLP1 et iSGLT2 par exemple) pour cette maladie (Marín-Peñalver *et al.*, 2016). Ils ne demeurent malheureusement que symptomatiques et ne ciblent pas les

causes de la pathologie car ces dernières sont encore méconnues, empêchant donc la découverte de médicaments permettant le traitement curatif total de la maladie.

Depuis une dizaine d'années, une nouvelle hypothèse proposée par certains chercheurs pour expliquer l'étiologie du diabète de type 2 est la cascade amyloïde. Cette hypothèse suggère que le peptide hIAPP, physiologiquement co-sécrété avec l'insuline par les cellules β pancréatiques, s'accumule anormalement dans le domaine extracellulaire du pancréas et est responsable de l'apoptose des cellules β , empêchant la régulation de la glycémie. Sous sa forme non-agrégée, hIAPP agit avec l'insuline pour la régulation de la glycémie et la sensation de satiété (Susa *et al.*, 2014). En revanche, les espèces formées par l'accumulation du peptide entraîneraient une toxicité cellulaire. Cependant, il a été montré depuis quelques années que les agrégats insolubles ne sont pas les seules espèces responsables de cette cytotoxicité, mais que les petits oligomères formés en début du processus d'oligomérisation de hIAPP pourraient également être à l'origine de l'apoptose des cellules pancréatiques (Jeong & An, 2015). Il convient donc de prendre en compte ces considérations pour la recherche d'un traitement curatif du diabète de type 2.

Les espèces précoces de l'oligomérisation de hIAPP présentent donc un intérêt majeur afin de concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques. En effet, la compréhension de leur mécanisme de formation ainsi que de leur structure et de leur proportion serait un réel atout pour la conception de nouvelles molécules pour le traitement du diabète de type 2 les ciblant spécifiquement. Ces informations manquantes sont à l'heure actuelle un frein pour le développement de traitements pour cette maladie. La problématique majeure pour cette caractérisation des espèces précoces concerne leur caractère métastable (Pillay & Govender, 2013). Il apparaît donc nécessaire de proposer de nouvelles méthodes analytiques rapides, efficaces, robustes et peu coûteuses tenant compte de la faible stabilité des espèces précoces afin d'évaluer de nouveaux candidats médicaments. L'objectif de ces méthodes est de mimer *in vitro* le processus d'oligomérisation de hIAPP puis d'étudier l'activité de nouvelles molécules vis-à-vis de ce processus. Elles pourraient également permettre d'améliorer la compréhension du mécanisme du diabète de type 2, et donc de servir de base à l'élaboration d'un diagnostic plus précoce de la pathologie.

hIAPP est sécrété à partir du clivage protéolytiques de proIAPP. Ce peptide est composé de 37 acides aminés et possède un caractère fortement agrégeant selon le principe de la cascade amyloïde. Une séquence clé du peptide a été récemment identifiée comme primordiale dans la conversion en feuillets β à l'origine du phénomène d'autoassemblage de hIAPP (Mo *et al.*, 2009). Cette séquence constitue donc une cible de choix pour la conception de nouvelles solutions thérapeutiques. Si un composé est capable d'interagir avec elle, il pourra perturber le mécanisme d'oligomérisation et ainsi inhiber la formation des espèces les plus toxiques. Les solutions thérapeutiques disponibles actuellement pour

le diabète de type 2 ne se concentrent que sur le contrôle de la glycémie (metformine, iSGLT2) et la production d'insuline (sécrétagogues de l'insuline, RA-GLP1). L'insuline est d'ailleurs indiquée comme traitement pour la phase la plus sévère du diabète de type 2 étant donné qu'elle n'est plus sécrétée, au même titre que hIAPP. Au cours de cette phase, une seule molécule permet de reproduire les effets bénéfiques de hIAPP sous sa forme saine, tout en s'affranchissant de son caractère amyloïde. Il s'agit du pramlintide, différent de hIAPP par seulement trois acides aminés (Wang *et al.*, 2015). Ce composé est efficace notamment afin de contrôler la glycémie postprandiale, mais ne permet pas de contrer la toxicité de hIAPP. Il existe donc tout un domaine de recherche à explorer concernant le traitement du diabète de type 2 et ciblant plus particulièrement le peptide hIAPP. En ce sens, diverses voies de recherche sont actuellement explorées par les chercheurs afin de réduire voire d'inhiber l'agrégation de hIAPP. On retrouve notamment parmi elles les molécules peptidiques ou peptidomimétiques, particulièrement efficaces pour cibler hIAPP grâce à leur conception spécifique, en sélectionnant soigneusement les acides aminés qui interagiront avec hIAPP pour le déstabiliser (Brender *et al.*, 2010; Franko *et al.*, 2018; Mishra *et al.*, 2013). Des polyphénols ainsi que de des métaux comme le zinc sont également à l'étude.

Peu de méthodes analytiques sont actuellement disponibles pour suivre *in vitro* l'oligomérisation de hIAPP depuis ses étapes précoces. Ce processus a en effet été étudié de manière globale, jusqu'à la formation de fibres insolubles. Pour cela, la spectrofluorimétrie à la Thioflavine T ainsi que la microscopie électronique ont été largement utilisées (Akter *et al.*, 2016; Hoffmann *et al.*, 2018). D'autres techniques ont également été envisagées comme la chromatographie d'exclusion stérique, la spectrométrie de masse ou la résonance magnétique nucléaire (Bram *et al.*, 2014; Hoffmann *et al.*, 2018; Larson *et al.*, 2000). Si celles-ci permettent effectivement d'observer les espèces précoces de l'oligomérisation de hIAPP, le manque de résolution ou des oligomérisations trop rapides les rendent peu efficaces pour suivre ce processus dès son état initial monomérique. Il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode d'électrophorèse capillaire permettant l'analyse de hIAPP et encore moins pour le suivi de son oligomérisation depuis l'état initial, bien que des travaux impliquant cette technique aient récemment démontré son potentiel dans le cas du peptide amyloïde A β ₁₋₄₂ de la maladie d'Alzheimer (Brinet *et al.*, 2014).

L'objectif principal de cette thèse a donc été de développer de nouvelles stratégies analytiques permettant d'évaluer de nouveaux candidats médicaments pour le diabète de type 2 ciblant plutôt l'oligomérisation de hIAPP. La première étape a été d'identifier les différentes espèces impliquées dans l'oligomérisation reproduite *in vitro* par une méthode analytique permettant de suivre ce processus en temps réel. Ceci a impliqué de développer des conditions d'incubation du peptide et d'analyse permettant de mimer *in vitro* au mieux le processus pathologique d'oligomérisation de hIAPP

se déroulant *in vivo*. Pour cela, la procédure de traitement de hIAPP à sa réception pour s'assurer de son état non-agrégé ainsi que son milieu d'incubation pour reproduire l'oligomérisation *in vitro* ont été optimisés. En parallèle, l'influence de l'origine du peptide synthétique commercial sur son oligomérisation a été étudiée. Après avoir exploré deux techniques (l'électrophorèse capillaire et la mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse) pour permettre le suivi *in vitro* de l'oligomérisation, la dernière étape de ce travail a été l'étude de l'activité de composés candidats comme un foldamère et des peptidomimétiques de hIAPP sur les espèces formées précocement lors de l'oligomérisation de hIAPP par les méthodes développées au cours de la thèse.

La partie bibliographique de ce manuscrit détaille donc dans un premier temps l'importance de la conformation des protéines pour l'expression de leurs fonctions physiologiques. Les pathologies amyloïdes ont ensuite été abordées en montrant que le processus pathologique, toujours inexpliqué, est commun. L'exemple du diabète de type 2 a ensuite été plus largement décrit, en soulignant l'implication de hIAPP. Un état de l'art des solutions thérapeutiques actuellement disponibles ainsi que celles en voie de développement ou de recherche est également proposé.

Le deuxième chapitre rapporte un état de l'art sur l'ensemble des techniques analytiques disponibles à l'heure actuelle pour suivre l'oligomérisation et l'agrégation de hIAPP ou de molécules similaires, le peptide A β ayant été jugé assez proche de hIAPP du point de vue de son mécanisme d'oligomérisation, ainsi que pour évaluer l'activité de molécules. Après avoir discuté de la préparation d'échantillon permettant de mimer les conditions physiologiques, nécessaire pour ces études d'oligomérisation, les méthodes spectroscopiques et de microscopie ont été abordées. Dans un second temps, nous présentons les méthodes séparatives permettant d'identifier les différentes espèces formées lors de la cinétique d'oligomérisation de hIAPP. Ces techniques, quantitatives ou non, contribuent à mieux décrire le processus d'oligomérisation d'un point de vue moléculaire.

La partie expérimentale de ce manuscrit est composée de trois chapitres. Dans un premier chapitre, nous nous sommes intéressés aux paramètres influençant la cinétique d'oligomérisation de hIAPP *in vitro* comme le milieu d'incubation et la provenance du peptide. L'influence de la présence de mimes de membranes cellulaires a également été étudiée dans le cadre de l'oligomérisation de hIAPP. Après une optimisation des conditions d'incubation permettant de mimer la cinétique d'oligomérisation, trois sources de peptide synthétique différentes ont été comparées en termes de pureté et de cinétique d'oligomérisation par électrophorèse capillaire, spectrofluorimétrie à la Thioflavine T et spectrométrie de masse. Cette partie a permis de définir les conditions optimales permettant de suivre en temps réel l'oligomérisation de hIAPP ainsi que le lot de peptide à utiliser, afin de reproduire *in vitro* aussi fidèlement que possible la cascade amyloïde depuis ses étapes les plus précoces.

Le second chapitre détaille plus spécifiquement la recherche de techniques permettant de suivre la cinétique d'oligomérisation de hIAPP depuis son état initial. Nous nous sommes ainsi orientés vers la mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse et l'électrophorèse capillaire afin d'étudier ce processus. Nous avons tenté d'identifier les différentes espèces formées au cours du temps et observées en électrophorèse capillaire, par des méthodes reposant sur la spectrométrie de masse et la filtration par centrifugation. Le marquage de hIAPP par une sonde fluorescente a également été envisagé afin de se rapprocher de concentrations physiologiques.

Finalement, le troisième chapitre de cette partie expérimentale est consacré à l'évaluation d'inhibiteurs synthétisés par le laboratoire BioCIS (Faustine Bizet, sous la direction du Pr Sandrine Onger et encadrée par le Dr Julia Kaffy). Ces inhibiteurs de nature peptidomimétique ont été conçus dans le but de cibler la séquence amyloïdogénique de hIAPP (FGAIL) afin de prévenir son oligomérisation. L'activité d'un autre inhibiteur de type foldamère synthétisé par l'Institut des biomolécules Max Mousseron de Montpellier (Dr Ludovic Maillard), a été étudiée. Après un criblage par la fluorescence à la Thioflavine T, ces molécules ont été testées par la méthode d'électrophorèse capillaire développée dans le chapitre IV. La mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse, a également été utilisée pour déterminer les interactions formées entre l'inhibiteur et hIAPP. La microscopie électronique par transmission a permis de comparer les morphologies des fibres en présence ou non d'inhibiteurs ce qui a permis de mettre en évidence quelques molécules présentant une activité vis-à-vis de l'oligomérisation de hIAPP.

Références bibliographiques – Introduction générale

- Akter, R., Cao, P., Noor, H., Ridgway, Z., Tu, L. H., Wang, H., Wong, A. G., Zhang, X., Abedini, A., Schmidt, A. M., & Raleigh, D. P. (2016). Islet Amyloid Polypeptide: Structure, Function, and Pathophysiology. *J Diabetes Res*, 2016, 2798269. <https://doi.org/10.1155/2016/2798269>
- Bram, Y., Frydman-Marom, A., Yanai, I., Gilead, S., Shaltiel-Karyo, R., Amdursky, N., & Gazit, E. (2014). Apoptosis induced by islet amyloid polypeptide soluble oligomers is neutralized by diabetes-associated specific antibodies. *Scientific Reports*, 4. <https://doi.org/SICI 426710.1038/srep04267>
- Brender, J. R., Hartman, K., Nanga, R. P. R., Popovych, N., de la Salud Bea, R., Vivekanandan, S., Marsh, E. N. G., & Ramamoorthy, A. (2010). Role of Zinc in Human Islet Amyloid Polypeptide Aggregation. *Journal of the American Chemical Society*, 132(26), 8973–8983. <https://doi.org/10.1021/ja1007867>
- Brinet, D., Kaffy, J., Oukacine, F., Glumm, S., Onger, S., & Taverna, M. (2014). An improved capillary electrophoresis method for in vitro monitoring of the challenging early steps of Abeta1-42 peptide oligomerization: application to anti-Alzheimer's drug discovery. *Electrophoresis*, 35(23), 3302–3309. <https://doi.org/10.1002/elps.201400271>
- Chen, C., Cohrs, C. M., Stertmann, J., Bozsak, R., & Speier, S. (2017). Human beta cell mass and function in diabetes: Recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis. *Molecular Metabolism*, 6(9), 943–957. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.06.019>
- Chiti, F., & Dobson, C. M. (2006). Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), 333–366. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901>
- Close, W., Neumann, M., Schmidt, A., Hora, M., Annamalai, K., Schmidt, M., Reif, B., Schmidt, V., Grigorieff, N., & Fändrich, M. (2018). Physical basis of amyloid fibril polymorphism. *Nature Communications*, 9(1), 699. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03164-5>
- Fitzpatrick, A. W. P., Debelouchina, G. T., Bayro, M. J., Clare, D. K., Caporini, M. A., Bajaj, V. S., Jaroniec, C. P., Wang, L., Ladizhansky, V., Müller, S. A., MacPhee, C. E., Waudby, C. A., Mott, H. R., De Simone, A., Knowles, T. P. J., Saibil, H. R., Vendruscolo, M., ... Dobson, C. M. (2013). Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- β amyloid fibril. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(14), 5468–5473. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219476110>
- Franko, A., Rodriguez Camargo, D. C., Böddrich, A., Garg, D., Rodriguez Camargo, A., Rathkolb, B., Janik, D., Aichler, M., Feuchtinger, A., Neff, F., Fuchs, H., Wanker, E. E., Reif, B., Häring, H.-U., Peter, A., & Hrabě de Angelis, M. (2018). Epigallocatechin gallate (EGCG) reduces the intensity of pancreatic amyloid fibrils in human islet amyloid polypeptide (hIAPP) transgenic mice. *Scientific Reports*, 8(1), 1116. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18807-8>
- Hoffmann, A., Caillon, L., Salazar Vazquez, L. S., Spath, P.-A., Carlier, L., Khemtémourian, L., & Lequin, O. (2018). Time dependence of NMR observables reveals salient differences in the accumulation of early aggregated species between human islet amyloid polypeptide and amyloid- β . *Physical Chemistry Chemical Physics*. <https://doi.org/10.1039/C7CP07516B>
- Jeong, H. R., & An, S. S. A. (2015). Causative factors for formation of toxic islet amyloid polypeptide oligomer in type 2 diabetes mellitus. *Clinical Interventions in Aging*, 10, 1873–1879. <https://doi.org/10.2147/CIA.S95297>

- Larson, J. L., Ko, E., & Miranker, A. D. (2000). Direct measurement of islet amyloid polypeptide fibrillogenesis by mass spectrometry. *Protein Sci*, *9*(2), 427–431. <https://doi.org/10.1110/ps.9.2.427>
- Marín-Peñalver, J. J., Martín-Timón, I., Sevillano-Collantes, C., & Del Cañizo-Gómez, F. J. (2016). Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*, *7*(17), 354–395. <https://doi.org/10.4239/wjd.v7.i17.354>
- Mishra, A., Misra, A., Sri Vaishnavi, T., Thota, C., Gupta, M., Ramakumar, S., & Chauhan, V. S. (2013). Conformationally restricted short peptides inhibit human islet amyloid polypeptide (hIAPP) fibrillization. *Chemical Communications*, *49*(26), 2688. <https://doi.org/10.1039/c3cc38982k>
- Mo, Y., Lu, Y., Wei, G., & Derreumaux, P. (2009). Structural diversity of the soluble trimers of the human amylin(20-29) peptide revealed by molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical Physics*, *130*(12). <https://doi.org/10.1063/1.3097982>
- Pillay, K., & Govender, P. (2013). Amylin uncovered: a review on the polypeptide responsible for type II diabetes. *Biomed Res Int*, *2013*, 826706. <https://doi.org/10.1155/2013/826706>
- Sipe, J. D., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Ikeda, S. I., Merlini, G., Saraiva, M. J. M., & Westermark, P. (2016). Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid*, *23*(4), 209–213. <https://doi.org/10.1080/13506129.2016.1257986>
- Susa, A. C., Wu, C., Bernstein, S. L., Dupuis, N. F., Wang, H., Raleigh, D. P., Shea, J.-E., & Bowers, M. T. (2014). Defining the Molecular Basis of Amyloid Inhibitors: Human Islet Amyloid Polypeptide–Insulin Interactions. *Journal of the American Chemical Society*, *136*(37), 12912–12919. <https://doi.org/10.1021/ja504031d>
- Tomita, T. (2012). Islet amyloid polypeptide in pancreatic islets from type 2 diabetic subjects. *Islets*, *4*(3), 223–232. <https://doi.org/10.4161/isl.20477>
- Wang, H., Ridgway, Z., Cao, P., Ruzsicska, B., & Raleigh, D. P. (2015). Analysis of the ability of pramlintide to inhibit amyloid formation by human islet amyloid polypeptide reveals a balance between optimal recognition and reduced amyloidogenicity. *Biochemistry*, *54*(44), 6704–6711. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00567>
- Westermark, P. (2011). Amyloid in the islets of Langerhans: thoughts and some historical aspects. *Uppsala Journal of Medical Sciences*, *116*(2), 81–89. <https://doi.org/10.3109/03009734.2011.573884>
- Westermark, P., Wernstedt, C., Wilander, E., Hayden, D. W., O'Brien, T. D., & Johnson, K. H. (1987). Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *84*(11), 3881 LP-3885. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/84/11/3881.abstract>
- Zheng, Y., Ley, S. H., & Hu, F. B. (2018). Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*, *14*(2), 88–98. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.151>

Partie bibliographique

Chapitre I. Les pathologies amyloïdes ou l'impact d'un mauvais repliement protéique

1. Définition d'une pathologie amyloïde

1.1. Rappels sur la structure des protéines

Les protéines sont des macromolécules biologiques assurant une multitude de fonctions nécessaires au bon fonctionnement des organismes vivants. Elles sont présentes au sein des cellules et des tissus, et sont composées d'un ou plusieurs enchaînements d'acides aminés appelés peptides. Cet enchaînement d'acides aminés constitue la structure primaire de la protéine et représente leur premier élément de structuration. Cette structure primaire conduit ensuite à l'apparition d'une structure secondaire qui caractérise le repliement local d'une séquence peptidique. On retrouve notamment l'hélice α et le feuillet β , mais aussi le coude, qui relie deux hélices ou deux feuillets. La dernière possibilité est la pelote statistique, où aucune structure organisée n'est observable. On retrouve généralement plusieurs de ces structures au sein d'une protéine. Cette structuration secondaire est rendue possible par la présence de liaisons hydrogène entre acides aminés éloignés dans la structure primaire qui stabilisent l'ensemble. De par ces interactions et la gêne stérique due aux chaînes latérales des acides aminés, toutes les conformations ne sont pas possibles pour une séquence donnée, et seuls certaines valeurs d'angles de liaisons, appelés *psi* et *phi* sont acceptés. Ces angles appelés angles dièdres sont représentés dans la Figure 1 :

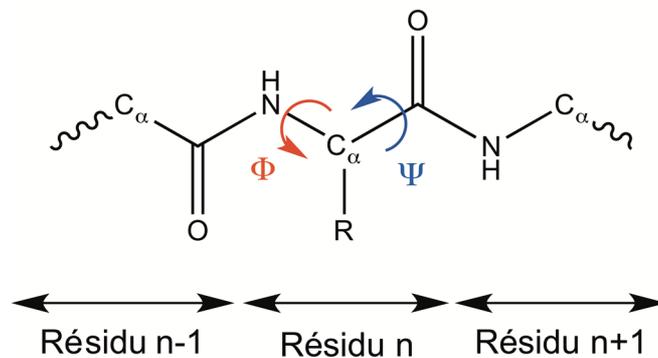


Figure 1: Représentation de la liaison peptidique avec les angles dièdres (IUPAC : <https://doi.org/10.1351/goldbook.D01730>)

Ainsi, les structures possibles sont définies par le diagramme de Ramachandran qui représente les zones où les conformations sont les plus stables en fonction des angles *psi* et *phi* (Figure 2) (Ramachandran *et al.*, 1963).

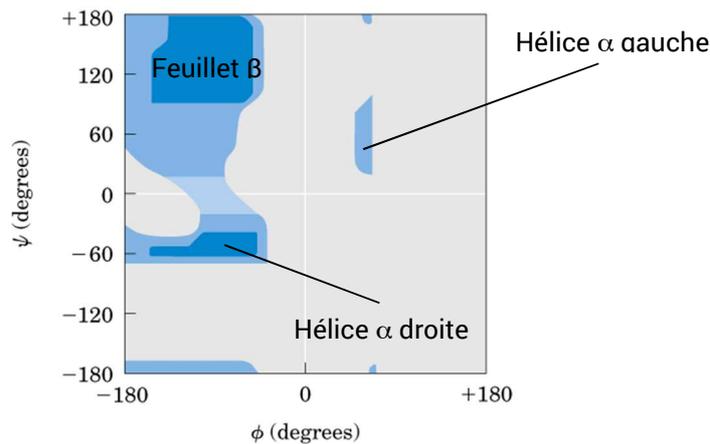


Figure 2: Diagramme de Ramachandran délimitant les zones de stabilité des différentes conformations en fonction des angles de liaison (adapté de Ramachandran 1963)

- Hélice α :** Cette structure est très fréquente lors du repliement des protéines. Sa formation est permise par la présence de liaison hydrogène entre le carbonyle d'un résidu n et l'hydrogène de l'amide d'un résidu $n+4$. On retrouve les hélices α droites, qui tournent dans le sens horaire ($\Phi \approx -57^\circ$ et $\Psi \approx -47^\circ$), et gauches qui tournent dans le sens trigonométrique ($\Phi \approx 45^\circ$ et $\Psi \approx 60^\circ$). Un pas d'hélice alpha contient en moyenne 3,6 résidus pour une distance de 0,54 nm (chaque résidu contribue pour 0,15 nm). Vue du dessus, la structure de cette hélice sera analogue à un polygone à 4 ou 5 cotés. Cette version d'hélice α est prépondérante mais il en existe d'autres, de géométrie légèrement variable. On retrouve par exemple l'hélice 3_{10} pour laquelle la liaison hydrogène est formée entre les résidus n et $n+3$. Le pas étant composé de 3 acides aminés, sa structure se rapprochera du triangle. Cette hélice est légèrement plus lâche que la précédente avec un pas de 0.60 nm. A l'inverse, on trouve également les hélices Π présentant un pas de 0.50 nm (liaison hydrogène formée entre n et $n+5$). Tous les acides aminés sont représentés dans cette structure, bien que la proline et la glycine aient une occurrence faible. D'une part, la glycine ne possède pas de carbone β et affiche donc une grande liberté conformationnelle, favorisant donc des conformations aléatoires. La proline est trop rigide pour intégrer une hélice en raison de son cycle à 5. A l'inverse, certains acides aminés favorisent ces structures tels que l'acide glutamique, la méthionine ou l'alanine (Chou & Fasman, 1978).

- Feuillet β :** les feuillets β sont observés moins fréquemment que les hélices α . Ils sont en général composés d'une quinzaine de résidus (Livre Biochimie Structurale et Métabolique de Christian Moussard). Ces feuillets sont formés par liaisons hydrogène entre les groupements N-H et C-O de deux enchaînements peptidiques. On peut distinguer deux types de feuillets β : les feuillets parallèles ($\Phi \approx -140^\circ$ et $\Psi \approx 135^\circ$) et antiparallèles ($\Phi \approx -120^\circ$ et $\Psi \approx 115^\circ$). Cette caractéristique est définie par l'orientation des séquences peptidiques entre elles : si les deux brins vont dans la même direction (les extrémités N-terminales des deux chaînes sont adjacentes), le feuillet est dit parallèle. Dans le cas où ils vont dans des directions opposées, le feuillet est dit antiparallèle. La Figure 3 montre que les cycles formés grâce aux liaisons hydrogène dans les deux cas ne sont pas équivalents.

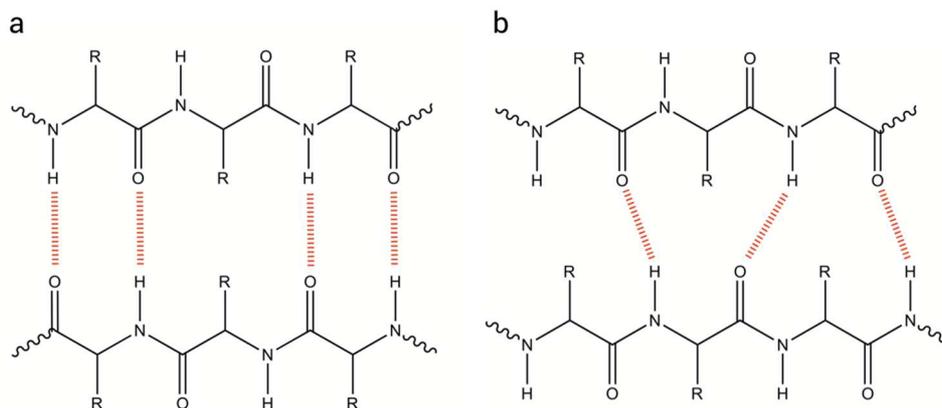


Figure 3: Représentation de la structure secondaire feuillet β ((a) antiparallèle et (b) parallèle) stabilisée grâce aux liaisons hydrogène (en rouge)

En effet, les feuillets parallèles vont former des cycles de 12 atomes autour des liaisons hydrogènes, tandis que pour les feuillets antiparallèles, ils seront de 10 ou 14 atomes. Dans le cas des feuillets antiparallèles, les liaisons hydrogènes sont plus courtes, et donc plus stables que pour les feuillets parallèles. Notons que cette structure ne se limite pas à l'association de deux brins : les groupements donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène pointant vers l'extérieur du système peuvent également être impliqués dans la formation de feuillets β . Par exemple, du fait de la faible stabilité des feuillets parallèles, on les retrouve en général formés de cinq brins ou plus. Les chaînes latérales des acides aminés peuvent également jouer un rôle dans la stabilité des feuillets, même s'il demeure moindre que celui joué par les liaisons hydrogène. Comme pour l'hélice α , certains acides aminés favorisent cette structure tels que ceux possédant une chaîne aliphatique (comme la valine, la leucine ou l'isoleucine) ou aromatique (phénylalanine ou tyrosine) (Chou & Fasman, 1978).

On observe ensuite la structure tertiaire qui correspond à la forme générale de la protéine due à l'association de plusieurs structures secondaires ou à son repliement. Cette structure est stabilisée à l'aide d'interactions non-covalentes plus ou moins énergétiques décrites dans le Tableau I :

Tableau I : Distances et énergies de liaison des interactions présentes dans une protéine

Liaison	Type de liaison	Energie (kJ/mol)	Longueur (Å)
Pont disulfure	Covalente	250	2.2
Hydrophobe	Non-covalente	12-30	Variable
Hydrogène		10-40	3
Electrostatique		12	Variable
Van der Waals		4-17	3.5

Le pont disulfure est un élément de structuration tertiaire, majoritairement intra-protéique et de plus forte énergie. Il est obtenu par oxydation de deux cystéines et forme une liaison covalente. On retrouve également des liaisons non-covalentes telles que des ponts salins entre acides aminés de charges opposées, des interactions hydrogène entre un donneur et un accepteur de protons ou hydrophobe dans le cas d'acides aminés aromatiques par exemple.

Enfin, on observera parfois une structure quaternaire lorsque plusieurs sous-unités protéiques s'assemblent pour donner un complexe protéique actif, même s'il arrive qu'une protéine soit active hors de sa structure quaternaire. On notera que le principal facteur responsable de cette structuration est l'effet hydrophobe présent entre deux acides aminés non polaires.

La structure tridimensionnelle des protéines joue un rôle majeur dans l'expression de leur fonction biologique. La formation de la structure secondaire, impactant les structures tertiaires et quaternaires, est particulièrement importante. Il a été montré qu'un défaut de conformation pouvait être à l'origine de certaines maladies appelées pathologies conformationnelles soit par perte de fonctionnalité (Lomas & Carrell, 2002), soit par induction d'une activité toxique (Takalo *et al.*, 2013).

1.2. Impact de la structure tri-dimensionnelle sur la fonctionnalité

Adopter une structure tridimensionnelle stable et fonctionnelle est nécessaire pour les protéines. En effet, une protéine ne peut assurer la fonction pour laquelle elle a été produite seulement si sa structure est adaptée. Ce repliement s'effectue de manière spontanée et la protéine est alors active.

Il apparaît que dans des conditions données, la protéine évolue rapidement vers sa structure fonctionnelle, dite structure native. Cette structuration peut toutefois être assistée par une protéine dite chaperonne. Dans le cas d'une petite protéine, celle-ci adoptera sa conformation active naturellement. En revanche, pour de protéines plus importantes, l'action d'une protéine chaperonne est nécessaire. Cette dernière va reconnaître le mauvais repliement de la protéine, et venir s'associer à elle grâce à la reconnaissance d'un site hydrophobe localisé sur la partie externe, à l'inverse d'une protéine active et correctement repliée qui renfermera son cœur hydrophobe. La protéine chaperonne va alors modifier la conformation de la protéine ciblée pour lui faire exposer ses sites hydrophiles, qui se retrouveront au contact de l'eau (Kim *et al.*, 2013). Ce mauvais repliement est observé dans de nombreuses pathologies, notamment celles dites amyloïdes pour lesquelles la présence de groupements hydrophobes exposés conduit à un phénomène d'agrégation pathologique (Figure 4).

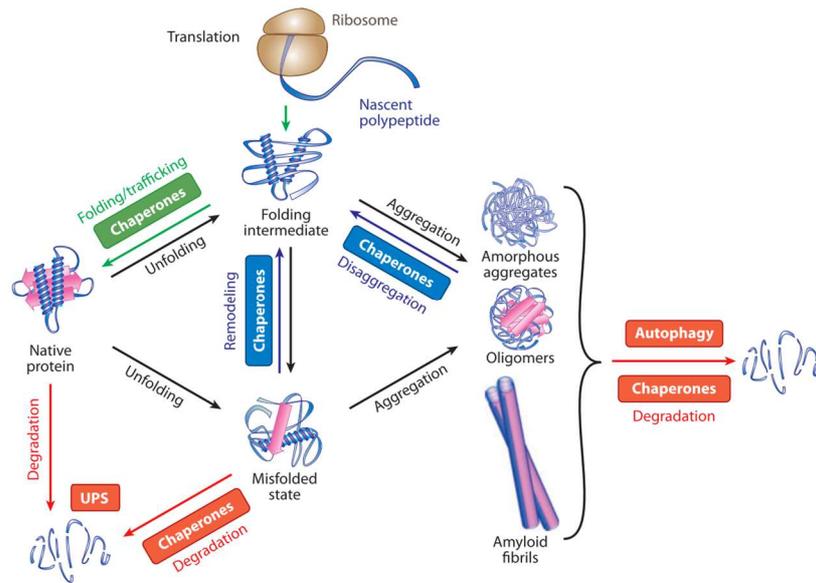


Figure 4 : Réseau reliant les différentes conformations adoptées d'une protéine en fonction des différentes modifications (Kim 2013)

On sait que l'expression de l'activité d'une protéine est directement reliée à sa structure, et donc aux domaines fonctionnels qu'elle expose. Sa dénaturation aura des conséquences multiples. La première sera en général la perte de son activité biologique. La seconde sera une modification de sa solubilité. En effet, si l'interface avec son milieu est modifiée, la solubilité le sera aussi. Ceci peut conduire à une agrégation puis à une précipitation de la protéine. Un changement de conformation, peut aussi induire une toxicité. Le mécanisme de dénaturation peut être provoqué par plusieurs facteurs :

- La température : une élévation de température conduit généralement à une rupture des liaisons hydrogène et donc à la perte de la structure tridimensionnelle (X. Wang *et al.*, 2014).
- Le pH : une modification du pH, même légère, conduit à une modification de la charge des groupes ionisables de la protéine. Ceci a pour effet une déstabilisation de la structure ainsi qu'un changement de solubilité (Hidaka *et al.*, 2015).
- La présence d'agents chimiques : on en distingue de plusieurs types : les chaotropes qui, à hautes concentrations, rompent les liaisons hydrogène, ou les détergents qui peuvent provoquer des interactions hydrophobes avec les chaînes latérales des acides aminés apolaires (Otzen, 2002; Salvi *et al.*, 2005). On retrouve également les acides et bases qui modifient le pH, et les agents réducteurs qui détruisent les ponts disulfures, provoquant un changement de conformations.

Il demeure cependant exceptionnel de retrouver ces agents chimiques *in vivo*, à l'inverse des deux autres causes. Ce processus de dénaturation est souvent réversible, sauf si la perte de structuration est suivie par la création de liaisons covalentes (réduction de ponts disulfures intramoléculaires puis formation de ponts intermoléculaires) ou non qui vont restructurer la protéine dans une nouvelle conformation. Il arrive également que la dénaturation soit à l'origine d'un processus d'agrégation conduisant parfois à la formation de fibres insolubles. Ce processus étant favorable d'un point de vue

thermodynamique, l'intervention de protéines chaperonnes devient nécessaire pour rétablir la forme active de la protéine.

1.3. Fibrillation de protéines et pathologies amyloïdes associées

Dans certaines conditions, peptides ou protéines se rassemblent afin de former un assemblage de fibres appelées fibres amyloïdes qui tendent à précipiter dès que le complexe devient trop gros et insoluble. De façon formelle, on définit le terme amyloïde, apparu pour la première fois en 1854, comme une substance capable de se lier à une sonde telle que le Congo Red, possédant une apparence bien définie en TEM, et ayant un motif de diffraction aux RX connu (Sipe *et al.*, 2012). Plus généralement, on parle d'amyloïde pour caractériser un dépôt extracellulaire fibreux et anormal dans les organes et tissus (Rambaran & Serpell, 2008). De nombreuses maladies sont liées à ce phénomène de formation de fibres insolubles, et sont appelées pathologies amyloïdes ou amyloses. On retrouve parmi elles les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, le diabète de type 2, la cataracte... Ces pathologies peuvent être classées selon trois grandes classes : les pathologies amyloïdes neurodégénératives, systémiques ou localisées. Pour autant, les structures amyloïdes sont parfois utilisées par l'organisme dans des processus non-pathologiques au cours de processus fonctionnels. Un exemple a été reporté chez l'homme avec un domaine de la protéine Pmel17 (Berson *et al.*, 2003; Chiti & Dobson, 2006).

Dans le cas d'un processus pathologique, la protéine mise en cause va évoluer vers une conformation majoritairement en feuillets β quand il ne s'agit pas de sa conformation native (Tableau II). Ces feuillets β vont s'associer pour former les fibres amyloïdes d'une largeur comprise entre 6 et 13 nm et d'une longueur comprise entre 100 et 1600 nm (Chiti & Dobson, 2006; Cohen & Calkins, 1959; Makin & Serpell, 2005; Rambaran & Serpell, 2008; Sipe *et al.*, 2016). La forte concentration en feuillets β est d'ailleurs confirmée par l'affinité au Congo Red, connu pour marquer spécifiquement ces structures, ainsi que par la RMN à l'état solide (Luca *et al.*, 2007). Cependant, si toutes les protéines amyloïdes aboutissent à la formation de structures β dans le cas de pathologies, il est intéressant de noter que leurs structures primaires sont différentes.

On voit que la figure de diffraction aux RX fait apparaître deux distances caractéristiques : 4,7 Å qui correspond à la distance entre deux brins liés par des liaisons hydrogène, et 10 Å qui correspond à la distance entre deux feuillets (Rambaran & Serpell, 2008; Sunde & Blake, 1997) (Figure 5a et b). Ces résultats confortent également la structuration en feuillets β des fibres amyloïdes. Il apparaît également en microscopie que les fibres ne sont pas droites mais torsadées, avec un pas de vrillage variant entre 10 et 100 nm (Figure 5c). Plus précisément, des protofibrilles organisées en feuillets β se regroupent pour former des fibres torsadées, selon un motif différent en fonction des protéines concernées (Akter *et al.*, 2016; Close *et al.*, 2018; Fitzpatrick *et al.*, 2013; Jiménez *et al.*, 2002; Meinhardt *et al.*, 2009; Sachse *et al.*, 2010; Schirmer, 2014; Schmidt *et al.*, 2015). Il demeure néanmoins compliqué d'obtenir des informations structurales plus poussées sur les structures intermédiaires qui conduisent finalement aux fibres, du fait de leur caractère métastable. Les outils disponibles actuellement seront détaillés dans le Chapitre II.

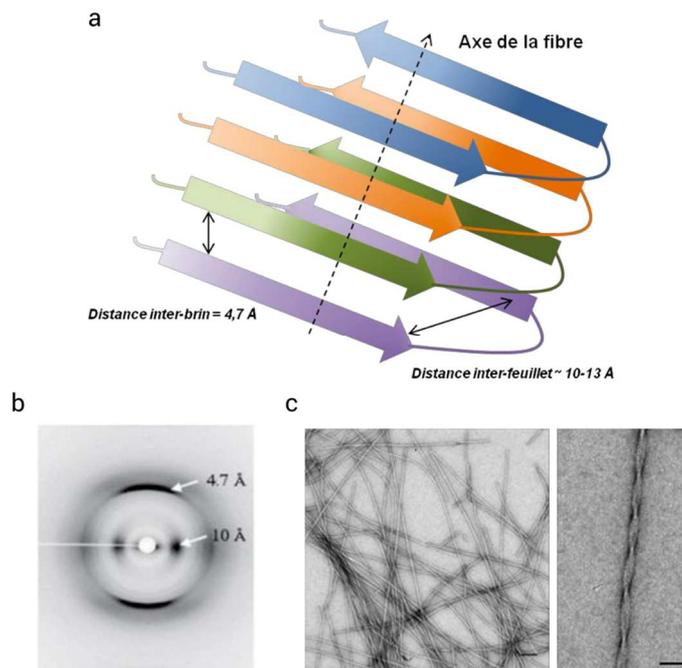


Figure 5 : (a) Représentation schématique d'une fibre amyloïde ; (b) Figure de diffraction aux rayons X caractéristique d'un amyloïde montrant les distances inter-brins et inter-feuillets de 4,7 Å et 10 Å respectivement ; (c) Image par microscopie électronique en transmission de fibres torsadées amyloïdes (Schirmer 2014)

On dénombre à ce jour une quarantaine de protéines dites amyloïdes responsables d'autant de pathologies (Tableau II) (Harrison *et al.*, 2007; Sipe *et al.*, 2012; Stefani & Dobson, 2003). Si ces quarante protéines ont des caractéristiques structurales communes, elles ne visent cependant pas la même cible biologique. Un point commun entre toutes ces maladies est la difficulté que l'on rencontre pour les traiter, voire pour les détecter pour certaines. Ceci explique la forte augmentation des recherches dans ce domaine. La dernière décennie a d'ailleurs vu de nombreux articles traitant de ces pathologies véritablement exploser. Néanmoins, les mécanismes conduisant à l'apparition des fibres semblent bien compris, suivant un processus appelé cascade amyloïde (Pillay & Govender, 2013). Dans certaines conditions, deux monomères de la protéine concernées vont s'associer pour former un dimère, puis des oligomères de différentes tailles. Ces espèces ont la particularité d'adopter une conformation en feuillets β , tout en restant solubles. Des protofibrilles sont ensuite formées qui vont ensuite s'associer entre elles pour produire les fibres amyloïdes. Si les fibres ont été largement caractérisées, l'identification et la toxicité des espèces oligomériques solubles restent à élucider. En effet, une nouvelle hypothèse tend à reconsidérer la toxicité des espèces impliquées dans ce processus. En effet, dans le cas du diabète de type 2, les premières études montraient dans plus de 90% des cas la présence de plaques amyloïdes dans le domaine extracellulaire du pancréas des patients (Mukherjee *et al.*, 2015). Cependant, il semblerait que ces plaques ne soient pas en réalité les espèces responsables de la maladie, mais simplement la conséquence du processus pathologique. Les espèces les plus toxiques seraient les oligomères solubles, qu'il est donc nécessaire de pouvoir identifier (Haataja *et al.*, 2008).

Une question reste cependant à élucider, concernant la toxicité des espèces oligomériques solubles qui conduisent à la formation des fibres amyloïdes. Il apparaît qu'il s'agit d'une problématique relativement nouvelle, mais que de plus en plus de chercheurs tendent à considérer pour expliquer les mécanismes pathologiques (Figure 6).

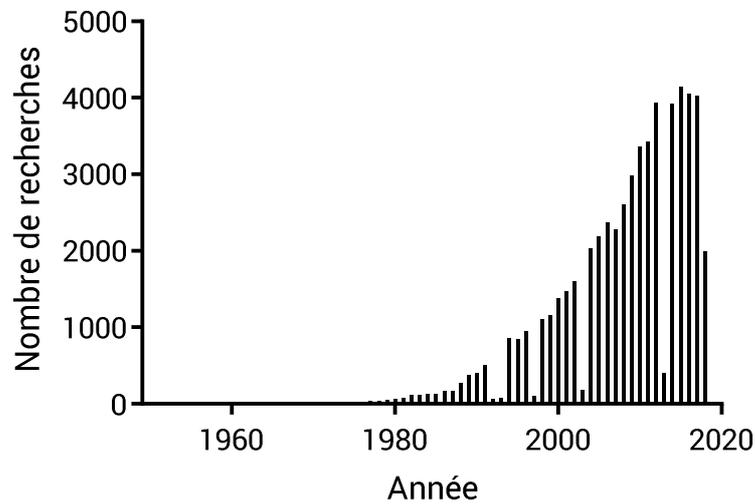


Figure 6 : Augmentation de la recherche sur les protéines amyloïdes depuis 1949 (Source PubMed « Amyloid protein »)

Les différentes maladies et protéines associées sont regroupées dans le Tableau II, ainsi que les organes ciblés et la conformation native des peptides ou protéines impliqués :

Tableau II : Pathologies amyloïdes, protéines / peptides avec leur conformation et organes ciblés associés (Chiti 2006, Sipe 2016) (? représente une conformation inconnue)

	Peptide / Protéine	Maladie	Organes ciblés	Structure native
Neurodégénératif	Aβ	Alzheimer's disease	SNC	Aléatoire
	α-synuclein	Parkinson's disease	SNC	Aléatoire
		Dementia with Lewy bodies	SNC	Aléatoire
	Tau	Frontotemporal dementia with Parkinsonism	SNC	Aléatoire
	Prion	Spongiform encephalopathies	SNC	Aléatoire et hélice α
	Superoxide dismutase 1	Amyotrophic lateral sclerosis	SNC	Feuillet β
	Huntington with polyQ expansion	Huntington's disease	SNC	Aléatoire
	Ataxins with polyQ expansion	Spinocerebellar ataxias	SNC	Feuillet β et ?
	TATA box-binding protein with polyQ expansion	Spinocerebellar ataxia 17	SNC	Hélice α et Feuillet β
	Androgen receptor with polyQ expansion	Spinal and bulbar muscular atrophy	SNC	Hélice α et ?
	Atrophin-1 with polyQ expansion	Hereditary dentatorubral-pallidolusian atrophy	SNC	?
	ABri	Familial British dementia	SNC	Aléatoire
ADan	Familial Danish dementia	SNC	Aléatoire	
Systémique	Immunoglobulin light chains or fragments	AL amyloidosis	Moelle osseuse, rein, coeur	Feuillet β
	Fragments of serum amyloid A protein	AA amyloidosis	Tous les organes sauf SNC	Hélice α
		Familial Mediterranean fever	Tous les organes sauf SNC	Hélice α
	Wild-type transthyretin	Senile systemic amyloidosis	Cœur, ligaments	Feuillet β
	Mutants of transthyretin	Familial amyloidotic polyneuropathy	SNP, SNA, cœur, yeux	Feuillet β
	β2-microglobulin	Hemodialysis-related amyloidosis	Système musculo-squelettique	Feuillet β
	N-terminal fragments of apolipoprotein AI	ApoAI amyloidosis	Cœur, foie, rein, SNP, testicules, larynx, peau	Aléatoire
	N-terminal fragments of apolipoprotein AII	ApoAII amyloidosis	Rein	?
N-terminal fragments of apolipoprotein AIV	ApoAIV amyloidosis	Rein	?	

Chapitre I. Les pathologies amyloïdes ou l'impact d'un mauvais repliement protéique

	Fragments of gelsolin mutants	Finnish hereditary amyloidosis	SNP, cornée	Aléatoire
	Mutants of lysozyme	Lysozyme amyloidosis	Rein	Hélice α et Feuillet β
	Variants of fibrinogen α -chain	Fibrinogen amyloidosis	Rein	?
	Mutant of cystatin C	Icelandic hereditary cerebral amyloid angiopathy	SNP, peau	Hélice α et Feuillet β
	Peptide / Protéine	Maladie	Organes ciblés	Structure native
Localisé	hIAPP	Type II diabetes	Pancréas	Aléatoire
	Calcitonin	Medullary carcinoma of the thyroid	Thyroïde	Aléatoire
	Atrial natriuretic factor	Atrial amyloidosis	Cœur	Aléatoire
	Prolactin	Pituitary prolactinoma	Hypophyse	Hélice α
	Insulin	Injection-localized amyloidosis	Site d'injection	Hélice α
	Medin	Aortic medical amyloidosis	Cœur	?
	Kerato-epithelin C-terminal fragments	Hereditary lattice corneal dystrophy	Cornée	?
	Lactoferrin	Corneal amyloidosis associated with trichiasis	Cornée	Hélice α et Feuillet β
	γ -crystallins	Cataract	Yeux	Feuillet β
	Lung surfactant protein C	Pulmonary alveolar proteinosis	Poumon	?
	A β	Inclusion-body myositis	Muscles des bras & jambes	Aléatoire
	Keratins	Cutaneous lichen amyloidosis	Peau	?

2. Physiopathologie du Diabète de Type 2

2.1. Introduction

La première référence connue au diabète de type 2 remonte 4000 ans avant J.C. en Chine mais la première avancée majeure provient de Paul Langherans avec la découverte des îlots éponymes, responsables notamment de la production d'insuline (découverte en 1921), de glucagon et de hIAPP. Ce n'est toutefois qu'en 1901 que sera défini le rôle du pancréas dans le diabète lorsque Eugène Opie apporte la preuve de la présence de plaques amyloïdes extracellulaires dans les îlots de patients diabétiques (Figure 7a). Il faudra cependant attendre 80 ans pour que deux groupes apportent la preuve que ces plaques amyloïdes sont constituées de hIAPP (Cooper *et al.*, 1987; Westermark *et al.*, 1987) (Figure 7b).

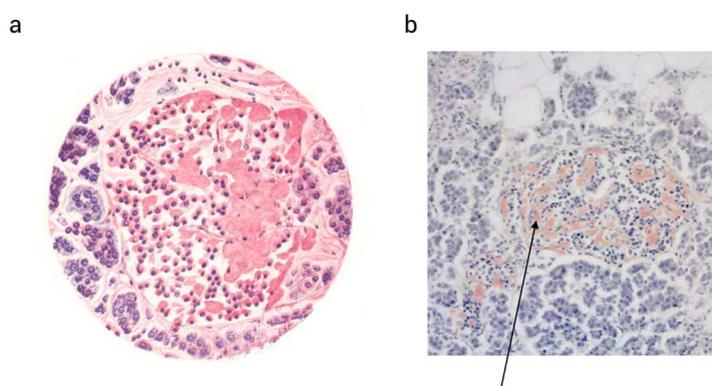


Figure 7 : (a) Dessin des îlots de Langherans avec présence de plaques amyloïdes (Opie 1901) ; (b) Image de plaques amyloïdes (en rouge, identifiées par la flèche) obtenue au microscope à lumière polarisée après marquage au Congo Red (adapté de Westermark 2011)

Le diabète de type 2 est la forme rencontrée dans une large majorité des cas (environ 95%), devant le diabète de type 1 et le diabète gestationnel. Cette maladie touche plus de 400 millions de personnes à travers le monde (Chaudhury *et al.*, 2017; Guariguata *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2018) avec un nombre de personnes décédées de 3,5 millions par an. Cependant, si le diagnostic de la pathologie est bien établi à partir d'une simple mesure de la glycémie, aucun traitement curatif total n'est à ce jour disponible. Nous disposons à l'heure actuelle que de traitements symptomatiques ou d'appoint qui contiennent la maladie. Ceux-ci seront détaillés plus loin. L'OMS prévoit d'ailleurs que le diabète sera la septième cause de mortalité dans le monde en 2030 (Mathers & Loncar, 2006). En France, 19 milliards d'euros sont dépensés par an afin de prendre en charge les patients atteints et de financer de nouvelles recherches (Atlas International Diabetes Federation, 2017).

2.2. Facteurs influençant la pathologie

Pour un individu sain, la glycémie est régulée grâce principalement à l'action de l'insuline. Après un repas, l'insuline est alors sécrétée et permet le stockage du glucose par les muscles, les tissus adipeux

et le foie. L'apparition du diabète de type 2 résulte d'une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. Environ 50 gènes sont associés au diabète de type 2 (Morris *et al.*, 2012). Ces gènes peuvent être liés aux concentrations de glucose et d'insuline, à l'obésité ou aux cellules β (McCarthy, 2010; Scott *et al.*, 2012). Néanmoins, la seule combinaison de facteurs environnementaux et de gènes codant pour la masse adipeuse ne suffit pas pour provoquer la pathologie, mais seulement une obésité. Il faut en plus ajouter des gènes responsables du dysfonctionnement des cellules β pour déclarer la maladie. On estime que le risque de développer la maladie est de 40% si l'un des deux parents est atteint et de 70% si les deux parents le sont (Ali, 2013). Ceci montre bien que les facteurs environnementaux ne sont pas seuls responsables de l'apparition de T2D, mais que les cellules β sont fortement impliquées dans ce processus (Figure 8).

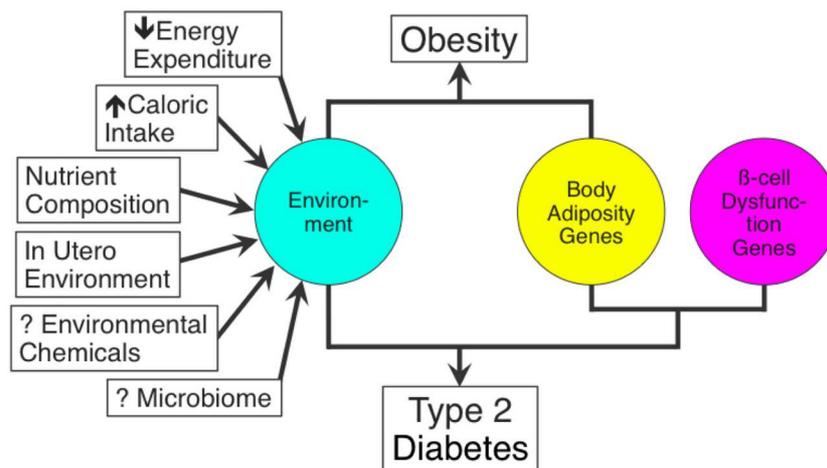


Figure 8 : Corrélation entre les facteurs environnementaux et la contribution génétique à l'apparition du diabète de type 2 (Kahn 2014)

Les facteurs environnementaux conduisant à la maladie sont bien définis pour deux d'entre eux : un fort apport calorique associé à une faible dépense d'énergie. 80% des personnes souffrant de la maladie présentent une obésité (Golay & Ybarra, 2005), confirmant son importance comme décrit dans la figure 8. Néanmoins, la composition nutritive des repas a également son importance, pouvant être à l'origine de dysfonctionnement des cellules β par exemple.

En pratique, la régulation du glucose est dirigée par une boucle de rétroaction impliquant les cellules β productrices d'insuline et les récepteurs de cette dernière. La formation du complexe insuline-récepteur va provoquer la relocalisation du transporteur Glut4 (Chang *et al.*, 2004), permettant l'assimilation du glucose par les muscles et tissus adipeux (Foley *et al.*, 2011). Dans le cas d'un patient diabétique, la communication entre l'insuline et son récepteur va être rompue, ce qui va avoir pour effet d'empêcher la relocalisation du transporteur de glucose Glut4 au niveau de la membrane cellulaire (Figure 9). Le stockage du glucose dans les tissus adipeux est donc inhibé, provoquant l'augmentation de la glycémie (Boucher *et al.*, 2014). Différents mécanismes de résistance de l'insuline ont été proposés, dus à une lipotoxicité ou des mutations génétiques par exemple.

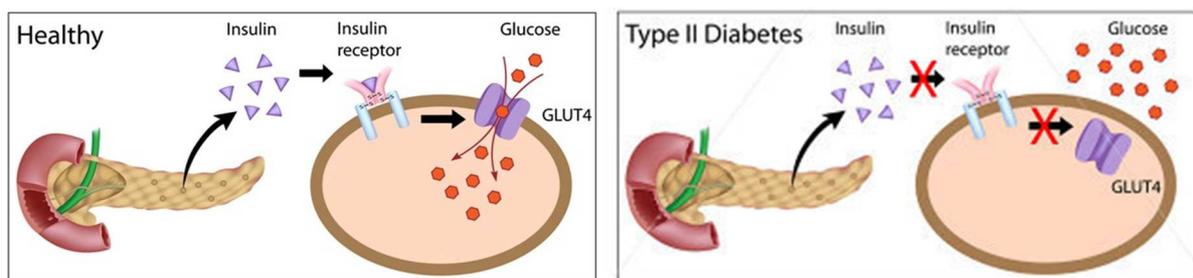


Figure 9 : Schéma simplifié de l'action de l'insuline pour la régulation du glucose grâce au récepteur Glut4

2.3. Conséquences

Le diabète de type 2 se caractérise par une augmentation de la glycémie, au-delà de 1,26 g/L pour un individu à jeun ou 2 g/L après un repas. Cette glycémie élevée correspond à un défaut d'assimilation du glucose par les sites de stockage. Les conséquences de cette augmentation aux niveaux micro et macrovasculaires se répercutent sur plusieurs organes si elle n'est pas contrôlée :

- Les yeux, affectant principalement la rétine et le cristallin et pouvant conduire à la cécité. Le diabète est la première cause de cécité chez les personnes de plus de 65 ans. La rétinopathie touche plus de 50% des diabétiques (Fong *et al.*, 2004).
- Les reins peuvent être fortement dégradés, le diabète étant la première cause de mise sous dialyse des patients. 50% des patients sont atteints de néphropathie (Detournay *et al.*, 2012).
- Les artères et le cœur, conduisant à une augmentation du risque d'accident vasculaire dû à la coagulation importante du sang. La mortalité cardiovasculaire chez les patients diabétiques est environ quatre fois supérieure à celle des patients sains, et représente la cause majeure de mortalité (>65%) parmi les patients diabétiques. On observe également une hypertension artérielle ainsi que l'augmentation du taux de cholestérol (Forbes & Cooper, 2013).
- Les membres inférieurs généralement, les diabétiques étant plus sensibles aux infections car le processus de cicatrisation est perturbé. Ceci peut conduire à l'amputation des membres concernés (le diabète est la première cause d'amputation en France).
- Les nerfs peuvent également être altérés par cette glycémie élevée conduisant à une neuropathie. Tous les nerfs peuvent être atteints en cas de diabète (Forbes & Cooper, 2013).

Au niveau des cellules β pancréatiques (Chen *et al.*, 2017), la pathologie se distingue en deux périodes distinctes. Lorsque l'insuline commence à être mal utilisée (bien que toujours produite), le pancréas va augmenter la quantité de cellules β , et celles-ci vont augmenter leur production d'insuline afin de compenser son défaut d'utilisation. Il s'agit de la phase pré-diabétique. Cependant, après un certain temps, les cellules ne supporteront plus cette surcharge de production d'insuline et leur nombre ainsi que leur fonction va diminuer, limitant la production d'insuline et empêchant la bonne assimilation du glucose. Il s'agit alors de la phase diabétique (Figure 10).

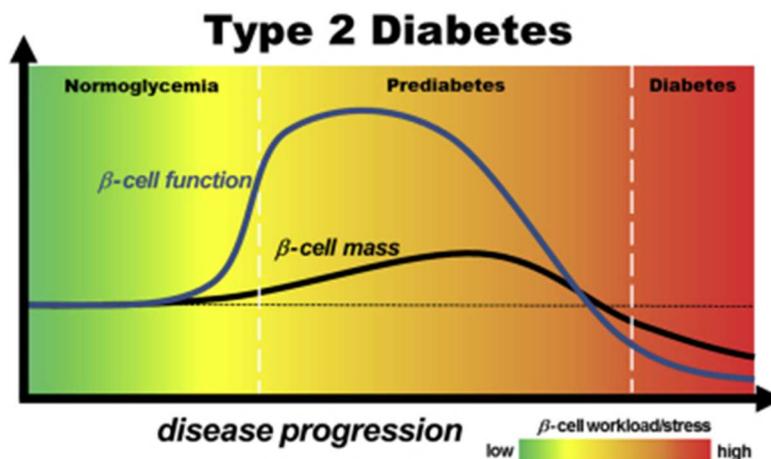


Figure 10 : Evolution de la quantité et de l'activité des cellules β avant et pendant la maladie (adapté de Chen 2017)

2.4. hIAPP : human Islet Amyloid PolyPeptide

Nous avons vu que le diabète de type 2 est caractérisé par des signes macroscopiques, mais également par des indices microscopiques tels que la présence de plaques amyloïdes extracellulaires insolubles composées de hIAPP. Cependant, si hIAPP semble être impliqué dans ce processus pathologique, il est au même titre que l'insuline nécessaire à la bonne régulation de la glycémie.

2.4.1. Rôle de hIAPP chez un patient sain

Après avoir rappelé le rôle de l'insuline dans la régulation de la glycémie, il est intéressant de noter que le peptide amyloïde hIAPP contribue également à ce processus. Une pro-hormone de 67 acides aminés sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, proIAPP, subit un clivage protéolytique pour aboutir à hIAPP. hIAPP est composé de 37 acides aminés et est produit dans une quantité cent fois plus faible que l'insuline (Susa *et al.*, 2014) (Figure 11). La production de hIAPP est réalisée dans le compartiment intracellulaire au pH faiblement acide de 5.5, après quoi il est sécrété dans le compartiment extracellulaire à pH physiologique. Chez un patient sain, la concentration de hIAPP dans le plasma est comprise entre 4 (à jeun) et 25 pmol/L (après un repas) (Marzban *et al.*, 2003). A ce jour, aucun récepteur spécifique de hIAPP n'a été découvert, même si des sites de liaisons ont été proposés dans le cerveau et le cortex rénal (Per Westermark, 2011). Partant de cette observation, il se pourrait que hIAPP soit impliqué dans des processus de régulation de la glycémie en contrôlant la digestion et la satiété par exemple, ainsi que la libération du glucagon. Il a même été observé que hIAPP pouvait avoir un effet de réduction de la masse corporelle dans les cas d'administration chronique de pramlintide (analogue de hIAPP) chez l'humain (Wielinga *et al.*, 2010).



Figure 11 : Séquence de hIAPP, avec un pont disulfure entre C2 et C7 (adapté de Akter 2016)

2.4.2. Fibrillation de hIAPP suivant la cascade amyloïde et structures associées

Le peptide hIAPP a donc des propriétés nécessaires chez un patient non-diabétique afin de réguler la glycémie. Néanmoins, dans certaines conditions, il arrive qu'un processus pathologique se mette en place et conduise à la dérégulation de la glycémie. Plusieurs hypothèses ont été formulées quant au mécanisme responsable de cette dérégulation. Parmi elle, on notera celle concernant le surplus de graisse dans les tissus adipeux, qui empêche l'insuline de jouer son rôle par à cause d'un défaut de signalisation (DeFronzo, 2004). Il a également été démontré qu'une importante quantité de graisse dans le pancréas pouvait être toxique pour les cellules β responsables de la production d'insuline, ce qui suggère un mécanisme lié à une lipotoxicité (Sattar & Gill, 2014).

Cependant, une nouvelle hypothèse a émergé et fait intervenir hIAPP au travers de son oligomérisation et de sa fibrillation (Abedini & Schmidt, 2013; Haataja *et al.*, 2008) dans des conditions favorables à l'apparition de la maladie comme une obésité. En effet, hIAPP tend à s'oligomériser selon un schéma appelé cascade amyloïde qui définit les espèces impliquées dans ce processus (Figure 12). Il est toutefois très compliqué d'obtenir des données structurales sur les différentes espèces formées, étant donnée la très forte propension de hIAPP à s'agréger. Les espèces sont de plus en plus stables, et la variabilité sur les morphologies observées est importante. Néanmoins, il semblerait que la séquence SNNFGAILSS soit responsable de la propension amyloïdogénique de hIAPP (Moet *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015).

Dès 2000, une étude par dichroïsme circulaire a montré que hIAPP incubé dans HFIP pur pendant plusieurs jours adopte une conformation en hélice α . Lorsque la proportion de HFIP est diminuée à 1%, on observe après 24h une conformation en feuillets β associée à la présence de fibres insolubles (Higham *et al.*, 2000). A l'inverse, sans HFIP, le peptide précipite mais les feuillets β ne sont plus observés. Ceci suggère que le milieu d'incubation a une forte influence sur la conformation du peptide. Le lien entre la préparation d'échantillon et l'agrégation sera discuté dans le chapitre II. Des fibres organisées en feuillets β en présence de HFIP ont également été observées dans une seconde étude (Jayasinghe & Langen, 2004). hIAPP semble donc s'oligomériser en feuillets β , mais l'organisation de ces feuillets reste à discuter.

En effet, une structure de ces feuillets a été proposée en 2001 par diffraction aux RX et TEM, suggérant un repliement en « e », avec trois feuillets β et deux boucles au sein des monomères formant les fibres, avec un espace inter-brin de 4,7 Å (Figure 12a) (Jaikaran & Clark, 2001; Sumner Makin & Serpell, 2004). En 2005, une nouvelle organisation des trois brins en « S » a été proposée, grâce aux interactions entre les résidus apolaires au cœur des brins (Figure 12b) (Kajava *et al.*, 2005). Ces brins β s'organiseraient ensuite de manière à former une structure fibrillaire torsadée. Une troisième organisation a été

proposée en 2007, impliquant cette fois non plus trois brins mais seulement deux reliés par une boucle au sein d'un monomère, conduisant à une structure en « U » (Figure 12c) (Luca *et al.*, 2007). Les deux brins sont ici écartés de 5 à 12 Å. Une autre étude a confirmé ce modèle en 2012, avec cependant un espace inter-brins de 15 Å (Bedrood *et al.*, 2012).

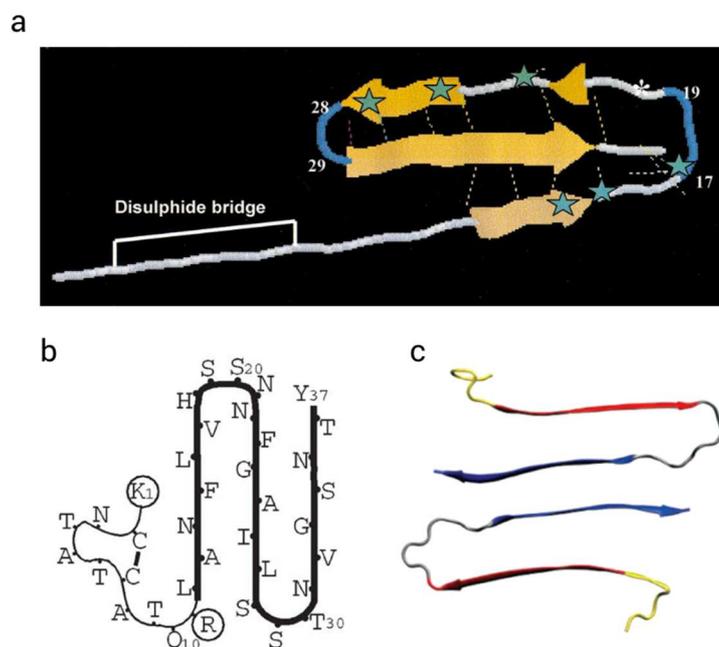


Figure 12 : Différentes organisations de feuillets β : (a) Organisation en « e » (Jaikaran 2001) ; (b) Organisation en « S » (Kajava 2005) ; (c) Organisation en « U » (Luca 2007)

En parallèle de ces études, plusieurs équipes ont investigué l'apport de la modélisation moléculaire pour l'étude de la structuration de hIAPP. En 2013, une étude par dynamique moléculaire a comparé hIAPP et rIAPP (IAPP du rat), dont la structure ne diffère que par six acides aminés et dont l'absence d'oligomérisation a été démontrée. Dans le cas de hIAPP, les feuillets β sont prédominants par rapport à une structure hélicoïdale (40% et 10% respectivement) tandis qu'on observe l'inverse pour rIAPP (5% et 40% respectivement). Les proportions de boucle et de structures aléatoires sont proches (Figure 13) (Wu & Shea, 2013). Il semblerait donc que la forme non-amyloïdogénique de IAPP soit dans une conformation hélicoïdale, et adopte ensuite une conformation en feuillets β , plus toxique. Il apparaît donc que les formes les plus amyloïdogéniques sont majoritairement en feuillets β .

Toutefois, hIAPP étant sécrété dans un milieu cellulaire, certaines études se sont intéressées au comportement de hIAPP dans un tel milieu, et notamment à sa conformation. Pour cela, des mimes de membranes cellulaires comme des liposomes de phospholipides sont utilisés. Il a été reporté que ces membranes accélèrent jusqu'à un facteur 10 l'oligomérisation de hIAPP en servant de site de nucléation pour le peptide (Knight & Miranker, 2004). Les auteurs montrent de plus que l'interaction entre hIAPP et la membrane a lieu à l'extrémité N-terminale du peptide. En 2006, la même équipe s'est intéressée à la conformation du peptide lorsqu'il est en interaction avec la membrane (Knight *et al.*,

2006). Il apparaît alors que le peptide s'organise en hélice α au contact de la membrane (étape I). Ces travaux suggèrent donc une structure hélicoïdale du peptide avec insertion de la partie N-terminale dans la membrane (étape II). Les monomères hélicoïdaux s'associent ensuite pour former des petits agrégats liés à la membrane (étape III), et sont considérés par les auteurs comme les espèces responsables de la rupture de la membrane. Ces agrégats sont ensuite convertis en fibres amyloïdes organisées en feuillets β (étape IV) (Figure 13). Ceci confirme une précédente étude de 2005 (Jayasinghe & Langen, 2005).

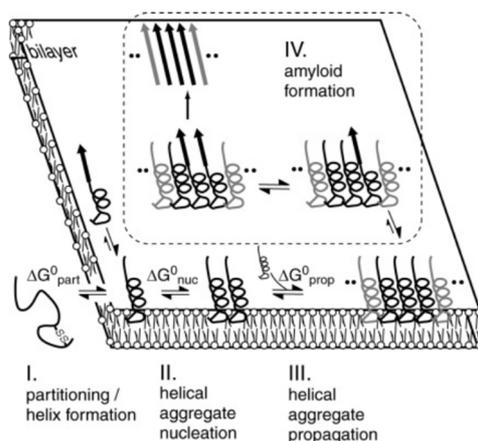


Figure 13 : Schéma explicitant le processus d'agrégation de hIAPP en présence de membranes, en quatre étapes (Knight 2006)

Ces observations montrent qu'il est effectivement très compliqué de déterminer précisément la structure de ces espèces, d'autant plus qu'elles sont très peu stables. Il existe un grand nombre d'espèces, ou de conformations, au cours du processus d'oligomérisation, ce qui rend difficile l'estimation de la toxicité de chacune.

2.4.3. Toxicité des espèces impliquées dans la cascade amyloïde

Il a été montré pour la première fois en 1994 que hIAPP était toxique pour des cellules pancréatiques humaines dès $5 \mu\text{M}$ (Lorenzo *et al.*, 1994). Seule la toxicité des fibres amyloïdes a été démontrée dans ces travaux, d'après leur apparence en TEM ainsi qu'en biréfringence sous lumière polarisée en présence de Congo Red. Cependant, deux études ont démontré plus tard qu'en ajoutant directement des fibres amyloïdes déjà formées sur des cellules pancréatiques, la viabilité de ces dernières était assurée (Janson *et al.*, 1999; Konarkowska *et al.*, 2006). A l'inverse, une solution fraîchement préparée de hIAPP ajoutée aux cellules pancréatiques induit l'apoptose des cellules (Janson *et al.*, 1999; Jeong & An, 2015). Ces résultats montrent que les fibres observées dans le cas de pathologies amyloïdes comme le diabète de type 2 ne seraient pas les espèces les plus toxiques du processus pathologique, bien qu'elles puissent être à l'origine de phénomènes inflammatoires (Westwell-Roper *et al.*, 2016). Les espèces cytotoxiques pour les cellules pancréatiques seraient les intermédiaires métastables de la cascade. Cette conclusion est appuyée par l'interaction que le peptide possède avec des membranes :

une solution fraîche de hIAPP provoque une rupture de ces membranes, ce qui n'est pas le cas avec des fibres. La rupture des membranes est totale dès 30 μM (Cao *et al.*, 2013; Haataja *et al.*, 2008), bien que cette concentration soit variable en fonction des membranes utilisées. Il s'avère néanmoins que peu d'études sont disponibles sur hIAPP, alors que la toxicité des oligomères de A β a été plus largement étudiée. Les conclusions sont identiques à celles de hIAPP et confirment que la cytotoxicité est due principalement aux espèces oligomériques intermédiaires solubles (Sakono & Zako, 2010). Toutes ces études démontrent donc une toxicité extracellulaire de hIAPP, majoritairement due aux oligomères intermédiaires solubles.

Cependant, d'autres mécanismes de toxicité ont été proposés, notamment le stress du réticulum endoplasmique, la surproduction de cytokines favorisant des processus inflammatoires ou l'endommagement des mitochondries provoquant l'augmentation de la production d'espèces oxygénées réactives (ROS) (Cao *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2018).

Il a été de plus montré que la co-incubation entre ces peptides et des protéines chaperonnes à un ratio sub-stœchiométrique pouvait réduire leur toxicité. Il semblerait donc que l'action des protéines chaperonnes empêcherait la destruction des membranes en convertissant rapidement les petits oligomères toxiques en des formes fibrillaires moins toxiques (Mannini *et al.*, 2012). Ces résultats confirment la toxicité des intermédiaires solubles. D'un point de vue moléculaire, un mécanisme a été proposé récemment pour expliquer la cytotoxicité des oligomères de hIAPP (Pithadia *et al.*, 2016). Confirmant le mécanisme explicité Figure 13, l'interaction de hIAPP avec la membrane provoque la formation de pores conduisant à l'apoptose des cellules pancréatiques par fuite de leur matériel cellulaire (Figure 14). Le processus de croissance des fibres à la membrane endommagerait également celle-ci (Figure 14 iv) (Engel *et al.*, 2008; Jan *et al.*, 2011).

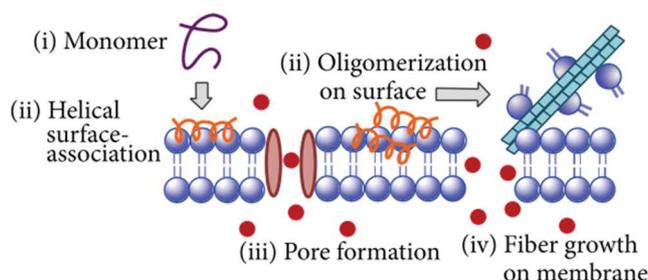


Figure 14 : Représentation simplifiée du mécanisme d'interaction entre les différentes formes de hIAPP et les membranes cellulaires, expliquant l'apoptose des cellules par fuite du matériel cellulaire (Pithadia 2016)

2.5. Diagnostic

Le diagnostic du diabète de type 2 repose sur une mesure de la glycémie à un instant donné, dans différentes conditions. Les valeurs normales de glycémie sont inférieures à 100 mg/dL à jeun et 140 mg/dL à la deuxième heure d'une hyperglycémie provoquée en dissolvant 75 g de glucose anhydre

dans de l'eau (HPGO). Le patient sera déclaré diabétique si la glycémie est supérieure à une des trois valeurs suivantes :

- 126 mg/dL (7mmol/L) dans le cas d'une mesure de glycémie à jeun (absence d'apport calorique depuis au moins 8h).
- 200 mg/dL (11.1 mmol/L) à n'importe quel moment de la journée, en présence de signes cliniques d'hyperglycémie suivants : perte de poids inexplicquée, polyurie, polydipsie.
- 200 mg/dL (11.1 mmol/L) à la deuxième heure d'une HPGO.

Entre ces valeurs normales et valeurs limites, on définit un groupe de patients intermédiaires non diabétiques mais présentant des facteurs de risques pour un futur diabète ou des maladies cardiovasculaires.

Afin d'avoir une vision sur une période plus large de la glycémie, il est également possible de quantifier l'hémoglobine glyquée HbA1c. Elle est obtenue par glycation de l'hémoglobine en cas d'hyperglycémie prolongée. Celle-ci permet d'obtenir une estimation sur les 8 à 12 semaines précédant l'analyse. Si sa proportion est supérieure à 6.5% par rapport à l'hémoglobine non-glyquée, on déclare le patient comme étant diabétique. On considère également qu'au-delà de 7.5%, il s'agit d'un facteur de risque de complications cardiovasculaires.

2.6. Approches thérapeutiques

Les traitements proposés pour le diabète de type 2 sont à ce jour symptomatiques et ne permettent pas une guérison totale de la maladie. Ils concernent notamment le contrôle et la régulation de la glycémie pour limiter les effets indésirables, notamment cardiovasculaires. Cependant, de nouvelles stratégies voient le jour selon une approche plus globale, ciblant la cause de cette pathologie et non les symptômes. Pour cela, la compréhension des mécanismes pathologiques est nécessaire, notamment grâce à de nouveaux outils analytiques détaillés dans le chapitre 2.

2.6.1. Solutions actuelles

Les traitements actuels se concentrent sur la régulation du glucose, notamment en améliorant la production et la reconnaissance de l'insuline. Toutefois, une alimentation adaptée ainsi qu'une activité physique régulière sont également indispensables pour limiter les effets du diabète. Ces deux facteurs contribuent en effet à retarder l'apparition de la maladie. Les différentes solutions disponibles à l'heure actuelle sont détaillées dans le Tableau III (Marín-Peñalver *et al.*, 2016).

Tableau III : Résumé des différents médicaments disponibles pour le diabète de type 2, avec leurs actions et leurs effets secondaires

		Généralités - Mécanisme d'action	Indications / bénéfices additionnels	Effets secondaires
Voie orale	Metformine	Principal traitement pour T2D. Diminue les niveaux de lipopolysaccharide dans le foie. Inhibe la gluconéogenèse.	Peut être utilisé en association avec d'autres traitements. Diminue la glycémie de 20% et HbA1c de 1.5%. Contre-indiquée si GFR < 30 mL/min. Diminue potentiellement les risques cardiovasculaires et de cancer.	Risques gastrointestinaux (anorexie, nausées). Diminue l'absorption de vitamine B12.
	Sécréteurs d'insuline (sulfonylurées et glinides)	Largement utilisés pour le traitement du T2D. Stimulent la production d'insuline par les cellules β en augmentant le niveau de calcium cytoplasmique.	Efficaces à long terme et peu coûteux. Réduction de HbA1c de 1.5% pour les sulfonylurées et 1% pour les meglitinides.	Perte d'efficacité dû à la destruction des cellules β , risques d'hypoglycémie (moins présents avec les nouvelles générations). Potentiels risques cardiovasculaires.
	Inhibiteurs d'Alpha-glucosidase	Réduisent la quantité de triglycérides postprandiale. Retardent l'absorption des carbohydrates diminuent l'hyperglycémie postprandiale.	Réduction de HbA1c modeste comparée aux autres traitements.	Risques gastrointestinaux (diarrhée, douleur), dû à la non-digestion des carbohydrates.
	Thiazolidinediones (TZD)	Plus disponibles en France depuis 2011 car risques trop importants. Augmentent la sensibilité à l'insuline et diminuent la production de glucose. Préservent l'activité des cellules β .	Efficacité similaire à la metformine.	Prise de poids, risques cardiaques élevés. Augmentation du risque de cancer de la vessie et de fracture osseuse.
	Inhibiteurs de Dipeptidyl peptidase-4 (iDPP4)	Augmentent l'activité des îlots et le contrôle de la glycémie en inhibant	5 iDPP4 existent et sont utilisées en combinaison ou non. Réduction de HbA1c d'environ	Peu de risques d'hypoglycémie. Potentiels risques de dérèglement hépatique.

		DPP4 pour empêcher l'inactivation des incrétines	0.7% en fonction des doses. (études à long terme). Doses diminuées si GFR < 50 mL/min. Pas de risques cardiovasculaires.	
	Inhibiteurs de Sodium glucose co-transporter-2 (iSGLT2)	iSGLT2 favorisent l'excrétion du glucose par voie urinaire et réduisent l'hyperglycémie en inhibant la réabsorption rénale du glucose.	Efficacité réduite chez les patients atteints de dysfonctionnements rénaux. 3 familles principales sont utilisées en combinaison ou non. Réduction de HbA1c d'environ 0.7% en fonction des doses (études à long-terme). Pas de risque de sur-stimulation des cellules β .	Faible risque d'hypoglycémie. Perte de poids (1-5 kg). Risque d'infections urogénitales.
Injectable	Glucagon-like peptide-1 receptor agonist (RA-GLP1)	Augmente la sécrétion d'insuline, diminue la production de glucagon, ralentit la digestion et augmente la satiété.	Faible demi-vie : 1 à 2 min à cause de la digestion par DPP4. Demi-vie augmentée pour les nouvelles générations (jusqu'à une semaine). Réduction de HbA1c d'environ 1.5% en fonction des doses (études à long-terme) pour la dernière génération.	Risques gastrointestinaux (nausée, diarrhée). Faible risque d'hypoglycémie. Perte de poids (1-3 kg).
	Insuline	Plusieurs préparations sont disponibles en fonction de la durée d'action.	Réduction de HbA1c d'environ 1.1%.	Nouvelles générations réduisent les risques d'hypoglycémie.
	Pramlintide	Reproduit l'action de hIAPP en contrôlant la glycémie postprandiale et favorisant la satiété.	Réduction de HbA1c comprise entre 0.6 et 1%. Pas de risque d'hypoglycémie.	Perte de poids (1-5 kg). Provoque des nausées

On remarque dans ce tableau que les solutions disponibles à l'heure actuelle, bien qu'efficaces, présentent d'importants effets secondaires. De plus, tous ces traitements ne sont que symptomatiques et en particulier, ne réduisent pas de manière directe l'apoptose des cellules β . Ils nécessitent un suivi journalier, ne permettant que le contrôle momentané de la glycémie. C'est pourquoi de nouvelles voies de recherches émergent afin de cibler spécifiquement les espèces responsables de la pathologie.

2.6.2. Voies de recherches

Au regard des médicaments disponibles à ce jour, il s'avère que tous présentent des effets secondaires et sont généralement coûteux à produire. L'étude de nouvelles stratégies pour la conception de candidats médicaments peu coûteux et présentant peu d'effets secondaires est donc une priorité dans le traitement du diabète de type 2. Parmi les stratégies étudiées, celle visant la diminution de l'agrégation de hIAPP semble prometteuse, en particulier pour diminuer l'apoptose des cellules β pancréatiques. Plusieurs espèces impliquées dans le processus pathologique lié à hIAPP peuvent alors être ciblées : le monomère de hIAPP, que l'on retrouve chez les patients sains, les formes oligomériques solubles et les formes fibrillaires insolubles. On distingue par conséquent une multitude de voies possibles pour empêcher la formation d'intermédiaires toxiques (Figure 15), comme la conservation de hIAPP dans son état monomérique ou une rapide évolution vers des formes fibrillaires supposées moins toxiques que les oligomères. Ce grand nombre de possibilités ouvre de nouvelles perspectives concernant le traitement du diabète de type 2, et plusieurs solutions sont à l'heure actuelle étudiées.

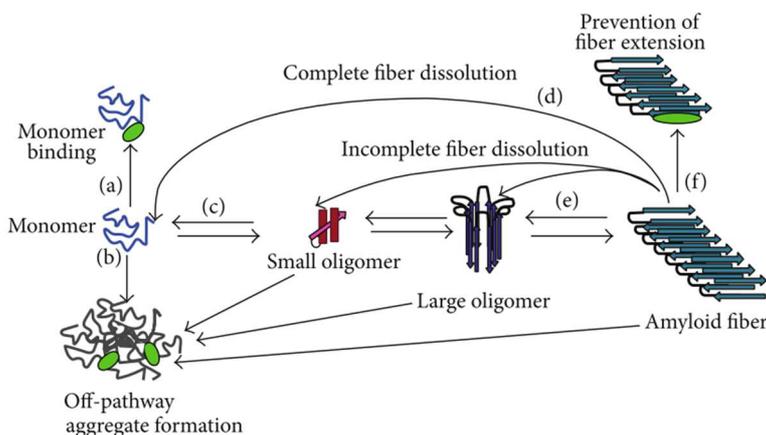


Figure 15 : Cascade amyloïde de hIAPP détaillée avec les différentes espèces cibles pour le développement de nouveaux traitements (Pithadia 2016)

2.6.2.1. Les inhibiteurs peptidiques

Deux voies possibles s'ouvrent si la forme monomérique est ciblée. On peut en effet ralentir voire stopper l'oligomérisation, ou la dévier vers une voie formant des oligomères non toxiques.

Les inhibiteurs peptidiques présentent l'intérêt d'être très sélectifs lorsque les séquences sont soigneusement choisies pour reconnaître la cible, ici hIAPP. Par exemple, il a été montré en 2010 (Cao *et al.*, 2010) que rIAPP (différent de hIAPP par les six substitutions suivantes : H18R, F23L, A25P, I26V, S28P et S29P ; les structures complètes sont présentées Figure 16) peut se complexer à hIAPP afin de limiter son oligomérisation de manière dose-dépendante en ciblant la région hélicoïdale de hIAPP. rIAPP ne forme pas de fibres et permet au rapport molaire 10/1 de diminuer de 85% la quantité d'agrégats formés par hIAPP seul. Partant de ce constat, un mime peptidique de hIAPP a été proposé et approuvé par la FDA en 2005 : le Pramlintide (PM) (Tableau III). Ce composé reprend trois substitutions de rIAPP (position 25, 28 et 29, Figure 16), empêchant ainsi son oligomérisation (H. Wang *et al.*, 2015). Si son activité est identique à celle de hIAPP, PM n'a jamais été évaluée comme inhibiteur de son agrégation (Pillay & Govender, 2013). De plus, étant totalement peptidique, ce composé est peu stable face à la protéolyse.

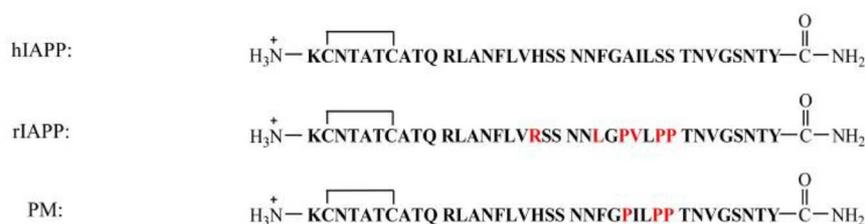


Figure 16 : Séquences de hIAPP, rIAPP et PM montrant les différentes substitutions (Wang 2015)

En 2013, Mishra *et al.* ont développé deux pentapeptides inhibant la formation de fibres amyloïdes (Mishra *et al.*, 2013). Ils ont montré par études computationnelles que ces molécules interagissent avec la forme monomérique hélicoïdale de hIAPP. D'un point de vue quantitatif, la quantité d'agrégats est réduite dans les deux cas d'environ 70%. Un acide aminé non-naturel a été incorporé dans chacun des deux inhibiteurs. Il s'agit d'un analogue de la phénylalanine possédant une double liaison entre C_α et C_β, apportant une stabilité accrue face à la protéolyse enzymatique (English & Stammer, 1978). Ceci constitue un avantage majeur pour un inhibiteur. Ce motif permet également de contrôler la structure des peptides dans lesquels il est présent en fonction de leur taille (Gupta *et al.*, 2008; Mathur *et al.*, 2004; Rajashankar *et al.*, 1992; Ramagopal *et al.*, 2001). La Figure 17 montre le mode d'action de ces molécules, empêchant la formation des oligomères toxiques. L'intérêt majeur de ce design est la reconnaissance de la structure de hIAPP par les acides aminés choisis, offrant une grande sélectivité ainsi qu'une stabilité accrue.

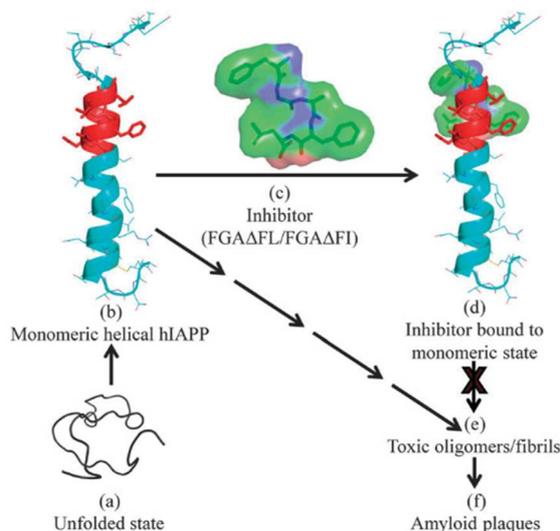


Figure 17 : interaction de l'inhibiteur FGAΔF(I) avec les monomères hélicoïdaux pour le stabiliser et éviter la formation d'oligomères toxiques (Mishra 2013)

2.6.2.2. Les polyphénols

En parallèle des inhibiteurs peptidiques, on retrouve également la famille des polyphénols, peu spécifiques entre les différentes protéines amyloïdes mais très efficaces. Parmi eux, on retrouve l'épigallocatechin-3-gallate (EGCG, Figure 18a), un composé issu du thé vert, dont l'activité anti-agrégation a été largement démontrée sur Aβ et hIAPP (Franko *et al.*, 2018; Mo *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2017; Young *et al.*, 2014). Ces travaux ont notamment montré une diminution de la conformation en feuillets β en présence d'EGCG. On observe également la formation d'un complexe entre hIAPP et EGCG, conduisant à la formation d'agrégats amorphes et non toxiques *in vitro* et *in vivo*. Ceci suggère une voie d'oligomérisation alternative pour hIAPP ne produisant pas d'oligomères toxiques mais conduisant tout de même à la formation de structures insolubles. EGCG est également capable de désagréger les structures fibrillaires (Meng *et al.*, 2010; Pithadia *et al.*, 2016).

Parmi les polyphénols, on retrouve également la curcumine, issu du curcuma (Figure 18b). Tout comme EGCG, la curcumine possède une affinité non-spécifique pour les espèces amyloïdes. En plus de ses propriétés anti-amyloïdes, elle est déjà largement utilisée comme anti-oxydant ou anti-cancéreux (Pithadia *et al.*, 2016). En revanche, son mécanisme d'action contre l'oligomérisation des amyloïdes demeure peu connu. Elle semble conduire à des formes alternatives des agrégats (Daval *et al.*, 2010) comme EGCG, mais possède également la capacité de déstructurer les intermédiaires oligomériques vers des conformations monomériques aléatoires non toxiques (Pithadia *et al.*, 2016; Sparks *et al.*, 2012). Bien que son mode d'action soit double, son activité est limitée par une cytotoxicité de l'ordre du μM, qui peut se révéler incompatible avec les concentrations nécessaires pour inhiber l'oligomérisation, de l'ordre de la dizaine de μM voire plus (Daval *et al.*, 2010).

Le resveratrol, issu du raisin, est également un polyphénol ayant des propriétés anti-agrégation pour les amyloïdes (Figure 18c). Contrairement à EGCG, le resvératrol ne se lie pas au monomère de hIAPP

(Tu *et al.*, 2015). Il ne fait que ralentir l'agrégation en se complexant à hIAPP de manière non-réversible, mais permet néanmoins de conserver une viabilité cellulaire de 90% (Pithadia *et al.*, 2016).

On retrouve enfin la silibinine, autre composé de type polyphénol (Figure 18d). Il a été montré en 2012 (Cheng *et al.*, 2012) que ce composé permet à la fois un blocage de l'oligomérisation dès le monomère, mais convertirait également des fibres structurées en agrégats amorphes. Dès le ratio 1/1, la silibinine permet de retarder l'agrégation d'un facteur 2 tout en améliorant la viabilité cellulaire *in vitro* de 10%. Tous ces inhibiteurs, bien qu'efficaces, présentent un désavantage majeur : ils ne sont pas spécifiques de hIAPP. Ceci peut conduire lors d'étude *in vivo* à de potentiels effets secondaires indésirables si les inhibiteurs ciblent d'autres protéines ou récepteurs, provoquant d'autres effets biologiques.

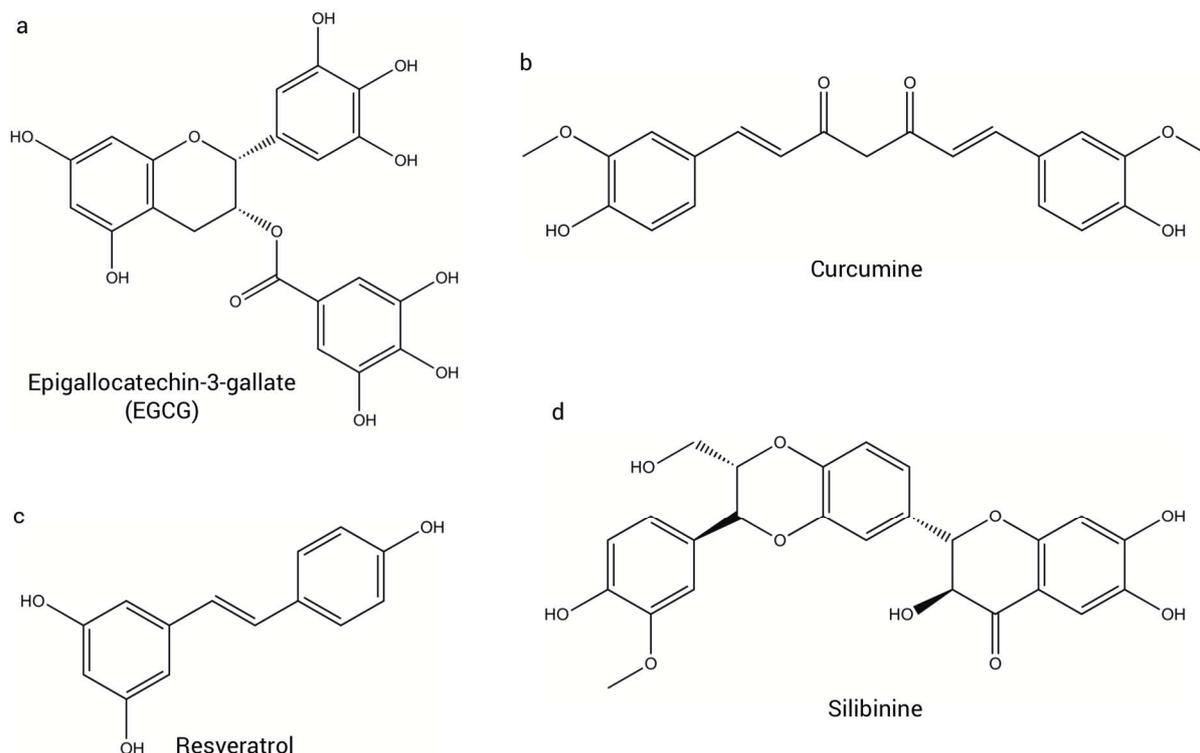


Figure 18 : Structure de quatre polyphénols étudiés comme inhibiteur de l'agrégation de hIAPP : (a) EGCG ; (b) Curcumine ; (c) Resveratrol et (d) Silibinine

2.6.2.3. Les métaux

Étant donné que les fibres amyloïdes ne seraient pas les espèces les plus toxiques de la cascade amyloïde, il pourrait être intéressant d'essayer de déplacer l'équilibre entre les différentes formes vers leur formation. Il a été montré que les métaux de transitions tels que le zinc peuvent être à l'origine de la stabilisation de formes fibrillaires lorsqu'ils sont employés à faible concentration (< 50 μM) (Nedumpully-Govindan *et al.*, 2015). A haute concentration, le zinc tend au contraire à détruire les structures fibrillaires. Cependant, il semble que la concentration de hIAPP ait un fort impact sur ces résultats car on observe un phénomène inverse lorsque l'on passe de 10 à 5 μM . Des expériences de résonance magnétique nucléaire ont montré que le zinc se coordonne à l'Histidine 18 provoquant une

perturbation de la structure du peptide (Brender *et al.*, 2010). Le Cobalt ainsi que le Cuivre ont eux aussi été étudiés comme inhibiteurs de l'agrégation de hIAPP (Jeong *et al.*, 2010; Suh *et al.*, 2008).

Toutes ces études montrent la complexité qu'il existe à développer des nouveaux inhibiteurs, notamment du fait de la grande variabilité observée pour les conformations de hIAPP. La toxicité des différentes espèces est encore sujette à discussion également. La difficulté est donc de produire un inhibiteur ciblant une conformation donnée, notamment sur les oligomères intermédiaires, très peu étudiés et considérés comme les espèces les plus toxiques. L'efficacité de nouveaux inhibiteurs développés au laboratoire sera discutée dans le chapitre V de ce manuscrit.

Références bibliographiques – Chapitre I

- Abedini, A., & Schmidt, A. M. (2013). Mechanisms of islet amyloidosis toxicity in type 2 diabetes. *FEBS Lett*, *587*(8), 1119–1127. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.01.017>
- Akter, R., Cao, P., Noor, H., Ridgway, Z., Tu, L. H., Wang, H., Wong, A. G., Zhang, X., Abedini, A., Schmidt, A. M., & Raleigh, D. P. (2016). Islet Amyloid Polypeptide: Structure, Function, and Pathophysiology. *J Diabetes Res*, *2016*, 2798269. <https://doi.org/10.1155/2016/2798269>
- Ali, O. (2013). Genetics of type 2 diabetes. *World Journal of Diabetes*, *4*(4), 114–123. <https://doi.org/10.4239/wjd.v4.i4.114>
- Bedrood, S., Li, Y., Isas, J. M., Hegde, B. G., Baxa, U., Haworth, I. S., & Langen, R. (2012). Fibril structure of human islet amyloid polypeptide. *J Biol Chem*, *287*(8), 5235–5241. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.327817>
- Berson, J. F., Theos, A. C., Harper, D. C., Tenza, D., Raposo, G., & Marks, M. S. (2003). Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. *The Journal of Cell Biology*, *161*(3), 521–533. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302072>
- Boucher, J., Kleinridders, A., & Kahn, C. R. (2014). Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009191>
- Brender, J. R., Hartman, K., Nanga, R. P. R., Popovych, N., de la Salud Bea, R., Vivekanandan, S., Marsh, E. N. G., & Ramamoorthy, A. (2010). Role of Zinc in Human Islet Amyloid Polypeptide Aggregation. *Journal of the American Chemical Society*, *132*(26), 8973–8983. <https://doi.org/10.1021/ja1007867>
- Cao, P., Abedini, A., Wang, H., Tu, L. H., Zhang, X., Schmidt, A. M., & Raleigh, D. P. (2013). Islet Amyloid Polypeptide Toxicity and Membrane Interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *110*(1) Cao, P.; Abedini, A.; Wang, H.; Tu, L. H.; Zhang, X.; Schmidt, A. M.; Raleigh, D. P. Islet Amyloid Polypeptide Toxicity and Membrane Interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013, *110*, 19279., 19279.
- Cao, P., Marek, P., Noor, H., Patsalo, V., Tu, L.-H., Wang, H., Abedini, A., & Raleigh, D. P. (2013). Islet amyloid: From fundamental biophysics to mechanisms of cytotoxicity. *FEBS Letters*, *587*(8), 1106–1118. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.01.046>
- Cao, P., Meng, F., Abedini, A., & Raleigh, D. P. (2010). The Ability of Rodent Islet Amyloid Polypeptide To Inhibit Amyloid Formation by Human Islet Amyloid Polypeptide Has Important Implications for the Mechanism of Amyloid Formation and the Design of Inhibitors. *Biochemistry*, *49*(5), 872–881. <https://doi.org/10.1021/bi901751b>
- Chang, L., Chiang, S.-H., & Saltiel, A. R. (2004). Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, *10*(7–12), 65–71. <https://doi.org/10.2119/2005-00029.Saltiel>
- Chaudhury, A., Duvoor, C., Reddy Dendi, V. S., Kraleti, S., Chada, A., Ravilla, R., Marco, A., Shekhawat, N. S., Montales, M. T., Kuriakose, K., Sasapu, A., Beebe, A., Patil, N., Musham, C. K., Lohani, G. P., & Mirza, W. (2017). Clinical Review of Antidiabetic Drugs: Implications for Type 2 Diabetes Mellitus Management. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *8*, 6. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00006>
- Chen, C., Cohrs, C. M., Stertmann, J., Bozsak, R., & Speier, S. (2017). Human beta cell mass and function

- in diabetes: Recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis. *Molecular Metabolism*, 6(9), 943–957. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.06.019>
- Cheng, B., Gong, H., Li, X., Sun, Y., Zhang, X., Chen, H., Liu, X., Zheng, L., & Huang, K. (2012). Silibinin inhibits the toxic aggregation of human islet amyloid polypeptide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 419(3), 495–499. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2012.02.042>
- Chiti, F., & Dobson, C. M. (2006). Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), 333–366. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901>
- Chou, P. Y., & Fasman, G. D. (1978). Empirical predictions of protein conformation. *Annu Rev Biochem*, 47(1), 251–276. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.47.070178.001343>
- Close, W., Neumann, M., Schmidt, A., Hora, M., Annamalai, K., Schmidt, M., Reif, B., Schmidt, V., Grigorieff, N., & Fändrich, M. (2018). Physical basis of amyloid fibril polymorphism. *Nature Communications*, 9(1), 699. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03164-5>
- Cohen, A. S., & Calkins, E. (1959). Electron Microscopic Observations on a Fibrous Component in Amyloid of Diverse Origins. *Nature*, 183, 1202. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/1831202a0>
- Cooper, G. J., Willis, A. C., Clark, A., Turner, R. C., Sim, R. B., & Reid, K. B. (1987). Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(23), 8628 LP-8632. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/84/23/8628.abstract>
- Daval, M., Bedrood, S., Gurlo, T., Huang, C.-J., Costes, S., Butler, P. C., & Langen, R. (2010). The effect of curcumin on human islet amyloid polypeptide misfolding and toxicity. *Amyloid*, 17(3–4), 118–128. <https://doi.org/10.3109/13506129.2010.530008>
- DeFronzo, R. A. (2004). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Medical Clinics of North America*, 88(4), 787–835. <https://doi.org/10.1016/J.MCNA.2004.04.013>
- Detournay, B., Simon, D., Guillausseau, P.-J., Joly, D., Verges, B., Attali, C., Clement, O., Briand, Y., & Delaitre, O. (2012). Chronic kidney disease in type 2 diabetes patients in France: Prevalence, influence of glycaemic control and implications for the pharmacological management of diabetes. *Diabetes & Metabolism*, 38(2), 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2011.11.005>
- Engel, M. F. M., Khemtémourian, L., Kleijer, C. C., Meeldijk, H. J. D., Jacobs, J., Verkleij, A. J., de Kruijff, B., Killian, J. A., & Höppener, J. W. M. (2008). Membrane damage by human islet amyloid polypeptide through fibril growth at the membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(16), 6033–6038. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708354105>
- English, M. L., & Stammer, C. H. (1978). The enzyme stability of dehydropeptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 83(4), 1464–1467. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(78\)91385-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(78)91385-2)
- Fitzpatrick, A. W. P., Debelouchina, G. T., Bayro, M. J., Clare, D. K., Caporini, M. A., Bajaj, V. S., Jaroniec, C. P., Wang, L., Ladizhansky, V., Müller, S. A., MacPhee, C. E., Waudby, C. A., Mott, H. R., De Simone, A., Knowles, T. P. J., Saibil, H. R., Vendruscolo, M., ... Dobson, C. M. (2013). Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- β amyloid fibril. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(14), 5468–5473. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219476110>
- Foley, K., Boguslavsky, S., & Klip, A. (2011). Endocytosis, Recycling, and Regulated Exocytosis of Glucose Transporter 4. *Biochemistry*, 50(15), 3048–3061. <https://doi.org/10.1021/bi2000356>

- Fong, D. S., Aiello, L., Gardner, T. W., King, G. L., Blankenship, G., Cavallerano, J. D., Ferris, F. L., Klein, R., & American Diabetes Association. (2004). Retinopathy in diabetes. *Diabetes Care*, 27 Suppl 1(suppl 1), S84-7. <https://doi.org/10.2337/DIACARE.27.2007.S84>
- Forbes, J. M., & Cooper, M. E. (2013). Mechanisms of Diabetic Complications. *Physiological Reviews*, 93(1), 137–188. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2011>
- Franko, A., Rodriguez Camargo, D. C., Böddrich, A., Garg, D., Rodriguez Camargo, A., Rathkolb, B., Janik, D., Aichler, M., Feuchtinger, A., Neff, F., Fuchs, H., Wanker, E. E., Reif, B., Häring, H.-U., Peter, A., & Hrabě de Angelis, M. (2018). Epigallocatechin gallate (EGCG) reduces the intensity of pancreatic amyloid fibrils in human islet amyloid polypeptide (hIAPP) transgenic mice. *Scientific Reports*, 8(1), 1116. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18807-8>
- Golay, A., & Ybarra, J. (2005). Link between obesity and type 2 diabetes. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 19(4), 649–663. <https://doi.org/10.1016/J.BEEM.2005.07.010>
- Guariguata, L., Whiting, D. R., Hambleton, I., Beagley, J., Linnenkamp, U., & Shaw, J. E. (2014). Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract*, 103(2), 137–149. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.11.002>
- Gupta, M., Acharya, R., Mishra, A., Ramakumar, S., Ahmed, F., & Chauhan, V. S. (2008). Dehydrophenylalanine (Δ Phe) as a β Breaker: Extended Structure Terminated by a Δ Phe-Induced Turn in the Pentapeptide Boc-Phe1-Ala2-Ile3- Δ Phe4-Ala5-OMe. *ChemBioChem*, 9(9), 1375–1378. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800053>
- Haataja, L., Gurlo, T., Huang, C. J., & Butler, P. C. (2008). Islet amyloid in type 2 diabetes, and the toxic oligomer hypothesis. *Endocr Rev*, 29(3), 303–316. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0037>
- Harrison, R. S., Sharpe, P. C., Singh, Y., & Fairlie, D. P. (2007). Amyloid Peptides and Proteins in Review. *Rev. Physiol. Biochem. Pharm.*, 159, 1.
- Hernández, M. G., Aguilar, A. G., Burillo, J., Oca, R. G., Manca, M. A., Novials, A., Alcarraz-Vizan, G., Guillén, C., & Benito, M. (2018). Pancreatic β cells overexpressing hIAPP impaired mitophagy and unbalanced mitochondrial dynamics. *Cell Death & Disease*, 9(5), 481. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0533-x>
- Hidaka, T., Shimada, A., Nakata, Y., Kodama, H., Kurihara, H., Tokihiro, T., & Ihara, S. (2015). Simple model of pH-induced protein denaturation. *Physical Review E*, 92(1), 012709. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.92.012709>
- Higham, C. E., Jaikaran, E. T., Fraser, P. E., Gross, M., & Clark, A. (2000). Preparation of synthetic human islet amyloid polypeptide (IAPP) in a stable conformation to enable study of conversion to amyloid-like fibrils. *FEBS Lett*, 470(1), 55–60. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10722845>
- Jaikaran, E. T. A., & Clark, A. (2001). Islet amyloid and type 2 diabetes: from molecular misfolding to islet pathophysiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1537(3), 179–203. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(01\)00078-3](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(01)00078-3)
- Jan, A., Adolfsson, O., Allaman, I., Buccarello, A.-L., Magistretti, P. J., Pfeifer, A., Muhs, A., & Lashuel, H. A. (2010). A β 42 neurotoxicity is mediated by ongoing nucleated polymerization process rather than by discrete A β 42 species. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.172411>
- Janson, J., Ashley, R. H., Harrison, D., McIntyre, S., & Butler, P. C. (1999). The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles. *Diabetes*, 48(3), 491–498. <https://doi.org/10.2337/DIABETES.48.3.491>

- Jayasinghe, S. A., & Langen, R. (2004). Identifying structural features of fibrillar islet amyloid polypeptide using site-directed spin labeling. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(46), 48420–48425. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406853200>
- Jayasinghe, S. A., & Langen, R. (2005). Lipid membranes modulate the structure of islet amyloid polypeptide. *Biochemistry*, *44*(36), 12113–12119. <https://doi.org/10.1021/bi050840w>
- Jeong, H. R., & An, S. S. (2015). Causative factors for formation of toxic islet amyloid polypeptide oligomer in type 2 diabetes mellitus. *Clin Interv Aging*, *10*, 1873–1879. <https://doi.org/10.2147/CIA.S95297>
- Jeong, K., Chung, W. Y., Kye, Y. S., & Kim, D. (2010). Cu(II) cyclen cleavage agent for human islet amyloid peptide. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *18*(7), 2598–2601. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.02.045>
- Jiménez, J. L., Nettleton, E. J., Bouchard, M., Robinson, C. V., Dobson, C. M., & Saibil, H. R. (2002). The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(14), 9196–9201. <https://doi.org/10.1073/pnas.142459399>
- Kajava, A. V., Aebi, U., & Steven, A. C. (2005). The Parallel Superpleated Beta-structure as a Model for Amyloid Fibrils of Human Amylin. *Journal of Molecular Biology*, *348*(2), 247–252. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2005.02.029>
- Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., & Ulrich Hartl, F. (2013). Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis. *Annual Review of Biochemistry*, *82*(1), 323–355. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-092442>
- Knight, J. D., Hebda, J. A., & Miranker, A. D. (2006). Conserved and cooperative assembly of membrane-bound alpha-helical states of islet amyloid polypeptide. *Biochemistry*, *45*(31), 9496–9508. <https://doi.org/10.1021/bi060579z>
- Knight, J. D., & Miranker, A. D. (2004). Phospholipid Catalysis of Diabetic Amyloid Assembly. *Journal of Molecular Biology*, *341*(5), 1175–1187. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.06.086>
- Konarkowska, B., Aitken, J. F., Kistler, J., Zhang, S., & Cooper, G. J. S. (2006). The aggregation potential of human amylin determines its cytotoxicity towards islet β -cells. *FEBS Journal*, *273*(15), 3614–3624. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05367.x>
- Lomas, D. A., & Carrell, R. W. (2002). Serpinopathies and the conformational dementias. *Nature Reviews Genetics*, *3*, 759. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrg907>
- Lorenzo, A., Razzaboni, B., Weir, G. C., & Yankner, B. A. (1994). Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus. *Nature*, *368*(6473), 756–760. <https://doi.org/10.1038/368756a0>
- Luca, S., Yau, W.-M., Leapman, R., & Tycko, R. (2007). Peptide Conformation and Supramolecular Organization in Amylin Fibrils: Constraints from Solid-State NMR. *Biochemistry*, *46*(47), 13505–13522. <https://doi.org/10.1021/bi701427q>
- Makin, O. S., & Serpell, L. C. (2005). Structures for amyloid fibrils. *FEBS Journal*, *272*(23), 5950–5961. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05025.x>
- Mannini, B., Cascella, R., Zampagni, M., van Waarde-Verhagen, M., Meehan, S., Roodveldt, C., Campioni, S., Boninsegna, M., Penco, A., Relini, A., Kampinga, H. H., Dobson, C. M., Wilson, M. R., Cecchi, C., & Chiti, F. (2012). Molecular mechanisms used by chaperones to reduce the toxicity of aberrant protein oligomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(31), 12479–12484. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117799109>

- Marín-Peñalver, J. J., Martín-Timón, I., Sevillano-Collantes, C., & Del Cañizo-Gómez, F. J. (2016). Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*, *7*(17), 354–395. <https://doi.org/10.4239/wjd.v7.i17.354>
- Marzban, L., Park, K., & Verchere, C. B. (2003). Islet amyloid polypeptide and type 2 diabetes. *Experimental Gerontology*, *38*(4), 347–351. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(03\)00004-4](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(03)00004-4)
- Mathers, C. D., & Loncar, D. (2006). Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine*, *3*(11), e442. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030442>
- Mathur, P., Ramakumar, S., & Chauhan, V. S. (2004). Peptide design using α -dehydro amino acids: From β -turns to helical hairpins. *Biopolymers*, *76*(2), 150–161. <https://doi.org/10.1002/bip.10571>
- McCarthy, M. I. (2010). Genomics, Type 2 Diabetes, and Obesity. *New England Journal of Medicine*, *363*(24), 2339–2350. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0906948>
- Meinhardt, J., Sachse, C., Hortschansky, P., Grigorieff, N., & Fändrich, M. (2009). A β (1-40) Fibril Polymorphism Implies Diverse Interaction Patterns in Amyloid Fibrils. *Journal of Molecular Biology*, *386*(3), 869–877. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2008.11.005>
- Meng, F., Abedini, A., Plesner, A., Verchere, C. B., & Raleigh, D. P. (2010). The Flavanol (-)-Epigallocatechin 3-Gallate Inhibits Amyloid Formation by Islet Amyloid Polypeptide, Disaggregates Amyloid Fibrils, and Protects Cultured Cells against IAPP-Induced Toxicity. *Biochemistry*, *49*(37), 8127–8133. <https://doi.org/10.1021/bi100939a>
- Mishra, A., Misra, A., Sri Vaishnavi, T., Thota, C., Gupta, M., Ramakumar, S., & Chauhan, V. S. (2013). Conformationally restricted short peptides inhibit human islet amyloid polypeptide (hIAPP) fibrillization. *Chemical Communications*, *49*(26), 2688. <https://doi.org/10.1039/c3cc38982k>
- Mo, Y., Lei, J., Sun, Y., Zhang, Q., & Wei, G. (2016). Conformational Ensemble of hIAPP Dimer: Insight into the Molecular Mechanism by which a Green Tea Extract inhibits hIAPP Aggregation. *Scientific Reports*, *6*, 33076. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/srep33076>
- Mo, Y., Lu, Y., Wei, G., & Derreumaux, P. (2009). Structural diversity of the soluble trimers of the human amylin(20-29) peptide revealed by molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical Physics*, *130*(12). <https://doi.org/10.1063/1.3097982>
- Morris, A. P., Voight, B. F., Teslovich, T. M., Ferreira, T., Segre, A. V, Steinthorsdottir, V., Strawbridge, R. J., Khan, H., Gallert, H., Mahajan, A., Prokopenko, I., Kang, H. M., Dina, C., Esko, T., Fraser, R. M., Kanoni, S., Kumar, A., ... DIABetes Genetics Replication And Meta-analysis (DIAGRAM) Consortium. (2012). Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nature Genetics*, *44*(9), 981–990. <https://doi.org/10.1038/ng.2383>
- Mukherjee, A., Morales-Scheihing, D., Butler, P. C., & Soto, C. (2015). Type 2 diabetes as a protein misfolding disease. *Trends Mol Med*, *21*(7), 439–449. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.04.005>
- Nedumpully-Govindan, P., Yang, Y., Andorfer, R., Cao, W., & Ding, F. (2015). Promotion or Inhibition of Islet Amyloid Polypeptide Aggregation by Zinc Coordination Depends on Its Relative Concentration. *Biochemistry*, *54*(50), 7335–7344. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00891>
- Otzen, D. E. (2002). Protein Unfolding in Detergents: Effect of Micelle Structure, Ionic Strength, pH, and Temperature. *Biophysical Journal*, *83*(4), 2219–2230. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)73982-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)73982-9)
- Pillay, K., & Govender, P. (2013). Amylin uncovered: a review on the polypeptide responsible for type II diabetes. *Biomed Res Int*, *2013*, 826706. <https://doi.org/10.1155/2013/826706>

- Pithadia, A., Brender, J. R., Fierke, C. A., & Ramamoorthy, A. (2016). Inhibition of IAPP Aggregation and Toxicity by Natural Products and Derivatives. *J Diabetes Res*, 2016, 2046327. <https://doi.org/10.1155/2016/2046327>
- Rajashankar, K. R., Ramakumar, S., & Chauhan, V. S. (1992). Design of a helical motif using .alpha.,.beta.-dehydrophenylalanine residues: crystal structure of Boc-Val-DELTA.Phe-Phe-Ala-Phe-DELTA.Phe-Val-DELTA.PHe-Gly-OCH₃, a 310-helical nonapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, 114(23), 9225–9226. <https://doi.org/10.1021/ja00049a086>
- Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C., & Sasisekharan, V. (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of Molecular Biology*, 7(1), 95–99. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(63\)80023-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2836(63)80023-6)
- Ramagopal, U. A., Ramakumar, S., Sahal, D., & Chauhan, V. S. (2001). De novo design and characterization of an apolar helical hairpin peptide at atomic resolution: Compaction mediated by weak interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(3), 870–874. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.3.870>
- Rambaran, R. N., & Serpell, L. C. (2008). Amyloid fibrils: abnormal protein assembly. *Prion*, 2(3), 112–117. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19158505>
- Sachse, C., Grigorieff, N., & Fändrich, M. (2010). Nanoscale Flexibility Parameters of Alzheimer Amyloid Fibrils Determined by Electron Cryo-Microscopy. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(7), 1321–1323. <https://doi.org/10.1002/anie.200904781>
- Sakono, M., & Zako, T. (2010). Amyloid oligomers: formation and toxicity of A β oligomers. *FEBS Journal*, 277(6), 1348–1358. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07568.x>
- Salvi, G., De Los Rios, P., & Vendruscolo, M. (2005). Effective interactions between chaotropic agents and proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 61(3), 492–499. <https://doi.org/10.1002/prot.20626>
- Sattar, N., & Gill, J. M. (2014). Type 2 diabetes as a disease of ectopic fat? *BMC Medicine*, 12(1), 123. <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0123-4>
- Schirmer, C. (2014). *Chaperons moléculaires et tauopathies : effet de Hsp90 sur la fibrillation in vitro du peptide VQIVYK issu de la protéine tau*. Retrieved from <http://www.theses.fr>
- Schmidt, M., Rohou, A., Lasker, K., Yadav, J. K., Schiene-Fischer, C., Fändrich, M., & Grigorieff, N. (2015). Peptide dimer structure in an A β (1-42) fibril visualized with cryo-EM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(38), 11858–11863. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503455112>
- Scott, R. A., Lagou, V., Welch, R. P., Wheeler, E., Montasser, M. E., Luan, J., Mägi, R., Strawbridge, R. J., Rehnberg, E., Gustafsson, S., Kanoni, S., Rasmussen-Torvik, L. J., Yengo, L., LeCoeur, C., Shungin, D., Sanna, S., Sidore, C., ... Barroso, I. (2012). Large-scale association analyses identify new loci influencing glycemic traits and provide insight into the underlying biological pathways. *Nature Genetics*, 44(9), 991–1005. <https://doi.org/10.1038/ng.2385>
- Sipe, J. D., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Ikeda, S. I., Merlini, G., Saraiva, M. J. M., & Westermark, P. (2012). Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid*, 19(4), 167–170. <https://doi.org/10.3109/13506129.2012.734345>

- Sipe, J. D., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Ikeda, S. I., Merlini, G., Saraiva, M. J. M., & Westermark, P. (2016). Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid*, 23(4), 209–213. <https://doi.org/10.1080/13506129.2016.1257986>
- Sparks, S., Liu, G., Robbins, K. J., & Lazo, N. D. (2012). Curcumin modulates the self-assembly of the islet amyloid polypeptide by disassembling α -helix. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 422(4), 551–555. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.013>
- Stefani, M., & Dobson, C. M. (2003). Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *Journal of Molecular Medicine*, 81(11), 678–699. <https://doi.org/10.1007/s00109-003-0464-5>
- Suh, J., Chei, W. S., Lee, T. Y., Kim, M. G., Yoo, S. H., Jeong, K., & Ahn, J. Y. (2008). Cleavage agents for soluble oligomers of human islet amyloid polypeptide. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 13(5), 693–701. <https://doi.org/10.1007/s00775-008-0354-y>
- Sumner Makin, O., & Serpell, L. C. (2004). Structural characterisation of islet amyloid polypeptide fibrils. *J Mol Biol*, 335(5), 1279–1288.
- Sunde, M., & Blake, C. (1997). The Structure of Amyloid Fibrils by Electron Microscopy and X-Ray Diffraction. *Protein Misassembly*, Volume 50, 123–159. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60320-4](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60320-4)
- Susa, A. C., Wu, C., Bernstein, S. L., Dupuis, N. F., Wang, H., Raleigh, D. P., Shea, J.-E., & Bowers, M. T. (2014). Defining the Molecular Basis of Amyloid Inhibitors: Human Islet Amyloid Polypeptide–Insulin Interactions. *Journal of the American Chemical Society*, 136(37), 12912–12919. <https://doi.org/10.1021/ja504031d>
- Takalo, M., Salminen, A., Soininen, H., Hiltunen, M., & Haapasalo, A. (2013). Protein aggregation and degradation mechanisms in neurodegenerative diseases. *American Journal of Neurodegenerative Disease*, 2(1), 1–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3601466/>
- Tu, L.-H., Young, L. M., Wong, A. G., Ashcroft, A. E., Radford, S. E., & Raleigh, D. P. (2015). Mutational Analysis of the Ability of Resveratrol To Inhibit Amyloid Formation by Islet Amyloid Polypeptide: Critical Evaluation of the Importance of Aromatic–Inhibitor and Histidine–Inhibitor Interactions. *Biochemistry*, 54(3), 666–676. <https://doi.org/10.1021/bi501016r>
- Wang, H., Ridgway, Z., Cao, P., Ruzsicska, B., & Raleigh, D. P. (2015). Analysis of the ability of pramlintide to inhibit amyloid formation by human islet amyloid polypeptide reveals a balance between optimal recognition and reduced amyloidogenicity. *Biochemistry*, 54(44), 6704–6711. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00567>
- Wang, X., Lim, H. J., & Son, A. (2014). Characterization of denaturation and renaturation of DNA for DNA hybridization. *Environ Health Toxicol*, 29(0), e2014007-0. <https://doi.org/10.5620/eht.2014.29.e2014007>
- Westermark, P. (2011). Amyloid in the islets of Langerhans: thoughts and some historical aspects. *Uppsala Journal of Medical Sciences*, 116(2), 81–89. <https://doi.org/10.3109/03009734.2011.573884>
- Westermark, P., Wernstedt, C., Wilander, E., Hayden, D. W., O'Brien, T. D., & Johnson, K. H. (1987). Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(11), 3881 LP-3885. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/84/11/3881.abstract>

- Westwell-Roper, C., Denroche, H. C., Ehses, J. A., & Verchere, C. B. (2016). Differential Activation of Innate Immune Pathways by Distinct Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) Aggregates. *The Journal of Biological Chemistry*, 291 (17), 8908–8917. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.712455>
- Wielinga, P. Y., Löwenstein, C., Muff, S., Munz, M., Woods, S. C., & Lutz, T. A. (2010). Central amylin acts as an adiposity signal to control body weight and energy expenditure. *Physiology & Behavior*, 101(1), 45–52. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2010.04.012>
- Wu, C., & Shea, J. E. (2013). Structural Similarities and Differences between Amyloidogenic and Non-Amyloidogenic Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) Sequences and Implications for the Dual Physiological and Pathological Activities of These Peptides. *Plos Computational Biology*, 9(8). <https://doi.org/ARTN e100321110.1371/journal.pcbi.1003211>
- Xu, Z.-X., Ma, G.-L., Zhang, Q., Chen, C.-H., He, Y.-M., Xu, L.-H., Zhou, G.-R., Li, Z.-H., Yang, H.-J., & Zhou, P. (2017). Inhibitory Mechanism of Epigallocatechin Gallate on Fibrillation and Aggregation of Amidated Human Islet Amyloid Polypeptide. *ChemPhysChem*, 18 (12), 1611–1619. <https://doi.org/10.1002/cphc.201700057>
- Young, L. M., Cao, P., Raleigh, D. P., Ashcroft, A. E., & Radford, S. E. (2014). Ion mobility spectrometry-mass spectrometry defines the oligomeric intermediates in amylin amyloid formation and the mode of action of inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*, 136(2), 660–670. <https://doi.org/10.1021/ja406831n>
- Zheng, Y., Ley, S. H., & Hu, F. B. (2018). Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*, 14(2), 88–98. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.151>

Chapitre II. Méthodes d'étude *in vitro* des phénomènes d'oligomérisation et d'agrégation pathologiques de protéines

1. Introduction

Comme nous l'avons vu dans le Chapitre I, il existe plus d'une trentaine de pathologies liées à des protéines dites amyloïdes telles que le peptide hIAPP, le peptide A β ₁₋₄₂ ou la protéine du prion pour respectivement le diabète de type 2, la maladie d'Alzheimer et l'encéphalopathie spongiforme. Un point commun à toutes ces pathologies est une absence, totale ou partielle, de compréhension des mécanismes physiopathologiques d'oligomérisation *in vivo* des peptides ou protéines impliqués, et donc l'absence à ce jour de traitement curatif. C'est pourquoi une des nouvelles pistes thérapeutiques envisagées afin de guérir ces pathologies est l'exploration de ces mécanismes, et notamment de la cascade amyloïde. Une solution pour cela est de la reproduire *in vitro* afin de mimer l'apparition des différentes espèces impliquées dans ces processus. Ces approches peuvent conduire à mieux comprendre les causes de ces pathologies, mais aider aussi à proposer de nouvelles solutions thérapeutiques en évaluant l'activité de candidats médicaments. De nombreuses techniques que nous allons détailler ici ont été développées dans cet objectif. Séparatives ou non, ces méthodes se concentrent de plus en plus sur les espèces les plus précoces du mécanisme d'assemblage, après avoir largement étudié les formes plutôt insolubles et de grande taille. Notons que dans certains cas, les techniques analytiques ont surtout été employées pour l'étude du peptide A β ₁₋₄₂, qui peut être considéré comme le pendant de hIAPP pour la maladie d'Alzheimer.

2. Importance de la préparation d'échantillon

La compréhension du mécanisme pathologique d'oligomérisation de peptides et protéines amyloïdes a nécessité le développement de nombreuses techniques analytiques. Cependant, les résultats obtenus sont très largement dépendants de la manière dont l'échantillon peptidique ou protéique a été préparé. Au cours de sa thèse, Federica Bisceglia a étudié l'influence de 3 protocoles de préparation sur la cinétique d'oligomérisation de A β ₁₋₄₂ (Figure 19) (Bisceglia, 2018). Les protocoles diffèrent notamment par la concentration du peptide ainsi que les conditions d'incubation de A β dans l'hexafluoroisopropanol (HFIP, solvant habituellement utilisé afin d'éliminer les agrégats éventuellement présents dans l'échantillon en poudre du fournisseur). L'évaporation de HFIP est ensuite réalisée soit sous vide, soit à pression atmosphérique. Enfin, le milieu de mise en solution pour initier l'agrégation est également différent.

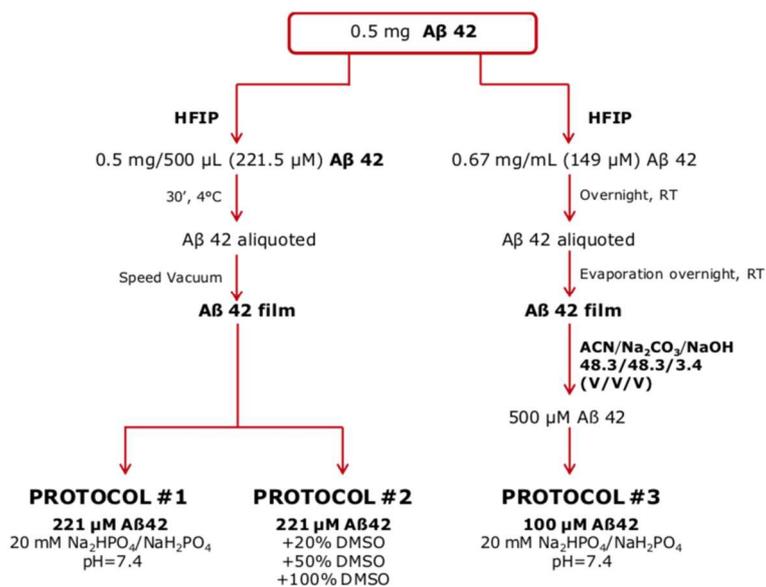


Figure 19 : Résumé des 3 protocoles de préparation utilisés pour le suivi de l'oligomérisation de Aβ₁₋₄₂ par électrophorèse capillaire (Bisceglia, 2018)

Les résultats obtenus avec les protocoles 1 et 3 sont très différents, bien que le milieu de mise en solution soit identique. Hormis la différence d'intensité, normale au regard de la concentration de Aβ₁₋₄₂ dans les deux protocoles, les espèces observées lors de leur analyse par électrophorèse capillaire ne sont pas identiques. Le protocole 1 permet l'observation de 3 pics au cours de la cinétique qui disparaissent tous en 14 jours. Le protocole 3 quant à lui conduit à l'apparition de 3 pics différents en termes de mobilité et d'intensité qui disparaissent totalement en 35 jours. Ces résultats montrent clairement l'influence du traitement par l'HFIP jusqu'à la mise en solution. On peut également s'interroger sur l'importance du fournisseur étant donné qu'il n'est pas identique pour les deux protocoles. On peut donc considérer le protocole 1 comme conduisant à une oligomérisation rapide et le 3 comme lente. Le protocole 2, dont seule la mise en solution diffère du protocole 1, conduit à observer la disparition des trois pics en 28 jours.

L'électrophorèse capillaire a ici permis de mettre en évidence l'importance de la préparation du peptide Aβ₁₋₄₂, et notamment du mode d'évaporation du solvant, du milieu de dissolution organique ou aqueux et de la concentration de départ. Cette variabilité a également été démontrée sur le peptide hIAPP avec d'autres techniques d'analyse, comme la spectrofluorimétrie (partie 3.1.1.2) ou le dichroïsme circulaire (CD) (partie 3.1.5).

En 2017, une équipe a réalisé de la spectrofluorimétrie sur hIAPP avec un protocole de préparation d'échantillon proche du protocole 1, avec une première solubilisation dans HFIP, la préparation d'aliqots, l'élimination de l'HFIP par lyophilisation et enfin la reprise des échantillons secs par un milieu tamponné à pH 7,4 (Sebastiao *et al.*, 2017). La fin de la cinétique est atteinte après 5h d'incubation. Une autre étude par spectrofluorimétrie et CD utilisant des conditions proches confirme ce résultat (Fortin & Benoit-Biancamano, 2016). En revanche, l'oligomérisation est fortement ralentie

lorsque le milieu de reprise est simplement constitué d'eau milliQ, sans traitement préalable par un solvant (Pilkington *et al.*, 2017). Enfin, lorsque le peptide est préparé dans le DMSO et non HFIP, même si le milieu de reprise est proche (milieu tamponné à pH 6,8), l'oligomérisation est très fortement ralentie. Toutefois, la forte concentration de sonde fluorescente utilisée ici pourrait également contribuer à ce ralentissement (Lydia M. Young *et al.*, 2014).

Les auteurs ont donc montré que le traitement par l'HFIP (ou un autre solvant) et le milieu de reprise (nature du tampon et force ionique) sont déterminants au regard non seulement des espèces formées mais aussi des cinétiques d'oligomérisation des peptides amyloïdes. Ceci a été démontré pour hIAPP et A β . De manière générale, la présence de HFIP dans la préparation, voire dans le milieu d'analyse conduit à des oligomérisations plus rapides. A l'inverse, le DMSO semble les ralentir. Les étapes intermédiaires d'élimination de solvant (lyophilisation, évaporation) ainsi qu'un traitement aux ultrasons peuvent également jouer un rôle sur la vitesse d'oligomérisation. Ces travaux montrent donc clairement que la préparation d'échantillon est une étape cruciale pour mimer le processus d'oligomérisation. C'est l'un des aspects qu'il a été nécessaire d'étudier en amont des analyses dans cette thèse.

3. Les méthodes non séparatives

Deux grandes classes de méthodes non séparatives sont actuellement disponibles pour l'étude de l'oligomérisation de protéines amyloïdes : les techniques spectroscopiques et par microscopie. Ces méthodes ont permis de réaliser les premières études d'agrégation du peptide hIAPP décrivant ce processus d'un point de vue assez global.

3.1. Les méthodes spectroscopiques

3.1.1. La spectrofluorimétrie

La détection de composés amyloïdes par fluorescence repose sur l'utilisation de sondes qui, lorsqu'elles s'associent avec les structure amyloïdes cibles, forment un complexe fluorescent ou coloré permettant de suivre l'agrégation d'un peptide amyloïde en temps réel. Parmi ces sondes, on retrouve principalement le Rouge Congo (CR) ainsi que la Thioflavine T qui sont les plus utilisées sur hIAPP et donc les plus étudiés. La Thioflavine S est également utilisée pour marquer les plaques amyloïdes en présence de cellules (Oskarsson *et al.*, 2015; Yoshimura *et al.*, 2015). De nouvelles sondes permettant le marquage des protéines amyloïdes sont apparues ces dernières années telles que des oligothiophènes (Göransson *et al.*, 2012) et le p-FTAA (Reinke & Gestwicki, 2011), ou plus récemment encore un dérivé phosphoré, le NEB (Zheng *et al.*, 2018) dont l'intensité de fluorescence est 10 fois supérieure à celle de la ThT. Ces molécules ont été à l'heure actuelle très peu employées, et la méthode standardisée la plus utilisée reste celle au CR et à la ThT.

3.1.1.1. Le rouge Congo

Le Rouge Congo (CR) a été utilisé dès le 19^e siècle comme colorant textile, puis a rapidement été utilisé comme colorant de fibres amyloïdes (Steensma, 2001). Il possède une grande affinité pour les structures en feuillets β , dont sont enrichies certaines fibres amyloïdes. Le CR, représenté Figure 20a, interagit avec les peptides amyloïdes et notamment le peptide hIAPP par des interactions à la fois hydrophobes (en bleu) et ioniques (en orange). En spectrophotométrie d'absorbance UV, ces interactions entraînent un déplacement du maximum d'absorbance (effet bathochrome) de 490 à 540 nm (Jaikaran *et al.*, 2001; Pillay & Govender, 2013). L'apparition de fibres amyloïdes au cours du processus d'oligomérisation amplifie cet effet bathochrome et permet donc de suivre l'agrégation à l'aide d'un microscope à lumière polarisée (Westermarck, 2011) (Figure 20b). Le mécanisme d'action du Rouge Congo est encore sujet à discussion, même si de nombreux modèles d'interaction ont été proposés dans une revue de 2007 (Frid *et al.*, 2007) pour le cas des pathologies neurodégénératives formant des fibres amyloïdes.

Bien que le Rouge Congo soit efficace pour marquer les fibres amyloïdes, il présente trois contre-indications majeures pour l'étude de l'oligomérisation de hIAPP. La première est sa non-sélectivité vis-à-vis d'un amyloïde donné. La seconde est la nécessité d'avoir des structures fibrillaires en feuillets β assez volumineuses pour que le complexe se forme, ce qui n'est pas le cas pour les petits oligomères formés en début d'oligomérisation, qui ne peuvent être détectés. La troisième est la nécessité d'utiliser un microscope biréfringent pour suivre l'agrégation.

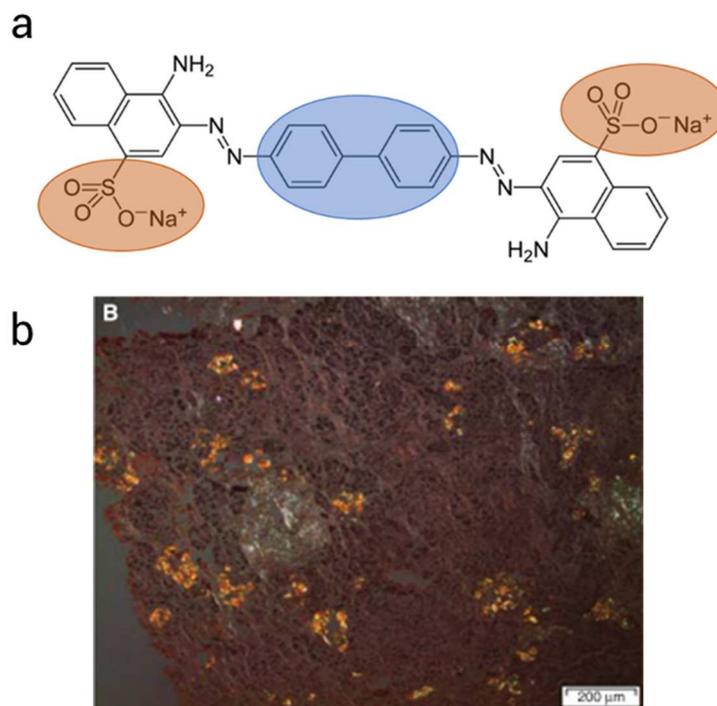


Figure 20 : (a) Structure du Rouge Congo avec ses sites d'interactions hydrophobe en bleu et ionique en orange ; (b) Plaques amyloïdes de hIAPP marquées au Rouge Congo observées avec un microscope à lumière polarisée (adapté de Westermarck 2011)

3.1.1.2. La thioflavine T

Découverte en 1959 (Vassar & Culling, 1959), la sonde la plus utilisée à l'heure actuelle est la thioflavine T (ThT), un benzothiazole utilisé pour marquer les structures amyloïdes riches en feuillets β , *in vitro* et *in vivo* (Biancalana & Koide, 2010). Alors que son utilisation est largement répandue, le mécanisme d'action de la ThT demeure complexe et commence seulement à être pleinement élucidé. Le principe de base de la fluorescence repose sur l'excitation du complexe ThT-fibrilles à 445 nm, suivi par l'émission rapide d'un photon détecté à 485 nm. La ThT représentée sur la Figure 21a possède deux noyaux caractéristiques, un fragment aniline (en bleu) et un fragment benzothiazole (en orange). La liaison simple entre ces deux groupes permet à la ThT de tourner librement en solution, ce qui empêche une stabilisation des états excités générés par une excitation photonique. A l'inverse, lorsque la ThT se complexe avec les feuillets β de structures amyloïdes, la rotation des deux groupes autour de la liaison simple devient impossible, permettant ainsi la stabilisation des états excités. Le rendement quantique de fluorescence est alors multiplié par 1000 (Figure 21b) et rend cette fluorescence détectable et mesurable pour suivre l'agrégation de protéines ou peptides amyloïdes (Biancalana & Koide, 2010; Sulatskaya *et al.*, 2012). Il a, de plus, été démontré que la ThT n'influe pas sur la structure des fibres de $A\beta_{1-40}$ formées, et n'était pas capable de détruire les fibres déjà formées (Levine, 1997).

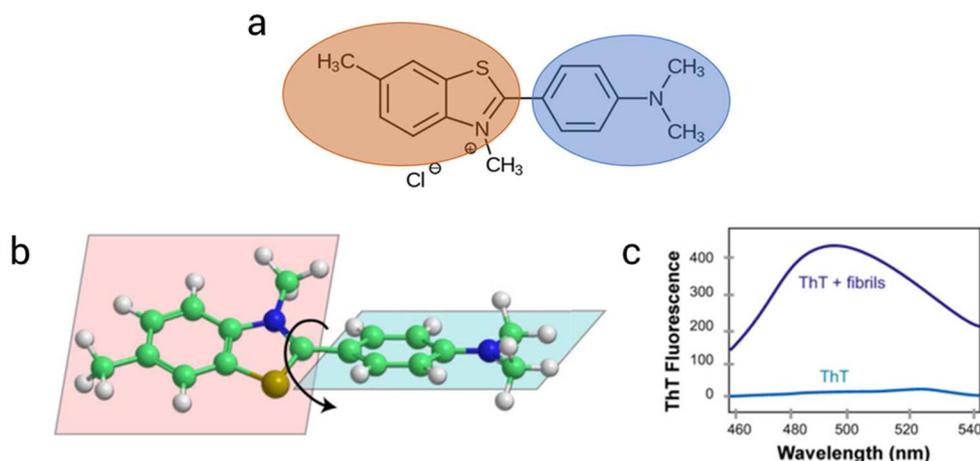


Figure 21 : (a) Structure de la ThT avec ses fragments aniline en bleu et benzothiazole en orange ; (b) Rotation entre les plans du fragment aniline et du fragment benzothiazole ; (c) Multiplication du rendement de fluorescence par 1000 lorsque la ThT est complexée avec les fibres (provenance non-précisée) (adapté de Biancalana 2010)

La ThT est capable de marquer toutes les fibres amyloïdes telles que l'insuline (Groenning *et al.*, 2007), $A\beta_{1-40}$ (Bourhim *et al.*, 2007), $A\beta_{1-42}$ (Bartolini *et al.*, 2011; Göransson *et al.*, 2012) ou celles provenant de hIAPP (Abedini *et al.*, 2016). Nous avons même vu au chapitre I que le marquage par la ThT est devenu une des caractéristiques pour considérer une structure comme amyloïde. Cependant, aucune étude n'a, à ce jour, déterminé avec précision la structure des complexes formés entre la ThT et les fibres de protéines amyloïdes. Concernant hIAPP, on suppose tout de même que l'interaction a lieu au niveau de son cœur hydrophobe (séquence FGAIL). On retrouve d'ailleurs la même interaction pour

Aβ₁₋₄₂ avec la séquence KLVFF (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2010). Cette technique est donc particulièrement intéressante pour le suivi de l'agrégation en feuillets β dont on sait qu'ils forment une structure centrale dans l'agrégation de protéines amyloïdes. De plus, la spectrofluorimétrie associée à la ThT est à l'heure actuelle la technique la plus employée afin de déterminer l'activité d'un inhibiteur de l'agrégation de hIAPP de manière globale.

L'agrégation d'une protéine amyloïde suivi par la fluorescence à la ThT se déroule en trois phases distinctes qui conduisent à la formation de fibres, majoritairement structurées en feuillets β (Figure 22a) (Hoffmann, 2015) :

- Une phase de nucléation (lag phase) durant laquelle la protéine, sous forme monomérique, va se structurer pour former des petits oligomères. Ces espèces sont encore trop pauvres en feuillets β pour fluorescer, même en présence de ThT.
- Une phase d'élongation (growth phase) durant laquelle les structures grossissent et la proportion de feuillets β augmente par modification de la structure secondaire de la protéine. Ceci provoque une augmentation croissante de la fluorescence sur un temps plus ou moins long selon la vitesse d'agrégation, jusqu'à atteindre un plateau de fluorescence.
- Un plateau (saturation phase) où la fluorescence n'augmente plus, signe que tous les monomères ont été consommés.

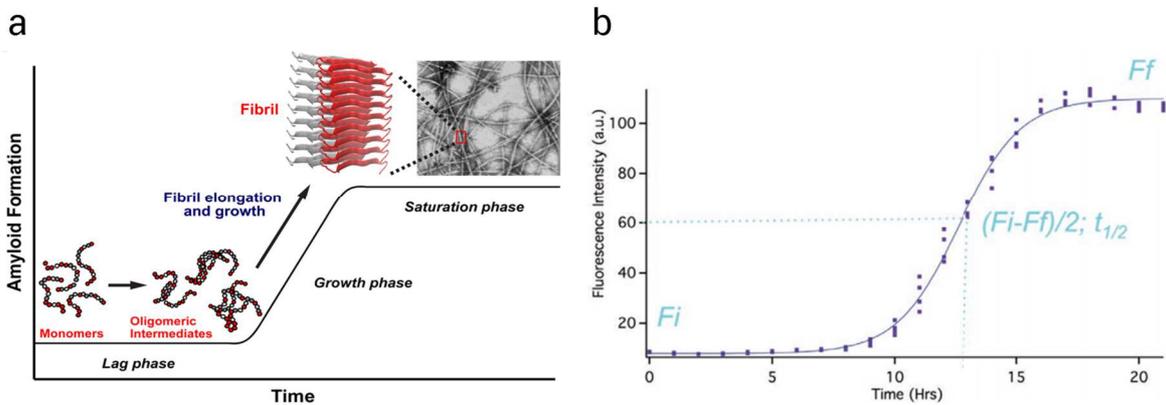


Figure 22 : (a) Diagramme schématique illustrant l'oligomérisation et l'agrégation de hIAPP (Abedini 2016) ; (b) Evolution de l'intensité de fluorescence du complexe ThT-protéine au cours du temps, modélisée mathématiquement par une fonction de Boltzmann (Figure adapté de Hoffmann 2015)

La courbe l'intensité de fluorescence F ainsi obtenue suit une sigmoïde de Boltzmann (Figure 22b), selon l'équation 1 :

$$F = F_f - \frac{F_i - F_f}{1 + \exp\left(\frac{t - t_{1/2}}{\tau}\right)} \quad \text{[Equation 1]}$$

Où t correspond au temps d'incubation, F_i et F_f la fluorescence à $t=0$ h d'incubation et en fin de cinétique respectivement, $t_{1/2}$ le temps d'incubation pour lequel la fluorescence atteint 50% de la fluorescence maximale et $1/\tau$ la vitesse d'élongation, reliée à la pente de la sigmoïde à son point d'inflexion.

A partir de cette équation, on peut extraire trois paramètres servant de comparaison entre deux courbes. Ces comparaisons sont utiles lors de tests d'inhibiteurs où l'on compare les courbes en présence et en l'absence d'inhibiteur. Le premier est l'intensité du plateau de fluorescence F_f , caractéristique de la quantité de fibres amyloïdes formées (si la quantité de ThT n'est pas limitante). Le second est le temps de nucléation t_N qui correspond à la durée de la phase de latence, caractéristique du délai avant le début de l'oligomérisation. Enfin, on peut utiliser le $t_{1/2}$, caractérisant le temps nécessaire pour former 50% du total des fibres en fin de cinétique.

A titre d'exemple, la Figure 23 décrit l'activité de deux composés testés vis-à-vis de l'oligomérisation de hIAPP à deux concentrations molaires différentes (Kumar *et al.*, 2014). hIAPP est incubé à 40 μ M dans un tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7,4 contenant 100 mM de KCl. Il apparaît clairement que le composé OP₅ n'a pas d'effet au ratio molaire 0,1/1, et qu'en revanche il accélère l'agrégation de hIAPP au ratio molaire 1/1. A l'inverse, l'autre composé OQ₅ retarde d'un facteur 3 environ cette agrégation au ratio 0,1/1, tandis que l'agrégation est complètement inhibée au ratio 1/1. Ces résultats montrent que le suivi de la fluorescence à la ThT est une technique de choix pour l'étude de la cinétique d'oligomérisation de hIAPP ainsi que le test d'activité d'inhibiteurs d'oligomérisation.

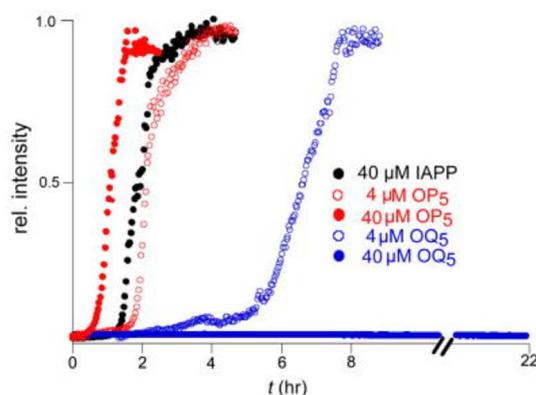


Figure 23 : Cinétique d'agrégation de hIAPP suivie par la fluorescence à la ThT en absence (noir) et en présence (couleur) des inhibiteurs OP₅ et OQ₅ à différentes concentrations (Kumar 2014)

En 2016, une étude a comparé par fluorescence à la ThT l'agrégation de hIAPP et IAPP du rat (rIAPP) à la même concentration dans un tampon Tris HCl 20 mM pH 7,4 (Abedini *et al.*, 2016). Si une augmentation de la fluorescence pour hIAPP est enregistrée au cours du temps, cela ne semble pas être le cas pour rIAPP, qui ne semble donc pas s'agréger (Figure 24).

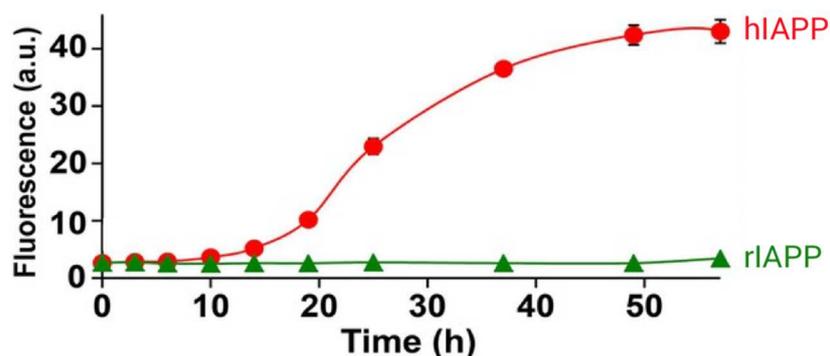


Figure 24 : Suivi de l'agrégation de hIAPP et rIAPP par fluorescence à la ThT (incubation dans Tris HCl 20 mM pH 7,4) (adapté de Abedini 2016)

La fluorescence à la ThT permet également de tester l'influence de modèles membranaires mimant des cellules sur l'agrégation de hIAPP. Ces modèles sont de plus en plus utilisés car ils pourraient constituer un site d'interaction fort avec le peptide, et donc modifier son oligomérisation. Caillon *et al.* ont ainsi mesuré le temps de nucléation ainsi que la vitesse d'élongation pour 14 milieux de composition lipidique différent, mettant en évidence un phénomène d'accélération ou de ralentissement de l'agrégation de hIAPP selon la composition des membranes en présence (Caillon *et al.*, 2013). Ainsi, la combinaison équimolaire de DOPC et DOPS accélère d'un facteur 5 l'agrégation de hIAPP, tandis que le mélange DOPC/DOPE (7/3) la ralentit d'un facteur 2. Le DMPC seul donne des résultats très proches d'un milieu sans lipide (« lipid free ») (Tableau IV). La taille des liposomes de DOPC a un fort impact sur la cinétique d'oligomérisation de hIAPP (un facteur 2 entre 50 nm et 800 nm).

Tableau IV : Evolution des temps de nucléation t_N et des vitesses d'élongation τ mesurés lors de l'agrégation de hIAPP en présence ou non de membranes lipidiques par fluorescence à la ThT (adapté de Caillon 2013)

Membranes	t_N (h)	τ (h^{-1})
Lipid-free	9.7 ± 1.0	1.5 ± 0.2
DOPC	11.8 ± 1.2	2.6 ± 0.2
DOPC/DOPS	2.1 ± 0.5	0.2 ± 0.2
DOPC/DOPG	2.2 ± 0.5	0.2 ± 0.2
DOPC/DOPE (7:3)	20.2 ± 2.0	0.8 ± 0.2
DOPC 50 nm	6.3 ± 0.8	1.3 ± 0.2
DOPC 800 nm	15.5 ± 1.5	2.3 ± 0.2
DMPC	10.7 ± 1.2	2.1 ± 0.2
DPPC	12.3 ± 1.2	1.3 ± 0.2
POPC	13.6 ± 1.2	1.6 ± 0.2
DOPC/Chol (7:3)	20.1 ± 2.0	2.9 ± 0.2
DOPC/SM (7:3)	13.1 ± 1.8	1.6 ± 0.2
DOPC/Chol/SM (4:3:3)	13.1 ± 1.2	1.6 ± 0.2
POPC/Chol/SM (1:1:1)	12.9 ± 1.3	2.4 ± 0.2
Bicelles	8.5 ± 0.8	2.8 ± 0.2

Cette technique, facile de mise en œuvre et permettant un criblage d'inhibiteur en série et à moindre coût sur une durée de plus de quarante heures, présente tout de même quelques inconvénients, notamment le fait qu'elle ne soit pas réellement quantitative. En effet, une étude réalisée en 2007 (Bourhim *et al.*, 2007) a démontré que pour A β ₁₋₄₀, l'augmentation de fluorescence n'était pas linéaire avec la quantité d'A β monomère initialement présente. De plus, les travaux suggèrent qu'il existe une concentration optimale en protéine amyloïde pour laquelle la fluorescence est la plus importante, indépendamment de la quantité de ThT ajoutée tant que celle-ci n'est pas limitante. Plus récemment, une étude a montré que de nombreux paramètres pouvaient influencer sur la cinétique d'oligomérisation mesurée par cette méthode, tels que l'intervalle entre les mesures, le nombre de puits mesurés ou la quantité de ThT utilisée (Sebastiao *et al.*, 2017). Ces résultats montrent clairement qu'il est nécessaire de travailler dans des conditions strictement identiques pour comparer deux expériences, sans quoi les comparaisons de $t_{1/2}$ et d'intensités de plateau ne seront pas pertinentes, et donc de tester un inhibiteur dans les mêmes conditions que le contrôle sans inhibiteur. Cette méthode peut également présenter un biais lié à une éventuelle compétition entre la ThT et les inhibiteurs étudiés. En 2005, une étude a d'ailleurs démontré l'existence de plusieurs sites possibles de liaison entre la ThT et A β ₁₋₄₀ (Levine III, 2005). Cette multiplicité peut conduire à la présence de sites communs pour une interaction entre le peptide, la ThT et un inhibiteur (Hudson *et al.*, 2009). Cette compétition entre la ThT et l'inhibiteur peut donc conduire à des courbes non représentatives de l'action de l'inhibiteur sur A β ₁₋₄₀.

Bien que peu spécifique, la fluorescence à la ThT reste adaptée pour suivre l'agrégation *in vitro* de hIAPP. De plus, la ThT est soluble dans l'eau et compatible avec des milieux tamponnés, ce qui en fait une sonde adaptée pour ce genre d'étude. Cependant, si elle reste efficace et encore très largement utilisée, il demeure que la fluorescence à la ThT ne fournit pas d'indications sur les petits oligomères formés en début de cinétique et considérés par certains auteurs comme les plus toxiques vis-à-vis des cellules pancréatiques.

3.1.2. La turbidimétrie

La turbidimétrie consiste à mesurer le degré de turbidité d'un milieu, c'est-à-dire la teneur en particules en suspension. Le principe repose sur la diffusion d'un faisceau incident, généralement à 600 nm (ou toute longueur d'onde ne provoquant pas d'absorption ou de fluorescence), par les particules présentes produisant un faisceau diffusé d'intensité moindre que le faisceau incident. La diminution de l'intensité est proportionnelle à la quantité de particules en suspension. Si la solution est parfaitement limpide, le faisceau ne sera pas dévié et toute l'intensité sera récupérée. La turbidimétrie peut donc être utilisée pour quantifier l'apparition d'espèces insolubles dans un milieu n'absorbant pas à 600 nm. En revanche, si elle ne permet pas de discriminer la taille des différentes espèces contrairement à la diffusion dynamique de la lumière (voir 2.1.3), elle permet de détecter des espèces insolubles qui ne se lieraient pas à la ThT car peu structurées. La turbidimétrie a été appliquée à la quantification de diverses fibres amyloïdes insolubles, indépendamment de leur conformation.

Dans une première étude menée à deux pH différents, Abedini et Raleigh (2005) ont utilisé un faisceau incident à 400 nm pour montrer une turbidité plus importante dans un tampon glycine contenant 4%

de HFIP à pH 8,8 qu'à pH 4,0 de hIAPP₈₋₃₇ (dont le comportement est très proche de celui de hIAPP₁₋₃₇) à 51 μ M en suivant l'agrégation sur 80 min. Les résultats sont cohérents avec ceux obtenus par fluorescence à la ThT, bien que les espèces observées par ces deux méthodes ne soient pas identiques. Cette différence de cinétique quant à la production d'espèces insolubles peut s'expliquer par la charge nulle de l'histidine 18 à pH 8,8, empêchant une répulsion électrostatique entre les deux brins β et permettant donc plus facilement l'agrégation.

Dans une seconde étude (Azriel & Gazit, 2001), les auteurs se sont intéressés à un fragment caractéristique de hIAPP, se comportant comme le peptide entier vis-à-vis de l'agrégation. Il s'agit du fragment 22-29 (NFGAILSS), pour lequel la turbidité a été mesurée à 405 nm au cours du temps, dans un tampon Tris 10 mM à pH 7,2 contenant 4% de DMSO. L'analyse de ce peptide ayant subi des substitutions par une alanine a également été menée. Il apparaît que le plateau maximum de turbidité est toujours atteint au même moment (environ 22 min), indépendamment des substitutions, mais que l'intensité du plateau varie. Le fragment non-modifié « wild type » (WT) se situe à une valeur intermédiaire (Figure 25). Ceci montre que ce fragment forme plus de fibres insolubles que le fragment substitué F2A par exemple, mais moins que celui substitué N1A.

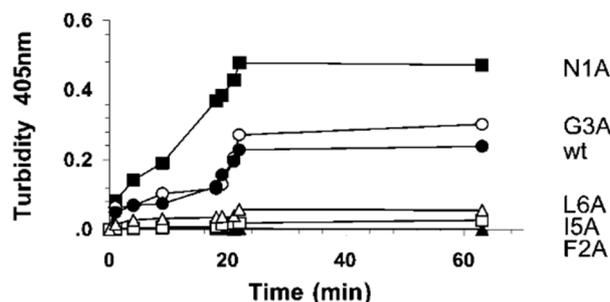


Figure 25 : Mesure de la turbidité à 405 nm au cours du temps du fragment 22-29 de hIAPP WT ou muté (N1A, G3A, L6A, I5A, F2A) incubé dans du Tris 10 mM (+4% de DMSO) pH 7,2 (Azriel 2001)

La turbidimétrie est donc adaptée pour suivre l'apparition d'espèces amyloïdes insolubles. En revanche, cette méthode présente deux inconvénients : le premier est son incapacité à détecter les oligomères solubles de la cascade amyloïde. Le second est sa limite de détection, se trouvant largement au-dessus de la concentration de hIAPP *in vivo* (Rhoades & Gafni, 2003).

3.1.3. La diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) est une technique permettant de mesurer la taille de particules dans un milieu donné, grâce à la mesure de l'intensité de lumière diffusée, en général à 90°, après collision entre un faisceau incident et les particules en suspension. Cette technique permet, au

contraire de la turbidimétrie, de différencier les particules selon leur taille. Cette technique permet une mesure de la taille des particules en intensité, en volume ou en nombre.

Ainsi en 2016, une étude a montré que la taille des particules d'une solution de hIAPP (16 μM , tampon PBS 20 mM pH 7,4) augmentait, de 300 nm à plus de 2 μm entre 1 et 24 min d'incubation (Chen *et al.*, 2016) (Figure 26a). La taille des espèces mesurée au tout début (300 nm) ne correspond cependant pas à la taille attendue d'un monomère de hIAPP de 3.9 kDa qui serait plutôt aux alentours de 1-3 nm (Erickson, 2009). Ceci suggère donc que le point de départ de l'agrégation ne correspond pas à du monomère mais à des espèces déjà partiellement oligomérisées. De plus, le fait d'observer qu'une seule population de particules à chaque analyse (sauf à 21 min où une seconde population est visible) semble indiquer que les espèces de plus haut poids ne sont pas visibles. En effet, la DLS présente un biais, qui surestime la quantité des espèces les plus grosses. La distribution obtenue en DLS est basée principalement sur une mesure d'intensité, qui introduit artificiellement un rapport 10^6 entre deux distributions de 5 et 50 nm pour une même concentration (Figure 26b) (Guide d'utilisation Zetasizer Malvern, page 11-5) car les grosses particules diffusent beaucoup plus la lumière que les petites. Même si les mesures en nombre et volume sont censées corriger ce phénomène, elles découlent directement de la mesure en intensité et sont donc également biaisées. Il est donc probable que les espèces de petites tailles soient sous-estimées car masquées par celle de plus grosses tailles, ce qui expliquerait le fait que l'on observe qu'une seule population. Malgré ce biais, les auteurs ont montré que la présence de tréhalose à forte concentration (de l'ordre de la centaine de mM) accélère le processus d'oligomérisation, en formant des agrégats plus gros que lorsque hIAPP est incubé seul, dès le début de l'incubation.

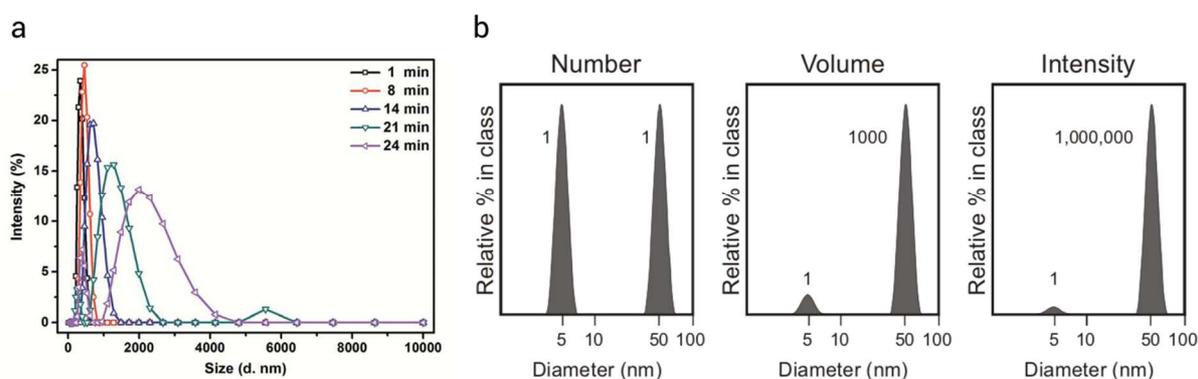


Figure 26 : (a) Suivi de la taille des particules formées dans une solution de hIAPP (16 μM dans un tampon PBS 20 mM pH 7,4) (Chen 2016) ; (b) Représentation schématique du biais introduit par cette technique lors de la mesure en intensité de la taille des particules (Manuel utilisation Malvern page 11-5)

L'étude d'Azriel et Gazit menée en 2001 portant sur un fragment caractéristique de hIAPP montre que la taille obtenue par DLS après 60 min d'incubation à 100 μM (tampon Tris 10 mM pH 7,2 + 1% de DMSO) varie entre 100 et 500 nm selon les fragments analysés (WT ou mutés), sauf pour la substitution F2A, pour laquelle la taille est seulement de 1 nm après 60 min (Azriel & Gazit, 2001). Ces

résultats sont en accord avec les résultats de turbidité qui montraient que la substitution F2A produisait le moins de particules insolubles. A l'inverse, les substitutions I5A et L6A ont la même turbidité que F2A après 60 min, mais avec une taille de particules mesurées 100 fois plus faible. Ce résultat reste inexplicé et semble indiquer que la quantité de particules insolubles formées est différente selon les substitutions. La quantité de DMSO présente dans le tampon (4% pour la turbidité, 1% pour la DLS) peut également être à l'origine de ces différences.

Contrairement aux deux études précédentes, une troisième étude (Gong *et al.*, 2013) a montré que hIAPP incubé à 30 μ M à 37°C (tampon phosphate de sodium 25 mM pH 7,4, contenant 50 mM de NaCl et 1% de HFIP) présentait des particules ayant un diamètre d'environ 0.1 nm juste après l'incubation. Dès 12 minutes d'incubation, leur taille atteignait 100 nm et plus de 1 μ m après 1 heure. Dans ces travaux, la préparation de la solution de hIAPP implique une concentration finale en HFIP de 1%, qui tendrait à stabiliser le peptide sous forme monomérique plus longtemps qu'en absence de HFIP et permettrait donc de débiter l'incubation avec du monomère exclusivement. La cinétique d'agrégation qui suit est en revanche plus rapide.

Au vu des conditions expérimentales utilisées, ces résultats montrent que les conditions d'incubation de l'échantillon sont critiques vis-à-vis des espèces insolubles formées. En effet, les résultats obtenus avec les conditions n'utilisant pas de solvant organique montrent l'apparition de grosses structures très rapidement (1 min) après l'incubation (Chen *et al.*, 2016). En revanche, en présence de DMSO ou de HFIP, la taille des espèces observées est moindre et est même cohérente avec la taille de hIAPP monomère lorsque l'on utilise HFIP pour préparer l'échantillon et l'analyser. Ainsi, s'il est possible de suivre l'oligomérisation de hIAPP depuis son état initial monomérique, ceci implique souvent d'utiliser des solvants pour « monomériser » hIAPP et partir d'un état vraiment initial du processus d'oligomérisation. Toutefois, la présence de solvant peut parfois conduire à une altération de l'affinité d'un inhibiteur pour hIAPP, et donc biaiser l'évaluation de son activité.

Toutes les méthodes décrites précédemment, bien que fort utiles pour la compréhension du mécanisme global ne permettent d'étudier seulement les fibres d'un point de vue macroscopique. Aucune d'entre elles ne fournit de détail sur le mécanisme d'oligomérisation de hIAPP d'un point de vue moléculaire ou conformationnel.

3.1.4. La spectroscopie RAMAN

La spectroscopie RAMAN a été employée afin d'obtenir plus d'informations sur la structure des différentes espèces impliquées dans la cascade amyloïde de hIAPP. Introduite au cours des années 1930, cette technique permet une détermination de la structure moléculaire de l'échantillon observé. Son principe repose sur l'excitation de l'échantillon pour lequel ses atomes sont portés à un état d'énergie « virtuel », puis sur l'émission de radiations caractéristiques de type Stokes (majoritaires) ou anti-Stokes dont les énergies renseignent sur les propriétés de l'échantillon, telles que sa structure moléculaire ou son état cristallin.

Concernant hIAPP plus particulièrement, il ne s'agit pas ici de déterminer la composition du peptide qui est déjà bien connue, mais plutôt sa structure secondaire, celle des oligomères et celle des fibres. Très récemment, une étude (Rawat *et al.*, 2018) a montré que les oligomères sont majoritairement constitués d'hélices α , tandis que les agrégats possédaient principalement une structure en feuillets β (Figure 27). Les oligomères ont été produits par incubation pendant 15 min à 35 μ M dans un tampon acétate d'ammonium pH 7,4 suivi d'une congélation rapide et d'une lyophilisation à -45°C . Les agrégats sont produits en laissant incuber la même solution de hIAPP que précédemment mais pendant 3 jours.

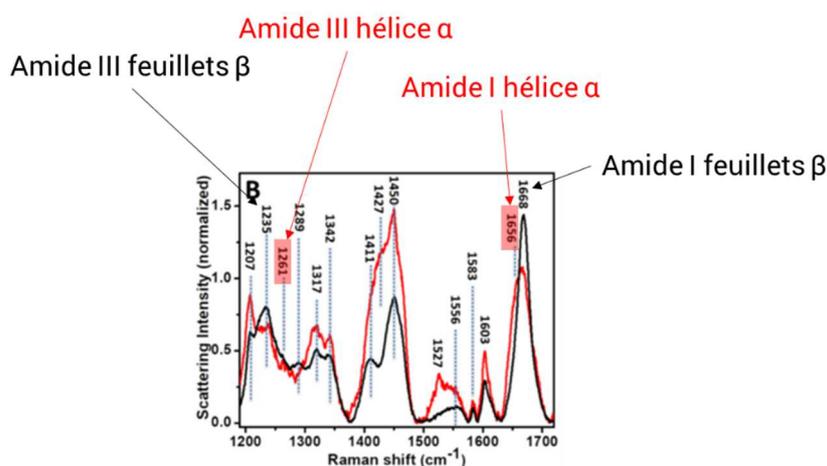


Figure 27 : Spectre Raman d'oligomères (rouge) et de fibres (noir) de hIAPP montrant des différences majeures dans leur structure secondaire, notamment au niveau des bandes amide I (1660 cm^{-1}) et III (1235 cm^{-1}) (Rawat 2018)

En 2017, une étude a été réalisée par micro-Raman sur des fibres de hIAPP WT ainsi que sur certains variants (Louros *et al.*, 2017). Une intense bande amide I à 1671 cm^{-1} caractéristique de feuillets β est observée, confirmant le lien entre feuillets β et agrégation de hIAPP. Cette agrégation se produit en effet principalement lorsque la proportion de feuillets β au sein des structures amyloïdes est suffisante. Concernant les variants, les substitutions effectuées révèlent qu'une altération des propriétés hydrophobes du segment 8-17 tout comme une substitution unique par une proline dans le segment 20-29 ne suffisent pas à empêcher l'agrégation puisque la présence de feuillets β est toujours démontrée. En revanche, la substitution I26P permet de restaurer la viabilité de cellules pancréatiques de rat INS-1 (Figure 28a), ce qui indiquerait que la conformation de hIAPP n'est pas seule responsable de sa toxicité (P Cao *et al.*, 2013). Cette lignée cellulaire est à l'heure actuelle la plus utilisée pour étudier la toxicité de hIAPP et des différentes espèces impliquées dans le processus.

Enfin, tandis que l'étude précédente a montré qu'une seule substitution dans le segment 20-29 ne suffisait pas à inhiber l'agrégation, une triple substitution par des prolines dans ce même segment comme avec rIAPP (Figure 28b) semble empêcher ce phénomène d'agrégation. Il a également été montré que rIAPP n'était pas cytotoxique vis-à-vis de cellules INS-1 (Figure 28a) (Abedini *et al.*, 2016;

Cao *et al.*, 2013). rIAPP ne diffère de hIAPP que par 6 acides aminés, dont 5 sont situés dans le segment 20-29. Ceci suggère qu'un nombre de substitution minimal serait nécessaire pour diminuer voire annihiler le caractère amyloïde de hIAPP, mais aussi qu'une substitution par une seule proline (I26P) dans le segment 20-29 permettrait de conserver une bonne viabilité cellulaire (> 85%).

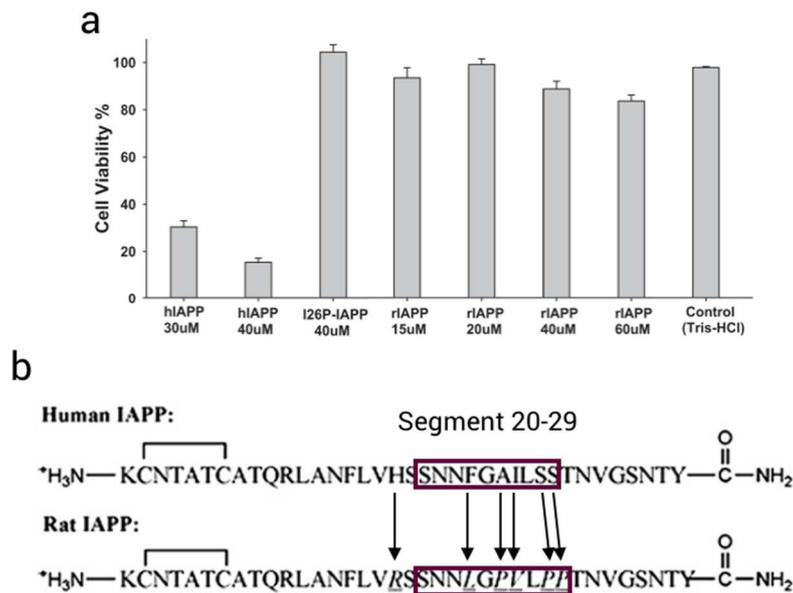


Figure 28 : (a) Comparaison de la viabilité cellulaire de cellules pancréatiques INS-1 en présence de hIAPP, hIAPP I26P et rIAPP ; (b) Structures primaires de hIAPP et rIAPP montrant le segment 20-29 impliqué dans l'agrégation et la toxicité de la protéine (adapté de Cao 2013)

Plus récemment, l'équipe du professeur Lecomte a utilisé une variante de la spectroscopie Raman, la TERS (Tip-Enhanced Raman Spectroscopy) pour déterminer la structure secondaire de A β ₁₋₄₂, ainsi que deux de ses variants (L34T et oG37C, formant respectivement des oligomères moins et plus toxiques que le peptide WT d'après les auteurs) (Bonhommeau *et al.*, 2017). L'intérêt majeur de la TERS, qui consiste en un couplage entre un microscope à force atomique et un spectromètre Raman, est son gain en résolution ainsi qu'en sensibilité par rapport à un spectromètre Raman classique. Brièvement, on estime que la résolution est améliorée d'un facteur 10³ (de 1 μ M à < 3 nm) et la sensibilité d'un facteur 10⁶ (vandenAkker *et al.*, 2015). Cette technique a permis de démontrer que les trois peptides analysés présentent tous une structure en feuillets β d'après l'intensité de la bande amide I (environ 55%). La structure secondaire du peptide n'est donc pas seule responsable de sa toxicité. Cependant, la bande amide III permet de distinguer les feuillets β parallèles et antiparallèles. Les résultats montrent que les oligomères toxiques semblent constituer majoritairement de feuillets antiparallèles (Figure 29). L'orientation des feuillets a donc un impact sur la toxicité des oligomères.

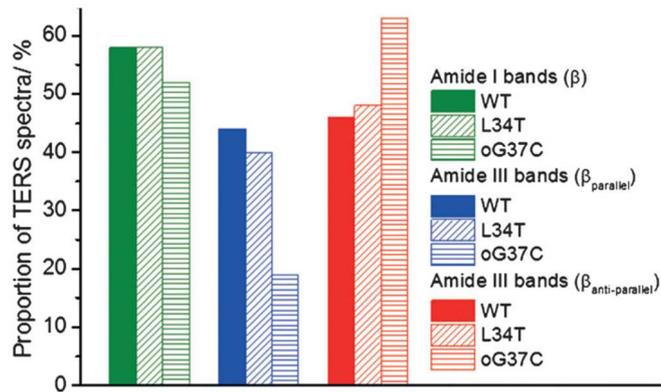


Figure 29 : Proportion de feuillets β mesurée par spectroscopie Raman sur les bandes amide I et amide III pour $A\beta_{1-42}$ et ses variants L34T et oG37C (Bonhommeau 2017)

Une dernière étude menée également par TERS a permis d'étudier les différences structurales qu'il peut y avoir entre la surface et le cœur des fibres (vandenAkker *et al.*, 2015) formées *in vitro* à partir d'une solution de hIAPP préparée à 73 μM dans un tampon phosphate 50 mM pH 2,0 ou pH 7,8. Les résultats montrent que si le cœur est bien constitué majoritairement de feuillets β , la surface contient principalement des conformations en hélice α ou aléatoires.

3.1.5. Le dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (CD) permet l'étude de la structure secondaire des peptides et protéines à l'aide de lumière polarisée. Brièvement, cette lumière polarisée et circulaire peut être décrite en deux composantes caractérisant une ellipse. Lorsque ces composantes traversent un échantillon présentant une chiralité et un ou des groupement(s) chromophore(s), l'une des deux va être absorbée davantage. Cette différence d'absorption, dépendante de la longueur d'onde incidente utilisée, peut alors être convertie en une valeur d'ellipticité exprimée en degré qui après normalisation par la concentration de l'échantillon permet de déterminer une ellipticité molaire $[\theta]$. Il est possible de tracer cette ellipticité molaire en fonction de la longueur d'onde incidente (Figure 30a) (Kelly *et al.*, 2005). Pour chaque structure secondaire, un spectre de CD caractéristique peut être observé. Après déconvolution, il devient possible de déterminer la proportion de chaque type de structure secondaire présent dans le peptide ou la protéine étudiée.

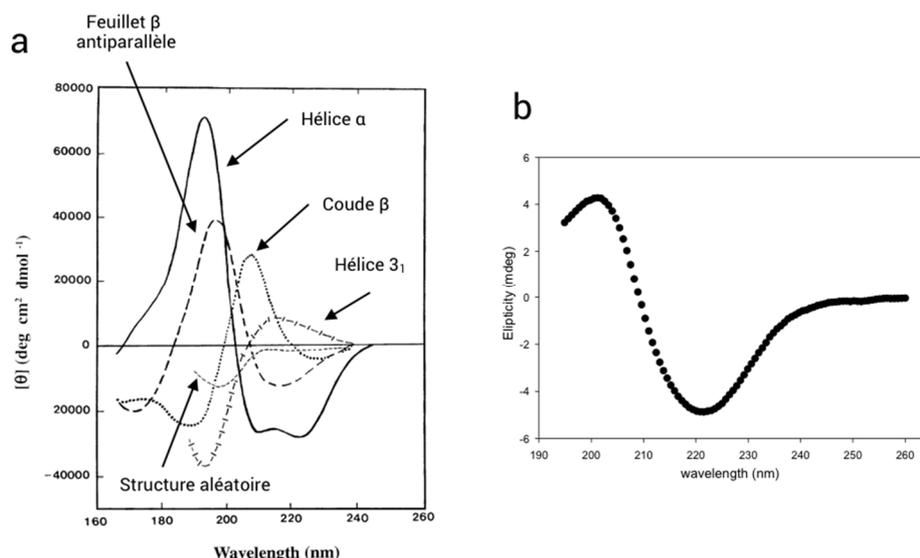


Figure 30 : (a) Modèle de spectres de dichroïsme circulaire de différentes structures secondaires (Kelly 2005) ; (b) Spectre de hIAPP obtenu en dichroïsme circulaire après que le plateau de fluorescence ait été atteint, montrant un pic intense à 220 nm (Cao 2012)

Cette technique est donc intéressante, au même titre que la spectroscopie Raman, afin d'obtenir des informations sur la structure secondaire de hIAPP. En effet, il est possible de suivre la conversion en feuillets β par l'apparition d'un pic négatif à 220 nm (Figure 30b). Une étude par CD a montré en 2012 (Cao *et al.*, 2012) que hIAPP était majoritairement composé de feuillets β après 1 heure d'incubation, lorsque les fibres sont formées. Dans cette étude, hIAPP est incubé à 16 μM dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,4 contenant 2% de HFIP. En revanche, dans les mêmes conditions mais sans HFIP, ce résultat est atteint après 3 jours d'incubation. Ce résultat a été confirmé par Gong *et al.* en 2013 (Gong *et al.*, 2013) qui ont montré que si hIAPP était majoritairement sous une conformation aléatoire au tout début de l'incubation, il évoluait vers une structure en feuillets β après 12 heures d'incubation. hIAPP est alors incubé à 15 μM dans un tampon phosphate de sodium 25 mM pH 7,4 contenant 50 mM de NaCl et 1% de HFIP. Ce pourcentage de HFIP est intermédiaire et il n'est donc pas étonnant d'observer une conversion totale en 12h, durée intermédiaire entre les 1h et 3 jours observés dans l'étude précédente. Cette dernière étude a également montré que le bisphénol A accélérât cette conversion et que la présence de HFIP dans le milieu d'incubation tendait à accélérer celle-ci.

Fortin *et al.* (Fortin & Benoit-Biancamano, 2016) ont eux obtenu une conversion de hIAPP (15 μM dans du PBS 10 mM pH 7,4 + 1% de HFIP) en feuillets β après 1 heure d'incubation. Cette conversion très rapide peut s'expliquer par la forte concentration de NaCl (>100 mM) dans le PBS, qui favorise une agrégation plus rapide comme cela a été montré par Marek *et al.* en 2012 (Marek *et al.*, 2012).

En parallèle, des travaux ont étudié par CD l'influence de la présence de membranes lipidiques sur l'agrégation de hIAPP (Caillon *et al.*, 2013). Brièvement, si les micelles de SDS ont tendance à stabiliser la conformation en hélice alpha (sans formation de fibres), des bicelles ou vésicules

composées de DOPC, DOPG ou DHPC provoquent au contraire une accélération de la formation de fibres amyloïdes selon le spectre de CD.

3.1.6. La résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN), peut être employée pour étudier les interactions existantes entre deux partenaires (protéine-protéine ou protéine-ligand). En effet, le déplacement chimique de tout atome, de spin non nul, pouvant être étudié par RMN sera affecté par son environnement électronique. Les expériences les plus utilisées sont celles à deux dimensions (RMN 2D), plus résolutive que les expériences à une dimension comme le proton 1D-¹H. En RMN 2D, on peut distinguer les expériences permettant l'observation de couplage homonucléaire dans l'espace telles que les expériences ¹H-¹H-NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) (Keeler, 2010, chapitre 9) qui permet l'observation d'interactions entre deux protons distants de moins de 5Å ou scalaire comme ¹H-¹H-COSY (Correlation Spectroscopy) (Keeler, 2010, chapitre 8, p. 190-200). On retrouve également des expériences de couplages hétéronucléaires, nécessitant cette fois la présence de liaisons covalentes, telles que les séquences ¹H-¹³C-HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) ou ¹H-¹³C-HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation). Des variantes avec le noyau ¹⁵N remplaçant le ¹³C existent également, mais nécessitent l'enrichissement de la protéine en ¹⁵N (Keeler, 2010, chapitre 8, p. 209-212 et 215-220).

Ainsi la RMN est adaptée à l'étude de l'oligomérisation et l'agrégation de hIAPP. Cette technique est également capable de fournir des informations sur la structure secondaire de la protéine. On distingue deux grands types de RMN : la RMN à l'état liquide et celle à l'état solide. Le grand intérêt de l'état solide, bien que beaucoup moins résolutif, réside dans le fait qu'il permet d'annuler les mouvements browniens des molécules présents lorsqu'elles sont solubilisées, et donc de mieux observer les interactions qu'elles établissent. Il n'y a de plus pas de limite de taille d'étude des objets. Ainsi, cette technique a permis en 2007 de déterminer la structure de protofibrilles formées par hIAPP à l'état solide (Luca *et al.*, 2007), et même d'identifier des structures en fibres torsadées. Les fibres torsadées sont composées de l'empilement de deux monomères de hIAPP chacun constitué de 2 feuillets β antiparallèles associés, formant ainsi une structure de 5 nm de large et de hauteur. Ces résultats sont en accord avec les observations de TEM (Bedrood *et al.*, 2012).

En 2012, une équipe a étudié d'une part la cinétique de disparition du monomère grâce à la RMN du ¹⁹F en utilisant la 4-trifluorométhylphénylalanine (tfmF) en remplacement de la phénylalanine en position 23 de la séquence de hIAPP, et d'autre part la compétition qu'il pouvait y avoir entre un inhibiteur de l'agrégation de hIAPP, l'épigallocatechine gallate (EGCG), et la ThT vis-à-vis de son agrégation (Suzuki *et al.*, 2012). Le peptide a été ici incubé à 85 μM dans un tampon phosphate de sodium 20 mM pH 7,3, contenant 50 mM de NaCl et 10% de D₂O. Il ressort qu'avec une haute concentration de ThT de 100 μM (Figure 31a), une compétition existe entre l'inhibiteur et la sonde fluorescente alors qu'elle disparaît lorsque la concentration de ThT est de 10 μM (Figure 31b). L'influence de la température sur la vitesse d'oligomérisation a également été étudiée, et les résultats montrent clairement que l'oligomérisation est d'autant plus rapide que la température est élevée.

Cette étude a toutefois été menée sur un peptide hIAPP modifié par l'introduction du groupement trifluorométhyle. La cinétique pourrait donc être différente par rapport au peptide WT.

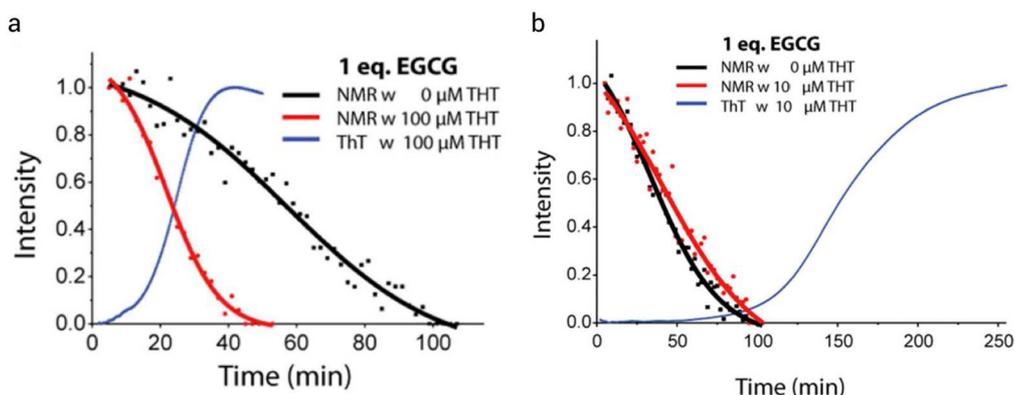


Figure 31 : Mise en évidence, par suivi de l'intensité du signal de ^{19}F de hIAPP modifié par RMN et par fluorescence à la ThT, de la compétition entre EGCG et ThT vis-à-vis de leur association aux fibres de hIAPP lorsque la concentration de ThT augmente. Les courbes du signal RMN du ^{19}F sans et avec 10 μM de ThT se superposent (b) alors qu'elles ne se superposent plus quand la ThT atteint 100 μM (a) (adapté de Suzuki 2012)

Hoffmann *et al.* (Hoffmann *et al.*, 2018) ont également suivi la disparition du monomère de hIAPP en suivant les résonances du proton ^1H dans la région méthyle du spectre sur 3h d'incubation à 75 μM dans un tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7,4 (D_2O). Le signal du monomère est quasiment nul au terme de ces trois heures d'incubation dans le cas de hIAPP (Figure 32a). A l'inverse, un équilibre s'établit entre le monomère et les formes oligomériques en ce qui concerne $\text{A}\beta_{1-42}$, traduisant certainement des voies et des cinétiques d'oligomérisation différentes entre les deux peptides. En parallèle, la même équipe a mené une étude similaire en présence de liposomes DOPC/DOPS 7/3 (A Hoffmann, Saravanan, *et al.*, 2018). hIAPP est alors incubé à 50 μM dans un tampon phosphate 50 mM pH 7,4 (D_2O), avec un rapport molaire peptide/liposomes de 1/10. La disparition complète des signaux aromatiques de hIAPP monomère est également complète dès 3h (Figure 32b). Ainsi hIAPP dans ce milieu se comporte apparemment comme dans un milieu sans lipide. Ces travaux montrent qu'au moins 2 régions du spectre RMN sont exploitables afin de suivre la cinétique d'oligomérisation de hIAPP.

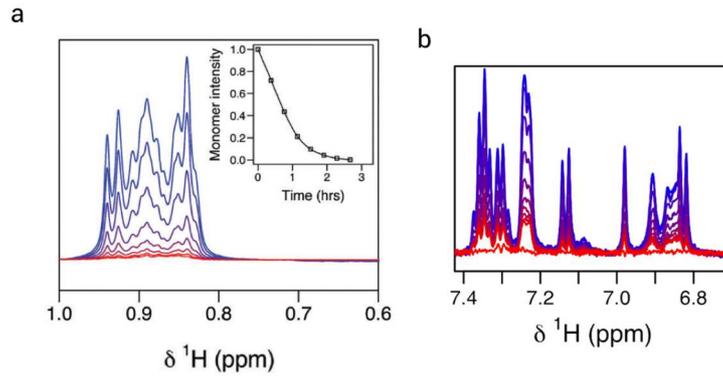


Figure 32 : (a) Suivi de la disparition des signaux méthyles obtenus par RMN du proton ^1H au cours de la cinétique d'oligomérisation de hIAPP réalisée de 0 (bleu) à 3h d'incubation (rouge) (phosphate de sodium 10 mM pH 7,4 dans D2O) (Hoffmann 2018a) ; (b) Suivi de la disparition des signaux aromatiques obtenus par RMN du proton ^1H au cours de la cinétique d'oligomérisation de hIAPP réalisée de 0 (bleu) à 3h d'incubation (rouge), en présence de liposomes DOPC/DOPS (phosphate 50 mM pH 7,4 dans D2O) (Hoffmann 2018b)

La RMN permet également la détermination des sites d'interaction entre le peptide et un potentiel inhibiteur qui viendrait empêcher ou ralentir l'oligomérisation. Kumar *et al.* (Kumar *et al.*, 2014) ont montré l'influence d'un inhibiteur OQ5 à différents rapports molaires sur les déplacements chimiques de hIAPP obtenus par RMN-2D ^1H - ^{15}N HSQC. Les résonances affectées (Figure 33) correspondent aux atomes du peptide en interaction avec l'inhibiteur. Bien que cette étude n'ait pas été menée sur hIAPP, elle donne tout de même une preuve de concept sur les possibilités de la RMN pour étudier les sites d'interactions entre hIAPP et un inhibiteur.

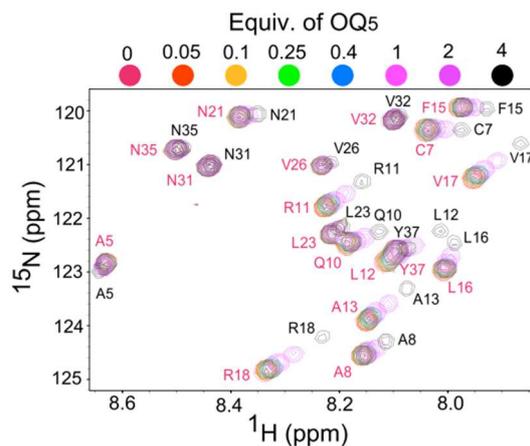


Figure 33 : Suivi des déplacements chimiques des corrélations $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ de hIAPP par RMN-2D ^1H - ^{15}N HSQC en fonction du nombre d'équivalents d'inhibiteur ajoutés au milieu d'incubation (pH 7,4) (Kumar 2014)

La RMN permet donc de suivre la cinétique de disparition du monomère ainsi que la caractérisation structurale d'interactions entre hIAPP et un inhibiteur. Cette technique permet également la

détermination de paramètres d'affinité comme la constante de dissociation par exemple (K_D), en se basant sur les variations de déplacements chimiques (Williamson, 2013). Ceci permettrait éventuellement de déterminer l'affinité d'un inhibiteur vis-à-vis de hIAPP, et donc son efficacité. Il s'agirait d'un bon complément à la spectrofluorescence à la ThT, malgré un temps d'analyse allongé.

3.2. Les méthodes de microscopie

Il existe plusieurs types de microscopie comme la microscopie optique (photonique), la microscopie électronique ou la microscopie à force atomique. La résolution pour un microscope optique est limitée à 0,2 μm , et n'est donc pas adaptée à l'observation de fibres amyloïdes qui ont un diamètre compris entre 5 et 10 nm (Chiti & Dobson, 2006). En revanche, la microscopie électronique par transmission possède une résolution de l'ordre de l'Angström, et est donc adaptée non seulement pour visualiser les fibres amyloïdes, mais aussi des espèces de basse masse moléculaire grâce à la microscopie immunoélectronique, variante de la microscopie électronique par transmission (Esparza *et al.*, 2016). Il est également possible d'adapter un microscope optique classique avec des filtres polarisants par exemple, afin de réaliser des expériences de microscopie à lumière polarisée (voir partie 2.1.1.). Bien qu'un peu moins répandue, on trouve enfin la microscopie à force atomique dont la résolution est de l'ordre du nm.

3.2.1. En transmission électronique

La microscopie en transmission électronique (TEM) permet grâce à un faisceau d'électrons la détermination de la morphologie de l'échantillon. Les électrons sont absorbés d'une façon différente en fonction de la nature de la zone d'échantillon analysée, comme des fibres ou des agrégats amorphes par exemple. L'utilisation d'agents de contraste tel que l'acétate d'uranyle permet d'améliorer l'observation de la morphologie des espèces étudiées en colorant négativement l'échantillon, qui apparaît alors blanc sur fond noir.

La première description de fibres amyloïdes issues de tissus par TEM a été réalisée en 1983 (Merz *et al.*, 1983) pour la maladie d'Alzheimer en analysant directement des fractions de cerveaux humains contenant des plaques séniles. En 2000, une étude a comparé par TEM la morphologie de hIAPP synthétique entier et de certains de ses fragments (Goldsbury *et al.*, 2000). Plus particulièrement, ils ont montré que si hIAPP entier formait bien des fibres, le fragment 20-29 ne formait qu'une association de protofibrilles de dimension 30% plus faible que les fibres amyloïdes observées sur le peptide entier. Ils ont de plus étudié le fragment 8-37 de hIAPP en comparant la masse (kDa) par unité de longueur (nm) de ce fragment et de hIAPP entier. Il apparaît alors que les fibres de hIAPP entier sont environ 20% plus dense que celle du fragment 8-37 (20.9 kDa/nm contre 16.1 kDa/nm). Tous les fragments ainsi que hIAPP entier ont été incubés dans un tampon Tris-HCl 10 mM à pH 7,3. En 2012, une étude a ensuite largement décrit les fibres amyloïdes produites par hIAPP après une incubation de 3 à 7 jours, en démontrant qu'il s'agissait d'hélices gauche constituées de monomères organisés en feuilletts β (Figure 34a) (Bedrood *et al.*, 2012). Ces hélices sont visibles en TEM (Figure 34b).

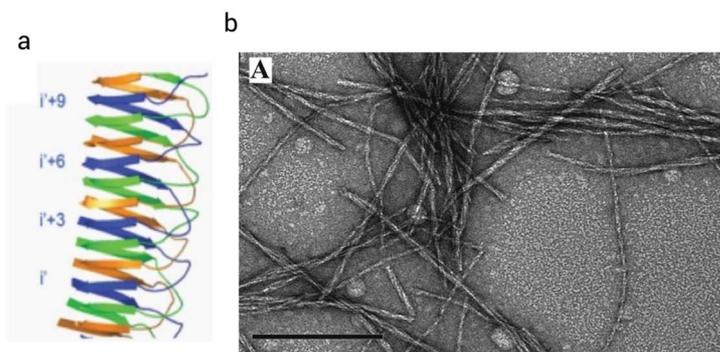


Figure 34 : (a) Modèle de la structure fibrillaire en feuillets de hIAPP ; (b) Image de TEM de fibres de hIAPP avec contraste négatif (adapté de Bedrood 2012)

Depuis quelques années, la TEM est utilisée en combinaison avec la fluorescence à la ThT pour suivre les cinétiques d'oligomérisation de peptides amyloïdes, notamment afin d'éviter les faux positifs (Noor *et al.*, 2012). Très récemment, une étude a décrit le processus d'oligomérisation de hIAPP sur 3 jours (A Hoffmann, Caillon, *et al.*, 2018). Dans les conditions d'incubation employées (75 μ M dans du phosphate de sodium 10 mM pH 7,4), l'échantillon est constitué exclusivement d'espèces amorphes au début de l'incubation, alors que des fibres de 5 à 8 nm apparaissent clairement après 3 jours (Figure 35). Les travaux de Hoffmann et Bedrood démontrent que la vitesse de formation de fibres peut varier en fonction des conditions d'incubation utilisées.

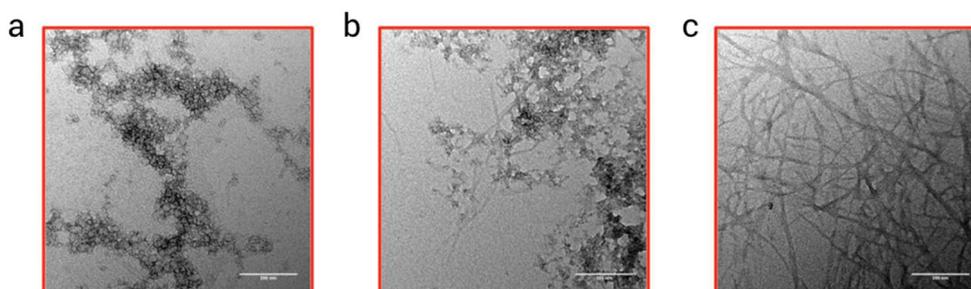


Figure 35 : Images TEM d'échantillons de hIAPP incubé (a) 1h, (b) 5h et (c) 3 jours montrant la présence d'oligomères amorphes après 1h d'incubation évoluant vers des fibres structurées après 3 jours (Hoffmann 2018)

Même si la TEM est beaucoup plus résolutive que la microscopie optique classique, tout comme la fluorescence à la ThT, elle ne permet l'observation que de structures suffisamment grosses pour être visibles comme les fibres. Ceci exclut donc les intermédiaires oligomériques. De plus, l'observation ne se fait qu'en deux dimensions. Enfin, l'analyse d'un échantillon par TEM nécessite qu'il soit placé sous vide, limitant ainsi la capacité à mimer *in vitro* la cinétique d'oligomérisation se produisant *in vivo*.

Afin d'observer les intermédiaires oligomériques, une variante de la TEM peut être utilisée : la microscopie immunoélectronique. Si l'observation de l'échantillon est identique, un marquage avec

des anticorps conjugués à des particules d'or de 6 nm permet la détection de petits oligomères, voire même d'espèces solubles dans le cas de A β (Esparza *et al.*, 2016). Cette technique ouvre de nouvelles perspectives quant à l'observation des petits intermédiaires, peu stables et difficilement isolables. En revanche, les anticorps n'étant pas spécifiques d'un oligomère donné, il n'est pas possible avec cette méthode de les isoler de manière non-ambigüe.

3.2.2. A force atomique

La microscopie à force atomique (AFM), bien que moins répandue que la TEM, permet une visualisation en relief de l'échantillon grâce à une pointe tenue sur un bras, idéalement constitué d'un unique atome (de la qualité de la pointe dépend la résolution obtenue). Lorsque cette pointe s'approche de l'échantillon, des interactions soit par attraction soit par répulsion vis-à-vis de l'échantillon sont enregistrées et permettent de déterminer la topographie de l'échantillon.

Dès 1999, la formation de fibres amyloïdes de hIAPP par AFM sur plusieurs heures en déterminant notamment la vitesse d'élongation des fibres a été étudiée. Cette vitesse a été déterminée à 1,1 nm/min à partir des deux extrémités en incubant le peptide à 13 μ M dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,3 (Goldsbury *et al.*, 1999).

La grande résolution de l'AFM a permis de résoudre jusqu'à la forme dimérique (<10 kDa) du peptide A β ₁₋₄₂ (Giuffrida *et al.*, 2009). Très récemment, cette technique a permis d'étudier l'agrégation de hIAPP en présence de modèles membranaires formés de monocouches d'alcane-thiols autoassemblés (Hajiraissi *et al.*, 2018), en fonction de la nature des fonctions chimiques présentées par les monocouches. hIAPP a été incubé dans du PBS 150 mM pH 7,4 contenant 1% de DMSO pendant 6h en présence des monocouches avant d'être analysé par AFM. Il s'avère par exemple que la présence de groupements méthyles à la surface inhibe la formation de fibres, tandis que la présence de fonctions hydroxyles favorise cette fibrillation (Figure 36). Ceci suggère que l'agrégation de hIAPP est influencée en partie par la présence et la nature des sites d'interactions en surface des membranes avec lequel il peut former des complexes ou des associations.

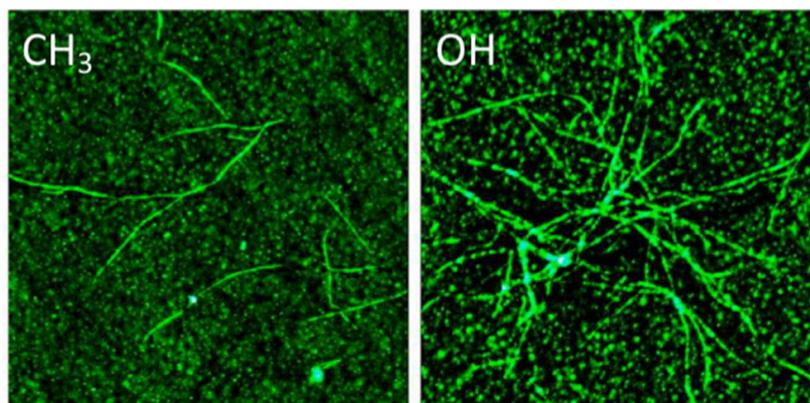


Figure 36 : Images d'AFM de hIAPP incubé durant 6h et agrégé sur des monocouches d'alkanethiols autoassemblées portant des groupes fonctionnels méthyle (CH_3) et hydroxyle (OH) (adapté de Hajiraissi 2018)

4. Les méthodes séparatives

Si les méthodes détaillées précédemment permettent de suivre assez facilement l'oligomérisation de hIAPP d'un point de vue global, elles présentent également le défaut de ne pas séparer les différentes espèces impliquées dans ce processus entre elles et de ne pas pouvoir les individualiser pour les étudier plus finement. L'utilisation de méthodes séparatives est donc indispensable, bien qu'il s'agisse souvent de méthodes plus compliquées à développer.

4.1. L'électrophorèse sur gel

L'électrophorèse sur gel est une technique de séparation très utilisée pour séparer des protéines sous l'effet d'un champ électrique, en fonction de différents paramètres selon le mode employé. Plusieurs modes de séparations sont possibles qui permettent une séparation des protéines selon leur masse moléculaire (SDS-PAGE), leur mobilité (PAGE natif) ou encore leur point isoélectrique (IEF).

La principale technique utilisée pour les protéines et peptides est le SDS-PAGE, dans laquelle le Sodium Dodécyl Sulfate (SDS, détergent anionique) va dénaturer la protéine en rompant ses liaisons faibles et apporter une charge négative uniforme sur l'ensemble des protéines. Ainsi toutes les protéines auront la même densité de charge, et leur séparation au travers du gel ne dépendra plus que de leur taille, directement reliée à leur masse moléculaire selon le modèle de Ogston (Labrie *et al.*, 2000).

hIAPP a déjà été analysé par SDS-PAGE depuis plus de 10 ans maintenant, notamment pour contrôler sa production (Lopes *et al.*, 2004; Sasahara *et al.*, 2014) ou pour étudier son interaction avec une enzyme impliquée dans la maladie d'Alzheimer (Rulifson *et al.*, 2016). En revanche, très peu d'études se sont intéressées à la formation d'intermédiaires oligomériques et à leur suivi.

En 2014, une analyse par SDS-PAGE et Western-Blot (Tris-tricine, gel polyacrylamide 15%) a été proposée afin de séparer le monomère, le dimère et le trimère de hIAPP (Bram *et al.*, 2014). Pour rIAPP qui ne forme pas de fibres, on observe seulement le monomère (Figure 37a). Cette méthode présente néanmoins des désavantages. Le premier est la présence de SDS, agent dénaturant, qui peut conduire à la déstabilisation des structures oligomériques les moins stables. Ceci peut d'ailleurs expliquer pourquoi l'espèce de plus haute masse moléculaire observée soit le trimère. Le second est la difficulté d'utiliser cette technique en temps réel pour suivre l'oligomérisation *in vitro* de hIAPP. Enfin, cette étude a été réalisée suite à un protocole permettant de produire des oligomères stables n'évoluant pas vers la formation de fibres. En effet, le signal de fluorescence à la ThT n'augmente pas et le dichroïsme circulaire ne montre qu'une conformation hélice α prédominante pour tous les oligomères détectés.

A ce jour, en raison de la très faible stabilité des intermédiaires oligomériques, aucune méthode ne permet de suivre l'oligomérisation de hIAPP. La seule qui a été proposée à ce jour repose sur une séparation par SDS-PAGE après une étape de cross-linking permettant de former une liaison covalente par photo-initiation entre les monomères (Cheng *et al.*, 2012). Dans cette étude, sans cross-linking, seul le monomère est visible pour hIAPP. Avec cross-linking, toutes les espèces comprises entre le monomère et le 14-mer ont pu être séparées (Figure 37b).

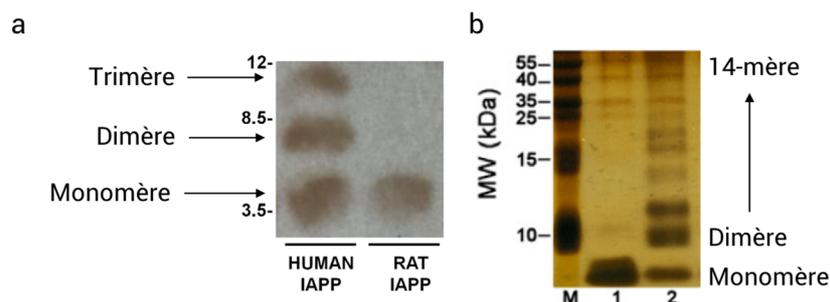


Figure 37 : (a) SDS-PAGE (détection Western-Blot) de hIAPP incubé à 200 μ M montrant le monomère, le dimère et le trimère et de rIAPP servant de référence (adapté de Bram 2014) ; (b) SDS-PAGE (détection nitrate d'argent) de hIAPP préparé sans (ligne 1) et avec (ligne 2) étape de cross-linking permettant d'observer du monomère au 14-mer (colonne 2). M : marqueur de masse moléculaire (adapté de Cheng 2012)

En revanche, le gel SDS-PAGE a été assez souvent réalisé sur $A\beta_{1-42}$. Dès 1995, une étude a montré que les premiers oligomères formés (dimère, trimère et tétramère) étaient stables en présence de SDS (Podlisny *et al.*, 1995). A l'inverse, les espèces de taille plus importante, moins stables, ont tendance à se dissocier dans ces conditions et ne sont pas observables. Ce résultat a été confirmé par les travaux de Brinet *et al.* (Brinet *et al.*, 2014) dans lequel un gel SDS-PAGE Tris-glycine 17% a été réalisé immédiatement après mise en solution du peptide $A\beta_{1-42}$ dans un tampon phosphate 20 mM pH 7,4 à 100 μ M. Le gel permet de distinguer effectivement monomère, dimère, trimère et tétramère, mais pas les espèces de plus haute masse moléculaire. Cette méthode a en revanche permis de suivre

l'influence d'un inhibiteur sur l'oligomérisation de A β ₁₋₄₂ (Amijee *et al.*, 2012). Ces résultats semblent indiquer que les oligomères de A β ₁₋₄₂ sont plus stables que ceux de hIAPP. Il a néanmoins été montré que les oligomères de A₁₋₄₂ sont largement artefactuels et induits par le SDS (Pujol-Pina *et al.*, 2015).

4.2. L'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire est une des techniques de choix pour l'analyse de protéines car elle ne requiert que très peu d'échantillon et n'est pas destructrice. Elle présente également l'intérêt, tout comme l'électrophorèse sur gel, de pouvoir travailler dans plusieurs modes différentes tels que l'électrophorèse capillaire de zone (CZE), la chromatographie capillaire électrocinétique micellaire ou encore la focalisation isoélectrique capillaire. Toutes reposent sur des modes de séparation différents impliquant la mobilité électrophorétique des composés, leur hydrophobie ou leur point isoélectrique par exemple. L'annexe I détaille plus amplement cette technique ainsi que ses grandeurs caractéristiques. Concernant hIAPP, aucune étude reposant sur cette technique n'était publiée au début de ce travail de thèse. Seules deux études ont été publiées en 2011 et 2013 impliquant l'étude par électrophorèse capillaire combinée avec des immuno-essais de mIAPP (IAPP de souris) (Guillo & Roper, 2011; Lomasney *et al.*, 2013). A l'inverse, l'électrophorèse capillaire a déjà été largement utilisée pour le suivi de l'agrégation du peptide A β ₁₋₄₂ *in vitro*, notamment en couplage avec une détection UV.

Il n'existe à l'heure actuelle aucune étude permettant de suivre l'oligomérisation de hIAPP dans des conditions physiologiques (ou s'en rapprochant) reposant sur l'électrophorèse. En revanche, dès 2004, le groupe de De Lorenzi s'est intéressé à cette technique pour suivre l'agrégation *in vitro* de A β ₁₋₄₀ ou A β ₁₋₄₂ (Brogi *et al.*, 2014; Butini *et al.*, 2013; Colombo *et al.*, 2009; Sabella *et al.*, 2004). La première étude menée a permis de séparer deux groupes d'espèces A et B formées lors de l'oligomérisation de A β ₁₋₄₂ (Sabella *et al.*, 2004) par CZE-UV, incubé dans des conditions physiologiques (phosphate 20 mM pH 7,4, Figure 38a). Afin de détruire les agrégats potentiellement déjà formés initialement avant l'incubation, l'échantillon est au préalable traité avec un mélange 50/50 (v/v) d'acétonitrile et de Na₂CO₃, suivi d'ultra-sons et d'une centrifugation. Le tampon de séparation (BGE) est constitué de phosphate 80 mM pH 7,4. Ces deux pics A et B sont présents dès le début de l'incubation. Des expériences de filtrations sur membranes de cut-off 50 kDa ont permis de montrer que le groupe A était constitué d'espèces dont la masse est comprise entre 3 et 50 kDa (monomère au 11-mer), tandis que le groupe B correspondait à des espèces de masse supérieure à 50 kDa. Il apparaît donc clairement que beaucoup d'espèces ne sont pas résolues sous ces deux groupes. La toxicité des espèces présentes sous les pics A et B à 24h a également été évaluée par tests MTT sur une lignée cellulaire IMR32 (cellules humaines de neuroblastome). Il ressort que le groupe A est très peu toxique tandis que le groupe B diminue la viabilité cellulaire d'environ 30%, au même niveau qu'un échantillon global de A β ₁₋₄₂ (Figure 38b). Ces résultats ont été confirmés un peu plus tard par des tests MTT menés sur la lignée SH-SY5Y (cellules humaines de moelle osseuse) (Brogi *et al.*, 2014).

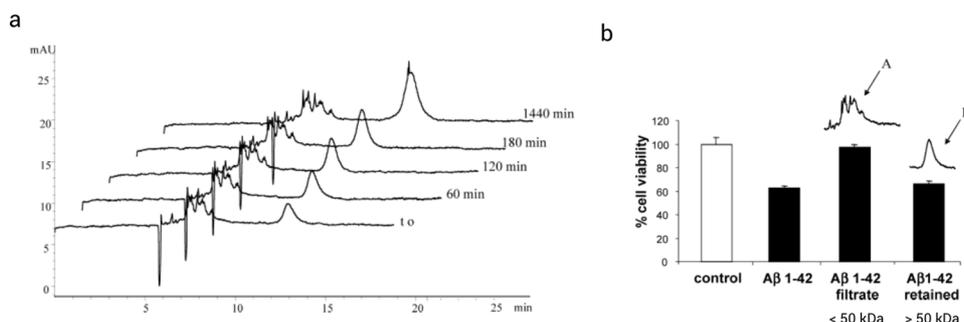


Figure 38 : (a) Profils électrophorétiques de Aβ₁₋₄₂ à différents temps d'incubation permettant de séparer deux groupes d'espèces : du monomère au 11-mer (pic A) et des espèces de MW > 50 kDa (pic B) ; (b) Étude de la viabilité cellulaire par tests MTT menées sur Aβ₁₋₄₂ non-séparé ainsi que sur les pics A et B (Sabella 2004)

En 2009, une étude est venue compléter celle-ci en suivant la cinétique d'oligomérisation de Aβ₁₋₄₂ par fractionnement d'écoulement de champ par écoulement asymétrique combiné à la diffusion de la lumière multi-angles (Rambaldi *et al.*, 2009). Les résultats montrent que le pic A correspond à des espèces ayant un rayon hydrodynamique compris entre 4,7 et 12 nm, taille cohérente pour des espèces de masse moléculaire comprise entre 3 et 50 kDa.

Cette méthode de suivi de l'oligomérisation de Aβ₁₋₄₂ par CZE-UV a été appliquée par le même groupe à l'évaluation de nouvelles molécules anti-agrégation, en corrélant les résultats à la disparition, ou non, d'une activité neurotoxique. En 2009, ils ont démontré l'activité d'inhibition de l'oligomérisation du peptide de deux anticancéreux, la mitoxantrone et la pixantrone, bien que ces deux molécules présentent une activité cytotoxique (Colombo *et al.*, 2009). Plus tard, ce même groupe a étudié avec succès l'activité d'inhibiteurs de cholinestérases (Brogi *et al.*, 2014). Malheureusement, le traitement appliqué sur l'échantillon ne permet toujours pas de séparer davantage les différentes espèces. En revanche, le composé 2a, un peptide modifié poly-aromatique (Figure 39a) apparaît comme le plus actif sur les espèces déjà agrégées (Brogi *et al.*, 2014; Butini *et al.*, 2013). Les électrophérogrammes obtenus par CZE-UV (Figure 39b) aux différents temps d'incubation montrent une diminution du pic A conjuguée à une augmentation du pic B lorsque Aβ est incubé seul. En présence d'inhibiteur au rapport molaire 1/0.5 (Aβ/2a), on observe l'apparition de spikes (pics extrêmement fins et qui correspondent à des espèces non solubles) mais les intensités globales des pics A et B ne semblent pas affectées. Lorsque l'on augmente la proportion d'inhibiteurs (1:2 puis 1:5), le pic B n'est plus formé respectivement à 48h et 6h. Il semble donc qu'à ces deux rapports molaires plus élevés, l'agrégation de Aβ₁₋₄₂ soit accélérée par le composé.

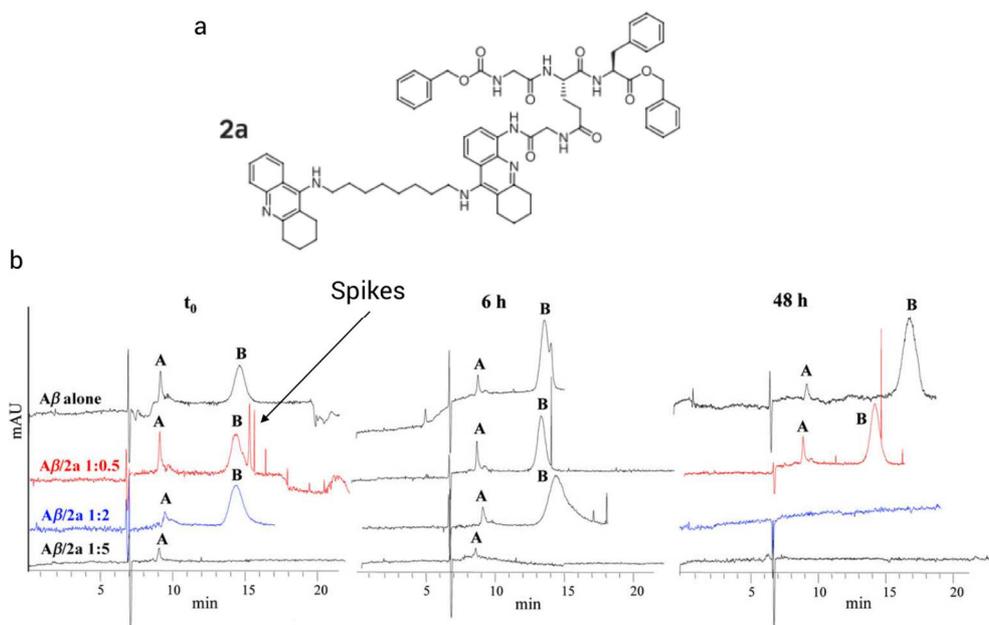


Figure 39 : (a) Structure du composé inhibiteur de l'oligomérisation de $A\beta_{1-42}$ (2a) ; (b) Étude de l'activité du composé 2a sur l'oligomérisation de $A\beta_{1-42}$ par CZE-UV à 0h, 6h et 48h d'incubation (adapté de Brogi 2014)

Les mêmes paramètres d'électrophorèse capillaire ont été utilisés pour ces quatre travaux, à savoir brièvement un capillaire de 53 cm (longueur totale), une tension de séparation de 16 kV et un BGE phosphate de sodium 80 mM pH 7,4. Le désavantage majeur de cette méthode est la présence d'espèces oligomériques voire agrégées dès le tout début de l'incubation, qu'il est impossible de séparer. Ceci suggère que la cinétique ne démarre pas à son réel point de départ, ce qui peut être problématique étant donnée la toxicité relative des espèces impliquées dans la cascade amyloïde. Ce résultat peut donc être un frein à l'interprétation de l'activité anti-agrégation d'un composé donné.

Pour résoudre cette difficulté, Federica Bisceglia (2018) s'est intéressée très récemment durant sa thèse à l'étude de $A\beta_{1-42}$ par CE, et notamment à l'influence de la préparation de l'échantillon et de ses conditions d'incubations pour l'observation des intermédiaires oligomériques de basse masse moléculaire. Elle a en effet démontré que la nature des espèces observées ainsi que leur proportion étaient largement dépendant des protocoles utilisés pour la solubilisation ainsi que pour la mise en solution permettant d'initier l'oligomérisation. Les trois protocoles étudiés ont été détaillés Figure 19 (partie 2). Les cinétiques associées sur 14, 28 et 35 jours respectivement pour les protocoles 1, 2 et 3 sont présentées Figure 40. $A\beta_{1-42}$ a été fourni par Anaspec pour les protocoles 1 et 2, et par Bachem pour le protocole 3.

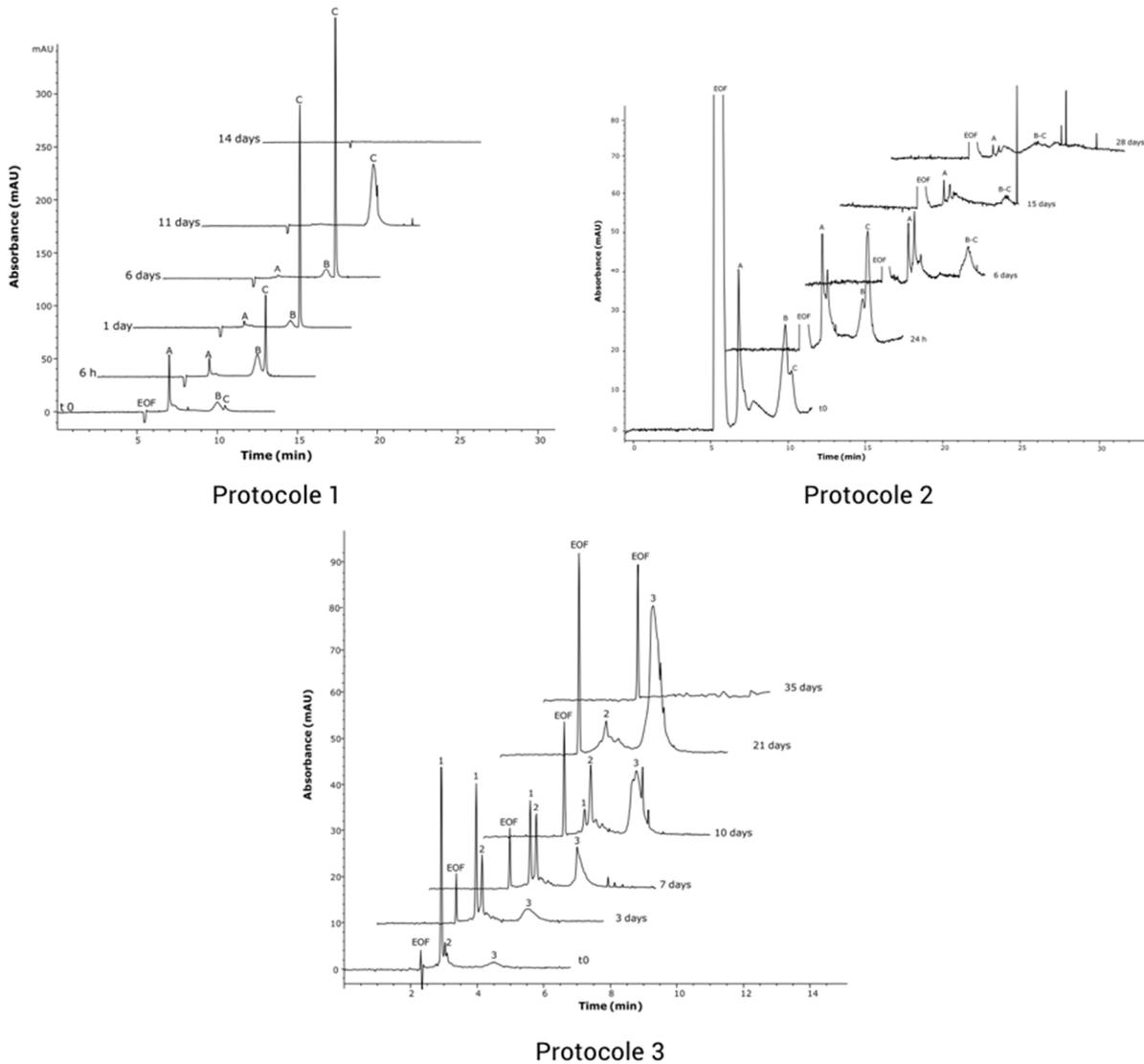


Figure 40 : Profils électrophorétiques (CZE-UV) obtenus à partir de 3 protocoles de préparation d'échantillon de $A\beta_{1-42}$ montrant des différences dans la nature des espèces formées et leur proportion relative à différents temps d'incubation (Bisceglia 2018)

Les protocoles 1 et 2 utilisent les mêmes paramètres de CE (méthode A) que ceux décrits précédemment page 32. Le protocole 3 utilise des paramètres différents (tension, durée de rinçage), transposés pour être adaptés à un capillaire plus court (méthode B). Les deux méthodes de CE A et B utilisées ne sont donc pas très différentes. Des différences de profils sont toutefois observées et ne dépendent probablement que du protocole de préparation d'échantillon et éventuellement du fournisseur de $A\beta$. On observe maintenant trois groupes de pics (A, B et C) ou (1, 2 et 3), et non plus deux comme à la Figure 38a, les mobilités électrophorétiques des pics A, B, C ou 1, 2, 3 étant différentes selon le protocole de préparation de l'échantillon. Les espèces formées sont donc différentes, ainsi que leur proportion relative.

Concernant le protocole 2, seule la mise en solution dans le DMSO est différente par rapport au protocole 1. Dans le DMSO, la cinétique est donc deux fois plus lente et conduit à la formation des mêmes espèces que dans un tampon phosphate, mais dans des proportions différentes. Comme discuté à la partie 2, le protocole de mise en solution de A β ₁₋₄₂ a donc un fort impact sur sa cinétique d'oligomérisation. Si les trois protocoles étudiés ici ne conduisent pas à la vitesse de cinétique, trois pics sont toujours observés dès la mise en solution. Ceci signifie qu'il est impossible avec ces protocoles de mimer un réel début de cinétique avec du monomère uniquement.

En 2014, une nouvelle méthode de CZE-UV a permis le suivi de l'agrégation de A β ₁₋₄₂ dès les premières heures d'incubation, avec une préparation d'échantillon optimisée, permettant l'observation du monomère principalement en début d'incubation (Figure 41) (Brinet *et al.*, 2014). Pour cela, la longueur du capillaire a été augmentée (80 cm mais détection côté court à 10,2 cm pour détecter les espèces rapidement) et 9 mM de DAB ont été ajoutés au BGE utilisé page 32, permettant de limiter l'adsorption. La tension de séparation a été portée à -30 kV, et la procédure de rinçage a été optimisée. Ce résultat a été confirmé par mesure de dispersion de Taylor (TDA) ainsi que par SDS-PAGE. Ce protocole est donc beaucoup plus approprié pour le suivi de l'agrégation de A β , ainsi que l'évaluation de nouveaux composés inhibant cette oligomérisation. Des molécules ont par la suite été évaluées grâce à cette méthode de CE, permettant d'identifier certains peptidomimétiques possédant une capacité à retarder la formation des oligomères toxiques et à restaurer la viabilité cellulaire (Kaffy *et al.*, 2014, 2016).

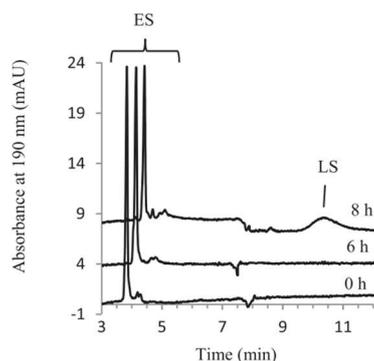


Figure 41 : Cinétique d'oligomérisation de A β ₁₋₄₂ in vitro suivie par CE permettant de séparer les espèces formées précocement (ES) et après 8h d'incubation (LS) (Brinet 2014)

Ces résultats montrent clairement que la composition du BGE ainsi que la tension sont des paramètres critiques, au même titre que la préparation d'échantillon. Aucune méthode n'étant à ce jour disponible pour l'analyse de hIAPP par électrophorèse capillaire et étant donné le potentiel de cette technique démontré dans le cas du peptide A β ₁₋₄₂, mes travaux de thèse ont exploré cette méthode afin de l'appliquer à hIAPP, et notamment au suivi de son oligomérisation depuis son état le plus précoce.

Une méthode d'électrophorèse couplée à la détection de fluorescence induite par laser (CE-LIF) a été développée pour réaliser des immuno-dosages de l'insuline, du glucagon et de mIAPP de façon simultanée (Guillo & Roper, 2011). En revanche, cette méthode ne pourrait pas être employée pour un suivi *in vitro* de la cascade amyloïde à proprement parler puisqu'elle implique une complexation avec

un anticorps détectable par fluorescence. Le principal avantage de la détection LIF repose sur la limite de détection qu'elle est capable d'atteindre. En effet, alors que la CE-UV requiert des concentrations de l'ordre de la dizaine de μM , la CE-LIF a permis par exemple la détection de peptides A β à des concentrations de l'ordre de la dizaine de nM (Verpillot *et al.*, 2011), voire encore plus faibles (sub-nM) lorsque des stratégies de pré-concentration électrocinétiques ont été appliquées en amont de l'analyse (Crosnier De Lassichère *et al.*, 2018). La CE-LIF est donc une technique attractive en terme de sensibilité pour s'approcher davantage des concentrations physiologiques de hIAPP. En revanche, elle implique forcément l'ajout d'un groupement fluorophore qui empêche de mimer fidèlement le processus de la cascade amyloïde.

4.3. La chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est un mode particulier de la chromatographie en phase liquide qui permet la séparation de protéines et peptides selon leur volume hydrodynamique, lui-même relié à leur masse moléculaire. Cette technique ne repose pas sur des interactions entre la phase stationnaire et le soluté mais uniquement sur la capacité des molécules à passer au travers des pores de particules de phase stationnaire. Plus les molécules sont petites, plus elles passeront de temps dans les pores et plus elles seront éluées avec des volumes d'élution élevés, contrairement aux plus grosses molécules (Hong *et al.*, 2012).

Cette méthode a donc été utilisée pour suivre quantitativement le processus d'oligomérisation de hIAPP en couplage avec deux types de détection : l'UV et la spectrométrie de masse. En 2014, l'étude de Bram *et al.* portant sur la préparation d'oligomères stables de hIAPP a été complétée par une analyse des oligomères par SEC-UV réalisée à 280 nm (Bram *et al.*, 2014). En utilisant une colonne Superdex 75 10/300 avec une phase mobile PBS pH 7,4 et un tampon PBS 10 mM pH 7,4, quatre groupes d'espèces correspondant au monomère, dimère, trimère et des agrégats de 90 kDa ont été séparés (Figure 42a). Toutefois, la concentration de hIAPP assez importante utilisée favorise la présence de gros oligomères sur le chromatogramme, ce qui les rend plus facilement détectable. Cette étude a été réalisée en utilisant un protocole particulier pour la préparation d'échantillon, qui contribuerait selon les auteurs à la stabilisation des oligomères.

Une précédente étude avait montré la capacité de la SEC à résoudre ces mêmes oligomères, juste après l'incubation, seulement en présence de Bisphénol A (BPA) sur une colonne Tosoh TSK GW2000 avec une phase mobile composée de phosphate de sodium pH 7,4, et 20% d'acétonitrile (Gong *et al.*, 2013). Sans BPA, cette méthode ne permet d'observer que le monomère, peut-être en raison de la présence d'acétonitrile qui dissocierait les oligomères. Par ailleurs, les auteurs montrent que le BPA accélère l'oligomérisation de hIAPP et permet la stabilisation du dimère et du trimère, facilitant leur observation par SEC quand la proportion de BPA augmente (Figure 42b). D'autres études ont démontré la capacité de la SEC à suivre les espèces formées lors de l'oligomérisation de diverses protéines ou peptides amyloïdes, telles que A β , la calcitonine ou la κ -caséine (Avidan-Shpalter & Gazit, 2006; Ecroyd *et al.*, 2010; Pryor *et al.*, 2012; Randrianjatovo-Gbalou *et al.*, 2015). Les études sur la κ -caséine n'ont

permis de distinguer que la forme monomérique des formes agrégées. Ces travaux montrent donc la grande difficulté à séparer et individualiser les oligomères de tailles intermédiaires de protéines amyloïdes formés au cours du temps par cette technique.

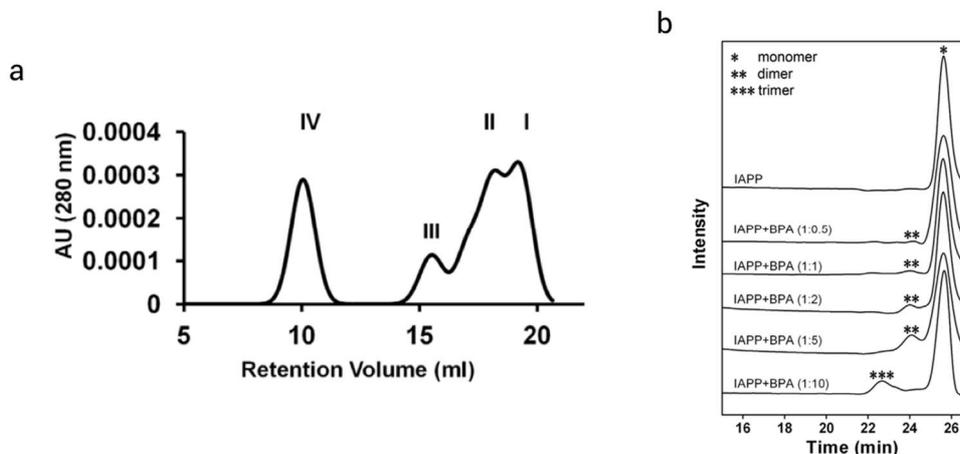


Figure 42 : (a) Séparation par SEC-UV de 4 groupes d'oligomères de hIAPP incubé à 200 μ M (I : monomère, II : dimère, III : trimère et IV : >90 kDa) (Bram 2014) ; (b) Suivi par SEC-UV de l'apparition de dimère et trimère lorsque la concentration de bisphénol A (BPA) augmente (Gong 2013)

Les travaux portant sur l'étude de l'agrégation de protéines par SEC-MS en ligne sont beaucoup plus rares. Toutes les méthodes reposant sur la SEC avec une détection MS proposées jusqu'ici pour l'observation d'agrégats concernent plutôt des anticorps monoclonaux ou des protéines intactes. Ces analyses ont été réalisées hors ligne (Kükler *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012). Cependant, une incertitude sur l'état de la fraction collectée demeure systématiquement étant donné que l'échantillon peut évoluer entre la SEC et l'analyse en MS. Les phases mobiles employées en SEC en conditions non dénaturantes contiennent des quantités importantes de sels souvent non volatils qu'il est impossible d'injecter en MS. Ces phases mobiles conduisent également à de la suppression ionique (Hong *et al.*, 2012). Ces difficultés rendaient cette méthode peu utilisée car il était difficile jusqu'alors d'être suffisamment sensible en conditions natives avec l'ESI-MS pour avoir des données fiables. Les progrès réalisés récemment sur les phases stationnaires et les spectromètres de masse permettent maintenant de réaliser le couplage SEC-MS en ligne, bien qu'il n'existe aucune méthode développée à ce jour avec hIAPP. En 2014, une étude a démontré le pouvoir de cette technique pour la résolution d'oligomères de la BSA et de la transférine (Muneeruddin *et al.*, 2014). Ces protéines ne sont pas considérées comme des amyloïdes mais ces résultats sont encourageants pour envisager le développement de cette technique pour le suivi de l'oligomérisation de peptides amyloïdes.

La SEC est donc un moyen efficace pour détecter des oligomères de protéines. En revanche, elle présente deux désavantages. Le premier est sa faible résolution comparée à d'autres techniques comme l'électrophorèse capillaire ou d'autres modes d'HPLC. La seconde est l'importante quantité d'échantillon nécessaire pour réaliser une analyse. Ces désavantages ont toutefois tendance à

disparaître un peu avec l'arrivée des colonnes de faible diamètre, moins consommatrices d'échantillons et plus résolutive.

4.4. La spectrométrie de masse couplée à la mobilité ionique

Dès le début des années 2000, l'analyse de hIAPP monomérique ainsi que de fibres a été réalisée (Larson *et al.*, 2000) par ESI-MS. Une solution de hIAPP à 25 μM préparée dans l'HFIP d'abord puis diluée dans une solution d'acétate d'ammonium 150 mM / Tris 1 mM pH 7,4 a été infusée dans un spectromètre à temps de vol (TOF) après ionisation à température ambiante et pression atmosphérique. Cette méthode a notamment permis de suivre en temps réel la décroissance de l'état de charge +4 du monomère (m/z 976, Figure 43a). Les auteurs ont également montré la très bonne reproductibilité du suivi de la disparition du monomère par ESI-MS sur 4 analyses indépendantes (Figure 43b). rIAPP a été utilisé comme standard interne à 2 μM pour la quantification car il ne forme pas de fibre contrairement à hIAPP. Les auteurs ont montré par ailleurs qu'en co-analysant le monomère et les fibres de hIAPP, uniquement des signaux correspondant au monomère étaient détectés. Ceci est cohérent avec la difficile redissolution des fibres amyloïdes, mais aussi avec leur ionisation peu efficace ainsi qu'une masse hors de celles mesurées par le spectromètre. On peut également supposer une dissociation importante dans l'instrument pour ces fibres.

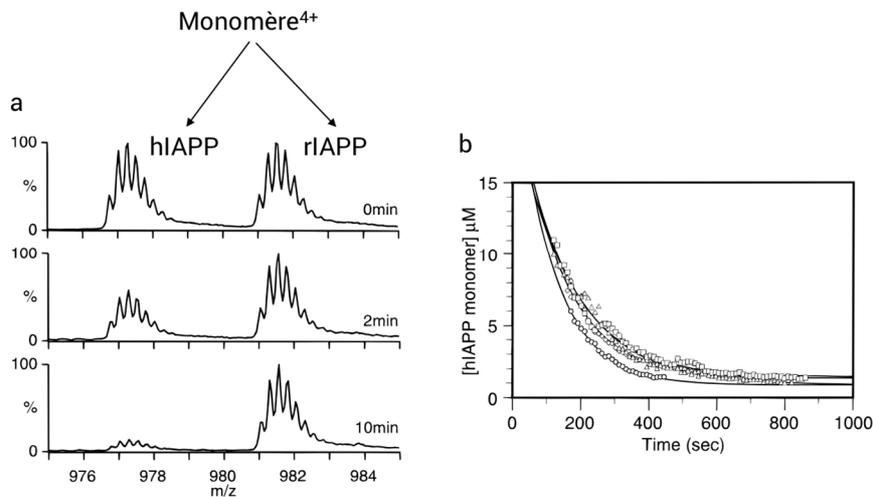


Figure 43 : (a) Suivi de la diminution du pic de monomère 4+ de hIAPP par ESI-MS (TOF) en présence de rIAPP utilisé comme standard interne ; (b) Étude de la reproductibilité du processus ($n=4$) (Larson 2000)

Plus récemment, une nouvelle approche a été développée : la mobilité ionique. Cette variante de la spectrométrie de masse est en plein essor, le nombre de publications traitant de la mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse ayant d'ailleurs décuplé depuis le début des années 2000 (source : PubMed « ion mobility mass spectrometry»). Le schéma d'un spectromètre de masse quadrupole – temps de vol (Q-TOF) à mobilité ionique est présenté Figure 44a. La cellule de mobilité

est ici insérée entre le quadrupole et la détection par temps de vol. Cette cellule est précédée de deux guides d'ions (trap et transfer), qui peuvent également servir de cellules de collision.

La mobilité ionique repose sur le déplacement de molécules chargées et de formes différentes en phase gazeuse au sein d'un « drift tube » rempli d'un gaz inerte. Les molécules sont transportées dans le tube sous l'effet d'un champ électrique (Borsdorf & Eiceman, 2006). Plus la densité de charge est élevée et plus le volume hydrodynamique de la molécule est faible, plus elle va se déplacer rapidement dans le tube. Cette technique permet notamment une séparation d'oligomères isobares ainsi que de conformères (Figure 44b) (Pacholarz *et al.*, 2012; Woods *et al.*, 2013). Un paramètre utilisé pour caractériser cette séparation est la section de collision efficace (CCS), représentant la section apparente de la molécule en tenant compte de sa forme et de son déplacement dans la cellule de mobilité. Cette CCS est directement reliée au volume hydrodynamique de la protéine et peut être déterminée précisément à partir des « drift times » avec un étalonnage préalable.

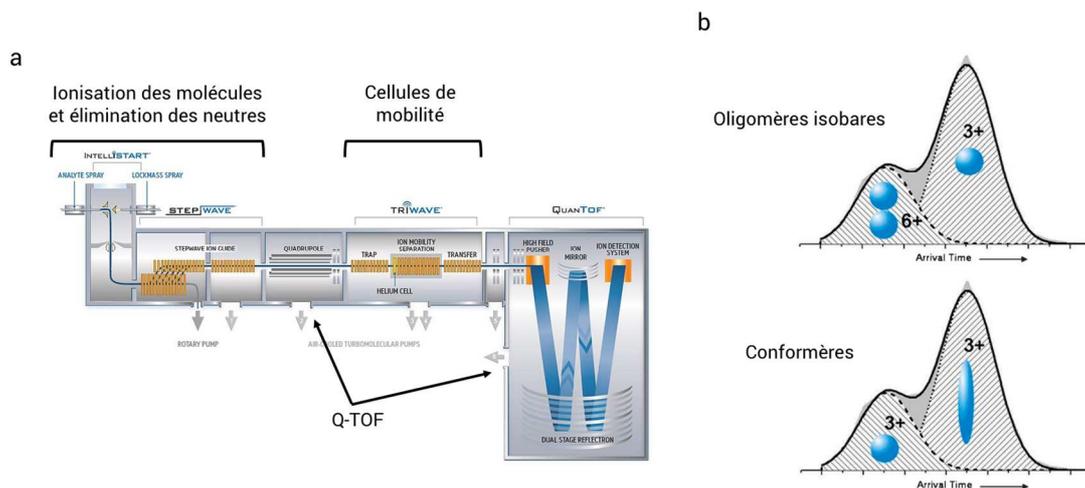


Figure 44 : (a) Schéma d'un spectromètre de masse Q-TOF à mobilité ionique (Synapt G2-Si, Waters) ; (b) Séparation d'oligomères isobares et de conformères par IMS-MS (adapté de Pacholarz 2012)

Cette technique est adaptée pour séparer des conformères de protéines ce qui était jusqu'alors impossible avec d'autres techniques. Ainsi, une étude a permis en 2013 la résolution de plus d'une dizaine de conformères de l'ubiquitine (Shvartsburg & Smith, 2013). Ces avancées ont donc ouvert de nouvelles voies concernant l'analyse des processus pathologiques amyloïdes, et notamment dans le cas du diabète de type 2 avec hIAPP (Bleiholder *et al.*, 2011; Dupuis *et al.*, 2011; Dupuis *et al.*, 2009; Ilitchev *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2015; Riba *et al.*, 2015; Woods *et al.*, 2013).

En 2014, par exemple, l'équipe du Professeur Radford a proposé une méthode pour identifier les intermédiaires oligomériques produits lors de l'agrégation de hIAPP par IMS-MS, avec le même instrument que celui présenté Figure 44a, équipé d'une source nanoESI. De manière générale, les paramètres ont été choisis de façon à préserver les intermédiaires oligomériques. La tension de capillaire pour l'ionisation est fixée à 1,7 kV, avec une température de source de 60 °C. La tension de cône a été optimisée afin de favoriser la transmission des plus gros oligomères. Leurs résultats

montrent la formation d'oligomères jusqu'à l'hexamère (Figure 45a) (Lydia M. Young *et al.*, 2014). Cette technique offre donc une nouvelle dimension de séparation, et permet par exemple de distinguer deux conformères pour le monomère 2+ (Figure 45b).

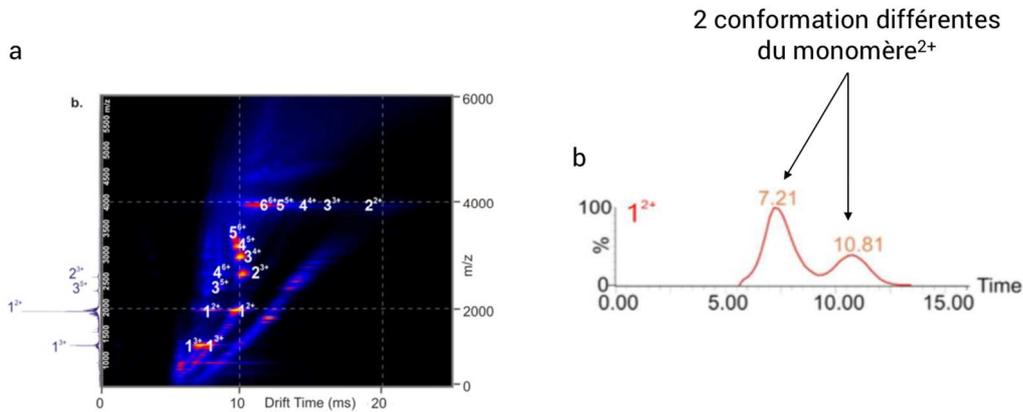


Figure 45 : (a) Spectre 2D d'IMS-MS obtenu après deux minutes d'incubation de hIAPP à 50 μ M dans un tampon acétate d'ammonium 20 mM pH 6,8 à 37 °C permettant d'observer du monomère (1) à l'hexamère (6) ; (b) Mobilogramme associé au monomère²⁺ montrant l'existence de deux conformations différentes (7.21 et 10.81 ms) et leur proportion relative associée (adapté de Young 2014)

Cette technique a été employée pour tester des inhibiteurs sur hIAPP. Young *et al.* ont étudié l'influence de l'EGCG à différents rapports molaires. Les oligomères sur lesquels se fixent EGCG sont déterminées grâce à la spectrométrie de masse. Ainsi ils ont pu montrer que la production d'oligomères était réduite de manière importante en présence de l'inhibiteur, et ce d'autant plus que le ratio molaire EGCG/hIAPP augmentait (Figure 46).

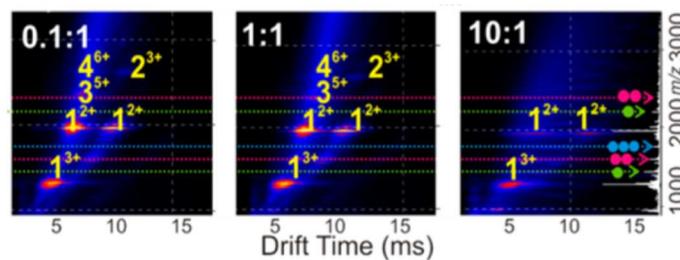


Figure 46 : Mise en évidence par IMS-MS de l'influence de l'EGCG à différentes concentrations sur l'inhibition de la formation d'oligomères de hIAPP (Young 2014)

En 2015, les mêmes auteurs ont appliqué cette méthode (seuls deux paramètres influençant peu la stabilité des oligomères ont été optimisés) au screening de 10 molécules testées vis-à-vis de leur activité inhibitrice de l'oligomérisation de hIAPP (Young *et al.*, 2015). Ces études ont fourni également des informations sur la nature de l'interaction entre certains inhibiteurs et le peptide (spécifique, non-spécifique ou colloïdale). Cette stratégie a été employée à relativement haut débit. Les échantillons

ont été placés dans des plaques 96 puits, ce qui réduit la quantité de protéine nécessaire à l'analyse. En 2017, le même groupe a inclus cette technique dans une stratégie plus globale allant du design de l'inhibiteur à ses tests d'activité (Young *et al.*, 2017). Cette technique est en effet la seule à permettre l'observation de différents conformères avec leur identification de manière certaine et en ligne. Les limites de cette technique seront discutées dans la partie expérimentale de ce manuscrit.

Références bibliographiques – Chapitre II

- Abedini, A., Plesner, A., Cao, P., Ridgway, Z., Zhang, J., Tu, L. H., Middleton, C. T., Chao, B., Sartori, D. J., Meng, F., Wang, H., Wong, A. G., Zanni, M. T., Verchere, C. B., Raleigh, D. P., & Schmidt, A. M. (2016). Time-resolved studies define the nature of toxic IAPP intermediates, providing insight for anti-amyloidosis therapeutics. *ELife*, *5*, e12977. <https://doi.org/10.7554/eLife.12977>
- Abedini, A., & Raleigh, D. P. (2005). The role of His-18 in amyloid formation by human islet amyloid polypeptide. *Biochemistry*, *44*(49), 16284–16291. <https://doi.org/10.1021/bi051432v>
- Amijee, H., Bate, C., Williams, A., Virdee, J., Jeggo, R., Spanswick, D., Scopes, D. I. C., Treherne, J. M., Mazzitelli, S., Chawner, R., Evers, C. E., & Doig, A. J. (2012). The N-Methylated Peptide SEN304 Powerfully Inhibits A β (1–42) Toxicity by Perturbing Oligomer Formation. *Biochemistry*, *51*(42), 8338–8352. <https://doi.org/10.1021/bi300415v>
- Avidan-Shpalter, C., & Gazit, E. (2006). The early stages of amyloid formation: Biophysical and structural characterization of human calcitonin pre-fibrillar assemblies. *Amyloid*, *13*(4), 216–225. <https://doi.org/10.1080/13506120600960643>
- Azriel, R., & Gazit, E. (2001). Analysis of the minimal amyloid-forming fragment of the islet amyloid polypeptide. An experimental support for the key role of the phenylalanine residue in amyloid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(36), 34156–34161. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102883200>
- Bartolini, M., Naldi, M., Fiori, J., Valle, F., Biscarini, F., Nicolau, D. V., & Andrisano, V. (2011). Kinetic characterization of amyloid-beta 1–42 aggregation with a multimethodological approach. *Analytical Biochemistry*, *414*(2), 215–225. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2011.03.020>
- Bedrood, S., Li, Y., Isas, J. M., Hegde, B. G., Baxa, U., Haworth, I. S., & Langen, R. (2012). Fibril structure of human islet amyloid polypeptide. *J Biol Chem*, *287*(8), 5235–5241. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.327817>
- Biancalana, M., & Koide, S. (2010). Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta*, *1804*(7), 1405–1412. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.04.001>
- Bisceglia, F. (2018). Identification of beta-amyloid fibrillogenesis modulators as pharmacological tools in Alzheimer's disease: an integrated approach.
- Bleiholder, C., Dupuis, N. F., Wyttenbach, T., & Bowers, M. T. (2011). Ion mobility-mass spectrometry reveals a conformational conversion from random assembly to beta-sheet in amyloid fibril formation. *Nature Chemistry*, *3*(2), 172–177. <https://doi.org/10.1038/nchem.945>
- Bonhommeau, S., Talaga, D., Hunel, J., Cullin, C., & Lecomte, S. (2017). Tip-Enhanced Raman Spectroscopy to Distinguish Toxic Oligomers from A β 1–42 Fibrils at the Nanometer Scale. *Angewandte Chemie International Edition*, *56*(7), 1771–1774. <https://doi.org/10.1002/anie.201610399>
- Borsdorf, H., & Eiceman, G. A. (2006). Ion mobility spectrometry: Principles and applications. *Applied Spectroscopy Reviews*, *41*(4), 323–375. <https://doi.org/10.1080/05704920600663469>
- Bourhim, M., Kruzel, M., Srikrishnan, T., & Nicotera, T. (2007). Linear quantitation of A β aggregation using Thioflavin T: Reduction in fibril formation by colostrinin. *Journal of Neuroscience Methods*, *160*(2), 264–268. <https://doi.org/10.1016/J.JNEUMETH.2006.09.013>

- Bram, Y., Frydman-Marom, A., Yanai, I., Gilead, S., Shaltiel-Karyo, R., Amdursky, N., & Gazit, E. (2014). Apoptosis induced by islet amyloid polypeptide soluble oligomers is neutralized by diabetes-associated specific antibodies. *Scientific Reports*, *4*. <https://doi.org/SICI 426710.1038/srep04267>
- Brinet, D., Kaffy, J., Oukacine, F., Glumm, S., Onger, S., & Taverna, M. (2014). An improved capillary electrophoresis method for in vitro monitoring of the challenging early steps of Abeta1-42 peptide oligomerization: application to anti-Alzheimer's drug discovery. *Electrophoresis*, *35*(23), 3302–3309. <https://doi.org/10.1002/elps.201400271>
- Brogi, S., Butini, S., Maramai, S., Colombo, R., Verga, L., Lanni, C., De Lorenzi, E., Lamponi, S., Andreassi, M., Bartolini, M., Andrisano, V., Novellino, E., Campiani, G., Brindisi, M., & Gemma, S. (2014). Disease-modifying anti-Alzheimer's drugs: Inhibitors of human cholinesterases interfering with β -amyloid aggregation. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, *20*(7), 624–632. <https://doi.org/10.1111/cns.12290>
- Butini, S., Brindisi, M., Brogi, S., Maramai, S., Guarino, E., Panico, A., Saxena, A., Chauhan, V., Colombo, R., Verga, L., De Lorenzi, E., Bartolini, M., Andrisano, V., Novellino, E., Campiani, G., & Gemma, S. (2013). Multifunctional Cholinesterase and Amyloid Beta Fibrillization Modulators. Synthesis and Biological Investigation. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, *4*(12), 1178–1182. <https://doi.org/10.1021/ml4002908>
- Caillon, L., Lequin, O., & Khemtémourian, L. (2013). Evaluation of membrane models and their composition for islet amyloid polypeptide-membrane aggregation. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, *1828*(9), 2091–2098. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.05.014>
- Cao, P., Abedini, A., Wang, H., Tu, L. H., Zhang, X., Schmidt, A. M., & Raleigh, D. P. (2013). Islet Amyloid Polypeptide Toxicity and Membrane Interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *110*(1) Cao, P.; Abedini, A.; Wang, H.; Tu, L. H.; Zhang, X.; Schmidt, A. M.; Raleigh, D. P. Islet Amyloid Polypeptide Toxicity and Membrane Interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013, *110*, 19279., 19279.
- Cao, P., Tu, L.-H., Abedini, A., Levsh, O., Akter, R., Patsalo, V., Schmidt, A. M., & Raleigh, D. P. (2012). Sensitivity of Amyloid Formation by Human Islet Amyloid Polypeptide to Mutations at Residue 20. *Journal of Molecular Biology*, *421*(2), 282–295. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.12.032>
- Chen, C.-H., Yao, T., Zhang, Q., He, Y.-M., Xu, L.-H., Zheng, M., Zhou, G.-R., Zhang, Y., Yang, H.-J., & Zhou, P. (2016). Influence of trehalose on human islet amyloid polypeptide fibrillation and aggregation. *RSC Advances*, *6*(18), 15240–15246. <https://doi.org/10.1039/C5RA27689F>
- Cheng, B., Gong, H., Li, X., Sun, Y., Zhang, X., Chen, H., Liu, X., Zheng, L., & Huang, K. (2012). Silibinin inhibits the toxic aggregation of human islet amyloid polypeptide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *419*(3), 495–499. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2012.02.042>
- Chiti, F., & Dobson, C. M. (2006). Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annual Review of Biochemistry*, *75*(1), 333–366. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901>
- Colombo, R., Carotti, A., Catto, M., Racchi, M., Lanni, C., Verga, L., Caccialanza, G., & De Lorenzi, E. (2009). CE can identify small molecules that selectively target soluble oligomers of amyloid β protein and display antifibrillogenic activity. *Electrophoresis*, *30*(8), 1418–1429. <https://doi.org/10.1002/elps.200800377>
- Crosnier De Lassichère, C., Mai, T. D., Otto, M., & Taverna, M. (2018). Online Preconcentration in Capillaries by Multiple Large-Volume Sample Stacking: An Alternative to Immunoassays for Quantification of Amyloid Beta Peptides Biomarkers in Cerebrospinal Fluid. *Analytical Chemistry*,

90(4), 2555–2563. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03843>

Dupuis, N. F., Wu, C., Shea, J.-E., & Bowers, M. T. (2009). Human islet amyloid polypeptide monomers form ordered beta-hairpins: a possible direct amyloidogenic precursor. *Journal of the American Chemical Society*, 131(51), 18283–18292. <https://doi.org/10.1021/ja903814q>

Dupuis, N. F., Wu, C., Shea, J. E., & Bowers, M. T. (2011). The amyloid formation mechanism in human IAPP: dimers have beta-strand monomer-monomer interfaces. *J Am Chem Soc*, 133(19), 7240–7243. <https://doi.org/10.1021/ja1081537>

Ecroyd, H., Thorn, D. C., Liu, Y., & Carver, J. A. (2010). The dissociated form of kappa-casein is the precursor to its amyloid fibril formation. *The Biochemical Journal*, 429(2), 251–260. <https://doi.org/10.1042/BJ20091949>

Erickson, H. P. (2009). Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. *Biological Procedures Online*, 11, 32–51. <https://doi.org/10.1007/s12575-009-9008-x>

Esparza, T. J., Wildburger, N. C., Jiang, H., Gangolli, M., Cairns, N. J., Bateman, R. J., & Brody, D. L. (2016). Soluble Amyloid-beta Aggregates from Human Alzheimer's Disease Brains. *Scientific Reports*, 6(1), 38187. <https://doi.org/10.1038/srep38187>

Fortin, J. S., & Benoit-Biancamano, M.-O. (2016). Inhibition of islet amyloid polypeptide aggregation and associated cytotoxicity by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 94(1), 35–48. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2015-0117>

Frid, P., Anisimov, S. V., & Popovic, N. (2007). Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Brain Research Reviews*, 53(1), 135–160. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESREV.2006.08.001>

Giuffrida, M. L., Caraci, F., Pignataro, B., Cataldo, S., De Bona, P., Bruno, V., Molinaro, G., Pappalardo, G., Messina, A., Palmigiano, A., Garozzo, D., Nicoletti, F., Rizzarelli, E., & Copani, A. (2009). β -Amyloid Monomers Are Neuroprotective. *The Journal of Neuroscience*, 29(34), 10582 LP-10587. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/content/29/34/10582.abstract>

Goldsbury, C., Goldie, K., Pellaud, J., Seelig, J., Frey, P., Müller, S. A., Kistler, J., Cooper, G. J. S., & Aebi, U. (2000). Amyloid Fibril Formation from Full-Length and Fragments of Amylin. *Journal of Structural Biology*, 130(2), 352–362. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jsbi.2000.4268>

Goldsbury, C., Kistler, J., Aebi, U., Arvinte, T., & Cooper, G. J. . (1999). Watching amyloid fibrils grow by time-lapse atomic force microscopy. *Journal of Molecular Biology*, 285(1), 33–39. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2299>

Gong, H., Zhang, X., Cheng, B., Sun, Y., Li, C., Li, T., Zheng, L., & Huang, K. (2013). Bisphenol A accelerates toxic amyloid formation of human islet amyloid polypeptide: a possible link between bisphenol A exposure and type 2 diabetes. *PLoS One*, 8(1), e54198. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054198>

Göransson, A.-L., Nilsson, K. P. R., Kågedal, K., & Brorsson, A.-C. (2012). Identification of distinct physicochemical properties of toxic prefibrillar species formed by A β peptide variants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 420(4), 895–900. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2012.03.097>

Groenning, M., Norrman, M., Flink, J. M., van de Weert, M., Bukrinsky, J. T., Schluckebier, G., & Frokjaer, S. (2007). Binding mode of Thioflavin T in insulin amyloid fibrils. *Journal of Structural Biology*, 159(3), 483–497. <https://doi.org/10.1016/J.JSB.2007.06.004>

- Guillo, C., & Roper, M. G. (2011). Simultaneous capillary electrophoresis competitive immunoassay for insulin, glucagon, and islet amyloid polypeptide secretion from mouse islets of Langerhans. *Journal of Chromatography A*, *1218*(26), 4059–4064. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.006>
- Hajiraissi, R., Hanke, M., Yang, Y., Duderija, B., Gonzalez Orive, A., Grundmeier, G., & Keller, A. (2018). Adsorption and Fibrillization of Islet Amyloid Polypeptide at Self-Assembled Monolayers Studied by QCM-D, AFM, and PM-IRRAS. *Langmuir*, *34*(11), 3517–3524. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b03626>
- Hoffmann, A. (2015, September 25). *Oligomerization and fibrillization properties of amyloid peptides and interactions with inhibitors*. <http://www.theses.fr>. Paris 6. Retrieved from <http://www.theses.fr/2015PA066442>
- Hoffmann, A., Caillon, L., Salazar Vazquez, L. S., Spath, P.-A., Carlier, L., Khemtémourian, L., & Lequin, O. (2018). Time dependence of NMR observables reveals salient differences in the accumulation of early aggregated species between human islet amyloid polypeptide and amyloid- β . *Physical Chemistry Chemical Physics*. <https://doi.org/10.1039/C7CP07516B>
- Hoffmann, A., Saravanan, M. S., Lequin, O., Killian, J. A., & Khemtémourian, L. (2018). A single mutation on the human amyloid polypeptide modulates fibril growth and affects the mechanism of amyloid-induced membrane damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2018.02.018>
- Hong, P., Koza, S., & Bouvier, E. S. P. (2012). Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, *35*(20), 2923–2950. <https://doi.org/10.1080/108010826076.2012.743724>
- Hudson, S. A., Ecroyd, H., Kee, T. W., & Carver, J. A. (2009). The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds. *FEBS Journal*, *276*(20), 5960–5972. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07307.x>
- Ilitchev, A. I., Giammona, M. J., Do, T. D., Wong, A. G., Buratto, S. K., Shea, J.-E., Raleigh, D. P., & Bowers, M. T. (2016). Human Islet Amyloid Polypeptide N-Terminus Fragment Self-Assembly: Effect of Conserved Disulfide Bond on Aggregation Propensity. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, *27*(6), 1010–1018. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1347-7>
- Jaikaran, E. T., Higham, C. E., Serpell, L. C., Zurdo, J., Gross, M., Clark, A., & Fraser, P. E. (2001). Identification of a novel human islet amyloid polypeptide beta-sheet domain and factors influencing fibrillogenesis. *J Mol Biol*, *308*(3), 515–525. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4593>
- Kaffy, J., Brinet, D., Soulier, J. L., Correia, I., Tonali, N., Fera, K. F., Iacone, Y., Hoffmann, A. R., Khemtémourian, L., Crousse, B., Taylor, M., Allsop, D., Taverna, M., Lequin, O., & Ongeri, S. (2016). Designed Glycopeptidomimetics Disrupt Protein-Protein Interactions Mediating Amyloid beta-Peptide Aggregation and Restore Neuroblastoma Cell Viability. *J Med Chem*, *59*(5), 2025–2040. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01629>
- Kaffy, J., Brinet, D., Soulier, J. L., Khemtémourian, L., Lequin, O., Taverna, M., Crousse, B., & Ongeri, S. (2014). Structure-activity relationships of sugar-based peptidomimetics as modulators of amyloid beta-peptide early oligomerization and fibrillization. *Eur J Med Chem*, *86*, 752–758. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.09.031>
- Keeler, J. (2010). *Understanding NMR Spectroscopy* (Wiley).
- Kelly, S. M., Jess, T. J., & Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica*

- et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1751(2), 119–139. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005>
- Kükreer, B., Filipe, V., Van Duijn, E., Kasper, P. T., Vreeken, R. J., Heck, A. J. R., & Jiskoot, W. (2010). Mass spectrometric analysis of intact human monoclonal antibody aggregates fractionated by size-exclusion chromatography. *Pharmaceutical Research*, 27(10), 2197–2204. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0224-5>
- Kumar, S., Brown, M. A., Nath, A., & Miranker, A. D. (2014). Folded small molecule manipulation of islet amyloid polypeptide. *Chem Biol*, 21(6), 775–781. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.05.007>
- Labrie, J., Mercier, J. F., & Slater, G. W. (2000). An exactly solvable Ogston model of gel electrophoresis. V. Attractive gel-analyte interactions and their effects on the Ferguson plot. *Electrophoresis*, 21(5), 823–833. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000301\)21:5<823::AID-ELPS823>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000301)21:5<823::AID-ELPS823>3.0.CO;2-4)
- Larson, J. L., Ko, E., & Miranker, A. D. (2000). Direct measurement of islet amyloid polypeptide fibrillogenesis by mass spectrometry. *Protein Sci*, 9(2), 427–431. <https://doi.org/10.1110/ps.9.2.427>
- Levine, H. (1997). Stopped-Flow Kinetics Reveal Multiple Phases of Thioflavin T Binding to Alzheimer β (1-40) Amyloid Fibrils. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 342(2), 306–316. <https://doi.org/10.1006/ABBI.1997.0137>
- Levine III, H. (2005). Multiple ligand binding sites on A β (1–40) fibrils. *Amyloid*, 12(1), 5–14. <https://doi.org/10.1080/13506120500032295>
- Li, H., Ha, E., Donaldson, R. P., Jeremic, A. M., & Vertes, A. (2015). Rapid assessment of human amylin aggregation and its inhibition by copper(II) ions by laser ablation electrospray ionization mass spectrometry with ion mobility separation. *Anal Chem*, 87(19), 9829–9837. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02217>
- Lomasney, A. R., Yi, L., & Roper, M. G. (2013). Simultaneous monitoring of insulin and islet amyloid polypeptide secretion from islets of Langerhans on a microfluidic device. *Anal Chem*, 85(16), 7919–7925. <https://doi.org/10.1021/ac401625g>
- Lopes, D. H. J., Colin, C., Degaki, T. L., de Sousa, A. C. V, Vieira, M. N. N., Sebollela, A., Martinez, A. M. B., Bloch, C., Ferreira, S. T., & Sogayar, M. C. (2004). Amyloidogenicity and Cytotoxicity of Recombinant Mature Human Islet Amyloid Polypeptide (rhlAPP). *Journal of Biological Chemistry*, 279(41), 42803–42810. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406108200>
- Louros, N. N., Tsiolaki, P. L., Baltoumas, F. A., Chryssikos, G. D., Gionis, V., Hamodrakas, S. J., & Iconomidou, V. A. (2017). Tracking the amyloidogenic core of IAPP amyloid fibrils: Insights from micro-Raman spectroscopy. *Journal of Structural Biology*, 199(2), 140–152. <https://doi.org/10.1016/J.JSB.2017.06.002>
- Luca, S., Yau, W.-M., Leapman, R., & Tycko, R. (2007). Peptide Conformation and Supramolecular Organization in Amylin Fibrils: Constraints from Solid-State NMR. *Biochemistry*, 46(47), 13505–13522. <https://doi.org/10.1021/bi701427q>
- Marek, P. J., Patsalo, V., Green, D. F., & Raleigh, D. P. (2012). Ionic strength effects on amyloid formation by amylin are a complicated interplay among Debye screening, ion selectivity, and Hofmeister effects. *Biochemistry*, 51(43), 8478–8490. <https://doi.org/10.1021/bi300574r>
- Merz, P. A., Wisniewski, H. M., Somerville, R. A., Bobin, S. A., Masters, C. L., & Iqbal, K. (1983). Ultrastructural morphology of amyloid fibrils from neuritic and amyloid plaques. *Acta Neuropathologica*, 60(1), 113–124. <https://doi.org/10.1007/BF00685355>

- Muneeruddin, K., Thomas, J. J., Salinas, P. A., & Kaltashov, I. A. (2014). Characterization of small protein aggregates and oligomers using size exclusion chromatography with online detection by native electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, *86*(21), 10692–10699. <https://doi.org/10.1021/ac502590h>
- Noor, H., Cao, P., & Raleigh, D. P. (2012). Morin hydrate inhibits amyloid formation by islet amyloid polypeptide and disaggregates amyloid fibers. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, *21*(3), 373–382. <https://doi.org/10.1002/pro.2023>
- Oskarsson, M. E., Singh, K., Wang, J., Vlodavsky, I., Li, J.-P., & Westermark, G. T. (2015). Heparan Sulfate Proteoglycans Are Important for Islet Amyloid Formation and Islet Amyloid Polypeptide-induced Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(24), 15121–15132. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.631697>
- Pacholarz, K. J., Garlish, R. A., Taylor, R. J., & Barran, P. E. (2012). Mass spectrometry based tools to investigate protein–ligand interactions for drug discovery. *Chemical Society Reviews*, *41*(11), 4335. <https://doi.org/10.1039/c2cs35035a>
- Pilkington, E. H., Xing, Y., Wang, B., Kakinien, A., Wang, M., Davis, T. P., Ding, F., & Ke, P. C. (2017). Effects of Protein Corona on IAPP Amyloid Aggregation, Fibril Remodelling, and Cytotoxicity. *Scientific Reports*, *7*(1), 2455. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02597-0>
- Pillay, K., & Govender, P. (2013). Amylin uncovered: a review on the polypeptide responsible for type II diabetes. *Biomed Res Int*, *2013*, 826706. <https://doi.org/10.1155/2013/826706>
- Podlisny, M. B., Ostaszewski, B. L., Squazzo, S. L., Koo, E. H., Rydell, R. E., Teplow, D. B., & Selkoe, D. J. (1995). Aggregation of secreted amyloid beta-protein into sodium dodecyl sulfate- stable oligomers in cell culture. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.16.9564>
- Pryor, N. E., Moss, M. A., & Hestekin, C. N. (2012). Unraveling the early events of amyloid-beta protein (A β) aggregation: techniques for the determination of A β aggregate size. *Int J Mol Sci*, *13*(3), 3038–3072. <https://doi.org/10.3390/ijms13033038>
- Pujol-Pina, R., Vilapriñó-Pascual, S., Mazzucato, R., Arcella, A., Vilaseca, M., Orozco, M., & Carulla, N. (2015). SDS-PAGE analysis of A β oligomers is disserving research into Alzheimer’s disease: appealing for ESI-IM-MS. *Scientific Reports*, *5*, 14809. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/srep14809>
- Rambaldi, D. C., Zattoni, A., Reschiglian, P., Colombo, R., & De Lorenzi, E. (2009). In vitro amyloid A β 1-42 peptide aggregation monitoring by asymmetrical flow field-flow fractionation with multi-angle light scattering detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *394*(8), 2145–2149. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2899-1>
- Randrianjatovo-Gbalou, I., Marcato-Romain, C. E., & Girbal-Neuhauser, E. (2015). Quantification of amyloid fibrils using size exclusion chromatography coupled with online fluorescence and ultraviolet detection. *Anal Biochem*, *488*(Supplement C), 19–21. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.07.014>
- Rawat, A., Maity, B. K., Chandra, B., & Maiti, S. (2018). Aggregation-induced conformation changes dictate islet amyloid polypeptide (IAPP) membrane affinity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2018.03.027>
- Reinke, A. A., & Gestwicki, J. E. (2011). Insight into amyloid structure using chemical probes. *Chemical Biology & Drug Design*, *77*(6), 399–411. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2011.01110.x>
- Rhoades, E., & Gafni, A. (2003). Micelle Formation by a Fragment of Human Islet Amyloid Polypeptide. *Biophysical Journal*, *84*(5), 3480–3487. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)70068-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)70068-X)

- Riba, I., Barran, P. E., Cooper, G. J. S., & Unwin, R. D. (2015). On the structure of the copper-amylin complex. *International Journal of Mass Spectrometry*, 391, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2015.09.001>
- Rodríguez-Rodríguez, C., Rimola, A., Rodríguez-Santiago, L., Ugliengo, P., Álvarez-Larena, Á., Gutiérrez-de-Terán, H., Sodupe, M., & González-Duarte, P. (2010). Crystal structure of thioflavin-T and its binding to amyloid fibrils: insights at the molecular level. *Chemical Communications*, 46(7), 1156. <https://doi.org/10.1039/b912396b>
- Rulifson, I. C., Cao, P., Miao, L., Kopecky, D., Huang, L., White, R. D., Samayoa, K., Gardner, J., Wu, X., Chen, K., Tsuruda, T., Homann, O., Baribault, H., Yamane, H., Carlson, T., Wiltzius, J., & Li, Y. (2016). Identification of Human Islet Amyloid Polypeptide as a BACE2 Substrate. *PLoS One*, 11(2), e0147254. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147254>
- Sabella, S., Quaglia, M., Lanni, C., Racchi, M., Govoni, S., Caccialanza, G., Calligaro, A., Bellotti, V., & De Lorenzi, E. (2004). Capillary electrophoresis studies on the aggregation process of β -amyloid 1-42 and 1-40 peptides. *Electrophoresis*, 25(18–19), 3186–3194. <https://doi.org/10.1002/elps.200406062>
- Sasahara, K., Morigaki, K., & Shinya, K. (2014). Amyloid aggregation and deposition of human islet amyloid polypeptide at membrane interfaces. *FEBS J*, 281(11), 2597–2612. <https://doi.org/10.1111/febs.12807>
- Sebastiao, M., Quittot, N., & Bourgault, S. (2017). Thioflavin T fluorescence to analyse amyloid formation kinetics: Measurement frequency as a factor explaining irreproducibility. *Anal Biochem*, 532, 83–86. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.06.007>
- Shvartsburg, A. A., & Smith, R. D. (2013). Separation of protein conformers by differential ion mobility in hydrogen-rich gases. *Analytical Chemistry*, 85(14), 6967–6973. <https://doi.org/10.1021/ac4015963>
- Steensma, D. P. (2001). “Congo” red: out of Africa? *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 125(2), 250–252. [https://doi.org/10.1043/0003-9985\(2001\)125<0250:CR>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1043/0003-9985(2001)125<0250:CR>2.0.CO;2)
- Sulatskaya, A. I., Kuznetsova, I. M., & Turoverov, K. K. (2012). Interaction of Thioflavin T with Amyloid Fibrils: Fluorescence Quantum Yield of Bound Dye. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(8), 2538–2544. <https://doi.org/10.1021/jp2083055>
- Suzuki, Y., Brender, J. R., Hartman, K., Ramamoorthy, A., & Marsh, E. N. (2012). Alternative pathways of human islet amyloid polypeptide aggregation distinguished by ¹⁹F nuclear magnetic resonance-detected kinetics of monomer consumption. *Biochemistry*, 51(41), 8154–8162. <https://doi.org/10.1021/bi3012548>
- vandenAkker, C. C., Deckert-Gaudig, T., Schlegler, M., Velikov, K. P., Deckert, V., Bonn, M., & Koenderink, G. H. (2015). Nanoscale Heterogeneity of the Molecular Structure of Individual hIAPP Amyloid Fibrils Revealed with Tip-Enhanced Raman Spectroscopy. *Small*, 11(33), 4131–4139. <https://doi.org/10.1002/smll.201500562>
- Vassar, P. S., & Culling, C. F. (1959). Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues. *Archives of Pathology*, 68, 487–498. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/13841452>
- Verpillot, R., Esselmann, H., Mohamadi, M. R., Klafki, H., Poirier, F., Lehnert, S., Otto, M., Wiltfang, J., Jean-Louis, V., & Taverna, M. (2011). Analysis of Amyloid- β Peptides in Cerebrospinal Fluid Samples by Capillary Electrophoresis Coupled with LIF Detection. *Analytical Chemistry*, 83(5), 1696–1703. <https://doi.org/10.1021/ac102828f>

- Wang, G., Johnson, A. J., & Kaltashov, I. A. (2012). Evaluation of Electrospray Ionization Mass Spectrometry as a Tool for Characterization of Small Soluble Protein Aggregates. *Analytical Chemistry*, 84(3), 1718–1724. <https://doi.org/10.1021/ac203017x>
- Westermark, P. (2011). Amyloid in the islets of Langerhans: thoughts and some historical aspects. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 116(2), 81–89. <https://doi.org/10.3109/03009734.2011.573884>
- Williamson, M. P. (2013). Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 73, 1–16. <https://doi.org/10.1016/J.PNMRS.2013.02.001>
- Woods, L. A., Radford, S. E., & Ashcroft, A. E. (2013). Advances in ion mobility spectrometry-mass spectrometry reveal key insights into amyloid assembly. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1834(6), 1257–1268. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.10.002>
- Yoshimura, M., Ono, M., Watanabe, H., Kimura, H., & Saji, H. (2015). Feasibility of Amylin Imaging in Pancreatic Islets with β -Amyloid Imaging Probes. *Scientific Reports*, 4(1), 6155. <https://doi.org/10.1038/srep06155>
- Young, L. M., Ashcroft, A. E., & Radford, S. E. (2017). Small molecule probes of protein aggregation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 39, 90–99. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2017.06.008>
- Young, L. M., Cao, P., Raleigh, D. P., Ashcroft, A. E., & Radford, S. E. (2014). Ion mobility spectrometry-mass spectrometry defines the oligomeric intermediates in amylin amyloid formation and the mode of action of inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*, 136(2), 660–670. <https://doi.org/10.1021/ja406831n>
- Young, L. M., Saunders, J. C., Mahood, R. A., Reville, C. H., Foster, R. J., Tu, L. H., Raleigh, D. P., Radford, S. E., & Ashcroft, A. E. (2015). Screening and classifying small-molecule inhibitors of amyloid formation using ion mobility spectrometry-mass spectrometry. *Nat Chem*, 7(1), 73–81. <https://doi.org/10.1038/nchem.2129>
- Zheng, X., Xu, Z., Li, H., & Fu, H. (2018). A sensitive probe for amyloid fibril detection with strong fluorescence and early response. *RSC Advances*, 8(29), 15870–15875. <https://doi.org/10.1039/C8RA00751A>

Partie expérimentale

Chapitre III. Préparation des échantillons pour les études de cinétiques d'oligomérisation

1. Introduction

Afin de développer une méthode permettant de suivre l'oligomérisation de hIAPP *in vitro*, la première étape a consisté à sélectionner la source du peptide hIAPP qui sera utilisée pour les études de cinétiques d'oligomérisation. Nous avons dans un premier temps comparé les propriétés et la qualité de différents peptides synthétiques disponibles sur le marché. Nous avons également étudié le protocole de préparation de l'échantillon avant son stockage et d'incubation pour la réalisation de la cinétique. La préparation d'échantillon est très importante car elle doit permettre de traiter de manière identique tous les lots fournis par le même fournisseur, de désagréger éventuellement les espèces oligomérisées ou agrégées potentiellement déjà présentes dans l'échantillon dès sa réception. D'autre part, nous avons étudié l'impact du milieu d'incubation de hIAPP afin de trouver des conditions permettant l'observation de l'oligomérisation dans une échelle de temps compatible avec un suivi en temps réel et *in vitro*. La comparaison des lots de peptide a été réalisée grâce à trois techniques : l'électrophorèse capillaire (CE), la spectrofluorimétrie à la Thioflavine T et la spectrométrie de masse (ESI-QToF-MS). Enfin, une étude complémentaire a été menée afin de se rapprocher des conditions physiologiques de hIAPP en introduisant des liposomes dans le milieu d'incubation, permettant de mimer la présence de membranes cellulaires.

1.1. Importance du milieu d'incubation sur la cinétique d'oligomérisation de hIAPP

1.1.1. Influence du pH

Après sa synthèse *in vivo* par les cellules β pancréatiques, hIAPP est stocké dans le milieu intracellulaire à pH 5,5 avant d'être excrété dans le milieu extracellulaire qui lui a un pH 7,4 (Akter *et al.*, 2016; Khemtémourian *et al.*, 2011; Skeby *et al.*, 2016). Les études reportées dans la littérature (Chapitre II) afin d'étudier l'oligomérisation de hIAPP rapportent d'ailleurs majoritairement l'emploi de milieux d'incubation à un pH de 7,4. Cependant, aucune d'entre elles n'a permis de suivre *in vitro* l'oligomérisation de hIAPP, notamment depuis son état initial et monomérique. Ceci peut s'expliquer par une oligomérisation trop rapide à ce pH pour être observée. A pH physiologique, la Lys1, l'Arg11 ainsi que l'extrémité N-terminale sont chargées positivement. Le résidu His18 qui est très proche de la séquence clé de hIAPP (20-29) impliquée dans son oligomérisation se protone à pH < 5, affaiblissant le pouvoir d'association entre deux monomères. Ainsi aux pH < 5, l'oligomérisation est ralentie. A l'inverse, une incubation de hIAPP dans un milieu à pH physiologique serait favorable à une agrégation rapide. Ceci a été confirmé par des travaux montrant une agrégation ralentie à pH 5,5 par rapport au pH 7,4 (tampon Tris-HCl 10 mM contenant 100 mM de NaCl). De plus, à ce pH plus acide, une absence de conversion en feuillet β démontrée par dichroïsme circulaire associée à une lag phase multipliée

par 2 et un plateau de fluorescence divisé par 5 en fluorescence à la ThT ont été reportées (Khemtmourian *et al.*, 2011) (Figure 47) :

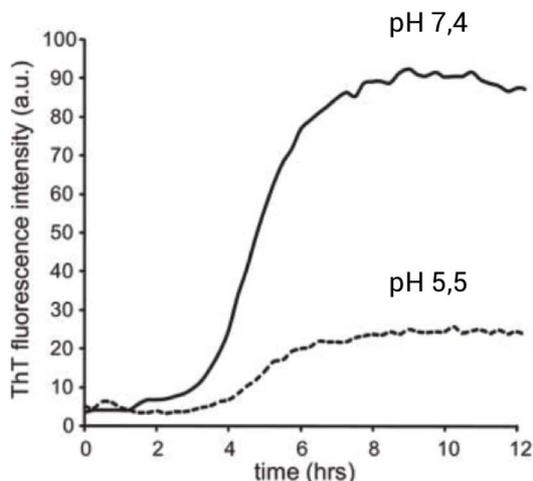


Figure 47 : Comparaison de l'agrégation de hIAPP observée par spectrofluorimétrie à la ThT à pH intracellulaire (5,5, pointillés) et extracellulaire (7,4, trait plein) (adapté de Khemtmourian 2011)

Afin d'observer *in vitro* le processus depuis son état initial et surtout de pouvoir observer les étapes les plus en amont de cette oligomérisation, nous avons décidé d'aller encore plus loin en comparant la cinétique avec un milieu d'incubation à pH 7,4 ou pH 3,7. Ce travail a fait l'objet d'une partie présentée dans un manuscrit en cours de soumission, présenté dans la partie 2 de ce chapitre.

1.1.2. Intérêt des liposomes comme mimes de membranes cellulaires

hIAPP est sécrété *in vivo* dans un milieu cellulaire, impliquant la présence de membranes. Différents groupes se sont intéressés à l'influence de ces membranes sur la cinétique d'oligomérisation de hIAPP, afin de se rapprocher des conditions physiologiques. Il a été montré que les liposomes constituaient un modèle efficace afin de mimer ces membranes cellulaires (Knobloch *et al.*, 2015). Lorsqu'ils sont co-incubés avec hIAPP, une accélération du processus d'oligomérisation a été observée par plusieurs auteurs (Hebda *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2014). Tout comme le pH, la présence de membranes cellulaires aurait donc un impact sur la vitesse d'oligomérisation de hIAPP. D'un point de vue expérimental, l'addition de liposomes a également été testée dans ce travail.

1.2. Importance de la préparation des échantillons

En marge du comportement de hIAPP suivant le pH de son milieu d'incubation et éventuellement d'analyse si celle-ci n'est pas suffisamment rapide, on constate également selon la littérature des différences sur sa vitesse d'agrégation qui pourrait être imputées à la préparation d'échantillon en amont, ainsi qu'à la technique d'analyse utilisée (Chapitre II). Dans le cas du peptide $A\beta_{1-42}$ par exemple, une préparation spécifique a d'ailleurs été développée au laboratoire (Brinet *et al.*, 2014) afin de désagréger le peptide commercial à sa réception. Dans le cas de hIAPP, il sera probablement

nécessaire de le traiter spécifiquement à sa réception afin de le désagréger éventuellement puis de le conserver sans qu'il ne s'oligomérisse. Il pourra ensuite être reconstitué dans son tampon d'incubation avant d'être analysé.

En 2015, il a été montré que la provenance de l'échantillon avait un fort impact sur l'oligomérisation de A β ₁₋₄₂ (Suvorina *et al.*, 2015). Les auteurs ont comparé le comportement de A β ₁₋₄₂ provenant de cinq fournisseurs différents, préparés, stockés, reconstitués puis analysés dans les mêmes conditions. Une seule technique conduit à des résultats identiques entre tous les lots, la spectrofluorimétrie à la ThT, qui suggèrent que le peptide des différents lots ne s'oligomérisse pas (Bartolini *et al.*, 2011; Kaffy *et al.*, 2014; Lindberg *et al.*, 2017). Toutes les autres techniques utilisées (spectrométrie de masse, diffraction aux RX et TEM) ont permis de mettre en évidence une différence d'agrégation entre les lots, sans qu'un lien ne puisse être fait avec leur pureté. Les morphologies des espèces formées observées sont également différentes. Les auteurs recommandent d'ailleurs d'apporter une attention particulière à la qualité du peptide ainsi qu'au protocole de préparation d'échantillon. La provenance du peptide amyloïde semble donc avoir une importance primordiale pour le suivi de la cinétique d'oligomérisation de manière certaine et reproductible. Cet aspect a donc été le cœur de l'étude menée sur hIAPP présentée en partie 2 de ce chapitre dans le cas de hIAPP.

2. Article 1 : “Evidence for different quality and *in vitro* oligomerization behavior for synthetic hIAPP obtained from different sources”

L'article présenté ci-dessous détaille l'influence de la source du peptide sur sa cinétique d'oligomérisation. En amont de cette étude, la préparation d'échantillon de hIAPP dès sa réception a été optimisée. Comme pour A β , l'hydroxide d'ammonium a été envisagé pour désagréger le peptide, mais celui-ci conduit au contraire à une agrégation accélérée. Il ne peut donc pas être utilisé ici. Nous avons donc utilisé l'hexafluoroisopropanol (HFIP) pur qui a déjà été largement décrit pour le traitement de hIAPP à sa réception (Khemtmourian et al., 2011; Young et al., 2014). La durée de traitement par l'HFIP a été discuté dans l'article ci-dessous. HFIP est ensuite évaporé sous un flux d'azote puis sous vide. L'échantillon sec est alors ensuite reconstitué dans le tampon avant analyse afin de mimer la cinétique. Ce tampon a par la suite été optimisé afin de faciliter l'observation des différentes espèces impliquées dans l'oligomérisation de hIAPP.

Après ces optimisations, la pureté du peptide provenant de différentes sources a été étudiée grâce à l'électrophorèse capillaire et la spectrométrie de masse. Les résultats ont mis en évidence des différences nettes concernant la pureté de l'échantillon, en termes de contaminant ou d'espèces déjà oligomérisées. Enfin, l'influence de la pureté de l'échantillon sur son oligomérisation, pour les différents lots, a été étudiée par spectrofluorimétrie à la ThT et par électrophorèse capillaire. Nous avons alors pu montrer que la pureté de l'échantillon a un impact direct sur la nature des espèces formées lors de l'oligomérisation, ainsi que sur leur proportion.

Evidence for different quality and *in vitro* oligomerization behavior for synthetic hIAPP obtained from different sources

Corentin Berardet ^{a,b}, Julia Kaffy ^b, Frédéric Halgand ^c, Guillaume Van der Rest ^c, Sandrine Onger ^b, Myriam Taverna ^{a,*}

^a Institut Galien Paris Sud, UMR 8612, Proteins and Nanotechnologies in Analytical Science (PNAS), CNRS, Univ. Paris-Sud, Univ. Paris-Saclay, 5 Rue Jean-Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France

^b BioCIS, UMR 8076, Fluorinated Molecules and Medicinal Chemistry, CNRS, Univ. Paris-Sud, Univ. Paris-Saclay, 5 Rue Jean-Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France

^c LCP, UMR 8000, Réactivité des Ions, Spectrométrie de Masse, Analyse et Spectroscopies (RISMAS), CNRS, Univ. Paris-Sud, Univ. Paris-Saclay, Rue Henri Becquerel, Bâtiment 201 P2, 91405 Orsay, France

*Corresponding author (M. Taverna)

E-mail address: myriam.taverna@u-psud.fr

Postal address: 5 Rue Jean-Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France

Phone number: +33 1 46 83 54 62

Abstract

Type 2 diabetes is characterized by the aggregation of human Islet Amyloid Polypeptide (hIAPP), from monomer to amyloid plaques made of insoluble fibrils. Great differences concerning the nature of formed species or oligomerization kinetics can be highlighted between reported *in vitro* studies on hIAPP aggregation process. In this work, we investigated if the sample itself could be at the origin of those observed differences. To this aim, four different hIAPP samples obtained from three sources or suppliers have been analyzed and compared by capillary electrophoresis (CE), ThT fluorescence spectroscopy and ESI-QToF-MS. Lots provided by the same supplier were shown to be very similar whatever the analytical technique used to characterize them. In contrast, several critical differences could be pointed out for hIAPP provided by different suppliers. We demonstrated that in several samples, some oligomerized peptide (e.g. dimer) was already present upon reception. Purity was also different and the proneness of the peptide solution to form fibrils *in vitro* within 24h could vary considerably from one sample source to another but not from lot to lot of the same kind of sample. All those results demonstrate that the quality and state of the hIAPP can impact greatly on the aggregation kinetics, and on the information provided by these *in vitro* tests. Finally, a careful selection of the peptide batch and source is mandatory to perform studies on the oligomerization of hIAPP *in vitro* or for screening new inhibitory molecules toward this pathological process.

1. Introduction

Affecting more than 400 million people in the world, type 2 diabetes (T2D) is now considered as a major public health issue [1]. Treatments are only non-etiological, considering that the cause of this disease is not elucidated yet. In 96% of diabetic patients, extracellular amyloid deposits composed of amyloid fibrils of Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) are found in the pancreas [2]. IAPP is produced by proteolytic cleavage of the pro-islet amyloid polypeptide co-secreted with insulin in a 100:1 molar ratio [2]. During the pathological amyloid cascade, an aggregation process which ultimately leads to the formation of amyloid plaques, morphologically distinct species of different sizes and solubilities are formed such as oligomers, protofibrils and fibrils [1]. The last decade, a new hypothesis has emerged concerning the role of IAPP in T2D, and potential toxicity of the related species like oligomers [3]. This hypothesis tends to consider that small oligomers are mostly responsible for the toxicity towards β -cells.

Stable and insoluble IAPP fibrils have been the most studied species up to now, using several analytical techniques like TEM [4,5], Thioflavin T (ThT) fluorescence spectroscopy [6] or DLS [7,8]. Little work has been devoted to the study at a molecular level of IAPP oligomerization from the earliest stages of the process. This would give insights on the parameters triggering or stopping this pathological process. Studies which investigated *in vitro* this pathological process have been based on either fluorescence spectrophotometry using ThT as a β -sheet probe [9–16], size exclusion liquid chromatography [15], SDS-PAGE [15,17], NMR [5,18,19] or IMS-MS [12,16,20–23]. However they provided different (if not conflicting) results, in terms of observed species (size and conformations of IAPP) and also of kinetics rate of the oligomerization process. Those discrepancies could be attributed to the different techniques employed for these studies. However, several studies employing the same techniques generated also different conclusions, showing it exists other sources of variability.

Marek and co-workers have shown in 2012, using ThT spectrofluorescence, that for IAPP the ionic strength and the pH of the incubation solution is crucial regarding its fibrilization rate [24]. At low pH, they pointed out that even the nature of the buffer anion had an impact on the oligomerization. In 2017, Sebastiao *et al.* have demonstrated that the measurement frequency in ThT fluorescence spectroscopy experiments can modify the IAPP oligomerization kinetics [11], whereas Suzuki and co-workers have shown that the presence of Thioflavin-T in the incubation medium does not modify the kinetics rate [25]. This means analytical parameters (measurement intervals, temperature...) can be a variability source, as well as incubation conditions (buffers nature, concentration, pH...).

Besides, Suvorina and coworkers have demonstrated the polymorphism that could arise for A β ₁₋₄₂ fibrils purchased from different suppliers although incubated in the same medium. Whereas the variability has not been demonstrated on early formed species, this study showed that the peptide source can have a strong impact on its oligomerization behavior [26]. It appears then, that variability may also arise from the production method of the peptide, and also from the state, purity and quality of the different IAPP batches employed for these studies.

Considering that no work has been reported to date about the variability induced by IAPP provenance, we had deeply investigated whether its source had an influence on the oligomerization behavior of this peptide. To achieve this goal, we combined different techniques (CE-UV, ESI-QToF-MS and ThT spectroscopy) to characterize IAPP obtained from three different suppliers. Two were commercially

available, and one was produced by a custom peptide synthesis platform. We also investigated the variability of different batches of the same supplier. We characterized both fresh peptide samples and after 1 day of storage at ambient temperature to get insight on their oligomerization behavior.

2. Materials and methods

- **Chemicals**

hiAPPs (TFA salt) were purchased from several suppliers: Bachem also called supplier A (Bubendorf, Switzerland), Sigma, supplier B (St. Louis, MO, USA) and custom peptide synthesis platform, supplier C, (at University of Cergy-Pontoise (Cergy-Pontoise, France). Sodium hydroxide was obtained from VWR (Fontenay-sous-Bois, France) and sodium chloride from Euromedex (Strasbourg, France). Ammonium acetate, DMSO, hexafluoroisopropanol (HFIP), methanol, hexadimethrine bromide (Polybrene, MW 4000-6000 g/mol), thioflavin T were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). All buffers were prepared in deionized water. Deionized water was prepared with a Direct-Q® 3 Water Purification System from Millipore (Milford, USA).

- **Samples preparation**

All hiAPP samples were dissolved upon reception in 100% HFIP, incubated for 1h at room temperature. After aliquoting them, samples were dried at 40°C under vacuum and then stored at -20°C. Dried peptides were reconstituted in 50 mM ammonium acetate buffer pH 3.7 at a concentration of 100 µM at room temperature. The same sample preparation was used for CE-UV and ESI-QToF-MS experiments. For Thioflavin-T experiments only, the peptide was reconstituted in 100% DMSO at 200 µM. For ESI-QToF-MS experiments, the stock solutions were diluted to 5 µM for Supplier A and 10 µM for Supplier B and C.

- **Capillary electrophoresis**

CE experiments were carried out with a P/ACE MDQ (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) equipped with a UV detection at 200 nm. Bare fused silica capillaries (60 cm total length x 50 µm id) were purchased from Polymicro technologies (Phoenix, AZ, USA). The polybrene (PB) coating procedure was previously described [27]. Briefly, after the capillary preconditioning with MeOH and NaOH (0.1 and 1M), the capillary was flushed with a 0.2% PB solution and then with water. Capillary was finally equilibrated with the running buffer prior to the analysis.

- **ThT fluorescence spectroscopy**

ThT spectroscopy experiments were carried out with a microplate reader Fluostar Optima (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) equipped with 440/485 excitation/emission filters. 96-wells plates were used. Buffer was composed of 10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 µM ThT and was adjusted to pH 7.4. Each well was filled with 195 µL of buffer and 5 µL of hiAPP solution (5 µM final concentration).

- **ESI-QToF-MS experiments**

Mass spectrometry experiments were performed on a Synapt G2-Sⁱ HDMS Q-ToF instrument (Waters, Manchester, UK) equipped with a traveling wave ion mobility cell. In this device, the electric field which is applied in a small region, moves along the tube to transport ions to the detector [28]. All samples were infused to the ion source at 5 μ L/min flow rate. Acquisition of mass spectra was carried out over the 500 to 5000 m/z mass range and m/z calibration was performed using sodium trifluoroacetate leading to a typical error below 2 ppm. In order to preserve as much as possible oligomeric complexes, we used non-denaturing conditions as follow: positive ion mode was chosen regarding hIAPP pI (~8.6) and acidic analysis conditions (ammonium acetate 50 mM pH 3.7). Experimental parameters set on the instrument were the following: capillary voltage = 2.4 kV, sampling cone = 70 V, source offset = 70 V, source temperature = 40 °C, desolvation gas flow = 0 L/h (500 for Supplier C).

3. Results and discussion

3.1 Study of the dissolution media and the incubation buffer

We first studied the impact of the dissolution medium and sample preparation on the hIAPP state upon sample reception. Different protocols of dissolution were tested on one commercial hIAPP sample (Supplier A). Prior to the reconstitution in the analysis medium, all commercial and dried peptides were cleaned up from potential aggregated species using an HFIP treatment, followed by its evaporation under vacuum and storage at -20°C. Two different dissolution times with HFIP were tested: one hour and one night. ThT fluorescence spectroscopy, which allows the monitoring of β -sheets structures formed over time, was then used to check the absence of fluorescence signal and therefore of aggregated and β -sheets structures. Samples were analyzed immediately after reconstitution in a 10 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl pH 7.4. The obtained fluorescence intensity curves did not exhibit any difference, either on the lag phase duration nor the plateau intensity. We kept the one-hour dissolution for subsequent studies.

As the incubation buffer could have a profound impact on hIAPP aggregation, we tested two different media: 10 mM Tris-HCl containing 100 mM NaCl pH 7.4 and 50 mM ammonium acetate pH 3.7, by measuring the ThT fluorescence intensity over time (Figure 1). This experiment was repeated on two different batches from Supplier A (A1 and A2). We observed that the curves are superimposable for the two batches in each medium showing that the two peptide batches are very similar. The two buffers lead however to quite different fluorescence curves in terms of lag phase (start of the fluorescence increase), saturation phase (time to the plateau) and fluorescence intensity at the plateau. In the Tris-HCl medium (pH 7.4), the lag phase is 2 times shorter than in the ammonium acetate buffer, whereas the intensity of the fluorescence plateau is 3 times higher. This indicates that the ammonium acetate buffer leads to a slower kinetics, and forms less β -sheets species of hIAPP. We can not exclude however that this buffer contribute itself to lower the fluorescence emission. From these results, the ammonium acetate buffer, having a slower oligomerization rate, has been retained for the further studies on hIAPP oligomerization process by CE and ESI-QToF-MS.

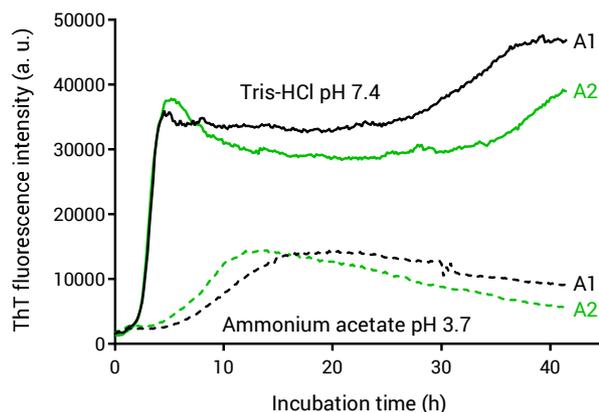


Figure 1. ThT fluorescence spectroscopy monitoring over time of aggregation of hIAPP from two lots of the same Supplier A (5 μ M in DMSO) and incubated in two different buffers (Tris: 10 mM Tris-HCl / 100 mM NaCl pH 7.4 + 10 μ M ThT and AA: 50 mM ammonium acetate pH 3.7 + 10 μ M ThT); λ_{exc} 440 nm, λ_{em} 485 nm.

3.2 Comparison of hIAPP from three different suppliers

Just after reconstitution, fresh hIAPP samples were analyzed by capillary electrophoresis (CE-UV) and ESI-QToF-MS to get more insights on their composition and aggregation state.

We analyzed the three samples freshly reconstituted using a CE-UV method we developed [27]. This method uses a PB-coated capillary to avoid hIAPP adsorption onto capillary walls. Capillary electrophoresis profiles exhibit strong differences between batches analyzed under the same conditions and concentrations (100 μ M) (Figure 2). Profiles are similar for peptides from Supplier A and C with one main peak (peak 3) corresponding to the monomeric peptide and two smaller ones (peaks 1 & 2) that were shown to be hIAPP species with a MW above 100 kDa. Two additional peaks a & b are present for the peptide from Supplier C. They correspond either to impurities or to hIAPP related species like other small oligomers. The lot from Supplier B exhibits the same major peak but at a very low intensity (15 times lower). Peaks 1 & 2 are not present in this sample but a new peak is detected (2'). These results indicate that the peptide in this lot is already aggregated to a significant proportion. From CE experiments, we can conclude that hIAPP peptides provided by Suppliers C and A are very close, the purity of Supplier A is clearly higher however. The peptide of Supplier B is probably under an oligomerized or aggregated form.

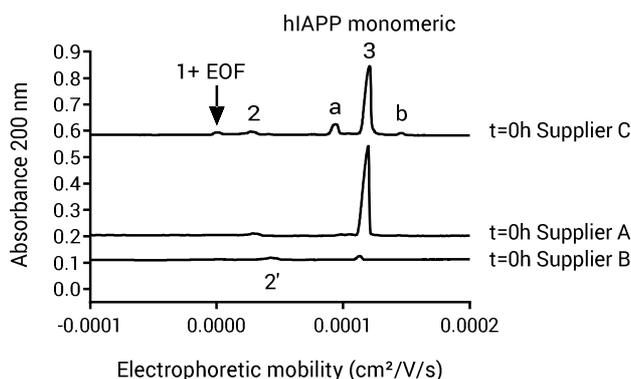


Figure 2. Electropherograms of hIAPP obtained from Suppliers A, B and C, using polybrene coated capillaries (60 cm x 50 μm) with a BGE composed of 50 mM ammonium acetate pH 3.7 (applied voltage: -25 kV, detection 200 nm). For each Supplier, hIAPP is reconstituted at 100 μM in BGE and analyzed immediately.

In order to explain the differences observed between the peptides from different suppliers, ESI-QToF-MS has been used to determine the composition of each peptide batch (Figure 3). All the calculated and expected mass considered in this section are monoisotopic average masses. For all suppliers, four characteristic hIAPP signals are observed and assigned to monomer and dimer. Supplier A exhibits a peak at m/z 976.259 (monomer +4: M^{4+}), which leads to a calculated mass of 3901.036 Da, and a second at m/z 1301.343 (M^{3+}) with a calculated mass of 3901.029. Both are corresponding to the monomer whose expected mass is 3900.868. Two smaller peaks are observed, corresponding to a dimeric form with an expected mass of 7801.736 (m/z 1561.392 for dimer $^{5+}$ and m/z 1951.503 for monomer $^{2+}$ /dimer $^{4+}$). Results obtained for the three investigated peptides are summarized in Table I. For all the three suppliers, calculated mass are similar and consistent with expected masses.

Table I: Monoisotopic calculated mass for each signal each supplier, with associated average mass for monomer and dimer

	Supplier A	Supplier B	Supplier C
Monomer $^{4+}$	3901.036	3900.904	3900.948
Monomer $^{3+}$	3901.029	3900.900	3900.927
Monomer $^{2+}$	3901.006	3900.890	3900.944
Mean (monomer)	3901.024	3900.898	3900.939
Dimer $^{4+}$	7802.012	7801.780	7801.888
Dimer $^{5+}$	7801.960	7801.865	7801.840
Mean (dimer)	7801.986	7801.823	7801.864

For Suppliers B and C, however, an additional peak was observed at m/z 538 which is likely a contaminant in the peptide lot. Moreover, the intensity of the hIAPP monomeric signal (m/z 976) is about 100 times less intense in the peptide from Supplier B than in A, indicating a much higher monomeric purity in that lot. The spectrum from Supplier C batch is more complex. Two new signals at m/z 942 and 1256 are visible. Considering their charge states (+4 and +3 respectively), those peaks could be assigned to hIAPP without the C-Term Tyrosine with a sodium adduct (3760.805 Da). All those results confirm the presence of hIAPP in all peptide batches, but certainly with different oligomerization states and purities.

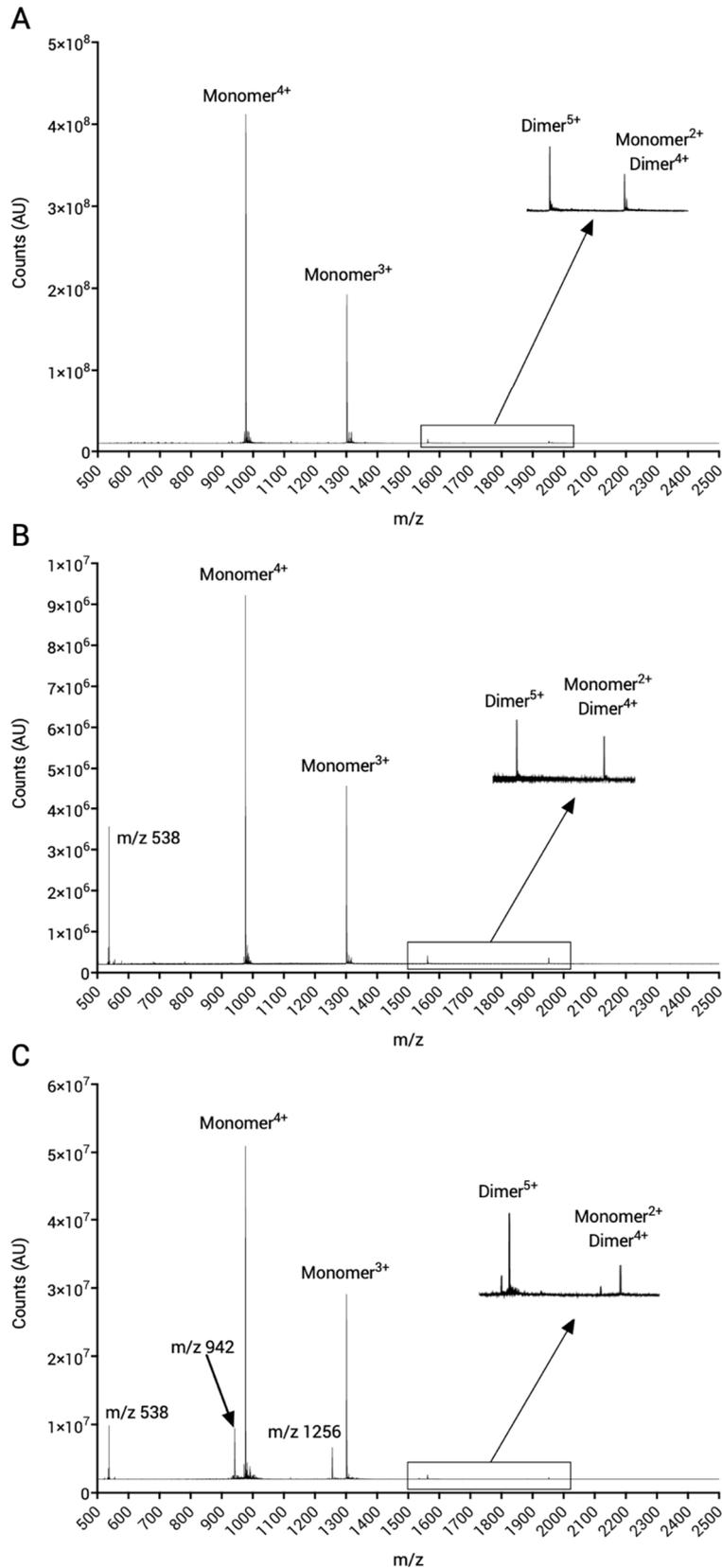


Figure 3. Mass spectra of hIAPP from Suppliers A, B and C (Figure A, B and C respectively) obtained by direct infusion of the hIAPP solution in a Synapt G2-Sⁱ instrument. hIAPP was dissolved in ammonium acetate 50 mM pH 3.7 at a concentration of 5 μ M (A) or 10 μ M (B and C). Considering the overall results, it appears that hIAPP from Supplier A is the purest, in terms of contaminant or oligomerization state.

3.3 Impact of the observed differences on the aggregation behavior

Regarding those results, the three suppliers provide hIAPP in different states (structural and or aggregation states) and degree of purity. We therefore investigated whether those differences have an impact on the aggregation kinetics. ThT fluorescence spectroscopy data obtained after reconstitution of each peptide lot in Tris-HCl medium pH 7.4 were used to compare the aggregation kinetics of the three peptides in the same incubation and analytical conditions (Table II). Some differences on the lag phase, the saturation phase and the fluorescence intensity at the plateau are clearly pointed out. Peptide from Supplier A oligomerizes 3.5 times faster than C, producing also more β -sheets species according to the fluorescence intensity at the plateau. Oligomerization kinetics of hIAPP from Supplier B is intermediate compared to the two others, but the fluorescence is 8 times less intense than that obtained from Supplier A. This could explain the lower proportion of hIAPP from Supplier B already pointed out by CE compared to the others. According to the Table II, β -sheets fibrils are not formed neither with the same kinetics nor with the same proportions for the three suppliers upon time. It seems that a low purity leads to a diminution of the β -sheets species production, as well as some delay for their formation. This confirms that the peptide source has a strong impact on the oligomerization process of hIAPP.

Table 1. Lag phase, saturation phase and plateau intensity comparison by ThT fluorescence for the three suppliers

Supplier	Lag phase	Saturation phase	Fluorescence intensity at the plateau
A	2h	5h	40000
B	5h	7h	5000
C	7h	12h	10000

The CE-UV method used previously is also suitable to monitor in real time the in vitro oligomerization process of hIAPP [27]. This method was therefore used to compare the behavior of the three peptides regarding their provenance. CE experiments have been performed over 20 hours of incubation in the ammonium acetate 50 mM pH 3.7 buffer (Figure 4). Peak 1 & 2 (2' for Supplier B) areas were all increased over time whatever the supplier. However, peak 3 behavior upon incubation time is markedly different. For Supplier A, its area almost decreased to zero after 20 hours of incubation. On the contrary, it remained constant for Supplier C. Its area decreased to zero for Supplier B but starting with a very low intensity as previously stated.

Between Supplier A and C, peaks 1 & 2 did not increase in the same proportion. They are more intense after 20 hours of incubation for Supplier C, indicating that more high molecular weight oligomers are formed in this lot, whereas the monomer is maintained over time. The monomer almost completely disappeared after 20h of incubation with the peptide from Supplier A. For Supplier B, considering the mobility of peak 2' is different that the one of peak 2, we can suppose this peptide leads to the formation of alternative large oligomers compared to Suppliers A & C.

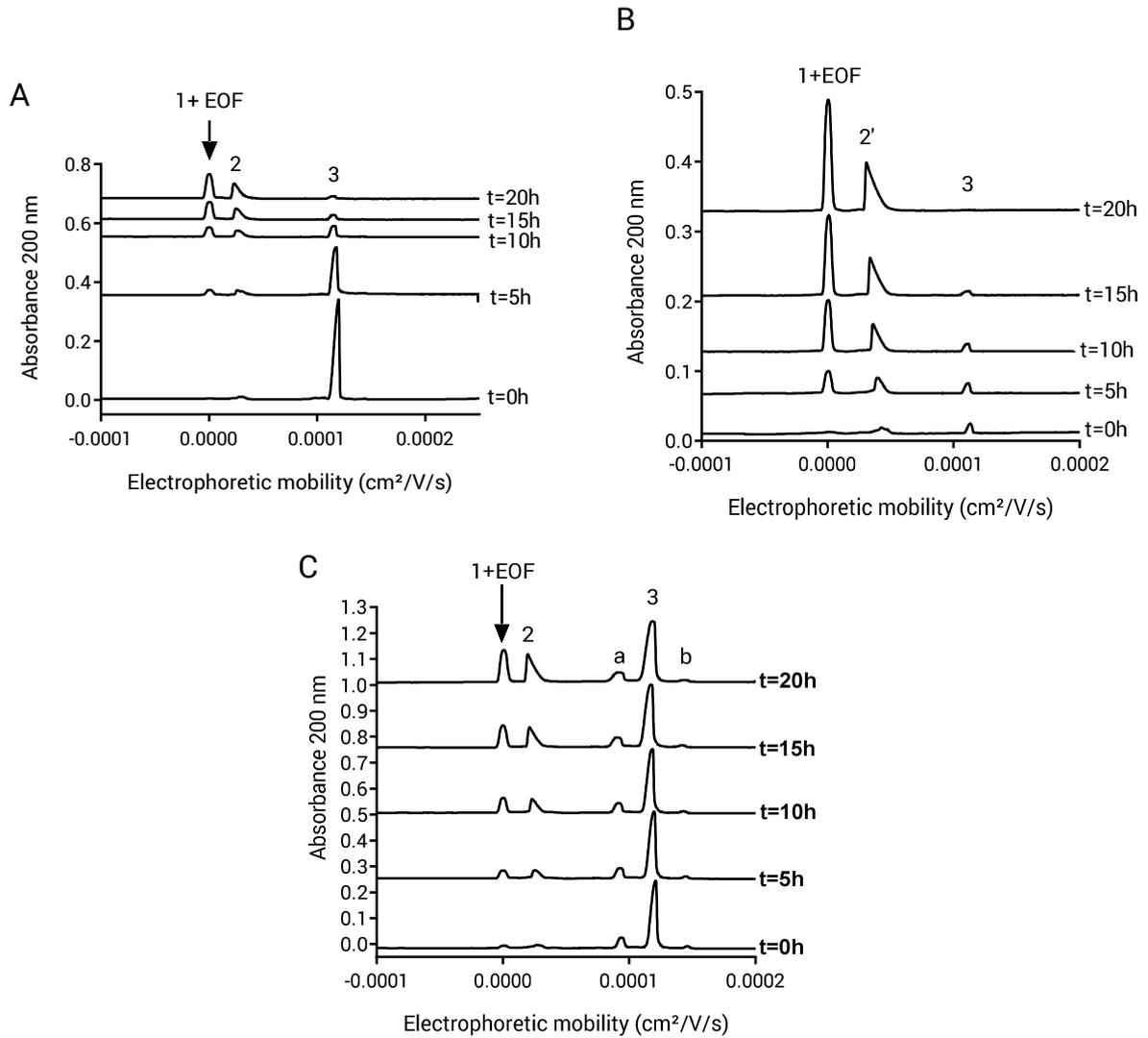


Figure 4. CE profiles of hIAPP incubated in 50 mM ammonium acetate pH 3.7 over 20 hours obtained for the three peptide sources (A) Supplier A; (B) Supplier B and (C) Supplier C. Electropherograms are shifted on Y-axis. Parameters are the same as in Fig 2.

Concluding remarks

Monitoring the *in vitro* hIAPP oligomerization is a key step to design new drug molecules in order to target hIAPP oligomeric species. However, it remains very challenging due to the high variability observed during various oligomerization monitoring experiments. We demonstrated that besides the technique employed and the incubation medium selected, the peptide source is of paramount importance in this *in vitro* oligomerization process. Whereas similar results were observed for two lots from the same furnisher, marked differences appeared with hIAPP provided by three different suppliers. The three techniques used which provide insights either on β -sheets formation (ThT spectrofluorimetry), purity (ESI-QToF-MS) and monomer / large oligomers kinetics (CE-UV) provide different results for the peptide from each supplier. Lag phase observed by ThT fluorescence can vary by a 3-fold factor, and CE shows very different kinetics of disappearance for the monomer peak for instance. Those results clearly exhibit the importance to carefully select the peptide provenance, in order to obtain repeatable oligomerization kinetics. This is particularly true for the activity evaluation of anti-hIAPP oligomerization molecules, tested as drug candidates in type 2 diabetes.

References

- [1] K. Pillay, P. Govender, Amylin uncovered: a review on the polypeptide responsible for type II diabetes, *Biomed Res Int.* 2013 (2013) 826706. doi:10.1155/2013/826706.
- [2] C.E. Higham, R.L. Hull, L. Lawrie, K.I. Shennan, J.F. Morris, N.P. Birch, K. Docherty, A. Clark, Processing of synthetic pro-islet amyloid polypeptide (proIAPP) "amylin" by recombinant prohormone convertase enzymes, PC2 and PC3, in vitro, *Eur J Biochem.* 267 (2000) 4998–5004. <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1046/j.1432-1327.2000.01548.x/asset/j.1432-1327.2000.01548.x.pdf?v=1&t=j4h0zj6h&s=2eab41e1d001193b625adc04434ca76423ae81c8>.
- [3] L. Haataja, T. Gurlo, C.J. Huang, P.C. Butler, Islet amyloid in type 2 diabetes, and the toxic oligomer hypothesis, *Endocr Rev.* 29 (2008) 303–316. doi:10.1210/er.2007-0037.
- [4] S. Bedrood, Y. Li, J.M. Isas, B.G. Hegde, U. Baxa, I.S. Haworth, R. Langen, Fibril structure of human islet amyloid polypeptide., *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 5235–41. doi:10.1074/jbc.M111.327817.
- [5] A. Hoffmann, L. Caillon, L.S. Salazar Vazquez, P.-A. Spath, L. Carlier, L. Khemtémourian, O. Lequin, Time dependence of NMR observables reveals salient differences in the accumulation of early aggregated species between human islet amyloid polypeptide and amyloid- β , *Phys. Chem. Chem. Phys.* (2018). doi:10.1039/C7CP07516B.
- [6] A. Abedini, A. Plesner, P. Cao, Z. Ridgway, J. Zhang, L.H. Tu, C.T. Middleton, B. Chao, D.J. Sartori, F. Meng, H. Wang, A.G. Wong, M.T. Zanni, C.B. Verchere, D.P. Raleigh, A.M. Schmidt, Time-resolved studies define the nature of toxic IAPP intermediates, providing insight for anti-amyloidosis therapeutics, *Elife.* 5 (2016) e12977. doi:10.7554/eLife.12977.
- [7] C.-H. Chen, T. Yao, Q. Zhang, Y.-M. He, L.-H. Xu, M. Zheng, G.-R. Zhou, Y. Zhang, H.-J. Yang, P. Zhou, Influence of trehalose on human islet amyloid polypeptide fibrillation and aggregation, *RSC Adv.* 6 (2016) 15240–15246. doi:10.1039/C5RA27689F.
- [8] R. Azriel, E. Gazit, Analysis of the minimal amyloid-forming fragment of the islet amyloid polypeptide. An experimental support for the key role of the phenylalanine residue in amyloid formation., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 34156–61. doi:10.1074/jbc.M102883200.
- [9] R. Khurana, C. Coleman, C. Ionescu-Zanetti, S.A. Carter, V. Krishna, R.K. Grover, R. Roy, S. Singh, Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils, *J Struct Biol.* 151 (2005) 229–238. doi:10.1016/j.jsb.2005.06.006.
- [10] E.H. Pilkington, Y. Xing, B. Wang, A. Kakinen, M. Wang, T.P. Davis, F. Ding, P.C. Ke, Effects of Protein Corona on IAPP Amyloid Aggregation, Fibril Remodelling, and Cytotoxicity, *Sci. Rep.* 7 (2017) 2455. doi:10.1038/s41598-017-02597-0.
- [11] M. Sebastiao, N. Quittot, S. Bourgault, Thioflavin T fluorescence to analyse amyloid formation kinetics: Measurement frequency as a factor explaining irreproducibility, *Anal Biochem.* 532 (2017) 83–86. doi:10.1016/j.ab.2017.06.007.
- [12] L.M. Young, P. Cao, D.P. Raleigh, A.E. Ashcroft, S.E. Radford, Ion mobility spectrometry-mass spectrometry defines the oligomeric intermediates in amylin amyloid formation and the mode of action of inhibitors, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 660–670. doi:10.1021/ja406831n.
- [13] J.S. Fortin, M.-O. Benoit-Biancamano, Inhibition of islet amyloid polypeptide aggregation and associated cytotoxicity by nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 94 (2016) 35–48. doi:10.1139/cjpp-2015-0117.
- [14] H. Gong, X. Zhang, B. Cheng, Y. Sun, C. Li, T. Li, L. Zheng, K. Huang, Bisphenol A accelerates toxic amyloid formation of human islet amyloid polypeptide: a possible link between bisphenol A exposure and type 2 diabetes, *PLoS One.* 8 (2013) e54198. doi:10.1371/journal.pone.0054198.

- [15] Y. Bram, A. Frydman-Marom, I. Yanai, S. Gilead, R. Shaltiel-Karyo, N. Amdursky, E. Gazit, Apoptosis induced by islet amyloid polypeptide soluble oligomers is neutralized by diabetes-associated specific antibodies, *Sci. Rep.* 4 (2014). doi:SICI 426710.1038/srep04267.
- [16] I. Riba, P.E. Barran, G.J.S. Cooper, R.D. Unwin, On the structure of the copper-amylin complex, *Int. J. Mass Spectrom.* 391 (2015) 47–53. doi:10.1016/j.ijms.2015.09.001.
- [17] B. Cheng, H. Gong, X. Li, Y. Sun, X. Zhang, H. Chen, X. Liu, L. Zheng, K. Huang, Silibinin inhibits the toxic aggregation of human islet amyloid polypeptide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 419 (2012) 495–499. doi:10.1016/J.BBRC.2012.02.042.
- [18] H.R. Patel, A.S. Pithadia, J.R. Brender, C.A. Fierke, A. Ramamoorthy, In Search of Aggregation Pathways of IAPP and Other Amyloidogenic Proteins: Finding Answers through NMR Spectroscopy, *J Phys Chem Lett.* 5 (2014) 1864–1870. doi:10.1021/jz5001775.
- [19] A. Hoffmann, M.S. Saravanan, O. Lequin, J.A. Killian, L. Khemtémourian, A single mutation on the human amyloid polypeptide modulates fibril growth and affects the mechanism of amyloid-induced membrane damage, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* (2018). doi:10.1016/J.BBAMEM.2018.02.018.
- [20] H. Li, E. Ha, R.P. Donaldson, A.M. Jeremic, A. Vertes, Rapid assessment of human amylin aggregation and its inhibition by copper(II) ions by laser ablation electrospray ionization mass spectrometry with ion mobility separation, *Anal Chem.* 87 (2015) 9829–9837. doi:10.1021/acs.analchem.5b02217.
- [21] L.M. Young, J.C. Saunders, R.A. Mahood, C.H. Revill, R.J. Foster, L.H. Tu, D.P. Raleigh, S.E. Radford, A.E. Ashcroft, Screening and classifying small-molecule inhibitors of amyloid formation using ion mobility spectrometry-mass spectrometry, *Nat Chem.* 7 (2015) 73–81. doi:10.1038/nchem.2129.
- [22] L.M. Young, J.C. Saunders, R.A. Mahood, C.H. Revill, R.J. Foster, A.E. Ashcroft, S.E. Radford, ESI-IMS-MS: A method for rapid analysis of protein aggregation and its inhibition by small molecules, *Methods.* 95 (2016) 62–69. doi:10.1016/j.ymeth.2015.05.017.
- [23] N.F. Dupuis, C. Wu, J.E. Shea, M.T. Bowers, The amyloid formation mechanism in human IAPP: dimers have beta-strand monomer-monomer interfaces, *J Am Chem Soc.* 133 (2011) 7240–7243. doi:10.1021/ja1081537.
- [24] P.J. Marek, V. Patsalo, D.F. Green, D.P. Raleigh, Ionic strength effects on amyloid formation by amylin are a complicated interplay among Debye screening, ion selectivity, and Hofmeister effects, *Biochemistry.* 51 (2012) 8478–8490. doi:10.1021/bi300574r.
- [25] Y. Suzuki, J.R. Brender, K. Hartman, A. Ramamoorthy, E.N. Marsh, Alternative pathways of human islet amyloid polypeptide aggregation distinguished by ¹⁹F nuclear magnetic resonance-detected kinetics of monomer consumption, *Biochemistry.* 51 (2012) 8154–8162. doi:10.1021/bi3012548.
- [26] M.Y. Suvorina, O.M. Selivanova, E.I. Grigorashvili, A.D. Nikulin, V. V. Marchenkov, A.K. Surin, O. V. Galzitskaya, Studies of Polymorphism of Amyloid-β 42 Peptide from Different Suppliers, *J. Alzheimer's Dis.* 47 (2015) 583–593. doi:10.3233/JAD-150147.
- [27] C. Berardet, J. Kaffy, S. Onger, M. Taverna, A capillary electrophoresis method to investigate the oligomerization of the human Islet Amyloid Polypeptide involved in Type 2 Diabetes, *J. Chromatogr. A.* (2018). doi:10.1016/j.chroma.2018.10.006.
- [28] K. Richardson, D. Langridge, K. Giles, Fundamentals of travelling wave ion mobility revisited: I. Smoothly moving waves, *Int. J. Mass Spectrom.* 428 (2018) 71–80. doi:10.1016/j.ijms.2018.03.007.

3. Etude complémentaire - Impact de la présence des liposomes sur la cinétique d'oligomérisation de hIAPP

Après avoir mis en évidence l'importance de l'origine du peptide sur l'oligomérisation de hIAPP, une étude complémentaire a été menée afin de tenter de se rapprocher davantage des conditions physiologiques pour suivre *in vitro* l'oligomérisation de hIAPP. En effet, des travaux ont démontré l'impact des membranes cellulaires sur cette cinétique d'oligomérisation, qu'il est possible de mimer à l'aide de liposomes. Cette étude complémentaire porte donc sur l'influence des liposomes sur la cinétique d'oligomérisation de hIAPP.

3.1. Matériels et méthodes

3.1.1. Matériels

Pour ces études, quatre lots différents de peptide hIAPP synthétiques ont été utilisés. Deux proviennent du fournisseur Bachem (Bubendorf, Suisse), appelé fournisseur A ici. Le troisième provient du fournisseur Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis), appelé fournisseur B. Le quatrième provient d'une plateforme de synthèse peptidique de l'Université de Cergy-Pontoise (Cergy-Pontoise, France), appelé fournisseur C. Pour chaque lot, le peptide sous forme solide est solubilisé dans l'HFIP pur à réception et à une concentration de 1 mM, puis incubé pendant 1h. L'échantillon est ensuite aliquoté par 10 μ L, et l'HFIP est évaporé sous courant d'azote, puis dans une enceinte placée sous vide. Les aliquots sont ensuite stockés à -20°C avant leur utilisation.

3.1.2. Préparation des liposomes

La 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) et le 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (DOPG) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis). La production des liposomes s'est appuyée sur des travaux de 2014 utilisant des liposomes de DOPC/DOPG en quantité équimolaire (Kumar *et al.*, 2014). La synthèse a été réalisée en collaboration avec le Pr Sylviane Lesieur (Equipe 2) de l'Institut Galien Paris-Sud.

Afin de mesurer précisément les masses de phospholipides utilisés pour la préparation des liposomes, celles-ci ont été obtenues après une double pesée des vials, à chaque étape du protocole. Le film mixte de DOPC et DOPG est obtenu après dissolution successive des phospholipides dans le CHCl_3 à 50 mg/mL, puis évaporation sous un flux d'azote à l'aide d'un évaporateur sous flux gazeux. Une fois les films obtenus, ils sont soit congelés à -20°C, soit aliquotés pour une utilisation immédiate. Pour cela, le mélange DOPC/DOPG est repris dans du CHCl_3 puis séparé en cinq aliquots qui sont ensuite évaporés à nouveau. Ils sont ensuite reconstitués dans un tampon phosphate 50 mM / KCl 100 mM pH 7,4 à 20 mg/mL de phospholipide. L'hydratation est complète lorsque l'on obtient un mélange laiteux sans amas en solution ou accroché aux parois du tube. Les liposomes se forment alors naturellement et leur taille est uniformisée par 21 filtrations au travers d'une membrane composée de pores de 100 μ m

à l'aide d'un extrudeur Avantilipids (Alabaster, AL, USA). La taille est ensuite contrôlée par DLS à 0,5 mg/mL (Figure 48) avec un instrument Nano-ZS90 (Malvern instrument, Orsay, France). Lors des analyses par spectrofluorimétrie, les liposomes sont introduits dans le tampon à la concentration de 0,5 mg/mL.

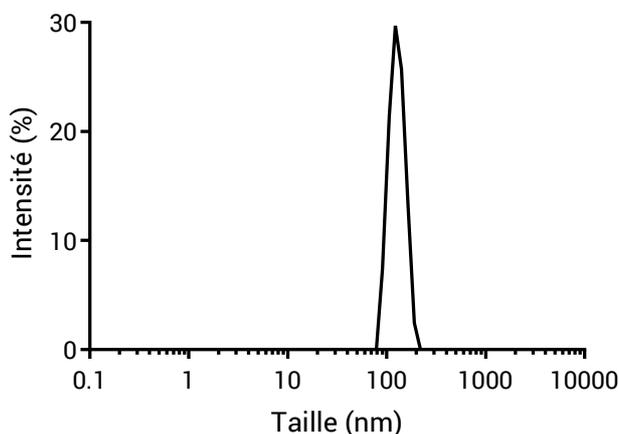


Figure 48 : Profil de DLS obtenu pour les liposomes DOPC/DOPG préparés après 21 passages à travers la membrane d'extrusion de taille 100 nm, à une concentration de 0,5 mg/mL dans le milieu de reprise (phosphate 50 mM KCl 100 mM pH 7,4)

3.2. Résultats

L'article présenté fait ressortir un comportement différent de hIAPP produits par différents fournisseurs vis-à-vis de l'oligomérisation. A l'issue de cette étude, nous avons jugé que le peptide provenant du fournisseur A semblait être le plus adapté pour l'étude de l'oligomérisation de hIAPP. Il présente en effet la pureté la plus élevée, un état d'agrégation faible en début de cinétique ainsi qu'une évolution du profil de CE au cours du temps d'incubation compatible avec un mécanisme d'oligomérisation. En parallèle de cette étude et afin de reproduire plus fidèlement le milieu physiologique, et notamment un milieu contenant des cellules β pancréatiques, nous avons tenté d'introduire les liposomes dans le milieu d'incubation. Les liposomes ont en effet été décrits comme des mimes de membranes cellulaires, et permettent de se rapprocher *in vitro* de conditions physiologiques. La première étape de ce travail a donc été d'étudier l'influence de l'addition des liposomes dans le milieu d'incubation de hIAPP sur la cinétique d'oligomérisation du peptide. Dans une seconde partie, nous avons étudié si l'impact des liposomes sur la cinétique variait selon la provenance du peptide.

Leur production s'est appuyée sur une étude utilisant des liposomes de DOPC/DOPG (Kumar *et al.*, 2014), et leur synthèse a été réalisée en collaboration avec le Pr Sylviane Lesieur de l'Institut Galien Paris-Sud. Tout d'abord, la présence d'une seule distribution de liposomes à 100 nm a été vérifiée par DLS. On attend en effet une seule population selon le protocole décrit dans l'étude présentant la

préparation des liposomes. Ceci permet de s'affranchir des différences en termes d'interactions avec le peptide qui pourraient être dues à la présence de plusieurs tailles de liposomes.

Les liposomes à une concentration de 0,5 mg/mL ont été ajoutés dans le milieu d'incubation, et la cinétique d'oligomérisation de hIAPP a ensuite été suivie par spectrofluorimétrie à la ThT. Les résultats obtenus montrent que la cinétique d'oligomérisation de hIAPP n'est ici pas modifiée en présence de liposomes pour ce lot du fournisseur A. Cette cinétique a été réalisée deux fois de manière indépendante et la tendance observée est identique (Figure 49). Les courbes obtenues montrent que ni la lag phase ni l'intensité de fluorescence au plateau ne sont modifiés de manière significative en présence de liposomes. On remarque néanmoins que les liposomes génèrent un signal lorsqu'ils sont analysés seuls, dont l'intensité est d'environ 4000. Ceci explique le décalage de l'intensité de fluorescence en début de cinétique en présence de liposomes. L'ordre d'introduction du peptide et des liposomes a également été étudié ainsi que leur concentration, sans aboutir à des différences significatives sur l'agrégation en leur présence.

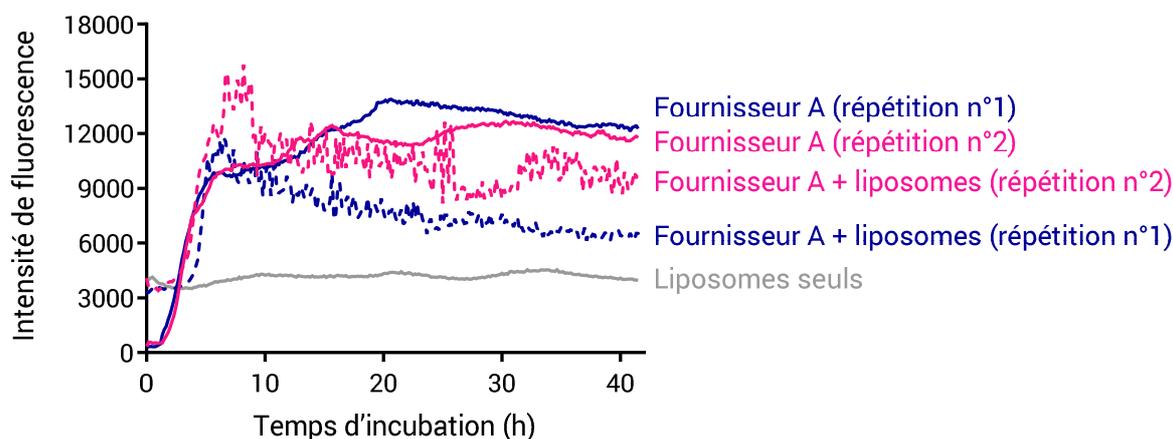


Figure 49 : Comparaison de deux cinétiques d'oligomérisation de hIAPP indépendantes (bleu et rose) suivies par spectrofluorimétrie à la ThT en présence et en absence de liposomes à 0,5 mg/mL (respectivement en pointillés et trait plein). Le signal des liposomes seuls (0,5 mg/mL) est présenté en gris

Les résultats obtenus sont donc contraires à ce qui a été suggéré dans la littérature (Kumar *et al.*, 2014; Kumar & Miranker, 2013). Il semblerait même ici que la cinétique soit ralentie (lag phase de 2h sans liposomes et 5h avec). L'intensité du plateau de fluorescence semble être plus faible, bien que les liposomes seuls présentent une fluorescence résiduelle d'environ 4000. La différence de fluorescence entre le début et la fin de l'incubation en présence de liposomes est donc d'environ 6000, alors qu'elle est de 12000 environ sans les liposomes. Il semblerait donc que la proportion d'espèces adoptant une conformation β soit plus faible en présence de liposomes. Ceci serait cohérent avec le processus d'oligomérisation sur des membranes décrit dans la littérature, favorisant la production d'espèces en hélices α (Chapitre I).

Afin de savoir si les conclusions obtenues ne sont pas liées au lot de peptide utilisé, nous avons reproduit l'étude avec le lot provenant du fournisseur C. Alors que la cinétique d'agrégation observée par spectrofluorimétrie à la ThT est très différente entre ces deux lots de source différente en l'absence de liposomes, la Figure 50 montre que celle-ci devient similaire pour les lots des fournisseurs A et C en présence de liposomes. Les lag phases restent cependant différentes d'un facteur 2 environ entre le fournisseur A et le C en présence de liposomes. Si l'accélération de la cinétique en présence de liposomes n'était pas observée sur le lot du fournisseur A, elle l'est bien pour le lot du fournisseur C (diminution d'un facteur 2 de la lag phase).

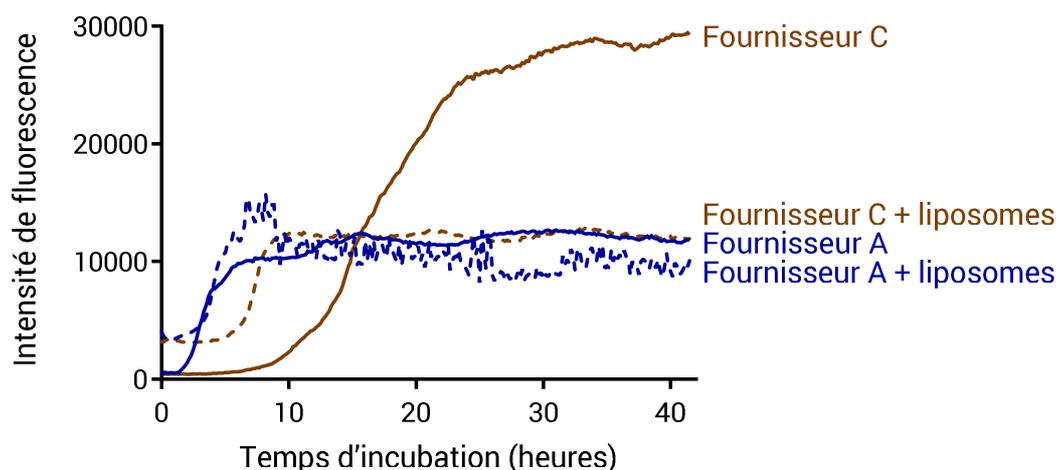


Figure 50 : Comparaison de cinétique d'agrégation de hIAPP (Fournisseur A : bleu et Fournisseur C : marron) par spectrofluorimétrie à la ThT en présence et en absence de liposomes (pointillés et trait plein respectivement)

Toutefois, comme observé pour le lot du fournisseur A, on note une diminution de la différence de fluorescence entre le début et la fin de l'incubation pour le lot du fournisseur C en présence de liposomes (6000 sans liposomes, 30000 avec). La proportion de feuillets β est donc encore plus largement réduite en présence de liposomes avec le lot du fournisseur C par rapport au A.

Une importante variabilité a toutefois été observée lors de la répétition de ces expériences de spectrofluorimétrie à la ThT. Il est donc compliqué de formuler des conclusions définitives quant à l'influence des liposomes. Nous pouvons néanmoins supposer que l'influence des liposomes n'est pas la même en fonction du lot de peptide, et que leur utilisation tend à uniformiser les cinétiques d'agrégation des peptides provenant de différents fournisseurs en termes d'intensité de plateau de fluorescence et de lag phase.

4. Conclusions

Les travaux présentés dans ce chapitre ont démontré l'impact de la source du peptide ainsi que des conditions d'analyses pour l'étude *in vitro* de son oligomérisation, en termes d'espèces impliquées et de leur proportion. Il apparaît clairement qu'un lot déjà agrégé ne permettra pas de suivre les étapes précoces de l'oligomérisation de hIAPP, qui sont essentielles étant donnée la toxicité des espèces impliquées lors de ces étapes. Un lot présentant une pureté trop faible pourra également conduire à l'observation d'espèces supplémentaires, et modifier la vitesse d'agrégation de hIAPP. Les conditions d'analyses sont également très importantes. Nous avons en effet confirmé qu'un milieu à pH physiologique aura tendance à accélérer l'oligomérisation tandis qu'un pH acide la ralentit, facilitant notamment l'observation des espèces présentes en tout début de cinétique. Ces pH acides nous éloignent toutefois des conditions physiologiques recherchées pour mimer la cinétique *in vitro*, mais constitue un point de départ intéressant pour déterminer les différentes espèces impliquées dans le processus d'oligomérisation, et notamment celles formées lors des étapes les plus précoces.

Ce travail a été complété par l'étude de l'influence de liposomes (DOPC/DOPG rapport molaire 1/1) sur l'oligomérisation de hIAPP dans le milieu d'analyse. La tendance générale observée dans la littérature est une accélération de la cinétique, mais ceci n'a pas été retrouvée pour tous les lots testés dans nos travaux. On observe une différence de l'impact de la présence de liposomes selon le lot de peptide analysé. La pureté du lot ou son état plus ou moins monomérique semble donc avoir une incidence sur les interactions que le peptide peut former avec des membranes. Nous pouvons néanmoins affirmer sans ambiguïté que la présence des liposomes tend à uniformiser les cinétiques entre les différents lots, alors qu'elles sont très différentes en leur absence.

Références bibliographiques – Chapitre III

- Akter, R., Cao, P., Noor, H., Ridgway, Z., Tu, L. H., Wang, H., Wong, A. G., Zhang, X., Abedini, A., Schmidt, A. M., & Raleigh, D. P. (2016). Islet Amyloid Polypeptide: Structure, Function, and Pathophysiology. *J Diabetes Res*, 2016, 2798269. <https://doi.org/10.1155/2016/2798269>
- Bartolini, M., Naldi, M., Fiori, J., Valle, F., Biscarini, F., Nicolau, D. V., & Andrisano, V. (2011). Kinetic characterization of amyloid-beta 1–42 aggregation with a multimethodological approach. *Analytical Biochemistry*, 414(2), 215–225. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2011.03.020>
- Brinet, D., Kaffy, J., Oukacine, F., Glumm, S., Onger, S., & Taverna, M. (2014). An improved capillary electrophoresis method for in vitro monitoring of the challenging early steps of Abeta1-42 peptide oligomerization: application to anti-Alzheimer's drug discovery. *Electrophoresis*, 35(23), 3302–3309. <https://doi.org/10.1002/elps.201400271>
- Hebda, J. A., Magzoub, M., & Miranker, A. D. (2014). Small molecule screening in context: Lipid-catalyzed amyloid formation. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 23(10), 1341–1348. <https://doi.org/10.1002/pro.2518>
- Kaffy, J., Brinet, D., Soulier, J. L., Khemtémourian, L., Lequin, O., Taverna, M., Crousse, B., & Onger, S. (2014). Structure-activity relationships of sugar-based peptidomimetics as modulators of amyloid beta-peptide early oligomerization and fibrillization. *Eur J Med Chem*, 86, 752–758. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.09.031>
- Khemtémourian, L., Doménech, E., Doux, J. P. F., Koorengel, M. C., & Killian, J. A. (2011). Low pH Acts as Inhibitor of Membrane Damage Induced by Human Islet Amyloid Polypeptide. *Journal of the American Chemical Society*, 133(39), 15598–15604. <https://doi.org/10.1021/ja205007j>
- Knobloch, J., Suhendro, D. K., Zieleniecki, J. L., Shapter, J. G., & Köper, I. (2015). Membrane–drug interactions studied using model membrane systems. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(6), 714–718. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.03.007>
- Kumar, S., Brown, M. A., Nath, A., & Miranker, A. D. (2014). Folded small molecule manipulation of islet amyloid polypeptide. *Chem Biol*, 21(6), 775–781. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.05.007>
- Kumar, S., & Miranker, A. (2013). A foldamer approach to targeting membrane bound helical states of islet amyloid polypeptide. *Chemical Communications*, 49(42), 4749–4751. <https://doi.org/10.1039/C3CC41452C>
- Lindberg, D. J., Wesén, E., Björkeröth, J., Rocha, S., & Esbjörner, E. K. (2017). Lipid membranes catalyse the fibril formation of the amyloid- β (1–42) peptide through lipid-fibril interactions that reinforce secondary pathways. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1859(10), 1921–1929. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.05.012>
- Skeby, K. K., Andersen, O. J., Pogorelov, T. V., Tajkhorshid, E., & Schiott, B. (2016). Conformational Dynamics of the Human Islet Amyloid Polypeptide in a Membrane Environment: Toward the Aggregation Prone Form. *Biochemistry*, 55(13), 2031–2042. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00507>
- Suvorina, M. Y., Selivanova, O. M., Grigorashvili, E. I., Nikulin, A. D., Marchenkov, V. V., Surin, A. K., & Galzitskaya, O. V. (2015). Studies of Polymorphism of Amyloid- β 42 Peptide from Different Suppliers. *Journal of Alzheimer's Disease*, 47(3), 583–593. <https://doi.org/10.3233/JAD-150147>

Young, L. M., Cao, P., Raleigh, D. P., Ashcroft, A. E., & Radford, S. E. (2014). Ion mobility spectrometry-mass spectrometry defines the oligomeric intermediates in amylin amyloid formation and the mode of action of inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*, *136*(2), 660–670. <https://doi.org/10.1021/ja406831n>

Chapitre IV. Développement d'une méthode de suivi de l'oligomérisation de hIAPP

Après avoir mis en évidence l'importance de la préparation de l'échantillon ainsi que de la provenance du peptide, la seconde étape de ma thèse a été de développer une technique de suivi en temps réel et *in vitro* de l'oligomérisation de hIAPP. Cette technique a pour but ensuite de tester l'activité sur hIAPP de nouveaux composés anti-agrégation synthétisés au sein de l'équipe FLUOPEPIT de BioCIS. L'objectif est ici de développer une méthode répétable et compatible avec un suivi *in vitro* en temps réel, permettant de quantifier les espèces impliquées dans le processus d'oligomérisation. En revanche, étant donné la concentration physiologique de hIAPP de l'ordre du pM (Lee 2012), la sensibilité de la méthode ne sera pas ici un critère déterminant puisque ces concentrations ne seront pas atteintes. Nous travaillerons avec des concentrations compatibles avec les méthodes envisagées, de l'ordre du μM . A l'inverse, la résolution est un critère prédominant, étant donné que l'objectif est de séparer voire de quantifier un maximum d'espèces. D'après la littérature décrite dans le chapitre II, nous attendons notamment des espèces comme le monomère, le dimère, le trimère ainsi que des oligomères de hautes masses moléculaires. L'identification des espèces séparées serait évidemment un plus, et c'est pourquoi nous nous sommes dirigés vers des techniques et des conditions capables d'être couplées à la spectrométrie de masse. En ce sens, deux types de techniques analytiques ont été explorées : la mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse et l'électrophorèse capillaire. Une étude complémentaire a également été menée afin de se rapprocher de la concentration physiologique de hIAPP en marquant le peptide à l'aide d'une sonde fluorescente. Le peptide dérivé a ensuite été analysé par électrophorèse capillaire et spectrofluorimétrie à la ThT.

1. Matériels et méthodes

1.1. Mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse (IMS-MS)

Les manipulations sont réalisées sur un Synapt G2-Sⁱ de Waters équipé d'une source ESI et d'un analyseur Q-ToF possédant une cellule de mobilité, en collaboration avec l'équipe du Pr Van der Rest (LCP Orsay, équipe RISMAS). Le schéma de l'instrument utilisé a été présenté dans la partie 4.4 du chapitre II. Cette source est particulièrement adaptée pour l'ionisation de peptides ou protéines car elle permet l'utilisation de conditions douces, permettant d'ioniser les molécules tout en tentant de conserver leur structure native. Cette technique permet de séparer des peptides selon leur conformation et leur masse. L'analyseur à temps de vol (ToF) est adapté aux peptides du fait de sa cadence d'analyse élevée. De plus il permet d'analyser des molécules de hauts m/z , ce qui est important si l'on souhaite rechercher des oligomères de peptides. Les conditions d'analyse ont été optimisées afin de préserver les oligomères. Les principaux paramètres instrumentaux utilisés sont les suivants :

- Capillary voltage : 2.4 kV
- Sampling cone et source offset voltages : 70 V
- Source temperature : 40 °C / Dessolvation temperature : 50°C
- Cone & dessolvation gas : 0 L/h
- Nebuliser : 5 bar
- Trap & transfer collision energy : 2 et 4 V respectivement (valeurs minimales pour assurer la transmission des ions)

hIAPP (Bachem, Bubendorf, Suisse) a été mis en solution à 100 µM dans un tampon acétate d'ammonium 50 mM pH 3,7, avant d'être dilué à la concentration souhaitée pour l'analyse. L'échantillon est ensuite directement infusé dans la source à l'aide d'un pousse-seringue (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) à un débit de 5 µL/min. L'acquisition des spectres est réalisée à 1 Hz et pendant 5 minutes. Les conditions complètes sont disponibles en annexe III.

1.2. Chromatographie d'exclusion stérique couplée à la détection UV

Les analyses en SEC-UV ont été réalisées sur un instrument HPLC spectraSYSTEM (ThermoFisher Scientific, Rockford, USA) équipé d'un injecteur (AS3000) et d'un détecteur UV (UV1000). La détection est réalisée à 200 nm. Quatre colonnes ont été utilisées pour mettre au point la séparation des espèces de hIAPP formées au cours du temps. Leurs caractéristiques sont présentées ci-dessous, avec la nature de phase stationnaire :

- Tosoh TSKgel G2000SWxl : 7,8 x 300 mm ; taille de particules 5 µm, taille de pores 125 Å (gamme de masse moléculaire : 5000 – 150000 Da). Phase stationnaire à base de silice. Débit : 0.8 mL/min
- Agilent BioSEC 3 : 4,6 x 300 mm ; taille de particules 3 µm, taille de pores 100 Å (gamme de masse moléculaire : 100 – 100000 Da). Phase stationnaire contenant un coating hydrophile propriétaire. Débit : 0.3 mL/min
- Tosoh TSKgel Alpha-2500 : 7,8 x 300 mm ; taille de particules 7 µm, taille de pores 25 Å (gamme de masse moléculaire : 100 – 10000 Da). Phase stationnaire à base de méthacrylate hydrophile. Débit : 1 mL/min
- Tosoh TSKgel G3000SWxl : 7,8 x 300 mm ; taille de particules 5 µm, taille de pores 250 Å (gamme de masse moléculaire : 10000 – 500000 Da). Phase stationnaire à base de silice. Débit : 1 mL/min

Un mélange standard de protéines est utilisé pour tracer la droite de calibration servant à estimer la masse moléculaire des espèces analysées. Le mélange est constitué des protéines suivantes : insuline bovine (5733 Da), aprotinine (6511 Da), α-lactalbumine (14070 Da), β-lactoglobuline (18280 Da), pepsine (35000 Da) et BSA (66000 Da). Toutes sont analysés à 1 mg/mL dans l'eau. Pour certaines colonnes, ce mélange sera réduit à quelques protéines seulement.

1.3. Chromatographie d'exclusion stérique couplée à l'IMS-MS

Les analyses de SEC-IMS-MS ont été réalisées sur un système Acquity (Waters, Manchester, UK) couplé à un spectromètre de masse à mobilité ionique Synapt G2-Sⁱ (Waters, Manchester, UK). Les paramètres de masse sont les mêmes que ceux décrits dans la partie 1.1. La colonne utilisée est une colonne à base de Silice : Tosoh Super SW3000, 1 x 300 mm, 4 µm, 250 Å (gamme de masse moléculaire : 10000 – 500000 Da). Le débit employé est de 0,1 mL/min. 10 µL d'une solution de hIAPP à 10 µM préparée à partir d'une solution mère à 100 µM dans un tampon acétate d'ammonium 50 mM pH 7,4 sont injectés sur la colonne.

1.4. Marquage de hIAPP avec un fluorophore

Une étude a été réalisée afin de tenter de suivre l'oligomérisation de hIAPP par électrophorèse capillaire avec une détection fluorescence. Ainsi nous avons procédé au marquage de hIAPP par le Fluoprobe 488NHS (Interchim, Montluçon, France) en utilisant un protocole déjà publié par notre équipe pour le marquage de Aβ₁₋₄₂ (Verpillot *et al.*, 2011). Le peptide a été incubé dans un tampon borate de sodium 40 mM pH 10,5 contenant le Fluoprobe 488 NHS avec un rapport molaire de 200/1 (Fluoprobe/peptide) à température ambiante pendant deux minutes. Trois filtrations sur une membrane de 3 kDa (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit, Millipore (UK) Limited, Hertfordshire, UK) à 14000 g pendant 4 min permettent ensuite d'éliminer l'excès de fluorophore pour l'analyse. 100 µL d'eau sont ajoutés sur la membrane entre chaque filtration pour améliorer le rinçage. Le peptide marqué est récupéré par 100 µL dans le rétentat puis analysé directement.

2. La mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse (IMS-MS)

2.1. Etude de l'IMS-MS pour le suivi de l'oligomérisation en temps réel

La spectrométrie de masse couplée à la mobilité ionique permet la séparation des ions dans deux dimensions : selon leur rapport m/z mesuré ici à partir du temps de vol ainsi que leur mobilité ionique, déterminée à partir de leurs temps de drift mesurés dans la cellule de mobilité, qui est elle-même dépendante de leur section efficace de collision (CCS). Ce paramètre caractérise le repliement d'une molécule dans l'espace, et donc sa conformation. Cette approche a été envisagée afin de suivre l'oligomérisation de hIAPP en temps réel, et éventuellement les différents conformères qui peuvent se former pour chaque oligomère. L'IMS-MS a déjà été employée pour le screening de molécules inhibant l'oligomérisation de hIAPP (Young *et al.*, 2015, 2016; Young *et al.*, 2014; Young *et al.*, 2017) mais pas pour le suivi de l'oligomérisation. L'objectif ici est donc de suivre l'apparition et/ou la disparition des espèces impliquées dans la cascade amyloïde. Pour cela, le développement de la méthode s'est basée sur des paramètres déjà mis au point par l'équipe du Pr Van der Rest (LCP) pour l'étude de complexes non-covalents formés par la PrP dont la masse est de 23 kDa (Van der Rest *et al.*, 2017). Etant donné que la masse de hIAPP n'est seulement de 3,9 kDa, ces paramètres instrumentaux ont été optimisés pour l'observation de petits complexes non-covalents. Plus particulièrement, les paramètres de source

ont été optimisés, ainsi que ceux concernant la mobilité ionique pour se placer dans des conditions les plus douces possibles afin de favoriser le maintien des complexes non-covalents. Ainsi, la tension de capillaire est abaissée de 4,5 à 2,5 kV et les tensions de « cone » et de « source offset » sont diminuées de 150 à 40 et 50V respectivement. La température de source est portée à 60°C tandis que celle de désolvatation est réduite de 150 °C à 50 °C. Les énergies de « trap » et de « transfer » sont désactivées et le débit de gaz de désolvatation est réduit à 350 L/h. Les paramètres de mobilités sont également adaptés à la taille des complexes. L'objectif étant d'étudier la formation des différents oligomères au cours du temps, des acquisitions ont été réalisées à différents temps d'incubation (de 0 à 24h). Nous avons ensuite comparé les intensités des signaux obtenus pour chaque oligomère afin de détecter une éventuelle évolution de ces signaux (en intensité ou présence) au cours du temps. La Figure 51 montre les spectres de masses obtenus directement après la mise en solution de hIAPP dans un tampon acétate d'ammonium 50 mM pH 3,7 et après 24h d'incubation. On observe des espèces allant du monomère à l'hexamère pour les deux temps d'incubation, avec des sensibilités différentes. Du monomère au trimère, la sensibilité est bonne et on peut facilement distinguer les massifs isotopiques (rapport signal / bruit supérieur à 20). A l'inverse, du tétramère à l'hexamère, l'observation est plus compliquée avec un rapport signal / bruit inférieur à 6. Concernant le monomère, quatre états de charge différents sont observés (de +2 à +5) tandis que seulement deux sont observés pour le dimère (4+ et 5+). Pour tous les autres oligomères, seul un état de charge est observé pour chacun d'eux. L'étude de leur évolution au cours du temps a donc été réalisée sur le seul état de charge observable pour chaque oligomère.

Les deux spectres montrent de légères différences entre les deux temps d'incubation. Le rapport des intensités du monomère⁴⁺ / monomère³⁺ est de 0,4 directement après incubation, tandis qu'il augmente jusqu'à 2 après 24h. Il semblerait donc qu'après 24h, l'état de charge du monomère de hIAPP augmente, probablement en raison des conditions d'incubations acides (pH 3,7) qui favoriseraient la production d'espèces plus chargées. Parmi les deux états de charge de dimère, on observe d'ailleurs que la forme 5+ est plus intense que la forme 4+. Les mobilités associées aux différentes espèces ne sont en revanche pas affectées. Par exemple, pour le monomère⁴⁺, aucun nouveau pic n'apparaît après 24h d'incubation, signe qu'aucune nouvelle conformation de monomère⁴⁺ n'apparaît au cours du temps (Figure 52). L'augmentation d'intensité des deux mobilités observées à 7,17 et 9,48 ms est due à l'augmentation du signal du monomère⁴⁺ dans le spectre de masse. L'intensité du monomère⁵⁺ (m/z 781,2) est multipliée d'un facteur 2, confirmant que les conditions acides favorisent les états de charge élevés. Le signal du dimère⁵⁺ (m/z 1561,2) est également deux fois plus intense après 24h d'incubation. Le pic à m/z 683 n'est pas expliqué et ne semble pas provenir de hIAPP étant donné son profil isotopique. Son intensité est néanmoins divisée par 4 après 24h d'incubation.

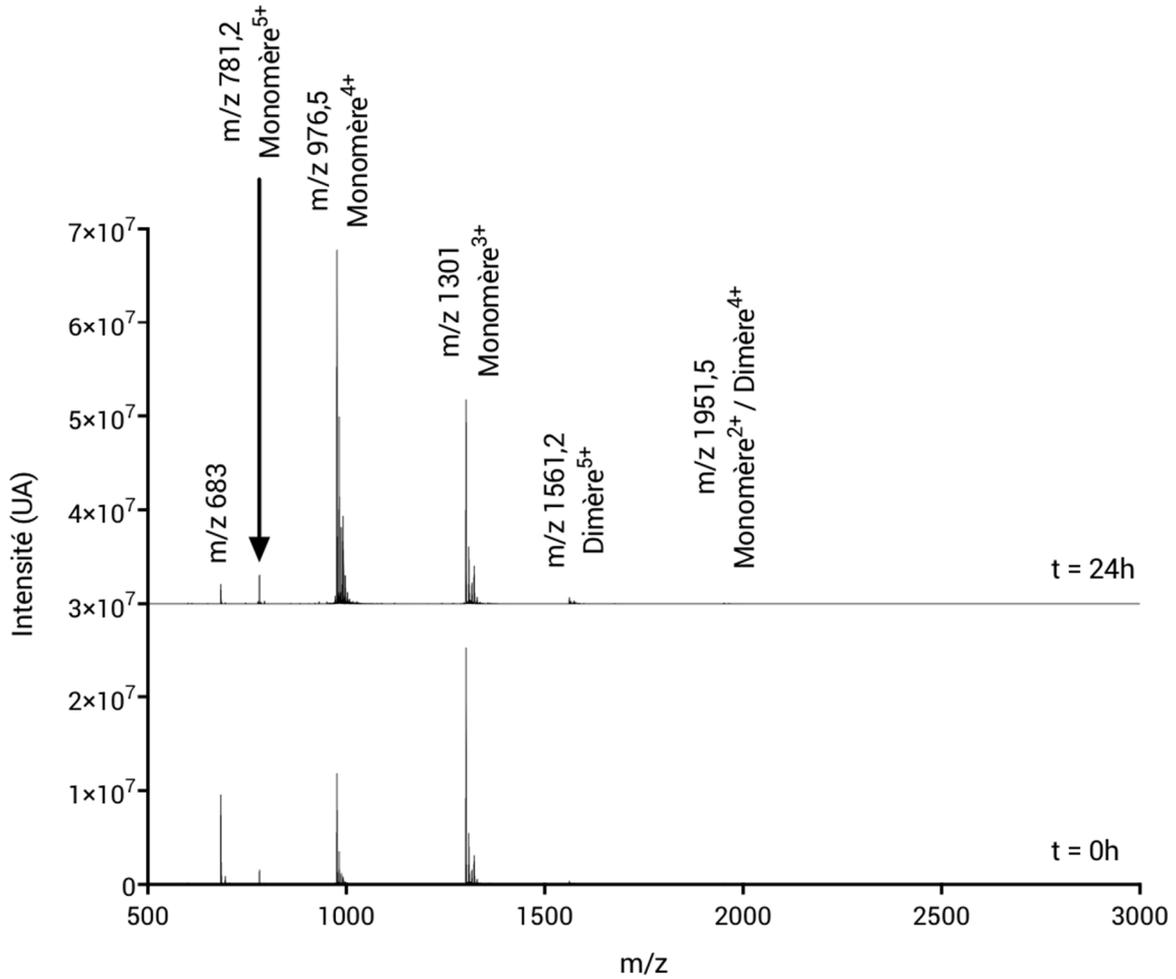


Figure 51 : Spectres de masses de hIAPP obtenus sur un spectromètre de masse à mobilité ionique directement après la mise en solution et après 24h d'incubation dans un tampon acétate d'ammonium 50mM pH 3,7

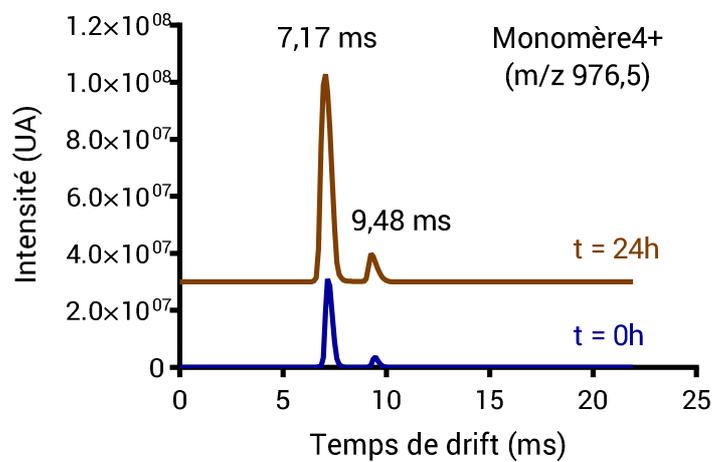


Figure 52 : Mobilogrammes associés au monomère⁴⁺ (m/z 976,5) directement après la mise en solution ($t = 0\text{h}$) et après 24h d'incubation, montrant deux mobilités à 7,17 ms et 9,48 ms

L'exemple du signal caractéristique du tétramère est présenté en Figure 3, avec une intensité très faible et peu d'évolution entre la mise en solution et 24h d'incubation (Figure 53).

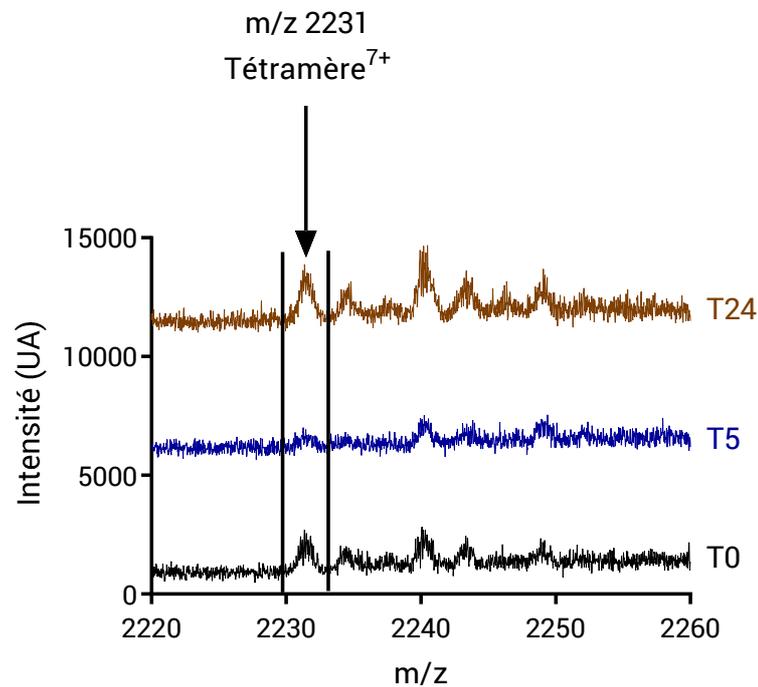


Figure 53 : Évolution du signal caractéristique du tétramère⁷⁺ de hIAPP par IMS-MS entre 0 et 24h d'incubation, montrant une disparition puis une réapparition du signal

Les résultats obtenus sont assez surprenants puisque l'on n'observe pas d'évolution concordante avec une oligomérisation de hIAPP en termes d'intensité de signaux en fonction des différents temps d'incubation pour aucune des espèces oligomériques détectées. Ces résultats sont contradictoires avec l'hypothèse de la cascade amyloïde qui voudrait que la proportion d'oligomères au cours du temps augmente au détriment du monomère, ainsi qu'avec les résultats obtenus en électrophorèse capillaire (partie 2) et en spectrofluorimétrie à la ThT. Or nous n'observons ici que la conversion des formes de monomères entre elles vers les états de charge les plus élevés, sans évolution notable des proportions d'oligomères. Ce résultat est cohérent avec les résultats de l'équipe du Pr Radford (Young *et al.*, 2014). Ces travaux montrent la présence du monomère à l'hexamère lorsque le peptide est analysé directement après la mise en solution, avec des conformations différentes pour chacune des espèces. Cependant, les expériences qu'ils ont menées après 5h d'incubation montrent une disparition des oligomères, lorsque le peptide est incubé dans un milieu de force ionique supérieure à 100 mM. A l'inverse, lorsque la force ionique est plus faible (20 mM), les auteurs n'observent pas de différences entre 0 et 5h d'incubation. Nous observons bien une diminution du signal du tétramère⁷⁺ avec notre milieu d'incubation de force ionique 50 mM (Figure 53), mais il ré-augmente à 24h. Ceci pourrait être dû à l'apparition et la disparition non-linéaires des différentes espèces. Cette hypothèse reste peu probable d'après les résultats de spectrofluorimétrie à la ThT et d'électrophorèse capillaire présentés

en partie Chapitre III.2 qui suggèrent que le système évolue principalement dans le sens de la formation d'espèces de hautes masses moléculaires. Cependant, dans certains cas à haute concentration, le peptide peut être au départ sous une forme agrégée off-pathway qui se redissocie ensuite en monomère (Wälti *et al.*, 2015).

Une hypothèse plus probable ressort donc pour expliquer ces résultats : celle de la dissociation des complexes non-covalents (impliquant des interactions de faible énergie ou peu nombreuses) lors de l'analyse. En effet, la spectrométrie de masse met en jeu des énergies importantes au niveau de la source (plusieurs kV) ainsi que dans l'analyseur qui peuvent entraîner la dissociation des espèces les moins stables. La présence de gaz et de vides partiels peut également être à l'origine de ce phénomène. Si ces interactions sont suffisamment nombreuses et les énergies de liaison associées suffisamment élevées, il est possible d'observer ces complexes intacts. Il semblerait néanmoins que ce ne soit pas le cas pour hIAPP. En l'occurrence, si les plus gros oligomères sont détruits au profit des plus petits, il paraît alors logique de n'observer aucune évolution puisque tout le système reviendrait à son état initial après dissociation. En l'état, cette technique avec les paramètres employés pour ce travail semble donc limitée pour l'étude de l'oligomérisation de hIAPP. Elle demeure néanmoins capable d'identifier les différentes espèces et leurs conformations associées. La Figure 52 présente d'ailleurs deux conformations, dont les temps de drift associés sont de 7,17 et 9,48 ms, pour le monomère⁴⁺ (m/z 976,5). Afin de pouvoir exploiter cette technique, il sera nécessaire de s'affranchir de ce phénomène de dissociation, ou à défaut de pouvoir le quantifier pour en tenir compte. Pour cela, deux options peuvent alors être envisagées :

- Coupler la spectrométrie de masse à une méthode séparative comme la SEC afin d'estimer la fraction dissociée lors de l'analyse d'un oligomère donné.
- Utiliser la spectrométrie de masse en tandem sans énergie de collision afin de calculer un taux de conversion en utilisant les intensités des ions fils produits à partir d'un précurseur donné pour un oligomère.

2.2. Etude du phénomène de dissociation des oligomères lors de l'IMS-MS

Nous avons mené deux études afin d'étudier le phénomène de dissociation des complexes de hIAPP et pouvoir éventuellement le quantifier. Dans un premier temps nous avons couplé l'IMS-MS à une séparation par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) en amont. L'idée était de séparer les espèces selon leur masse moléculaire par SEC-UV à partir d'une droite de calibration. Le couplage SEC-IMS-MS a ensuite été réalisé afin de comparer les masses moléculaires obtenues en SEC-UV avec celles des spectres de masses associés à chaque fraction de SEC. Si d'autres masses que celles obtenues par la droite de calibration sont observées en SEC-IMS-MS (notamment des masses plus faibles que celles attendues), cela signifie qu'un phénomène de dissociation se produit dans le spectromètre. Dans un second temps nous avons envisagé la spectrométrie de masse en tandem, sans énergie de collision. L'objectif était cette fois d'identifier ou non la présence du phénomène de dissociation, tout en s'affranchissant d'une méthode séparative en amont de l'IMS-MS. Le principe est ici de sélectionner un ion précurseur caractéristique d'un oligomère donné dans le quadropole, puis

d'observer sur le spectre de masse les ions fils éventuellement produits par simple dissociation dans la cellule de mobilité ionique.

2.2.1. Couplage de l'IMS-MS à la chromatographie d'exclusion stérique

2.2.1.1. Développement de la méthode de séparation par SEC-UV

Avant de réaliser le couplage à l'IMS-MS, nous avons au préalable développé la méthode de séparation des monomères/oligomères de HIAPP par SEC couplée à l'UV, le but étant de déterminer la présence ou non d'un phénomène de dissociation au moyen d'une technique rapide, utilisant des phases mobiles douces contenant peu de solvant organique, quantitative et compatible avec un suivi en temps réel. Cette technique a été employée à deux reprises pour séparer des oligomères de HIAPP, bien que ce ne soit pas pour un suivi de cinétique en temps réel (Bram *et al.*, 2014; Gong *et al.*, 2013), et a permis d'observer selon les auteurs du monomère au trimère, ainsi qu'une fraction contenant des espèces de HIAPP associées de 90 kDa.

Pour ce travail, quatre colonnes et diverses phases mobiles ont été testées, notamment l'acétate d'ammonium à des concentrations comprises entre 100 et 500 mM et des pH compris entre 3,7 et 7,4. Seuls ces pH acides ont été envisagés afin de ralentir la cinétique d'oligomérisation du peptide. Bien que plus intéressant d'un point de vue analytique (répulsion entre le peptide et la phase stationnaire), les pH basiques n'ont pas été testés afin de ne pas risquer d'oligomériser HIAPP trop rapidement. Des interactions électrostatiques (avec les phases stationnaires à base de silice) et polaires ou hydrogènes (avec les phases stationnaires à base de polymère hydrophile) sont donc attendues. En ce sens, l'ajout de NaCl (entre 100 et 500 mM), d'acétonitrile (entre 0 et 60%) et d'isopropanol (entre 3 et 20%) afin de limiter les phénomènes d'adsorption a également été étudié. Le principe de fonctionnement de la chromatographie d'exclusion stérique est détaillé en Annexe II.

Afin de sélectionner les conditions d'analyses optimales, deux critères principaux ont été identifiés. Le premier est la capacité de la colonne à séparer les différents oligomères formés, ce qui implique une résolution suffisante entre deux espèces séparées de 3,9 kDa (masse du monomère). Le second est l'identification des espèces grâce à l'estimation de leur masse. Ceci implique de pouvoir utiliser une droite de calibrage permettant de déterminer la masse des espèces contenues sous chaque pic, et donc de s'assurer de l'absence d'affinité entre le soluté et la phase stationnaire. C'est pourquoi quatre colonnes ont été testées. Ces colonnes ont été choisies principalement selon leurs domaines de fractionnement adaptés à la séparation d'espèces comprises globalement entre 1 et 100 kDa pour les plus grosses. Ceci implique des tailles de pores adaptées d'environ 100 Å. Une colonne avec un domaine plus étendu (10 – 500 kDa) et une avec un domaine restreint (0,1 – 10 kDa) ont également été testées afin d'identifier de potentiels gros complexes et de résoudre sans ambiguïté monomère et dimère. La phase mobile a été optimisée pour chacune d'entre elles afin de limiter le phénomène d'adsorption, très présent avec ce peptide.

• Avec la colonne Tosoh TSKgel G2000SWxl présentant selon le fournisseur un domaine de fractionnement compris entre 5 et 150 kDa, le pH de la phase mobile ainsi que la quantité de NaCl ont été optimisés. Une première phase mobile acétate d'ammonium 20 mM pH 3,7 contenant 500 mM de NaCl a été envisagée. Cependant, même les protéines standards comme la β -lactoglobuline ou la thyroglobuline ne sont pas observables dans ces conditions. Nous avons donc augmenté la force ionique de l'acétate d'ammonium de 20 à 100 mM, et le pH a été ajusté à 5,7. Un seul pic de hIAPP est observé, dont la masse est erronée puisque l'élution a lieu après celle de la phénylalanine qui indique le volume de perméation totale. D'après la droite de calibrage présentée en Figure 5, la masse estimée de hIAPP est de 1172 Da, qui ne correspond à la masse du monomère de hIAPP qui est de 3903 Da.

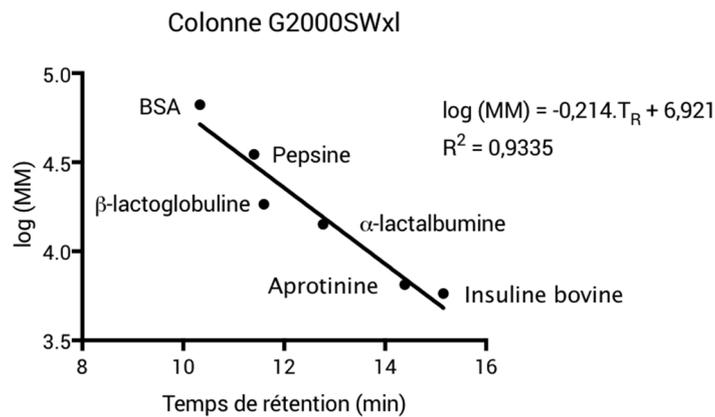


Figure 54 : Droite de calibrage obtenue sur la colonne Tosoh TSKgel G2000SWxl (Phase mobile : acétate d'ammonium 100 mM pH 7,4 + 500 mM NaCl)

La concentration de NaCl a ensuite été diminuée à 100 mM, sans que des différences significatives ne soient observées. Malgré le problème de rétention trop élevée pour hIAPP, nous avons tenté d'analyser des solutions de hIAPP incubé dans le tampon acétate d'ammonium 50 mM pH 3,7 pendant 24h ainsi qu'un blanc (tampon d'incubation seul). Les chromatogrammes présentés à la Figure 55 montrent que hIAPP est toujours élué après le pic des sels, à un temps de rétention très proche (17,7 min).

D'après l'analyse du blanc, il s'avère que seul le dernier pic est caractéristique de hIAPP. Le même résultat est observé à différents temps d'incubation, de 4 à plus de 40h d'incubation. Ceci prouve que cette colonne n'est pas capable de séparer les différentes formes oligomériques de hIAPP. Il semblerait donc que des phénomènes d'interactions entre la phase stationnaire et hIAPP se produisent malgré les optimisations réalisées sur la phase mobile et provoquent une rétention excessive au détriment de la résolution entre les espèces, faussant l'estimation de sa masse par la droite de calibration. Il se pourrait également que des phénomènes de dissociation se produisent pour les oligomères, notamment en raison de la dilution lors de l'analyse, ce qui expliquerait la présence d'un seul pic pour hIAPP.

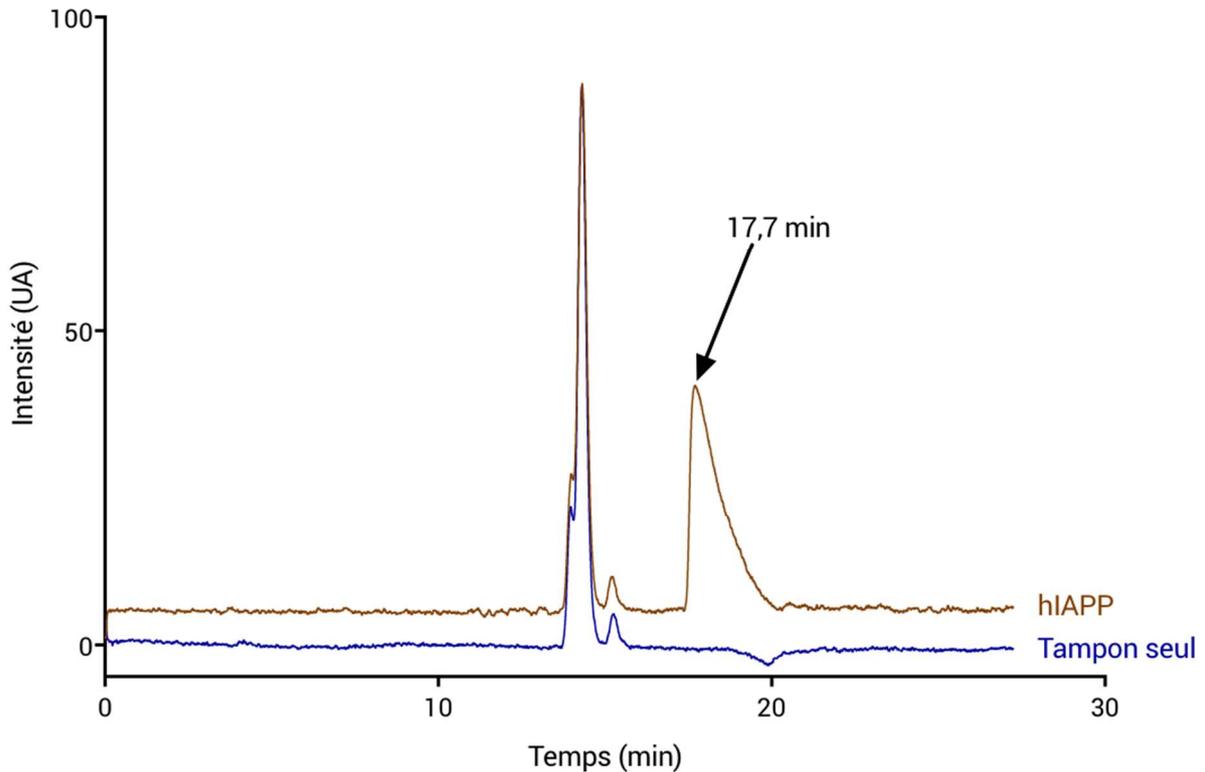


Figure 55 : Analyse d'un échantillon de hIAPP par SEC sur une colonne Tosoh TSKgel G2000SWxl montrant un pic caractéristique du peptide à 17,70 min (Phase mobile : acétate d'ammonium 100 mM pH 5,7 + 100 mM NaCl) ainsi que du tampon seul

- Avec la colonne Agilent BioSEC 3 présentant un domaine de fractionnement linéaire d'après le fournisseur de 0,1 à 100 kDa, la phase mobile a été choisie après optimisation du pH. Un solvant organique a été ajouté pour minimiser les interactions hydrophobes entre le peptide et la phase stationnaire. Concernant le pH, nous avons comparé la même phase mobile contenant 5% d'acétonitrile à pH 3,7 et 7,4. Il s'avère qu'à pH 3,7, le signal de hIAPP est très faible et l'aprotinine (plus petit marqueur de masse moléculaire, masse moléculaire = 6511 Da) est éluée en 8,94 min tandis que la thyroglobuline (plus haut marqueur, masse moléculaire = 305000 Da) est éluée en 6,82 min. Ceci ne laisse qu'un domaine de fractionnement linéaire très réduit pour éluer toutes les espèces de hIAPP. De plus, la phénylalanine (marqueur du volume de perméation totale, 165 Da) est éluée en 12,43 min alors que le pic de hIAPP, peu intense, est élué à 11,18 min. hIAPP est donc tout juste dans la fenêtre de séparation mais très proche du volume de perméation totale. A pH 7,4 dans les mêmes conditions, l'aprotinine est éluée à 10,3 min, la BSA à 6,87 min et hIAPP à 15,56 min. La fenêtre de détection est donc allongée, malgré l'adsorption toujours présente (la phénylalanine est éluée en 12,40 min). Le pH 7,4 a donc été conservé, étant donné qu'il offre une fenêtre de séparation plus importante qu'à pH 3,7.

La quantité d'acétonitrile a ensuite été optimisée afin de limiter le phénomène d'adsorption. 20 et 40% d'acétonitrile ont été testés dans la phase mobile. A 20% d'acétonitrile, le pic de hIAPP est élué en 11,94 min mais est perturbé par les pics du tampon, ce qui empêche sa quantification. Avec 40% d'acétonitrile dans la phase mobile, le temps de rétention de hIAPP diminue à 9,16 min et est séparé

de celui des sels (Figure 56). Cependant, la droite de calibration ($\log(MM) = -0,601 \cdot T_R + 8,832$; $r^2 = 0,96$) tracée avec trois protéines standards (aprotinine, α -lactalbumine, BSA) montre que l'adsorption est toujours présente, étant donné que la masse de hIAPP estimée à partir de la droite est de 2122 Da.

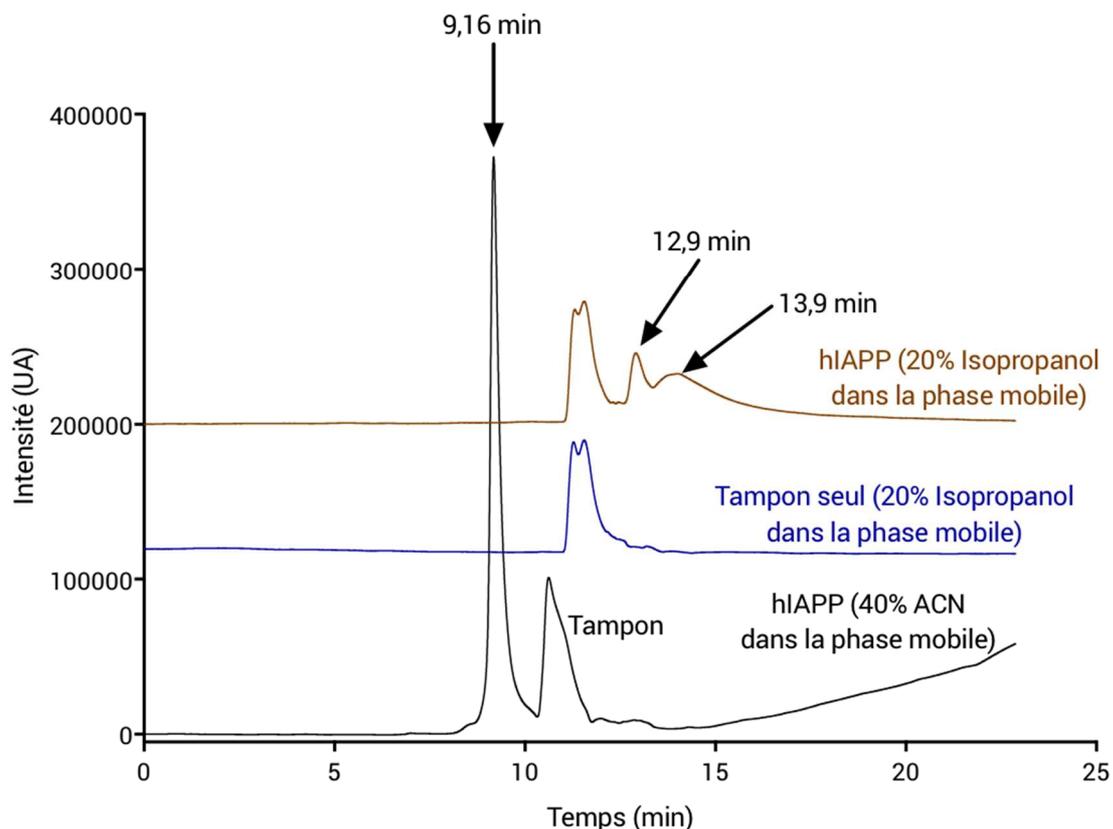


Figure 56 : Analyse d'un échantillon de hIAPP incubé 4h dans un tampon acétate d'ammonium 50 mM pH 3,7 et de tampon d'incubation seul par SEC sur une colonne Agilent BioSEC 3 (Phase mobile : acétate d'ammonium 100 mM + 20% isopropanol, détection UV à 200 nm), ainsi que d'un échantillon de hIAPP frais avec 40% d'acétonitrile dans la phase mobile

L'isopropanol a également été envisagé comme modificateur de phase mobile. Les conditions ont été : acétate d'ammonium 100 mM pH 7,4 / isopropanol (80/20 v/v) à un débit de 0,3 mL/min. On observe alors trois pics, le premier pic dédoublé provient des sels de l'échantillon. On sépare donc deux formes différentes de hIAPP dans ces conditions aux temps de rétention 12,9 et 13,9 min (Figure 56) alors qu'un seul pic est observé avec l'acétonitrile, quel que soit son pourcentage dans la phase mobile.

Cette phase stationnaire possède un revêtement polymérique hydrophile permettant de diminuer théoriquement l'adsorption par interaction électrostatique par rapport à de la silice vierge. Or il s'avère que même avec la présence du modificateur organique dans la phase mobile, l'adsorption reste très importante. Ceci suggère donc d'autres interactions de type polaires ou hydrogènes sont présentes, sans que la présence d'un modificateur organique ne permette de s'en affranchir. Notons que l'on n'observe pas ce phénomène avec des protéines standards (aprotinine, α -lactalbumine et BSA) servant

à la calibration. Le peptide a donc la caractéristique de faire de fortes interactions avec la phase stationnaire.

- Les deux autres colonnes testées (Tosoh TSK α -2500 et G3000SWxl) ne permettent pas d'obtenir une meilleure séparation que celles obtenues avec les deux colonnes précédentes. En présence de 20% d'acétonitrile, la colonne α -2500 conduit à un pic large interféré par le pic de sel, résultat similaire à celui obtenu avec la colonne BioSEC 3. La colonne G3000SWxl quant à elle conduit également à un seul pic en présence de 20% d'acétonitrile dans la phase mobile, toutefois plus fin qu'avec la colonne α -2500. Les droites de calibrage n'ont pas été tracées pour ces deux colonnes.

Il semblerait donc que les phases stationnaires à base de silice ne soient pas efficaces pour séparer les différentes espèces formées lors de l'oligomérisation de hIAPP, aux pH de travail acides qui ont été choisis. Le résultat aurait probablement été différent avec un pH de phase mobile basique, mais celui-ci aurait favorisé une oligomérisation rapide du peptide, qui nous aurait potentiellement privé des étapes précoces de la cinétique. La colonne la plus intéressante est la BioSEC 3, qui permet de résoudre deux pics associés à hIAPP en présence d'isopropanol. La colonne α -2500 qui présente des résultats comparables à la BioSEC 3 n'a cependant pas été retenue du fait de son faible diamètre de pores, permettant d'espérer seulement la séparation du monomère et du dimère.

2.2.1.2. Couplage de la SEC à l'IMS-MS

La mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse permet de détecter la présence d'au moins 6 espèces, du monomère à l'hexamère, d'après les résultats présentés partie 2.1 et la littérature (Young *et al.*, 2014). Or la séparation obtenue sur les colonnes BioSEC et G2000SWxl ne conduit au mieux qu'à deux pics dont il est impossible de déterminer la masse exacte, plusieurs espèces pouvant être contenues sous chaque pic. Il est donc compliqué d'utiliser la SEC afin d'estimer la dissociation engendrée par l'IMS-MS. Nous avons cependant tenté de coupler la colonne BioSEC avec l'IMS-MS en utilisant les conditions de phase mobile optimale et des conditions natives douces pour la spectrométrie de masse afin de déterminer les espèces présentes sous chaque pic. La tension de capillaire est légèrement diminuée à 2,4 kV tandis que les tensions de « cone » et de « source offset » sont remontées à 70 V. La température de source est abaissée à 40°C, et on élimine le gaz de désolvatation (He). Le rapport signal / bruit pour les gros oligomères est alors de 20 et celui des petits de 50.

Une colonne a donc été testée, la Tosoh TSKgel Super SW3000, dont la phase stationnaire est à base de silice, mais avec un diamètre interne plus faible la rendant plus adaptée au couplage avec le spectromètre de masse (diamètre interne de 1 mm). Les mêmes conditions de séparation que celles utilisées avec la colonne BioSEC 3 sont utilisées, avec toutefois le pourcentage d'isopropanol abaissé à 10%. Le même échantillon que celui utilisé lors des expériences de masse en infusion directe a été injecté sur la colonne Super SW3000.

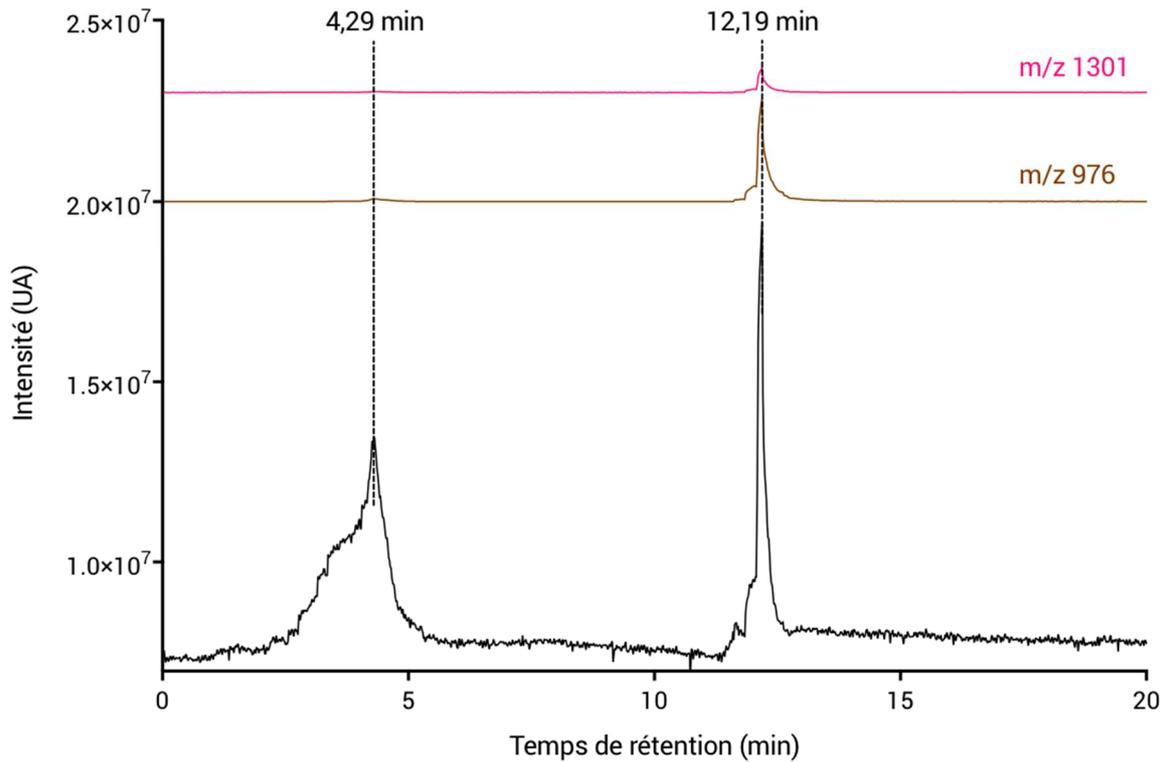


Figure 57 : Analyse d'un échantillon de hIAPP par SEC sur une colonne Tosoh SuperSW3000 montrant deux pics caractéristiques de hIAPP à 4,29 et 12,19 min composés du monomère³⁺ (m/z 1301) et monomère⁴⁺ (m/z 976) (Phase mobile ; acétate d'ammonium 100 mM pH 7,4 + 10% isopropanol)

On obtient alors deux pics (Figure 57) lorsque le peptide incubé 20h dans un tampon acétate d'ammonium 50 mM pH 3,7 est injecté. Le premier (4,29 min) est très large et contient majoritairement des espèces contenues dans le blanc. On distingue cependant quelques signaux appartenant à hIAPP monomère à des intensités vingt fois plus faibles que ceux présents dans le deuxième pic (12,19 min) (Figure 58a). Ainsi ce deuxième pic qui présente des épaulements contient bien le peptide, mais seules des formes monomériques (3+, m/z 1301 et 4+, m/z 976) sont détectables (Figure 58b). Il semblerait donc que si des espèces liées à hIAPP de plus haut poids moléculaire que le monomère sont présentes en solution, les conditions ne permettent pas de les maintenir sous forme oligomérique. Ces résultats montrent que la SEC ne permet pas, avec les conditions testées, de séparer les différents oligomères de hIAPP et que le couplage ne nous permet pas de déduire avec fiabilité leur masse.

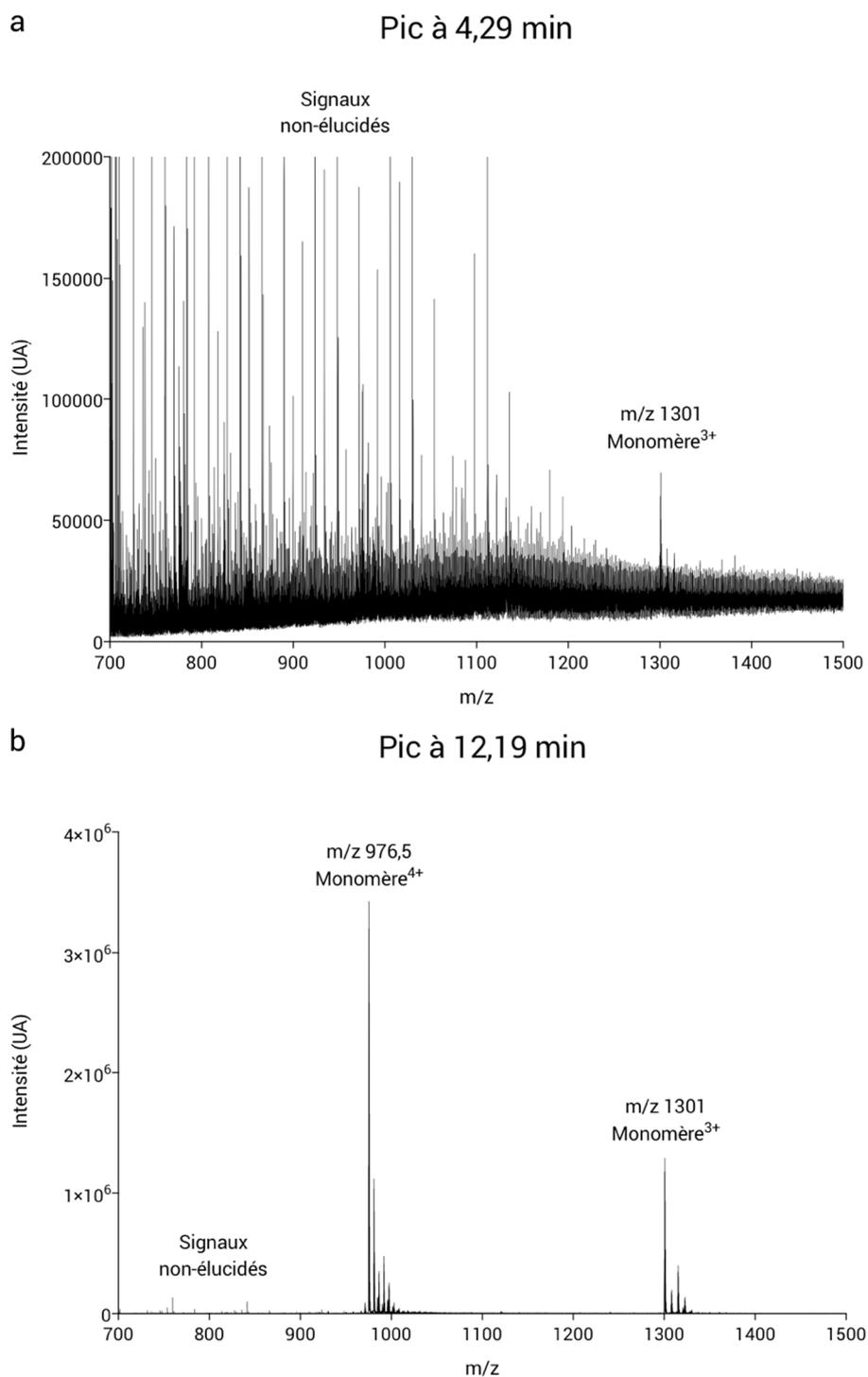


Figure 58 : Spectres de masses des deux pics observés en SEC sur la colonne Super SW3000 (phase mobile : acétate d'ammonium 100 mM pH 7,4 + 10% isopropanol à 4,29 (a) et 12,19 min (b). Seul le monomère est présent dans les deux pics, bien qu'il soit à la limite de détection dans le pic à 4,29 min

La SEC couplée à la spectrométrie de masse n'a donc pas permis d'observer les oligomères, bien que l'on suspecte leur dissociation dans le spectromètre, étant donné les deux pics présents en SEC contenant des espèces reliées à HIAPP. Il a donc été nécessaire de trouver une méthode alternative

afin de valider ou non cette hypothèse. Pour cela, la solution envisagée a été d'utiliser seulement le spectromètre de masse couplé à la mobilité ionique, sans méthode séparative en amont. Le spectromètre est alors utilisé en tandem, bien qu'aucune énergie de collision ne soit appliquée, afin de sélectionner un précurseur d'un oligomère donné dans le quadropole et de regarder si d'autres espèces sont présentes dans le spectre de masse. Si oui, cela signifie qu'un phénomène de dissociation a eu lieu entre le quadropole et le ToF.

2.2.2. Mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse en tandem sans énergie de collision

2.2.2.1. Méthodologie employée

Face à la difficulté d'observer les oligomères par le mode IMS-MS simple ou couplé avec la chromatographie d'exclusion stérique, nous avons développé une nouvelle stratégie dont l'objectif est de mettre en évidence le phénomène de dissociation, permettant ainsi d'estimer le taux de dissociation des oligomères lors de leur analyse par spectrométrie de masse couplée à la mobilité ionique. Cette méthode repose sur l'utilisation du mode MS-MS sans appliquer une énergie de collision supérieure à celle nécessaire pour transporter les ions dans la « trap » ou le « transfer » entourant la cellule de mobilité. Les paramètres d'analyse utilisés ici sont exactement les mêmes que ceux utilisés pour le mode IMS-MS simple. La seule différence est la sélection d'un précurseur d'un oligomère donné à partir du quadripôle. Si aucune dissociation (ou autre phénomène de transformation) n'intervient, le spectre de masse obtenu par le ToF résultant de cet ion sélectionné ne sera composé uniquement de son signal. Dans le cas contraire, des signaux d'autres oligomères, d'ordres inférieurs dans le cas de la dissociation, seront présents dans le spectre. Ces signaux seront caractéristiques d'ions fils formés entre le quadripôle et le ToF et résulteront d'un processus de dissociation. Ceci nous permettra de calculer les intensités de toutes les espèces retrouvées dans le spectre de masse (précurseur d'un oligomère et ions résultants de la dissociation), et donc d'en déduire un taux de dissociation pour le précurseur choisi, calculé selon l'équation 2. Le taux de dissociation caractérise la proportion d'espèces formées par dissociation par rapport à la quantité de précurseur.

$$\text{Taux de dissociation (\%)} = \frac{\text{Intensité des ions fils}}{\text{Intensité des ions fils} + \text{Intensité du précurseur}} \quad [\text{Equation 2}]$$

Cette méthode a été appliquée à un précurseur par oligomère donné (soit un rapport m/z sélectionné par oligomère). La solution de HIAPP à 50 µM fraîchement préparée est injectée directement dans la source en infusion directe. Les scans sont réalisés à la fréquence de 1 Hz et accumulés pendant 3 minutes. La manipulation est réalisée en triplicat pour chaque ion précurseur sélectionné pour chaque oligomère. Les rapports m/z sélectionnés comme précurseur pour chaque oligomère sont résumés dans le Tableau V. Ces rapports ont été choisis car ils sont les plus intenses respectivement pour chaque oligomère lors de l'analyse d'une solution fraîche de HIAPP.

Tableau V : liste des m/z sélectionnés pour caractériser la dissociation de chaque oligomère

Espèces	Etats de charge z	Rapport m/z sélectionné
Monomère	3+	1301
Dimère	5+	1561,2
Trimère	7+	1672,7
Tétramère	7+	2230,3
Pentamère	9+	2168,3
Hexamère	10+	2341,8

2.2.2.2. Analyses par IMS-MS en tandem sans énergie de collision

L'étude a donc été réalisée sur l'ensemble des précurseurs décrits dans le Tableau V. Pour chaque cas, des espèces supplémentaires au précurseur ont été observées, signe que la dissociation est présente pour tous ces oligomères. Dans le cas du rapport m/z 1672.7, caractéristique du trimère⁷⁺, on obtient le spectre de masse présenté Figure 59 (les coefficients de variations indiqués ont été calculés à partir des intensités obtenues sur trois répliqués). Notons que des adduits sodium Na⁺ sont présents pour tous les m/z observés, ainsi ils ont également été pris en compte pour le calcul des intensités. La Figure 59 montre dans un premier temps que les coefficients de variation sont bons, prouvant que l'expérience est répétable. Dans un second temps, on observe une proportion d'ions fils non-négligeables, signe d'une dissociation importante en appliquant une énergie de collision minimale dans la « trap » et le « transfer », nécessaire pour assurer la transmission des ions jusqu'au ToF.

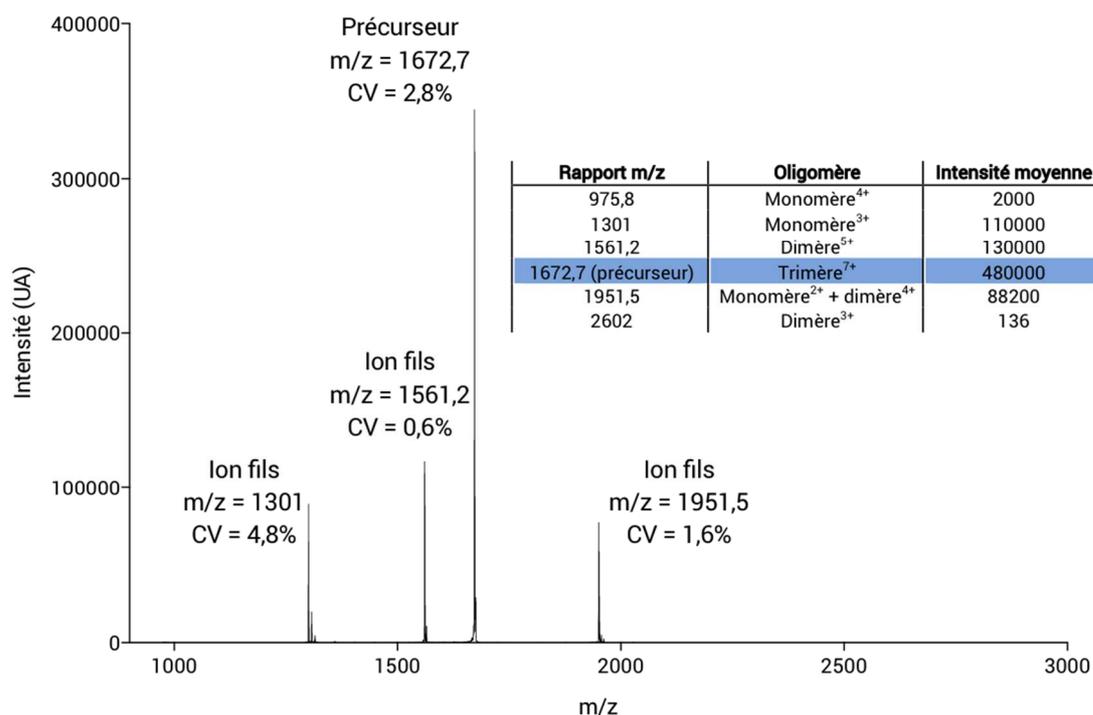


Figure 59 : Spectre MSMS obtenu avec la sélection de l'ion précurseur 1672,7 correspondant au trimère⁷⁺ sans application d'énergie de collision dans la « trap » ou le « transfer » montrant l'apparition de pics d'ions fils

On retrouve également deux autres m/z, dans des proportions minimales (975,8 et 2602) et qui ne sont apparents qu'en zoomant cette figure. Le résumé des signaux retrouvés correspondant au précurseur et aux ions fils produits lors de la dissociation est présenté en encart dans la Figure 59.

Le rapport des intensités des ions fils sur l'intensité de tous les signaux du spectre permet d'estimer un taux de dissociation de 41% pour ce précurseur du trimère. La même opération a été réalisée sur l'ion précurseur le plus intense de chaque autre oligomère. Les taux de conversion obtenus sont présentés dans le Tableau VI :

Tableau VI : Taux de dissociation obtenus par MS-MS sans énergie de collision pour chaque précurseur caractéristique d'un oligomère

Rapport m/z précurseur	Oligomère	Taux de conversion
1301	Monomère	0,41%
1561,2	Dimère	21%
1672,7	Trimère	41%
2230,3	Tétramère	37%
2168,3	Pentamère	41%
2341,8	Hexamère	46%

Les résultats obtenus montrent que globalement la dissociation augmente à partir du tétramère. Le pourcentage obtenu pour le monomère ne correspond majoritairement qu'à une évolution de l'état de charge, de l'état 3+ à l'état 4+. Ce résultat est un bon contrôle et prouve qu'il n'y a pas de fragmentation du monomère dans ces conditions. Il est également intéressant de noter qu'en passant du dimère au trimère, le taux de dissociation double, signe que la stabilité des oligomères décroît rapidement lorsqu'ils deviennent trop importants.

Ces résultats expliquent la difficulté que l'on rencontre à observer les plus gros oligomères, étant donné qu'environ deux molécules sur cinq sont détruites dans la partie Q-ToF / IMS du spectromètre de masse pour les oligomères à partir du trimère, et ce malgré l'absence d'énergie de collision dans la « trap » et le « transfer ». Or les énergies mises en jeu en amont, au niveau de la source sont plus importantes que celles que l'on trouve entre le premier quadripôle et le ToF. On peut donc supposer que le taux de dissociation dans la source est encore plus élevé que celui que l'on observe ici, et que la perte de sensibilité est donc considérable pour les oligomères.

Cependant, cette méthode présente tout de même quatre inconvénients :

- Le premier concerne le rendement d'ionisation des espèces concernées. Si ce rendement n'est pas équivalent pour toutes les espèces, le taux de conversion calculé ne rendra pas compte de la réalité. Par exemple, si le précurseur a un rendement d'ionisation deux fois plus élevé que les autres espèces retrouvées dans le spectre de masse, et que son taux de conversion calculé est de 10%, le taux de conversion réel serait en fait de 20%, à cause de la sous-estimation de l'intensité des ions fils.
- Le second est lié à la sélection du précurseur dans le premier quadripôle. On perd de fait toute l'information entre la source et ce quadripôle. Cette technique ne permet donc de caractériser l'état des oligomères seulement sur une partie du spectromètre de masse.
- Le troisième concerne le nombre de signaux caractéristiques de chaque oligomère. En effet, en ne considérant qu'un seul précurseur par oligomère, on ne peut pas réellement parler de taux de conversion de l'oligomère mais seulement de celui de l'ion précurseur choisi. Afin d'avoir une vision plus générale pour chaque oligomère, il serait nécessaire de réaliser l'expérience pour chaque ion observé pour chaque oligomère.
- Le dernier problème concerne la concentration de peptide utilisée. Il a été montré qu'au-delà de 20 μM en peptide, des phénomènes d'association non-spécifiques pouvaient apparaître. Dans notre cas, il se pourrait que certains oligomères ne soient pas réellement présents dans la solution de hIAPP mais qu'ils soient plutôt formés dans la source au moment de la désolvatation. Or on ne peut considérer ces espèces comme « naturelles ». Cette étude a donc aussi été réalisée à 10 μM , mais certains signaux sont devenus beaucoup trop faibles pour les quantifier.

Cette étude a été répétée sur un échantillon de hIAPP après 24h d'incubation et dans les mêmes conditions. Cependant, nous pouvons comparer uniquement les taux de dissociation, étant donné que la technique employée ici n'est pas quantitative en absolu. Il est donc impossible de comparer les intensités brutes des précurseurs entre le T0 et le T24. Pour cela, il serait nécessaire d'introduire un standard interne comme rIAPP n'interfère pas avec hIAPP et de concentration connue afin de

pouvoir corriger son intensité, et donc celles des signaux de hIAPP. Les taux de dissociation à 0 et 24h d'incubation sont résumés dans le Tableau VII. On observe que pour le monomère, le taux de dissociation après 24h d'incubation est identique à celui directement après incubation. Le même résultat est observé pour le dimère. Le taux de dissociation est légèrement plus important après 24h d'incubation pour le trimère. En revanche, à partir du tétramère, le taux de dissociation est plus faible après 24h d'incubation.

Tableau VII : Évolution du taux de dissociation des différents précurseurs de chaque oligomère à 0 et 24h d'incubation

Oligomère	m/z précurseur	Taux de dissociation à t=0h (%)	Taux de dissociation à t=24h (%)	Delta dissociation (%)
Monomère	1301	0,41	0,23	0,18
Dimère	1561,2	21,13	21,44	-0,31
Trimère	1672,7	40,72	47,16	-6,44
Tétramère	2230,3	36,58	17,08	19,5
Pentamère	2168,3	40,76	37,57	3,18
Hexamère	2341,8	45,57	30,04	15,53

Cette variation du taux de dissociation entre 0 et 24h d'incubation peut s'expliquer de plusieurs manières :

- La proportion d'espèces dissociées formées serait identique entre 0 et 24h d'incubation, mais l'intensité du signal de l'ion précurseur sélectionné serait plus importante après 24h d'incubation. Ceci expliquerait le taux de dissociation plus faible observé.
- L'ampleur de la dissociation serait dépendante de la quantité de précurseur. Elle serait alors d'autant plus faible que la concentration en oligomères est importante. Cette hypothèse, assez contre-intuitive, pourrait être vérifiée en augmentant la concentration du peptide infusé.
- Le phénomène de dissociation ne serait pas reproductible et les molécules se dissocieraient de manière aléatoire. Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait répéter ces expériences à 0 et 24h d'incubation.

Les résultats obtenus montrent que lors de l'analyse de hIAPP par IMS-MS, la dissociation des espèces se produit dès le dimère, dans des proportions atteignant plus de 40% pour les plus gros oligomères. Il apparaît donc impossible d'utiliser cette technique afin de suivre la cinétique d'oligomérisation du peptide.

Cette étude de spectrométrie de masse en tandem a également été réalisée en appliquant une énergie de collision croissant afin de comparer la stabilité des oligomères entre eux. Les résultats ont permis de déterminer si les oligomères ne sont composés respectivement que d'une forme, peu stable, qui se dissocie en partie sans énergie de collision, ou si pour chaque oligomère, plusieurs formes cohabitent : par exemple une forme peu stable qui se dissocie sans énergie de collision et une forme plus stable

qui nécessiterait une certaine énergie pour être dissociée. Sur l'instrument utilisé, l'énergie de collision peut être appliquée dans deux cellules (« trap » et « transfer », situées respectivement avant et après la cellule de mobilité). Étant donné que l'on souhaite avoir des données de mobilité sur les ions produits, on applique l'énergie dans la « trap ». Trois valeurs d'énergies de collision différentes pour chacun des précurseurs ont été testées : 10, 20 et 40V. hIAPP est ici fraîchement incubé à 50 μ M. Pour chaque ion précurseur, les résultats sont présentés dans la Figure 60, dans laquelle le pourcentage d'ion précurseur survivant est présenté en fonction de l'énergie de collision appliquée dans la « trap ». Le pourcentage de survivant est calculé selon l'équation 3.

$$\% \text{ de survivant} = 100 - \text{taux de dissociation} (\%) \quad [\text{Equation 3}]$$

La Figure 60 montre que l'ion caractéristique du monomère³⁺ n'est pas fragmenté avec une énergie de collision jusqu'à 40V puisque le signal du précurseur est conservé à 100%. A l'inverse, pour les espèces du dimère au pentamère, le pourcentage d'ion précurseur survivant reste constant jusqu'à 10V, puis décroît jusqu'à disparaître totalement avec l'application d'une énergie de collision de 40V. Dans le cas d'ion précurseur de l'hexamère, on observe une diminution linéaire jusqu'à 40V. On conserve toutefois environ 20% de ce précurseur, même avec l'application d'une énergie de 40V. Ceci tendrait à suggérer que l'hexamère serait le plus stable de tous les oligomères observés dans cette étude. Ce résultat corrobore une observation faite sur le peptide A β ₁₋₄₂, pour lequel il a été proposé un mécanisme d'oligomérisation passant par des intermédiaires hexamériques cycliques (Brorsson *et al.*, 2010).

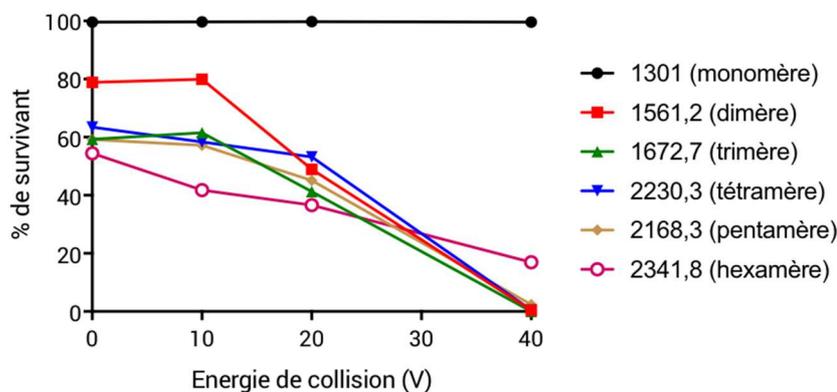


Figure 60 : Évolution du pourcentage de chacun des six précurseurs survivant en fonction de l'énergie de collision appliquée dans la « trap »

Dans le cas où une seule forme serait présente, on pourrait alors s'attendre à une diminution rapide et linéaire de ces pourcentages même avec une faible énergie de collision. Or entre 0 et 10V, l'énergie de collision n'influe pas ou très peu sur le pourcentage d'ion précurseur survivant sélectionné pour chaque oligomère jusqu'au pentamère. En revanche, au-delà de 10V, le taux de dissociation diminue considérablement jusqu'à atteindre 100% à 40V. Les résultats expérimentaux montrent donc que la diminution du pourcentage de survivant ne se poursuit qu'après un certain seuil d'énergie compris entre 10 et 20V. Ce palier observé entre 0 et 10V suggère que plusieurs formes de chaque ion précurseur

cohabitent, de stabilités différentes. Une première forme se dissocierait rapidement sans énergie de collision, tandis qu'une autre nécessiterait l'application d'une énergie comprise entre 10 et 20V. En effet, les pourcentages de dissociation sont déjà importants sans énergie de collision. Cependant, l'examen des mobilogrammes associés à chaque ion précurseur sans énergie de collision et sous 20 V ne montrent aucune différence en temps de drift, suggérant alors que les mêmes formes sont présentes. L'exemple de l'ion précurseur du dimère 5^+ (m/z 1561,2) est présenté Figure 61. Si différentes formes de stabilités différentes existent, celle-ci ne seraient donc pas différenciables par la mobilité ionique.

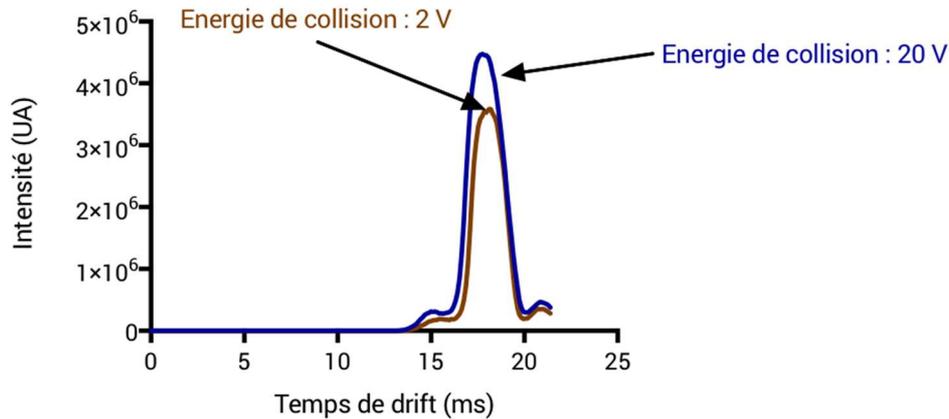


Figure 61 : Comparaison des mobilogrammes du m/z 1562,2 associé au dimère avec des énergies de collision de 2 et 20 V dans la trap

2.3. Conclusion

D'après ces résultats, il apparaît que la mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse n'est pas adaptée pour suivre la cinétique d'oligomérisation de hIAPP, en raison du phénomène de dissociation se produisant pour les oligomères dans l'instrument. En revanche, elle présente la capacité de quantifier le pourcentage de dissociation d'un ion précurseur associé à un oligomère de hIAPP donné lorsqu'elle est utilisée en tandem. La chromatographie d'exclusion stérique couplée à l'IMS-MS quant à elle n'a pas permis d'étudier ce phénomène de dissociation, en raison du manque de résolution entre les différents oligomères et d'un phénomène d'adsorption important sur la phase stationnaire. Une troisième méthode reposant sur électrophorèse capillaire a donc été explorée afin de suivre l'oligomérisation de hIAPP. Ce suivi de la cinétique d'oligomérisation de hIAPP, réalisé par CE-UV, n'a jusqu'alors jamais été réalisé. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un coating polymérique cationique, le polybrène, ayant pour but de diminuer les interactions entre la silice et le peptide. Les analyses sur un capillaire de silice vierge ont en effet révélé une adsorption importante du peptide sur la silice, conduisant à des pics larges et des analyses peu répétables. Toujours dans le but de ralentir la cinétique d'oligomérisation, le peptide est incubé et analysé dans un tampon acétate d'ammonium 50 mM pH 3,7. Afin d'identifier les différents pics séparés par cette méthode, plusieurs méthodes d'identification ont été utilisées comme les filtrations par centrifugation et la CE-MS. Les résultats obtenus sont présentés dans l'article dans la partie Chapitre III.2 de ce chapitre

3. Article 2 : "A capillary zone electrophoresis method to investigate the oligomerization of the human Islet Amyloid Polypeptide involved in Type 2 diabetes"

A capillary zone electrophoresis method to investigate the oligomerization of the human Islet Amyloid Polypeptide involved in Type 2 Diabetes

Corentin Berardet ^{a,b}, Julia Kaffy ^b, Sandrine Onger ^b, Myriam Taverna ^{a,*}

^a Institut Galien Paris Sud, UMR 8612, Proteins and Nanotechnologies in Analytical Science (PNAS), CNRS, Univ. Paris-Sud, Univ. Paris-Saclay, 5 Rue Jean Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France

^b BioCIS, UMR 8076, Fluorinated Molecules and Medicinal Chemistry, CNRS, Univ. Paris-Sud, Univ. Paris-Saclay, 5 Rue Jean Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France

*Corresponding author (M. Taverna)

E-mail address: myriam.taverna@u-psud.fr

Postal address: 5 Rue Jean-Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France

Phone number: +33 1 46 83 54 62

Abstract

Type 2 diabetes is characterized by the aggregation of human Islet Amyloid Polypeptide (hIAPP) from monomer to large and insoluble fibrils. According to several recent studies, small soluble oligomers are now considered as potential toxic species. No monitoring tool has been reported to mimic *in vitro* the oligomerization process of hIAPP over time, although this would allow selecting candidate compounds that slow down or stop this pathological process. Considering the poor stability of those species and the necessity to monitor in real time, a compatible with the monitoring of hIAPP oligomerization CE method coupled to UV detection was developed. Three groups of hIAPP oligomers/monomers formed during this process could be separated. A polybrene coating was used to avoid adsorption of hIAPP onto capillary walls. Peaks identification was performed using a combination of CE-MS, filtrations and SDS-PAGE. They revealed that one peak is composed of monomer with a very small amount of dimer and trimer, whereas the two others are composed of bigger species higher than 100 kDa. We demonstrated that this real time oligomerization process started from the very initial step, with hIAPP principally as a monomer, until the formation of very big oligomers. This method was shown to be repeatable with RSDs on electrophoretic mobilities and relative peak areas less than 1.6 and 5.8% respectively for the monomer peak. Its application to study the anti-aggregation properties of resveratrol showed that this compound saved more than 30% of the monomeric hIAPP form whereas it almost disappeared without. The method opens new perspectives for the screening of potential drugs for type 2 diabetes.

Keywords: Type 2 diabetes, islet amyloid polypeptide, capillary zone electrophoresis, CE-MS, amyloid oligomerization, inhibitor

1. Introduction

Type 2 diabetes (T2D) is a major public health issue, affecting more than 400 million people in the world [1–3]. Visible T2D symptoms are well known, like thirst or recurring infections. Those are consecutive to high glycemia which leads ultimately to dramatic cardiovascular issues. Risk factors of the pathology are well known like physical inactivity or genetics. However, only few insights are currently available about the etiology of this disease. An insulin resistance conjugated with β -cells dysfunction have been demonstrated [3]. It has also been reported that a peptide, the human Islet Amyloid Polypeptide (hIAPP) is involved in the physiopathology through its oligomerization [4–7]. Under specific conditions, hIAPP tends to oligomerize, starting with the formation of small oligomers (dimers, trimers...) and leading to high molecular weight fibrils. Those fibrils are found in amyloid plaques, present in the pancreas of 90% of patients affected by T2D [8,9]. However, a new hypothesis has recently emerged and tends to reconsider the toxicity of the species formed during the oligomerization [10,11]. Indeed, studies indicate that early and small oligomers formed could be more toxic than fibrils for the pancreas precluding thereby the normal insulin secretion. Moreover, no curative treatment is available for T2D. Indeed, insulin, glucagon-like peptide (GLP-1) receptor agonists or sodium glucose cotransporter (SGLT2) inhibitors are only chronic and non-etiological treatments [12–14]. New therapeutic strategies are thus highly desirable. The understanding of hIAPP aggregation and the possibility to mimic *in vitro* by analytical methods this oligomerization process, focusing on small soluble oligomers, could be a good starting point to design new drug candidates for T2D. However, this analytical development is very challenging considering it must reproduce *in vitro* an *in vivo* process occurring in the pancreas. The method should be non-destructive as much as possible and preserve the species formed while using near to physiological conditions [15,16].

hIAPP fibrils have already been studied by thioflavin-T (ThT) spectroscopy and transmission electron microscopy (TEM) [17,18], whereas very few data have been reported on soluble oligomers. hIAPP oligomers are considered as metastable, which makes them unstable, particularly in harsh conditions required for analytical techniques like high voltages or denaturing agents. Bram and coworkers developed in 2012 a method to produce stable oligomers and could analyze them by several analytical techniques, especially size exclusion chromatography (SEC). Four different species were separated: monomer, dimer, trimer and one fraction containing species over 90 kDa [19]. No other work has reported to date the separation by SEC of hIAPP oligomers formed naturally *in vitro*. Ion Mobility Spectroscopy coupled to Mass Spectrometry (IMS-MS) has also been proposed to either monitor species formed over time or to test new candidates able to inhibit hIAPP oligomerization. In most cases, IMS-MS revealed the presence of monomers to hexamers as early as the first minutes of hIAPP incubation [20–23], whereas other studies reported up to tetramer [24–26] or trimer [27] only at these stages. The *in vitro* oligomerization process should start from an initial

point containing exclusively monomeric form to have access to the very early stages of this pathological process. This technique providing a new separation dimension, although very sensitive is still not suitable for the monitoring of the amyloid cascade from its very initial stage. Thioflavin-T fluorescence spectroscopy, widely used for fibrils analysis, is also able to monitor the aggregation over time. This technique is robust, easy to use, but target only β -sheets rich species which correspond to hIAPP high MW oligomers [28,29] which are formed at a very late stage of the cascade. Although Thioflavin-T spectroscopy is now used to screen anti-amyloid compounds [30–32], not being a separation technique cannot provide insights on individual species involved in the oligomerization and even less on the small oligomers formed. Another spectroscopic technique, light scattering diffusion has been tested to get insights on hIAPP oligomerization. Transitions in species size were observed overtime using higher peptide concentrations (micromolar level) than physiological ones for sensitivity reasons. So, this method can hardly be employed to mimic *in vivo* concentrations. Moreover the presence of large species (> 100 nm) at all incubation times were reported [33]. This is due to an intrinsic characteristic of the instrument leading to the underestimation of the small species, but also requiring high experimental concentrations.

Regarding the cited techniques, none of them really meet the criteria to be employed as an *in vitro* monitoring of hIAPP amyloid cascade starting from the monomeric form of hIAPP and focusing on the early formed species. Capillary electrophoresis (CE) allows to work close to physiological conditions, without denaturing agents and provides fast and efficient separations. A β ₁₋₄₂, an amyloid peptide involved in Alzheimer's disease, has been analyzed with success by this technique. The method was able to perform the separation of early and late formed species [34–36]. However, electrokinetic techniques (gel electrophoresis and CE) have not yet been explored for hIAPP peptide. In this study, we propose a capillary electrophoresis method allowing for the first time the separation of early species formed during the amyloid cascade of hIAPP and the *in vitro* real time monitoring of this oligomerization process. To limit peptide adsorption onto the capillary and achieve a robust and repeatable method, different coating strategies based on cationic polymers like polyethyleneimine (PEI) and polybrene (PB) were tested. The identification of the different separated species was performed using a combination of SDS-PAGE, ThT fluorescence spectroscopy, filtration methods and CE-mass spectrometry. The method relevance was tested by evaluating resveratrol, a well-known molecule reported to inhibit the aggregation of hIAPP and other amyloid proteins like A β ₁₋₄₂ peptide involved in Alzheimer disease [37,38].

1. Materials and methods

1.1 Chemicals

hIAPP (TFA salt) was purchased from Bachem (Bubendorf, Switzerland). Sodium hydroxide (1M) was obtained from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). SDS-PAGE gels were prepared in-house. Coomassie Brilliant Blue R-250 staining solution was purchased from Biorad (Hercules, CA, USA). Ammonium acetate (>98%), acetic acid (100%), hexafluoroisopropanol (HFIP, >99.8%), DMSO (99.5%),

polybrene (>94%), dextran 200,000 g/mol, tricine (>99%), sodium dodecyl sulfate (SDS, 99%), thioflavin T (>65%), Tris/HCl (>99%) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Glycine (99%) and NaCl (100%) were obtained from Euromedex (Souffelweyersheim, France). Molecular weight markers (1.7-40 kDa) were purchased from ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). Acetonitrile (> 99.9%) and isopropanol (99.6%) were purchased from VWR (Fontenay-sous-bois, France).

1.2 Samples preparation

The commercial hIAPP was dissolved upon reception in pure HFIP at 1 mM and incubated for 1 hour at room temperature, followed by an aliquoting and an immediate evaporation under nitrogen flow, then under vacuum and storage at -20°C. Just before each kinetics, the dried peptide was reconstituted in 50 mM ammonium acetate buffer pH 3.7 at 100 µM. The same sample preparation was used for CE and SDS-PAGE experiments. For Thioflavin T spectroscopy experiments, the same pretreatment with HFIP was applied, in that case however, the dried peptide was reconstituted in 100 % DMSO at 0.2 mM before the experiment.

1.3 Thioflavin T spectroscopy

ThT spectroscopy experiments were carried out with a microplate reader Fluostar Optima (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) equipped with 440/485 excitation/emission filters. 96-wells plates were used. Buffer was composed of 10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 µM ThT and was adjusted to pH 7.4. Each well was filled with 194 µL of buffer, 5 µL of hIAPP (5 µM final concentration) and 1 µL of inhibitor stock solution (concentration of 10 mM for ratio 10/1 compared to hIAPP). For control experiments (without inhibitor), inhibitor stock solution was replaced by pure DMSO. Kinetics points were acquired every 10 min for 42 hours.

1.4 Capillary electrophoresis

1.4.1 CE-UV

CE-UV experiments were carried out with a MDQ Instrument (SCIEX, Framingham, MA, USA) equipped with a UV detector. Detection was performed at 200 nm. Bare fused silica capillaries (50 µm id x 365 µm od) were purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). Silica capillaries were coated with a 0.2% (w/v) polybrene solution. Briefly, solid polybrene was dissolved in water under heating at 50°C. Bare fused silica capillary was preconditioned with MeOH, 1M NaOH, 0.1M NaOH and with H₂O for in-between rinsing. All flushings were done at 20 psi for 15 min. The capillary was then coated with the 0.2% polybrene solution for 15 min at 20 psi. The coated capillary was then flushed with the background electrolyte (BGE) at 20 psi for 45 min and equilibrated under -25 kV for 2 hours. Polybrene-modified capillaries were 60 cm total length (49.8 cm to the detector). The BGE was a 50 mM ammonium acetate buffer, pH 3.7. The separation was carried out under -25 kV at 25°C. The sample was injected from the inlet by hydrodynamic injection at 0.8 psi for 10 s. After each run, the capillary was rinsed for 5 min with 1 M NaOH, 5 min with water, recoated for 10

min with 0.2% polybrene (w/v), and finally equilibrated with the running buffer for 5 min at 20 psi. For the experiment in presence of resveratrol, 1 μ L of a 100 mM stock solution in DMSO was added to the peptide solution, ending with a 1/10 (hIAPP/resveratrol) molar ratio.

1.4.2 CE-MS

CE-MS experiments were performed with the CE 7100 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) hyphenated to a qTOF mass spectrometer 6540 (Agilent) equipped with a JetStream source. Acquisition was performed in positive mode. Same capillaries as for CE-UV experiments were used, with a triple layer coating composed of polybrene 10% - dextran 3% - polybrene 10% (w/v). This coating method has been previously reported as a stable one for CE-MS experiments [39]. Sheath liquid composition and fragmentor voltages were also optimized to maximize the signal intensities while preserving non-covalent complexes. The selected sheath liquid was composed of 90/10 H₂O/MeOH with 0.1% of acetic acid. The background electrolyte was 50 mM ammonium acetate pH 3.7. Separation was carried out under -25 kV at 25°C with a forward pressure of 1.45 psi. MS parameters were the following: capillary voltage was set to 2.4 kV, fragmentor and skimmer at 300 and 70 V respectively. Source temperature was 70°C with a sheath liquid flow rate at 10 μ L/min.

1.5 Filtration experiments

For filtration experiments, Nanosep devices were used with different membrane cut off (3, 10, 30 and 100 kDa). The following protocol was used for each membrane: preconditioning of the membrane with 500 μ L of BGE and centrifugation for 5 min at 14,000g (filtrate was eliminated), filling of the membrane with 100 μ L of sample and centrifugation for 5 min at 14,000g under room temperature, addition of 200 μ L of BGE and centrifugation for 5 min at 14,000g for rinsing. Retentates were recovered in 100 μ L of BGE and filtrates were directly taken off from the bottom vial. Both were analyzed immediately by CE-UV. To take into account the dilution of filtrated fractions, measured intensities of retentates were divided by 3 for the calculation of the percentage of peak 3 intensity. The relative percentage of peak 3 area (rA_3) was calculated as the intensity of the peak 3 in the retentate divided by that of retentate + filtrate.

1.6 SDS-PAGE

SDS-PAGE analysis of the hIAPP solution were performed using 15% Tris-Glycine in-house prepared gels. Starting from the sample preparation detailed in section 2, 50 μ L of 200 μ M hIAPP were mixed with 10 μ L of a 6X SDS-PAGE buffer. 10 μ L of this preparation was then deposited into a lane of the gel, which corresponds to 8 μ g of hIAPP. The same amount of hIAPP was loaded in all wells. SDS-PAGE was carried out between 100 and 250V to keep the current under 50 mA. Gel staining was performed with a Coomassie Brilliant Blue R-250 staining solution from BioRad (Hercules, CA, USA).

1.7 Size Exclusion Chromatography (SEC)

SEC experiments were performed with a HPLC spectraSYSTEM instrument (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) equipped with a UV detector. Detection was performed at 200 nm. Several stationary phases were tested: BioSEC 3 (3 μm , 300 x 4.6 mm) from Agilent (Santa Clara, CA, USA), TSKgel Alpha-2500 (7 μm , 300 x 7.8 mm), TSKG3000SW (10 μm , 300 x 7.5 mm) and TSKG200SW_{XL} (5 μm , 300 x 7.8 mm) from Tosoh Bioscience (Tokyo, Japon). Several mobile phases were also tested with ammonium acetate (from 40 to 500 mM, at pH 3.7 or 7.4) and acetonitrile or isopropanol as organic modifiers up to 40%.

3. Results and discussion

3.1 *In vitro* oligomerization monitoring of hIAPP by CE

In order to follow this oligomerization, the first step was to develop a quantitative CE method compatible with a real-time monitoring.

3.1.1 CE method development

The electrophoretic separation of the different species formed during the *in vitro* oligomerization of hIAPP was developed using CE and using as a first attempt uncoated silica capillaries. Strong adsorption was observed with irreproducible results and broad peaks (figure 1A), whatever the tested buffers (sodium phosphate, ammonium acetate, Tris, MES and HEPES), pHs (from 3.7 to 7.4) and ionic strengths (from 20 to 100 mM). We then moved to a cationic coated capillary to allow separation under acidic conditions with a positively charged peptide (pI of hIAPP ~ 8.4). Those conditions were expected to reduce peptide adsorption onto capillary walls. In that case, only acidic BGE pHs were investigated. This was motivated by the willingness to observe the different oligomerization stages with a quite slow process [40,41].

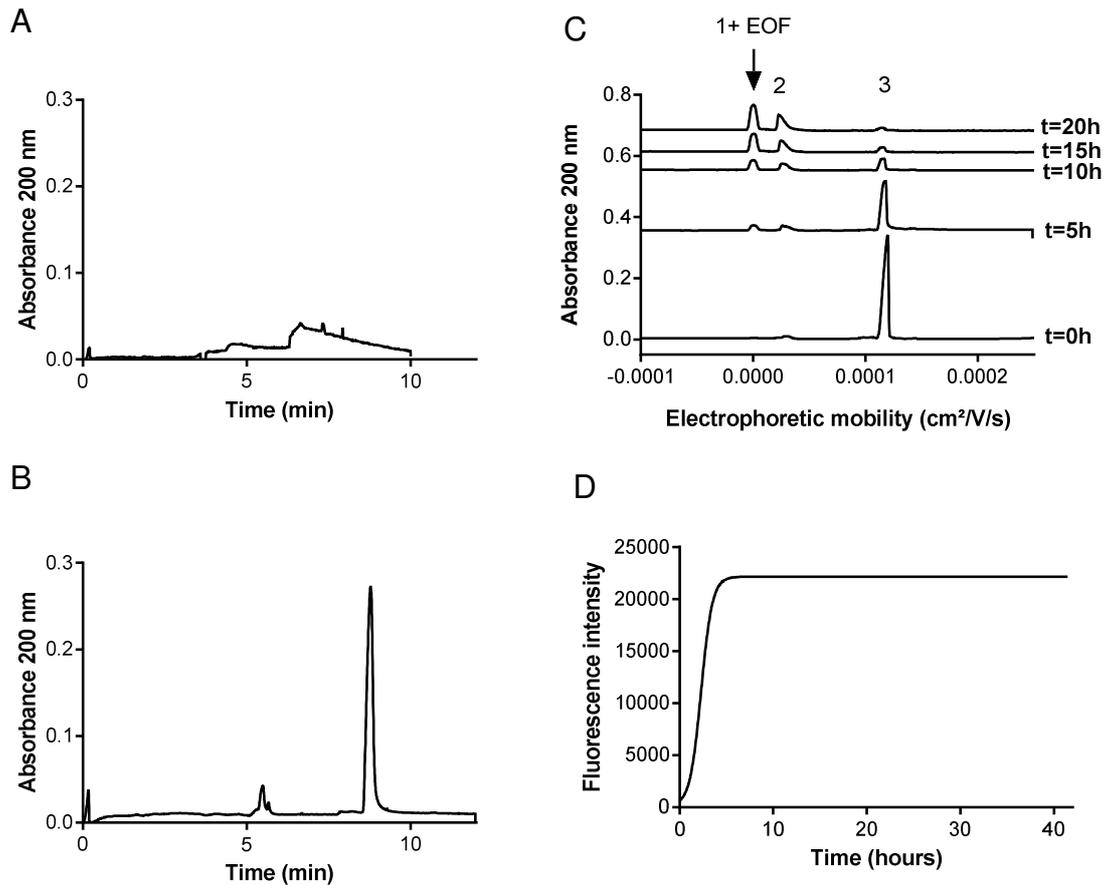


Figure 1. Electropherograms obtained for hIAPP analysis (A) using an uncoated capillary (60 cm x 50 μm) and a BGE composed of 20mM Tris-HCl pH 7.4 or polybrene coated capillaries (60 cm x 50 μm) with a BGE composed of 50 mM ammonium acetate at (B) pH 5.5 or (C) 3.7. In (C) the whole in vitro monitoring of hIAPP oligomerization at different times after the sample reconstitution ($t=0\text{h}$) is presented. Electropherograms have been shifted on the Y axis. For (A-C): sample is 100 μM hIAPP freshly dissolved in BGE; applied voltage -25 kV, detection: 200nm; Injection: 0.8 psi for 10 seconds; (D) Monitoring of hIAPP aggregation by ThT fluorescence spectrofluorimetry. Conditions: buffer 10 mM Tris/HCl pH 7.4, 100 mM NaCl with 10 μM of ThT. λ_{exc} 440 nm, λ_{em} 485 nm. Sample: 5 μM hIAPP freshly dissolved in DMSO

Polyethyleneimine (PEI) was first tried but we experienced frequent current failures that we attributed to hIAPP precipitation. Although widely used as a coating to perform proteins separations in capillary electrophoresis [42,43], it has also been reported sometimes to induce precipitation by a complexation mechanism between PEI and proteins [44]. Keeping the same strategy, we used then polybrene (PB), another cationic polymer expected to reduce protein adsorption and tune the electroosmotic flow (EOF). Several parameters were optimized: PB concentration for the coating process, BGE ionic strengths (from 40 to 60 mM), pHs (in acidic ranges between 3.5 and 6.8) and between-run rinses (NaOH 1M or 0.1M). 0.2% of PB with 50 mM ammonium acetate at pH 3.7 as BGE gave the highest resolution for hIAPP analysis. Rinsing with 1M NaOH proved to be the most efficient to regenerate the capillary wall. Under those conditions, two distinct species could be resolved in less than 10 minutes (figure 1C, $t = 0\text{h}$). However, peak 1 co-migrated with the EOF one in

all tested conditions. Increasing the pH to 5.5 was also tested but showed a lower resolution between peaks 1 & 2 (figure 1B).

We observed that peaks 1 & 2 areas increased over incubation time while that of peak 3 decreased (figure 1C). After 20 hours of incubation, peak 3 almost disappeared. We also noticed that between 5 and 10 hours of incubation, peak asymmetries of peaks 1 & 2 drastically increased revealing a modification of the species (nature or abundance) migrating under those peaks. However, as CE-UV does not allow the identification of each peak, we employed four complementary techniques to attempt some peak assignment.

3.1.2 Peaks identification

Size exclusion chromatography was tested in order to gain insight on the species present at different incubation times in the CE profile by determining their exact mass. Four different columns were tested. Those columns were selected based on their fractionating domain compatible with the expected mass of hIAPP oligomers. We also selected stationary phases, based on either polymers or silica. For stationary phases made with silica, NaCl has been introduced in the mobile phase to lower electrostatic interactions.

With the TSK G2000SWxl, a mobile phase composed of 20mM ammonium acetate pH 3.7 with 500 mM NaCl was tested, but no signal was obtained even for standard proteins. Buffer pH and concentration were then raised to 5.7 and 100 mM respectively, keeping 500 mM NaCl. In those conditions, estimated mass of the hIAPP peak was 1172 Da which does not correspond to the monomer one (3903 Da). The peptide was strongly adsorbed onto this silica stationary phase, even with high NaCl concentrations. A BioSEC 3 was then tested using a 100mM ammonium acetate mobile phase. At pH 3.7, hIAPP eluted close to the total permeation volume, which means that adsorption still occurred although this stationary phase has a hydrophilic layer. At pH 7.4, adsorption was still present. With 20% of acetonitrile, hIAPP peak interfered with salt one. 40% acetonitrile provided some separation of hIAPP from the salts. However, the mass of the hIAPP peak was still largely underestimated. By replacing acetonitrile by isopropanol two peaks were observed for hIAPP but still eluting too late.

Two other columns were tested (TSK α -2500 and G3000SWxl) which did not provide better results. α -2500 column, whose fractionating domain is reduced compared to the other tested columns, provided similar results to the BioSEC one, whereas G3000SWxl did not allow the observation of more than one peak for hIAPP.

In conclusion, too strong interactions between the peptide and the different stationary phases (made of silica or hydrophilic polymers) tested was observed, even with the best conditions obtained (column Agilent BioSEC 3; 100mM ammonium acetate pH7.4/acetonitrile (60/40)). No accurate mass determination of separated species could be deduced from these experiments. We therefore performed SDS-PAGE analysis of hIAPP solutions at room temperature at $t = 0h$ and $10h$ and after 3 weeks of incubation. No sample heating prior to sample loading was performed to preserve as much as possible the non-covalent oligomers [45]. From $t = 0h$ to $24h$, the gel exhibited only one band at 3.9 kDa corresponding to the monomer. The intensity of this band clearly decreased over time by 3-fold from $t = 0h$ to $10h$ (data not shown). No other band was observable in those conditions, even

close to the wells where could remain large species unable to penetrate inside the gel. This is due either to the dissociation of the formed oligomers or to an accelerated oligomerization that produced large aggregates which did not penetrate inside the gel and could not be detected by the staining even in the bottom of the wells. After 3 weeks of incubation no band at all was observed probably because all the monomer was oligomerized leading to large aggregates. SEC and SDS-PAGE were found not helpful to assign hIAPP CE peaks. We then performed sample filtration experiments using 4 different membrane cut-offs (3, 10, 30 and 100 kDa). The filtration was performed for hIAPP samples incubated at 0, 5, 15 or 24h, by centrifugation at 25°C. Experiments were also conducted at 4°C, showing no difference compared to 25°C. In each case, retentates and filtrates were analyzed by CE.

Figure 2 shows the relative peak intensity of peak 3 (rA_3) measured from the retentates at different incubation times. rA_3 in retentates was found nearly constant from $t = 0h$ to 24h with the 3 kDa membrane, whereas no peak was observed in the retentate after the filtration on 10 kDa membrane at $t = 0h$ and 10h. Thus peak 3 which is the main peak appearing at $t = 0h$ is composed of species whom molecular masses range from 3 to 10 kDa. At $t = 15h$, retentate contained 50% of species with MW higher than 10 kDa whereas at $t = 24h$ they represented less than 20%.

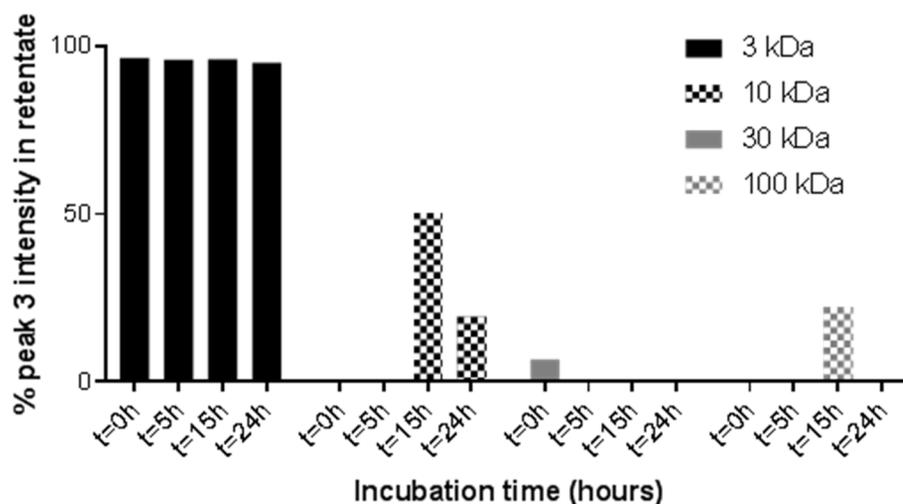


Figure 2. Relative peak areas for peak 3 measured by CE-UV in the retentates of different filtrated hIAPP sample incubated from 0 to 24h at 25°C. Filtrations were performed with 3, 10, 30 or 100kDa membranes.

CE analyses of retentates showed the presence of 40-60% of species migrating in peaks 1 and 2, whatever the membrane used. They correspond therefore to oligomers with molecular mass over 100 kDa, and appeared directly after the reconstitution of hIAPP in the BGE.

To confirm this identification, a CE-MS method under mild conditions was developed keeping the same experimental conditions as for CE-UV. MeOH/0.1% acetic acid at different proportions were tested (10/90 to 50/50) as the sheath liquid. With too high proportions of MeOH (e.g 50%) no hIAPP signal was observed. 10% of MeOH allowed the observation of several oligomers. However,

compared to the CE-UV profile, the resolution deteriorated and only two peaks were observed for a fresh sample analyzed within 5 minutes of incubation (figure 3A). Peak a was composed of hIAPP monomer at a very low level (40 times less than in peak b). Peak b corresponded mostly to the monomer and contained also at a very low concentration, some small oligomers (dimer and trimer, figure 3B and 3C). A different profile was obtained after 4 hours of incubation, as peak b was split into two peaks (b_1 and b_2). The poor resolution between those two peaks can be explained by both the nebulizing gas pressure (5 psi) and the CE forward pressure (1.45 psi) applied. b_2 was almost exclusively composed of small oligomers, whereas b_1 corresponded to a mixture of species from the monomer until the heptamer. The proportion of these large species was twice higher at $t = 4h$ compared to $0h$ (figure 3D). These results clearly demonstrate that large species are formed from $t = 0h$ and $4h$. After 24 hours of incubation, no peak was observable on the TIC, all the monomer and small oligomers have disappeared. These results are in agreement with filtration experiment results and also consistent with the amyloid cascade scheme producing first small oligomers and later on much larger ones.

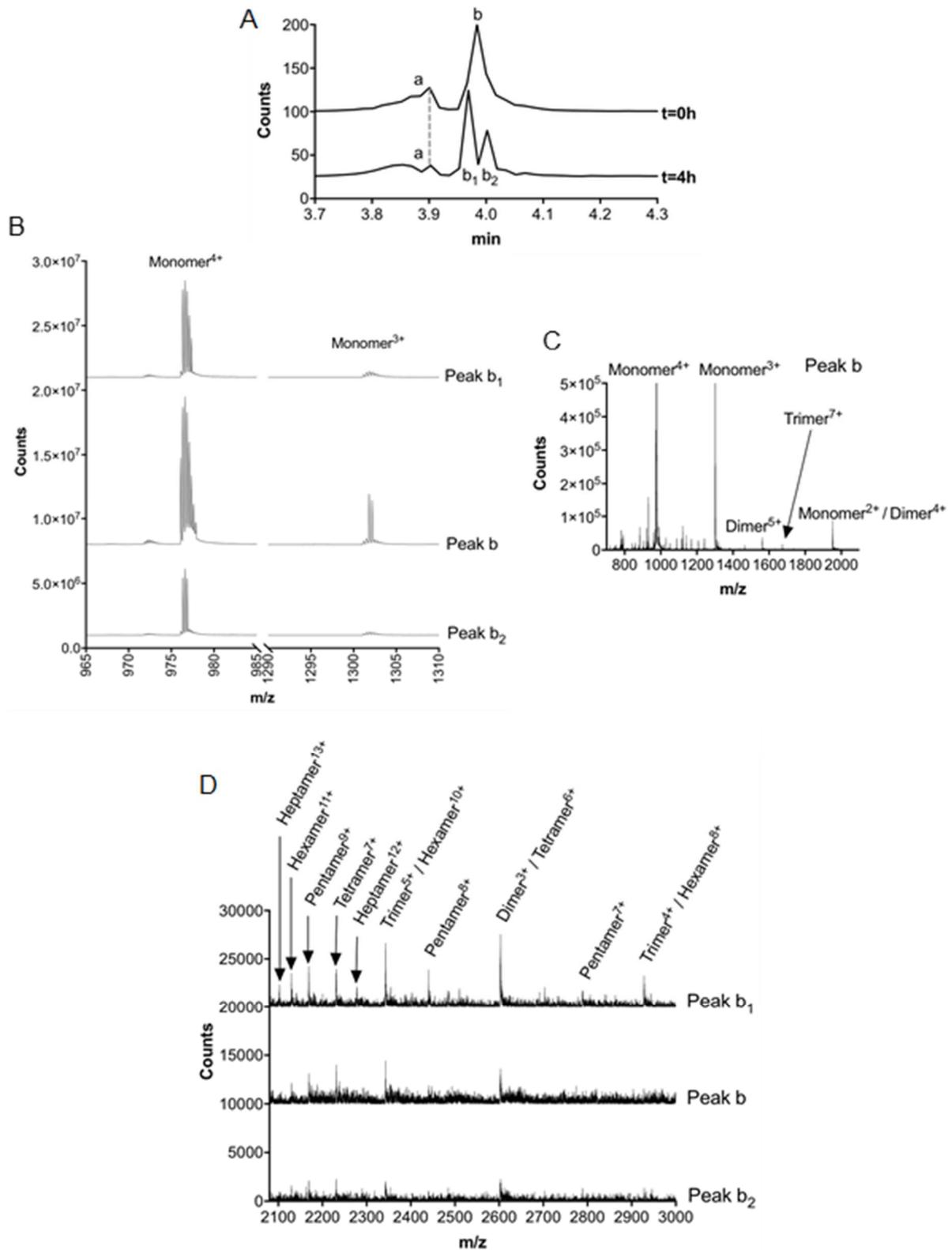


Figure 3. Electropherogram obtained with a triple layer polybrene-dextran-polybrene coated capillary at $t = 0h$ and $4h$. All conditions are the same as in fig 1C. (A). Spectra for Peaks b, b₁ and b₂ on the 700-2100 m/z region (B). Zoomed in intensity of this region for peak b (C). Spectra of peaks b, b₁ and b₂ on the 2100-3000 m/z region (D).

The overall results obtained with the different identification techniques are coherent with the evolution of peak intensities observed for different incubation times by CE-UV. They indicate that peak 3 is mainly composed of monomer, and also a small amount of dimer and trimer while peaks 1 & 2 are composed of larger and non-stable species with molecular mass over 100kDa. They appear as a consequence of the amyloid cascade, provoking in turn, a decrease of the low MW species.

In T2D, the pathological process is reported to occur with the oligomerization of β -sheets units [17]. We finally analyzed a hIAPP solution by ThT fluorescence spectroscopy. This technique has been indeed widely used to follow the aggregation of compounds through their β -sheets accumulation [29]. Results clearly showed that hIAPP is aggregating over time, with a lag phase of 2 hours and a steep increase until a plateau after 5 hours (figure 1D). This result confirmed that hIAPP oligomerization took place also *in vitro* as highlighted by CE and that it involved the apparition of β -sheets rich species.

3.2 Repeatability of the method

In order to use this method to test potential new inhibitors toward hIAPP oligomerization, we performed some repeatability studies. The repeatability of the whole analytical method was investigated using the most intense peak at $t = 0h$ of incubation (peak 3). Briefly, the same coating procedure was applied to 3 different capillaries. Analysis of three hIAPP aliquots, prepared from the same batch, in the same conditions were performed over three days. RSDs of electrophoretic mobilities and relative peak areas were estimated to be 0.9% and 0.5% respectively ($n=3$). Relative peak areas were calculated as the ratio between the peak area of one peak over the sum of all peak areas (1 to 3) at a given incubation time. The absence of interfering species under peak 1 which comigrate with that of EOF has been verified at any time of the kinetics by running a kinetics with BGE only instead of hIAPP sample. These results demonstrate that the CE method and the coating procedure are repeatable.

We then evaluated the repeatability of the oligomerization process over time. We performed 3 different kinetics using three different aliquots of the same batch of hIAPP and using the same capillary but on three different days. The same tendency as observed in Figure 1 was observed for the three kinetics. Figure 4 shows the evolution of relative peak areas of the three peaks over time. For all the incubation times and for each of the three peaks, RSDs of electrophoretic mobilities and relative areas were respectively less than 4.3% and 13.7%. Results showed a slightly higher variability of relative peaks areas, especially for peak 3 and at intermediate incubation times (10 and 15h) while they remained under 4.2% for other incubation times. We concluded that this method is suitable for the oligomerization monitoring. Kinetics was also repeated on different capillaries and different days, but RSDs were much higher than those obtained from one single capillary. The oligomerization process is indeed very sensitive to experimental conditions, like ambient temperature or aliquot preparation. Those parameters can highly influence the kinetics and we assumed that for the purpose of testing inhibitor activity of new compounds regarding this oligomerization it is highly desirable to perform kinetics with and without the addition of the tested molecule, the same day and using the same capillary.

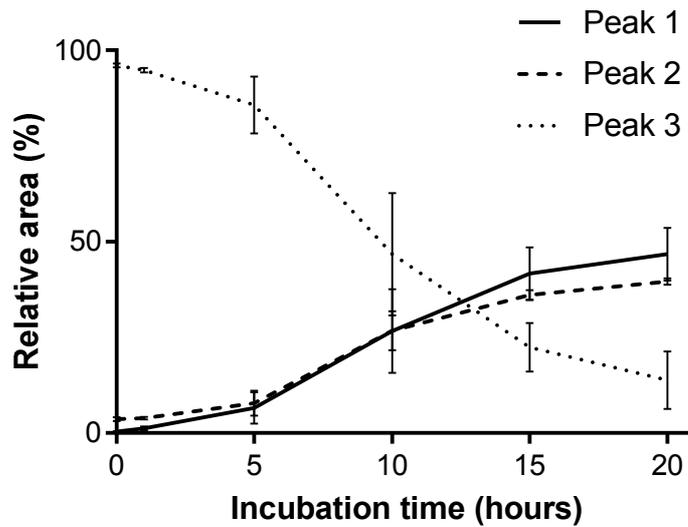


Figure 4. Relative peak areas over time for each hIAPP species measured by CE-UV and using the same PB-coated capillary. Measurements were performed in triplicate; a new aliquot of the same hIAPP batch was used for each analysis. For other conditions, see fig 1C. Error bars represent the standard deviation

3.3 Effect of resveratrol on the *in vitro* hIAPP oligomerization

Finally, the method was used to test the influence of resveratrol, a reference oligomerization inhibitor for hIAPP [46,47] at a 1/10 (hIAPP/resveratrol) ratio. This ratio was selected based on previous studies [47]. We checked by spectrofluorimetric experiments based on the ThT fluorescent dye that this compound provoked an increase of the “oligomerization” lag time of hIAPP and a decrease of the fluorescent plateau, demonstrating thereby its impact on the oligomerization process (data not shown). Figure 5 compares the evolution of A_{tx} / A_{t0} ratio area in the absence or presence of resveratrol at different incubation times (A_{tx} representing peak 3 area at the time of incubation x while A_{t0} is the peak 3 area at $t = 0h$). No other peaks were observable in the electropherogram, except the one of DMSO used initially to dissolve resveratrol and which co-migrated with peak 1. It appears that after 20 hours of incubation, more than 30% of hIAPP monomer (and probably traces of dimer and trimer too) was maintained in presence of resveratrol whereas the corresponding peak had almost disappeared with hIAPP alone. This result confirms the anti-aggregation characteristic of resveratrol and can be considered as a proof of concept that validates our developed method for the screening of potential drugs for T2D.

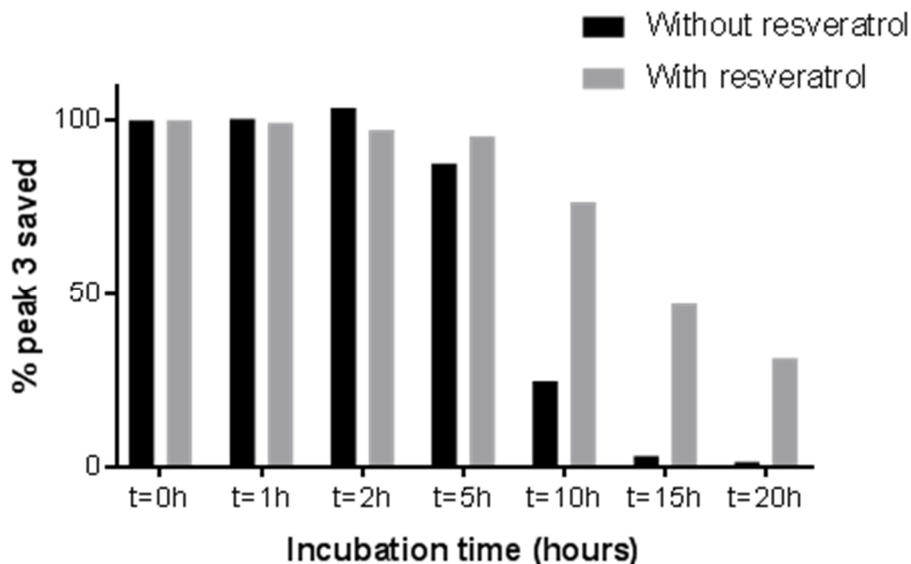


Figure 5. Percentage of remaining peak 3 in the presence (10/1 ratio, grey) or in the absence (black) of resveratrol obtained with the CE method and at different incubation times (from 0h to 20h). CE analysis was performed under the same conditions as in fig 1C.

4. Concluding remarks

In vitro monitoring of hIAPP peptide aggregation process is a very important challenge not only to understand the pathological process involved in type 2 diabetes but also to test new potential inhibitors of hIAPP oligomerization. The emerging hypothesis demonstrates that the toxicity towards pancreatic β -cells is due to low MW and soluble oligomers of hIAPP, which makes the development of a monitoring tool mandatory for the early oligomer species. We developed a CE method allowing, for the first time, the monitoring in real time of the species involved in the *in vitro* hIAPP oligomerization kinetics, starting from the initial point of this process until the disappearance of the main monomeric species. CE-MS, filtrations and SDS-PAGE were used to confirm the assignments of the peaks in that profile, showing peak 3 is composed of monomer and to very low amount of dimer and trimer whereas peaks 1 and 2 are composed of species higher than 100 kDa. This method was shown to be repeatable enough to allow the screening of potential drugs toward this pathological process. The new CE separation method was tested using resveratrol to confirm its antiaggregating activity. We could indeed demonstrate that this compound preserves the hIAPP monomer *in vitro*. This method is therefore suitable for activity evaluation or screening of anti-hIAPP oligomerization compounds and provides already a useful tool for new drug discovery in T2D.

Acknowledgments

This work was supported by a public grant overseen by the French national Research Agency (ANR) as part of the "Investissement d'Avenir" program, through the "IDI 2015" project funded by the IDEX Paris-Saclay, ANR-11-IDEX-0003-02.

References

- [1] A. Chaudhury, C. Duvoor, V.S. Reddy Dendi, S. Kraleti, A. Chada, R. Ravilla, A. Marco, N.S. Shekhawat, M.T. Montales, K. Kuriakose, A. Sasapu, A. Beebe, N. Patil, C.K. Musham, G.P. Lohani, W. Mirza, Clinical Review of Antidiabetic Drugs: Implications for Type 2 Diabetes Mellitus Management, *Front Endocrinol.* 8 (2017) 6. doi:10.3389/fendo.2017.00006.
- [2] L. Guariguata, D.R. Whiting, I. Hambleton, J. Beagley, U. Linnenkamp, J.E. Shaw, Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035, *Diabetes Res Clin Pr.* 103 (2014) 137–149. doi:10.1016/j.diabres.2013.11.002.
- [3] Y. Zheng, S.H. Ley, F.B. Hu, Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications, *Nat Rev Endocrinol.* 14 (2018) 88–98. doi:10.1038/nrendo.2017.151.
- [4] R. Akter, P. Cao, H. Noor, Z. Ridgway, L.H. Tu, H. Wang, A.G. Wong, X. Zhang, A. Abedini, A.M. Schmidt, D.P. Raleigh, Islet Amyloid Polypeptide: Structure, Function, and Pathophysiology, *J Diabetes Res.* 2016 (2016) 2798269. doi:10.1155/2016/2798269.
- [5] P. Westermark, A. Andersson, G.T. Westermark, Islet Amyloid Polypeptide, Islet Amyloid, and Diabetes Mellitus, *Physiol Rev.* 91 (2011) 795.
- [6] K. Pillay, P. Govender, Amylin uncovered: a review on the polypeptide responsible for type II diabetes, *Biomed Res Int.* 2013 (2013) 826706. doi:10.1155/2013/826706.
- [7] A. Abedini, A.M. Schmidt, Mechanisms of islet amyloidosis toxicity in type 2 diabetes, *FEBS Lett.* 587 (2013) 1119–1127. doi:10.1016/j.febslet.2013.01.017.
- [8] A. Mukherjee, D. Morales-Scheihing, P.C. Butler, C. Soto, Type 2 diabetes as a protein misfolding disease, *Trends Mol Med.* 21 (2015) 439–449. doi:10.1016/j.molmed.2015.04.005.
- [9] M.N. Andrews, Comparing the structural properties of human and rat islet amyloid polypeptide by MD computer simulations, *Biophys. Chem.* 156 (2011) 43–50. doi:10.1016/J.BPC.2010.12.007.
- [10] L. Haataja, T. Gurlo, C.J. Huang, P.C. Butler, Islet Amyloid in Type 2 Diabetes, and the Toxic Oligomer Hypothesis, *Endocr. Rev.* 29 (2008) 303.
- [11] C.C. Lee, Y. Sun, H.W. Huang, How type II diabetes-related islet amyloid polypeptide damages lipid bilayers, *Biophys J.* 102 (2012) 1059–1068. doi:10.1016/j.bpj.2012.01.039.
- [12] S.G. Swinnen, J.B. Hoekstra, J.H. DeVries, Insulin Therapy for Type 2 Diabetes, *Diabetes Care.* 32 (2009) S253–S259. doi:10.2337/dc09-S318.
- [13] V. Gupta, Glucagon-like peptide-1 analogues: An overview, *Indian J. Endocrinol. Metab.* 17 (2013) 413–421. doi:10.4103/2230-8210.111625.
- [14] B. Haas, N. Eckstein, V. Pfeifer, P. Mayer, M.D.S. Hass, Efficacy, safety and regulatory status of SGLT2 inhibitors: focus on canagliflozin, *Nutr. & Diabetes.* 4 (2014) e143. doi:10.1038/nutd.2014.40.
- [15] P.J. Marek, V. Patsalo, D.F. Green, D.P. Raleigh, Ionic strength effects on amyloid formation by amylin are a complicated interplay among Debye screening, ion selectivity, and Hofmeister effects, *Biochemistry.* 51 (2012) 8478–8490. doi:10.1021/bi300574r.
- [16] M. Sebastiao, N. Quittot, S. Bourgault, Thioflavin T fluorescence to analyse amyloid formation kinetics: Measurement frequency as a factor explaining irreproducibility, *Anal Biochem.* 532 (2017) 83–86. doi:10.1016/j.ab.2017.06.007.
- [17] S. Bedrood, Y. Li, J.M. Isas, B.G. Hegde, U. Baxa, I.S. Haworth, R. Langen, Fibril structure of human islet amyloid polypeptide, *J Biol Chem.* 287 (2012) 5235–5241. doi:10.1074/jbc.M111.327817.
- [18] O. Sumner Makin, L.C. Serpell, Structural characterisation of islet amyloid polypeptide fibrils, *J Mol Biol.* 335 (2004) 1279–1288.
- [19] Y. Bram, A. Frydman-Marom, I. Yanai, S. Gilead, R. Shaltiel-Karyo, N. Amdursky, E. Gazit, Apoptosis induced by islet amyloid polypeptide soluble oligomers is neutralized by diabetes-associated specific antibodies, *Sci. Rep.* 4 (2014). doi:SICI 426710.1038/srep04267.
- [20] L.M. Young, P. Cao, D.P. Raleigh, A.E. Ashcroft, S.E. Radford, Ion mobility spectrometry-mass spectrometry defines the oligomeric intermediates in amylin amyloid formation and the mode of action of inhibitors, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 660–670. doi:10.1021/ja406831n.

- [21] L.M. Young, J.C. Saunders, R.A. Mahood, C.H. Reville, R.J. Foster, L.H. Tu, D.P. Raleigh, S.E. Radford, A.E. Ashcroft, Screening and classifying small-molecule inhibitors of amyloid formation using ion mobility spectrometry-mass spectrometry, *Nat Chem.* 7 (2015) 73–81. doi:10.1038/nchem.2129.
- [22] L.M. Young, J.C. Saunders, R.A. Mahood, C.H. Reville, R.J. Foster, A.E. Ashcroft, S.E. Radford, ESI-IMS-MS: A method for rapid analysis of protein aggregation and its inhibition by small molecules, *Methods.* 95 (2016) 62–69. doi:10.1016/j.ymeth.2015.05.017.
- [23] G.R. Hilton, J.L.P. Benesch, Two decades of studying non-covalent biomolecular assemblies by means of electrospray ionization mass spectrometry, *J. R. Soc. Interface.* 9 (2012) 801–816. doi:10.1098/rsif.2011.0823.
- [24] L.C. Palmieri, B. Melo-Ferreira, C.A. Braga, G.N. Fontes, L.J. Mattos, L.M. Lima, Stepwise oligomerization of murine amylin and assembly of amyloid fibrils, *Biophys Chem.* 180–181 (2013) 135–144. doi:10.1016/j.bpc.2013.07.013.
- [25] J.L. Larson, E. Ko, A.D. Miranker, Direct measurement of islet amyloid polypeptide fibrillogenesis by mass spectrometry, *Protein Sci.* 9 (2000) 427–431. doi:10.1110/ps.9.2.427.
- [26] A.C. Susa, C. Wu, S.L. Bernstein, N.F. Dupuis, H. Wang, D.P. Raleigh, J.E. Shea, M.T. Bowers, Defining the molecular basis of amyloid inhibitors: Human islet amyloid polypeptide-insulin interactions, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 12912–12919. doi:10.1021/ja504031d.
- [27] I. Riba, P.E. Barran, G.J.S. Cooper, R.D. Unwin, On the structure of the copper-amylin complex, *Int. J. Mass Spectrom.* 391 (2015) 47–53. doi:10.1016/j.ijms.2015.09.001.
- [28] R. Khurana, C. Coleman, C. Ionescu-Zanetti, S.A. Carter, V. Krishna, R.K. Grover, R. Roy, S. Singh, Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils, *J Struct Biol.* 151 (2005) 229–238. doi:10.1016/j.jsb.2005.06.006.
- [29] M. Biancalana, S. Koide, Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils, *Biochim Biophys Acta.* 1804 (2010) 1405–1412. doi:10.1016/j.bbapap.2010.04.001.
- [30] O. V Kulikov, S. Kumar, M. Magzoub, P.C. Knipe, I. Saraogi, S. Thompson, A.D. Miranker, A.D. Hamilton, Amphiphilic oligoamide α -helix peptidomimetics inhibit islet amyloid polypeptide aggregation, *Tetrahedron Lett.* 56 (2015) 3670–3673. doi:10.1016/j.tetlet.2015.02.132.
- [31] S. Kumar, M.A. Brown, A. Nath, A.D. Miranker, Folded small molecule manipulation of islet amyloid polypeptide, *Chem Biol.* 21 (2014) 775–781. doi:10.1016/j.chembiol.2014.05.007.
- [32] S. Kumar, A. Miranker, A foldamer approach to targeting membrane bound helical states of islet amyloid polypeptide, *Chem. Commun.* 49 (2013) 4749–4751. doi:10.1039/C3CC41452C.
- [33] C.-H. Chen, T. Yao, Q. Zhang, Y.-M. He, L.-H. Xu, M. Zheng, G.-R. Zhou, Y. Zhang, H.-J. Yang, P. Zhou, Influence of trehalose on human islet amyloid polypeptide fibrillation and aggregation, *RSC Adv.* 6 (2016) 15240–15246. doi:10.1039/C5RA27689F.
- [34] D. Brinet, J. Kaffy, F. Oukacine, S. Glumm, S. Ongeri, M. Taverna, An improved capillary electrophoresis method for in vitro monitoring of the challenging early steps of A β 1-42 peptide oligomerization: application to anti-Alzheimer's drug discovery, *Electrophoresis.* 35 (2014) 3302–3309. doi:10.1002/elps.201400271.
- [35] S. Sabella, M. Quaglia, C. Lanni, M. Racchi, S. Govoni, G. Caccialanza, A. Calligaro, V. Bellotti, E. De Lorenzi, Capillary electrophoresis studies on the aggregation process of β -amyloid 1-42 and 1-40 peptides, *Electrophoresis.* 25 (2004) 3186–3194. doi:10.1002/elps.200406062.
- [36] S. Paracha, C. Hestekin, Field amplified sample stacking of amyloid beta (1-42) oligomers using capillary electrophoresis, *Biomicrofluidics.* 10 (2016) 033105. doi:10.1063/1.4954051.
- [37] A. Pithadia, J.R. Brender, C.A. Fierke, A. Ramamoorthy, Inhibition of IAPP Aggregation and Toxicity by Natural Products and Derivatives, *J Diabetes Res.* 2016 (2016) 2046327. doi:10.1155/2016/2046327.
- [38] F. Li, Q. Gong, H. Dong, J. Shi, Resveratrol, a neuroprotective supplement for Alzheimer's disease, *Curr Pharm Des.* 18 (2012) 27–33. <http://www.eurekaselect.com/76124/article>.
- [39] R. Haselberg, G.J. de Jong, G.W. Somsen, Capillary electrophoresis of intact basic proteins using noncovalently triple-layer coated capillaries, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 2408–2415. doi:10.1002/jssc.200900164.
- [40] L. Khemtémourian, E. Doménech, J.P.F. Doux, M.C. Koorengel, J.A. Killian, Low pH Acts as

- Inhibitor of Membrane Damage Induced by Human Islet Amyloid Polypeptide, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 15598–15604. doi:10.1021/ja205007j.
- [41] S. Jha, J.M. Snell, S.R. Sheftic, S.M. Patil, S.B. Daniels, F.W. Kolling, A.T. Alexandrescu, pH Dependence of Amylin Fibrillization, *Biochemistry*. 53 (2014) 300–310. doi:10.1021/bi401164k.
- [42] D. Figeys, R. Aebersold, Capillary electrophoresis of peptides and proteins at neutral pH in capillaries covalently coated with polyethyleneimine, *J. Chromatogr. B*. 695 (1997) 163–168. doi:10.1016/S0378-4347(97)00022-4.
- [43] F.B. Erim, A. Cifuentes, H. Poppe, J.C. Kraak, Performance of a Physically Adsorbed High-Molecular-Mass Polyethyleneimine Layer as Coating for the Separation of Basic-Proteins and Peptides by Capillary Electrophoresis, *J. Chromatogr. A*. 708 (1995) 356–361.
- [44] R.R. Burgess, Chapter 20 Protein Precipitation Techniques, *Methods Enzymol.* 463 (2009) 331–342. doi:10.1016/S0076-6879(09)63020-2.
- [45] D. Raleigh, X. Zhang, B. Hastoy, A. Clark, The beta-cell assassin: IAPP cytotoxicity, *J Mol Endocrinol.* 59 (2017) R121–R140. doi:10.1530/JME-17-0105.
- [46] L. Wei, P. Jiang, W. Xu, H. Li, H. Zhang, L. Yan, M.B. Chan-Park, X.W. Liu, K. Tang, Y. Mu, K. Pervushin, The molecular basis of distinct aggregation pathways of islet amyloid polypeptide, *J Biol Chem.* 286 (2011) 6291–6300. doi:10.1074/jbc.M110.166678.
- [47] L.-H. Tu, L.M. Young, A.G. Wong, A.E. Ashcroft, S.E. Radford, D.P. Raleigh, Mutational Analysis of the Ability of Resveratrol To Inhibit Amyloid Formation by Islet Amyloid Polypeptide: Critical Evaluation of the Importance of Aromatic–Inhibitor and Histidine–Inhibitor Interactions, *Biochemistry*. 54 (2015) 666–676. doi:10.1021/bi501016r.

4. Etude complémentaire – Marquage de hIAPP par une sonde fluorescente pour diminuer la limite de détection en électrophorèse capillaire

4.1. Introduction

Après avoir développé une méthode de CE permettant de suivre l'oligomérisation de hIAPP *in vitro*, une étude complémentaire a été menée afin de tenter de se rapprocher davantage des conditions physiologiques pour suivre cette oligomérisation. En effet, les concentrations d'analyses utilisées en CE-UV (100 μM) sont environ 10^8 fois plus élevées que les concentrations physiologiques de ce peptide (de l'ordre du pM dans le plasma) (Zhang *et al.*, 2016), et cela pourrait biaiser les résultats obtenus *in vitro*. Cette étude complémentaire concerne le marquage du peptide par une sonde fluorescente afin d'améliorer sa détection et de pouvoir diminuer les concentrations *in vitro* lors de l'analyse de hIAPP par CE. Cette sonde fluorescente a déjà été utilisée pour dériver les peptides A β (Crosnier De Lassichère *et al.*, 2018) et se rapprocher leurs concentrations physiologiques lors de l'analyse. C'est pourquoi cette stratégie a été envisagée pour le peptide hIAPP.

4.2. Résultats

Le marquage de hIAPP s'est donc appuyé sur des travaux récemment réalisés au laboratoire (Crosnier De Lassichère *et al.*, 2018). Le marquage du peptide par la sonde fluorescente (Fluoprobe 488 NHS) repose sur la dérivation d'une ou de plusieurs amines primaires du peptide. Celle-ci peut donc en théorie avoir lieu sur les lysines, les arginines et l'extrémité N-terminale du peptide. Il existe donc trois sites de marquage possible pour hIAPP (Lys1, Arg11 et l'extrémité N-terminale). Le marquage reste cependant dépendant de l'environnement de l'amine. Il sera par exemple ici très difficile de réaliser le marquage sur la Lys1 et l'extrémité N-terminale en raison de la gêne stérique. La dérivation a été réalisée dans un tampon borate 40 mM pH 10,5, avec un rapport molaire de 200/1 (marqueur/hIAPP). Il a été montré sur les peptides A β que dans ces conditions, le marquage est réalisé en deux minutes environ. Ce temps court est favorable pour limiter l'oligomérisation de hIAPP accélérée à ce pH. Afin d'éliminer l'excès de marqueur fluorescent, des filtrations par centrifugation sur des membranes de 3 kDa sont ensuite réalisées.

Une fois la procédure de marquage réalisée, nous avons analysé l'échantillon par la méthode de CE-UV déjà développée afin de vérifier si la dérivation était efficace. Les résultats sont présentés en Figure 62. L'électrophérogramme correspondant à hIAPP seul analysé directement après sa reconstitution dans un tampon acétate d'ammonium 50 mM pH 3,7 montre un pic dont la mobilité électrophorétique est de $1,2 \cdot 10^{-4}$ cm²/V/s. Le fluorophore analysé seul ne montre lui aucun pic dans cette région mais présente deux pics caractéristiques, ainsi qu'un pic intense de mobilité nulle correspondant au DMSO. L'électrophérogramme du peptide dérivé ne présente malheureusement aucun pic supplémentaire par rapport au peptide seul, hormis celui correspondant à des formes agrégées ($0,2 \cdot 10^{-4}$ cm²/V/s). Or si la procédure de marquage est efficace, nous devrions observer à la fois une diminution du pic de hIAPP

non-dérivé ainsi que l'apparition d'un nouveau pic, ce qui n'est pas le cas ici. La co-injection du peptide seul fraîchement reconstitué et du fluorophore ne montre pas non-plus le pic caractéristique de hIAPP. Il semblerait donc que la présence du fluorophore conduise à une déstabilisation du peptide, sans que les gros oligomères habituellement observés ne soient formés. Plusieurs tampons de séparation ont été envisagés (PBS, bicarbonate de sodium à des pH entre 7,4 et 10,5), sans qu'il ne soit possible pour chacun d'eux d'observer un nouveau pic correspondant au peptide marqué. Il semblerait donc que la procédure de marquage dans le tampon borate à pH 10,5 agrège très rapidement le peptide, sans que celui-ci ne soit marqué efficacement.

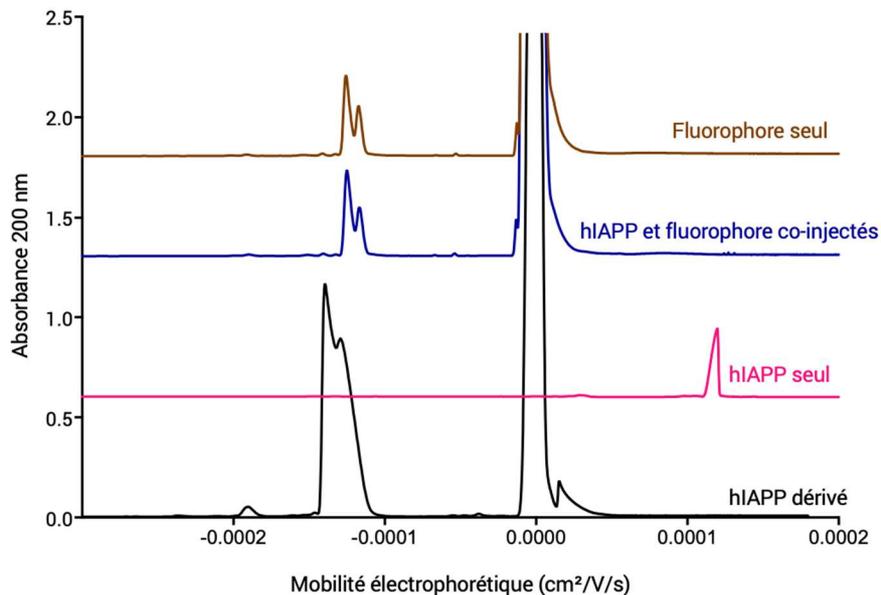


Figure 62 : Electrophérogrammes obtenus en CE-UV pour le fluorophore seul (marron), hIAPP non-dérivé co-injecté avec la solution de fluorophore (bleu), hIAPP seul après dérivation (rose) et de hIAPP dérivé (noir) (BGE : acétate d'ammonium 50 mM pH 3,7 ; V = -25 kV ; capillaire polybrène ; détection 200 nm)

Afin de confirmer cette hypothèse, l'électrophorèse couplée à une détection fluorescence induite par laser (CE-LIF) a été utilisée afin de détecter éventuellement le peptide marqué, non-déTECTÉ en UV. Les mêmes conditions qu'en CE-UV ont été utilisées. Il s'avère que tous les pics caractéristiques du fluorophore seul sont retrouvés dans le profil CE du peptide dérivé, sans qu'aucun nouveau pic caractéristique du peptide dérivé ne soit observé. Le peptide marqué n'est donc pas détectable dans ces conditions Figure 63.

Au pH choisi pour la séparation, le peptide est chargé positivement (+3). Sa mobilité électrophorétique est donc de même signe que la mobilité électroosmotique, et devrait donc être détectable avant l'EOF dont le temps de migration est de 8 minutes. On peut donc supposer que soit le marquage du peptide n'est pas efficace, soit le peptide dérivé co-migre avec l'un des signaux du fluorophore. La procédure

de marquage a donc été tentée dans un tampon tricine 50 mM à pH 8,5 afin d'améliorer son efficacité, sans succès. De plus, d'autres tampons de séparations (PBS, tricine, borate, bicarbonate à des pH compris entre 7,4 et 10,5) ont été utilisés afin de résoudre le peptide marqué du fluorophore dans le cas d'une co-migration. Aucun nouveau pic n'a cependant pu être détecté. On peut donc supposer à ce stade que le marquage du peptide n'est pas réalisé.

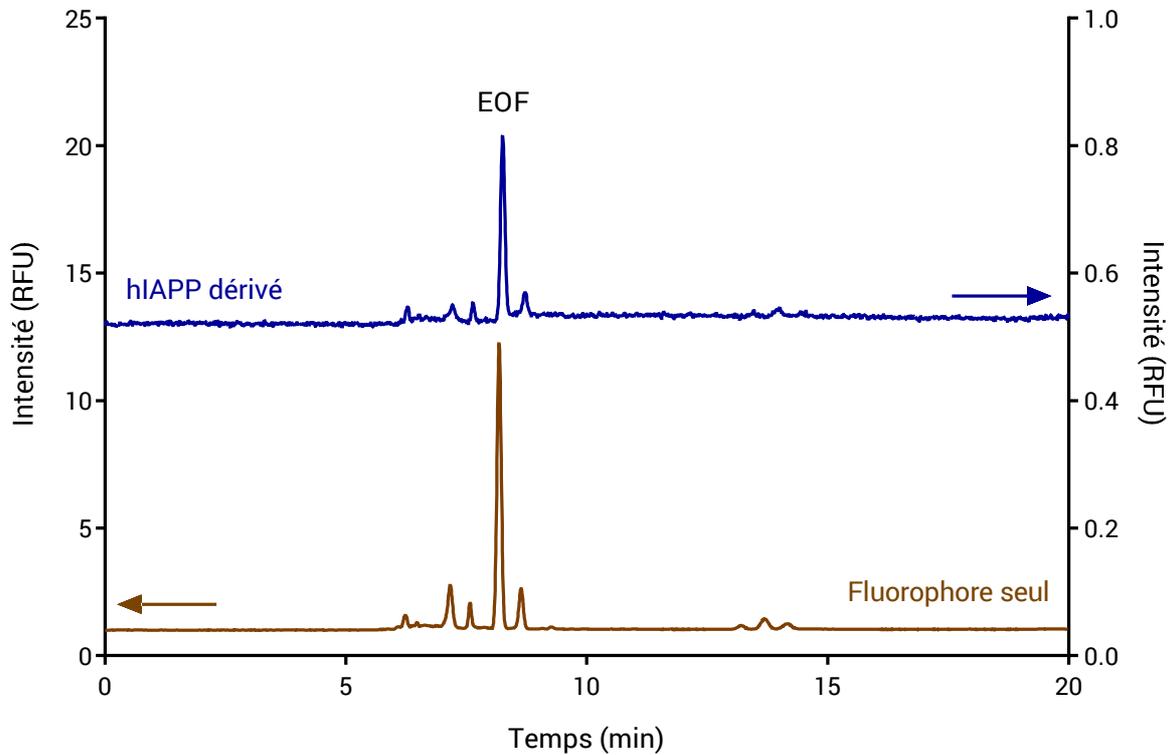


Figure 63 : Electrophérogrammes obtenus en CE-LIF du fluorophore seul après 3 filtrations sur membrane de 3 kDa et du peptide dérivé après 4 filtrations sur membrane de 3kDa (BGE : acétate d'ammonium 50 mM pH 3.7 ; V = - 25kV ; capillaire polybrène)

La spectrofluorimétrie à la ThT a donc été envisagée afin de vérifier si le marquage avait lieu, et son éventuel impact sur la cinétique d'oligomérisation. Nous avons donc analysé dans les mêmes conditions le peptide dérivé et le peptide seul (tampon Tris-HCl 10 mM + NaCl 100 mM pH 7,4 contenant 10 μ M de ThT). Les gains ont été ajustés pour chaque expérience afin d'éviter la saturation des signaux. Les courbes de fluorescence obtenues montrent que le peptide seul suit un processus d'oligomérisation cohérent avec ce qui a été observé jusqu'alors. En revanche, le peptide dérivé ne présente pas de signal caractéristique d'une agrégation (Figure 64) avec une fluorescence constante entre 10000 et 15000 au cours du temps. Le suivi du fluorophore seul dans le tampon d'incubation a également été réalisé sans qu'aucun signal ne soit observé, prouvant ainsi que le signal observé pour le peptide dérivé est dû uniquement à son agrégation en feuillets β . Il semble donc que la procédure de marquage conduise à une oligomérisation accélérée et peut-être instantanée du peptide, sans que le marquage ne soit efficace.

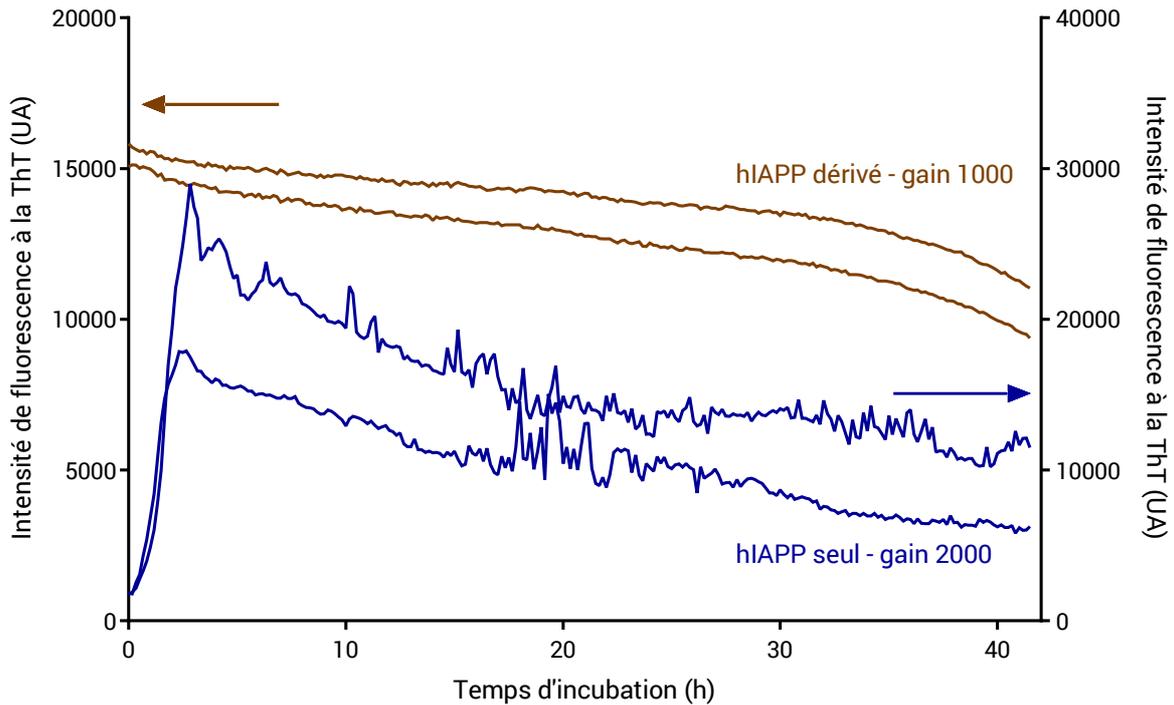


Figure 64 : Comparaison sur 42h des signaux de spectrofluorimétrie à la ThT de hIAPP seul non dérivé (gain 2000, intensité sur l'axe de droite) et de hIAPP dérivé (gain 1000, intensité sur l'axe de gauche). Conditions : tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,4 NaCl 100 mM + 10 μ M ThT, λ_{exc} 440 nm, λ_{em} 485 nm

Néanmoins, la proximité de la longueur d'onde d'émission du complexe feuillets β -ThT (485 nm) et celle d'excitation du fluorophore (493 nm) nous ont conduit à étudier un milieu contenant un autre marqueur de feuillets β que la ThT afin de s'affranchir de toute interférence. Le Congo Red (CR) a donc été testé car ses longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont différentes de celle de la sonde de marquage (λ_{ex} 497 nm / λ_{em} 614 nm). Malheureusement, aucun résultat intéressant n'a été obtenu avec ce marqueur de fibres amyloïdes, sur le peptide marqué et non marqué. Aucune évolution de signal caractéristique d'une oligomérisation n'est observé avec une longueur d'onde d'excitation fixée à 488 nm et celle d'émission à 520 ou 690 nm. Ces longueurs d'onde d'émission sont peut-être trop éloignées de celle du CR pour détecter un signal. Il semblerait donc qu'avec nos conditions, le CR ne permette pas de suivre l'oligomérisation d'un peptide amyloïde comme la ThT.

5. Conclusions

Les travaux présentés dans ce chapitre montrent donc la capacité de l'électrophorèse capillaire à suivre l'oligomérisation de hIAPP depuis son tout début. Cette technique ne nécessite qu'une faible quantité d'échantillon et sa répétabilité a été démontrée. Associée à des techniques d'identification comme la CE-MS ou les filtrations sur membranes, cette méthode a permis l'identification de trois groupes d'espèces de hIAPP : le monomère (et éventuellement dimère voire trimère) ainsi que deux groupes d'espèces de masses moléculaires supérieures à 100 kDa. L'électrophorèse capillaire a également permis de déterminer l'activité d'un inhibiteur connu de l'oligomérisation de hIAPP. Cette méthode a été employée pour l'étude de nouveaux composés développés au laboratoire. Les résultats sont présentés dans le chapitre V.

En marge de cette technique, la mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse ainsi que la chromatographie d'exclusion stérique ont également été investiguées. La séparation des différents oligomères de hIAPP par SEC s'est avérée très compliquée en raison de leur adsorption sur la phase stationnaire. Les stratégies mises en œuvre pour contrer ce phénomène conduisent certainement à la dissociation des complexes non-covalents. La mobilité ionique n'a pas non plus permis de suivre l'oligomérisation de hIAPP, également en raison d'une forte dissociation des espèces dans l'instrument. Néanmoins, cette technique a permis de quantifier cette dissociation qui atteint environ 40% du trimère à l'hexamère. Ce résultat confirme la faible stabilité des espèces impliquées dans l'oligomérisation de hIAPP. De plus, nous verrons dans le chapitre III que cette technique permet toujours des études structurales de la complexation entre hIAPP et un inhibiteur, ainsi qu'une quantification relative des différentes formes.

Enfin, nous avons essayé de marquer hIAPP à l'aide d'un fluorophore (Fluoprobe 488 NHS) afin de diminuer la limite de détection de hIAPP, dans le but de se rapprocher de conditions physiologiques lors du suivi *in vitro* de l'oligomérisation de hIAPP par CE. Ce fluorophore a déjà été employé sur le peptide A β ₁₋₄₂ mais le marquage n'a malheureusement pas été efficace sur hIAPP, quelques soient les conditions testées. Il demeure néanmoins une option à explorer dans le cadre de l'étude de l'oligomérisation de hIAPP afin de se rapprocher de concentrations physiologiques. Toutefois, il sera nécessaire pour cela d'optimiser les conditions de marquage qui n'ont pas été optimisées dans cette étude (durée, concentration du peptide et du fluorophore, pH du milieu utilisé pour le marquage) voire de se diriger vers une autre sonde fluorescente comme le FITC par exemple, ou un autre solvant de dissolution de la sonde (différent du DMSO).

Références bibliographiques – Chapitre IV

- Bram, Y., Frydman-Marom, A., Yanai, I., Gilead, S., Shaltiel-Karyo, R., Amdursky, N., & Gazit, E. (2014). Apoptosis induced by islet amyloid polypeptide soluble oligomers is neutralized by diabetes-associated specific antibodies. *Scientific Reports*, *4*. <https://doi.org/SICI 426710.1038/srep04267>
- Brorsson, A.-C., Kumita, J. R., MacLeod, I., Bolognesi, B., Speretta, E., Luheshi, L. M., Knowles, T. P. J., Dobson, C. M., & Crowther, D. C. (2010). Methods and models in neurodegenerative and systemic protein aggregation diseases. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, *15*, 373–396.
- Crosnier De Lassichère, C., Mai, T. D., Otto, M., & Taverna, M. (2018). Online Preconcentration in Capillaries by Multiple Large-Volume Sample Stacking: An Alternative to Immunoassays for Quantification of Amyloid Beta Peptides Biomarkers in Cerebrospinal Fluid. *Analytical Chemistry*, *90*(4), 2555–2563. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03843>
- Gong, H., Zhang, X., Cheng, B., Sun, Y., Li, C., Li, T., Zheng, L., & Huang, K. (2013). Bisphenol A accelerates toxic amyloid formation of human islet amyloid polypeptide: a possible link between bisphenol A exposure and type 2 diabetes. *PLoS One*, *8*(1), e54198. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054198>
- Van der Rest, G., Rezaei, H., & Halgand, F. (2017). Monitoring Conformational Landscape of Ovine Prion Protein Monomer Using Ion Mobility Coupled to Mass Spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, *28*(2), 303–314. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1522-x>
- Verpillot, R., Esselmann, H., Mohamadi, M. R., Klafki, H., Poirier, F., Lehnert, S., Otto, M., Wiltfang, J., Jean-Louis, V., & Taverna, M. (2011). Analysis of Amyloid- β Peptides in Cerebrospinal Fluid Samples by Capillary Electrophoresis Coupled with LIF Detection. *Analytical Chemistry*, *83*(5), 1696–1703. <https://doi.org/10.1021/ac102828f>
- Young, L. M., Cao, P., Raleigh, D. P., Ashcroft, A. E., & Radford, S. E. (2014). Ion mobility spectrometry-mass spectrometry defines the oligomeric intermediates in amylin amyloid formation and the mode of action of inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*, *136*(2), 660–670. <https://doi.org/10.1021/ja406831n>
- Young, L. M., Saunders, J. C., Mahood, R. A., Revill, C. H., Foster, R. J., Ashcroft, A. E., & Radford, S. E. (2016). ESI-IMS-MS: A method for rapid analysis of protein aggregation and its inhibition by small molecules. *Methods*, *95*, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.05.017>
- Young, L. M., Saunders, J. C., Mahood, R. A., Revill, C. H., Foster, R. J., Tu, L. H., Raleigh, D. P., Radford, S. E., & Ashcroft, A. E. (2015). Screening and classifying small-molecule inhibitors of amyloid formation using ion mobility spectrometry-mass spectrometry. *Nat Chem*, *7*(1), 73–81. <https://doi.org/10.1038/nchem.2129>
- Young, L. M., Tu, L.-H., Raleigh, D. P., Ashcroft, A. E., & Radford, S. E. (2017). Understanding copolymerization in amyloid formation by direct observation of mixed oligomers. *Chemical Science*, *8*(7), 5030–5040. <https://doi.org/10.1039/C7SC00620A>
- Zhang, X.-X., Pan, Y.-H., Huang, Y.-M., & Zhao, H.-L. (2016). Neuroendocrine hormone amylin in diabetes. *World Journal of Diabetes*, *7*(9), 189–197. <https://doi.org/10.4239/wjd.v7.i9.189>
- Wälti, M. A., Orts, J., Vögeli, B., Campioni, S., & Riek, R. (2015). Solution NMR Studies of Recombinant A β (1–42): From the Presence of a Micellar Entity to Residual β -Sheet Structure in the Soluble Species. *ChemBioChem*, *16*(4), 659–669. <https://doi.org/10.1002/cbic.201402595>

Chapitre V. Évaluation de l'activité de nouveaux composés anti-agrégation de hIAPP

1. Introduction

Après avoir mis au point les conditions d'études optimales, ainsi que les techniques permettant d'observer les différentes espèces formées lors de l'oligomérisation de hIAPP, des inhibiteurs de cette oligomérisation ont été testés. Ces nouveaux composés ont été synthétisés au sein de notre laboratoire FLUOPEPIT à BioCIS, ainsi que dans le cadre d'une collaboration avec une équipe de l'IBMM à Montpellier, et ont été conçus spécialement afin d'inhiber l'oligomérisation. La conception de ces molécules repose soit sur une structure hélicoïdale pouvant interagir sur le repliement initial de hIAPP en structure hélicoïdale (partie 2), soit sur une stratégie basée sur des mimes de structure en β -hairpin (épingle à cheveux) pour interagir avec des espèces métastables très précoces monomériques ou oligomériques structurées en feuillet β (partie 3). Cette dernière stratégie avait déjà été développée par notre laboratoire avec des inhibiteurs du peptide $A\beta_{1-42}$ mimant une β -hairpin et incluant des acides aminés de la séquence amyloïdogénique KLVFF de $A\beta_{1-42}$ (Pellegrino et al., 2017; Tonali et al., 2018; Vahdati et al., 2017). Pour être sélectif de hIAPP, d'autres séquences peptidiques et peptidomimétiques ont ici été incorporées comme par exemple la séquence « FGAIL », décrite comme la séquence amyloïdogénique impliquée dans l'agrégation de hIAPP (Akter et al., 2016).

Afin d'étudier l'activité de ces molécules, de nombreuses techniques ont été employées, à commencer par les plus classiques que sont la spectrofluorimétrie à la ThT et la microscopie électronique en transmission. Ces deux techniques détaillées dans le chapitre II permettent de suivre l'agrégation de hIAPP d'un point de vue global, ainsi que la morphologie des espèces formées lors de l'étape finale de fibrillation. Après ces premiers tests, les molécules ont été évaluées par notre méthode d'électrophorèse capillaire, décrite au chapitre IV. La mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse a également été utilisée afin de déterminer les espèces ciblées par l'inhibiteur, ainsi que la réduction de la proportion de dimère et trimère formés. Enfin, des tests cellulaires sont en cours afin de déterminer si les molécules sont capables de restaurer la viabilité cellulaire.

2. Article 3 : "Helical foldamers of thiazole-based γ -amino acid as dual inhibitors of amyloid- β peptide and islet amyloid polypeptide oligomerization and fibrillization"

Helical foldamers of thiazole-based γ -amino acid as dual inhibitors of amyloid- β peptide and islet amyloid polypeptide oligomerization and fibrillization

J. Kaffy,^{*a} C. Berardet,^{a,b} L. Mathieu,^c B. Legrand,^c M. Taverna,^b F. Halgand,^d G. Van Der Rest,^d L. T. Maillard,^{*c} S. Ongerì.^a

^a BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris Saclay, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

^b Institut Galien Paris Sud, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris Saclay, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

^c Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR 5247, CNRS Universités Montpellier I et II, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 15 Avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier Cedex 5, France

^d Laboratoire de Chimie Physique Université Paris Sud, Université Paris Saclay, Orsay, France

Corresponding authors: E-mail: julia.kaffy@u-psud.fr; Tel: +33 (0)146835743
E-mail: ludovic.maillard@umontpellier.fr; Tel: +33 (0)411759604

Abstract

Type 2 diabetes and Alzheimer's disease are currently two major public health issues. Although these pathologies seem clinically very distinct, alteration of glucose homeostasis for T2D and neurodegeneration for AD, these 2 pathologies are closely related because T2D is a risk factor for AD and both pathologies are part of the degenerative disorders named amyloidoses. The misfolding and the aggregation of peptides, hIAPP and A β ₁₋₄₂ respectively for T2D and AD are shared by these two pathological mechanisms. While a large number of hIAPP and A β ₁₋₄₂ inhibitors are designed to target β -sheet rich structures composing the toxic amyloid oligomers and fibrils, the strategy aiming at trapping the non-toxic monomeric forms of hIAPP and A β ₁₋₄₂ in their helical native conformation has been less investigated. In this context, we report herein, the first example of helical foldamers, based on γ -building blocks of the amino-thiazole-carboxylic acids type, as dual inhibitors of hIAPP and A β ₁₋₄₂ aggregation. Biophysical assays including Thioflavin-T fluorescence, transmission electronic microscopy, capillary electrophoresis and IMS-MS show that the hexameric helical foldamer **6** efficiently inhibits hIAPP and A β ₁₋₄₂ oligomerization and fibrillization with the additional ability to interact selectively and preserve the non-toxic monomeric species of A β ₁₋₄₂ and hIAPP.

Keywords:

amyloid peptides, A β ₁₋₄₂, hIAPP, Alzheimer's disease, Type 2 Diabetes, aggregation, fibrillization, oligomeric forms, cytotoxic species.

1. Introduction

Type 2 diabetes (T2D) is a major public health issue, affecting nearly 400 million people in the world.¹ Alzheimer's disease (AD) is also of major concern with approximately 47 million people worldwide living with AD, number that is expected to reach 75 million by 2030.² At first glance, the two diseases appear to be completely distinct. However, clinical studies suggest that they are linked as they both involve impaired glucose homeostasis and altered brain function and because T2D might be an increased risk for AD.³ Insulin resistance, insulin degrading enzyme deficiency, oxidative stress are some of the common pathological conditions found in T2D and AD.⁴ Furthermore, they both belong to a group of degenerative disorders named amyloidosis owing to the misfolding and the aggregation of amyloid proteins, namely amyloid- β peptide ($A\beta_{1-42}$) in the case of AD and human islet amyloid polypeptide (hIAPP) in the case of T2D.⁵ $A\beta_{1-42}$ and hIAPP aggregates share structural characteristics such as highly ordered cross- β structures.⁶ Emerging evidence supports the hypothesis that, in addition to the pathogenic self-interactions, cross-amyloid interactions between $A\beta_{1-42}$ and hIAPP may also play a critical role in protein aggregation.⁷ These observations lead very recently the interest to find dual inhibitors of $A\beta_{1-42}$ and hIAPP.⁸ Otherwise, most of the modulators of $A\beta_{1-42}$ or hIAPP aggregation are designed to interact with the peptides in their β -sheet conformations and target the late fibrillar species. Indeed, the large numbers of small molecules described to inhibit $A\beta$ or hIAPP fibrillation are built on a planar aromatic scaffold such as the polyphenols resveratrol, epigallocatechin-3-gallate and curcumin, for which the β -sheet structure represent the major macromolecular target.^{8,9,10} It is now admitted that preventing also the presence of soluble transient oligomers of $A\beta_{1-42}$ and hIAPP, that precede fibril formation, is crucial because they are highly toxic species and constitute a major cause of the death of neurons and pancreatic islet cells respectively.¹¹ Some small molecules such as polyphenols^{9,10} or peptide derivatives^{12,13} have been reported to target these oligomers. However, the aggregation process generates metastable species (dimer, small and larger oligomers) that are inherently difficult to isolate and therefore to characterize. Furthermore, most of these species contain some β -sheet elements to different degrees but nevertheless similar making it difficult to selectively target one particular species. As the monomer species of $A\beta_{1-42}$ and hIAPP are non toxic and probably more easily cleared, the strategy aiming at preserving these species is of particular interest, as already demonstrated by some of us with peptides derivatives mimicking β -hairpin structures.^{13a,b} An alternative strategy to trap $A\beta_{1-42}$ and hIAPP into their non-toxic monomeric forms would be to target their native form or their α -helix conformation before they switch to β -sheet conformation that induce the aggregation process. However only few examples of ligands designed to interact with these amyloid peptides in their α -helical conformation support this hypothesis^{14,15} and only few studies have reported the rational use of ligand adopting an helical structure in order to interfere with this early step of folding of $A\beta_{1-42}$ ^{14b,14d,14f} or hIAPP.^{15a-c}

Some of us reported the design and synthesis of 4-amino-methyl-2-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylic acids as new ring constrained γ -amino acids.¹⁶ We demonstrated that oligomers of these new building blocks were able to adopt of a novel right-handed 9-helix structure.¹⁷ We hypothesize here that these new foldamers can interact with the early helical structures of $A\beta_{1-42}$ and hIAPP in order to inhibit both the early oligomerization and the late fibrillization of the two amyloid proteins. Thus we report here the

anti-aggregation properties towards both $A\beta_{1-42}$ and hIAPP of 2-amino-4-aminomethyl-1,3-thiazole-5-carboxylic acids based foldamers **1**, **2** and **3** that were newly synthesized and of the previously reported foldamers **4**, **5** and **6**¹⁷ (Fig. 1).

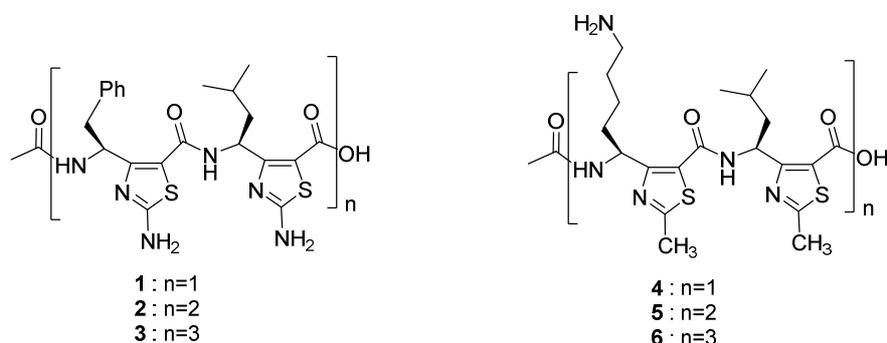
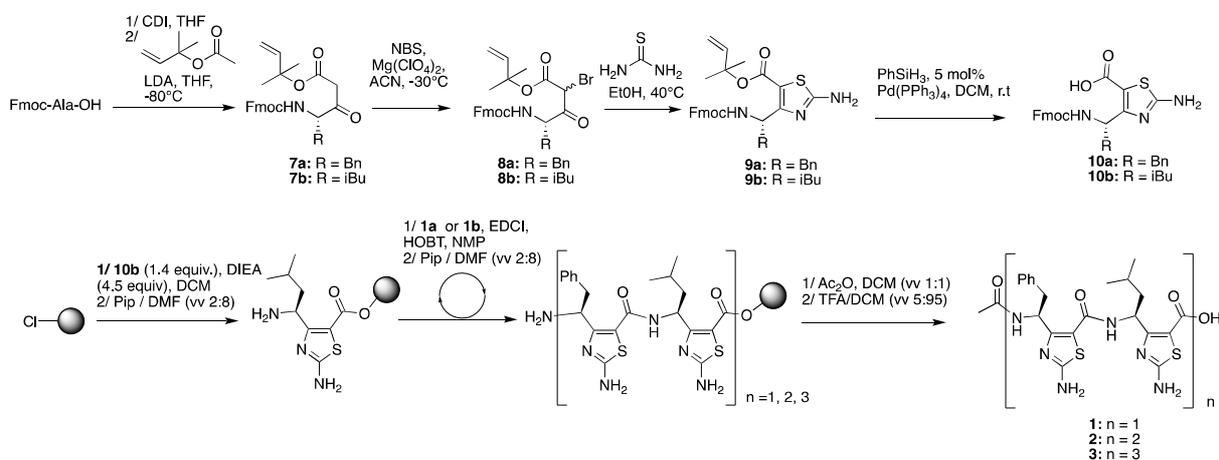


Figure 1. Structure of both series of foldamers: 2-amino-4-aminomethyl-1,3-thiazole-5-carboxylic acid based compounds **1-3** and 4-amino-methyl-2-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylic acid based compounds **4-6**.¹⁷

2. Results and discussion

2.1. Synthesis and structural characterization



Scheme 1. Synthesis of compounds **1-3**

The thiazole-based γ -amino acids **10a**, **10b** were synthesized as previously described by our group.¹⁶ Briefly, as shown in the scheme 1, the *N*-Fmoc-Phe-OH and *N*-Fmoc-Leu-OH were engaged in a cross-Claisen condensation to lead the α -ketoester **7a** and **7b** respectively. Monohalogenations were done using NBS and $Mg(ClO_4)_2$ as catalyst.¹⁸ The resulting α -bromo- β -ketoesters **8a** and **8b** were reacted with thiourea to lead to the fully protected intermediates **9a** and **9b**. Quantitative deprotection of the dimethylallyl esters were carried out with 3 mol% $Pd(PPh_3)_4$ and phenylsilane. The γ -peptides **1-3** were then prepared by solid-phase oligomerization of the *N*-Fmoc protected γ -amino acids **10a** and **10b** on chlorotrityl resin using EDCI and HOBT as coupling reagents. Finally the terminal amine functions were acetylated then the peptides were released from the solid-support by TFA 5% in DCM. RP-HPLC

purification led to oligomers **1**, **2** and **3** in 53%, 33% and 15% respectively. Due to low solubility in water, NMR studies were conducted in CD₃OH. The NMR signals of **1**, **2** and **3** were well dispersed and nearly all ¹H resonances could be assigned combining COSY, TOCSY and ROESY spectra. The sequential assignment was based on the strong NH(*i*)/^γCH(*i*-1) NOE correlations classically observed on the ROESY/NOESY spectra of helical oligomers. The observed strong NH deshielding (> 9 ppm) (Table S1, S2, S3, S1) as well as ³J(NH,^γCH) values < 6 Hz (Table S4, S1) which have been recognized as a structural marker related to the formation of a C₉ hydrogen-bonding pattern were also in agreement with a global helical folding (Fig. S1, S1). However, we observed on **2** (tetramer) and **3** (hexamer) spectra (Fig. S2 b), c), S1) two sets of signals corresponding to the two C-terminus residues. Such conformational variability at the C-terminus probably results from a lack of H bond linked to the presence of a carboxylic acid function on the last residue.

Synthesis and structural characterization of foldamers **4**, **5**, **6** were already reported by some of us¹⁷ and more recently folding of 4-amino-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylic based foldamers was studied in order to establish FT-IR and NMR structural markers.¹⁹

2.2. Inhibition of Aβ₁₋₄₂ and hIAPP fibrillization

The ability of foldamers **1-6** to interact with Aβ₁₋₄₂ and hIAPP fibril formation was investigated using the *in vitro* thioflavin-T (ThT) fluorescence assay. ThT is the standard dye used to monitor the kinetics of aggregation of amyloid proteins because it fluoresces upon binding to β-sheet rich structures.²⁰. The fluorescence curves for Aβ₁₋₄₂ and hIAPP controls displayed the typical sigmoidal pattern, starting with an initial lag phase lasting around 3-5 h for Aβ₁₋₄₂ and 1 h for hIAPP, followed by a rapid polymerization phase ending by a plateau reached after 10-15 h for Aβ₁₋₄₂ and 5 h for hIAPP. Each compound was tested at three different foldamer/ amyloid peptide ratios; 10/1, 1/1 and 0.1/1. Two parameters were deduced from the fluorescence curves: (1) *t*_{1/2}, is defined as the time at which fluorescence has reached half of its maximal value, which gives insight on the rate of the aggregation process and (2) F, the fluorescence intensity at the plateau, which is, in a first approximation, related to the amount of fibrillar material formed.

The three foldamers of the first series, **1-3** displayed no activity on the fibrillization of the Aβ₁₋₄₂ (Table 1). Contrariwise, the second series of compounds **4-6** exhibited a significant and strong inhibitory effect on the fibrillization of Aβ₁₋₄₂ peptide; this effect being foldamer size- and dose-dependent. Indeed, for the dimer derivative **4**, a modest activity was observed at the high 10/1 and 1/14/Aβ₁₋₄₂ ratios. No effect was detected at 0.1/1 ratio of **4**/Aβ₁₋₄₂. At a 10-fold excess, the activity on the rate of aggregation of the tetramer **5** was significantly better than for the dimer **4**; *t*_{1/2} being increased by 127 % (*vs* 21 % for **4**). At this high ratio, the effect on the fluorescence plateau was similar for both dimer **4** and tetramer **5** with a decrease of 35 and 39 % respectively. At 1/1 ratio, a significant effect on the rate of fibrillization was observed for tetramer **5** (*t*_{1/2} increased by 50 %) compared to no effect for **4**. Surprisingly, the effect on the fluorescence plateau was slightly less pronounced for tetramer **5** compared to dimer **4** with a decrease of F by 29 and 15 % respectively. As for dimer **4**, no effect was detected for the 0.1/1 ratio for **5**. The most significant activity on Aβ₁₋₄₂ aggregation was obtained for

the hexameric foldamer **6** with a complete inhibition of the fibrillization process at a **6**/ $A\beta_{1-42}$ ratio of 10/1 (Fig. 2). Compound **6** still displayed a very good efficiency at a 1/1 ratio, identical to the activity of the tetramer **5** at a 10/1 ratio; $t_{1/2}$ being increased by 130 % and F decreased by 40 %. Moreover, this activity was maintained at a **6**/ $A\beta_{1-42}$ substoichiometric ratio of 0.1/1 and was very close to the activity of the tetramer **5** at the 1/1 ratio; $t_{1/2}$ being elongated by 55 % and F decreased by 19 %. To summarize, within the active series of foldamers **4-6**, a size-dependent effect has been highlighted; with hexamer **6** being more active than tetramer **5** which was more active than dimer **4**. The helical structure of **6** seems to bring very promising activities. However, the lack of effect on $A\beta_{1-42}$ fibrillization of the first series of foldamers **1-3**, suggested that even if they adopt similar helicoidal structure the lateral side chains play a preponderant role in the interactions with $A\beta_{1-42}$ and thus in the inhibition of its fibrillization. Indeed, the three butylamine groups mimicking the lysine side chain grafted on the hexamer **6** were highly beneficial for its activity compared with the three benzyl groups mimicking the phenylalanine side chain present in the inactive hexamer **3**. This result associated with the presence of numerous negatively charged residues in the peptidic sequence of $A\beta_{1-42}$ (3 Glu3-11-22, 3 Asp1-7-23 and Ala42), with 2 residues in the central nucleation core,²¹ suggested that electrostatic interactions were likely to be established between $A\beta_{1-42}$ and these foldamers, **4**, **5** and more strongly with **6** and were highly beneficial for the activity of the molecules. The favorable effect of free amine was already reported for two other series of inhibitors: glycopeptidomimetic compounds,^{13c} and piperidine-pyrrolidine peptidomimetics.^{13a-b} In comparison, the potential aromatic and hydrophobic interactions between the benzyl side chains of foldamers **1-3** and $A\beta_{1-42}$ did not seem favorable for their activity on $A\beta_{1-42}$ fibrillization.

The data obtained on the aggregation process of hIAPP showed that the three foldamers of the first series, **1-3** displayed also only very modest to no activity on its fibrillization (Table 2). Indeed, only dimer **1** at 10-fold excess showed a decrease of the fluorescence plateau of 40 % comparing with IAPP control and no effect was observed at 1/1 and 0.1/1 ratios. Tetramer **2** was inactive at the three tested ratios. The tendency of hexamer **3** to self-aggregate and to be organized in structures that bind the ThT in the control experiment at 50 μ M, prevented the evaluation of hIAPP in its presence in at this concentration (**3**/ $A\beta_{1-42}$:10/1). Surprisingly, at 1/1 ratio, hexamer **3** slightly accelerated the aggregation process; the $t_{1/2}$ being reduced by 44 % without any effect on the fluorescence plateau. No effect was observed at 0.1/1 ratio. However, as observed on $A\beta_{1-42}$ fibrillization, foldamers **4-6** displayed a significant foldamer size- and dose-dependent inhibitory effect on the fibrillization of hIAPP. Dimer **4** and tetramer **5**, showed mainly an effect in delaying the aggregation kinetics of hIAPP. An extension of 59 and 159 % of the $t_{1/2}$ was calculated for compounds **4** and **5** respectively at the 10-fold excess ratio. At 1/1 ratio, dimer **4** still slightly delayed the process (+17 % of the $t_{1/2}$) but tetramer **5** had no effect. At 0.1/1 ratio, both **4** and **5** are inactive on the aggregation kinetics. Moreover, without any effect on the fluorescence plateau at the three tested ratios, these foldamers, **4** and **5**, did not decrease the amount of fibers formed. As previously mentioned on $A\beta_{1-42}$, the most significant activity on the aggregation process of hIAPP was observed for the hexameric foldamer **6**, with a $t_{1/2}$ increased by more than 400 % and a decrease of F of more than 60 % at a **6**/ $A\beta_{1-42}$ ratio of 10/1 (Fig. 3). However, this activity is only partially maintained at 1/1 ratio (+21% for $t_{1/2}$ and no effect on F), and completely

suppressed at the **6**/IAPP ratio of 0.1/1. while **6** continued to display a good activity on A β ₁₋₄₂ aggregation at these two ratios.

Thus, the second series of foldamers, **4-6** exhibited a much more pronounced activity on hIAPP fibrillization than the first series of foldamers, **1-3**. A foldamer size-dependent effect had also been highlighted; the hexamer **6** being the most active of the series. However, the hexamer **6** showed a stronger inhibitory capacity against A β ₁₋₄₂ fibrillization than against hIAPP fibrillization. Indeed, **6** displayed very good activities on both kinetics ($t_{1/2}$) and quantity of fibers formed (F) at the three ratios tested (**6**/A β ₁₋₄₂, 10/1, 1/1, 0.1/1). This effect is less pronounced on IAPP aggregation; being important at **6**/A β ₁₋₄₂ ratio of 10/1 on both parameters ($t_{1/2}$ and F), quite modest at stoichiometric ratio on the kinetic parameter ($t_{1/2}$) and null on F and no effect was observed on both parameters at substoichiometric ratio. This more intense effect on A β ₁₋₄₂ aggregation could be attributed to the nature of the side chains of **6** which displayed a terminal free amine which is therefore positively charged. This would be very favorable to establish electrostatic interactions with the numerous anionic residues of A β ₁₋₄₂. On the contrary, since IAPP does not have positively charged residues, these electrostatic interactions cannot be established.

As these foldamers were soluble in aqueous media, we verified that their activity on A β ₁₋₄₂ and hIAPP fibrillization were maintained when solubilized in water (without any DMSO). Indeed, the most active foldamer **6**, dissolved in water displayed a comparable activity in both fluorescence assays as when solubilized in the same amount of DMSO at **6**/amyloid peptide ratios of 10/1 and 1/1. The excellent biological activity associated with solubility under physiological conditions, two essential criteria to purchase biological applications, are satisfied.

In summary, the second series of foldamers, **4-6** displayed a promising inhibitory effect on the fibrillization of both A β ₁₋₄₂ and hIAPP with a more pronounced effect on A β ₁₋₄₂ than on hIAPP. We demonstrated that this effect was concentration and foldamer size dependent; the hexameric foldamer **6** being the most active compound. For this reason, we decided to investigate more in detail its anti-amyloid mechanism of action on both A β ₁₋₄₂ and hIAPP amyloid peptides.

Table 1. Effects of compounds **1-6** on $A\beta_{1-42}$ fibrillization assessed by ThT-fluorescence spectroscopy at a compound/ $A\beta_{1-42}$ ratio of 10/1, 1/1 and 0.1/1 (the concentration of $A\beta_{1-42}$ in this assay is 10 μM). Curves are presented in Fig. S4, SI.

Compounds (Compound/ $A\beta$ ratio) ^[a]	$t_{1/2}$ increase (%) ^[b]	F decrease (%) ^[c]
1 10/1, 1/1, 0.1/1	ne ^[d]	ne
2 10/1, 1/1, 0.1/1	ne	ne
3 10/1 ^[e] , 1/1, 0.1/1	ne	ne
4 10/1	+21±1	-35±5
4 1/1	ne	-29±8
4 0.1/1	ne	ne
5 10/1	+127±13	-39±3
5 1/1	+50±1	-15±8
5 0.1/1	ne	ne
6 10/1	NA ^[f]	-92±2
6 1/1	+130±6	-40±4
6 0.1/1	+55±5	-19±8
6 (water) 10/1	NA	-84±2
6 (water) 1/1	+169±17	-57±6

Parameters are expressed as mean \pm SE, n=3.

^[a] Unless otherwise indicated, compounds were dissolved in DMSO; the final concentration kept constant at 0.5 % (v). ^[b] See supporting information for the calculation of the $t_{1/2}$ increase. ^[c] See supporting information for the calculation of the F decrease.

^[d] ne = no effect, ^[e] compound **3** self-aggregates at 100 μM , ^[f] NA = no aggregation.

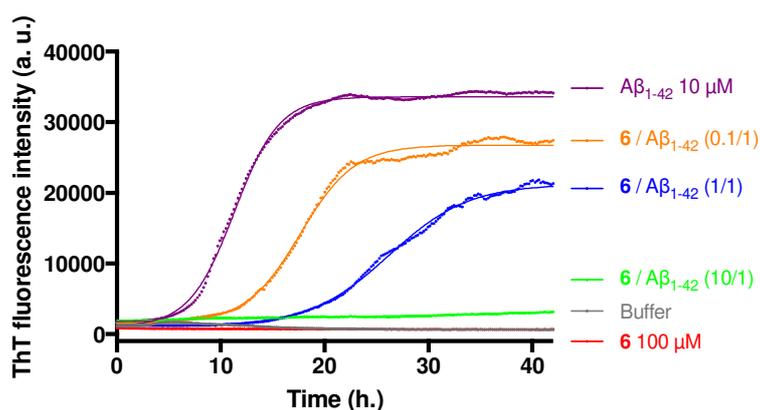


Figure 2. Representative curves of ThT fluorescence assays over time showing $A\beta_{1-42}$ (10 μM) aggregation in the absence (purple curve) and in the presence of **6** at compound/ $A\beta_{1-42}$ ratios of 10/1 (green curves), 1/1 (blue curves) and 0.1/1 (yellow curves). The control curves are represented in red lines and buffer in grey.

Table 2. Effects of compounds **1-6** on hIAPP fibrillization assessed by ThT-fluorescence spectroscopy at a compound/hIAPP ratio of 10/1, 1/1 and 0.1/1 (the concentration of IAPP in this assay is 5 μ M). Curves are presented in Fig. S5, SI.

Compounds (Compound/hIAPP ratio) ^[a]	$t_{1/2}$ increase (%) ^[b]	F decrease (%) ^[c]
1 10/1	+7 \pm 1	-40 \pm 24
1 1/1	ne ^[d]	ne
1 0.1/1	ne	ne
2 10/1, 1/1, 0.1/1	ne	ne
3 10/1 ^[e] ,	SA ^[f] ,	SA
3 1/1	-44 \pm 7	ne
3 0.1/1	ne	ne
4 10/1	+59 \pm 28	ne
4 1/1	+17 \pm 11	ne
4 0.1/1	ne	ne
5 10/1	+159 \pm 50	ne
5 1/1	ne	ne
5 0.1/1	ne	ne
6 10/1	+404 \pm 45	-62 \pm 8
6 1/1	+21 \pm 12	ne
6 0.1/1	ne	ne
6 (water) 10/1	+490 \pm 30	-67 \pm 1
6 (water) 1/1	ne	ne
6+LUV 10/1	+47 \pm 5	-28 \pm 8
6+LUV 1/1	+14 \pm 2	ne
6+LUV 0.1/1	ne	ne

Parameters are expressed as mean \pm SE, n=3.

^[a] Unless otherwise indicated, compounds were dissolved in DMSO; the final concentration kept constant at 3 % (v). ^[b] See supporting information for the calculation of the $t_{1/2}$ increase. ^[c] See supporting information for the calculation of the F decrease.

^[d] ne = no effect, ^[e] compound **3** self-aggregates at 50 μ M, ^[f] SA = saturation of the fluorescence signal.

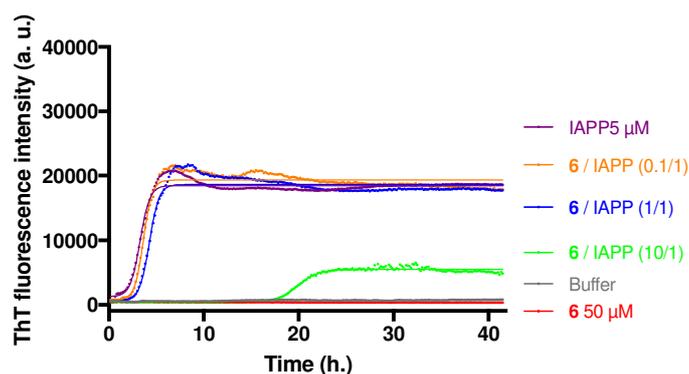


Figure 3. Representative curves of ThT fluorescence assays over time showing hIAPP (5 μM) aggregation in the absence (purple curve) and in the presence of **6** at compound/hIAPP ratios of 10/1 (green curves), 1/1 (blue curves) and 0.1/1 (yellow curves). The control curves are represented in red lines and buffer in grey.

Activity on hIAPP fibrillization in the presence of liposomes

As phospholipids bilayers are known to catalyze and modify hIAPP self-assembly, liposomes were used as membrane models. The conditions were those reported by Miranker *et al.*^{15a} : formation of LUVs (large unilamellar vesicles) from a 1/1 mixture of anionic (dioleoylphosphatidylglycerol [DOPG]) and zwitterionic (dioleoylphosphatidylcholine [DOPC]) lipids of a diameter of 100 nm at 1 mg/mL. In these conditions, Miranker *et al.* showed that hIAPP undergoes a transition from a predominantly random coil conformation to an α -helical structure and then converts to β -sheet rich species. Oligoquinoleine compounds were described as able to maintain the helical structure of hIAPP and to have a strong inhibitory activity on IAPP aggregation in presence of liposomes but were less active without liposomes.^{15a} Contrariwise, it has been demonstrated that common hIAPP inhibitors bearing planar aromatic scaffolds such as resveratrol and acid fuchsin were inactive on hIAPP aggregation in the presence of liposomes. This result was certainly due to the fact that β -sheet structure of hIAPP represent the macromolecular target of this kind of inhibitors. In light of these results, we tested the hexamer **6** in the ThT-fluorescence assay in the presence of LUV. Contrary to oligoquinoleines, the anti-fibrillization of the hexamer **6** was significantly reduced in presence of LUV compared to the experiment in the absence of LUV (Table 2). Rather than suggesting that this hexamer is unable to interact with hIAPP in its helical conformation, this result can be explained by the preferential interaction of hexamer **6** with LUV rather than with hIAPP peptide.

TEM experiments

Transmission electron microscopy (TEM) analyses were performed on compound **6** that showed the most significant effect on $\text{A}\beta_{1-42}$ and hIAPP aggregation in the ThT-fluorescence assays. Images were recorded in the same experimental conditions of the ThT-fluorescence experiments after 42 h of preincubation of the hexamer **6** with 10 μM of $\text{A}\beta_{1-42}$, and 17 h with 5 μM of hIAPP, corresponding in both cases to maximum aggregation in the ThT assays. In the control sample of $\text{A}\beta_{1-42}$, a very dense network of long fibers displaying a typical morphology was observed (Fig. 4, left image). Only shorter,

thinner and very scarce fibers, compared with those observed in the control grid, were visible in the sample containing the A β ₁₋₄₂ incubated with the hexamer **6** at a 10/1 ratio (**6**/A β ₁₋₄₂, Fig. 4, middle image). At 1/1 ratio the network of fibers was denser than in the presence of an excess of **6** and displayed some globular aggregates but the amount of fibrillary material remained significantly less important than in the control grid (Fig. 4, right image). These results validated the ThT-fluorescence data, demonstrating that compound **6** dramatically slowed down the aggregation of A β ₁₋₄₂ and efficiently reduced the amount of typical amyloid fibrils formed.

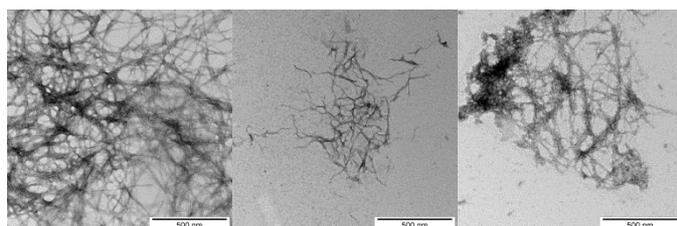


Figure 4. Effect of hexamer **6** on the fibril formation of A β ₁₋₄₂ visualized by TEM. Negatively stained images were recorded after 42 h of incubation of A β ₁₋₄₂ (10 μ M in 10 mM Tris·HCl and 100 mM NaCl at pH 7.4) alone (left) or in the presence of 100 μ M of **6** (middle) and of 10 μ M of **6** (right). Scale bars, 500 nm.

The control sample containing hIAPP alone, displayed an extremely dense network of long and entangled fibers displaying a typical morphology (Fig. 5, left image). Only very short, straight and scarce fibers, compared with those observed in the control grid, were visible in the sample containing hIAPP incubated with **6** at 10/1 ratio (**6**/IAPP, Fig. 5, middle image). At 1/1 ratio, the network of fibers was really denser than in the presence of an excess of the hexamer **6**, and seemed only very slightly less dense than in the control grid. Moreover, this network displayed a comparable morphology to that observed in hIAPP control (Fig. 5, right image). These results were in accordance with the ThT-fluorescence data, indicating that compound **6** dramatically slowed down the aggregation process of hIAPP and efficiently reduced the amount of typical amyloid fibrils formed particularly at the 10/1 ratio of **6**/IAPP.

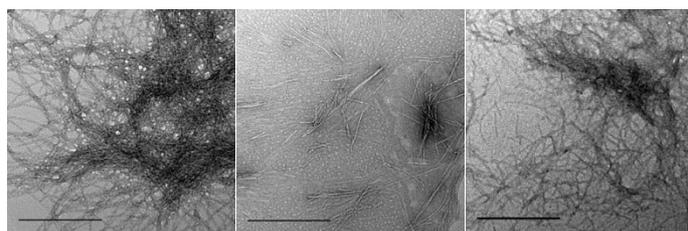


Figure 5. Effect of hexamer **6** on the fibril formation of hIAPP visualized by TEM. Negatively stained images were recorded after 17 h of incubation of hIAPP (5 μ M in 10 mM Tris·HCl and 100 mM NaCl at pH 7.4) alone (left) or in the presence of 50 μ M of **6** (middle) and of 5 μ M of **6** (right). Scale bars, 500 nm.

Activity on A β ₁₋₄₂ and IAPP oligomerization by capillary electrophoresis experiments.

We next evaluated the effect of hexamer **6** on the oligomerization process of A β ₁₋₄₂ and hIAPP peptides using capillary electrophoresis methods developed by some of us,^{22,23} that allow to monitor the soluble species formed during the early A β ₁₋₄₂²² and hIAPP²³ aggregation processes.

The electrophoretic profile obtained for the A β ₁₋₄₂ control sample (Fig. 6a)), showed the typical A β profile over time. At the beginning of the kinetics, the monomer ES was the major visible species associated with a very small amount of small oligomers ES'. The quantity of monomer decreased steadily to totally disappear after 10 h of kinetics and spikes (large insoluble aggregates) appeared in the electrophoretic profiles from 2 h (not visible on the figure). We noticed that large soluble oligomers (LS) are hardly visible in this kinetics, as we have previously observed that their intensity is variable.^{13a,b,c,22} In the presence of 1/1 ratio of compound **6**, (Fig. 6b) the monomer was greatly stabilized until 20h. Indeed, while the peak of monomer was no longer visible in the control kinetics after 10 h, more than 70 % of the monomer remained in presence of the hexamer **6** at 20 h (see peak area of the monomer (ES) related to its maximum peak area in the control sample, Fig. 6c). As the monomer ES, small soluble ES' species seemed also stabilized. Moreover, spikes appeared from 1 h and their quantity were noticeable from 5 h. Like in the control experiment, the larger soluble aggregated species (LS peak) were not formed. Furthermore, a large peak occurring before EOF was observed from the beginning of the kinetics. Its intensity decreased and from 0 to 5h and remained stable after 5 h. This peak was assigned to associated forms of hexamer **6**, which were almost dissolved after 5 h (see electrophoretic profile of **6** control, Fig. 6d). At 0h, these associated forms of hexamer **6** probably trapped some A β ₁₋₄₂ monomer because the ES peak is very small at t₀, while it reappeared after 5h. These results suggested that hexamer **6** was able to greatly delay the oligomerization process of A β ₁₋₄₂ even at the low 1/1 ratio, by strongly stabilizing A β ₁₋₄₂ monomer, described as non-toxic species, and, to a lesser extent small soluble oligomers.

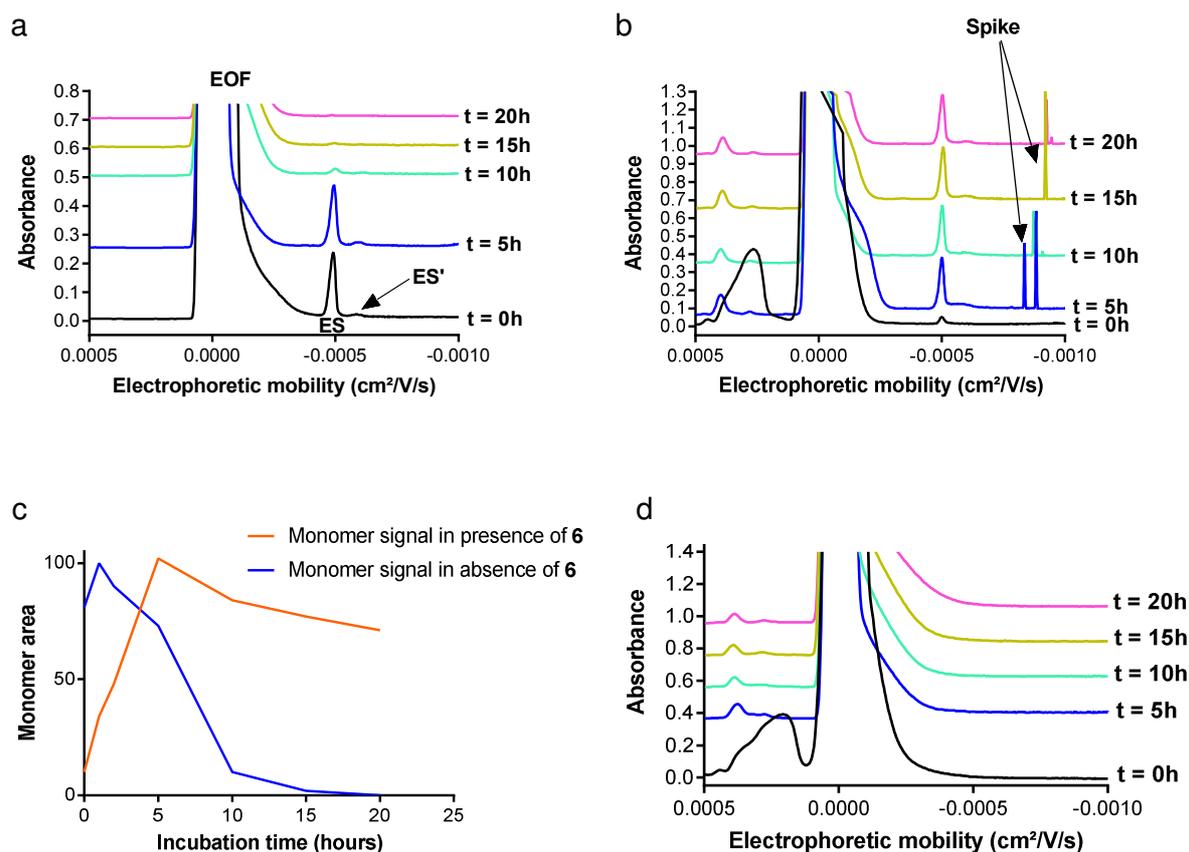


Figure 6. a) Electrophoretic profile of $A\beta_{1-42}$ peptide (100 μM) obtained immediately (0 h) and after 5, 10, 15 and 20 h sample reconstitution. b) Electrophoretic profile of $A\beta_{1-42}$ peptide (100 μM) in presence of **6** (100 μM) obtained immediately (0 h) and after 5, 10, 15 and 20 h after sample reconstitution. c) The evolution of A_{t_x} / A_{t_0} ratio area in the absence or in the presence of **6** at different incubation times, A_{t_x} representing peak 3 area at the time of incubation x while A_{t_0} is the peak 3 area at $t = 1$ h. d) Electrophoretic profile of **6** (100 μM) control obtained immediately (0 h) and after 5, 10, 15 and 18 h after sample reconstitution.

Our recently developed capillary electrophoresis method was used to monitor the soluble species formed during hIAPP oligomerization in the presence of compound **6**.²³ This method allowed the monitoring of three groups of hIAPP soluble species formed during the aggregation process over 20 hours. Peak 3 was composed of monomer with a very small amount of dimer and trimer, whereas peaks 1 and 2 were mainly composed of larger species higher than 100kDa. The control electrophoretic profile of hIAPP alone (Fig. 7a) showed that the quantity of monomer decreased steadily and totally disappeared after 15 h of kinetics and that concomitantly, the quantity of soluble oligomers (peak 2) increased regularly from 0 to 20 h. The evaluation of the amount of oligomers present in peak 1 was impossible because this peak comigrated with the EOF. In the presence of hexamer **6** at 1/1 ratio, the monomer of hIAPP (peak 3) was greatly stabilized until the 15h while it was no longer visible in the control kinetics after 10h. Fig. 7c compared peak 3 areas in the absence and in the presence of **6**, related to its maximum peak area in the control sample (hIAPP alone at 0 h). It appeared that after 10 hours of incubation, more than 60% of hIAPP monomer (probably also in the presence of some dimer and trimer) was maintained in the presence of compound **6** whereas the corresponding peak almost

disappeared in hIAPP control. The quantification of the amount of oligomers present in peak 2 could not be performed because some associated forms of the hexamer **6** comigrated with this peak (seen on the control electrophoretic profile of **6** alone, Fig. 7d). These overall results indicated that compound **6** strongly delayed hIAPP oligomerization by essentially stabilizing the monomer of hIAPP during the first 15h of the kinetics.

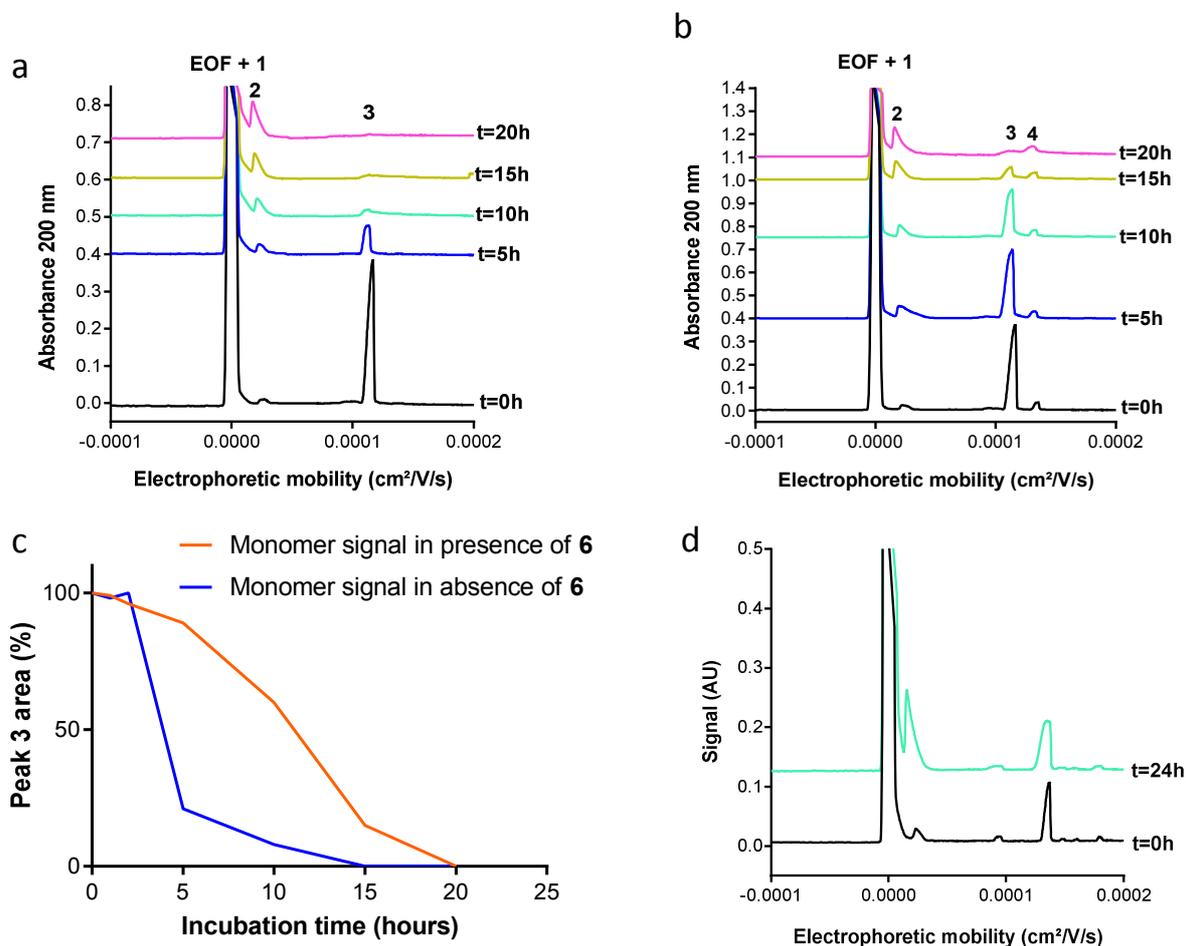
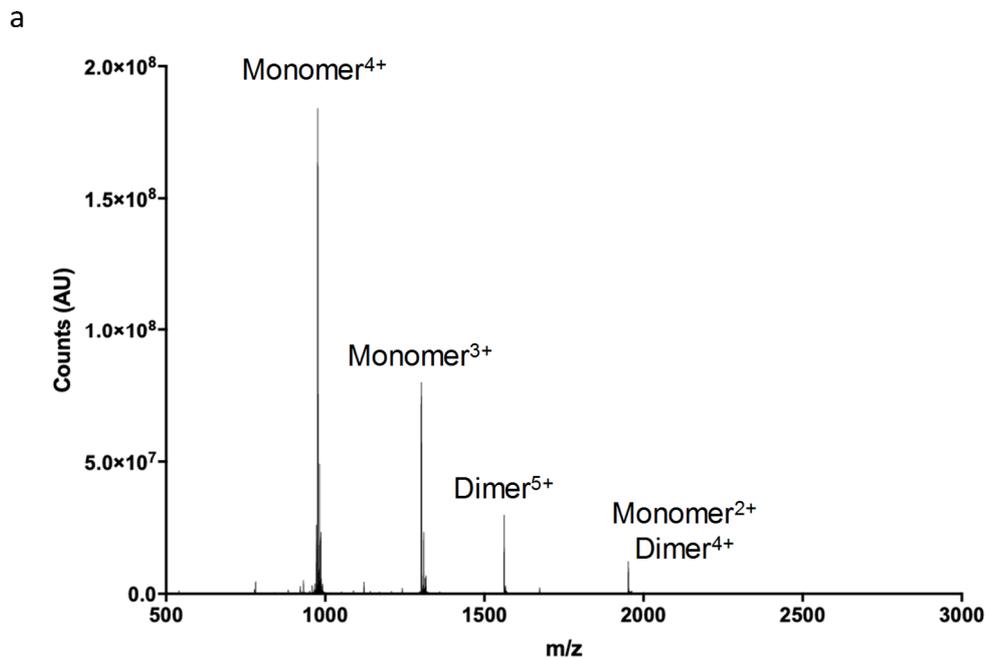


Figure 7. a) Electrophoretic profile of hIAPP peptide (100 μM) obtained immediately (0 h) and 5, 10, 15 and 20 h after sample reconstitution. b) Electrophoretic profile of hIAPP peptide (100 μM) in presence of **6** (100 μM) obtained immediately (0 h) and 5, 10, 15 and 20 h after sample reconstitution. c) The evolution of A_{tx} / A_{t0} ratio area in the absence or in the presence of **6** at different incubation times, A_{tx} representing peak 3 area at the time of incubation x while A_{t0} is the peak 3 area at $t = 0\text{h}$. d) Electrophoretic profile of **6** (100 μM) control obtained immediately (0 h) and 24 h after sample reconstitution.

IMS-MS experiments

IMS-MS has been developed in order to identify the different species involved in the oligomerization process as well as to determine the activity of inhibitors towards this oligomerization.²⁴ However, we observed a strong dissociation phenomenon of the oligomers even when we used soft conditions (see supplementary info S15), making it non-suitable for the *in vitro* quantitative monitoring of the oligomerization and of the kinetics. Nevertheless, IMS-MS remains adapted for a qualitative analysis in order to study the potential interactions between the peptide and the inhibitor. We used here this

characteristic to probe the inhibition of hIAPP oligomers and to determine the potential monomer and/or oligomers targeted species of the most promising compound **6**. Using the same buffer as CE for IAPP (AA 50 mM pH 3,7 at room temperature), IMS-MS of of hIAPP (50 μ M) showed from monomer to hexamer of hIAPP, within several charge states for each species (Fig. 8a and b). The peptide was incubated in the same conditions as described previously in presence of the hexamer **6** at different ratios **6**/hIAPP (1/1, 5/1 or 10/1). In the presence of **6**, large oligomers (tetramer, pentamer, hexamer) completely disappeared at all ratios (Fig.s8 c, d, e) and small oligomers (dimer, trimer) were reduced from the 5/1 ratio. We noticed that the trimer totally disappeared at 10/1 ratio; the dimer being the only oligomer detected at this ratio.



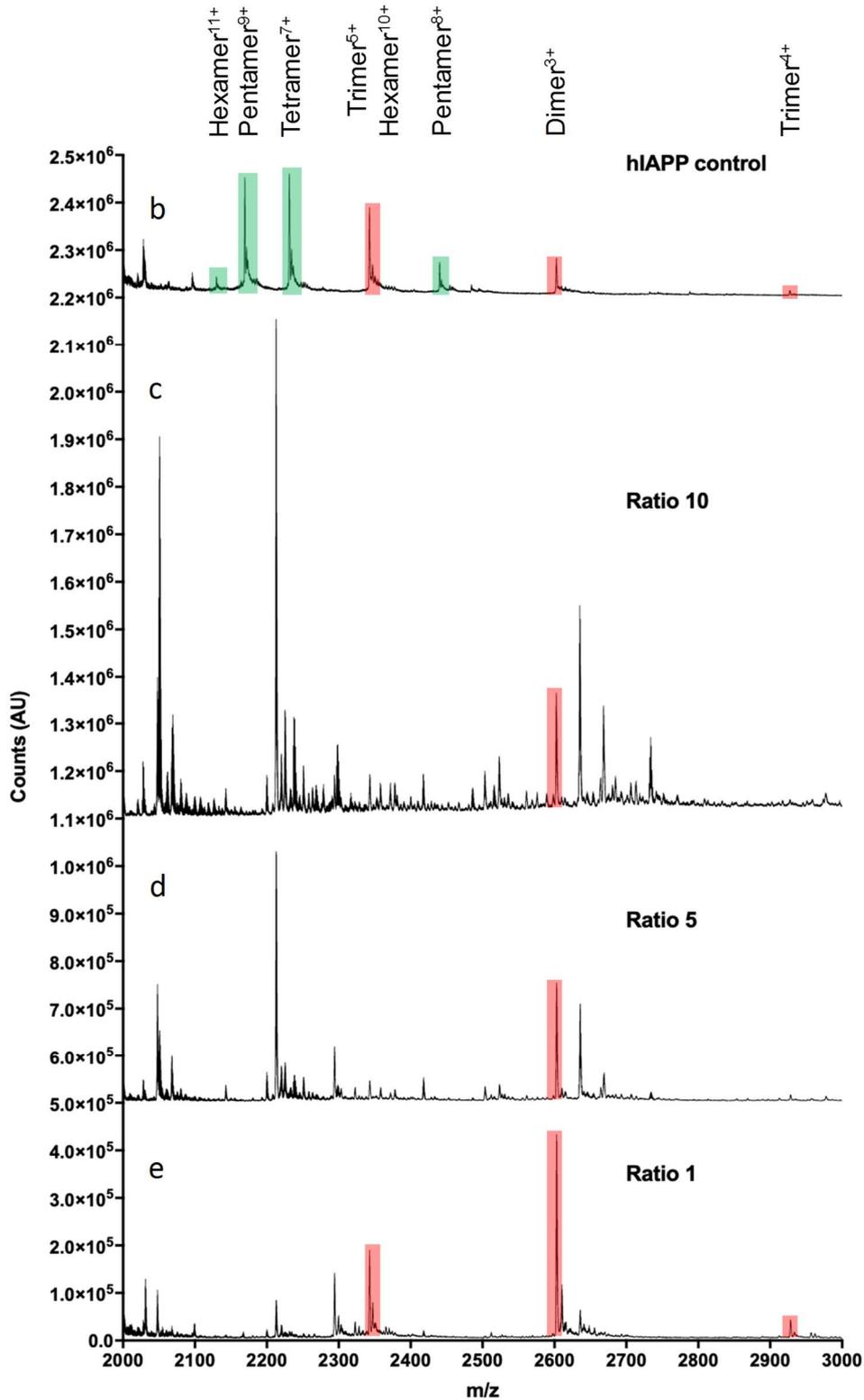


Figure 8. ESI-MS mass spectrum of hIAPP alone (50 μ M) from m/z a) 500-200 and b) 2000-3000 highlighting the small oligomers (in red) and large oligomers (in green). c) ESI-MS mass spectrum of hIAPP in presence of **6** at **6**/hIAPP ratios of 10/1, d) 5/1, and e) 1/1.

To allow a better accurate quantification of the small oligomers, a lower concentration of hIAPP was used (5 μ M instead of 50 μ M, but same protocol) because the quantification in the previous experiments was impossible due to saturation of some monomer signals. The low hIAPP concentration used here made uncertain the absence of large oligomers (tetramer, pentamer and hexamer). Those large oligomers were not detectable. However, we cannot assume that they are really absent or if it was due to the low concentration used in this experiment. We then focused on the smaller ones only (dimer and trimer). As expected, the relative quantity of dimer and trimer compared to monomer decreased when the ratio was higher (Fig. 9). We can conclude that the presence of hexamer **6** dramatically decreased the proportion of small oligomers that almost totally disappeared at the high ratios.

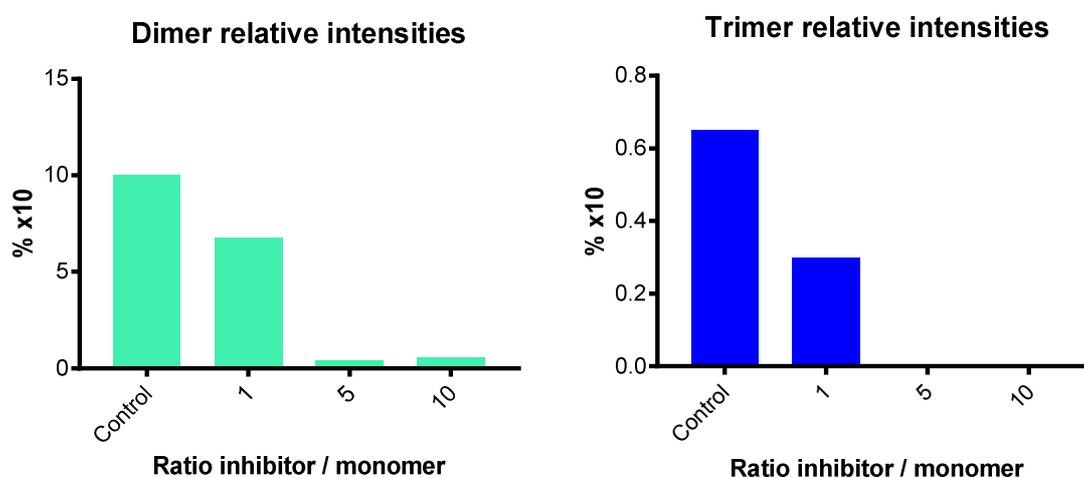


Figure 9. Relative intensities calculated from the ESI-MS mass spectrum and using the following ratio: sum of oligomer intensities / sum of monomer intensities. Percentages are multiplied by 10 in order to better see the variations.

Next, we tried to find out with which oligomeric species of hIAPP compound **6** preferentially interacted. Control experiments of **6** alone exhibited a lot of signals, all assigned as different charge states or fragments. In the experiment where hIAPP is in the presence of **6**, characteristic peaks of complexes between hIAPP monomers and **6** appeared, as confirmed by Tandem MS studies performed on those signals (at the 10/1 ratio of **6**/IAPP). As expected, the higher the ratio the higher the proportion of monomeric hIAPP/**6** complexes (Fig. 10). The calculation was performed the same way as it was done for the oligomers. These results demonstrated that the hexamer **6** was mainly in interaction with the monomeric form of IAPP. It has been demonstrated that this hexameric compound **6** adopted an helical conformation. Regarding the evolution of the conformations of the different species involved in the amyloid cascade of IAPP, the monomer should be the only one in α -helix, assuming the oligomerization occurs by the stacking of β -sheets units. Our observations were coherent with expected results from the theory; hexamer **6** in helical conformation preferentially interacted with IAPP species being in helical conformation, namely the monomer.

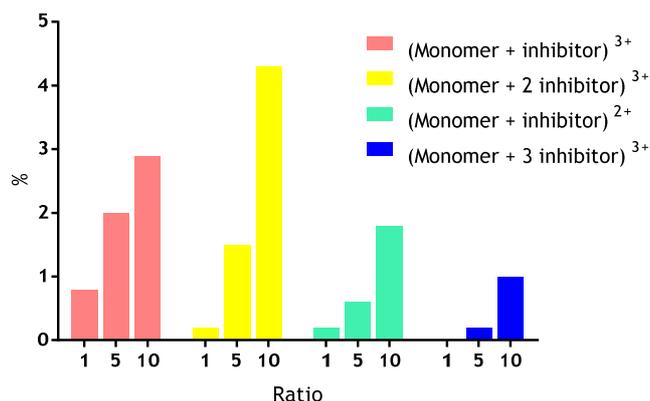


Figure 10. Relative intensities of hIAPP monomer/**6** complexes observed at different ratios of **6**/hIAPP (1/1, 5/1, 10/1) and calculated from the ESI-MS mass spectra.

A strong dissociation phenomenon has been observed for large oligomers with this techniques. This could explain why no complex between **6** and hIAPP oligomers are visible here. However, large oligomers are still visible even with the dissociation occurring. That is why we suppose here that if no complex between **6** and hIAPP oligomers are visible, it is because they are not formed at all. For more details about dissociation, see supplementary info S15.

Protection against A β ₁₋₄₂ and hIAPP toxicity

Foldamer **6** is currently investigated to determine its ability to reduce the toxicity of aggregated A β ₁₋₄₂ to SH-SY5Y neuroblastoma cells and the toxicity of hIAPP to INS-1 pancreatic cells.

Conclusion

The synthesis of a new series of foldamers based on the 2-amino-4-aminomethyl-1,3-thiazole-5-carboxylic acid γ -amino-acid building block is described. The dimer **1** encloses one benzyl side chain and one isobutyl side chain, tetramer **2** and hexamer **3** are respectively composed of two and three dimers. The activity of compounds **4-6** towards the aggregation of two amyloid proteins $A\beta_{1-42}$ and hIAPP involved in Alzheimer's disease and hIAPP was compared with that of a second series of foldamers **4-6** previously synthesized.¹⁷ The two series differs by the presence of a methyl in position 2 instead of an amine and a butylamine chain at the γ -position in dimer **4**, instead of a benzyl side chain dimer **1**. Both series of foldamers share a common global helical folding reported here for foldamers **1-3** and previously reported for foldamers **4-6**.¹⁷ The capacity of the six foldamers **1-6** to inhibit the aggregation of $A\beta_{1-42}$ and hIAPP was investigated by conducting; *i*) Thioflavin-T fluorescence assays combined with TEM experiments in order to evaluate the effect on the late fibrillization and *ii*) capillary electrophoresis analyses associated with IMS-MS experiments to deeper investigate the activity on the early oligomerization process. Foldamers of the first series **1-3**, displayed almost no effect on $A\beta_{1-42}$ and hIAPP fibrillization. However, the second series of foldamers **4-6** exhibited a significant and important inhibitory effect on $A\beta_{1-42}$ and hIAPP fibrillization, the activity being slightly stronger on $A\beta_{1-42}$. This effect was dose and foldamer size dependent. Indeed, hexamer **6** displayed the most promising $A\beta_{1-42}$ and hIAPP anti-fibrillization activity. We bring the proof that the helical folding is a promising strategy to inhibit the aggregation process of both $A\beta_{1-42}$ and hIAPP. However, hexamer **6** presented a well-defined 9-helix structure, while hexamer **3** showed a more conformational variability at the C-terminus. This can explain the lack of activity of **3**. Furthermore, the difference of activity might also be explained by the nature of the lateral side chains grafted on the foldamers. Indeed, the three butylamine groups anchored on the hexamer **6** seem highly beneficial compared to the three benzyl groups present in the inactive hexamer **3**. This result suggests that electrostatic interactions, rather than pi-pi interactions possible with foldamer **3**, are beneficial for compound **6** to interact with the amyloid proteins Especially since hexamer **6** is more active on $A\beta_{1-42}$ fibrillization and oligomerization than on hIAPP, we can suspect that the presence of free amine groups allow ionic interactions of **6** with acidic residues of $A\beta_{1-42}$... On the contrary, hIAPP does not have any positively charged residues neither in the amyloidogenic sequence N₂₂FGAIL₂₇²⁵, neither at the C-terminal residue. Therefore, in the case of hIAPP, the presence of carbon side chains (butyl and pentyl) in **6** is probably sufficient to establish efficient hydrophobic interactions with hIAPP, but additional electrostatic interactions can increase the affinity for $A\beta_{1-42}$. Deeper investigations on the early oligomerization processes of $A\beta_{1-42}$ and IAPP performed by CE and IMS-MS confirm our initial hypothesis that foldamer **6** interacts selectively with monomeric species of $A\beta_{1-42}$ and hIAPP and that **6** preserves the monomeric, non-toxic, species of $A\beta_{1-42}$ and hIAPP.

Experimental section

Synthesis of foldamers 1-3

The protocol of synthesis of **1-3** are given in Supporting Information

Fluorescence-Detected ThT Binding Assay (A β ₁₋₄₂).

A β ₁₋₄₂ was purchased from American Peptide and ThT was obtained from Sigma. The peptide was dissolved in an aqueous 1% ammonia solution to a concentration of 1 mM and then, just prior to use, was diluted to 0.2 mM with 10 mM Tris-HCl and 100 mM NaCl buffer (pH 7.4). Stock solutions of foldamers were dissolved in DMSO or in water with the final concentration kept constant at 0.5% (v/v). ThT fluorescence was measured to evaluate the development of A β ₁₋₄₂ fibrils over time using a fluorescence plate reader (Fluostar Optima, BMG labtech) with standard 96-well black microtiter plates (final volume in the wells of 200 μ L). Experiments were started by adding the peptide (final A β ₁₋₄₂ concentration equal to 10 μ M) into a mixture containing 40 μ M ThT in 10 mM Tris-HCl and 100 mM NaCl buffer (pH 7.4) with and without the foldamers at different concentrations (100, 10, 1 μ M) at room temperature. The ThT fluorescence intensity of each sample (performed in duplicate or triplicate) was recorded with 440/485 nm excitation/emission filters set for 42 h performing a double orbital shaking of 10 s before the first cycle. The fluorescence assays were performed between 2 and 4 times on different days, with the same batch of peptide. The ability of compounds to inhibit A β ₁₋₄₂ aggregation was assessed considering both the time of the half-aggregation ($t_{1/2}$) and the intensity of the experimental fluorescence plateau (F). The relative increase of $t_{1/2}$ is defined as the experimental $t_{1/2}$ in the presence of the tested compound relative to the one obtained without the compound and is evaluated as the following percentage: $[t_{1/2}(\text{A}\beta + \text{compound}) - t_{1/2}(\text{A}\beta)] / t_{1/2}(\text{A}\beta) \times 100$. The decrease of the experimental plateau is defined as the intensity of experimental fluorescence plateau observed with the tested compound relative to the value obtained without the compound and is evaluated as the following percentage: $(\text{FA}\beta + \text{compound} - \text{FA}\beta) / \text{FA}\beta \times 100$.

Fluorescence-Detected ThT Binding Assay (IAPP)

IAPP was purchased from Bachem. IAPP was dissolved in pure hexafluoro-isopropanol (HFIP) at a concentration of 1 mM and incubated for 1 hour at room temperature to dissolve any preformed aggregates. Next, HFIP was evaporated with dry nitrogen gas followed by vacuum desiccation for 3 hours. The resulting peptide film was then dissolved in DMSO to obtain stock solutions of IAPP (0.2 mM). Stock solutions of foldamers were dissolved in DMSO (10, 1 and 0.1 mM). The concentration of DMSO was kept constant at 3% (v/v) in the final volume of 200 μ L. Thioflavin-T binding assays were used to measure the development of fibrils over time. A plate reader (Fluostar Optima, BmgLabtech) and standard 96-wells flat-bottom black microtiter plates in combination with a 440 nm excitation filter and a 485 nm emission filter were used. The ThT assay was started by adding 5 μ L of a 0.2 mM IAPP stock solution and 1 μ L of stock solutions of compounds to test to a mixture of 10 μ M ThT and 10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl at pH 7.4. The concentration of IAPP was held constant at 5 μ M and compounds were added to yield compound/IAPP ratios of 10/1, 1/1 and 0.1/1. The ThT assays was performed in triplicate. The ability of compounds to inhibit IAPP aggregation was assessed

considering both the time of the half-aggregation ($t_{1/2}$) and the intensity of the experimental fluorescence plateau (F). The relative increase of $t_{1/2}$ is defined as the experimental $t_{1/2}$ in the presence of the tested compound relative to the one obtained without the compound and is evaluated as the following percentage: $[t_{1/2} (\text{IAPP} + \text{compound}) - t_{1/2} (\text{IAPP})] / t_{1/2} (\text{IAPP}) \times 100$. The decrease of the experimental plateau is defined as the intensity of experimental fluorescence plateau observed with the tested compound relative to the value obtained without the compound and is evaluated as the following percentage: $(\text{FIAPP} + \text{compound} - \text{FIAPP}) / \text{FIAPP} \times 100$.

Transmission Electron Microscopy.

A β_{1-42} experiments: Samples were prepared under the same conditions as those in the ThT-fluorescence assay except that ThT is not added. Aliquots of A β_{1-42} (10 μM in 10 mM Tris-HCl and 100 mM NaCl, pH 7.4 in the presence and absence of hexamer **6**) were adsorbed onto 300-mesh carbon grids for 2 min, washed, and dried. The samples were negatively stained for 45 s on 2% uranyl acetate in water. After draining off the excess of staining solution and drying, images were obtained using a ZEISS 912 Omega electron microscope operating at an accelerating voltage of 80 kV.

hIAPP experiments: Samples were prepared under the same conditions as in the ThT-fluorescence assay. Aliquots of IAPP (5 μM in 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.4 in the presence and absence of hexamer **6**) were adsorbed onto 300-mesh carbon grids for 2 min, washed and dried. The samples were negatively stained for 45 s. on 2 % uranyl acetate in water. After draining off the excess of staining solution and drying, the grids were observed using a JEOL 2100HC TEM operating at 200 kV with a LaB6 filament. Images were recorded in zero-loss mode with a Gif Tridiem energy-filtered-CCD camera equipped with a 2k x 2k pixel-sized chip (Gatan inc., Warrendale, PA). Acquisition was accomplished with the Digital Micrograph software (versions 1.83.842, Gatan inc., Warrendale, PA).

Capillary electrophoresis protocol (A β_{1-42})

Sample preparation: the commercial A β_{1-42} was dissolved upon reception in 0.16% NH₄OH (at 2 mg/mL) for 10 minutes at 20°C, followed by an immediate lyophilization. The dried sample was then stored at -20°C until use. CE-UV experiments were carried out with a P/ACE™ MDQ Capillary Electrophoresis System (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) equipped with a PDA (photodiode array) detector. UV Detection was performed at 190 nm. The prepared sample (as previously described) was dissolved in 20 mM phosphate buffer at pH 7.4, containing DMSO for control or stock solutions of hexamer **6** to keep constant the DMSO/phosphate buffer ratio at 2.5%. The final peptide concentration was 100 μM with a peptide/compound ratio of 1/1. For the CE separation of A β oligomers, it was used a fused silica capillary of 80 cm (10.2 cm to the detector) with an internal diameter of 50 μm . The buffer separation solution was a 80 mM phosphate buffer at pH 7.4. The separation was carried out under -20 kV and constant temperature at 25°C. The samples were injected by hydrodynamic injection at 0.5 psi for 10 s. After each run, the capillary was rinsed for 3.5 min with NaOH 1 M, 3.5 min with water, 1 min with DMSO 10 % and 1 min with SDS 50 mM.

Capillary electrophoresis protocol (hIAPP)

Sample preparation: the commercial hIAPP was dissolved upon reception in pure HFIP at 1 mM and incubated for 1 hour at room temperature, followed by an aliquoting and an immediate evaporation under nitrogen flow, then vacuum and storage at -20°C. Just before each kinetics, the dried peptide was reconstituted in 50 mM ammonium acetate buffer pH 3.7 at 100 µM. Hexamer 6 was dissolved in DMSO and added to the peptide solution to reach 100 µM.

CE-UV experiments were carried out with a MDQ Instrument (SCIEX, Framingham, MA, USA) equipped with a UV detector. Detection was performed at 200 nm. Bare fused silica capillaries (50 µm id x 365 µm od) were purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). Silica capillaries were coated with a 0.2% polybrene solution. Briefly, solid polybrene was dissolved in water under heating at 50°C. Bare fused silica capillary was preconditioned with MeOH, NaOH 1M, NaOH 0.1M and with H₂O for in-between rinsing. All flushings were done at 20 psi for 15 min. The capillary was then coated with the 0.2% polybrene solution for 15 min at 20 psi. The coated capillary was then flushed with the background electrolyte (BGE) at 20 psi for 45 min and equilibrated under -25 kV for 2 hours. Polybrene capillaries were 60 cm total length (49.8 cm to the detector). The BGE was a 50 mM ammonium acetate buffer, pH 3.7. The separation was carried out under -25 kV at 25°C. The sample was injected from the inlet by hydrodynamic injection at 0.8 psi for 10 s. After each run, the capillary was rinsed for 5 min with 1 M NaOH, 5 min with water, recoated for 10 min with 0.2% polybrene, and finally equilibrated with the running buffer for 5 min at 20 psi.

ESI-IMS-MS experiments were carried out with a Synapt G2-SⁱQ-TOF instrument (Waters, Milford, MA, USA) equipped with an ESI interface. Positive ion mode was used. The instrument has a traveling-wave IMS device situated between the quadrupole and the TOF analyzers. Samples of hIAPP (as previously described for the CE-UV experiments) were injected by direct infusion through a syringe at 5 µL/min. Main IMS-MS parameters are detailed the following: the capillary voltage was set at 2.4 kV, with the sampling cone and source offset at 70V. Source and desolvation temperatures were respectively 40 °C and 75°C. Data were processed with MassLynx and Driftscope.

Supplementary info is available in Annex III of this thesis manuscript.

Acknowledgment

IDEX Paris Saclay (IDI 2015, ANR-11-IDEX-0003-02) is thanked for financial support for Corentin Berardet. Yasmine Iacone (Erasmus student from the Università degli Studi di Milano) is thanked for her contribution to electrophoresis capillary experiments on Aβ₁₋₄₂. Ghislaine Frébourg (Institut de Biologie Paris Seine (IBPS)/FR 3631, Service de Microscopie Electronique, Université Pierre et Marie Curie (UPMC), France) is thanked for her contribution to cryo-electron microscopy. The Laboratory BioCIS is a member of the Laboratory of Excellence LERMIT supported by a Grant from ANR (ANR-10-LABX-33).

References

- 1- A. Chaudhury, C. Duvoor, V.S. Reddy Dendi, S. Kraleti, A. Chada, R. Ravilla, A. Marco, N.S. Shekhawat, M.T. Montales, K. Kuriakose, A. Sasapu, A. Beebe, N. Patil, C.K. Musham, G.P. Lohani, W. Mirza, , *Front Endocrinol.* 8 (2017) 6. doi:10.3389/fendo.2017.00006.
- 2- <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2016.pdf>
- 3- a) Messier C, *Neurobiol Aging.* 2005, Suppl 1:26-30; b) S Roriz-Filho J¹, Sá-Roriz TM, Rosset I, Camozzato AL, Santos AC, Chaves ML, Moriguti JC, Roriz-Cruz M. *Biochim Biophys Acta.* 2009, 1792, 432-43 ; c) A. Jayaraman, C. J. Pike, *Curr Diab Rep.* 2014, 14, 476.
- 4- a) M. K. Song, D. S. Bischoff, A. M. Song, K. Uyemura, D. T. Yamaguchi, *BBA Clinical* 7 (2017) 41–54; b) M. A. Schilling *J. Alzheimers Dis.* 51 (2016) 961–977 c) D. A. Butterfield, F. Di Domenico, E. Barone, *Biochim. Biophys. Acta* 2014, 1842, () 1693–1706.
- 5- P. C. Ke, M.-A. Sani, F. Ding, A. Kaminen, I. Javed, F. Separovic, T. P. Davis, R. Mezzenga, *Chem. Soc. Rev.*, 2017, 46, 6492-6531
- 6- R. Riek, D. S. Eisenberg, *Nature*, 2016, 539, 227-235.
- 7- a) L.-M. Yan, A. Velkova, M. Tatarek-Nossol, E. Andreetto, A. Kapurniotu *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 1246 –1252; b) E. Andreetto, L.-M. Yan, M. Tatarek-Nossol, A. Velkova, R. Frank, A. Kapurniotu, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 3081 –3085
- 8- B. Ren, Y. Liu, Y. Zhang, Y. Cai, X. Gong, Y. Chang, L. Xu, J. Zheng, *ACS Chem Neurosc.* 2018, 9, 1215-1224
- 9- a) F. Belluti, A. Rampa, S. Gobbi, *Exp. Opin. Ther. Pat.*, 2013, 23, 581-596; b) S.-B. Syarifah-Noratiqah, I. Naina-Mohamed, M. S. Zulfarina, H.M.S Qodriyah. *Current Drug Targets*, 2018, 19, 927 – 937
- 10- Pithadia, A.; Brender, J. R.; Fierke, C. A.; Ramamoorthy, A. *J. Diabetes Res.* 2016, 2016:2046327
- 11- a) I. Benilova, E. Karran, B. De Strooper *Nat. Neurosci.*, 2012, 15, 349-357; b) L. Haataja, T. Gurlo, C.J. Huang, P.C. Butler, *Endocr. Rev.* 2008, 29, 303-316; c) Y. Bram, A. Frydman-Marom, I. Yanai, S. Gilead, R. Shaltiel-Karyo, N. Amdursky, E. Gazit, *Sci. Rep.* 2014, 4, 4267
- 12- D. Goyal, S. Shuaib, S. Mann, B. Goyal, *ACS Comb. Sci.* 2017, 19, 55–80
- 13- a) S. Pellegrino, N. Tonali, E. Erba, J. Kaffy, M. Taverna, A. Contini, M. Taylor, D. Allsop, M. L. Gelmi, S. Ongeri *Chem. Sci.*, 2017, 8, 1295 – 1302; b) N. Tonali, J. Kaffy, J.-L. Soulier, M.L. Gelmi, E. Erba, M. Taverna, C. van Heijenoort, T. Ha-Duong, S. Ongeri ; *Eur. J. Med. Chem.*, 2018, 154, 280-293; c) J. Kaffy, D. Brinet, J-L Soulier, I. Correia, N. Tonali, K. F. Fera, Y. Iacone, A. R. F. Hoffmann, L. Khemtemourian, B. Crousse, M. Taylor, D. Allsop, M. Taverna, O. Lequin, S. Ongeri, *J. Med. Chem.* 2016, 59, 2025–2040; d) L. Tran, J. Kaffy, S. Ongeri; T. Ha-Duong, *ACS Chem. Neurosci.* 2018, DOI: 10.1021/acscchemneuro.8b00341.
- 14- a) C. Nerelius, A. Sandegren, H. Sargsyan, R. Raunak, H. Leijonmarck, U. Chatterjee, A. Fisahn, S. Imarisio, D. A. Lomas, D. C. Crowther, R. Strömberg, and J. Johansson, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106, 23, 9191-9196; b) L.Fülöp, I. M. Mándity, G. Juhász, V. Szegedi, A. Hetényi, E. Wéber, Z. Bozsó, D. Simon, M. Benkő, Z. Király, T. A. Martinek TA. *PLoS ONE*, 2012, 7, 7, e39485 ; c) D.

- Honcharenko, P. P. Bose, J. Maity, F. R. Kurudenkandy, A. Juneja, E. Flöistrup, H. Biverstål, J. Johansson, L. Nilsson, A. Fisahn, R. Strömberg, *Org. Biomol. Chem.* 2014 12 6684-6693; d) E. Brandenburg, H. von Berlepsch, U. I. M. Gerling, C. Böttcher, B. Kokschi, *Chem. Eur. J.* 2011 17 10651-61; e) M. Bartolini, C. Bertucci, M. L. Bolognesi, A. Cavalli, C. Melchiorre, V. Andrisano, *ChemBioChem* 2007 8 2152-61 ; f) A. Henning-Knechtel, I. Chehade, M. Magzoub, A. D. Hamilton *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, 139, 17098–17108.
- 15- a) S. Kumar, M. A. Brown, A. Nath, A. D. Miranker, *Chem. Biol.*, 2014, 21, 775-781; b) S. Kumar, D. Miranker, *ChemComm*, 2013, 49, 4749-4751; c) S. Kumar, M. Birol, D. E. Schlamadinger, S. P. Wojcik, E. Rhoades, D. Miranker *Nature comm.* 2016 doi DOI: 10.1038/ncomms11412
- 16- L. Mathieu, C. Bonnel, N. Masurier, L. T. Maillard, J. Martinez, V. Lisowski, *Eur. J. Org. Chem.* 2015, 2015, 2262-2270.
- 17- L. Mathieu, B. Legrand, C. Deng, L. Vezenkov, E. Wenger, C. Didierjean, M. Amblard, M.-C. Averlant-Petit, N. Masurier, V. Lisowski, J. Martinez, L. T. Maillard, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2013, 125, 6122 –6126
- 18- D. Yang, Y. L. Yan, B. Lui, *The Journal of organic chemistry* 2002, 67, 7429-7431.
- 19- C. Bonnel, B. Legrand, J.-L. Bantignies, H. Petitjean, J. Martinez, N. Masurier, L. T. Maillard, *Org. Biomol. Chem.* 2016, 14, 8664-8669.
- 20- LeVine 3rd, H. *Methods Enzymol.* 1999, 309, 274-284.
- 21- a) Ahmed, M.; Davis, J.; Aucoin, D.; Sato, D.; Ahuja, S.; Aimoto, S.; Elliott, J. J.; Van Nostrand W. E.; O Smith. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010, 17, 561-567; b) Hochdörffer, K.; März-Berberich, J.; Nagel-Steger, L.; Epple, M.; Meyer-Zaika, W.; Horn, A.H.C.; Sticht, H.; Sinha, S.; Bitan, G.; Schrader, T. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 4348-4358.
- 22- Brinet, D.; Kaffy, J.; Oukacine, F.; Glumm, S.; Onger, S.; Taverna, M. *Electrophoresis* 2014, 35, 3302-3309.
- 23- C. Berardet, J. Kaffy, S. Onger, M. Taverna, *J. Chromato. A* 2018, doi: 10.1016/j.chroma.2018.10.006
- 24- a) L.M. Young, P. Cao, D.P. Raleigh, A.E. Ashcroft, S.E. Radford, , *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 660–670. b) L.M. Young, J.C. Saunders, R.A. Mahood, C.H. Revill, R.J. Foster, L.H. Tu, D.P. Raleigh, S.E.Radford, A.E. Ashcroft, Screening and classifying small-molecule inhibitors of amyloid formation using ion mobility spectrometry-mass spectrometry, *Nat Chem.* 7 (2015) 73–81. c) L.M. Young, J.C. Saunders, R.A. Mahood, C.H. Revill, R.J. Foster, A.E. Ashcroft, S.E. Radford, , *Methods.* 95 (2016) 62–69. d) I. Riba, P.E. Barran, G.J.S. Cooper, R.D. Unwin, *Int. J. Mass Spectrom.* 391 (2015) 47–53. d) H. Li, E. Ha, R.P. Donaldson, A.M. Jeremic, A. Vertes, *Anal Chem.* 87 (2015) 9829–9837.
- 25- R. Akter, P. Cao, H. Noor, Z. Ridgway, L.-H. Tu, H. Wang, A. G. Wong, X. Zhang, A. Abedini, A. M. Schmidt, D. P. Raleigh, *J. Diabetes Res.* 2016, 2798269

3. Compléments d'études – inhibiteurs peptidomimétiques mimes de β -hairpin.

Après avoir montré l'activité d'un inhibiteur de type hélicoïdal, nous avons appliqué la même méthodologie d'étude d'activité à d'autres composés de type peptidomimétiques capables d'adopter une structure en β -hairpin (épingle à cheveux). L'objectif était d'interagir avec des espèces métastables très précoces monomériques ou oligomériques structurées en feuillet β . Ces molécules viendraient donc s'insérer dans les structures β de hIAPP et déstabiliseraient les interactions établies entre les brins β intra et intermoléculaires, selon le schéma proposé en Figure 65. Le brin supérieur, un peptidomimétique est conçu afin de perturber les interactions intramoléculaires entre les brins β de hIAPP. Le brin inférieur en mimant la structure primaire de la séquence amyloïdogénique « FGAIL » de hIAPP permet quant à lui de perturber les interactions intermoléculaires entre deux monomères de hIAPP. Ceci empêcherait l'addition de nouvelles molécules de hIAPP, et inhiberait donc son agrégation.

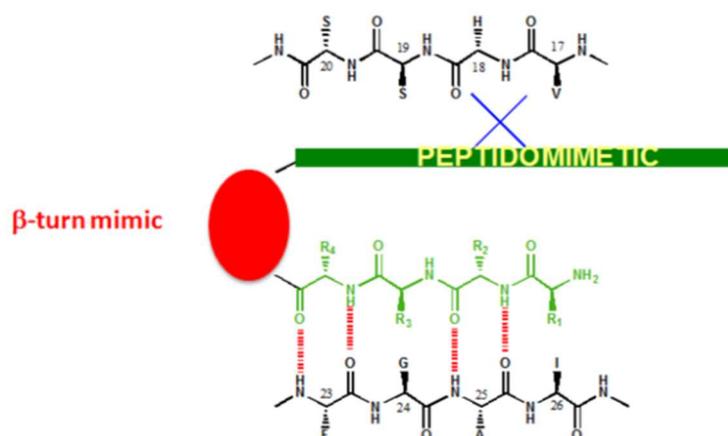
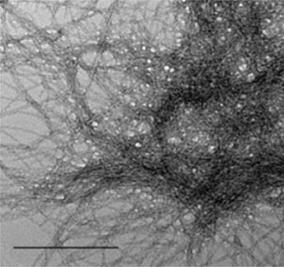
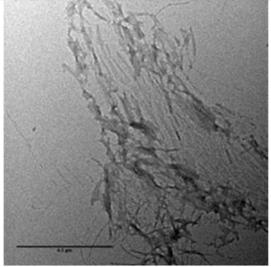


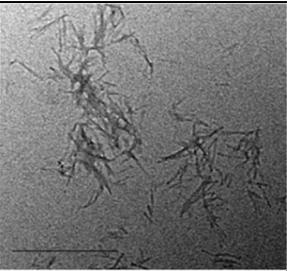
Figure 65 : Représentation schématique de la structure des molécules inhibitrices de l'oligomérisation de hIAPP conçues rationnellement

Trois composés FB195, FB246 et AOa ont été évalués. Pour des raisons de confidentialité, les structures détaillées ne sont pas montrées dans ce manuscrit. AOa comporte deux bras peptidiques, alors que FB195 et FB246 présentent des acides aminés de type « aza » sur leur brin supérieur. Les mêmes analyses que celles réalisées dans l'article présenté en partie 2 ont été menées, et les résultats sont présentés dans le Tableau VIII :

Tableau VIII : Résumé de l'activité des inhibiteurs AOa et FB195 aux rapports molaires 1/1 et 1/10 (hIAPP/inhibiteur), étudiée par spectrofluorimétrie à la ThT, TEM, CE et IMS-MS

Échantillon	Spectrofluorimétrie à la ThT	TEM	Électrophorèse capillaire	IMS-MS
Contrôle	$t_{1/2}$: 2h Intensité au plateau : 25000	 hIAPP 5 μ M après 17h d'incubation	Disparition du monomère en 10h	Observation du monomère à l'hexamère
FB195 Ratio 1	$t_{1/2}$: pas d'effet Intensité au plateau : -46 \pm 8%	Pas de donnée	Disparition du monomère en 10h	Présence du dimère et trimère, plus faibles que dans le contrôle
FB195 Ratio 10	$t_{1/2}$: +18 \pm 8% Intensité au plateau : -76 \pm 2%		Disparition du monomère en 15h	Présence uniquement du dimère en très faible proportion
AOa Ratio 1	$t_{1/2}$: +120 \pm 24% Intensité au plateau : -64 \pm 3%	Pas de donnée	Disparition du monomère en 15h	Présence du dimère et trimère, plus faibles que dans le contrôle

Chapitre V. Evaluation de l'activité de nouveaux composés anti-agrégation de hIAPP

AOa Ratio 10	$t_{1/2}$: +268±30% Intensité au plateau : -88±1%		Disparition du monomère difficile à estimer en raison du manque de résolution entre le pic de l'inhibiteur et celui de hIAPP	Présence uniquement du dimère en très faible proportion
FB246 Ratio 10	$t_{1/2}$: pas d'effet Intensité au plateau : -45±6%	Pas de donnée	Disparition du monomère en 10h	Pas de donnée
FB246 Ratio 1	$t_{1/2}$: pas d'effet Intensité au plateau : -79±7%	Pas de donnée	Disparition du monomère en 10h	Pas de donnée
FB246 Ratio 0,5	Pas de donnée	Pas de donnée	Disparition du monomère en 20h	Pas de donnée

Deux rapports molaires ont donc été étudiés pour chaque inhibiteur : 1/1 et 1/10 (hIAPP/inhibiteur). Les résultats montrent dans un premier temps que les inhibiteurs testés ici sont actifs afin de prévenir l'oligomérisation, et ce dès le rapport molaire 1/1. Ceci est notamment observé en spectrofluorimétrie à la ThT, où on observe des modifications sur le $t_{1/2}$ l'intensité du plateau de fluorescence. L'inhibition de la formation des gros oligomères (tétramère, pentamère et hexamère) est également complète à ce rapport molaire d'après les expériences d'IMS-MS. Les images de TEM obtenues au rapport molaire 1/10 montrent que le réseau de fibres est largement diminué en présence d'inhibiteur. On observe également que la morphologie des espèces formées est différente en présence d'inhibiteur, puisqu'elles semblent de type amorphe contrairement aux fibres organisées en absence d'inhibiteur.

Les résultats montrent dans un second temps que le rapport molaire 1/10 est toujours le plus efficace pour inhiber l'agrégation, peu importe l'inhibiteur. La production de feuillettes β est diminuée et ralentie d'après la spectrofluorimétrie à la ThT d'un facteur 1,5 à 2 en fonction de l'inhibiteur. Les expériences de CE montrent que la présence des inhibiteurs AOa et FB195 permet de conserver le monomère plus longtemps, que dans l'expérience contrôle, ce qui n'est pas forcément le cas au rapport molaire 1/1. Ces observations confirment le caractère dose-dépendant de l'inhibition. Cette dernière est donc d'autant plus efficace que la quantité d'inhibiteur est élevée.

En revanche, les résultats avec FB246 sont très surprenants et intéressants. L'électrophérogramme de hIAPP seul est présenté Figure 66a. Sur l'électrophérogramme du composé FB246 contrôle (Figure 66b), on retrouve à nouveau le pic 2' comme dans le cas du composé sous forme hélicoïdale présenté dans la partie 2 de ce chapitre, dont l'intensité augmente au cours du temps (cette auto-association est également suspectée pour les deux autres composés AOa et FB195 pour lesquels un pic est également observé au même niveau que le pic 2 dans l'électrophérogramme contrôle des composés seuls). Le pic 4 correspond au composé FB246, on remarque que ce pic s'élargit au cours du temps en conservant une intensité à peu près constante.

Lorsque hIAPP est en présence du composé FB246 au rapport molaire 5/1 (Figure 66c) ou 1/1 (Figure 66d), on note à nouveau la présence du pic 2+2', le pic 3 du monomère de hIAPP est présent jusqu'à 10h comme sur le contrôle, il n'y a pas d'activité notable du composé FB246 sur le monomère de hIAPP à ces 2 rapports molaires. Au rapport molaire 0,5/1 (Figure 66e), on observe une nette différence par rapport aux ratios plus élevés, avec la présence du monomère (pic 3) au-delà de 15h. On ne peut pas juger de son activité sur les espèces oligomériques car elles ne sont pas visibles.

Ce dernier résultat tend à faire penser que FB246 s'auto associe dans les conditions de l'EC, d'où l'apparition du pic 2' et la déformation du pic 4, et n'est donc plus disponible pour interagir avec le monomère de hIAPP. Une diminution de la concentration du composé diminue probablement son auto-association et engendre donc une augmentation de son activité vis-à-vis de hIAPP. Afin de vérifier que le pic 2' correspond à des espèces oligomérisées de FB246, un contrôle avec la même concentration qu'au rapport molaire 1/0,5 (50 μ M) doit être fait, afin de voir si l'intensité de ce pic 2' diminue avec la concentration.

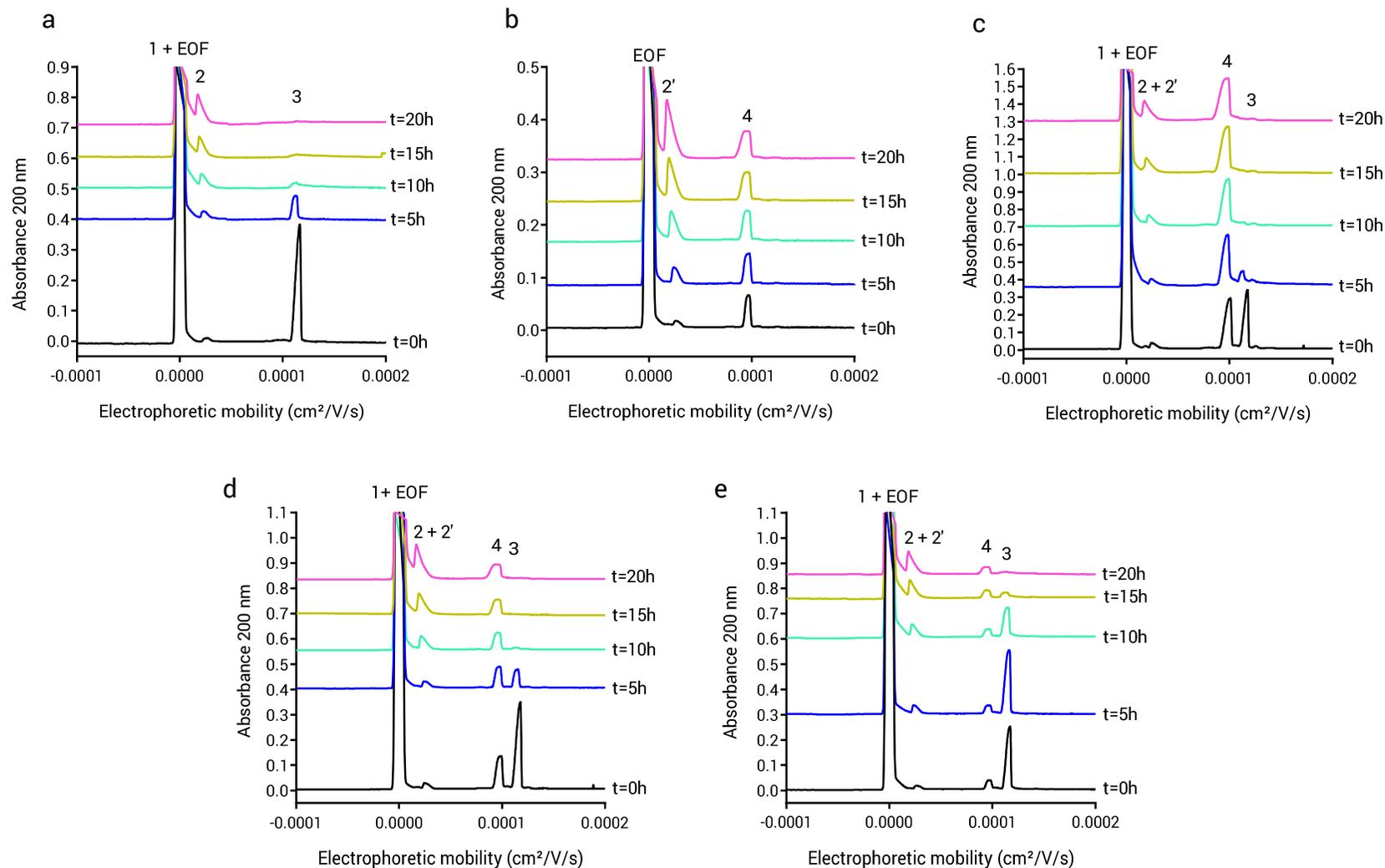


Figure 66 : Electrophérogammes de (a) hIAPP seul ; (b) de FB246 seul ; (c) de hIAPP/FB246 au rapport molaire 1/5 ; (d) de hIAPP/FB246 au rapport molaire 1/1 et (e) de hIAPP/FB246 au rapport molaire 1/0,5 obtenus avec un capillaire possédant un revêtement polybrène (60 cm x 50 µm) et un BGE composé d'acétate d'ammonium 50 mM pH 3,7 (tension = - 25 kV ; détection 200 nm)

Ces trois molécules semblent donc être efficaces afin d'inhiber le processus pathologique d'oligomérisation de hIAPP. Si l'on compare AOa et FB195 entre eux, il semblerait que AOa soit plus efficace que FB195. En effet, il présente une meilleure activité par spectrofluorimétrie à la ThT. De plus, il semble actif dès le rapport molaire 1/1 en électrophorèse capillaire, ce qui n'est pas le cas de FB195. Les résultats obtenus par IMS-MS sont quant à eux identiques. Il semblerait donc d'après les résultats obtenus sur ces deux molécules qu'elles présentent une activité plus importante lorsque la version « naturelle » des acides aminés est utilisée (AOa), contrairement à la version « aza » de FB195. La version « aza » présente néanmoins une bonne activité. Ces deux composés vont à nouveau être évalués par électrophorèse capillaire à un rapport molaire plus faible de 1/0,5 (hIAPP/inhibiteur) qui s'est avéré plus efficace pour FB246.

Nous avons également comparé l'inhibiteur JMV 5826 présenté dans l'article en partie 2 avec AOa, dont l'inhibition est réalisée respectivement par similarité de structure secondaire hélicoïdale et en feuillet β . La comparaison des résultats obtenus en spectrofluorimétrie à la ThT est présentée en Figure 67.

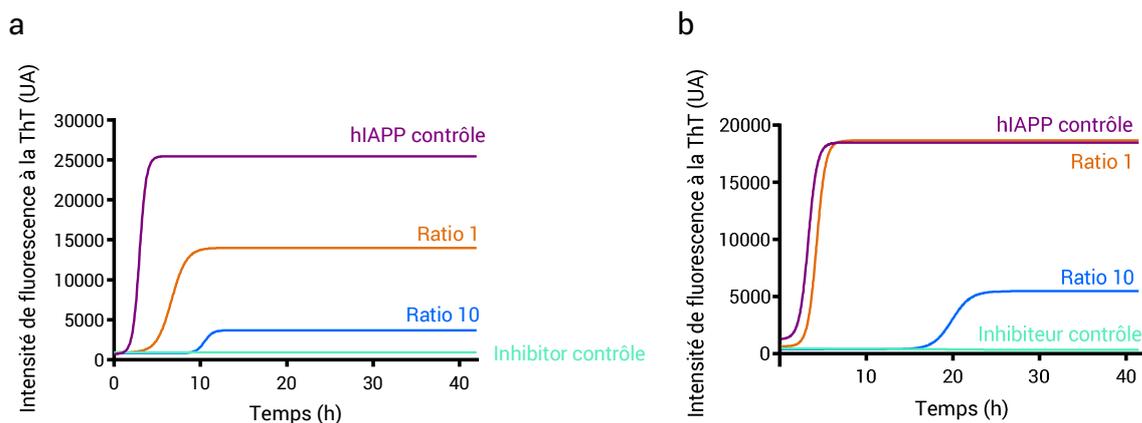


Figure 67 : Courbes de spectrofluorimétrie à la ThT obtenues pour hIAPP seul, l'inhibiteur seul ainsi qu'aux rapports molaires 1/1 et 1/10 (hIAPP / inhibiteur) avec (a) AOa et (b) JMV5826

Il apparaît que l'inhibition par un mime de feuillet β est efficace dès le rapport molaire 1/1 contrairement à celle par un mime d'hélice. En revanche, au rapport molaire 1/10, les deux molécules sont actives d'après cette technique. Toutefois, il est intéressant de noter que les deux paramètres qui sont le lag phase et l'intensité du plateau de fluorescence ne sont pas affectés de la même façon par les deux molécules. Pour AOa, le lag phase est augmenté d'un facteur 5 tandis qu'il est pratiquement augmenté d'un facteur 10 avec JMV5826. A l'inverse, la présence d'AOa permet de réduire l'intensité du plateau de fluorescence d'un facteur 6 tandis qu'il est réduit d'un facteur 3 avec JMV5826. Il semble donc que le mime hélicoïdal intervienne plutôt en retardant l'oligomérisation

précoce plus longtemps (lag phase augmentée) mais que le composé mime de feuillet β soit capable d'inhiber de façon plus efficace la fibrillation plus tardive en perturbant les structures en feuillet β de hIAPP (diminution du plateau de fluorescence). Ceci n'a pas pu être confirmé par la CE car AOa et JMV5826 maintiennent le monomère de hIAPP de façon similaire mais il ne nous a pas été possible d'évaluer leur effet sur les plus gros oligomères (pic 2), en raison de l'auto-association des inhibiteurs engendrant un pic 2' de même mobilité électrophorétique que le pic 2.

Néanmoins, nous avons pu déterminer par mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse que JMV5826, de conformation hélicoïdale, se lie uniquement à la forme monomérique de hIAPP. Ce résultat est cohérent puisque hIAPP monomère adopterait lui aussi une conformation hélicoïdale avant son processus d'oligomérisation. En revanche, nous avons pu observer que AOa se lie quant à lui au monomère ainsi qu'au dimère, montrant ainsi la différence d'activité des inhibiteurs en fonction de leurs structures.

4. Conclusion

La méthode d'électrophorèse développée au Chapitre IV, combinée à d'autres outils comme la spectrofluorimétrie à la ThT ainsi que la mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse, a donc permis d'étudier l'activité de nouveaux inhibiteurs de l'oligomérisation de hIAPP. Ces techniques ont permis de tester ici quatre molécules, dont les mécanismes d'activité sont supposés différents (similarité de structure secondaire hélicoïdale ou de feuillet β). Ces résultats permettent de souligner l'importance du suivi des étapes précoces du processus pathologique d'oligomérisation, et de mettre en évidence les limites des techniques classiques de suivi comme la spectrofluorimétrie à la ThT. Celle-ci doit en effet être combinée à l'EC et l'IMS-MS afin de suivre l'oligomérisation dès ses premières étapes. La corrélation de ces résultats avec des évaluations cellulaires sur des cellules pancréatiques INS-1 sont en cours. Le premier objectif est de vérifier que les molécules testées ne sont pas toxiques pour ces cellules. Le deuxième objectif est de vérifier si leur effet d'inhibition de l'oligomérisation est bien corrélé à une protection de la toxicité cellulaire induite par des oligomères de hIAPP sur les cellules INS-1. Ces travaux sur les composés mimes de feuillet β feront l'objet de publications à court terme.

Références bibliographiques – Chapitre V

- Akter, R., Cao, P., Noor, H., Ridgway, Z., Tu, L. H., Wang, H., Wong, A. G., Zhang, X., Abedini, A., Schmidt, A. M., & Raleigh, D. P. (2016). Islet Amyloid Polypeptide: Structure, Function, and Pathophysiology. *J Diabetes Res*, 2016, 2798269. <https://doi.org/10.1155/2016/2798269>
- Pellegrino, S., Tonali, N., Erba, E., Kaffy, J., Taverna, M., Contini, A., Taylor, M., Allsop, D., Gelmi, M. L., & Ongeri, S. (2017). β -Hairpin mimics containing a piperidine-pyrrolidine scaffold modulate the β -amyloid aggregation process preserving the monomer species. *Chemical Science*, 8(2), 1295–1302. <https://doi.org/10.1039/c6sc03176e>
- Tonali, N., Kaffy, J., Soulier, J.-L., Gelmi, M. L., Erba, E., Taverna, M., van Heijenoort, C., Ha-Duong, T., & Ongeri, S. (2018). Structure-activity relationships of β -hairpin mimics as modulators of amyloid β -peptide aggregation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 154, 280–293. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.05.018>
- Vahdati, L., Kaffy, J., Brinet, D., Bernadat, G., Correia, I., Panzeri, S., Fanelli, R., Lequin, O., Taverna, M., Ongeri, S., & Piarulli, U. (2017). Synthesis and Characterization of Hairpin Mimics that Modulate the Early Oligomerization and Fibrillization of Amyloid β -Peptide. *European Journal of Organic Chemistry*, 2017(20), 2971–2980. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201700010>

Conclusion générale

Ce travail de thèse a eu pour but de développer des méthodes analytiques afin d'évaluer voire de cribler la capacité de nouveaux candidats médicaments à inhiber le processus pathologique d'oligomérisation de hIAPP impliqué dans le diabète de type II. Ces méthodes *in vitro* devaient permettre de suivre ce processus depuis ses étapes précoces afin d'identifier les espèces impliquées, puis d'évaluer l'impact d'inhibiteurs sur ces espèces et leur formation.

Afin de répondre à cette problématique, la préparation de l'échantillon à sa réception a dans un premier temps été étudiée. Nous avons montré qu'une brève incubation du peptide à réception dans l'hexafluoroisopropanol était nécessaire pour obtenir un échantillon composé majoritairement du peptide à l'état monomérique. Par ailleurs, des différences sur la vitesse de disparition du monomère ainsi que la nature des espèces formées et leurs proportions au cours de la cinétique d'oligomérisation du peptide ont été décelées selon l'origine du peptide. Ces différences sont probablement dues à des puretés et des états d'agrégation initiaux différents de l'échantillon en fonction de la source. Le peptide du fournisseur Bachem a été sélectionné pour le développement des méthodes de suivi de cinétique. Nous avons également étudié l'impact de la présence de liposomes utilisés comme mimes de membranes cellulaires a par spectrofluorimétrie à la ThT afin de se rapprocher de conditions physiologiques. Nous n'avons pas pu montrer que la présence de liposomes (mimant les membranes cellulaires du pancréas) dans l'échantillon modifiait les cinétiques comme cela avait été suggéré dans la littérature, mais nous avons montré que leur présence tendait à uniformiser les cinétiques d'oligomérisations de hIAPP provenant de différentes sources sans que nous puissions en expliquer la raison.

La mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse a dans un premier temps été envisagée pour suivre la cinétique d'oligomérisation de hIAPP depuis ses étapes précoces. Cependant, nous avons mis en évidence la présence d'un phénomène de dissociation important lors de ces expériences, limitant l'usage de cette technique pour des études quantitatives, et donc le suivi du processus d'oligomérisation. Néanmoins, cette technique a pu être utilisée dans le cadre de l'évaluation d'inhibiteurs, afin de déterminer les proportions relatives d'oligomères dans l'échantillon en présence ou non de l'inhibiteur, ainsi que les espèces oligomériques établissant des interactions avec ce-dernier. Malgré ce phénomène de dissociation, il reste tout de même possible d'étudier plus en détail la conformation des espèces observées. Lors d'expériences futures, nous étalonnerons par exemple les sections de collision efficaces pour nous permettre d'accéder à celles des différents oligomères. Ces résultats permettront d'avoir une vision globale de l'échantillon, en termes d'espèces et de

conformations associées. La mobilité ionique présente contrairement à la spectrométrie de masse l'intérêt d'être quantitative. Nous pourrions utiliser cet avantage afin par exemple de comparer différentes sources de peptides en fonction des proportions de chaque conformation, ou d'étudier l'action d'un inhibiteur sur les différentes conformations.

Une méthode d'électrophorèse capillaire couplée à une détection UV a donc été développée afin de suivre en temps réel ce processus d'oligomérisation de hIAPP depuis son état monomérique initiale. Cette méthode a permis la résolution de trois groupes d'espèces apparentées à hIAPP, et ce dès le début de l'oligomérisation. Nous avons ensuite caractérisé ces espèces par SDS-PAGE, chromatographie d'exclusion stérique, filtrations par centrifugation et électrophorèse couplée à la spectrométrie de masse. Les études menées montrent que l'espèce présente en début de cinétique, qui correspond principalement au monomère, disparaît pratiquement totalement après 15h d'incubation. Deux groupes d'espèces de masses moléculaires supérieures à 100 kDa sont également détectés au cours de la cinétique. Leurs proportions augmentent de manière constante sur les 20h d'incubation. Nous avons ensuite démontré l'intérêt de la CE-UV pour l'évaluation d'inhibiteurs, en montrant que le resvératrol, inhibiteur connu de l'oligomérisation de peptides amyloïdes, permettait de retarder la disparition du monomère (30% du monomère est conservé après 20h d'incubation). En marge de ce développement, nous avons tenté de nous rapprocher des concentrations physiologiques de hIAPP pour l'étude *in vitro* et ceci en tentant d'abaisser les concentrations en peptides nécessaires pour l'analyse. Nous avons tenté de dériver le peptide par une sonde fluorescente. Ce travail n'a pas conduit à des résultats exploitables, notamment en raison du pH basique utilisé pour le marquage, conduisant probablement à une oligomérisation accélérée de hIAPP. Aucun signal du peptide dérivé n'a pu être observé. Afin de réaliser le marquage efficacement, il pourrait être intéressant de changer le pH du milieu de marquage vers un pH acide. Néanmoins, le marquage avec la sonde utilisée dans cette étude n'est efficace qu'à pH basique. La solution pourrait donc être de choisir une sonde capable de marquer hIAPP à pH acide.

Cette thèse a également impliqué la synthèse de peptidomimétiques originaux, conçus rationnellement dans le but d'interagir spécifiquement avec la séquence amyloïdogénique de hIAPP (F₂₃G₂₄A₂₅I₂₆L₂₇). Nous avons montré que ces molécules, qui s'organisent en petits feuillets β , établissent des interactions avec hIAPP et déstabilisent à la fois les interactions intra et intermoléculaires entre les brins β formés par hIAPP, permettant potentiellement de moduler les étapes précoces de l'oligomérisation. Une molécule synthétisée par l'équipe du Dr Ludovic Maillard (Institut des biomolécules Max Mousseron de Montpellier) et se structurant naturellement en hélice a également montré une activité pour l'inhibition de l'oligomérisation de hIAPP. Les résultats obtenus sont donc prometteurs pour les deux types de molécules testées. Nous avons de plus montré que les

interactions établies par ces deux types de molécules avec hIAPP ne sont pas identiques, mettant en évidence l'impact de la conception des molécules sur leur activité vis-à-vis de l'oligomérisation de hIAPP. Les tests de viabilité cellulaire sont en cours afin de déterminer si la présence des inhibiteurs permet de restaurer une bonne viabilité cellulaire par rapport à hIAPP seul.

Les travaux menés au cours de cette thèse ont donc permis de tester de nouvelles solutions thérapeutiques pour le diabète de type 2, mais aussi d'apporter de nouveaux éléments pour la compréhension de son mécanisme pathologique, pour lequel des points restent à élucider à ce jour. Les méthodes développées ici peuvent cependant encore être améliorées en particulier afin de mimer davantage le processus pathologique *in vivo*. Pour cela, la première piste à explorer serait de mener ces études en incubant le peptide à pH physiologique et non à pH acide. Ce dernier a été utilisé au cours de cette thèse pour ralentir l'oligomérisation et donc maximiser les chances d'observer des espèces précoces et métastables de la cinétique. Il serait donc intéressant d'utiliser la méthode d'électrophorèse capillaire développée pour un suivi en temps réel mais avec une incubation du peptide à pH physiologique. Ces expériences nécessiteront sûrement de raccourcir la durée d'analyse de la méthode afin de pouvoir analyser en temps réel des temps d'incubation rapprochés en début de cinétique, étant donné que celle-ci va être accélérée. Ceci pourrait être réalisé en modifiant le type de revêtement utilisé pour le capillaire en remplaçant le revêtement non permanent à base de polybrène par un revêtement covalent ou adsorbé de manière permanente (tricouche polybrène-dextran-polybrène) par exemple. Ceci permettrait de supprimer l'étape de recouvrement du capillaire réalisée à chaque début d'analyse et qui prend 20 minutes dans la procédure totale. Par ailleurs, la composition des liposomes utilisés pour mimer les membranes cellulaires du pancréas et se rapprocher ainsi des conditions *in vivo*; peut être encore optimisée, en termes de composition et de rapports molaires entre les phospholipides utilisés. Une piste à explorer pourrait donc être de définir la composition optimale des liposomes à utiliser afin de mimer les membranes des cellules β pancréatiques, puis d'inclure ces liposomes dans le milieu d'incubation pour les expériences de suivi d'oligomérisation d'électrophorèse capillaire-UV.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont également reposé pour une grande part sur la mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse. Si cette technique, très sensible et très résolutive, a permis d'identifier les espèces formées lors de l'oligomérisation, nous avons montré qu'elle pouvait présenter des limites pour le suivi de l'oligomérisation du peptide hIAPP. Le passage de l'échantillon en phase gazeuse lors de l'analyse associé aux conditions expérimentales spécifiques comme des hautes tensions ou des vides poussés peuvent en effet conduire à des modifications de l'échantillon non-désirées. Dans le cas du peptide hIAPP, nous avons démontré qu'un phénomène de dissociation des plus grosses espèces formées avaient lieu lors de l'analyse, bien que les conditions

instrumentales et chimiques aient été optimisées afin de conserver la structure des complexes non covalents par des conditions douces. Cependant, l'état actuel de l'instrumentation ne permet pas de se placer dans des conditions strictement natives pour l'analyse de biomolécules et peut conduire à des biais, comme la dissociation, faussant les résultats obtenus. Des phénomènes d'auto-association lors de la désolvatation des solutés dans la source peuvent également se produire, notamment à haute concentration. Il semblerait donc que la spectrométrie de masse soit pour l'instant encore limitée pour l'analyse d'espèces oligomérisées et agrégées non covalentes. Elle constitue cependant une voie de recherche très active en ce moment pour étudier d'autres phénomènes d'agrégation, impliquant par exemple la protéine du prion ou d'anticorps monoclonaux. Ainsi, de même que la découverte de la source ESI par Fenn en 1984 a révolutionné les analyses de biomolécules par spectrométrie de masse, il semblerait qu'un nouveau palier puisse être franchi en termes d'instrumentation afin d'améliorer la stabilité des complexes non-covalents dans l'instrument. Ceci permettrait d'obtenir des informations structurales et conformationnelles inaccessibles à ce jour.

Une dernière perspective peut être dégagée de ce travail. En effet, il pourrait être intéressant d'implémenter le couplage entre l'électrophorèse capillaire, la détection UV et la mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse en ligne. Très peu de travaux ont reporté jusqu'alors ce couplage. Le couplage entre ces techniques permettrait d'atteindre une grande profondeur d'informations sur les espèces impliquées dans l'oligomérisation de hIAPP, d'un point de vue quantitatif, qualitatif et conformationnel. Celles-ci seraient alors séparées en fonction de leur rapport charge/volume (électrophorèse capillaire) et quantifiées avec la détection UV. Le passage dans la cellule de mobilité des espèces présentes sous chaque pic permettrait de déterminer les différentes conformations présentes de manière quantitative, puis de les relier à une espèce donnée grâce au spectre de masse. Cette technique semble donc prometteuse pour suivre la cinétique d'oligomérisation de hIAPP, voire d'autres peptides ou protéines amyloïdes. Bien que les débits observés en électrophorèse capillaire soient compatibles avec la spectrométrie de masse sans avoir recours à une division, ce couplage présente néanmoins quelques difficultés techniques. La première est le phénomène de succion dû aux vides présents dans le spectromètre de masse qui tendent à diminuer la résolution en électrophorèse capillaire. Ce phénomène peut être atténué en travaillant avec une interface sans liquide additionnel. La seconde est la nécessité de développer un revêtement permanent pour le capillaire. Ce revêtement, généralement polymérique, ne peut être dynamique (pas compatible avec la spectrométrie de masse) ni à régénérer après chaque analyse, sans quoi le débit des analyses serait fortement réduit. La troisième est le volume de données obtenues pour chaque analyse. On obtient en effet des données en trois dimensions et très volumineuses. Une réflexion sur le traitement des données voire sur son automatisation est donc nécessaire, sans quoi les temps de retraitement deviennent excessivement longs.

Annexes I. Principes de base de l'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire (CE) est une technique analytique permettant la séparation de molécules de tailles et charges variables au sein d'un capillaire de diamètre interne généralement compris entre 20 et 100 μm . Ses qualités intrinsèques (l'efficacité, la rapidité d'analyse ainsi que la faible quantité d'échantillon nécessaire) en font une technique puissante et parfaitement adaptée pour l'analyse des protéines et peptides. Le principe de la séparation repose sur la migration des espèces sous un champ électrique, pouvant atteindre jusqu'à 30 kV. Une représentation schématique de l'instrumentation en CE est présentée en Figure 68.

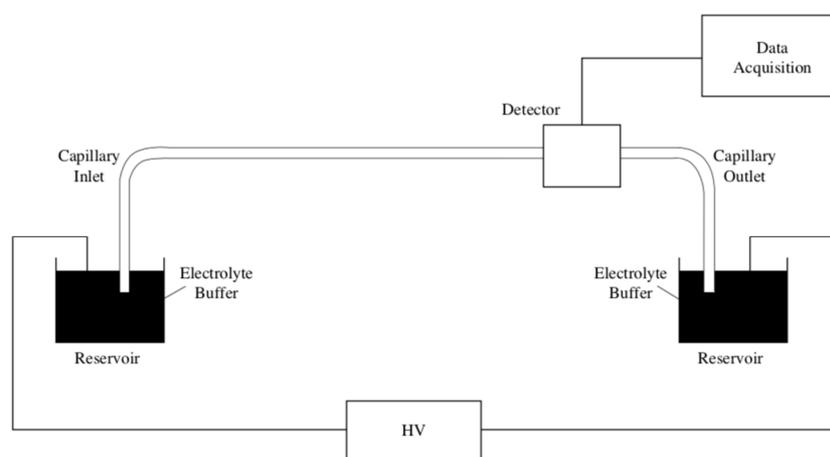


Figure 68 : Représentation schématique de l'instrumentation utilisée en électrophorèse capillaire

La migration apparente des espèces dans le capillaire est la résultante de deux phénomènes que nous allons détailler ci-dessous : l'électroosmose (eo) caractéristique des conditions d'analyses ainsi que la migration électrophorétique (ep) caractéristique de l'analyte en question.

1. L'électroosmose

Le phénomène d'électroosmose est dû à l'écoulement d'un milieu chargé, ici dans un capillaire, suite à l'application d'un champ électrique tangentiel. La surface du capillaire est recouverte de groupements silanols dont le pK_a est d'environ 2. Lorsque le pH est supérieur à 2, ces silanols seront chargés négativement et vont attirer les cations mobiles de l'électrolyte afin d'assurer la neutralité à la surface du capillaire. Une double couche va alors se former à la surface du capillaire : une première couche dense en cations, proche des silanols (couche de Stern), et une seconde, plus diffuse et plus éloignée (couche de Gouy-Chapman). Cette double couche peut être caractérisée par la valeur de son

potentiel de surface, appelé potentiel ζ (en V). Ce potentiel est décrit selon l'équation 4, et dépend de l'épaisseur de la double couche, de la densité de charges et des paramètres de l'électrolyte :

$$\zeta = \frac{\delta \cdot \sigma}{\varepsilon_r \cdot \varepsilon_0} \text{ avec } \delta = \sqrt{\frac{\varepsilon_r \cdot \varepsilon_0 \cdot R \cdot T}{2 \cdot I \cdot F^2}} \quad \text{[Equation 4]}$$

Où δ est l'épaisseur de la double couche (m), σ la densité de charges de surface du capillaire (C.m^{-2}), ε_r la constante diélectrique de l'électrolyte, ε_0 la permittivité du vide ($8,85 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2 \cdot \text{N}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$), R la constante des gaz parfaits ($8,325 \text{ J.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$), T la température (K), I la force ionique de l'électrolyte et F la constante de Faraday (96500 C.mol^{-1}).

Sous l'effet du champ électrique, les cations de la couche de Stern ne vont pas se déplacer car leurs interactions avec les silanols du capillaire sont trop intenses. En revanche, les cations de la couche de Gouy-Chapman vont se mettre en mouvement vers l'électrode polarisée négativement de l'instrument, la cathode en conditions classiques. Cette migration provoquée par le champ électrique va entraîner un déplacement de toutes les espèces présentes dans le milieu, indépendamment de leur charge. Ce déplacement est nommé électroosmose, et présente un profil plat, contrairement aux séparations sous pression qui présentent un profil de vitesse parabolique (chromatographie en phase liquide). C'est ce profil plat qui permet de limiter la diffusion lors des séparations et d'obtenir des efficacités élevées. L'électroosmose, ou flux électroosmotique, peut être caractérisée selon l'équation 5 par la vitesse électroosmotique v_{eo} (m.s^{-1}), dépendante de la mobilité électroosmotique μ_{eo} ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et du champ électrique appliqué (V.cm^{-1}) :

$$v_{eo} = \mu_{eo} \cdot E = -\frac{\varepsilon_r \cdot \varepsilon_0 \cdot \zeta}{\eta} \cdot E \quad \text{[Equation 5]}$$

Où η correspond à la viscosité du milieu (Pa.s). La mobilité électrophorétique dépend donc du milieu (composition, pH, force ionique, viscosité) ainsi que de la surface du capillaire. Notons ici qu'il est possible de modifier cette surface par des traitements spécifiques, comme le recouvrement par des polymères modifiant les paramètres de surface.

2. La migration électrophorétique

La migration électrophorétique correspond au déplacement d'une espèce chargée sous l'effet d'un champ électrique. Cette espèce va se déplacer vers l'électrode de polarité opposée à sa charge à la vitesse v_{ep} (m.s^{-1}), dépendante de la mobilité électrophorétique de l'espèce μ_{ep} ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et du champ électrique appliqué (V.cm^{-1}) décrite dans l'équation 6 :

$$v_{ep} = \mu_{ep} \cdot E \quad \text{[Equation 6]}$$

La mobilité électrophorétique μ_{ep} d'une espèce est dépendante de son rayon hydrodynamique r_h ainsi que de sa charge q , donc plus globalement de sa densité de charge (équation 7). A charge égale, un petit cation se déplacera par exemple plus rapidement qu'un gros.

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6. \pi. r_h. \eta} \quad \text{[Equation 7]}$$

3. Séparation en électrophorèse capillaire de zone

3.1. Principe de séparation

Différents modes de séparation sont disponibles en électrophorèse capillaire. Parmi eux, l'électrophorèse capillaire de zone (CZE) est un des plus courants, avec un électrolyte support de pH et force ionique constants. La migration des espèces à séparer sous l'effet du champ électrique est gouvernée par leur densité de charges. Plus cette densité est élevée, plus les espèces vont se déplacer rapidement vers l'électrode de polarité opposée. Les espèces neutres ne sont pas séparées dans ce mode. Les cations, dirigés dans le même sens que le flux électroosmotique, migreront plus vite que les anions. Dans le cas de l'analyse de peptides possédant des groupements ionisables, le pH de l'électrolyte support joue donc un rôle prépondérant puisque c'est lui qui va fixer l'état de charge du peptide en fonction de son point isoélectrique. En CZE, la migration d'une espèce est caractérisée par sa mobilité apparente μ_{app} , somme de la mobilité électroosmotique et de la mobilité électrophorétique. C'est cette grandeur qui est pratiquement mesurée.

$$\mu_{app} = \mu_{eo} + \mu_{ep} = \frac{L \cdot l}{V \cdot t_m} \quad \text{[Equation 8]}$$

Où L est la longueur totale du capillaire (cm), l la longueur jusqu'au détecteur (cm), V la tension appliquée (V) et t_m le temps de migration de l'espèce (s). La Figure 69 représente la direction et l'intensité de la mobilité de chaque type d'espèces lors d'une séparation. On note qu'il ne sera possible de détecter un anion que si la mobilité électroosmotique est supérieure en valeur absolue à sa mobilité électrophorétique.

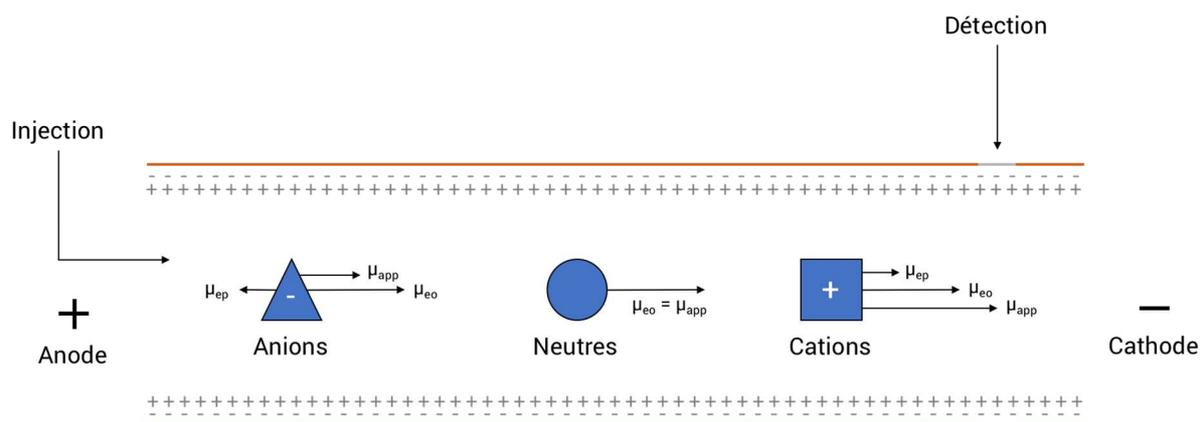


Figure 69 : Principe de séparation en électrophorèse capillaire de zone

La CZE présente l'avantage d'être simple de mise en œuvre et est particulièrement adaptée pour l'analyse de peptides en raison de sa bonne efficacité. L'optimisation de cette technique se concentre principalement sur les paramètres de l'électrolyte support (composition, pH et force ionique).

3.2. Stratégies pour limiter les phénomènes de dispersion

Un phénomène souvent rencontré avec les peptides à haut pI (peptide basique) peut cependant s'avérer problématique : l'adsorption de l'analyte sur le capillaire. En effet, si le pH de l'électrolyte support est inférieur au pI du peptide, celui-ci va être chargé positivement et une interaction électrostatique peut alors s'établir entre le peptide et la paroi du capillaire chargée négativement (Menon & Zydney, 1998; Rabiller-Baudry & Chaufer, 2001). Ce phénomène est à l'origine d'une forte dégradation de la qualité de séparation, causant notamment une déstabilisation du flux électroosmotique, un élargissement ainsi qu'une faible reproductibilité sur les aires et temps de migrations des pics. Les injections répétées de solutions contenant des peptides ou protéines peuvent également favoriser ce phénomène, d'où l'importance de s'assurer que le protocole de rinçage du capillaire après l'analyse est optimal afin de désorber les peptides en interaction avec la paroi. Une stratégie pour contrer ce phénomène est de moduler la force ionique et le pH de l'électrolyte support (McCormick, 1988; Rodriguez & Li, 1999; Stutz *et al.*, 2003). Travailler à un $pH < 2$ permettrait de limiter l'ionisation des silanols, tandis qu'un $pH > pI$ du peptide le chargerait négativement, provoquant une répulsion entre la paroi et le peptide. Cependant, il n'est pas toujours possible de travailler à ces pH extrêmes, en raison de la stabilité des biomolécules dans ces conditions. On peut également augmenter la force ionique du tampon afin de limiter les interactions non spécifiques, mais ceci est dépendant de l'effet Joule provoqué par le passage du courant. Plus la force ionique est élevée, plus

l'effet Joule est important. Si cet effet devient trop important, la température dans le capillaire va augmenter provoquant une détérioration de la séparation (Ross *et al.*, 2001).

La stratégie la plus employée consiste à recouvrir la paroi du capillaire d'un revêtement (permanent ou non), la rendant neutre ou chargée positivement (Doherty *et al.*, 2003; Lucy *et al.*, 2008; Stutz, 2009). Parmi les revêtements permanents, on peut citer les polymères comme le polybrène (PB), le polyacrylamide (PAA) ou l'alcool polyvinylique (PVA) qui nécessitent un traitement en amont du capillaire avant utilisation. D'autres traitements, dits dynamiques (directement intégrés dans le tampon d'analyse) sont disponibles comme des tensioactifs (SDS), des alkylamines (DAB) ou des dérivés de la cellulose (HPMC) (Nehmé *et al.*, 2008).

Annexes II. Principe de la chromatographie d'exclusion stérique

4. Séparation en chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est un mode particulier de la chromatographie liquide permettant la séparation de molécules (polymères, peptides, protéines...) selon leur taille uniquement. Alors que la chromatographie liquide en phase inverse est basée sur les interactions entre le soluté, la phase mobile et la phase stationnaire, la SEC ne repose que sur des interactions entre la phase mobile et le soluté. La phase stationnaire est constituée de particules sphériques inertes dont la porosité est contrôlée. Les solutés dont la taille (volume hydrodynamique) est inférieure à celle des pores vont pénétrer dans ces pores, et donc parcourir un trajet plus important jusqu'à la détection que les molécules ne pouvant pas rentrer dans les pores. Les molécules les plus petites seront donc éluées après les plus grosses (Hong *et al.*, 2012). Ce phénomène est décrit Figure 70 :

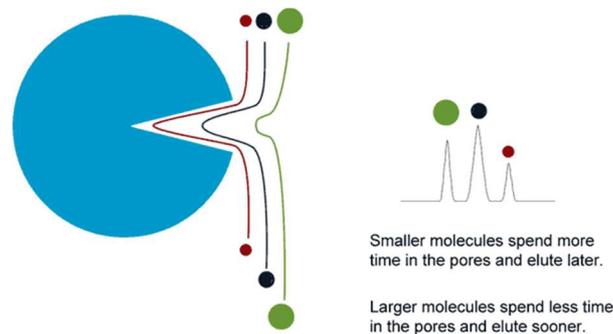


Figure 70 : Principe de séparation des molécules selon leur taille en chromatographie d'exclusion stérique (Agilent)

Cette technique permet donc la séparation des molécules selon leur taille. Il est alors possible de réaliser une courbe de calibration en utilisant des molécules de poids moléculaires connus, en traçant $\log(\text{MW}) = f(t_r)$. Cette équation est caractéristique d'une droite sur le domaine de linéarité de la colonne (Hong *et al.*, 2012). Le temps de rétention d'un soluté permet ensuite de remonter à sa masse moléculaire.

5. Cas particulier des protéines et peptides

5.1. Correspondance volume hydrodynamique – masse moléculaire

La SEC permet donc de déduire la masse moléculaire d'une protéine à partir de son temps de rétention. Pour cela, on estime que le temps de rétention est directement relié au volume hydrodynamique de la

protéine (passage au travers des pores), et donc que volume hydrodynamique et masse moléculaire sont proportionnels. Or cette théorie n'est vérifiée que dans le cas de protéines parfaitement globulaires, ne présentant pas de motifs en surface qui pourrait fausser l'estimation de son volume hydrodynamique comme une glycosylation importante. Cette situation idéale n'est jamais rencontrée, mais demeure toutefois une bonne approximation pour l'estimation de la masse moléculaire de protéines. Dans le cas d'un système trop complexe, il est possible de coupler la SEC à des détecteurs donnant directement la masse des molécules comme le MALS (Multi-Angle Light Scattering) voire la spectrométrie de masse.

5.2. Phénomènes d'adsorption

Comme en électrophorèse capillaire, le phénomène d'adsorption sur la phase stationnaire reste problématique pour l'étude de biomolécules par SEC pouvant conduire à des déplacements de temps de rétention et de l'asymétrie pour les pics (O'Callaghan *et al.*, 1995; Tantipolphan *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2008). Or il est primordial que le soluté n'interagisse pas avec la phase stationnaire afin que sa masse, estimée à partir de son temps de rétention, ne soit pas erronée. Pour cela, des améliorations ont été apportées sur les phases stationnaires par les constructeurs afin de les rendre le plus inerte possible. Lors de l'analyse, il est également possible de contrer ce phénomène d'interactions non-spécifiques, notamment en adaptant la phase mobile. On peut par exemple augmenter sa force ionique ou ajouter un solvant organique afin de réduire les interactions électrostatiques.

Annexe III. Supplementary informations Article 3

Helical foldamers of thiazole-based γ -amino acid as dual inhibitors of amyloid- β peptide and islet amyloid polypeptide oligomerization and fibrillization

J. Kaffy,^{*a} C. Berardet,^{a,b} L. Mathieu,^c B. Legrand,^c M. Taverna,^b F. Halgand,^d G. Van Der Rest,^d L. T. Maillard,^{*c} S. Ongerì.^a

^a BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris Saclay, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

^b Institut Galien Paris Sud, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris Saclay, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

^c Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR 5247, CNRS Universités Montpellier I et II, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 15 Avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier Cedex 5, France

^d Laboratoire de Chimie Physique Université Paris Sud, Université Paris Saclay, Orsay, France

Corresponding authors: E-mail: julia.kaffy@u-psud.fr; Tel: +33 (0)146835743

E-mail: ludovic.maillard@umontpellier.fr; Tel: +33 (0)411759604

Table of contents

Page S2 Structure of foldamers **1**, **2** and **3**.

Page S3 Synthesis of foldamers **1**, **2** and **3**

Page S6 NMR data for the conformational studies of compounds **1**, **2** and **3**.

Pages S10 ¹H NMR spectra of the dimer **1**, tetramer **2** and hexamer **3**.

Pages S12 Fluorescence-detected ThT binding assay (A β_{1-42}) and representative curves of ThT fluorescence assays over time showing A β_{1-42} aggregation in presence of compounds **4**, **5**, **6** and **6** (water).

Pages S13 Fluorescence-detected ThT binding assay (hIAPP) and representative curves of ThT fluorescence assays over time showing hIAPP aggregation in presence of compounds **4**, **5**, **6**, **6** (water) and **6**+LUV.

Page S15 Experimental procedure for transmission electron microscopy studies.

Page S15 Capillary electrophoresis protocols.

Page S16 Experimental procedure for ESI-IMS-MS experiments.

Page S16 References

Structure of foldamers 1, 2 and 3

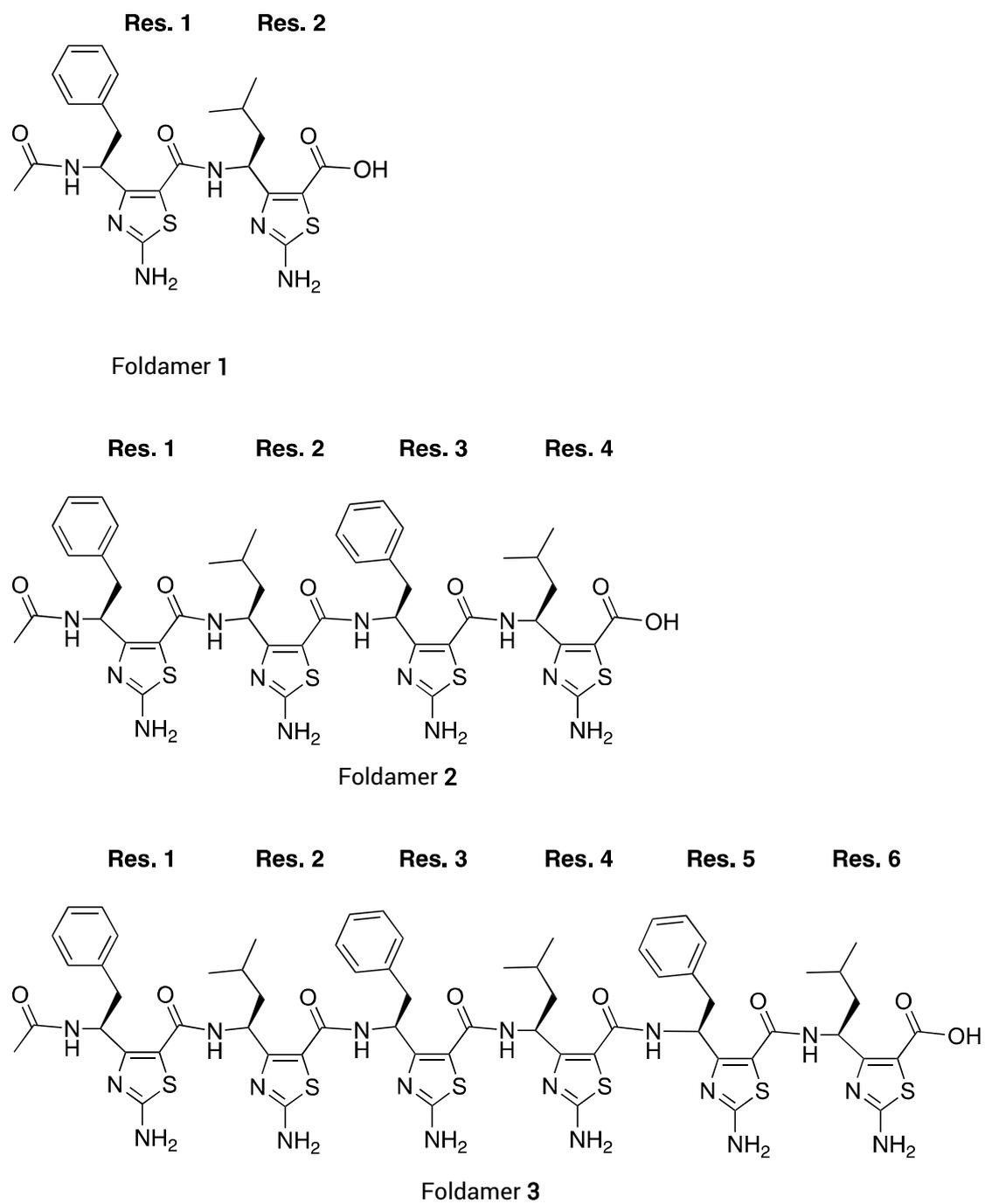


Figure S1. Structure of foldamers 1, 2 and 3.

Synthesis of foldamers 1-3

Procedure

Commercially available reagents and solvents were used without any further purification. Reactions were monitored by HPLC using an analytical Chromolith Speed Rod RP-C18 185 Pm column (50 x 4.6 mm, 5 μ m) using a flow rate of 5.0 mL/min, and gradients from 100/0 to 0/100 eluents A/B over 3 (condition A) or 5 min (condition B), in which eluents A = H₂O / TFA 0.1% and B = CH₃CN / TFA 0.1%. Detection was done at 214 nm and 254 nm using a Photodiode Array Detector. Retention times are reported as follows: LC: t_R = (min). ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded at room temperature in deuterated solvents. Chemical shifts (δ) are given in parts per million relative to TMS or relative to the solvent [¹H: δ (CDCl₃) = 7.24 ppm; ¹³C: δ (CDCl₃) = 77.2 ppm]. The following abbreviations are used to designate the signal multiplicities: s (singlet), d (doublet), dd (doublet doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), br (broad). Analytical Thin-Layer Chromatography (TLC) was performed using aluminium-backed silica gel plates coated with a 0.2 mm thickness of silica gel or with aluminium oxide 60 F254, neutral. LC-MS spectra (ESI) were recorded on an HPLC using an analytical Chromolith Speed Rod RP-C18 185 Pm column (50 x 4.6 mm, 5 μ m) using a flow rate of 3.0 mL/min, and gradients of 100/0 to 0/100 eluents A/B over 2.5 min, in which eluents solvent A = H₂O / HCOOH 0.1% and solvent B = CH₃CN / HCOOH 0.1%. High-Resolution Mass Spectrometric analyses were performed with a time-of-flight (TOF) mass spectrometer fitted with an Electrospray Ionisation Source (ESI). All measurements were performed in the positive ion mode. Melting points (mp) are uncorrected and were recorded on a capillary melting point apparatus.

General procedure for synthesis of β -ketoester 7

Imidazolide formation: in a 250 mL two-neck flask under a nitrogen atmosphere was dissolved the Fmoc-AA-OH (28.57 mmol) in dry THF. Then CDI (5.096 g, 31.41 mmol, 1.1 equiv) was added in three times. A catalytic amount of DMAP (105 mg, 0.8571 mmol, 3 mol%) was added 2-3 min after and the solution was stirred for 1 h at r.t.

Enolate formation: under a nitrogen atmosphere, a 500 mL three-neck flask was charged with LiHMDS (100 mL, 100 mmol, 1M solution in THF) followed by dry THF (100 mL). After cooling at -78°C 1,1-dimethylallylacetate (14.650 g, 114.3 mmol) was added dropwise over 10 min. The solution was stirred at -78°C for 5-10 min, then at r.t. for 10 min and finally at -78°C for 20 min.

Condensation: Imidazolide solution was added dropwise to the enolate solution at -78°C over 5-10 min. After stirring for 15 minutes (HPLC monitoring) the mixture was removed from the cold bath and poured onto a solution of 10% aqueous citric acid (200 mL) until pH 7. The crude was extracted with EtOAc (2 x 100 mL). The combined organic layers were washed with saturated NaHCO₃ solution (1 x 100 mL) and brine (3 x 150 mL), dried, filtered and evaporated under reduced pressure to yield crude product. Purification by flash column chromatography afforded the pure β -ketoester.

1,1-dimethylprop-2-en-1-yl (4S)-4-(N-Fmoc)-amino-3-oxo-5-phenylpentanoate 7a: Pale pink solid. Yield: 66 %. Mp: 101-102°C. [α]_D²⁰ = +0.55° (c 1.00, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.52 (s, 6H); 3.01 (ABX, J = 7.0, 14.0 Hz, 1H); 3.18 (ABX, J = 7.0, 14.0 Hz, 1H); 3.40 (d, J = 5.3 Hz, 2H); 4.17 (t, J = 6.9 Hz, 1H); 4.40 (m, 2H); 4.67 (m, 1H); 5.10 (d, J = 10.8 Hz, 1H); 5.19 (d, J = 17.5 Hz, 1H); 5.34 (d, J = 7.6 Hz, 1H); 6.07 (dd, J = 10.8, 17.5 Hz, 1H); 7.14 (d, J = 7.0 Hz, 1H); 7.23-7.33 (m, 6H); 7.40 (t, J = 7.4 Hz, 2H); 7.53 (t, J = 7.4 Hz, 2H); 7.77 (d, J = 7.4 Hz, 2H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 26.4 (2C); 37.1; 47.3; 48.0; 60.9; 67.1; 82.8; 113.5; 120.1 (2C); 125.2 (2C); 127.2 (2C); 127.3; 127.9 (2C); 128.9

(2C); 129.4 (2C); 135.9; 141.4 (2C); 141.8; 143.8 (2C); 155.8; 165.6; 201.7 ppm. LC (condition A): tR = 2.04 min (major) and 2.19 min (minor) (keto-enol equilibrium). LC-MS: (ESI+): m/z 498.2 ([M+H]⁺) 100%, 520.2 ([M+Na]⁺) 10%. HRMS (ESI) calcd for C₃₁H₃₁NO₅Na⁺: 520.2100, found 520.2098. FT-IR: ν_{max} (cm⁻¹) 3313; 2984; 1738; 1713; 1692; 1534; 1323; 1254; 1124; 1031; 929; 836; 755; 741; 703.

1,1-dimethylprop-2-en-1-yl (4S)-4-(N-Fmoc)-amino-6-methyl-3-oxoheptanoate 7b: White solid. Yield: 73 %. Mp: 117-118°C. [α]_D²⁰ = -10.2° (c 1.00, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 0.95 (t, J = 6.2 Hz, 6H); 1.41 (m, 2H); 1.53 (s, 6H); 1.68 (m, 1H); 3.41 (AB, J = 15.6 Hz, 1H); 3.49 (AB, J = 15.6 Hz, 1H); 4.22 (t, J = 6.6 Hz, 1H); 4.42 (s, 1H); 4.45 (d, J = 6.6 Hz, 2H); 5.09 (d, J = 10.8 Hz, 1H); 5.19 (d, J = 17.4 Hz, 1H); 5.19 (s, 1H), 6.08 (dd, J = 10.9, 17.4 Hz, 1H); 7.32 (t, J = 7.4 Hz, 2H); 7.40 (t, J = 7.4 Hz, 2H); 7.59 (m, 2H); 7.78 (d, J = 7.4 Hz, 2H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 21.7; 23.4; 25.0; 26.5 (2C); 40.3; 47.5 (2C); 58.8; 67.0; 82.7; 113.5; 120.2 (2C); 125.1 (2C); 127.2 (2C); 127.9 (2C); 141.5 (2C); 142.0; 143.9 (2C); 156.2; 165.7; 202.7 ppm. LC (condition A): tR = 2.29 min (major) and 2.52 min (minor) (keto-enol equilibrium). LC-MS: (ESI+): m/z 464.3 ([M+H]⁺) 100%, 486.3 ([M+Na]⁺) 10%. HRMS (ESI) calcd for C₂₈H₃₄NO₅⁺: 464.2437, found 464.2416. FT-IR: ν_{max} (cm⁻¹) 3375; 3041; 2958; 1739; 1717; 1536; 1452; 1353; 1249; 1237; 1222; 1126; 1098; 1038; 942; 760; 737; 730.

General procedure for ATC synthesis 10

Synthesis of bromo-β-ketoesters 8: To a solution of the β-ketoester 7 (6.47 mmol) in acetonitrile (50 mL) was added magnesium perchlorate (477 mg, 2.13 mmol, 0.3 equiv.). The solution was stirred at -45°C for 10 min. A solution of NBS (1200 mg, 6.80 mmol, 1.1 equiv.) in acetonitrile (15 mL) was then added dropwise over 5 min. The reaction was completed after few minutes stirring at -45°C (HPLC monitoring). The mixture was diluted with Et₂O (80 mL), washed with water (2 × 80 mL) and brine (3 × 40 mL). The organic layer was dried on MgSO₄, filtered and the solvent was removed under vacuum to give the crude product, which was used in the next step without further purification.

Hantzsch cyclization: To a solution of α-mono-brominated β-ketoester 8 (6.47 mmol) in absolute ethanol was added a solution of the thiourea (1965 mg, 25.8 mmol, 4 equiv.) dissolved in absolute ethanol. The solution was heated for 2 h at 40°C until completion of the reaction (HPLC and TLC monitoring). EtOH was evaporated and the yellowish solid was partitioned between EtOAc (50 mL) and water (50 mL). The organic layer was washed with water (3 × 40 mL) and brine (1 × 40 mL). The combined organic layers were dried on magnesium sulfate, filtered and evaporated under vacuum to yield the crude product. Purification by column chromatography on silica gel afforded ATC 9.

1,1-dimethylprop-2-en-1-yl 2-amino-4-[(1S)-1-(N-Fmoc)-amino-2-phenethyl]-1,3-thiazole-5-carboxylate 9a: White solid. Yield: 90 %. Mp: 119-120°C. [α]_D²⁰ = +0.07° (c 1.00, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.56 (m, 6H); 3.10 (d, J = 7.2 Hz, 2H); 4.20 (m, 2H); 4.29 (m, 1H); 5.10 (d, J = 11.0 Hz, 1H); 5.19 (d, J = 17.5 Hz, 1H); 5.71 (q, J = 8.0 Hz, 1H); 6.07 (br, 2H); 6.10 (dd, J = 17.5, 11 Hz, 1H); 6.16 (d, J = 9.2 Hz, 1H); 7.13-7.26 (m, 5H); 7.27 (t, J = 7.5 Hz, 2H); 7.38 (t, J = 7.5 Hz, 2H); 7.53 (d, J = 7.5 Hz, 2H); 7.74 (d, J = 7.5 Hz, 2H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 26.7; 26.8; 41.4; 47.3; 51.4; 66.9; 82.8; 113.2; 120.0 (2C); 125.3; 125.4 (2C); 126.7; 127.1 (2C); 127.7 (2C); 128.3 (2C); 129.7 (2C); 137.2; 141.4 (2C); 142.3; 144.1 (2C); 155.9; 158.1; 160.5; 169.8 ppm. LC (condition A): tR = 1.96 min. LC-MS: (ESI+): m/z 554.2 ([M+H]⁺) 100%, 576.2 ([M+Na]⁺) 10%. HRMS (ESI) calcd for C₃₂H₃₂N₃O₄S⁺: 554.2114, found 554.2123. FT-IR: ν_{max} (cm⁻¹) 3316; 3198; 2982; 1691; 1614; 1494; 1450; 1317; 1280; 1251; 1076; 1046; 923; 827; 758; 739; 699.

1,1-dimethylprop-2-en-1-yl 2-amino-4-[(1S)-1-(N-Fmoc)-amino-3-methylbutyl]-1,3-thiazole-5-carboxylate 9b: White solid. Yield: 85 %. Mp: 113-114°C. $[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} = -16.0^\circ$ (c 1.00, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) $\delta = 0.95$ (m, 6H); 1.53 (m, 2H); 1.61 (s, 3H); 1.62 (s, 3H); 1.73 (m, 1H); 4.21 (m, 1H); 4.32 (dd, $J = 10.3, 7.0$ Hz, 1H); 4.40 (dd, $J = 10.3, 7.0$ Hz, 1H); 5.12 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H); 5.23 (d, $J = 17.6$ Hz, 1H); 5.42 (m, 1H); 5.82 (br, 2H); 6.04 (m, 1H); 6.17 (dd, $J = 17.6, 10.9$ Hz, 1H); 7.29 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H); 7.38 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H); 7.59 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H); 7.75 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) $\delta = 22.3; 23.3; 25.1; 26.7; 27.0; 44.4; 47.4; 49.2; 66.7; 82.5; 113.1; 120.0$ (2C); 125.3 (3C); 127.1 (2C); 127.7 (3C); 141.4 (2C); 142.5; 144.1 (2C); 156.1; 161.6; 170.1 ppm. LC (condition A): $t_R = 2.23$ min. LC-MS: (ESI+): m/z 520.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 100%, 542.2 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 10%. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}^+$: 520.2270, found 520.2274. FT-IR: ν_{max} (cm^{-1}) 3313; 2955; 1695; 1615; 1496; 1450; 1316; 1257; 1075; 1043; 923; 827; 758; 738.

General procedure for dimethylallyl ester deprotection – access to N-Fmoc-ATC-OH 10a and 10b

The fully protected ATC **9** (2.1 mmol) was dissolved in dry THF (15 ml) then palladium tetrakis triphenylphosphine (122 mg, 5 mol%) and phenylsilane (522 μl , 2.0 equiv.) were added to the reaction mixture. The solution was stirred at room temperature for 1 hour. The solvent was removed under reduced pressure. The *N*-Fmoc-ATC-OH **10a** and **10b** were used without any further purification.

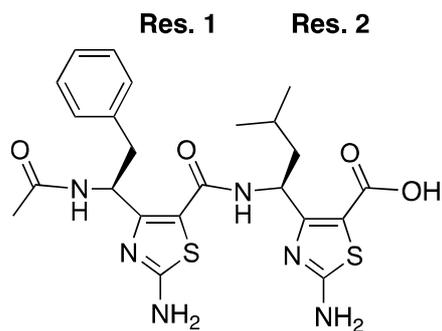
Procedure for peptide elongation on chlorotrityl resin – synthesis of compounds 1-3 (n=1,2,3)

The peptides **1-3** were assembled on 2-chloro-trityl chloride resin (Novabiochem). Fmoc-ATC-OH **10b** (0.1 mmol) was loaded on 2-chlorotritylchloride resin (350 mg, loading 0.3 mmol/g) in the presence of diisopropylethylamine (DIEA, 4 equiv.) in CH_2Cl_2 (5 mL). The unreacted sites on the resin were capped by washing with a mixture of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{DIPEA}$ (17:2:1) followed by MeOH. Following removal of the Fmoc-group using 20% piperidine in *N*-methyl-2-DMF (3x30 min), chain elongations were performed at room temperature with Fmoc-ATC-OH **10a** and Fmoc-ATC-OH **1b** (2 equiv. each), EDCI (2 equiv), HOBt (2 equiv.) in NMP as solvent (2 ml). After completion of the synthesis, the linear peptides were capped with $\text{Ac}_2\text{O}/\text{DCM}$ (1:1 v/v, 2ml) then cleaved from the resin with $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{DCM}$ (5:95 v/v). After removing the solvent, the peptides were purified by preparative HPLC on a Delta Pak, C18 column (15 μm , 40 x 100 mm; Solvent A: $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ vol/vol 0.1%; Solvent B: MeCN/TFA vol/vol 0.1%; flow 20 mL/min; linear gradient A/B: from 10/90 to 60/60 in 50 min) and lyophilized. HPLC analyses were performed on an analytical Chromolith Speed Rod RP-C18 185 Pm column (50x4.6 mm, 5 μm) using a flow rate of 5.0 mL/min, and gradient from 100/0 to 0/100 eluents A/B over 3 min, in which eluents A= H_2O / TFA 0.1% and B= CH_3CN / TFA 0.1%. Detections were done at 214 nm and 254 nm using a Photodiode Array Detector.

Peptide **1** (n=1) $T_R = 1.14$ min. LC-MS: (ESI+): m/z 517 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 100%. NMR: see Table S1.

Peptide **2** (n=2) $T_R = 1.41$ min. LC-MS: (ESI+): m/z 973.5 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 487.3 ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$) 100%. NMR: see Table S2.

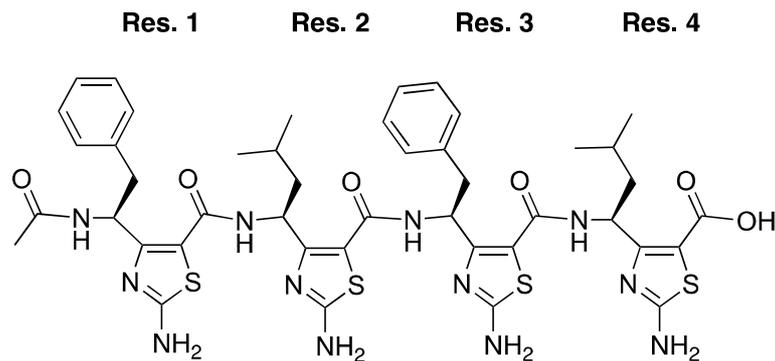
Peptide **3** (n=3) $T_R = 1.62$ min. LC-MS: (ESI+): m/z 1429.8 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 715.4 ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$) 100%. NMR: see Table S3.

Table S1: ^1H NMR chemical shifts for **1** in CD_3OH at 293 K.**Conformer 1 (82%)**

<i>Residue</i>	<i>HN</i>	γ <i>CH</i>	δ <i>CH</i>	<i>Others</i>
CH₃CO	-	-	-	CH ₃ 2.03
Res. 1	8.45	5.52	3.09	CH 6.99 CH 7.09 CH 7.06
Res. 2	9.20	5.93	1.67, 1.84	$^{\epsilon}$ CH 0.99; $^{\zeta}$ CH ₃ 0.98, 0.96

Conformer 2 (18%)

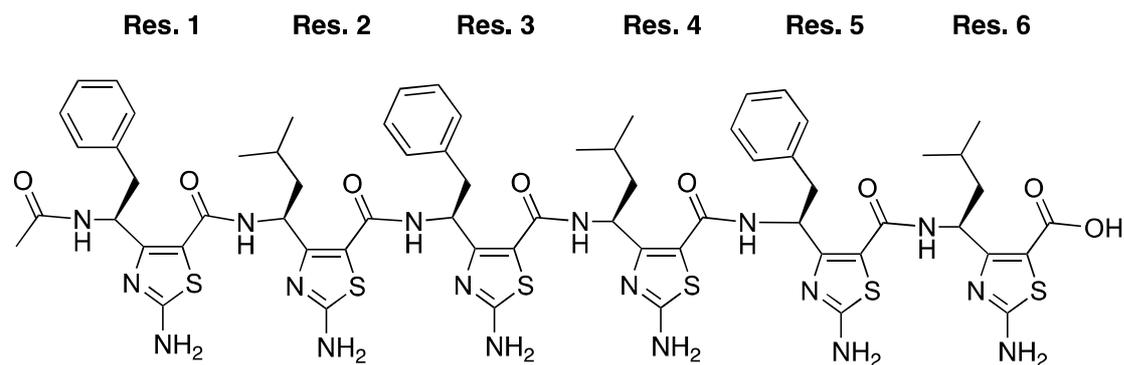
<i>Residue</i>	<i>HN</i>	γ <i>CH</i>	δ <i>CH</i>	<i>Others</i>
CH₃CO	-	-	-	CH ₃ 2.03
Res. 1	8.64	5.37	3.05, 3.15	CH 6.99 CH 7.09 CH 7.06
Res. 2	9.20	5.93	1.67, 1.84	$^{\epsilon}$ CH 0.99; $^{\zeta}$ CH ₃ 0.98, 0.96

Table S2: ^1H NMR chemical shifts for **2** in CD_3OH at 293 K.**Conformer 1 (55%)**

<i>Residue</i>	<i>HN</i>	^1CH	$^{\delta}\text{CH}$	<i>Others</i>
CH_3CO	-	-	-	CH_3 2.03
Res. 1	8.62	5.47	3.13	CH 7.01 CH 7.05 CH 7.05
Res. 2	9.71	5.29	1.68, 2.11	$^{\epsilon}\text{CH}$ 1.68; $^{\zeta}\text{CH}_3$ 0.72, 1.23
Res. 3	10.31	5.67	3.28	CH 7.05 CH 7.08 CH 7.07
Res. 4	9.70	5.93	1.68, 1.96	$^{\epsilon}\text{CH}$ 1.69; $^{\zeta}\text{CH}_3$ 1.02

Conformer 2 (45%)

<i>Residue</i>	<i>HN</i>	^1CH	$^{\delta}\text{CH}$	<i>Others</i>
CH_3CO	-	-	-	CH_3 2.03
Res. 1	8.62	5.47	3.13	CH 7.01 CH 7.05 CH 7.05
Res. 2	9.71	5.25	1.66, 2.07	$^{\epsilon}\text{CH}$ 1.66; $^{\zeta}\text{CH}_3$ 0.68, 1.23
Res. 3	10.48	5.40	3.30	CH 7.07 CH 7.08 CH 7.07
Res. 4	9.61	4.94	1.69, 2.00	$^{\epsilon}\text{CH}$ 1.69; $^{\zeta}\text{CH}_3$ 0.99

Table S3: ^1H NMR chemical shifts for **3** in CD_3OH at 293 K.**Conformer 1 (55%)**

<i>Residue</i>	<i>HN</i>	γ <i>CH</i>	δ <i>CH</i>	<i>Others</i>
CH ₃ CO	-	-	-	CH ₃ 2.03
Res. 1	8.63	5.48	3.13	CH 7.01 CH 7.05 CH 7.05
Res. 2	9.74	5.30	1.69, 2.14	$^{\epsilon}$ CH 1.69; $^{\zeta}$ CH ₃ 0.72, 0.89
Res. 3	10.46	5.59	3.31	CH 7.05 CH 7.07 CH 7.07
Res. 4	10.08	5.28	1.80, 2.05	$^{\epsilon}$ CH 1.31; $^{\zeta}$ CH ₃ 0.80
Res. 5	10.35	5.69	3.29	CH 7.05 CH 7.08 CH 7.07
Res. 6	9.70	5.93	1.98	$^{\epsilon}$ CH 1.66; $^{\zeta}$ CH ₃ 0.90

Conformer 2 (45%)

<i>Residue</i>	<i>HN</i>	γ <i>CH</i>	δ <i>CH</i>	<i>Others</i>
CH ₃ CO	-	-	-	CH ₃ 2.03
Res. 1	8.63	5.48	3.13	CH 7.01 CH 7.05 CH 7.05
Res. 2	9.74	5.30	1.69, 2.14	$^{\epsilon}$ CH 1.69; $^{\zeta}$ CH ₃ 0.72, 0.89
Res. 3	10.46	5.59	3.31	CH 7.05 CH 7.07 CH 7.07
Res. 4	10.08	5.28	1.80, 2.05	$^{\epsilon}$ CH 1.31; $^{\zeta}$ CH ₃ 0.80
Res. 5	10.53	5.39	3.32	CH 7.05 CH 7.08 CH 7.07
Res. 6	9.61	4.94	1.70, 2.00	$^{\epsilon}$ CH 1.02; $^{\zeta}$ CH ₃ 0.89, 0.72

Table S4: Coupling Constants $^3J(\text{NH}, \text{CH})$ of **1**, **2** and **3** at 298 K (in Hz) in CD_3OH . Values for the major conformers are in bleu, while values for minors conformers are in green.

Residue	1 (dimer)	2 (Tetramer)	3 (Hexamer)
Res. 1	5.7	6.1	5.2
	8.1	6.1	5.2
Res. 2	8.1	o	o
	6.9	o	o
Res. 3		4.4	4.8
		6.1	5.2
Res. 4		o	4.1
		6.4	4.1
Res. 5			6.1
			o
Res. 6			5.9
			5.9

o: overlaps.

Table S5: Inter-residue NOEs correlations observed in the ROESY spectrum of **1**, **2** and **3** in CD_3OH at 293 K.

	1 (dimer)	2 (Tetramer)	3 (Hexamer)
Name of the NOE correlation	NOE		
2.HN-1.HG	s	s	s
3.HN-2.HG		s	s
4.HN-3.HG		s	s
5.HN-4.HG			s
6.HN-5.HG			s

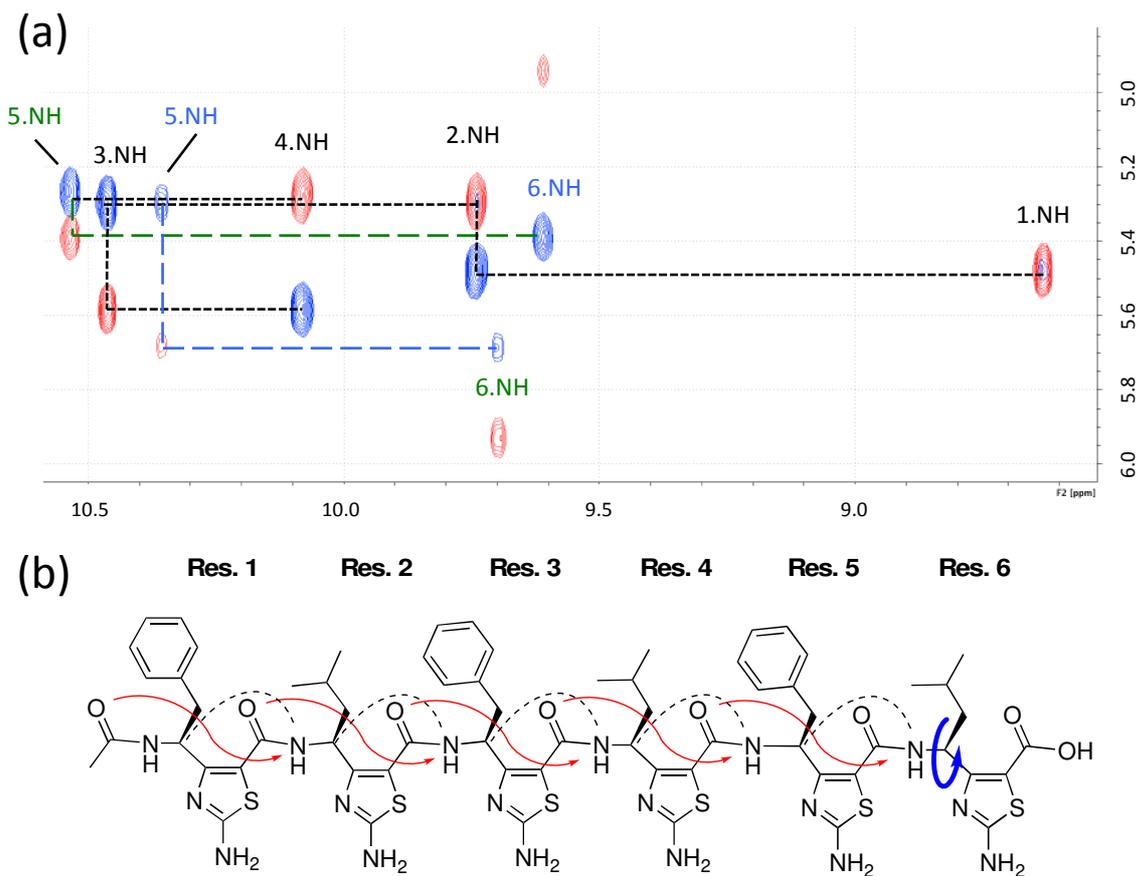


Figure S2. (a) NH/ γ CH region of the TOCSY (in red) and ROESY (in blue) spectra of hexamer **6** recorded in CD₃OH at 293K. Typical strong sequential NOEs HN(i)/ γ CH(i-1) are annotated with dash lines. Two sets of signals are observed for residues 5 and 6. (b) C₉ H-bonding network (red arrows) in accordance with typical inter-residue NOEs pattern (dash lines) along **3**. The blue arrow indicates a conformational variability around the two C-terminus residues.

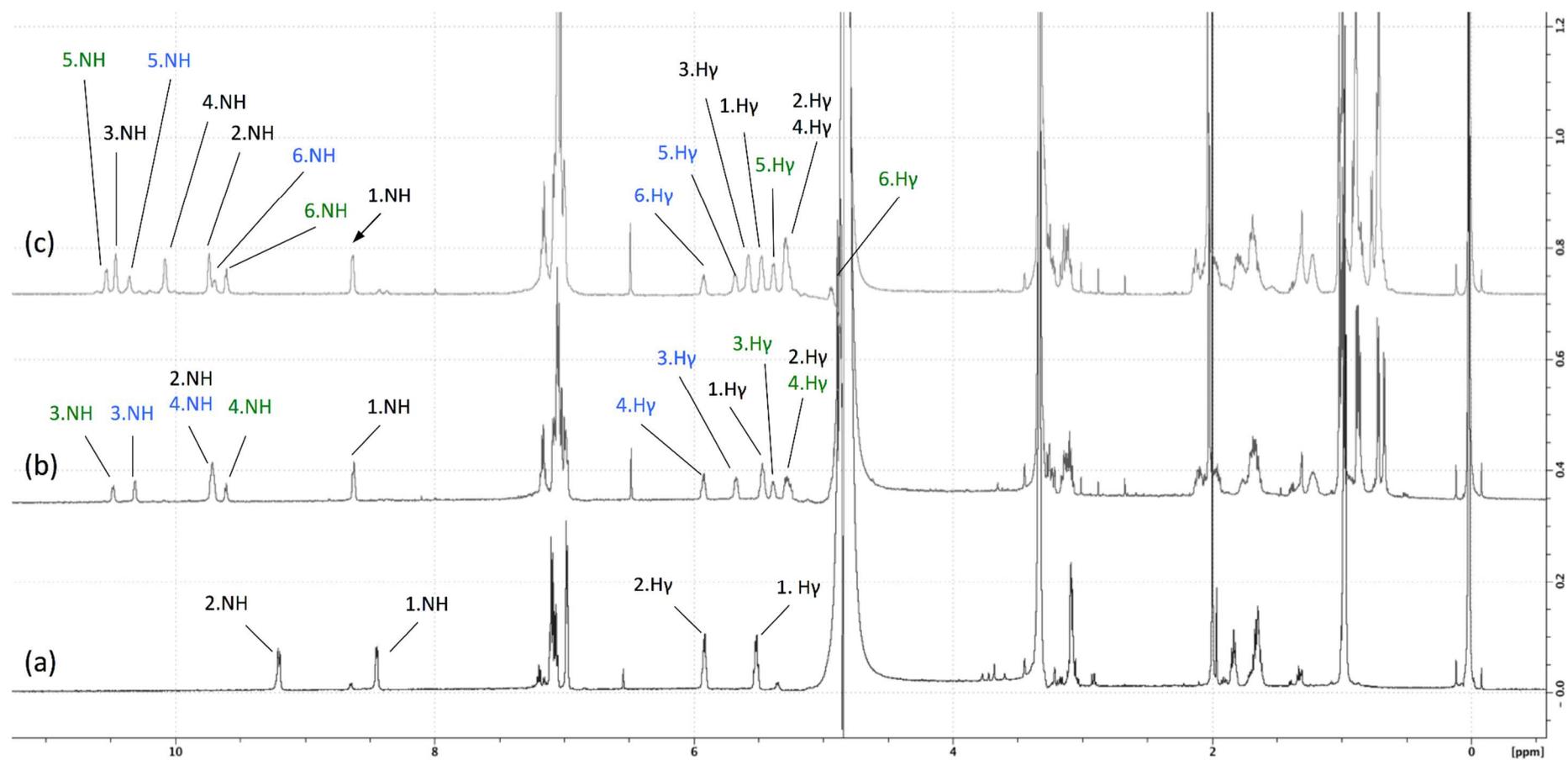


Figure S3: ¹H NMR spectra of the compounds (a) dimer 1, (b) tetramer 2 and (c) hexamer 3 at 298 K in CD₃OH. Major conformers are in blue while minor conformers are in green.

Fluorescence-detected ThT binding Assay ($A\beta_{1-42}$)

$A\beta_{1-42}$ was purchased from American Peptide and ThT was obtained from Sigma. The peptide was dissolved in an aqueous 1% ammonia solution to a concentration of 1 mM and then, just prior to use, was diluted to 0.2 mM with 10 mM Tris-HCl and 100 mM NaCl buffer (pH 7.4). Stock solutions of oligomers were dissolved in DMSO or in water with the final concentration kept constant at 0.5% (v/v). ThT fluorescence was measured to evaluate the development of $A\beta_{1-42}$ fibrils over time using a fluorescence plate reader (Fluostar Optima, BMG labtech) with standard 96-well black microtiter plates (final volume in the wells of 200 μ L). Experiments were started by adding the peptide (final $A\beta_{1-42}$ concentration equal to 10 μ M) into a mixture containing 40 μ M ThT in 10 mM Tris-HCl and 100 mM NaCl buffer (pH 7.4) with and without the foldamers at different concentrations (100, 10, 1 μ M) at room temperature. The ThT fluorescence intensity of each sample (performed in duplicate or triplicate) was recorded with 440/485 nm excitation/emission filters set for 42 h performing a double orbital shaking of 10 s before the first cycle. The fluorescence assays were performed between 2 and 4 times on different days, with the same batch of peptide. The ability of compounds to inhibit $A\beta_{1-42}$ aggregation was assessed considering both the time of the half-aggregation ($t_{1/2}$) and the intensity of the experimental fluorescence plateau (F). The relative increase of $t_{1/2}$ is defined as the experimental $t_{1/2}$ in the presence of the tested compound relative to the one obtained without the compound and is evaluated as the following percentage: $[t_{1/2} (A\beta + \text{compound}) - t_{1/2} (A\beta)] / t_{1/2} (A\beta) \times 100$. The decrease of the experimental plateau is defined as the intensity of experimental fluorescence plateau observed with the tested compound relative to the value obtained without the compound and is evaluated as the following percentage: $(FA\beta + \text{compound} - FA\beta) / FA\beta \times 100$.

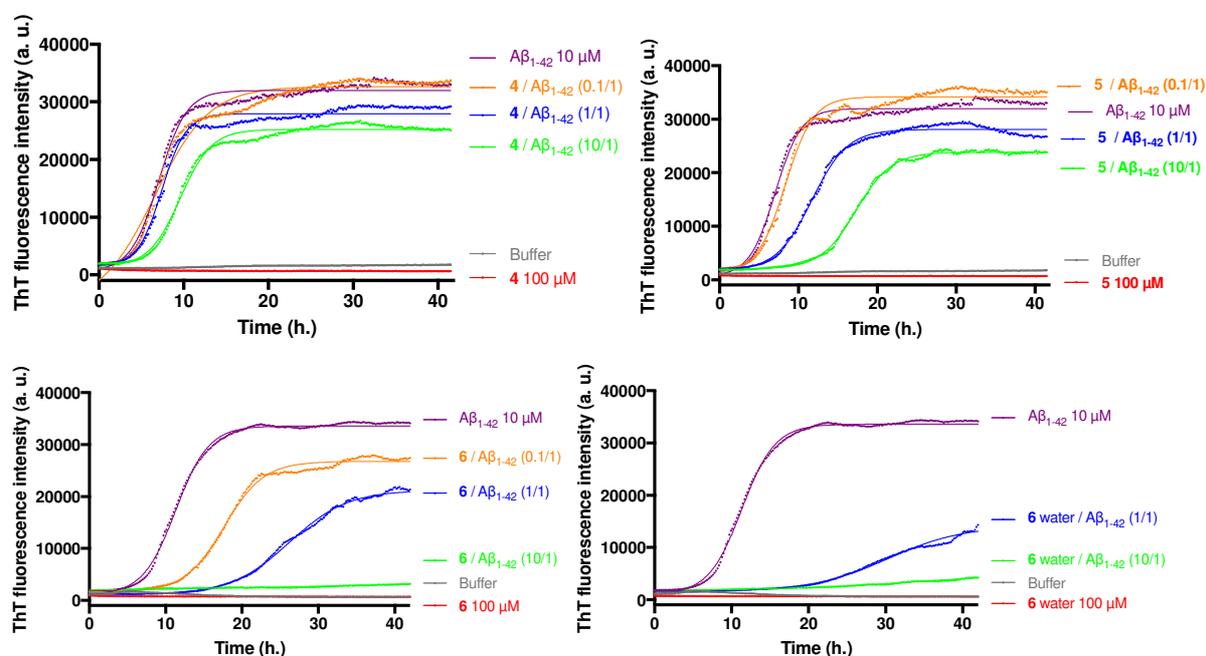
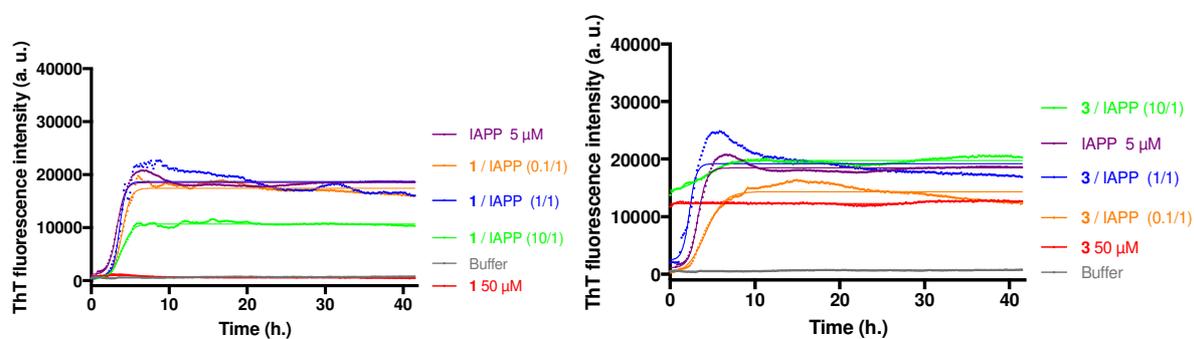


Figure S4. Representative curves of ThT fluorescence assays over time showing $A\beta_{1-42}$ (10 μ M) aggregation in the absence (purple curve) and in the presence of **4**, **5**, **6**, and **6** (water) at compound/ $A\beta_{1-42}$ ratios of 10/1 (green curves), 1/1 (blue curves) and 0.1/1 (yellow curves). The control curves are represented in red lines and buffer in grey.

Fluorescence-detected ThT Binding assay (hIAPP)

IAPP was purchased from Bachem. IAPP was dissolved in pure hexafluoro-isopropanol (HFIP) at a concentration of 1 mM and incubated for 1 hour at room temperature to dissolve any preformed aggregates. Next, HFIP was evaporated with dry nitrogen gas followed by vacuum desiccation for 3 hours. The resulting peptide film was then dissolved in DMSO to obtain stock solutions of hIAPP (0.2 mM). Stock solutions of oligomers were dissolved in DMSO (10, 1 and 0.1 mM). The concentration of DMSO was kept constant at 3% (v/v) in the final volume of 200 μ L. Thioflavin-T binding assays were used to measure the development of fibrils over time. A plate reader (Fluostar Optima, BmgLabtech) and standard 96-wells flat-bottom black microtiter plates in combination with a 440 nm excitation filter and a 485 nm emission filter were used. The ThT assay was started by adding 5 μ L of a 0.2 mM hIAPP stock solution and 1 μ L of stock solutions of compounds to test to a mixture of 10 μ M ThT and 10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl at pH 7.4. The concentration of IAPP was held constant at 5 μ M and foldamers were added to yield compound/IAPP ratios of 10/1, 1/1 and 0.1/1. The ThT assays were performed in triplicate. The ability of compounds to inhibit IAPP aggregation was assessed considering both the time of the half-aggregation ($t_{1/2}$) and the intensity of the experimental fluorescence plateau (F). The relative increase of $t_{1/2}$ is defined as the experimental $t_{1/2}$ in the presence of the tested compound relative to the one obtained without the compound and is evaluated as the following percentage: $[t_{1/2}(\text{hIAPP} + \text{compound}) - t_{1/2}(\text{hIAPP})] / t_{1/2}(\text{hIAPP}) \times 100$. The decrease of the experimental plateau is defined as the intensity of experimental fluorescence plateau observed with the tested compound relative to the value obtained without the compound and is evaluated as the following percentage: $(F_{\text{hIAPP} + \text{compound}} - F_{\text{hIAPP}}) / F_{\text{hIAPP}} \times 100$.



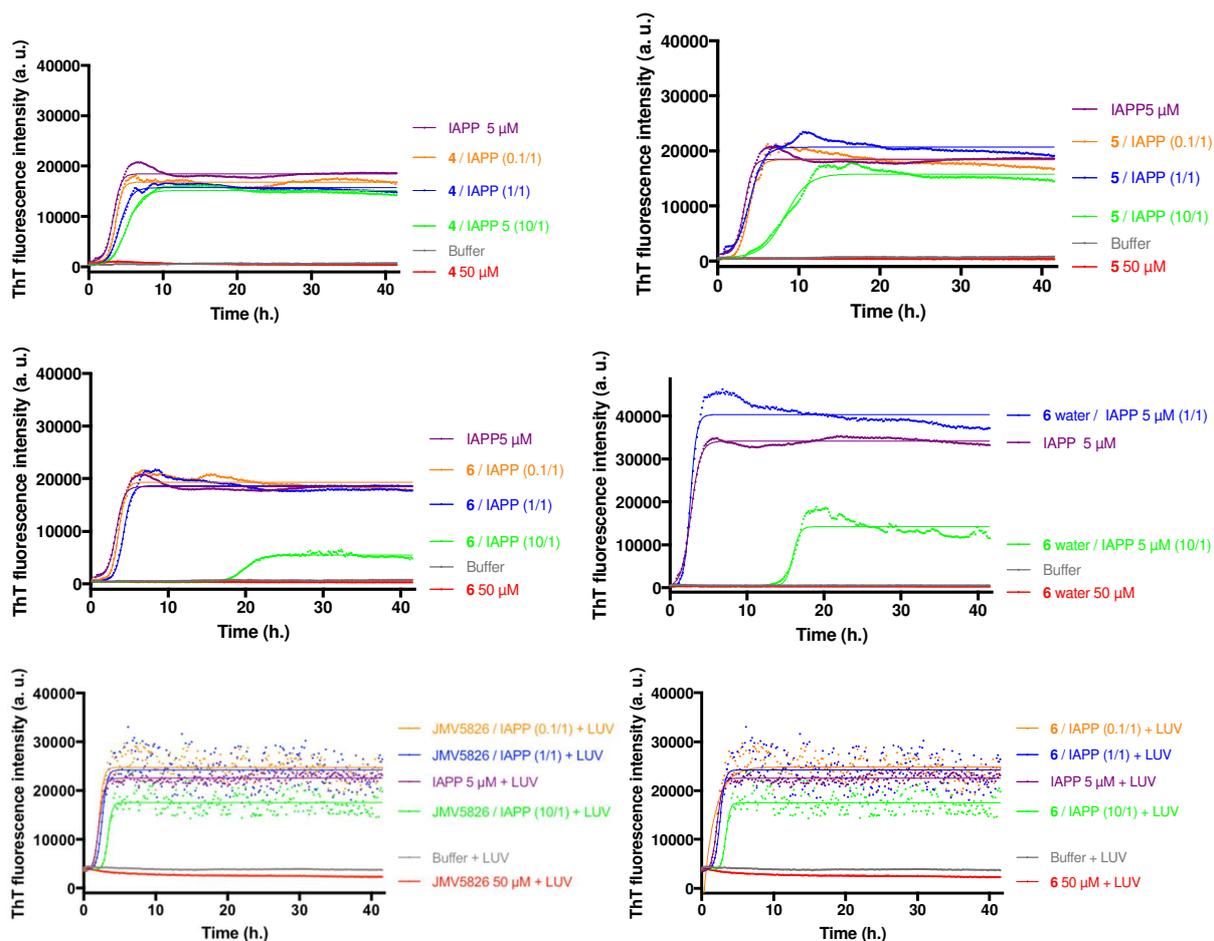


Figure S5. Representative curves of ThT fluorescence assays over time showing hIAPP (5 μ M) aggregation in the absence (purple curve) and in the presence of **1**, **3**, **4**, **5**, **6**, **6** (water) and 6+LUV at compound/hIAPP ratios of 10/1 (green curves), 1/1 (blue curves) and 0.1/1 (yellow curves). The control curves are represented in red lines and buffer in grey.

Transmission Electron Microscopy

A β ₁₋₄₂ experiments. Samples were prepared under the same conditions as those in the ThT-fluorescence assay except that ThT is not added. Aliquots of A β ₁₋₄₂ (10 μ M in 10 mM Tris-HCl and 100 mM NaCl, pH 7.4 in the presence and absence of **6**) were adsorbed onto 300-mesh carbon grids for 2 min, washed, and dried. The samples were negatively stained for 45 s on 2% uranyl acetate in water. After draining off the excess of staining solution and drying, images were obtained using a ZEISS 912 Omega electron microscope operating at an accelerating voltage of 80 kV.

IAPP experiments. Samples were prepared under the same conditions as in the ThT-fluorescence assay. Aliquots of IAPP (5 μ M in 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.4 in the presence and absence of **6**) were adsorbed onto 300-mesh carbon grids for 2 min, washed and dried. The samples were negatively stained for 45 s. on 2 % uranyl acetate in water. After draining off the excess of staining solution and drying, the grids were observed using a JEOL 2100HC TEM operating at 200 kV with a LaB6 filament. Images were recorded in zero-loss mode with a Gif Tridiem energy-filtered-CCD camera equipped with a 2k x 2k pixel-sized chip (Gatan inc., Warrendale, PA). Acquisition was accomplished with the Digital Micrograph software (versions 1.83.842, Gatan inc., Warrendale, PA).

Capillary electrophoresis protocol (A β ₁₋₄₂)

Sample preparation: the commercial A β ₁₋₄₂ was dissolved upon reception in 0.16% NH₄OH (at 2 mg/mL) for 10 minutes at 20°C, followed by an immediate lyophilization. The dried sample was then stored at -20°C until use.

CE-UV experiments were carried out with a P/ACE™ MDQ Capillary Electrophoresis System (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) equipped with a PDA (photodiode array) detector. UV Detection was performed at 190 nm. The prepared sample (as previously described) was dissolved in 20 mM phosphate buffer at pH 7.4, containing DMSO for control or stock solutions of compounds to keep constant the DMSO/phosphate buffer ratio at 2.5%. The final peptide concentration was 100 μ M with a peptide/compound ratio of 1/1. For the CE separation of A β oligomers, it was used a fused silica capillary of 80 cm (10.2 cm to the detector) with an internal diameter of 50 μ m. The buffer separation solution was a 80 mM phosphate buffer at pH 7.4. The separation was carried out under -20 kV and constant temperature at 25°C. The samples were injected by hydrodynamic injection at 0.5 psi for 10 s. After each run, the capillary was rinsed for 3.5 min with NaOH 1 M, 3.5 min with water, 1 min with DMSO 10 % and 1 min with SDS 50 mM.

Capillary electrophoresis protocol (hIAPP)

Sample preparation: the commercial hIAPP was dissolved upon reception in pure HFIP at 1 mM and incubated for 1 hour at room temperature, followed by an aliquoting and an immediate evaporation under nitrogen flow, then vacuum and storage at -20°C. Just before each kinetics, the dried peptide was reconstituted in 50 mM ammonium acetate buffer pH 3.7 at 100 μ M. **6** was dissolved in DMSO and added to the peptide solution to reach 100 μ M.

CE-UV experiments were carried out with a MDQ Instrument (SCIEX, Framingham, MA, USA) equipped with a UV detector. Detection was performed at 200 nm. Bare fused silica capillaries (50 μm id x 365 μm od) were purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). Silica capillaries were coated with a 0.2% polybrene solution. Briefly, solid polybrene was dissolved in water under heating at 50°C. Bare fused silica capillary was preconditioned with MeOH, NaOH 1M, NaOH 0.1M and with H₂O for in-between rinsing. All flushings were done at 20 psi for 15 min. The capillary was then coated with the 0.2% polybrene solution for 15 min at 20 psi. The coated capillary was then flushed with the background electrolyte (BGE) at 20 psi for 45 min and equilibrated under -25 kV for 2 hours. Polybrene capillaries were 60 cm total length (49.8 cm to the detector). The BGE was a 50 mM ammonium acetate buffer, pH 3.7. The separation was carried out under -25 kV at 25°C. The sample was injected from the inlet by hydrodynamic injection at 0.8 psi for 10 s. After each run, the capillary was rinsed for 5 min with 1 M NaOH, 5 min with water, recoated for 10 min with 0.2% polybrene, and finally equilibrated with the running buffer for 5 min at 20 psi.

ESI-IMS-MS experiments were carried out with a Synapt G2-SⁱQ-TOF instrument (Waters, Milford, MA, USA) equipped with a ESI interface. Positive ion mode was used. The instrument has a traveling-wave IMS device situated between the quadrupole and the TOF analyzers. Samples of hIAPP (as previously described for the CE-UV experiments) were injected by direct infusion through a syringe at 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Main IMS-MS parameters are detailed the following: the capillary voltage was set at 2.4 kV, with the sampling cone and source offset at 70V. Source and desolvation temperatures were respectively 40 °C and 75°C. Data were processed with MassLynx and Driftscope.

Strong oligomers dissociation has been observed with this technique. For more details, see chapter IV of this thesis manuscript, part 2.2.

References

- [1] L. Mathieu, C. Bonnel, N.Masurier, L. T. Maillard, J. Martinez, V. Lisowski, *Eur. J. Org. Chem.*, 2015, 2262-2270
- [2] D. Yang, Y. L. Yan, B. Lui, *The journal of organic chemistry*, 2002, 67, 7429-7431

Références bibliographiques – Annexes

- Doherty, E. A. S., Meagher, R. J., Albarghouthi, M. N., & Barron, A. E. (2003). Microchannel wall coatings for protein separations by capillary and chip electrophoresis. *ELECTROPHORESIS*, *24*(1-2), 34–54. <https://doi.org/10.1002/elps.200390029>
- Hong, P., Koza, S., & Bouvier, E. S. P. (2012). Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, *35*(20), 2923–2950. <https://doi.org/10.1080/10826076.2012.743724>
- Lucy, C. A., MacDonald, A. M., & Gulcev, M. D. (2008). Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, *1184*(1), 81–105. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.114>
- McCormick, R. M. (1988). Capillary Zone Electrophoretic Separation of Peptides and Proteins Using Low pH Buffers in Modified Silica Capillaries. *Analytical Chemistry*, *60*(21), 2322–2328. <https://doi.org/10.1021/ac00172a003>
- Menon, M. K., & Zydney, A. L. (1998). Measurement of Protein Charge and Ion Binding Using Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, *70*(8), 1581–1584. <https://doi.org/10.1021/ac970902r>
- Nehmé, R., Perrin, C., Cottet, H., Blanchin, M. D., & Fabre, H. (2008). Influence of polyelectrolyte coating conditions on capillary coating stability and separation efficiency in capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS*, *29*(14), 3013–3023. <https://doi.org/10.1002/elps.200700886>
- O'Callaghan, D. M., Donnelly, W. J., Slattery, H. M., & Mulvihill, D. M. (1995). Non-size exclusion effects during gel permeation chromatography of milk protein hydrolysates on an fplc superose 12 column. *Journal of Liquid Chromatography*, *18*(8), 1543–1562. <https://doi.org/10.1080/10826079508009294>
- Rabiller-Baudry, M., & Chaufer, B. (2001). Specific adsorption of phosphate ions on proteins evidenced by capillary electrophoresis and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, *753*(1), 67–77. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/11302449>
- Rodriguez, I., & Li, S. F. Y. (1999). Surface deactivation in protein and peptide analysis by capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, *383*(1), 1–26. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00485-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00485-1)
- Ross, D., Gaitan, M., & Locascio, L. E. (2001). Temperature Measurement in Microfluidic Systems Using a Temperature-Dependent Fluorescent Dye. *Analytical Chemistry*, *73*(17), 4117–4123. <https://doi.org/10.1021/ac010370l>
- Stutz, H. (2009). Protein attachment onto silica surfaces – a survey of molecular fundamentals, resulting effects and novel preventive strategies in CE. *ELECTROPHORESIS*, *30*(12), 2032–2061. <https://doi.org/10.1002/elps.200900015>
- Stutz, H., Bordin, G., & Rodriguez, A. R. (2003). Separation of selected metal-binding proteins with capillary zone electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, *477*(1), 1–19. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)01403-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)01403-4)

Tantipolphan, R., Romeijn, S., Engelsman, J. den, Torosantucci, R., Rasmussen, T., & Jiskoot, W. (2010). Elution behavior of insulin on high-performance size exclusion chromatography at neutral pH. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52(2), 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.01.014>

Yu, C.-M., Mun, S., & Wang, N.-H. L. (2008). Phenomena of insulin peak fronting in size exclusion chromatography and strategies to reduce fronting. *Journal of Chromatography A*, 1192(1), 121–129. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.03.055>

Titre : Développement de techniques physiques et chimiques pour l'étude et l'inhibition de l'oligomérisation et l'agrégation de hIAPP : intérêt dans le diabète de type 2

Mots clés : hIAPP – Amyloïde – Agrégation – Diabète de type 2

Résumé : La prévalence croissante du diabète de type II et les risques cardiovasculaires associés, sont maintenant considérés comme un enjeu majeur de santé publique. L'agrégation du polypeptide amyloïde humain des îlots (hIAPP) est liée à une dégénérescence des cellules β pancréatiques et à la pathogénèse du diabète de type II. Le mécanisme de la toxicité de hIAPP et la nature des espèces concernées (oligomères et/ou fibres) sont loin d'être élucidés, bien que de récentes études ont montré que les oligomères formés lors des étapes précoces du processus pourraient être les plus toxiques. Très peu de techniques permettent à l'heure actuelle de suivre cette oligomérisation en temps réel et d'évaluer des inhibiteurs de ce processus pathologique. Au cours de cette thèse, nous avons exploré la CE et l'IMS-MS comme techniques permettant de suivre l'oligomérisation de hIAPP *in vitro* en temps réel. Une méthode de CE a été développée, permettant d'évaluer de nouveaux inhibiteurs envers cette oligomérisation. Une méthode d'IMS-MS a également été développée pour décrire les interactions formées entre hIAPP et un inhibiteur. Des inhibiteurs peptidomimétiques ont été rationnellement conçus et synthétisés afin de déstabiliser les structures β formées lors de l'oligomérisation de hIAPP. L'évaluation de ces composés a permis de mettre en évidence la relation entre leurs structures et leurs activités inhibitrices. Des études de viabilité cellulaire sont en cours afin d'améliorer la compréhension de l'activité de ces molécules.

Title: Development of physical and chemical techniques for the study and the inhibition of IAPP oligomerization and fibrillization: interest in type II diabetes

Keywords: hIAPP – Amyloid – Agregation – Type 2 diabetes

Abstract: The rising prevalence of type II diabetes, and associated adverse cardiovascular risks, is now considered as a major public health challenge. The aggregation of human islet amyloid polypeptide (hIAPP) is linked to beta-cell degeneration and to the pathogenesis of type II diabetes. The mechanism of hIAPP toxicity and the species involved (oligomers and/or fibrils) are far to be elucidated, although recent studies have shown that early formed species could be the most toxic species. Very few techniques are currently available to monitor in real time this oligomerization and to evaluate inhibitors of this pathological process. During this PhD project, we investigated CE and IMS-MS as potential techniques to monitor *in vitro* and in real time the oligomerization of hIAPP. A CE-UV method has been developed, which allows the activity evaluation of new inhibitors. An IMS-MS method has also been developed to investigate the interactions formed between hIAPP and the inhibitors. Peptidomimetics inhibitors have been rationally designed and synthesized in order to destabilize β -sheets structures formed during the oligomerization process of hIAPP. The evaluation of those compounds revealed a relation between their structures and their inhibitory activities. Cellular viability tests are on-going to get more insights on those molecules activity.